

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
Doutorado

**PADRONIZAÇÃO DOS EXTRATOS DE *Stachytarpheta caynnensis* (Rich)
Vahl NA PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE FITOTERÁPICOS**
ROBERTA SABRINE DUARTE GONDIM

São Luís
2023

ROBERTA SABRINE DUARTE GONDIM

**PADRONIZAÇÃO DOS EXTRATOS DE *Stachytarpheta caynnensis* (Rich)
Vahl NA PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE FITOTERÁPICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde como requisito para obtenção do título de doutor.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Flavia Maria Mendonça do Amaral

São Luís

2023

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Gondim, Roberta Sabrine Duarte.

PADRONIZAÇÃO DOS EXTRATOS DE *Stachytarpheta caynnensis* Rich Vahl NA PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE FITOTERÁPICOS /
Roberta Sabrine Duarte Gondim. - 2023.

125 p.

Orientador(a): Flavia Maria Mendonça Amaral.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
São Luis, 2023.

1. Gervão. 2. Métodos extrativos. 3. Validação. 4.
Verbenaceae. I. Amaral, Flavia Maria Mendonça. II.
Título.

ROBERTA SABRINE DUARTE GONDIM

**PADRONIZAÇÃO DOS EXTRATOS DE *Stachytarpheta caynnensis* (Rich)
Vahl NA PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE FITOTERÁPICOS**

BANCA EXAMINADORA

Aprovado em: _____/_____/_____

Prof.^a Dr.^a Flavia Maria Mendonça do Amaral (orientadora)
Doutora em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
Universidade Federal do Maranhão

Prof.^a Dr.^a Crisálida Machado Vilanova
Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia
Universidade Federal do Maranhão

Prof.^o Dr. Lucas Martins França
Doutor em Ciências da Saúde
Universidade Federal do Maranhão

Prof.^a Dr.^a Maria do Socorro de Sousa Cartágenes
Doutora em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
Universidade Federal do Maranhão

Prof.^o Dr.^o Guilherme Silva Miranda
Doutor em Parasitologia
Universidade Federal de Minas Gerais

" Pois sabemos que a tribulação produz a paciência, a paciência prova a fidelidade e a fidelidade, comprovada, produz a esperança. E a esperança não engana. ”

(Romanos 5)

*Ao meu Pai **Roberto César Coelho Gondim**,
minha fonte de inspiração. A tua vida me motiva
a percorrer distâncias inimagináveis e dá sentido
as minhas conquistas. Eu te amo.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço sinceramente a todas as pessoas e forças que tornaram esta conquista possível:

Primeiramente, expresso minha profunda gratidão a Deus, pois sem Sua orientação e graça, nada disso seria possível. Sua presença foi fundamental em todos os momentos desta jornada.

Quero também agradecer à poderosa intercessão de Nossa Senhora Aparecida, que me amparou nos momentos de desespero e angústia, proporcionando força e esperança.

À Professora Doutora Flavia Maria Mendonça do Amaral, minha orientadora, quero estender meu mais sincero agradecimento. Sua confiança, apoio e generosidade em compartilhar seu vasto conhecimento foram fundamentais para o sucesso deste trabalho. Além disso, sua dedicação exemplar à profissão serviu como um farol a guiar meu caminho.

Não poderia esquecer de agradecer aos meus pais, Célia Duarte e Roberto César Gondim, que são meus maiores exemplos de amor incondicional. Sem o amor e apoio de vocês, minha jornada teria perdido todo o seu significado. Obrigado por tudo.

Meu querido filho, Paulo César, és minha fonte de motivação. Saiba que farei todo o possível para te ver feliz. Mamãe te ama profundamente.

Aos meus irmãos, Roberto César Gondim e Rodrigo César Gondim, vocês são minha rocha, meu refúgio constante. Nossa ligação é eterna, somos amor para toda a vida, somos cúmplices. Agradeço a Deus por me abençoar com irmãos tão especiais. Não posso deixar de mencionar meu sobrinho, Miguel Gondim, que é uma fonte inesgotável de amor em minha vida.

Expresso minha gratidão a todos os familiares, especialmente às minhas tias Antônia Duarte, Orlene Duarte e Celina Duarte, que sempre demonstraram carinho e afeto, e à minha prima Darlene Duarte, que me ensinou a amar à distância. Meu cunhado Ícaro Cerveira também merece agradecimentos especiais pelo apoio constante.

Ao Dr. Wermerson Assunção, meu sincero agradecimento por seu apoio, zelo, amizade, confiança e valiosas contribuições científicas ao longo desses anos.

Agradeço ao Dr. Ramon Guimarães por seu carinho, apoio e por ser um tio maravilhoso para o Paulo César.

Minha querida amiga e irmã, Isolda Ribeiro, merece meu profundo agradecimento por sua parceria e cumplicidade, que foram essenciais em minha jornada.

Ao Dr. Aécio Braga e à Dra. Mariana Serra, meus amigos e companheiros, agradeço por seu constante apoio, carinho e incentivo. Vocês são uma fonte diária de inspiração.

Diego Aires, sua cumplicidade, carinho e amor são inestimáveis, e por isso, agradeço de coração.

Aos amigos da UEMA, Gabriela Sampaio, Guilherme Miranda, Thiago Vinicius, Ranielly Araújo, Lorrane Cantanhede, Fernanda e Gustavo, minha gratidão por todo o apoio ao longo desta jornada.

Agradeço imensamente à Dra. Jéssyca Wan Lume por seus conselhos, amizade, conversas e ajuda ao longo desses anos.

Aos amigos e colegas de turma e dos laboratórios LaFiBioS e Laboratório de Patogenicidade Microbiana (LAPMIC), que desempenharam um papel fundamental na realização da pesquisa, meu sincero agradecimento.

Agradeço a todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) e também a todos os funcionários que contribuíram para o desenvolvimento das atividades acadêmicas.

Por fim, agradeço à FAPEMA pelo financiamento do projeto e pela bolsa recebida.

Obrigado a todos por fazerem parte desta jornada e por tornarem este momento possível.

RESUMO

Os estudos de validação visam confirmar cientificamente as propriedades terapêuticas atribuídas as espécies vegetais para sua inclusão na cadeia produtiva de fitoterápicos, na perspectiva de oferta de medicamento com qualidade, eficaz e seguro. Nas etapas da validação de espécies vegetais, merece destaque os estudos de padronização, que deve iniciar ainda na fase da pesquisa básica com material vegetal. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi realizar estudo de validação com ênfase a padronização dos extratos das folhas de *Stachytarpheta caynnensis* (Rich.) Vahl, família Verbenaceae, conhecida como gervão, fundamentado em ensaios químicos, físico-químicos e biológicos *in vitro*. Os resultados dessa tese são apresentados em dois capítulos. O capítulo 1 é um artigo de revisão da espécie *Stachytarpheta caynnensis* (Rich.) Vahl, com ênfase aos aspectos de etnobotânica, etnofarmacologia, atividade biológica, composição química e toxicidade; realizada em bases de dados (Biological Abstracts, Chemical Abstracts, Medline, Lilacs, Web of Science, Science Direct, PubMed), sendo evidenciada comprovação de atividade biológica como cicatrizante de feridas, anti-inflamatória, anti-hipertensiva, hipoglicemiante, protetora gástrica, dentre outras; com comprovação de compostos isolados como: verbascosídeo, martinósídeo, ácido betulínico, Nnenoside B; mas com necessidade de continuidade das pesquisas dada a escassez de estudos clínicos. O capítulo 2 compreende estudo de padronização dos extratos de *Stachytarpheta caynnensis*, para definir o melhor procedimento extrativo (maceração assistida por ultrassom, percolação e extração em aparelho de Soxhlet) e relações de hidromódulo (1:6 e 1:8) com folhas de *Stachytarpheta caynnensis*, segundo teor de polifenóis e flavonoides, perfil cromatográfico e atividades antioxidante, antimicrobiana, inibição da produção de biofilme e citotoxicidade. Os melhores resultados foram obtidos com maceração em hidromódulo 1:6 para as avaliações química, antimicrobiana e inibidora de produção de biofilme. Na avaliação antiproliferativa, o extrato com melhor efetividade foi o de soxlet no hidromódulo 1:8, permitindo assim, a padronização dos extrativos da espécie para continuidade dos estudos *in vivo*, dado a relevância dos resultados de eficácia nos modelos empregados.

Palavras-chave: gervão, verbenaceae, métodos extrativos, validação

ABSTRACT

Validation studies aim to scientifically confirm the therapeutic properties attributed to plant species for their inclusion in the production chain of herbal medicines, with the perspective of offering medication of quality, efficacy, and safety. In the stages of validation of plant species, particular emphasis is placed on standardization studies, which should begin even in the basic research phase with plant material. In this sense, the objective of this work was to carry out a validation study with an emphasis on standardization of extracts from the leaves of *Stachytarpheta caynnensis* (Rich.) Vahl, family Verbenaceae, known as "gervão," based on chemical, physicochemical, and in vitro biological assays. The results of this thesis are presented in two chapters. Chapter 1 is a review article of the species *Stachytarpheta caynnensis* (Rich.) Vahl, focusing on ethnobotany, ethnopharmacology, biological activity, chemical composition, and toxicity aspects; conducted on databases (Biological Abstracts, Chemical Abstracts, Medline, Lilacs, Web of Science, Science Direct, PubMed), demonstrating biological activity as wound healer, anti-inflammatory, antihypertensive, hypoglycemic, gastric protector, among others; with isolated compounds such as: verbascoside, martynoside, betulinic acid, Nnenoside B; but with the need for further research due to the scarcity of clinical studies. Chapter 2 comprises a standardization study of extracts from *Stachytarpheta caynnensis*, to define the best extraction procedure (assisted maceration by ultrasound, percolation, and extraction in a Soxhlet apparatus) and hydromodule ratios (1:6 and 1:8) with *Stachytarpheta caynnensis* leaves, according to polyphenol and flavonoid content, chromatographic profile, and antioxidant, antimicrobial, biofilm production inhibition, and cytotoxicity activities. The best results were obtained with maceration in a 1:6 hydromodule for chemical, antimicrobial, and biofilm production inhibition evaluations. In the antiproliferative evaluation, the most effective extract was from the Soxhlet apparatus with a 1:8 hydromodule, thus allowing the standardization of the species' extracts for the continuity of in vivo studies, given the relevance of the efficacy results in the models employed.

Keywords: gervão, verbenaceae, extraction methods, validation

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------------------|--|
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| CFM | Concentração Fungicida Mínima |
| CI ₅₀ | Concentração que inibe 50% da resposta biológica |
| CIM | Concentração Inibitória Mínima |
| CLAE-DAD | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-Detector-Arranjo de Diodo |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DP | Desvio Padrão |
| DPPH [*] | Difenil-picrilhidrazil (1,1-difenil-2 picrilhidrazil) |
| ERO | Espécies Reativas de Oxigênio |
| OMS | Organização mundial de Saúde |
| PBS | Solução Tamponada de Fosfato |
| P&D&I | Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação |
| PNPIC | Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares |
| PPPM | Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais |
| RENAFITO | Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos |
| RMN de ¹ H | Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio |
| SUS | Sistema Único de Saúde |
| UFMA | Universidade Federal do Maranhão |

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

- Figura 1.** Planta medicinal e suas substâncias responsáveis pelo efeito medicinal..... 19
- Figura 2.** Visão geral de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl, destacando a inflorescência..... 22
- Figura 3.** Fluxograma das etapas da pesquisa para descoberta e desenvolvimento de medicamentos a partir de espécies vegetais 25

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Linha do tempo da ocorrência dos estudos inventariados na pesquisa bibliográfica nos anos de 1968 a 2022..... 43
- Tabela 1.** Uso terapêutico popular da *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. com indicação do farmacógeno, modo de preparação e referência do estudo etnofarmacológico 45
- Tabela 2.** Composição química de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. 52
- Tabela 3.** Estudos farmacológicos de diferentes partes de *S.cayennensis* determinadas por diferentes ensaios..... 60

CAPÍTULO 2

- Tabela 1.** Rendimento (%), polifenóis totais (mgGA)/g, flavonoides (mgQE)/g e atividade antioxidante por DDPH (CE₅₀) nos extratos hidroetanólicos das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. obtidos por planejamento fatorial. 78
- Figura 1.** Cromatogramas obtidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massa com Ionização por *Electrospray* (LC-ESI-IT-MS), no comprimento de onda (λ) de 270 nm, dos extratos hidroetanólicos das folhas de *Stachytarpheta cayennensis*

| | |
|--|----|
| (Rich.) Vahl. obtidos em aparelho de Soxhlet no hidromódulo 1:8 (S 1:8) (A) e por maceração em ultrassom no hidromódulo 1:8 (MU 1:8) (B)..... | 82 |
| Tabela 2. Compostos identificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massa com Ionização por <i>Electrospray</i> (LC-ESI-IT-MS) nos extratos hidroetanólicos das folhas de <i>Stachytarpheta cayennensis</i> (Rich.) Vahl. obtidos por maceração em ultrassom no hidromódulo 1:8 (MU 1:8) e em aparelho de Soxhlet no hidromódulo 1:8 (S 1:8)..... | 83 |
| Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) frente <i>Escherichia coli</i> não patogênica (HB101), <i>Escherichia coli</i> patogênica (042) e <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538) dos extratos hidroetanólicos das folhas de <i>Stachytarpheta cayennensis</i> (Rich.) Vahl. obtidos por planejamento fatorial | 85 |
| Figura 2. Efeitos dos extratos hidroetanólicos das folhas de <i>Stachytarpheta cayennensis</i> (Rich.) Vahl., obtidos por planejamento fatorial sobre a produção de biofilme de <i>Escherichia coli</i> 042 e <i>Staphylococcus aureus</i> | 85 |
| Figura 3. Atividade antiproliferativa dos extratos hidroalcoólicos das folhas de <i>Stachytarpheta cayennensis</i> (Rich.) Vahl., obtidos por planejamento fatorial em células de carcinoma de mama MCF-7. | 90 |
| Figura 4. Atividade antiproliferativa dos extratos hidroalcoólicos das folhas de <i>Stachytarpheta cayennensis</i> (Rich.) Vahl., obtidos por planejamento fatorial em células de adenocarcinoma colorretal Caco-2. | 91 |
| Figura 5. Atividade antiproliferativa dos extratos hidroalcoólicos das folhas de <i>Stachytarpheta cayennensis</i> (Rich.) Vahl., obtidos por planejamento fatorial em células de Melanoma Maligno A-375..... | 92 |
| Figura 6. Atividade antiproliferativa dos extratos hidroalcoólicos das folhas de <i>Stachytarpheta cayennensis</i> (Rich.) Vahl., obtidos por planejamento fatorial em células de Carcinoma Hepatocelular Hep G2 | 93 |

SUMÁRIO

| | |
|--|------------|
| 1. INTRODUÇÃO | 155 |
| 2. REFERENCIAL TEÓRICO..... | 177 |
| 2.1 Uso de plantas como recurso terapêutico | 177 |
| 2.2 Os estudos de validação de espécies vegetais com ênfase a padronização dos extrativo..... | 24 |
| 2.2.1 A padronização dos extratos vegetais | 28 |
| 2.2.1.1 Variáveis da extração..... | 30 |
| a) Granulometria..... | 30 |
| b) Solvente..... | 30 |
| c) Processos extrativos | 33 |
| d) Temperatura | 34 |
| e) Tempo de extração | 36 |
| f) Secagem | 37 |
| 3. OBJETIVOS | 39 |
| 3.1 Objetivo geral..... | 39 |
| 3.2 Objetivos específicos..... | 39 |
| 5. RESULTADOS | 40 |
| 5.1 Capítulo 1 | 40 |
| 5.2 Capítulo 2 | 64 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 104 |
| REFERÊNCIAS | 105 |
| APÊNDICES..... | 111 |

1. INTRODUÇÃO

No cenário mundial, a Fitoterapia está inserida na sociedade contemporânea como forma alternativa e/ou complementar na terapêutica, integrada nas mais diversas classes sociais, não somente às populações das zonas rurais ou regiões desprovidas de assistências à saúde, mas também com utilização aumentada nas populações nos centros urbanos, devido a inserção de políticas que regulamentam e incentivam o uso de plantas medicinais e fitoterápicos, e também dado incentivo promovido pelo modismo de consumo de produtos naturais (BORGES; SALES, 2018, BRASIL, 2020).

O Brasil é reconhecido pela sua rica biodiversidade e diversidade sociocultural, preservando o uso de plantas na terapêutica, com grande legado das populações tradicionais; bem como o incentivo da Política Nacional de Saúde para adoção da Fitoterapia, especialmente na Atenção Primária à Saúde; mas, paralelamente a esse cenário, o desenvolvimento e produção de medicamentos fitoterápicos ainda são precários, sem inovações de forma continuada, ficando inclusive atrás de países menos desenvolvidos tecnologicamente (NESPOLI et al., 2021).

Assim, para garantia de oferta de fitoterápicos com certificação de eficácia, segurança e qualidade, faz-se necessário vencer barreiras nacionais, tais como: investimentos incipientes em Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação, falta de parcerias entre universidades e empresas, carência de estudos com espécies vegetais nativas, de grande ocorrência local e uso terapêutico popular, especialmente por populações tradicionais, falta de estudos de padronização dos extratos vegetais e fitoterápicos derivados e, ainda, a barreira institucional decorrente das normas e critérios para produção e comercialização com sustentabilidade com base no incentivo a agroecologia (CASTRO; ALBIERO, 2016; NESPOLI et al., 2021).

Hasenclever et al. (2017) afirmam que a inexistência de padronização das preparações vegetais alvo dos estudos de validação, para posterior oferta como medicamentos, representa grande gargalo na cadeia produtiva.

Nesse sentido vale enfatizar que, reconhecidamente, os extratos vegetais representam as preparações mais empregadas nos estudos de validação, bem como nas formulações fitoterápicas derivadas; mas, considerando que tais preparações sofrem por diversas variáveis que podem influenciar na composição química e atividade terapêutica, é imprescindível a

padronização desses extratos vegetais, fundamentada na interface da bioatividade e fitoquímica. (LAZZAROTTO-FIGUEIRÓ et al., 2021).

Amaral et al. (2021) enfatizam que os estudos de padronização devem priorizar a avaliação dos extrativos vegetais por meio de planejamento fatorial, com definição das variáveis que influenciam na extração, já que essa representa a etapa fundamental na obtenção de fitoterápicos, garantindo a separação de substâncias de interesse (bioativos) da matriz complexa.

Assim, no delineamento de um estudo de padronização de extratos vegetais devem ser consideradas as variáveis independentes (granulometria da droga vegetal, qualidade e quantidade de solvente, método extrativo, temperatura, tempo e pH) e como variáveis dependentes deve ser empregado: rendimento, composição química e atividade biológica (SIMÕES et al., 2017).

Vale ainda destacar, que nos estudos de padronização é possível a definição de marcadores ativos e/ou analíticos, com a identificação e determinação das substâncias químicas relacionadas aos efeitos biológicos, geralmente representados pelas que ocorrem em maior concentração ou potência farmacológica, assumindo papel fundamental para a garantia da eficácia (SIMÕES et al., 2017; AMARAL et al., 2021).

Diante o exposto, quer na pesquisa básica quer na produção dos fitoterápicos derivados é imprescindível a padronização dos extratos para garantia da manutenção e reprodutibilidade da qualidade dos fitoterápicos derivados com otimização da obtenção dos seus bioativos.

Nesse sentido, na perspectiva de contribuir com uso seguro e racional de plantas e suas preparações derivadas, o Grupo de Produtos Naturais da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) tem desenvolvido estudos de validação de espécies vegetais de ampla distribuição local e uso popular, com ênfase ao desenvolvimento dos estudos de padronização dos seus extrativos.

Assim, em continuidade a linha de pesquisa do Grupo, esse trabalho propõe contribuir nos estudos de validação com *Stachytarpheta caynnensis* (Rich.) Vahl, espécie de amplo e diversificado uso popular no estado do Maranhão já comprovado em estudo etnofarmacológico do Grupo, para garantia da manutenção e reprodutibilidade da qualidade dos fitoterápicos derivados com otimização da obtenção dos seus bioativos.

Os resultados são apresentados em forma de dois artigos intitulados: a) Capítulo 1: “*Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl.: do uso tradicional à evidência farmacológica”, submetido ao periódico Scientia Plena; b) Capítulo 2: “Influência das variáveis da extração na composição química e atividade biológica de extratos das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. (Verbenaceae)” a ser submetido ao periódico Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Uso de plantas como recurso terapêutico

Os conhecimentos sobre as plantas medicinais, assim como o seu uso em forma de medicamento, têm acompanhado a humanidade ao longo dos anos. Entretanto, recentemente vem ocorrendo um retorno a essa utilização por grande parte da população, ganhando espaço no mercado que havia sido dominado por produtos industrializados (CARNEIRO et al., 2014).

Trata-se de recursos medicinais alternativos para o tratamento de diversas enfermidades e, muitas vezes, espécies vegetais, na forma de droga vegetal, planta medicinal *in natura*, produto tradicional fitoterápico e/ou fitoterápico, representam a base terapêutica e muitas vezes, são o primeiro e/ou único recurso terapêutico de grande parte da população mundial (ALVES, 2013, SANTOS et al., 2016). Muitas espécies vegetais possuem propriedades terapêuticas, e, portanto, o uso de plantas medicinais representa um fator essencial para a manutenção das condições de saúde das pessoas (MORELLI, 2010).

A planta medicinal é definida como a espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos. Droga vegetal representa planta medicinal, ou suas partes, que contenham as substâncias responsáveis pela ação terapêutica, após processos de coleta/colheita, estabilização, quando aplicável, e secagem, podendo estar na forma íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada. Os fitoterápicos são produtos obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais. No Brasil, a legislação de fitoterápicos industrializados, diferencia dois tipos de fitoterápicos: o medicamento fitoterápico e o produto tradicional fitoterápico. Os medicamentos fitoterápicos têm sua segurança e eficácia baseadas em evidências clínicas; enquanto que os produtos tradicionais fitoterápicos utilizam dados de uso seguro e efetivo publicados na literatura técnico-científica, sendo concebidos para serem utilizados sem a

vigilância de um médico para fins de diagnóstico, de prescrição ou de monitorização; não podendo ser empregados em doenças, distúrbios, condições ou ações consideradas graves; além de não poder conter matérias-primas em concentração de risco tóxico conhecido e não devem ser administrados pelas vias injetável e oftálmica (BRASIL, 2014a).

O efeito de uma planta medicinal é determinado pela forma a qual a espécie é usada, desde sua posologia e preparo (LEMNIS, 2016). Assim, para se ter uma garantia no uso desses fitoterápicos e produtos derivados é necessário não apenas medidas de controle, mas a realização de campanhas que visem informar a população de seus riscos e benefícios, e os profissionais de saúde devem ter educação contínua sobre esses elementos. Estudos com plantas medicinais tem merecido cada vez mais atenção, devido às informações que fornecem a ciência (CARNEIRO et al., 2014).

A utilização de plantas medicinais e fitoterápicos é uma prática mundialmente disseminada, sendo encorajada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), especialmente em países em desenvolvimento. No Brasil, em 2006, o Ministério da Saúde lançou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), oferecendo aos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS), principalmente no âmbito da Atenção Primária à Saúde (APS), a Fitoterapia (BRASIL, 2006). A seguir, foi divulgada a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS). E em 2014, o número de municípios que ofertavam a Fitoterapia na APS era três vezes maior que em 2004, antes da criação da PNPIC (BRASIL, 2006; ANTONIO et al., 2014).

A utilização de espécies vegetais para o tratamento de enfermidade no Brasil, é justificada pela formação cultural, tendo as culturas indígenas, africanas e europeias como base que conduziram a uma ampla diversidade nos aspectos materiais, sociais e espirituais (BORBA et al., 2006). Além disso, o país possui a maior biodiversidade, devido variedade de biomas, e um abrangente número de espécies vegetais, o que estimula a utilização de plantas para fins medicinais (BRASIL, 2016).

Essa integração da identidade cultural nas diferentes regiões brasileiras, faz com que o uso de espécies vegetais seja comum no dia a dia da população maranhense, cuja região está inserida no bioma Amazônico e no bioma Cerrado, ambos com uma diversidade de espécies com potencial terapêutico (SANTOS, 2017; GUARÇONI et al., 2020). Assim, a vasta diversidade de recursos naturais em conjunto com uma expressiva diversidade sociocultural no

território maranhense contribuem para a população fazer uso das espécies da flora local para prevenção e tratamento de doenças (MADALENO, 2011; OLIVEIRA et al., 2012).

O metabolismo vegetal é constituído por dois tipos de substâncias, os metabólitos primários e os secundários (Figura 1). O metabolismo primário é aquele que fornece as substâncias envolvidas nas funções básicas essenciais da vida celular. Os metabólitos secundários são produzidos a partir dos metabólitos primários e são específicos de cada espécie, onde participam das interações intra e intercelular do próprio organismo ou com células de outros organismos, também atuam em processos de polinização pela produção de substâncias que atraem os agentes vivos deste processo ou contribuem para a resistência da planta pela defesa contra pestes e outras doenças e estabelecendo a competência para a guerra química dos ajustes necessários à convivência e sobrevivência ambiental (BRAZ-FILHO, 2009).

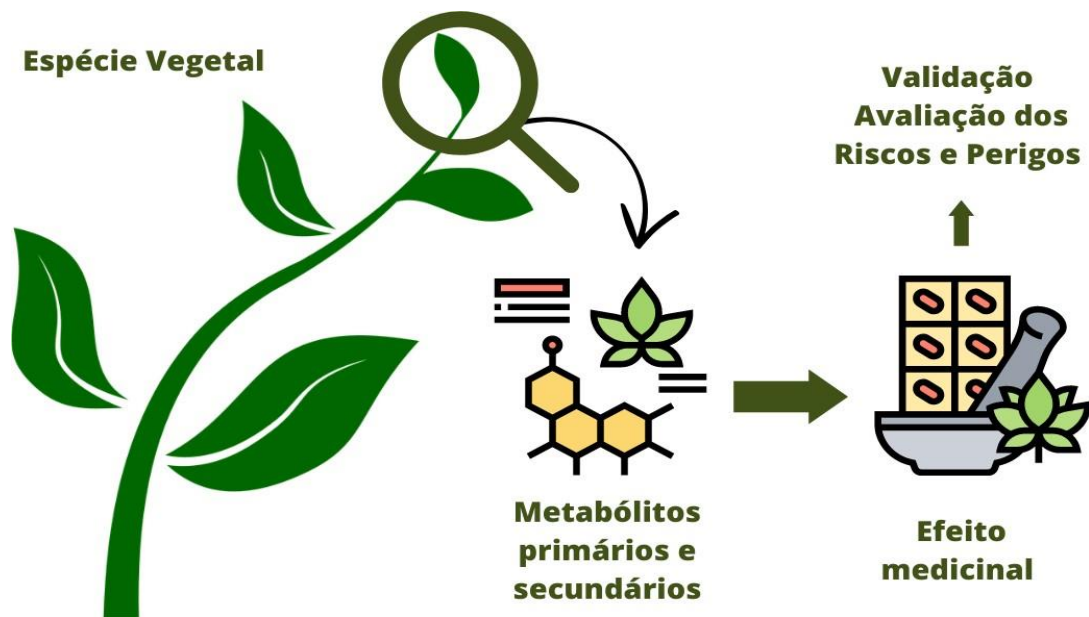


Figura 1. Planta medicinal e suas substâncias responsáveis pelo efeito medicinal. Fonte: ANVISA (2022), adaptado por Gondim (2022).

Os estudos fitoquímicos compreendem a extração e identificação dos constituintes presentes no vegetal, principalmente os metabólitos secundários que geralmente são os responsáveis por ações biológicas (SONAGLIO et al., 2010). Os metabólitos secundários presentes nas plantas correspondem a uma série de substâncias com um perfil amplamente

variado, e muitos deles podem revelar efeitos biológicos quando utilizados pelo homem, tornando-se um importante foco de estudos para pesquisadores que visam o isolamento e a identificação dessas substâncias biologicamente ativas, potenciais candidatas para o desenvolvimento de novos fármacos (KABERA et al., 2014).

Merece destaque, ainda, que é importante identificar a presença de possíveis substâncias tóxicas, reduzindo os perigos a quem faz uso de determinadas plantas, visto que podem elas causar efeitos deletérios até mesmo pelo contato na pele, como irritações oculares, dermatites, alergias e queimaduras (CECHINEL-ZANCHETT, 2017).

Produtos ou medicamentos derivados de espécies vegetais, necessitam, assim como qualquer outro recurso terapêutico validado, terem comprovados sua eficácia e segurança para utilização, devendo passar por procedimentos de controle de qualidade em toda sua cadeia produtiva, que vai desde o plantio até o produto final a ser dispensado (SOUZA- MOREIRA et al., 2010).

O desenvolvimento de um fitoterápico padronizado agrega um valor tecnológico no desenvolvimento da forma farmacêutica contendo plantas medicinais, ao contrário das formas farmacêuticas que contém apenas o material vegetal moído, além de garantir a qualidade e eficácia do medicamento. Para isso, inicialmente deve-se fazer um levantamento bibliográfico na literatura científica e popular enfocando a droga vegetal e suas propriedades químicas e farmacológicas (KLEIN et al., 2009).

Através do levantamento bibliográfico pode-se selecionar uma espécie por meio de pesquisa quimiotaxonômica (onde aspectos morfológicos associados à identificação de grupos botânicos podem indicar a presença de determinados grupos químicos que tenham atividade farmacológica). Posteriormente, coleta-se um espécime da planta prepara-se uma exsicata e faz-se a identificação botânica e o registro em um herbário oficial (TOLEDO et al., 2003; KLEIN et al., 2009). Em paralelo, fazem-se os estudos fitoquímicos que compreendem as etapas de isolamento, elucidação estrutural e identificação de constituintes do vegetal, sobretudo aqueles originários do metabolismo secundário, responsáveis, ou não, pela ação biológica. O estabelecimento de marcadores químicos, que são substâncias químicas características de determinada espécie vegetal são indispensáveis ao planejamento e monitoramento das ações de transformação tecnológica, bem como aos estudos de estabilidade dos produtos intermediários e finais (KLEIN et al., 2009).

Tendo em vista que todo o conteúdo vegetal é considerado como substância ativa, o controle de qualidade de produtos derivados de plantas medicinais é bastante complexo, excetuando-se as plantas nas quais a substância ativa já é amplamente conhecida e sua eficácia já está estabelecida (SAHOO et al., 2010).

2.2 *Stachytarpheta cayennensis* (L.) Vahl

Stachytarpheta cayennensis (L.) Vahl (Figura 2) pode ser encontrada em diversos países, incluindo Bahamas, Brasil, Gana, Haiti, Índia, Jamaica, Camarões, Malásia, México, Antilhas e Nigéria, naturalizada em regiões tropicais e subtropicais do mundo, floresta Atlântica, Caatinga e Campo Rupestre, floresce e frutifica em todos os meses do ano (ATKINS, 2005).

A espécie cresce comumente perto de matas. É um subarbusto anual ou perene, ereto, muito ramificado, de 70-100 cm de altura, com inflorescências terminais espigados, com poucas flores de coloração azul. É uma espécie muito utilizada na medicina tradicional brasileira na forma de infusão de suas folhas e de toda parte aérea como tônico estomacal, estimulante das funções gastrintestinais, contra febres, como diurético e emoliente, para problemas hepáticos crônicos incluindo a hepatite e, para promover a transpiração. (LORENZI e MATOS, 2002).

Atualmente, a distribuição taxonômica desta espécie segundo *Plants Database*, (2019) é a seguinte:

Reino: Plantae

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Lamiales

Família: Verbenaceae

Gênero: *Stachytarpheta*

Espécie: *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl

Faz parte dos grupos de plantas existentes no meio ambiente, citadas como plantas daninhas, também conhecidas como plantas invasoras ou espontâneas e que, ocorrem naturalmente com crescimento espontâneo em áreas de cultivo (ALTIERI, et al., 2003).

S. cayennensis é comum em campo aberto como pastagens, campos de cultivo, e terrenos baldios. Esta espécie também é tolerante à sombra e pode invadir florestas de baixa densidade. Cresce em todos os tipos de solos, incluindo solos inférteis e secos. Embora possa tolerar a seca, esta espécie cresce melhor em solos úmidos e areno-argilosos e sua propagação é feita por sementes (HEAR, 2012; SIGRIST, 2012).

É uma planta ereta, perene, ramificada, um tanto angular, subarbusto muito resistente à tração (Figura 2). Geralmente tem folhas alternas, ovais com pecíolo distinto e bordas serrilhadas e recortadas, com até 8 cm de comprimento e 2-4,5 de largura, um ápice agudo ou subagudo, aspecto ligeiramente enrugado, cor verde, terminal inflorescência com hastes lineares, flor séssil com cálice gamossépalo, piloso no dorso, corola com cinco pétalas soldadas na base, de coloração lilás, com androceu com dois estames férteis e dois estaminódios (LORENZ e MATOS, 2002; ONOFRE, 2015).

Figura 2: Visão geral de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl, destacando a inflorescência.



Fonte: GONDIM, 2022.

Secções transversais da lâmina foliar evidenciaram uma epiderme uni estratificada com cutícula espessa e colênquima constituído por 03 (três) a 04 (quatro) camadas de células. O mesofilo dorsiventral com parênquima paliçádico ocupa cerca de metade da face adaxial e o parênquima lacunoso com 03 (três) a 04 (quatro) camadas de células com reservas de compostos fenólicos. A nervura central possui formato convexo-convexo. O pecíolo, em corte transversal, evidencia formato côncavo-convexo com epiderme uni-estratificada coberta por tricomas tectores curtos unisseriados, e revestidos por fina cutícula. A folha é anfi-hipoestomática, os estômatos são do tipo anomocítico e diacítico (MACHADO et al., 2008).

Os estudos anatômicos da espécie são escassos até o momento, concentrando-se nas folhas, evidenciando a necessidade de estudos em outros órgãos para determinar parâmetros para a avaliação da identificação das espécies, com definição de parâmetros de autenticidade.

As folhas de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl., são utilizadas no tratamento de doenças respiratórias, como tônico, vermífugo, febrífugo, antiinflamatório, analgésico, hepatoprotetor, laxante, na redução de colesterol, no tratamento de distúrbios gástricos, sinusite (FERREIRA, 2000; RODRIGUES; CARVALHO, 2001; MOREIRA et al., 2002; JACOBY et al., 2002; AGRA et al., 2007b). As folhas também são usadas para tratar a diarreia e vermes intestinais. Na Malásia, a decocção das folhas é usada para tratamento de úlcera nasal e como terapia alternativa em malária (SASIDHARAN et al, 2007). Segundo Parra e colaboradores (2001), outras propriedades farmacológicas dessa planta têm sido estudadas como sedativo e antipirético.

Estudos farmacológicos têm comprovado atividade analgésica, laxativa, na inibição da secreção gástrica (MESIA, 2004), gastroprotetora, antiinflamatória (PENIDO et al., 2006), hipoglicemiante (ADEBAJO et al., 2007). Moreira et al. (2007) comprovaram atividade leishmanicida em extratos hidroalcoólicos de folhas secas de *Stachytarpheta cayennensis* contra formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis*.

A constatação da atividade leishmanicida no estudo desenvolvido por Moreira et al. (2007), deve estimular o prosseguimento dos estudos de citotoxicidade, visando avaliação de possível amplo espectro de atividade antiprotozoária.

Estudo desenvolvido por Ordóñez et al. (2001) comprovou atividade giardicida in vitro com extrato hidroalcoólico das folhas *Stachytarpheta cayennensis* (L.) Vahl., sendo comprovada, ainda, inibição do crescimento de trofozoítos de *Giardia lamblia* com outras

espécies da família Verbenaceae (TAPIA-PÉREZ et al., 2003; CALZADA et al., 2006; PONCE-MACOTELA et al., 2006).

Em sua composição química apresenta alcalóides, glicosídeos (verbenalina e verbenina), taninos, saponinas, flavonoides, esteroides, quinonas, compostos fenólicos e ácido glicogênico, sendo que alguns destes constituintes químicos também estão contidos em várias espécies vegetais com efeitos em protozooses, principalmente com ação *leishmanicida* (MOREIRA et al., 2007; FROELICH et al., 2008; PENIDO et al., 2006).

Em estudo de avaliação da atividade giardicida *in vitro* realizado por Amaral (2007) com extrato hidroalcoólico das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* comprovou intensa atividade contra trofozoítos de *Giardia lamblia*.

2.3 Os estudos de validação de espécies vegetais com ênfase a padronização dos extrativos

O processo de transformação de uma planta em medicamento, logo um produto tecnicamente elaborado, implica em diversas etapas da pesquisa básica até o desenvolvimento tecnológico do bioproduto em escala industrial a ser disponibilizado ao mercado consumidor; etapas, essas que, em conjunto, caracterizam os estudos de validação (SIMÕES et al., 2017; AMARAL et al., 2021).

Os estudos de validação visam confirmar cientificamente as propriedades terapêuticas atribuídas as espécies vegetais, especialmente as nativas e/ou grande ocorrência local empregadas na prática popular; e, assim, possibilitar a inclusão de tais espécies na cadeia produtiva de fitoterápicos, na perspectiva de oferta de produto qualificado, eficaz, seguro e padronizado; possibilitando emprego como medicamento em seres vivos (BRANDÃO, 2017); envolvendo estudos etnodirigidos, botânicos, agrônômicos, químicos, biológicos (farmacologia e toxicologia pré-clínica e clínica) e farmacêutico (metodologia analítica de controle de qualidade e produção tecnológica) (ENDERLE et al., 2018; AMARAL et al., 2021) como consta na Figura 3.

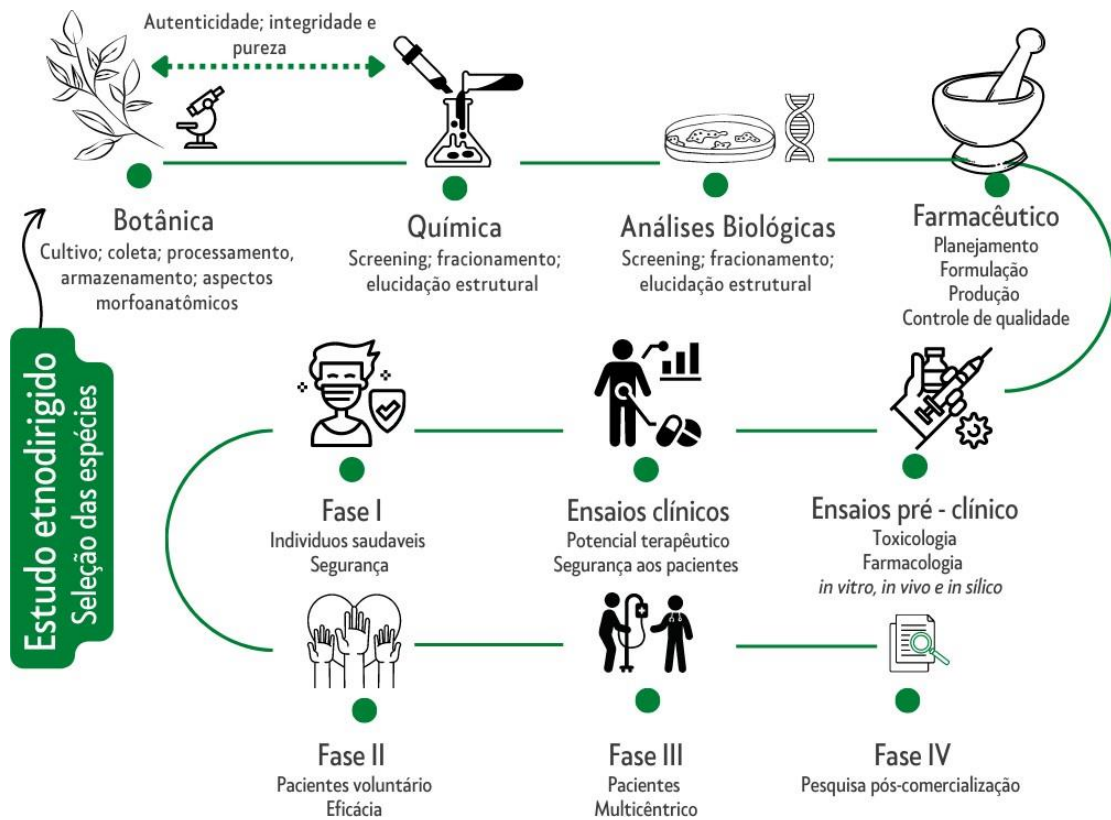


Figura 03. Fluxograma das etapas da pesquisa para descoberta e desenvolvimento de medicamentos a partir de espécies vegetais. Fonte. Amaral (2007); Linck (2015), adaptado por Gondim (2023).

O uso do conhecimento tradicional representa ferramenta importante na Fitoterapia, mas deve ser aceita e valorizada como critério mais adequado para triagem de espécies vegetais com potencial terapêutico, sendo encontrados resultados mais promissores em estudos que utilizam tal critério do que aqueles que definem a espécie a ser estudada aleatoriamente e, por isso, as pesquisas etnofarmacológicas são largamente utilizadas pelos laboratórios da indústria farmacêutica na descoberta de novos agentes terapêuticos (MIGLIATO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011).

A correta identificação botânica certifica a autenticidade do material vegetal, uma vez que a maioria dos processos de desenvolvimento de medicamentos ocorrem a partir de plantas selecionadas por estudos etnodirigidos, onde as espécies vegetais costumam ser referenciadas

por nomes venaculares, sendo, portanto, necessária a coleta do exemplar para a identificação em herbários reconhecidos (VERDAM; SILVA, 2010).

Na avaliação macroscópica, as espécies vegetais são avaliadas pelas características botânicas macroscópicas, com análises a olho nu ou com auxílio de lupa, com exsiccatas, fotos ou desenhos. A avaliação microscópica pode ser fundamentada na investigação de características histológicas da epiderme (tricomatos e estômatos), tecidos fundamentais (colênquima, parênquima e esclerênquima), tecidos condutores (xilema e floema) e estruturas secretoras (bolsas secretoras, dutos secretores, idioblastos, laticíferos, dentre outros) e inclusões celulares (cristais de oxalato de cálcio, inulina), podendo ser realizada ainda reações histoquímicas para detecção de amido, mucilagem, tanino (FARIAS, 2010).

Mais recentemente, tem sido introduzido técnicas de avaliação de autenticidade de matérias-primas vegetais (planta *in natura* e droga vegetal) através de análise do Ácido Desoxirribonucleico (DNA), destacando-se o DNA *Barcode*, que consiste em sequências curtas de genes ou regiões intergênicas que podem ser empregadas como marcadores moleculares para a identificação de plantas (SUCHER; CARLES, 2008, FARIAS, 2017).

Os estudos químicos ou fitoquímicos compreendem etapas de avaliação qualitativa e quantitativa de constituintes ou metabólitos secundários, seguido do isolamento e elucidação estrutural dos princípios ativos ou substâncias responsáveis pela ação biológica, empregando métodos químicos, físicos e/ou físico-químicos envolvendo técnicas de caracterização, métodos cromatográficos, espectrometria de massas, espectroscopia no ultravioleta, no visível e no infravermelho; bem como a ressonância magnética nuclear (RMN) de próton e carbono 13 (REGINATTO, 2017; AMARAL et al., 2021).

Assim, a análise química de constituintes ou metabólitos secundários representa parâmetro de avaliação de integridade indispensável no controle de qualidade, considerando que as matérias-primas vegetais podem apresentar variabilidade na composição química, dependendo de vários fatores intrínsecos e extrínsecos, influenciando na concentração de constituintes químicos no material vegetal e, conseqüentemente, na segurança e eficácia (KUNLE et al., 2012; AMARAL et al., 2021).

O controle de qualidade da integridade do material vegetal também pode ser realizado por meio de ensaios biológicos compreendendo estudos biológicos pré-clínicos e clínicos (Figura 2). Os ensaios pré-clínicos envolvem as fases de ensaios *in vitro* (órgãos isolados,

culturas de células e tecidos, tecidos simulados e fluidos corpóreos, organismos inferiores) e *in vivo* (animais de laboratório) na avaliação da atividade farmacológica e toxicológica; possibilitando avaliar os parâmetros de eficácia e segurança terapêutica, os quais mantêm relação direta com a composição química do vegetal (LAPA et al., 2004; MACÊDO; OLIVEIRA, 2006).

Na sequência da validação, merece destaque os estudos farmacológicos, os quais devem iniciar com ensaios pré-clínicos seguido dos ensaios clínicos para certificação de eficácia e segurança ao uso (Figura 02).

Os estudos pré-clínicos têm como objetivo avaliar os potenciais efeitos adversos e riscos para os seres humanos, sendo categorizados em três grupos: farmacológicos, farmacocinéticos e toxicológicos. Essas investigações envolvem a realização de testes tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Notavelmente, há uma crescente preferência pelos testes *in vitro*, impulsionada pela pressão social para reduzir o uso de animais na pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos, conforme destacado por TIMBRELL (2009).

Após resultados promissores nas avaliações pré-clínicas, segue-se para a etapa de ensaios clínicos, visando comprovar o potencial terapêutico e segurança em seres humanos. Esses ensaios compreendem 04 (quatro) fases (Figura 2): fase I, em que o produto é testado em voluntários saudáveis, sem objetivos terapêuticos, visando avaliar a segurança e tolerabilidade do fármaco, através de dados de farmacodinâmica, farmacocinética e biodisponibilidade; fase II, realizada com um número reduzido de pacientes voluntários que possuem a patologia para qual a droga é investigada, buscando avaliar a eficácia terapêutica, determinar da dose e regime terapêutico, verificar a relação dose/resposta e estabelecer um perfil de segurança a curto prazo; fase III, que é realizada com um número maior de pacientes, com o objetivo de comprovar a segurança e efetividade do tratamento com a nova droga, através de ensaios comparativos a placebo e ao fármaco de referência e, assim, obter a autorização de introdução no mercado; e, por último, a fase IV, conhecida como Farmacovigilância ou Pesquisa Pós-Comercialização, na intenção de otimizar o uso do medicamento, avaliando possíveis interações medicamentosas e efeitos adversos adicionais (farmacovigilância), descrevendo padrões de uso dando suporte ao Marketing (BRAGA et al., 2017; SUNTAR, 2020).

2.2.1 A padronização dos extratos vegetais

Nas etapas da validação de espécies vegetais, merecem destaque os estudos de padronização, visando a definição das variáveis que possam influenciar na extração das substâncias de interesse farmacológico (bioativos) da matriz vegetal, logo na eficácia e segurança ao uso, representando uma otimização da cadeia produtiva, da matéria prima vegetal ao Fitoterápico; o que deve iniciar ainda na fase da pesquisa básica com material vegetal e seus extrativos selecionados para investigação científica (LIMA et al., 2020; AMARAL et al., 2021; LAZZAROTTO-FIGUEIRÓ et al., 2021).

Plantas medicinais podem ser definidas, de uma maneira ampla, como sendo toda "espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos" (Resolução Anvisa n. 18/2013) (Brasil, 2013a). Essas plantas têm sido exploradas para fins medicinais de diversas maneiras, podendo ser utilizadas com base no conhecimento tradicional passado de geração em geração, pela transformação industrial e obtenção de medicamentos fitoterápicos, ou pelo uso dessas espécies para extração de princípios ativos vegetais (CARVALHO, 2011). A inserção da fitoterapia no SUS alcançou visibilidade com a implantação da *Política Nacional de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos*, por meio do Decreto n. 5.813, de 22 de junho de 2006, e a *Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS*, que ganharam mais representatividade com a publicação da Portaria MS/GM n. 886, de 20 de abril de 2010, que instituiu a Farmácia Viva no SUS (Brasil, 2006a, 2006b, 2010a).

De acordo com a legislação brasileira (RDC Anvisa n. 14, de 31 de março de 2010), as plantas medicinais são definidas de uma maneira mais genérica, como "espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos" (Brasil, 2010c). Conforme o artigo 7º, da Lei n. 5.991, de 17 de dezembro de 1973, o comércio de plantas medicinais é definido como privativo das farmácias e ervanários, desde que observado o acondicionamento adequado e a classificação botânica (BRASIL, 1973).

Já as drogas vegetais englobam as assim consideradas plantas medicinais ou suas partes "que contenham as substâncias, ou classes de substâncias, responsáveis pela ação terapêutica, após processos de coleta ou colheita, estabilização e secagem, íntegras, rasuradas, trituradas ou pulverizadas" (RDC Anvisa n. 10, de 9 de março de 2010) (BRASIL, 2010d).

De acordo com a legislação (RDC Anvisa n. 14, de 31 de março de 2010), medicamentos fitoterápicos são "obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais" com comprovação de sua eficácia, segurança e reprodutibilidade de sua qualidade. Não se enquadra nesta categoria aqueles medicamentos que incluem na sua composição "substâncias ativas isoladas, sintéticas ou naturais, nem associações dessas com extratos vegetais" (Brasil, 2010c).

A RDC Anvisa n. 14/2010 estabeleceu requisitos a serem seguidos para garantir a qualidade dos medicamentos produzidos, exigindo a reprodutibilidade dos produtos fabricados, obtida por meio do uso de matérias-primas padronizadas e rígido controle de qualidade. O produto final obtido deve ser avaliado sob diferentes aspectos, mas essencialmente quanto à presença e quantificação de seus marcadores, os quais serão a base para definição da dosagem e conseqüentemente todo o desenvolvimento do produto até sua apresentação final.

Nesse sentido, considerando que os extratos vegetais representam as preparações intermediárias ou acabadas mais frequentemente empregadas nas formulações fitoterápicas sólidas, semi-sólidas ou líquidas, em escala oficial e industrial, envolvendo várias etapas operacionais com diversas variáveis, que podem alterar a estabilidade dos constituintes químicos e, conseqüentemente, a atividade terapêutica desejada, é fundamental o desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para padronização dessas preparações (SONAGLIO et al., 2004).

Os estudos de padronização devem priorizar a avaliação dos métodos extrativos que são feitos pelo planejamento fatorial, evidenciando as variáveis de extração que influencia no processo (MIGLIATO et al., 2011). No estudo das variáveis que podem influenciar a extração é imprescindível a avaliação da granulometria, qualidade e quantidade de solvente, método extrativo, temperatura, tempo, tensão superficial e pH (SIMÕES et al., 2004;).

Assim, devido à complexidade e variabilidade dos compostos químicos das espécies vegetais, devemos considerar que diversas variáveis podem ocasionar a perda da integridade da composição química vegetal e, conseqüentemente, da resposta biológica. Portanto, na garantia de obtenção de produtos vegetais de qualidade, os estudos de padronização, possibilitam, ainda, a definição das substâncias ativas ou majoritárias, os marcadores analíticos e/ou ativos, a serem monitorizados da droga vegetal ao produto acabado para certificação da qualidade (LIMA, 2009; SIMÕES et al., 2017).

2.2.1.1 Variáveis da extração

a) Granulometria

A análise granulométrica do material vegetal é uma etapa imprescindível para a padronização de um processo extrativo. Partículas com dimensões homogêneas aumentam a área de contato entre o material vegetal e o líquido extrator, podendo aumentar, conseqüentemente, a eficiência da extração (PRISTA et al., 2008).

O tamanho da partícula também é conhecido por influenciar a área de superfície de um material sólido. Partículas menores apresentam uma maior área de contato com o líquido extrator, mas, neste caso, nem sempre há um aumento na eficiência do processo extrativo. O poder de penetração dos solventes depende, por exemplo, da consistência dos tecidos que formam o material a extrair e principalmente do processo de extração. Partículas muito pequenas tendem a formar uma camada compacta de pó, dificultando a penetração do solvente, principalmente em métodos como a percolação, que necessitam da passagem do líquido extrator entre as partículas do material triturado (VASCONCELOS et al., 2005). Já o material com tamanho de partícula muito grande pode resultar em um pó com menor área superficial exposta ao solvente extrator e também apresentar baixa eficiência extrativa (GUIZZO et al., 2015; MIGLIATO et al., 2007).

De acordo com a literatura, a distribuição do tamanho de partícula influencia diretamente no processo extrativo, e que uma droga vegetal com tamanho de partícula muito alto ou baixo pode influenciar negativamente na eficiência extrativa do sistema de solvente utilizado (PÉRTILE et al., 2007; SONAGLIO et al., 2003).

Zaiter et al., (2016) ao avaliarem a influência do tamanho de partículas na faixa entre 20 e 500 μm do pó de *Camellia sinensis* (chá da Índia) sobre o teor de polifenóis e atividade antioxidante, constataram que a atividade e o teor de constituintes eram influenciados pelo tamanho de partícula, sendo que os melhores resultados foram encontrados com tamanhos de partícula de 100 e 180 μm .

b) Solvente

O solvente a ser empregado na extração deve ser definido em função na natureza química da droga vegetal, devendo ser o mais seletivo possível, para garantir extração das substâncias de interesse em quantidades adequadas. Como a solubilidade de uma substância é na maioria das vezes, condicionada pela polaridade, a seletividade do solvente ou misturas destes frequentemente é definida pela semelhança do grau de polaridade com os constituintes químicos da droga vegetal de interesse farmacológico (MIGLIATO et al., 2011).

Entre os fatores que interferem no teor de compostos a serem extraídos, o solvente escolhido tem se mostrado de extrema importância, pois além de analisar a eficiência em extrair o metabólito desejado, deve-se levar em consideração a toxicidade e risco de manuseio, o custo, a disponibilidade e a estabilidade das substâncias extraídas (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2004).

A quantidade do solvente a ser empregada na extração define o hidromódulo (relação droga: solvente), podendo influenciar na extração, devendo ser idealizado a redução do gasto de solvente de modo a garantir economia do processo; mas a quantidade do solvente está condicionada ao equilíbrio do gradiente de concentração no meio, o que torna necessário a definição da quantidade ideal de solvente a ser empregada (NORIEGA, 2005).

É considerado que quanto maior o tempo de extração maior contato entre droga e solvente, logo maior extração, com maior fluxo de difusão do solvente através da parede celular da droga contribuindo para equilíbrio da concentração de ativos no meio intra e extracelular; porém deve ser avaliado o solvente e método extrativo, pois o prolongamento do tempo de contato pode ocasionar processos de degradação do extrato, tais como hidrólise e fermentações, além de ocasionar dissolução dos princípios de menor solubilidade indesejáveis de extração (FONSÊCA, 2005).

Morais (2019) observou que os altos teores de sólidos totais se encontram na faixa de concentração etanólica entre 40 e 80%, e que a maiores temperaturas se obtêm, maiores teores de sólidos totais. O autor relata ainda que foi possível perceber o aumento da concentração de sólidos totais com a diminuição da concentração de etanol, onde os pontos ótimos obtidos foram de 48,78% na concentração de etanol/água.

O álcool em concentrações relativamente elevadas dissolve muito bem componentes da planta que apresentam interesse farmacológico, como é o caso dos flavonoides, taninos,

alcaloides entre outros. Entretanto, reduz a extração de compostos polares, que também podem ter alguma atividade (SOUZA, 2003).

Alguns estudos demonstram que solventes com polaridade maior extraem maiores teores de compostos fenólicos, entretanto, o solvente alcóolico tem sido empregado para extração de fenólicos, dando maior rendimento de extrato total. A literatura relata que, soluções de misturas de álcool e água são mais eficientes na extração de compostos fenólicos em comparação com os mesmos solventes quando utilizados puros (GIRONI; PIEMONTE, 2011).

Oliveira et al. (2016) realizaram estudo utilizando como solventes na extração o etanol e o solvente hidroalcóolico, constatando que o solvente hidroalcóolico a 70% possuiu melhor rendimento em praticamente todos os métodos extrativos, em detrimento do etanol. Os resultados mostraram que as técnicas de extração e a natureza do solvente extrator afetam diretamente nos rendimentos extrativos e no teor de metabólitos presentes, podendo interferir em atividades biológicas e farmacológicas, porém, é necessário conhecer a natureza do material a ser estudado.

Segundo Veggi (2013) a água não somente aumenta a eficiência da extração de compostos fenólicos, mas também é o solvente mais adequado por ser ecologicamente seguro e ter baixo custo.

Os resultados encontrados por Peixoto (2012) indicaram que o solvente constituído por 50% de etanol, foi capaz de extrair maiores teores de metabólitos da planta *Bauhinia forficata* Link. (pata de vaca) nas condições estabelecidas.

Coutinho (2013) constatou que para as folhas de *Melia azedarach* (cinamomo), o solvente que obteve os melhores resultados de rendimento foi o metanol, com pouca diferença do etanol, com resultados inferiores para o clorofórmio.

Pinto et al. (2019) produziram extratos alcoólicos de *Chenopodium ambrosioides* L (matruz) para usar no controle de arboviroses e observaram que o extrato etanólico obteve um rendimento de 10,09%, o extrato metanólico apresentou um rendimento de 7,86% e o extrato hexânico um rendimento de 2,058%, valores inferiores ao encontrado no presente estudo. Os resultados deste estudo demonstram que o método extrativo, o solvente utilizado, o tempo e a temperatura influenciam diretamente no rendimento total do extrato, porém é preciso levar em consideração que muitas substâncias são termolábeis e outras podem sofrer modificações estruturais irreversíveis em altas temperaturas (YAMINI et al., 2008; TIWARI et al., 2011).

É preciso salientar que a água quando associada à solventes orgânicos, ajuda a tornar o meio um pouco mais polar, favorecendo dessa forma a extração de compostos fenólicos (LAPORNIK et al., 2005).

Anagnostopoulou et al. (2006) estudaram sete extratos de cascas de *Citrus × sinensis* (laranja doce), demonstrando que a fração na qual empregaram o solvente acetato de etil pode ser utilizada como eficiente antioxidante em alimentos e formulações medicinais, devido ao alto conteúdo de compostos fenólicos e atividade sequestradora de radicais livres encontrados na amostra.

Em folhas de *Panax ginseng* (ginseng), o extrato etanólico evidenciou maior ação sequestradora de radical livre e atividade quelante de íons ferro. Além disso, continha maior quantidade de fenólicos (2.333,2 mg/100 g) e flavonoides (1.199,1mg/100 g) que os extrato aquoso e metanólico em extração sequencial com água, etanol e metanol, respectivamente (JUNG et al., 2006)

c) Processos extrativos

Muitos estudos vêm demonstrando a influência da extração no teor de metabólitos secundários e no rendimento dos extratos (VONGSAK et al., 2013; BAMPOULI et al., 2014; KARABEGOVIĆ et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2016). Os métodos extrativos para obtenção de extratos vegetais incluem maceração, infusão, percolação, decocção, extração contínua quente (Soxhlet), extração em contra-corrente, extração assistida por microondas, ultra-som, fluido supercrítico e turbólise. (TIWARI et al., 2011).

Em estudos realizados para observação da eficiência dos métodos extrativos (GNOATTO et al., 2007; KARABEGOVIĆ et al., 2014), demonstraram que a extração por Soxhlet utilizando etanol obtiveram os melhores rendimentos extrativos, onde a escolha do método extrativo, o solvente utilizado, o tempo e a temperatura influenciam diretamente no rendimento total do extrato, porém é preciso levar em consideração que muitas substâncias são termolábeis e outras podem sofrer modificações estruturais irreversíveis em altas temperaturas (YAMINI et al., 2008; TIWARI et al., 2011).

Estudo realizado por Herzi et al. (2013), demonstra diferenças significativas quanto a natureza dos componentes e a quantidade destes no que se diz respeito ao método de extração,

além de detectar na extração por Soxhlet uma alta quantidade de substâncias de alta massa molecular.

Estudo avaliando diferentes técnicas extrativas (ultrassom, turbólise, maceração, decocção, infusão e Soxhlet) e proporções de teor alcoólico a 92,8 % e 70 % (v/v), através da quantificação de constituintes ativos de *Dicksonia sellowiana* (xaxim), demonstrou que as técnicas decocção e turbólise com teor alcoólico 70 % (v/v) eram mais eficientes que as demais técnicas avaliadas; demonstrando, ainda, que dentre os métodos utilizados de maceração, infusão e decocção, o método que apresentou o maior rendimento para os extratos etanólicos e hidroalcoólicos 70% foi decocção (OLIVEIRA et al., 2016).

Costa (2016) avaliando os valores de rendimento obtidos na extração supercrítica com as extrações por Soxhlet, constatou que os extratos obtidos por extração supercrítica apresentaram um rendimento menor que os extratos obtidos por solventes orgânicos, os quais variaram entre 10,4 e 31,8%.

Na padronização de tecnologia de obtenção de extratos hidroalcoólicos da casca de frutos de *Myrciaria cauliflora* (jabuticaba), foi investigado a extração a quente por refluxo, extração assistida por ultrassom e extração por percolação através da quantificação de fenóis totais; evidenciando que percolação apresentou melhor eficiência extrativa (BORGES, 2015).

O método de maceração é bastante utilizado, devido ser um método a frio e de baixo custo, possui maior tempo de contato com a droga vegetal, porém não leva ao esgotamento da droga vegetal. Entretanto, de acordo com Trusheva et al. (2007), um tempo de maceração mais longo pode ocasionar mudanças químicas, particularmente a oxidação de fenólicos compostos como flavonoides, indicando que o período de maceração deve ser inferior a 48 h. Em controversa, Cunha et al. (2006) constataram que um período mais longo aumenta o rendimento da extração material. Portanto, diante das controvérsias, é essencial que os estudos de padronização definam qual período de maceração ideal em combinação com solventes de extração adequados para obter compostos desejáveis.

d) Temperatura

A temperatura do processo extrativo pode influenciar de maneira positiva, ocasionando aumento da solubilidade de determinado princípio ativo, diminuição da viscosidade do solvente

e aumento da velocidade de difusão, justificado os processos de extração a quente serem mais rápidos do que aqueles realizados a temperatura ambiente (VIGANÓ et al., 2016).

Quando a temperatura é elevada, as taxas de difusão e solubilidade dos analitos aumenta; a viscosidade e tensão superficial dos solventes diminuem, facilitando o contato dos analitos com os solventes, o que pode acelerar o processo de extração (ATES et al., 2011). Mas deve ser considerado o risco do emprego de temperatura elevada dada a degradação de princípios ativos termolábeis ou termosensíveis, sendo recomendado limite máximo de 60°C (MIGLIATO et al., 2011; SIMÕES et al., 2017).

O uso da temperatura como um fator que melhora a extração de compostos fenólicos, em especial os flavonoides, tem sido descrito na literatura (KRAUJALIS et al., 2011; BASSANI et al., 2014; LIU et al., 2015).

Mochi (2005) verificou diferentes temperaturas no rendimento do óleo essencial e teor de 1,8-cineol presente nas folhas de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh (eucalipto vermelho), variando de 35 até 70 °C, e pode verificar que as temperaturas de 65 e 70 °C obtiveram rendimentos maiores comparado a outras temperaturas mais baixas.

Do ponto de vista econômico, processos com baixas temperaturas, podem reduzir custos na extração, com alto rendimento, em menor tempo, e conseqüentemente menor consumo de solvente, sendo possível, portanto, otimizar o processo (CORSO, 2008; FREITAS et al., 2008; PEDERSSETTI, 2008).

Com o objetivo de otimizar a extração dos compostos antioxidantes da microalga *Spirulina platensis*, Herrero e colaboradores (2005b) utilizaram hexano, éter de petróleo, etanol e água para a extração, assim como temperaturas e tempos distintos; comprovando que altas temperaturas de extração apresentaram grande influência em todos os resultados, alterando os compostos com propriedades antioxidantes.

Sulaiman et al., (2017) avaliaram a influência dos parâmetros de extração, como temperaturas (60 – 80 ° C) na extração de compostos fenólicos na planta *Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau (Belalai Gajah), evidenciando que com um tempo de extração prolongado a 80 °C, ocorre diminuição no rendimento da extração porque a alta temperatura causa a oxidação e degradação dos compostos desejados.

Devido à sua instabilidade frente ao aumento de temperatura, é aconselhável que a extração de antocianinas não ocorra em temperaturas superiores à 60 °C, sendo ideal que o

processo seja realizado abaixo de 40 °C, pois temperaturas superiores podem promover rápida degradação térmica e, conseqüentemente, redução da estabilidade e concentração das antocianinas nos extratos (FAVARO, 2008). É muito comum a extração de antocianinas em temperaturas baixas (MEDINA et al., 2011).

Os trabalhos de Ghitescu et al. (2014) e Tabaraki & Rastgoo (2015) relatam que o aumento da temperatura em elevadas concentrações de etanol, na mistura etanol-água, favorece a obtenção de compostos fenólicos.

e) Tempo de extração

É considerado que quanto maior o tempo de extração maior contato entre droga e solvente, logo maior extração, com maior fluxo de difusão do solvente através da parede celular da droga contribuindo para equilíbrio da concentração de ativos no meio intra e extracelular; porém deve ser avaliado o solvente e método extrativo pois o prolongamento do tempo de contato pode ocasionar processos de degradação do extrato, tais como hidrólise e fermentações, além de ocasionar dissolução dos princípios de menor solubilidade indesejáveis de extração (FONSÊCA, 2005).

Em estudo realizado com resíduos de frutas vermelhas, os extratos foram preparados com etanol, metanol e água e tempos de extração de 1, 12 e 24 horas; sendo evidenciado que o conteúdo de polifenóis diminuiu no extrato aquoso com maior tempo de extração, enquanto nos extratos metanólicos e etanólicos houve acréscimo no conteúdo de fenóis com o aumento do tempo (LAPORNIK et al., 2005).

Matanna et al. (2015) avaliaram a influência de diferentes tempos de extração no teor e composição química do óleo essencial da espécie *Pothomorphe umbellata* (aguaxima); comprovando que o tempo de 180 minutos proporcionou maior rendimento do óleo essencial (0,42%), enquanto a composição química não foi influenciada pelos diferentes tempos de destilação.

Ehlert et al. (2006) constataram a influência do tempo de extração em sete espécies medicinais estudadas pelos autores; o máximo teor de óleo essencial foi obtido aos 130 minutos de extração para *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (Capim limão), 150 minutos para as espécies: *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Citronela), *Aristolochia* sp (Papo de Peru), *Hyptis pectinata*

(L.) Poit (Sambacaitá) e *Hyptis fruticosa* Salzm. ex. Benth. (Hortelã do mato); 160 minutos para *Lippia sidoides* Cham.(Alecrim pimenta) e 230 min para *Eucalyptus globulus* Labill. (Eucalipto-da-Tasmânia), comprovando a variação existente na produção de óleo essencial conforme a espécie e o tempo de hidrodestilação.

Já para espécie *Rosmarinus officinalis* L. (Alecrim), Prins et al. (2006), constataram que no tempo de 90 minutos é possível conseguir uma maximização do rendimento de óleo essencial desta espécie.

As diferenças constatadas pelos autores podem estar relacionadas ao tipo de estrutura secretora das espécies produtoras de óleos essenciais, que podem facilitar ou dificultar sua saída dos tecidos que as produzem, bem como as características de sua solubilidade ou volatilidade, atribuídas principalmente aos compostos terpênicos, da classe dos monoterpenos. Os monoterpenos são muito voláteis e, geralmente, são os componentes predominantes em óleos essenciais (VELOSO et al., 2012).

f) Secagem

Novas possibilidades tecnológicas para a obtenção de extratos secos de plantas medicinais têm estimulado a produção de fitoterápicos. Tendo em vista que a tendência das indústrias farmacêuticas brasileiras é a substituição de formas fluidas tradicionais pelo extrato na forma de pó, os extratos secos representam um campo em significativa expansão. Os extratos secos possuem várias vantagens como maior estabilidade física, química e microbiológica, além da possibilidade de padronização dos princípios ativos (LOPES et al.,2020).

O processo de secagem deve ser avaliado com base em estudos sob diferentes condições de temperatura, tempo e carregamento do equipamento de secagem, de modo a viabilizar uma matéria-prima friável o suficiente para atender ao processo subsequente de moagem, bem como manter a estabilidade dos princípios ativos a partir de armazenagem em embalagem e local adequados. Além disso, esses processos apresentam impacto direto na umidade da droga vegetal (BRASIL, 2014) e podem ser monitorados utilizando o método descrito na monografia individual do produto na Farmacopeia Brasileira 6ª edição (BRASIL, 2019).

A obtenção de um produto à base de plantas medicinais possui diferentes aspectos, dependendo se a substância ativa está na forma de droga vegetal ou como preparação derivada da droga vegetal. Tendo em vista que muitos fatores podem afetar a qualidade de produtos de

plantas medicinais, incluindo clima, período de colheita e processamento pós-colheita, processos de padronização são requisitos básicos para garantir um nível consistente e adequado das substâncias ativas, garantindo a eficácia e qualidade do produto, visto que condições diferentes de processamento podem levar a produtos com qualidades diferentes (SOUZA, 2007). Isto não é uma tarefa fácil devido a plantas e suas preparações serem (ao contrário de drogas sintéticas) misturas complexas de componentes com diferentes características físico-químicas (SOUZA; OLIVEIRA, 2006).

Soares e Silva et al. (2012) utilizaram os adjuvantes Aerosil® e maltodextrina na avaliação de dois processos de secagem na preparação de extrato seco de *Mikania glomerata* Spreng. (guaco), a secagem por atomização (*spray dryer*) e liofilização, com o objetivo de identificar o melhor processo para produzir um extrato seco com um nível elevado de cumarina. Baseado nos resultados obtidos, o processo de secagem por liofilização foi o melhor para obtenção dos extratos secos de guaco com altos níveis de cumarina.

Ao escolher métodos adequados de secagem de materiais específicos, devem-se considerar todos os fatores relevantes, tais como a capacidade de produção, o capital e o custo operacional, forma do produto e o tempo de secagem (LIU et al., 2011).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Realizar estudo de padronização de extratos das folhas de *Stachytarpheta caynnensis* (Rich) Vahl, empregando ensaios químicos e biológicos.

3.2 Objetivos específicos

- propor o método extrativo das folhas de *Stachytarpheta caynnensis* (Rich) Vahl mais eficiente segundo variáveis químicas, físico-químicas e biológicas.
- aplicar ensaios qualitativos e quantitativos de caracterização e doseamento dos constituintes químicos nos extratos das folhas de *Stachytarpheta caynnensis* (Rich) Vahl;
- realizar ensaios pré-clínicos *in vitro* com extratos das folhas de *Stachytarpheta caynnensis* (Rich) Vahl obtidos por planejamento fatorial em modelos de atividade antimicrobiana, inibidora de formação de biofilme e antiproliferativa;

5. RESULTADOS

5.1 Capítulo 1

***Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl.: do uso tradicional à evidência farmacológica**

Stachytarpheta cayennensis (Rich.) Vahl: from traditional use to pharmacological evidence

R.S.D. Gondim^{1*}; J.W.L.S.Godinho¹, T.D.Ferreira¹, R.G. Souza², M.B.Serra², W.A.Barroso²,
F.M.M. do Amaral¹.

¹ Laboratório de Fitoterapia e Biotecnologia em Saúde, Universidade Federal do Maranhão,
Campus Bacanga, Av. dos Portugueses, 1966, 65080-805, São Luís, Maranhão, Brasil.

² Faculdade ITPAC Santa Inês, BR 316, 346, Vila Olímpica, 65304-770, Santa Inês,
Maranhão, Brasil.

RESUMO

Introdução: *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. (Verbanaceae) (gervão roxo) é uma espécie de ampla distribuição nas Américas tropicais e de amplo uso popular terapêutico no Brasil. **Objetivo:** Avaliar o potencial da espécie quanto a presença de atividades farmacológicas promissoras para o desenvolvimento de produtos de interesse humano. **Métodos:** Foi realizado uma revisão de literatura narrativa, incluindo aspectos da taxonomia, etnofarmacologia, atividade biológica, composição química e toxicidade, disponibilizados em bases de dados científicos (Biological Abstracts, Chemical Abstracts, Medline, Lilacs, Web of Science, Science Direct, PubMed, Food and Drugs Administration). Foram incluídos artigos, teses e dissertações publicados entre 1950 e 2022, sem distinção de idioma. Foram excluídos documentos duplicados, não disponibilizados na íntegra, irrelevantes aos objetivos do estudo, monografias, relatórios técnicos e resumos. **Resultados:** A espécie tem diversas indicações populares de usos medicinais, com estudos que comprovam atividade biológica como cicatrizante de feridas, anti-inflamatória, anti-hipertensiva, hipoglicemiante, protetora gástrica. Compostos isolados como verbascosídeo, martinósídeo, ácido betulínico, Nnenside B, estão envolvidos nas atividades biológicas. **Conclusão:** O potencial medicinal da espécie é reconhecido, mas é necessário prosseguir nos estudos farmacológicos e químicos, com ênfase aos estudos de validação em modelos *in vivo*, bem como nos estudos de padronização dos seus extrativos, na perspectiva real de desenvolvimento de novos fitoterápicos.

Palavras-chave: Verbanaceae, revisão, uso popular, atividade biológica.

ABSTRACT

Introduction: *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae) (purple vervain) is a species widely distributed in tropical Americas and extensively used for therapeutic purposes in Brazil. **Objective:** To assess the potential of the species for the presence of promising pharmacological activities for the development of products of human interest. **Methods:** A narrative literature review was conducted, including aspects of taxonomy, ethnopharmacology, biological activity, chemical composition, and toxicity, available in scientific databases (Biological Abstracts, Chemical Abstracts, Medline, Lilacs, Web of Science, Science Direct, PubMed, Food and Drugs Administration). Articles, theses, and dissertations published between 1950 and 2022 were included, regardless of language. Duplicate documents, those not available in full, irrelevant to the study's objectives, monographs, technical reports, and abstracts were excluded. **Results:** The species has several popular indications for medicinal uses, with studies confirming biological activities such as wound healing, anti-inflammatory, antihypertensive, hypoglycemic, and gastric protective properties. Isolated compounds like verbascoside, martynoside, betulinic acid, Nnenoside B are involved in these biological activities. **Conclusion:** The medicinal potential of the species is recognized, but further pharmacological and chemical studies are needed, with an emphasis on validation studies in in vivo models and the standardization of its extracts, with a real perspective on the development of new herbal medicines.

Keywords: Verbenaceae, review, popular use, biological activity.

INTRODUÇÃO

O emprego de plantas como alternativa no tratamento de doenças pela população decorre não somente pelo efeito terapêutico das plantas, mas também da dificuldade de acesso aos serviços de saúde, aos custos dos medicamentos sintéticos e a grande diversidade vegetal (SANTOS ABN, et al., 2016). Embora sejam vistas por grande parte da população como sinônimos de segurança e benefício à saúde é de suma importância salientar que muitas plantas

medicinais costumeiramente utilizadas apresentam sim substâncias capazes de exercer ação tóxica sobre outros organismos vivos (MENGUE SS, et al., 2017).

Estima-se que 80% da população mundial façam uso das plantas com finalidade terapêutica. No Brasil, mesmo em capitais de urbanização mais recente, percebe-se grande prevalência da utilização de plantas pela população (CAMARGO M, 2014). As plantas apresentam propriedades químicas, orgânicas e inorgânicas, com diferentes potenciais para pesquisa científica (PEDROSO RS, et al., 2021). Assim, países como o Brasil, com grandes desigualdades sociais e econômicas, com ênfase ao difícil acesso a bens e serviços de saúde, deve ter incentivado a Pesquisa & Desenvolvimento de novas alternativas e/ou complementos terapêuticos com base na biodiversidade nacional, com ênfase as espécies vegetais nativas, de larga ocorrência e amplo uso popular (AMARAL FMM, et al., 2021).

Nesse sentido, a família Verbenaceae merece destaque, incluindo 2.600 espécies, envolvendo ervas, arbustos e algumas árvores; agrupadas em 100 gêneros com distribuição pantropical; com número mais significativo de espécies encontradas na América Latina, onde ocorrem em uma ampla gama de ecossistemas (O'LEARY N, et al., 2012). Muitas espécies desta família são conhecidas como aromáticas, empregadas para uso ornamental ou na medicina popular desde a antiguidade, com destaque aos gêneros *Aloysia*, *Lantana*, *Lippia* e *Stachytarpheta* (O'LEARY N, et al., 2012).

Stachytarpheta cayennensis (Rich.) Vahl., mais comumente conhecida pelo nome popular de gervão roxo, é uma planta originária da América Central e do Sul, sendo naturalizada nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo (LORENZI HE e MATOS FJA, 2008). Apesar de ser usada como ornamental, seu plantio, cultivo doméstico e comercialização (totalmente baseada no extrativismo) ocorrem fundamentalmente pelas suas amplas e comprovadas propriedades medicinais (CARDOSO PH, et al., 2018).

MÉTODOS

A pesquisa foi realizada nas bases de dados *Biological Abstracts*, *Chemical Abstracts*, *Medline*, *Lilacs*, *Web of Science*, *Science Direct*, *PubMed* e *Food and Drugs Administration*, empregando-se a seguinte fórmula: [(*Stachytarpheta cayennensis*) OR gervão OR gervão-azul OR (gervão roxo)] AND (etnofarmacologia OR atividade biológica OR composição química

OR farmacognosia OR toxicidade)]. Foram incluídos artigos, teses e dissertações publicados entre 1950 e 2022, sem distinção de idioma. Foram excluídos documentos duplicados, não disponibilizados na íntegra, irrelevantes aos objetivos do estudo, monografias, relatórios técnicos e resumos.

A revisão utilizou 89 publicações, resultando na elaboração da linha do tempo (Figura 1), apresentando dados sobre a ocorrência desses estudos com *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. Em resumo, avalia que a maioria dos estudos aconteceram entre os anos de 2009 a 2018, concentrando os estudos em regiões tropicais e subtropicais.

Figura 1 – Linha do tempo da ocorrência dos estudos inventariados na pesquisa bibliográfica nos anos de 1968 a 2022.



Fonte: GONDIM, et al., 2022.

Em relação aos países e continentes predominantes dos estudos, observou-se que 88 % dos artigos inventariados ocorreram na América do Sul, com predomínio dos estudos no Brasil, 3% no continente Africano, com predominância dos estudos na Nigéria.

RESULTADOS

USO TRADICIONAL

Stachytarpheta cayennensis é utilizada para fins medicinais e ornamentais (LORENZI et al., 2002). Na prática popular é bastante utilizada para diversos fins terapêuticos; com estudos etnofarmacológicos que evidenciam o uso para afecções do sistema digestivo, ação anti-inflamatória, analgésica, cicatrizante, antiparasitária (Tabela 1). Dos 35 estudos etnofarmacológicos inventariados, 40% referem uso popular para tratamento de doenças inflamatórias, e 51,42% nas afecções do sistema digestivo. Dos estudos etnobotânicos realizados com o gervão roxo, constatou-se que em 68% dos casos, a utilização estava centrada nas folhas, enquanto em 28% dos casos, o método extrativo de infusão era predominante.

Tabela 1. Uso terapêutico popular da *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. com indicação do farmacógeno, modo de preparação e referência do estudo etnofarmacológico.

| Indicação | Farmacógeno | Modo de preparo | Referência |
|---|-------------|------------------------------------|------------------------|
| Giardíase | Folhas | NI | Neiva et al., 2014 |
| Infecções, gonorréia, problemas cardíacos, depurativo do sangue | Folhas | Infusão e decocção | Barros et al., 2007 |
| Depurativo do sangue | Folhas | Infusão | Ahmed et al., 2006 |
| Broncodilatador | Folhas | Decocção | Moreira et al., 2020 |
| Analgésico, antiinflamatório, depurativo, antigripal, Hipocolesteremiante, hipotensor | Folhas | NI | Somavilla et al., 1996 |
| Verminoses | Folhas | Infusão | Manosso et al., 2021 |
| Leshimanicida | Folhas | Pó da folha (espalhado pela lesão) | Moreira et al., 2002 |
| Diurético, distúrbios no coração, fígado | Folhas | NI | Nilles, 2019 |

Tabela 1. Uso terapêutico popular da *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. com indicação do farmacógeno, modo de preparação e referência do estudo etnofarmacológico. (cont.)

| | | | |
|--|--------|----------------------------|--------------------------|
| Colesterol, dor de estômago, fígado e vesícula | Folhas | Infusão | Battisti et al., 2013 |
| Cicatrizante, antidiabético, doenças respiratórias, antitussígeno, lesão bucal | Folhas | Infusão, decocção | Gonçalves et al., 2018 |
| Inflamação | Folhas | Infusão | Ferreira et al., 2020 |
| Fígado; gordura no fígado; inflamação | Folhas | Chá | David, Pasa, 2017 |
| Bronquite, febre, gripe | Folhas | Infusão, decocção, tintura | Liporacci; Simão, 2013 |
| Contusão | Folhas | Maceração | Santos et al., 2014 |
| Rins, diabetes, próstata | Folhas | Chá | Vásquez et al., 2014 |
| Dor de estômago, dor de coluna, machucaduras internas | Folhas | NI | Bueno et al., 2005; |
| Gastrite, câncer | Folhas | Maceração | Soares et al, 2013 |
| Antigripal; cicatrizante; inflamação no pulmão; gordura do fígado | Folhas | Chá | Moreira; Oliveira, 2017. |

Tabela 1. Uso terapêutico popular da *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. com indicação do farmacógeno, modo de preparação e referência do estudo etnofarmacológico. (cont.)

| | | | |
|--|--------------|----------------|--------------------------|
| Infecções, erupção cutânea, dor no estômago, raiva e febre | Folhas | NI | Saltos et al., 2016 |
| Antigripal, para dores musculares e torcicolo, distúrbios renais, diurético, contra reumatismo, amigdalite | Folhas | Infusão | Messias et al., 2015 |
| Diurético, antiinflamatório, infecção, dengue, rins, feridas | Folhas | Infusão e sumo | Souza et al., 2017 |
| Anti-inflamatório | Folhas | Infusão | Penildo et al., 2016 |
| Má digestão | Folhas | Chá | Oliboni et al., 2022 |
| Estômago, fígado | Folhas | - | Pereira et al., 2011 |
| Inflamação | Caule e Raiz | Infusão | Ferreira et al., 2020 |
| Dor de estômago, dor de coluna, machucaduras internas | Caule e Raiz | NI | Bueno et al., 2005; |
| Antigripal; cicatrizante; inflamação no pulmão; gordura do fígado | Caule e Raiz | Chá | Moreira; Oliveira, 2017. |

Tabela 1. Uso terapêutico popular da *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. com indicação do farmacógeno, modo de preparação e referência do estudo etnofarmacológico. (cont.)

| | | | |
|--|--------------|----------------------|--------------------------|
| Gripe | Caule e Raiz | Decocção | Povh et al., 2014 |
| Infecções, erupção cutânea, dor no estômago, dor, raiva, febre | Caule e Raiz | NI | Saltos et al., 2016 |
| Colesterol, dor de estômago, fígado, gosto bom e vesícula; | Caule e Raiz | Infusão | Battisti et al., 2013 |
| Doenças do fígado | Flor e fruto | Infusão | Costa et al., 2011 |
| Dor de cabeça/dor na coluna, gripe/inflamação de garganta | NI | NI | Lemos et al., 2015 |
| Fraqueza do organismo; hepatite; má digestão; doença de estômago e fígado; tumores, furúnculos e afecções urinárias. | NI | Infusão e cataplasma | Pereira et al., 2009 |
| Bronquite e tosse | NI | NI | Vasconcelos et al., 2017 |
| Problemas do sistema gástrico, hepatite e problemas renais | NI | NI | Neto Galvão et al., 2020 |
| Hipoglicemiante | NI | NI | Feijó et al., 2012 |

| | | | |
|---|----|---------|------------------------|
| Esteatose hepática, digestão, aumentar o metabolismo hepático, fígado, melhorar o funcionamento do fígado, gastrite | NI | Infusão | Damasceno et al., 2019 |
|---|----|---------|------------------------|

NI: não informado

ESTUDOS FITOQUÍMICOS

Screening químico realizado com folhas de *Stachytarpheta cayennensis* revelou a presença de compostos fenólicos, alcaloides, ácidos voláteis e saponinas (ALIYU, et al. 2008), poliamida iridoides, glicosídeos fenilpropanoides (ONOFRE SB, et al., 2015), flavonoides, cardioativos, antracenosídeos, saponinas hemolíticas, taninos, catequinas, carotenoides, óleos voláteis, cumarinas e mucilagens (SOUZA TJT, et al. 2005).

Estudos de Okoye TC, et al. (2010; 2014) demonstraram, além desses compostos, a presença de esteroides, glicosídeos e terpenoides. Dalmagro AP e Gasparetto A (2020) identificaram heterosídeos cianogénicos, taninos, alcaloides, flavonoides, esteroides e triterpenos.

A tabela 2 indica compostos químicos identificados em estudos desenvolvidos com folhas, cascas e raízes de *Stachytarpheta cayennensis*. Nos estudos de caracterização fitoquímica do gervão roxo, destaca-se que em 33% dos casos analisados, o solvente acetato de etila foi empregado como parte do processo de extração. Além disso, observou-se que o método extrativo mais frequentemente citado foi a hidrodestilação por Clevenger com 49%. Notavelmente, as folhas surgiram como o farmacógeno mais utilizado como fonte para os estudos.

Do extrato alcoólico das folhas da *Stachytarpheta cayennensis*, na fração n-butanólica, foram isolados e identificados dois compostos: o acteosídeo e o ipolamiideo (SCHAPOVAL EES, et al., 1998). Leitão GG, et al. (2005) identificaram e isolaram a partir do extrato de acetato de etila das raízes, os compostos verbascosídeo, isoverbascosídeo e martinósídeo.

Adebajo et al. (2007), da fração butanólica das folhas, isolaram e caracterizaram os compostos 6 β - hidroxiiipolamideo, ipolamideo e o isoverbascosídeo. Através do extrato de acetato de etila das folhas, cinco glicosídeos feniltanóides puderam ser identificados o acteosídeo, leucosceptosídeo A, martinósídeo e jionosídeo D e o iso-acteosídeo (FROELICH et al., 2008).

Em um estudo caracterização do óleo essencial (OE) das folhas de *S. cayennensis* por GC-MS (Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas), utilizando dois métodos: hidrodestilação por Clevenger seguido de partição com acetato de etila (HCA)

e hidrodestilação por Clevenger seguido de partição com hexano (HCH), mostrou que o perfil químico e o rendimento dos OEs isolados pelos dois métodos são diferentes, o que reforça a necessidade de padronização dos estudos com espécies vegetais.

O acteosideo é uma substância que ocorre com frequência nas plantas das famílias da ordem Lamiales, tal como a Verbenaceae. Devido seu caráter majoritário esta substância é frequentemente avaliada em ensaios biológicos, e frequentemente associada como um dos princípios ativos da espécie (MAQUIAVELI et al., 2016; PENIDO et al., 2006).

A fitoquímica das espécies do gênero *Stachytarpheta* ainda se mostra pouco explorada, tendo sido descrito apenas estudos de isolamento de algumas substâncias.

Tabela 2. Composição química de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl.

| Farmacógeno | Método de extração | Solvente | Composto químico | Referência (s) |
|-------------|--------------------|------------------|------------------------------|------------------------|
| Folhas | Soxlet | Álcool 70% | Acteosídeo | Schapoval et al., 1998 |
| | | Metanol | | Froelich et al., 2008 |
| | Maceração | | | |
| | Soxlet | Álcool 70% | Ipolamiideo | Schapoval et al., 1998 |
| | Soxlet | Hexano Etanol | Verbascosídeo, | Souza et al., 2011 |
| | NI | Metanol | Isoverbascosídeo | Adebajo et al., 2007 |
| | NI | Metanol | 6 β -hidroxiipolamideo | Adebajo et al., 2007 |
| | NI | Metanol | Ipolamideo | Adebajo et al., 2007 |
| | Maceração | Metanol | LeucosceptosídeoA | Froelich et al., 2008 |
| | Maceração | Metanol | | Froelich et al., 2008 |
| | | | Martinosídeo | Souza et al., 2011 |
| | Soxlet | Hexano Etanol | | |

Tabela 2. Composição química de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. (cont.)

| | | | | |
|------------------------------|-----------|-------------|------------------|------------------------|
| | Maceração | Metanol | Jionosídeo D | Froelich et al., 2008 |
| | Maceração | Metanol | Iso-acteosídeo | Froelich et al., 2008 |
| | Soxlet | Etanol | Ácido betulínico | Souza et al., 2010 |
| | Soxlet | Hexano | | Souza et al., 2011 |
| | | Etanol | | |
| Caule | NI | Clorofórmio | Nnenside B | Okoronkwo et al., 2015 |
| | NI | Clorofórmio | Nnenside B | Okoronkwo et al., 2015 |
| Raíz | NI | Clorofórmio | Nnenside B | Okoronkwo et al., 2015 |
| | Soxlet | Hexano | Verbascosídeo | Leitão et al., 2005 |
| | | Etanol | Isoverbascosídeo | |
| | | | Martinosídeo. | |
| Óleo essencial das folhas | | | | |

Tabela 2. Composição química de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. (cont.)

| | | | |
|----------------------------------|------------------|--|--------------------------|
| Hidrodestilação por Clevenger | Acetato de etila | (3Z)-octen-2-ol | Adams, 2007 |
| | | metil 7-metilciclopenta[c]piran-4- carboxilato | |
| Hidrodestilação por Clevenger | Hexano | (E)-4-hexen-1-ol | Tret'yakov, et al., 2008 |
| Hidrodestilação por Clevenger | | 1,2-benzenedicarboxílico ácido, bis(2- metilpropil) éster | Ramsey, et al., 1980 |
| Hidrodestilação por Clevenger | Hexano | Citronelol | Hoskovec, et al., 2005 |
| Hidrodestilação por Clevenger | Hexano | O-decil-hidroxilamina | Triqui, et al., 1995 |
| Hidrodestilação por Clevenger | Hexano | N-propil acetato | Shimadzu, et al., 2003 |
| Hidrodestilação por Clevenger | Acetato de etila | Furfural | Adams, 2007 |
| Hidrodestilação por Clevenger | Acetato de etila | 4-hidroxi-4-metil-2-pentanone | Adams, 2007 |

Tabela 2. Composição química de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. (cont.)

| | | | |
|-------------------------------|------------------|---|------------------------------|
| Hidrodestilação por Clevenger | Acetato de etila | 3-hexen-1-ol | Adams, 2007 |
| | Hexano | 2-butóxi-etanol | Shimadzu, et al., 2003 |
| | Hexano | 1-hepten-3-ol | Eelmore, et al., 2000 |
| Hidrodestilação por Clevenger | Acetato de etila | Benzenoacetaldeído | Adams, 2007 |
| | Acetato de etila | Terpineol | Adams, 2007 |
| | | 2,6-dimetil-undecano | Schomburg, et al., 1968 |
| Hidrodestilação por Clevenger | Acetato de etila | 1,7-dimetil-4-(1-metiletil) ciclodecano | Adams, 2007 |
| Hidrodestilação por Clevenger | Acetato de etila | 2-buten-1-ona, 1-(2,6,6-trimetil-1,3-ciclohexadien- 1-il) - | Adams, 2007 |
| Hidrodestilação por Clevenger | Acetato de etila | Panaxjapino A | Andriamaharavo, et al., 2014 |
| Hidrodestilação por Clevenger | Acetato de etila | Metil 7-metilciclopenta[c]piran-4-carboxilato | Nereshima, et al., 2019 |
| Hidrodestilação por Clevenger | Acetato de etila | 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecan-1-o | Wei, et al., 2001 |

| | | | |
|----------------------------------|------------------|--------------------|------------------------|
| Hidrodestilação por Clevenger | Acetato de etila | 6-metil-octadecano | Kotowska, et al., 2007 |
|----------------------------------|------------------|--------------------|------------------------|

NI: não informado

ESTUDOS FARMACOLÓGICOS

Algumas pesquisas de ação farmacológicas têm sido desenvolvidas com as folhas e raízes de *S. cayennensis*, corroborando com as aplicações medicinais (Tabela 3).

O extrato hidroalcoólico de folhas secas, possui efeito leishmanicida *in vitro* sobre formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonenses* (MOREIRA LP, et al., 2007).

Adebajo AC, et al. (2007) testaram, *in vivo* e *in vitro*, a atividade hipoglicemiante. Em modelo *in vivo*, pela solução aquosa, o extrato metanólico e a fração butanólica da *S. cayennensis* apresentaram ótima redução de glicose do sangue no teste de aloxana-diabéticos. Enquanto no teste *in vitro*, utilizando células secretoras de insulina, a fração butanólica apresentou indução pela secreção de insulina.

O extrato hidroalcoólico das folhas tem ação antibacteriana *in vitro* sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, potencial no tratamento de hipercolesterolemia e obesidade atuando na redução de riscos de acidentes vasculares (SILVEIRA LMS, et al., 2007). O extrato bruto hidroalcoólico (EBH) obtido de partes aéreas da planta foi submetido a avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* sobre cepas de *Staphylococcus aureus* oxacilina-sensíveis e oxacilina-resistentes; apresentado Concentração Inibitória Mínima (CIM) variando de 0,4 a 1,6 mg/mL e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de 1,6 a 12,5 mg/mL; com resultados indicando que a planta tem moderada atividade antibacteriana (SILVEIRA LMS, et al., 2007).

Duarte et al. (2002) testaram *in vitro* a atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico 70% da planta no micro-organismo *Streptococcus faecium*, notando uma Concentração Mínima Inibitória (CIM) satisfatória. Estudo de Onofre SB, et al. (2015), com óleo essencial da espécie, também apresentou resultados promissores, com atividade antibacteriana contra os micro-organismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Estudo realizado por Onofre SB e colaboradores (2015) com espécies de *Candida* foi possível observar a atividade antifúngica do extrato aquoso das folhas contra *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida stellatoideia*, *Candida dubliniensis* e *Candida krusei*.

Na avaliação de atividade antimicrobiana, Okoye TC, et al. (2010; 2014) observaram que o extrato metanólico das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* mostrou-se eficaz no tratamento de *Candida albicans* e outros microrganismos em infecções da cavidade oral, inibindo o crescimento microbiano.

Na avaliação do efeito sobre o sistema nervoso central, com ação sedativa e ansiolítica, constatou que os extratos etanólico e aquoso das folhas possuem ação moduladora do sono; indicando que as frações butanol e aquosa do extrato possuem atividade sedativa, enquanto a fração acetato de etila possui propriedade estimulante (AKANMU MAO, et al., 2005). Os mecanismos neurais pelos quais a sedação observada foi induzida pelos extratos de folhas são sugeridos como gabaérgicos e opióides (OLAYIWOLA G, et al., 2013).

Okoye TC, et al. (2014) mostraram que as folhas de *Stachytarpheta cayennensis* apresentavam potentes propriedades imunomoduladoras, demonstrando efeito imunomodulador potente nas respostas imunitárias humoral e mediadas por células em modelo *in vivo*.

No levantamento dos estudos que fundamentam essa revisão, foi evidenciado, até o momento, somente um estudo preliminar de padronização desenvolvido por Neiva VA, et al. (2014) utilizando extrato hidroetanólico das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* obtidos por maceração e percolação, contra o trofozoíto de *Giardia lamblia*, evidenciando atividade giardicida mais expressiva no extrato de maceração (120.93 ± 2.54).

Estudo utilizando camundongos demonstrou que o extrato metanólico das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* exibiu uma estimativa de DL₅₀ superior a 5000 mg/kg (por via oral) e não causou qualquer mortalidade e sinais de intoxicação aguda após o período de observação de 48h (OKOYE TC, et al., 2014). Este estudo corrobora com a investigação dos efeitos tóxicos do extrato metanólico de folhas de *Stachytarpheta cayennensis* em ratos após doses agudas e repetidas de 28 dias em ratos machos e fêmeas, onde a DL₅₀ do extrato também foi superior a 5000 mg/kg, sugerindo que o extrato pode ser não tóxico. Entretanto, o extrato é potencialmente nocivo para órgãos vitais em doses mais altas ou quando administrado repetidamente, sendo necessário evitar o uso indiscriminado (OLAYODE AO, et al., 2019).

Nos bancos de dados foram encontradas as seguintes patentes contendo bioprodutos da espécie em questão: Composição farmacêutica à base de *Stachytarpheta* sp., processo

de obtenção e seu uso no tratamento do vitiligo (US20130287868A1)(FERREIRA EQ, 2013); Mistura de plantas imunologicamente ativa e sua aplicação na prevenção em um método de tratamento de lesões (WO2016128471A1) (WILMANOWICZ, 2016); Processo para obtenção de compostos farmacêuticos fitoterápicos a partir uma ou mais partes de plantas do gênero *Stachytarpheta* (BR 122020000045-7) (QUEIROZ APA, 2019).

A avaliação dos estudos inventariados neste trabalho, possibilitou definir que as variáveis de extração interferem nas respostas biológicas, permitindo, assim, a identificação da necessidade de padronização das etapas de produção desses extratos vegetais. Nota-se que muitos trabalhos não trazem informações importantes dos métodos extrativos o que dificulta a reprodutibilidade do teste de avaliação da atividade biológica, isso só evidencia a negligência na padronização dos derivados vegetais, essenciais para garantia da qualidade no desenvolvimento de um produto de interesse farmacológico.

Tabela 3. Estudos farmacológicos de diferentes partes de *S.cayennensis* determinadas por diferentes ensaios.

| Parte analisada/método de extração | País de coleta | Tipo de ensaio | Atividades determinadas | Referência |
|---|----------------|--|--|-------------------------|
| Infusão, decocção e extrato hidroetanólico (70%) das folhas e frações | Brasil | <i>in vivo</i> (ratos–edema de pata; sensibilidade térmica) | Anti-inflamatório e Antinociceptivo | Schapoal et al., 1998 |
| Extrato etanólico das folhas (maceração) | Brasil | <i>in vitro</i> (Larvas de terceiro estágio de <i>Aedes aegypti</i>) | Atividade larvicida frente a larva de <i>Aedes aegypti</i> | Porto et al.2017 |
| Extrato aquoso das folhas | Brasil | <i>in vitro</i> (contra cepas de contra <i>Candida albicans</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida stellatoideia</i> , <i>Candida dubliniensis</i> e <i>Candida krusei</i>) | Antifúngico | Onofre et al.,2015b |
| Maceração hidroalcoólica das folhas | Brasil | <i>in vitro contra</i> formas promastigotas de <i>Leishmania braziliensis</i> e <i>L. amazonensis</i> | Inibição das formas promastigotas de <i>Leishmania</i> | Moreira et al., 2007 |
| Extrato aquoso das folhas (infusão) | Brasil | <i>in vivo</i> (efeitos na secreção gástrica, motilidade gástrica, inflamação e dor) | Inibição da secreção de ácido gástrico | Mesia-vela et al., 2004 |

Tabela 3. Estudos farmacológicos de diferentes partes de *S.cayennensis* determinadas por diferentes ensaios.(cont.)

| | | | | |
|--|---------|---|--|-------------------------|
| Extrato hidroalcoólico das folhas | Brasil | <i>in vitro</i> (contra cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>) | Antibacteriano sobre cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> | Silveira et al., 2007 |
| Extrato bruto etanólico das raízes (extração por aparelho de Soxlet) | Brasil | <i>in vitro</i> (contra <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>S.epidermidis</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>) | Atividade antimicrobiano moderada | Souza et al., 2010 |
| Óleo essencial das folhas | Brasil | <i>in vitro</i> (contra diferentes sorotipos de <i>Escherichia coli</i>) | Antibacteriano (contra 4 dos 11 sorotipos) | Duarte et al., 2007 |
| Extrato aquoso das folhas | | <i>in vivo</i> (ratos e camundongos) | Antidiarreica | Almeida et al., 1995 |
| Extratos hidroetanólico (70% e 96%) das folhas | Brasil | <i>in vivo</i> (camundongos) | Anti-inflamatório e gastroprotetor | Penido et al., 2006 |
| Extrato metanólico das folhas e frações | Nigéria | <i>in vitro</i> (antimicrobiano) <i>ex vivo</i> (antiespasmódico) | Antimicrobiano e antiespasmódico | Okoye et al., 2010 |
| Extrato aquoso e metanólico das folhas e suas frações | Nigéria | <i>in vivo e in vitro</i> (ratos com diabetes induzida) | Hipoglicemiante | Adebajo et al., 2007 |
| Extrato etanólico das folhas | Nigéria | <i>in vivo</i> (camundongos infectados com malária) | Antiparasitário (contra Malária) | Okokon et al., 2008 |
| Fração butanólica do extrato aquoso das folhas | Brasil | <i>in vitro</i> (viabilidade de enzimas e do parasito) | Antiparasitário (contra Leishmaniose) | Maquiaveli et al., 2016 |

Tabela 3. Estudos farmacológicos de diferentes partes de *S.cayennensis* determinadas por diferentes ensaios (cont.)

| | | | | |
|---|----------|--|--|--|
| Extrato aquoso da planta inteira | Brasil | <i>in vivo</i> (úlceras induzidas– camundongos) | Antiulcerogênico | Vela et al., 1997 |
| Extrato metanólico das folhas e suas frações (extração por maceração) | Nigéria | <i>in vivo</i> (camundongos–hipnose por pentobarbital e labirinto T elevado) | Sedativo Ansiolítico | Olayiwola, Ukponmwan, & Olawode, 2013. |
| Extrato hidroetanólico das folhas (maceração e percolação) | Brasil | <i>in vitro</i> (cepas axênicas de <i>Giardia Lamblia</i>) | Atividade giardicida | Neiva et al. 2014 |
| Extrato metanólico das folhas | Paraguai | <i>in vitro</i> (pseudotipo SARS-CoV-2 baseado em HIV-1) | Inibição a entrada de SARS-CoV-2 nas células | González-Maldonado et al., 2022 |

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Stachytarpheta cayennensis é uma espécie nativa de grande ocorrência no Brasil, possui potencial para geração de bioprodutos, com ênfase terapêutica. A eficácia como antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, hipoglicemiante, gastroprotetora, entre outras, é evidenciada por diversos estudos, o que pode ser atribuído à presença de compostos fenólicos. Foi evidenciado que acteosídeo e ipolamiida cumarinas são os marcadores químicos para a espécie mostrando que os estudos de validação de espécies vegetais são essenciais para garantir segurança no uso medicinal popular e para o controle de qualidade dos fitoterápicos, o que permite um controle farmacognóstico da espécie.

Os resultados encontrados demonstram a necessidade da padronização dos extratos na condução da pesquisa básica com extratos vegetais, com o uso de planejamento fatorial na realização de experimentos como um instrumento eficaz para a otimização da extração de componentes químicos específicos, bem como repostas biológicas.

O amplo uso terapêutico e potencial farmacológico já evidenciado, devem estimular a continuidade dos estudos de validação, com ênfase na elucidação dos mecanismos de ação, toxicidade e testes botânicos para definir parâmetros de eficácia, segurança e qualidade de uso.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) e à Universidade Federal do Maranhão (UFMA) pelo apoio financeiro e reconhecimento e a todos os participantes por seu valioso tempo e compromisso com este estudo.

REFERÊNCIAS

ADEBAJO AC, et al. Hypoglycaemic constituents os *Stachytarpheta cayennensis* leaf. *Planta med.* 73(3), p.214-50, Feb. 2007.

AKANMU MAO, et al. Acute Toxicity and Sleep-Wake EEG Analysis of *Stachytarpheta cayennensis* (Verbenaceae) in Rodents. *African Journal of Traditional Complimentary and Alternative Medicine.* 2005;2:222–232.

ALIYU AB, et al. Nectário extrafloral de *Stachytarpheta cayennensis*. Phytochemical analyses and mineral elements composition of some medicinal plants of Northern Nigeria. *Nigerian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7(1): 119-125, 2008.

ALTIERI, M. A.; SILVA, E. N.; NICHOLLS, C. I. O papel da biodiversidade no manejo de pragas. Ribeirão Preto; Editora Holos, 2003, 226p.

ALVES NRF, et al. Contribuições das plantas medicinais e uso de chás no ensino de química orgânica: revisão narrativa de literatura. *Brazilian Journal of Development*, v. 8, n. 4, p. 26369-26387, 2022.

AMARAL FMM, et al. Estudo de validação de espécies vegetais: o elo entre o saber popular e o fitoterápico. *Trajetória e pesquisa nas ciências farmacêuticas*. 1. ed. Ponta Grossa: Atena Editora, 2021. p.11-32.

ATKINS S. O gênero *Stachytarpheta* (Verbenaceae) no Brasil. *Kew Bulletin*, 60(2): 161; 2005.

CAMARGO M. As plantas medicinais e o sagrado: a etnofarmacobotânica em uma revisão historiográfica da medicina popular no Brasil. 1ª ed. – São Paulo: Ícone, 2014.

CARDOSO PH, et al. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Verbenaceae. **Rodriguésia**, v. 69, n. 3, p. 1397-1403, 2018.

DALMAGRO AP e GASPARETTO A. "Stachytarpheta cayennensis (Rich.) Vahl: constituição fitoquímica preliminar e efeito antibacteriano." *Brazilian Journal of Health Review.* 3(1): 532-544; 2020.

DUARTE MGR, et al. Triagem fitoquímica e atividade antibacteriana in vitro de plantas daninhas. *LECTA* 20(2):177-182; 2002.

EZENYI IC, et al. *Stachytarpheta cayennensis* metanol leaf extract and solvente fractions display antiplasmodial activity against Plasmodium berghei berghei in vivo. *International Journal of Phytopharmacy*, 7(1): 1-9; 2016.

FERREIRA EQ. Pharmaceutical composition on the basis of *Stachytarpheta* sp., a process for obtaining the same and its use for treating vitiligo. US20130287868A1, 2013 jun.

FROELICH S, et al. Phenylethanoid glycosides from *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl, Verbenaceae, a traditional antimalarial medicinal plant. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18, 517-520, 2008.

GONZÁLEZ-MALDONADO P, et al. Screening of Natural Products Inhibitors of SARS-CoV-2 Entry. *Molecules*, 27(5): 1743; 2022.

LEITÃO GG, et al. Step-gradient CCC separation of phenylpropanoid and iridoid glycosides from roots of *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 28(12-13): 2053-2060; 2005.

LORENZI HE e MATOS FJA. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. 2. ed, Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum; 2008. 532p.

LORENZI HE e MATOS FJA. *Plantas Mediciniais no Brasil: nativas e exóticas*. Nova Odessa, Plantarum, 2002.

LORENZI HE. *Plantas Mediciniais No Brasil/Nativas e Exóticas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum; 2002.

MACHADO SR, et al. Morphological patterns of extrafloral nectaries in woody plant species of the Brazilian cerrado. *Plant Biology*, 68:5, 1-14; 2008.

MAQUIAVELI CC, et al. *Stachytarpheta cayennensis* extract inhibits promastigote and amastigote growth in *Leishmania amazonensis* via parasite arginase inhibition. *Journal of Ethnopharmacology*, 192:108-113; 2016.

MENGUE SS, et al. Uso de plantas medicinais na gravidez. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 11, n. 1, p. 21-35, 2017.

MOREIRA LP, et al. Efeito leishmanicida in vitro de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae)/In vitro leishmanicidal effect of *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae), 17: 59-63; 2007.

NEIVA VA, et al. Plant species used in giardiasis treatment: ethnopharmacology and in vitro evaluation of anti-Giardia activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24: 215-224; 2014.

O'LEARY N. et al. Species delimitation in *Lippia* section *Goniostachyum* (Verbenaceae) using the phylogenetic species concept. *Botanical Journal of the Linnean Society*, Londres, v. 170, p.197– 219, 2012.

OKOKON J, et al. In vivo antimalarial activity of ethanolic leaf extract of *Stachytarpheta cayennensis*. *Indian Journal of Pharmacology*, 40(3): 111-113; 2008.

- OKOYE TC, et al. Antimicrobial and antispasmodic activity of leaf extract and fractions of *Stachytarpheta cayennensis*. Asian Pacific Journal of tropical medicine, 3(3): 189-192; 2010.
- OKOYE TC, et al. Efeitos imunomoduladores do extrato de folhas de *Stachytarpheta cayennensis* e seu efeito sinérgico com artesunato. Completo BMC. Alternar. Med. 14:376-383; 2014.
- OLAYIWOLA G, et al. Sedative and anxiolytic effects of the extracts of the leaves of *Stachytarpheta cayennensis* in mice. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 10(6):568-79; 2013.
- OLAYODE OA, et al. Biochemical, hematological and histopathological evaluation of the toxicity potential of the leaf extract of *Stachytarpheta cayennensis* in rats. Journal of traditional and complementary medicine, 10(6): 544-554; 2019.
- ONOFRE SB, et al. Antifungal activity of the aqueous extract of *Stachytarpheta cayennensis*, (Rich.) Vahl. (Verbenaceae), on oral candida species. Journal of Medicinal Plants Research, 9(2): 42-47; 2015.
- PEDROSO RS, et al. Plantas medicinais: uma abordagem sobre o uso seguro e racional. Physis: Revista de Saúde Coletiva, v. 31, 2021.
- PENIDO C, et al., 2006. Anti-inflammatory and anti-ulcerogenic properties of *Stachytarpheta cayennensis* (LC Rich) Vahl. Journal of Ethnopharmacology, 104(1-2): 225-233; 2006.
- PORTO KRA, et al. Screening of plant extracts and fractions on *Aedes aegypti* larvae found in the state of Mato Grosso do Sul (Linnaeus, 1762) (Culicidae). Anais da Academia Brasileira de Ciência, 89(2): 895-906; 2017.
- QUEIROZ APA, et al. Bioética no uso de animais em experimentação. Ciência Atual, 13(1): 2-19; 2019.
- SANTOS ABN, et al. Plantas medicinais conhecidas na zona urbana de Cajueiro da Praia, Piauí, Nordeste do Brasil. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, 18: 442-450; 2016.
- SCHAPOVAL EES, et al. Antiinflammatory and antinociceptive activities of extracts and isolated compounds from *Stachytarpheta cayennensis*. J Ethnopharmacol 1998, 60(1):53-59.
- SILVEIRA LMS, et al. Atividade antibacteriana de extrato de gervão frente cepas de *Staphylococcus aureus* oxacilinasensíveis e oxacilina-resistentes isoladas de amostras biológicas. Revista Brasileira de Análises Clínicas, 39(4): 299-301; 2007.
- SOUZA TJT, et al. Análise morfo-histológica e fitoquímica de *Verbena litoralis* Kunth. Acta farmacéutica bonaerense, 24(2): 209; 2005.

WILMANOWICZ. Immunologisch aktives phyto-gemisch und seine anwendung bei der prävention und in einem verfahren zur behandlung von effloreszenzen, WO2016128471A1, 2016.

5.2 Capítulo 2

Influência das variáveis da extração na composição química e atividade biológica de extratos das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. (Verbenaceae)

Roberta Sabine Duarte Gondim¹, Flavia Maria Mendonça do Amaral¹

¹ Laboratório de Fitoterapia e Biotecnologia em Saúde, Universidade Federal do Maranhão, Campus Bacanga, Av. dos Portugueses, 1966, 65080-805, São Luís, Maranhão, Brasil.

*Correspondência: robertasabrine2@hotmail.com.br

RESUMO

Este trabalho objetivou padronizar extratos das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae), uma planta medicinal também conhecida por gervão, gerbão e gerbão roxo. A coleta ocorreu em janeiro e fevereiro de 2021 em Paço do Lumiar, Maranhão, Brasil. Após secagem e moagem, as folhas foram submetidas a extração por maceração com ultrassom (MU), percolação (P) e em aparelho de Soxhlet (S), em solvente hidroetanólico, nas relações de hidromódulo 1:6 e 1:8. Foram realizados ensaios de caracterização química e de atividades farmacológicas *in vitro* e *ex vivo*. Nossos resultados mostraram que: *a*) melhor rendimento no extrato P1:8 (17,88%); *b*) teores mais significativos de polifenóis e flavonoides evidenciados no extrato MU1:6 ($257,8 \pm 0,023$ mg EAG/g) para polifenóis e em P1:8 ($7,865 \pm 0,065$ mg EQ/g) para flavonoides; *c*) nos extratos MU 1:8 e S1:8 analisados foram identificados os compostos VerbascosideO, IsoverbascosideO, Luteolina-O-glucuronide, Cistanoside D e Epicatequina-catequina; *d*) em relação a atividade antioxidante, o extrato de MU 1:8 apresentou teores mais significativos (CE50: $6,71 \pm 0,07$ µg/mL); *e*) à exceção de P1:6 todos os demais extratos tiveram Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) contra *Escherichia coli* não patogênica (HB101); em relação a inibição frente *Escherichia coli* patogênica (042), CIM foi obtida em MU1:8 e P1:8 e a CBM foi apresentada somente em P1:8, já em relação *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), todos os extratos apresentaram CIM e CBM; *f*) houve redução significativa ($p < 0,05$) de biofilme para *Escherichia coli* (042) em todos os extratos analisados, exceto P1:6 ($6,25$ mg/mL), e para *Staphylococcus aureus* em todos os extratos 1:6 e nas concentrações de

0,75mg/mL em MU1:8 e P 1:8 e de 0,375 mg/mL em P1:8 e S1:8; g) todos os extratos exerceram, após 48 horas de tratamento, efeito antiproliferativo acentuado em doses acima de 100 µg/mL nas linhagens tumorais Carcinoma hepatocelular (HepG2), melanoma maligno (A-375), carcinoma de mama (MCF-7) e adenocarcinoma colorretal (Caco-2 humano). Os resultados evidenciados, permitem afirmar que a espécie possui potencial para continuidade dos estudos de validação na perspectiva de desenvolvimento de bioprodutos a base de *Stachytarpheta caynnensis*, sendo constatada a influência dos procedimentos extrativos e relação droga: solvente em variáveis dependentes empregadas nesse estudo, possibilitando definirmos parâmetros para padronização dos seus extrativos na dependência da finalidade biológica do uso da espécie.

Palavras-chave: padronização, extratos vegetais, hidromódulo, biofilme, citotoxicidade *in vitro*

INTRODUÇÃO

Atualmente, a Fitoterapia é uma alternativa amplamente aceita à terapia convencional, sendo adotada por diversas camadas sociais, não se restringindo mais às áreas rurais. Sua popularidade crescente nos centros urbanos é impulsionada por regulamentações favoráveis e pela tendência contemporânea de consumo de produtos naturais (BORGES; SALES, 2018, BRASIL, 2020).

Para a garantia de oferta de fitoterápicos com certificação de eficácia, segurança e qualidade, faz-se necessário investimentos em Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação, com ênfase nas espécies vegetais nativas, de grande ocorrência local e uso terapêutico popular, com estímulo aos estudos de validação (NESPOLI et al., 2021).

Na validação de espécies vegetais, os estudos de padronização são cruciais para definir variáveis que impactam na extração de substâncias farmacologicamente relevantes da matriz vegetal, assegurando eficácia e segurança do uso. Essa abordagem otimiza a cadeia produtiva, da matéria-prima vegetal ao produto final, começando na fase inicial da pesquisa básica com materiais específicos para investigação científica (AMARAL et al., 2021; LAZZAROTTO-FIGUEIRÓ et al., 2021).

Hasenclever et al. (2017) afirmam que a inexistência de padronização das preparações vegetais alvo dos estudos de validação, para posterior oferta como medicamentos, representa grande gargalo na cadeia produtiva.

Nesse sentido vale enfatizar que, reconhecidamente, os extratos vegetais representam as preparações mais empregadas nos estudos de validação, bem como nas formulações fitoterápicas derivadas; mas, considerando que tais preparações sofrem por diversas variáveis que podem influenciar na composição química e atividade terapêutica, é imprescindível a padronização desses extratos vegetais, fundamentada na interface da bioatividade e fitoquímica (LAZZAROTTO-FIGUEIRÓ et al., 2021).

Nesse contexto, *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae), nomes vernaculares: gervão e gervão roxo, representa espécie nativa nas Américas, de grande ocorrência especialmente no Brasil (ATKINS, 2005). Essa espécie é bastante utilizada na medicina popular como anti-inflamatória, com atividades cientificamente comprovadas para atividade anti-Leishmania, antipirética, anti-helmíntica, diurética, emoliente e no tratamento de disfunções do aparelho digestivo (LORENZI; MATOS, 2002; MAQUIAVELI et al., 2016; TROJAN-RODRIGUES et al., 2012). Entretanto, apesar de seu destaque como planta medicinal, não há estudos de validação da espécie, com ênfase na padronização de seus derivados vegetais.

Assim, reconhecendo a necessidade de contribuir no desenvolvimento dos estudos com espécies com potencial para obtenção de bioprodutos, esse trabalho objetiva realizar estudo de padronização de extratos das folhas de *Stachytarpheta cayennensis*, a partir da análise de rendimento, composição química e atividades antioxidante, antimicrobiana, inibição da produção de biofilme e citotoxicidade in vitro em linhagens de células cancerosas humanas.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e identificação botânica

As folhas de *Stachytarpheta cayennensis* foram obtidas por coleta manual em habitat natural, no município de Paço do Lumiar (latitude: 02° 31' 51,5" S e longitude 44° 10' 18' O), Maranhão, Brasil; nos meses de janeiro e fevereiro de 2021. A identificação

botânica foi realizada no Herbário de Biologia da Universidade Federal do Maranhão (MAR), com exsicata número 10.538.

Obtenção do extrato

A amostra vegetal foi seca por cinco dias em estufa com circulação de ar (temperatura de 38°C); seguida de trituração em moinho de facas, obtendo pó moderadamente grosso (710 - 250 µm) (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019). O material seco e moído foi submetido a extração empregando etanol a 70% como solvente, por procedimentos a frio (maceração com ultrassom e percolação) e quente (extração por Soxhlet), três ciclos de 30 minutos com intervalo de 10 minutos para maceração com ultrassom, três dias para percolação e em aparelho Soxhlet foram realizadas duas sifonagens completas em temperatura constante de 65 °C. Nesta etapa do estudo foram definidas como variável dos hidromódulos, as relações de droga/solvente de 1:6 e 1:8 (BARROS NETO, 1995; NORIEGA et al., 2005; SIMÕES et al., 2017). Os extratos obtidos foram codificados em: MU 1:6 (maceração com ultrassom em hidromódulo 1:6), MU 1:8 (maceração com ultrassom em hidromódulo 1:8), P 1:6 (percolação em hidromódulo 1:6), P 1:8 (percolação em hidromódulo 1:8), S 1:6 (extração em aparelho de Soxhlet em hidromódulo 1:6) e S 1:8 (extração em aparelho de Soxhlet em hidromódulo 1:8).

As soluções extrativas foram submetidas à concentração sob pressão reduzida em rotaevaporador (SIMÕES et al., 2017; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019).

Desenho experimental

Os ensaios de caracterização química e biológicos foram realizados a partir de planejamento fatorial. Para avaliar a influência de variáveis na extração, foram considerados 02 (dois) fatores: processo de extração em 03 (três) níveis (maceração com ultrassom, percolação e extração em aparelho de *Soxhlet*) e relação de hidromódulo (droga/solvente) em 02 (dois) níveis (1:6 e 1:8). Como parâmetros de análise (variáveis dependentes) foram empregadas: composição química (rendimento, teor de polifenóis totais, teor de flavonoides, perfil cromatográfico), atividades antioxidante, antimicrobiana e inibição da produção de biofilme. Ainda em fase de desenvolvimento, estão sendo realizados ensaios de espécies reativas de oxigênio (EROs), potencial de membrana

mitocondrial (PMM), apoptose e necrose celular. Adicionalmente, fundamentado na análise das variáveis dependentes anteriormente citadas (rendimento, teor de polifenóis totais, atividade antimicrobiana) foram selecionados 03 (três) extratos para avaliação de citotoxicidade *in vitro* em linhagens de células cancerosas humanas (Carcinoma hepatocelular/HepG2, melanoma maligno/A-375, carcinoma de mama/MCF-7 e adenocarcinoma colorretal/Caco-2 humano); e 02 (dois) extratos para análise por Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas, fundamento na avaliação qualitativa através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

Análise por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H)

Para aquisição dos espectros, as amostras foram solubilizadas em 500 μL de DMSO- d_6 e transferidas para tubos de RMN de 5 mm. Os dados de RMN foram obtidos em um espectrômetro de RMN Bruker AscendTM 400 MHz, operando a 9,4 Tesla, observando o núcleo de ^1H em 400,13 MHz, equipado com uma sonda direta (BBO) com campo de gradiente no eixo z. Os espectros foram processados no software TOPSPIN. Os deslocamentos químicos foram referenciados em relação ao sinal do TMS (0,0 ppm) (PRESTES et al., 2009).

Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de massa com ionização por eletrospray (LC-ESI-IT-MS)

Fundamentado na análise qualitativa dos perfis cromatográficos através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) (dados não publicados) e os espectros por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H) foram selecionados dois extratos (MU1:8: extração à frio e S:1:8: extração à quente) para análise por LC-ESI-IT-MS; utilizando sistema de cromatografia líquida (LC) *Shimadzu Prominence* com duas bombas injetoras automáticas Shimadzu LC-20AD (SIL-20A HT) e equipado com uma coluna Phenomenex® Gemini (250 x 4,6mm – 5 μm). As fases móveis foram: água ultrapura acidificada (0,01% HCOOH) (solvente A) e metanol grau HPLC, também acidificado (0,01% HCOOH) (solvente B), a uma taxa de fluxo de 1,0 mL/min, com o gradiente de metanol: 5% a 100% de B em 50 min e 100% de B até 60 min. O volume de injeção foi de 10,0 μL . O LC foi acoplado a espectrômetro de massa (MS) (Amazon X, Bruker, Massachusetts, EUA) equipado com ionização por *eletrospray* (ESI) e

analisador do tipo íon-trap (IT) em modo negativo, nas seguintes condições: voltagem capilar de 5kV e temperatura 325°C, o nitrogênio foi usado tanto como gás de secagem quanto gás nebulizador a uma taxa de fluxo de 12L/min e pressão a 10 psi. Os espectros foram adquiridos na faixa m/z 100-1500 Da, com dois ou mais eventos.

Determinação de rendimento

Os extratos foram filtrados e concentrados em estufa $40 \pm 2^\circ\text{C}$ até a completa evaporação dos solventes, sendo raspado e pesado. Com base na metodologia usada por Rodrigues et al. (2011), estabeleceu-se uma relação entre os resultados obtidos e realizaram-se os cálculos para rendimento para os extratos. Onde: Rendimento do extrato (%) = (o peso do extrato após secagem; / peso do pó utilizado inicialmente na preparação do extrato hidroalcoólico) X 100

Teor de polifenóis totais

As concentrações de polifenóis totais foram determinadas utilizando 100 μL da solução dos extratos hidroetanólicos das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* (2 mg/mL), 100 μL do reagente Folin-Ciocalteu (Merck®) e 1,0 mL da solução de carbonato de sódio a 20%, por 02 (duas) horas em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Ácido gálico (Merck®) foi utilizado como padrão. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-VIS (Lambda 35, Perkin Elmer®) a 760 nm, com resultados expressos em equivalente ácido gálico (EAG) (CHAILLOU et al., 2004; ABREU et al., 2006).

Teor de flavonoides

As concentrações de flavonoides foram obtidas empregando 500 μL da solução dos extratos hidroetanólicos das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* (2 mg/mL) e 500 μL de solução metanólica de cloreto de alumínio a 5%, por 30 minutos, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Quercetina (Merck®) foi utilizada como padrão, com leituras realizadas em espectrofotômetro UV-VIS (Lambda 35, Perkin Elmer) a 425 nm e resultados expressos em equivalente quercetina (EQ) (CHAILLOU et al., 2004; ABREU et al., 2006; DUTRA et al. 2008).

Atividade antioxidante

Foi determinada pelo método fotolorimétrico *in vitro* utilizando o radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), segundo Brand-Willians et al. (1995) com modificações. As amostras dos extratos hidroetanólicos foram diluídas em metanol P.A com diferentes concentrações (5, 25, 50 e 100 µg/mL), em seguida adicionados à solução metanólica de DPPH (40 µg/mL). Após 30 min de reação em temperatura ambiente ao abrigo da luz, a absorbância foi medida em espectrofotômetro UV/VIS a 517nm. Padrão de ácido gálico foi usado como controle positivo nas mesmas condições das amostras. A porcentagem de descoloração do radical DPPH foi obtida com a equação: Atividade antioxidante (%) = $[(A_{DPPH} - A_{amostra})/A_{DPPH}] \times 100$. Onde A_{DPPH} é a absorbância do DPPH (controle negativo) e $A_{amostra}$ é a absorbância do radical na presença dos extratos ou dos padrões. Os resultados foram expressos como valores de CE_{50} (concentração efetiva 50%), concentração do extrato que causa a perda de 50% da atividade de DPPH (BRAND-WILLIAMS et al., 1995; MOLYNEUX, 2004).

Ensaio da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Foi empregada a metodologia de microdiluição em caldo (CLSI, 2018) com adaptações. Suspensões bacterianas de *Escherichia coli* não patogênica (HB101), *Escherichia coli* patogênica (042) e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 foram preparadas e ajustadas pela escala nefelométrica 0,5 de McFarland associada à espectrofotometria de UV-Vis (absorbância_{625nm}=0,08-0,13) para aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. O inóculo bacteriano com 10^8 UFC/mL foi diluído na proporção de 1:20, reduzindo a quantidade de células suspensas para 5×10^6 UFC/mL, 10 uL desta suspensão foram adicionadas aos poços de uma placa de poliestireno contendo 100 uL de meio Mueller Hinton e concentrações dos extratos etanólicos das folhas de *Stachytarpheta cayennensis*, que variaram de 25 a 0,01 mg/mL. O número de células contidas em cada poço foi de aproximadamente suspensas para 5×10^5 UFC/mL. A placa foi incubada por 16 - 20 horas a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. A interpretação da CIM foi realizada pelo ensaio de microtitulação de resazurina (REMA – *Resazurin Microtiter Assay*) (ZAWAWI et al., 2020). Foram adicionados 50 uL de resazurina 0,03% nos poços, seguido de incubação, protegido da luz e em condições estáticas, por 1-2 horas. Os testes foram realizados em triplicata. A

Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi definida através da incubação a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18-24 horas de 5 uL do volume total de cada poço aplicados em meio ágar Mueller Hinton, MacConkey ou Lúria Bertani. A CBM foi atribuída à placa em que não foi observado crescimento visível de microrganismo após o período de incubação estabelecido.

Ensaio de Inibição da formação de biofilme

Para verificar a capacidade de inibição de formação de biofilme *in vitro* dos dos extratos hidroetanólicos das folhas de *Stachytarpheta cayennensis*, foram utilizadas as concentrações sub-inibitórias de $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ da concentração inibitória mínima. As estirpes produtoras de biofilme utilizadas para o ensaio foram *Escherichia coli* 042 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Inóculo contendo aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (preparado como descrito anteriormente) foi diluído na proporção de 1:10, deixando-o a $1,5 \times 10^7$ UFC/mL, 10 uL dessa suspensão bacteriana diluída foram adicionados aos poços da placa de poliestireno contendo 190 uL de meio caldo Lúria Bertani com as concentrações pré-determinadas dos extratos. A placa foi incubada por 24 horas a 37°C em condições estáticas, após este tempo, o meio presente nos poços foi desprezado e submetidos à lavagem por 03 (três) vezes com Tampão Fosfato-Salino (PBS) estéril para remoção das células planctônicas (não aderidas). Adicionou-se 200 uL de metanol (Vetec-99,8%) para fixação do biofilme. Após 15 minutos o metanol foi desprezado e a placa foi posta para secagem ao ar e 200 uL de cristal violeta a 0,3% foram adicionados aos poços seguido de incubação por 20 minutos. Todos os poços foram lavados com água destilada estéril por 06 (seis) vezes, seguido da adição de 200 uL de etanol (Quimex-99,5%) por 2 minutos, para remoção do biofilme corado, 150 uL do extrato do biofilme (biofilme + etanol) foi transferido para poços limpos e realizada a leitura de sua absorbância em espectrofotômetro de microplaca (Heales – Modelo MB-580) com comprimento de onda de 550 nm (FERRO et al., 2016; HUTTENER et al., 2018).

Atividade antiproliferativa

Cultivo celular para atividade antiproliferativa

As linhagens de Carcinoma hepatocelular (HepG2), melanoma maligno (A-375), carcinoma de mama (MCF-7) e adenocarcinoma colorretal (Caco-2 humano) foram cultivadas em meio de cultura recomendado pelas diretrizes da *American Type Culture Collection*. Brevemente, as células foram cultivadas em meio Dulbecco MEM (DMEM/baixa glicose; Vitrocell®)/HAM F-12 (Vitrocell®), pH 7,4, contendo 10% de soro fetal bovino (Gibco®). A cultura foi mantida em atmosfera contendo 95% O₂ e 5% CO₂ a 37 °C., expandidos para atingir a quantidade ideal para os experimentos.

Ensaio de atividade antiproliferativa

Todas as linhagens celulares foram plaqueadas a 5×10^3 células/poço em placas de 96 poços e deixadas *overnight*. Os tratamentos foram realizados por 48 h com os extratos obtidos por maceração em ultrassom, percolação e em aparelho de Soxhlet no hidromódulo de 1:8 (selecionados com base na análise das variáveis dependentes: rendimento, teor de polifenóis totais, atividade antimicrobiana), nas 100, 200, 400, 800 e 1000 µg/mL (diluído em meio de cultura Dulbecco MEM). A triagem de proliferação celular foi avaliada por MTT (BARBISAN et al., 2014). Brevemente, após as 48 horas de incubação com os extratos, o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados 03 (três) vezes com PBS. Depois, 100 µL de [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, do inglês] (MTT) (0,5 mg/mL) foi adicionado em cada poço e as placas incubadas por 1h30min a 37 °C. Em seguida, o meio foi descartado e adicionado 100 µL de solução solubilizante (90 mM HCl em isopropanol absoluto) por 30 minutos sob agitação. As placas foram lidas a 590 nm em espectrofotômetro (VERSAmax Molecular Devices) e a porcentagem de proliferação foi calculada comparando os grupos tratados com o grupo controle (100%). Após os resultados de proliferação celular, análises futuras foram realizadas com as doses mais baixas.

Análises estatísticas

Todos os testes foram realizados em triplicata. Na determinação de teor de polifenóis (mgEAG/g), teor de flavonoides (mgEQ/g) e atividade antioxidante (concentração efetiva 50%: CE₅₀) os resultados foram expressos em média ± desvio padrão (X ± SD). Para os ensaios de citotoxicidade, os valores das concentrações

inibitórias de 50% do crescimento celular máximo (IC_{50}) foram estimados usando *GraphPad Prism* versão 8 para Windows (*GraphPad Software*, CA, EUA). As análises estatísticas para os testes biológicos foram e/ou serão realizadas utilizando o software *GraphPad Prism* e os dados foram analisados por análise de variância *One way* (ANOVA) e teste de Tukey. Valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Embora *Stachytarpheta cayennensis* represente espécie nativa, de grande ocorrência, com amplo e diversificado uso popular, até o momento, não foram evidenciados estudos de certificação da eficácia e segurança, o que estimula esse estudo de validação da espécie com ênfase aos de padronização, com extratos das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* obtidos por diferentes procedimentos extrativos (maceração assistida por ultrassom, percolação e extração em aparelho de Soxhlet) e relações de hidromódulo (1:6 e 1:8), a partir da avaliação das variáveis rendimento, teor de polifenóis e flavonoides.

Na avaliação das variáveis dependentes empregadas nesse estudo, já estudadas, obtivemos resultados que mostram a forte influência dessas variáveis nos extratos.

A tabela 1 apresenta os resultados dos extratos hidroetanólicos das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl., obtidos por planejamento fatorial; evidenciando resultados mais significativos em: *a*) rendimento: extrato obtido por percolação no hidromódulo 1:8 (P 1:8) (17,88%); *b*) polifenóis: extrato MU 1:6 ($257,8 \pm 0,023$ mg EAG/g); *c*) flavonoides: extrato P 1:8 ($7,865 \pm 0,065$ mg EQ/g) para flavonoides; *d*) atividade antioxidante: S1:8 (CE_{50} : $2,238 \pm 0,101$ μ g/mL).

Tabela 1. Rendimento (%), polifenóis totais (mgGA)/g, flavonoides (mgQE)/g e atividade antioxidante por DPPH (CE₅₀) nos extratos hidroetanólicos das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl.

| EXTRATO | RENDIMENTO | POLIFENÓIS TOTAIS (mgGA)/g | FLAVONOIDES (mgQE)/g | DPPH (CE ₅₀) (µg/mL) |
|---------|--------------------|----------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|
| MU 1:6 | 12,72 ^b | 257,8 ± 0,023 ^a | 554,6 ± 0,001 ^b | 2,771 ± 0,14 ^b |
| P 1:6 | 12,91 ^b | 201,3 ± 0,087 ^b | 578,8 ± 0,091 ^b | 2,74 ± 0,005 ^b |
| S 1:6 | 14,32 ^b | 173,2 ± 0,667 ^b | 687,0 ± 0,053 ^b | 2,66 ± 0,012 ^b |
| MU 1:8 | 14,75 ^b | 222,8 ± 0,658 ^b | 444,5 ± 0,162 ^b | 3,012 ± 0,155 ^b |
| P 1:8 | 17,88 ^a | 210,2 ± 0,208 ^b | 786,5 ± 0,065 ^a | 2,425 ± 0,110 ^b |
| S 1:8 | 13,65 ^b | 207,9 ± 0,734 ^b | 587,0 ± 0,121 ^b | 2,238 ± 0,101 ^a |

^a indica diferença significativa em relação aos demais extratos (p≤0,05), ANOVA seguido de Tukey-Kramer; Valor de CE₅₀ do ácido gálico (empregado como controle positivo no ensaio de DPPH): 1,5 µg/mL. MU 1:6: maceração com ultrassom no hidromódulo de 1:6; MU 1:8: maceração com ultrassom no hidromódulo de 1:8; P 1:6: percolação no hidromódulo de 1:6; P 1:8: percolação no hidromódulo de 1:8.; S 1:6: extração em aparelho de Soxhlet no hidromódulo de 1:6; S 1:8: extração em aparelho de Soxhlet no hidromódulo de 1:8.

Comparando os resultados de rendimento do nosso estudo a outros já desenvolvidos com a espécie, obtivemos rendimentos superiores ao de outros estudos realizados com a mesma espécie. O resultado com P1:8 (17,88%) foi 22,63% superior ao obtido pela maceração com metanol realizada por Lopata et al. (2011), chegando a 49% acima do rendimento alcançado pela percolação com etanol empregada por Queiroz (2007). Isso reflete a influência tanto dos solventes quanto do processo extrativo empregados nesses estudos, os quais utilizaram percolação com etanol e em suas extrações, resultados esses diferentes que podem ser condicionados por diversos fatores, com ênfase as variáveis da extração entre esses estudos.

Nos estudos de padronização de extrativos, reconhecidamente a variável rendimento deve ser valorizada na perspectiva de melhoria da rentabilidade do processo, mas vale enfatizar que valores mais expressivos de rendimento, não necessariamente expressam extrato de melhor qualidade dada a possibilidade de representar extração de constituintes indesejáveis (COUTO, 2012; SILVA, 2018).

Embora maceração assistida por ultrassom e extração em Soxhlet sejam reconhecidas como procedimentos de maior produtividade, no nosso estudo, o extrato hidroetanólico de *Stachytarpheta cayennensis* P 1:8 apresentou melhor rendimento (resíduo seco); pode ser justificado pela passagem contínua do líquido extrator renovado na percolação, levando ao esgotamento da planta através do gotejamento lento do material; bem como a possível estabilidade de fitoconstituintes devido a percolação ocorrer em temperatura ambiente (NAVARRO, 2005).

Estudo de Lima et al. (2013) com extrato hidroalcoólico obtido por decocção das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* demonstrou valor de $142,49 \pm 1,38$ mgGA/g de teor de compostos fenólicos, inferior à média do nosso estudo, com resultado mais expressivo na extração obtida por maceração com ultrassom (MU 1:6), reconhecida como mais eficiente, com maior produtividade, pela capacidade das ondas sonoras ocasionarem variação da pressão no solvente, com a formação e colapso de bolhas, ocorrendo o fenômeno da cavitação; favorecendo a extração pelo aumento da permeabilidade da parede celular e aumento da tensão mecânica das células (ARAÚJO; SANTANA, 2020; SILVA et al., 2020).

De acordo com Borges et al., (2015), a extração por percolação apresentou melhor eficiência extrativa (8,75 mg/mL) de fenóis totais, quando comparado aos processos extrativos por refluxo (0,16mg/mL) e extração assistida por ultrassom (0,07mg/mL) nos extratos hidroalcoólicos de frutos de *Myrciaria cauliflora* (Jabuticaba).

Analisando os teores de flavonoides dos nossos extratos, comprovamos, mais uma vez, melhores resultados com extração com percolação em hidromódulo 1:8 (P 1:8), evidenciando a influência das duas variáveis na extração desses constituintes. Nossos resultados foram consideravelmente superiores aos obtidos em outros estudos realizados com a mesma espécie. Com valores acima de 100% em relação a outros estudos conduzidos com a mesma espécie. Estudos de Onofre et al. (2015), apresentaram teores de $2,69 \pm 0,49$ a $6,21 \pm 0,67$ com frações hexânica, acetato de etila e etanol obtidas por maceração; resultados esses diferentes que podem ser condicionados por diversos fatores, com ênfase as variáveis da extração entre esses estudos.

Com base no escore de Melo et al. (2010), todos os extratos de *Stachytarpheta cayennensis* demonstram boa atividade antioxidante, com resultado mais significativo em S1:8, evidenciando a influência das 02 (duas) variáveis.

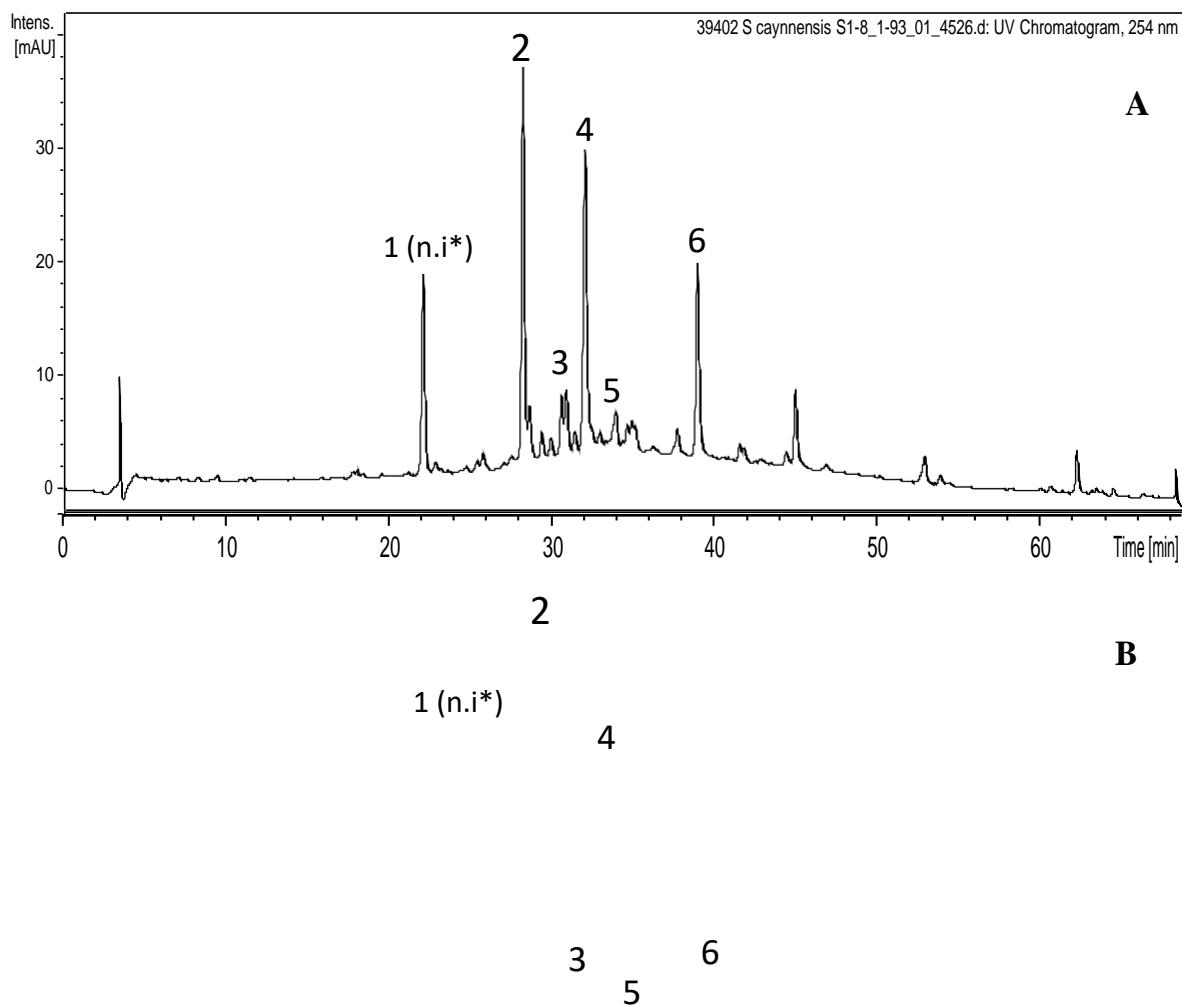
Estudos de atividade antioxidante já realizados com extratos das folhas de *Stachytarpheta cayennensis*, pelo método do DPPH, também evidenciaram a capacidade antioxidante dos extratos, mas sendo observado valores maiores em nossos extratos, o que pode ser justificado pelas diferenças metodológicas entre esses estudos, com ênfase as variáveis a extração (RAYNIYAR et al., 2014; ONOFRE et al., 2015a; EZENYI et al., 2016).

A técnica de RMN de ^1H foi empregada para se obter o perfil químico dos extratos, e pode-se observar que, de maneira geral, o perfil das amostras é bastante semelhante, apresentando possivelmente a mesma composição química, tanto em relação a um constituinte majoritário ou a uma classe de constituintes químicos. Este método espectroscópico permite a identificação de metabólitos em misturas complexas, como extratos vegetais, sem a necessidade de isolamento prévio (KIM et al., 2011). No entanto, a RMN pode ser desafiadora devido à ampla sobreposição de sinais em regiões plotadas do espectro, como observado nos espectros de RMN de ^1H (APÊNDICE 1). Assim, os espectros de RMN revelaram sinais expressivos na região de hidrogênios aromáticos (5,50 a 8,50 ppm), que podem estar associados à presença de compostos fenólicos, principalmente os flavonoides. Da mesma forma, a observação de sinais na região alifática (0,50 a 5,50 ppm), pode ser atribuída à presença de terpenoides, carboidratos (5,50 a 3,00 ppm), bem como ácidos orgânicos (0,50 a 3,00 ppm) presentes nos extratos. Embora a extensa sobreposição de sinais em todas as regiões espectrais dificulte a identificação de metabólitos específicos nos extratos, os resultados apresentados neste trabalho corroboram estudos anteriores com a espécie.

Foi possível observar a através do espectro de RMN que a presença do composto Verbascosideo, que foi obtido em clorofórmio deuterado (CDCl_3), revelando dois grupos distintos de sinais para os prótons aromáticos, cada um representando sistemas ABX diferentes. Um desses grupos está associado à substituição do ácido cafeico, evidenciando sinais característicos do sistema AB em δ : 6.18 (1H, d, $J = 15.94$ Hz, H-8) e 7.44 (1H, d, $J = 15.90$ Hz, H-7), dupletos largos com altas constantes de acoplamento indicando estarem em posição *trans* (XIE et al., 2012; GARRO, 2021). O próton anomérico no grupo metil da ramnose foi facilmente identificado, mostrando padrões de deslocamento do duplete característico em δ : 5.17 (1H, d, $J = 3.7$ Hz, Rha-H-1) indicando a substituição do grupo funcional OH pela ligação 3-O-Aglicona (KHOUND, 2023). Além disso, o

deslocamento químico mais elevado do próton H-4G indica a influência da substituição do ácido cafeico no C-4G. A influência do grupo aglicona em C-1G também foi observada pelos sinais específicos. Em resumo, os espectros de RMN de ^1H permitiram a caracterização dos resíduos aromáticos, a identificação do grupo aglicona em C-1 e a esterificação pela porção cafeóila em C-4G nos compostos. Sugerindo assim, que o Verbascodieno é o marcador analítico da espécie.

Na identificação dos principais compostos químicos presentes foi obtido o perfil cromatográfico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massa com Ionização por *Electrospray* (LC-ESI-IT-MS) dos extratos hidroetanólicos das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* MU 1:8 e S 1:8 (Figura 1), com perfis cromatográficos sem indicar diferenças quanto a identificação dos compostos químicos. A escolha desses dois extratos foi fundamentada na avaliação preliminar dos cromatogramas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) (dados não publicados), Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H), avaliação da atividade antioxidante, teor de fenóis e flavonoides. Foi observado que os extratos de maceração em ultrassom, percolação e em aparelho de Soxhlet, nos hidromódulos de 1:6 e 1:8, tiveram o mesmo perfil qualitativamente nos cromatogramas por HPLC e RMN de ^1H ; e da avaliação química o extrato de Soxlet 1:8 tem a melhor atividade antioxidante, e o extrato de Maceração 1:8 teve a menor atividade antioxidante. Sendo assim, optou-se por fazer a investigação por LC-ESI-IT-MS de 01 (um) extrato obtido por método extrativo à quente (aparelho de Soxhlet) e 01 (um) à frio (maceração em ultrassom).



* Não identificado

Figura 1. Cromatogramas obtidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massa com Ionização por *Electrospray* (LC-ESI-IT-MS), no comprimento de onda (λ) de 270 nm, dos extratos hidroetanólicos das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. obtidos em aparelho de Soxhlet no hidromódulo 1:8 (S 1:8) (A) e por maceração em ultrassom no hidromódulo 1:8 (MU 1:8) (B)

Com base na dereplicação dos espectros de massas obtidos para cada pico foi possível identificar 05 (cinco) compostos em ambos extratos: a) verbascosídeo (pico 2) (Glicosídeo feniletanoide); b) isoverbascosídeo (Glicosídeo feniletanoide) (pico 3), c) luteolina-O-glicuronídeo (pico 4) (flavonoide - flavonas), d) cistanosídeo D (pico 5) (Glicosídeo feniletanoide) e epicatequina-catequina (pico 6) (flavonois/polifenóis) (tabela 2).

Tabela 2. Compostos identificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massa com Ionização por *Electrospray* (LC-ESI-IT-MS) nos extratos hidroetanólicos das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. obtidos por maceração em ultrassom no hidromódulo 1:8 (MU 1:8) e em aparelho de Soxhlet no hidromódulo 1:8 (S 1:8)

| Nº | Tempo de retenção (min) | [M-H] | MSn Fragmento | Composto | Fórmula molecular |
|----|-------------------------|--------|------------------------|--------------------------|---|
| 2 | 28.2 | 623,20 | 659,461,62,315,461,315 | Verbascosídeo | C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅ |
| 3 | 30.7 | 623,15 | 461, 315, 134 | Isoverbascosídeo | C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅ |
| 4 | 32.2 | 461.04 | 461, 284, 282 | Luteolina-O-glicuronídeo | C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂ |
| 5 | 33.9 | 651.20 | 583, 475, 328, 283 | Cistanosídeo D | C ₃₁ H ₄₀ O ₁₅ |
| 6 | 39.0 | 571.02 | 284 | Epicatequina-catequina | C ₁₅ H ₂₂ O ₁₃ |

Verbascosídeo, classificado como glicosídeo feniletanoide, tem sido caracterizado por ação anti-inflamatória e anti-ulcerogênica (PENIDO et al., 2006), no tratamento da leishmaniose tegumentar (MAQUIAVELI et al., 2016) e propriedades anticancerígenas *in vivo* e/ou *in vitro* contra diferentes tipos de tumores ou linhagens de células cancerígenas (KHALAF; JASIM; IBRAHIM, 2021).

Verbascosídeo e isoverbascosídeo foram identificados em estudos com extratos de partes aéreas de *Stachytarpheta cayennensis* (KOOIMAN, 1975; SCHAPOVAL et al., 1998; ADEBAJO et al., 2007). Estudos de Souza et al. (2010; 2011) demonstraram a importância dos constituintes químicos verbacosídeo, martinósídeo e ácido betulínico para o potencial antioxidante da *Stachytarpheta cayennensis*, uma vez que esses componentes foram capazes de diminuir a peroxidação lipídica e prevenir contra lesões mitocondriais por estresse oxidativo.

Apesar da vasta ocorrência dos metabólitos secundários isolados na família Verbenaceae, *Stachytarpheta cayennensis* ainda é pouco explorado do ponto de vista químico. Os metabólitos luteolina-O-glicuronídeo, cistanosídeo D e epicatequina-catequina estão sendo relatados pela primeira vez para a espécie.

Houve diminuição do teor do composto 6 (epicatequina-catequina), o que resultou em menor atividade antioxidante com MU1:8, a extração desse composto foi melhor em S1:8, que demonstrou maior atividade antioxidante. Já foi demonstrado que a catequina é capaz de reduzir danos oxidativos (MERCER et al., 2005) e que epicatequina modulou a expressão e a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase (RAMIREZ-SANCHEZ et al., 2013).

Os glicosídeos feniletanoides são característicos constituintes das famílias Lamiaceae e Verbenaceae. Dois dos compostos isolados, nomeadamente acteoside e iso-acteoside já foram encontrados em *Stachytarpheta cayennensis* (SCHAPOVAL et al., 1998; ADEBAJO et al., 2007; PEREIRA et al., 2008), e acteoside também em *Stachytarpheta glabra* (VICCINI et al., 2008), enquanto outros glicosídeos feniletanoides como leucosceptosídeo A, martinósídeo, e jionósídeo foram detectados pela primeira vez no gênero *Stachytarpheta* no estudo de Froelich e colaboradores (2008). Em espécies da família Verbenaceae, a atividade antioxidante pode ser devido a flavonoides e também, a glicosídeos fenilpropanóides que foram detectados em grande número de espécies desta família (MENSOR et al., 2001).

A luteolina é um flavonoide natural da subclasse das flavonas, a sua propriedade antioxidante é amplamente reportada e de grande interesse para a indústria (KHAN et al., 2016; IMRAN et al., 2019; BOEING et al., 2020). Além de possui atividade anti-inflamatória (VILLALVA et al., 2019; BOEING et al., 2020), anticancerígenos (AZIZ et al., 2018). No entanto, as baixas solubilidade e biodisponibilidade da luteolina limitam suas aplicações funcionais (LUO et al., 2019).

Na avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos hidroetanólicos das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* foi evidenciado que, exceto P1:6, todos os extratos foi determinada Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) contra *Escherichia coli* não patogênica (HB101); em relação a inibição frente *Escherichia coli* patogênica (042), os extratos MU1:8 e P1:8 promoveram CIM, enquanto

o extrato de P1:8 apresentou CBM; já em relação *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), todos os extratos apresentaram CIM e CBM (tabela 3).

Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) frente *Escherichia coli* não patogênica (HB101), *Escherichia coli* patogênica (042) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) dos extratos hidroetanólicos das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. obtidos por planejamento fatorial

| Extratos | <i>Escherichia coli</i> não patogênica (HB101) | <i>Escherichia coli</i> patogênica (042) | <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538) |
|---|--|--|--|
| Concentração Inibitória Mínima (CIM) – (mg/mL) | | | |
| MU1:6 | 11,35 | NE | 5,68 |
| MU1:8 | 5,68 | 22,72 | 2,84 |
| P 1:6 | 11,35 | NE | 5,68 |
| P 1:8 | 5,68 | 11,35 | 1,42 |
| S 1:6 | 5,68 | NE | 5,68 |
| S 1:8 | 5,68 | NE | 1,42 |
| CLO* | 0,0009 | NA | 0,0019 |
| AMP** | NA | 0,0019 | NA |
| Concentração Bactericida Mínima (CBM) – (mg/mL) | | | |
| MU1:6 | 10,33 | NE | 5,68 |
| MU1:8 | 5,68 | NE | 2,84 |
| P 1:6 | NE | NE | 5,68 |
| P 1:8 | 5,68 | 22,72 | 1,42 |
| S 1:6 | 10,33 | NE | 5,68 |
| S 1:8 | 5,68 | NE | 2,84 |
| CLO* | 0,0009 | NA | 0,0019 |
| AMP** | NA | 0,0041 | NA |

MU 1:6: maceração com ultrassom no hidromódulo de 1:6; MU 1:8: maceração com ultrassom no hidromódulo de 1:8; P 1:6: percolação no hidromódulo de 1:6; P 1:8: percolação no hidromódulo de 1:8; S 1:6: extração em aparelho de Soxhlet no hidromódulo de 1:6; S 1:8: extração em aparelho de Soxhlet no hidromódulo de 1:8. CLO*: clorafenicol; AMP**: ampicilina; NA: não se aplica; NE: não encontrado.

Todos os extratos no hidromódulo de 1:8 apresentaram CIM e CBM frente a *Escherichia coli* não patogênica. A quantidade de solvente pode estar relacionada a extração dos metabólitos responsáveis por essa ação antimicrobiana.

Na avaliação da atividade antimicrobiana do extrato metanólico das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* obtido por maceração, observou uma CIM de 14,12 (mg/mL)

frente ao *Staphylococcus aureus* (Okoye et al., 2010). Os nossos dados apresentaram CIM inferiores a este estudo, comprovando que diferenças metodológicas entre esses estudos, servem de validação para uma resposta biológica. Esta atividade biológica pode ser atribuída a presença do verbascosídeo que atua na síntese protéica do microorganismo, utilizando como mecanismo de ação a morte da bactéria por inibição da leucina (AVILA et al., 1999).

Silveira e colaboradores (2007) avaliaram a atividade antibacteriana *in vitro* do extrato hidroalcoólico obtido por maceração sobre cepas de *Staphylococcus aureus* oxacilina-sensíveis e oxacilina-resistentes; apresentado Concentração Inibitória Mínima (CIM) variando de 0,4 a 1,6 mg/mL e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de 1,6 a 12,5 mg/mL; com resultados indicando que a planta tem moderada atividade antibacteriana (SILVEIRA et al., 2007).

O extrato de percolação 1:8 mostrou-se um desempenho antimicrobiano em todas as cepas avaliadas. A *Stachytarpheta cayennensis* é uma espécie rica em polifenóis, e por não ter sido submetida a extração à quente, preservou a estabilidade do material e a resposta biológica (PEREIRA et al., 2006).

Atividade antimicrobiana também é relatada em testes com polifenóis. Um exemplo de estudo relacionando a atividade antimicrobiana com polifenóis é o trabalho realizado por Rashd et al (2014), no qual o extrato metanólico de *Diospyros virginiana* L. apresentou atividade antimicrobiana frente a diversos microrganismos. Esta atividade foi associada aos polifenóis quercetina, miricetina e luteolina, isolados da planta.

A atividade antibacteriana de flavonoides é comprovada por muitos autores (COWAN, 1999; CUSHNIE et al., 2005; CUSHNIE & LAMB, 2011). Cushnie e Lamb (2011) propõem que esta atividade dos flavonoides está relacionada a danos na membrana citoplasmática (causada por perfuração e/ ou redução da fluidez da membrana), inibição da síntese de ácidos nucleicos (causada pela inibição da topoisomerase) e inibição do metabolismo energético (causada pela inibição da NADH citocromo C redutase).

No ensaio de inibição da formação de biofilme pelos extratos hidroetanólicos das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* (figura 2) foi evidenciado: a) em relação *Escherichia coli* 042 todos os extratos no hidromódulo 1:6 ocasionaram inibição significativa, exceto P1:6 (6,25 mg/mL), o qual não apresentou CIM e CBM (tabela 3); já em relação aos extratos no hidromódulo 1:8 houve redução estatisticamente

significante, quando comparamos com o grupo controle, exceto em P 1:8 (6 mg/mL); b) no biofilme de *Staphylococcus aureus* todos os extratos no hidromódulo 1:6 promoveram reduções com significância estatística ($p < 0,05$); enquanto extratos no hidromódulo de 1:8, apresentaram redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nas seguintes concentrações: 0,75mg/mL (MU1:8); 0,75 mg/mL (P1:8); 0,375 mg/mL (P 1:8) e 0,375 mg/mL (S 1:8).

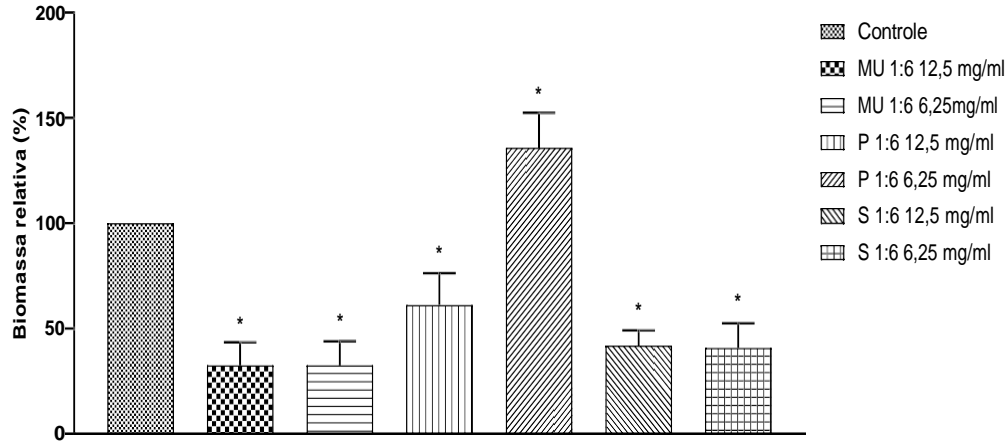
Até o presente momento, não há informações científicas sobre o efeito do extrato de *Stachytarpheta cayennensis* na inibição da formação de biofilme. Nesse sentido, deve ser estimulado a continuidade dos estudos nesse segmento, considerando que a formação de biofilmes é uma medida usada para o desenvolvimento da resistência bacteriana (BOUYAHYA et al., 2017).

Os compostos fenólicos desempenham um papel importante na prevenção e controle do desenvolvimento de biofilmes, nomeadamente os polifenóis, impedem a sua adesão a superfícies ou tecidos epiteliais, e os flavonóides, intervêm com moléculas reguladoras de mecanismos de *quorum sensing* (mecanismos de comunicação entre bactérias).

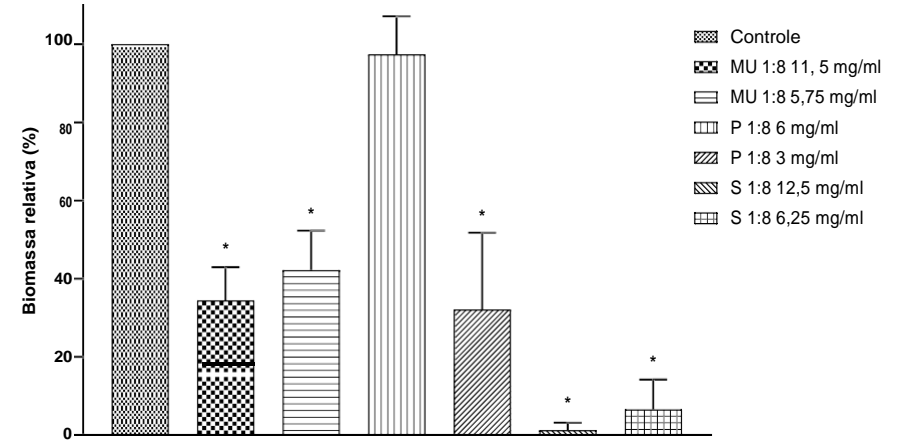
É possível afirmar que esses resultados corroboram com os resultados encontrados para compostos fenólicos uma vez que aquele extrato em que foi utilizada uma menor concentração para inibir a produção do biofilme em teste foi o produzido MU1:6 sendo este o que obteve maiores quantidades de compostos fenólicos com $257,8 \pm 0,023$ mgGA)/g.

De acordo com Auricchio e Bacchi (2003) é difícil comparar atividade antimicrobiana de extratos de plantas pois são muitas as variáveis que irão influenciar no resultado como aspectos climáticos que exercem influência na composição química do vegetal, parte da planta estudada, forma de preparar o extrato e, por isso, a necessidade de padronização.

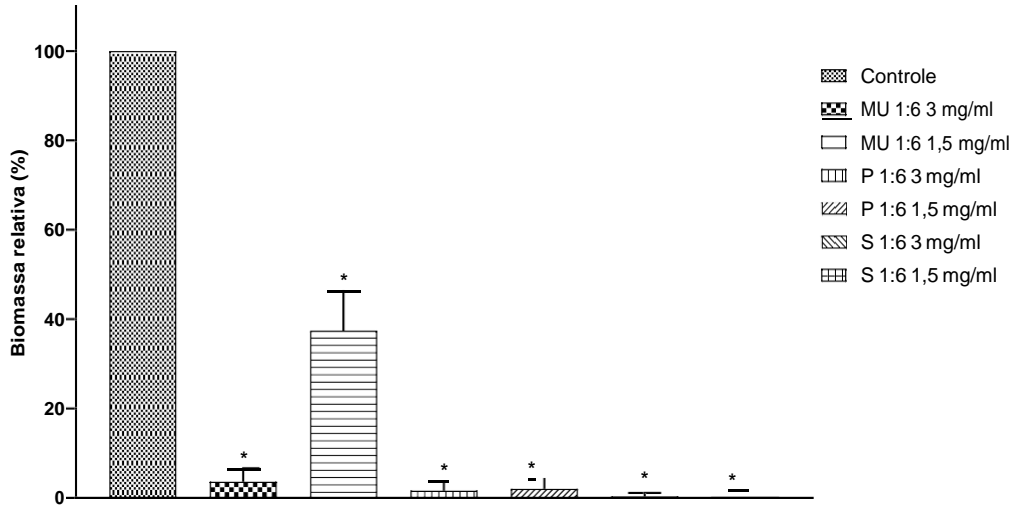
Escherichia coli 042



Escherichia coli 042



Staphylococcus aureus ATCC 6538



Staphylococcus aureus ATCC 6538

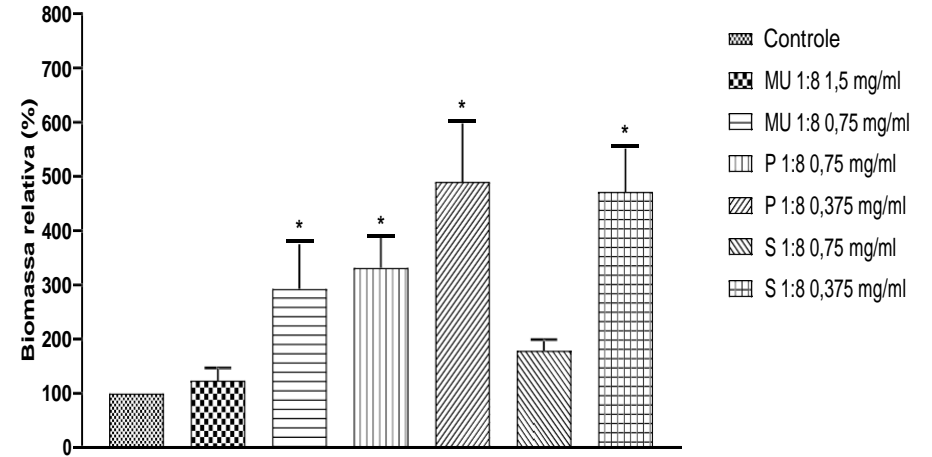


Figura 2. Efeitos dos extratos hidroetanólicos das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl., obtidos por planejamento fatorial sobre a produção de biofilme de *Escherichia coli* 042 e *Staphylococcus aureus*. Legenda: MU 1:6: maceração com ultrassom no hidromódulo de 1:6; MU 1:8: maceração com ultrassom no hidromódulo de 1:8; P 1:6: percolação no

hidromódulo de 1:6; P 1:8: percolação no hidromódulo de 1:8; S 1:6: extração em aparelho de Soxhlet no hidromódulo de 1:6; S 1:8: extração em aparelho de Soxhlet no hidromódulo de 1:8.

Foi realizada uma análise antiproliferativa dos extratos em linhagens de Carcinoma hepatocelular (HepG2), melanoma maligno (A-375), carcinoma de mama (MCF-7) e adenocarcinoma colorretal (Caco-2 humano) (Figuras 3,4,5,6).

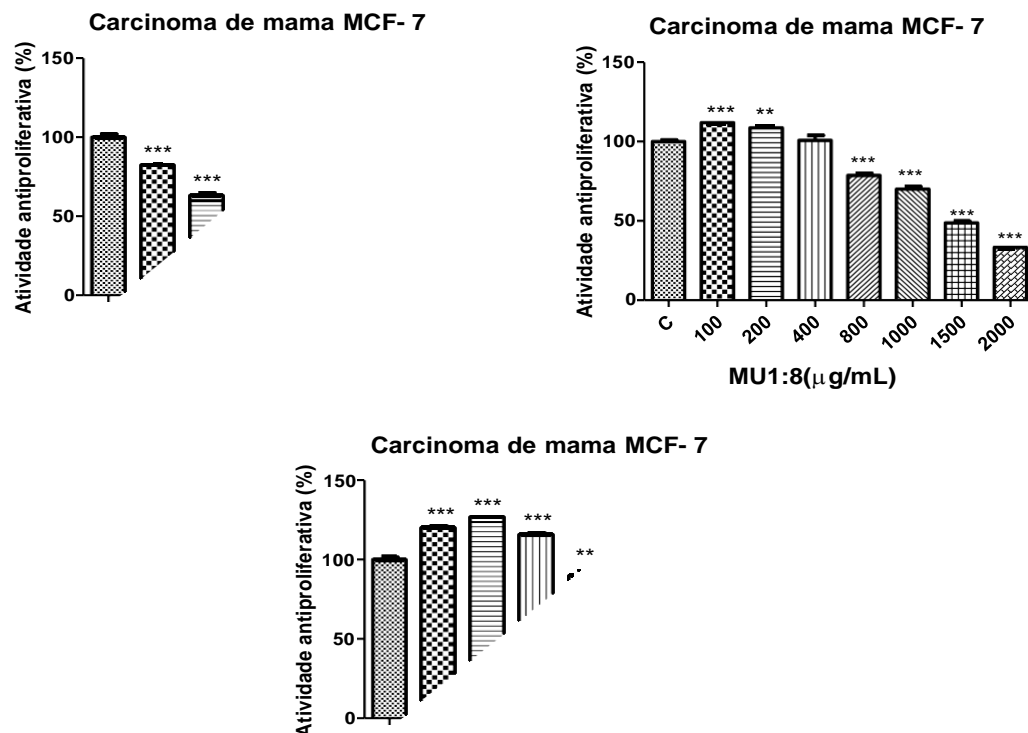


Figura 3: Atividade antiproliferativa dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl., obtidos por planejamento fatorial em células de carcinoma de mama MCF-7. A atividade antiproliferativa foi determinada por MTT após tratamento por 48 horas com os extratos. A porcentagem de proliferação foi calculada quando comparada ao grupo controle (C) (100%). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das médias (triplicata). As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância *One-way* (ANOVA), seguida de pós-teste Newman-Keuls. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$ em comparação com o controle (C). Legenda: MU 1:8: maceração com ultrassom no hidromódulo de 1:8; S 1:8: extração em aparelho de Soxhlet no hidromódulo de 1:8; P 1:8: percolação no hidromódulo de 1:8.

Os resultados mostraram que as células tratadas com o extrato de maceração, percolação e soxlet no hidromódulo de 1:8 por 48 horas apresentaram uma diminuição na proliferação do carcinoma de mama (MCF-7) dependente da dose comparado ao controle (Figura 3). A atividade antiproliferativa dos extratos S1:8 nas células MCF-7 nas doses de 100, 200, 400, 800 e 1.000 $\mu\text{g/mL}$ foi de 65,06%, 71,58%, 72,61%, 74,56%, 74,86%, respectivamente; dos extratos MU1:8 nas células MCF-7 nas doses de 800, 1000, 1500 e 2000 $\mu\text{g/mL}$ foi de 21,34%, 29,94%, 51,25%, 66,63%, respectivamente; dos extratos P1:8

nas doses de 800, 1.000, 1500 e 2000 $\mu\text{g/mL}$ foi de 10,17%, 20,2%, 53,52%, 64,3%, respectivamente.

Nossos resultados indicam que os extratos de maceração, percolação e soxlet no hidrómodulo 1:8 exerceram um efeito antiproliferativo acentuado sobre as células MCF-7. Na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$, o extrato de soxlet teve um melhor efeito antiproliferativo (74,86%).

Houve diminuição na proliferação do Adenocarcinoma Colorretal Caco-2 tratadas por 48 horas com os extratos de maceração, percolação e soxlet no hidromódulo de 1:8 (Figura 4).

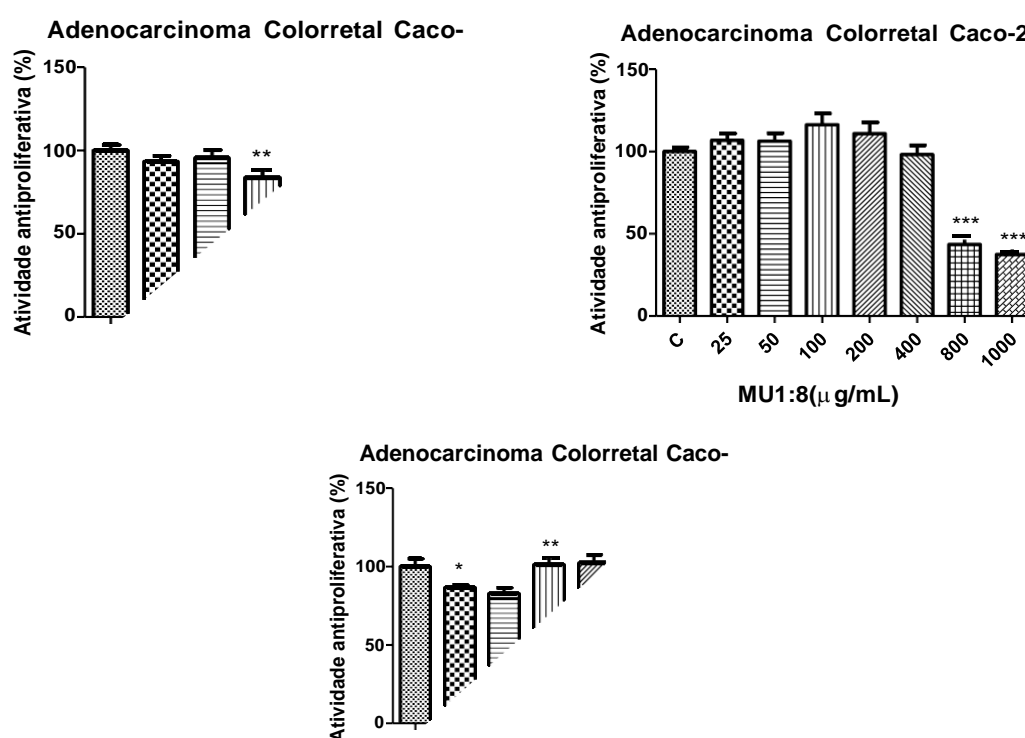


Figura 4: Atividade antiproliferativa dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl., obtidos por planejamento fatorial em células de adenocarcinoma colorretal Caco-2. A atividade antiproliferativa foi determinada por MTT após tratamento por 48 horas com os extratos. A porcentagem de proliferação foi calculada quando comparada ao grupo controle (C) (100%). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das médias (triplicata). As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância *One-way* (ANOVA), seguida de pós-teste Newman-Keuls. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$ em comparação com o controle (C). Legenda: MU 1:8: maceração com ultrassom no hidromódulo de 1:8; S 1:8: extração em aparelho de Soxhlet no hidromódulo de 1:8; P 1:8: percolação no hidromódulo de 1:8.

A atividade antiproliferativa dos extratos S1:8 nas células Caco-2 nas doses de 100, 200, 400, 800 e 1.000 $\mu\text{g/mL}$ foi de 16,4%, 46,2%, 61,06%, 69,2%, 67,36%

respectivamente; dos extratos MU1:8 nas doses de 400, 800 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ foi de 1,87%, 56,49%, 62,52%, respectivamente, enquanto os extratos de P1:8 nas doses de 400, 800 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ foi de 11,23%, 49,49%, 66,39%, respectivamente. Na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$, o extrato de soxlet teve um melhor efeito antiproliferativo (67,36%), frente as células Caco-2.

Em relação ao tratamento de 48 horas com os extratos de maceração, percolação e soxlet no hidromódulo de 1:8, os resultados mostraram uma diminuição na proliferação do Melanoma Maligno A-375 dependente da dose (Figura 5).

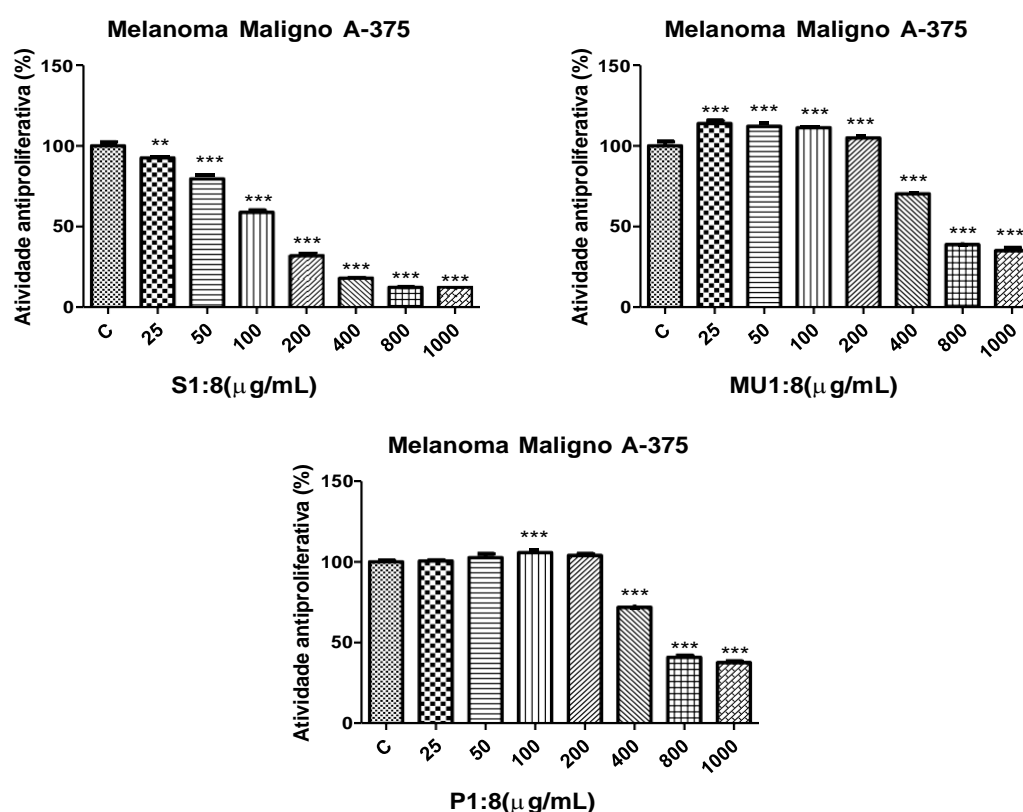


Figura 5: Atividade antiproliferativa dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl., obtidos por planejamento fatorial em células de Melanoma Maligno A-375. A atividade antiproliferativa foi determinada por MTT após tratamento por 48 horas com os extratos. A porcentagem de proliferação foi calculada quando comparada ao grupo controle (C) (100%). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das médias (triplicata). As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância *One-way* (ANOVA), seguida de pós-teste Newman-Keuls. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$ em comparação com o controle (C). Legenda: MU 1:8: maceração com ultrassom no hidromódulo de 1:8; S 1:8: extração em aparelho de Soxhlet no hidromódulo de 1:8; P 1:8: percolação no hidromódulo de 1:8.

A atividade antiproliferativa dos extratos S1:8 nas células A-375 nas doses de 400, 800, 1000 $\mu\text{g/mL}$ foi de 81,96%, 87,68% e 87,96%, respectivamente; extratos MU1:8 nas doses de 400, 800, 1.000 $\mu\text{g/mL}$ foi de 29,66%, 61,16%, 64,88%, respectivamente; dos extratos P1:8 nas concentrações 400, 800, 1000 $\mu\text{g/mL}$ foi 28,18%, 59,16%, 62,49%,

respectivamente. Na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$, o extrato de soxlet teve um melhor efeito antiproliferativo (87,96%), frente as células A-375.

Avaliando a resposta dos extratos frente as células de carcinoma hepatocelular Hep G2, observou que as células tratadas com o extrato de maceração, percolação e soxlet no hidromódulo de 1:8 por 48 horas apresentaram uma diminuição na proliferação dose dependente (Figura 6).

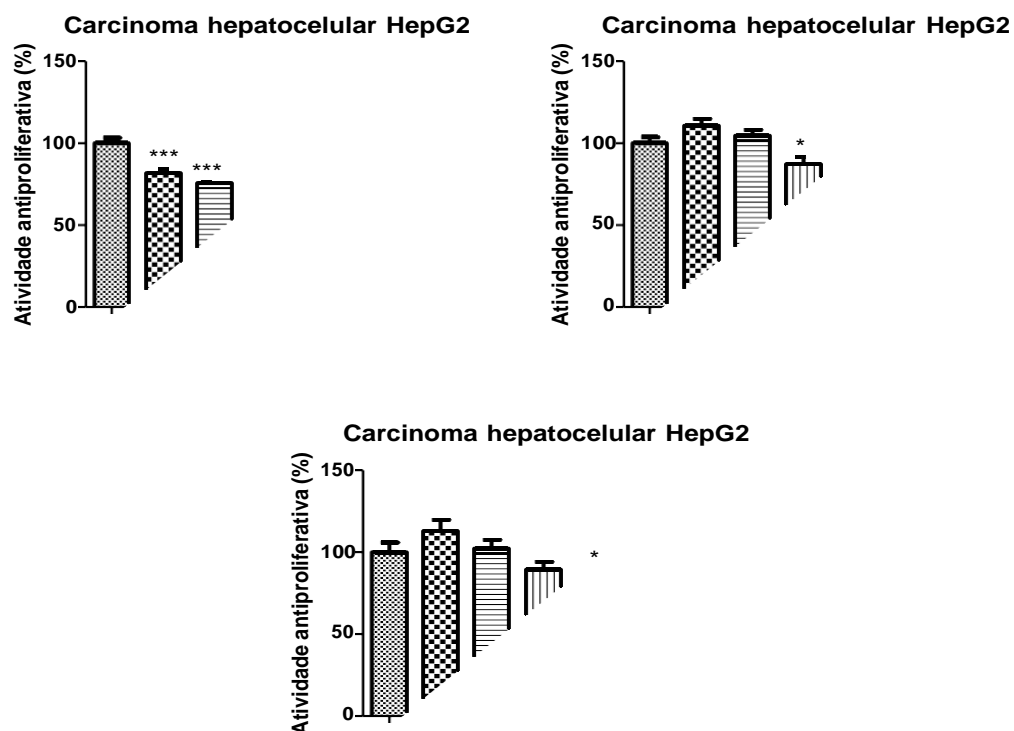


Figura 6: Atividade antiproliferativa dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl., obtidos por planejamento fatorial em células de Carcinoma Hepatocelular Hep G2. A atividade antiproliferativa foi determinada por MTT após tratamento por 48 horas com os extratos. A porcentagem de proliferação foi calculada quando comparada ao grupo controle (C) (100%). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das médias (triplicata). As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância *One-way* (ANOVA), seguida de pós-teste Newman-Keuls. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$ em comparação com o controle (C). Legenda: MU 1:8: maceração com ultrassom no hidromódulo de 1:8; S 1:8: extração em aparelho de Soxhlet no hidromódulo de 1:8; P 1:8: percolação no hidromódulo de 1:8.

A atividade antiproliferativa dos extratos S1:8 nas células Hep G2 nas doses de 400, 800, 1000 $\mu\text{g/mL}$ foi de 77,64%, 77,99%, 77,99%, respectivamente. E dos extratos MU1:8 nas doses de 400, 800, 1.000 $\mu\text{g/mL}$ foi de 13,51%, 30,59%, 37,79%, respectivamente. E os extratos P1:8 nas concentrações 400, 800, 1.000 $\mu\text{g/mL}$ foi 10,68%, 19,95%, 33,41%, respectivamente. Na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$, o extrato de soxlet teve um melhor efeito antiproliferativo (77,99%), frente as células Hep G2.

Muitas plantas têm sido usadas pela medicina tradicional para tratar o câncer e constituem a base da medicina moderna, uma vez que a maioria dos agentes quimioterápicos são moléculas identificadas e isoladas de plantas. Esses compostos bioativos derivados de plantas são capazes de afetar o crescimento, proliferação e diferenciação celular, reverter as disfunções epigenéticas relacionadas ao câncer, prevenir metástases, reduzir a tumorigênese e aumentar a eficácia da rádio e quimioterapia (PISTOLLATO et al., 2015).

O estresse oxidativo, causado pelo desequilíbrio entre a formação de espécies reativas e o nível de compostos antioxidantes em organismos vivos, é uma das principais causas de desordens celulares, que culmina no aparecimento de diversas doenças, dentre elas o câncer (ISSA et al., 2006). O extrato de soxlet teve um melhor efeito antiproliferativo frente a todas as linhagens tumorais avaliadas no presente estudo, fato que pode ser justificado pelo resultado mais significativo na avaliação da atividade antioxidante, analisada a partir da capacidade de sequestro de radicais DPPH livres.

A presença dos compostos fenólicos nos extratos também justifica este efeito, visto que os fenóis dos extratos de plantas medicinais são de grande interesse como estratégia anticâncer devido à sua atuação em diversas vias de sinalização e baixos efeitos colaterais. Foi relatado que os polifenóis derivados de plantas têm o potencial de inibir a progressão do tumor e sensibilizar as células cancerígenas à quimioterapia e radioterapia (VANDEN BERGHE, 2012).

As drogas quimioterápicas produzidas a partir dos polifenóis podem melhorar a sobrevida do paciente, com baixo efeito colateral, regulando as vias de sinalização celular, reduzindo a invasão e metástase das células cancerígenas, protegendo as células normais durante o tratamento e reduzindo os danos causados pela quimioterapia e radioterapia (CHANG et al., 2015), ressaltando a capacidade destes em inibir a proliferação celular e/ou induzir apoptose. A apoptose, também conhecida como morte celular programada, elimina as células danificadas ou células que podem ser inapropriadamente induzidas a proliferar, representando, assim, um mecanismo de proteção contra a transformação neoplásica e o desenvolvimento de tumores (D'ARCHIVIO et al., 2008; MASELLA et al., 2004).

É possível inferirmos que a constatação da influência das variáveis de extração, especialmente na resposta biológica, deve estimular a continuidade dos estudos nessa linha investigação.

CONCLUSÕES

Os processos metodológicos empregados nesse estudo possibilitou definir as variáveis que interferem nos extrativos das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl., indicando que as variáveis: procedimento extrativo e hidromódulo, influenciam na concentração de constituintes químicos, conseqüentemente na sua atividade biológica, comprovando que os melhores resultados, são dos extratos obtidos em hidromódulo 1:6 e como método extrativo os obtidos por maceração para a avaliação química, antimicrobiana e inibidora da produção de biofilme bacteriano. Na avaliação antiproliferativa, o extrato com melhor efetividade é o de soxlet no hidromódulo 1:8, o que nos possibilita a definição de parâmetros para padronização dos extratos de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. na dependência da finalidade biológica do uso da espécie. Na garantia da qualidade de extratos das folhas *S. cayennensis*, além da adoção dessas variáveis para otimização, o composto Verbascosideo pode ser empregado como marcador analítico no controle de qualidade da espécie vegetal.

REFERÊNCIAS

ABREU BVB, BATISTA MCA, AZEVEDO CC, DUTRA RP, NOGUEIRA AMC, COSTA MCP, RIBEIRO MNS. Quantificação de polifenóis de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (túbia) coletado no cerrado maranhense. Revista Ciências da Saúde, 8: 18-24; 2006.

ADEBAJO, A.C.; OLAWODE E.O.; OMOBUWAJO O.R.; ADESANYA S.A.; BEGROW F.; ELKHAWAD A.; AKANMU M.A.; EDRADA R.; PROKSCH P.; SCHMIDT T.J.; KLAES M.; VERSPOHL E.J. Hypoglycaemic constituents of *Stachytarpheta cayennensis* leaf. Planta med. 73(3), p.214-50, Feb. 2007.

ALVES TMA, KLOOS H, ZANI CL. Eleutherinone, a Novel Fungitoxic Naphthoquinone from *Eleutherine bulbosa* (Iridaceae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 98(5): 709-712; 2003.

AMARAL, F. M. M.; OLIVEIRA, M. A.; COUTINHO, D. F.; GODINHO, J. W. L. S.; CARTÁGENES, M. S. S.; NEIVA, V. A.; NEIVA NETO, R. R.; BASTOS, W. M.

Estudo de validação de espécies vegetais: o elo entre o saber popular e o fitoterápico. In: *Trajatória e pesquisa nas ciências farmacêuticas*. 1 ed. Ponta Grossa: Atena Editora, v. 1, p. 33 - 54, 2021.

ANVISA. *Farmacopeia Brasileira*, 6.ed. Brasília, DF; 2022.

ARAÚJO, G. B., SANTANA, L. C. L. A. Avaliação da casca do fruto e do caule do mandacaru como fontes de compostos fenólicos totais antioxidantes através da obtenção de extratos pelas técnicas de maceração e ultrassom. *Scientia Plena*, 16 (9), 2020.

ATKINS S. O gênero *Stachytarpheta* (Verbenaceae) no Brasil. *Kew Bulletin*, 60(2): 161; 2005.

AURICCHIO, M. T.; BACCHI, E. M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. *Revista Instituto Adolfo Lutz*. 62: 55-6, 2000

AZIZ, N.; KIM, M. Y.; CHO, J. Y. Anti-inflammatory effects of luteolin: A review of in vitro, in vivo, and in silico studies. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 225, n. September 2017, p. 342–358, 2018.

BARROS NETO B, SCARMINIO IS, BRUNS RE. Planejamento e otimização de experimentos. Campinas, SP: Unicamp; 1955.

BATALHA JÚNIOR, N. J. P, AMARAL, F. M. M., COSTA, I. S., BATALHA, M. N., COUTINHO, D. F., GODINHO, J. W. S., BRITTO, M. H. S. S., & BEZERRA, S. A. (2020). FARMACOVIGILÂNCIA EM FITOTERAPIA: uma breve abordagem. In: *Ciências da Saúde no Brasil: Impasses e Desafios 2. 1 ed. Ponta Grossa: Atena*

BOEING, T. et al. Luteolin prevents irinotecan-induced intestinal mucositis in mice through antioxidant and anti-inflammatory properties. *British Journal of Pharmacology*, n. January, p. 1–16, 2020.

BORGES FV, SALES MDC. Políticas públicas de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil: sua história no sistema de saúde, *Pensar Acadêmico*, Manhuaçu, 16(1); 13-27, 2018.

- BOUYAHYA A. et al. Medicinal plant products targeting quorum sensing for combating bacterial infections. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(8): 729-743; 2017.
- BRAND-WILLIAMS W, CUVELIER ME, BERSET C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm Wiss. Technol.*, 28(1): 25-30; 1995.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Portal da Saúde. Práticas Integrativas e Complementares (PICS). 2020. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z-1/p/praticas-integrativas-e-complementares-pics>> Acesso em: 14 set. 2022.
- CAMPOS, S. C.; SILVA, C. G.; CAMPANA, P. R. V.; ALMEIDA, V. L. Toxicidade de espécies vegetais. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, v.18, p.373-382, 2016.
- CARDOSO, I. C., PEREIRA, H. M. G., TAPPIN, M. R. R., BEHRENS, M. D., 2017. Influence of extraction technique and particle size of the plant material in the content of total phenolic compounds of tincture of *Alpinia zerumbet* leaves. *Revista Fitos*, 11,1-126.
- CASTRO, R. A.; ALBIERO, A. L. M. O mercado de matérias primas para indústria de fitoterápicos. *Revista Fitos*, v. 10, n. 1, p. 59-72, 2016.
- CHAILLOU LL, HERRERA HA, MAIDANA JF. Estudo de própolis de Santiago Del Estero, Argentina. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 24: 11-15; 2004.
- CHANG HP, SHEEN LY, LEI YP. The protective role of carotenoids and polyphenols in patients with head and neck cancer. *J Chin Med Assoc.*, 78:89-95; 2015.
- CIOFFI G, D' AURIA M, BRACA A, MENDEZ J, CASTILLO A, MORELLI I, DE SIMONE F, DE TOMMASI N. Antioxidant and freeradical scavenging activity of constituents of the leaves of *Tachigalia paniculata*. *Journal of Nature Products*, (65): 1526-1529; 2002.
- CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE [CLSI] (2015). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 1–240.

COUTO CLL. *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae): Estudos de revisão e padronização dos extratos na pesquisa e desenvolvimento de fitoterápico giardicida. Dissertação [Mestrado em Ciências da Saúde] - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, 2012.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 12, n. 4, p. 564–582, 1999.

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

DALMAGRO AP, GASPARETTO A. "Stachytarpheta cayennensis (Rich.) Vahl: constituição fitoquímica preliminar e efeito antibacteriano." *Brazilian Journal of Health Review*. 3(1): 532-544; 2020.

DALMAGRO, A.P, ADRIANA G. "Stachytarpheta cayennensis (Rich.) Vahl: constituição fitoquímica preliminar e efeito antibacteriano." *Brazilian Journal of Health Review* 3.1 (2020): 532-544.

D'ARCHIVIO M, SANTANGELO C, SCAZZOCCHIO B, VARÌ R, FILESI C, MASELLA R, GIOVANNINI C. Modulatory Effects of Polyphenols on Apoptosis Induction: Relevance for Cancer Prevention. Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 9: 213-228; 2008.

DE MOURA, D. F., DE ALBUQUERQUE MELO, M., DE MELO BARROS, D., ROCHA, T. A., SILVA, F. A., DA SILVA, G. M., & DA FONTE, R. D. A. B. (2020). A Importância da Biossegurança na Produção e Utilização de Produtos Naturais e Fitoterápicos. *Brazilian Journal of Development*, 6(2), 7054-7062.

DUTRA RP, NOGUEIRA AMC, MARQUES RRO, COSTA MCP, RIBEIRO MNS. Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (túbia) em municípios da Baixada maranhense, Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(4): 557-562, 2008.

EZENYI IC et al. *Stachytarpheta cayennensis* metanol leaf extract and solvent fractions display antiplasmodial activity against *Plasmodium berghei berghei* in vivo. *International Journal of Phytopharmacy*, 7(1): 1-9; 2016.

Farmacopeia Brasileira, 2019. 6.ed. Brasília: Anvisa.

FERNANDES BF, GONÇALVES H R, GUIMARÃES MR, ALVES AA, BIESKI IGC. Estudo etnofarmacológico das plantas medicinais com presença de saponinas e sua importância medicinal. *Revista da Saúde da AJES*, 5(9): 16-22; 2019.

FERRO TAF. Cinnamaldehyde inhibits *Staphylococcus aureus* virulence factors and protects against infection in a *Galleria mellonella* model. *Frontiers in microbiology*, 7: 2052; 2016.

FLORA DO BRASIL. Verbenaceae na Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro; 2020.

FROELICH, S., GUPTA, M. P., SIEMS, K., & JENETT-SIEMS, K. (2008). Phenylethanoid glycosides from *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl, Verbenaceae, a traditional antimalarial medicinal plant. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18, 517-520.

FURUSAWA M, TANAKA T, ITO T, NISHIKAWA A, YAMASAKI N, NAKAYA K, MATSURA N, TSUCHIYA H, NAGAYAMA M, IINUMA M. Antioxidant activity of hydroxyflavonoid. *Journal of Health Sciences*, 51: 376-378; 2005.

GARCÍA AA, CARRIL, EPU. Metabolismo secundário de plantas. *Reduca (biología)*, 2 (3): 2011.

GOBBO-NETO L, LOPES N. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, 30: 374-381; 2007.

GOMES M. J., DE SOUSA A.T. A., THIJAN N. DE A. C., V., LYRA DE V.C., D., DO DESTERRO R., M., CARNEIRO N., S., ... & DE ALBUQUERQUE, U. P. Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid northeastern Brazil. *Molecules*, 15(12), 8534-8542, 2010.

HASENCLEVER, L., PARANHOS, J., COSTA, C. R., CUNHA, G., & VIEIRA, D. (2017). A indústria de fitoterápicos brasileira: desafios e oportunidades. *Ciência & Saúde Coletiva*, 22(8), 2559-2569.

HU, M.; YAN, H.; FU, Y.; JIANG, Y.; YAO, W.; YU, S.; ZHANG, L.; WU, Q.; DING, A.; SHAN, M. Optimal Extraction Study of Gastrodin-Type Components from *Gastrodia Elata* Tubers by Response Surface Design with Integrated Phytochemical and Bioactivity Evaluation. *Molecules*, v. 24, n. (3):547, 2019.

HÜTTENER M, PRIETO A, ESPELT J, BARNABÉU M, JUARÉZ A. Stringent response and AggR-dependent virulence regulation in the enteroaggregative *Escherichia coli* strain 042. *Frontiers in microbiology*, 9: 717; 2018.

IMRAN, M. Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: A review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 112, n. September 2018, 2019.

Khalaf, H. A. A., Jasim, R. A., & Ibrahim, I. T. (2021). Verbascoside—A review of its antitumor activities. *Pharmacology & Pharmacy*, 12(6), 109-126.

KHAN, M. A. et al. Comparative investigation of the free radical scavenging potential and anticancer property of *Diospyros blancoi* (Ebenaceae). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 6, n. 5, p. 410–417, 2016.

KLEIN T, LONGHINI R, BRUSCHI ML, MELLO JCP. Fitoterápicos: um mercado promissor. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada*, São Paulo, 30(3): 241-248; 2009.

KOOIMAN P. The occurrence of iridoids glycosides in the verbenaceae. *Acta Bot Neerl.* 1975;24:459–68.

KORKINA LG, DE LUCA C, KOSTYUK VA, PASTORE S. Plant polyphenols and tumors: from mechanisms to therapies, prevention, and protection against toxicity of anti-cancer treatments. *Curr Med Chem.* 16: 3943-65; 2009.

KUNLE OF, EGHAREVBA HO, AHMADU PO. Standardization of herbal medicines - a review. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, 4 (3): 101-112; 2012.

KUNLE, O. F.; EGHAREVBA, H. O.; AHMADU, P. O. Standardization of herbal medicines - a review. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, v.4, n.3, p.101-112, 2012.

LAZZAROTTO-FIGUEIRÓA, J.; CAPELEZZOA, A. P.; SCHINDLER, M. S. Z.; FOSSÁA, J. F. C.; ALBENY-SIMÕESA, D., ZANATTAA, L.; OLIVEIRA, J. V.; DAL MAGRO, J. Antioxidant activity, antibacterial and inhibitory effect of intestinal disaccharidases of extracts obtained from *Eugenia uniflora* L. Seeds. *Brazilian Journal of Biology*, v. 81, n. 2, p. 291-300, 2021

LIMA, M. J. S.; DA SILVA, M. Y. C.; DE MELO, K. R.; CHAGAS, B. F.; ROLIM, L. A.; NETO, P. J. R.; LIMA, W. Q. F.; PEREIRA, T. C. D.; PEREIRA, M. G.; BRITO, N. J. N. D.; ZAMPIERON, R. G.; SILVA, G. A. D. Avaliação fitoquímica e antioxidante

de plantas medicinais do norte do Mato Grosso. FACIDER-Revista Científica, v. 2, n. 2, 2013

LIMA-SALGADO TM, COCCUZZO SAMPAIO S, CURY-BOAVENTURA MF, CURI R. Modulatory effect of fatty acids on fungicidal activity, respiratory burst and TNF- α and IL-6 production in J774 murine macrophages. *Br J Nutr.* 105: 1173-1179; 2011.

LUO, Y. et al. Luteolin cocrystals: Characterization, evaluation of solubility, oral bioavailability and theoretical calculation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 50, n. September 2018, p. 248–254, 2019.

MAQUIAVELI CC, OLIVEIRA E SÁ AM, VIEIRA PC, SILVA ER. Stachytarpheta cayennensis extract inhibits promastigote and amastigote growth in Leishmania amazonensis via parasite arginase inhibition. *Journal of Ethnopharmacology*, 192:108-113; 2016.

MERTENS-TALCOTT SU, LEE JH, PERCIVAL SS, TALCOTT ST. Induction of cell death in Caco-2 human colon carcinoma cells by ellagic acid rich fractions from muscadine grapes (*Vitis rotundifolia*). *J Agric Food Chem.* 54(15): 5336-5343; 2006.

MOLYNEUX P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26: 211–219; 2004.

NESPOLI, G.; GOMES, A. M. O.; BORGES, C. F.; CHAGAS, D, C.; DIAS, J. V. S.; MATTOS, L.; BEHRENS, M.; LEDA, P. H. O. Educação popular e plantas medicinais na atenção básica à saúde. Rio de Janeiro: EPSJV, 2021. 192 p

Nóbrega, A. B., 2012. Padronização de extratos de *Eugenia florida* DC. e seu estudo toxicológico para o desenvolvimento de um fitoterápico ou fitofármaco. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde). Universidade Federal Fluminense. Niterói, Rio de Janeiro.

NORIEGA P, RÖPKE CD, CAMILO CM, FREITAS PCD, BARROS SBM. Avaliação por análise fatorial das condições da extração do 4- nerolidilcatecol de *Pothomorphe umbellata* (L). *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.* 41(2): 261-269; 2005.

ONOFRE SB et al. Antifungal activity of the aqueous extract of *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. (Verbenaceae), on oral candida species. *Journal of Medicinal Plant Research*, 9(2): 42-47; (2015b).

ONOFRE SB et al. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoids contents in *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. (Verbenaceae). *Journal of Medicinal Plant Research*, 9(17): 569-575; (2015a).

ONOFRE SB, MATTIELLO SP, SANTOS ZMQ, KAGIMURA FY. Antimicrobial activity of essential oils obtained from *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. (Verbenaceae) collected in the South-west region of Paraná-Brazil. *Journal of Medicinal Plant Research*, 8(46): 1347-1353; 2014.

PENIDO C, COSTA KA, FUTURO DO, PAIVA SR, KAPLAN MAC, FIGUEIREDO MR, HENRIQUES MGMO. 2006. Anti-inflammatory and anti-ulcerogenic properties of *Stachytarpheta cayennensis* (LC Rich) Vahl. *Journal of Ethnopharmacology*, 104(1-2): 225-233; 2006.

PIO CM. Dicionário das plantas úteis ao Brasil. Ministério de Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. V.2, p. 395; 1984.

PISTOLLATO F, GIAMPIERI F, BATTINO M. The use of plant-derived bioactive compounds to target cancer stem cells and modulate tumor microenvironment. *Food Chem Toxicol.* 75: 58-70; 2015.

RAUNIYAR R et al. Anti-tyrosinase activity of *Stachytarpheta cayennensis* in vitro. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, 3(7): 14259-14266; 2014.

RIBEIRO, CAMILA NUNES DE MORAIS, SOUZA, WESLEY MAURÍCIO DE.. Phytochemistry screening and antimicrobial activity of *Stachytarpheta cayennensis* – *gervai* (l.c.rich) vahl. *Revista bioeletronica biociências, biotecnologia e saúde*. N2.2011

RODRIGUES, T. S.; GUIMARÃES, S. F.; RODRIGUES, R. G.; GABRIEL, J. V. Métodos de secagem e rendimento dos extratos de folhas de *Plectranthus barbatulus* (boldo-da-terra) e *P. ornatus* (boldo-miúdo). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 13, n. 1, p. 587-590, 2011.

ROSALI DA SILVA, M. F. Characterization of the libidibia ferrea dry extract for antihyperglycemic therapy. Brazilian Journal of Development, v.6, n.12, p.97488-97506, 2020.

SCHAPOVAL E.E.S.; DE VARGAS M.R.; CHAVES C.G.; BRIDI R.; ZUANAZZI J.A.; HENRIQUES A.T.: Antiinflammatory and antinociceptive activities of extracts and isolated compounds from *Stachytarpheta cayennensis*. J Ethnopharmacol 1998, 60(1):53–59.

SILVA EC. Estudo de padronização de extratos de *Hancornia speciosa* Gomes como alternativa terapêutica para obesidade. Dissertação [Mestrado em Saúde e Ambiente] - Universidade Federal do Maranhão. São Luís, MA, 2018.

SILVA, O. N., AMARAL, F. M. M., GODINHO, J. W. L.S., FERREIRA, T. T. D., COUTINHO, D. F., NEIVA, V. A., NEIVA NETO, R. R., & BASTOS, W. M. (2021). Toxicidade de plantas de uso medicinal: desmitificando o “se natural, não faz mal”. In: Trajetória e pesquisa nas ciências farmacêuticas. 1 ed. Ponta Grossa: Atena Editora, 1, 11 –

SILVEIRA LMS et al. Atividade antibacteriana de extrato de gervão frente cepas de *Staphylococcus aureus* oxacilinasensíveis e oxacilina-resistentes isoladas de amostras biológicas. Revista Brasileira de Análises Clínicas, 39(4): 299-301; 2007.

SIMÕES CMO, SCHENKEL EP, GOSMANN G, MELLO JCP, MENTZ LA, PETROVICK PR. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. Editora Artmed, Porto Alegre, Rio Grande do Sul; 2017.

SONAGLIO D, ORTEGA GG, PETROVICK PR, BASSANI VL. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES COM, SCHENKEL EP, GOSMANN G, MELLO JCP, MENTZ LA, PETROVICK PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 7.ed. rev. ampl., primeira reimpressão. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, p. 289-326; 2016.

SOUZA PA, RODRIGUES C, SANTIAGO APSA, LUCAS NC, LEITAO GG, GALINA AF. Antioxidant activity of natural compounds of *Stachytarpheta*

cayennensis (Rich.) Vahl, Verbenaceae, by scavenger of mitochondrial reactive oxygen species. *Rev Bras Farmacogn.* 21:420-426; 2011.

SOUZA PA, SILVA CG, MACHADO BRP, LUCAS NC, LEITAO GG, ELEUTHERIO ECA, ORTIZ GMD, BENCHETRIT LC. Evaluation of antimicrobial, antioxidant and phototoxic activities of extracts and isolated compounds from *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl, Verbenaceae. *Rev. Bras. Farmacogn.* 20(6): 922-928, 2010.

STEVENS, P.F. Angiosperm Phylogeny Website. v. 9, junho 2008, 2010.

TOLEDO ACO, HIRATA LL, CRUZ, MMB, MIGUEL MD, MIGUEL, OC. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. *Revista Lecta, Bragança Paulista*, 21 (1/2): 7-13; 2003.

VANDEN BERGHE W. Epigenetic impact of dietary polyphenols in cancer chemoprevention: lifelong remodeling of our epigenomes. *Pharmacol Res.* 65:565-576; 2012.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo de padronização dos extratos das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich) Vahl revelou resultados notáveis e promissores tanto em ensaios químicos quanto biológicos. Diversos parâmetros foram avaliados, fornecendo uma visão abrangente do potencial terapêutico desses extratos; o que evidencia a representatividade dos estudos de padronização de extratos vegetais, estimulando, assim, a continuidade dos estudos com a espécie a serem realizados com extrato padronizado.

Os experimentos revelaram que o extrato P1:8 demonstrou o melhor rendimento, atingindo um valor de 17,88%. Além disso, a caracterização química evidenciou teores mais significativos de polifenóis e flavonoides nos extratos MU1:6 ($257,8 \pm 0,023$ mg EAG/g) e P1:8 ($7,865 \pm 0,065$ mg EQ/g), respectivamente. Compostos bioativos como Verbascoside, Isoverbascosideo, Luteolina-O-glucuronide, Cistanoside D e Epicatequina-catequina foram identificados nos extratos MU 1:8 e S1:8. Sendo o composto Verbascosideo o marcador analítico no controle de qualidade da espécie vegetal.

A atividade antioxidante foi especialmente notável no extrato MU 1:8, revelando um EC50 de $6,71 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$. Em termos de atividade antibacteriana, todos os extratos, exceto P1:6, mostraram resultados promissores contra *Escherichia coli* não patogênica (HB101) e *Escherichia coli* patogênica (042), enquanto todos apresentaram eficácia contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) em relação à CIM e CBM.

Além disso, a capacidade de redução de biofilme foi evidente em vários extratos, exceto P1:6, mostrando uma redução significativa ($p < 0,05$) para *Escherichia coli* (042) e *Staphylococcus aureus*, indicando um potencial impacto no controle de infecções por biofilme.

O estudo revelou também um efeito antiproliferativo acentuado em doses superiores a $100 \mu\text{g/mL}$ em linhagens tumorais Carcinoma hepatocelular (HepG2), melanoma maligno (A-375), carcinoma de mama (MCF-7) e adenocarcinoma colorretal (Caco-2 humano) para todos os extratos analisados, após 48 horas de tratamento.

Esses resultados sugerem fortemente o potencial terapêutico dos extratos de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich) Vahl, destacando sua riqueza em compostos bioativos, atividade antioxidante, antibacteriana, capacidade de redução de biofilme e efeito antiproliferativo em linhagens tumorais. Esses achados estimulam futuras investigações para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos ou terapias alternativas baseadas nessas descobertas promissoras.

REFERÊNCIAS

- AGRA, M. F. et al. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 111, p. 383-395, 2007.
- ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, p. 678-689, 2006.
- ALVES, L. F. Produção de fitoterápicos no Brasil: história, problemas e perspectivas. *Revista Virtual Química*, v. 5, p. 450-513, 2013.
- AMARAL, F. M. M. Potencial giardicida de espécies vegetais: aspectos da etnofarmacologia e bioprospecção. João Pessoa, 2007. 346p. Tese (Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba).

ANAGNOSTOPOULOU, M. A. et al. Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). *Food Chemistry*, London, v. 94, n. 1, p. 19-25, 2006.

ANTÔNIO, G. D.; TESSER, C. D.; MORETTI-PIRES, R. O. Fitoterapia na atenção primária à saúde. *Revista de Saúde Pública*, v. 48, n. 3, p. 541-553, 2014.

ATES, B. et al. Pressurized liquid extraction of phenolic compounds from Anatolia própolis and their radical scavenging capacities. *Food and Chemical Toxicology*, v. 49, n. 7, p. 1592–1597, jul. 2011.

AVILA, J. G. et al. Mode of action of *Buddleja cordata* vernascoside against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 66, p. 75-78, 1999.

BAMPOULI, A. et al. Comparison of different extraction methods of *Pistacia lentiscus* var. chia leaves: Yield, antioxidant activity and essential oil chemical composition. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, v. 1, n. 3, p. 81-91, 2014.

BASSANI, D. C.; NUNES, D. S.; GRANATO, D. Optimization of Phenolics and Flavonoids Extraction Conditions and Antioxidant Activity of Roasted Yerba-Mate Leaves (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae) using Response Surface Methodology. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 86, n. 02, p. 923, 2014.

BAUER, R. Quality criteria and standardization of phytopharmaceuticals: Can acceptable drug standards be achieved?. *Drug Information Journal: DIJ/Drug Information Association*, v. 32, n. 1, p. 101-110, 1998.

BORBA, A. M.; MACEDO, M. Plantas medicinais usadas para a saúde bucal pela comunidade do bairro Santa Cruz, Chapada dos Guimarães, MT, Brasil. *Acta Botanica Brasílica*, v. 20, p. 771-782, 2006.

BORGES, L. L. Bioprodutos padronizados em compostos fenólicos obtidos de resíduos agroindustriais das cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg [tese]. Brasília, DF: Universidade de Brasília, 2014.

BOUYAHYA, A. et al. Medicinal plant products targeting quorum sensing for combating bacterial infections. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 10, n. 8, p. 729-743, 2017.

BRAGA, F. C.; RATES, S. M. K.; SIMÕES, C. M. O. Avaliação de eficácia e segurança de produtos naturais candidatos a fármacos e medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. 1.ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. p.53-68.

BRANDÃO, M. G. Importância dos registros históricos na investigação e utilização de produtos naturais. Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Mello, J. C. P., 2017, p. 29-38.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. 5º relatório nacional para a Convenção Sobre Diversidade Biológica. Brasília: MMA, 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 3.385, de 15 de dezembro de 2016. Defere "o registro do medicamento cloridrato de lorcasserina". Diário Oficial da União – Suplemento, Brasília, DF, 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.26, de 09 de março de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos Fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. DOU, 2014a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Política nacional de práticas integrativas e complementares no SUS: PNPIC-SUS; 2006.

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

EZENYI IC et al. *Stachytarpheta cayennensis* metanol leaf extract and solvent fractions display antiplasmodial activity against Plasmodium berghei berghei in vivo. International Journal of Phytopharmacy, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2016.

FALKENBER GMB, SANTOS RI, SIMÕES CMO. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES CMO. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. da UFRGS/UFSC, 2004. Cap. 10, p. 229-245.

FARIAS. M. R. Avaliação da Qualidade de Matérias-Primas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. Cap. 12, p. 263-288.

FAVARO MMA. Extração, estabilidade e quantificação de antocianinas de frutas típicas brasileiras para aplicação industrial como corantes. Dissertação (Mestrado em Química) – UNICAMP, 2008. 100p.

FERREIRA, M.R.C. Identificação e valorização das plantas medicinais de uma comunidade pesqueira do litoral paraense (Amazônia Brasileira). Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Pará, Pará, 2000. 268f.

FONSECA, Said Gonçalves da Cruz. Farmacotécnica de fitoterápicos. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2005.

FREITAS LS, OLIVEIRA JV, DARIVA C, JACQUES RA, CAMARÃO EB. Extraction of grape seed oil using compressed carbon dioxide and propane: extraction yields and characterization of free glycerol compounds. J. Agricultural and Food Chemistry, v. 56, p. 2558-2564, 2008.

FREITAS LS, OLIVEIRA JV, DARIVA C, JACQUES RA, CARAMÃO EB.

GHITESCU RE, VOLF L, CARAUSU C, BÜHLMANN AM, GILCA IA, POPA VI. Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from spruce wood bark. Ultrason Sonochem, v. 22, p. 535–541, 2015.

GIRONI F, PIEMONTE V. Temperature and solvent effects on polyphenol extraction process from chestnut tree wood. Chemical Engineering Research and Design, v. 89, n. 7, p. 857-862, 2011.

GNOATTO SCB, BASSANI VL, COELHO GC, SCHENKE EP. Influência do método de extração nos teores de metilxantinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. ST.- Hil., Aquifoliaceae). *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 304-307, 2007.

GOBBO-NETO L, LOPES N. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, v. 30, p. 374-381, 2007.

GUARÇONI EAE, COSTA DMT, ARAÚJO V. Ethnobotanical study of medicinal plants used in Quilombo Piratininga, municipality of Bacabal, Maranhão, Brazil. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, v. 25, n. 3, p. 1-11, 2020.

GUIZZO PL, BREDDA TCC, SCARPA MVC, NAVARRO FF. Controle de Qualidade e triagem fitoquímica da droga vegetal das folhas de *Morus nigra* L. (MORACEAE). *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 36, n. 2, p. 259-265, 2015.

HERRERO M. MARTÍN-ÁLVAREZ PJ, SEÑORÁNS FJ, CIFUENTES A, IBÁÑEZ E. Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga. *Food Chemistry*, London, v. 93, n. 3, p. 417-423, 2005.

HERZI, N. et al. Comparison of different methods for extraction from *Tetraclinis articulata*: yield, chemical composition and antioxidant activity. *Food Chemistry*, v.141, n.4, p.3537-3545, 2013.

HOSSAIN MB, BARRY-RYAN C, MARTIN-DIANA AB, BRUNTON NP. Effect of drying method on the antioxidant capacity of six Lamiaceae herbs. *Food Chemistry*, v. 123, n. 1, p. 85-91, 2010.

HOUGHTON PJ, HOWES MJ, LEE CC, STEVENTON G. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: Visualizing an elephant. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 110, p. 391-400, 2007.

JACOBY, C.; COLTRO, E.M.; SLOMA, D.C.; MÜLLER, J.; DIAS, L.A.; LUFT, M.; BERUSKI, P.; RONDON NETO, R.M. Plantas medicinais utilizadas pela comunidade rural de Guamirim, Município de Irati, PR. *Revista Ciências Exatas e Naturais*, v. 4, p. 79-89, 2002.

JUNG CH, SEOG H, CHOI WOOK, PARK M. Antioxidant properties of various solvent extracts from wild ginseng leaves. *LWT - Food Science and Technology*, London, v. 36, n. 3, p. 266-274, 2006.

KABERA JN, SEMANA E, MUSSA AR, He X. Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 2, p. 377-392, 2014.

KARABEGOVIĆ IT, STOJICEVIC SS, VELICKOVIC DT, TODOROVIC ZB, NIKOLIC C, LAZIC M. The effect of different extraction techniques on the composition and antioxidant activity of cherry laurel (*Prunus laurocerasus*) leaf and fruit extracts. *Industrial Crops and Products*, v. 54, p. 142-148, 2014.

KATZ L, BALTZ RH. Natural product discovery: past, present, and future. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 43, n. 2-3, p. 155-176, 2016.

- KLEIN T, LONGHINI R, BRUSCHI ML, MELLO JCP. Fitoterápicos: um mercado promissor. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada*, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 241-248, 2009.
- KRAUJALIS P, VENSKUTONIS PR, IBÁÑEZ E, HERRERO M. Optimization of rutin isolation from *Amaranthus paniculatus* leaves by high pressure extraction and fractionation techniques. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 104, p. 234-242, 2015.
- LAPA AJ, SOUCCAR C, LIMA-LANDMAN MTR, LIMA TCM. Farmacologia e Toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES COM, SCHENKEL EP, GOSMANN G, MELLO JCP, MENTZ LA, PETROVICK PR. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5.ed. rev. ampl., primeira reimpressão. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. 198, 2004.
- LAPORNIK B, PROSEK M, WONDRA AG. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*, Essex, v. 71, n. 2, p. 214-222, 2005.
- LAZZAROTTO-FIGUEIRÓA, J., CAPELEZZOA, A. P., SCHINDLER, M. S. Z., FOSSÁA, J. F. C., ALBENYSIMÕESA, D., ZANATTAA, L., OLIVEIRA, J. V., DAL MAGRO, J. Antioxidant activity, antibacterial and inhibitory effect of intestinal disaccharidases of extracts obtained from *Eugenia uniflora* L. Seeds. *Brazilian Journal of Biology*, v. 81, n. 2, p. 291-300, 2021.
- LEMNIS (2016). "LEMNIS Farmácia". [Online]. Disponível: <http://www.lemnismfarmacia.com.br/passiflora-maracuja-%E2%80%93-no-tratamento-dainsonia-ansiedade-irritabilidade-e-insonia/>. Acesso em 8 Jun. 2016.
- LIMA LG. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para padronização dos extratos hidroalcoólicos de *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng e *Schinus terebinthifolius* Raddi. Recife, [Dissertação de Mestrado] Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, 2009. 87p.
- LIU Y, WANG H, CAI XJ. *Food Sci. Technol.* 2015, v. 52, p. 2336.
- LIYANA-PATHIRANA, C, SHAHIDI, F. Optimization of extraction of phenolics compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry*, v. 93, p. 45-56, 2005.
- LOPATA, Victor José; GARDONI, Benilda luiza klingelfus; NOWACKI, Luciana; RIBEIRO, Camila Nunes de Moraes; SOUZA, Wesley Maurício de. Triagem fitoquímica e atividade antimicrobiana da *Stachytarpheta cayennensis* – gervão (l.c. rich) vahl. Phytochemistry screening and antimicrobial activity of *Stachytarpheta cayennensis* – gervai (l.c.rich) Vahl. *Revista Eletrônica de Biociências, Biotecnologia e Saúde*, v. 2, n. 1, 2011.
- MACÊDO, RO; OLIVEIRA, EJ. Pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos com atividade sobre o sistema nervoso central. In: ALMEIDA, RN. *Psicofarmacologia: fundamentos práticos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 95-111.
- MADALENO, IM. Plantas da medicina popular de São Luis, Brasil. Bélem: Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. *Ciências Humanas*, v. 6, n. 2, p. 273-286, 2011.

MANN, T. Chemical aspects of biosynthesis. New York: Oxford University Press Inc., 1994. 92 p.

MATTANA, RDS et al. Efeitos de diferentes tempos de extração no teor e composição química do óleo essencial de folhas de pariparoba [*Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.]. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 17, p. 150-156, 2015.

MEDINA, AL et al. Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. Food Chemistry, v. 128, n. 4, p. 916-922, 2011.

Melo, J. G., Araújo, T. A. S., Castro, V. T. N. A., Cabral, D. L. V., Rodrigues, M. D., Nascimento, S. C., Amorim, E. L. C., Albuquerque, U. P. Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid northeastern Brazil. Molecules, v. 15, p. 8534-8542, 2010.

MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. Phytotherapy Research, London, v. 15, n. 2, p. 127-130, 2001. Disponível em:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000118&pid=S0100-.

MESIA, V.S.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; LAPA, A.J. Pharmacological study of *Stachytarpheta cayennensis* Vahl in rodents. Phytomedicine, v. 11, n° 7-8, p. 616-624, 2004.

MIGLIATO, KF et al. Planejamento experimental na otimização da extração dos frutos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. Química Nova, v. 34, n. 4, p. 695-699, 2011.

MIGUEL, MD; MIGUEL, OG. Desenvolvimento de fitoterápicos. São Paulo: Robe Editorial, 2000.

MOCHI, VT. Efeitos da temperatura de secagem no rendimento do óleo essencial e teor de 1,8 – cineol presentes nas folhas de *Eucalyptus camaldulensis*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

MORAIS, SA. Otimização do processo de extração de taninos a partir da espécie *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia), Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2019. 98p.

MOREIRA, RC et al. Efeito leishmanicida in vitro de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae)/In vitro leishmanicidal effect of *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae), 17: 59-63; 2007.

MOREIRA, RCR et al. Nível de conhecimentos sobre leishmaniose tegumentar americana (LTA) e uso de terapias alternativas por populações de uma área endêmica da Amazônia do Maranhão, Brasil. Caderno de Saúde Pública, v. 18, n. 1, p. 187-195, 2002.

MORELLI, MS. Guia de produção para plantas medicinais, aromáticas e flores comestíveis. Porto Alegre, RS: Cidadela, 2010.

NEIVA, VA et al. Plant species used in giardiasis treatment: ethnopharmacology and in vitro evaluation of anti-Giardia activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 24, p. 215-224, 2014.

NESPOLI, G. et al. Educação popular e plantas medicinais na atenção básica à saúde. Rio de Janeiro: EPSJV, 2021.

OKOYE, TC et al. Atividade antimicrobiana e antiespasmódica de extrato de folhas e frações de *Stachytarpheta cayennensis*. *Pacífico asiático J. Trop.*, v. 3, p. 189-192, 2010.

OLIVEIRA, SGD et al. An ethnomedicinal survey on phytotherapy with professionals and patients from Basic Care Units in the Brazilian Unified Health System. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 140, n. 2, p. 428-437, 2012.

OLIVEIRA, VB et al. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clae-dad de *Dicksonia sellowiana* (presl.). Hook, dicksoniaceae. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, v. 18, p. 230-239, 2016.

ONOFRE, SB et al. Antimicrobial activity of essential oils obtained from *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. (Verbenaceae) collected in the South-west region of Paran-Brazil. *Journal of Medicinal Plant Research*, v. 8, n. 46, p. 1347-1353, 2014.

ORDÓÑEZ, MG. Ensayos farmacológicos in vitro para evaluar actividad anti-giardíásica. *Revista Cubana de Farmácia*, v. 35, p. 66-73, 2001.

PARRA, A. et al. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, v. 8, n. 5, p. 395-400, 2001.

PEDERSSETTI, MM. Análise dos efeitos da temperatura e pressão na extração supercrítica do óleo essencial de Canola com dióxido de carbono e N- Propano. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual do Paraná, Toledo, 2008, 65 p.

PEIXOTO, MS. Obtenção, caracterização e avaliação toxicológica de extrato seco padronizado à base de *Bauhinia forficata* link (Master's thesis, Universidade Federal de Pernambuco), 2012.

Pereira, A. C. et al. Purification of an antibacterial compound from *Lantana lilacina*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, p. 204-208, 2008.

PÉRTILE, R. Isolamento e elucidação estrutural de compostos polares de *Lippia alba* (Miller) NE Brown Ex Britt. & Wils, 2007.

PINTO, AC et al. Current status challenges and trends on natural products in Brazil. *Quimica Nova*, v. 25, p. 45-61, 2002.

PINTO, LPDAP et al. Extratos de Erva-de-Santa-Maria na saúde pública: controle do vetor de arbovirose. *Revista Pró-univerSUS*, v. 10, n. 1, p. 102-105, 2019.

- Ponce-Macotela, M. et al. Orégano (*Lippia* spp.) kills *Giardia duodenalis* trophozoites in vitro: anti-giardasic and ultrastructural damage. *Parasitol Res*, v. 98, p. 557-569, 2006.
- PRINS, CL et al. Efeito do tempo de extração sobre a composição e o rendimento do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). *Revista Brasileira Plantas Mediciniais*, v. 8, n. 4, p. 92-95, 2006.
- PRISTA, LN et al. *Tecnologia farmacêutica*, 4. ed. Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa, 1996. ISBN 972-31-0678-7.
- QUEIROZ, APA et al. Bioética no uso de animais em experimentação. *Ciência Atual*, v. 13, n. 1, p. 2-19, 2019.
- RAMBECK, B. Mito das experiências em animais, 2007. Disponível em: <http://www.uipa.org.br/portal/modules/soapbox/article.php?articleID=1>. Acesso em 21 ago. 2012.
- RATES, SMK. Plants as source of drugs. *Toxicon*, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001.
- Rauniyar, R. et al. Anti-tyrosinase activity of *Stachytarpheta cayennensis* in vitro. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, v. 3, n. 7, p. 14259-14266, 2014.
- RODRIGUES, E.; CARLINI, ELA. A importância dos levantamentos etnofarmacológicos no desenvolvimento de fitomedicamentos. *Revista Racine*, São Paulo, v. 70, p. 30-35, 2002.
- RODRIGUES, V.E.G.; CARVALHO, D.A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande - Minas Gerais. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 25, p. 102-123, 2001.
- ROGERO, SO et al. Teste in vitro de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. *Materials research*, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.
- SAHOO, Niharika; MANCHIKANTI, Padmavati; DEY, Satyahari. Herbal drugs: standards and regulation. *Fitoterapia*, v. 81, n. 6, p. 462-471, 2010.
- SANTOS, ABN et al. Plantas medicinais conhecidas na zona urbana de Cajueiro da Praia, Piauí, Nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 18, p. 442-450, 2016.
- SANTOS, KA. Estudo etnobotânico de plantas medicinais utilizadas como hipoglicemiantes por usuários do Programa de Fitoterapia da Universidade Federal do Maranhão, Brasil. *Scientia Plena*, v. 13, n. 3, p. 1-12, 2017.
- SASIDHARAN, S.[et al]. Antidiarrheal and antimicrobial activities of *Stachytarpheta jamaicensis* leaves. *Indian J Pharmacology*, v. 39, [S.I], p. 245-248, 2007.
- SILVA, EC. Estudo de padronização de extratos de *Hancornia speciosa* Gomes como alternativa terapêutica para obesidade. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente), Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, 2018.
- SILVA JUNIOR, JF. A cultura da mangaba. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 26, n. 1, p. 1-2, 2004.

- SILVA, LS. *Mikania glomerata* Sprengel (Guaco): obtenção de extrato seco e determinação do nível de cumarina por espectrofotometria. [Tese], Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2012.
- SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 7. ed. rev. ampl., 1. reimpr. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2016. p. 289-326.
- SOUZA, C. R. F. D. Estudo comparativo da produção de extrato seco de *Bauhinia forficata* Link pelos processos spray-dryer e leito de jorro. Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo, 2003.
- SUCHER, N. J.; CARLES, M. C. Genome-Based Approaches to the Authentication of Medicinal Plants. *Planta Medica*, v. 74, n. 6, p. 603-623, 2008.
- SULAIMAN, I. S. C. et al. Effects of temperature, time, and solvent ratio on the extraction of phenolic compounds and the anti-radical activity of *Clinacanthus nutans* Lindau leaves by response surface methodology. *Chemistry Central Journal*, v. 11, n. 1, p. 54-55, 2017.
- SUNTAR, I. Importance of ethnopharmacological studies in drug discovery: role of medicinal plants. *Phytochemistry Reviews*, v. 19, p. 1199-1209, 2020.
- TABARAKI, R.; RASTGOO, S. Comparison between conventional and ultrasound-assisted extractions of natural antioxidants from walnut green husk. *Korean J Chem Eng*, v. 31, n. 4, p. 676-683, 2014.
- TAPIA-PÉREZ, M. E. et al. Screening of Mexican medicinal plants from antiprotozoal activity - Part II. *Pharm Biol*, v. 41, p. 180-183, 2003.
- TEIXEIRA, L. N.; STRINGHETA, P. C.; OLIVEIRA, F. A. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. *Ceres*, v. 55, n. 4, 2015.
- TIMBRELL, J. A.; MARRS, T. C. Biotransformation of xenobiotics. In: GOODMAN & GILMAN. *As bases farmacológicas da terapêutica*. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 2003.
- TIWARI, P. et al. Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, v. 1, n. 1, p. 98-106, 2011.
- TOLEDO, A. C. O. et al. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. *Revista Lecta, Bragança Paulista*, v. 21, n. 1/2, p. 7-13, 2003.
- TRABULSI FILHO, F. A. et al. Estudo de padronização de extratos de *Anacardium occidentale* L. na pesquisa e desenvolvimento de fitoterápicos giardícidias. *Caderno de Pesquisa, São Luís*, v. 20, p. 7-15, 2013.
- TRACY, J. W.; WEBSTER, L. T. Jr. Fármacos usados na quimioterapia das infecções por protozoários: amebíase, giardíase, tricomoníase, tripanossomíase, leishimaniose, e outras infecções causadas por protozoários. In: GOODMAN & GILMAN. *As bases farmacológicas da terapêutica*. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 2003.

- TRUSHEVA, B.; TRUNKOVA, D.; BANKOVA, V. Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. *Chemistry Central Journal*, v. 1, p. 13, 2007.
- VASCONCELOS, E. A. F. et al. Influence of Extractive Process, Solvent and Particle Size of Plant Material on the Total Solids Content of *Schinus terebinthifolius* Raddi Extractive Solutions. *Revista Fitos*, p. 74-79, 2005.
- VEGGI, P. C. Obtenção de compostos fenólicos de plantas brasileiras via tecnologia supercrítica utilizando cossolventes e extração assistida por ultrassom. Tese de Doutorado, [sn], 2013.
- VELOSO, R. A. et al. Composição e fungitoxicidade do óleo essencial de capim citronela em função da adubação orgânica. *Pesq. Agropec. Bras.*, v. 47, n. 12, p. 1707-1713, 2012.
- VERDAM, M. C. S.; SILVA, C. B. O estudo de plantas medicinais e a correta identificação botânica. *Visão Acadêmica*, v. 11, p. 7-13, 2010.
- VICCINI, L. F. et al. Ipolamiide and fulvoipolamiide from *Stachytarpheta glabra* (Verbenaceae): A structural and spectroscopic characterization. *Journal of Molecular Structure*, v. 875, n. 1-3, p. 27-31, 2008.
- VIGANÓ, J. Sequential extraction of bioactive compounds from industrial by-products of passion fruit (*Passiflora edulis* sp.) using pressurized fluids. 2016. Tese (Doutorado). [sn].
- VILLALVA, M. et al. Supercritical anti-solvent fractionation for improving antioxidant and anti-inflammatory activities of an *Achillea millefolium* L. extract. *Food Research International*, v. 115, p. 128-134, 2019.
- VONGSAK, B. et al. Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. *Industrial Crops and Products*, v. 44, p. 566–571, 2013.
- WATERMAN, P. G. The chemistry of volatile oils. In: HAY, R. K. M.; WATERMAN, P. G. *Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production*. Essex: Longman Group, 1993. p. 41-61.
- YAMINI, Y. et al. Comparison of essential oil compositions of *Salvia mirzayanii* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. *Food Chemistry*, v. 108, n. 1, p. 341–346, 2008.
- ZAITER, A. et al. Effect of particle size on antioxidant activity and catechin content of green tea powders. *Journal of Food Science and Technology*, v. 53, n. 4, p. 2025-2032, 2016.

APÊNDICES

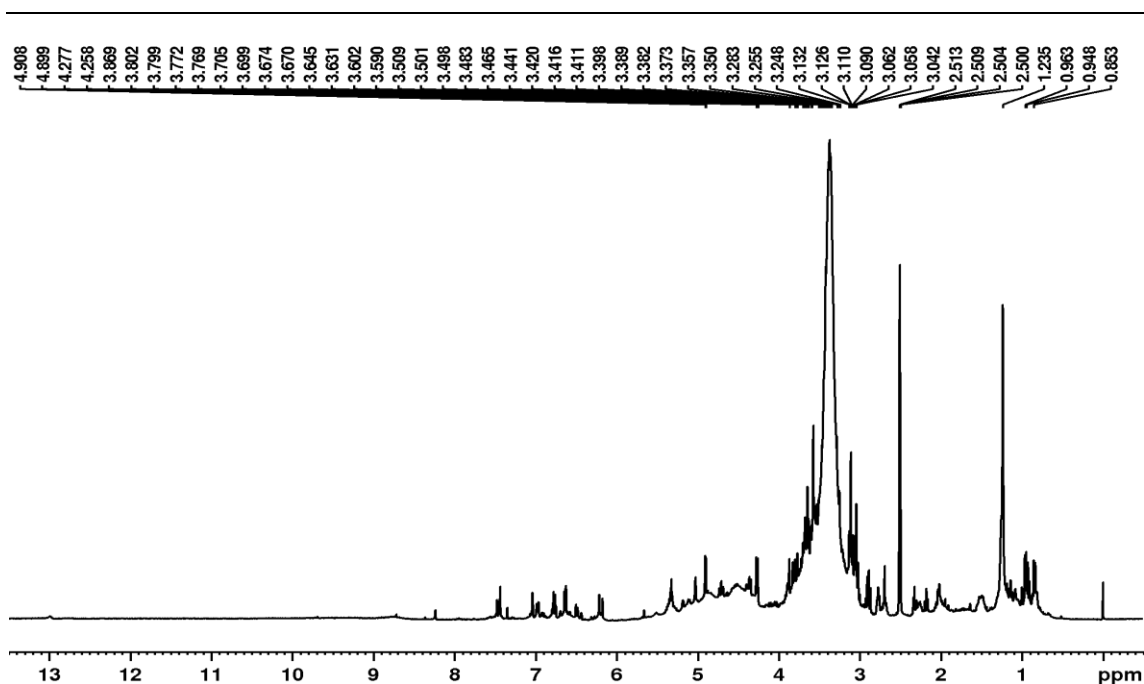


Figura 1. Espectro de RMN de ^1H do extrato hidroetanólico das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. obtidos por maceração no hidromódulo de 1:6 (400 MHz, DMSO- d_6).

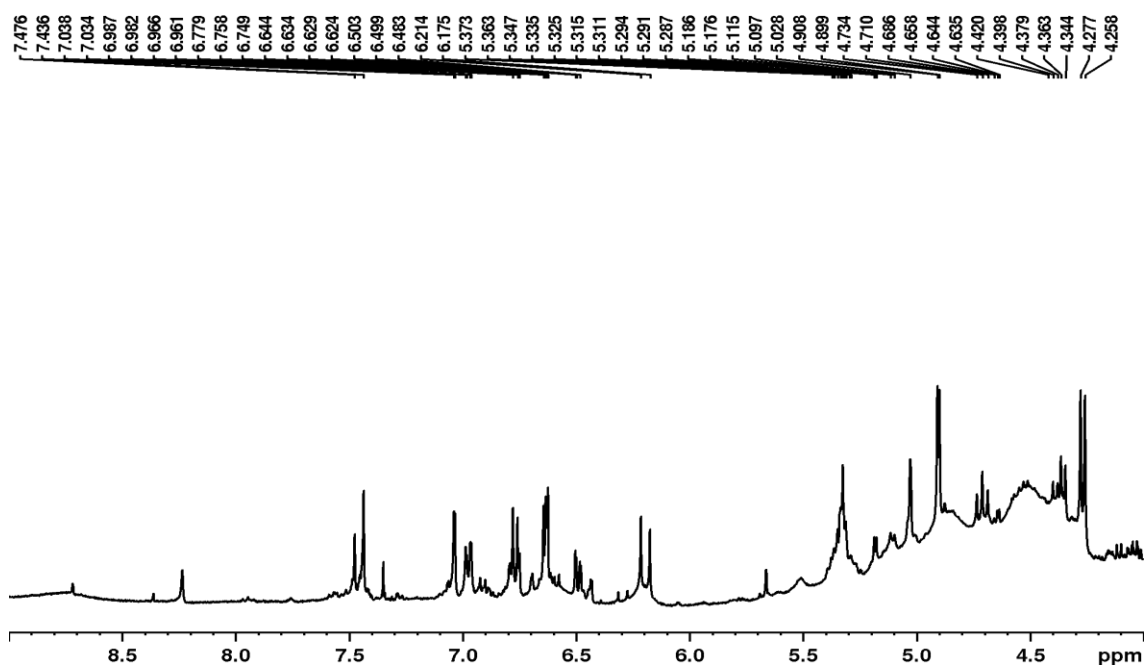


Figura 2. Ampliação da região 9,00-4,00 ppm do espectro de RMN de ^1H do extrato hidroetanólico das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. obtidos por maceração no hidromódulo de 1:6 (400 MHz, DMSO- d_6).

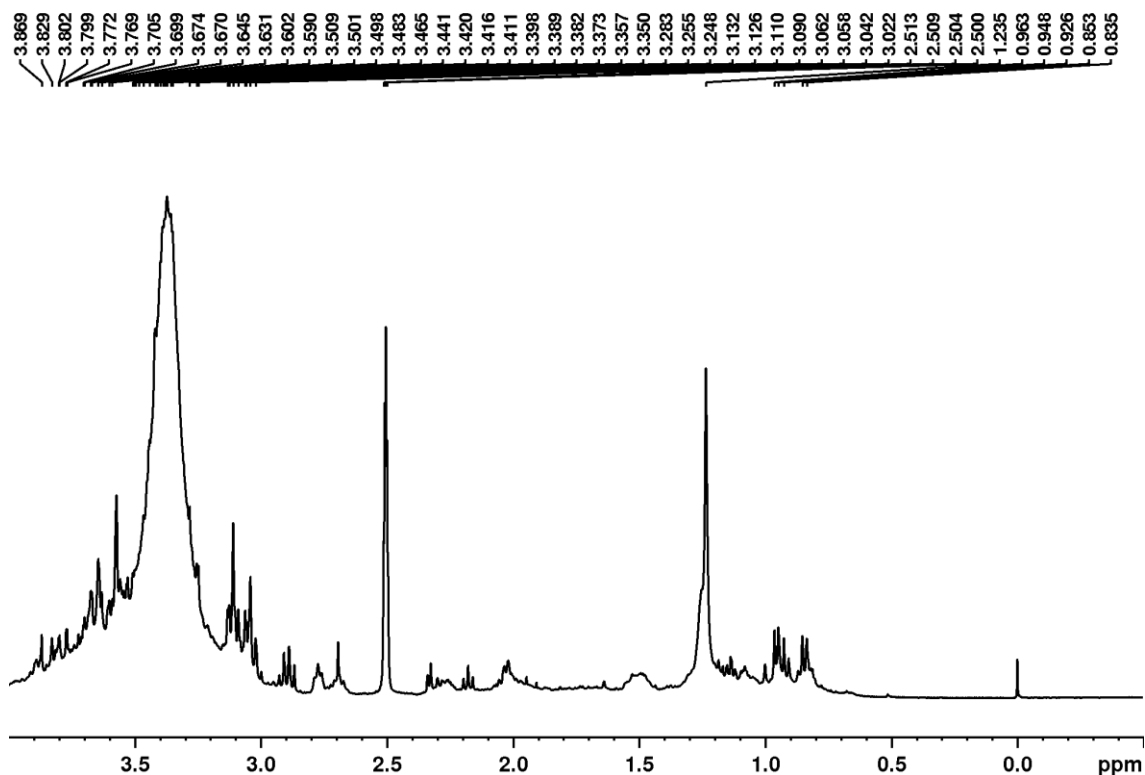


Figura 3. Ampliação da região 4,00 a -0,50 ppm do espectro de RMN de ^1H do extrato hidroetanólico das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. obtidos por maceração no hidromódulo de 1:6 (400 MHz, DMSO- d_6).

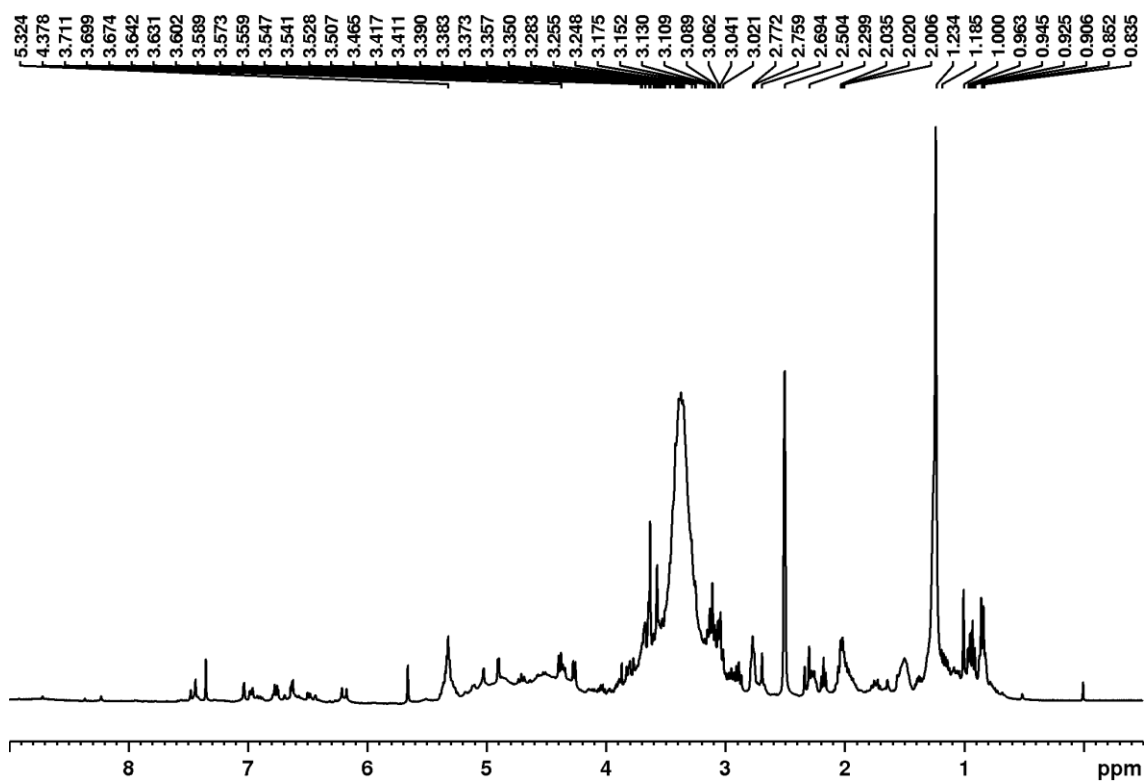


Figura 4. Espectro de RMN de ^1H do extrato hidroetanólico das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. obtidos por maceração no hidromódulo de 1:8 (400 MHz, DMSO- d_6).

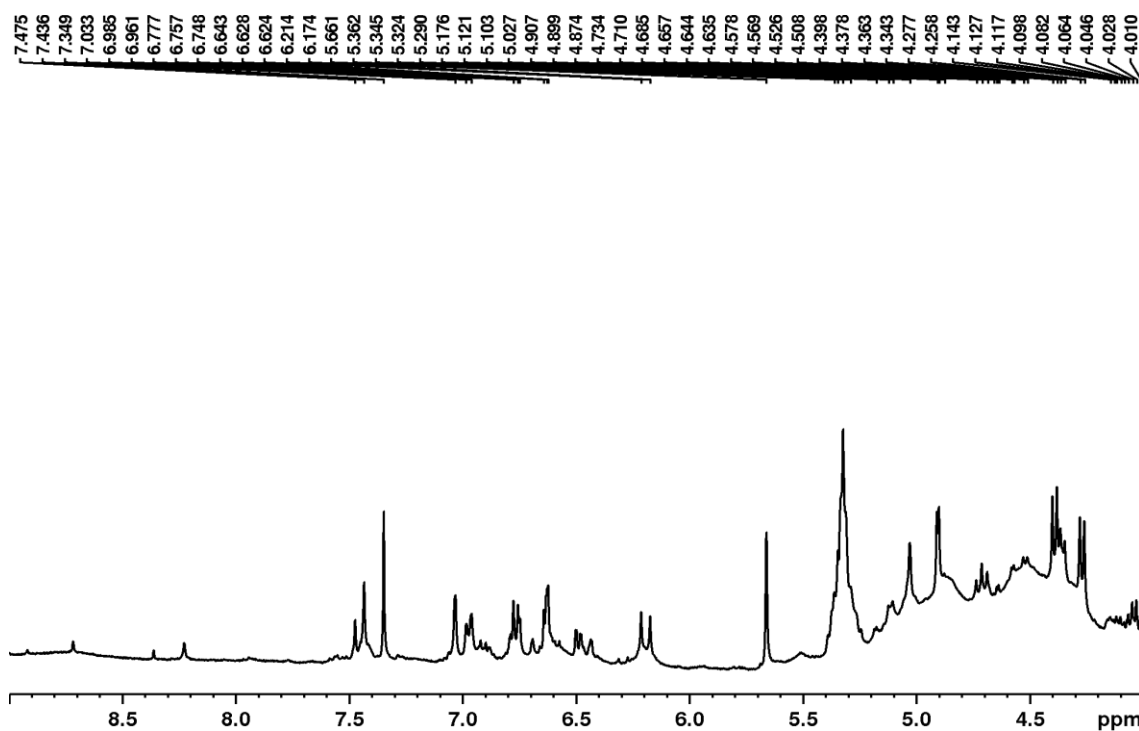


Figura 5. Ampliação da região 9,00 a 4,00 ppm do espectro de RMN de ^1H do extrato hidroetanólico das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. obtidos por maceração no hidromódulo de 1:8 (400 MHz, DMSO-d_6).

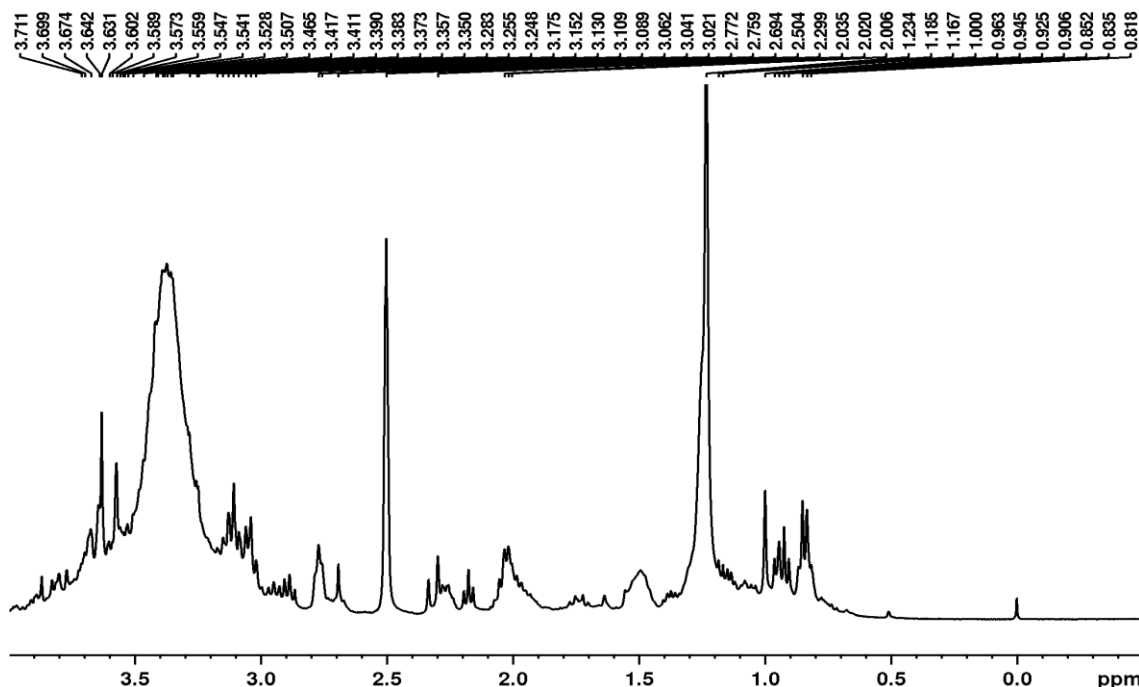


Figura 6. Ampliação da região 4,00 a -0,50 ppm do espectro de RMN de ^1H de do extrato hidroetanólico das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. obtidos por maceração no hidromódulo de 1:8 (400 MHz, DMSO-d_6).

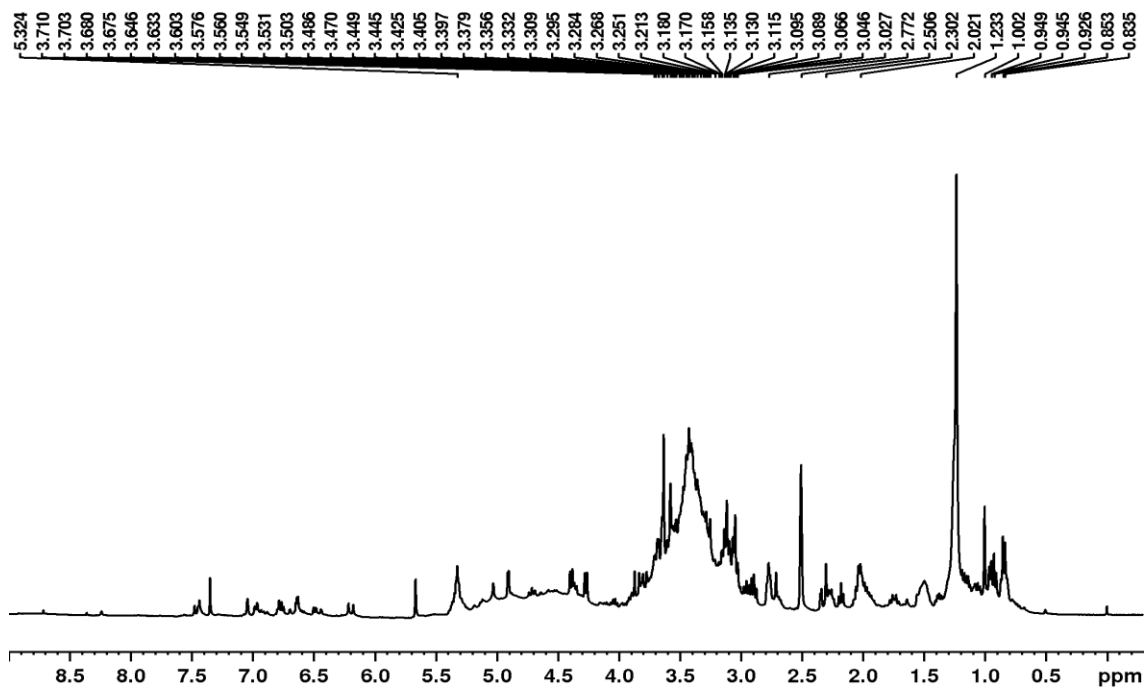


Figura 7. Espectro de RMN de ^1H do extrato hidroetanólicos das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. obtidos por maceração no hidromódulo de 1:8 (400 MHz, DMSO- d_6).

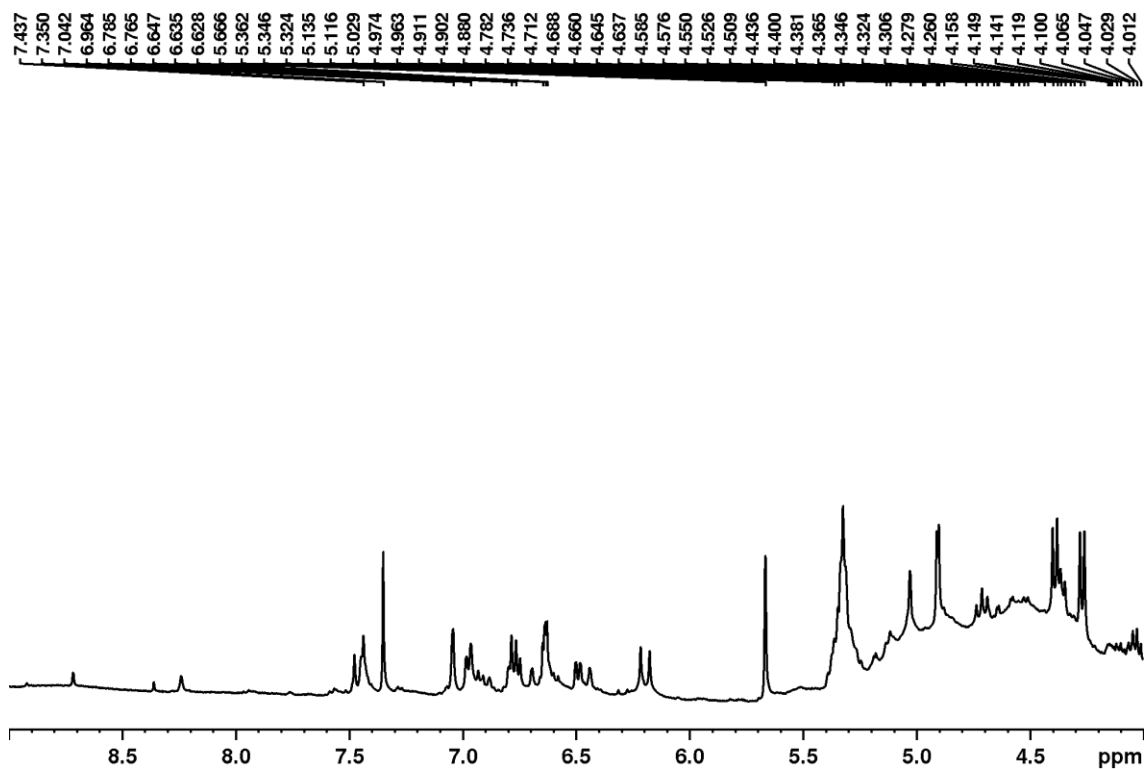


Figura 8. Ampliação da região 9,00 a 4,00 ppm do espectro de RMN de ^1H do extrato hidroetanólicos das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. obtidos por maceração no hidromódulo de 1:8 (400 MHz, DMSO- d_6).

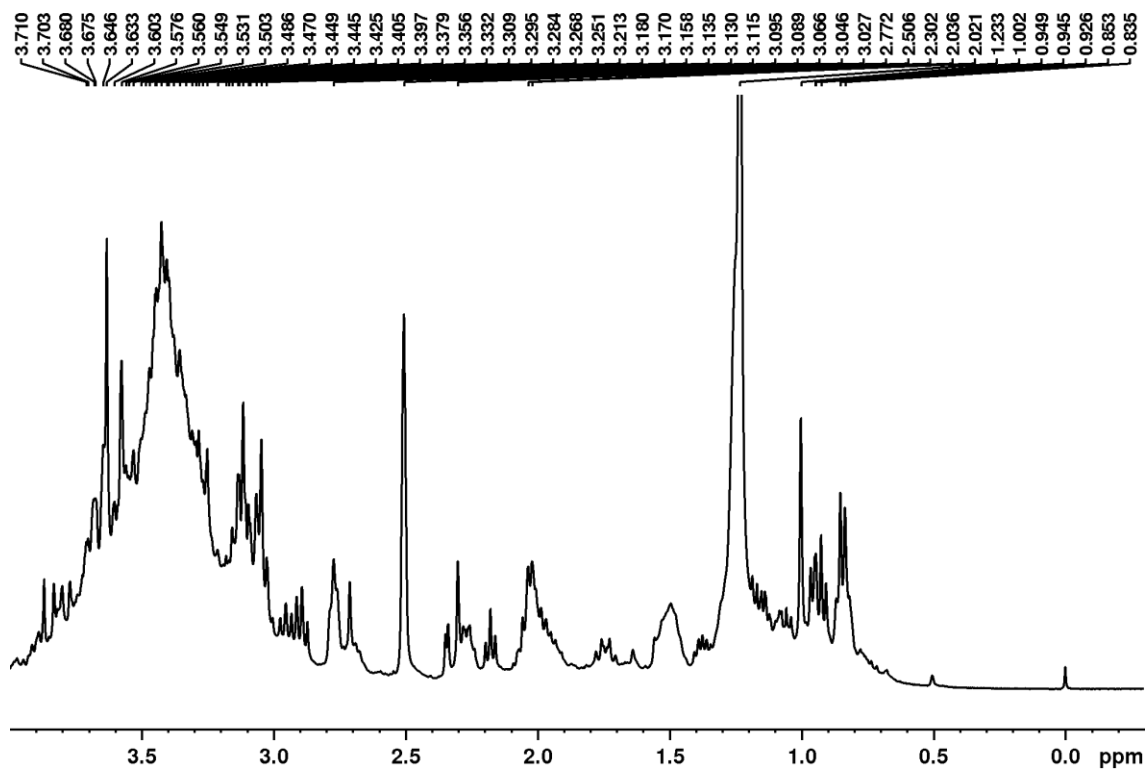


Figura 9. Ampliação da região 4,00 a -0,30 ppm do espectro de RMN de ^1H do extrato hidroetanólico das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. obtidos por maceração no hidromódulo de 1:8 (400 MHz, DMSO-d_6).

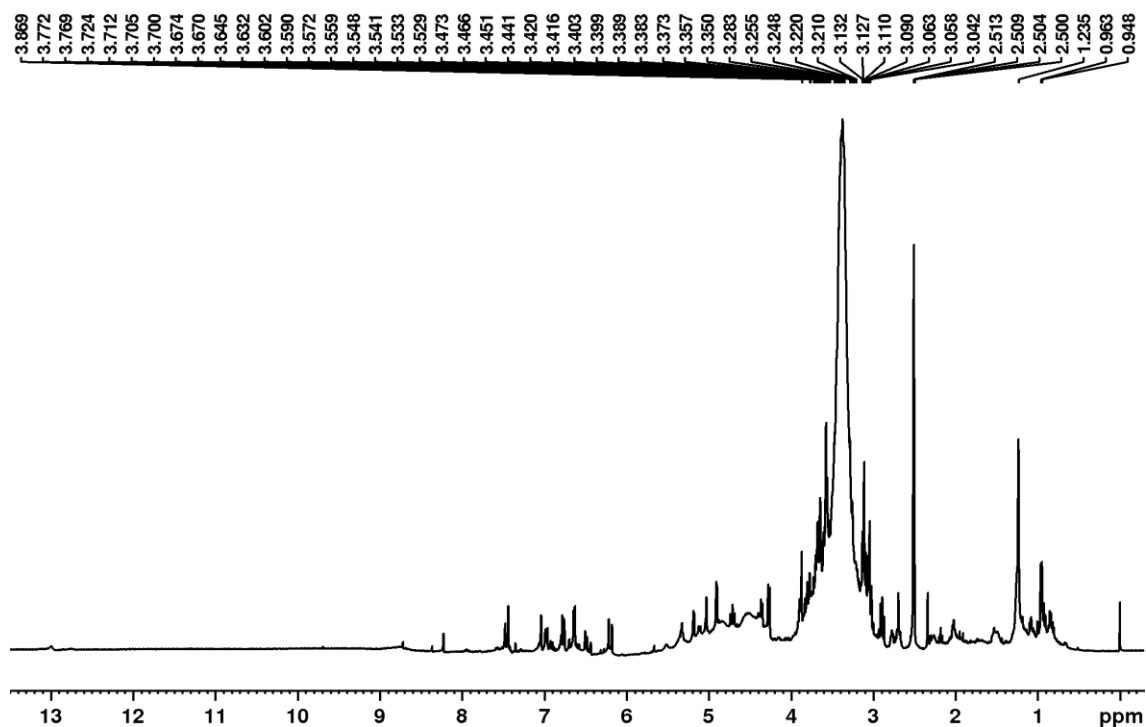


Figura 10. Espectro de RMN de ^1H do extrato hidroetanólico das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. obtidos por percolação no hidromódulo de 1:8 (400 MHz, DMSO-d_6).

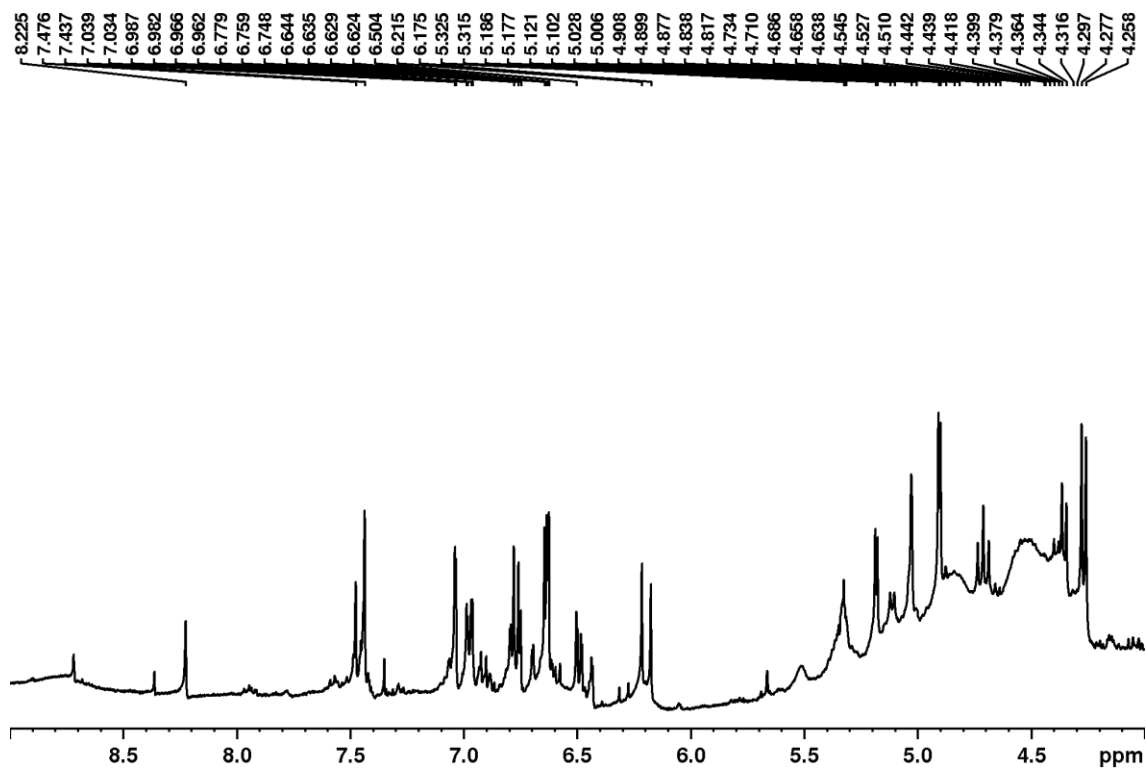


Figura 11. Ampliação da região 9,00 a 4,00 ppm do espectro de RMN de ^1H do extrato hidroetanólico das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. obtidos percolação no hidromódulo de **1:8** (400 MHz, DMSO- d_6).

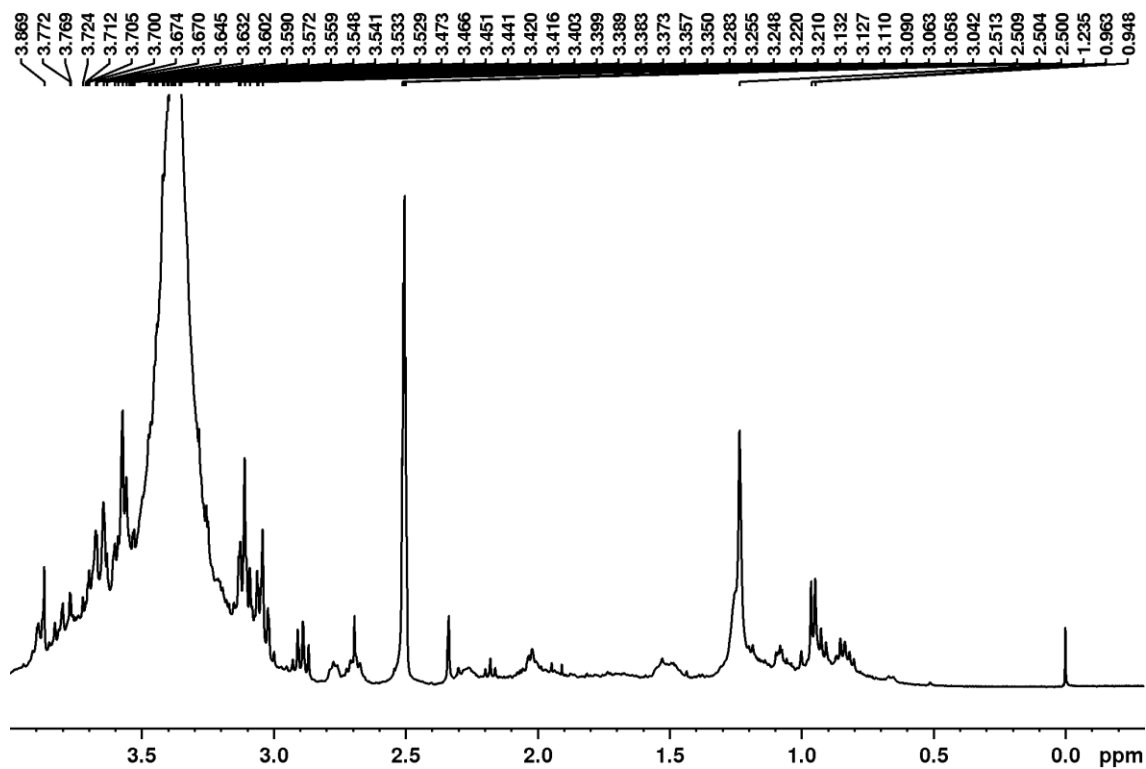


Figura 12. Ampliação da região 4,00 a -0,30 ppm do espectro de RMN de ^1H do extrato hidroetanólico das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. obtidos percolação no hidromódulo de **1:8** (400 MHz, DMSO- d_6).

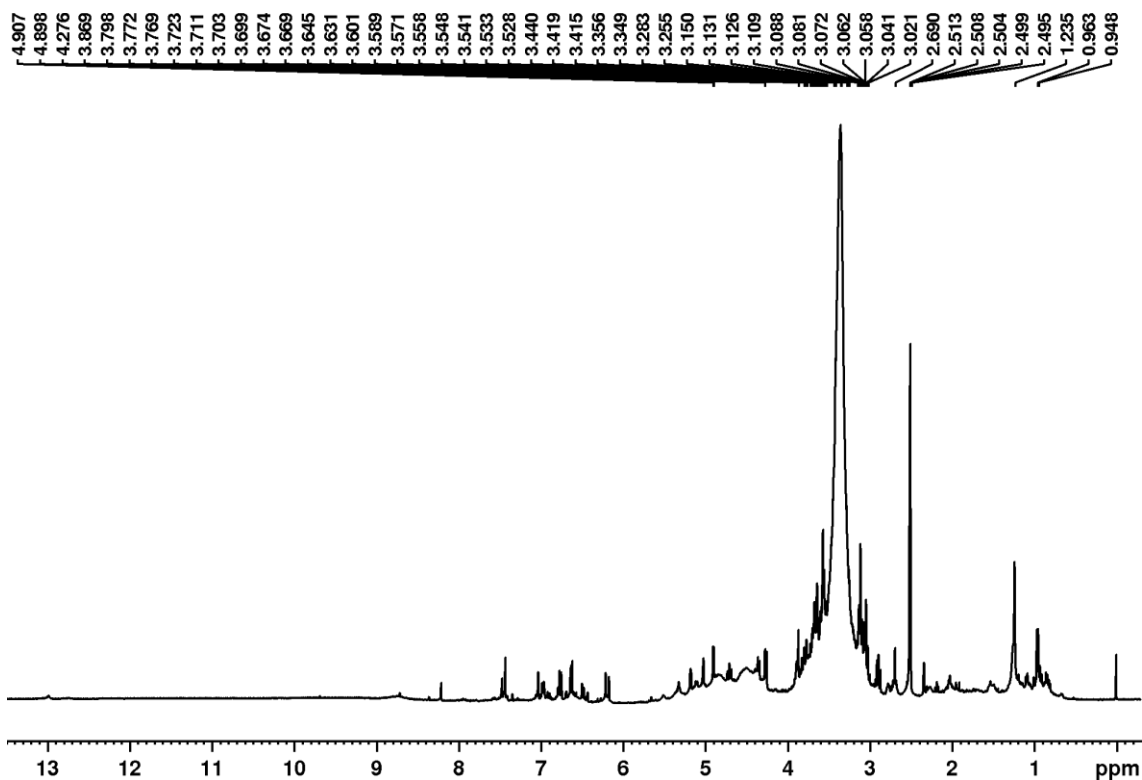


Figura 13. Espectro de RMN de ^1H do extrato hidroetanólico das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. obtidos por soxlet no hidromódulo de 1:6 (400 MHz, DMSO-d_6).

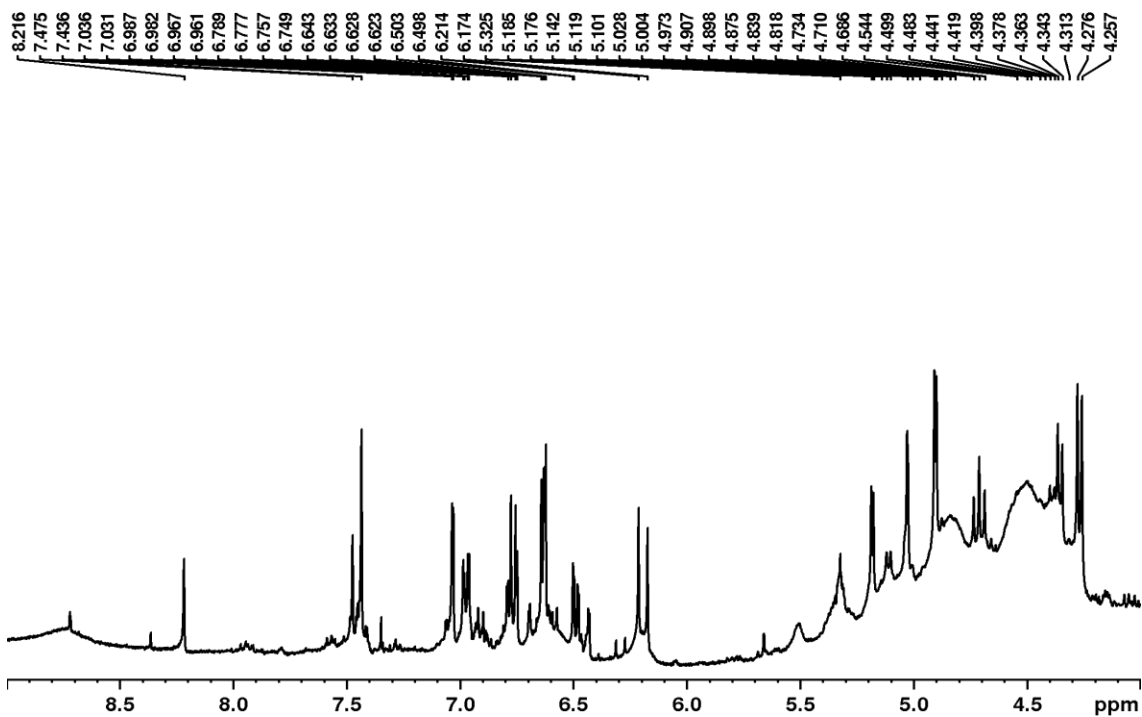


Figura 14. Ampliação da região 9,00 a 4,00 ppm do espectro de RMN de ^1H do extrato hidroetanólico das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. obtidos por soxlet no hidromódulo de 1:6 (400 MHz, DMSO-d_6).

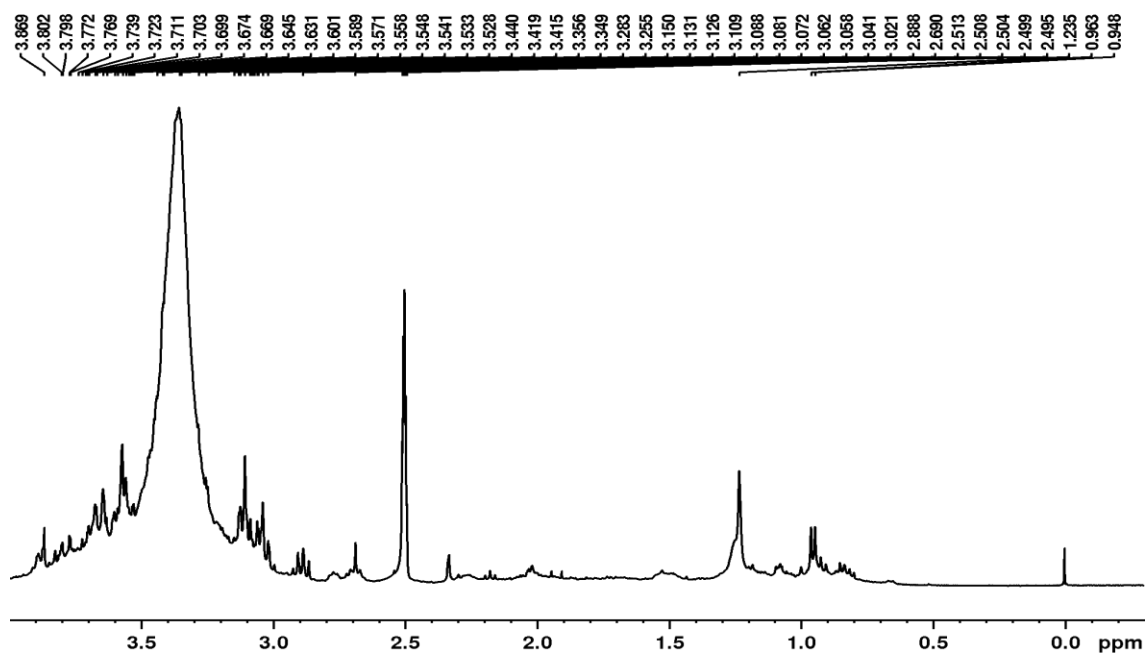


Figura 15. Ampliação da região 4,00 a -0,30 ppm do espectro de RMN de ^1H do extrato hidroetanólico das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. obtidos por soxlet no hidromódulo de 1:6 (400 MHz, DMSO-d_6).

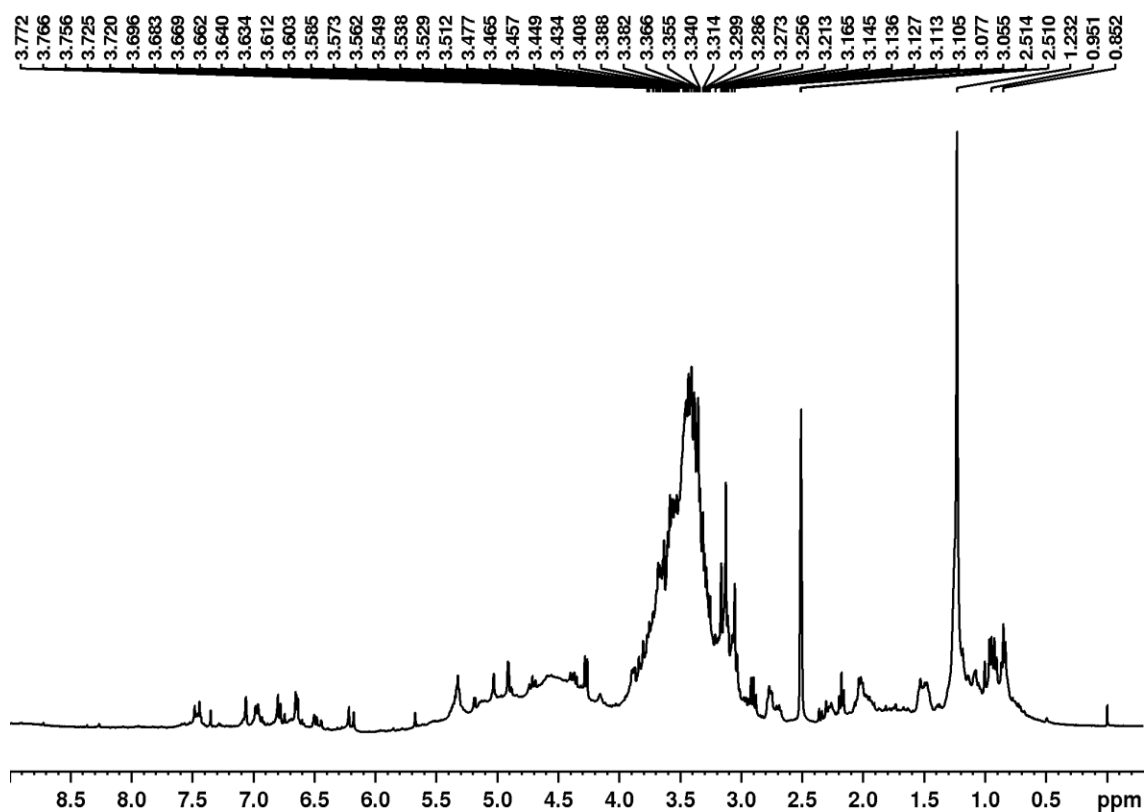


Figura 16. Espectro de RMN de ^1H do extrato hidroetanólico das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. obtidos por soxlet no hidromódulo de 1:8 (400 MHz, DMSO-d_6).

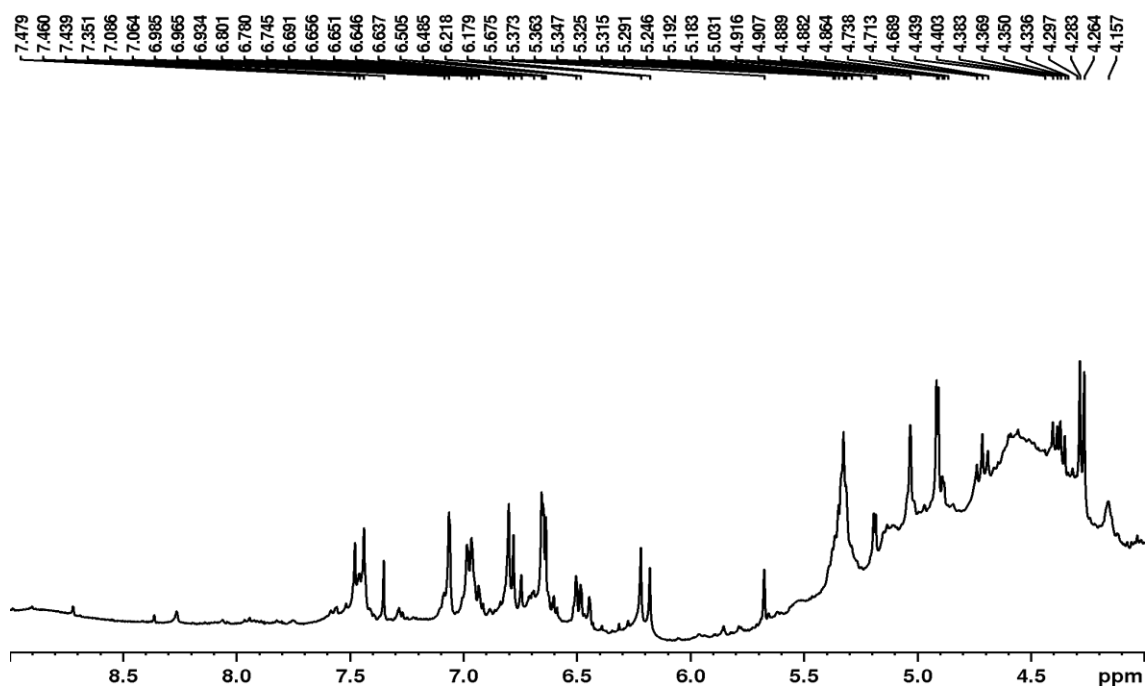


Figura 17. Ampliação da região 9,00 a 4,00 ppm do espectro de RMN de ^1H de do extrato hidroetanólico das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. obtidos por soxlet no hidromódulo de 1:8 (400 MHz, DMSO- d_6).

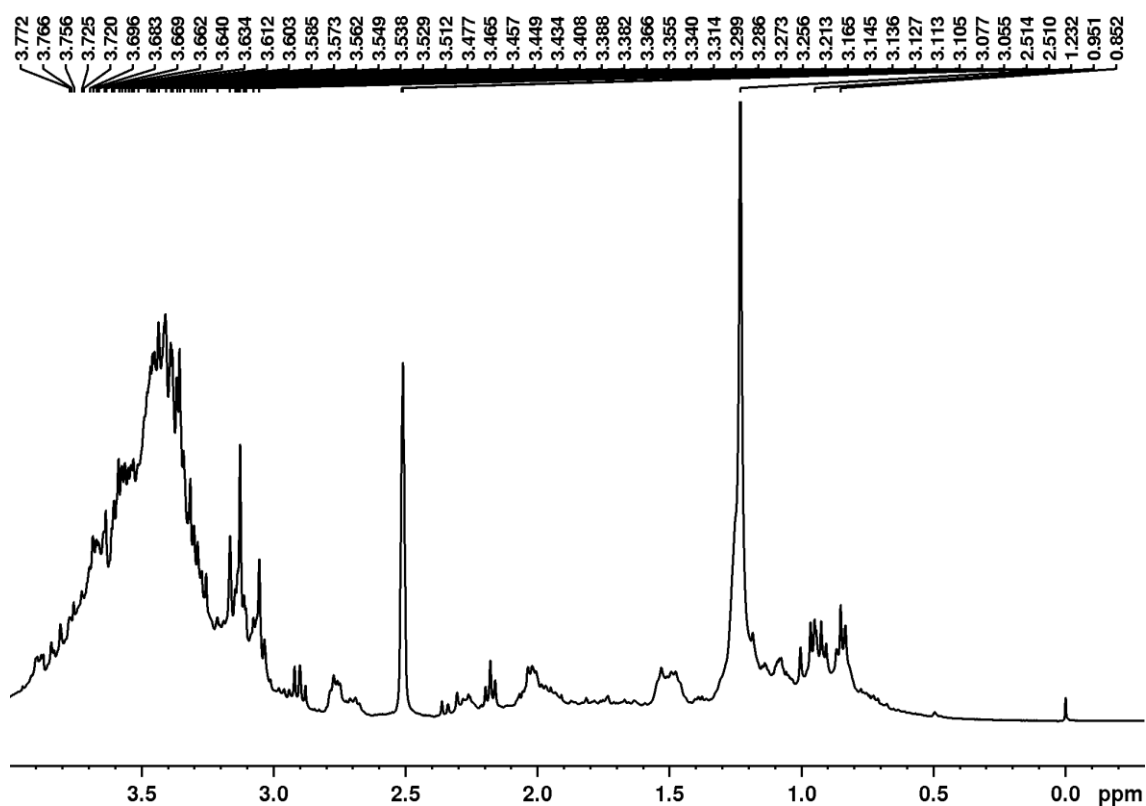


Figura 18. Ampliação da região 4,00 a -0,30 ppm do espectro de RMN de ^1H do extrato hidroetanólico das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. obtidos por soxlet no hidromódulo de 1:8 (400 MHz, DMSO- d_6).

