

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**PERFIL QUÍMICO DE *Glandularia selloi* (Spreng.) Tronc. (VERBENACEAE) DE
OCORRÊNCIA NO RIO GRANDE DO SUL**

LUANA CHRISTINE COMERLATO

PORTO ALEGRE, 2014

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**PERFIL QUÍMICO DE *Glandularia selloi* (Spreng.) Tronc. (VERBENACEAE) DE
OCORRÊNCIA NO RIO GRANDE DO SUL**

Dissertação apresentada por Luana Christine
Comerlato para obtenção do TÍTULO DE
MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Dr. José Ângelo S. Zuanazzi

PORTO ALEGRE, 2014

Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 29 de Agosto de 2014, pela banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Miriam Anders Apel
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Eduardo Luis Konrath
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Sérgio Augusto de Loreto Bordignon
Centro Universitário La Salle

CIP - Catalogação na Publicação

Comerlato, Luana Christine
PERFIL QUÍMICO DE *Glandularia selloi* (Spreng.)
Tronc. (VERBENACEAE) DE OCORRÊNCIA NO RIO GRANDE DO
SUL / Luana Christine Comerlato. -- 2014.
112 f.

Orientador: José Ângelo Silveira Zuanazzi.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto
Alegre, BR-RS, 2014.

1. Verbenaceae. 2. *Glandularia selloi*. 3.
Flavonoides. 4. Iridoides. 5. Feniletanoides. I.
Zuanazzi, José Ângelo Silveira, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Farmacognosia do Departamento de Produção de Matéria-Prima e Central Analítica da Faculdade de Farmácia da UFRGS e Departamento de Química no campus do Vale da UFRGS. Laboratório de Microbiologia da Universidade Feevale. O autor recebeu bolsa de estudos CAPES e o trabalho foi financiado pela CAPES, CNPq e FAPERGS.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que em todas dificuldades durante esta jornada, me guiou e colocou no meu caminho pessoas generosas que contribuíram para a realização desse trabalho.

Aos meus pais, por todo apoio, amor e incentivo.

Ao Prof. Dr. José Ângelo S. Zuanazzi pela oportunidade, apoio e contribuição científica.

Este trabalho não poderia ter sido concebido sem a contribuição da Prof^a. Dr^a. Gilsane Lino von Poser. À você querida mestre, minha admiração, carinho, amizade e eterno agradecimento pela contribuição pessoal e científica.

À Prof^a. Dr^a. Márcia Vignoli, minha admiração, amizade e meu agradecimento pela contribuição científica.

À Dr^a. Ana Luiza Ziulkoski, meu carinho e agradecimento pelo apoio, oportunidade e confiança e a Luciana R. Figueiró pela dedicação, apoio e contribuição científica.

À minha querida Prof^a. Dr^a. Elfrides E. Schapoval, minha admiração, gratidão pelo carinho e atenção que disponibilizou durante sua disciplina.

Às minhas queridas e amáveis Controlet's, Luíza A. Frank, Bruna Medeiros, Marina Nemitz, Sara Bianchi, Letícia Lucca e Michele Rambo, agradeço à vocês por todo apoio, carinho e ajuda.

Às minhas amigas Marcella Vilaverde Diello e Michele Rambo, meu carinho, amizade, admiração e eterno agradecimento por toda ajuda neste trabalho, pelas inúmeras risadas que tornaram dias difíceis em leves e inesquecíveis.

Aos professores do curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelo aprendizado e atenção.

Aos colegas e professores do Laboratório de Farmacognosia pela ajuda, à Grazielle Ramos pela orientação, ajuda e contribuição científica.

Aos colegas de Laboratório de Farmacognosia, Gari Ccapatinta especialmente pela ajuda nos espectros de RMN, Fernando Cidade Torres, Gabriela Meirelles, Henrique Bridi pela ajuda, momentos de descontração e apoio.

Aos funcionários da Faculdade de Farmácia da UFRGS pela ajuda e atenção.

Somos a soma das nossas decisões.

Woody Allen

RESUMO

O gênero *Glandularia* (Verbenaceae) é constituído por cerca de 80 espécies que ocorrem em regiões subtropicais e temperadas da América do Sul e América do Norte, com uma distribuição disjunta. No Sul do Brasil, encontra-se a espécie *Glandularia selloi* (Spreng.) Tronc., que não apresenta utilização medicinal descrita na literatura assim como não há relatos de estudos sobre a sua composição química. No entanto, a investigação do potencial químico da espécie torna-se importante como uma interessante fonte para a descoberta de novas substâncias ativas a partir de produtos naturais. O objetivo deste estudo foi investigar os principais metabólitos de *Glandularia selloi* nativa do Rio Grande do Sul. Para os experimentos foram coletados material na cidade de Osório, RS – Brasil, sendo posteriormente seco em temperatura ambiente, separado em raízes, caules, folhas e inflorescência, pulverizados em moinho de facas e submetido a maceração com metanol. Foram realizadas análises com CLAE-DAD, CLUE-EM visando caracterizar os extratos. Compostos obtidos através de cromatografia de coluna de sílica gel foram analisados por RMN ¹H e RMN ¹³C. As análises permitiram identificar quatro compostos sendo eles: verbascosídeo, crisoeriol diglicosilado e diacetilado, crisoeriol diglicosilado e monoacetilado e 6-OH-β-ipolamida. Realizou-se também ensaio de citotoxicidade com extratos metanólicos de raízes, caules, folhas e inflorescência de *Glandularia selloi*, onde se observou efeito citotóxico em todos os extratos.

Palavras-chaves: *Glandularia selloi*, verbascosídeo, crisoeriol diglicosilado e diacetilada, crisoeriol diglicosilada e monoacetilada e 6-OH-β-ipolamida.

ABSTRACT

The *Glandularia* genus (Verbenaceae) comprises about 80 species occurring in subtropical and temperate regions of South America and North America, with a disjunct distribution. In the southern regions of Brazil, the *Glandularia selloi* (Spreng.) Tronc. species can be found, which has no medical uses described in literature and no reports on its chemical composition have been found either. However, investigation of the chemical potential of this species becomes important as a strategy to discover new active substances from natural products. The aim of this study was to investigate the main metabolites of a native species from Rio Grande do Sul, *Glandularia selloi*. Botanical samples for experiments were collected in the city of Osório, RS - Brazil, and subsequently dried separated by parts, crushed and subjected to methanol maceration. Analysis by HPLC-PDA, UPLC-MS were performed aiming to characterize the extracts. Isolated compounds obtained through column chromatography on silica gel were analyzed by ^1H and ^{13}C NMR. These analyses allowed the identification of four compounds: verbascoside, diglycosylated and diacetylated crysoeriol, diglycosylated and monoacetylated crysoeriol and 6- β -OH-hydroxyipolamiide. Further assays also were carried out to investigate the cytotoxicity of the species and it was observed that the methanolic extracts of all *Glandularia selloi* parts were cytotoxic species.

Keywords: *Glandularia selloi*, verbascoside, diglycosylated and diacetylated crysoeriol, diglycosylated and monoacetylated crysoeriol and 6- β -OH-hydroxyipolamiide.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. <i>Glandularia selloi</i> (Spreng.) Tronc.....	37
FIGURA 2. Núcleo fundamental dos flavonoides e sua numeração.....	39
FIGURA 3. Estrutura do Iridano.....	41
FIGURA 4. Clivagem dos anéis e seus derivados.....	42
FIGURA 5. Espectro de UV do pico majoritário dos extratos metanólicos de raízes, caules, folhas e inflorescência de <i>Glandularia selloi</i> analisados.....	61
FIGURA 6. Perfil cromatográfico do padrão de verbascosídeo.....	62
FIGURA 7. Cromatogramas dos extratos metanólicos de raízes, caules, folhas e inflorescência de <i>Glandularia selloi</i> e Padrão de verbascosídeo.....	63
FIGURA 8. Cromatogramas dos extratos metanólicos de raízes, caules, folhas e inflorescência de <i>Glandularia selloi</i> e espectro do pico com t_r 7,2 minutos.....	64
FIGURA 9. Cromatogramas dos extratos metanólicos de raízes, caules, folhas e inflorescência de <i>Glandularia selloi</i> e espectro do pico com t_r médio de 12,1 minutos.....	66
FIGURA 10. Cromatogramas dos extratos metanólicos de raízes, caules, folhas e inflorescência de <i>Glandularia selloi</i> e espectro do pico com t_r 13,7 de minutos.....	67
FIGURA 11. Espectro de RMN ^1H para a substância isolada, verbascosídeo	69

FIGURA 12. Estrutura verbascosídeo.....	71
FIGURA 13. Estrutura do crisoeriol.....	73
FIGURA 14. Sub-estrutura do composto 3	75
FIGURA 15. Estrutura de 6 β - OH – ipolamiida	77
FIGURA 16. Comparação entre os valores de viabilidade celular pelo teste do MTT e VN em células Vero expostas a (0,01; 0,1; 1; 10 e 100 μ g/mL) por 24 horas dos extratos de raízes, caules, folhas e inflorescências de <i>Glandularia selloi</i>	79
FIGURA 17. Morfologia de células vero expostas aos extratos aquosos das partes de <i>Glandularia selloi</i> por 24 h	80

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Sistema gradiente utilizado para análise do perfil cromatográfico em CLAE-DAD dos extratos de raízes, caules, folhas e inflorescência de <i>Glandularia selloi</i>	53
TABELA 2. Sistema gradiente para CLUE-EM para análise dos compostos 2 e 4 isolados de extrato metanólico de folhas e caules de <i>Glandularia selloi</i>	54
TABELA 3. Comparação de dados de RMN ¹³ C do composto 2 com os descritos na literatura para crisoeriol.....	72
TABELA 4. Comparação de dados de RMN ¹³ C do composto 3 com os descritos na literatura para crisoeriol.....	74
TABELA 5. Correlação heteronuclear de RMN ¹ H e ¹³ C (HSQC e HMBC) do composto.....	75
TABELA 6. Comparação de dados de RMN ¹³ C do composto 4 com os descritos na literatura para 6β-OH-ipolamiida.....	76

LISTA DE QUADROS

- QUADRO 1.** Feniletanoides dissacarídeos com α -L-ramnose ligado ao C3' da glicose 45
- QUADRO 2.** Comparação dos valores de RMN ^1H obtidos para o composto 1 e valores encontrados na literatura para verbascosídeo..... 70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA- Análise de Variância

CC – Cromatografia em Coluna

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CLAE-DAD – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diódos

CLUE-EM - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplado à espectrometria de massas

DMSO – Dimetil Sulfóxido

EM – Espectro de massas

MTT - brometo de 3 - (4,5 dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difenil tetrazólio

RMN ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio 1

RMN ¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

VN – Vermelho neutro

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	26
1 OBJETIVOS	32
1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
2 REVISÃO DA LITERATURA	36
2.1 ASPECTOS BOTÂNICOS	36
2.1.1 Família Verbenaceae	36
2.1.2 Gênero <i>Glandularia</i> J.F.Gmel.	36
2.1.3 <i>Glandularia selloi</i> (Spreng.) Tronc.36	37
2.2 ASPECTOS QUÍMICOS	39
2.2.1 Flavonoides	39
2.2.2 Iridoides	41
2.2.3 Feniletanoides	43
2.3 ASPECTOS FARMACOLÓGICOS	46
2.3.1 Flavonoides	46
2.3.2 Iridoides	47
2.3.3 Feniletanoides	47
2.4 CITOTOXICIDADE	48
3 MATERIAIS E MÉTODOS	52
3.1 MATERIAIS	52
3.1.1 Solventes em geral	52
3.1.2 Reagentes específicos e Padrões	52
3.1.3 Cromatografia em camada delgada (CCD)	52
3.1.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	52
3.1.5 Espectroscopia de RMN ¹ H e RMN ¹³ C	53
3.1.6 Cromatografia de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE-EM)	53
3.2 MÉTODOS	54
3.2.1 Coleta da amostra	54
3.2.2 Preparação do material vegetal	54

3.2.3 Isolamento dos compostos	54
3.2.4 Ensaios de Citotoxicidade	55
4 RESULTADOS	55
4.1 PERFIL CROMATOGRÁFICO	61
4.2 ESCOLHA DAS FRAÇÕES DA CROMATOGRAFIA EM COLUNA DO EXTRATO DAS FOLHAS E CAULES.....	65
4.3 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS	68
4.3.1 Composto 1	68
4.3.2 Composto 2	71
4.3.3 Composto 3	73
4.3.4 Composto 4	76
4.4 CITOTOXICIDADE	77
DISCUSSÃO GERAL	83
CONCLUSÕES	90
REFERÊNCIAS	94
ANEXOS	107

A utilização de plantas medicinais com propriedades terapêuticas vem de tempos imemoráveis. Por um longo tempo, os produtos minerais, vegetais e animais foram as principais fontes de drogas (BAQUAR, 1995; RATES, 2001; TADEG *et al.*, 2005;). Sabe-se que cerca de 25% dos fármacos utilizados são de origem vegetal e 50% de origem sintética que possuem relação química com os princípios isolados de plantas medicinais (SILVA e CECHINEL, 2002).

Contudo, dos 252 fármacos considerados essenciais pela Organização Mundial de Saúde (OMS), 11% são exclusivamente de origem vegetal. A morfina, alcaloide isolado de *Papaver somniferum* L. empregado no tratamento de dor intensa, assim como os ginkolídeos, produzidos por *Ginkgo biloba* L., com propriedades anti-trombóticas constituem exemplos de compostos com aplicações terapêuticas (HARVEY, 2000; RATES, 2001; BARREIRO e BOLZANI, 2009).

O Brasil é um dos líderes mundiais em biodiversidade, e dados de 2014 relatam 45804 espécies para a flora brasileira, sendo 4677 de Algas, 32701 de Angiospermas, 1536 de Briófitas, 5637 de Fungos, 30 de Gimnospermas e 1233 de Samambaias e Licófitas (LISTA DE ESPÉCIES DA FLORA DO BRASIL, 2014).

O aumento na identificação de produtos com possível utilização econômica ou terapêutica é diretamente proporcional ao aumento do conhecimento sobre a riqueza de espécies. No entanto, os cientistas estimam que a Terra hospede entre 5 e 30 milhões de espécies, sendo apenas cerca de 1,5 milhão descritas até o momento (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

O interesse crescente por terapias alternativas e pelo uso terapêutico de produtos naturais, especialmente os derivados de plantas, aumentou nos últimos anos (HAMSAR e MZATON, 2012). A procura por produtos de origem vegetal deve-se a inúmeras razões, como por exemplo, a terapia ineficaz e efeitos colaterais gerados pela medicina convencional, assim como a falta de acesso ao tratamento farmacológico convencional pela população (RATES, 2001).

Inseridas na medicina popular estão algumas espécies da família Verbenaceae (CALVO *et al.*, 1998; DELAPORTE *et al.*, 2002; COSTA *et al.*, 2003; CALVO, 2006; PENIDO *et al.*, 2006; AHMAD *et al.*, 2009; OKOYE *et al.*, 2010; CONCEIÇÃO *et al.*, 2012; BLANCO *et al.*, 2013; FERRAZ *et al.*, 2013). A família é amplamente representada em regiões temperadas, tropicais e subtropicais da América do Norte, Central e do Sul, África e Índia (SANDERS, 2001; PERALTA e MÚLGURA, 2011), compreendendo 34 gêneros e 1200 espécies (ATIKNS, 2004). Para o Brasil são reconhecidos 16 gêneros e 295 espécies nativas, sendo destas 198 endêmicas (SALIMENA *et al.*, 2013).

Economicamente, alguns táxons nativos de Verbenaceae são utilizados para inúmeros fins medicinais como, por exemplo, *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc., planta aromática, popularmente chamada de "erva-de-santa", "erva-de-nossa-senhora" e "garupá", entre outros nomes. As partes aéreas dessa espécie são utilizadas para o tratamento de cefaleia, bronquite, depressão, distúrbios do sistema nervoso e digestivo (ZENI *et al.*, 2011). Os compostos químicos encontrados neste táxon são flavonoides, feniletanoides (SILVA *et al.*, 2006), sesquiterpenos e triterpenos (ZENI *et al.*, 2011).

As folhas de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br., espécie conhecida popularmente no Brasil como cidreira, são usadas na forma de infusão para tratar hipertensão, distúrbios do sistema nervoso e digestivo, tosse e bronquite. Os constituintes presentes no óleo volátil de *L. alba* são monoterpenos como citral, linalol, cariofileno, carvona e mirceno. Destaca-se também nesta espécie a presença de iridoídeos (von POSER *et al.*, 1997), feniletanoides (BARBOSA *et al.*, 2006) e flavonoides glicosídeos do grupo das flavonas (HENNEBELLE *et al.*, 2006).

Verbena officinalis L. é citada na medicina tradicional de vários países. Um estudo etnobotânico realizado em Navarra (região norte Ibérica) por Akerreta, Cavero e Calvo (2007), indicou 175 utilizações diferentes, pertencentes a 9 categorias terapêuticas e está listada na Farmacopeia Chinesa e na Farmacopeia Britânica. Vários estudos científicos têm demonstrado os efeitos anti-inflamatório (CALVO *et al.*, 1998; DEEPAK e HANDA, 2000), antibacteriano (HERNÁNDEZ *et al.*, 2000), neuroprotetor (LAI *et al.*, 2006), analgésico (CALVO, 2006), antifúngico e

antioxidante (BILIA *et al.*, 2008; CASANOVA *et al.*, 2008) desta planta. Os principais componentes químicos de *V. officinalis* são iridoides, feniletanoides, flavonoides e terpenoides (CALVO *et al.*, 1998; DEEPAK e HANDA, 2000; BILIA *et al.*, 2008). Vários iridoides glicosídeos foram isolados de algumas espécies de *Verbena*, identificados como os iridoides verbalina, hastatosideo e pulchelosideo I e II (CHEYMOL, 1937; DAMTOFT *et al.*, 1979; MILZ e RIMPLER, 1978a e 1978b).

Neste contexto o gênero *Glandularia* J.F. Gmel. se destaca, visto que, em 1974 era considerado como uma seção do gênero *Verbena* L. No entanto, *Glandularia* e *Verbena* ainda apresentam problemas de circunscrição, nesse caso, possuem características em comum, sendo difícil distingui-los morfológicamente (THODE e MENTZ, 2010).

Estudos etnofarmacológicos realizados na “*Sierra de Comechingones*”, Argentina, por Goleniowski e colaboradores (2006) revelou que as folhas da espécie *Glandularia platensis* (Spreng.) são utilizadas como contraceptivo e as folhas da espécie *Glandularia peruviana* (L.) Small são usadas como antiespasmótico. Entretanto, a composição química deste gênero, é desconhecida, carecendo de estudos nesta área.

Dessa forma, a utilização de produtos naturais como uma estratégia bem sucedida para a descoberta de novos fármacos, assim como a importância de estudos que ampliem o conhecimento sobre a família Verbenaceae, surge o interesse pelo desenvolvimento do estudo químico de *Glandularia selloi*.

1 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal deste trabalho é a identificação do complexo químico presente em *Glandularia selloi* (Spreng.) Tronc. (Verbenaceae), assim como verificar a citotoxicidade dos seus extratos metanólicos de raízes, caules, folhas e inflorescência.

1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterização do complexo químico de *Glandularia selloi* utilizando:

- RMN ¹H e RMN ¹³C;
- Espectrometria de massas;
- Espectrofotometria no UV-visível.

Determinação da citotoxicidade utilizando células Vero

- Teste de viabilidade de linhagem celular pela redução do sal de MTT
- Ensaio de citotoxicidade vermelho neutro

A revisão bibliográfica foi realizada nas seguintes bases de dados: ScienceDirect (1930-2013), WEB OF SCIENCE, BIOLOGICAL ABSTRACT, PubMed (1945-2013), MEDLINE (1940-2013), Wiley (1930-2013). Estudos químicos, biológicos e farmacológicos referentes a *Glandularia selloi* não foram encontrados, entretanto, existem alguns estudos com espécies de *Verbena*, assim como com outros táxons da família Verbenaceae.

2.1 ASPECTOS BOTÂNICOS

2.1.1 Família Verbenaceae

A família Verbenaceae é formada por pequenas árvores, arbustos, cipós e ervas, pertence à ordem Lamiales e tem sofrido diversas alterações em sua circunscrição, estando proximamente relacionada à Lamiaceae (STEVENS, 2008). Atualmente a família é considerada um grupo monofilético, com a passagem de alguns de seus gêneros para Lamiaceae ou para outras famílias (WAGSTAFF e OLMSTEAD, 1997).

2.1.2 Gênero *Glandularia* J.F.Gmel.

Segundo Thode e Mentz (2010) o gênero *Glandularia* foi descrito em 1796, por Johann Friedrich Gmelin, mas foi posteriormente considerado como uma das seções de *Verbena* L. por outros autores (Schauer 1847; Bentham e Hooker 1876; Briquet 1895). Em 1847, Schauer dividiu *Verbena* em duas seções, baseado na presença de apêndice no conetivo das anteras. *Glandularia* voltou a ser considerado como um gênero distinto de *Verbena*, somente em 1933, por Small. Em 1944, Schnack e Covas contribuíram com informações sobre caracteres morfológicos e anatômicos, sustentando a circunscrição do gênero.

O gênero *Glandularia* J.F. Gmel. (Verbeneae) reúne cerca de 80 espécies distribuídas nas regiões subtropicais e temperadas da América do Sul e América do

Norte, estendendo-se desde o sul do Canadá até o norte da Patagônia, com distribuição disjunta (THODE e MENTZ, 2010).

Das 33 espécies de *Glandularia* que ocorrem no território nacional, 27 espécies ocorrem no Rio Grande do Sul, a citar: *Glandularia aristigera* (S. Moore) Tronc., *Glandularia catharinae* (Moldenke) O'Leary & P. Peralta, *Glandularia corymbosa* (Ruiz & Pav.) O'Leary & P. Peralta, *Glandularia guaibensis* P. Peralta & Thode, *Glandularia guaranitica* Tronc., *Glandularia hasslerana* (Briq.) Tronc., *Glandularia herteri* (Moldenke) Tronc., *Glandularia humifusa* (Cham.) Botta, *Glandularia jordanensis* (Moldenke) O'Leary & P. Peralta, *Glandularia lobata* (Vell.) P. Peralta & Thode, *Glandularia marrubioides* (Cham.) Tronc., *Glandularia megapotamica* (Spreng.) Cabrera & Dawson, *Glandularia nana* (Moldenke) Tronc., *Glandularia peruviana* (L.) Small, *Glandularia phlogiflora* (Cham.) Schnack & Covas, *Glandularia platensis* (Spreng.) Schnack & Covas, *Glandularia pulchra* (Moldenke) Botta, *Glandularia rectiloba* (Moldenke) P. Peralta & Thode, *Glandularia scrobiculata* (Griseb.) Tronc., *Glandularia selloi* (Spreng.) Tronc., *Glandularia sessilis* (Cham.) Tronc., *Glandularia stellarioides* (Cham.) Schnack & Covas, *Glandularia subincana* Tronc., *Glandularia tenera* (Spreng.) Cabrera, *Glandularia tessmannii* (Moldenke) P. Peralta & Thode, *Glandularia thymoides* (Cham.) N. O'Leary e *Glandularia tomophylla* (Briq.) P. Peralta (THODE e MENTZ, 2010).

2.1.3 *Glandularia selloi* (Spreng.) Tronc.

Erva rasteira, radicante nos nós, apresenta caule pubescente a estrigoso. As folhas são pinatissectas, as inflorescências são do tipo espigas multifloras, com brácteas lanceoladas. A corola é hipocrateriforme, lilás a roxa, externamente pilosa, com tubo de 12-13 mm comprimento e limbo 7-10 mm de diâmetro (Figura 1) (THODE e MENTZ, 2010).

Esta espécie ocorre no sul do Brasil e também no Uruguai, apresenta ampla ocorrência no Estado, sendo abundante nas dunas do Litoral e em diversas apresentando ampla ocorrência no estado do Rio Grande do Sul, sendo abundante nas dunas do Litoral e em diversas outras regiões. Pode crescer isolada ou em

populações, podendo ser encontrada em campos, terrenos arenosos, úmidos, turfeiras, áreas degradadas e beiras de estrada (THODE e MENTZ, 2010).

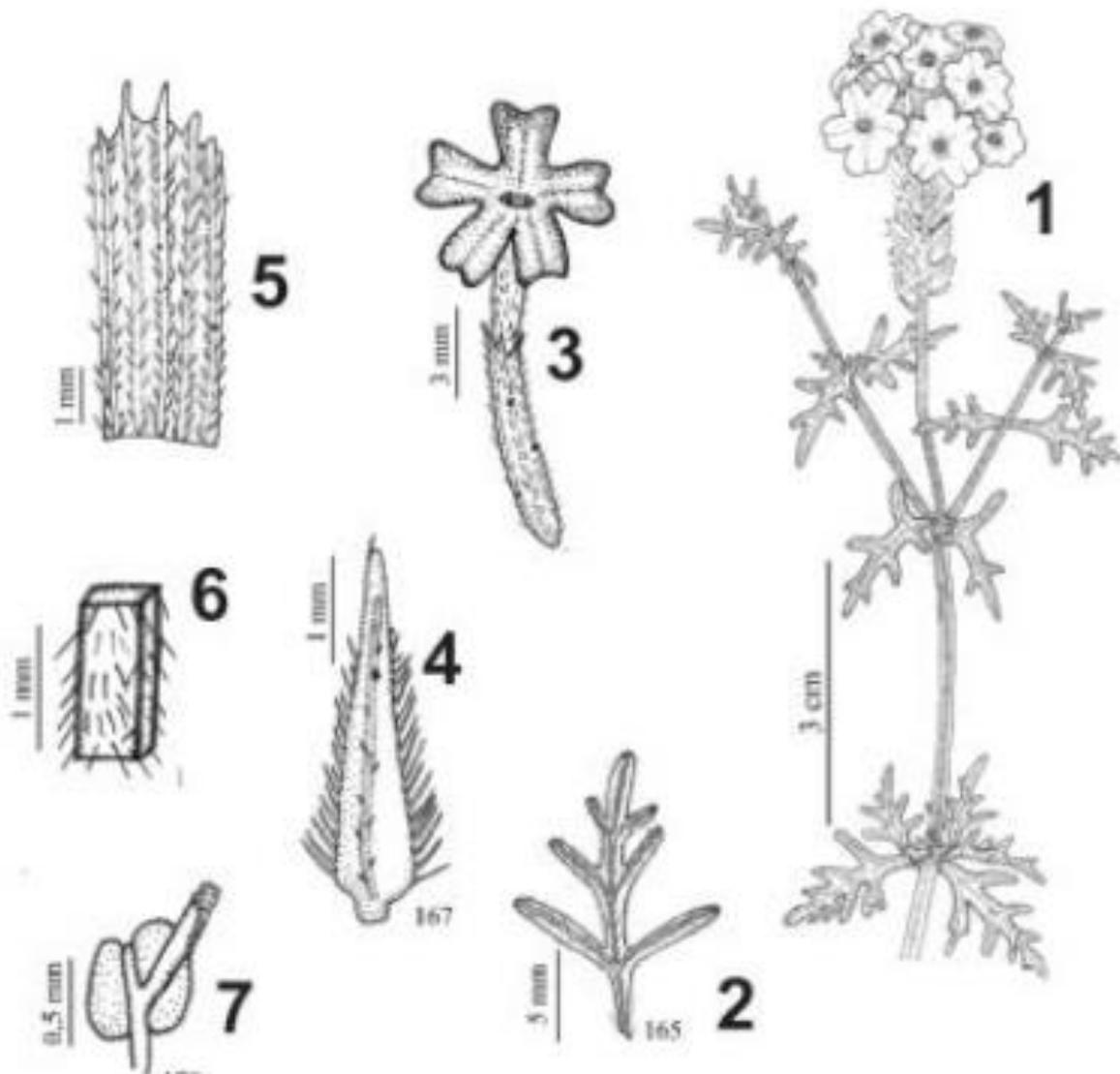


Figura 1. *Glandularia selloi* (Spreng.) Tronc. Adaptado de Thode e Mentz (2010). 1. Aspecto Geral da planta. 2. Folha, face abaxial. 3. Flor. 4. Bráctea. 5. Cálise. 6. Indumento do pêndulo das florescências 7. Antera do par superior de estames com apêndice no conetivo, vista dorsal.

Fonte: Adaptado de THODE e MENTZ, 2010.

2.2 ASPECTOS QUÍMICOS

2.2.1 Flavonoides

Os flavonoides são compostos de baixo peso molecular, polifenóis bioativos que desempenham um papel importante de proteção nas plantas contra danos causados pela luz ultravioleta (UVB), auxiliam na atração de animais polinizadores e dispersores de sementes (TAIZ e ZEIGER, 2004). Esses compostos fenólicos são caracterizados pela presença de 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, tendo por base a estrutura flavona (2-fenil-benzopirona), com as unidades recebendo denominação e numeração conforme descrito na Figura 2 (CUNHA, 2005; IWASHINA, 2000; ZUANAZZI e MONTANHA, 2010; SANDHAR *et al.*, 2011).

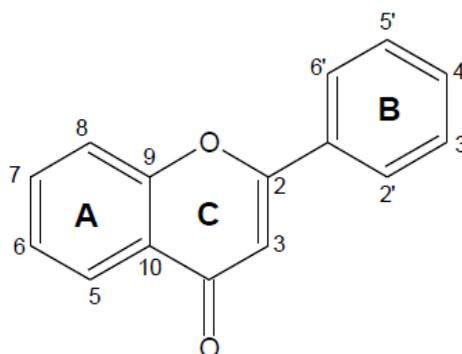


Figura 2. Núcleo fundamental dos flavonoides e sua numeração
Fonte: CUNHA, 2005.

Os flavonoides podem ocorrer na forma aglicona glicosídica ou com derivados metilados. Os flavonoides na forma de aglicona consistem num anel benzênico (A), condensado com um anel de 6 membros (B) que, por sua vez, transporta um anel fenílico (C) como substituinte na posição 2. O anel de 6 membros (B) condensado com o anel benzênico, ou é uma γ -pirona (flavonóis e flavonas) ou o seu derivado di-hidro. A posição dos substituintes benzênicos divide a classe destas moléculas em flavonoides (substituição na posição 2) e isoflavonoides (substituição na posição 3) (CUNHA, 2005; IWASHINA, 2000; SANDHAR *et al.*, 2011).

Os flavonoides são diferenciados através de seus substituintes, geralmente ligados a grupamentos hidroxila ou metoxila na estrutura fundamental (aglicona) ou

ligados a resíduos de açúcares, podendo ocorrer na forma de O-glicosídeo ou C-glicosídeo (IWASHINA, 2000; CUYCKENS e CLOEYS, 2004).

O efeito da glicosilação é tornar o flavonoide menos reativo, mais polar e solúvel em água, de forma que esta modificação pode ser considerada como uma forma essencial de proteção em plantas, evitando danos citoplasmáticos e, armazenar de forma segura os flavonoides nos vacúolos celulares (JUSTESEN *et al.*, 1998; CUYCKENS e CLOEYS, 2004). Portanto, nas folhas das plantas os flavonoides ocorrem predominantemente como conjugados glicosídicos.

Os flavonoides são frequentemente oxigenados, substituídos com hidroxilas e/ou metoxilas. As flavonas podem ser classificadas em vários subgrupos que são indicados, principalmente (i) hidroxilação, (ii) O- metilação, (iii) C – metilação, (iv) isoprenilação ou (v) substituição metilenodioxí, além das estruturas aglicona S- e C-glicosídeos bem conhecidos (MARTENS e MICHÖFER, 2005).

Os mesmos são divididos em classes, mais comumente usada, flavonas, flavonóis, antocianinas, flavanonas e isoflavonoides (SAMUELSSON, 1999; MARTENS e MITHÖFER, 2005; ZUANAZZI e MONTANHA, 2010).

As flavonas e flavonóis fazem parte de um grande grupo de flavonoides de origens biossintéticas muito próximas. Como os flavonóis são flavonas substituídas na posição C-3 por uma hidroxila ambos são, em geral, classificados juntos. Justifica-se por suas análises, sínteses e reações químicas possuírem uma base teórica comum (MARTENS e MITHÖFER, 2005; ZUANAZZI e MONTANHA, 2010).

A maioria das flavonas identificadas em plantas estão sob forma conjugada, com um ou mais açúcares ligados aos grupos hidroxilas por uma ligação hemiacetal facilmente destruída por hidrólise ácida. As flavonas são derivadas da 2-fenilcromona, possuem grupamento metoxila ou isoprenila ligados ao carbono 3 e são chamadas de 3-metoxi-flavonas ou 3-prenilflavonas respectivamente (ZUANAZZI e MONTANHA, 2010). Ocorrem principalmente como 7-O-glicosídeos, mas substituições podem ser encontradas em qualquer outra posição hidroxilada (MARTENS e MICHÖFER, 2005).

As flavonas podem ser encontradas em todas as partes das plantas, acima e abaixo do solo, em órgãos vegetativos e reprodutores: tronco, folhas, brotos, casca, cerne, espinhos, raízes, rizomas, flores, frutas, sementes e também em exsudato ou resina (MARTENS e MICHÖFER, 2005).

2.2.2 Iridoides

Iridoides são metabólitos secundários da flora e fauna terrestre e aquática encontrados em um grande número de famílias de plantas, geralmente como glicosídeos, e atuam na proteção contra predadores, devido ao seu sabor amargo (EL-NAGGAR e BEAL, 1980; GÁLVEZ *et al.*, 2005; DINDA *et al.*, 2007a). São substâncias monoterpênicas que possuem um esqueleto ciclopentano-[C]-pirano, baseado na estrutura de iridano (Figura 3).

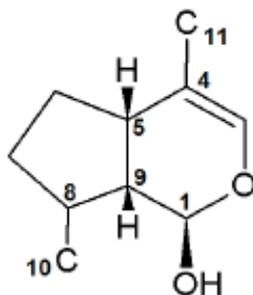


Figura 3. Estrutura do Iridano.

Fonte: Adaptado de DINDA *et al.* (2007a).

A clivagem oxidativa em C-7 e C-8 do anel ciclopentano fornece o chamado *seco-iridoide*1-3 (Figura 4-A) e a clivagem do anel pirano origina derivados de iridoides (Figura 4-B) (SAMPAIO-SANTOS e KAPLAN, 2001; DINDA *et al.*, 2007a).

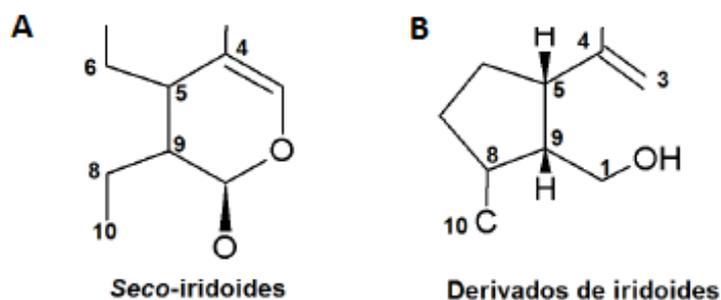


Figura 4. Clivagem dos anéis e seus derivados. A) representação da estrutura química de seco-iridoides, originados pela clivagem do anel ciclopentano; B) representação da estrutura química de derivados de iridoides, gerados pela clivagem do anel pirano.

Fonte: Adaptado de DINDA *et al.* (2007a).

O termo “iridoide” foi utilizado pela primeira vez em 1950, sendo o primeiro iridoide isolado de formigas *Iridomyrmex* que sintetizam iridodial, o qual possui função defensora (GÁLVEZ *et al.*, 2005).

Apesar de terem sido inicialmente obtidos de formigas, a maior parte dos iridoides isolados até hoje são provenientes de plantas, geralmente encontrados na forma glicosilada. Esses compostos são interessantes devido a inúmeras razões, estando relacionados com alcaloides indol monoterpênicos, possuem diferentes atividades farmacológicas, sendo utilizados como marcadores quimiotaxonômicos (GÁLVEZ *et al.*, 2005; DINDA *et al.*, 2007a).

Os iridoides podem ser divididos em dois grandes grupos: iridoides carbocíclicos e *seco*-iridoides. Modificações nestas estruturas principais dão origem a inúmeros compostos descritos na literatura (JENSEN, 1992). Por possuírem distribuição restrita a determinados grupos de plantas, iridoides são considerados importantes marcadores quimiotaxonômicos. Dentre as famílias que possuem estes compostos encontram-se Apocynaceae, Scrophulariaceae, Diervilaceae, Lamiaceae, Lagamiaceae e Rubiaceae, entre outras (TUNDIS *et al.*, 2008).

Sabe-se que a biossíntese desses compostos é de alta complexidade, tanto que estudos realizados objetivando a elucidação de rotas sintéticas permitiram a identificação de duas principais rotas, as quais determinadas em diferentes grupos de táxons, auxiliando na determinação de relações filogenéticas (JENSEN, 1992). Assim, determinou-se que a rota I origina iridoides carbocíclicos e *seco*-iridoides,

enquanto que a rota II origina iridoides carbocíclicos descarboxilados, e alguns seco-iridoides com estrutura diferente dos produzidos na rota I (JENSEN *et al.*, 2002). Determinados grupos de plantas possuem exclusivamente a rota I ou rota II (JENSEN, 1992).

2.2.3 Feniletanoides

Feniletanoides glicosídeos (FEG) são um grupo de compostos naturais solúveis em água amplamente distribuídos no reino vegetal. Estes metabólitos são estruturalmente caracterizados como derivados do ácido benzóico, contendo anel fenil-etil, ao qual é adicionada beta-glicopirranose (apiose, galactose, rhamnose ou xilose) por éster ou ligação glicosídica respectivamente (RADEV, 2010). Na verdade, alguns dos FEG também são conhecidos como fenilpropanoides glicosídeos, devido à presença de uma ou mais porções fenilpropila, contribuído pelo éster, formando ácidos aromáticos, tais como o ácido cinâmico, o ácido caféico e ácido ferúlico (Fu *et al.*, 2008).

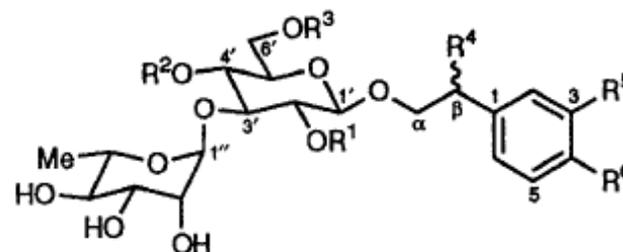
Estes compostos podem ser isolados de folhas, caules, frutos, flores, raízes e casca de plantas, em famílias como Acanthaceae, Asteraceae, Berberidaceae, Buddlejaceae, Crassulaceae, Gesneriaceae, Lamiaceae, Magnoliaceae, Oleaceae, Orobanchaceae, Plantaginaceae, Scrophulariaceae e Verbenaceae (FU *et al.*, 2008; RADEV, 2010).

Sua classificação é estabelecida com base no número, tipo e posição dos açúcares na molécula ou as variações nas suas estruturas nucleares. Em geral, os FEG na sua maioria encontrados até agora, têm menos de quatro açúcares na molécula. A substituição no C-3 ' é uma característica comum dos FEG com α -L-ramnose, substituinte mais comum nesta posição, como mostra a Quadro 1 (FU *et al.*, 2008).

Como feniletanoides são um grande grupo de metabólitos secundários produzidos pelas plantas, estes têm desempenhado um papel importante em estudos de quimiotaxonomia vegetal (FU *et al.*, 2008).

Extração de FEG a partir da planta é feita geralmente através de solventes polares orgânicos (metanol e em menor grau, etanol e acetato de etila), seguido pela dissolução do extrato bruto em água e lavagem com solventes orgânicos. A utilização de gel de sílica e CHCl_3 - MeOH ou CHCl_3 - MeOH - H_2O como eluente é muito comum, embora as condições ácidas envolvidas podem levar a decomposição dos glicosídeos (JIMÉNEZ e RIGUERA, 1994).

Quadro 1. Feniletanoides dissacarídeos com α -L-ramnose ligado ao C3' da glicose.



Nome	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Atividade Biológica	Referência
2'-O-acetil-acteosideo	Ac	Cf	H	H	OH	OH	Inibidor da proteína quinase e 5-lipoxigenase	NISHIMURA <i>et al.</i> , 1990
Acteosideo (Kusagina) (Verbascosideo) (Crobanchina)	H	Cf	H	H	OH	OH	Inibidor da proteína quinase ¹ , aldose redutase ² e da formação de ácidos hidroxiicosatetraenoicos (5-HETEs) ³ . Antibacteriano ⁴ , fitoalexina ⁵ , citotóxico ⁶ e antioxidante ⁷ . A mistura de acteoside com orobanchosideo tem propriedades neurolépticas ⁸ , anti-hepatotóxico ⁹ e imunossupressor ¹⁰ . Anti-tremor L-DOPA ¹¹ , anti-hipertensivo ¹¹ , analgésico ¹¹ e proteção contra decaimento da aprendizagem em ratos ¹² .	¹ HERBERT <i>et al.</i> , 1990; ² RAVN <i>et al.</i> , 1990; ³ KIMURA <i>et al.</i> , 1987; ⁴ KITAGAWA <i>et al.</i> , 1987; ^{4,5} SHOYAMA <i>et al.</i> , 1987; ⁶ PETTIT <i>et al.</i> , 1990; ⁷ MIYASE <i>et al.</i> , 1993; ⁸ PIERETTI <i>et al.</i> , 1992; ⁹ HOUGHTON e HIKINO, 1989; ¹⁰ SASAKI <i>et al.</i> , 1989; ¹¹ ANDARY <i>et al.</i> , 1980; ¹¹ ANDARY <i>et al.</i> , 1982; ¹² SATO <i>et al.</i> , 1995
Campneosideo II (β -hidroxi-acteosideo)	H	Cf	H	OH	OH	OH	Antibacteriano e inibidor da formação de ácidos hidroxiicosatetraenoicos (5-HETEs)	KITAGAWA <i>et al.</i> , 1987; KIMURA <i>et al.</i> , 1987;
Cistanosideo C	H	Cf	H	H	OMe	OH	Proteção contra queda de comportamentos sexuais e de aprendizagem em ratos e anti-estresse.	SATO <i>et al.</i> , 1995 KOBAYASHI <i>et al.</i> , 1987
Cistanosideo D (isômero E)	H	Fr	H	H	OMe	OH	Anti-estresse	KOBAYASHI <i>et al.</i> , 1987
Isoacteosideo	H	lfr	H	H	OH	OH	Citotóxico, antioxidante e imunossupressor	NISHIMURA <i>et al.</i> , 1990; MIYASE <i>et al.</i> , 1993; PETTIT <i>et al.</i> , 1990; SASAKI <i>et al.</i> , 1989
Isomartinosideo	H	H	Fr	H	OH	OMe	Antioxidante	MIYASE <i>et al.</i> , 1993
Jionosideo C	H	Cf	H	H	H	OH	Inibidor de redutase da aldose e de 5-lipoxigenase	NISHIMURA <i>et al.</i> , 1990
Jionosideo D	H	Cf	H	H	OH	OMe	Inibidor da aldose redutase	NISHIMURA <i>et al.</i> , 1990
Leucosceptosideo A	H	Cf	H	H	OH	OH	Antioxidante	MIYASE <i>et al.</i> , 1993
Martinosideo	H	Fr	H	H	OH	OMe	Antioxidante	MIYASE <i>et al.</i> , 1993

2.3 ASPECTOS FARMACOLÓGICOS

2.3.1 Flavonoides

Para os flavonoides foram relatados uma vasta gama de atividades biológicas tais como anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral, antialérgica (COOK e SAMMAN, 1996; CUSHNIE e LAMB, 2005) antitumoral e vasodilatadora além de mostrarem aplicabilidade no tratamento de doenças neuro-degenerativas, (WILLIAMS *et al.*, 2004; CHEBIL *et al.*, 2006; TSUCHIYA, 2010).

Flavonoides são conhecidos por inibir a peroxidação lipídica, agregação de plaquetas, permeabilidade capilar, ciclo-oxigenase e atividades enzimáticas da lipoxigenase. Eles exercem estes efeitos como antioxidantes, eliminadores de radicais livres, quelantes de cátions divalentes (COOK e SAMMAN, 1996; MIDDLETON *et al.*, 2000; CHEBIL *et al.*, 2006). Estes são também referidos como inibidores de enzimas como hidrolases, hialuronidase, fosfatase alcalina, arilsulfatase, cAMP fosfodiesterase, lipase, α -glicosidase e quinase (NARAYANA *et al.*, 2001).

Pesquisas mostram que a posição na qual a porção glicosídica encontra-se ligada aos flavonoides pode estar diretamente associada à atividade biológica apresentada por eles (OHMORI *et al.*, 2000; HEIM *et al.*, 2002; YANG *et al.*, 2006). Flavonoides livres ou na forma de glicosídeos podem atuar de formas diferentes, sendo que em muitos casos os glicosídeos apresentam melhor atividade do que a forma de aglicona livre (MISHRA *et al.*, 2003).

A glicosilação também está diretamente relacionada com a biodisponibilidade dos flavonoides, pois alteram sua absorção intestinal (HOLLMAN *et al.*, 1995; MATSUMOTO *et al.*, 2004), bem como a posição onde os açúcares estão ligados, pois afetam sua desglicosilação por células do intestino delgado e do fígado (DAY *et al.*, 1998) sendo possível alterar a ação farmacológica esperada.

2.3.2 Iridoides

Durante longo período iridoides foram ignorados quanto a sua importância farmacológica, porém, com a identificação química de diversas plantas medicinais, a presença de iridoides atraiu a atenção de pesquisadores para estudos da bioatividade dos mesmos (GHISALBERTI, 1998; DINDA *et al.*, 2007b).

Dentre as atividades descritas para iridoides, destaca-se: anti-inflamatória, antiviral, antitumoral, antibacteriana, purgativa, inseticida, hepatoprotetora, antialérgico, antiartrítico, antifúngica, antiespasmódica, neuroprotetora, anticoagulante, entre outras (GHISALBERTI, 1998; DINDA *et al.*, 2007b e 2011).

2.3.3 Feniletanoides

Alguns dos feniletanoides foram testados quanto à sua atividade biológica, revelando ação antioxidante, imunomoduladora, antibacteriana, anti-inflamatória, analgésica, neuroprotetora, vasodilatadora, cardiovascular, antifúngica, antiproliferativa, entre outras (FU *et al.*, 2008).

O interesse especial por pesquisadores nos feniletanoides glicosídeos, principalmente na farmacologia destes compostos, é fundamentado em sua cadeia lateral ligado a uma unidade de ácido caféico. Isto porque estes compostos têm uma baixa toxicidade e amplo espectro farmacológico, o que os torna promissores em termos de criação de novos fármacos de origem natural (FU *et al.*, 2008).

Alguns compostos foram testados clinicamente, como o acteosídeo, que ajuda a reduzir a incidência de cataratas e neuropatias secundárias no diabético (JIMENES e RIGUERA, 1994).

2.4 CITOTOXICIDADE

Segurança, eficácia e qualidade dos medicamentos à base de plantas são os desafios mais importantes para a pesquisa em medicina tradicional. Em 2013 a Organização Mundial de Saúde (OMS) desenvolveu orientações técnicas e metodologias de investigação sobre medicamentos fitoterápicos. Todavia, observou-se também que alguns países não seguem nenhum requisito regulamentar para a avaliação da segurança destes produtos (Organização Mundial da Saúde, 2005).

No Brasil, a segurança do medicamento à base de plantas é certificada por uso tradicional, pesquisas bibliográficas, ensaios pré-clínicos ou clínicos (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010). Estudos pré-clínicos recomendados são os testes de toxicidade em animais clássicos (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004), mas a consciência de questões éticas referentes à experimentação animal tornou-se mais proeminente aumentando a necessidade de reduzir, substituir e aperfeiçoar os ensaios com animais (PIERSMA, 2006).

A partir de meados da década de 1980, a tecnologia de cultura celular começou a ser amplamente utilizada na pesquisa toxicológica (ZUCCO, 2004), contribuindo para a avaliação toxicológica *in vitro*. Os ensaios de citotoxicidade utilizam diferentes parâmetros visando identificar a proliferação e morte celular, os quais podem ser avaliadas por colorimetria e absorbância devido à incorporação de certas substâncias (WEYERMANN *et al.*, 2005).

Por ser um teste rápido, econômico e funcional o ensaio de MTT vem sendo amplamente utilizado como um teste de rastreio para avaliar a citotoxicidade *in vitro*. A sua aplicabilidade na avaliação de toxicidade de extratos de plantas tem sido promissora.

O teste mostra a ruptura de uma função bioquímica crítica e efeitos de citotoxicidade precoce (MALICH *et al.*, 1997). O princípio do teste baseia-se na técnica desenvolvida por Mosmann (1983), no qual um sal de tetrazol amarelo e solúvel em água MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5- difeniltetrazólio) é reduzido na membrana mitocondrial interna para um sal de formazan púrpura pela ação da

succinato desidrogenase. O produto resultante indica o estado de atividade mitocondrial e reflete o número de células viáveis (TRIAGLIA *et al.*, 1991; BUTLER, 2004; FRESHNEY, 2005; VANDEN BERGHE *et al.*, 2013). É possível que mesmo após a morte da célula, a mitocôndria permaneça com a atividade desidrogenase succinato intacta, sendo interpretado como sobrevida (BERRIDGE *et al.*, 2005). Alguns compostos podem também aumentar ou reduzir a atividade succinato desidrogenase, sem afetar a sobrevivência da mitocôndria (VANDEN BERGHE *et al.*, 2013), ou ainda, interagir com o sal de MTT (SHOEMAKER *et al.*, 2004; PENG *et al.*, 2005; LUPU e POPESCU, 2013).

Outro ensaio utilizado neste trabalho e que proporciona uma estimativa quantitativa do número de células viáveis é o ensaio de incorporação do vermelho neutro (VN). Esse baseia-se na absorção e ligação do corante catiônico, na matriz lisossomal de células viáveis depois de sua incubação juntamente com o agente que será avaliado quanto à toxicidade (BORENFREUND *et al.*, 1988; TRIAGLIA *et al.*, 1991). Em condições normais, o pH do lisossoma é inferior ao do citoplasma, com isso, o corante preso no lisossomo é incapaz de deixar o interior da organela. Lisossomos danificados diminuem a quantidade de corante retido na cultura, sendo assim, a integridade lisossomal é um indicador altamente sensível de viabilidade celular (REPETTO *et al.*, 2008).

Os mecanismos que causam a alteração na estabilidade da membrana dos lisossomos ainda não são totalmente conhecidos, mas podem envolver efeitos diretos das substâncias químicas na membrana da célula ou aumentar a frequência de lisossomos secundários em células submetidas à exposição com a substância tóxica (MAYER *et al.*, 1992).

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Solventes em geral

Os solventes utilizados para este trabalho foram de procedência Merck, Nuclear[®] e Quimex[®]. Dentre os solventes utilizados destaca-se metanol, diclorometano, acetato de etila, todos de grau p.a. (analítico). Para CLAE os solventes utilizados foram metanol grau CLAE de procedência Merck[®] e água Milli-Q[®]. Para os ensaios de citotoxicidade utilizou-se solução de vermelho neutro e DMSO da Sigma[®].

3.1.2 Reagentes específicos e Padrões

Anisaldeído sulfúrico reagente para polifenóis e Reagente natural, reagente específico para flavonoides. Padrão de verbascosídeo fornecido pelo laboratório de Farmacognosia da UFRGS.

3.1.3 Cromatografia em camada delgada (CCD)

As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas em cromatofolhas de gel de sílica 60F₂₅₄ Merck[®].

3.1.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para obtenção dos cromatogramas foi utilizado equipamento ALLIANCE 2695, software gerenciador *Empower* (WATERS) e detector de Ultravioleta/Visível (UV/Visível 2487). A coluna cromatográfica utilizada na análise foi da marca Phenomenex[®] contendo fase reversa C₁₈ (5 μ) com dimensões 250x4,6 mm protegida por pré-coluna Lichrospher Merck[®] (10x4 mm d.i). O volume de injeção foi de 10 μ L. O sistema utilizado foi gradiente linear com tempo de análise

cromatográfica final de 25 min, fluxo de 0,5 mL/min, tal como representado na Tabela 1.

Tabela 1. Sistema gradiente utilizado para análise do perfil cromatográfico em CLAE-DAD dos extratos de raízes, caules, folhas e inflorescência de *Glandularia selloi*.

TEMPO (minutos)	FASE A%*	FASE B%**
0	80	20
4	60	40
8	50	50
10	40	60
11	30	70
15	20	80
18	10	90
20	-	100
22	60	40
25	80	20
30	80	20

* Água/ Metanol (90-10%)

** Metanol

3.1.5 Espectroscopia de RMN ¹H e RMN ¹³C

Todos os espectros foram desenvolvidos a temperatura ambiente, em solventes deuterados empregando como referência o tetra-metil-silano (TMS). Na obtenção dos espectros de RMN ¹H, RMN ¹³C e 2D foram medidos a 25° C em um espectrômetro Varian MR400 (operando a 400 MHz para ¹H e 100 MHz para ¹³C). Os espectros foram registados em metanol deuterado CD₃OD (Sigma) e água deuterada D₂O (Aldrich, St. Louis, EUA).

3.1.6 Cromatografia de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE-EM)

O equipamento usado para obtenção dos espectros de massas foi um Cromatógrafo de Ultra Eficiência (WATERS) acoplado no Espectrometro de Massas Q Tof Micromass (WATERS). A análise foi realizada por injeção direta com volume de injeção de 0,6 µL, o sistema gradiente é apresentado na Tabela 2. A detecção

dos íons moleculares é realizada por elétron-spray positivo com energia de impacto de $4,0 \times 10^6$.

Tabela 2. Sistema gradiente para CLUE-EM para análise dos compostos 2 e 4 isolados de extrato metanólico de folhas e caules de *Glandularia selloi*.

TEMPO (minutos)	FASE A%	FASE B%
0	80	20
0,23	60	40
1,03	50	50
1,43	40	60
1,83	30	70
2,63	20	80
3,03	10	90
3,43	0	100
3,83	60	40
4,00	80	20
5,00	80	20

* Água/ Metanol (90-10%)

** Metanol

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Coleta da amostra

As amostras de *Glandularia selloi* (Spreng.) Tronc. (raízes, caules, folhas e inflorescências) foram coletadas no estado do Rio Grande do Sul, em Osório, Morro da Borússia, no período de floração (novembro, 2012). O vegetal foi identificado pela Botânica Profa. Dra. Márcia Vignoli (UFCSPA), e a exsicata FOI depositada no Herbário do Instituto de Biociências da UFRGS, sob o número 190416. A coleta do material vegetal foi autorizada pelo CGEN/MMA (Conselho de Gestão do Patrimônio Genético - Ministério do meio Ambiente).

3.2.2 Preparação do material vegetal

O material fresco foi separado em raízes, caules, folhas e inflorescências e seco em local ventilado à temperatura ambiente, posteriormente triturado em moinho de facas. Para o *screening* em CLAE as raízes, caules, folhas e inflorescências

foram pesadas individualmente. Pesou-se em balança analítica 0,25 mg de material seco e pulverizado, transferiu-se para tubo de ensaio com tampa e acrescentou-se 5 mL de metanol. As amostras foram submetidas a extração em ultrassom por 2 horas sem aquecimento. Filtrou-se a solução com papel filtro. Após, esta solução foi transferida para um balão volumétrico de 10,0 mL sendo ajustado seu volume até 10 mL. Este extrato foi filtrado com membrana filtrante hidrofóbica (Millipore; 0,45 µm, 13 mm) para posteriormente ser analisado por CLAE-DAD.

Para as co-injeções dos extratos metanólicos de raízes, caules, folhas e inflorescência de *Glandularia seloi* usando padrão de verbascosídeo usou-se viels de capacidade de 1000 µL. Para cada extrato metanólico usou-se 2 viels o primeiro acrescentou-se 150 µL de MeOH + 850 µL de amostra e o segundo 150 µL de padrão + 850 µL de amostra.

Para o isolamento dos compostos utilizou-se 3 g de folhas e 27 g caules os quais foram submetidos separadamente à maceração, por 3 dias, em metanol em temperatura ambiente. Após este período, o material foi submetido à ultrassom por 2 horas, sendo filtrado ao término e o remanescente submetido novamente em maceração com metanol pelo mesmo intervalo de tempo. Este processo repetiu-se por mais duas vezes. Os extratos metanólicos foram reunidos e o solvente eliminado em evaporador rotatório. Após a secura do extrato, lavou-se com 5 mL de diclorometano para retirar parte da clorofila. O rendimento do extrato metanólico de folhas foi de 2,1% e para o extrato metanólico de caules o rendimento foi de 5,51%.

3.2.3 Isolamento dos compostos

3.2.3.1 Folhas

O extrato de folhas foi submetido à CC (dimensões 35 cm x 3 cm) utilizando gel de sílica como fase estacionária e como eluente diclorometano e metanol em ordem crescente de polaridade. Foram coletadas 82 frações que foram monitoradas através de CCD analítica.

3.2.3.2 Caules

O extrato de caule foi submetido à CC (dimensões 35 cm x 3 cm) utilizando gel de sílica como fase estacionária e como eluente diclorometano e metanol em ordem crescente de polaridade. Foram coletadas 43 frações.

3.2.4 Ensaios de Citotoxicidade

As células foram semeadas ($1,5 \times 10^4$ cels/mL; 200 μ L/orifício), em quadruplicata, em microplaca de 96 orifícios em meio de cultura DMEM, suplementadas com 10% de soro bovino fetal e expostas por 24 horas a diferentes concentrações dos extratos metanólicos de raízes, caules, folhas e inflorescências de *Glandularia selloi* (0,1%; 0,5%; 1%; 5%; 10%). Como controle negativo foram utilizadas células mantidas em meio de cultivo padrão. Ao final das 24 horas, todos os grupos foram submetidos aos ensaios do MTT e do VN.

3.2.4.1 Teste de viabilidade de linhagem celular pela redução do MTT

Foram adicionados 10 μ L da solução de 5 mg/mL do corante de MTT em cada orifício. Após exposição por 2 horas, o meio de cultura foi removido e 200 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados a cada orifício, para solubilização dos cristais de formazan. A absorbância foi verificada a 570 nm em leitora de microplacas. O teste MTT avalia a atividade metabólica das células quantificando a redução metabólica do MTT pelas desidrogenases mitocondriais, cuja coloração pode ser mensurada por espectrofotometria.

3.2.4.2 Ensaio de Citotoxicidade Vermelho neutro

As células foram cultivadas em condições padrão de manutenção celular. Após o período de incubação, o meio foi removido e as células foram expostas a 200 µL de um novo meio de cultura adicionando diferentes concentrações dos extratos metanólicos de raízes, caules, folhas e inflorescências de *Glandularia selloi* e controle (0,1%; 0,5%; 1%; 5%; 10%). Após incubação por 24 horas, o meio foi removido por aspiração e substituído por 200 µL meio de cultura DMEM sem soro fetal bovino contendo 50 µL/mL de vermelho neutro. As placas foram incubadas por 3 horas a 37 °C. O meio foi removido e 200 µL de uma solução fixadora de cloreto de cálcio 1% em formaldeído 0,5% foi adicionado e mantido por 5 minutos. A seguir, os cultivos foram lavados 3 vezes com tampão fosfato. Então, uma solução de ácido acético 1% em etanol 50% foi adicionada em cada orifício e a placa foi colocada em agitador por aproximadamente 10 minutos para solubilização do corante. A absorbância de cada orifício foi lida em 540 nm em leitora de microplacas. O teste avalia a capacidade das células, especialmente lisossomos, em incorporar o corante. Substâncias que causam danos a membrana celular ou interferem nesse processo diminuem a capacidade da célula em incorporar o vermelho neutro.

3.2.4.3 Análise estatística

Os dados obtidos a partir de ensaios *in vitro* de citotoxicidade foram expressos como média e desvio padrão, em valores percentuais relativos ao controle negativo. ANOVA de 1 via e pós-teste de Duncan foram utilizados para análise estatística com o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) 19.0 para Windows. O nível de significância foi de $p < 0,05$.

4.1 PERFIL CROMATOGRÁFICO

Os diversos órgãos do vegetal em estudo (raízes, caules, folhas e inflorescência) foram submetidos ao processo de extração conforme método apresentado no item 4.2.2. Os extratos de raízes, caules, folhas e inflorescência de *Glandularia selloi* foram analisados por CLAE (em anexo). Pode-se observar que todas as amostras, apresentam um pico predominante com t_r similar. O espectro de UV deste composto majoritário é apresentado na Figura 5.

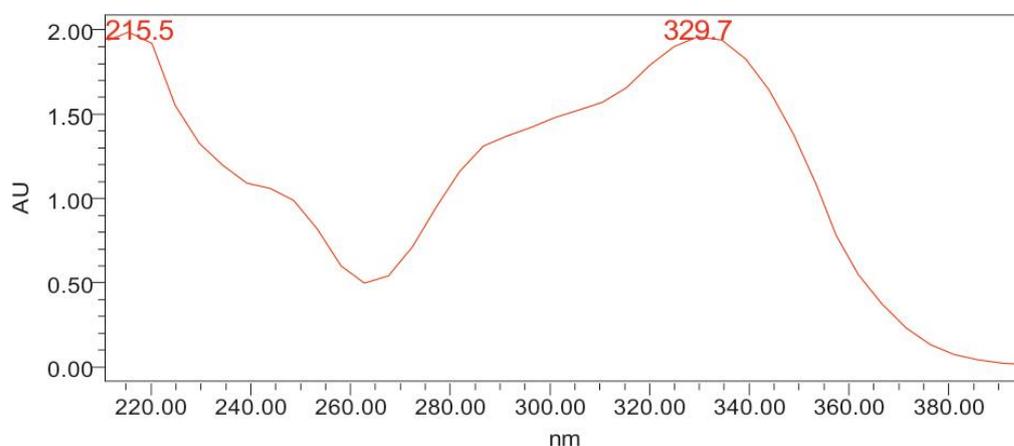


Figura 5. Espectro de UV do pico majoritário dos extratos metanólicos de raízes, caules, folhas e inflorescência de *Glandularia selloi* analisados.

Este espectro de UV é similar ao composto verbascosideo, feniletanoide presente em táxons da família Verbenaceae, já descrito para *Verbena officinalis* (JIMÉNEZ e RIGUERA, 1994; FUNES *et al.*, 2010; REHECHO *et al.*, 2011; SCHÖNBICHLER *et al.*, 2013), *Stachytarpheta cayennensis* (L.C. Rich) Vahl (SCHAPOVAL *et al.*, 1998; LEITÃO *et al.*, 2005; PENIDO *et al.*, 2006), *Lippia javanica* Spreng., *Lantana camara* Linné (OLIVIER *et al.*, 2010; OYOUROU *et al.*, 2013) e *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. (BARBOSA *et al.*, 2006).

Verifica-se também a presença de um pico com $t_r \cong 10,2$ que antecede o pico majoritário e outro pico posterior com $t_r \cong 10,9$ sendo visível em todos os extratos metanólicos. Esses picos possuem espectro de UV semelhante ao pico majoritário, entretanto, apresentam somente um máximo de absorbância de 329,5 nm.

Análise por CLAE-DAD de padrão verbascosídeo fornecido pelo laboratório de Farmacognosia da UFRGS possibilitou verificar o t_r e espectro de UV em 254 nm. Na figura 6 observa-se t_r 11,0 minutos do verbascosídeo e seu espectro de UV com 2 máximos de absorvância.

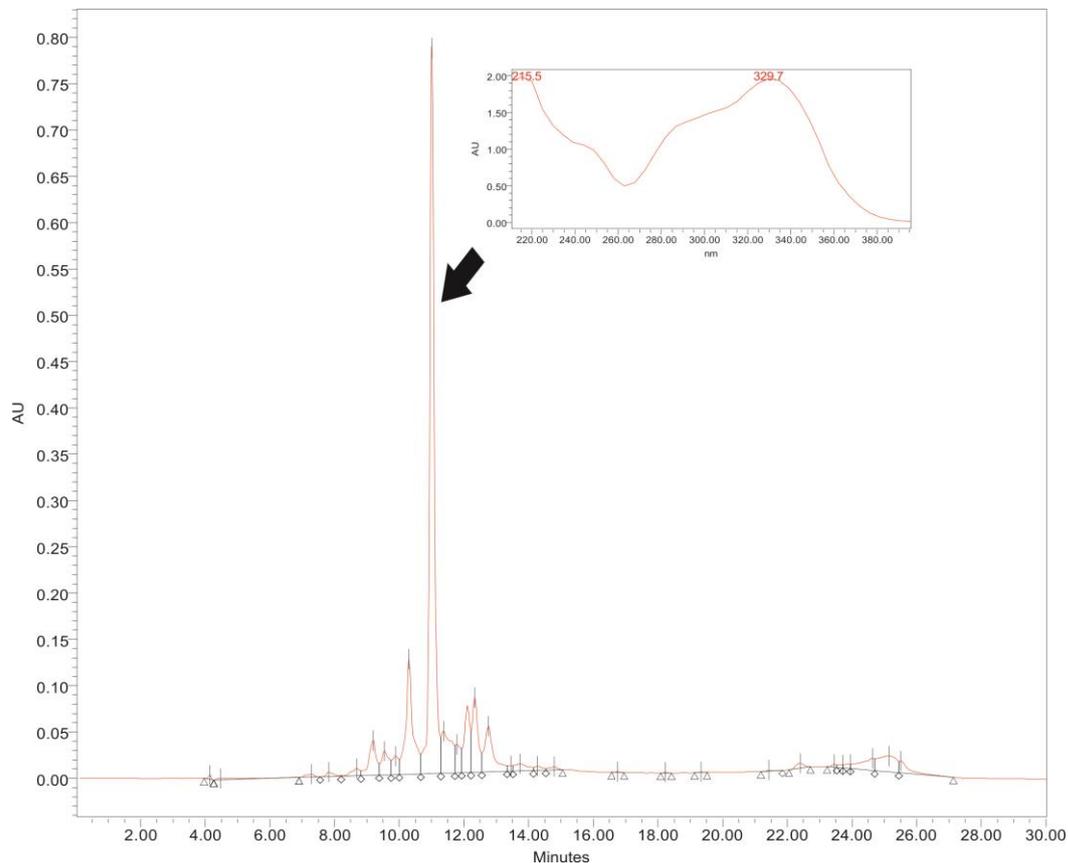


Figura 6. Perfil cromatográfico do padrão de verbascosídeo.

Na figura 7 verifica-se os t_r do pico majoritário nos extratos metanólicos de *Glandularia selloi* os quais foram similares quando comparados entre si, entretanto, comparando-se com o padrão, constata-se que o composto apresenta t_r 11,0 minutos. Contudo, o composto dos extratos metanólicos e o padrão de verbascosídeo não apresentaram diferenciação no UV, e não houve variação nos máximos de absorvância indicado pelo CLAE-DAD.

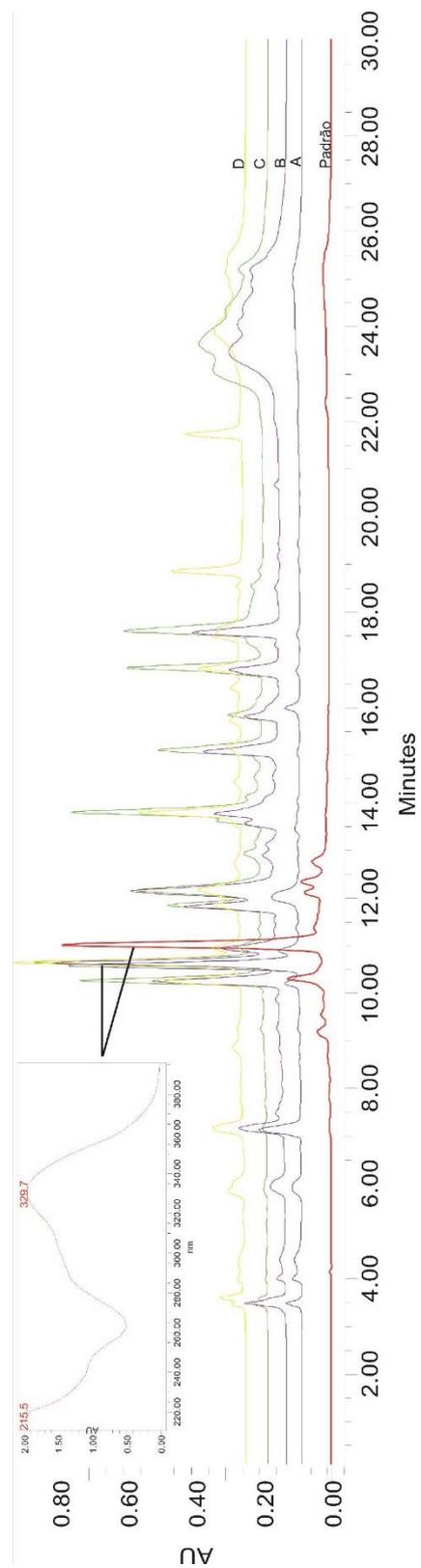


Figura 7. Cromatogramas dos extratos metanólicos de raízes, caules, folhas e inflorescência de *Glandularia selloi* e Padrão de verbascosídeo. **Legenda:** Padrão - padrão de verbascosídeo; **A** – Raízes; **B** – Folhas; **C** - Caules; **D** – Inflorescências.

Nos cromatogramas dos extratos metanólicos de raízes, caules e inflorescências observa-se um pico com t_r médio de 7,2 minutos com intensidade aproximadamente de 0,15 mAU. Os espectros de UV desse pico nos 3 extratos, apresentam um máximo de absorção em 229,7 nm como mostrado na Figura 8. O perfil deste espectro de UV sugere a presença de iridoide, grupo de compostos presente na família Verbenaceae.

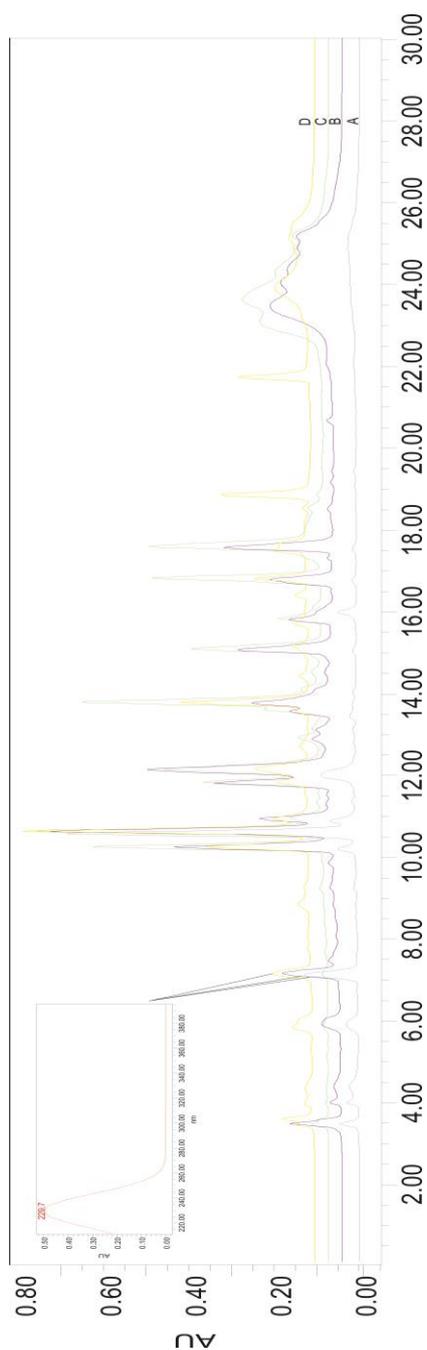


FIGURA 8. Cromatogramas dos extratos metanólicos de raízes, caules, folhas e inflorescência de *Glandularia seloi* e espectro do pico com t_r 7,2 minutos.
Legenda: **A** – Raízes; **B** – Folhas; **C** – Caules; **D** – Inflorescências

Nos cromatogramas de extratos metanólicos de caules, folhas e inflorescências é possível verificar dois picos com t_r médio; 11,8 e 12,1 minutos respectivamente que não são separados neste sistema de solventes. Todavia, fornecem um espectro de UV sem variação de absorvância. A intensidade dos picos é maior no extrato das folhas aproximadamente 0,20 e 0,30 mAU respectivamente e com menor intensidade para o extrato das inflorescências como mostra a Figura 9. Destaca-se também a presença de um pico com t_r médio de 13,7 minutos apresentando maior intensidade no extrato de folhas aproximadamente 0,70 mAU (Figura 10).

4.2 ESCOLHA DAS FRAÇÕES DA CROMATOGRAFIA EM COLUNA DO EXTRATO DAS FOLHAS E CAULES

A escolha das frações da cromatografia em coluna obtidas do extrato metanólico das folhas de *Glandularia selloi*, deu-se pela análise em cromatografia em camada delgada. Para o extrato das folhas foram selecionadas as frações 20-25 e 35-47, eluídas no sistema eluente de diclorometano:metanol (80:20 v/v) e visualizada sob luz UV (254 nm). Ao utilizar o reagente anisoaldeído sulfúrico como revelador, verificou-se coloração amarelada, indicando composto polifenol. Contudo, ao nebulizar Reagente natural, as manchas foram positivas para flavonoides, apresentando coloração amarelada.

A fração 66 foi eluída no sistema eluente de diclorometano:metanol (80:20 v/v) e visualizada sob luz UV (254 nm). Posteriormente, foi revelada com reagente anisoaldeído sulfúrico apresentando coloração marron esverdeado, indicando presença de composto polifenol.

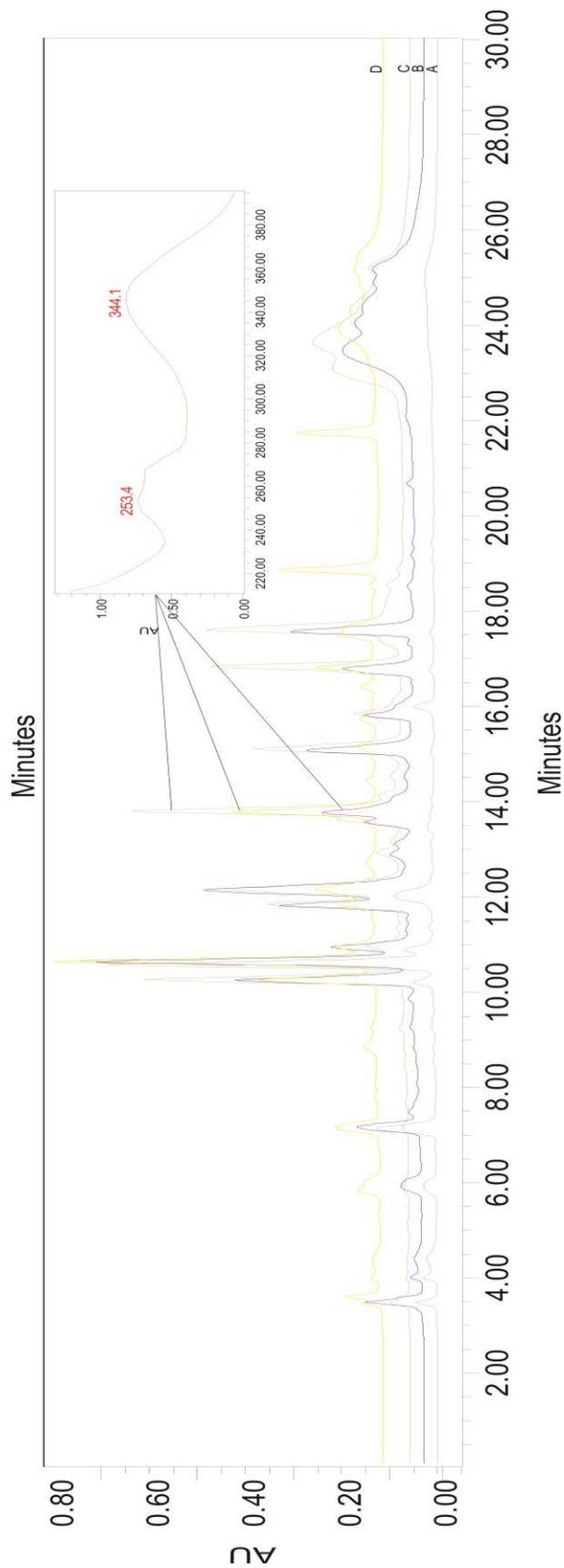


Figura 9. Cromatogramas dos extratos metanólicos de raízes, caules, folhas e inflorescência de *Glandularia selloi* e espectro do pico com t_r médio de 12,1 minutos. Legenda: **A** – Raízes; **B** – Folhas; **C** - Caules; **D** – Inflorescências

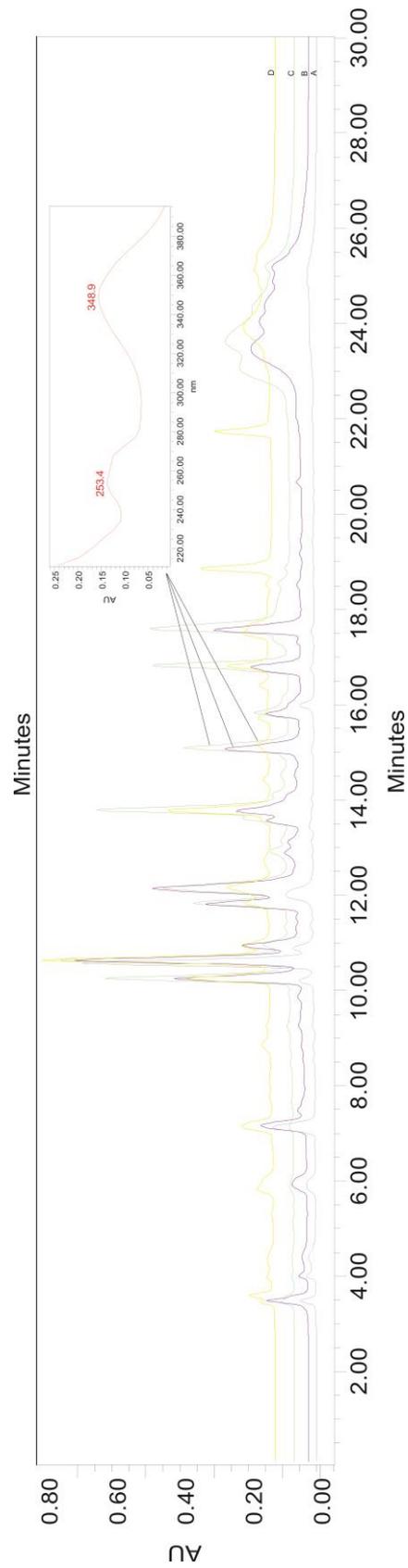


Figura 10. Cromatogramas dos extratos metanólicos de raízes, caules, folhas e inflorescência de *Glandularia selloi* e espectro do pico com t_r 13,7 de minutos. Legenda: **A** – Raízes; **B** – Folhas; **C** - Caules; **D** – Inflorescências

Para o extrato de caules foram selecionadas as frações 14-16 e 34, eluidas no sistema eluente de diclorometano:metanol (80:20 v/v) e visualizadas sob luz UV (254 nm). Ao nebulizar o reagente anisoaldeído sulfurico sobre a cromatoplaça, as manchas apresentaram coloração amarelada, indicando composto polifenol. Porém, ao revelar com Reagente natural, as manchas das frações 14-16, estas foram positivas para flavonoides. Comparando com as frações 20-25 do extrato das folhas, verificou-se o mesmo Rf de 0,58.

4.3 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS

4.3.1 Composto 1

O espectro de RMN ^1H para o composto 1 obtido na fração 66 do extrato metanólico das folhas está apresentada na Figura 11.

A comparação dos sinais, os deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento (J) obtidos da projeção do RMN ^1H do composto com os valores contidos na literatura para o verbascosídeo está apresentada no Quadro 2.

Pode-se destacar no espectro RMN ^1H do composto 1 a presença de um conjunto de sinais em δ 6.61 (1H, d , $J = 8,0$ Hz, H-6), δ 6,71 (1H, d , $J = 12,0$ Hz, H-2), δ 6,83 (1H, d , $J = 4,0$ Hz, H-5'''), δ 6,98 (1H, d , $J = 4,0$ Hz, H-6''') e δ 7,10 (1H, d , $J = 12,0$ Hz, H-2'''). Estas ressonâncias são características da presença de sistemas aromáticos, sendo parte de uma porção-cafeoil. Essa porção-cafeoil é devido aos sinais de dois hidrogênios em δ 6,29 (1H, d , $J = 16,0$ Hz, H-8''') e δ 7,65 (1H, d , $J = 16,0$ Hz, H-7'''). Sinais de hidrogênio em δ 2,83 (1H, m , H-7), 3,71 ppm (1H, m , H-8a) e δ 3,98 (1H, m , H-8b), revelaram que o segundo sistema aromático faz parte da porção feniletanoide. O espectro de RMN ^1H também apresentou um número de sinais entre 3,00 e 4,00 ppm, o que sugere a existência de açúcar na molécula. Um sinal em δ 1,11 (3H, d , $J = 8,0$ Hz, H-6''') é observado para os 3H do grupo CH_3 correspondente a ramnose e, além disso, um sinal em δ 5,22 (1H, m , H-1''')

H-1'). Comparando-se os dados de RMN ¹H com os dados publicados por Budzianowski e Skrzypczak (1995) e Gitzel Filho e colaboradores (2012), levou-se à proposta de ser a substância verbascosídeo.

Quadro 2. Comparação dos valores de RMN ¹H obtidos para o composto 1 e valores encontrados na literatura para verbascosídeo.

Posição	Budzianowski e Skrzypczak, 1995			Composto 1		Gitzel Filho <i>et al.</i> , 2012	
	RMN ¹ H - Verbascosídeo			RMN ¹ H		RMN ¹ H - Verbascosídeo	
	Tipo de C	δ (ppm)	J (Hz)	δ (ppm)	J (Hz)	δ (ppm)	J (Hz)
Cafeico							
1'''	C			-	-	-	-
2'''	CH	7,05	<i>d</i> (2,1)	7,10	<i>d</i> (2,0)	7,07	<i>d</i> (2,0)
3'''	C						
4'''	C						
5'''	CH	6,78	<i>d</i> (8,4)	6,83	<i>d</i> (8,0)	6,79	<i>d</i> (8,2)
6'''	CH	6,96	<i>dd</i> (2,1; 8,4)	6,98	<i>d</i> (8,0)	6,97	<i>dd</i> (8,22; 2,0)
7'''	CH	7,59	<i>d</i> (15,9)	7,65	<i>d</i> (16,0)	7,60	<i>d</i> (15,9)
8'''	CH	6,27	<i>d</i> (15,9)	6,29	<i>d</i> (16,0)	6,28	<i>d</i> (15,9)
9'''	C=O						
Feniletanoide							
1	C						
2	CH	6,69	<i>d</i> (1,8)	6,71	<i>d</i> (2,0)	6,71	<i>d</i> (2,0)
3	C						
4	C						
5	CH	6,67	<i>d</i> (8,4)	6,69	<i>m</i>	6,69	<i>d</i> (8,1)
6	CH	6,56	<i>dd</i> (1,8; 8,4)	6,61	<i>d</i> (8,0)	6,58	<i>d</i> (8,1)
7	CH ₂	2,79	<i>t</i> (7,8)	2,83	<i>m</i>	2,8	<i>m</i>
8	CH ₂	4,05 - 3,73	<i>m, dd</i> (5,3; 7,8)	3,98 - 3,71	<i>m</i>	4,05 - 3,75	<i>m</i>
Glucose							
1'	CH	4,37	<i>d</i> (7,8)	4,41	<i>d</i> (8,0)	4,39	<i>d</i> (7,9)
2'	CH	3,39	<i>dd</i> (7,8; 9,3)			3,4	<i>d</i> (9,2; 7,9)
3'	CH	3,81	<i>t</i> (9,3)	3,8	<i>m</i>	3,81	<i>t</i> (9,2)
4'	CH	4,92	<i>t</i> (9,3)	5,16	<i>m</i>	4,93	<i>m</i>
5'	CH					3,56	<i>m</i>
6'	CH ₂	3,61 - 3,55	<i>m</i>	3,71 - 3,55	<i>m</i>	3,71 - 3,56	<i>m</i>
Ramnose							
1''	CH	5,18	<i>d</i> (1,8)	5,22		5,20	<i>d</i> (2,0)
2''	CH	3,91	<i>dd</i> (1,8; 3,0)	3,92	<i>m</i>	3,93	<i>m</i>
3''	CH	3,58	<i>dd</i> (3,0; 9,6)	3,68		3,59	<i>m</i>
4''	CH	3,3	<i>t</i>	3,34	<i>t</i>	3,32	<i>m</i>
5''	CH	3,53	<i>dq</i> (9,6; 6,0)			3,59	<i>m</i>
6''	CH ₃	1,09	<i>d</i> (6,0)	1,11	<i>d</i> (8,0)	1,10	<i>d</i> (6,2)

A estrutura proposta para o composto 1, verbascosídeo, é apresentada na figura 12.

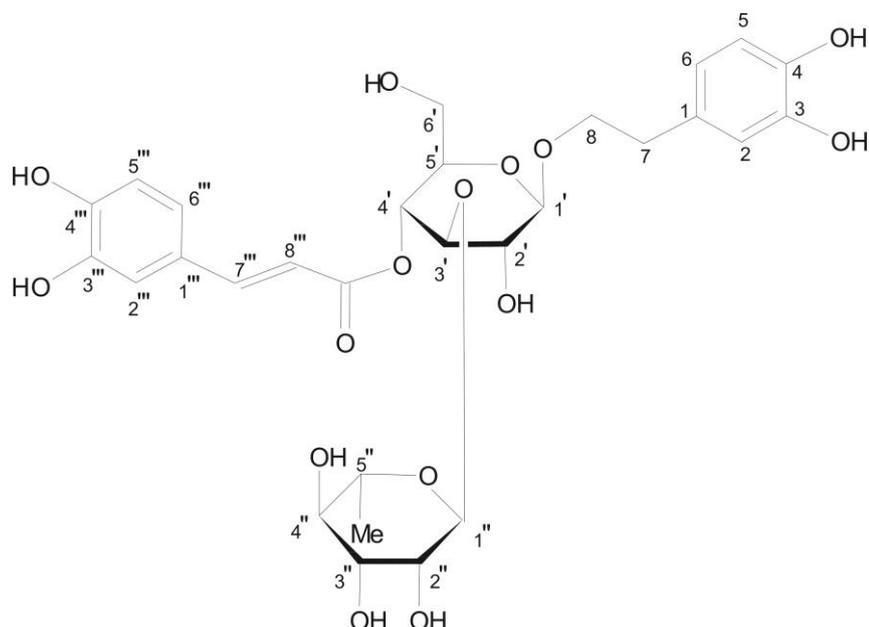


Figura 12. Estrutura verbascosídeo.
Fonte: Gitzel Filho *et al.*, 2012.

4.3.2 Composto 2

O espectro de RMN ^1H para o composto 2 obtido das frações 20-25 do extrato metanólico das folhas e as frações 14-16 do extrato metanólico dos caules está apresentado em anexo.

O espectro de RMN ^1H (em anexo) do composto 2 apresentou sinais em δ 7,58 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-6'), δ 7,44 (1H, s, H-2'), δ 6,94 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-5') e δ 6,97 (1H, s, H-3) atribuídos a hidrogênios ligados a carbono sp^2 . O sinal em δ 3,87 (3H, s, H-OCH₃) foi atribuído a hidrogênios de grupo metoxila. Os dubletos em δ 5,20 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-6) e δ 6,74 (1H, H-8), foram atribuídos a hidrogênios aromáticos com relação *meta* entre si. Sinais na região δ 2,0 \pm 1,0 indicam presença de dois grupos acetilados e sinais na região de 3,0 e 4,0 ppm sugerem a presença de dois açúcares na molécula. A posição de glicosilação é em C-7, já que os valores são compatíveis com a literatura (SAHIN *et al.*, 2004; PARK *et al.*, 2007; ALIPIEVA *et al.*, 2009).

O espectro de RMN ^{13}C (em anexo) apresentou sinais δ 182,46 (C-4), δ 151,52 (C-4'), δ 164,64 (C-7), δ 162,74 (C-2), δ 161,59 (C-5), δ 157,33 (C-9), δ 148,52 (C-3'), δ 121,62 (C-1'), δ 120,90 (C-6'), δ 116,12 (C-5'), δ 110,81 (C-2'), δ 103,89 (C-3), δ 105,80 (C-10), δ 99,57 (C-6) e δ 95,04 (C-8). Um sinal em δ 56,45 foi associado a um carbono sp^3 oxigenado.

O espectro de massas (em anexo) obtido é compatível com uma flavona do tipo crisoeriol, juntamente com dois açúcares e diacetilação na molécula. O espectro de massas da flavona mostrou pico em (m/z 732, $[\text{M}^+]$), correspondente ao íon molecular. A comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto 2 com aqueles publicados na literatura (Tabela 3) indicou a estrutura 5,7,4' tri-hidroxi -3'-metoxiflavona (crisoeriol) para a aglicona desta flavona (Figura 13), descrita pela primeira vez para o gênero *Glandularia*.

Tabela 3. Comparação de dados de RMN ^{13}C do composto 2 com os descritos na literatura para crisoeriol (PARK *et al.*, 2007).

	Composto 2	Crisoeriol
C	δC	δC
2	162,74	163,7
3	103,89	103,2
4	182,46	181,8
5	161,59	161,5
6	99,57	98,56
7	164,64	164,2
8	95,04	94,1
9	157,33	157,4
10	105,80	103,7
1'	121,62	121,5
2'	110,81	110,2
3'	148,52	148,1
4'	151,52	150,8
5'	116,12	115,8
6'	120,90	120,4
3'OMe	56,48	56,0

Pelos dados espectroscópicos verifica-se a presença duas oses e dois acetatos. Esta porção da molécula ainda não está totalmente definida, sendo necessários outros métodos espectroscópicos como NOESY, que serão obtidos oportunamente.

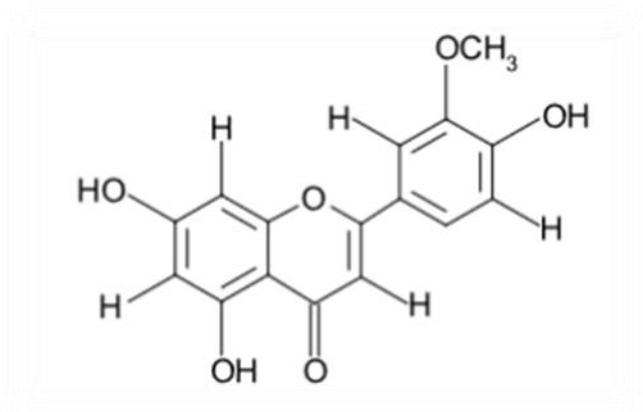


Figura 13. Estrutura do crisoeriol

4.3.3 Composto 3

O espectro de RMN ^1H (em anexo) obtido das frações 35-47 do extrato metanólico das folhas para o composto 3 apresentou sinais em δ 7,59 (1H, d, $J = 4,0$ Hz, H-6'), δ 7,57 (1H, s, H-2'), δ 6,94 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-5') e δ 6,97 (1H, s, H-3) atribuídos a hidrogênios ligados a carbono sp^2 . O sinal em δ 12,95 (1H, s, 5-OH) corresponde a uma hidroxila em posição *para* a uma carbonila e um sinal simples e intenso em δ 3,87 (3H, s, H-OCH₃) atribuídos a hidrogênios de grupo metoxila. Os dubletos em δ 5,17 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-6) e δ 6,80 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-8), foram atribuídos a hidrogênios aromáticos com relação *meta* entre si. Sinal na região δ 2,0 \pm 1,0 para RMN ^1H e sinal 170, 43 ppm para RMN ^{13}C confirmam a presença de grupo acetilado. Sinais na região de 3,0 e 4,0 ppm sugere a presença de açúcar na molécula. A posição de glicosilação é em C-7, já que os valores são compatíveis com a literatura (SAHIN *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2007; ALIPIEVA *et al.*, 2009) conforme apresentado na tabela 7.

O espectro de RMN ^{13}C apresentou sinais δ 182,46 (C-4), δ 164,62 (C-7), δ 162,99 (C-2), δ 161,56 (C-5), δ 157,38 (C-9), δ 148,52 (C-3'), δ 121,68 (C-1'), δ

120,96 (C-6'), δ 116,23 (C-5'), δ 110,78 (C-2'), δ 105,77 (C-3), δ 103,87 (C-10), δ 98,21 (C-6) e δ 95,08 (C-8). Um sinal em δ 56,45 foi associado a um carbono sp^3 oxigenado. A Tabela 4 mostra a comparação dos dados adquiridos no RMN ^{13}C com a literatura.

Tabela 4. Comparação de dados de RMN ^{13}C do composto 3 com os descritos na literatura para crisoeriol (SAHIN *et al.*, 2004).

	Composto 3	Crisoeriol
C	δC	δC
2	162,99	164,2
3	103,87	103,4
4	182,46	182,0
5	161,56	161,1
6	99,56	99,3
7	164,62	162,6
8	95,08	94,8
9	157,38	156,9
10	105,77	105,3
1'	121,68	121,1
2'	110,78	110,2
3'	148,52	148,1
4'	-	151,2
5'	116,23	115,7
6'	120,96	120,5
3'OMe	56,45	56,9

O espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear 1H e ^{13}C (HMBC) em anexo, mostrou os acoplamentos à longa distância entre o hidrogênio em δ 6,97 (H-3) com os carbonos em δ 162,99 (C-2), δ 105,77 (C-10) e o H da metoxila em δ 3,87 com o carbono δ 148,52. (C-3'). Nesta análise, observa-se ainda a posição relativa do grupo metoxila no carbono 3', sendo possível determinar através da correlação do hidrogênio do grupo metoxila em δ 3,87 (O-CH₃) com o carbono em δ 148,52 (C-3'), como mostrado na sub-estrutura abaixo (Figura 14).

A reunião de todos os dados espectroscópicos descritos acima permitiu sugerir para o composto 3 a estrutura de uma flavona.

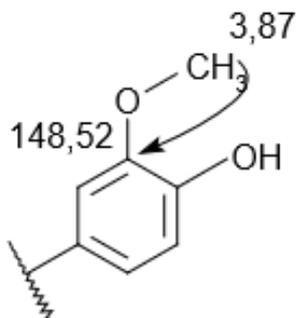


Figura 14. Sub-estrutura do composto 3

O espectro de RMN heteronuclear ^1H e ^{13}C à uma ligação com detecção no canal de hidrogênio (HSQC) permitiu associar os sinais de hidrogênio da aglicona a maioria de seus carbonos (Tabela 5).

Tabela 5. Correlação heteronuclear de RMN ^1H e ^{13}C (HSQC e HMBC) do composto 3.

	^{13}C	HSQC	HMBC
C	δC	δH	
2	162,99		(H - 3)
3	103,87	6,97 (1H, s)	
4			
5			
6	99,56	6,38 (1H, d, $J=0,72$ Hz)	
7			
8	95,08	6,80 (1H, d, $J=0,24$ Hz)	
9			
10	105,77		(H - 3)
1'			
2'	121,68	7,57 (1H, s)	
3'	148,52		OCH ₃
4'			
5'	116,23	6,97 (1H, s)	
6'	120,96	7,57 (1H, s)	
OCH ₃	56,45	3,87 (3H,s)	

4.3.4 Composto 4

O espectro de RMN ^1H (em anexo) para o composto 4 obtido da fração 34 do extrato metanólico de caules revelou a estrutura de um iridoide. A comparação de RMN ^{13}C da literatura com os valores obtidos, confirmou a estrutura e o modelo do composto, permitindo a identificação de $6\beta\text{-OH-ipolamiida}$ (Tabela 6). O valor de RMN ^{13}C (em anexo) da metila do C-10 (δ 19,75) na literatura é muito similar com outros compostos como o lamiol e harpagida. Este fato se dá pois todos tem uma função β -hidroxila no C-6, um grupo metileno no C-7, uma β -hidroxila e uma α -metila no C-8.

Tabela 6. Comparação de dados de RMN ^{13}C do composto 4 com os descritos na literatura para $6\beta\text{-OH-ipolamiida}$ (DE LUCA *et al.*, 1983).

	Composto 4	$6\beta\text{-OH- ipolamiida}$
C	δC	δC
1	93,63	94,2
3	151,78	154,5
4	113,36	112,8
5	69,62	70,4
6	-	74,5
7	44,97	47,0
8	74,1	74,1
9	56,72	59,1
10	19,75	23,6
11	168,19	169,0
OMe	51,76	52,7
1'	99,3	99,3
2'	72,35	73,3
3'	75,9	76,1
4'	69,64	70,4
5'	76,31	77,2
6'	60,03	61,5

Os dados obtidos do composto 4 também são similares ao iridoide ipolamiida, entretanto, o sinal no C-8 é mais blindado na $\beta\text{-OH-ipolamiida}$ do que na ipolamiida. Isto, seria devido a falta do efeito γ da OH do C-6 e, no C-5 aparece um sinal mais

desblindado para a ipolamiida como encontrado para outros iridoides glucosídeos tendo C-5/C-6 uma função β -*cis*-diol. Este comportamento está de acordo com a interação *cis*-diaxial entre as hidroxilas (DE LUCA *et al.*, 1983).

A estrutura proposta para 6 β - OH-ipolamiida (Figura 15) também está de acordo com os valores encontrados no espectro de RMN ^1H . Um sinal em δ 4,71 (1H, d) indica presença de hidrogênio anomérico de glucose β . Os sinais δ 3,69 (s, CO₂, Me), δ 2,35 (d, H-9) e δ 1,00 (s, 10-Me) também foram observados.

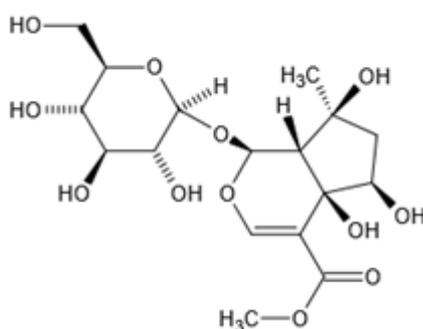


Figura 15. Estrutura de 6- β - OH – ipolamiida

Na análise em CLAE-EM, o espectro de massas do composto 4 obtido por injeção direta exibiu um pico íon molecular $[\text{M}+\text{Na}]^+$ em 445 m/z , que consiste na fórmula molecular C₁₇H₂₆O₁₂.

4.4 CITOTOXICIDADE

A preparação dos extratos foi descrita no item 4.2.1, sendo o extrato metanólico submetido à *secura* em fluxo de nitrogênio e ressuspendido com água. As Figuras 16A a 16D apresentam os resultados obtidos pelos testes do MTT e Vermelho neutro para avaliação dos efeitos citotóxicos dos extratos das partes de *Glandularia selloi*.

Observou-se alterações nas funções celulares em todos os extratos em ambos os ensaios, entretanto, não se observou um efeito dose dependente. O efeito

citotóxico ocorreu com doses mais baixas de extrato aquoso, ou seja, o meio de cultura com extrato resultou em valores de atividade mitocondrial ou de viabilidade lisossomal abaixo de 70% em relação ao controle negativo.

O teste do Vermelho neutro mostrou diminuição significativa na viabilidade celular a partir da concentração de 10 µg/mL para os extratos de raízes, folhas e inflorescências em 24 horas de tratamento. Curiosamente, para o extrato de caules, apenas a concentração mais baixa, 0,01 µg/mL, mostrou-se citotóxica tanto para o teste de VN como para o MTT.

Todavia, o teste de MTT revelou efeito citotóxico em todas as concentrações dos extratos, entretanto, na maior concentração dos extratos de raízes e inflorescências o efeito anti-proliferativo foi menor.

As alterações morfológicas provocadas pelos extratos das partes da *Glandularia selloi* são apresentadas na Figura 17. O efeito de destacamento das células da superfície de crescimento é visível na concentração 10 µg/mL no extrato de raízes (Figura 17-A), no extrato de folhas na concentração de 100 µg/mL (Figura 18-O) e no extrato de caules na concentração de 0,01 µg/mL.

Algumas células começaram a perder a sua forma característica, tornando-se redondas e de tamanho mais reduzido, acabando por desprender da superfície de crescimento. Com o aumento gradual da concentração nos extratos de folhas (Figura 17 N e O) respectivamente, verificou-se o decréscimo do número de células aderentes e o aumento do número de células em suspensão. A morfologia do controle negativo manteve-se inalterada durante as 24 horas de tratamento.

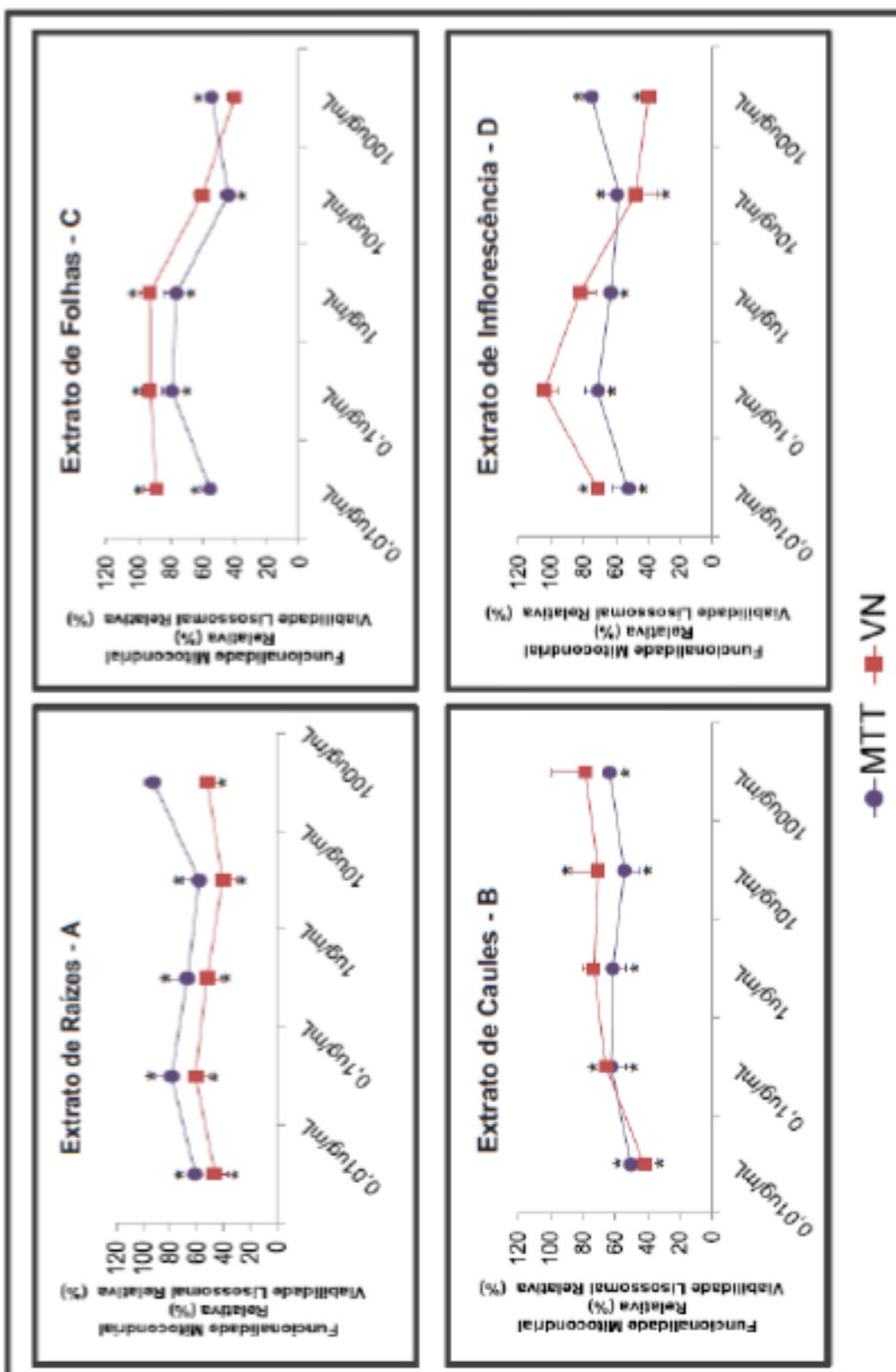


Figura 16. Comparação entre os valores de viabilidade celular pelo teste do MTT e VN em células Vero expostas a (0,01; 0,1; 1; 10 e 100 µg/mL) por 24 horas dos extratos de raízes, caules, folhas e inflorescências de *Glandularia selloi*. Cada ponto representa a média de 3 replicados ± desvio padrão.



Figura 17. Morfologia de células vero expostas aos extratos aquosos das partes de *Glandularia selloi* por 24 h.

O gênero *Gandularia* é representado por cerca de 80 espécies, sendo que 80 ocorrem na América do Sul e do Norte. Para o território nacional encontra-se 33 espécies dentre elas *Glandularia selloi*. Contudo, não há dados fitoquímicos referentes a nenhuma espécie deste gênero no Brasil. É surpreendente que um gênero com tantas espécies e de distribuição relativamente farta em algumas regiões do estado do Rio Grande do Sul, não tenha sido estudada química e/ou biologicamente até o momento.

Os perfis químicos apresentados nos cromatogramas das diversas partes de *Glandularia selloi* demonstraram composição semelhante quanto a TR e espectro de UV. Entretanto, foi possível verificar visualmente concentrações diferentes nos extratos. O extrato de raízes é o que apresenta menor concentração de compostos químicos quando comparado aos demais extratos, porém, pode-se afirmar que o verbascosídeo é o composto majoritário em todos os extratos.

Constatou-se que para os extratos de folhas e caules há presença de um composto com espectro de UV semelhante ao destinados a flavonas em maior quantidade quando comparados ao extrato de raízes e inflorescência. Entre estes extratos, este composto apresenta-se em maior concentração no extrato de folhas. Também é possível visualizar que a expressão de compostos após 13 minutos até 18 minutos nos cromatogramas é maior no extrato de folhas.

No extrato metanólico de inflorescências foi possível visualizar a presença de dois compostos em maior quantidade após 18 minutos no cromatograma, o que não é verificado nos demais extratos.

Os feniletanoides glicosídeos ocorrem amplamente em dicotiledôneas. As famílias mais amplamente estudadas são Scrophulariaceae (35 espécies), Oleaceae (25 espécies), Plantaginaceae (25 espécies), Lamiaceae (15 espécies) e Orobanchaceae (14 espécies). O primeiro feniletanoide glicosídeo a ser estudado foi o verbascosídeo em 1925 por Bridel e Charaux. Esse composto também é conhecido como acteosídeo, kusagina e orobanchina, frequentemente ocorrendo em uma mistura de fenilpropanoides glicosídeos estruturalmente relacionados. Contudo,

geralmente é o constituinte principal, compreendendo até 6% do peso seco de material foliar (SCOGIN, 1992; JIMÉNEZ e RIGUERA, 1994).

Feniletanoides têm desempenhado um papel importante em estudos de quimiotaxonomia vegetal. Exemplo a citar é o estudo qualitativo e quantitativo de feniletanoides em extratos metanólicos de cinco espécies do gênero *Phlomis* (Lamiaceae), incluindo *Phlomis nissolii*, *P. leucophracta*, *P. bruguieri*, *P. russeliana* e *P. kurdica*. Os resultados demonstraram que as variações no teor de feniletanoides podem ser usadas para estudo quimiotaxonômicos dentro do mesmo gênero (JIMÉNEZ e RIGUERA, 1994; KIRMIZIBEKMEZ *et al.*, 2005)

Estudos demonstram propriedades antioxidantes para verbascosídeo (HE *et al.*, 2000). Lin e colaboradores (2004) demonstraram que sete feniletanoides, incluindo verbascosídeo, extraídos de *Orobanchae caerulescens* Stephan (Orobanchaceae) foram capazes de suprimir a formação de conjugado de dieno com uma potência mais elevada do que o resveratrol, um fenólico antioxidante da uva.

Em algumas doenças, como câncer, danos ao DNA induzidos por radicais de oxigênio tem sido muitas vezes considerado como um evento causador. Assim, a busca por inibidores de radicais eficazes antes de causar danos no DNA ou agentes que podem reparar o DNA em idade crítica é crucial. Li e colaboradores (1997) verificaram que verbascosídeo e pediculariosídeo A podem suprimir a formação de lesão na timina e são, portanto, radioprotetores e potenciais anticancerígenos.

O composto verbascosídeo, isolado do extrato metanólico das folhas, foi identificado por técnicas espectroscópicas, substância relatada pela primeira vez para esta espécie.

No espectro de UV visível foi possível visualizar picos de absorbâncias característicos de flavonas: Banda I (usualmente 300 – 380 nm) e Banda II (usualmente 240 – 280 nm) (MABRY *et al.*, 1970). O composto 2 e 3, isolados de extratos metanólicos de folhas e caules, foram identificados como flavonoide do grupo das flavonas, crisoeriol. O conjunto crisoeriol diacetilado e diglicosilado é inédito, sem precedentes para a família Verbenaceae e demais famílias.

Flavonas são marcadores quimiotaxonômicos, a presença de tipos específicos de flavonas O-glicosídicas em algumas espécies de plantas tem implicações para a pesquisa quimiosistemática. Contudo, trabalhos apresentam crisoeriol acetilado na família Lamiaceae, a citar como exemplo a *Sideritis lanata* (Lamiaceae), crisoeriol 7-O-(6-O-acetil- β -Glc_p) isolado das partes aéreas (ALIPIEVA *et al.*, 2009). Sarkhail e colaboradores (2006) isolaram de *Phlomis olivieri* Benth. e *Phlomis persica* Boiss. (Lamiaceae) verbascosídeo e crisoeriol 7-O- β -D-glucosídeo; e crisoeriol 7- β -D-(3''-E-p-coumaroila) glucosídeo e lamiideo, respectivamente.

Maiores discussões acerca da importância destes metabólitos identificados neste táxon, no contexto taxonômico das espécies de ocorrência no estado do Rio Grande do Sul, devem aguardar estudos posteriores em outras espécies do gênero.

Neste trabalho não foi possível confirmar a localização da acetilação de ambas as flavonas isoladas assim como seus respectivos açúcares. Contudo, a glicosilação é compatível com valores da literatura, sugerindo que a mesma ocorra no carbono 7 do anel A. Sabe-se também que é mais comum e frequente encontrar glicosilação em 7-OH ou 4' -OH em flavonas do que em 5-OH (VEITCH e GRAYER, 2011).

O composto 4, um iridoide, foi identificado sendo 6- β -ipolamiida. Iridoides representam um grupo grande de ciclopentano (c) pirano monoterpenos que são geralmente glicosídeos, presente em um grande número de famílias de plantas.

Em espécies da família Lamiaceae a atividade antitumoral foi atribuída à ipolamiida, presente em *Phlomis armienica* e *Scutellaria salviifolia* (SARACOGLU *et al.*, 1995). Da mesma forma, a atividade anti-inflamatória determinada para espécie *Stachytarpheta cayennensis* (Verbenaceae), também deve-se a esse composto.

Neste estudo, os ensaios de MTT e VN foram capazes de mostrar os efeitos celulares de extratos aquosos das partes de *Glandularia selloi*. O extrato aquoso das folhas foi o único que apresentou efeito dose-dependente. Isto poderia ser justificado pela presença de verbascosídeo que apresenta citotoxicidade já relatada e formador de radicais livres (Fu *et al.*, 2008), justamente o que os testes empregados avaliam,

estresse oxidativo através da liberação de radicais livres. Entretanto, comparando o extrato de folhas com o extrato de raízes, onde o verbascosídeo é o composto majoritário e o que apresenta maior concentração dos demais, o efeito citotóxico não é tão expressivo quanto no extrato das folhas. Contudo, esses resultados nos mostram que outros compostos mesmo em menores concentrações podem estar envolvidos nesse processo.

No extrato aquoso de caules verificou-se perda de 60% de viabilidade celular na menor concentração 0,01 µg/mL, diferente do extrato de folhas em que nessa concentração a perda celular foi em torno de 20%. Efeito inverso foi observado na maior concentração, de 100 µg/mL, somente 20% de viabilidade celular. Sendo os extratos semelhantes em relação a composição química, o que poderia estar causando essa diferença nos resultados seria a concentração dos compostos químicos. Os compostos observados após 13 minutos no cromatograma do extrato de caules são menores que no extrato de folhas, sendo assim, em concentrações mais baixas atuam como protetores e em concentrações mais altas como oxidantes. Também, existe outra diferença, a presença de iridoide em maior concentração no extrato de caules, composto que poderia estar atuando como um protetor.

Com estes resultados obtidos é possível verificar a presença de atividade antiproliferativa e citotóxica desta espécie, indicando seu potencial terapêutico para inibição do ciclo celular.

Quanto ao extrato de caules, segundo Fikejö (1994), testes de genotoxicidade devem ser realizados quando a atividade antiproliferativa se mostra tão eficiente em concentrações baixas, pois fornece excelente parâmetro de análises citotóxica, além da observação da ocorrência de alterações cromossômicas no ciclo celular usado como indicativo para prevenir o consumo humano deste táxon.

Importante salientar, que muitos dos agentes empregados na terapia do câncer, são derivados de fontes naturais e foram descobertos a partir de testes de citotoxicidade por inibirem a proliferação de células cancerosas em modelos *in vitro* e *in vivo* (CRAAG e NEWMAN, 2005).

CONCLUSÕES

Este trabalho relata o primeiro estudo químico e biológico da espécie *Glandularia selloi*, planta nativa do Rio Grande do Sul.

Verificou-se que os extratos de raízes, caules, folhas e inflorescências de *Glandularia selloi* apresentam composição semelhante, porém, concentrações diferentes.

Constatou-se que o verbascosídeo é o composto majoritário em todas as partes da planta, mas apresenta maior concentração nas raízes.

Foram isolados e identificados 4 compostos dos caules e folhas de *Glandularia selloi*, verbascosídeo, crisoeriol diglicosilado-monoacetilado e, crisoeriol diglicosilado-diaetilado e 6- β -ipolamiida.

As flavonas encontradas até o momento são estruturas inéditas descritas para a família Verbenaceae e demais famílias.

Testes de citotoxicidade demonstraram que o extrato metanólico das folhas apresentou um efeito dose-dependente. O extrato metanólico de caules apresentou um comportamento inverso do extrato das folhas, sendo mais citotóxico na concentração menor. Sendo assim, esses resultados sugerem que o verbascosídeo é um co-adjuvante no efeito citotóxico dos extratos.

Outros ensaios com diferentes tipos celulares incluindo linhagens tumorais ajudariam elucidar possíveis efeitos biológicos dos extratos.

AGATIA, G.; AZZARELLO, E.; POLLASTRI, S.; TATTINI, M. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. **Plant Science**, v.196, p. 67-76, 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010. Resolução-RDC nº 14, de 31 de março de 2010. Brasília, Brasil.

AHMAD, N.; ZEB, F.; AHMAD, I.; WANG, F. Reperins A-D, four new antioxidative coumarinolignoids from *Duranta repens* Linn. **Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters**, v.19, p. 3521-3524, 2009.

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

ALIPIEVA, K.I.; KOSTADINOVA, E.P.; EVSTATIEVA, L.N.; STEFOVA, M.; BANKOVA, V.S. An iridoid and a flavonoid from *Sideritis lanata* L. **Fitoterapia**, v. 80, p. 51-53, 2009.

ATKINS, S. 2004. Verbenaceae. P. 449-468. In: Kadereit, J. **The Families and Genera of Vascular Plants**. VII. Flowering Plants: Dicotyledons: Lamiales (except Acanthaceae including Avicenniaceae). Berlin, Springer.

BAQUAR, S.R., 1995. **The role of traditional medicine in rural environment**. In: Issaq, S. (Ed.), *Traditional Medicine in Africa*. East Africa Educational Publishers Ltd., p. 141-142.

BARBOSA, F.G.; LIMA, M.A.S.; BRAZ-FILHO, R.; SILVEIRA, E.R. Iridoid and phenylethanoid glycosides from *Lippia alba*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.34, p.819-821, 2006.

BARREIRO, E.; BOLZANI, V. DA S. Biodiversidade fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v.32, p. 679- 688, 2009.

BENTHAM, G.; HOOKER, J.D. 1876. *Genera Plantarum* 2 (2): 1131-1160.

BERRIDGE, M.V.; HERST, P.M.; TAN, A.S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. **Biotechnology Annual Review**, v. 11, p. 127-152, 2005.

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

BLANCO, M.A.; COLAREDA, G.A.; VAN BAREN, C.; BANDONI, A.L.; RINGUELET, J.; CONSOLINI, A.E. Antispasmodic effects and composition of the essential oils from two South American chemotypes of *Lippia alba*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, p. 803-809, 2013.

BORENFREUND, E.; BABICH, H.; ALGUACIL, N.M. Comparisons of two *in vitro* cytotoxicity assays-the neutral red (nr) and tetrazolium mtt tests. **Toxicology in Vitro**, v.2, p. 1-6, 1988.

BRIDEL, M.; CHARAUX, C. Sur le processus du noircissement des Orobanches au cours de leur dessiccation. **C. R. hebd. Seanc. Acad. Sci.**, v. 180, p. 387-388, 1925.

BRIQUET, J. 1895. Verbenaceae. Pp. 132-182. In: Engler, A. & Prantl, K. Die natürlichen Pflanzenfamilien 4, v. 3a. Leipzig, W. Engelmann.

BUDZIANOWSK, J.; RZYPCAK, L. Phenylproaid estrfom Lamiu lb flowers. **Phytochemistry**, v.38, n.4, p.97-10, 1995.

BUTLER, M. **Animal cell culture and technology**. 2. ed. London: England: Taylor & Francis, 2004.

CALVO, M.I.; VILALTA, N.; SAN JULIAN, A.; FERNÁNDEZ, M. Anti-inflammatory activity of leaf extract of *Verbena officinalis* L. **Phytomedicine**, v. 5, p. 465-467, 1998.

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

CASANOVA, E., GARCÍA-MINA, J. M.; CALVO, M.I. Antioxidant and antifungal activity of *Verbena officinalis* L. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 63, p. 93-97, 2008.

CHEYMOL, J. 1937. Le verbenalósíde. **Étude chimique et physiologique**. Thesis. Paris.

CHEBIL, L.; HUMEAU, C.; FALCIMAIGNE, A.; ENGASSER, J.; GHOUL, M. Enzymatic acylation of flavonoids. **Process Biochemistry**, v.41, p. 2237-2251, 2006.

CONCEIÇÃO, A.O.; DE OLIVEIRA, F.F.; DE OLIVEIRA, R.A.; JUNIOR, A.J.S.; TARSER, L.; REYES-MORENO, C.; LAFOND, J. *Lantana macrophylla* Schauer (Verbenaceae) ethanolic extract induces activation of ERK1/2 and p38 MAPKs pathway and Ca²⁺ imbalance in human trophoblasts detived cell lins. **Food and Chemical Toxicology**, v.50, p. 1001-1012, 2012.

COOK, N.C.; SAMMAN, S. Flavonoids: Chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. **Nutritional Biochemistry**, v.7, p. 66-76, 1996.

COSTA, V.B.; COUBE, C.S.; MARINHO, B.G.; MATHEUS, M.E.; LEITAO, S.G.; FERNANDES, P.D. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Bouchea fluminensis*. **Fitoterapia**, v. 74, p.364–371, 2003.

CRAAG, G. M.; NEWMAN, D.J. Plants as source of anticancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 72-9, 2005.

CUNHA, A.P. **Farmacognosia e fitoquímica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbernkian, 670 p, 2005.

CUSHNIE, T.P.T.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 343-356, 2005.

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of Mass Spectrometry**, v.39, p. 1-15, 2004.

DAMTOFT, S.; JENSEN, S.R.; NIELSEN, B.J. Iridoids in *Verbena*. **Taxon**, v. 28(5/6), p. 525-528, 1979.

DAY, A. J.; DUPONT, M. S.; RIDLEY, S.; RHODES, M.; RHODES, M. J. C.; MORGAN, M. R. A.; WILLIAMSON G. Deglycosilation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver β -glucosidase activity. **FEBS Letters**, v. 436, p. 71-75, 1998.

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

DELAPORTE, R.H.; SANCHEZ, G.M.; CUELLAR, A.C.; GIULIANI, A.; DE MELLO, J.C.P. Anti-inflammatory activity and lipid peroxidation inhibition of iridoid lamiide isolated from *Bouchea fluminensis* (Vell.) Mold. (Verbenaceae). **Journal of Ethnopharmacology** v. 82, p. 127-130, 2002.

DE LUCA, C.; GUISO, M.; MARTINO, C. 6- β -hydroxyipolamiide, an iridoid glucoside from *Stachytarpheta mutabilis*. **Phytochemistry**, v.22, (5), p. 1185 -1187, 1983.

DINDA, B.; DEBNATH, S.; HARIGAYA, Y. Naturally occurring iridoids. A review, Part 1. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 55(2), p.159-222, 2007a.

DINDA, B.; DEBNATH, S.; HARIGAYA, Y. Naturally occurring secoiridoids and bioactivity of occurring iridoids and secoiridoids. A review, Part 2. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 55(5), p.689-728, 2007b.

DINDA, B.; DEBNATH, S.; BANIK, R. Naturally occurring iridoids and secoiridoids, an updated review, part. 4. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 59 (7), p. 803-833, 2011.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. São Paulo: Editora UNESP, p.323-330, 2002.

EL-NAGGAR, L.J.; BEAL, J.L. Iridoids, a review. **Journal of Natural Products**, v.43 (6), p. 649-707, 1980.

FERRAZ, R.P.C.; BONFIM, D.S.; CARVALHO, N.C.; SOARES, M.B.P.; DA SILVA, T.B.; MACHADO, W.J.; PRATA, A.P.N.; COSTA, E.V.; MORAES, V.R.S.; NOGUEIRA, P.C.L.; BEZERRA, D.P. Cytotoxic effect of leaf essential oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae). **Phytomedicine**, v.20, p. 615-621, 2013.

FIKEJÖ, G. Allium Test II: Assesmente of chemical's genotoxic potential by recording aberrations in chromosomes and cell divisions in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Toxicology and Water Quality**, v. 9, p. 235-41, 1994.

FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. 5.ed. New Jersey, EUA, 2005.

FU, G.; PANG, H.; WONG, Y.H. Naturally occurring phenylethanoid glycosides: potential leads for new therapeutics. **Current Medicinal Chemistry**, v.15, p. 2592-2613, 2008.

FUNES, L.; LAPORTA, O.; CERDÓN-CALERO, M.; MICOL, V. Effects of verbascoside, a phenylpropanoid glycoside from lemon verbena, on phospholipid model membranes. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.163, p.190-199, 2010.

GÁLVEZ, M.; MARTÍN-CORDERO, C.; AYSO, M.J. Pharmacological activities of iridoids biosynthesized by route II. **Natural Products Chemistry**, v. 32, p. 365-394, 2005.

GHISALBERTI, E.L. Biological and pharmacological activity of naturally occurring iridoids and secoiridoids. **Phytomedicine**, v.5 (2), p.147-163, 1998.

GITZEL FILHO, A.; MOREL, A. F.; ADOLPHO, L.; ILHA, V.; GIRALT, E.; TARRAGÓ, T.; DALCOL, I. I. Inhibitory effect of verbascoside isolated from *Buddleja brasiliensis* Jacq. ex Spreng on prolyl oligopeptidase activity. **Phytotherapy Research**. v.10, n.26, p. 1472-1475, 2012.

GOLENIOWSKI, M.E.; BONGIOVANNI, G.A.; PALÁCIO, L.; NUÑEZ, C.O.; CANTERO, J.J. Medicinal plants from the "Sierra de Comechingones". **Journal of Ethnopharmacology**, v.107, p. 324-341, 2006.

HAMSAR, M. N.; MIZATON, H. H. Potential of ant nest plants as an alternative cancer Treatment. **Journal of Pharmacy Research**, v.5, n.6, p. 3063-3066, 2012.

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**, v.5, n.7, p. 294-300, 2000.

HE, Z. D.; BUT, P.P.H.; CHAN, T.W.D.; DONG, H.; XU, H.X.; LAU, C.P.; SUN, H.D. Antioxidant activity of phenylethanoid glycosides from *Brandisia hancei*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.71, p. 483-486, 2001.

HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBLIYA, D.J. Flavonoids antioxidants: Chemistry, metabolism and structure- activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.13, p. 572-584, 2002.

HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; JOSEPH, H.; BAILLEUL, F. Phenolics and iridoids of *Lippia alba*. **Natural Product Communications**, v.1, p. 727-730, 2006.

HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; JOSEPH, H.; BAILLEUL, F. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.116, p. 211-222, 2008.

HERNÁNDEZ, N.E., TERRESCHUK, M.L.; ABDALA, L.R. Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafi del Valle (Tucumán, Argentina). **Journal of Ethnopharmacology**, v.73, p. 317-322, 2000.

HOLLMAN, P. C.; de VRIES, J. H. M.; van LEEWEN, S. D.; MENGELERS, M. J. B.; KATAN, M. B. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.62, p. 1276-1282, 1995.

IWASHINA, T. The structure and distribution of the flavonoids in plants. **Journal of Plant Research**, v.113, p. 287-299, 2000.

JENSEN, S.R. Systematic implications of the distribution of iridoids and other chemical compounds in the Loganiaceae and other families of the asteridae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v.79, n.2, p. 284-302, 1992.

JENSEN, S.R.; FRANZUK, H.; WALLANDER, E. Chemotaxonomy of the Oleaceae iridoids as taxonomic markers. **Phytochemistry**, v.60, p. 213-231, 2002.

JIMÉNEZ, C.; RIGUERA, R. Phenylethanoid glycosides in plants: structure and biological activity. **Natural Product Reports**, p. 591-606, 1994.

JUSTESEN, U.; KNUTHSEN, P.; LETH, T. Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v.799, p. 101-110, 1998.

KIRMIZIBEKMEZ, H.; MONTORO, P.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; DOENMEZ, A.; CALIS, I. Identification by HPLC-PAD-MS and quantification by HPLC-PAD of phenylethanoid glycosides of five *Phlomis* species. **Phytochemical Analysis**, v.16, n.1, p.1-6, 2005.

KUMAR, D.; KUMAR, A.; PRAKASH, O. Potential antifertility agents from plants: A comprehensive review. **Journal of Ethnopharmacology**, v.140, p. 1- 32, 2012.

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

LEITÃO, G.G.; ANDRE DE SOUZA, P.; MORAES, A.A.; BROWN, L. Step-gradient CCC separation of phenylpropanoid and iridoid glycosides from roots of *Stachytarpheta cayennensis* (Rich). Vahl. **Journal of Liquid Chromatography e Related Technologies**, v. 28, n.12, p. 2053-2060, 2005.

LI, W. Y.; ZHENG, R. L.; JIA, Z. J.; ZOU, Z. H.; LIN, N. Y. Repair effect of phenylpropanoid glycosides on thymine radical anion induced by pulse radiolysis. **Biophysical Chemistry**, v.67, p. 281-286, 1997.

LIN, L.C.; CHIOU, W.F.; CHOU, C.J. Phenylpropanoid glycosides from *Orobancha caerulea*. **Planta Medica**, v.70, p. 50-53, 2004.

LISTA DE ESPÉCIES DA FLORA DO BRASIL. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 12 de abril de 2014.

LUPU, A. R.; POPESCU, T. The noncellular reduction of MTT tetrazolium salt by TiO₂ nanoparticles and its implications for cytotoxicity assays. **Toxicology in Vitro**, v. 27, p. 1445–1450, 2013.

MABRY, M.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. In: **The Systematic Identification of Flavonoids**, New York: Springer, 1970, p. 41.

MALICH, G., MARKOVIC, B., WINDER, C. The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the *in vitro* cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. **Toxicology**, v.124, p. 179-192, 1997.

MARCH, R.; BRODBRELT, J. Analysis of flavonoids: Tandem mass spectrometry computational methods and NMR. **Journal of mass spectrometry**, v.43, p. 1581-1617, 2008.

MARTENS, S.; MITHÖFER, A. Flavones and flavone synthases. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2399-2407, 2005.

MATSUMOTO, M.; MATSUKAWA, N.; MINEO H.; CHIJI H.; HARA, H. A soluble flavonoid- glycoside, αG-rutin, is absorbed as glycosides in the isolated gastric and intestinal mucosa. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.68, p. 1929-1934, 2004.

MAYER, S.; MCCLEAN, S. Investigation of the cytotoxicity of eukaryotic and prokaryotic antimicrobial peptides in intestinal epithelial cells in vitro. **Biochemical Pharmacology**, v.71, n.9, p. 1289-1298, 2006.

MIDDLETON, E.J.R.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, v.52, p. 673-751, 2000.

MILZ, S.; RIMPLER, H. Pulchellosid I, ein neues iridoid aus *Verbena pulchella* Sweet. **Tetrahedron Letter**, v.10, p. 895-898, 1978a.

MILZ, S.; RIMPLER, H. Pulchellosid II, ein neues iridoid aus *Verbena pulchella* Sweet. **Tetrahedron Letter**, v. 38, p. 3549-3552, 1978b.

MISHRA, B.; PRIYADARSINI, K. I.; KUMAR, M. S.; UNNIKRIISHNAN, M. K.; MOHAN, H. Effect of O-glycosylation on the antioxidant activity and free radical reactions of a plant flavonoid, chrysoeriol. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.11, p. 2677-2685, 2003.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p. 55-63, 1983.

NARAYANA, K.R.; REDDY, S.R.; CHALUVADI, M.R.; KRISHNA, D.R. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. **Journal of Pharmacology**, v.33, p. 2-16, 2001.

OHMORI, K.; OHRUI, H.; SUZUKI, K. First synthesis of astilbin, biologically active glycosyl flavonoid isolated from Chinese folk medicine. **Tetrahedron Letters**, v.41, p. 5537-5541, 2000.

OKOYE, T.C.; AKAH, P.A.; OKOLI, C.O.; EZIKE, A.C.; MBAOJI, F.N. Antimicrobial and antispasmodic activity of leaf extract and fractions of *Stachytarpheta cayennensis*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.3, n.3, p.189-192, 2010.

OLIVEIRA, V.B.; YAMADA, L.T.; FAGG, C.W.; BRANDÃO, M. G. L. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v.48, n.1, p. 170-179, 2012.

OLIVIER, D.K.; SHIKANGA, E.A.; COMBRINCK, S.; KRAUSE, R.W.M; REGNIER, T.; DLAMINI, T.P. Phenylethanoid glycosides from *Lippia javanica*. **South African Journal of Botany**, v.76, n.1, p. 58-63, 2010.

OYOUROU, J. N.; COMBRINCK, S.; REGNIER, T.; MARSTON, A. Purification, stability and antifungal activity of verbascoside from *Lippia javanica* and *Lantana camara* leaf extracts. **Industrial Crops and Products**; v.43, p. 820-826, 2013.

PARK, Y.; MOON, B.H.; YANG, H.; LEE, Y.; LEE, E.; LIM, Y. Spectral assignments and reference data: complete assignments of NMR data of 13 hydroxymethoxyflavones. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 45, p. 1072–1075, 2007.

PENG, L.; WANG, B.; REN, P. Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 45, p. 108–111, 2005.

PENIDO, C.; COSTA, K.A.; FUTURO, D.O.; PAIVA, S.R.; KAPLAN, M.A.C; FIGUEIREDO, M.R.; HENRIQUES, M.G.M.O. Anti-inflammatory and anti-ulcerogenic properties of *Stachytarpheta cayennensis* (L.C. Rich) Vahl. **Journal of Ethnopharmacology**, v.104, n.1–2, p. 225–233, 2006.

PERALTA, P.F.; MÚLGURA, M.E. El género *Glandularia* (Verbenaceae) en Argentina. **Missouri Botanical Garden**, v.98, n.3, p. 358-412, 2011.

PETERSON, J.; DWYER, M.S.J.; RD, D.S.C. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, v.18, p. 1995-2018, 1998.

PIERSMA, A.H. Alternative methods for developmental toxicity testing. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 98, p. 427–431, 2006.

RADEV, R. Pharmacological effects of phenylethanoid glycosides. **Journal of Clinical Medicine**, v.3, n.2, p. 20-23, 2010.

RATES, S.M.K. Promoção no uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino da farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, p. 57-69, 2001.

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

REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J.L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature Protocols**, v. 3, p. 1125-1131, 2008.

RIJKE, E.D.; OUT, P.; NIESSEN, W.M.A.; ARIESE, F.; GOOJER, C.; BRINKMAN, U.A.T. Analytical separation and detection methods for flavonoids. **Journal of Chromatography A**, v.1112, p. 31-63, 2006.

SCHAUER, J.C. 1847. Verbenaceae. In: Candolle, A.P. De. **Prodromus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis** 11: 522-600

SCHNACK, B.; COVAS, C. Nota sobre la validez del género *Glandularia*. **Darwiniana**, v.6, p. 469-476, 1944.

SAHIN, F.P.; EZER, N.; CALIS, I. Three acylated flavone glycosides from *Sideritis ozturkii* Aytac & Aksoy. **Phytochemistry**, v.65, p. 2095–2099, 2004.

SALIMENA, F.R.G.; THODE, V.; MULGURA, M.; O'LEARY, N.; FRANÇA, F.; SILVA, T.R.S. 2012. *Verbenacea in lista de espécies da flora do brasil*. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB246>>. Acesso em: 30 de maio de 2014.

SAMPAIO-SANTOS, M.I.; KAPLAN, M.A.C. Biosynthesis significance of iridoids in chemosystematics. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.12, n.2, p. 144-153, 2001.

SAMUELSSON, G. **Drugs of Natural Origin: a textbook of pharmacognosy**, 4.ed. Estocolmo: Apotekarsocieteten, 1999, 551p.

SANDERS, R.W. The genera of Verbenaceae in the southeastern United States. **Harvard Papers in Botany**, v.5, p. 303-358, 2001.

SANDHAR, H.K.; KUMAR, B.; PRASHER, S.; TIWARI, P.; SALHAN, M.; SHARMA, P. Review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. **Internationale Pharmaceutica Scientia**, v.1, n.1, p. 25-41, 2011.

SARACOGLU, I.; INOUE, M.; CALIS, T.; OGIHARA, Y. Studies on constituents with cytotoxic and cytostatic activity of two Turkish medicinal plants *Phlomis armeniaca* and *Scutellaria salviifolia*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 18, p. 1396-1400, 1995.

SCHAPOVAL, E.E.; CHAVES, M.R.; BRIDI, R.; ZUANAZZI, J.A.; HENRIQUES, A.T. Anti-inflammatory and antinoceptive activities of extracts and isolated compounds from *Stachytarpheta cayennensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.60, p. 53-59, 1998.

SCHÖNBICHLER, S.A.; BITTNERA, L.K.H.; PALLUAA, J.D.; POPPB, M.; ABELB, G.; BONNA, G.K.; HUCKA, C.W. Simultaneous quantification of verbenalin and verbascoside in *Verbena officinalis* by ATR-IR and NIR spectroscopy. **Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.84, p. 97–102, 2013.

SCOGIN, R. The distribution of acteoside among angiosperms. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.20, n.5, p. 477- 480, 1992.

SHOEMAKER, M.; COHEN, I.; CAMPBELL, M. Reduction of MTT by aqueous herbal extracts in the absence of cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v.93, p. 381–384, 2004.

SILVA, K.; CECHINEL, V. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. **Química Nova**, v. 25, n.3, p. 449-454, 2002.

SILVA, C.C.; VANDRESEN, F.; OLIVEIRA, C.M.A.; KATO, L.; TANAKA, C.M.A.; FERREIRA, H.E. Chemical composition of *Aloysia gratissima* (Gillies e Hook) Tronc. (Verbenaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.34, p. 593–595, 2006.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Plantas da Medicina Popular do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 1986.

SMALL, J.K. **Manual of the southeastern Flora**. Chapel Hill: The University of North Carolina Press, 1933.

STEVENS, P.F. 2008. **Angiosperm Phylogeny Website**. Version 9, June 2008. Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>, acessado em janeiro de 2014.

TADEG, H. A.; MOHAMMEDB, E.; ASRES, K. C.; GEBRE-MARIAM, T. Antimicrobial activities of some selected traditional Ethiopian medicinal plants used in the treatment of skin disorders. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p. 168–175, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004, p.449-484.

THODE, A.Y; MENTZ, L. A. O gênero *Glandularia* J.F. Gmel. (Verbenaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.24, n.2, p. 529-557, 2010.

TRIGLIA, D.; BRAA, SS.; YONAN, C.; NAUGHTON, GK. Cytotoxicity testing using neutral red and *mtt* assays on a three- dimensional human skin substrate. **Toxicology in Vitro**, v.5, p. 573-578, 1991.

TSUCHIYA, H. Structure-dependent membrane interaction of flavonoids associated with their bioactivity. **Food Chemistry**, v.120, p. 1089-1096, 2010.

TUNDIS, R.; LOIZZO, M.R.; MENICHINI, F.; STATI, G.A.; MENICHINI, F. Biological and pharmacological activities of iridoids: recente developments. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v.8, n.4, p. 399-420, 2008.

VANDEN BERGHE, T.; GROOTJANS, S.; GOOSSENS, V.; DONDELINGER, Y., KRYSKO, D. V.; TAKAHASHI, N.; VANDENABEELE, P. Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo. **Methods**, v.61, p. 117-29, 2013.

VEITCH, N.C.; GRAYER, R. J. Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. **Natural Product Reports**, v.28, p. 1626-11695, 2011.

von POSER, G.L.; TOFFOLI, M.E.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A.T. Iridoid glucosides substitution patterns in Verbenaceae and their taxonomic implication. **Plant Systematics and Evolution**, v.205, p. 265–287, 1997.

WAGSTAFF, S.J.; OLMSTEWAD, R.G. Phylogeny of Labiatae and Verbenaceae inferred from rbcL Sequences. **Systematic Botany**, v.22, n.1, p. 165-179, 1997.

WEYERMANN, J.; LOCHMANN, D.; ZIMMER, A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. **International Journal of Pharmaceutics**, v.288, p. 369-376, 2005.

WILLIAMS, R.J.; SPENCER, J.P.E.; RICE-EVANS, C. Serial review: Flavonoids and isoflavonones (phytoestrogens): absorption, metabolism and bioactivity. **Free Radical Biology and Medicine**, v.36, p. 838-849, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **National policy on traditional medicine and regulation of herbal medicines**. Geneva, Switzerland: WHO Press, 2005.

YANG, X.; SUN, Y.; XU, Q.; GUO, Z. Synthesis and immunosuppressive activity of L-rhamnopyranosyl flavonoids. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v.4, p. 2483-2491, 2006.

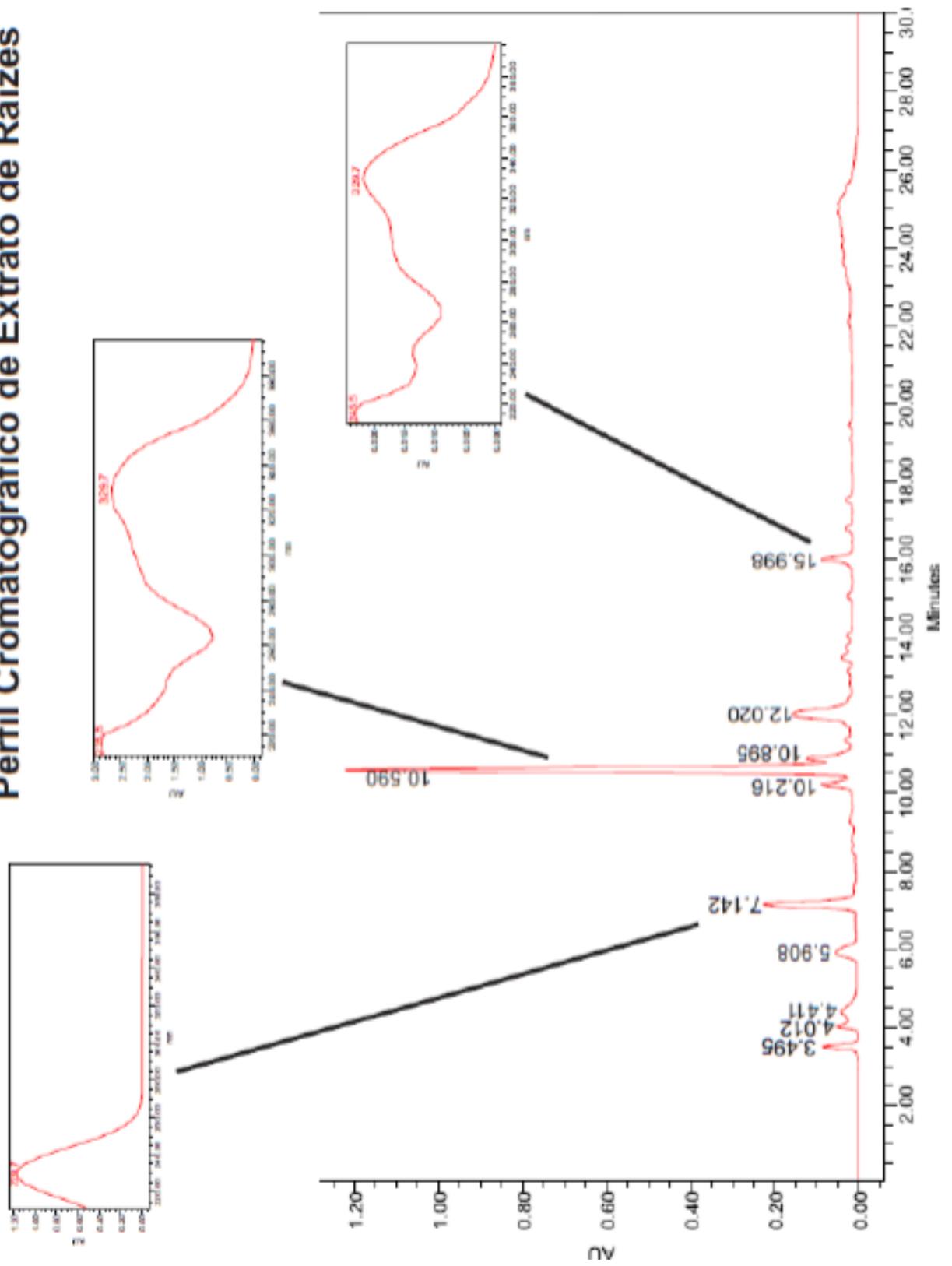
YUAN, Y.W; LIU, C.; MARX, H.E.; OLMSTEAD, R.G. An empirical demonstration of using pentatricopeptide repeat (PPR) genes as plant phylogenetic tools: Phylogeny of Verbenaceae and the *Verbena* complex. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 54, p. 23–35, 2010.

ZENI, A.L.B.; ZOMBOWSKI, A.D.E.; DAL-CIM, T.; MARASCHIN, M.; RODRIGUES, A.L.S.; TASCA, C.I. Antidepressant-like and neuroprotective effects of *Aloysia gratissima*: Investigation of involvement of L-arginina-nitric oxide-cyclic guanoside monophosphate pathway. **Journal of Ethnopharmacology**, v.37, p. 864-874, 2011.

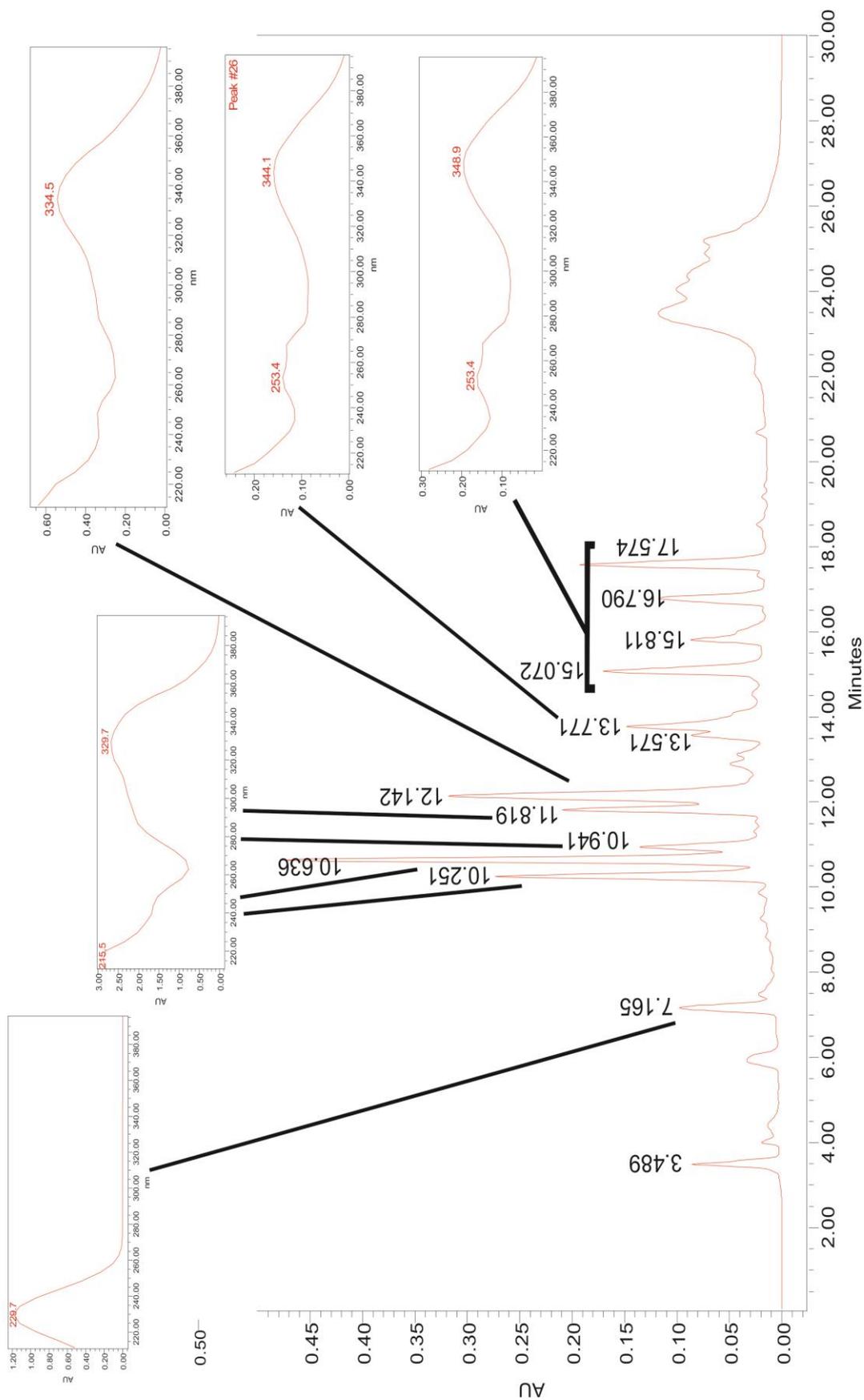
ZUANAZZI, J. A.; MONTANHA, J. A. Flavonoides. In: SIMÕES, *et al.* (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: Editora da Universidade UFRGS, 2010.

ZUCCO, F.; DE ANGELIS, I.; TESTAI, E.; STAMMATI, A. Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. **Toxicology in Vitro**, v.18, p. 153–163, 2004.

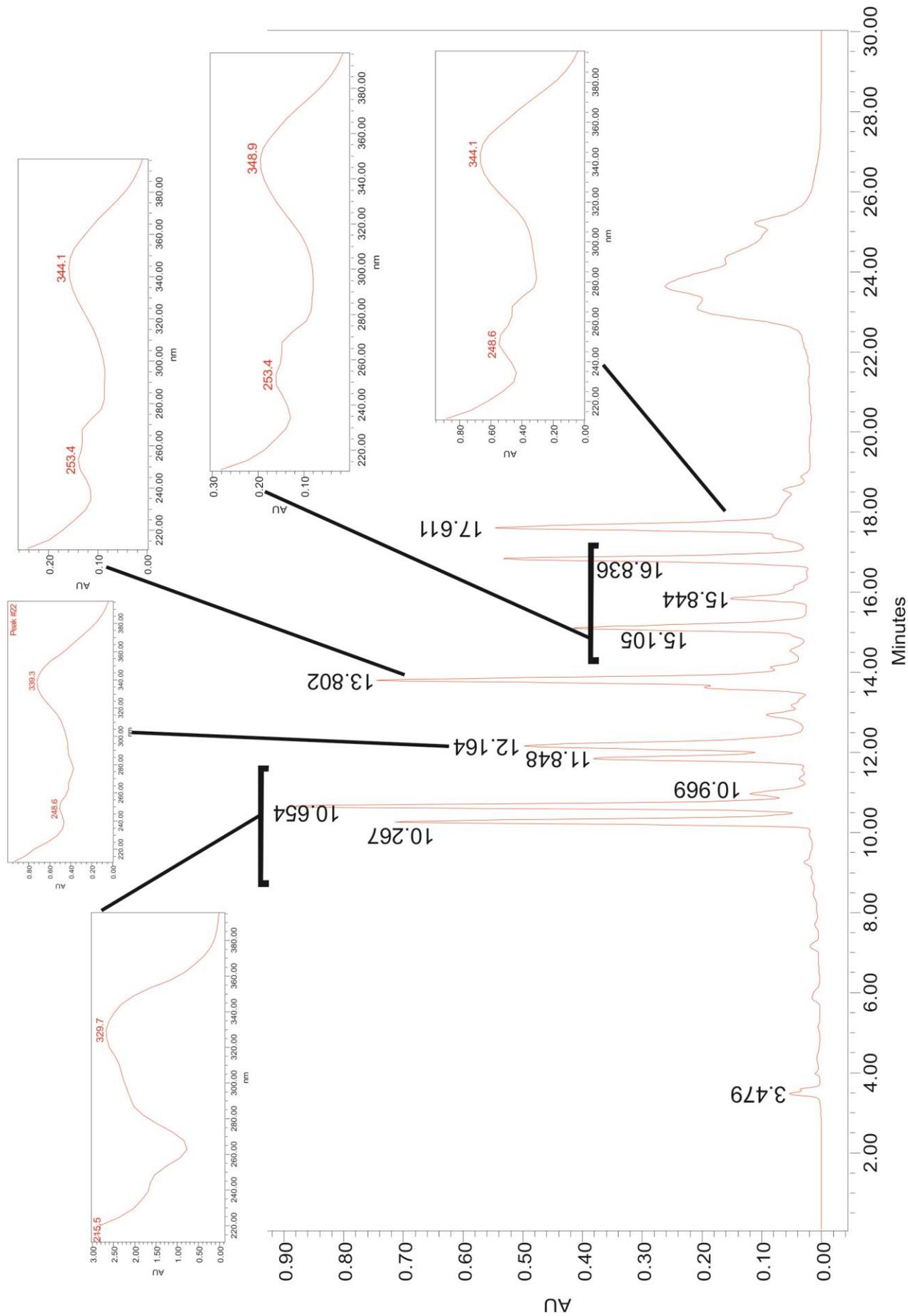
Perfil Cromatográfico de Extrato de Raízes



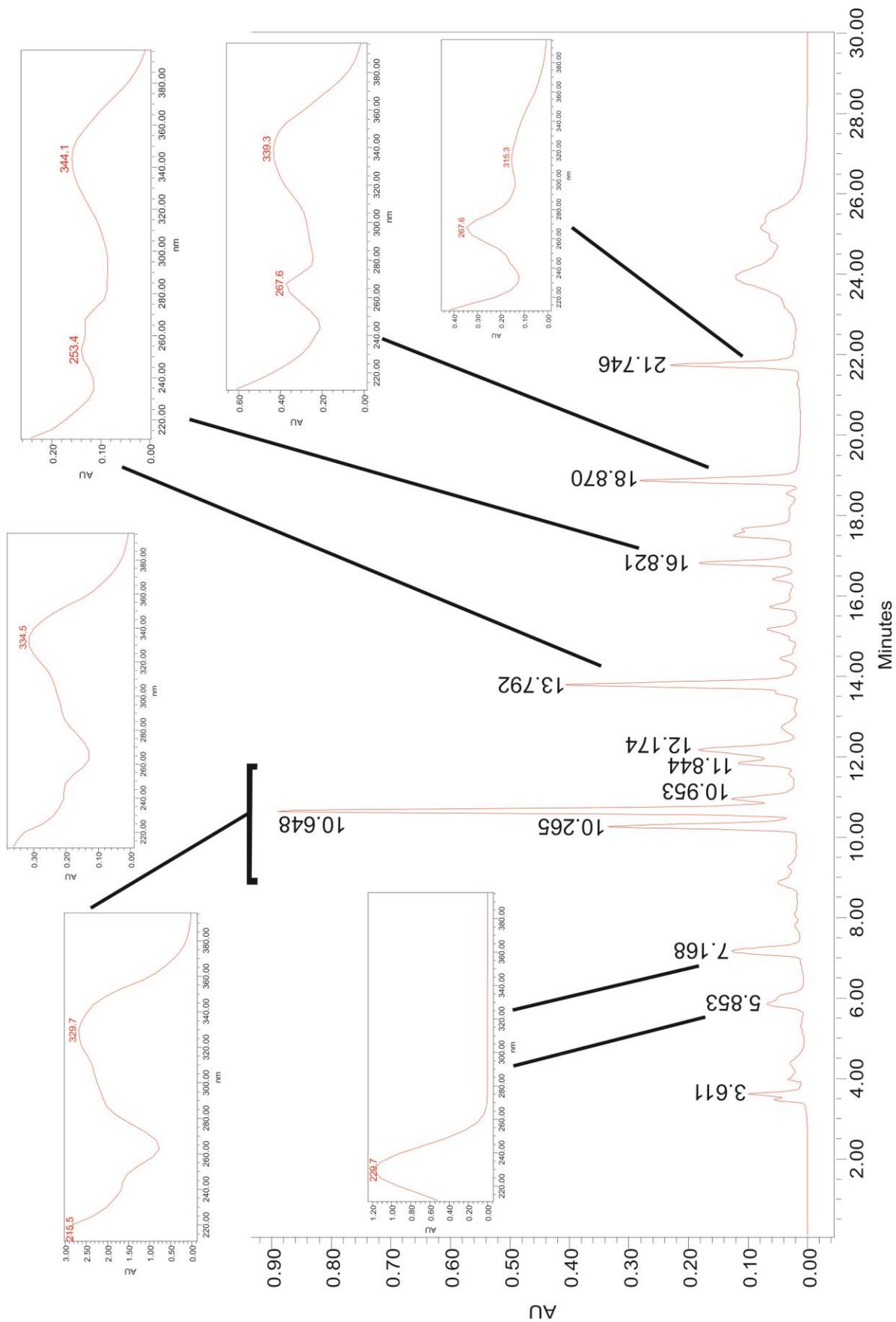
Perfil Cromatográfico de Extrato de Caules



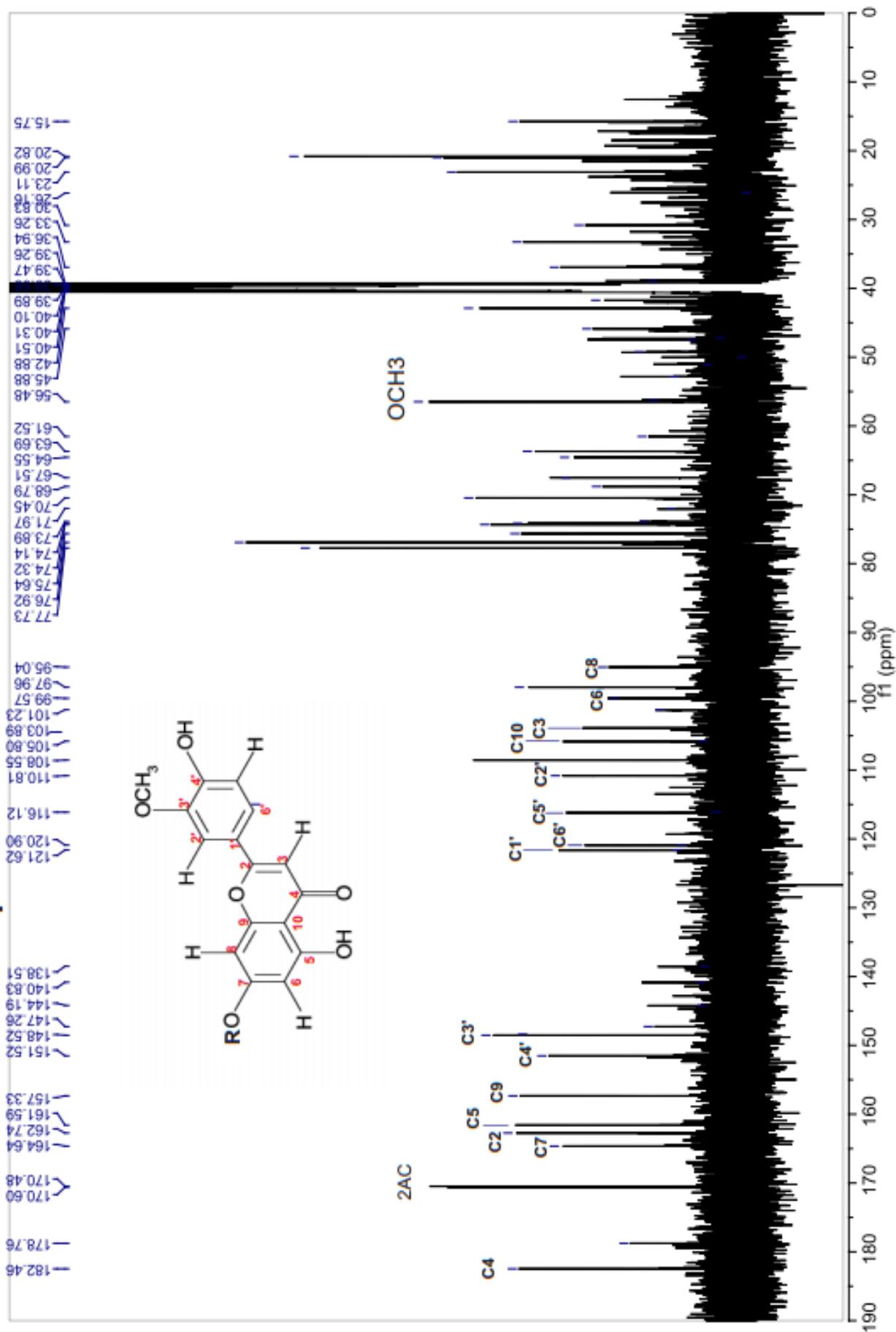
Perfil Cromatográfico de Extrato de Folhas



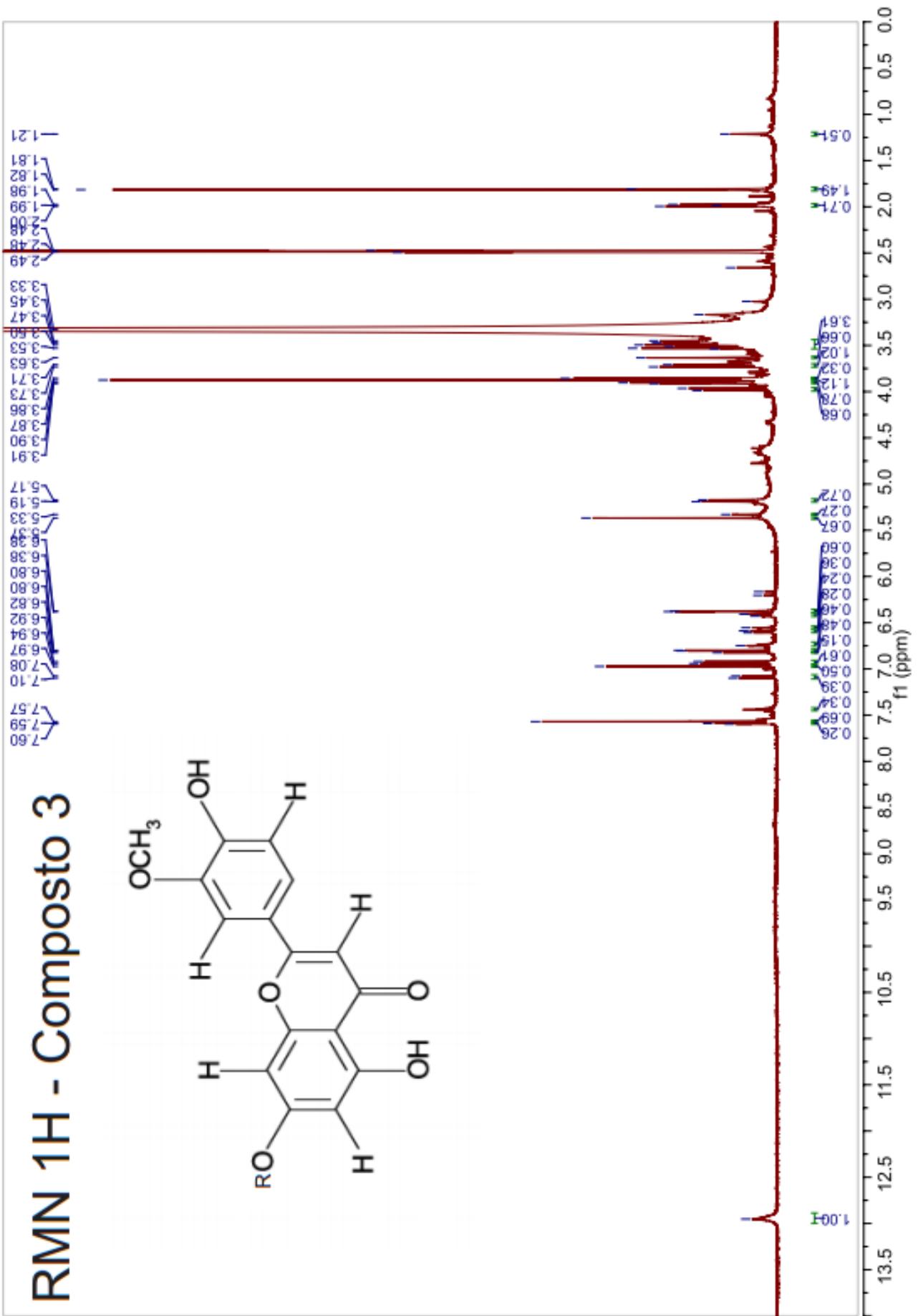
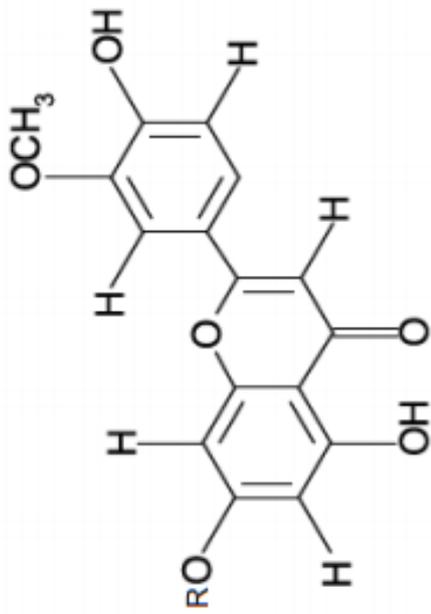
Perfil Cromatográfico de Extrato de Inflorescência



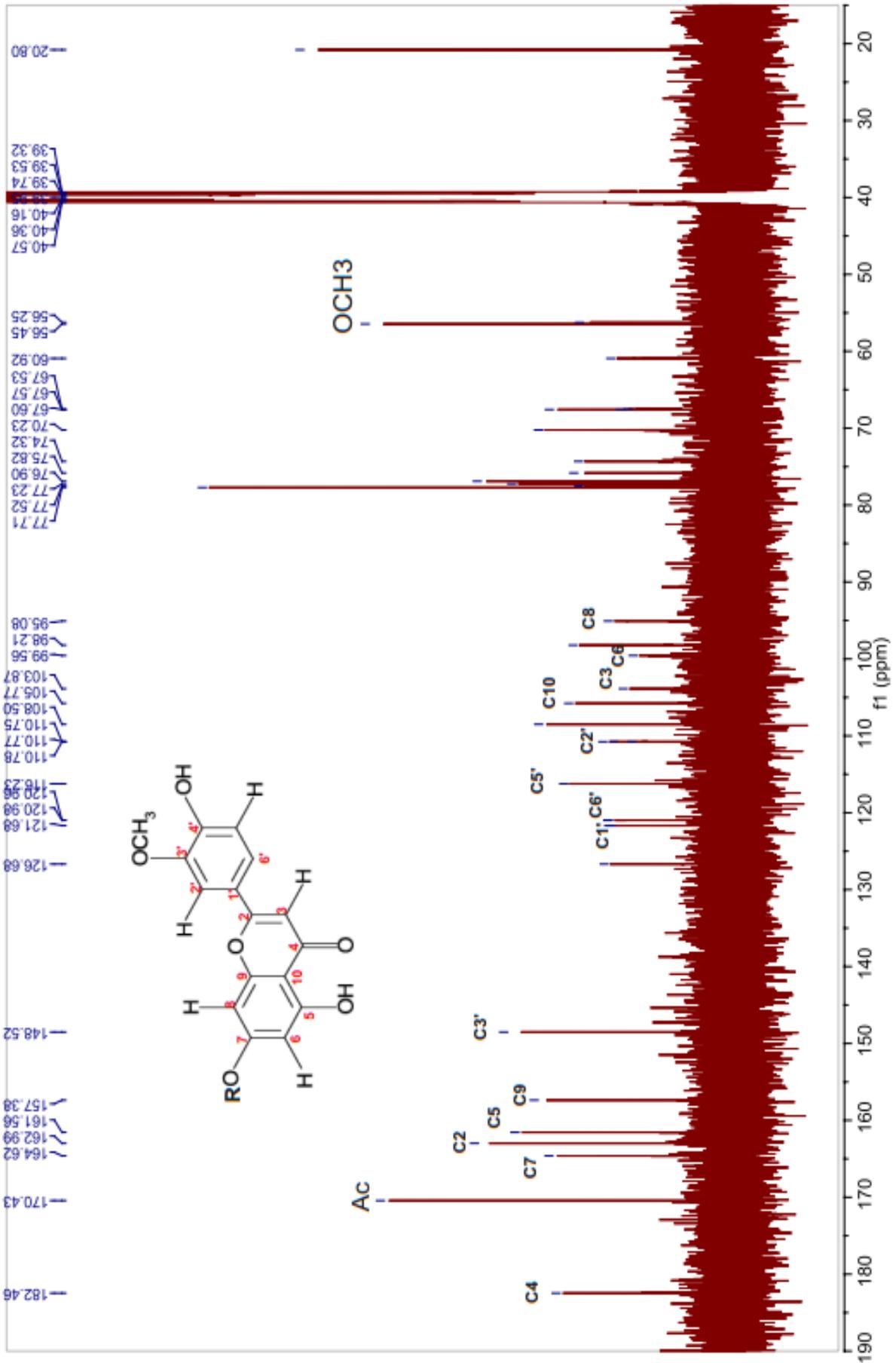
RMN 13C - Composto 2



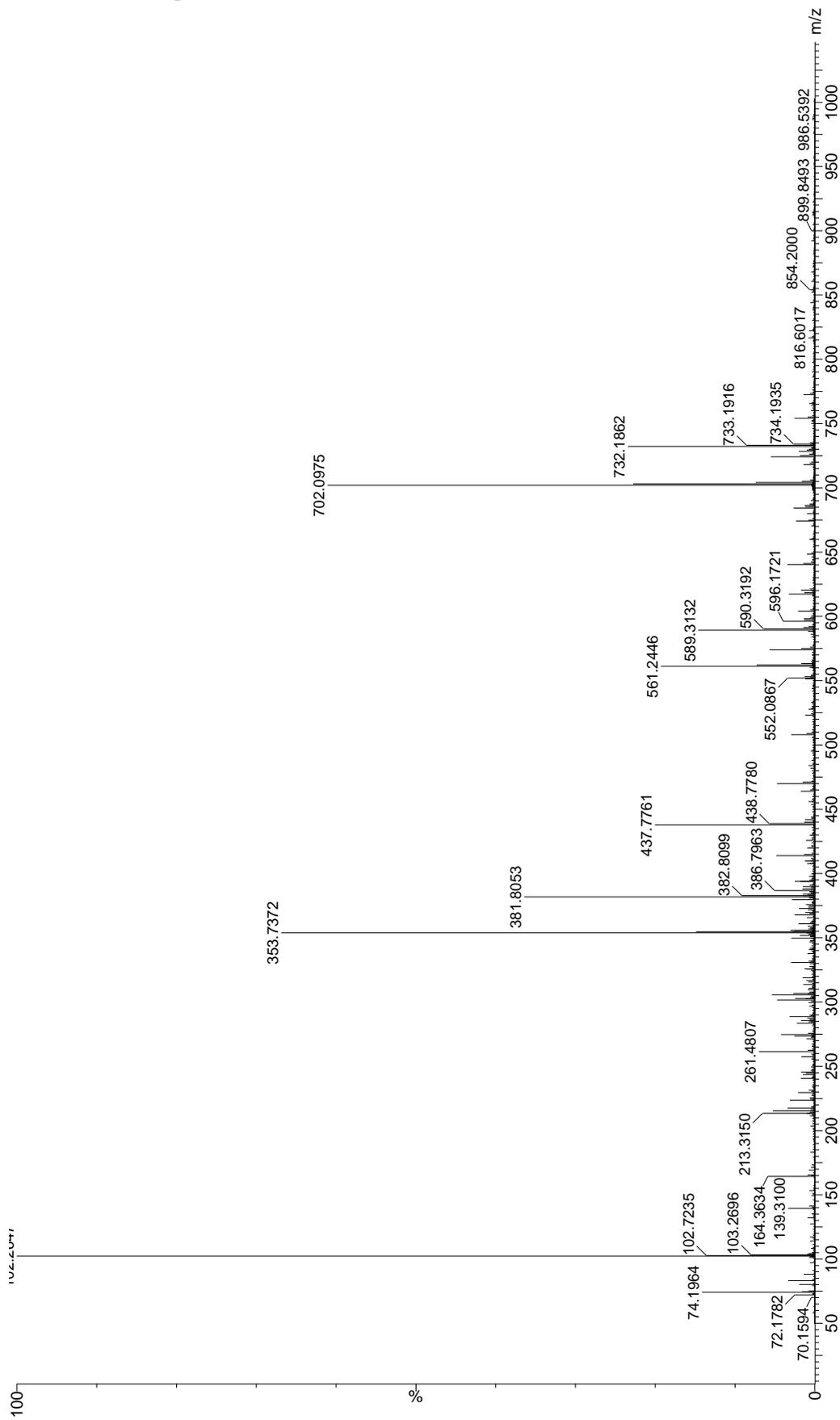
RMN 1H - Composto 3



RMN 13C - Composto 3



EM do Composto 2



EM do Composto 4

