

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

ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE ESPÉCIES DOS GÊNEROS
GLANDULARIA E *VERBENA* NATIVAS DO SUL DO BRASIL

ANGELICA SIGNOR VESTENA

PORTO ALEGRE, 2018

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

ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE ESPÉCIES DOS GÊNEROS
***GLANDULARIA* E *VERBENA* NATIVAS DO SUL DO BRASIL**

Dissertação apresentada por Angelica Signor Vestena
para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. José Ângelo S. Zuanazzi

Porto Alegre, 2018

Dissertação apresentada ao 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 21.03.2018, pela Banca Examinadora constituída por:

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

Prof. Dr. Saulo Fernandes de Andrade
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

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

Vestena, Angelica Signor
Estudo químico e biológico de espécies dos gêneros
Glandularia e Verbena nativas do sul do Brasil /
Angelica Signor Vestena. -- 2018.
169 f.
Orientador: Jose Angelo 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, 2018.

1. Glandularia. 2. Verbena. 3. Atividade
antiquimiotóxica. 4. Atividade hepatoprotetora. I.
Zuanazzi, Jose Angelo Silveira, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Farmacognosia (504 e 505H) do Departamento de Produção de Matéria-Prima e no Laboratório de Toxicologia (LATOX) do Departamento de Análises da Faculdade de Farmácia da Universidade do Rio Grande do Sul, com financiamento da CAPES, CNPQ e FAPERGS. O autor recebeu bolsa de estudos CAPES.

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de força, luz, coragem e amor. Agradeço por todos os aprendizados e oportunidades recebidas.

Ao professor Dr. José Ângelo pela oportunidade, confiança e conhecimentos transmitidos neste período.

A professora Dra. Gilsane Lino von Poser, por ter me acolhido com muito carinho, atenção e confiança, por ter sido minha guia nessa caminhada. Agradeço imensamente, por ter me repassado seus conhecimentos com tanta generosidade. Minha admiração por você é enorme!

Ao professor Dr. Sérgio Bordignon, pela dedicação na coleta e identificação do material vegetal utilizado neste estudo.

Aos professores e funcionários do PPGCF, pelo conhecimento transmitido e auxílio prestado.

Aos colegas do Laboratório de Farmacognosia (504), especialmente ao Henrique e Gabriela, que foram muito mais que colegas nessa jornada. Agradeço pelo apoio, amizade, pela troca de conhecimentos e momentos de descontração. Vocês são muito especiais, sou grata por ter tido a oportunidade de conviver com vocês.

Aos colegas do Laboratório de Farmacognosia (505H): Maria Helena, Marí, Mariana, Krissie, Natally, Marcos, Leticia, Guilherme e Elen. Obrigada pelo carinho, amizade, apoio, troca de conhecimento e pelos momentos de diversão. Em especial a Marí, pessoa maravilhosa que tive o prazer de conhecer e que quero levar para vida toda, obrigada pelo carinho de sempre, por me ajudar, motivar, me escutar e por toda a parceria. És muito especial, daquelas pessoas que dão sentido a palavra amizade.

As Gnosetes (Marí, Maria Helena, Melissa, Mari, Leti, Paula, Marina, Natally, Carol, Krissie) agradeço de coração pela amizade, incentivo, confiança e por tornarem essa jornada mais leve. Nenhuma pessoa passa pela nossa vida sem deixar um pouco dela

e levar um pouco de nós, saibam que sou muito feliz por ter tido a oportunidade de conhecê-las.

A minha grande amiga Maria Helena, presente que ganhei da faculdade de Farmácia que levo para vida, à qual tenho muita admiração, carinho e gratidão. Obrigada pelos incontáveis conselhos, por me animar nos momentos de desânimo e principalmente por sempre estar ao meu lado nos momentos bons e ruins. Te amo amiga!

As minhas amigas de infância Jordana e Bruna. Obrigada por estarem sempre presentes na minha vida. Vocês com certeza fazem parte de cada etapa e conquista que eu alcanço. Sou grata por termos construído uma amizade sincera e verdadeira. Amo vocês!

Por fim, mas não menos importante, a minha família! Aos meus pais Vicente e Maria Lourdes, ao meu irmão Henrique, minha cunhada Josiane e minha sobrinha Lauren. Vocês são fontes de fortaleza e amor, obrigada pelos ensinamentos, pelo apoio incondicional, carinho e por acreditarem na minha capacidade. Agradeço a Deus por ter permitido conviver com uma família tão especial e amorosa. Eu amo vocês!

RESUMO

As plantas medicinais são consideradas pela população uma alternativa para tratamento de diversas doenças. Entre estas, destacam-se as plantas da família Verbenaceae, como as espécies do gênero *Verbena*. Espécies reconhecidas atualmente como gênero *Glandularia* foram anteriormente descritas como *Verbena*. Esses gêneros ainda possuem problemas de circunscrição, tendo em vista que são táxons muitos semelhantes, sendo muitas vezes difícil diferenciá-los. Espécies de *Verbena* são bem relatadas na medicina popular quanto a atividade anti-inflamatória e para o tratamento de doenças hepáticas. Diante disso, objetivou-se com este trabalho o isolamento de compostos presentes em espécies dos gêneros *Glandularia* e *Verbena* e a avaliação das atividades hepatoprotetora e antiquimiotóxica de espécies de *Verbena* utilizadas na medicina popular. Os compostos isolados foram identificados através de técnicas cromatográficas e espectroscópicas. Extratos metanólicos de *V. montevidensis* e *V. litoralis* e o iridoide brasosídeo, presente em ambos os extratos, foram avaliados quanto a atividade antiquimiotóxica realizada de acordo com o teste modificado de Boyden e quanto a atividade hepatoprotetora e citotoxicidade *in vitro* realizado em células HepG2, pelos métodos de MTT e vermelho neutro. De *G. selloi* foram obtidos 6 β -OH-ipolamiida e dois derivados de crisoeriol com estruturas inéditas, seloisídeo A e seloisídeo B. Do extrato das partes aéreas de *G. lobata* foram isolados verbascosídeo e o iridoide griselinosídeo, que foi também isolado de *V. hirta* e *V. bonariensis*. De *V. montevidensis* obteve-se brasosídeo. No ensaio biológico antiquimiotáxico realizado com o extrato metanólico de *V. montevidensis* e com brasosídeo, seu produto isolado, todas as amostras apresentaram inibição significativa da migração leucocitária em relação ao controle. Os resultados obtidos para citotoxicidade *in vitro* demonstram que os extratos metanólicos e brasosídeo, não apresentaram citotoxicidade nas concentrações testadas. Esses extratos demonstraram atividade hepatoprotetora, em células HepG2, após lesão induzida por etanol. Brasosídeo protegeu as células nas menores concentrações testadas, sugerindo que a atividade hepatoprotetora dos extratos esteja relacionada ao sinergismo entre este composto e verbascosídeo. Os resultados encontrados nos ensaios biológicos corroboram o uso popular de algumas espécies de *Verbena* como agentes hepatoprotetor e anti-inflamatório.

Palavras chaves: *Glandularia*, *Verbena*, atividade antiquimiotóxica, atividade hepatoprotetora.

ABSTRACT

Medicinal plants are considered by the population an alternative to treat various diseases. Among these, stand out plants of the family Verbenaceae, such as the species of the genus *Verbena*. Species currently recognized as the genus *Glandularia* were previously described as *Verbena*. These genera still have problems of circumscription, since the taxa are very similar, being often difficult to differentiate them. *Verbena* species are well reported in folk medicine regarding anti-inflammatory activity and for the treatment of liver diseases. The objective of this work was the isolation of compounds present in species of the genera *Glandularia* and *Verbena* and the evaluation of the hepatoprotective and antichemotactic activities of *Verbena* species used in folk medicine.

The isolated compounds were identified by chromatographic and spectroscopic techniques. Methanolic extracts of the *V. montevidensis* and *V. litoralis* and the iridoid brasoside, present in both extracts, were evaluated for the antichemotactic activity performed according to the modified Boyden test and for the hepatoprotective activity and *in vitro* cytotoxicity performed in HepG2, by MTT and neutral red methods. From *G. selloi* 6 β -OH-ipolamiide and two chrysoeriol derivatives were obtained with novel structures, selloiside A and selloiside B. From the extract of the aerial parts of *G. lobata* verbascoside and the iridoid griselinoside were isolated. This iridoid was also isolated from *V. hirta* and *V. bonariensis* while *V. montevidensis* afforded brasoside. In the antichemotactic biological assay performed with the methanolic extract of *V. montevidensis* and with brasoside, all the samples showed significant inhibition of the leukocyte migration in relation to the control. The results obtained for *in vitro* cytotoxicity demonstrate that the methanolic extracts and brasoside did not present cytotoxicity at the concentrations tested. These extracts demonstrated hepatoprotective activity in HepG2 cells after ethanol-induced injury. Brasoside protected the cells at the lowest concentrations tested, suggesting that the hepatoprotective activity of the extracts is related to the synergism between this compound and verbascoside. The results found in the biological assays corroborate the popular use of some species of *Verbena* as hepatoprotective and anti-inflammatory agents.

Keywords: *Glandularia*, *Verbena*, antichemotactic activity, hepatoprotective activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura básica dos flavonoides.	27
Figura 2. Estrutura básica dos iridoides (A) e <i>seco</i> -iridoides (B).	29
Figura 3. Citotoxicidade de extrato metanólico de <i>V. montevidensis</i> (A e B), <i>V. littoralis</i> (C e D) e brasosídeo (E e F) pelos métodos de MTT e VN, respectivamente	65
Figura 4. Atividade hepatoprotetora de <i>V. montevidensis</i> (A e B), <i>V. littoralis</i> (C e D) brasosídeo (E e F) pelos métodos de MTT e VN, respectivamente	66
Figura 5. Efeito da migração leucocitária <i>in vitro</i> do extrato metanólico de <i>V. montevidensis</i> , o iridoide brasosídeo e a indometacina comparado ao LPS. *.# p<0,05 indicam diferença significativa comparado com o controle negativo e indometacina, respectivamente (ANOVA seguida por teste de Tukey's).	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Local da coleta das espécies de <i>Glandularia</i> e <i>Verbena</i>	39
Tabela 2. Sistema gradiente utilizado para análise por CLAE.	40
Tabela 3. Comparação dos dados de RMN de ^1H e de ^{13}C do composto Gs1 e da 6β -OH- <i>ipolamiida</i> em D_2O	51
Tabela 4. Dados de RMN uni (^1H , ^{13}C e APT) e bidimensionais (HSQC e HMBC) do composto Gs2, em $\text{DMSO-}d_6$	54
Tabela 5. Dados de RMN uni (^1H , ^{13}C e APT) e bidimensionais (HSQC e HMBC) do composto Gs3, em $\text{DMSO-}d_6$	56
Tabela 6. Dados RMN ^1H e ^{13}C do composto G11 e <i>griselinósídeo</i> (D_2O , 400Mz).	58
Tabela 7. Dados RMN ^1H e ^{13}C do composto Vm1 e <i>brasosídeo</i> (D_2O , 400Mz).	61

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REFERENCIAL TEÓRICO	23
2.1 Família Verbenaceae J.St.-Hil.	25
2.2 Gênero <i>Verbena</i> L.	25
2.3 Gênero <i>Glandularia</i> J.F.Gmel.	26
2.4 Metabólitos secundários	27
2.4.1 Flavonoides.....	27
2.4.2 Iridoides	28
2.4.3 Feniletanoides	29
2.5 Atividades biológicas investigadas no desenvolvimento do projeto	30
2.5.1 Atividade antiquimiotóxica <i>in vitro</i>	30
2.5.2 Hepatoproteção	31
3. OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo geral	35
3.2 Objetivos específicos	35
4. PARTE EXPERIMENTAL	37
4.1 Material vegetal	39
4.2 <i>Screening</i> dos constituintes químicos em CLAE	40
4.3 Extração do material vegetal	41
4.4 Isolamento e Purificação	41
4.5 Atividades biológicas	42
4.5.1 Atividade antiquimiotóxica <i>in vitro</i>	42
4.5.2 Atividade Hepatoprotetora e citotoxicidade	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 <i>Glandularia selloi</i>	49
5.1.1 Composto Gs1	50
5.1.2 Composto Gs2	52
5.1.3 Composto Gs3	54
5.2 <i>Glandularia lobata</i>	57
5.2.1 Composto Gl1	57
5.2.2 Composto Gl2.....	59
5.3 <i>Verbena montevidensis</i>	60
5.3.1 Composto Vm1	60

5.4 Atividades biológicas	62
5.4.1 Atividade hepatoprotetora e citotoxicidade	63
5.4.2 Atividade antiquimiotóxica	67
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
7. REFERÊNCIAS	75
ANEXOS	85
Manuscrito I.....	87
Manuscrito II	135

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais como uma alternativa para tratamento de diversas doenças é uma prática realizada pela população há milhares de anos. Porém, a pesquisa pelos constituintes químicos presentes nas plantas teve início apenas no século XIX, quando Friedrich Serturmer isolou a morfina, um alcaloide extraído da *Papaver somniferum*. Assim, esse acontecimento levou a uma busca contínua de medicamentos derivados de plantas (Dutra *et al.*, 2016).

Desde então, observou-se uma crescente busca em terapias alternativas e utilização terapêutica de produtos naturais (Nani, 2011). Esse interesse em fármacos de origem vegetal pode estar relacionado a diversos fatores, como a terapia convencional ineficiente, uso abusivo ou incorreto de fármacos sintéticos, bem como a falta de acesso de parte da população aos tratamentos convencionais (Rates, 2001).

Entre as plantas medicinais, pode-se destacar diversas espécies da família Verbenaceae. O gênero *Verbena* L., distribuído nas Américas do Sul e Norte é representado por 45 espécies. Outro gênero semelhante é *Glandularia* J.F. Gmel, encontrado abundantemente no Sul do Brasil, possuindo 84 espécies. Em classificação anterior *Glandularia* fazia parte do gênero *Verbena* L. (O'Leary *et al.*, 2007; Thode e Mentz, 2010).

As espécies dos gêneros *Glandularia* e *Verbena* apresentam muitas semelhanças (de Oliveira e Salimena, 2009). Devido a diversas características em comum nesses gêneros, há complexidade em diferenciá-los morfológicamente (Thode, 2009).

Glandularia se diferencia do gênero *Verbena* principalmente pela presença de um longo estilete e apêndices glandulares no par superior de estames, entretanto, nem todas as espécies possuem essas características morfológicas (O'Leary e Thode, 2016). Neste caso, estudos filogenéticos ajudam a diferenciar esses gêneros através do número de cromossomos (*Verbena* x =7, *Glandularia* x =5) (Yuan e Olmstead, 2008).

O primeiro estudo sobre a composição química de *Glandularia* descrito na literatura foi realizado com a espécie *G. selloi*. Neste estudo, foi observada a presença de feniletanoides, flavonas (derivadas do crisoeriol) e iridoide (6- β -hidroxi-ipolamiida), evidenciando a necessidade de realizar mais estudos com essa planta que é encontrada abundantemente do Sul do Brasil, visando à obtenção de novas substâncias ativas ou de novas fontes de moléculas promissoras (Comerlato, 2014).

A composição química de espécies de *Verbena* é bem descrita na literatura, como por exemplo, estudos realizados com a espécie *V. officinalis* mostram iridoides, fenilpropanoides, flavonoides e terpenoides como os principais metabólitos secundários (Bilia *et al.*, 2008; Rehecho *et al.*, 2011).

Devido à grande diversidade da flora do Brasil, a população brasileira tem tradição em fazer uso de plantas medicinais para tratar doenças agudas e crônicas (Leão *et al.*, 2007). Espécies do gênero *Verbena* são bem relatadas quanto ao uso na medicina popular. As espécies *V. montevidensis* e *V. litoralis*, são utilizadas para tratamento de doenças do estômago e fígado. *V. officinalis*, espécie nativa da Europa apresenta propriedade anti-inflamatórias (Ritter *et al.*, 2002; Barros *et al.*, 2007).

Desta forma, considerando os aspectos envolvidos na descoberta de novas substâncias ativas a partir de produtos naturais bem como seu potencial farmacológico, pode-se afirmar que os produtos naturais foram e continuam sendo uma fonte imensurável de novos fármacos para o tratamento de diversas doenças (Rates, 2001; Cragg *et al.*, 2014). Neste sentido, destaca-se a relevância deste trabalho em isolar compostos presentes em espécies dos gêneros *Glandularia* e *Verbena*, bem como avaliar as atividades hepatoprotetora e anti-quimiotóxica de espécies de *Verbena*, utilizadas na medicina popular.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Família Verbenaceae J.St.-Hil.

Verbenaceae é uma família botânica da ordem Lamiales que apresenta aproximadamente 34 gêneros e 1175 espécies distribuídas nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas dos hemisférios Sul e Norte (Bueno e Leonhardt, 2011). No Brasil são encontrados cerca de 16 gêneros e 277 espécies (Salimena *et al.*, 2017).

No estado do Rio Grande do Sul, Crespam (2010) mencionou 11 gêneros nativos (71 espécies), dentre eles, *Aloysia* Juss., *Bouchea* Cham., *Citharexylum* L., *Duranta* L., *Glandularia* J.F.Gmel., *Lantana* L., *Lippia* L., *Phyla* Lour., *Stachytarpheta* Vahl., *Verbena* L., *Verbenoxylum* Tronc. e *Petrea* L. (espécie introduzida e cultivada como ornamental).

Estudos químicos realizados com plantas da família Verbenaceae mostram ocorrência de iridoides e feniletanoides como os principais metabólitos secundários. Entretanto, terpenoides, flavonoides, saponinas, quinonas e alcaloides também foram relatados em algumas espécies (Vandresen, 2005).

Glandularia e *Junellia*, hoje aceitos como gêneros da família Verbenaceae, foram inicialmente considerados como partes de *Verbena*. O complexo *Verbena* inclui *Verbena*, *Glandularia* e *Junellia*, que possuem relações muito complexas. O número de cromossomos é um fator plausível para separar esses gêneros. *Verbena* possui número cromossômico $x=7$, *Glandularia* $x=5$ e *Junellia* $x=10$. Desta forma, estudos filogenéticos sugerem que *Junellia* é parafilética e mais ancestral entre os três gêneros, *Glandularia* e *Verbena* são monofiléticas e derivadas de *Junellia* (Yuan e Olmstead, 2008).

2.2 Gênero *Verbena* L.

O gênero *Verbena* é representado por aproximadamente 45 espécies distribuídas predominantemente no continente americano, mas também podem ser encontradas na

América tropical e temperada, norte da África, Ásia, Europa e Austrália (O'Leary *et al.*, 2007).

Na flora do Brasil são encontradas as espécies *V. alata* Otto ex Sweet, *V. bonariensis* L., *V. caniuensis* Moldenke, *V. ephedroides* Cham., *V. filicaulis* Schauer, *V. gracilescens* (Cham.) Herter, *V. hirta* Spreng., *V. hispida* Ruiz & Pav., *V. intercedens* Briq., *V. intermedia* Gillies & Hook. Ex Hook., *V. lindbergii* Moldenke, *V. litoralis* Kunth, *V. montevidensis* Spreng., *V. officinalis* L., *V. ovata* Cham., *V. rígida* Spreng. e *V. sagittalis* Cham., distribuídas pelo centro-oeste, sudeste e sul do país (O'Leary, 2017).

Em vários países, espécies do gênero *Verbena* são usadas na medicina popular para febre, tratamento de diarreia, distúrbios gastrointestinais, câncer, para alívio de inflamações de picadas de insetos e algumas doenças sexualmente transmitidas (Pérez-Arbeláez, 1978; Ocampo e Maffioli, 1987 apud Castro-Gamboa e Castro, 2004, p. 2370; Umaña e Castro, 1990). No Brasil, um levantamento bibliográfico realizado por Santos e colaboradores (2015) descreve espécies do gênero *Verbena* utilizadas na medicina popular para tratamento de problemas de fígado (dor e intoxicação), como estimulante de apetite, para reduzir colesterol, em dores no estômago, e ainda em leucemia e feridas.

2.3 Gênero *Glandularia* J.F.Gmel.

O gênero *Glandularia* é composto por aproximadamente 84 espécies distribuídas nas regiões subtropicais e temperadas da América do Sul e América do Norte (Peralta e Thode, 2010).

No Brasil, é relatada uma grande diversidade de representantes desse gênero, sendo encontradas pelo menos 31 espécies. A sua ocorrência é frequentemente associada a lugares abertos como campos, areia, áreas inundadas, encostas, campos rochosos, estradas, margem de florestas (Peralta e Thode, 2010; O'Leary e Thode, 2016; O'Leary *et al.*, 2018).

O gênero pode ser encontrado nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul. O estado do Rio Grande do Sul destaca-se por possuir o maior número de representantes, com 26 espécies e uma variedade (O’Leary e Thode, 2016).

2.4 Metabólitos secundários

2.4.1 Flavonoides

Flavonoides são metabólitos secundários conhecidos por seus efeitos benéficos a saúde. São encontrados naturalmente em plantas e grande parte de alimentos e bebidas, como frutas, legumes, cereais, chá, café, vinho. Os flavonoides representam 60% de todos os polifenóis naturais e estão presentes em todas as partes das plantas, especialmente nas flores e folhas (Middleton, 1998; Kumar e Pandey, 2013).

A estrutura geral dos flavonoides é 2-fenil-benzo- γ -pirano, composto por 15 carbonos, sendo dois anéis aromáticos (A e B) ligados por meio de um anel pirano heterocíclico (C) (**Figura 1**) (Middleton, 1998; Raffa *et al.*, 2017).

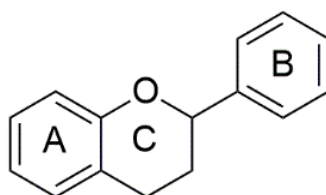


Figura 1. Estrutura básica dos flavonoides

A biossíntese dos flavonoides ocorre por meio da combinação dos ácidos chiquímico e acilpolimalonato. O fenilpropano, sintetizado através do ácido chiquímico, atua como precursor na síntese de um intermediário, ao qual posteriormente são incorporados na estrutura três resíduos de acetato, ocorrendo a ciclização da estrutura. Hidroxilações e reduções que ocorrem posteriormente originam diferentes tipos de flavonoides (Di Carlo *et al.*, 1999).

Com base em sua estrutura, os flavonoides diferem de acordo com o arranjo das hidroxilas, grupos metoxi, glicosilações e na conjugação entre o anel A e B. Podem ser divididos em principais subgrupos, incluindo flavonas, flavonóis, isoflavonoides, flavanonas, antocianidinas e flavanas (Kumar e Pandey, 2013; Zhou *et al.*, 2016)

Os flavonoides são bem relatados quanto à atividades biológicas, como hepatoprotetores, antioxidantes, antiproliferativos, anti-inflamatórios, antialérgicos, antibacterianos, antivirais, antitumorais, auxiliando no tratamento de doenças neurodegenerativas e cardiovasculares (Di Carlo *et al.*, 1999; Kumar e Pandey, 2013; Sing *et al.*, 2014).

2.4.2 Iridoides

Iridoides são metabólitos secundários presentes em um amplo número de plantas, encontrados em abundância nas angiospermas eudicotiledôneas, especialmente nas famílias Apocynaceae, Scrophulariaceae, Verbenaceae, Lamiaceae, Loganiaceae e Rubiaceae, sendo considerados importantes marcadores quimiotaxonômicos. Esses produtos são caracterizados estruturalmente por apresentar um esqueleto com anel de seis membros contendo oxigênio fundido a um anel ciclopentano, chamado de esqueleto ciclopentano-[C]-pirano (El-Naggar e Beal, 1980; Dinda *et al.*, 2007; Villaseñor, 2007; Viljoen *et al.*, 2012).

O esqueleto iridano é formado pela ciclização de 10-oxogeraniol biosintetizado a partir do geraniol por meio do 10-hidroxigeraniol para introduzir o iridodial, que posteriormente é oxidado produzindo iridotrial. Processos de glicosilação, metilação, oxidação, entre outros, convertem o iridotrial em diferentes iridoides. Desta forma, os iridoides podem ser divididos em quatro grupos de acordo com sua estrutura química, sendo estes: os iridoides não glicosídicos, iridoides glicosídicos, *seco*-iridoides e os bisiridoides (Bianco, 1994; Villaseñor, 2007; Viljoen *et al.*, 2012)

Os iridoides não glicosídicos são formados apenas pelo esqueleto iridano com uma metila nas posições 4 e 8 (**Figura 2a**). Os glicosídicos, que formam o maior grupo,

apresentam estruturas semelhantes com oito, nove ou dez átomos de carbono ligados a um monossacarídeo no C-1, geralmente β -D-glicose. A grande diversidade estrutural desse grupo deve-se aos diversos grupos funcionais ligados à aglicona como diferentes açúcares ou grupos epóxi (Dobler *et al.*, 2011; Viljon *et al.*, 2012). Os *seco*-iridoides (**Figura 2b**) são formados pela clivagem da ligação 7,8 do anel ciclopentano, enquanto os bisiridoides são resultantes da dimerização de iridoides e *seco*-iridoides (Villaseñor, 2007).

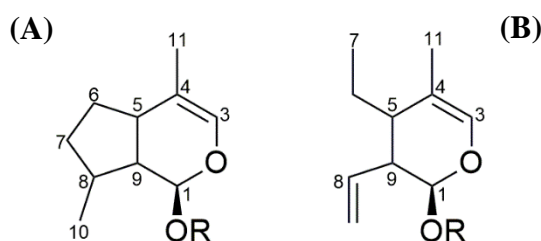


Figura 2. Estrutura básica dos iridoides (A) e *seco*-iridoides (B)

Diversos estudos revelam a ampla bioatividade dos iridoides, como antioxidante, antitumoral, anti-inflamatório, cardiovascular, hepatoprotetor, colerético, hipoglicêmico, hipolipidêmico, antiespasmódico, antiviral, antimicrobiano, imunomodulador e antialérgico (Tundis *et al.*, 2008).

2.4.3 Feniletanoides

Os feniletanoides glicosídicos, são compostos fenólicos, hidrossolúveis, distribuídos amplamente nas plantas medicinais. Caracterizam-se estruturalmente pela presença de um 2-feniletil- β -D-glicosídeo combinado com um ácido fenilpropanoico por meio de ligação éster na hidroxila do C-4 do glicosídeo como estrutura central. Estes compostos frequentemente são constituídos por ácidos aromáticos (ácido caféico, cumárico, cinâmico e isoferúlico) e vários açúcares (ramnose, xilose, apiose, lixose, alose, glicose e arabinose) por meio de éster ou ligações glicosídicas, respectivamente (Jimenez e Riguera, 1994; Fu *et al.*, 2008).

Diversas atividades biológicas são atribuídas aos feniletanoides, incluindo neuroproteção, antioxidante, imunorregulação, antitumoral, antiviral, antibacteriano, hepatoprotetor anti-inflamatório e efeito analgésico (Fu *et al.*, 2008).

2.5 Atividades biológicas investigadas no desenvolvimento do projeto

2.5.1 Atividade antiquimiotóxica *in vitro*

A inflamação é uma resposta biológica complexa do organismo que ocorre após o contato com microrganismos causadores de infecção e/ou lesão tecidual. Essa resposta pode ser rápida (aguda) ou longa (crônica). De uma forma geral, a principal função da inflamação é resolver a infecção ou reparar um dano e retornar ao estado de homeostase (Barton 2008; Beg *et al.*, 2011; Elsayed *et al.*, 2014).

A resposta inflamatória aguda ocorre rapidamente em meio a condições prejudiciais. Nesta fase, ocorrem eventos com alterações moleculares, celulares e fisiológicas. O processo é iniciado com a produção de mediadores químicos (sistema complemento, quimiocinas, citocinas, radicais livres, aminas vasoativas e eicosanoides) por células residentes no tecido danificado. A liberação destes quimioatrativos induz mudanças rápidas, ocorrendo polarização celular e desta forma, permitindo que a célula seja orientada migrando até o local da inflamação (Nuzzi *et al.*, 2007; Petri e Sanz, 2018). Assim, ocorre a rápida infiltração de leucócitos (neutrófilos, monócitos e linfócitos) ao tecido lesado (Fullerton e Gilroy, 2016).

Na resposta à infecção, dano tecidual e desenvolvimento do sistema imunológico, a migração leucocitária ao sítio da lesão ocupa um papel essencial. A liberação de substâncias quimioatrativas tem função de recrutar os leucócitos e células epiteliais para ajudar na resposta imune e cicatrização de feridas (Elsayed *et al.*, 2014). Esses quimioatrativos exercem seus efeitos por meio de interação com receptores acoplados à proteína G presentes na superfície celular e a resposta quimiotóxica é regulada por Rho GTPases (Petri e Sanz, 2018).

A inflamação crônica, geralmente é resultante de uma resposta autoimune ou uma resposta inflamatória aguda não eficaz na eliminação do microrganismo causador da infecção e/ou lesão, desta maneira, o processo inflamatório permanece e novas características são adquiridas. Neste tipo de resposta inflamatória ocorre a substituição do infiltrado de neutrófilos por macrófagos e células T com formação de granulomas e tecidos linfoides. A destruição tecidual é uma das características da inflamação crônica (Medzhitov, 2008).

É válido lembrar que há mais de 50 anos, a inflamação é tratada principalmente com anti-inflamatórios não esteroides (AINES), porém esses medicamentos apresentam diversos efeitos secundários durante o uso e desenvolvem problemas de saúde quando usados a longo prazo. Dessa forma, existe uma busca contínua por novos medicamentos naturais com potencial anti-inflamatório que apresentem efeitos adversos mínimos (Abd-Allah *et al.*, 2018).

2.5.2 Hepatoproteção

O fígado é um órgão fundamental na regulação de diversas funções metabólicas e processos fisiológicos do organismo. Dentre estas funções incluem-se o metabolismo de nutrientes, secreção biliar e síntese de proteínas, lipídios e carboidratos, assim como armazenamento de vitaminas (Domitrovié e Potočnjak, 2016). A lesão hepática está relacionada a alteração dessas funções metabólicas (Wolf, 1999).

Doenças hepáticas estão entre as principais causas de morbidade e mortalidade do mundo. Fatores que contribuem para a lesão hepática estão associados a estilo de vida pouco saudável, como obesidade, consumo excessivo de álcool e uso de drogas. Também pode-se relacionar lesão hepática com doenças autoimunes (hepatite imune e cirrose biliar primária) e fatores biológicos (bactérias, vírus e parasitas) (Chatterjee e Mitra, 2015).

Por meio de diversos mecanismos de ação, esses fatores podem desencadear degeneração e inflamação do fígado, podendo resultar em fibrose e cirrose. As doenças crônicas do fígado geralmente estão relacionadas ao estresse oxidativo (Rodeiro *et al.*, 2008).

Medicamentos naturais para o tratamento de doenças hepáticas são utilizados há séculos pela população. As plantas com essas propriedades, possuem diversos constituintes químicos como cumarinas, lignanas, monoterpenos, flavonoides, ácidos orgânicos, alcaloides e xantonas (Sharma e Gupta, 2002). Um dos exemplos de compostos naturais usados para tratamento de doenças hepáticas é a silimarina, isolada de *Silybum marianum*. Este composto possui atividade reconhecida na eliminação de radicais livres e conseqüentemente desempenha função na prevenção e tratamento ao dano oxidativo causados por EROs (Espécies Reativas de Oxigênio) (Hanafy *et al.*, 2016).

Outro exemplo de produto natural com atividade hepatoprotetora reconhecida é a curcumina, um composto fenólico isolado de *Curcuma longa*. O mecanismo de ação desta substância na prevenção de lesões hepáticas está relacionado com a inibição do fator de necrose tumoral (FNT) induzindo a apoptose (Lee *et al.*, 2017).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Tendo em vista a importância dos gêneros *Glandularia* e *Verbena*, o objetivo geral desta dissertação foi identificar o perfil químico presente em algumas espécies de *Glandularia* e *Verbena* nativas do sul do Brasil, bem como isolar seus componentes majoritários. Considerando a ampla utilização de espécies do gênero *Verbena* na medicina popular para tratar doenças hepáticas objetivou-se avaliar *in vitro* as atividades hepatoprotetora, citotóxica e antiquimiotóxica.

3.2 Objetivos específicos

- Selecionar, através de análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), as espécies mais promissoras para isolamento dos constituintes químicos.
- Preparar extratos, fracionar, isolar e elucidar compostos químicos presentes nas frações de espécies dos gêneros *Glandularia* e *Verbena*.
- Caracterizar o perfil químico das espécies de *Glandularia* e *Verbena* utilizando metodologias espectroscópicas (RMN ^1H e RMN ^{13}C) e espectrométricas (espectrometria de massas).
- Avaliar as atividades hepatoprotetora, citotóxica e antiquimiotóxica de extratos de espécies de *Verbena* utilizadas na medicina popular.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Material vegetal

As plantas dos gêneros *Glandularia* e *Verbena* foram coletadas em diferentes municípios do Estado do Rio Grande do Sul (**Tabela 1**), identificadas pelo Dr. Sergio A. Bordignon (UNILASSALE-RS) e posteriormente uma exsicata foi depositada no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN-UFRGS). A secagem do material foi realizada à temperatura ambiente.

Tabela 1. Local da coleta das espécies de *Glandularia* e *Verbena*

Espécies	Local da coleta	GPS
<i>G. balansae</i>	Joaquina/RS	28°57'02,7"Sul/50°25'46,2"Oeste
<i>G. catharinae</i>	São Francisco de Paula/RS	29°9'19,24"Sul/50°40'7,53"Oeste
<i>G. corymbosa</i>	São Francisco de Paula/RS	29°24'35,8"Sul/50°33'03,8"Oeste
<i>G. humifusa</i>	São Francisco de Paula/RS	29°16'2,17"Sul/50°44'19,94"Oeste
<i>G. lobata</i>	São José dos Ausentes/RS	28°46'27,5"Sul/50°03'44,5"Oeste
<i>G. marrubioides</i>	São Francisco de Paula/RS	29°14'37,3"Sul/50°44'20,6"Oeste
<i>G. phlogiflora</i>	São Francisco de Paula/RS	29°14'8,13"Sul/50°33'19,32"Oeste
<i>G. selloi</i>	Capão da Canoa/RS	29°37'12,9"Sul/49°56'48,8"Oeste
<i>G. subincana.</i>	São Jerônimo/RS	30°15'23,5"Sul/51°51'18"Oeste
<i>G. tenera</i>	São José dos Ausentes/RS	28°49'54,4"Sul/50°18'13,3"Oeste
<i>G. thymoides</i>	Santo Antônio da Patrulha/RS	29°51'49,03"Sul/50°31'11"Oeste
<i>G. tomophylla</i>	Quevedos/RS	29°15'49,26"Sul/54°14'12,3"Oeste
<i>G. peruviana</i>	Santo Antônio da Patrulha/RS	29°51'41,0"Sul/50°31'32"Oeste
<i>V. alata</i>	São Jerônimo/RS	29°58'07,7"Sul/51°44'35,2"Oeste
<i>V. bonariensis</i>	Nova Santa Rita/RS	29°49'01,8"Sul/51°23'07,6"Oeste
<i>V. equisetoides</i>	São Francisco de Paula/RS	29°26'11,8"Sul/50°34'21,0"Oeste
<i>V. hirta</i>	Jaquirana/RS	29°15'6,31"Sul/50°16'11,67"Oeste
<i>V. intermedia</i>	Jari/RS	29°30'50,09"Sul/54°33'48,44"Oeste

<i>V. litoralis</i>	Nova Santa Rita/RS	29°51'25"Sul/51°16'26"Oeste
<i>V. montevidensis</i>	Quevedos/RS	29°19'20.6"Sul/54°04'35.2"Oeste
<i>V. rígida</i>	Nova Santa Rita-RS	29°54'34"Sul/51°16'54,7"Oeste
<i>V. sagittalis</i>	Santo Antonio da Patrulha/RS	29°46'56,0"Sul/50°33'57,2"Oeste

4.2 Screening dos constituintes químicos em CLAE

Um *screening* com diferentes espécies dos gêneros *Glandularia* e *Verbena* (**Tabela 1**) foi realizado utilizando folhas (0,25 g) e raízes (0,25 g) extraídas com 5 mL de metanol por 1 hora em maceração assistida por ultrassom.

Posteriormente uma alíquota (500 µL) foi filtrada em membrana de PVDP (fluoreto de polivinilideno) 0,45 µm (Milipore, EUA). Os extratos foram analisados em CLAE-DAD.

Na análise por CLAE-DAD utilizou-se equipamento ALLIANCE 2695, software gerenciador *Empower* (WATERS), detector de Ultravioleta/Visível (UV/Visível 2487) com comprimento de onda entre 200-400 nm, coluna cromatográfica, marca Phenomenex® fase reversa C₁₈ (5 µm) com dimensões 250 x 4,6 mm protegida por pré-coluna Lichrospher Merck® (10 x 4 mm d.i). Utilizou-se sistema de eluição, empregando gradiente linear, composto de água (A) e metanol (B) (**Tabela 2**). O volume de cada injeção foi 10 µL e o tempo de análise cromatográfica final de 39 min com fluxo de 0,7 mL/min.

Tabela 2. Sistema gradiente utilizado para análise por CLAE

Tempo (minutos)	A (%)	B (%)
0	80	20
1	60	40
4	50	50
6	40	60

8	30	70
23	27	73
26	0	100
30	0	100
31	80	20
39	80	20

A fase móvel utilizada foi constituída de solventes com alto grau de pureza como água ultrapura e metanol (grau HPLC), previamente filtrados em membrana 0,45 µm e, desgaeficados durante 30 minutos em ultrassom.

Após as análises em CLAE-DAD, as espécies promissoras foram selecionadas para realização de extratos e isolamento.

4.3 Extração do material vegetal

O material vegetal seco e moído de *G. selloi* (Spreng.) Tronc (126 g partes aéreas e 7 g raízes), *G. lobata* (Vell.) P. Peralta & Thode (5 g partes aéreas), *V. montevidensis* Spreng (7 g partes aéreas) e *V. hirta* Spreng (13 g partes aéreas) foram extraídos com metanol por maceração estática até exaustão, na proporção planta: solvente de 1:5 (m/v). A eliminação do solvente realizou-se com o auxílio do evaporador rotatório, sob pressão reduzida e temperatura inferior a 45 °C.

4.4 Isolamento e Purificação

O processo de isolamento e purificação foi realizado por meio de fracionamento utilizando cromatografia em coluna (CC) de gel de sílica (Acros Organics; 0,060 – 0,200 mm) como fase estacionária e sistema gradiente composto por acetato de etila:metanol (100:0 → 70:30). Para purificar os compostos, foram realizadas sucessivas cromatografias em coluna.

O monitoramento das frações foi realizado por cromatografia em camada delgada, (CCD) utilizando como fase estacionária gel sílica GF₂₅₄ e fase móvel sistema diclorometano:metanol (80:20) ou acetato de etila:metanol:água (100:13,5:10). Após eluição, os cromatogramas foram observados em luz ultravioleta $\lambda = 254$ nm e 365 nm, e posteriormente revelados com vanilina sulfúrica.

A elucidação estrutural dos constituintes isolados foi realizada por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), em equipamento Bruker 400 MHz Ascend, empregando técnicas unidimensionais ¹H, ¹³C e APT e bidimensionais COSY, HSQC, TOCSY e HMBC (dados apresentados em anexo). As análises foram realizadas empregando dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*₆) e água deuterada (D₂O) como solventes. Para compostos que apresentam estrutura inédita realizou-se espectrometria de massas de alta resolução com ionização por electrospray (HRESIMS) em modo positivo (Bruker Q-TOF Impact II).

4.5 Atividades biológicas

4.5.1 Atividade antiquimiotóxica *in vitro*

Os experimentos foram realizados no laboratório de Farmacognosia (505H), em colaboração com a Prof. Dr. Miriam Apel, utilizando-se a técnica de Boyden descrita por Suyenaga e colaboradores (2001). Os leucócitos foram tratados nas concentrações de 0,1 a 10 µg/mL de extrato metanólico seco de *V. montevidensis* e o iridoide isolado desta mesma (brasosídeo) preparadas em polissorbato 80 e solução tampão de Hank's (HBSS, pH 7,4). Indometacina na concentração de 10 µg/mL dissolvido em HBSS foi utilizada como controle positivo. Como controle negativo, utilizou-se uma solução contendo leucócitos dissolvido em HBSS. A concentração final de polissorbato 80 nas soluções de trabalho foi inferior a 0,01%.

As câmaras cilíndricas empregadas nesse ensaio são construídas em acrílico transparente, constituídas de dois compartimentos (0,5 mL de capacidade cada): o compartimento inferior preenchido com uma solução contendo o fator quimiotático (solução de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* - LPS) diluído em plasma, e o compartimento superior com a suspensão de neutrófilos/amostras, separados por um filtro de nitrato de celulose com 13 mm de diâmetro e poros de 8 mm de diâmetro. Após a preparação da câmara em duplicata, incubou-se a 37 °C por 1 hora em atmosfera úmida.

Posteriormente, os filtros foram removidos, fixados, corados, diafanizados *overnight* e montados entre lâmina e lamínula. A leitura dos filtros foi realizada sob microscopia óptica, utilizando-se ampliação de 40 vezes. Com o foco no plano superior do filtro, aprofundou-se o plano de observação microscópico até que apenas duas células fossem visíveis em foco. A distância, medida em micrômetros, entre o plano superior do filtro e o destas duas células em foco, permitiu avaliar a capacidade migratória dos neutrófilos. A leitura foi realizada em cinco campos de cada filtro e o resultado expresso como a média.

4.5.1.1 Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando software GraphPad Prism 5.0, pelo método ANOVA seguido do teste de Tukey ($p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão.

4.5.2 Atividade Hepatoprotetora e citotoxicidade

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Toxicologia (LATOX), em colaboração com o Prof. Dr. Marcelo Arbo.

4.5.2.1 Linhagem celular e cultura

Células de hepatoblastoma humano (HepG2) foram cultivadas em meio DMEM com glicose suplementado com 10% de SFB (soro fetal bovino) e 1% de antibiótico. Em atmosfera umidificada as células foram mantidas em 5% de CO₂ a 37 °C. O meio foi trocado a cada 2-3 dias. As culturas foram tripsinizadas (0,25% de tripsina/1 mM EDTA), quando as células atingiram 70-80% de confluência e repicadas por no máximo 10 passagens.

4.5.2.2 Avaliação da citotoxicidade através da redução do MTT e incorporação do vermelho neutro

As células HepG2 foram semeadas em uma densidade de 50.000 células/poço em placas de 96 poços completado com um volume de 200 µL de meio de cultura, para obter monocamadas confluentes em 24 horas.

No dia seguinte, as células foram incubadas com 0,1, 1, 10 e 100 µg/mL dos extratos metanólicos (*V. montevidensis* ou *V. litoralis*) ou 10, 25, 50 e 100 µM de brasosídeo, iridoide presente em ambas as espécies. As soluções estoque foram preparadas dissolvendo os extratos em solução salina tamponada (PBS) e o brasosídeo em DMSO. As soluções de trabalho foram preparadas por diluições das soluções estoque em meio de cultura. Quando se utilizou DMSO, a concentração deste em meio de cultura não foi superior a 0,1%, nestes casos um controle de solvente (DMSO 0,1%) foi utilizado nos experimentos. Todas as amostras foram testadas em três experimentos independentes, com cada concentração em seis replicatas por ensaio.

O ensaio de redução do MTT mede a atividade das enzimas desidrogenases intracelulares, sendo um indicador de mitocôndrias metabolicamente ativas, desta forma, utilizado para estimar a viabilidade celular. Após 24 h de incubação com os tratamentos, as células foram mantidas a 37 °C com PBS contendo 0,5 mg/mL de MTT. Após 2 h, o meio de cultura foi removido e adicionou-se DMSO para dissolver os cristais de formazana. A absorbância foi medida a 585 e 600 nm em leitor de placa de poços múltiplos (SpetraMax M2e, SoftMax[®] Pro5, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Os resultados foram expressos como porcentagem de morte celular versus a concentração (Dias da Silva *et al.*, 2015).

O corante vermelho neutro (VN) é incorporado por meio de transporte ativo através da membrana plasmática da célula e mantida dentro dos lisossomos. Desta maneira, as células intactas podem incorporar o corante, diferentemente das células mortas ou danificadas, que não conseguem incorporá-lo, assim possibilitando estimar a viabilidade celular. Após 24 h de incubação das células HepG2, o meio foi substituído por PBS contendo 50 mg/mL de VN. As células foram mantidas a 37 °C por 2 h e em seguida, lavadas com PBS e lisadas com uma solução de 50% etanol/ 1% de ácido acético glacial. A absorbância foi medida a 540 nm em leitor de placa de poços múltiplos (SpectraMax M2e, SoftMax[®] Pro5, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). A porcentagem de morte celular em relação ao controle foi utilizada como medida de citotoxicidade (Arbo *et al.*, 2014).

4.5.2.3 Atividade hepatoprotetora

Para avaliar a atividade hepatoprotetora dos extratos metanólicos de *V. montevidensis*, *V. littoralis* e brasosídeo, as células foram semeadas a uma densidade de 50.000 células/poço em placa de 96 poços (volume final de 200 µL). Após 24 h, as células foram co-incubadas com 400 µM de etanol (Bak *et al.*, 2016) juntamente com 0,1, 1, 10 e 100 mg/L de extratos ou 10, 25, 50 e 100 µM de brasosídeo. Curcumina 50 µM foi utilizado como controle positivo. Após 24 h, foi determinada a morte celular através dos ensaios de redução do MTT e incorporação do VN. Os resultados finais foram expressos como porcentagem das condições de controle a partir de três experimentos independentes, com cada concentração testada em seis replicatas em cada ensaio.

4.5.2.4 Análise estatística

Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média (SEM) a partir de pelo menos três experimentos independentes. A normalidade da distribuição dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. A significância foi aceita para $p < 0,05$.

As comparações estatísticas entre grupos foram realizadas com ANOVA seguido por teste *post-hoc* de Bonferroni.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No desenvolvimento deste trabalho, um *screening* fitoquímico foi realizado com algumas espécies do gênero *Glandularia* e *Verbena* utilizando CLAE (**Tabela 1**).

As espécies de ambos os gêneros apresentaram predomínio de compostos com UV de feniletanoides. Várias atividades biológicas e farmacológicas são atribuídas a estes compostos, possivelmente pela atividade antioxidante uma vez que, por serem compostos fenólicos, possuem habilidade de sequestrar ânion superóxido ou radical hidroxila (Lee *et al.*, 2004).

Além dos feniletanoides, foram observados também compostos com perfil UV de absorção na região UV de iridoídeos e flavonas. Desta forma, entre as espécies analisadas cinco foram selecionadas (*G. selloi*, *G. lobata*, *V. montevidensis*, *V. hirta* e *V. bonariensis*) para isolamento dos componentes majoritários. Os dados espectroscópicos dos compostos isolados estão apresentados em anexo.

5.1 *Glandularia selloi*

O extrato metanólico bruto de *G. selloi* apresentou rendimento de 4,4 g (61%) para raízes e 81 g (64%) para partes aéreas. O fracionamento do extrato das raízes resultou no isolamento de um iridoídeo glicosilado, **composto Gs1** (40 mg).

O fracionamento do extrato das partes aéreas de *G. selloi* resultou no isolamento de duas flavonas acetiladas, **composto Gs2** (14 mg) e **composto Gs3** (23 mg).

Em CLAE, foi observado um composto com perfil de feniletanoide, com mesmo tempo de retenção de uma amostra padrão de verbascosídeo, confirmando o relato de Comerlato (2014).

Os resultados obtidos a partir desta espécie estão apresentados no artigo intitulado “Chrysoeriol derivatives and other constituents from *Glandularia seloi*” (manuscrito I em preparação), apresentado em anexo.

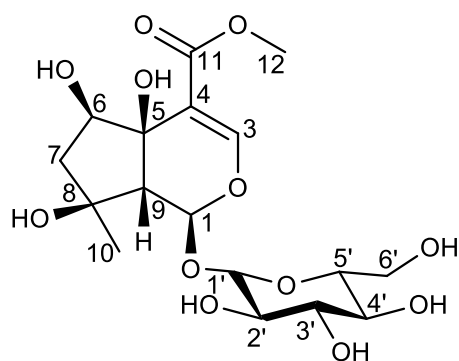
5.1.1 Composto Gs1

O composto Gs1 foi obtido após sucessivas CC, ao ser eluído com acetato de etila:metanol (90:10), como um sólido castanho amorfo, espectro de UV com banda intensa de absorção em 230,6 nm.

Os espectros de RMN uni e bidimensionais (**Tabela 3**), demonstram sinais que sugerem esqueleto iridoidal, como os simpletos em δ_H 7,45 ppm e δ_H 5,75 ppm correspondendo aos H-3 e H-1. Estes sinais estão correlacionados com os sinais em δ_C 151,8 ppm (C-3) e δ_C 93,6 ppm (C-1), respectivamente. Também pode-se observar o sinal referente ao grupo carbometoxila em C-4 (δ_C 113,4 ppm). A presença de uma β -glicose é indicada pelos sinais entre δ_H 3,23 – 3,85 ppm juntamente com o hidrogênio anomérico em δ_H 4,73 ppm.

Os dados de RMN obtidos foram comparados aos apresentados previamente na literatura (De Luca *et al.*, 1983), possibilitando identificar o composto com fórmula estrutural $C_{17}H_{26}O_{12}$ como 6β -OH-ipolamiida.

A 6β -OH-ipolamiida também foi confirmada através de CLAE-EM por injeção direta. Obteve-se o íon molecular $[M+Na]^+$ em 445 m/z , que consiste na fórmula molecular $C_{17}H_{26}O_{12}$, corroborando os dados apresentados por Yalçın e colaboradores (2008).



6β-OH-ipolamiida

Tabela 3. Comparação dos dados de RMN de ^1H e de ^{13}C do composto Gs1 e da 6β-OH-ipolamiida em D_2O .

Posição	^1H (δ_{H})	^{13}C (δ_{C})	HMBC	6β-OH-ipolamiida (De Luca <i>et al.</i> , 1983) (δ_{C})
1	5,75 (s)	93,6	5, 1', 3	94,2
3	7,45 (s)	151,8	5, 1, 4, 11	154,5
4		113,4		112,8
5		67,9		70,4
6	3,33 (d)	76,3		74,5
7	2,14 – 2,36 (dd)	44,9	5, 4	47,0
8		78,2		74,1
9	2,71 (s)	56,0	10, 5, 8, 1, 4	59,1
10	1,03 (s)	19,7	6, 9, 8	23,6
11		168,1		169,0
12	3,69 (s)	51,7	11	52,7
1'	4,73 (d)	98,3	1	99,3
2'	3,23 (m)	72,4	5', 1'	73,3
3'	3,58 (d)	76,3		76,1
4'	3,34 (m)	69,6	3'	70,4
5'	3,44 (s)	75,2	4'	77,2
6'	3,63 – 3,85 (d)	60,6		61,5

Esse iridoide já foi relatado para outras plantas, como *Stachytarpheta mutabilis* (De Luca *et al.*, 1983), (Verbenaceae), *Adenocalymma peregrinum* (Bignoniaceae) (dos Santos *et al.*, 2014) e *Wiedemannia orientalis* (Lamiaceae) (Güvrnalp *et al.*, 2006).

Quando *Glandularia* era classificada como parte do gênero *Verbena*, Milz e Rimpler (1979) relataram isolamento de iridoide de estrutura similar à da ipolamiida.

5.1.2 Composto Gs2

O composto Gs2 foi isolado empregando-se sucessivas CC, eluído nas frações de acetato de etila:metanol (96:04), como um pó amarelo, m/z 637,1763 $[M+H]^+$, fórmula molecular $C_{29}H_{33}O_{16}$.

Os espectros uni e bidimensionais (**Tabela 4**), mostraram sinais característicos de flavonoides. No espectro de 1H , a presença do anel B do flavonoide dissustituído é indicada pelos deslocamentos de três sinais em δ_H 7,59 ppm, δ_H 6,96 ppm e δ_H 7,61 ppm correspondentes aos H-2', H-5' e H-6'. A presença de dois dupletos em δ_H 6,40 ppm e δ_H 6,84 ppm correspondem aos H-6 e H-8 do anel A do flavonoide, caracterizando substituições nas posições 5 e 7. O sinal em δ_H 7,00 ppm foi atribuído ao H-3 do anel C. Dessa forma, conforme Sahin *et al.* (2004) e Calis *et al.* (2002), os dados indicam crisoeriol como a aglicona da estrutura.

Os simpletos em δ_H 3,90 ppm e δ_H 1,83 ppm indicam a presença de uma metoxila (H-7') e um grupo acetil (H-7''), respectivamente. O sinal em δ_H 12,99 ppm indica a presença de uma hidroxila na posição C-5 e, também, foi possível observar a presença de duas unidades de açúcar na estrutura.

No espectro de HMBC foi detectado que o C-7 apresenta correlação com H-6, confirmando, desta forma, a atribuição deste carbono nesta posição. A correlação entre C-7 e H-1'', sugere que a glicose está ligada ao C-7 da aglicona.

Por meio do experimento de 1H - 1H TOCSY, as estruturas dos açúcares foram determinadas e desta forma, obteve-se a completa elucidação do composto Gs2.

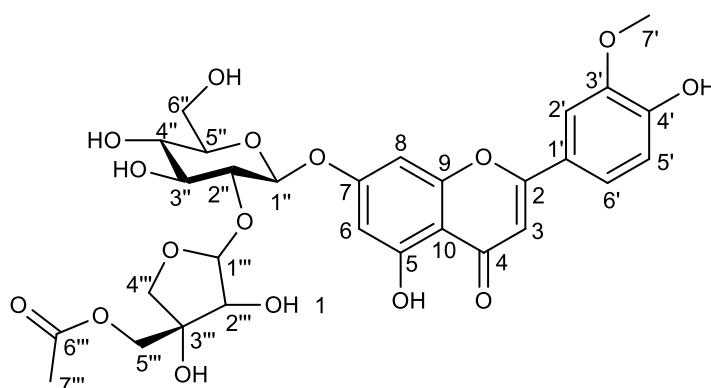
Nos experimentos de 1H - 1H TOCSY observou-se que a irradiação do sinal δ_H 5,20 ppm (d, $J = 7,5$ Hz) resultou em um sistema de rotação β -glucopiranosil. Por outro lado, o sinal δ_H 5,38 ppm (s), resultou em apenas um simpleto em δ_H 3,65 ppm, sugerindo a presença de uma unidade de apiofuranosil. O mesmo efeito foi previamente observado por Rinaldo e colaboradores (2007).

A constante de acoplamento 7,5 Hz do hidrogênio anomérico da glicose bem como o deslocamento químico (δ_C 108,5 ppm) do carbono anomérico da apiose demonstram que ambas porções anoméricas dos açúcares estão em configuração β (Jung *et al.* 2004; Rinaldo *et al.* 2007).

A correlação entre H-2'' (δ_H 3,53 ppm) com o carbono em C-1''' (δ_C 108,5 ppm) indica a ligação glicose – apiose (1''' \rightarrow 2''). Este fato é confirmado pelo aumento do deslocamento químico de C-2'' (δ_C 75,8 ppm), quando comparado a um análogo da estrutura de glicose não substituída (δ_C 72,8 ppm).

Ao comparar os deslocamentos químicos dos açúcares, observa-se que o sinal em δ_C 67,8 ppm (C-5''') da apiose encontra-se mais deslocado, indicando a acetilação nesta posição. Quando comparado a um análogo não acetilado, este carbono apresenta deslocamento de 62,4 ppm (Rinaldo *et al.*, 2007).

Desta forma, o composto Gs2 foi identificado como crisoeriol 7-*O*-[5'''-*O*-acetil- β -apiofuranosil-(1''' \rightarrow 2'')- β -glicopiranosídeo], o qual foi denominado seloisídeo A. Este é um produto de estrutura inédita, sendo também o primeiro relato deste tipo de flavonas em Verbenaceae.



Seloisídeo A

Tabela 4. Dados de RMN uni (^1H , ^{13}C e APT) e bidimensionais (HSQC e HMBC) do composto Gs2, em DMSO- d_6 .

Posição	^1H (δ_{H})	^{13}C (δ_{C}); tipo	HMBC
Aglicona			
2		164,7; C	
3	6,99 (s)	103,9; CH	2, 10
4		182,5; C	
5		161,6; C	
6	6,40 (m)	99,7; CH	7, 8, 10
7		163,0; C	
8	6,83 (d) $J=2,1$	95,1; CH	6, 9, 10
9		157,4; C	
10		105,8; C	
1'		121,7; C	
2'	7,59 (s)	110,8 CH	1', 4'
3'		148,6; C	
4'		151,5; C	
5'	6,96 (d) $J=8,2$	116,3; CH	1', 3'
6'	7,62 (d) $J=2,1$	121,0; CH	2'
7'	3,90 (s)	56,5; CH_3	3'
5-OH	12,99 (s)		5, 6, 10
Glicose			
1''	5,20 (d) $J=7,3$	98,2; CH	7
2''	3,53 (m)	75,8; CH	1'', 2'', 1'''
3''	3,48	77,3; CH	4'', 2''
4''	3,19	70,3; CH	6'', 5'', 3''
5''		77,5 CH	
6''	3,47	60,9; CH_2	5'', 3''
	3,71		4'', 2''
Apiose			
1'''	5,39 (s)	108,5; CH	3''', 4'''
2'''	3,66 (s)	76,9; CH	5''', 4'''
3'''		77,7; C	
4'''	3,74	74,5; CH_2	1''', 3''', 5'''
	4,01 (d), $J=9,5$		1''', 5'''
5'''	3,93 (d) $J=3,5$	67,8; CH_2	3''', 6'''
6'''		170,5; C	
7'''	1,83 (s)	20,8; CH_3	6'''

5.1.3 Composto Gs3

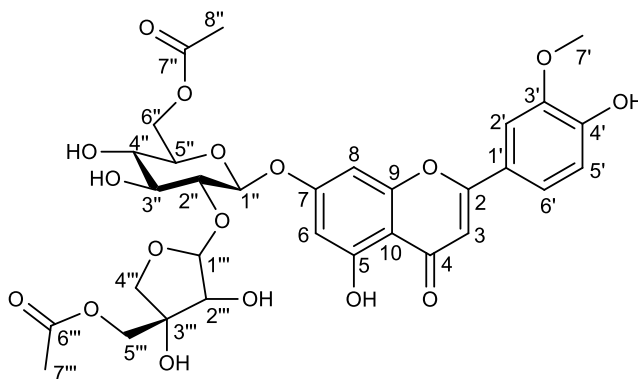
O composto Gs3 (23 mg) foi isolado empregando sucessivas CC, eluída com acetato de etila:metanol (98:02), obtido como um pó amarelo, m/z 679,1869 $[\text{M}+\text{H}]^+$, fórmula molecular $\text{C}_{31}\text{H}_{35}\text{O}_{17}$.

Os espectros de RMN do composto Gs3 (**Tabela 5**) foram semelhantes ao obtidos para o composto Gs2. Desta forma, foram observados crisoeriol como aglicona desta estrutura e dois açúcares, uma glicose e uma apiose.

Adicionalmente nos espectros de ^1H , foi observada a presença de um sinal adicional em δ_{H} 1,99 ppm referente a outro grupo acetil e deslocamento do H-6 e C-6 da glicose.

Observa-se que o sinal em δ_{C} 63,7 ppm, referente ao C 6'' da glicose está mais deslocado, quando comparado com um análogo não acetilado onde o deslocamento deste carbono é observado em aproximadamente δ_{C} 60,9 ppm, indicando a acetilação nessa posição do açúcar.

Desse modo, a estrutura do **composto Gs3** foi determinada como crisoeriol 7-*O*-[5'''-*O*-acetil- β -apiofuranosil (1''' \rightarrow 2'')-6''-*O*-acetil- β -glicopiranosídeo], o qual recebeu o nome trivial de seloisídeo B.



Seloisídeo B

Tabela 5. Dados de RMN uni (^1H , ^{13}C e APT) e bidimensionais (HSQC e HMBC) do composto Gs3, em DMSO- d_6 .

Posição	^1H (δ_{H})	^{13}C (δ_{C})	APT	HMBC
Aglicona				
2		164,7	C	
3	7,01 (s)	103,9	CH	2, 10
4		182,5	C	
5		161,6	C	
6	6,41 (m)	99,6	CCH	10, 7
7		162,7	C	
8	6,77 (d) $J=2,2$	95,1	CCH	6,7, 10, 9
9		157,4	C	
10		105,9	C	
1'		121,7	C	
2'	7,59 (s)	110,9	CH	3', 4', 6'
3'		148,5	C	
4'		151,5	C	
5'	6,95 (d) $J=8,8$	116,2	CH	1', 3'
6'	7,61 (d) $J=2,1$	120,9	CH	2'
7'	3,90 (s)	56,5	CH ₃	3'
5-OH	12,99 (s)			5, 6, 10
Glicose				
1''	5,24 (d) $J=7,6$	97,9	CH	7
2''	3,55 (m)	75,7	CH	1'', 2'', 1'''
3''	3,50 (s)	76,9	CH	2'', 4''
4''	3,50 (s)	70,5	CH	2''
5''	3,78 (m)	74,1	CH	
6''	4,05 (m)	63,7	CH ₂	3'', 5'', 7''
	4,33 (dd)			
	11,8; 1,8			
7''		170,5	C	
8''	1,99	21,0	CH ₃	7''
Apiose				
1'''	5,38 (s)	108,6	CH	3''', 4'''
2'''	3,67 (s)	76,9	CH	5'''
3'''		77,7	C	
4'''	3,75 (d) $J=9,5$	74,3	CH ₂	1''', 3'''
	4,03 (m)			
5'''	3,95 (d) $J=1,9$	67,5	CH ₂	4''', 3''', 6'''
6'''		170,6	C	
7'''	1,84 (s)	20,8	CH ₃	6'''

5.2 *Glandularia lobata*

O extrato metanólico bruto das partes aéreas de *G. lobata* apresentou rendimento de 2,5 g (50%). O fracionamento do extrato resultou no isolamento de um iridoide glicosilado, **composto G11** (23 mg) e um feniletanoide **composto G12** (100 mg).

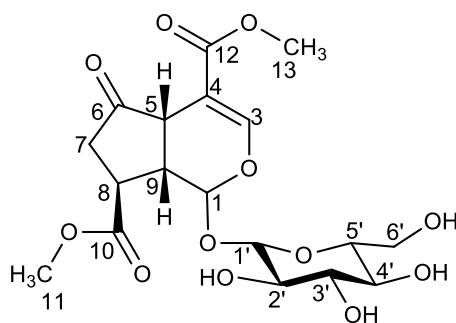
5.2.1 Composto G11

O composto G11 foi obtido por CC, ao ser eluído nas frações de acetato de etila:metanol (90:10), obtido como um sólido amorfo castanho.

Os espectros de ^1H e ^{13}C (**Tabela 5**), apresentam sinais característicos de esqueleto básico de iridoide, tais como o simpleto em δ_{H} 7,47 ppm e duplete em δ_{H} 5,22 ppm correspondentes aos H-3 e H-1, juntamente com os sinais δ_{C} 153,9 ppm e δ_{C} 95,8 ppm dos C-3 e C-1, respectivamente. Também podem ser observados sinais em δ_{H} 3,65 ppm e δ_{H} 3,66 ppm, dos ésteres metílicos. A presença destes grupamentos foi confirmada através dos sinais em δ_{C} 52,9 ppm e δ_{C} 52,1 ppm, referentes às metoxilas, e em δ_{C} 168,7 ppm e δ_{C} 175,5 ppm, referentes às carbonilas na posição C-10 e C-11. O espectro de ^{13}C apresentou 17 sinais de carbono, sendo que os sinais de C-5 e C-8 encontram-se sobrepostos.

A presença de uma β -D-glicose é indicada pelos sinais entre δ_{H} 3,22 – 3,78 ppm juntamente com o sinal do hidrogênio anomérico em δ 4,75 ppm.

Os dados de RMN obtidos foram comparados àqueles publicados por Jensen e Nielsen (1980) e Ono *et al.* (2006) possibilitando identificar o composto G11 como griselinósídeo.



Griselinosídeo

Tabela 6. Dados RMN ^1H e ^{13}C do composto G11 e griselinosídeo (D_2O , 400 MHz).

Posição	^1H (δ_{H})	^{13}C (δ_{C})	griselinosídeo (Ono <i>et al.</i> , 2006) (δ_{C})
1	5,22 (d)	95,8	97,3
3	7,47 (s)	153,9	154,1
4		102,9	105,1
5	3,30 (m)*	38,9	40,2
6		216,1	213,3
7	2,58 – 2,69 (dd)	37,1	37,8
8	3,30 (m)*	38,9	40,1
9	2,81 (dd)	39,7	41,3
10		175,5	175,7
11	3,65 (s)	52,9	53,0
12		168,7	168,5
13	3,66 (s)	52,1	52,0
Glicose			
1'	4,75 (d)	99,2	101,1
2'	3,22 (m)	72,5	74,6
3'	3,51 (m)	75,5	78,0
4'	3,34 (m)	69,3	71,6
5'	3,38 (d)	76,2	78,4
6'	3,58 – 3,78 (dd)	60,4	62,7

* Estes sinais podem ser intercambiáveis.

Este iridoide foi anteriormente isolado de três espécies de *Verbena* (*V. hirta*, *V. bonariensis* e *V. rigida*) (Milz e Rimpler, 1979). No desenvolvimento deste trabalho, griselinosídeo foi também isolado de *V. hirta* e *V. bonariensis*.

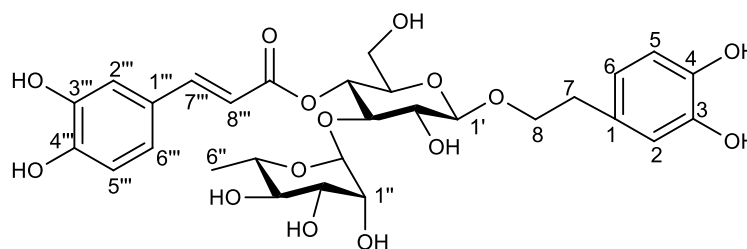
5.2.2 Composto G12

O composto G12 foi obtido após CC das frações eluídas com acetato de etila:metanol (95:05).

No espectro de ^1H foi observado um conjunto de sinais característicos de um feniletanoide. A porção 3-4 dihidroxifeniletíl da molécula pode ser observada pelo deslocamento dos sinais em δ_{H} 6,82 ppm (2H, d, $J=8,6$ Hz) correspondendo aos H-5 e H-2, juntamente com um sinal em δ_{H} 6,65 (1H, d, $J=8$ Hz, H-6), δ_{H} 2,75 ppm (2H, m, H-7) e δ_{H} 3,74-3,82 (2H, m, H-8).

Também foi possível verificar a presença do ácido caféico pelos deslocamentos em δ_{H} 6,28 ppm, (1H, d, $J=15,7$ Hz, H-8'''), δ_{H} 6,88 ppm (1H, d, $J=6$ Hz, H-5'''), δ_{H} 7,00 (1H, d, $J=6,5$ Hz, H-6'''), δ_{H} 7,13 (1H, s, H-2'''), δ_{H} 7,59 ppm (1H, d, $J=15,7$ Hz, H-7'''). Sinais de hidrogênio entre δ_{H} 3,00 e 4,00 ppm revelaram a presença de açúcar na molécula. Um duplete em δ_{H} 1,05 ppm (3H, $J=5,8$ Hz, H-6'') juntamente com o hidrogênio anomérico em δ_{H} 5,11 confirmam a presença de uma α -ramnose. Também pode ser observado um duplete em 4,64 com $J=7,9$ Hz atribuído a um hidrogênio anomérico de uma β -glicose.

Ao comparar aos dados de RMN da substância isolada com os dados apresentados por Andary e colaboradores (1982), foi possível identificar o composto G12 como verbascosídeo, também denominado acteosídeo.



Verbascosídeo

5.3 *Verbena montevidensis*

O extrato bruto das partes aéreas *Verbena montevidensis* apresentou rendimento de 2,68 g (34,8 %). O fracionamento dos extratos resultou no isolamento de um iridoide glicosilado, **composto Vm1** (12 mg).

5.3.1 Composto Vm1

Composto Vm1, sólido castanho amorfo, foi obtido empregando CC, ao ser eluído com acetato de etila:metanol (97:03).

Nos dados dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (**Tabela 7**), pode-se observar deslocamentos químicos de esqueleto iridoidal. Dois dupletos em δ_{H} 7,36 ppm e δ_{H} 5,67 ppm, correspondente aos H-3 e H-1, estão correlacionados aos carbonos em δ_{C} 150,1 ppm e δ_{C} 94,6 ppm respectivamente.

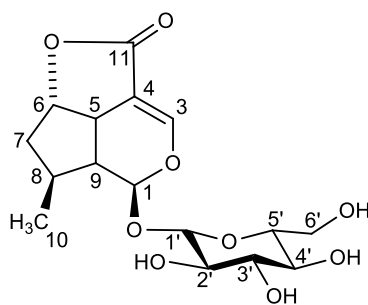
O sinal em δ_{H} 5,11 ppm está relacionado ao sinal δ_{C} 83,8 ppm, correspondendo ao C-6. Já os hidrogênios H-7, com deslocamentos em δ_{H} 1,64 ppm e 2,00 ppm correlacionam com o sinal em δ_{C} 41,0 ppm.

O sinal do carbono carboxílico da lactona, correspondente ao C-11, apresentou deslocamento químico em δ_{C} 174,3 ppm. Também foi possível observar o sinal de uma metila, um duplete em δ_{H} 0,95 ppm, juntamente com o sinal em δ_{C} 16,7 ppm, atribuído ao C-10.

Os sinais entre 3,27 ppm e 3,87 ppm, juntamente com o sinal em 4,83 (hidrogênio anomérico), evidenciam a presença de uma molécula de glicose ligada em configuração β .

Os dados de ressonância magnética da substância isolada, foram semelhantes aos dados apresentados por Rimpler e Franke (1987). Desta forma, o composto foi identificado como brasosídeo.

Este composto foi previamente isolado de outras espécies do gênero *Verbena* como *V. brasiliensis* (Rimpler e Franke, 1987), *V. litoralis* (Castro e Umanã, 1990) e *V. bracteata* (Milz e Rimpler, 1979).



Brasosídeo

Tabela 7. Dados RMN ^1H e ^{13}C do composto Vm1 e brasosídeo (D_2O , 400Mz).

Posição	^1H (δH)	^{13}C (δC)	brasosídeo (Rimpler e Franke, 1987) (δC)
1	5,67 (d)	94,6	96,71
3	7,36 (d)	150,1	150,74
4		103,3	104,13
5	3,41 (d)	37,9	38,53
6	5,11 (m)	83,8	84,54
7	1,64– 2,00 (m)	41,0	41,70
8	1,83 (dd)	31,5	32,24
9	2,10 (m)	44,8	45,57
10	0,95 (d)	16,7	17,40
11		174,3	175,13
Glicose			
1'	4,83 (d)	98,6	99,51
2'	3,27(s)	72,6	73,45
3'	3,46 (m)	75,5	76,33
4'	3,34 (d)	69,6	70,37
5'	3,44 (d)	76,3	77,11
6'	3,66 – 3,87 (dd)	60,7	61,50

5.4 Atividades biológicas

Na medicina popular, plantas amargas sempre foram consideradas bons remédios para tratar doenças hepáticas. Diversas plantas amargas são tradicionalmente utilizadas para estimular, limpar e proteger o fígado e vesícula biliar (Kumar *et al.*, 2005).

A utilização de aperitivos preparados com raízes de genciana é uma prática muito antiga, especialmente em países da Europa. Esses preparados são muito amargos e assim, conhecidos como “bitter”. Essa planta apresenta iridoides como componentes majoritários e esses metabólitos secundários são reconhecidos pelo intenso sabor amargo (McMullen *et al.*, 2014).

Na região sul do Brasil, dentre as plantas utilizadas na medicina popular para o tratamento de doenças do fígado, destaca-se as pertencentes à família Verbenaceae, como algumas espécies de *Verbena* conhecidas popularmente como “fel-da-terra” devido ao sabor amargo (Ritter *et al.*, 2002; Borges, 2010; Barros *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2015). O gênero *Verbena* é uma reconhecida fonte de iridoides, os quais conferem sabor amargo às plantas.

Extratos de diversas plantas como *Gentiana*, *Swertia* e *Gentianella* (Gentianeae) e *Gardenia jasminoides* (Rubiaceae), que possuem iridoides, são usadas como hepatoprotetores. Alguns iridoides isolados destas espécies provaram ser responsáveis por essa atividade. (Chen *et al.*, 2016). Assim, a propalada atividade hepatoprotetora de espécies de *Verbena* pode ser atribuída aos iridoides.

Os resultados obtidos a partir das atividades biológicas estão apresentados no artigo intitulado “Hepatoprotective and antichemotactic activities of *Verbena litoralis*, *Verbena montevidensis* and their main iridoid, brasoside” (manuscrito II em preparação), apresentado em anexo

5.4.1 Atividade hepatoprotetora e citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade dos extratos metanólicos de *V. montevidensis* e *V. litoralis* (0,1; 1; 10 e 100 µg/mL), bem como do brasosídeo, iridoide presente na composição química de ambos os extratos, (10; 25; 50 e 100 µM) foi realizada através dos ensaios de redução do sal de MTT e incorporação do VN. Os resultados estão apresentados em porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle (**Figura 3**).

Os testes de citotoxicidade realizados tanto pelo ensaio de redução do MTT quanto pela incorporação do VN, demonstraram que os extratos metanólicos de *V. montevidensis* e *V. litoralis* e o brasosídeo, não foram citotóxicos nas concentrações testadas. Esses resultados sugerem que *in vitro*, estas amostras não apresentam potencial tóxico em células HepG2.

O efeito hepatoprotetor dos extratos metanólicos e o brasosídeo foi avaliado nas mesmas condições do ensaio de citotoxicidade, utilizando 400 µM de etanol como agente hepatotóxico. Como controle positivo utilizou-se a curcumina, um produto natural com reconhecida atividade hepatoprotetora. Os resultados estão expressos em porcentagem de células vivas em relação ao controle (**Figura 4**).

Foi observado que os extratos metanólicos de *V. montevidensis* e *V. litoralis* tiveram um efeito semelhante tanto no ensaio de redução do MTT, quanto no ensaio de incorporação do VN. Os resultados mostram que, nas concentrações co-incubadas com o etanol, os extratos metanólicos foram eficientes na proteção das mesmas, não havendo morte celular, apresentando um efeito semelhante ao da curcumina (grupo controle).

O produto isolado, brasosídeo, protegeu as células nas menores concentrações testadas, 10 e 25 µM. Porém, o produto foi menos efetivo que a curcumina. Nas maiores concentrações, 50 e 100 µM, houve diminuição da viabilidade celular.

Gardenia jasminoides Ellis (Rubiaceae) é utilizada na medicina popular para tratamento de doenças hepáticas. Os constituintes majoritários presentes nessa planta são iridoides glicosídicos (geniposídeo gardenosídeo, genipina), relatados na literatura como hepatoprotetores (Chen *et al.*, 2016). Liang e colaboradores (2015) observaram o mesmo efeito com o iridoide gardenosídeo, considerado hepatoprotetor nas concentrações 10 e 20 µM, sendo tóxico em HepG2 nas concentrações de 30, 40 e 50 µM.

Neopicrorhiza scrophulariiflora (Plantaginaceae), utilizada na medicina tradicional chinesa, é outro exemplo de planta com atividade hepatoprotetora. Os iridoides presentes nesta planta, principalmente picrosídeo B, picrosídeo I, II e III, apresentaram essa atividade quando as células foram danificadas por tetracloreto de carbono (CCl₄) (Dinda *et al.*, 2009).

Outra classe de metabólitos secundários com ampla atividade hepatoprotetora são os feniletanoides, que protegem as células contra lesão causada por CCl₄. Shen e colaboradores (2015) sugerem que a atividade destes compostos esteja relacionada a atividade antioxidante e a baixa regulação do fator nuclear kappa B.

Neste contexto, verificou-se que os extratos metanólicos foram mais ativos que o produto isolado. Esse efeito possivelmente pode estar relacionado ao sinergismo entre o feniletanoide verbascosídeo e o iridoide brasosídeo, produto isolado que foi testado pelos ensaios de MTT e vermelho neutro.

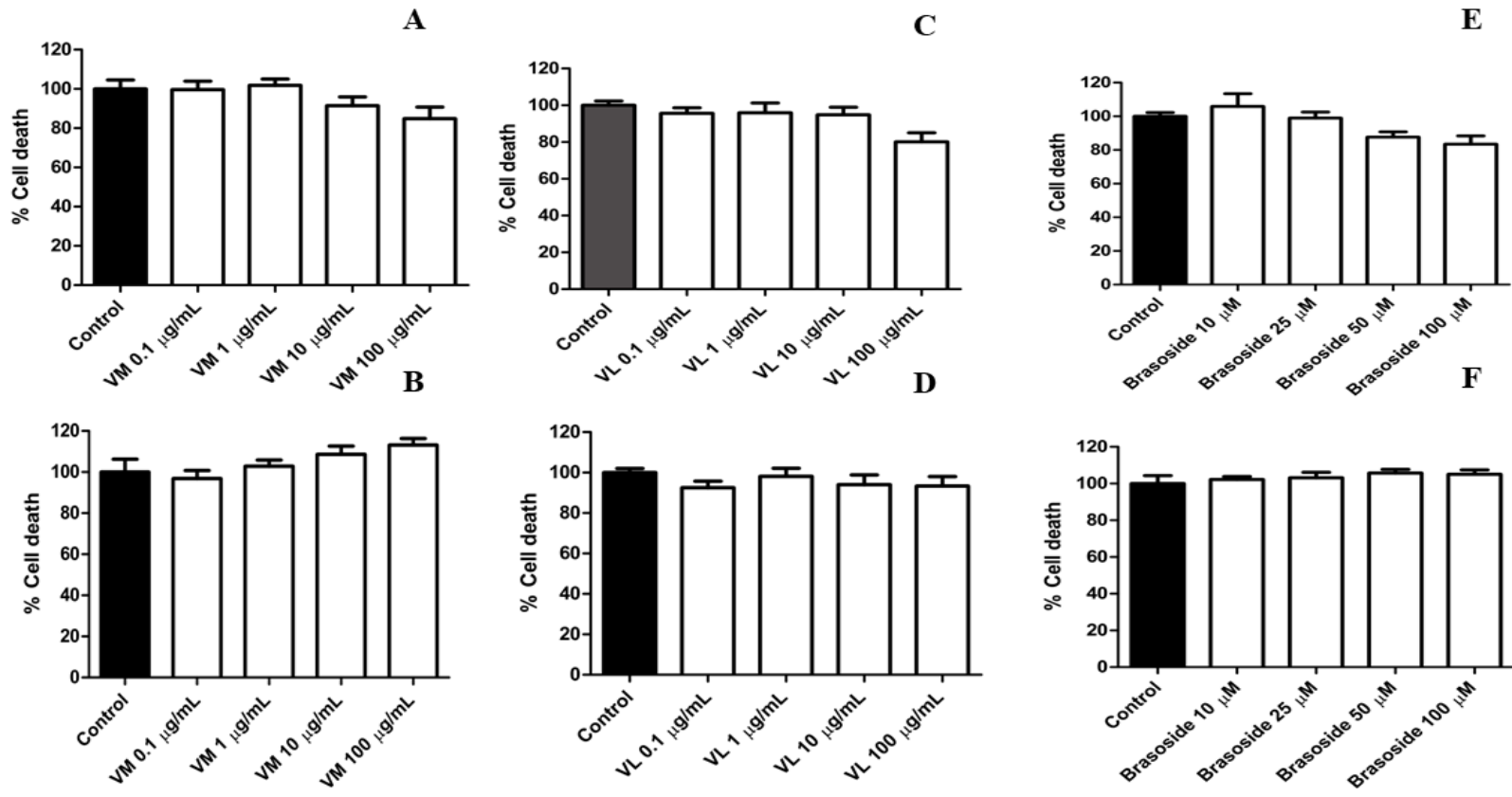


Figura 3. Citotoxicidade de extrato metanólico de *V. montevicensis* (A e B), *V. littoralis* (C e D) e brasósídeo (E e F) pelos métodos de MTT (A, C, E) e VN (B, D, F), respectivamente. Análise estatística por ANOVA ($p > 0,05$).

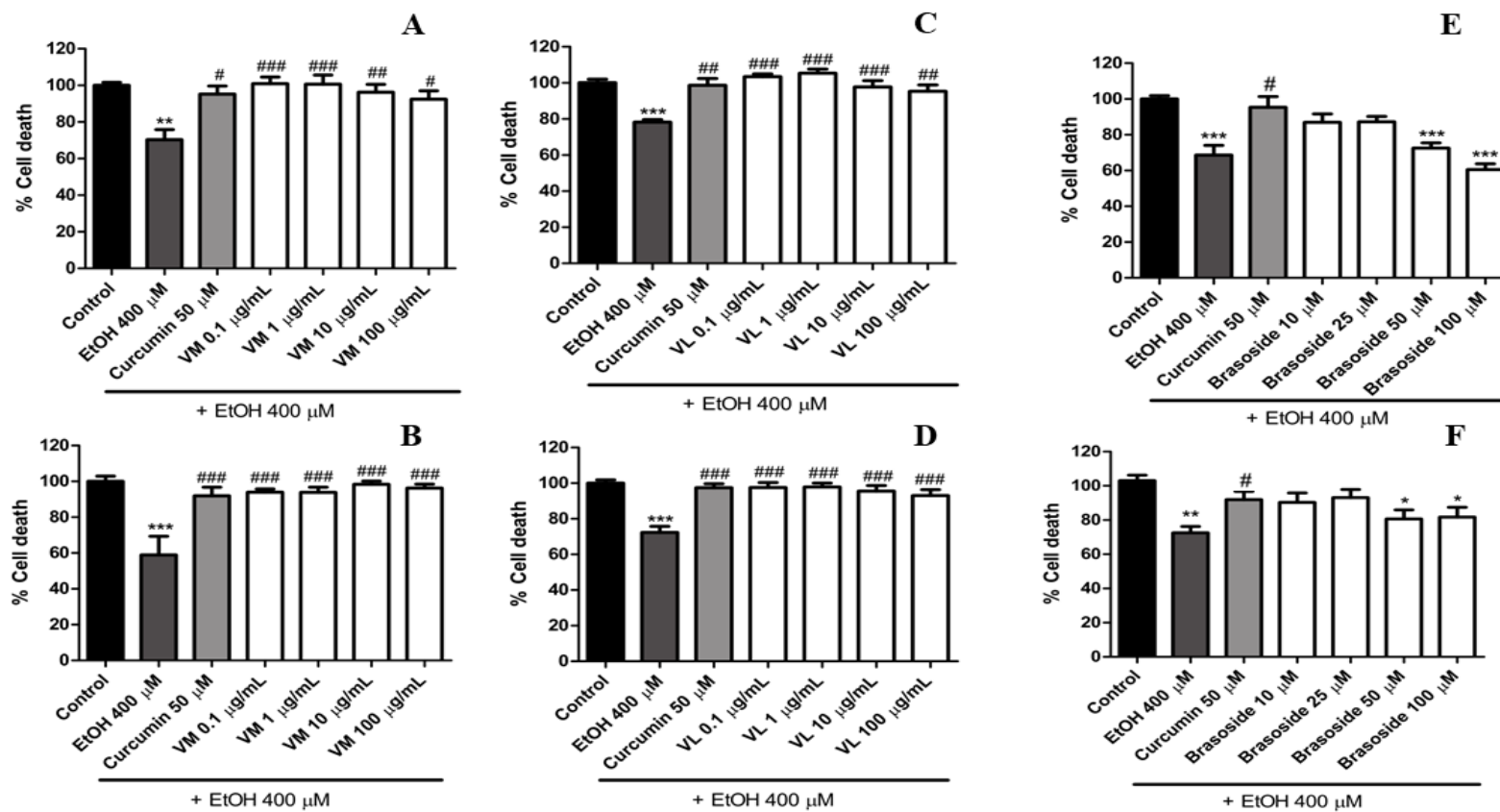


Figura 4. Atividade hepatoprotetora de *V. montevidensis* (A e B), *V. litoralis* (C e D) e brasosideo (E e F) pelos métodos de MTT (A, C, E) e VN (B, D, F), respectivamente. Análise estatística por ANOVA/Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em relação ao controle. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ em relação ao etanol 400 μM .

5.4.2 Atividade antiquimiotóxica

Por meio do ensaio *in vitro* antiquimiotáxico foi possível avaliar o potencial anti-inflamatório do extrato metanólico de *V. montevidensis*, bem como seu produto isolado brasosídeo. Os resultados (**Figura 5**) estão expressos como a porcentagem de migração de leucócitos em relação ao controle negativo.

O extrato metanólico foi testado nas concentrações de 5 e 10 µg/mL e o brasosídeo nas concentrações de 0,1, 1 e 5 µg/mL. Todas as concentrações testadas apresentaram inibição significativa em relação ao LPS ($p < 0,05$).

A indometacina, fármaco com atividade anti-inflamatória comprovada, inibiu 60,9% da migração leucocitária na concentração de 10 µg/mL. Ao comparar a indometacina com as amostras testadas, o extrato de *V. montevidensis* na concentração de 10 µg/mL apresentou efeito semelhante ao da indometacina, inibindo 58,1% da migração leucocitária, assim, não havendo diferença significativa. Já na concentração de 5 µg/mL houve diferença significativa ($p < 0,05$), o extrato foi menos ativo que a indometacina, apresentando 27,5% de inibição leucocitária.

No teste realizado com o produto isolado, brasosídeo, verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) em relação à indometacina nas concentrações de 5 µg/mL e 0,1 µg/mL, apresentando inibição da migração leucocitária de 100 e 41,6 %, respectivamente. Desta forma, a concentração de 5 µg/mL foi mais ativa que a indometacina em menor concentração, enquanto que a concentração de 0,1 µg/mL apresentou menor efeito. A concentração de 1 µg/mL apresentou 60% de inibição, logo teve efeito semelhante, não apresentando diferença significativa.

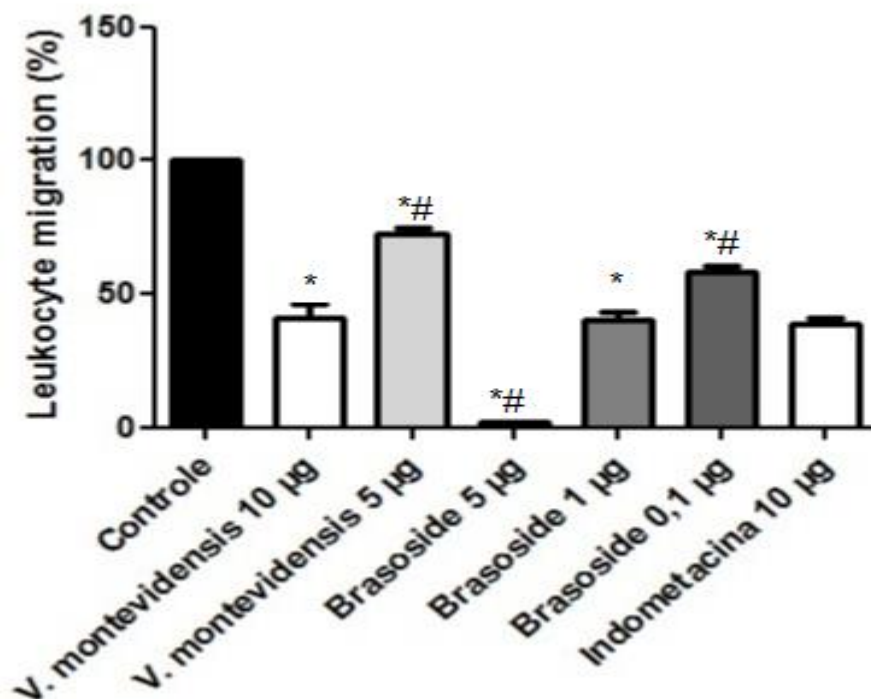


Figura 5. Efeito da migração leucocitária *in vitro* do extrato metanólico de *V. montevidensis*, o iridoide brasosídeo e a indometacina comparado ao LPS. *# $p < 0,05$ indicam diferença significativa comparado com o controle negativo e indometacina, respectivamente (ANOVA seguida por teste de Tukey's).

Os iridoides são uma classe de metabólitos secundários com reconhecida ação anti-inflamatória. Esses compostos possuem ação por diversos mecanismos. Asperulosídeo, por exemplo, atua inibindo mediadores pró-inflamatórios através da supressão da translocação nuclear do fator nuclear kappa-B (NF- κ B) e da fosforilação de MAPK (Qiu *et al.*, 2016)

Um modelo *in vivo* bem utilizado para avaliar a inflamação na fase aguda é o modelo da peritonite induzida pela carragenina, que permite quantificar e correlacionar a migração celular e o exsudato inflamatório (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004). Por esse método, iridoides como ipolamiida (Penido *et al.*, 2006) e lamiide (Delaporte *et al.*, 2002) apresentaram atividade anti-inflamatória.

Neste contexto, a ação antiquimiotáxica exibida pelo extrato metanólico de *Verbena montevidensis*, pode ser atribuído a presença do iridoide glicosídico brasosídeo, responsável pela atividade anti-inflamatória na fase aguda da inflamação.

Os experimentos para avaliação da atividade antiquimiotáxica do extrato metanólico de *V. litoralis* estão sendo realizados.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O gênero *Glandularia* é abundantemente encontrado no sul do Brasil. O Rio Grande do Sul é um dos estados brasileiros que se destaca pela diversidade de *Glandularia*, sendo encontradas 26 espécies (O’Leary e Thode, 2016).

O gênero *Verbena*, distribuído pelas Américas, é representado por 45 espécies. A história de *Verbena* está ligada ao gênero similar *Glandularia*. Anteriormente *Glandularia* era uma seção do gênero *Verbena* (O’Leary *et al.*, 2007).

Estudos acerca da composição química de espécies do gênero *Glandularia* são escassos. Em um estudo anterior realizado com a espécie *G. selloi*, foi observada a presença de feniletanoides, flavonas com estruturas parcialmente elucidadas e indícios de um iridoide, sugerido como 6- β -hidroxi-ipolamiida (Comerlato, 2014), sendo este o primeiro estudo relatando a composição química desta espécie.

No presente estudo foi possível isolar e elucidar dois novos compostos com estrutura inédita, denominados seloisídeo A e seloisídeo B, isolados do extrato metanólico das partes aéreas de *Glandularia selloi*. Estes produtos são derivados da flavona crisoeriol, com presença de dissacarídeos e acetilações. Este tipo de composto acetilado não é comum na Verbenaceae, sendo mais comumente relatado na família Lamiaceae. Além destes novos compostos, também foi isolado e confirmado a estrutura do iridoide glicosídico 6- β -hidroxi-ipolamiida.

No isolamento de compostos do extrato metanólico das partes aéreas da espécie *Glandularia lobata*, foi possível isolar e elucidar o iridoide glicosídico griselinósídeo, composto isolado também de partes aéreas de *V. hirta* e *V. bonariensis*. Esses resultados reforçam tamanha semelhança na composição química entre ambos os gêneros.

O isolamento de compostos da espécie *V. montevidensis* resultou em um iridoide glicosídico identificado como brasosídeo. Na literatura, esse iridoide foi relatado como parte da composição química da espécie *V. litoralis* (Castro e Umanã, 1990).

Os resultados dos testes para avaliação da atividade antiqumiotáxica realizados com o extrato de *V. montevidensis* e com seu produto isolado brasosídeo, sugerem que a atividade do extrato está relacionada especialmente ao iridoide glicosídico brasosídeo.

Os resultados obtidos para citotoxicidade *in vitro* demonstram que os extratos metanólicos de *V. montevidensis* e *V. litoralis* e o brasosídeo, não possuem citotoxicidade nas concentrações testadas frente a HepG2, assegurando sua utilização em estudos para investigações biológicas.

Os resultados da avaliação da atividade hepatoprotetora, aponta que os extratos metanólicos de *V. montevidensis* e *V. litoralis* são capazes de promover proteção das células quando lesadas por etanol. Nesse sentido reforça a utilização destas espécies na medicina popular para doenças hepáticas. O brasosídeo, produto presente nestes extratos protegeu as células apenas nas menores concentrações testadas, desta forma, sugere-se que o efeito protetor presente nestes extratos esteja relacionado ao sinergismo entre o brasosídeo e verbascosídeo.

7. REFERÊNCIAS

ABD-ALLAH, A.A.M.; ELDEEN, N.A.M.; MOHAMED, W.A.M.; NAGUIB, F. M. Mast cells and pro-inflammatory cytokines roles in assessment of grape seeds extract anti-inflammatory activity in rat model of carrageenan-induced paw edema. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 21, p. 97-107, 2018.

ANDARY, C.; WYLDE, R.; LAFFITE, C.; PRIVAT, G.; WINTERNITZ, F. Structures of verbascoside end orobanchoside, caffeic acid sugar eters from *Orobanche rapum-genistae*. **Phytochemistry**, v. 21, p. 1123-1127, 1982.

ARBO, M.D.; SILVA, R.; BARBOSA, D.J.; da SILVA, D.D.; ROSSATO, L.G.; BASTOS, M.L.; CARMO, H. Piperazine designer drugs induce toxicity in cardiomyoblast h9c2 cells through mitochondrial impairment. **Toxicology Letters**, v. 229, p. 178-189, 2014.

BAK, M.J.; TRUONG, V.L.; KO, S.Y.; NGUYEN, X.N.G.; INGKASUPART, P.; JUN, M.; SHIN, J.Y.; JEONG, W.S. Antioxidant and hepatoprotective effects of procyanidins from wild grape (*Vitis amurensis*) seeds in ethanol-induced cells and rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v.17, p. 758, 2016.

BARROS, F.M.C.; PEREIRA, K.N.; ZANETI, G.D.; HEINZMANN, B.M. Plantas de uso medicinal no município de São Luiz Gonzaga. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, p. 652-662, 2007.

BARTON, G.M. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, p. 413-420, 2008.

BEG, S.; SWAIN, S.; HASAN, H.; BARKAT, M.A.; HUSSAIN, M.S. Systematic review of herbals as potential anti-inflammatory agents: recent advances, current clinical status and future perspectives. **Pharmacognosy Review**, v. 5, p. 120-137, 2011.

BIANCO, A. Recent developments in iridoids chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v.66, p. 2335-2338, 1994.

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

BORGES, A.M. **Plantas medicinais no cuidado em saúde de moradores da Ilha dos Marinheiros: contribuições à enfermagem**. Dissertação, Programa de Pós Graduação em Enfermagem, Universidade Federal de Pelotas, p. 129, 2010.

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

CALIS, I.; KIRMIZIBEKMEZ, H.; ERSOZ, T.; SARACOGLU, I.; DONMEZ, A.A.; MITOVA, M.; HANDJIEVA, N.; POPOV, S. Iridoid, phenylethanoid and flavonoid glycosides from *Phlomis sintenisii*. **Acta Pharmaceutica Turcica**, v. 44, p.195–200, 2002.

CASTRO, O.; UMANÃ, E. Potencial biológico y químico de *Verbena littoralis*, uma planta medicinal usada em Costa Rica como agente antidiarreico. **Química nova**, v. 13, p. 310-311, 1990.

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

CHATTERJEE, R.; MITRA, A. An overview of effective therapies and recent advances in biomarkers for chronic liver diseases and associated liver cancer. **International Immunopharmacology**, v. 24, p. 335-345, 2015.

CHEN, P.; CHEN, Y.; WANG, Y.; CAI, S.; DENG, L.; LIU, J.; ZHANG, H. Comparative evaluation of hepatoprotective activities of geniposide, crocins and crocetin by CCl₄-induced liver injury in mice. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 24, p. 156-162, 2016.

COMERLATO, L.C. **Perfil químico de *Glandularia selloi* (Spreng.) Tronc. (VERBENACEAE) de ocorrência no rio grande do sul**. Dissertação, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.

CRAGG, G.M.; GROTHAUS, P.G.; NEYMAN, D.J. New horizons for old drugs and drugs leads. **Journal of Natural Products**, v. 77, p. 703-723, 2014.

CRESPAM, P.C. **Estudos da família Verbenaceae no Rio Grande do Sul, Brasil**. Dissertação, Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

De LUCA, C.; GUIISO, M.; MARTINO, C. 6- β -hydroxyipolamiide, an iridoid glucoside from *Stachytarpheta mutabilis*. **Phytochemistry**, v.22, p. 1185 -1187, 1983.

de OLIVEIRA, A.L.R.; SALIMENA, F.R.G. Nova combinação em *Glandularia* J. F. Gmel (Verbenaceae). **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 27, 2009.

DELAPORTE, R.H.; SÁNCHEZ, G.M.; CUELLAR, A.C.; GIULIANI, A.; 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.

Di CARLO, G., MASCOLO, N., IZZO, A.A.;CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Science**, v. 65, p. 337-353, 1999.

DIAS-DA-SILVA, D.; ARBO, M.D.; VALENTE, M.J.; BASTOS, M.L.; CARMO, H. Hepatotoxicity of piperazine designer drugs: comparison of different in vitro models. **Toxicology in Vitro**, v. 29, p. 987-996, 2015.

DINDA, B.; CHOWDHURY, D.R.; MOHANTA, B.C. Naturally occurring iridoids, secoiridoids and their bioactivity. An updated review, part 3, **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 57, p. 765-796, 2009.

DINDA, B.; DEBNATH, S.; HARYGAYA, Y. Naturally occurring iridoides. A review, part 1. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, p. 159-222, 2007.

- DOBLER, S.; PETSCHENKA, G.; PANKOKE, H. Coping with toxic plant compounds - The insect's perspective on iridoid glycosides and cardenolides. **Phytochemistry**, v. 72, p. 1593-1604, 2011.
- DOMITROVIĆ, R.; POTOČNJAK, I. A comprehensive overview of hepatoprotective natural compounds: mechanism of action and clinical perspectives. **Archives of Toxicology**, v. 90, p. 39-79, 2016.
- dos SANTOS, V.S.; MARQUES, M.R.; GOUVEA, D.R.; LOPES, N.P.; de PAIVA NETO, V.B.; CAROLLO, C.A. Metabolic response of *Adenocalymma peregrinum* during regeneration of the aerial parts. **International Journal of Plant Biology**, v. 5, 2014.
- DUTRA, R.C.; CAMPOS, M.M.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v.112, p. 4-29, 2016.
- EL-NAGGAR, L.J.; BEAL, J.L. Iridoids. A review. **Journal of Natural Products**, v. 43, p. 649- 707, 1980.
- ELSAYED, E.A.; EL ENSHASY, H.; WADAAN, M.A.M.; ALZIZ, R. Mushrooms: A potential natural source of anti-inflammatory compounds for medical applications. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p.1-15, 2014.
- 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.
- FULLERTON, J.N.; GILROY, D.W. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. **Nature Review Drug Discovery**, v. 15, p. 551-567, 2016.
- GÜVENALP, Z.; ÖZBEK, H.; ÜNSALAR, T.; KAZAZ, C.; DEMİREZER, Ö. Iridoid, flavonoid, and phenylethanoids glycosides from *Wiedemannia orientalis*. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 30, p. 391-400, 2006.
- HANAFY, A.; ALDAWSARI, H.M.; BADR, J.M.; IBRAHIM, A.K.; ABDEL-HADY, S.E.S. Evaluation of hepatoprotective activity of *Adansonia digitata* extract on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. Evidence-Based **Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, 2016.
- JENSEN, S.R.; NIELEN, B.J. Iridoid glucosides in *Griselinia*, *Aralidium* and *Toricellia*. **Phytochemistry**, v. 19, p. 2685-2688, 1980.
- JIMENEZ, C.; RIGUERA, R. Phenylethanoid glycosides in plants: Structure and biological activity. **Natural Product Reports**, v. 11, p. 591-606, 1994.
- JUNG, M.J.; KANG, S.S.; JUNG, Y.J; CHOI, J.S. Phenolic glycosides from the stem bark of *Albizia julibrissin*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, p. 1501-1503, 2004.
- KUMAR, N.; SINGH, B.; KAUL, V.K.; AHUJA, P.S. Iridoid bearing lants of temperate region. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 32, p. 247-302, 2005.

KUMAR, S.; PANDEY, A.K. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1-16, 2013.

LEÃO, R.B.A.; FERREIRA, M.R.C.; JARDIM, M.A.G. Levantamento de plantas de uso terapêutico no município de Santa Bárbara do Pará, Estado do Pará, Brasil. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, p. 21-25, 2007.

LEE, G.H.; LEE, H.Y.; CHOI, M.K.; CHUNG, H.W.; KIM, S.W.; CHAE, H.J. Protective effect of *Curcuma longa* L. extract on CCl₄-induced acute hepatic stress. **BMC Research Notes**, v. 10, p. 77-85, 2017.

LEE, K.J.; WOO, E.R.; CHOI, C.Y.; SHIN, D.W.; LEE, D.G.; YOU, H.J.; JEONG, H.G. Protective effect of acteoside on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. **Life Sciences**, v. 74, p. 1051-1064, 2004.

LIANG, H.; ZHANG, L.; WANG, H.; TANG, J.; YANG, J.; WU, C.; CHEN, S.; Inhibitory effect of gardenoside on free fatty acid-induced steatosis in HepG2 hepatocytes. **International Journal of Molecular Sciences**, v.16, p. 27749-27756, 2015.

MCMULLEN, M.K.; WHITEHOUSE, J.M.; WHITTON, P.A.; TOWELL, A. Bitter tastants alter gastric-phase postprandial haemodynamics. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 154, p. 719-727, 2014.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, p. 428-435, 2008.

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

MILZ, S.; RIMPLER, H. Verbreitung von Iridoiden in der Gattung *Verbena* und einigen anderen Verbenoideae. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 34 e, p. 319-329, 1979.

NANI, T.F. **Aspectos morfológicos e cromossômicos em espécies de *Plectranthus* L' Heritier**. Dissertação, Programa de Pós-Graduação em Genética e melhoramento de Plantas, Universidade Federal de Lavras, 2011.

NUZZI, P.A.; LOKUTA, M.A.; HUTTENLOCHER, A. Analysis of neutrophil chemotaxis. **Methods in Molecular Biology**, v.370, p. 23-36, 2007.

O' LEARY, N.; MÚLGURA, M.E.; MORRONE, O. Revisión taxonomía de las especies del género *Verbena* (Verbenaceae): serie Pachystachyae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 94, p. 571-621, 2007.

O'LEARY, N. *Verbena in Flora do Brasil 2020 em construção*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB15201>>. Acesso em 21 de dezembro de 2017.

O'LEARY, N.; BOLDORINI, A; THODE, V.A. *Glandularia in Flora do Brasil 2020 em construção*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB15140>>. Acesso em 04 de fevereiro de 2018.

O'LEARY, N.; THODE, V. The genus *Glandularia* (Verbenaceae) in Brazil. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 101, p. 699–749, 2016.

ONO, M.; OISHI, K.; ABE, H.; MASUOKA, C.; OKAWA, M.; IKEDA, T.; NOHARA, T. New iridoid glucosides from the aerial parts of *Verbena brasiliensis*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 54, p. 1421-1424, 2006.

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, p. 225-233, 2006.

PERALTA, P.; THODE, V. Una nueva especie, un Nuevo sttus y nuevas combinaciones en *Glandularia* (Verbenaceae) para el Sur de Brasil. **Rogriguésia**, v. 61, p 29-32, 2010.

PÉREZ-ARBELÁEZ, E. Plantas útiles de Colombia. **Litografía Arco**, 3 ed, p. 831,1978.

PETRY, B.; SANZ, M.J. Neutrophil chemotaxis. **Cell and Tissue Research**, v. 371, p. 1-12, 2018.

QIU, J.; CHI, G.; WU, Q.; REN, Y.; CHEN, C.; FENG, H. Pretreatment with the compound asperuloside decreases acute lung injury via inhibiting MAPK and NF- κ B signaling in a murine model. **International Immunopharmacology**, v. 31, p. 109–115, 2016.

RAFFA, D.; MAGGIO, B.; RAIMONDI, M.V.; PLESCIA, F.; DAIDONE, G. Recent discoveries of anticancer flavonoids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 142, p. 213-228, 2017.

RATES, S.M.K. Plants as source drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.

REHECHO, S.; HIDALGO, O.; de CIRRANO, 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. **LWT Food Science and Technology**, v. 44, p 875-882, 2011.

RIMPLER, H.; FRANKE, A. Vebraside, an iridoid glucoside from *Verbena brasiliensis*. **Phytochemistry**, v. 26, p. 3015-3020, 1987.

RINALDO, D.; RODRIGUES, C.M.; RODRIGUES, J.; SANNOMIYA, M.; dos SANTOS, L.C.; VILEGAS, W. New flavone from the leaves of *Neea theifera* (Nyctaginaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, p. 1132-1135, 2007.

RITTER, M.R.; SOBIERAJSKI, E.R.; SCHENKEL, E.P.; MENTZ, L.A. Plantas usadas como medicinais no município de Ipê, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p.51-62, 2002.

RODEIRO, I.; DONATO, M.T.; MARTÍNEZ, I.; HERNÁNDEZ, I.; GARRIDO, G.; GONZÁLES-LAVAUT, J.A.; MENÉNDEZ, R.; LAGUNA, A.; CASTELA, J.V.; GÓMEZ-LECHÓN, M.J. Potencial hepatoprotective effects of new Cuban natural products in rat hepatocytes culture. **Toxicology in Vitro**, v. 22, p. 1242-1249, 2008.

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.; SOUZA, V.C. 2015. Verbenaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB246>>. Acesso em 27 de novembro de 2017.

SANTOS, A.C.B.; NUNES, T.S.; COUTINHO, T.S.; SILVA, M.A.P. Uso popular de espécies medicinais da família Verbenaceae no Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 980-991, 2015.

SHARMA, S.K.; ALI, M.; GUPTA, J. Evaluation of Indian Herbal Hepatoprotective Drugs. In: Recent progress in medicinal plants (Phytochemistry and Pharmacology). v. 2, p. 253-70, 2002.

SHEN, T.; LI, X.; HU, W.; ZHANG, L.; XU, X.; WU, H.; JI, L. Hepatoprotective effect of phenylethanoid glycosides from *Incarvillea compacta* against CCL4-induced cytotoxicity in HepG2 cells. **Journal of the Korean Society from Applied Biological Chemistry**, v. 58, p. 617-625, 2015.

SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, p. 385-405, 2004.

SINGH, M.; KAUR, M.; SILAKARI, O. Flavones: An important scaffold for medicinal chemistry. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.84, p.206-239, 2014

SUYENAGA, E.S.; KONRATH, E.L.; DRESCH, R.R.; APEL, M.A., ZUANAZZI, J.A.; CHAVES, C.G., HENRIQUES, A.T. Appraisal of the antichemotactic activity of flavonoids on polymorphonuclear neutrophils. **Planta Medica**, v. 77, p. 698-704, 2001.

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

THODE, V. A. **O gênero *Glandularia* J.F. Gmel. (Verbenaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil**. Dissertação, Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

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

UMAÑA, E.; CASTRO, O. Chemical constituents of *Verbena littoralis*. **International Journal of Crude Drug Research**, v. 28, p. 175-176, 1990.

VANDRESEN, F. **Constituição química, atividades antibacteriana, antiedematogênica e toxicidade frente à *Artemia salina* da espécie vegetal *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Troncoso (Verbenaceae)**. Dissertação, Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada, Universidade Estadual de Maringá, 2005.

VILJOEN, A.; MNCWANGI, N.; VERMAAK, I. Anti-inflammatory iridoids of botanical origin. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 2104-2127, 2012.

VILLASEÑOR, I.M. Bioactivities of iridoids. **Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 307-314, 2007.

WOLF, P.L. Biochemical diagnosis of liver diseases. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v.14, p. 59–90, 1999.

YALÇIN, F.N.; KAYA, D.; ÇALIS, I.; ERSÖZ, T.; PALASKA, E. Determination of iridoid glycosides from four turkish *Lamium* species by HPLC-ESI/MS. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 32, p. 457-467, 2008.

YUAN, Y.W.; OLMSTEAD, R.G. A species-level phylogenetic study of the Verbena complex (Verbenaceae) indicates two independent intergeneric chloroplast transfers. **Molecular Phylogenetic and Evolution**, v. 48, p. 23-33, 2008.

ZHOU, Y.; ZHENG, J.; LI, Y.; XU, D.P.; LI, S.; CHEN, Y.M; LI, H.B. Natural Polyphenols for prevention and treatment of cancer. **Nutrients**, v. 9, p. 515, 2016.

ANEXOS

Manuscrito I

Chrysoeriol derivatives and other constituents from *Glandularia selloi*

Chrysoeriol derivatives and other constituents from *Glandularia selloi*

ABSTRACT

Glandularia selloi (Verbenaceae) presents phenylethanoids, an iridoid and flavone glycosides as the main components. Two novel chrysoeriol derivatives, selloiside A (**1**) and selloiside B (**2**) were isolated from the methanolic extract of the aerial parts. Both flavones are acylated disaccharides. Two known compounds verbascoside (**3**) and 6 β -hydroxy-ipolamiide (**4**) were isolated from the methanolic extract of the roots. The structures were elucidated using 1D, 2D NMR and MS. Acylflavones have taxonomic significance since they occur mainly in species from the order Lamiales, especially from the family Lamiaceae, closely related to Verbenaceae.

Keywords

Glandularia selloi, Acylated flavones, Phenylethanoid glycosides, Iridoids

Introduction

Glandularia J.F. Gmel (Verbenaceae) is a genus that encompasses approximately 80 species which grow in subtropical and temperate regions of South and North America [1-3]. Most of the species nowadays recognized as *Glandularia* were previously described as *Verbena* L. *Glandularia* presents a long style and glandular appendages in the upper pair of stamens, which distinguish the genus from *Verbena* [4]. No phytochemical data are available from *Glandularia* species. Nevertheless, for the genus *Verbena* compounds such as iridoids, phenylethanoids and flavonoids have been reported [5].

Glandularia selloi (Spreng) Tronc., is a ground grass (15-92 centimeters tall) that occurs abundantly in southern Brazil, mainly in the Rio Grande do Sul state, usually found in sand, flooded areas, rocky fields, degraded areas and road-sides [6].

Preliminary HPLC-PDA analyses of aerial parts and roots of *G. selloi* (Supporting information, S.1 and S.2) pointed to compounds with characteristic UV profiles of iridoids, flavones derivatives and phenylethanoids. Thus, in the presented study, we focused on the isolation and structure elucidation of these compounds.

Results and Discussion

From the methanolic extract of aerial parts of *G. selloi*, two new acetylated flavones derived from chrysoeriol were isolated, selloiside A (**1**) and selloiside B (**2**). From the

methanolic extract of roots, the phenylethanoid verbascoside (**3**) and the iridoid glycoside 6 β -hydroxy-ipolamiide (**4**) were obtained (**Fig. 1**).

Compound **1** was isolated as a yellow powder and identified through MS and NMR experiments. From HRESIMS analysis, compound **1** has exhibited a pseudomolecular peak at m/z 637.1764 $[M+H]^+$, consistent with a molecular formula of $C_{29}H_{33}O_{16}$. The 1H and ^{13}C NMR spectra showed characteristic flavonoid signals. In the 1H NMR spectrum, the presence of signals of the aromatic proton at 7.59 (H-2'), 6.96 (H-5') and 7.62 (H-6') indicates the 3',4'-disubstitution pattern of ring B (Table 1) [7]. Two signals in the aromatic region appeared as meta-coupled doublets at 6.40 (H-6) and 6.83 (H-8) with coupling constant value of 2.1 Hz. This data suggests that ring A bears substituents at positions 5 and 7 [7]. The typical proton signal of H-3 of flavone was observed at 6.99 confirming the presence of ring C. In the HSQC spectrum the correlations between the previously mentioned hydrogens with the respective carbons at 110.8 (C-2'), 113.3 (C-5'), 121.0 (C-6'), 99.7 (C-6), 95.1 (C-8), 103.9 (C-3) reinforce the assignments. The long-range correlation between C-3' (148.6) and H-7' (3.90) (**Fig. 2**) confirmed the presence of a methoxy group in this position (C-3'). These data are in agreement with the previously reported 1H and ^{13}C NMR spectra of the aglycone chrysoeriol [7, 8]. A doublet at 5.20 (H-1'') and a singlet at δ_H 5.39 (H-1''') revealed the presence of a disaccharide linked to chrysoeriol. The long-range correlation between C-7 (163.0) and the anomeric proton (5.20) has suggested that the disaccharide is linked to C-7. In addition, C-7 has also exhibited correlations with H-6 and H-8, confirming the assignment of this carbon. The structures of the sugar units were deduced by using 1H - 1H TOCSY, HSQC and HMBC NMR experiments. In the 1H - 1H TOCSY spectrum, it was observed, that the irradiation of H-1'' has revealed a spin system comprising the protons (3.53, 3.48, 3.47, 3.19), suggesting a β -glucopyranoside unit. On the other hand, irradiation of H-1''' revealed only

one singlet at 3.65, suggesting an apiofuranosyl unit [9, 10]. The $J_{H-1''-H-2''}$ coupling constant value (7.5 Hz) of the glucose as well as the chemical shift (108.5) of apiose anomeric carbon demonstrate that both anomeric portions of the sugars are in β configuration [11]. The HMBC correlation between H-2'' (3.53) with the carbon at C-1''' (108.5) indicates the glucose-apiose binding (1''' \rightarrow 2'') [12]. This fact is corroborated by the increase in chemical shift of C-2'' (75.8), when compared to an analog of the unsubstituted glucose structure (73.3) [13]. Additionally, in the ^1H and ^{13}C spectra it was observed signals at 1.83 (H-7'''), 20.8 (C-7''') and 170.5 (C-6'''), suggesting an acetyl group. This group is linked to apiose unit, confirmed by long-range correlations between C-6''' to H-5''' and H-7'''. This link was also supported by the chemical shift of C-5'''. The C-5''' (67.8) of the apiose in this compound is more deshielded than in the non-acetylated analog (64.2), indicating that the acetylation has occurred at this position [14]. Thus, compound **1** was identified as chrysoeriol 7-*O*-[5'''-*O* acetyl- β -apiofuranosyl (1''' \rightarrow 2'')]- β -glucopyranoside, and trivially named as selloside A (**1**).

The compound **2** was isolated as a yellow powder. From HREIMS analysis, compound **2** has exhibited a pseudomolecular peak at m/z 679.1872 $[\text{M}+\text{H}]^+$, consistent with a molecular formula of $\text{C}_{31}\text{H}_{35}\text{O}_{17}$. The ^1H and ^{13}C NMR spectra of compound **2**, great resembled those data of compound **1**. The main difference was the occurrence of additional signals at 1.99 (H-8'') and 21.0 (C-8'') that suggest the presence of another acetyl group. The long-range correlations between H-6'' (4.33) and C-7'' (170.5), and the deshielding of the C-6'' (63.7) when compared to the C-6'' of the non-acetylated analog (60.5) [14], indicates the acetylation of the OH-6''. Therefore, the structure was determined as chrysoeriol 7-*O*-[5'''-*O*-acetyl- β -apiofuranosyl (1''' \rightarrow 2'')]-6''-*O*-acetyl- β -D-glucopyranoside, and trivially named as selloside B (**2**).

Two known compounds were identified as verbascoside (**3**) [15] and 6 β -hydroxy-*ipolamiide* (**4**) [16] based on NMR data, as well as by comparison of the spectral data with those reported.

It is generally stated that Lamiaceae evolved from Verbenaceae, and that the limit between the two families is subjective. Traditionally, Lamiaceae are distinguished from Verbenaceae on the basis of gynoecial structure [17]. From the chemical view, species from both families have in common the production of iridoids and phenylethanoids glycosides.

As far as we know, this is the first report of acylated flavones *O*-glycosides in a member of Verbenaceae. Nevertheless, these compounds have been obtained from in some genera of Lamiaceae. In fact, this kind of compounds have been more frequently found in Lamiaceae than in other families [18-21]

Acylated flavones were reported from *Vitex* species but in that case, the compounds were *C*-glycosides [22]. It is worth to comment that *Vitex*, that was previously Verbenaceae, after phylogenetic studies was transferred to Lamiaceae. Other compound, with the acylation in the aglycone, was isolated from a *Premna* species [23]. This genus, formerly Verbenaceae, is now placed on Lamiaceae.

The results obtained in this study reinforce the well-established close phylogenetic relationship between Verbenaceae and Lamiaceae.

Materials and Methods

General Experimental Procedures

HRESIMS were acquired in positive-ion mode on a Bruker Q-TOF Impact II spectrometer equipped with an electrospray ionization source. NMR spectra (1D and 2D) were recorded on a Bruker Ascend 400 (25 °C, 400 MHz for ^1H and 100 MHz for ^{13}C) spectrometer. Spectra were recorded in DMSO- d_6 (99.9%, Sigma-Aldrich) and D $_2$ O (Sigma-Aldrich), and referenced against a residual non-deuterated solvent (δ_{H} 2.50 – δ_{C} 39.4 for DMSO- d_6 and δ_{H} 4.79 for D $_2$ O).

For extraction and isolation procedures reagent analytical grade, ethyl acetate (EtOAc), methanol (MeOH), dichloromethane (CH_2Cl_2) were used. Distilled water was utilized for the TLC mobile phase. The isolation was performed in column chromatography (CC) on silica gel (Acros Organics; 0.060 – 0.200 mm). The extracts and fractions obtained in the isolation procedures were monitored by TLC on precoated silica gel 60 Xtra SIL G/UV254 (Macherey-Nagel) as a stationary phase and EtOAc-MeOH-water (100:13.5:10) and CH_2Cl_2 -MeOH (80:20) as mobile phase. After the elution the chromatograms were visualized by UV-light at 254 and 356 nm, and at visible light after spraying vanillin and heating (yellow spots for flavones, light brown spots for iridoid and orange spots for verbascoside).

Analytical HPLC were performed on a Waters 2695 instrument with a 2998 PDA detector under the following parameters: the column Phenomenex C18 (250 x 4.6 mm) with a C18 pre-column Lichrospher Merck. The eluent system was a gradient of water (A) and methanol (B), starting with 80% of A going to 100% B. The volume of injection was 10 μL and the flow rate was 0.7 mL/min. The runtime was 39 min.

Plant material

The aerial parts and roots of *G. selloi* (Verbenaceae), were collected in Capão da Canoa (Curumim) (29°62'0.2" S/49°9'46" W), Rio Grande do Sul, Brazil in January 2016. The plant was identified by Prof. Dr. Marcia Vignoli-Silva. A voucher specimen was deposited in the Herbarium of the Federal University of Rio Grande do Sul (ICN), Brazil (ICN 190416). After collection, the plants were dried at room temperature and subsequently subjected to extraction.

Extraction and isolation

The dried aerial parts (126 g) and roots (70 g) of *G. selloi* were macerated separately, at room temperature, with methanol (plant-solvent ratio 1:5) in 24 h cycles, until exhaustion. The combined extracts were concentrated under reduced pressure at 40 °C.

A part of the methanolic extract of aerial parts (11 g) was submitted to column chromatography on silica gel (Acros Organics; 0.060 – 0.200 mm; 130 g; 9.5 cm x 11 cm) using as mobile phase a gradient of EtOAc: MeOH (100:0 - 0:100) which afford twenty yellow fractions (Fr. 1-20) (400 mL each) which were concentrated in vacuo and stored until further fractionation. Fr. 12-13 (300 mg) were subjected to CC using EtOAc:MeOH (100:0 – 95:5) gradient as a mobile phase to afford ten subfractions (SbFr. 1-10). SbFr 2-5 (EtOAc:MeOH, 100:0 - 98:2) were submitted to repeated CC under the same conditions previously described, resulting in the isolation of compound **1** (23 mg). The SbFr 7-8 (EtOAc:MeOH 97:3 - 96:4) was crystallized in methanol, resulting in the compound **2** (14 mg).

The methanolic extract of roots (4.4 g) was subjected to column chromatography on silica gel (Acros Organics; 0.060 – 0.200 mm; 60 g; 2.5 cm x 11 cm) using as mobile phase a gradient of EtOAc: MeOH (100:0 - 80:20) to afford 18 fractions (Fr. 1-18) (200 mL each). Fr 5-9 (EtOAc:MeOH, 100:0 - 95:5) (250 mg) afforded the known compound verbascoside (**3**). Fr 11-14 (EtOAc:MeOH, 100:0 - 90:10) resulted in the isolation of 6 β -hydroxy-ipolamiide (**4**) (40 mg).

Selloiside A (**1**): Yellow amorphous powder; TLC (silica gel, EtOAc-MeOH-water, 100:13.5:10) R_f 0.53; UV (MeOH: H₂O – 70.5:29.5) λ_{\max} 252, 347; ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) and ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) spectroscopic data are shown in **Table 1**; HRESIMS m/z 637.1764 [M+H]⁺, (calcd for C₂₉H₃₃O₁₆, 637.1763)

Selloiside B (**2**): Yellow amorphous powder; TLC (silica gel, EtOAc-MeOH-water, 100:13.5:10) R_f 0.66; UV (MeOH: H₂O – 70.9: 29.1) λ_{\max} 252, 348; ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) and ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) spectroscopic data are shown in **Table 1**; HRESIMS m/z 679.1872 [M+H]⁺, (calcd for C₃₁H₃₅O₁₇, 679.1869).

Supporting information

HRESIMS, 1D and 2D NMR spectra of the new compounds selloiside A (**1**) and selloiside B (**2**), and NMR spectra of the known verbascoside (**3**) and 6 β -hydroxy-ipolamiide (**4**) as well the HPLC analyses of aerial parts and roots of the *G. selloi* are available as Supporting Information.

Acknowledgments

The authors thank FAPERGS, CAPES, and CNPq for financial support and fellowships to J.A.S.Z. and G.L.V.P. The LRNANO/CNANO laboratory of UFRGS is acknowledged for NMR facilities

Conflict of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

- [1] Solbrig OT, Passani C, Glass R. Artificial hybridization between different ploidy levels in *Glandularia* (Verbenaceae). *Am J Bot* 1968; 55: 1235-1239
- [2] Troncoso NS. Los géneros de Verbenáceas e Sudamérica extratropical. *Darwiniana* 1974; 18: 295-412
- [3] Peralta P, Thode V. Uma nueva espécie, um nuevo status y nuevas combinaciones em *Glandularia* (Verbenaceae) para el Sur de Brasil. *Rodriguésia* 2010; 61: S29-S32
- [4] O’Leary N, Thode V. The genus *Glandularia* (Verbenaceae) in Brazil. *Ann Missouri Bot Gard* 2016; 101: 699–749
- [5] Oliver DK, Shiknga EA, Combrinck S, Krause RWM, Regnier T, Dlamini TP. Phenylethanoid glycosides from *Lippia javanica*. *S Afr J Bot* 2010; 76: 58-63

- [6] Thode AY, Mentz LA. O gênero *Glandularia* J.F. Gmel. (Verbenaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Acta Bot Bras* 2010; 24: 529-557
- [7] Sahin FP, Ezer N, Çalis I. Three acylated flavone glycosides from *Sideritis ozturkii* Aytac & Aksoy. *Phytochemistry* 2004; 65: 2095-2099
- [8] Calis I, Kirmizibekmez H, Ersoz T, Saracoglu I, Donmez AA, Mitova M, Handjieva N, Popov S. Iridoid, phenylethanoid and flavonoid glycosides from *Phlomis sintenisii*. *Acta Pharm Turc* 2002; 44: 195–200
- [9] Rinaldo D, Rodrigues CM, Rodrigues J, Sannomiya M, dos Santos LC, Vilegas W. New flavone from the leaves of *Neea theifera* (Nyctaginaceae). *J Braz Chem Soc* 2007; 18: 1132-1135
- [10] Jung MJ, Kang SS, Jung YJ, Choi JS. Phenolic glycosides from the stem bark of *Albizzia julibrissin*. *Chem Pharm Bull* 2004; 52: 1501-1503
- [11] Harborne JB. *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*, New York: Chapman and Hall; 1996
- [12] Agrawal PK. *Carbon 13 of Flavonoids*, New York: Elsevier; 1989
- [13] Markhan KR, Ternai B, Stanley R, Geiger H, Mabry TJ. Carbon-13 NMR studies of flavonoids-III: Naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives. *Tetrahedron* 1978; 34: 1389-1397
- [14] Liu G, Zhuang L, Song D, Lu C, Xu X. Isolation, purification, and identification of the main phenolic compounds from leaves of celery (*Apium graveolens* L. var. dulce Mill./Pers.). *J Sep Sci* 2016; 40: 472-479

- [15] Andary C, Wylde R, Laffite C, Privat G, Winternitz F. Structures of verbascoside and orobachoside, caffeic acid sugar esters from *Orobanche rapum-genistae*. *Phytochemistry* 1982; 21:1123-1127
- [16] De Luca C, Guiso M, Martino C. 6- β -hydroxyipolamiide, an iridoid glucoside from *Stachytarpheta mutabilis*. *Phytochemistry* 1983; 22:1185-1187
- [17] Cantino PD. Toward a phylogenetic classification of the Labiatae. *In*: Harley, R.M. & Reynolds, T. (eds). *Advances in Labiate science*. Royal Botanical Gardens, Kew, 1992; 27-37.
- [18] Bendiksby M, Thorbek L, Scheen AC, Lindqvist C, Rydin O. An updated phylogeny and classification of Lamiaceae subfamily Lamioideae. *Taxon* 2011; 60: 471-484.
- [19] Albach DC, Grayer RJ, Kite GC, Jensen SR. Veronica: Acylated flavone glycosides as chemosystematic markers. *Biochem Sys Ecol* 2005; 33: 1167-1177.
- [20] Güvenç A, Okada Y, Akkol EK, Duman H, Okuyama T, Çalis I. Investigations of anti-inflammatory, antinociceptive, antioxidant and aldose reductase inhibitory activities of phenolic compounds from *Sideritis brevibracteata*. *Food Chem* 2010; 118: 686-692
- [21] Demirtas I, Gecibesler, IH, Yaglioglu, AS. Antiproliferative activities of isolated flavone glycosides and fatty acids from *Stachys byzantina*. *Phytochem Lett* 2013; (In press)
- [22] Sridhar C, Rao KV, Subbaraju GV. Flavonoids, triterpenoids and a lignan from *Vitex altissima*. *Phytochemistry* 2005; 66: 1707-1712
- [23] Ghosh PS, Das N, Dinda B. Antioxidant flavone glycosides and other constituents from *Premna latifolia* leaves. *Indian J Chem* 2014; 53B: 746-749

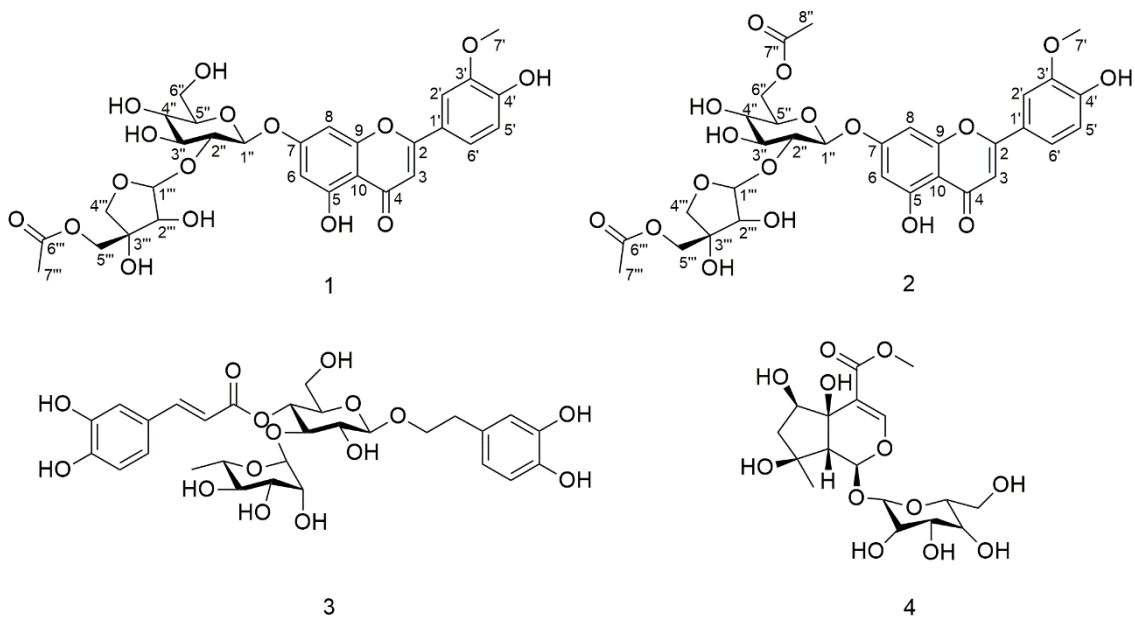


Fig. 1 Chemical structures of compounds **1-4** isolated from *Glandularia selloi*.

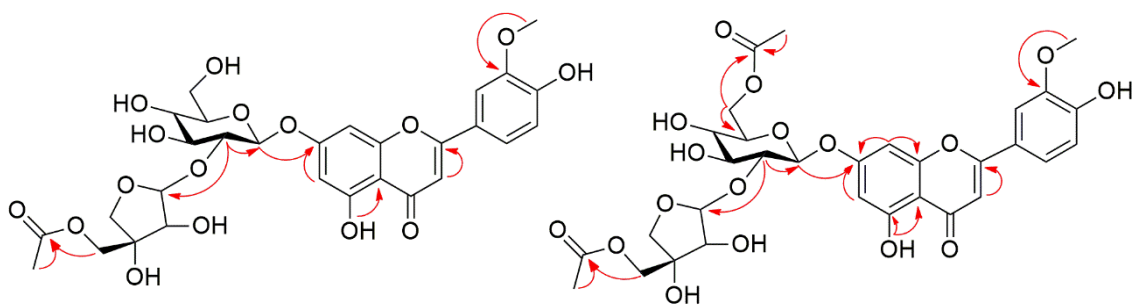


Fig. 2 Selected long-range correlations (HMBC) of compounds **1** and **2**.

Table 1. ^1H (400 MHz) and ^{13}C (100 MHz) NMR spectroscopic data of compounds **1** and **2**, at 400 MHz in $\text{DMSO-}d_6$

Position	Compound 1			Compound 2		
	^{13}C (δ_{C}); type	^1H (δ_{H})	HMBC	^{13}C (δ_{C}); type	^1H (δ_{H})	HMBC
Aglycone						
2	164.7; C			164.7; C		
3	103.9; CH	6.99 (s)	2, 10	103.9; CH	7.01 (s)	2;10
4	182.5; C			182.5; C		
5	161.6; C			161.6; C		
6	99.7;CH	6.40 (m)	7, 8, 10	99.6; CH	6.41 (m)	7; 10
7	163.0; C			162.7; C		
8	95.1; CH	6.83 (d) $J=2,1$	6, 9, 10	95.1; CH	6.77 (d) $J=2.2$	6,7, 9;10
9	157.4; C			157.4; C		
10	105.8; C			105.9; C		
1'	121.7; C			121.7; C		
2'	110.8 CH	7.59 (s)	1', 4'	110.9; CH	7.59 (s)	3', 4',6'

3'	148.6; C			148.5; C		
4'	151.5; C			151.5; C		
5'	116.3; CH	6.96(d) $J=8,2$	1', 3'	116.2; CH	6.95 (d) $J=8.8$	1', 3'
6'	121.0; CH	7.62 (d) $J=2,1$	2'	120.9; CH	7.61 (d) $J=2.1$	2'
7'	56.5; CH ₃	3.90 (s)	3'	56.5; CH ₃	3.90 (s)	3'
5-OH		12.99 (s)	5, 6, 10		12.99 (s)	5, 6, 10
Glucose						
1''	98.2; CH	5.20 (d) $J=7.3$	7	97.9; CH	5.24 (d) $J=7.60$	7
2''	75.8; CH	3.53 (m)	1'', 2'', 1'''	75.7; CH	3.55 (m)	1'', 2'', 1'''
3''	77.3; CH	3.48	4'', 2''	76.9; CH	3.50 (s)	4'', 2''
4''	70.3; CH	3.19	6'', 5'', 3''	70.5; CH	3.50 (s)	
5''	77.5 CH			74.1; C	3.78 (m)	
6''	60.9; CH ₂	3.47	5'', 3''	63.7; CH ₂	4.33 (dd) $J=11.8; 1.8$	3'', 5'', 7''
		3.71	4'', 2''			
7''				170.5; C		

8''				21.0; CH ₃	1.99	7''
Apiose						
1'''	108.5; CH	5.39 (s)	3''', 4'''	108.6; CH	5.38 (s)	3''', 4'''
2'''	76.9; CH	3.66 (s)	5''', 4'''	76.9; CH	3.67 (s)	5'''
3'''	77.7; C			77.7; C		
4'''	74.5; CH ₂	3.74 (d) <i>J</i> =9,5	1''', 3''', 5'''	74.3; CH ₂	3.75 (d) <i>J</i> =9.5	1''', 3'''
		4.01 (d) <i>J</i> =9,5	1''', 5'''		4.03 (m)	
5'''	67.8; CH ₂	3.93 (d) <i>J</i> = 3.5	3''', 6'''	67.5; CH ₂	3.95 (d) <i>J</i> =1.90	4''', 3''', 6'''
6'''	170.52; C			170.6; C		
7'''	20.80; CH ₃	1.83 (s)	6'''	20.8; CH ₃	1.84 (s)	6'''

Material suplementar relativo ao Manuscrito I

Supplementary material

Fig S1 HPLC analyses of the aerial parts from *Glandularia selloi* in 230 nm.

Fig S2 HPLC analyses of the roots from *Glandularia selloi* in 230 nm.

Fig S3. HRESIMS spectrum of selloiside A (**1**).

Fig S4. ^1H NMR spectrum of selloiside A (**1**) in $\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz.

Fig S5. ^{13}C NMR spectrum of selloiside A (**1**) in $\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz.

Fig S6. APT spectrum of selloiside A (**1**) in $\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz.

Fig S7. $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY spectrum of selloiside A (**1**) in $\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz.

Fig S8. $^1\text{H-}^1\text{H}$ TOCSY of the apiose anomeric proton (δH 5.39, H-1''') of selloiside A (**1**).

Fig S9. $^1\text{H-}^1\text{H}$ TOCSY of the glucose anomeric proton (δH 5.20, H-1'') of selloiside A (**1**).

Fig S10. HSQC spectrum of selloiside A (**1**) in $\text{DMSO-}d_6$.

Fig S11. Zoomed HSQC spectrum of selloiside A (**1**) in $\text{DMSO-}d_6$.

Fig S12. HMBC spectrum of selloiside A (**1**) in $\text{DMSO-}d_6$.

Fig S13 Zoomed HMBC spectrum of selloiside A (**1**) in $\text{DMSO-}d_6$.

Fig S14. HRESIMS spectrum of selloiside B (**2**).

Fig S15. ^1H NMR spectrum of selloiside B (**2**) in $\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz.

Fig S16. ^{13}C NMR spectrum of selloiside B (**2**) in $\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz.

Fig S17. APT spectrum of selloiside B (**2**) in $\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz.

Fig S18. $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY spectrum of selloiside B (**2**) in $\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz.

Fig S19. $^1\text{H-}^1\text{H}$ TOCSY 1D of the glucose anomeric proton (δH 5.24, H-1'') of selloiside B (**2**)

Fig S20. HSQC spectrum of selloiside B (**2**) in $\text{DMSO-}d_6$.

Fig S21. Zoomed HSQC spectrum of selloiside B (**2**) in $\text{DMSO-}d_6$.

Fig S22. HMBC spectrum of selloiside B (**2**) in $\text{DMSO-}d_6$.

Fig S23. Zoomed HMBC spectrum of selloiside B (**2**) in $\text{DMSO-}d_6$.

Fig S24. ^1H spectrum of verbascoside (**3**) in D_2O .

Fig S25. ^1H NMR spectrum of 6β -hydroxy-ipolamiide (**4**) in D_2O , 400 MHz.

Fig S26. ^{13}C NMR spectrum of 6β -hydroxy-ipolamiide (**4**) in D_2O , 100 MHz.

Fig S27. APT spectrum of 6 β -hydroxy-ipolamiide (**4**) in D₂O, 100 MHz

Fig S28. ¹H-¹H COSY spectrum of 6 β -hydroxy-ipolamiide (**4**) in D₂O, 400 MHz.

Fig S29. HSQC spectrum of 6 β -hydroxy-ipolamiide (**4**) in D₂O.

Fig S30. CLAE-EM of 6 β -hydroxy-ipolamiide (**4**)

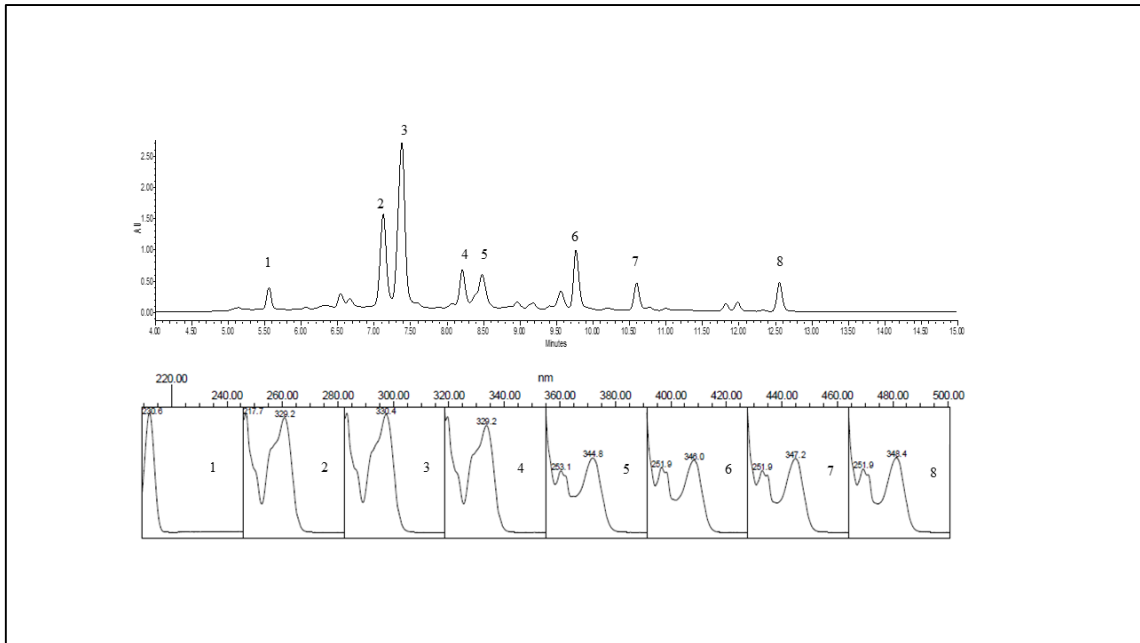


Fig S1. HPLC analyses of the aerial parts from *Glandularia selloi* in 230 nm.

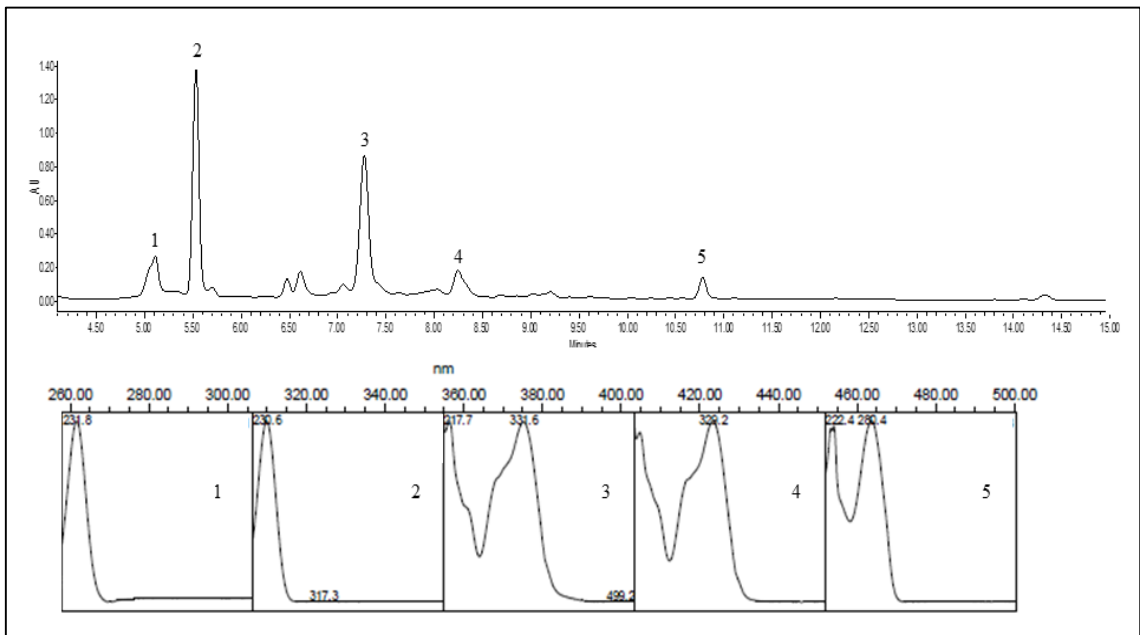


Fig S2. HPLC analyses of the roots from *Glandularia selloi* in 230 nm.

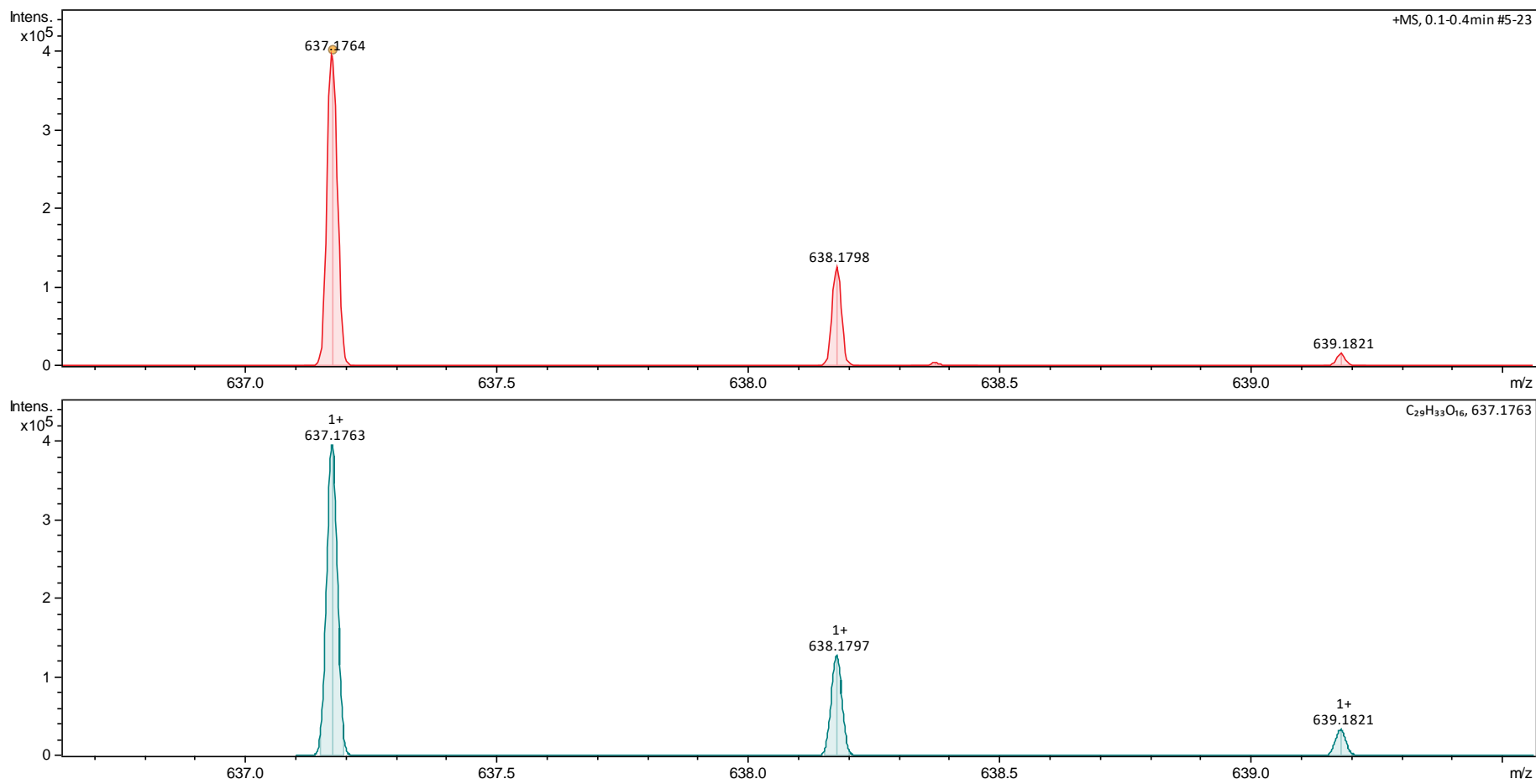


Fig S3. HRESIMS spectrum of selloside A (1).

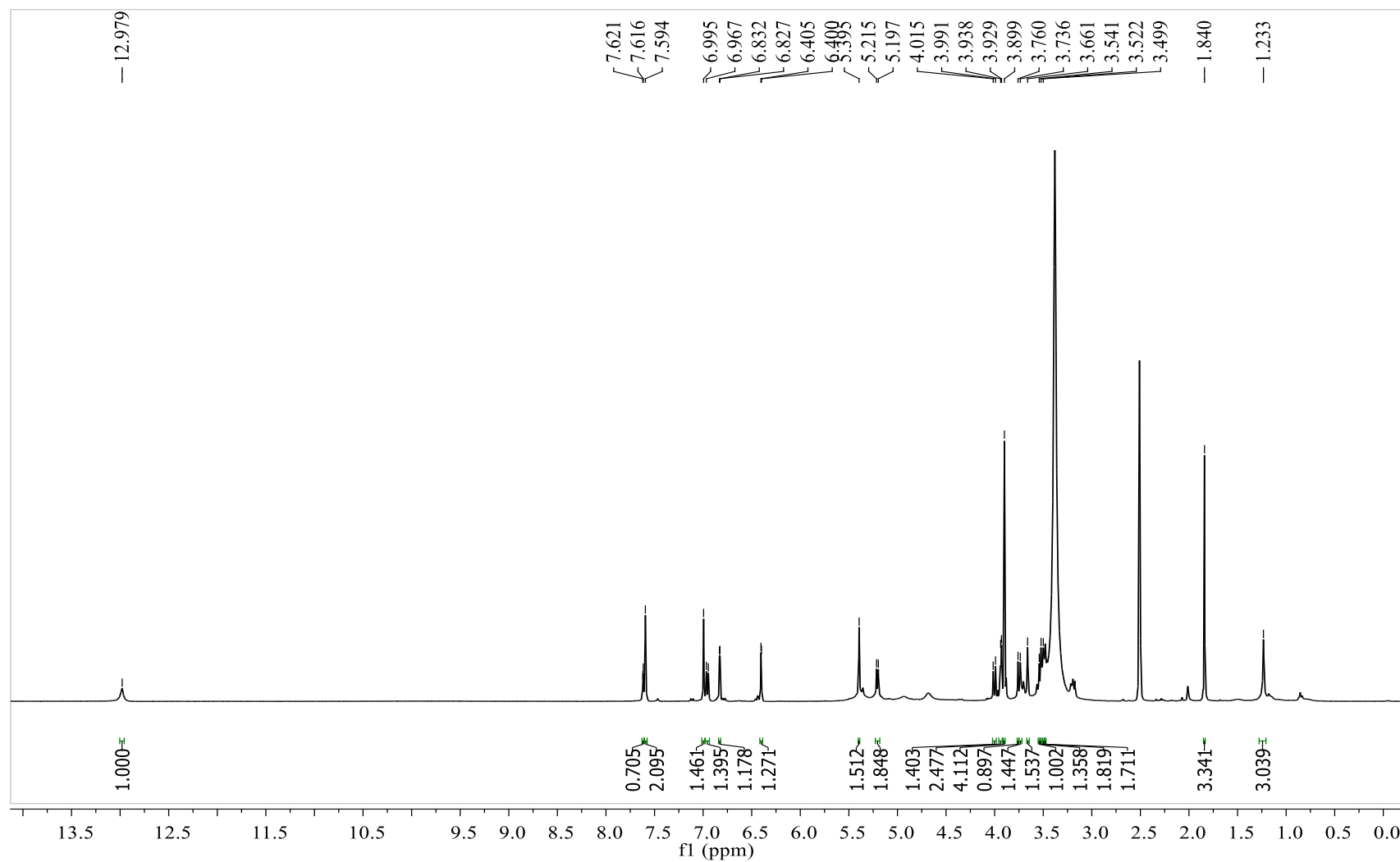


Fig S4. ^1H NMR spectrum of selloiside A (**1**) in $\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz.

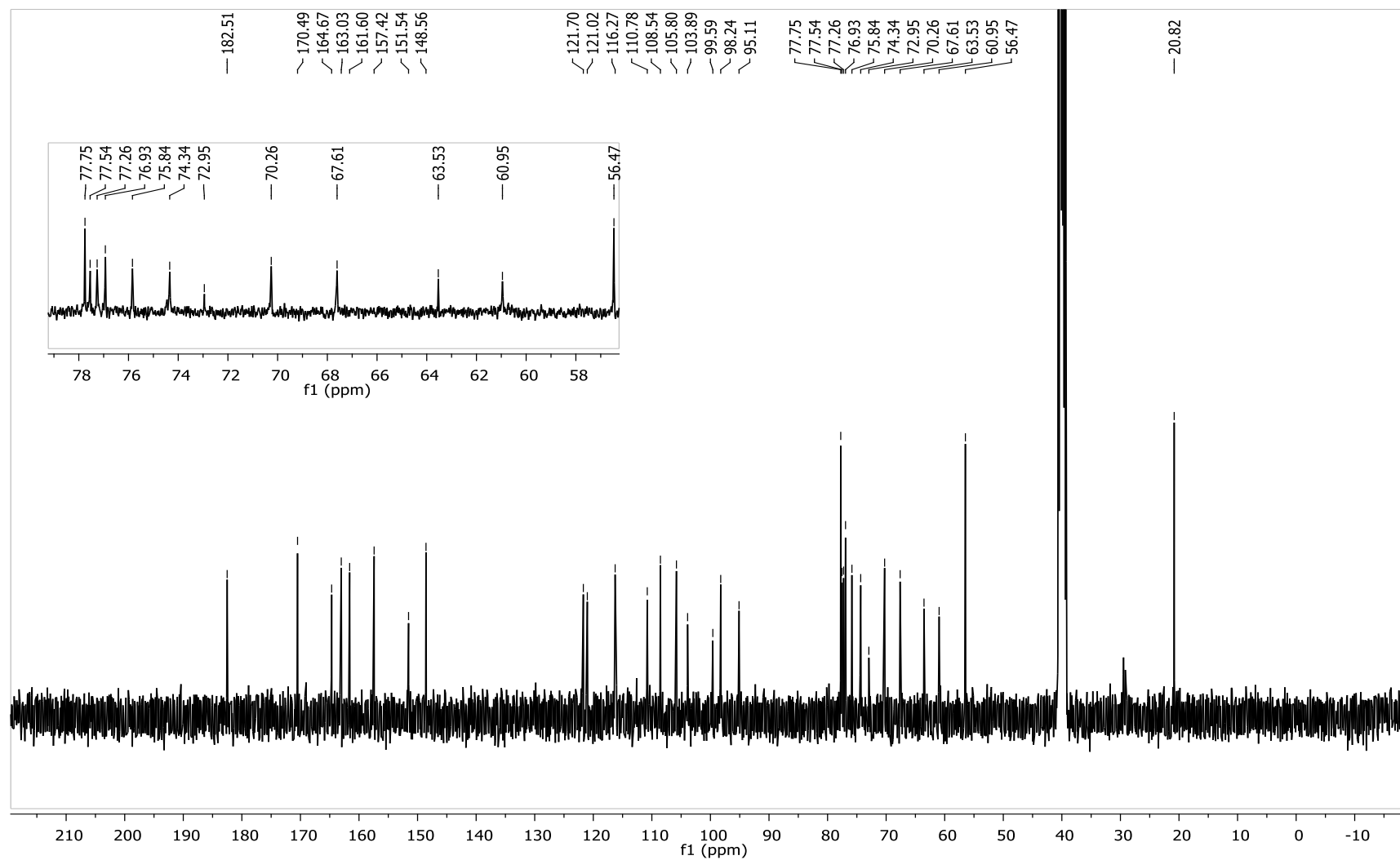


Fig S5. ^{13}C NMR spectrum of selloside A (1) in $\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz.

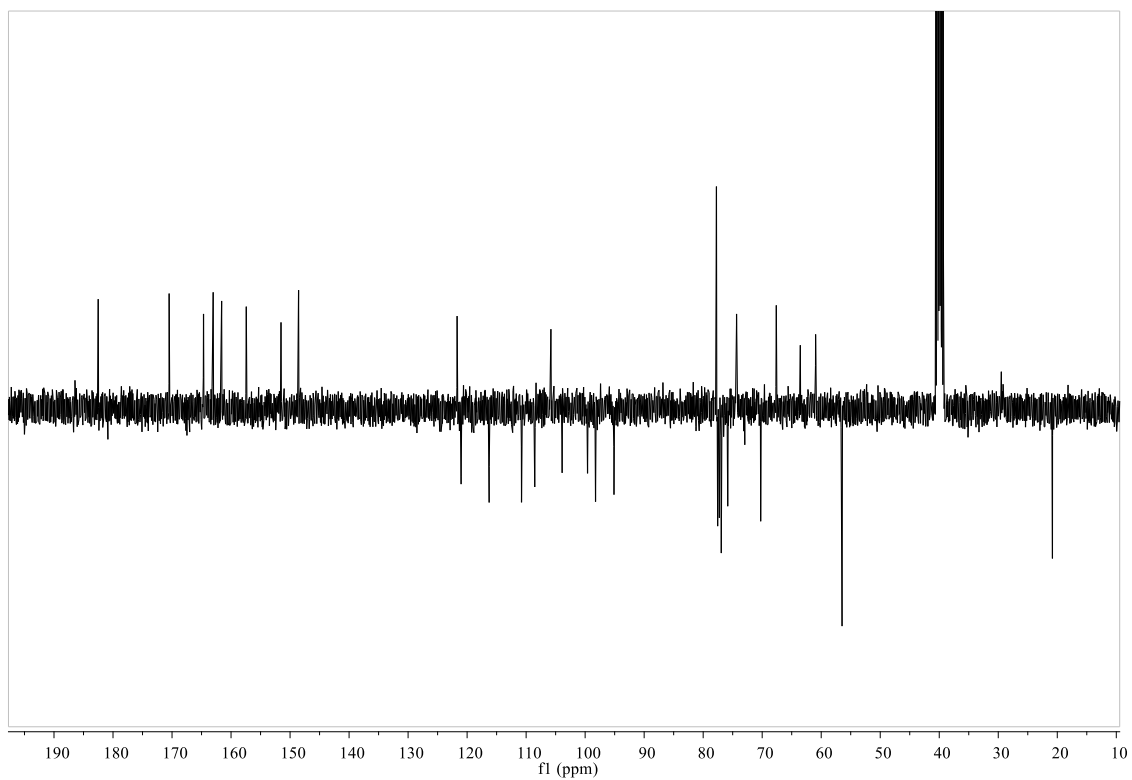


Fig S6. APT spectrum of selloside A (**1**) in DMSO-*d*₆, 100 MHz.

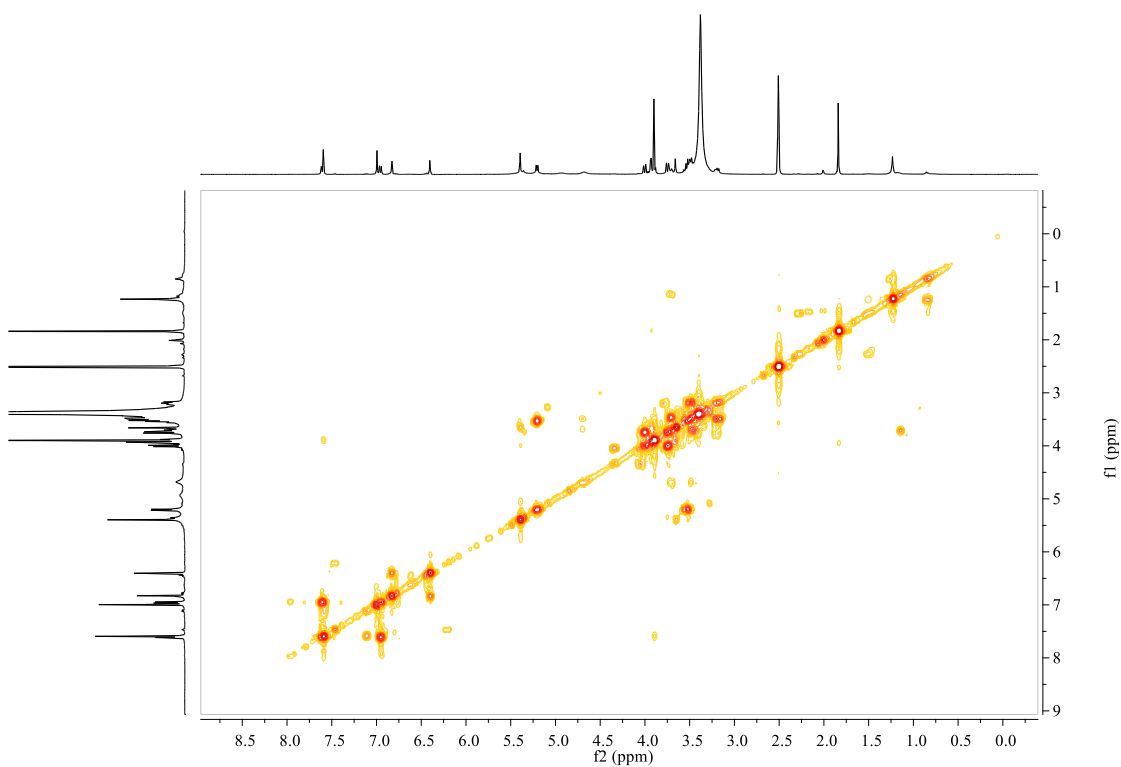


Fig S7. ¹H-¹H COSY spectrum of selloside A (**1**) in DMSO-*d*₆, 400 MHz.

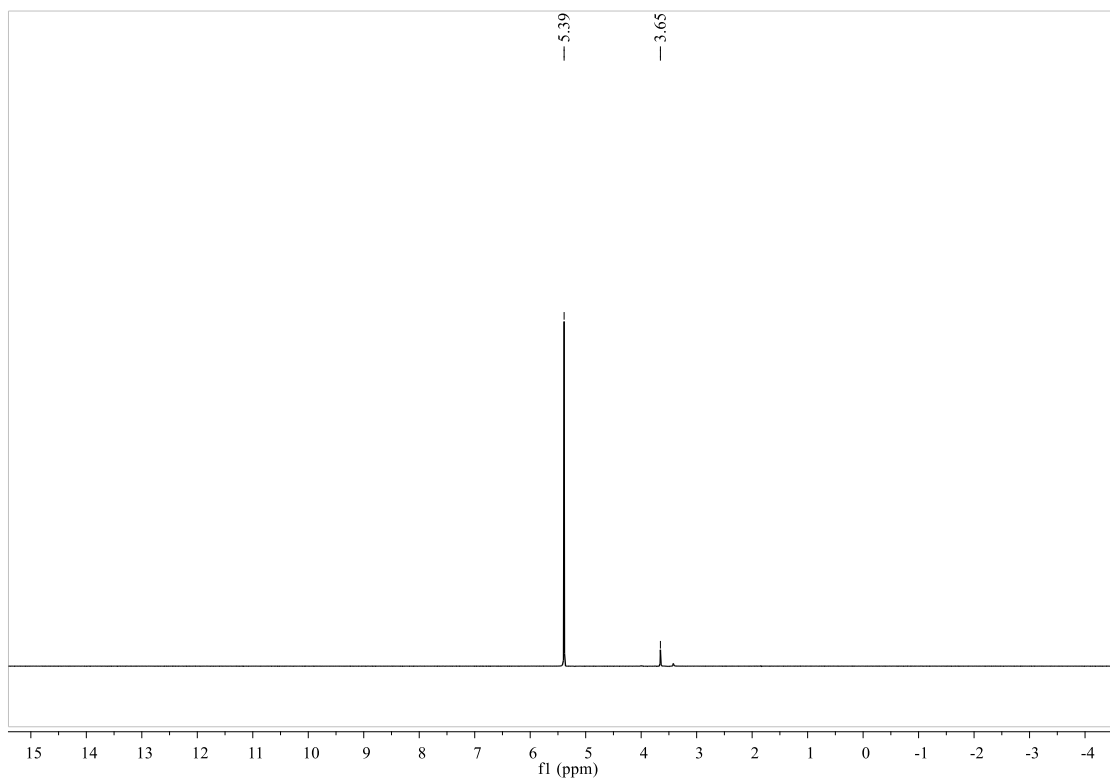


Fig S8. ^1H - ^1H TOCSY of the apiose anomeric proton (δH 5.39, H-1^m) of selloside A (**1**).

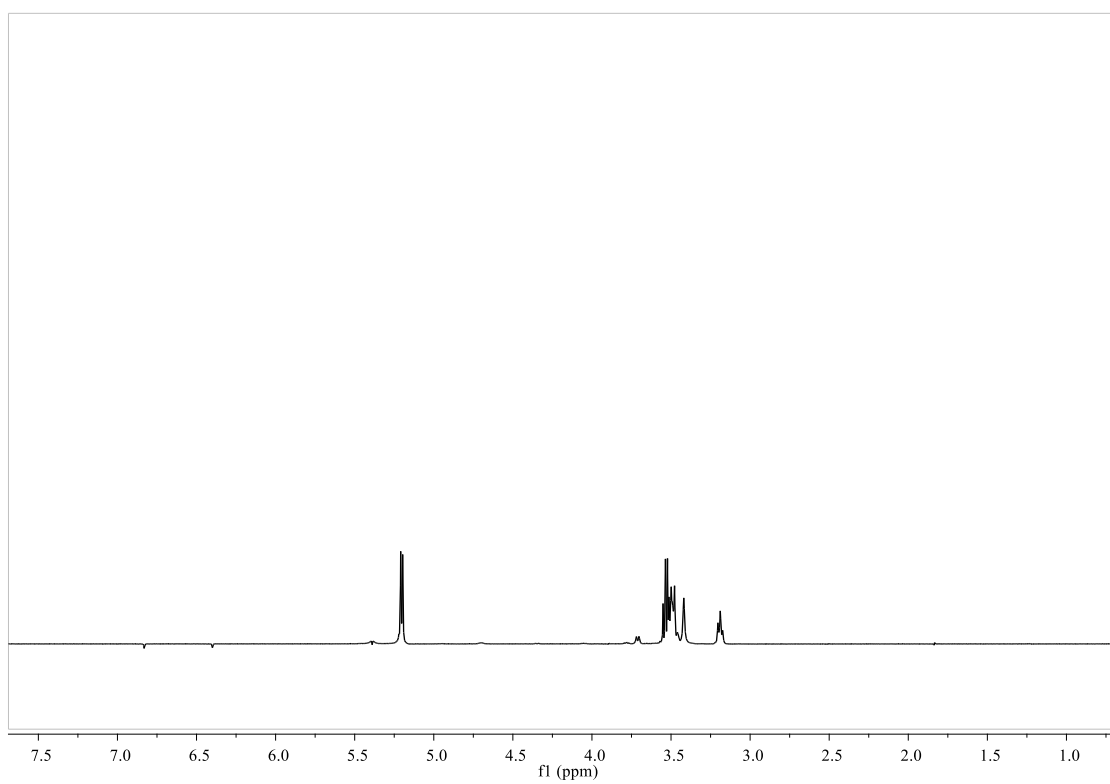


Fig S9. ^1H - ^1H TOCSY of the glucose anomeric proton (δH 5.20, H-1ⁿ) of selloside A (**1**).

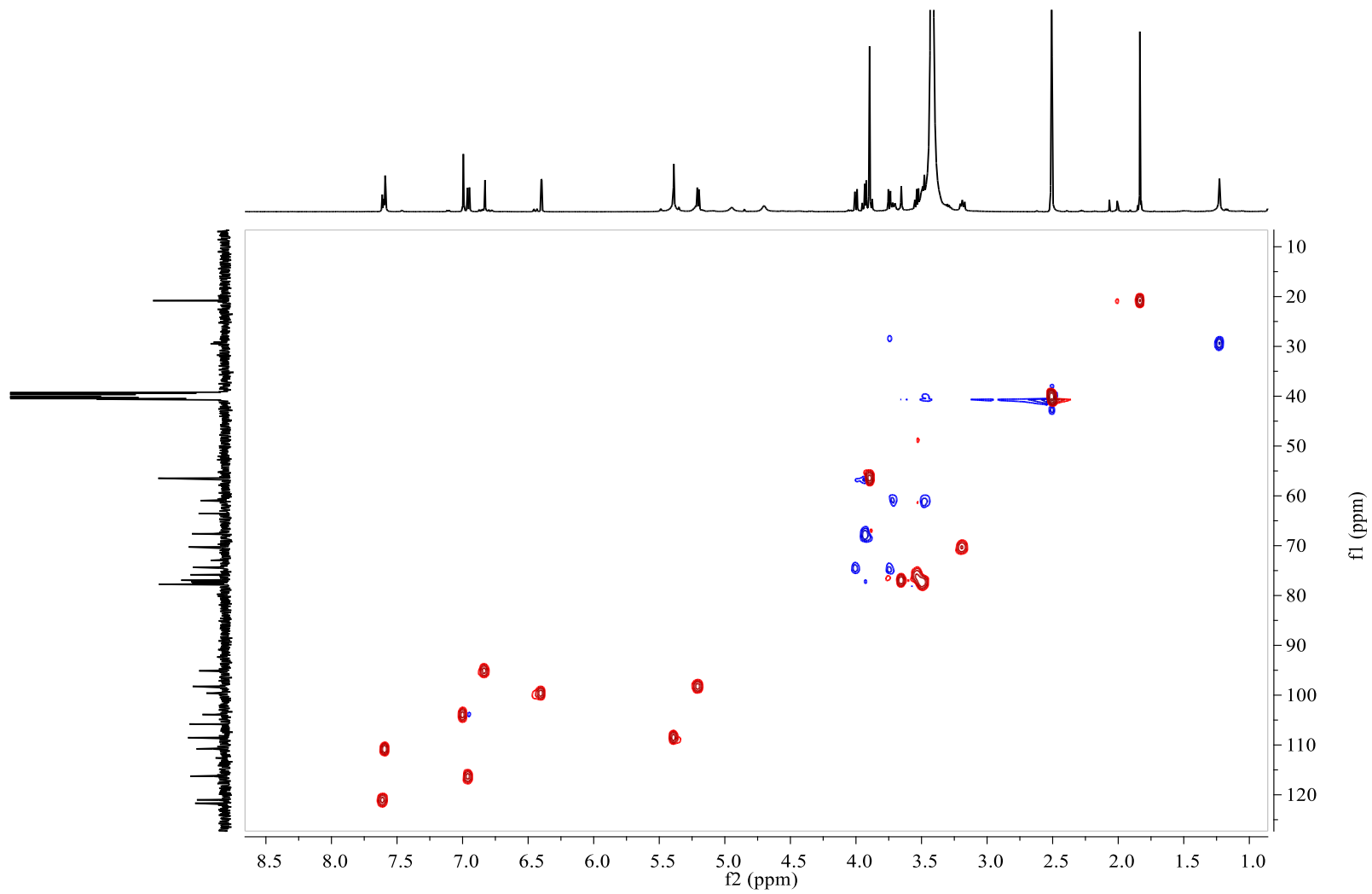


Fig S10. HSQC spectrum of selloside A (**1**) in DMSO-*d*₆.

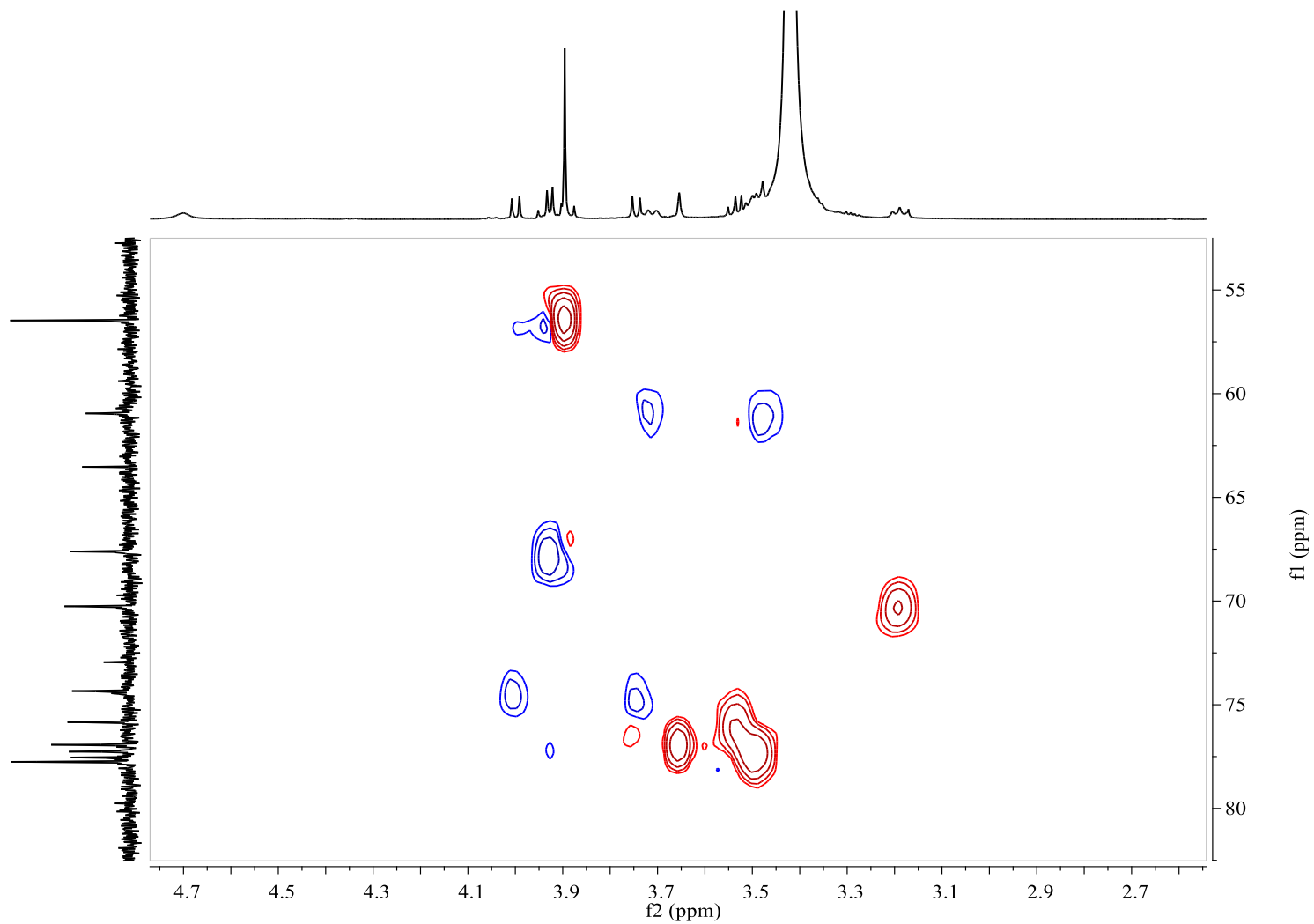


Fig S11. Zoomed HSQC spectrum of selloside A (**1**) in DMSO-*d*₆.

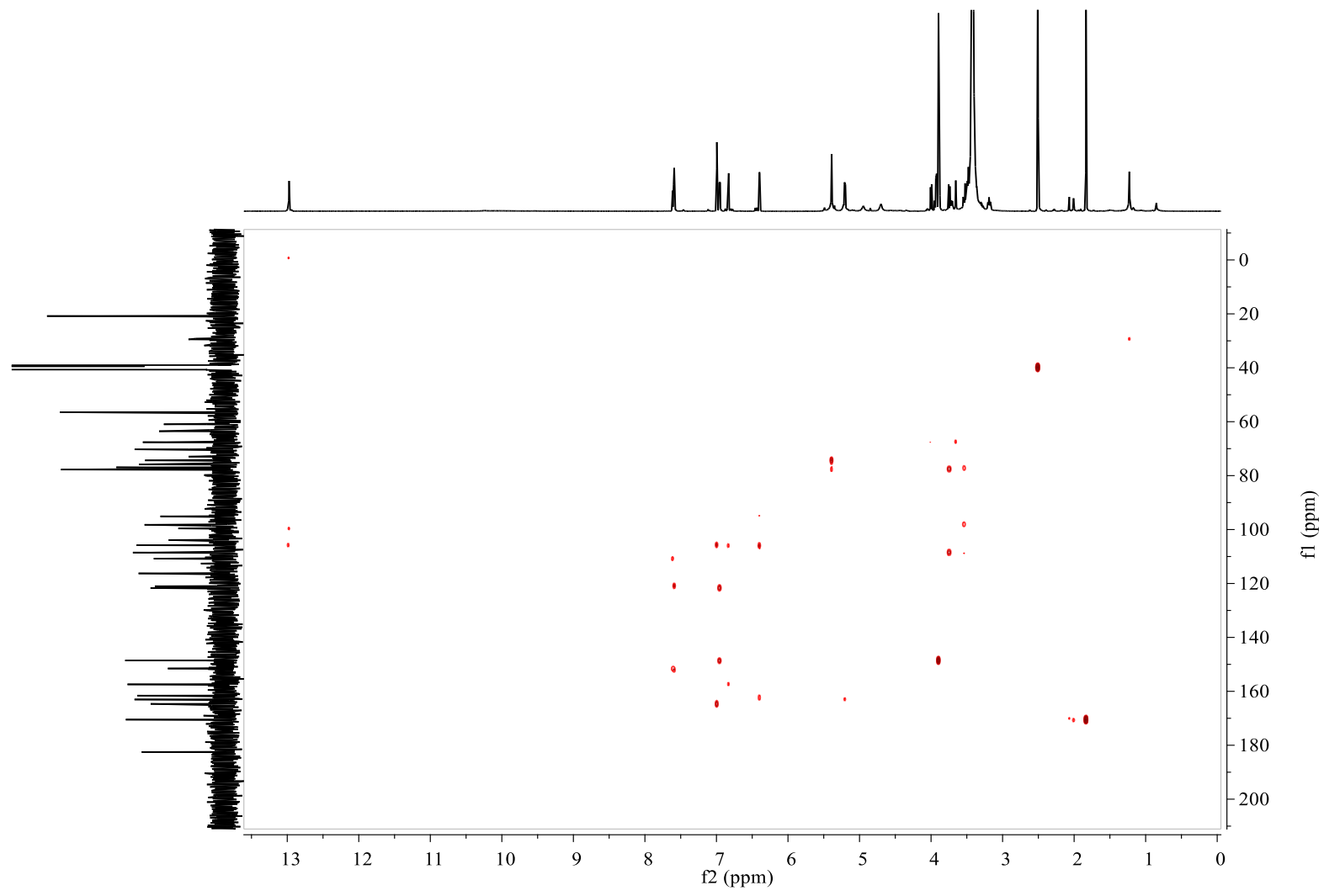


Fig S12. HMBC spectrum of selloside A (**1**) in DMSO-*d*₆.

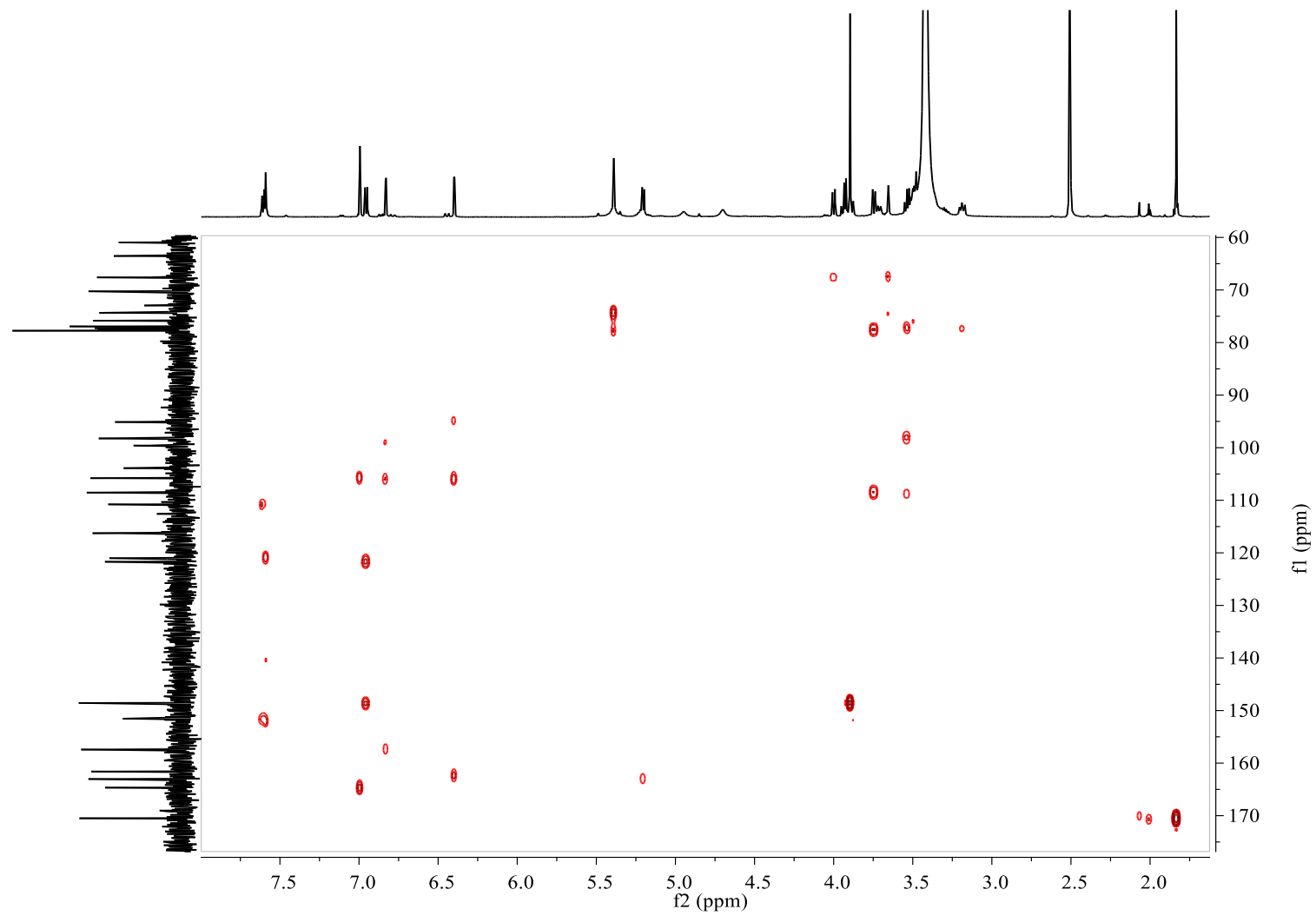


Fig S13. Zoomed HMBC spectrum of selloiside A (**1**) in DMSO-*d*₆.

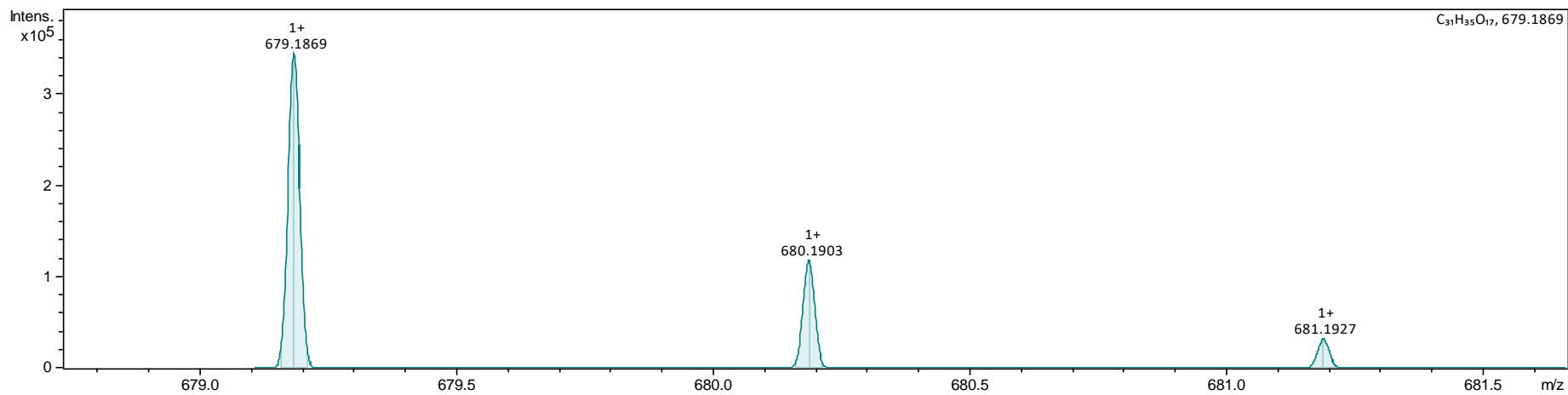
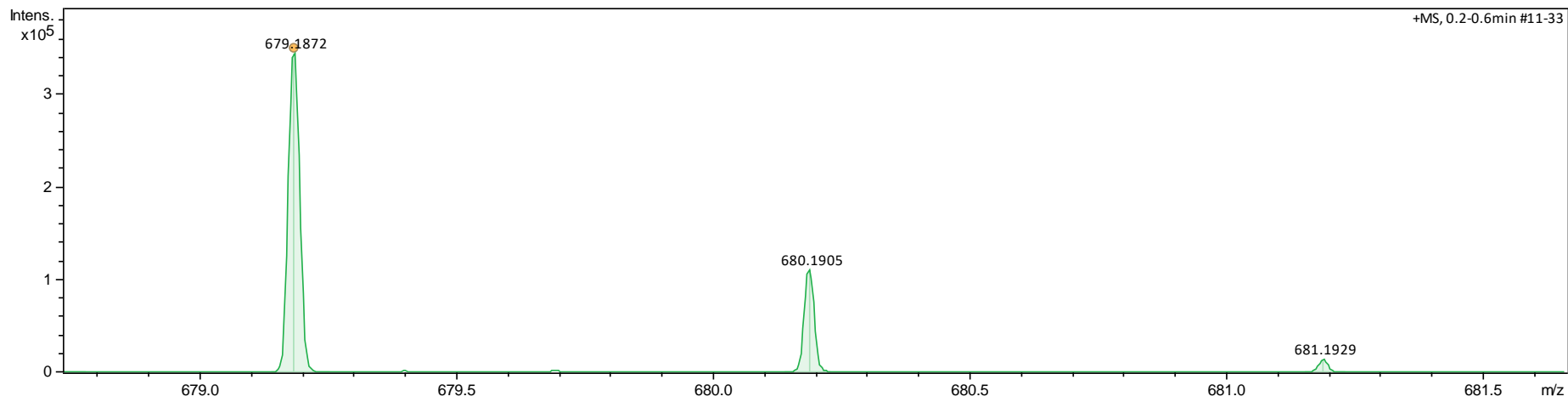


Fig S14. HRESIMS spectrum of selloiside B (2).

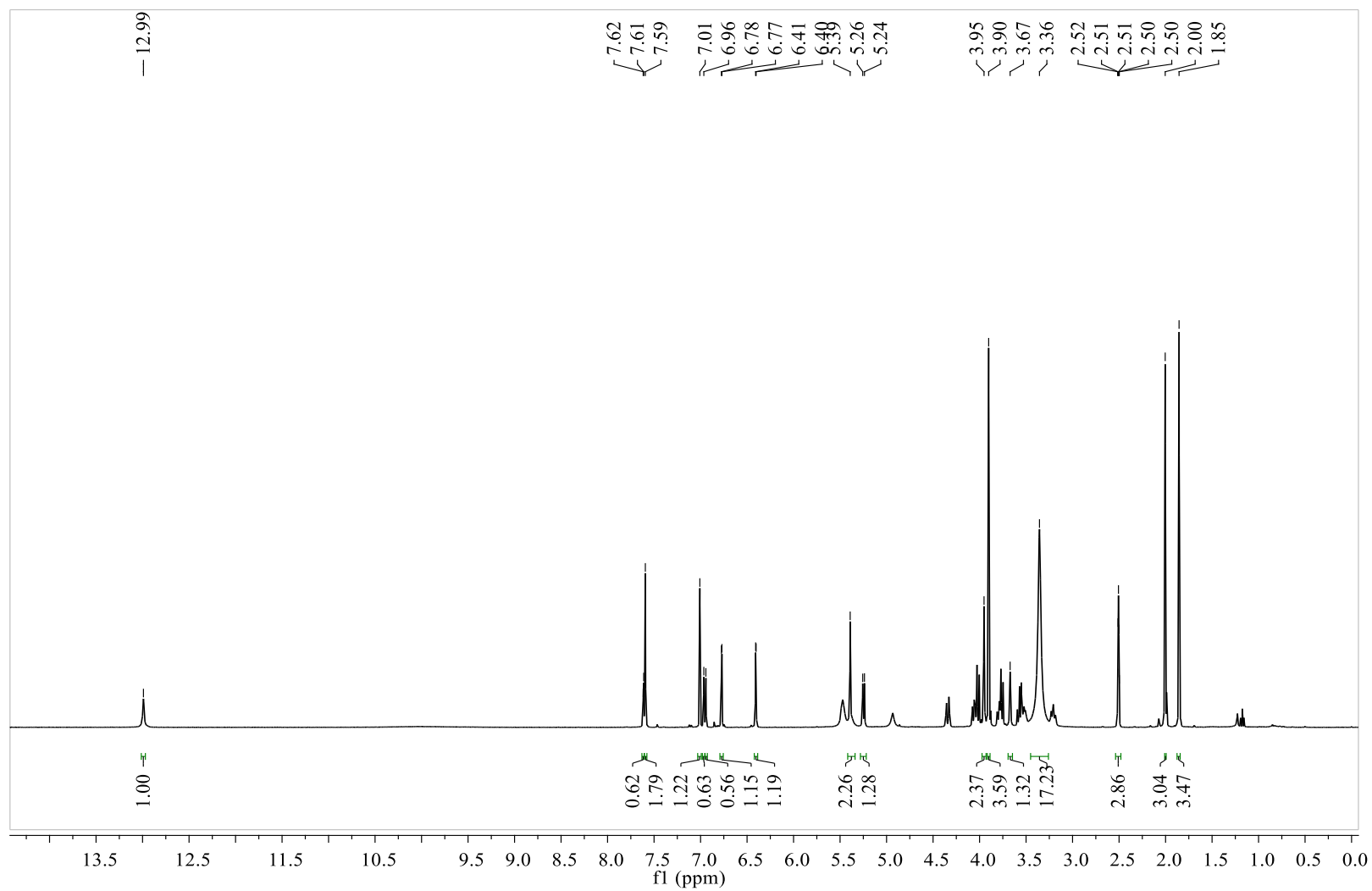


Fig S15. ^1H NMR spectrum of selloiside B (**2**) in $\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz.

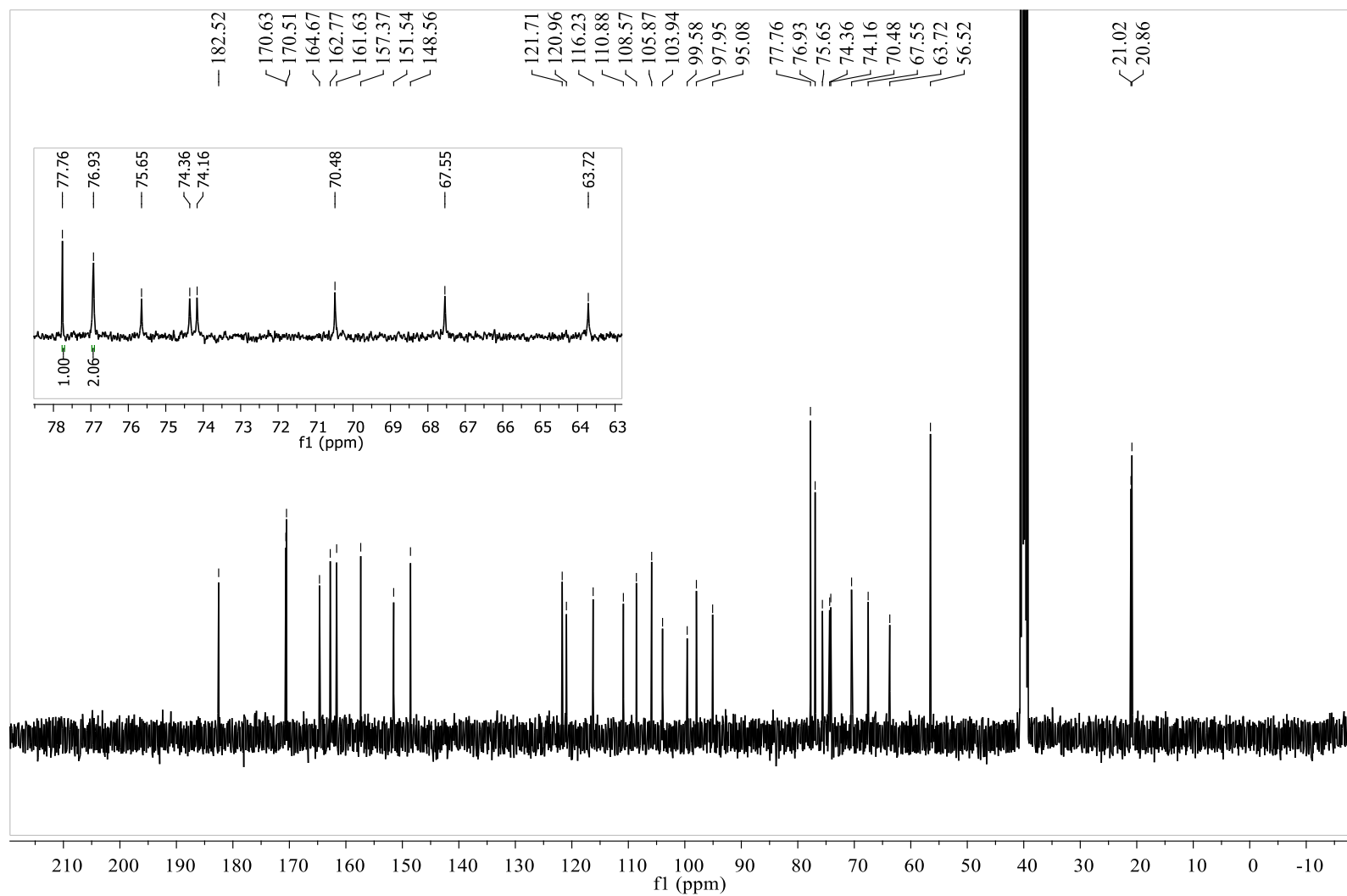


Fig S16. ^{13}C NMR spectrum of selloiside B (2) in $\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz.

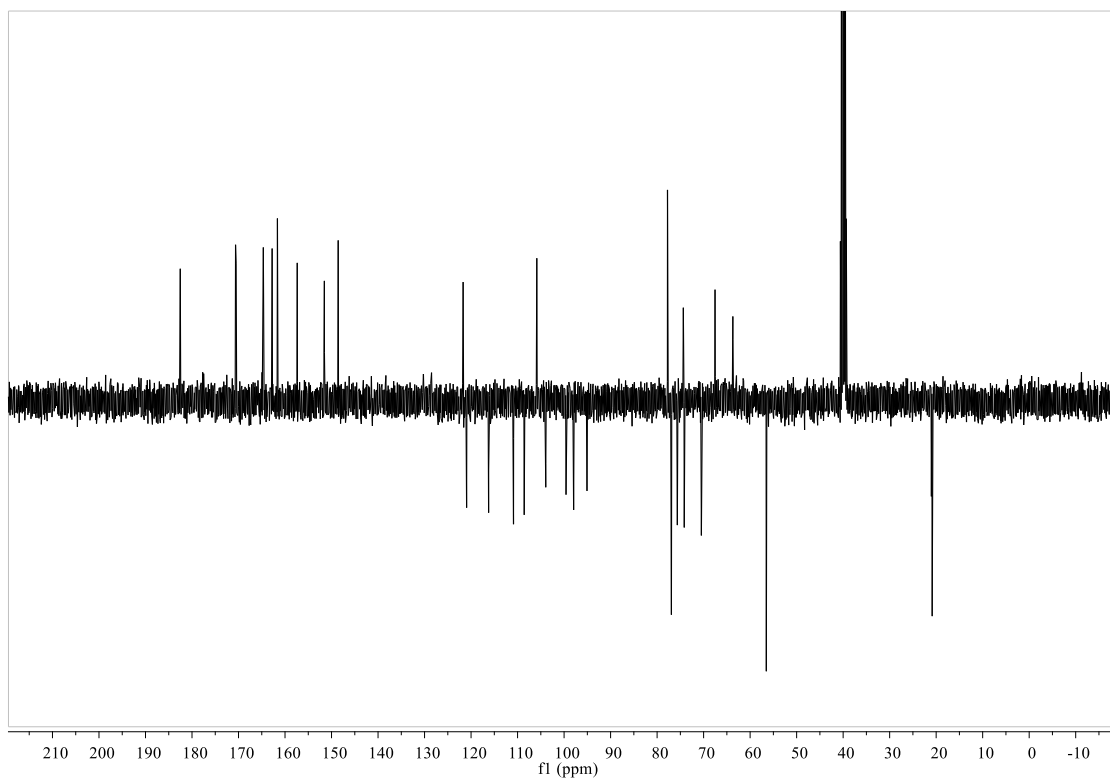


Fig S17. APT spectrum of selloside B (**2**) in DMSO-*d*₆, 100 MHz.

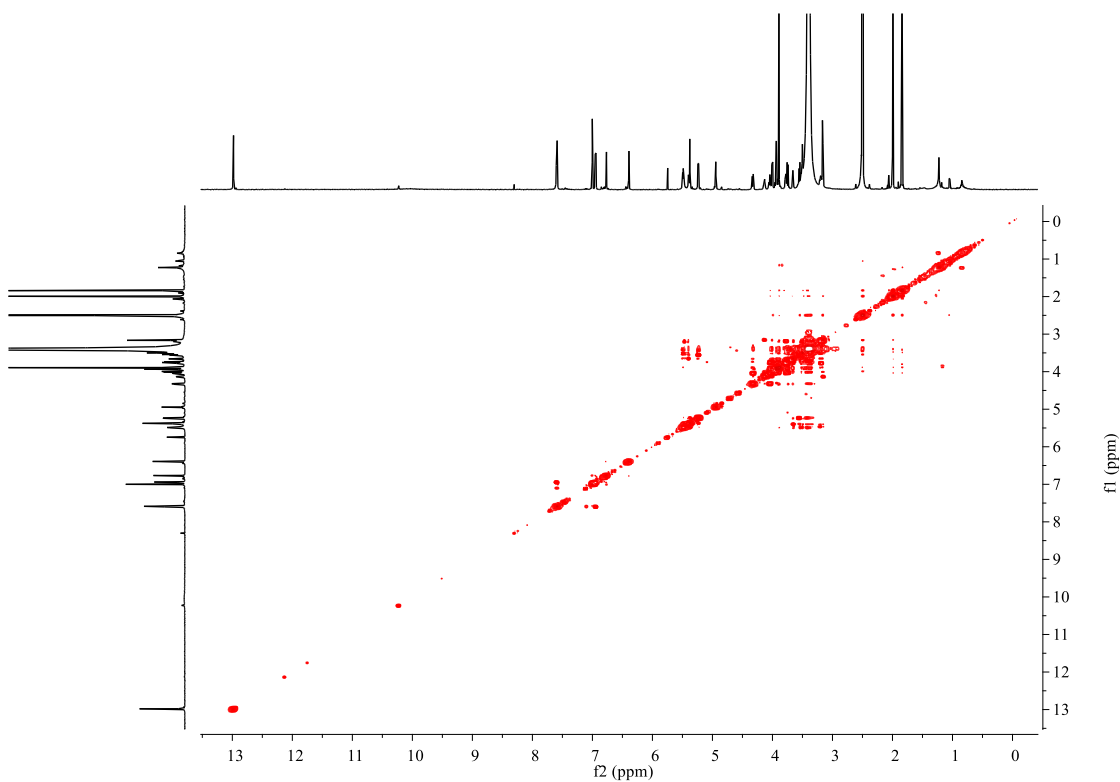


Fig S18. ¹H-¹H COSY spectrum of selloside B (**2**) in DMSO-*d*₆, 400 MHz.

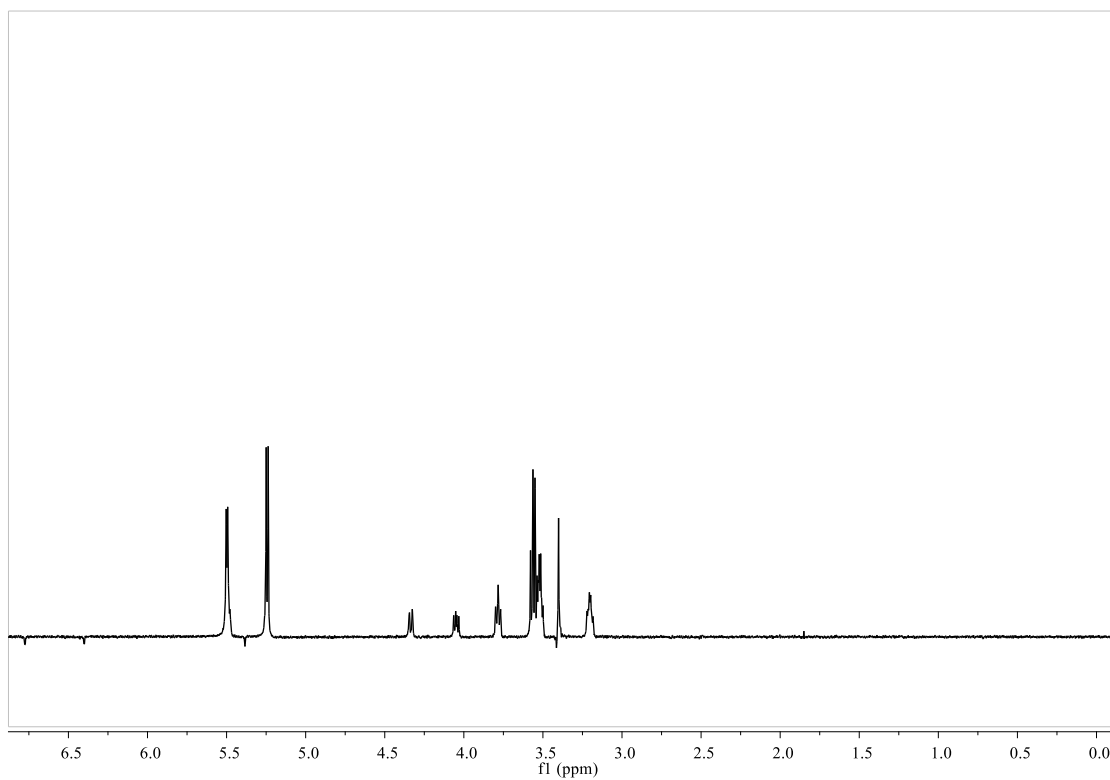


Fig S19. ^1H - ^1H TOCSY of the glucose anomeric proton (δH 5.24, H-1'') of selloside B (**2**).

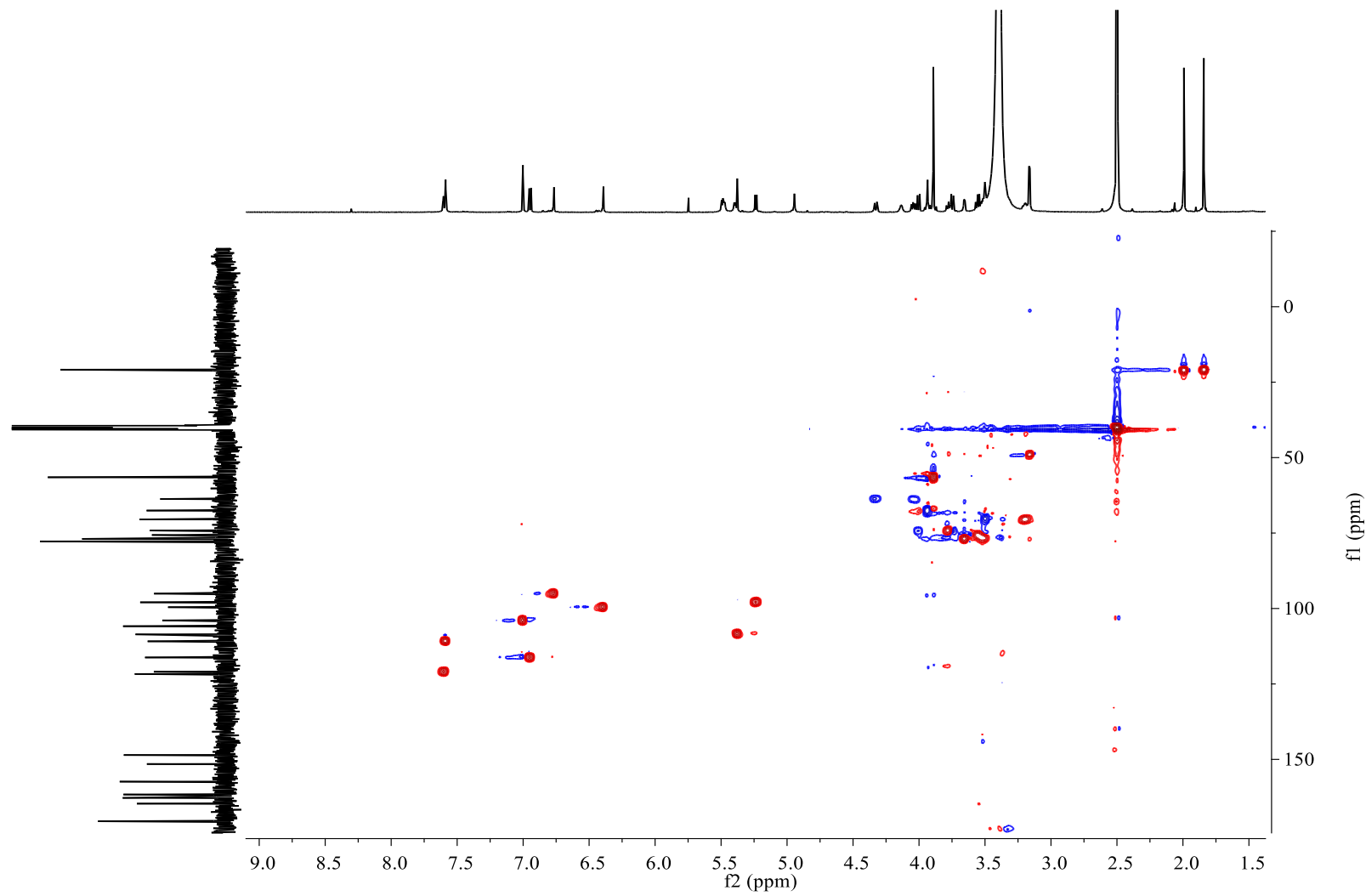


Fig S20. HSQC spectrum of selloside B (**2**) in DMSO- d_6 .

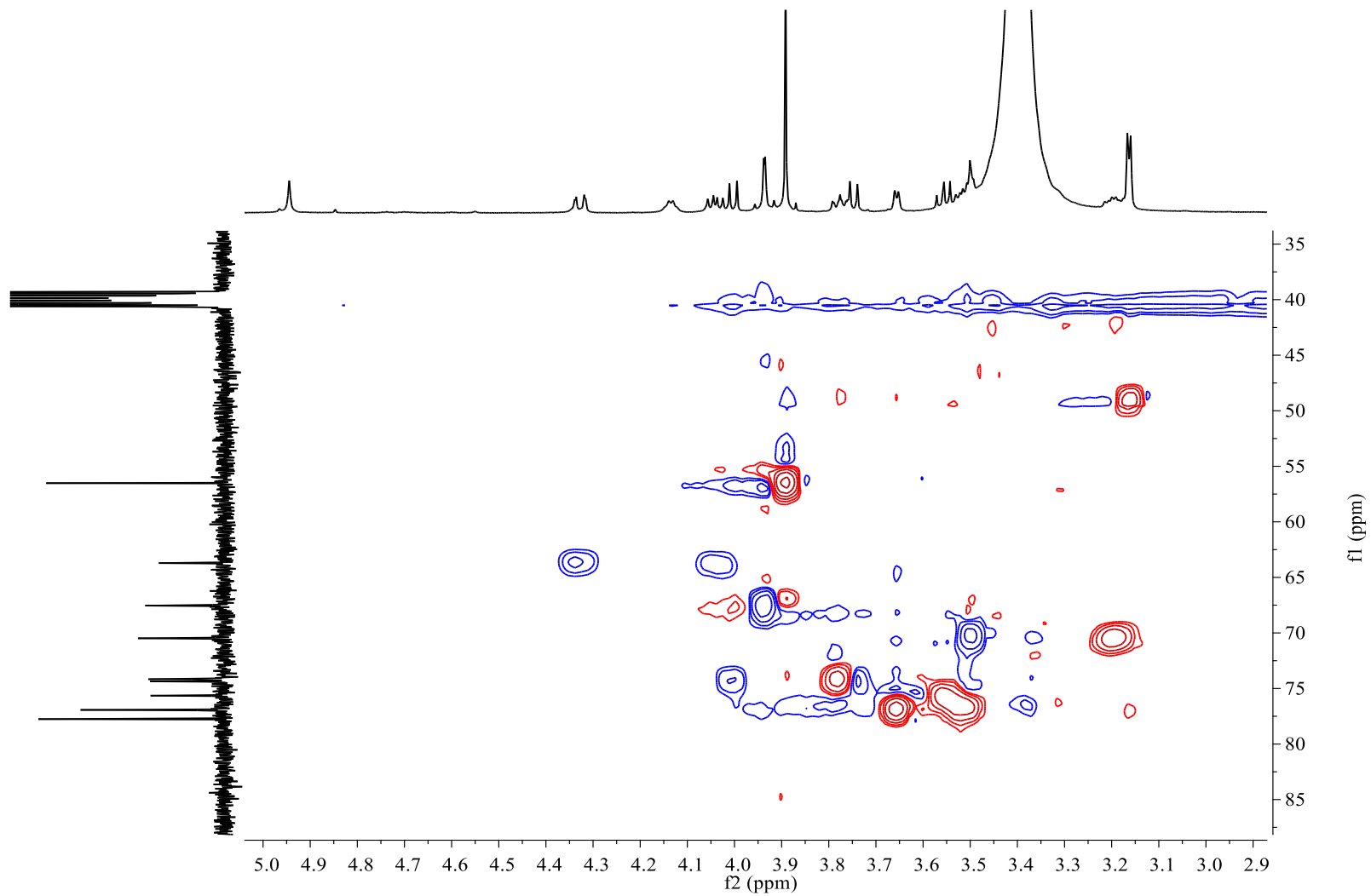


Fig S21. Zoomed HSQC spectrum of selloside B (**2**) in $\text{DMSO-}d_6$.

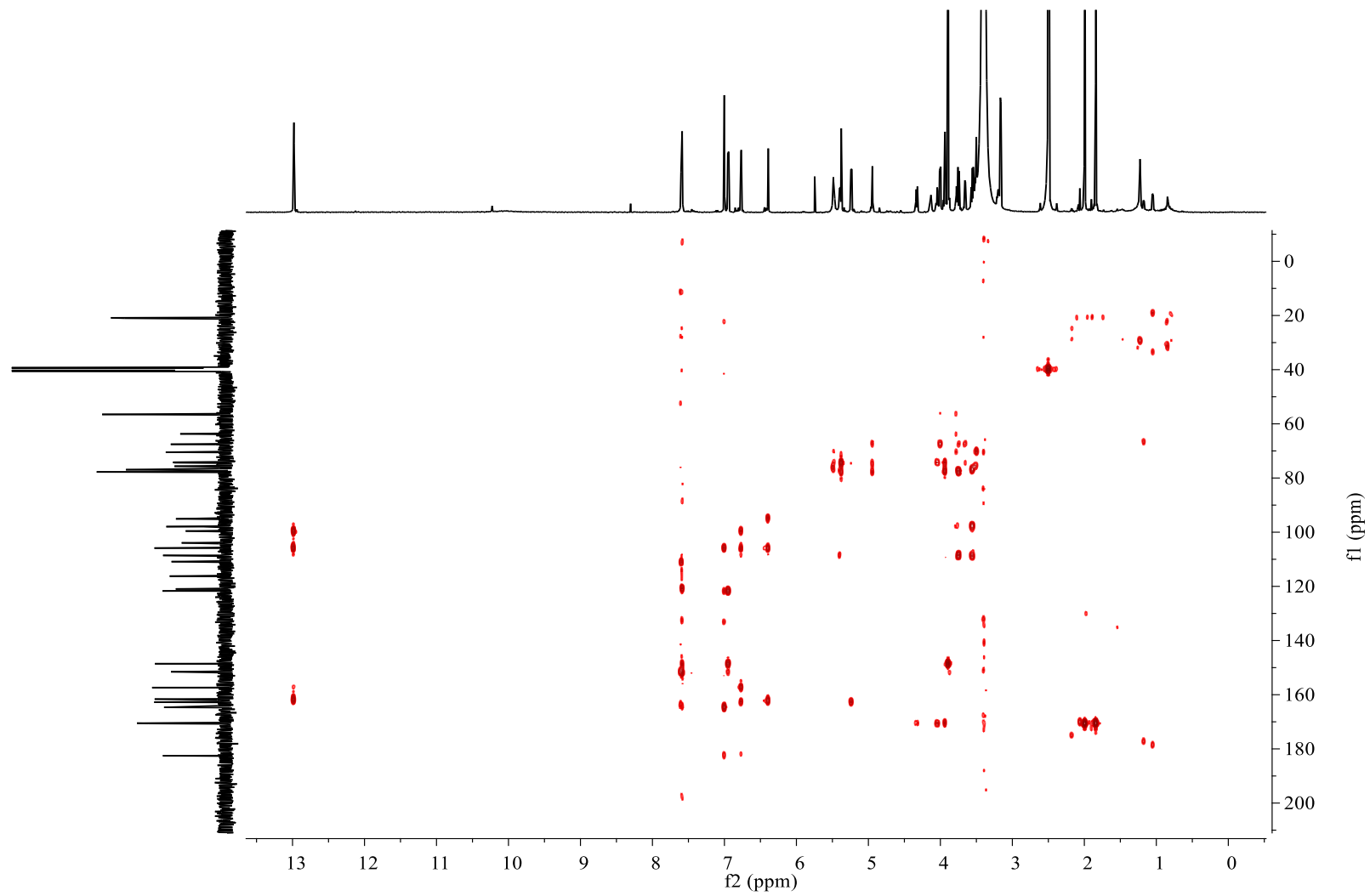


Fig S22. HMBC spectrum of selloiside B (**2**) in DMSO-*d*₆.

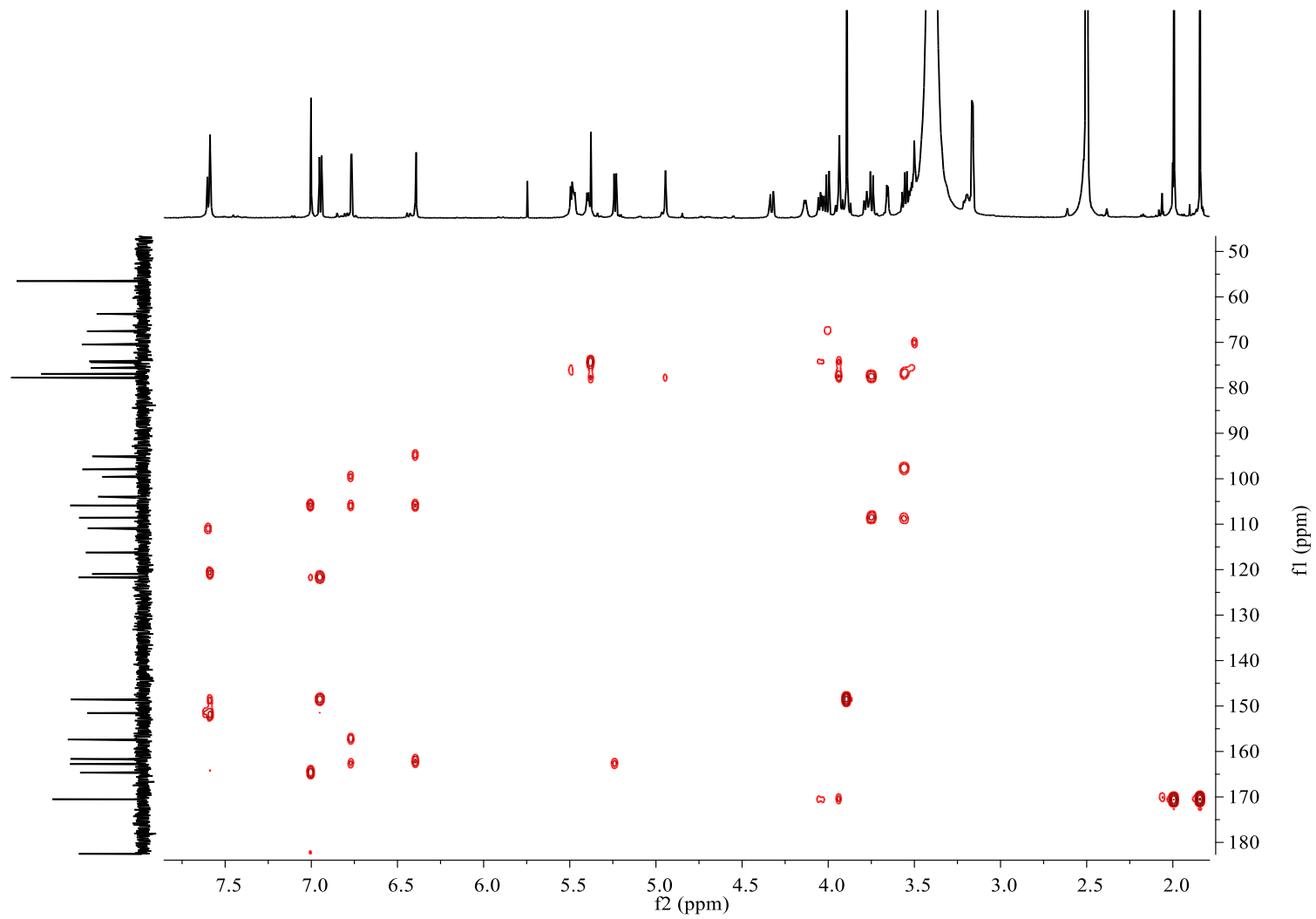


Fig S23. Zoomed HMBC spectrum of selloiside B (**2**) in DMSO-*d*₆.

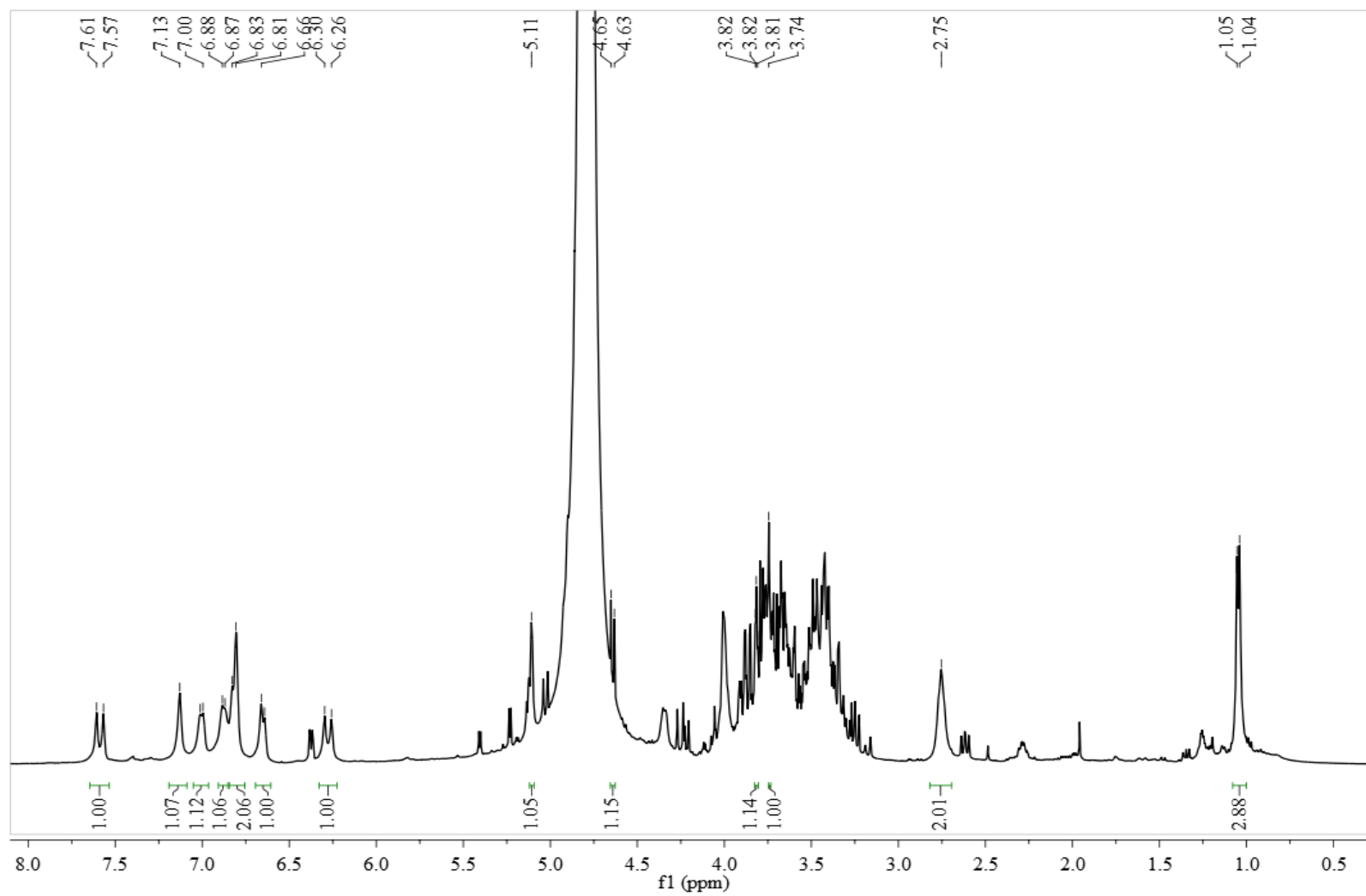


Fig S24. ^1H spectrum of verbascoside (**3**) in D_2O .

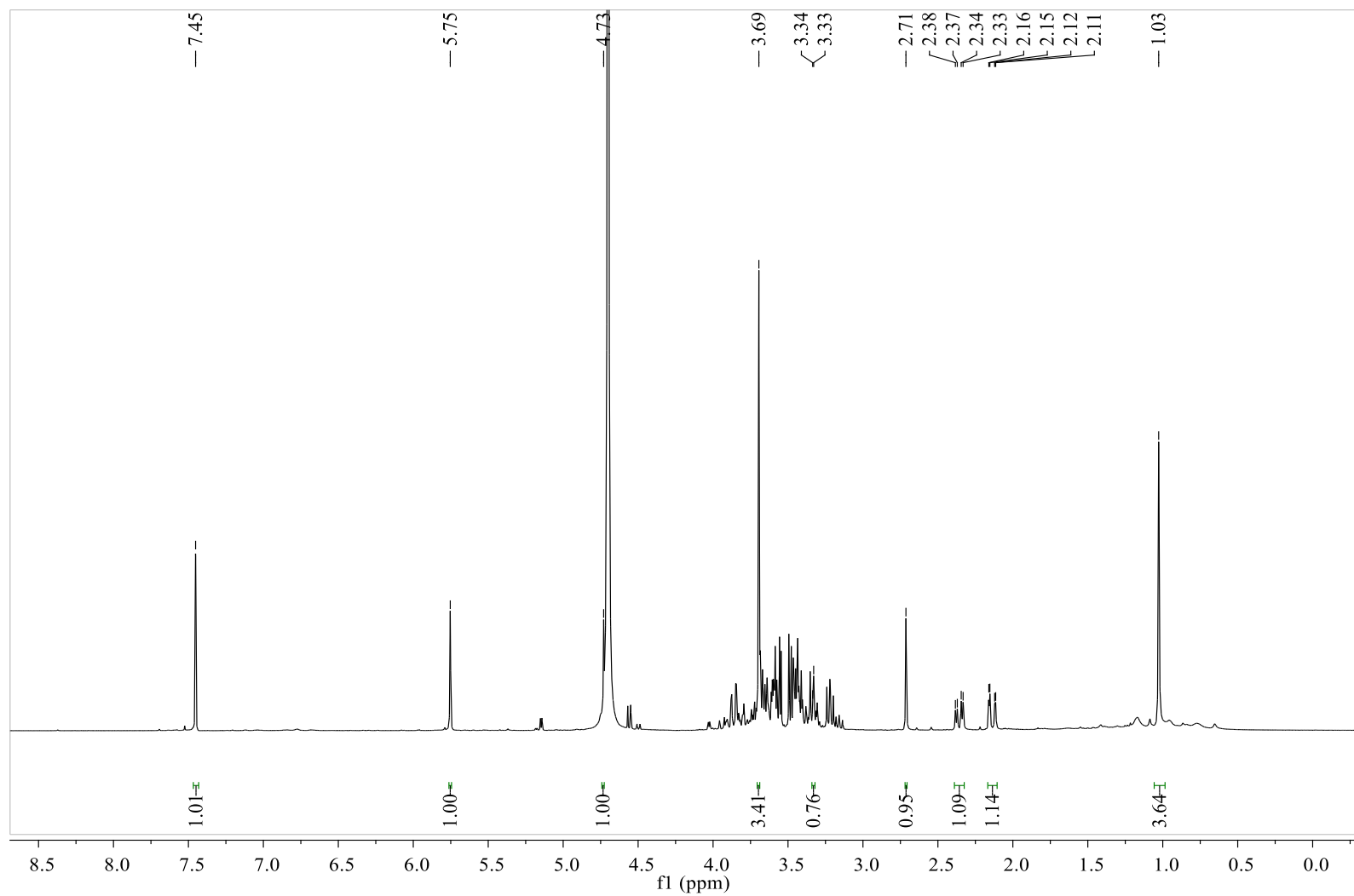


Fig S25. ¹H NMR spectrum of 6β-hydroxy-ipolamiide (**4**) in D₂O, 400 MHz.

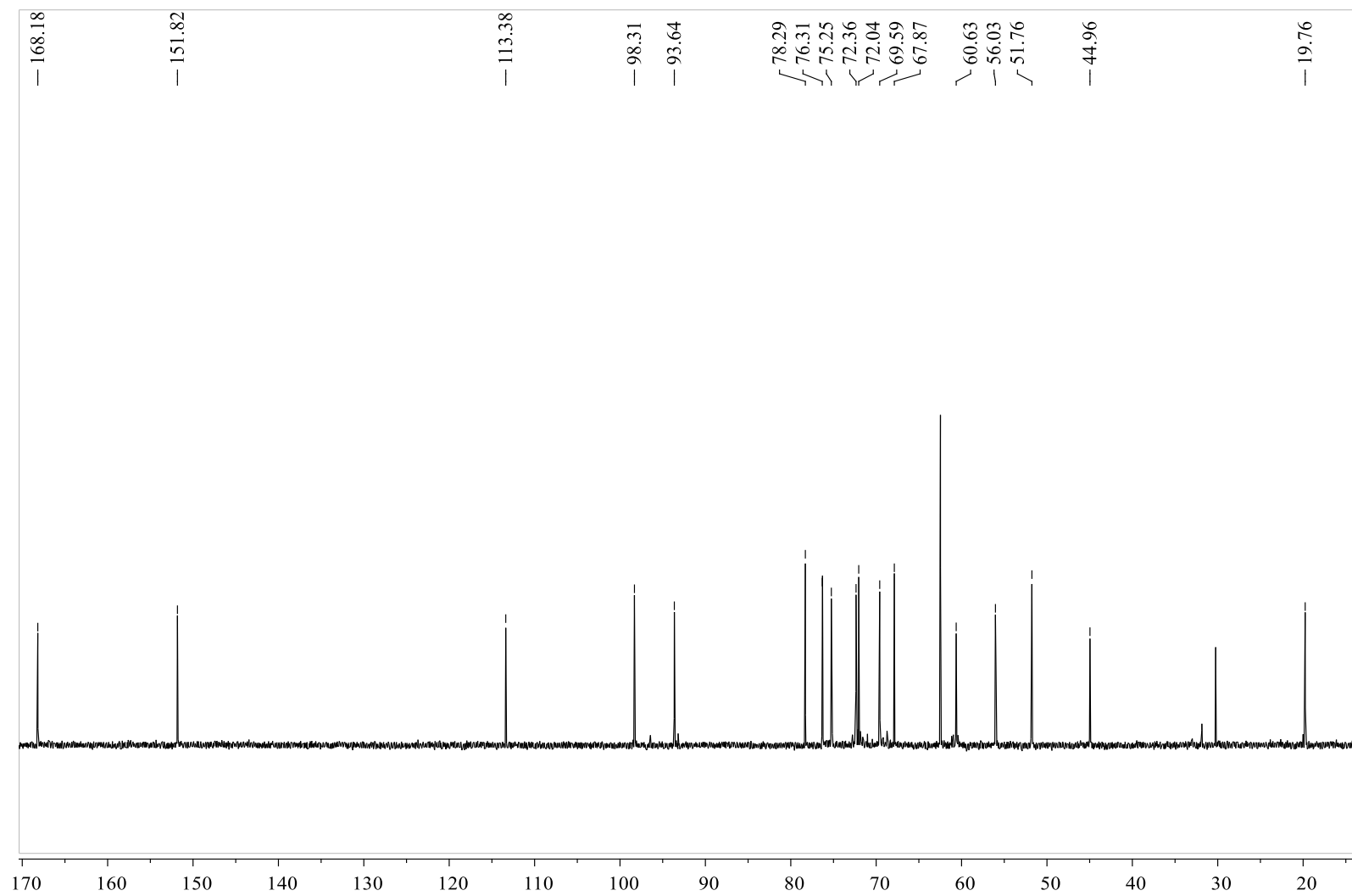


Fig S26. ¹³C NMR spectrum of 6β-hydroxy-ipolamiide (**4**) in D₂O, 100 MHz.

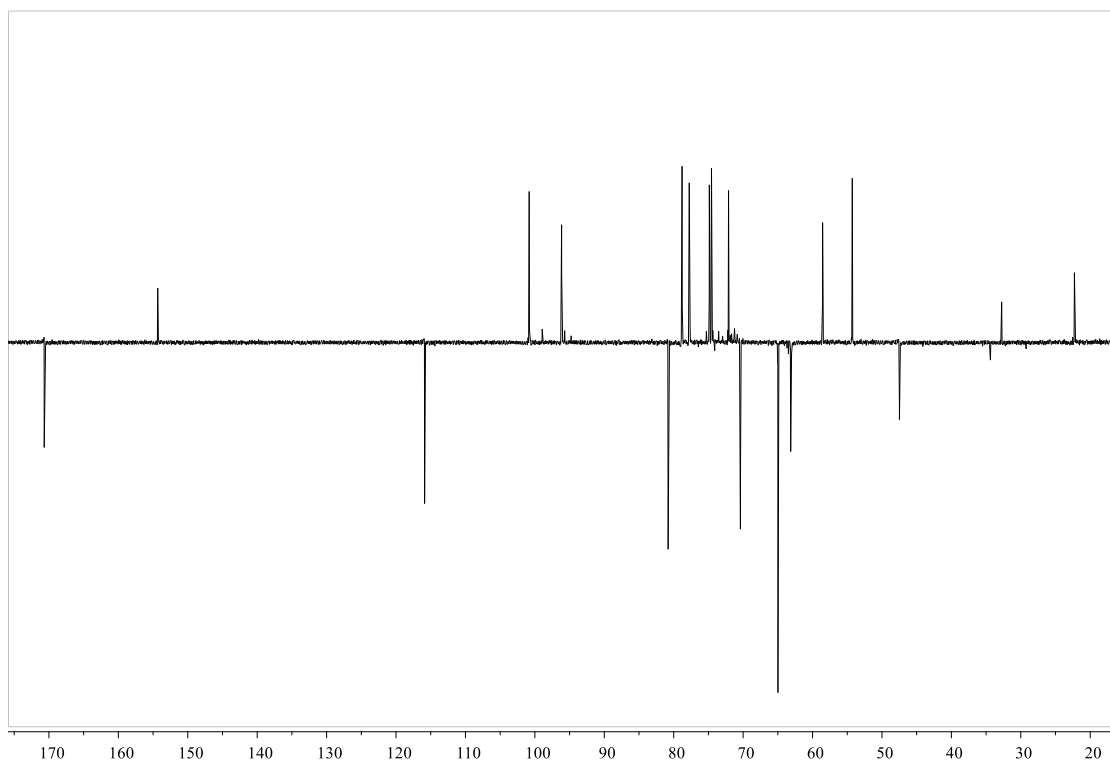


Fig S27. APT spectrum of 6β -hydroxy-ipolamiide (**4**) in D_2O , 100 MHz

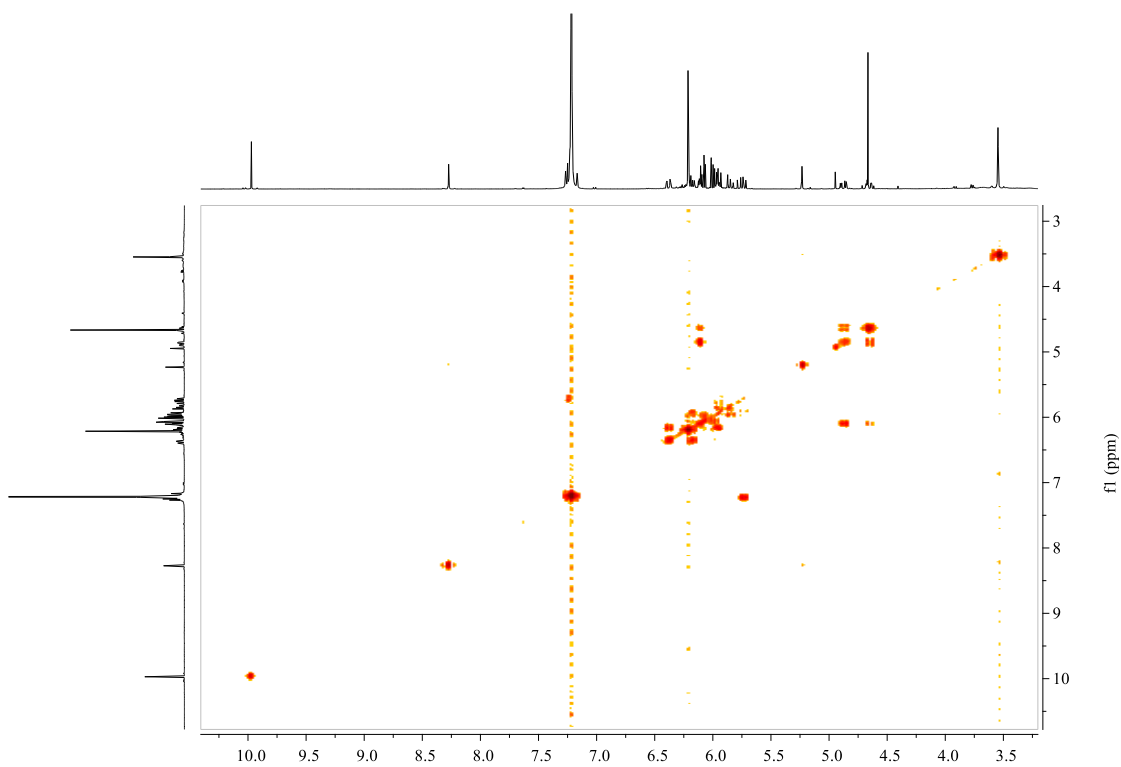


Fig S28. 1H - 1H COSY spectrum of 6β -hydroxy-ipolamiide (**4**) in D_2O , 400 MHz.

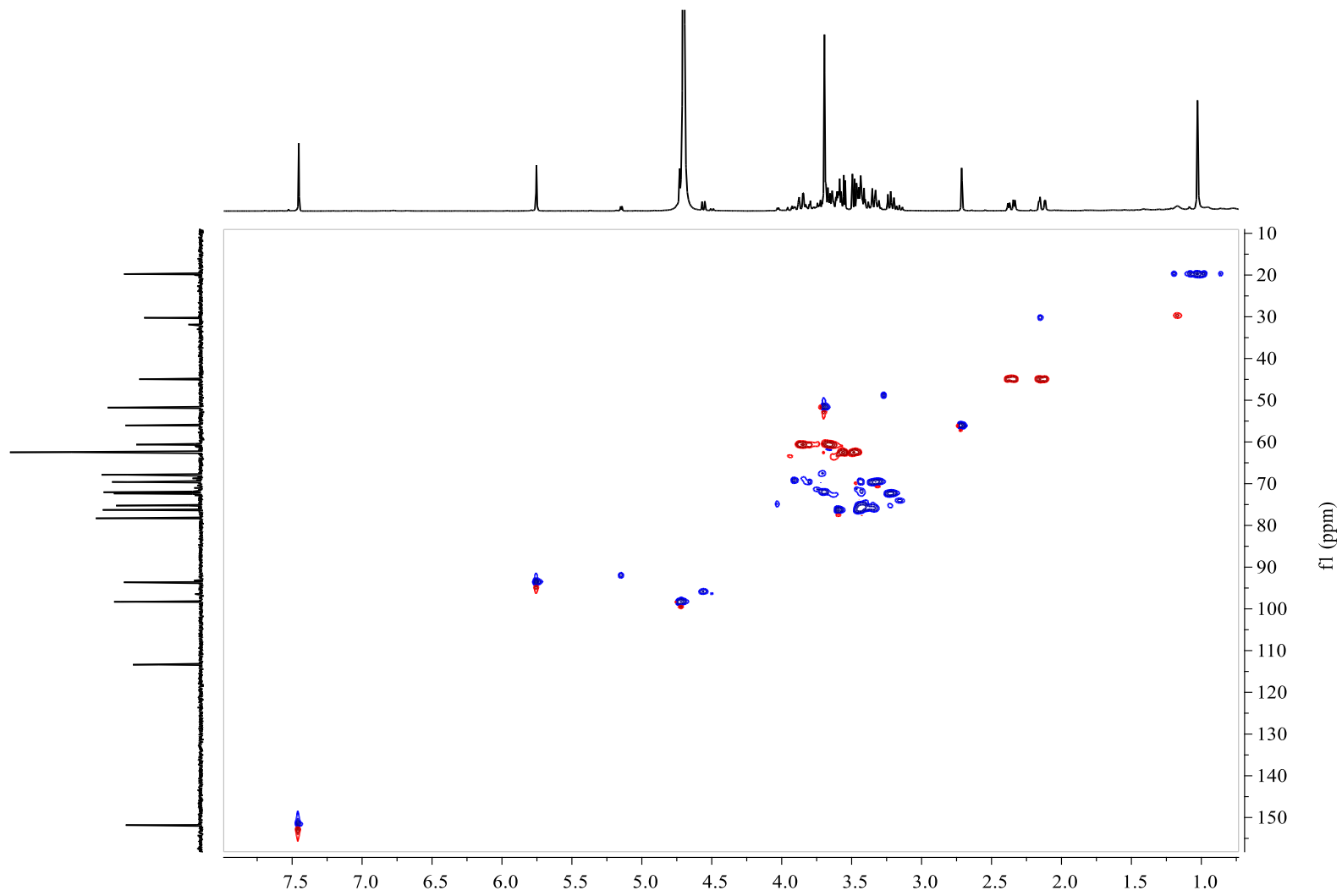


Fig S29. HSQC spectrum of 6 β -hydroxy-ipolamiide (**4**) in D₂O.

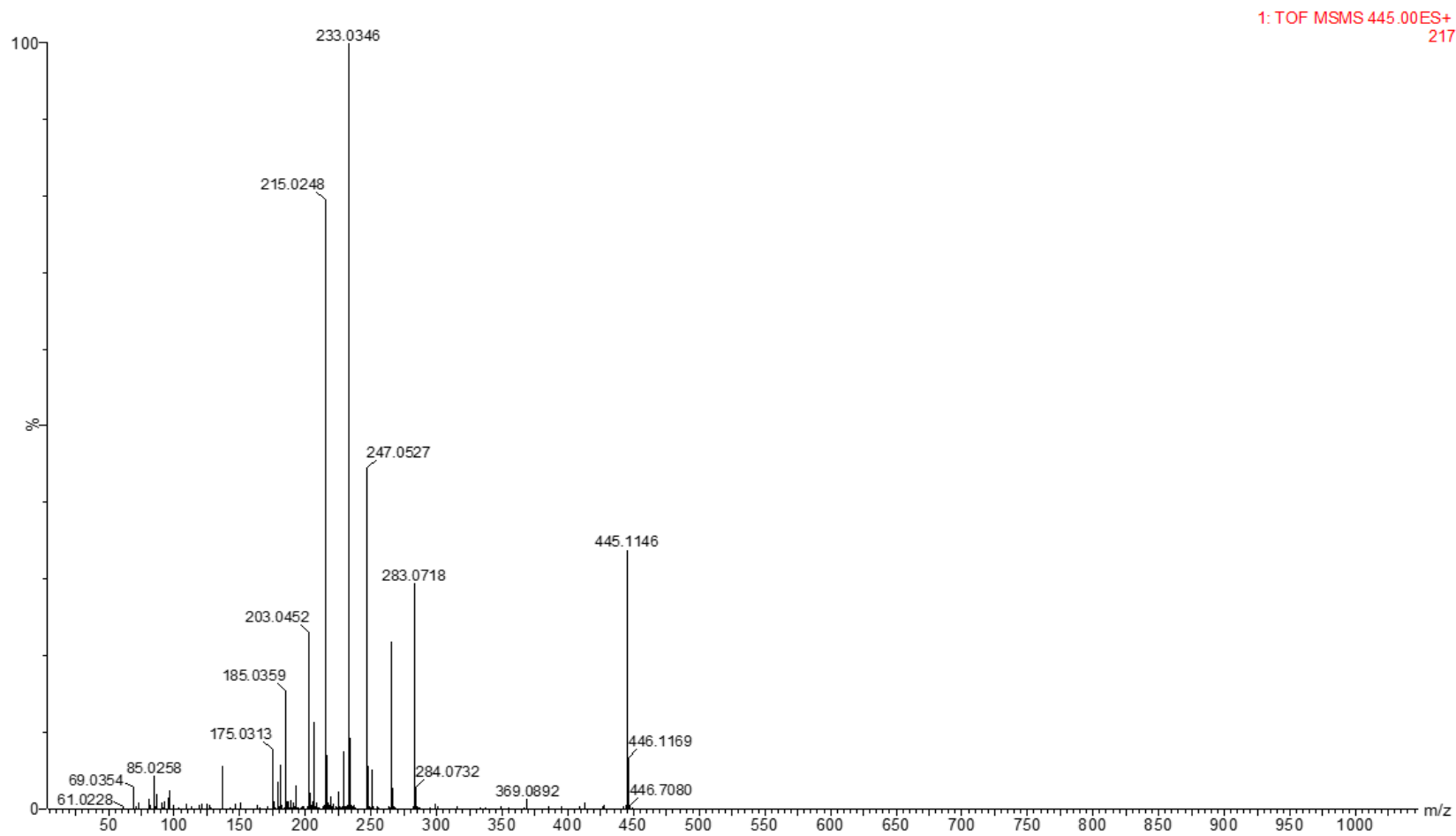


Fig S30. CLAE-EM of 6 β -hydroxy-ipolamiide (**4**)

Manuscrito II

**Hepatoprotective and antichemotactic activities of *Verbena litoralis*,
Verbena montevidensis and their main iridoid, brasoside**

Hepatoprotective and antichemotactic activities of *Verbena litoralis*, *Verbena montevidensis* and their main iridoid, brasoside

Manuscrito em preparação (Journal of Ethnopharmacology)

Abstract

Ethnopharmacological relevance: *Verbena montevidensis* and *Verbena litoralis* are plants that present morphological similarities. They are both known as "gervão" and "fel-da-terra" and are used in folk medicine to treat diseases related to the liver and stomach.

Aims of the study: The aim of current investigation was to determine the chemical composition and evaluate the hepatoprotective properties and cytotoxicity in Hep G2 cells, of the methanolic extracts *V. montevidensis*, *V. litoralis* and their main iridoid. The same samples were also evaluated for the antichemotactic activity.

Materials and methods: Dried aerial parts of *V. montevidensis* and *V. litoralis* were extracted with methanol by maceration. The extracts were analysed by HPLC. The extract of *V. montevidensis* afforded an iridoid as the main compound. The extracts and isolated compound were examined for the hepatoprotective effect and cytotoxicity in human hepatoma Hep G2 cells by MTT and Neutral red dye methods. The antichemotactic activity was carried out according to a modified Boyden chamber method. The leucocytes migration through the filter was measured using optical microscope.

Results: The methanolic extracts of both species showed the presence of iridoid and phenylethanoids as the main compounds. The iridoid brasoside was isolated and identified by spectroscopic methods. The phenylethanoid was characterized by the UV profile. The results of the biological assays indicate that the extracts of *V. montevidensis* and *V. litoralis* as well as brasoside were hepatoprotective against ethanol-induced

damage in HepG2 cells and present antichemotactic activity. The effect can be attributed to the main compounds present since both classes are recognized for these activities.

Conclusions: Our results contribute towards validation of the traditional use of *V. montevidensis* e *V. litoralis* in the treatment of liver disorders.

1. Introduction

From very early times there was the belief that bitter products were beneficial to the digestive system. Many people have the habit of using a bitter drink before meals, both to increase appetite and to facilitate digestion. Pharmacologic and physiologic evidences have been demonstrating that bitter compounds have noteworthy roles in the body and can be effective in stimulating digestion, increasing enteric blood flow and improving liver and pancreatic functions (Ekstrand et al., 2017; Gilca and Dragos, 2017; Lu et al., 2017).

In recent times, taste receptors outside the oral cavity, especially in the gastrointestinal tract, have been discovered. These receptors, especially bitter taste receptors (T2R), are present in non-gustatory cells, including airway epithelia, breast epithelia, gastro-intestinal cells, brain, among others, suggesting that they have additional functions besides taste perception. This subject has been the target of several studies and excellent reviews have been just published (Ekstrand et al., 2017; Gilca and Dragos, 2017; Lu et al., 2017).

In an analogy to bile bitterness, bitter plants have always been considered good remedies for treating liver disease and certain bitter herbs are used traditionally to stimulate, cleanse, and protect the liver and gall bladder. Among several plants used in the treatment of liver diseases, some species of *Verbena* (Verbenaceae) are known as “fel-da-terra” (“fel” means gall and “terra”, Earth), due to the very bitter taste (Ritter *et al.*, 2002; Borges, 2010; Kubo, 1997 Barros *et al.*, 2007; Garlet, 2000, Sebold, 2003; Vendruscolo, 2004; Merétika et al., 2010; Santos et al., 2015).

Thus, the aim of the current investigation was to determine the chemical composition and evaluate the hepatoprotective properties and cytotoxicity in Hep G2 cells as well as the antichemotactic activity of *Verbena montevidensis* Spreng. and *V. litoralis* Kunth, both used to treat liver intoxication and other hepatic disorders.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Aerial parts of *Verbena litoralis* Kunth and *Verbena montevidensis* Spreng. (Verbenaceae) were collected in Rio Grande do Sul, Brazil, in the cities of Nova Santa Rita, RS (29°51'25"S/51°16'26"W and 51°16'26"W) and Quevedos, RS (29°19'20.6"S and 54°04'35.2"W), respectively. The species were identified by Sérgio Augusto de Loreto Bordignon (UNILASALLE, RS, Brazil). Vouchers were deposited at the Herbarium of Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

2.2 HPLC screening

For the screening, aerial parts (0.25 g) were extracted with 5 mL of methanol for 1 h by ultrasound-assisted maceration. The extracts were analyzed by HPLC-PDA (Supplementary material S1 and S2).

HPLC analyses were carried out in a Waters equipment (Alliance 2695) with a Waters 2998 Photodiode array (PDA) detector. The column was a Phenomenex -C18 (250 x 4.6 mm) with a C-18 pre-column Lichrospher Merck®. The eluent system was a gradient of A: water and B: methanol, starting with 80% of A going to 100% B. The volume of injection was 10 µL and the flow rate was 0.7 mL/min. The runtime was 39 min.

2.3. Extraction and Isolation

The dried aerial parts (ca. 7 g) of *V. montevidensis* were macerated with methanol in 24 h cycles, until exhaustion. The pooled extracts were filtered, concentrated in vacuum and submitted to column chromatography (silica gel 60 Acros Organics; 0.060 - 0.200 mm)

affording a main compound that was identified based on spectroscopic data (^1H and ^{13}C NMR).

2.4. Hepatoprotective activity and cytotoxicity

2.4.1 Cell Line and Culture

Human hepatoblastoma HepG2 cells were routinely cultured in 75 cm² flasks using DMEM with high glucose medium, supplemented with 10% FBS (fetal bovine serum) and 1% antibiotic solution. Cells were maintained in a humidified 5% CO₂ – 95% air atmosphere at 37 °C. Medium was changed every 2-3 days. Cultures were passaged by trypsinization (0.25% trypsin/1 mM EDTA) when cells reached 70 - 80% confluence and subcultured over a maximum of 10 passages.

2.4.2 Cytotoxicity assay

For cytotoxicity assays, HepG2 cells were seeded at a density of 50,000 cells/well onto 96-well plates (Nest Biotech CO. Ltd., China) in a volume of 200 μL of complete culture medium, to obtain confluent monolayers within 24 hours. The following day, cells were incubated with 0.1, 1, 10, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ extracts or 10, 25, 50 and 100 μM brasoside in cell culture medium. Stock solutions were prepared by diluting the extracts in PBS and brasoside in DMSO, the working solutions were made up by diluting the sock solutions in cell culture medium. When DMSO was used, the concentration in cell culture medium was never higher than 0.1%, in these cases a solvent control of 0.1% DMSO in culture medium was used in all experiments. Triton X-100 1% was applied as a positive control. All drugs were tested in three independent experiments with each concentration in six replicates within each assay.

MTT reduction assay measures cellular dehydrogenases activity, an indicator of metabolically active mitochondria and it was used to estimate cell viability. After the 24 h incubation period, cells were kept at 37 °C with PBS containing 0.5 mg/ml MTT. Within 2 h, cell culture medium was removed and DMSO was added to dissolve the formazan crystals. Absorbance was measured at 585 and 600 nm in a multiwell plate reader (SpectraMax M2e, SoftMax® Pro 5, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Results were presented as a percentage of cell death versus concentration (Dias da Silva et al., 2015).

Neutral red dye (NR) is incorporated through passive transport by cell plasmatic membrane and kept inside lysosomes. Therefore, the intact cell can incorporate the dye, while dead or damaged cells cannot, making it another estimation of cell viability. At the end of 24 h incubations of HepG2 cells, the medium was replaced by PBS containing 50 µg/mL NR. Cells were maintained at 37°C for 2 h and thereafter, rinsed with PBS and lysed with a 50% ethanol/1% glacial acid acetic solution. Absorbance was measured at 540nm in a multiwell plate reader. Percentage of cell death relative to the control was used as cytotoxicity measure (Arbo et al., 2014).

2.4.3 Hepatoprotective activity

To evaluate the hepatoprotective activity of the extracts and brasoside, HepG2 cells were seeded at a density of 50,000 cells/well in 96-well plates (final volume of 200 µL). After 24 h cells were co-incubated with 400 µM ethanol (EtOH) (Bak et al., 2016) and 0.1, 1, 10, and 100 µg/mL extracts or 10, 25, 50 and 100 µM brasoside. After 24 h, cell mortality was determined through the MTT reduction and the NR uptake assays. The final results were expressed as percentage of control conditions from three independent experiments with each concentration tested in six replicates within each experiment.

2.5. Antichemotactic activity

Stock solutions (1000 µg/mL) of the methanolic extracts of *V. montevidensis* and *V. litoralis* and of the iridoid brasoside were previously prepared in Hanks buffer and Tween 80 (maximum concentration = 10%). The stock solutions were diluted in rat leukocytes solution to obtain the concentrations of 0.1–10.0 µg/mL used in the assay. Chemotaxis evaluation was performed according to the method described by Suyenaga et al. (2011). The leukocytes/samples were added to the upper wells of a modified Boyden chamber, separated from the chemotactic stimulant (LPS from *Escherichia coli*) present in the lower compartment by an 8.0 µm nitrocellulose filter (Millipore, USA). The leucocytes migration was measured using the microscope. The mean value of migration correspond the micrometer distance from the top of the filter to the farthest plane of focus still containing two cells in five microscopic fields. All experiment was carried out in duplicate.

2.6 Statistical analysis

The results of the assays for hepatoprotective activity and cytotoxicity are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM) from at least three independent experiments. Normality of the data distribution was assessed by the Kolmogorov–Smirnov normality test. Significance was accepted at $p < 0.05$. Statistical comparisons between groups were performed with one-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test.

The statistical analysis of the data obtained in the antichemotactic experiments was performed using the GraphPad Prism 5.0 software, by ANOVA followed by Tukey's test. Significance was accepted at $p < 0.05$ and the data were expressed as mean \pm SD.

3. Results and discussion

3.1. Chemical analysis

In the screening carried out by High-performance liquid chromatography it was observed that both methanolic extracts presented compounds with Ultraviolet absorption profiles of iridoid and phenylethanoid glycosides. (Supplementary material, Figs.S1 and S2). An iridoid glucoside was isolated from the methanolic extract of *V. montevidensis* and was identified as brasoside by comparison with the spectroscopic data published by Rimpler and Franke (1987). This iridoid was previously isolated from *V. litoralis* (Castro and Umanã, 1990). Both iridoid and phenylethanoid glycosides are responsible for the very bitter taste of the plants.

The use of digestive bitters, such as those prepared with gentian root is an ancient tradition, especially in Europa. The iridoids present in the plant confer the bitter taste and stimulate the secretion of both gastric juices and bile.

Iridoids are secondary metabolites recognized by the intense bitter taste. Several plants containing iridoids are used as hepatoprotective. Many studies confirmed this effect. Some examples are species of *Gentiana*, *Swertia* and *Gentianella* (Gentianeae)

and *Gardenia jasminoides* (Rubiaceae). Some iridoids isolated from these plants proved to be the responsible for the activity (Chen et al., 2016).

The bitter glycosides have been found not restricted to the same chemical class. Besides iridoids, phenylethanoids also have a bitter taste. Phenylethanoid glycosides (Jiménez and Riguera, 1994), are also known as verbascosides (Jansen, 1992) or caffeoyl phenylethanoid glycosides (Taskova et al., 2005) and some of them were named as bitter phenylpropanoid glycosides (Nonaka and Nishioka; Imakura et al., 1985). These compounds are the main constituents of kudingcha (bitter tea) one of the most popular beverages consumed in China. The bitter tea brewed from the leaves of *Ligustrum purpurascens* reduces inflammation, eliminates toxins, improves digestion, prevents metabolic disorders and more (Wong et al., 2001).

3.2 Cytotoxicity assay

The cultures received treatment with methanolic extract of the *V. litoralis* and *V. montevidensis* or brasoside for 24 h at concentrations of 0.1, 1, 10 e 100 µg/mL for extracts and 10, 25, 50 e 100 µM for brasoside, iridoid present in both species. Besides these treatments, the experiment included a control group (untreated cultures), which was considered to present 100% cell viability. The viability of the cultures was determined as percentage of cell viability in relation to the control (Fig 1).

The cytotoxicity was performed by the MTT reduction assay and by the incorporation of the NR. Both assay demonstrated that the methanolic extracts of the *V. montevidensis* and *V. litoralis*, as well as brasoside, were not cytotoxic in the concentrations tested. These results suggest, these samples do not present toxic potential in HepG2 cells *in vitro*.

3.3 Hepatoprotective activity

The hepatoprotective effect of the methanolic extracts and brasoside was evaluated under the same conditions of the cytotoxicity assay using 400 µM of ethanol as a hepatotoxic agent. As a positive control, curcumin, a natural product with recognized hepatoprotective activity, was used. The results are expressed as percentage of live cells relative to the control (Fig 2).

It was observed that the methanolic extracts of the *V. montenvidensis* and *V. litoralis* presented a similar effect both in the MTT reduction assay and in the NR incorporation assay. The results show that, in the co-incubated concentrations with ethanol, the methanolic extracts were efficient in protecting them, without cell death, presenting an effect similar to that of curcumin (control group).

The isolated product, brasoside, protected the cells in the lowest concentrations tested, 10 and 25 μM . Nevertheless, the product was less effective than curcumin. At the highest concentrations, 50 and 100 μM , the compound induced a decrease in cell viability.

The same effect was observed by Liang et al. (2015) with the iridoid gardenoside, that exhibited hepatoprotective activity at concentrations of 10 and 20 μM , being toxic in HepG2 at concentrations of 30, 40 and 50 μM . Gardonoside is an iridoid isolated from *Gardenia jasminoides* Ellis (Rubiaceae), plant used in Chinese medicine for treatment of liver diseases. The major constituents present in this plant are iridoids glycosides (geniposide, gardenoside and genipin), which are responsible for this activity (Chen et al., 2016).

Phenylethanoid glycosides are also recognized as a class of secondary metabolites with hepatoprotective activity (Shen et al., 2015; Shao et al., 2017) and this protection was likely due to antioxidative activity and down-regulation of NF- κ B.

In our study it was verified that the methanolic extracts were more active than the isolated product. This effect may possibly be related to the synergism between the phenylethanoids glycosides present in both extracts and the iridoid brasoside.

3.4 Antichemotactic activity

The antichemotactic activity assay evaluated the anti-inflammatory potential of the methanolic extracts of *V. montevidensis* and *V. litoralis* and the iridoid brasoside, by inhibition the leukocyte migration. (the experiment with the extract of *V. litoralis* is being repeated). The results, shown in **Fig. 3**, are expressed as percentage of neutrophil migration relative to the negative control. The methanolic extract was tested at concentrations of 5 and 10 $\mu\text{g/mL}$ and brasoside was tested at concentrations 0.1, 1 and

5 µg/mL. The positive control, indomethacin, inhibited 60.9% of migration at concentration of 10 µg/mL. All samples in the different concentrations inhibited significantly leukocyte migration ($P < 0.05$) when compared to the negative control. In relation to the positive control, the samples of brasoside at 1 µg/mL did not present a significant difference. The results that presented significant difference demonstrated inhibition of leukocyte migration of 27.5 and 58.1% (5 and 10 µg/mL) and 41.6 and 100% (0.1 and 5 µg/mL) for *V. montevidensis* and brasoside, respectively.

Iridoids are a class of secondary metabolites with recognized anti-inflammatory action. These compounds have action by several mechanisms. Asperuloside, for example, inhibits proinflammatory mediators by suppressing nuclear translocation of nuclear kappa-B factor (NF-kB) and phosphorylation of MAPK (Qiu et al., 2016)

An *in vivo* model widely used to evaluate inflammation in the acute phase is the carrageenan-induced peritonitis model, which allows quantification and correlation of cell migration and inflammatory exudate (Sherwood and Toliver-Kinsky, 2004). For this method, iridoids such as ipolamiide (Penido et al., 2006) and lamiide (Delaporte et al., 2002) showed anti-inflammatory activity.

In this context, the antichemotaxic action exhibited by the methanolic extract of *V. montevidensis* can be attributed to the presence of the iridoid glycoside brasoside, presenting anti-inflammatory activity in the acute phase of inflammation. The effect can be also attributed to the phenylethanoid glycosides which have shown relevant anti-inflammatory activity (Jiménez and Riguera, 1994; Schapoval et al., 1994; Gyurkovska et al., 2011).*

4. Conclusions

Verbena litoralis and *V. montevidensis*, used to treat liver diseases have been investigated and the conclusion is that the plants are hepatoprotective and the effect can

be related to the anti-inflammatory activity. The purported effect of the plants can be attributed to the iridoid and phenylethanoid glycosides present in both of them.

Acknowledgments

This work was supported by financial contributions of Brazilian agencies FAPERGS, CAPES and CNPq.

References

Arbo, M.D., Silva, R., Barbosa, D.J., da Silva, D.D., Rossato, L.G., Bastos, M.L., Carmo, H., 2014. Piperazine designer drugs induce toxicity in cardiomyoblast h9c2 cells through mitochondrial impairment. *Toxicol Lett* 229, 178-189.

Bak, M J., Truong, V-L., Ko, S-Y., Nguyen, X.N.G, Ingkasupart, P., Jun, M., Shin, J.Y., Jeong, W-S., 2016. Antioxidant and hepatoprotective effects of procyanidins from wild grape (*Vitis amurensis*) seeds in ethanol-induced cells and rats. *Int J Mol Sci* 17, 758.

Barros, F.M.C., Pereira, K.N., Zaneti, G.D., Heinzmann, B.M., 2007. Plantas de uso medicinal no município de São Luiz Gonzaga. *Lat Am J Pharm* 26, 652-662.

Borges, A.M., 2010. Plantas medicinais no cuidado em saúde de moradores da Ilha dos Marinheiros: contribuições à enfermagem. M. Sc. thesis, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, pp.129.

Castro, O., Umanã, E., 1990. Potencial biológico y químico de *verbena littoralis*, uma planta medicinal usada en Costa Rica como agente antidiarreico. *Quim nova* 13, 310-311.

Chen, P.; Chen, Y.; Wang, Y.; Cai, S.; Deng, L.; Liu, J.; Zhang, H. 2016. Comparative evaluation of hepatoprotective activities of geniposide, crocins and crocetin by CCl₄-induced liver injury in mice. *Biomol Ther* 24, 156-162.

Delaporte, R.H., Sánchez, G.M., Cuellar, A.C.; Giuliani, A., Mello, J.C.P., 2002. Anti-inflammatory activity and lipid peroxidation inhibition of iridoid lamiide isolated from *Bouchea fluminensis* (Vell.) Mold. (Verbenaceae). *J Ethnopharmacol* 82, 127-130

Dias-da-Silva, D., Arbo, M.D., Valente, M.J., Bastos, M.L., Carmo, H., 2015. Hepatotoxicity of piperazine designer drugs: comparison of different in vitro models. *Toxicol in Vitro* 29, 987–996.

Ekstrand, B., Young, J.F., Rasmussen, M.K., 2017. Taste receptors in the gut – A new target for health promoting properties in diet. *Food Res Int* 100, 1–8.

- Garlet, T.M.B., 2000. Levantamento das plantas medicinais utilizadas no município de Cruz Alta, RS, Brasil. M. Sc. Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, pp.211.
- Gilca, M., Dragos, D., 2017. Extraoral Taste Receptor Discovery: New Light on Ayurvedic Pharmacology. *Evid Based Complement Alternat Med* 2017, 1-30.
- Gyurkovska, V., Alipieva, K., Maciuk, A., Dimitrova, P., Ivanovska, N., Haas, C., Bley, T., Georgiev, M., 2011. Anti-inflammatory activity of Devil's claw *in vitro* systems and their active constituents. *Food Chem* 125, 171-178.
- He, j., Hu, X.P., Zeng, Y., Li, Y., Wu, H.Q., Qiu, R.Z., Ma, W.J., Li, T., Li, C.Y., He, Z.D., 2011. Advanced research on acteoside for chemistry and bioactivities. *J Asian Nat Prod Res* 13, 449-464.
- Imakura, Y., Kobayashi, S., Mima, A., 1985. Bitter phenyl propanoid glycosides from *Campsis chinensis*. *Phytochemistry* 24, 139-146.
- Jensen, S.R., 1992. Systematic Implications of the Distribution of Iridoids and Other Chemical Compounds in the Loganiaceae and Other Families of the Asteridae. *Ann Mo Bot Gard* 79, 284-302.
- Jiménez, C., Riguera R, 1994. Phenylethanoid glycosides in plants: structure and biological activity. *Nat Prod Rep* 11, 591-606.
- Kubo, R.R., 1997. Levantamento das plantas de uso medicinal em Coronel Bicaco, RS. M.Sc. thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, pp.163.
- Liang, H., Zhang, L., Wang, H., Tang, J., Yang, J., Wu, C., Chen, S., 2015. Inhibitory effect of gardenoside on free fatty acid-induced steatosis in HepG2 hepatocytes. *Int J Mol Sci* 16, 27749-27756.
- Lu, P., Zhang, C.H., Lifshitz, L.M., ZhuGe, R., 2017. Extraoral bitter taste receptors in health and disease. *J Gen Physiol* 149, 181-197.
- Merétika, A.H.C., Peroni, N., Hanazaki, N., 2010. Local knowledge of medicinal plants in three artisanal fishing communities (Itapoá, Southern Brazil), according to gender, age, and urbanization. *Acta Bot Brasilica* 24, 386-394.
- Nonaka, G., Nishioka, I., 1977. Bitter phenylpropanoid glycosides from *Conandron ramoidioides*. *Phytochemistry* 16, 1265-1267.
- Penido, C.; Costa, K.A., Futuro, D.O., Paiva, S.R., Kaplan, M.A.C., Figueiredo, M.R., Henriques, M.G.M.O., 2006. Anti-inflammatory and anti-ulcerogenic properties of *Stachytarpheta cayennensis* (L.C Rich) Vahl. *J Ethnopharmacol* 104, p. 225-233.
- Qiu, J., Chi, G., Wu, Q., Ren, Y., Chen, C., Feng, H., 2016. Pretreatment with the compound asperuloside decreases acute lung injury via inhibiting MAPK and NF-κB signaling in a murine model. *Int Immunopharmacol* 31, 109-115.
- Rimpler, H. & Franke, A. 1987. Verbraside, an iridoid glucoside from *Verbena brasiliensis*. *Phytochemistry*, v. 26, n. 11, p. 3015-3020.

Ritter, M.R; Sobierajski, E.R; Schenkel, E.P; Mentz, L.A. 2002. Plantas usadas como medicinais no município de Ipê, RS, Brasil. Rev Bras Farmacogn 12, 51-62.

SANTOS, A.C.B., NUNES, T.S., COUTINHO, T.S., SILVA, M.A.P., 2015. Popular use of medicinal species of the Verbenaceae family in Brazil. Rev Bras Plantas Med 17, 980-991.

Schapoval, E.E.S., de Vargas, M.R.W., Chaves, C.g., Bridi, R., Zuanazzi, J.A., Henriques, A.T., 1994. Antiinflammatory and antinociceptive activities of extracts and isolated compounds from *Stachytarpheta cayennensis*. J Ethnopharmacol 60, 53-59.

Sebold, D.F., 2003. Levantamento etnobotânico de plantas de uso medicinal no município de Campo Bom, Rio Grande do Sul, Brasil. M. Sc. thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, pp.107.

Shao, S.Y., Feng, Z.M., Yang, Y.N., Jiang, J.S., Zhang, P.C., 2017. Eight new phenylethanoid glycoside derivatives possessing potential hepatoprotective activities from the fruits of *Forsythia suspense*. Fitoterapia 122, 132-137.

Shen, T., Li, X., Hu, W., Zhang, L., Xu, X., Wu, H., Ji, L., 2015. Hepatoprotective effect of phenylethanoid glycosides from *Incarvillea compacta* against CCl₄-induced cytotoxicity in HepG2 cells. J Korean Soc Appl Biol Chem 58, 617-625.

Sherwood, E.R., Toliver-Kinsky, T., 2004. Mechanisms of the inflammatory response. Best Pract Res Clin Anaesthesiol 18, 385-405.

Suyenaga, E.S., Konrath, E.L., Dresch, R.R., Apel, M.A., Zuanazzi, J.A., Chaves, C.G., Henriques, A.T., 2001. Appraisal of the antichemotactic activity of flavonoids on polymorphonuclear neutrophils. Planta Med 77, 698-704.

Taskova, R.M., Gotfredsen, C.H., Jensen, S.R., 2005. Chemotaxonomic markers in *Digitalideae* (Plantaginaceae). Phytochemistry 66, 1440-1447.

Vendruscolo, G.S., 2004. Estudo etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais por moradores do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. M. Sc. thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, pp. 277.

Wong, I.Y.F., He, Z.D., Huang, Y., Chen, Z.Y., 2001. Antioxidative Activities of Phenylethanoid Glycosides from *Ligustrum purpurascens*. J Agric Food Chem 49, 3113-3119.

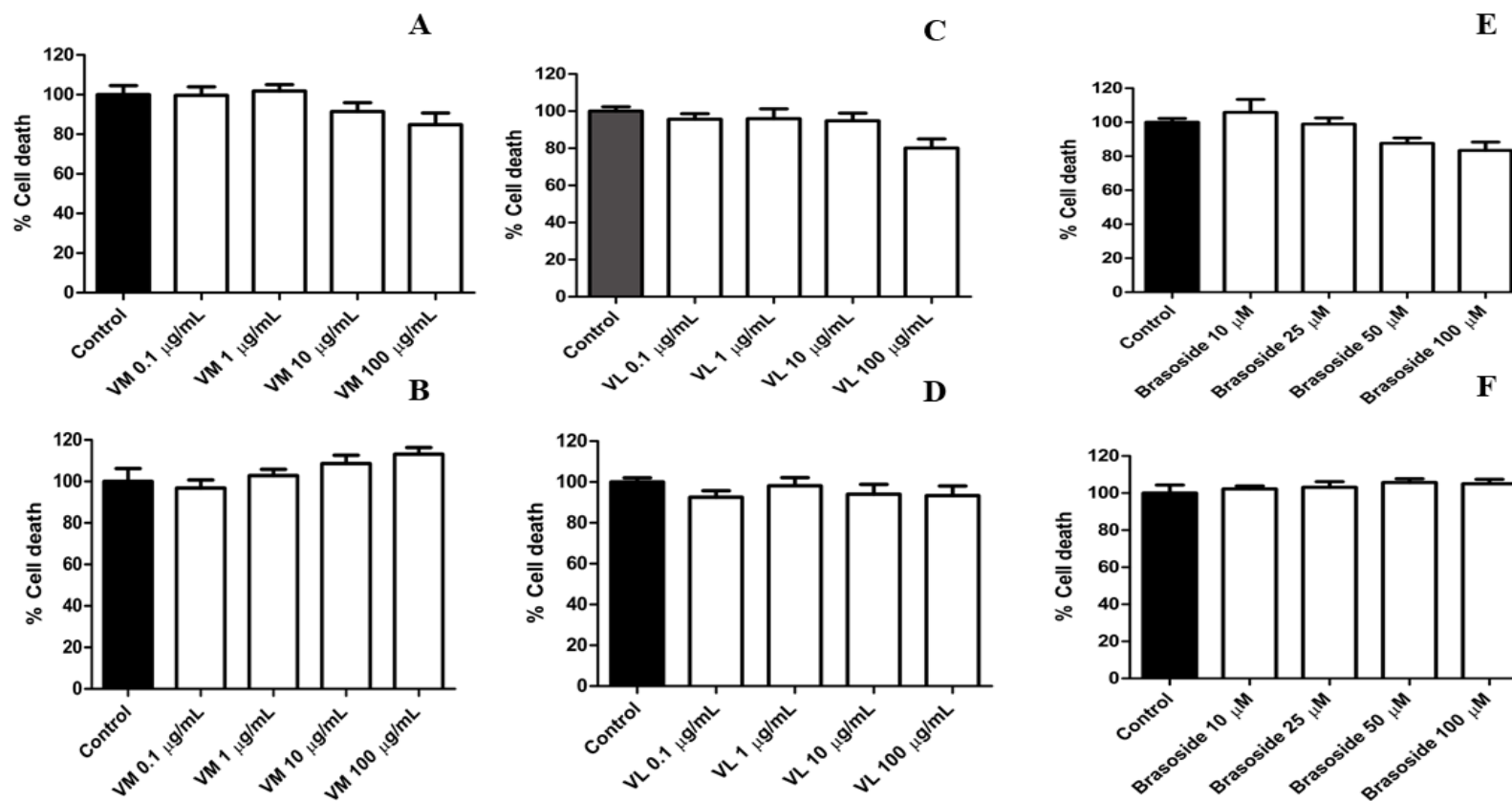


Fig 1. Cytotoxicity of methanolic extract of *V. montevidensis* (A and B), *V. litoralis* (C and D) and brasoside (E and F) by MTT assay (A, C, E) and NR (B, D, F), respectively. Statistical analysis by ANOVA ($p > 0.05$).

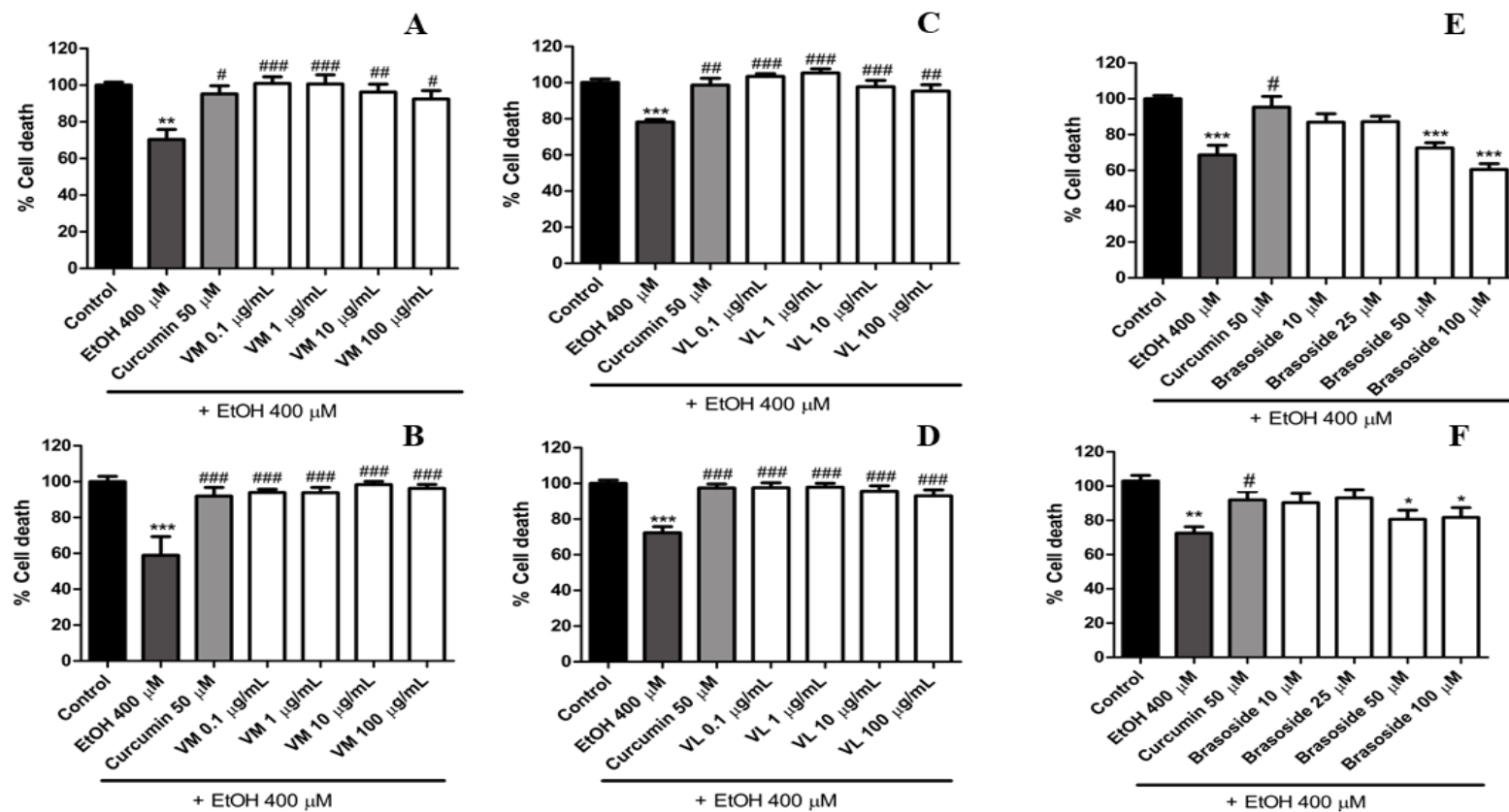


Fig 2. Hepatoprotective activity of *V. montevidensis* (A and B), *V. litoralis* (C and D) and brasoside (E and F) by MTT assay (A, C, E) and NR (B, D, F), respectively. Statistical analysis by ANOVA / Bonferroni. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared to control. # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ compared to 400 μ M ethanol.

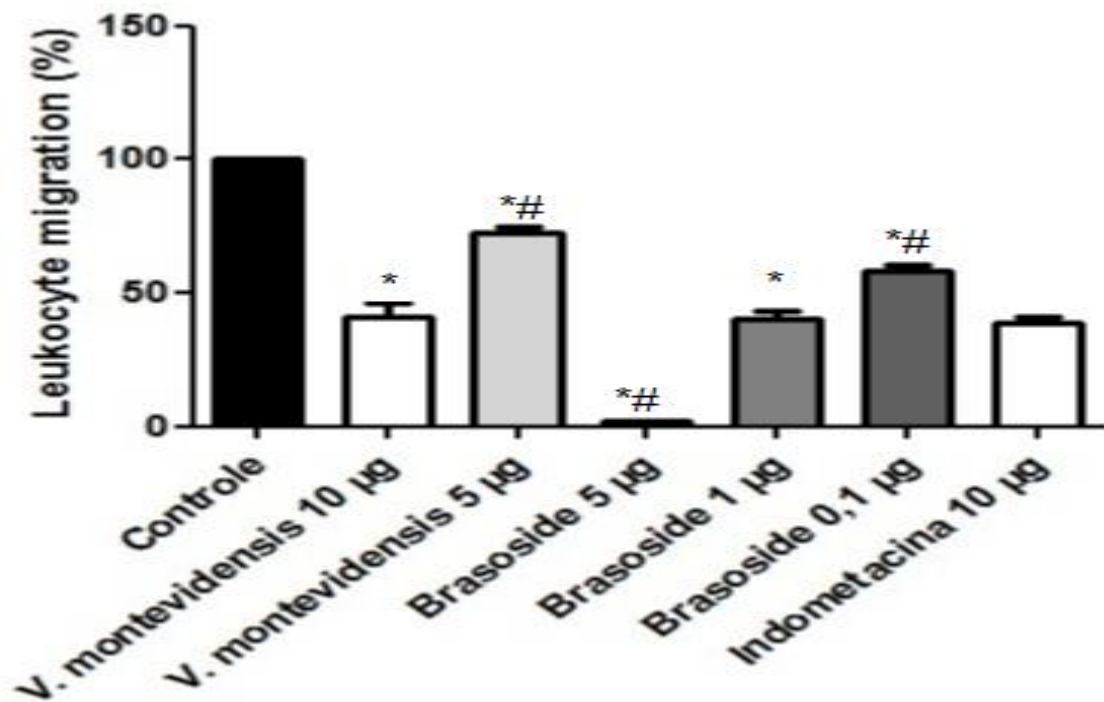


Fig 3. *In vitro* effect of *V. montevidensis*, brasoside and indomethacin in the neutrophil migration compared to negative control. *,#p <0.05 indicate significant difference compared to the negative control and indomethacin, respectively (ANOVA followed by Tukey's test).

Material suplementar relativo ao Manuscrito II

Supplementary material

Fig. S1 Screening (HPLC) *Verbena montevidenses* 230 nm.

Fig. S2 Screening (HPLC) *Verbena litoralis* 230 nm.

Fig. S3 Screening (HPLC) verbascoside 230 nm.

Fig. S4 ^1H NMR spectrum of brasoside (D_2O , 400 MHz).

Fig. S5 ^{13}C NMR spectrum of brasoside (D_2O , 100 MHz).

Fig. S6 APT spectrum of brasoside (D_2O , 100 MHz).

Fig. S7 HSQC spectrum of brasoside, in D_2O .

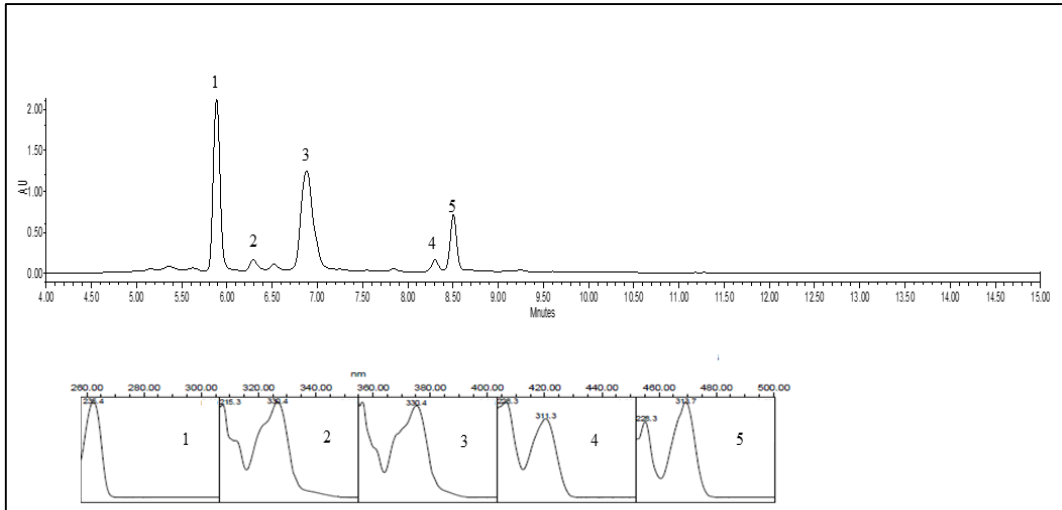


Fig. S1 Screening (HPLC) *Verbena montevidenses* 230 nm.

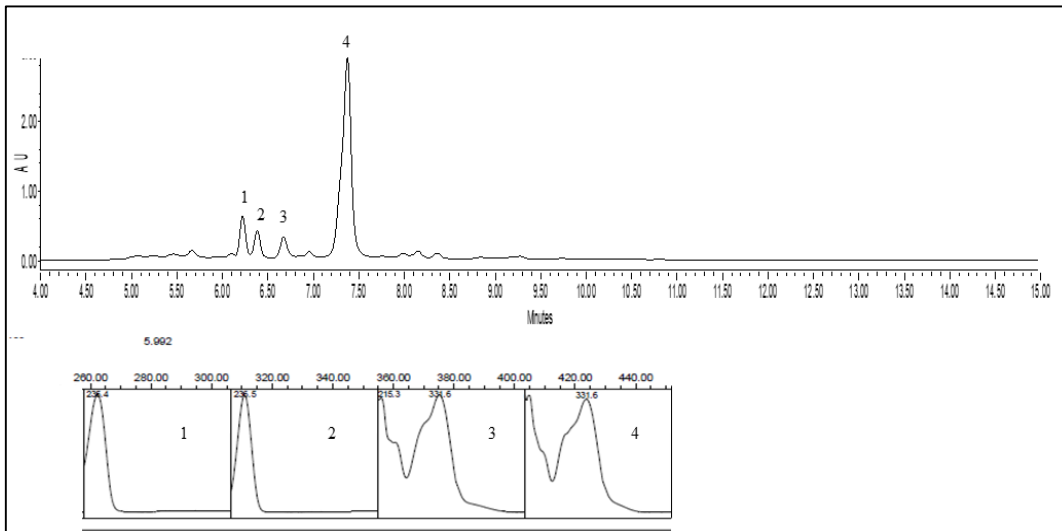


Fig. S2 Screening (HPLC) *Verbena litoralis* 230 nm.

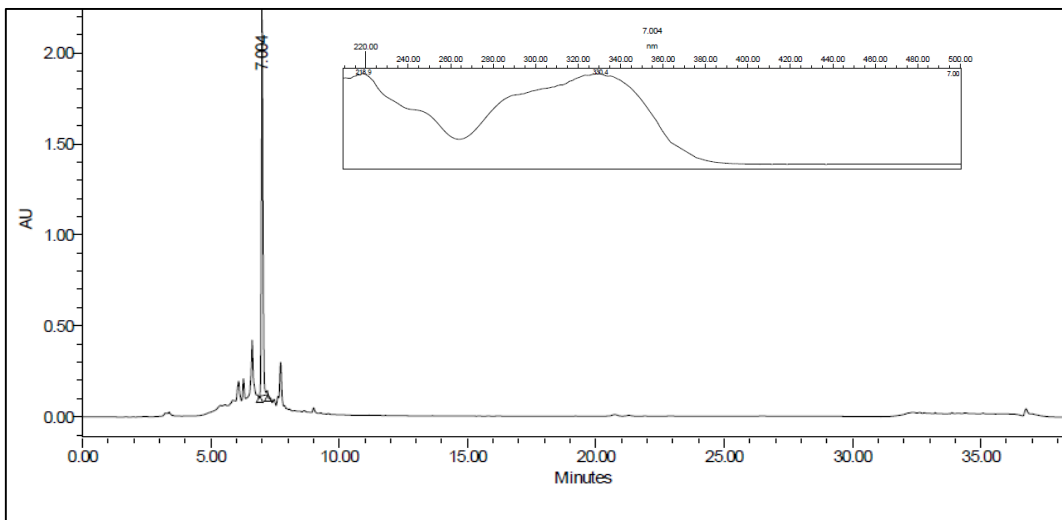


Fig. S2 Screening (HPLC) verbascoside 230 nm

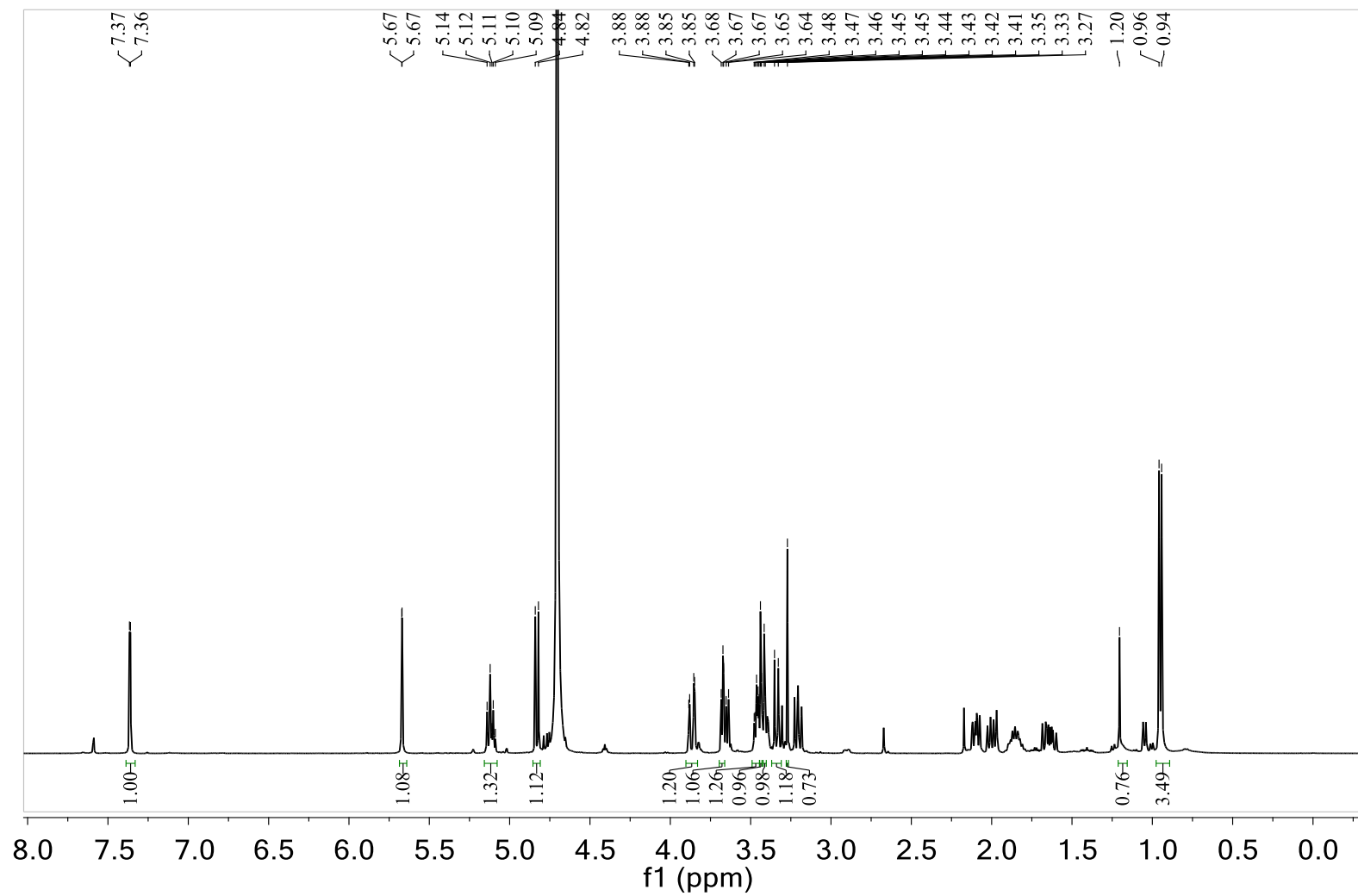


Fig. S4 ^1H NMR spectrum of brasoside (D_2O , 400 MHz).

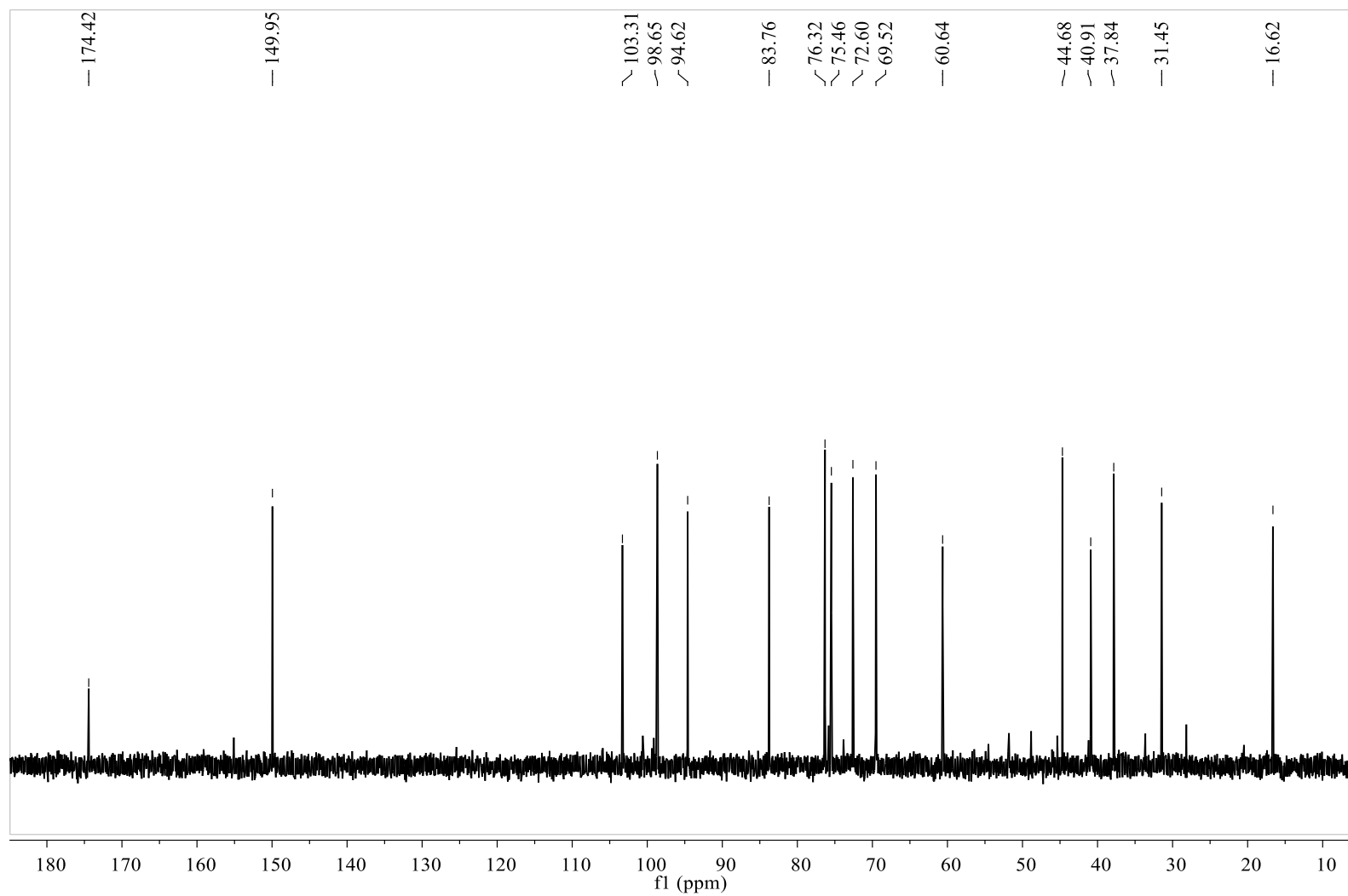


Fig. S5 ^{13}C NMR spectrum of brasoside (D_2O , 100 MHz).

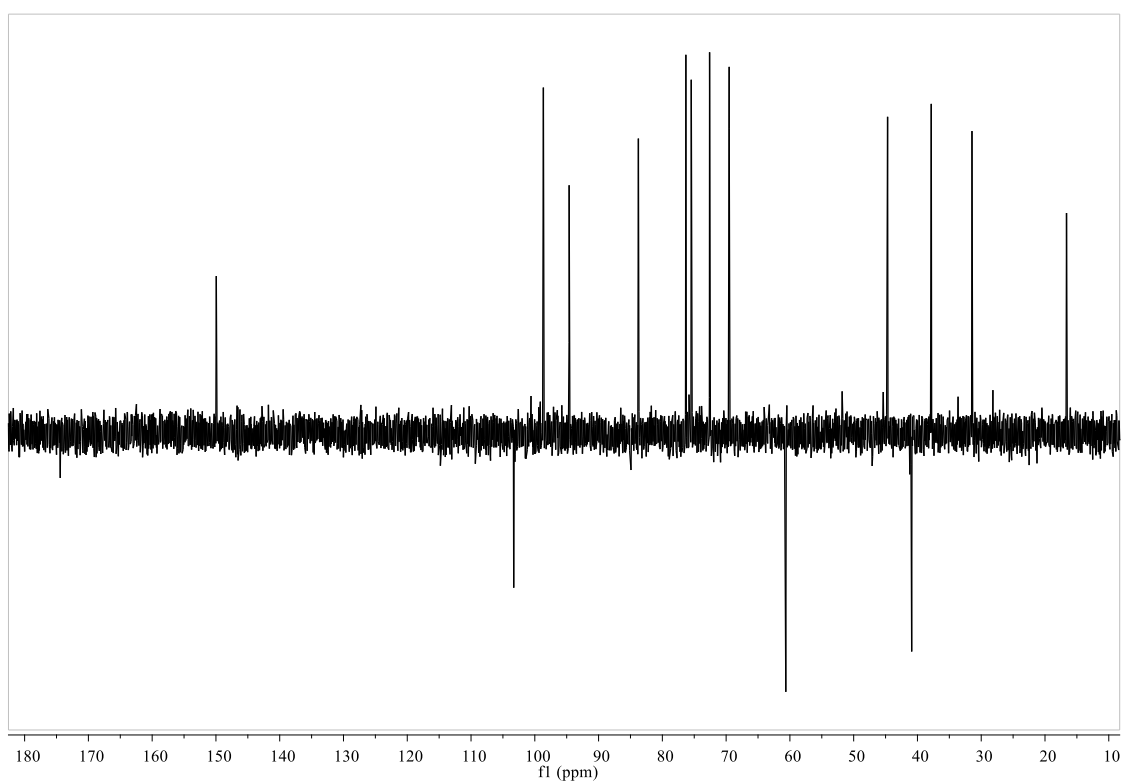


Fig. S6 APT spectrum of brasoside (D_2O , 100 MHz).

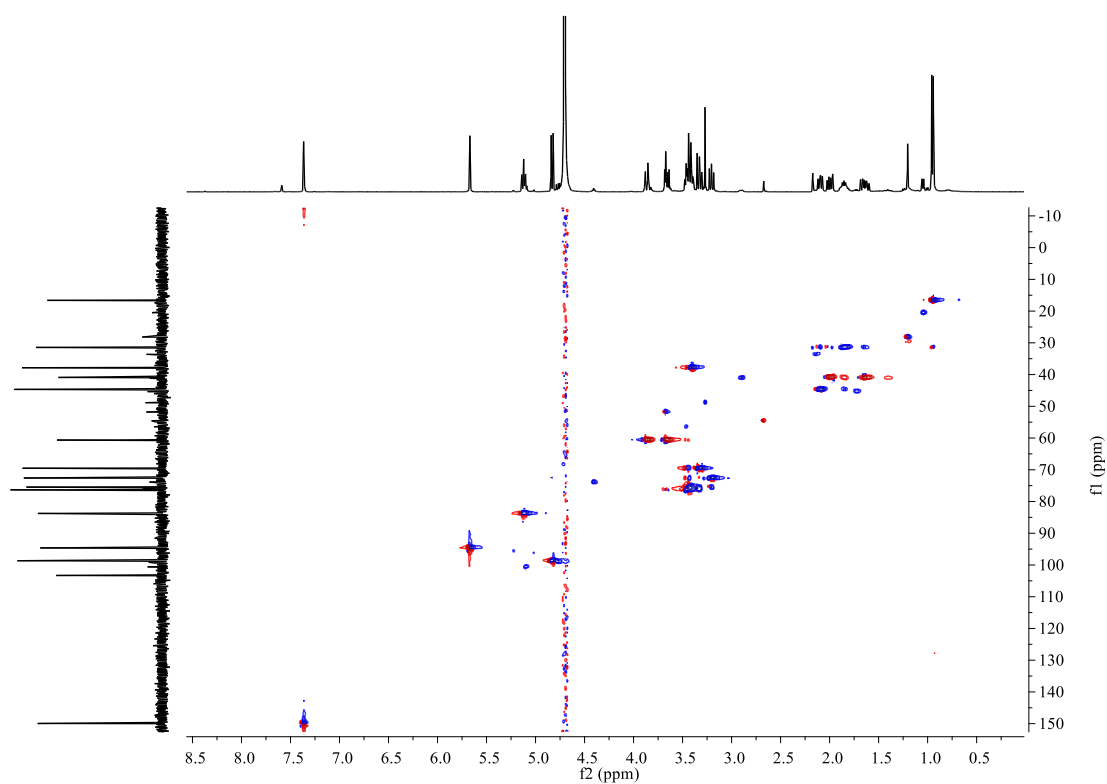
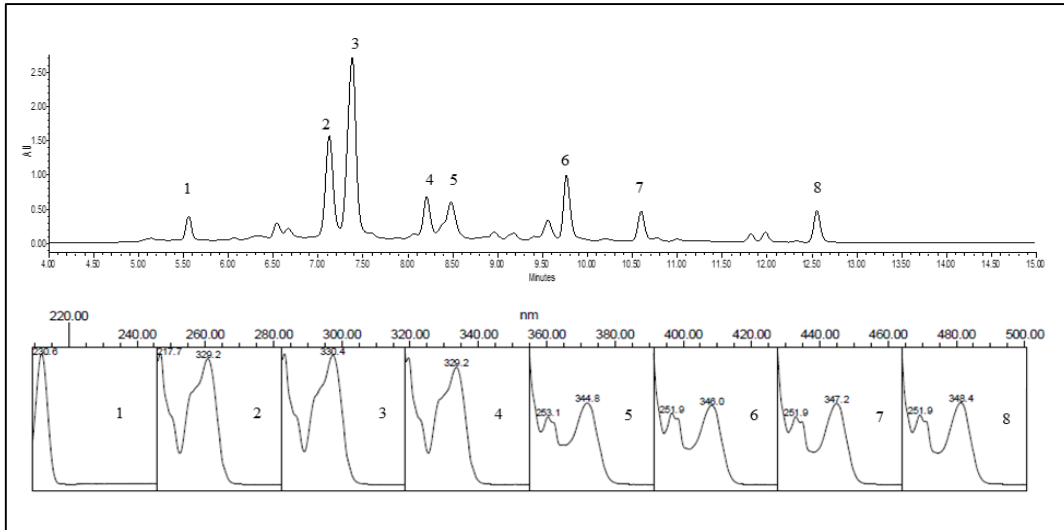
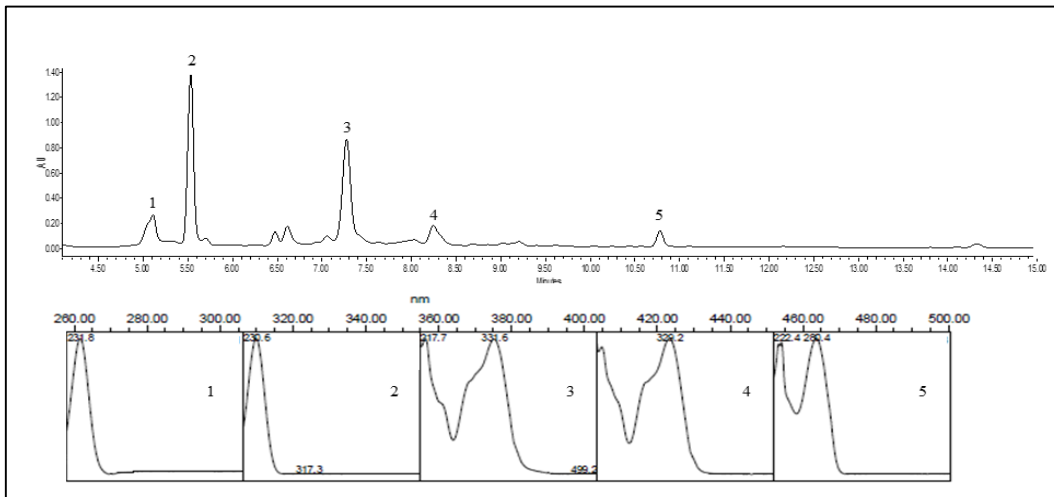


Fig. S7 HSQC spectrum of brasoside, in D_2O

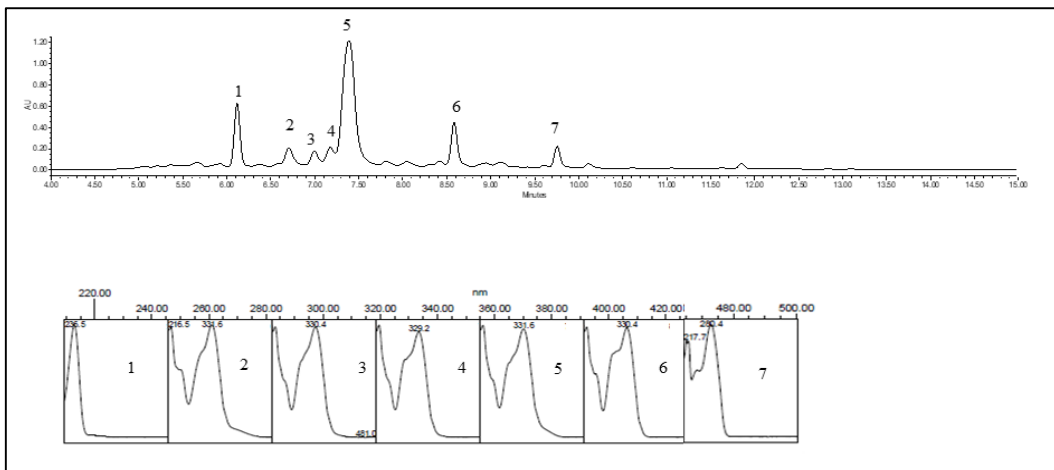
Dados adicionais



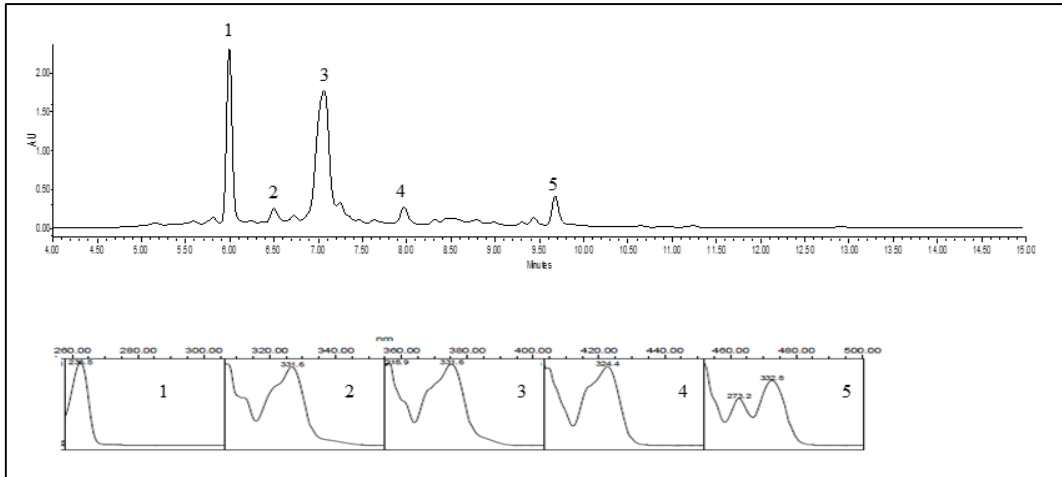
Screening em CLAE (230 nm) das partes aéreas de *G. seloi*.



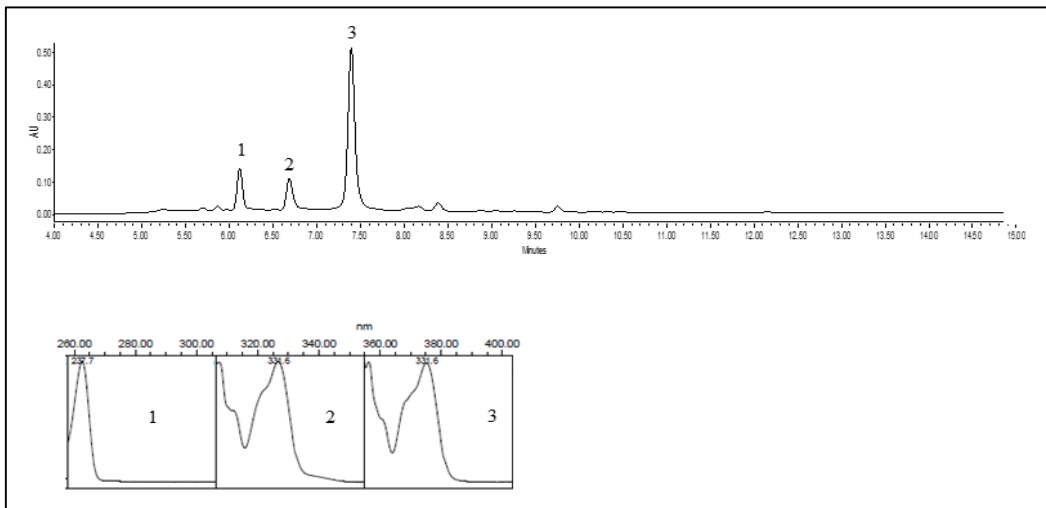
Screening em CLAE (230 nm) das raízes de *G. seloi*.



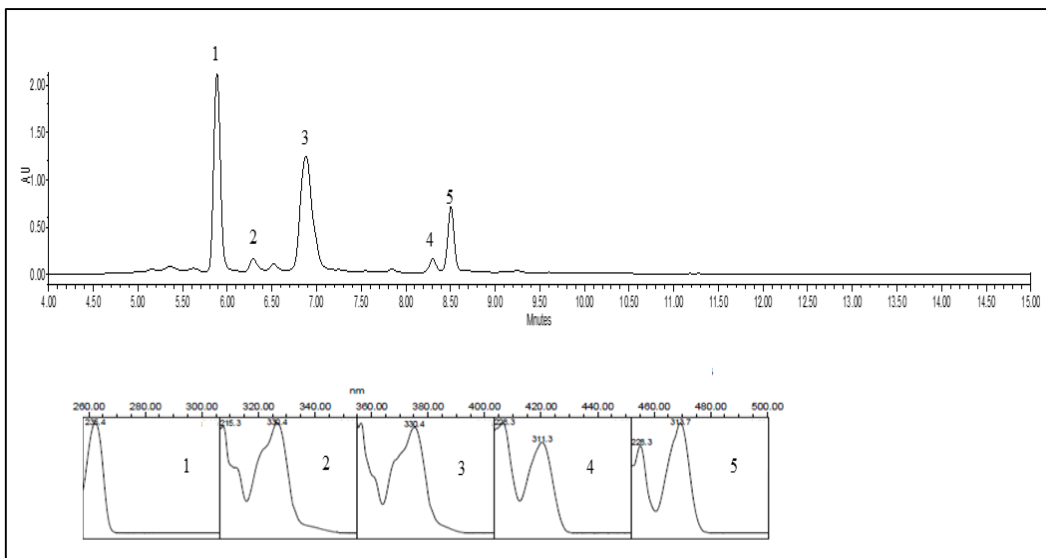
Screening em CLAE (230 nm) das partes aéreas de *G. lobata*.



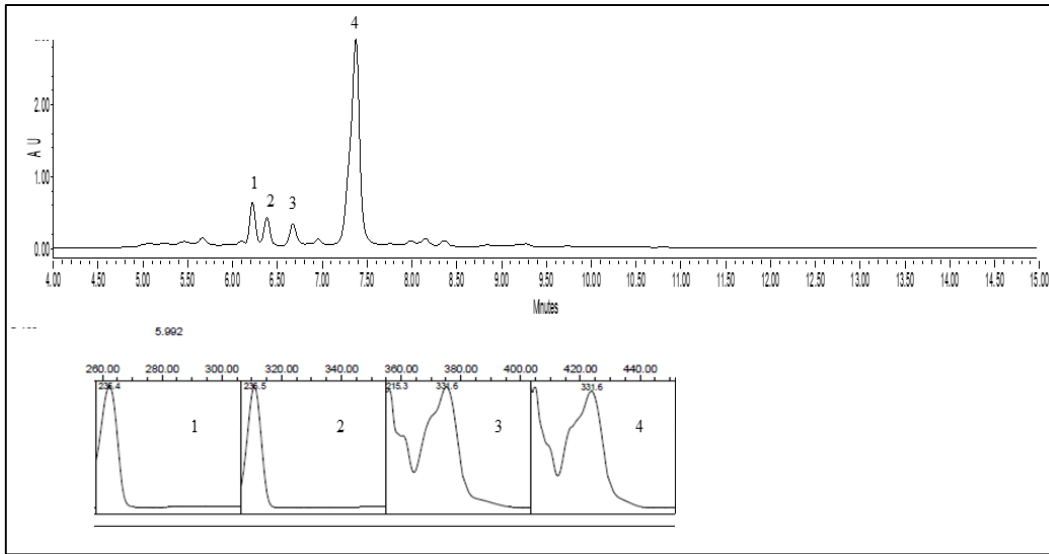
Screening em CLAE (230 nm) das partes aéreas de *V. hirta*



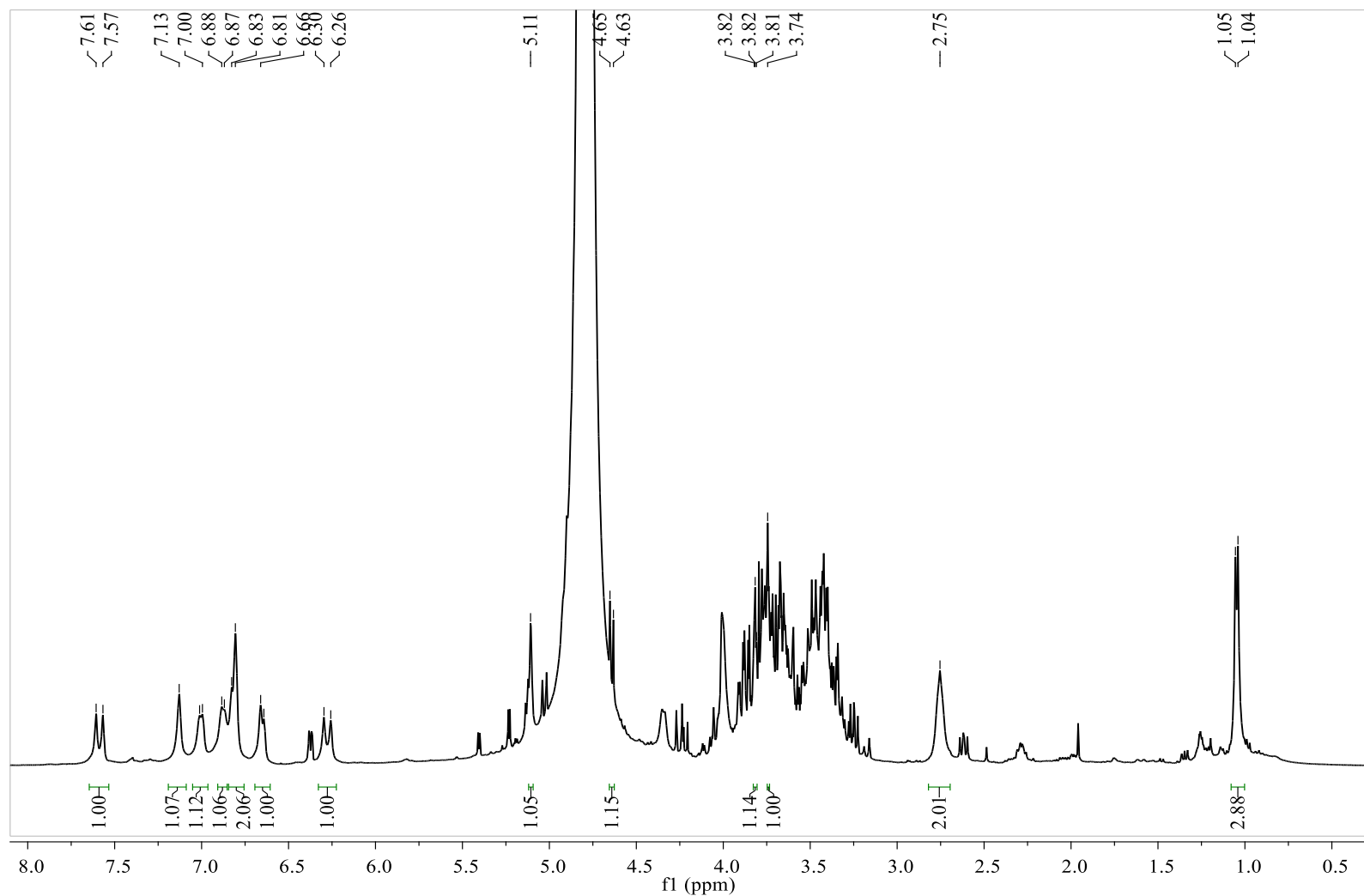
Screening em CLAE (230 nm) das partes aéreas de *V. bonariensis*.



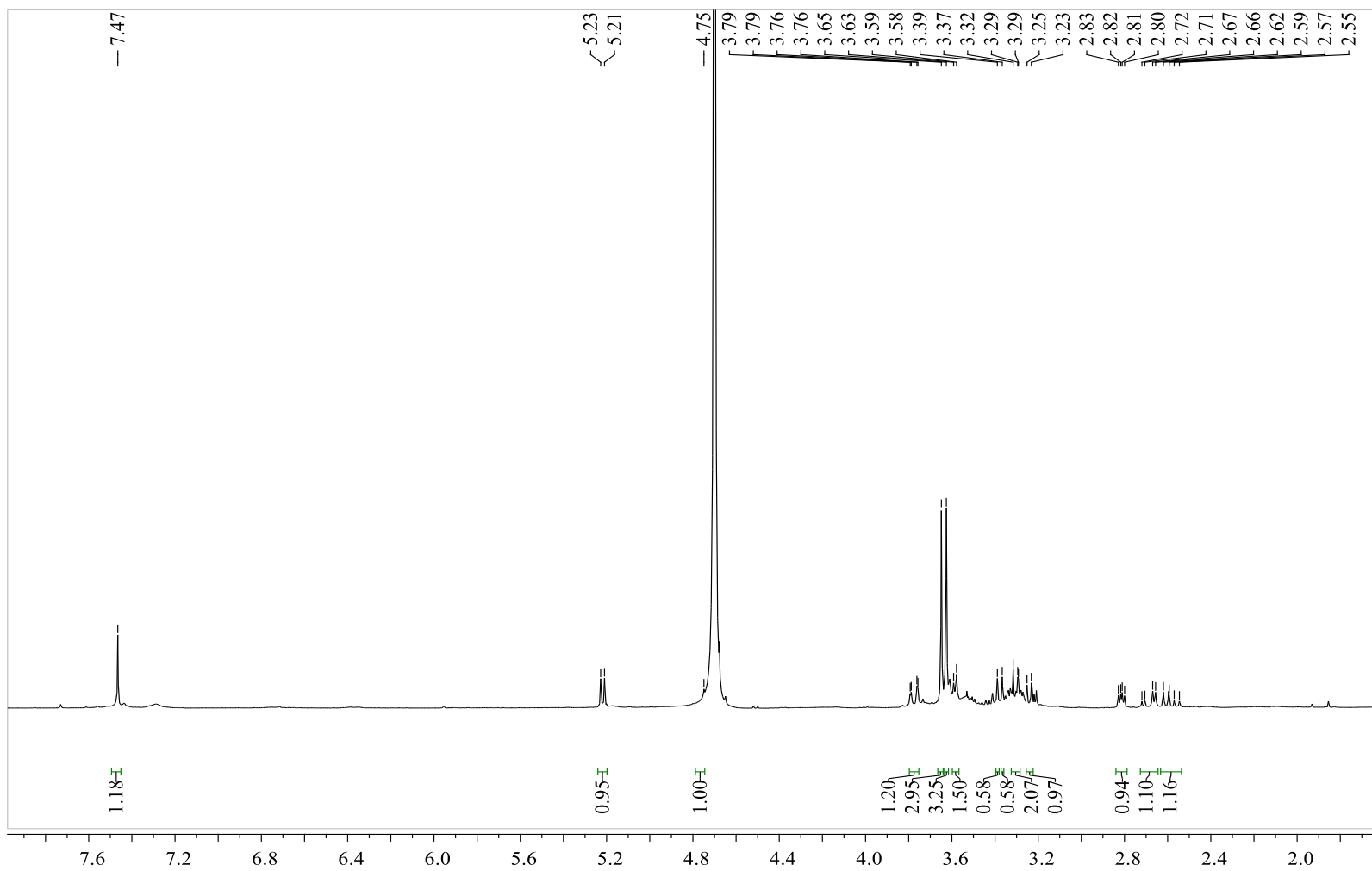
Screening em CLAE (230 nm) das partes aéreas de *V. montevidensis*



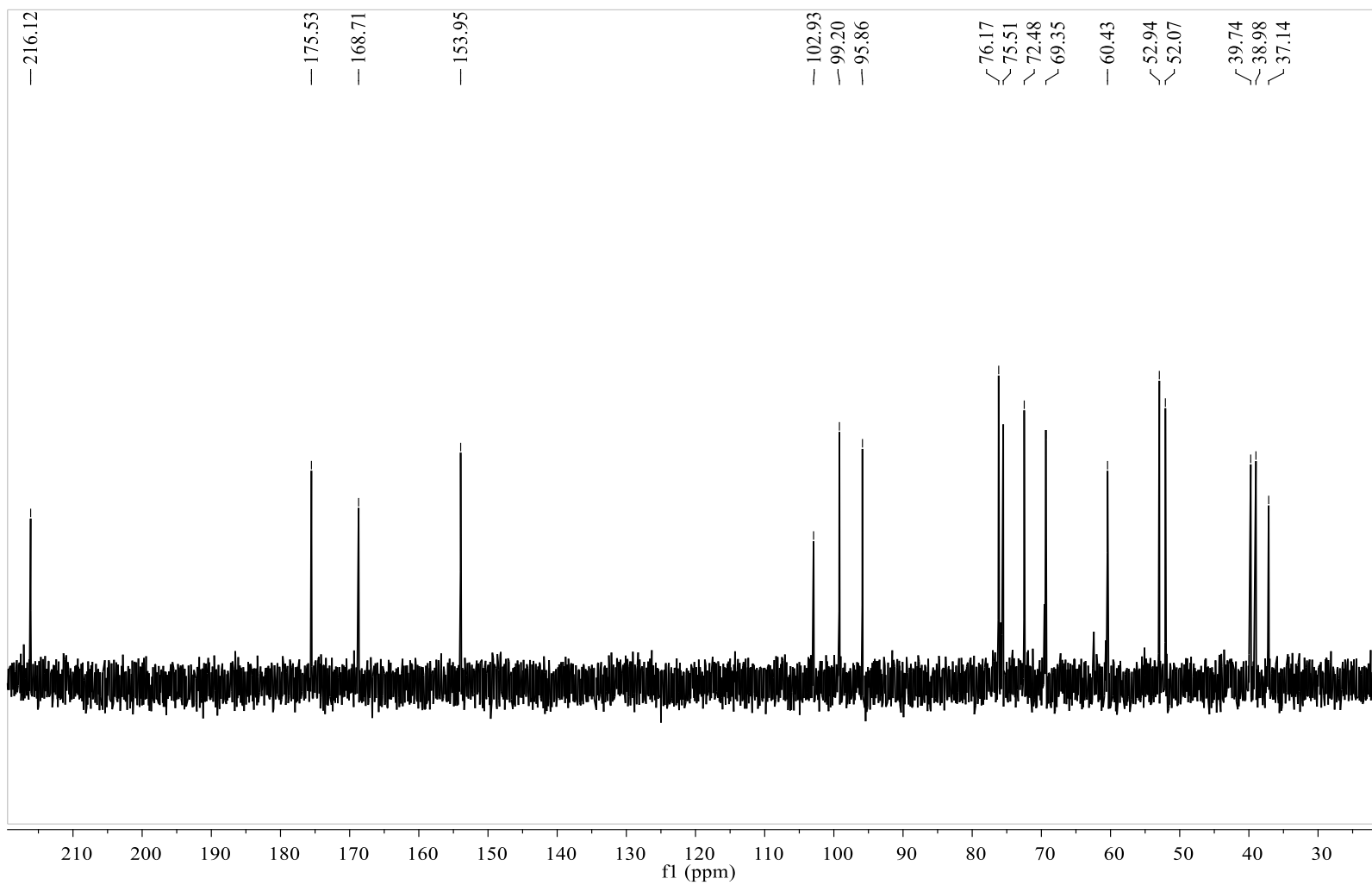
Screening em CLAE (230 nm) das partes aéreas de *V.litoralis*.



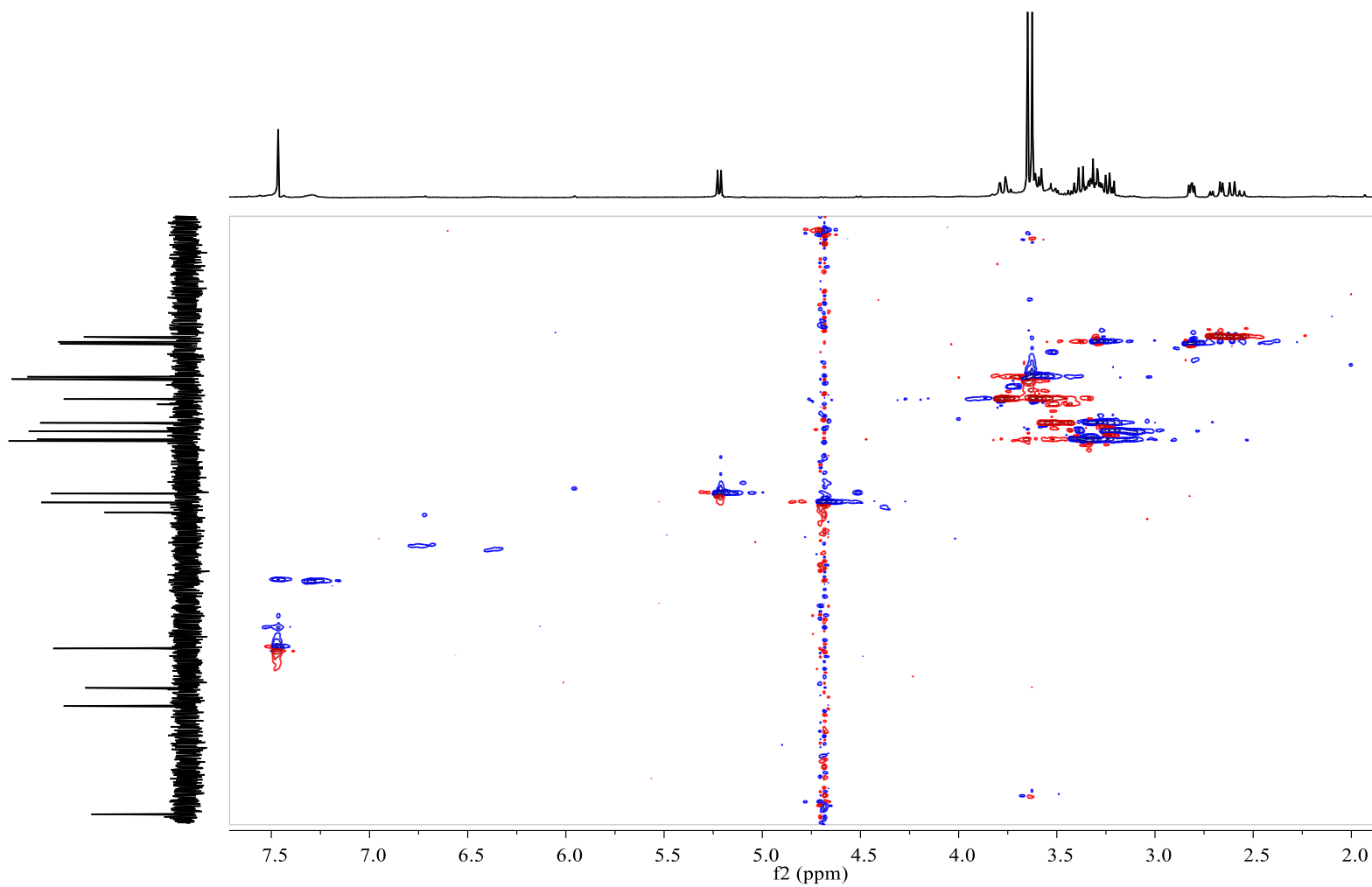
Espectro de RMN ^1H (400 MHz) do verbascosídeo (D_2O).



Espectro de RMN ^1H (400 MHz) do griselinosídeo (D_2O).



Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) do griselinosídeo (D_2O).



Espectro de correlação bidimensional HSQC do griselinosídeo (D₂O).