



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA
DE SANTANA**

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS**

LAÍS CARDOSO ALMEIDA

**ASPECTOS MORFOANATÔMICOS E FARMACOGNÓSTICOS DE
“GERVÃO” *Stachytarpheta jamaicensis* (L.) Vahl (VERBENACEAE)**

LAÍS CARDOSO ALMEIDA

**ASPECTOS MORFOANATÔMICOS E
FARMACOGNÓSTICOS DE “GERVÃO” *Stachytarpheta
jamaicensis* (L.) Vahl (VERBENACEAE)**

FEIRA DE SANTANA- BAHIA

2014

LAÍS CARDOSO ALMEIDA

**ASPECTOS MORFOANATÔMICOS E FARMACOGNÓSTICOS
DE “GERVÃO” *Stachytarpheta jamaicensis* (L.) Vahl
(VERBENACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientadora: Profa. Dra. Tânia Regina dos S. Silva (UEFS)
Co-orientador: Prof. Dr. Hugo Neves Brandão (UEFS).

A minha mãe, por quem tenho amor incondicional e gratidão infinita!

AGRADECIMENTOS

As mãos de Deus me levam aos lugares onde meus pés nunca levariam. Chegar aqui foi uma das tarefas mais difíceis que já me foram atribuídas, por precisar executar em paralelo ao momento mais difícil da minha vida. Por mil vezes pensei em não continuar. Mas Graças a Deus e as pessoas tão queridas que tenho o privilégio de contar na minha vida, aqui estou, finalizando esse ciclo e tendo a enorme oportunidade de poder agradecê-los.

Primeiramente, a Deus por ser o caminho, a verdade e a vida.

A Minha amada Mãe, pessoa por quem eu vivo, pelo cuidado, proteção, conselhos e ensinamentos. Por toda referência de Amor, Fé, Resignação e Coragem.

A minhas irmãs, Lívia e Lorena, AMORES DA MINHA VIDA, em especial a Lore que abdicou da sua trajetória acadêmica em prol da minha, sem você seria impossível chegar aqui.

A meu pai por está ao meu lado, por tanto amor e proteção.

As Tias: Vera, Cris e Lia.

A Tia Iza e Tia Marly, por TUDO! Palavras são insuficientes para agradecer e expressar a importância de vocês em todos os momentos.

A Vando, Dindo, César, Minho, Rafa, Ellen, Vena, Min, Victor, Vinícius, Tai, Nanda, Lila, Gênia e Xande pela dedicação e carinho.

A Neto, por ser sempre tão prestativo e me ajudar sempre que preciso.

A Elisângela, pela irmandade, parceria e inúmeros momentos compartilhados.

A Maria, por todas as vezes que me fez sorrir e por toda leveza.

A Cássia, amiga maravilhosa que tive oportunidade de reconhecer, obrigado por todo carinho e confiança.

A Gabriela, pela presença constante.

As amigas, Ninha, Pri, Lore pela torcida.

Aos amigos do Laboratório de Extração Vegetal (LAEX): Mai, Jéssica, Raíssa, Anderson, Luís e Leane, muito obrigado pelo convívio e pela força.

A Luís pelo desenho e companhia no laboratório.

Aos colegas do mestrado, em especial aos amigos Carine, André, Daniel e Íngara.

Aos doutores, Marcos, Guilherme e Ana Rosa, são exemplos de amor à profissão.

A orientadora, Prof^a Dr^a Tânia Regina, pela colaboração.

Ao co-orientador, Prof. Dr. Hugo Neves, por acreditar em mim, pela experiência trocada, incentivo e força.

Ao professor Raniere, grande incentivador da minha permanência nessa caminhada.

A Prof. Elinalva por ter me aceitado em seu laboratório e pela confiança.

A Fabrícia, sempre tão solícita.

A Prof. Cláudia e a equipe do laboratório de Micromorfologia Vegetal (LAMIV).

A Prof. Efigênia, pela ajuda no laboratório de Taxonomia Vegetal (TAXON).

Aos Professores do RGV pelo conhecimento transmitido.

A Alberto, por sempre ajudar no possível.

A todos os familiares e amigos que mesmo distantes remetem orações e sentimentos bons, o meu muito obrigado.

Aos que contribuíram direta ou indiretamente para a execução desse trabalho.

A Universidade Estadual de Feira de Santana, pela oportunidade de realização deste curso.

Ao Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais (PPGRGV) e à coordenação de Nível Superior (CAPES).

“As únicas pessoas que alcançam êxito são as que querem tanto o conhecimento que insistem em busca-lo mesmo em condições pouco favoráveis.”

C.S. Lewis- The weight of Glory

RESUMO

A espécie foi selecionada para realização da pesquisa devido à ampla utilização medicinal para tratamento de diarreia pela população do nordeste brasileiro. O objetivo desse trabalho foi estudar os aspectos morfoanômicos das folhas de *Stachytarpheta jamaicensis*, detectar presença das principais classes de metabólitos secundários presentes no extrato bruto de suas folhas e ainda avaliação do potencial antioxidante, citotóxico e antibacteriano do referido extrato e suas frações. Para alcançar os objetivos, secções paradérmicas e transversais foram efetuadas para estudo da epiderme e seus anexos. Analisou-se também caracteres da morfologia foliar e do pecíolo através de cortes histológicos. Foi realizada triagem fitoquímica do extrato bruto através de testes colorimétricos e ensaios de precipitação. A partir do extrato bruto metanólico, realizou-se partições com solventes de polaridade crescente (hexano, clorofórmio e acetato de etila). O fracionamento e purificação dos extratos particionados foi realizado por cromatografia em coluna (CC) e monitorado por cromatografia em camada delgada (CCD). O Extrato Bruto (EB) e as frações foram submetidos ao teste do sequestro do radical livre 1,1 – difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) e ao ensaio de letalidade da *Artemia salina*, para avaliação das atividades antioxidante e citotóxica, respectivamente. Para avaliação da atividade antibacteriana foram executadas as técnicas de difusão em disco, em poço e MIC (concentração inibitória mínima) frente às cepas de *Samonella* e *E.coli*. A lâmina foliar é anfiestomática, com estômatos do tipo diacítico, a epiderme é uniestratificada, com presença de tricomas tectores. Os resultados detectaram presença de taninos, flavonoides, alcaloides e saponinas. Na avaliação da atividade antioxidante, os valores de IC₅₀ (mg/ml) encontrados foram de 6,62 a 446,20 para os extratos testados. Quanto à citotoxicidade, todos os extratos apresentaram valores de LC₅₀ (mg/ml) de 211,16 a 446,20, sendo o extrato hexânico o mais ativo (LC₅₀ 211,16) . Quanto à análise antibacteriana, não foi demonstrada atividade dos extratos frente as bactérias testadas. A toxicidade apresentada pela folha dessa espécie remete cautela quanto à sua segurança para uso pela população.

PALAVRAS-CHAVE: *Stachytarpheta jamaicensis*, Morfoanatomia, Fitoquímica, Atividade biológica, Citotoxicidade.

ABSTRACT

The species was selected to carry out the research because of the wide medicinal use for diarrhea treatment by the Brazilian northeast population. The objective of this work was to study the morphological and anatomical aspects of the leaves of *Stachytarpheta jamaicensis*, detect the presence of the major classes of secondary metabolites present in the crude extract of the leaves and still assessing the potential antioxidant, cytotoxic and antibacterial said extract and its fractions. To achieve the objectives, paradermic sections and cross were made to study the epidermis and its annexes. Was also analyzed characters of leaf morphology and petiole through histological sections. Phytochemical screening of crude extracts was performed by colorimetric tests and tests precipitation. From the raw methanol extract was held partitions with increasing polarity solvents (hexane, chloroform and ethyl acetate). The fractionation and purification of the partitioned extracts was performed by column chromatography (CC) and monitored by thin layer chromatography (TLC). The crude extract (EB), and fractions were subjected to test the free radical sequestration 1,1 - diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) test and the mortality of *Artemia salina*, to assess antioxidant activities and cytotoxic activities, respectively. To evaluate the antibacterial activity were performed the disk diffusion techniques in well and MIC (minimum inhibitory concentration) compared to the strains of *Salmonella* and *E.coli*. The blade is amphistomatic with stomata of diacitic type, the epidermis is uniseriate, with the presence of trichomes. The results detected the presence of tannins, flavonoids, alkaloids and saponins. In the evaluation of antioxidant activity, IC 50 values (mg / ml) were found 6.62 to 446.20 for the tested extracts. For cytotoxicity, all extracts showed LC50 values (mg / ml) 211.16 to 446.20, and the hexane extract the most active (LC50 211.16). For antibacterial analysis, has not been demonstrated activity of extracts front bacteria tested. The toxicity of the leaf of this species refers caution about their safety for use by the population.

KEYWORDS: *Stachytarpheta jamaicensis*, Morphology, anatomy, phytochemistry, biological activity, cytotoxicity.

SUMÁRIO

RESUMO	07
ABSTRACT	08
1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	06
3. MATERIAIS E METÓDOS	07
3.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA	07
3.2 ESTUDO MORFOLÓGICO	07
3.3 ESTUDO ANATÔMICO	07
3.4 ESTUDO FITOQUÍMICO	08
3.5 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA E CROMATOGRAFIA EM COLUNA CROMATOGRÁFICA	10
3.6 TESTES DE BIOATIVIDADE	10
3.6.1 AVALIAÇÃO DA LETALIDADE CONTRA <i>Artemia salina</i>	10
3.6.2. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE- TESTE DO SEQUESTRO DO RADICAL DPPH	11
3.6.3. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA: DIFUSÃO EM DISCO	12
3.6.4. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA: DIFUSÃO EM POÇO	13
3.6.5. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA: CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (MIC)	13
4. RESULTADOS	14
4.1. DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA	14
4.2. DESCRIÇÃO ANATÔMICA DA FOLHA	16
4.3. TESTES FITOQUÍMICOS	20
4.4. COLUNA CROMATOGRÁFICA	22
4.5. TESTE DO DPPH	23
4.6. <i>Artemia salina</i>	28
4.7. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	31
5. DISCUSSÃO	34
6. CONCLUSÕES	37
7. REFERÊNCIAS	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Stachytarpheta jamaicensis</i>	05
Figura 2: Preparo do extrato das folhas de <i>S.jamaicensis</i>	08
Figura 3: Incubação dos náuplios de <i>Artemia salina</i>	11
Figura 4: Amostras submetidas ao teste DPPH	12
Figura 5: Aspecto morfológico da folha de <i>Stachytarpheta jamaicensis</i>	15
Figura 6: Microscopia óptica de folhas de <i>S. jamaicensis</i>	17
Figura 7: Microscopia óptica de nervura central, pecíolo de <i>S. jamaicensis</i>	18
Figura 8: Microscopia óptica de pecíolo das folhas de <i>S. jamaicensis</i>	19
Figura 9: Teste fitoquímico	21
Figura 10: Atividade antioxidante de concentrações do EBF da <i>S. jamaicensis</i>	24
Figura 11: Atividade antioxidante de concentrações do EHF da <i>S. jamaicensis</i>	25
Figura 12: Atividade antioxidante de concentrações do EAEF da <i>S. jamaicensis</i>	26
Figura 13: Atividade antioxidante de concentrações do ECF da <i>S. jamaicensis</i>	27
Figura 14: Mudança de coloração de diferentes concentrações dos Extratos	27
Figura 15: Atividade citotóxica de concentrações do EBF da <i>S. jamaicensis</i>	28
Figura 16: Atividade citotóxica de concentrações do EHF da <i>S. jamaicensis</i>	29
Figura 17: Atividade citotóxica de concentrações do EAEF da <i>S. jamaicensis</i>	30
Figura 18: Atividade citotóxica de concentrações do ECF da <i>S. jamaicensis</i>	31
Figura 19: Atividade antibacteriana- Difusão em disco	32
Figura 20: Atividade antibacteriana- Difusão em poço	32
Figura 21: Teste para determinação da concentração inibitória mínima (MIC)	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Expressão dos resultados do screening fitoquímico	20
Tabela 2- Subfrações obtidas da CC principal	22
Tabela 3- Subfrações coletadas da CC da FSJ 15	23
Tabela 4- Atividade antioxidante do EBF de <i>S. jamaicensis</i>	24
Tabela 5- Atividade antioxidante do EHF de <i>S. jamaicensis</i>	24
Tabela 6- Atividade antioxidante do EAEF de <i>S. jamaicensis</i>	25
Tabela 7- <i>Atividade antioxidante do ECF de S. jamaicensis</i>	26
Tabela 8- Atividade citotóxica do EBF da <i>S. jamaicensis</i>	28
Tabela 9- Atividade citotóxica do EHF da <i>S. jamaicensis</i>	29
Tabela 10- Atividade citotóxica do EAEF da <i>S. jamaicensis</i>	30
Tabela 11- Atividade citotóxica do ECF da <i>S. jamaicensis</i>	30
Tabela 12- Atividade antibacteriana dos extratos de <i>S. jamaicensis</i>	30
Tabela 13- Resultados do MIC	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC- Coleção de culturas americanas

CC- Cromatografia em Coluna

CCD- Cromatografia em Camada Delgada

CHCl₃ - Clorofórmio

DMSO- Dimetilsulfóxido

DPPH- 1,1 – difenil-2-picrilhidrazil

EAEF1- Extrato acetato de etila da folha

EBF- Extrato bruto da folha

ECF- Extrato Clorofórmico

EHF- Extrato hexânico da folha

FAA- formol, ácido acético e álcool etílico.

HUEFS- Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana

IC50- Concentração inibitória de 50% da atividade do DPPH

LC50- Concentração letal média

MeOH- Metanol

MIC- Concentração Inibitória Mínima

SFSJ- Subfração da folha da *S. jamaicensis*

1. INTRODUÇÃO GERAL

Apesar do progresso da química de síntese, é inegável que as plantas medicinais conquistaram importância cada vez maior no mercado de medicamentos tornando-se uma realidade mundial. A Organização Mundial de Saúde estima que 80% da população mundial utilizam a medicina tradicional para suprir suas necessidades médicas primárias, o que leva a compreender que o estudo de plantas medicinais é extremamente importante para a saúde pública. O desenvolvimento de estudos envolvendo as mesmas permite e facilita a elaboração de medicamentos fitoterápicos com qualidade e segurança, melhorando as possibilidades de uso de recursos regionais e conseqüentemente de comercialização no mercado mundial (GILBERT, 2005).

Em países industrializados, há um alto índice de prescrição de medicamentos que se utilizam da grande biodiversidade vegetal (LEITE, 2009). Entretanto, nos países em desenvolvimento, aproximadamente 80% da população recorre à medicina alternativa e/ou complementar para solucionar seus problemas de saúde, devido ao alto custo da terapêutica convencional (AHMAD *et al.*, 1998). Frequentemente, as pessoas fazem uso de plantas sem nenhum embasamento científico, prática que pode resultar em intoxicações e em outros distúrbios. No Brasil, esta realidade é agravada pela diversidade e abundância de espécies vegetais desconhecidas tanto química como taxonomicamente (ARNASON *et al.*, 1994).

A fitoterapia representa uma das práticas milenares, com o emprego de plantas para diversos propósitos terapêuticos, como no tratamento de processos inflamatórios, infecções, lesões de pele, diarreia, doenças venéreas, picadas de insetos etc. (SAMY *et al.*, 1998).

A RDC N°26/2014 traz o conceito de planta medicinal como espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos e define droga vegetal como planta medicinal ou suas partes, que contenham as substâncias responsáveis pela ação terapêutica, após processos de coleta/colheita, estabilização, secagem (quando aplicável), podendo ser íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada.

Como as plantas apresentam grande variedade de substâncias químicas, inclusive com efeitos biológicos potentes, a pesquisa com plantas que ainda não foram estudadas, bem como a avaliação desse potencial terapêutico torna-se essencial para descoberta de novos compostos bioativos (MUKHERJEE *et al.*, 2012).

O esclarecimento e registro dos constituintes resultantes do metabolismo secundário dos vegetais podem ser obtidos através da pesquisa fitoquímica que assume desde formatos simples como os testes colorimétricos e de precipitação a outros mais

complexos, tais como a identificação e isolamento de substâncias. (RODRIGUES *et al*, 2009).

O desenvolvimento de novas técnicas analíticas, assim como, a evolução dos instrumentos de análise espectrométrica, determinam, quais classes de compostos estão presentes nos extratos, permitindo correlação dos mesmos com os testes de atividade biológica (RODRIGUES *et al*, 2009). A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica de adsorção líquido-sólido, é um método simples, rápido, visual e econômico. A CCD é a técnica predominantemente escolhida para o acompanhamento de reações orgânicas, sendo também muito utilizada para a purificação de substâncias e para a identificação de frações coletadas em cromatografia líquida clássica (DEGANI *et al*, 1998).

É importante também salientar que alguns vegetais apresentam um conjunto de princípios ativos e a ação farmacodinâmica dos mesmos é mais conveniente do que um desses princípios isolados (OLIVEIRA *et al*, 2009).

Para o desenvolvimento de um medicamento, a partir de uma espécie botânica é necessário demonstrar a eficácia, daí a importância de realizar estudos que irão comprovar a sua atividade farmacológica e sua utilização com finalidades medicamentosas justificadas (FONSÊCA, 2005).

Para que a validação da planta medicinal se torne efetiva é necessário que a espécie possa ser examinada quanto aos aspectos botânicos, químicos, biológicos e farmacológicos (GILBERT *et al*, 2005).

Os testes de toxicidade são elaborados com os objetivos de avaliar ou prever os efeitos tóxicos nos sistemas biológicos e dimensionar a toxicidade relativa das substâncias (FORBES e FORBES, 1994). A avaliação a toxicidade pode ser feita a partir do experimento de letalidade da *Artemia salina* (Figura 1) que é um microcrustáceo de água salgada comumente usada como alimento para peixe (NASCIMENTO *et al.*, 2008). Essa prática é considerada como bioindicador para atividade antioxidante e teve início a partir de 1982 em testes de toxicidade aguda para monitoramento de extratos de plantas ou outros organismos, com vistas à detecção da presença de compostos citotóxicos (ANDERSON, 1991; SERRANO *et al*, 1996). Representa um método rápido e barato, possuindo grande capacidade para formar cistos dormentes, praticidade de manuseio e cultivo, além de ser um bioindicador eficaz em uma avaliação toxicológica pré-clínica (BAROSA *et al*, 2003).

Visando buscar novos fármacos para o tratamento de diversas doenças e aproveitando a biodiversidade vegetal do nordeste, pesquisas com plantas medicinais têm sido realizadas em busca de compostos com elevada atividade antioxidante (POTTERAT, 1998). Atualmente, devido às descobertas dos efeitos dos radicais livres nos organismos,

existe um grande interesse no estudo de antioxidantes que são definidos como compostos que protegem o sistema biológico contra o efeito nocivo de processos ou reações que podem causar oxidação excessiva (KRINSKY, 1994). Sabe-se que, antioxidantes são utilizados para proteção de cosméticos, fármacos e alimentos, evitando a decomposição oxidativa pela ação da luz, temperatura e umidade (BARREIROS *et al*, 2006).

Experimentos demonstram que enzimas e metabólitos encontrados em plantas superiores se defendem da ação oxidante através da inibição da formação de radicais livres e pelo sequestro dessas espécies oxigenadas, tais como, os radicais peróxidos. Diversas técnicas têm sido utilizadas para que a atividade antioxidante *in vitro* seja determinada, permitindo assim, uma rápida seleção de substâncias e/ou misturas potencialmente interessantes na prevenção de doenças crônico-degenerativas (DUARTE, 2010).

O método do DPPH que é baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes produzindo um decréscimo da absorvância a 515nm (BRAND-WILLIAMS *et al*, 1995). Dentre as substâncias naturais que tem apresentado atividades antioxidantes, destacam-se as lignanas e os flavonoides (FAURÉ, 1990).

Quanto à presença de substâncias antimicrobianas, é fato conhecido desde o tempo das cavernas em que o homem paleolítico as administrava para tratar as suas doenças. Embora não seja possível precisar com exatidão a origem da fitoterapia, sabe-se que é uma das maiores, melhores e mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. Devido a sua atividade metabólica secundária, os vegetais superiores são capazes de produzir substâncias antibióticas que são utilizadas como mecanismo de defesa contra microrganismos, insetos e herbívoros (FONSECA, 2005). Porém, só a partir da descoberta da penicilina a busca pelos antibióticos teve importância (SILVEIRA *et al*, 2009).

O uso constante de antibióticos segundo Moellering *et al* (2000) tem provocado uma série de problemas, destacando-se o desequilíbrio da ecologia humana e a resistência bacteriana, necessitando a busca por novos antibióticos eficazes. Essa vertente abre caminhos para a pesquisa com plantas medicinais.

Com o passar do tempo tornou-se crescente a resistência dos microrganismos às substâncias antibacterianas sintéticas. Assim, busca-se através de extratos de plantas, realizar testes que possam identificar novos compostos com atividade antibacteriana conhecida (SILVEIRA *et al*, 2009).

Essa atividade antibacteriana de extratos vegetais é determinada a partir de pequena quantidade da substância necessária para inibir o crescimento do microrganismo-teste (OSTROSKY, 2008).

As bactérias *Salmonella entérica* e *Escherichia coli* pertencem a família Enterobacteriaceae. Essas enterobactérias são bastante conhecidas por normalmente estarem envolvidas em infecções intestinais

A família Verbenaceae está constituída de aproximadamente 100 gêneros e 2600 espécies ocorrendo em regiões temperadas, tropicais e subtropicais de ambos os hemisférios. Seus representantes apresentam hábito variado, desde árvores de grande porte (*Tectoma grandis* L.) até ervas (*Verbena officinalis* L.). Entre as dicotiledôneas que contêm princípios aromáticos, a família se destaca por ter alguns de seus representantes utilizados na medicina popular por suas propriedades digestiva, antidiabética, antimalárica, antiúlcero-gênica e antiinflamatória, assim como utilização em odontologia e cosmética (BRAGA *et al*, 2009). *Lantana camara* L., *Lippia pseudo-thea* Schauer, *Stachytarpheta dichotoma* Vahl, são citadas na Farmacopeia Brasileira (BRANDÃO, 2008).

Considerada como planta daninha, *Stachytarpheta jamaicensis* (L.) Vahl (Figura 2), nativa do Brasil, cresce comumente perto de matas e em áreas sob distúrbio. É um subarbusto anual ou perene, ereto, muito ramificado, de 70-100 cm de altura, com inflorescências terminais espigadas, 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). 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 *et al* (2001), outras propriedades farmacológicas dessa planta têm sido estudadas como sedativo e antipirético.



Figura 1: *Stachytarpheta jamaicensis* A-Hábito; B-Detalhe da inflorescência; C-Detalhe da folha (Fotos: L.C.Almeida 2014).

Ocorre no Brasil outra espécie deste gênero com propriedades semelhantes, como, *Stachytarpheta cayennensis* que apresenta propriedades antipiréticas, estomáquicas, para o tratamento de doenças hepáticas crônicas e com diversas outras finalidades. Suas raízes são usadas como cicatrizantes e como atenuantes de dores reumáticas. Encontram-se estudos referentes a outras espécies do gênero na literatura, que indicam a ocorrência de substâncias com potencial farmacológico (BLANCO, 2005).

2.OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Analisar aspectos farmacognósticos, fitoquímicos e biológicos de *Stachytarpheta jamaicensis* (L.) Vahl.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever as características morfoanatômicas macro e microscópicas das folhas da espécie;
- Determinar o perfil fitoquímico do extrato bruto metanólico;
- Avaliar o potencial citotóxico e antibacteriano do extrato bruto metanólico das folhas de *Stachytarpheta jamaicensis*;
- Obter frações semi-purificadas;
- Realizar biomonitoramento quanto à atividade antioxidante.

3. MATERIAIS E METODOS

3.1. Coleta e identificação botânica

A coleta da amostra de *S. jamaicensis* foi realizada no município de Conceição do Almeida-BA (12° 46' 46" S; 39° 10' 12" W), em abril de 2013. Foram coletados 10kg de folhas. Uma parte do material foi herborizado e a exsicata depositada no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS 187054). A outra parte foi submetida a secagem em estufa para preparo dos extratos e fixação em FAA70 (JOHANSEN, 1940) por 48h e conservada posteriormente em CH₃ CH₂O_h 70%.

3.2. Estudo morfológico

A descrição morfológica foi realizada no TAXON (Laboratório de taxonomia vegetal). Foram analisados caracteres da morfologia foliar relacionados a composição, tamanho, cor, consistência, contorno, ápice, base, margem, venação e superfície da lâmina foliar. Quanto ao pecíolo, observou-se inserção na lâmina e tamanho. As amostras foram analisadas com auxílio de estereomicroscópio binocular (Taimim).

3.3. Estudo anatômico

A descrição anatômica foi realizada no LAMIV (Laboratório de Micromorfologia Vegetal- UEFS) e em folhas adultas a partir de secções transversais nas regiões de bordo, terço mediano e nervura central. Os cortes foram efetuados à mão livre, com auxílio de lâmina cortante, utilizando-se de isopor como suporte. Também foram realizadas secções transversais em pecíolo.

Os cortes escolhidos foram transferidos para uma solução de hipoclorito de sódio a 50% e permaneceram até completar a descoloração. Após a clarificação lavou-se os cortes em água destilada, corados com azul de Astra a 1% e safranina 1% (9:1) e montadas as lâminas semi-permanentes com glicerina a 50%, segundo técnica modificada de Kraus & Arduin (1997).

Secções paradérmicas à mão livre também foram efetuadas para estudo da epiderme e seus anexos, posteriormente coradas com solução de safranina a 1% hematoxilina e cloreto férrico.

As fotomicrografias e as descrições foram obtidas com o auxílio do microscópio óptico do LEE (Laboratório de Ecologia Evolutiva), com câmera fotográfica acoplada.

3.4. Estudo fitoquímico

O estudo fitoquímico foi realizado no LAEX (Laboratório de Extração Vegetal). O material vegetal fresco (9,986kg) foi submetido à estufa com circulação de ar à 60° C até secagem completa (1,969kg). Posteriormente submetido à moagem em macro moinho. O pó resultante foi pesado e transferido para erlenmeyers. O extrato bruto foi obtido por maceração com cinco extrações em metanol (maceração) por 72 horas cada. Após esse período e a partir desse extrato que foi concentrado em evaporador rotativo, realizaram-se partições com solventes de polaridade crescente (hexano, clorofórmio, acetato de etila). As frações obtidas também foram concentrados em evaporador rotativo e posteriormente secos em capela. As etapas estão descritas na figura 2 (A-F).



Figura 2- Preparo do extrato: A- material fresco; B- droga pulverizada em macro-moinho; C- maceração em metanol; D- concentração do extrato em evaporador rotativo; E- Extrato bruto metanólico; F- Partição do extrato.

Para determinar o perfil fitoquímico (*screening* fitoquímico) do extrato bruto do material analisado foi realizada a triagem fitoquímica com base na metodologia descrita por Matos (1997), que consiste nos seguintes testes analíticos qualitativos, para detecção dos respectivos metabólitos secundários:

Alcaloides: Evaporou-se até *secura*, em banho-maria aproximadamente 30 ml do extrato etanólico da planta, adicionando-se 5 ml de ácido clorídrico a 10% e aquecendo por 10 minutos. Após resfriamento e filtração, dividiu-se igualmente o filtrado em três tubos de ensaio. Juntaram-se ao primeiro algumas gotas do reativo de Mayer e aos outros respectivamente, reativo de Bertrand e reativo de Wagner.

Taninos: Para este teste, foi pesado 0,5g do EB, adicionando-se 25 mL de água destilada em um erlenmeyer. A solução foi aquecida durante 15 minutos, e após arrefecimento a mesma foi filtrada e adicionada em três tubos de ensaios. No tubo 1, foram colocados 1 mL do extrato aquoso e mais 5 mL de água destilada, além de 5 gotas de FeCl_3 a 2%. Nos demais tubos, foram adicionados 2 mL do extrato aquoso e 5 gotas de acetato de chumbo a 10% e 5 gotas de acetato de cobre a 3% no tubos 2 e 3, respectivamente.

Saponinas: 5ml do extrato etanólico da planta foi evaporado e retomado com água fervente. Após resfriamento, agitou-se vigorosamente, deixando em separado por 15 a 20 minutos. Classificou-se a presença de saponinas pela altura da espuma, 1cm= +; 2cm= ++; 3cm= +++.

Flavonoides: Em um tubo de ensaio, foi colocado 2 ml de extrato etanólico da planta, alguns fragmentos de magnésio e vertido, pelas paredes do tubo, gotas de ácido clorídrico diluído. Observou-se a coloração.

Derivados antracênicos livres: Colocou-se num tubo de ensaio 0,20g de pó da planta e após adicionou-se 5ml de clorofórmio, agitando. Feito isso, deixou-se 15 minutos em repouso. Recolheu-se a fase clorofórmica, separando-a em dois tubos de ensaio. No tubo juntou-se 1ml de solução de hidróxido de amônio diluído, agitando-o.

Cumarinas voláteis: Em um tubo de ensaio, colocou-se 2 ml de extrato etanólico da planta, tapando com papel filtro embebido de solução diluída de hidróxido de sódio, e levando ao banho-maria fervente por alguns minutos. O papel de filtro foi removido e examinado à luz UV, sendo a fluorescência amarela indicativa da presença de cumarinas.

Triterpenos e/ou esteróis: O resíduo de 10 ml de extrato etanólico da planta, tratado com 10 ml de clorofórmio anidro foi filtrado, dividindo em duas porções, sendo testado pelas reações de Liebermann-Burchard.

3.5. Cromatografia em camada delgada e cromatografia em coluna

As amostras analisadas: extrato bruto da folha (EBF); extrato acetato de etila da folha (EAEF); extrato hexânico da folha (EHF) e extrato clorofórmico (ECF), foram aplicadas aproximadamente a 1cm da base inferior da lâmina, com auxílio de um capilar. Após aplicação, a lâmina foi introduzida em uma cuba cromatográfica contendo a fase móvel adequada de modo a obter polaridade média em relação aos componentes da amostra. Assim, deixou-se a placa na cuba até que o solvente ascendesse por capilaridade. Desta maneira, o solvente arrastou os compostos menos adsorvidos na fase estacionária, separando-os dos mais adsorvidos. A fase móvel variou conforme a necessidade e disponibilidade. Foi utilizado processo de revelação.

De acordo com perfil CCD e a massa optou-se pelo fracionamento da fração clorofórmica por métodos de cromatografia em coluna. Com o objetivo de realizar a separação dos compostos, colunas cromatográficas foram realizadas a partir da fração clorofórmica. As colunas foram empacotadas com gel de sílica 60H da Merck. O sistema de eluição encontrado foi de polaridade crescente (hexano/acetato) para a primeira coluna e para a segunda iniciou-se com 100% CHCl₃, seguindo CHCl₃: MeOH (99:1).

3.6. Testes de bioatividade

3.6.1. Ensaio de letalidade - *Artemia salina*

Para esta análise adotou-se o método proposto por Meyer e colaboradores (1982). Os ovos de *Artemia salina* foram eclodidos em cuba retangular com um plástico dividindo-a em dois compartimentos. Os compartimentos encontravam-se conectados através de orifícios de 2 mm. A cuba foi preenchida com água do mar artificial preparada com água destilada. Posteriormente depositaram-se os ovos no compartimento escuro, enquanto que o outro compartimento foi iluminado. Após 48 horas coletou-se as larvas na parte iluminada com auxílio de pipeta Pasteur. As amostras testadas foram preparadas dissolvendo-se 50 mg do extrato em 5 ml de metanol. Dando continuidade, transferiu-se 10 camarões para cada ampola e então adicionado 5 ml de água do mar artificial. As ampolas ficaram mantidas sob iluminação e os camarões sobreviventes contados depois de 6 e 24 horas (Figura 3). Foram feitas 3 replicatas e um controle (metanol sem extrato). O índice de letalidade é dado pela fórmula: % morte = [(teste-controle)/controle] x 100. A realização do teste de letalidade da *A. salina* foi acompanhada por um teste em branco

com DMSO. Foi considerado ativo o extrato que apresentou CL_{50} em concentrações menores que 1000 μg de extrato.



Figura 3- Incubação dos camarões nos frascos contendo as diferentes concentrações do EB da *S. jamaicensis*

3.6.2. Atividade antioxidante (aa)- avaliação quantitativa da atividade sequestrante do radical DPPH

Para esta análise, adotou-se o método descrito por MALTERUD, (1993), que consiste em: numa cubeta contendo 3,0 ml de solução metanólica de DPPH (conc. 45 $\mu\text{g}/\text{ml}$) misturou-se rapidamente 50 μl da substância teste em solução de DMSO (Figura 4). O declínio da concentração foi registrado como redução na absorbância em 517 nm por um período de 15 minutos. A absorbância correspondente a 100% de sequestro de radical foi determinada com uma solução de pirogallol em DMSO, que causa o sequestro completo dentro de segundos. A absorbância da substância teste em 517 nm é determinada pela adição de 50 μl da solução desta substância em 3,0 ml de MeOH. A porcentagem de sequestro é calculada como: $\% \text{ Seq} = 100 \times (A_o - A_t) / (A_o - A_p)$. Aonde, A_o = absorbância inicial (absorbância com DPPH mais absorbância da substância teste); A_t = absorbâncias após 15 minutos com soluções teste; A_p = absorbâncias após 15 minutos com soluções de pirogallol (correlata à absorbância da substância teste). Os gráficos foram gerados no Microsoft Excel 2007 correlacionando os valores das médias de % de DPPH sequestrado *versus* as concentrações testadas do extrato de *S. jamaicensis*, foi empregado intervalo de confiança de 95%. Através da regressão linear dos pontos do gráfico, originou-se a equação da reta que foi utilizada para calcular o IC_{50} , que corresponde à concentração que atinge o sequestro de 50% do radical DPPH.

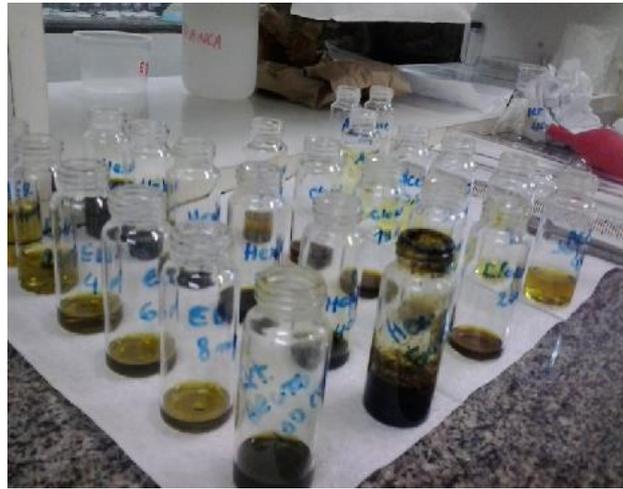


Figura 4 : Amostras submetidas ao teste DPPH.

3.6.3. Atividade antibacteriana: Difusão em disco

As culturas bacterianas foram obtidas de cepas padrões (ATCC) depositadas no banco de cultura da Fundação André Toselo. Os micro-organismos utilizados nos testes foram: *E. coli* (ATCC 29214) e *Salmonella enterica* (ATCC 9120). Os testes de susceptibilidade foram realizados usando um método padrão denominado Kirby-Bauer (Bauer e colaboradores, 1966). Os micro-organismos foram viabilizados 24 h antes da realização dos testes. As suspensões bacterianas foram feitas em solução de salina estéril (0,85%) usando escala nefelométrica de Mc Farland 0,5, correspondendo as concentrações finais de células bacterianas em torno de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. As suspensões bacterianas foram semeadas em placas de Petri contendo Ágar Mueller Hinton, usando swab de algodão estéril. Os testes foram preparados a partir do extrato bruto, clorofórmico e hexânico das folhas do gervão dissolvidos em tween 80 de forma a serem obtidas concentrações decrescentes iguais a 1000, 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 µg/mL e distribuídos em discos de papel esterilizados com diâmetro de 6 mm. Os discos embebidos com 15µL. de cada extrato foram secos em estufa e colocados sob o Ágar Mueller Hinton previamente semeados com suspensões bacterianas. As placas foram incubadas a 36°C/24 h. A leitura foi realizada verificando a presença de área de inibição ao redor do disco (mm). Os resultados foram comparados com discos de antibiótico padrão cloranfenicol – 30µg/ml (controle positivo). Como controle negativo utilizou-se o Tween 80 previamente testado quanto a sua interferência na viabilidade das células bacterianas. Todos os testes foram realizados em triplicata.

3.6.4. Atividade antibacteriana: difusão em poço

As culturas foram preparadas com metodologia equivalente ao teste de difusão em disco. Os testes foram preparados a partir do extrato bruto, clorofórmico e hexânico das folhas do gervão dissolvidos em tween 80 (0,03%) obtendo concentrações iguais a 1000 µg/mL. 30mL de cada extrato dissolvidos em tween 80 foram depositados em poços de 6 mm de diâmetro perfurados no Ágar Mueller Hinton solidificados em Placas de Petri (Kirby e Bauer) . As placas foram incubadas em estufa a $\pm 35^{\circ}\text{C}$ por 24 h. A leitura foi realizada, verificando a formação de halo de inibição ao redor dos poços. Como controle negativo foi utilizado o Tween 80 e como controle positivo solução de cloranfenicol – 0,6µg/ml. Os testes foram realizados em triplicata e em repetição (3x).

3.6.5. Atividade antibacteriana: Concentração inibitória mínima (MIC)

Os extratos testados foram submetidos ao teste da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de microdiluição em caldo (Lima *et al.*, 2006; Santos *et al.*; Santos *et al.*, 2007). Foi separado e autoclavado todo o material necessário para a realização do teste no LAMASP, sendo também preparado o meio Mueller Hinton (MH) caldo. Em seguida foram preparados os extratos (0,08g dos extratos diluídos em 4 mL de tween 80.) com concentração final de 1000 µg/mL, sendo realizada diluição seriada até a concentração de 250 µg/mL. Foram preparadas as suspensões bacterianas com as respectivas cepas: *Salmonella enterica* , *E.coli* , de modo a obter uma concentração bacteriana em torno de $1-2 \times 10^8$ ufc/mL (0,5 da escala McFarland). O teste de CIM foi realizado em uma microplaca com 96 poços, onde em cada poço, exceto nos poços do controle negativo, foi colocado 90µL de meio Muller Hinton, 100 µL de extrato, seguido de 10 µL da suspensão bacteriana. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 48 horas. Durante os testes foram utilizados como controle positivo o meio de cultura+bactéria e o tween 80 (0,03%)+bactéria. Como controle negativo o meio de cultura estéril e o tween 80 (0,03%) estéril. E como padrão utilizou-se a gentamicina para *E.coli* (ATCC 29214) e cloranfenicol para *Salmonella* (ATCC 9120). Após 48h na estufa foi adicionada a rezasurina (10uL) e após mais 3 horas de incubação os resultados foram analisados visualmente e classificados de acordo com a seguinte legenda: SI = sem inibição do crescimento bacteriano, I= inibição do crescimento bacteriano, R= resistente, NT= não testado.

4. RESULTADOS

4.1. Descrição morfológica

Subarbusto ereto, muito ramificado, de 70-100 cm de altura. Folhas opostas; simples; membranácea; 6,0-2,8 x 8,0-3,7cm; limbo elíptico; ápice agudo; base cuneada; serrilhada; discolor; face adaxial verde escuro; face abaxial verde claro; nervação peninérvia, tricomas ásperos; pecíolo 0,8 a 1,3 cm. Inflorescências terminais, espigas 10-45 cm de compr., 3- 4,5 mm larg.; brácteas lanceoladas, 5mm comprimento x 0,1mm larg.; Flores pentâmeras; gamopétalas; cálice tubular, gamossépalo, 6 mm compr.; Corola gamopétala, bilabiada, 8mm comprimento , azul-arroxeadada; estames amarelos 4, 0,1 mm comprimento, antera 0,5 mm larg.; ovário supero, bicarpelar, óvulos 2, lóculos 2;. Fruto 5 mm de comprimento, seco, esquizocárpico, preto (Figura 5 A-G).

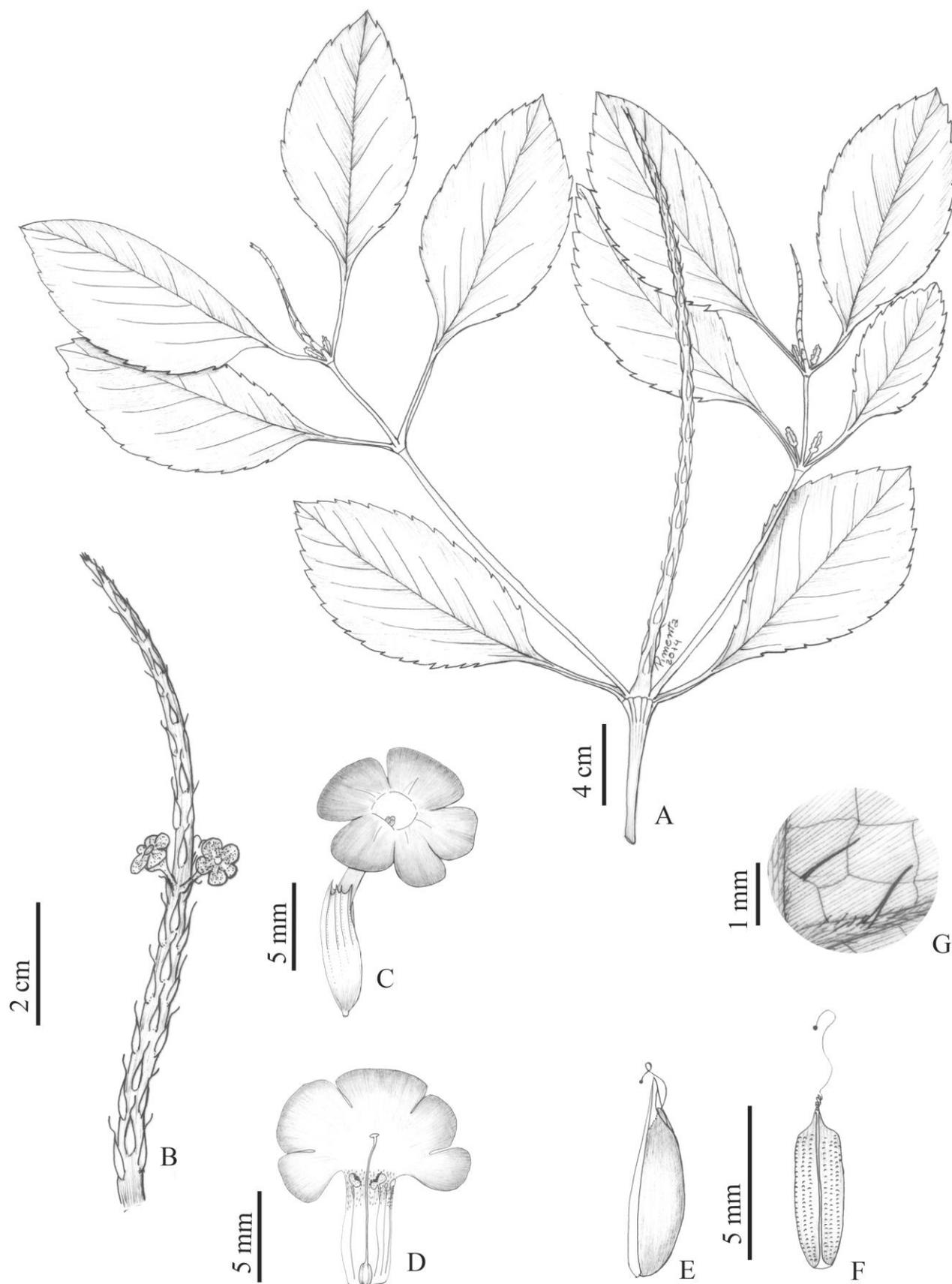


Figura 5: Aspecto morfológico de *Stachytarpheta jamaicensis*. A- Hábito; B- Inflorescência; C- Flor; D- Detalhe da flor; E-Fruto; F- Detalhe do fruto; G - Aspecto da superfície foliar.

4.2. Descrição anatômica da folha de *S. jamaicensis*

Em vista frontal, os materiais analisados revelam epiderme com células apresentando paredes anticliniais sinuosas nas faces abaxial e adaxial (Figura 6 A e B).

As folhas são anfiestomáticas, com estômatos do tipo diacíticos nas duas faces. Os estômatos são levemente projetados em relação às demais células epidérmicas. (Figura 6 A e B).

O bordo da lâmina foliar exibe a epiderme composta por células de tamanho e formas irregulares, revestida por cutícula espessa (Figura 6C).

Adjacente à epiderme encontra-se várias camadas de colênquima angular (Figura 6D). Na porção basal ocorre tricoma conoidal (Figura 6E).

Em secção transversal, mesófilo é do tipo heterogêneo assimétrico constituído de parênquima paliçádico e lacunoso. O parênquima lacunoso é constituído por cinco estratos de células (Figura 6F). Parênquima paliçádico ocorre até as proximidades do sistema vascular. Colênquima com até cinco camadas de células é registrado na face abaxial (Figura 7A).

A lâmina foliar possui tricomas tectores mais frequentes no limbo e na face adaxial (Figura 7 A e B), epiderme uniestratificada, revestida por cutícula espessada, com células de formato cilíndrico nas faces adaxial e abaxial (Figura 7 C). A região vascular apresenta floema na região interna e xilema externamente (Figura 7 D, E e F).

A nervura principal, em secção transversal, apresenta formato convexo, com a epiderme adaxial e abaxial unisseriada, formada por células um pouco maiores em relação às da lâmina foliar e revestida por cutícula espessada (Figura 8B).

Na região central há um único feixe vascular do tipo bicolateral em arco aberto, envolto por faixa colenquimática (8 F e 8 A).

O pecíolo, em secção transversal, apresenta superfície adaxial ligeiramente côncava e a abaxial convexa, o contorno é regular. O feixe vascular do pecíolo mostra-se semelhante ao da nervura principal. (Figura 8 A).

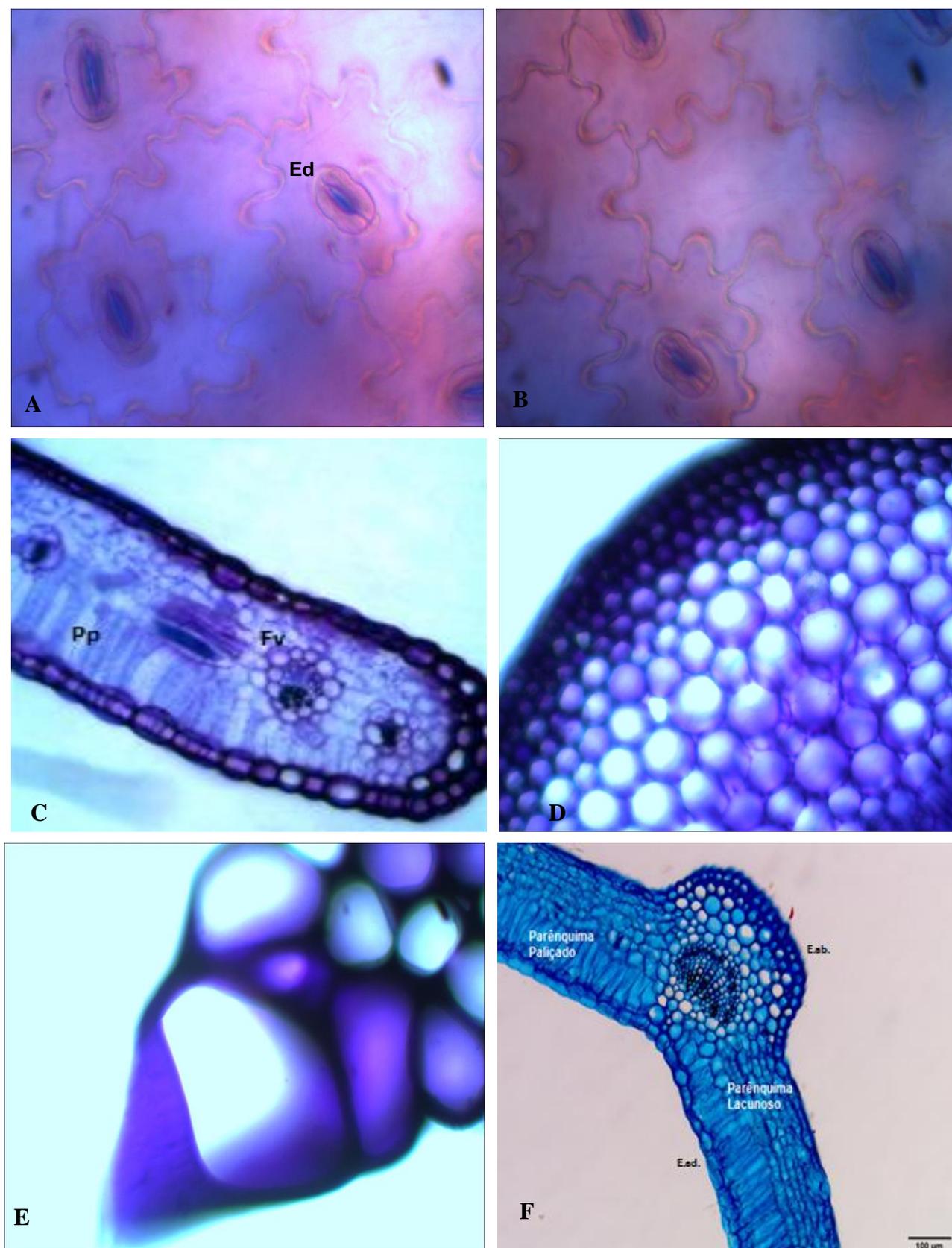


Figura 6: Microscopia óptica de folhas de *S. jamaicensis*. **A e B.** Estômatos diacíticos.; **C.** Bordo. Fv: feixe vascular; Pp: parênquima paliçádico; **D.** Colênquima angular. ; **E.** Tricoma conoidal; **F.** Mesófilo. Tt: Tricoma tector.

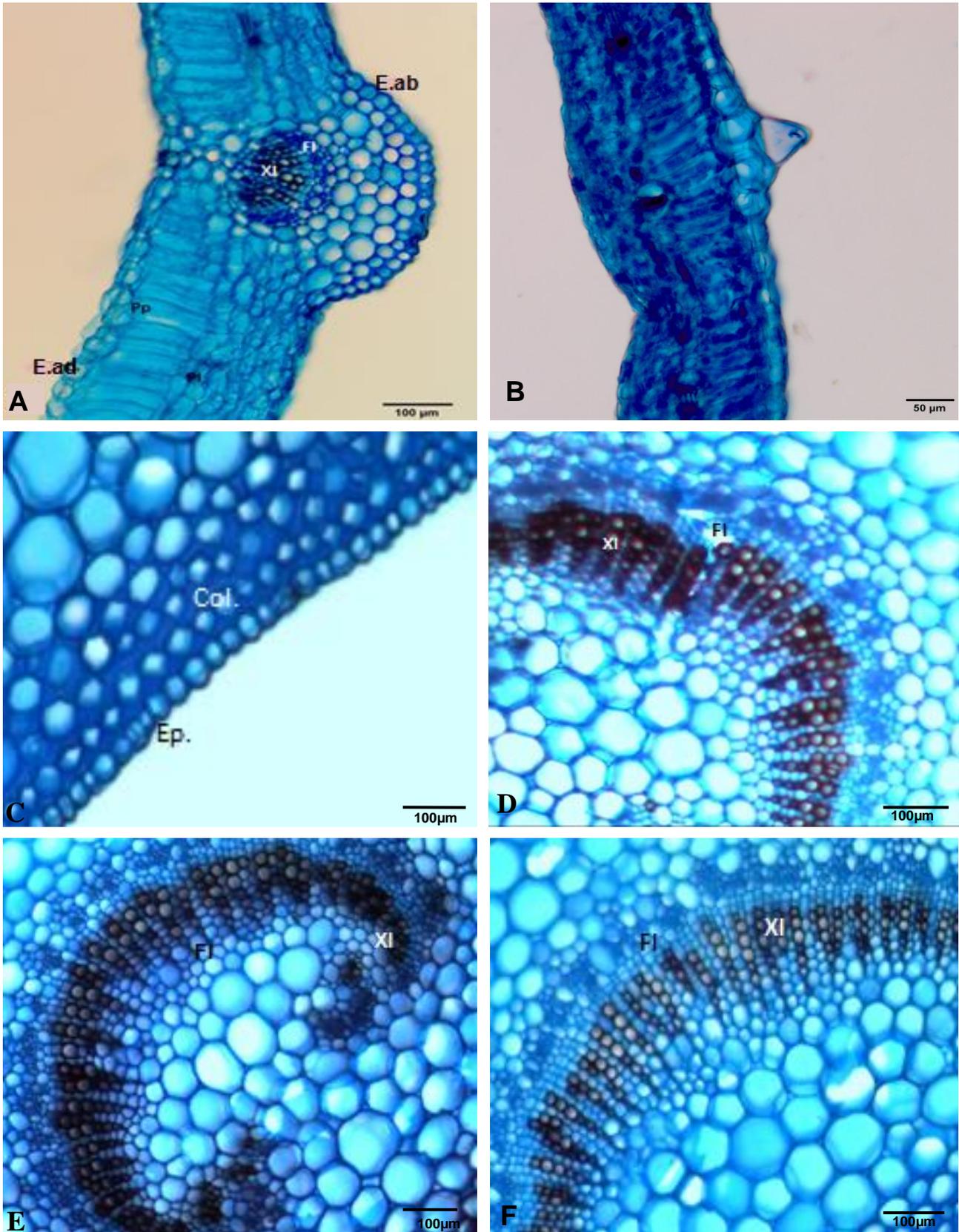


Figura 7: Microscopia óptica de nervura central, pecíolo de *S. jamaicensis*. **A.** Epiderme abaxial ; **B** Mesófilo. Tt: Tricoma tector ; **C.** Cutícula espessa, Ep: Epiderme; Col: colênquima; **D, E e F.** Sistema vascular. XI: xilema; FI: floema.

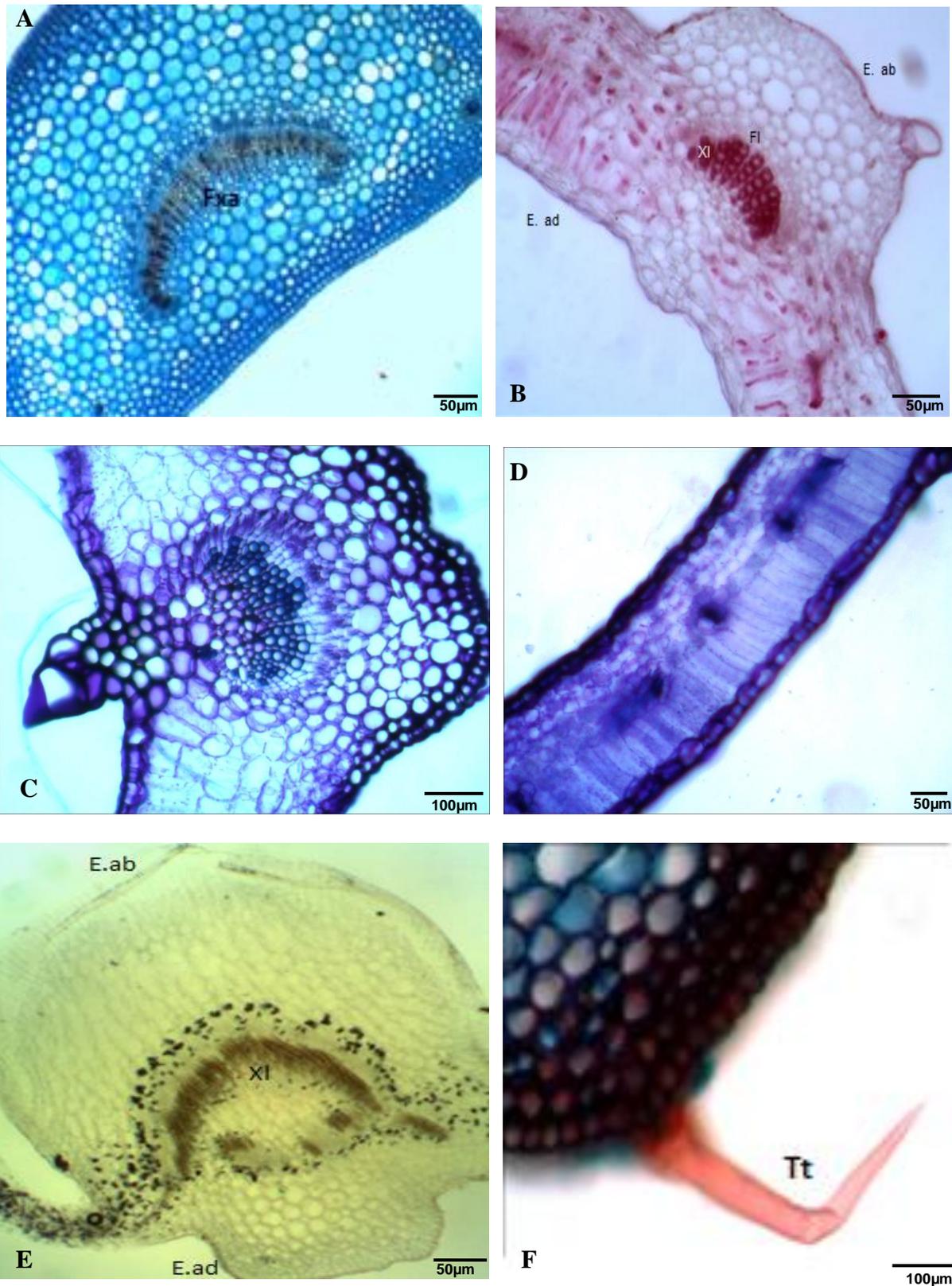


Figura 8: Microscopia óptica de pecíolo de *S. jamaicensis*. **A:** Pecíolo. Fxa:Feixe vascular em arco; **B:** Nervura central. Tt: Tricoma tector; Ead: epiderme adaxial; Eab: epiderme abaxial. **C:** Porção basal. Tt: Tricoma tector; Xl:xilema; Fl: floema; Pl: parênquima lacunoso. **D:** Mesófilo; Pp: parênquima paliçádico. **E:** Pecíolo; Xl: xilema; Ba: bainha amilífera; **F:** Mesófilo; Tt: Tricoma tector.

4.3. Testes fitoquímicos

O resultado dos testes fitoquímicos qualitativos do extrato bruto da folha (EBF) (tabela 1) apresentaram presença da maioria dos grupos de metabólitos secundários analisados. Para cumarinas e derivados antracênicos o resultado foi negativo, o que não exclui definitivamente a presença destes. O resultado demonstrou indicativo de taninos, observando-se mudança de coloração e aparecimento de precipitado nas duas reações realizadas com a amostra (Figura 9 A). Foi possível indicar presença de flavonoides no EBF da *S. jamaicensis* pelo aparecimento da coloração avermelhada (Figura 9 B). Não foi observada presença de derivados antracênicos livres. Houve indicativo de esteróis, através da mudança de coloração da amostra analisada (Figura 9 C). O resultado indicou possível presença de saponinas, sendo visualizada pequena formação de espuma persistente por mais de 30 minutos, após agitação da amostra (Figura 9 D). A presença de cumarinas não foi indicada, apenas uma mancha não fluorescente foi observada na amostra analisada (Figura 9 E). O teste para alcaloides indicou a possível presença desse grupo de substâncias, pelo aparecimento de precipitado na amostra testada (Figura 9 F).

Tabela 1: Expressão dos resultados do Screening Fitoquímico:

Teste	<i>S. jamaicensis</i>
Taninos condensados	+++
Flavonoides	+++
Derivados Antracênicos	-
Esteróis	+++
Saponinas	+
Cumarinas	-
Alcaloides	+

Não detectado (-); Fortemente (+++); Moderadamente (++); Fracamente (+).

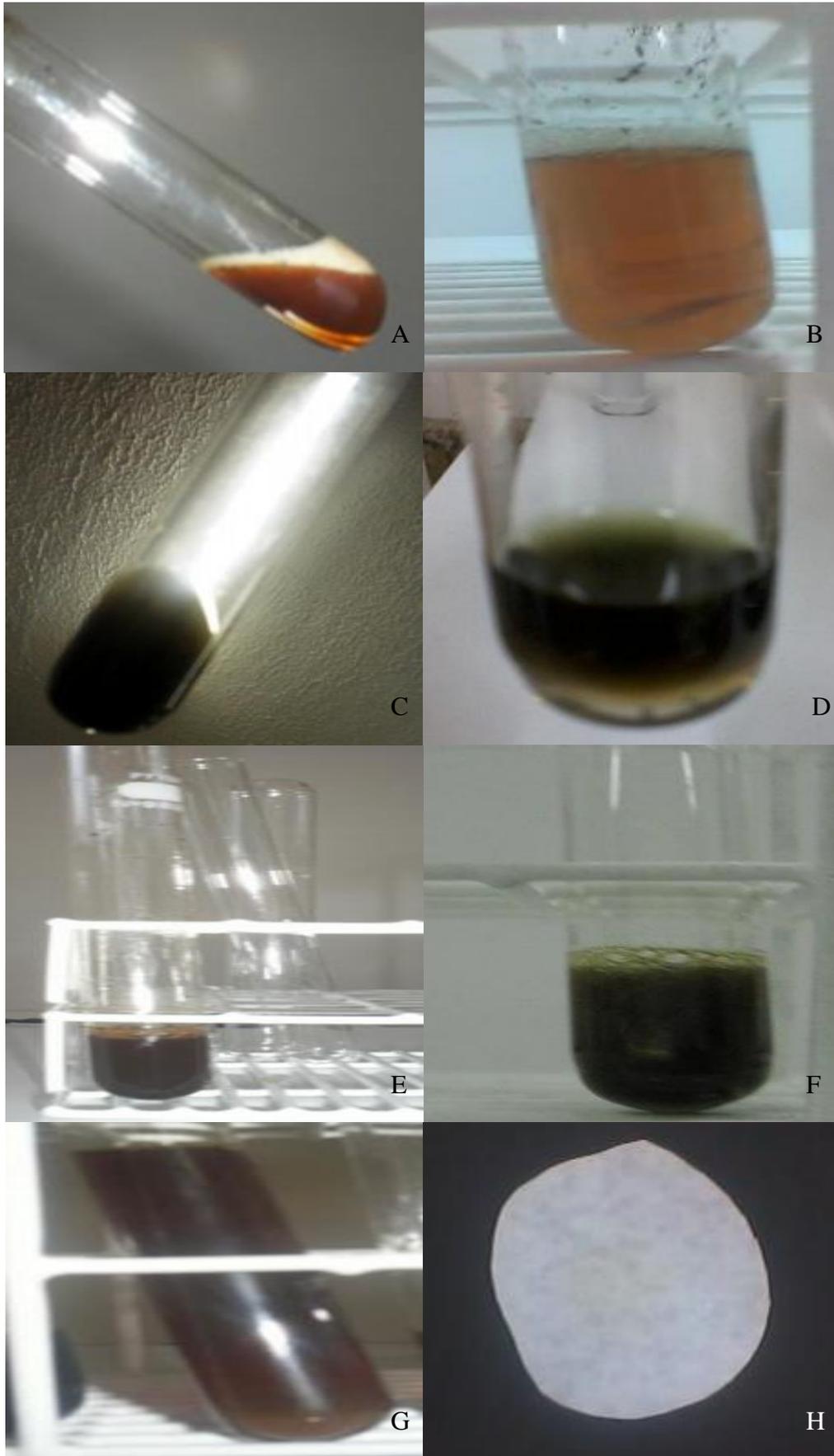


Figura 9: Teste fitoquímico: A- Flavonoides; B-. Saponinas; C- Tanino condensado; D.esterois; E e F-derivados antracênicos ;G - Alcaloides; H-cumarinas.

4.4. Coluna cromatográfica

Obteve-se 41 sub-frações na primeira coluna e após eluição e revelação das placas as que obtiveram perfis cromatográficos semelhantes foram reunidas, totalizando 29 sub-frações que foram monitoradas por cromatografia em camada delgada para evidenciar a presença dos compostos de interesse. Após análise dessas frações obtidas escolheu-se a sub-fração 15 para realizar nova coluna cromatográfica, obtendo-se 13 novas sub-frações (tabela 2).

Tabela 2: – Subfrações obtidas da CC principal

Código das frações	Frações reunidas	Massa (g)	Substâncias isoladas
FSJ4	1-4	0,297	-
FSJ9	6-8	0,508	-
FSJ13	10-12	0,682	-
FSJ15	-	0,852	-
FSJ17	13-16	0,484	-
FSJ22	17-21	0,692	-
FSJ23	22-25	0,616	-
FSJ24	26-27	0,342	-
FSJ25	-	0,218	-
FSJ26	29	0,092	-
FSJ27	30-32	0,117	-
FSJ28	33-36	0,179	-
FSJ29	37-41	0,239	-

A sub-fração SFSJ15 devido a massa obtida (0,852 g) e perfil cromatográfico foi submetida a novo fracionamento em CC. Recolheu-se 13 subfrações. Após análise em cromatografia em camada delgada com fase móvel clorofórmio/metanol, foram reunidas 6 subfrações.

Código das frações	Frações reunidas	Massa (mg)	Substâncias isoladas
FSJ15-1	1-4	0,009	-
FSJ15-2	6-8	0,002	-
FSJ15-3	9-11	0,030	-
FSJ15-4	-	0,008	-
FSJ15-5	14-16	0,015	-
FSJ15-6	17-21	0,020	-

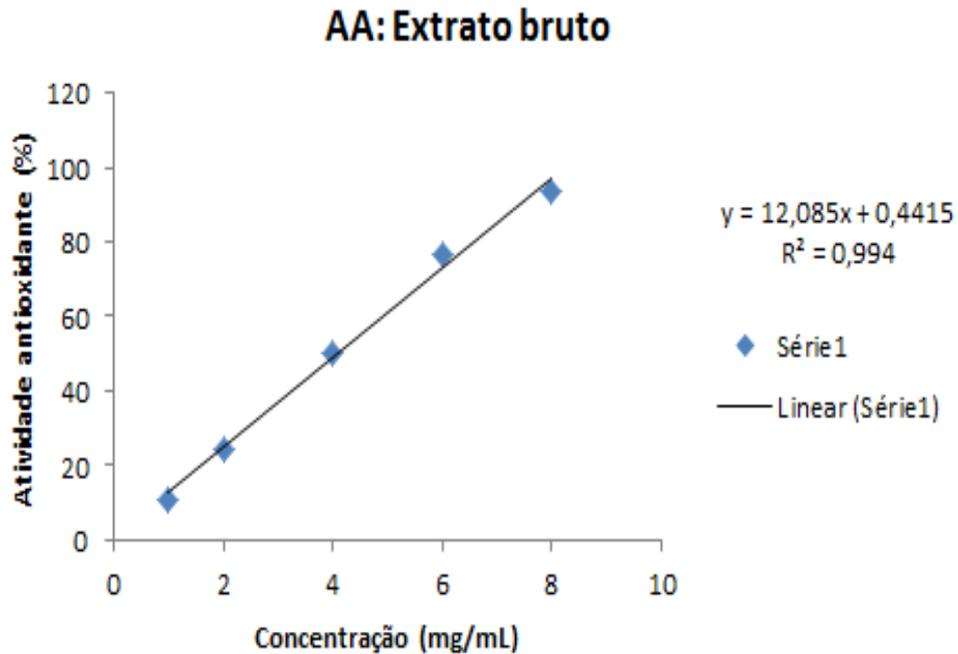
4.5. Teste do DPPH

A partir dos resultados das absorvâncias foi possível determinar os respectivos percentuais de atividade sequestradora de radicais livres DPPH para cada concentração. As diferentes concentrações testadas apresentaram atividade confirmando sua ação antioxidante pela técnica quantitativa que utilizou o radical DPPH.

Nesse ensaio quantitativo, o extrato bruto foi testado em diferentes concentrações variando entre 1 a 8mg/mL, sendo submetido à leitura em espectrofotômetro à 517nm. Foi possível determinar a partir dos resultados das absorvâncias, os respectivos percentuais de atividade sequestradora de radicais livres DPPH para cada concentração. Para obter o valor do IC₅₀, ou seja, a concentração que atinja o sequestro de 50% do radical DPPH utilizou-se dados de cinco diferentes concentrações, as quais apresentaram linearidade adequada (Tabela 4). O cálculo do IC₅₀ foi realizado por regressão linear a partir dos pontos plotados no gráfico da atividade antioxidante (Figura 10), com intervalo de confiança de 95%. O valor de IC₅₀ encontrado para o EBF foi de 4,1 mg/mL.

Tabela 4: Percentuais de atividade antioxidante do EBF de *S. jamaicensis*.

Concentração (mg/mL)	Atividade Antioxidante (%)	IC ₅₀
8	93,9 ± 0,80	4,1 mg/mL
6	76,7 ± 4,1	
4	50,2 ± 2,8	
2	24,2 ± 0,30	
1	11 ± 0,10	

**Figura 10:** Gráfico da atividade antioxidante do EBF da *S. jamaicensis*.

O extrato hexânico da folha (EHF) foi testado em diferentes concentrações variando entre 7 a 50mg/mL (tabela 5). A atividade sequestradora de radicais livres DPPH foi determinada na tabela 3. O valor de IC₅₀ encontrado para o EHF foi de 29,35 mg/mL.

Tabela 5: Percentuais de atividade antioxidante de amostras do EHF de *S. jamaicensis*.

Concentração (mg/mL)	Atividade Antioxidante (%)	IC ₅₀
50	86,55 ± 0,7	29,35 mg/mL
45	75,97 ± 3,16	
30	52,07 ± 7,85	
20	34 ± 5,41	
7	10,55 ± 13,07	

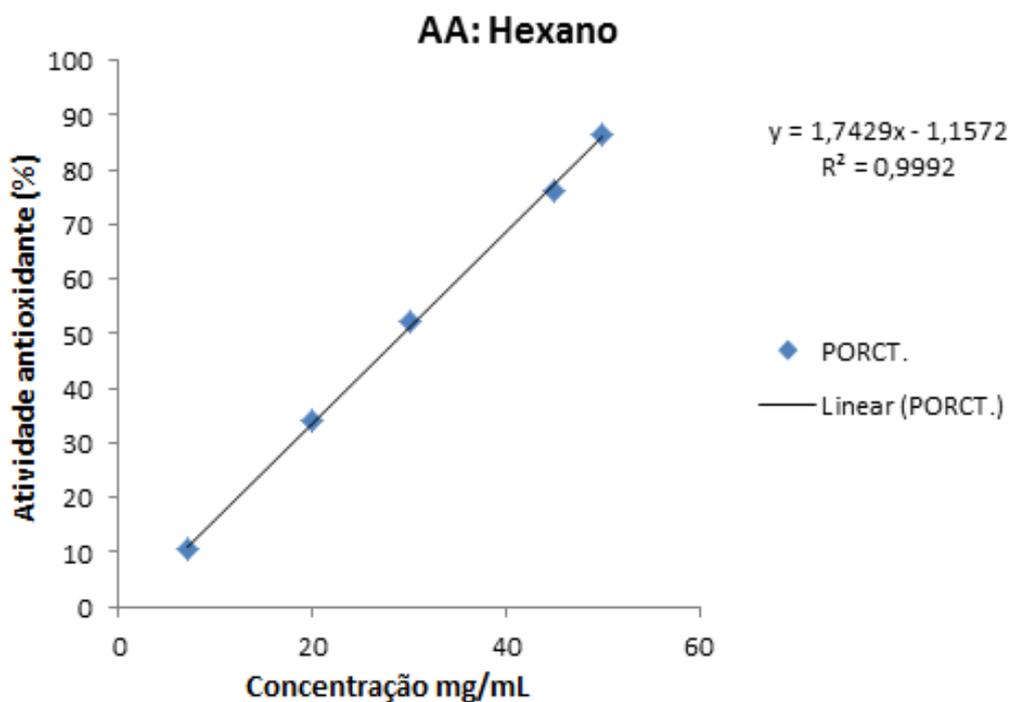


Figura 11: Gráfico de Atividade antioxidante de concentrações do EHF da *S. jamaicensis*

O extrato de acetato de etila da folha (EAEF) foi testado em diferentes concentrações variando entre 0,125 a 5mg/ML. A atividade sequestradora de radicais livres DPPH foi determinada na tabela 4. O valor de IC₅₀ encontrado para o EAEF foi de 2,46 mg/mL.

Tabela 6: Percentuais de atividade antioxidante do EAEF de *S. jamaicensis*.

Concentração (mg/mL)	Atividade Antioxidante (%)	IC ₅₀
5	94,4 ± 3,8	
3,5	68,55 ± 0,18	
1,8	37,38 ± 0,56	2,46 mg/mL
0,5	17,5 ± 2,49	
0,125	7,97 ± 0,87	

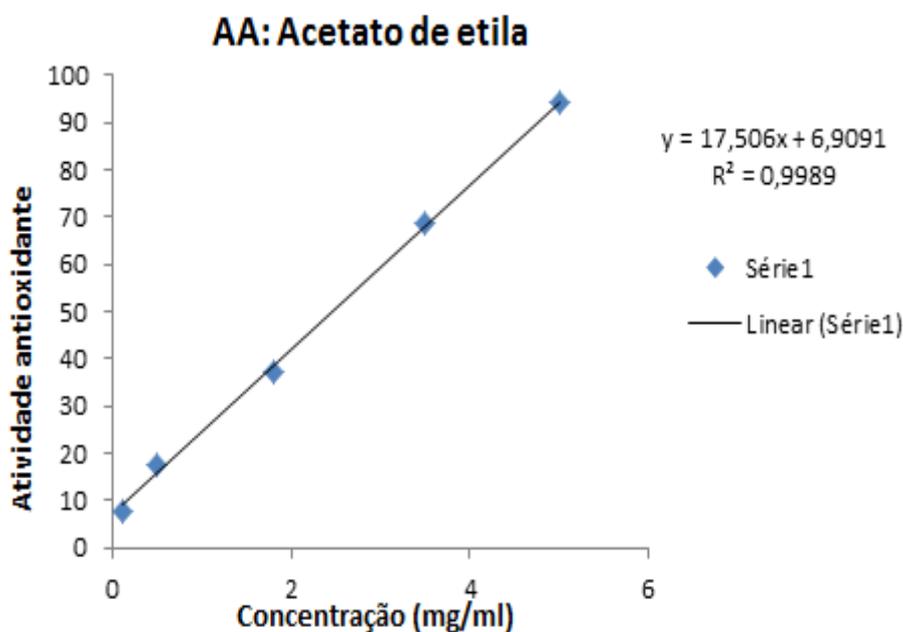


Figura 12: Gráfico de Atividade antioxidante de concentrações do EAEF da *S. jamaicensis*

O extrato clorofórmico da folha (ECF) foi testado em diferentes concentrações variando entre 0,5 a 9mg/mL, A atividade sequestradora de radicais livres DPPH foi determinada (tabela 7). A partir do gráfico da atividade antioxidante (Figura 13), calculou-se o valor de IC₅₀ encontrado para o ECF foi de 6,62 mg/mL.

Tabela 7: Percentuais de atividade antioxidante do ECF de *S. jamaicensis*.

Concentração (mg/mL)	Atividade Antioxidante (%)	IC ₅₀
9	65,91 ± 0,76	
7,5	56,11 ± 1,2	
2,5	21,73 ± 0,36	6,62 mg/mL
1	13,94 ± 1,96	
0,5	6,76 ± 0,18	

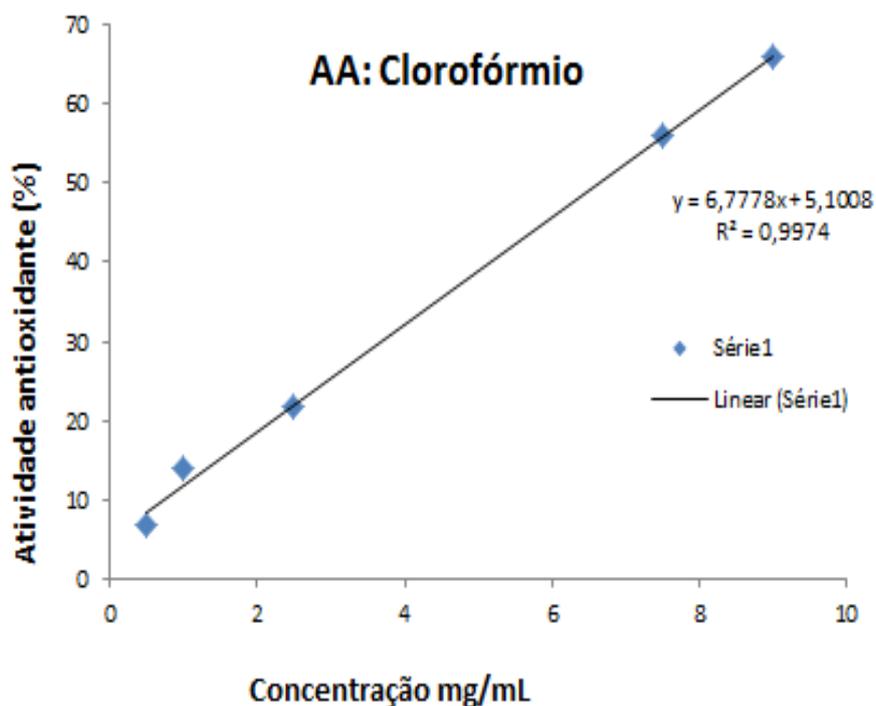


Figura 13: Atividade antioxidante de concentrações do ECF da *S. jamaicensis*

O método do DPPH é baseado na transferência de elétrons de um composto antioxidante, nesse caso, presente no extrato, para esse radical livre, que ao ser reduzido perde sua coloração púrpura (Figura 18).



Figura 14: Mudança de coloração de diferentes concentrações dos Extratos da *S. jamaicensis* após reação com o DPPH

O valor do IC₅₀ de 2,46 mg/mL para a espécie *S. jamaicensis*, demonstra que o EAEF foi o mais ativo.

4.6. *Artemia salina*

A citotoxicidade da folha de *S.jamaicensis* foi investigada através do ensaio de letalidade frente à *Artemia salina* que é um bioindicador de toxicidade. O EBF foi testado, inicialmente, nas concentrações entre 100 e 400µg/mL, sendo necessário a realização do teste em concentrações mais baixas e mais altas (50, 100, 250, 400, 700 e 1000g/mL) de forma que as mesmas apresentassem faixa linear de 10 a 90% (Tabela 8).

Tabela 8: Percentuais de atividade citotóxica do EBF de *S.jamaicensis*

Concentração (µg/mL)	Atividade Citotóxica (%)	CI50 (µg/mL)
1000	100 ± 0	
700	73,33	
400	46,66	446,2µg/ml
250	33,33	
100	16,66	
50	6,66	

O coeficiente de correlação obtido foi $R^2 = 0,999$, Desvio padrão \pm

A concentração letal média (CL_{50}) para o EBF encontrada foi de 446,2µg/ml. Por regressão linear a partir do gráfico, calculou-se esse valor, baseado as concentrações testadas e seus respectivos percentuais de atividade citotóxica, utilizando-se intervalo de confiança de 95% (Figura 15).

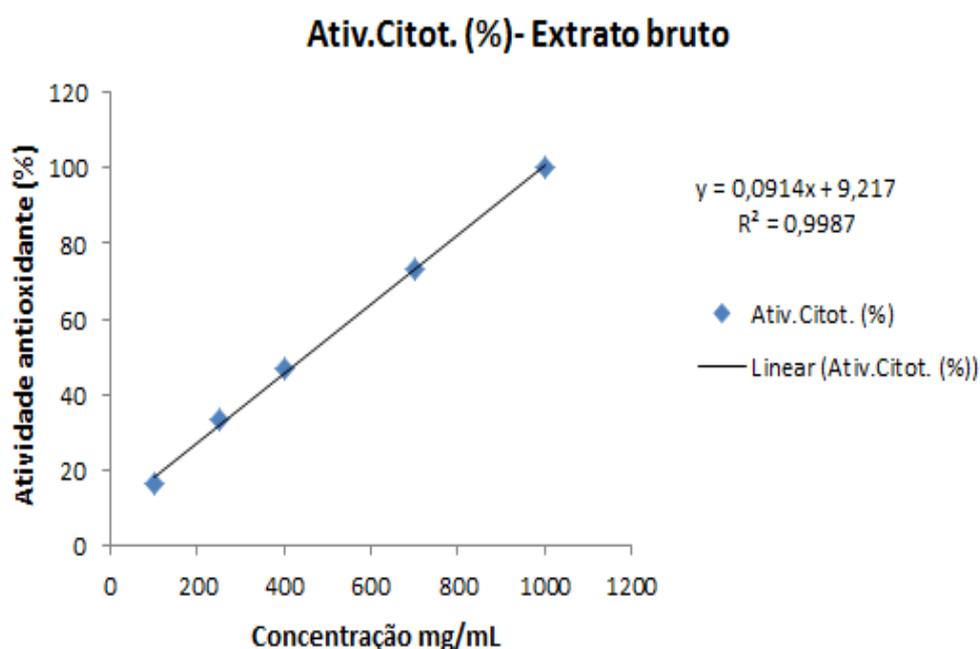


Figura 15: Gráfico da Atividade citotóxica de concentrações do EBF da *S. jamaicensis*.

O EHF foi testado, inicialmente, nas concentrações entre 100 e 400µg/mL, sendo necessário a realização do teste em concentrações mais baixas (300, 200, 80 g/mL),

(Tabela 9). A concentração letal média (CL₅₀) para o EHF encontrada foi de 211,11µg/ml. (Figura 16).

Tabela 9: Percentuais de atividade citotóxica do EHF de *S.jamaicensis*.

Concentração (µg/mL)	Atividade Citotóxica (%)	CI50 (µg/mL)
500	100 ± 0	
400	86,66±3,45	
300	66,66 ± 3,28	211,11µg/ml
200	46,66 ± 4,99	
80	26,66 ± 2,55	

O coeficiente de correlação obtido foi R² = 0,999, Desvio padrão ±

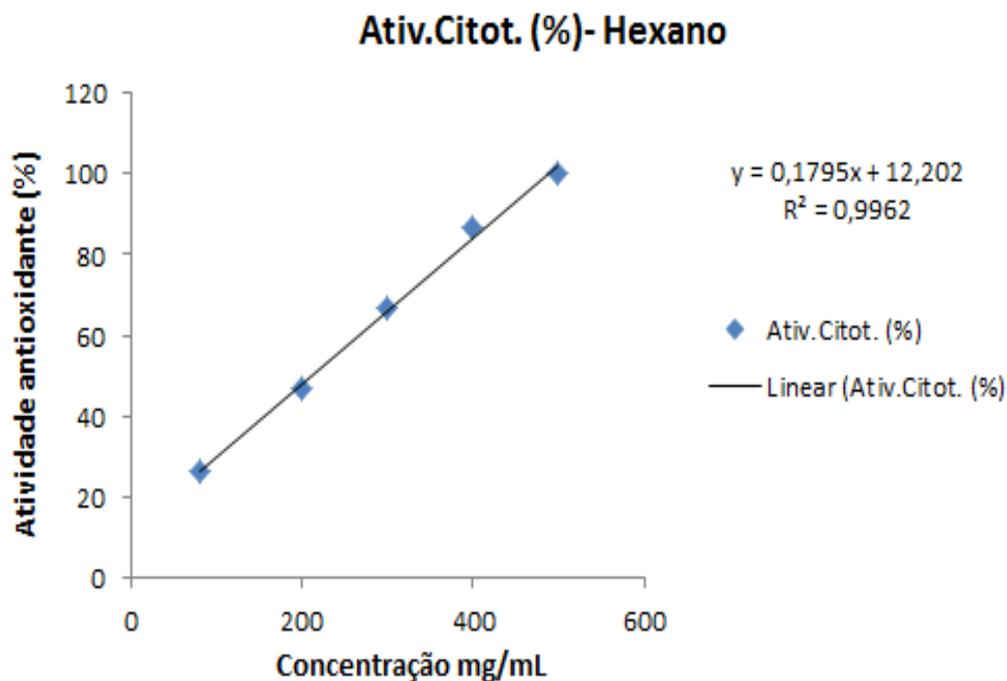


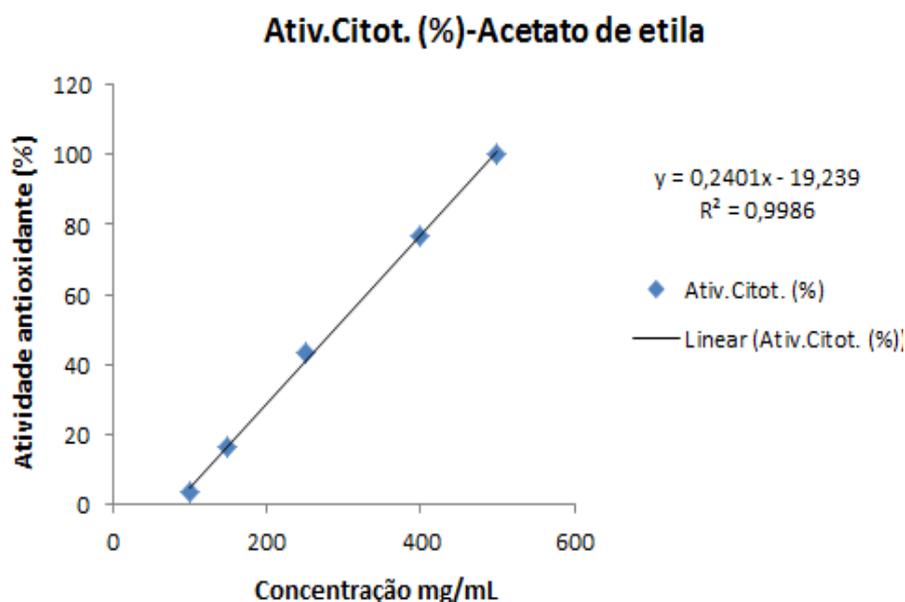
Figura 16: Gráfico da Atividade citotóxica de concentrações do EHF da *S. jamaicensis*

O EAEF foi testado, inicialmente, nas concentrações entre 100 e 400µg/mL, sendo necessário a realização do teste em concentrações mais altas (500µg/ml), (Tabela 10). A concentração letal média (CL₅₀) para o EAEF encontrada foi de 288,49µg/ml. (Figura 17).

Tabela 10: Percentuais de atividade citotóxica do EAEF de *S.jamaicensis*.

Concentração (µg/mL)	Atividade Citotóxica (%)	CI50 (µg/mL)
500	100 ± 0	
400	76,66 ± 3,00	
250	43,33 ± 7,48	288,49µg/ml
150	16,66 ± 8,41	
100	3,33 ± 11,70	

O coeficiente de correlação obtido foi $R^2 = 0,999$, Desvio padrão ±

**Figura 17:** Gráfico da Atividade citotóxica de concentrações do EAEF da *S. jamaicensis*

O EC foi testado, inicialmente, nas concentrações entre 100 e 400µg/mL, sendo necessário a realização do teste em concentrações mais baixas e mais altas, (Tabela 11). A concentração letal média (CL_{50}) para o ECF encontrada foi de 285,43µg/ml. (Figura 18).

Tabela 11: Percentuais de atividade citotóxica do ECF de *S.jamaicensis*.

Concentração (µg/mL)	Atividade Citotóxica (%)	CI50 (µg/mL)
500	100 ± 0	
400	76,66 ± 2,98	
300	53,33 ± 3,22	285,43µg/ml
250	40 ± 3,36	
150	20 ± 1,19	

O coeficiente de correlação obtido foi $R^2 = 0,999$, Desvio padrão ±

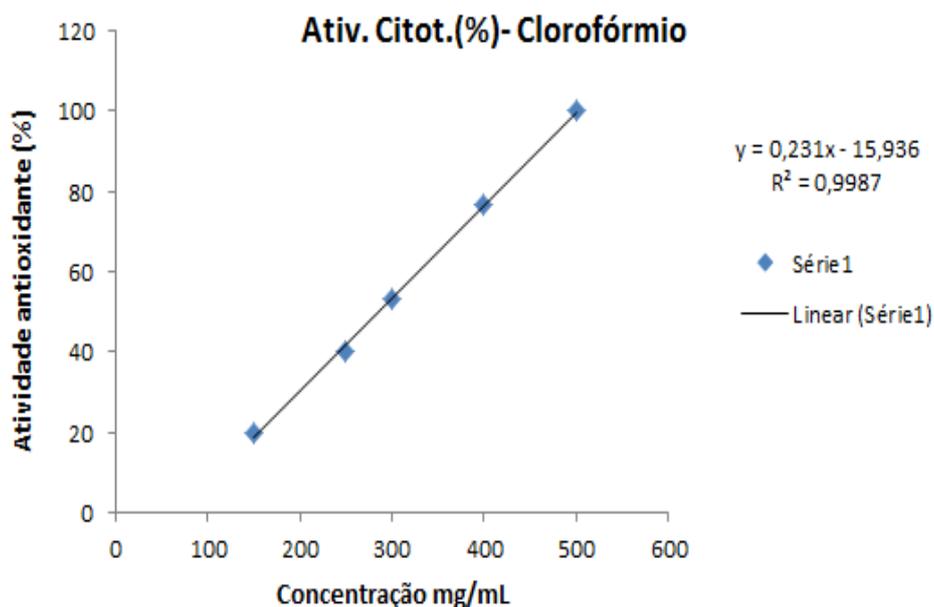


Figura 18: Gráfico da Atividade citotóxica de concentrações do ECF da *S. jamaicensis*.

4.7. Atividade antibacteriana

A partir da análise dos resultados pode-se afirmar que o extrato das folhas de *S. jamaicensis* não apresentou atividade contra as cepas *Salmonella entérica* (ATCC 9120) e *Escherichia coli* (ATCC 29214) em nenhuma das metodologias testadas (tabela 12, figura 19).

Tabela 12: Atividade antibacteriana de extrato das folhas de *S.jamaicensis*.

Amostras	Halos de inibição - Difusão em poço	
	<i>Salmonella</i>	<i>E.coli</i>
Extrato Bruto	-	-
Extrato Hexânico	-	-
Extrato Acetato	-	-
Extrato Clorofórmico	-	-
Gentamicina	NT	I
Cloranfenicol	I	R

- = não formação de halo de inibição, NT= não testado; I- inibição do crescimento bacteriano; R=resistente.

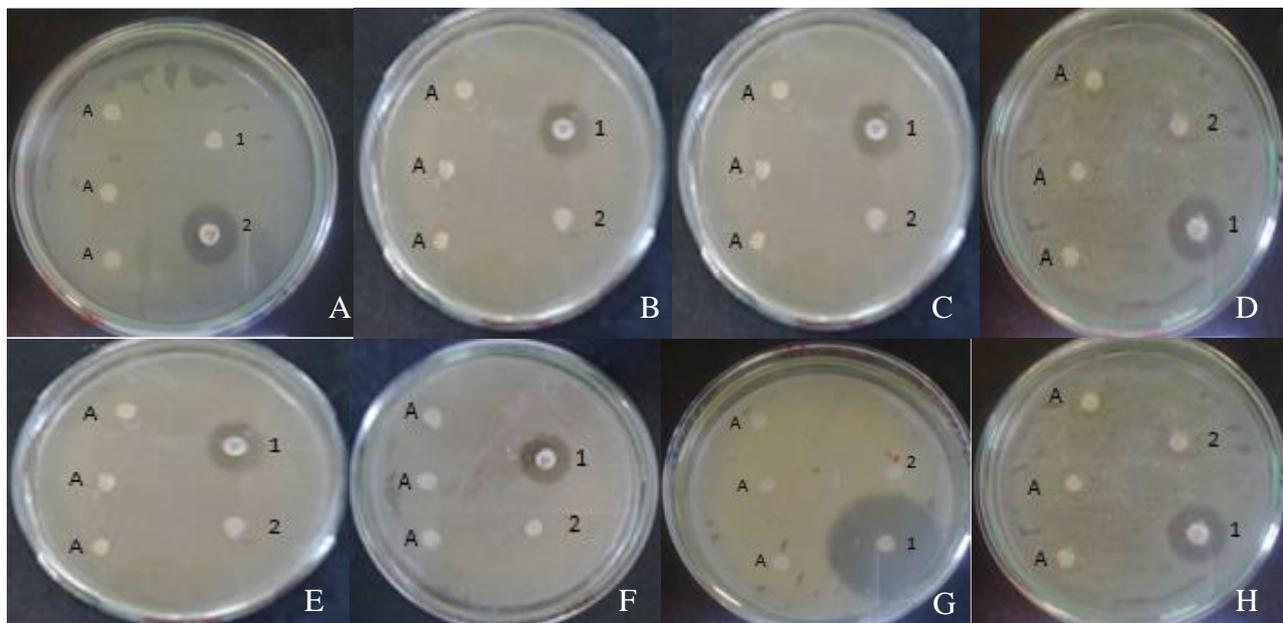


Figura 19: Difusão em disco. **A-G:** 1-controle positivo, 2-controle negativo. *E.coli:* **A-** Ext. Clorofórmico; **B-** Ext. bruto; **C-** Ext. hexânico; **D-** Ext. acetato de etila, *Salmonella:* **E-**Ext. clorofórmico; **F-** Ext. bruto; **G-**Ext. acetato; **H-** Ext. hexânico.

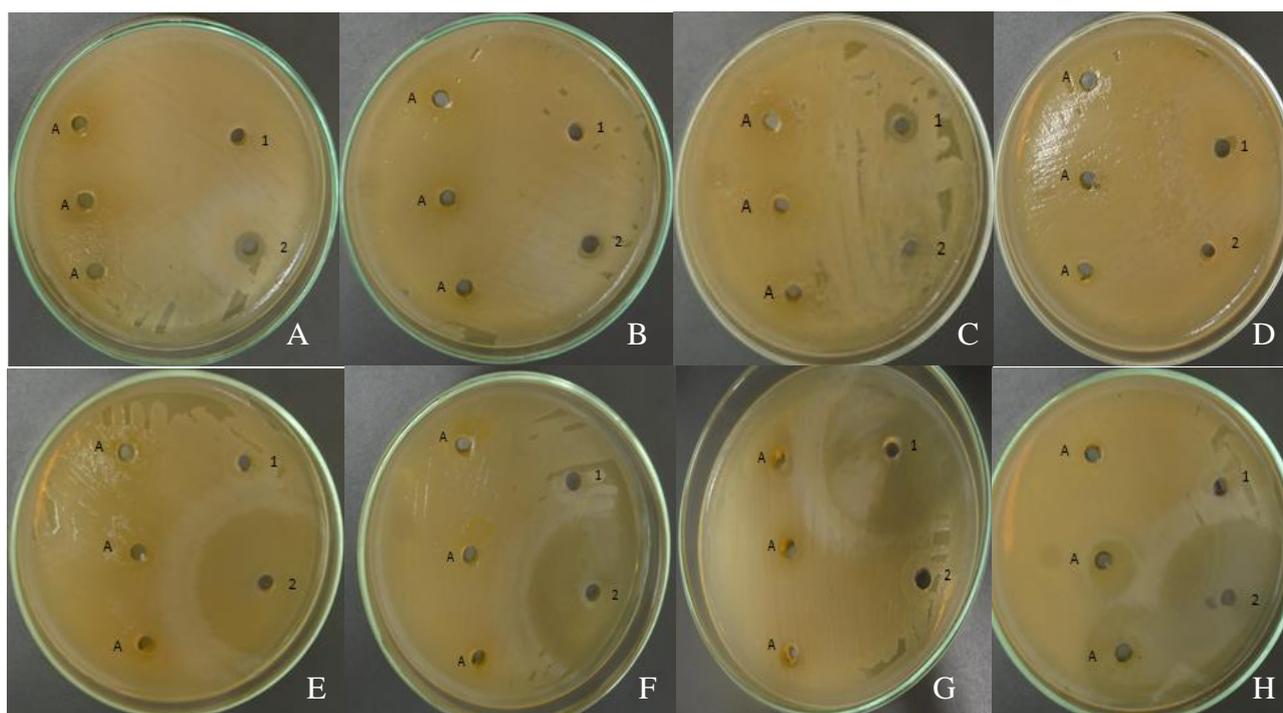


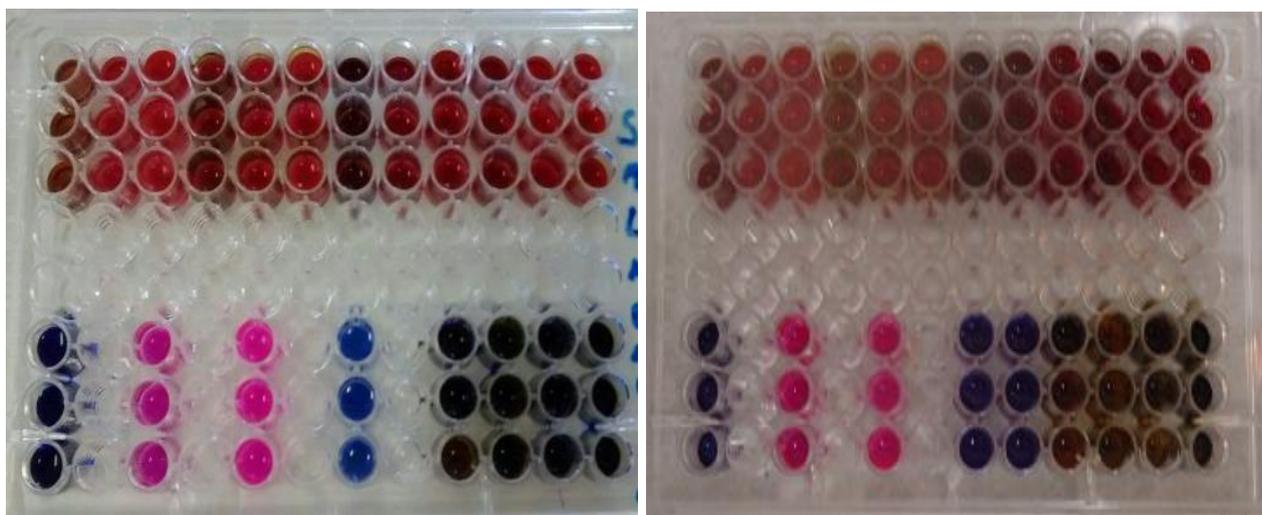
Figura 20: Difusão em poço: *E. coli:* **A:** Acetato; **B:**Clorofórmio; **C:**Ext.bruto; **D:**Hexano. *Salmonella:* **E-** Ext. acetato **F-**Ext. Clorofórmico; **G-** Ext.bruto; **H-**Ext. Hexano.

Os resultados do MIC podem ser vistos na tabela 12 e ilustrados na figura 21. Os Extratos testados não demonstraram atividade antibacteriana frente às bactérias testadas.

Tabela 13: Resultados do MIC.

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i>
Extrato Bruto Metanólico	SI	SI
Hexano	SI	SI
Acetato	SI	SI
Clorofórmio	SI	SI
Cloranfenicol	R	I
Gentamicina	I	NT

SI = sem inibição do crescimento bacteriano, I= inibição do crescimento bacteriano, R= resistente, NT= não testado.

**Figura 21** – Teste para concentração inibitória mínima: A- *Salmonella*; B- *E. coli*.

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho foi demonstrado, através de estudos morfoanatomicos, as características macro e microscópicas para a folha da espécie, perfil fitoquímico, potencial antioxidante, citotóxico e antibacteriano da espécie *Stachytarpheta jamaicensis*.

Baseado nas observações anatômicas realizadas em *Stachytarpheta jamaicensis* foi verificado que muitas das estruturas são comuns àquelas descritas para a família (Metcalf & Chalk, 1988). Dentre estes caracteres destacam-se aqueles observados nas folhas, como os tipos de tricomas, glandular e não-glandular e o mesofilo dorsiventral.

Além de todas as descrições acerca da morfologia foliar não se referem às expansões existentes no pecíolo, que se constituem em um importante caractere que pode ser acrescentado à diagnose da espécie (GUTIERRE, 2003).

Em *Lippia alba*, observou-se tricomas tectores. As folhas de *Bouchea fluminensis* são simples, opostas, cruzadas, de ápice agudo e ligeiramente pilosas em ambas as faces, epiderme unisseriada e recoberta por cutícula espessa e paredes com expressivas sinuosidades. A folha é anfiestomática, com estômatos na maioria das vezes anomocítico, ocorrendo também com relativa frequência, do tipo diacítico (FERREIRA et al., 2003)

Segundo Metcalfe e Chalk (1972), a presença de estômatos em ambas as faces caracteriza alguns gêneros de Verbenaceae, como *Bailonia*, *Amasonia*, *Casselia* e diversas espécies de *Bouchea*.

Os estômatos identificados nesse estudo são coerentes com a afirmação de Inamdar (1969) que na maioria das espécies de Verbenaceae os estômatos são do tipo diacítico, podendo também ocorrer em paralelo a outros tipos.

As características morfológicas externas estão de acordo com as informações referentes à família. As folhas das Verbenaceae são geralmente folhas opostas verticiladas, simples, inteiras, serradas ou partidas e sem estípulas (SOUSA, 2005).

A *Stachytarpheta cayenensis* (Rich), que é outra espécie do mesmo gênero, muito parecida visualmente com a *jamaicensis*, tem presença de flavonoides na parte aérea e a *Lantana camara* L., outra espécie da mesma família apresenta esse metabólito secundário em suas folhas (BOUZADA et al, 2006).

O estudo realizado por BOUZADA et al (2006), também demonstrou a ocorrência de alcaloides para *Lantana camara* L. e *S. cayenensis*.

O teste para alcaloides indicou a possível presença desse grupo de substâncias no EBF da *S. jamaicensis*, pelo aparecimento de precipitado na amostra testada.

Em estudos de triagem fitoquímica da *Lippia alba* foi detectada a presença de esteroides (AGRA e BARBOSA FILHO, 1990; CORRÊA, 1992a; MING et al., 1992; GOMES et al., 1993), flavonóides (AGRA e BARBOSA FILHO, 1990; GUPTA, 1995),

taninos (AGRA e BARBOSA FILHO, 1990; GUPTA, 1995), saponinas (GOMES, MIGUEL e MOREIRA, 1990; GOMES *et al.*, 1993), Além destes, foi descrita a presença de alcalóides, iridóides (GUPTA, 1995).

De acordo com a literatura, alguns flavonoides apresentam, atividade antidiarreica. Tem-se como exemplo, a quercetina e ternatina. Observou-se essa atividade dos flavonoides através de experimentos em ratos com diarreia crônica e motilidade intestinal de camundongos (Galvez *et al.*, 1993; Galvez *et al.*, 1996; Rao *et al.*; 1997). Assim, a possível presença de flavonoides no extrato bruto de *S. jamaicensis* pode vir ainda, a justificar o efeito do chá das folhas dessa espécie como antidiarreico, uma vez que os relatos comprovam que essa classe de metabólitos secundários está relacionada com essa atividade.

Recentemente foram avaliadas propriedades antinociceptiva e leishmanicida do extrato etanólico da *S. cayennensis*. Os resultados obtidos confirmaram o efeito antioxidante significativo de verbascosídeo e do ácido betulinico a partir de *S. cayennensis* usando um ensaio *in vivo*, sugerindo que as raízes da planta são fonte potencial de antioxidantes (Moreira *et al*, 2007;.. Penido *et al*, 2006;.. Schapoval *et al*, 1998).

Nesse estudo foi observado no extrato bruto da folha de *S. jamaicensis* a possível presença de taninos, flavonoides, esteróis, saponinas e alcaloides. Já em sua composição química, *S. cayennensis* apresenta, alcalóides, glicosídios, taninos, saponinas, flavonóides, esteróides, quinonas, compostos fenólicos e ácido glicogênico, sendo que alguns destes constituintes químicos também estão contidos em várias espécies vegetais com efeitos leishmanicidas (Mathias; Emily, 1993). Saponinas também demonstraram possível presença na análise do extrato bruto da *S. jamaicensis*, sendo que existem relatos na literatura de que a espécie é utilizada como expectorante das vias aéreas superiores. A presença dessas substâncias em plantas funciona também na defesa contra insetos e patógenos, assim como na manutenção do crescimento (SOUZA, 2011).

O poder redutor do antioxidante é avaliado através da capacidade dos antioxidantes presentes nas amostras em sequestrar o radical estável DPPH•. Ao doar um elétron o mesmo passa por um processo de oxidação, modificando assim, a coloração violeta para amarelada (NEVES *et al*, 2009). A atividade antioxidante de uma amostra é inversamente proporcional ao consumo de DPPH, ou seja, quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será o seu IC₅₀ e maior a sua atividade antioxidante. (SOUZA e colaboradores, 2007).

A espécie *S. jamaicensis* apresentou significativa presença de compostos antioxidantes na folha capazes de doar hidrogênio radicalar ou transferir elétron para o

radical DPPH, revelando efeito de proteção contra os riscos de muitos processos patológicos desencadeados por agentes oxidantes como os radicais livres. O melhor valor de IC50 encontrado foi de 6,6242 mg/ml.

Não há estudos na literatura avaliando tal atividade biológica da *S. jamaicensis*. Mas existem relatos de atividade para espécies da família, tais como os resultados encontrados por SOUSA (2012), que para *S. cayennensis* relatou atividade antioxidante, com valores de IC50 referentes a 764 mg/ml.

Face aos resultados obtidos, é de extrema importância aperfeiçoar o estudo sobre o potencial antioxidante da *S. jamaicensis* identificando assim, substâncias isoladas responsáveis por esta atividade.

Quanto a atividade antibacteriana, faz-se necessário testar novas cepas, inclusive gram negativas e antifúngicas, uma vez que existem relatos de atividade antibacteriana de espécies da família na literatura.

Um estudo com outra espécie do gênero, a *Stachytarpheta cayennensis* mostrou que o extrato possui atividade frente às cepas de *Staphylococcus aureus* e que essa planta pode ser usada como auxílio no combate de bactérias comuns em infecções secundárias (SILVEIRA *et al*, 2008). Do mesmo modo, a *Lantana camara*, outra espécie da mesma família, demonstra atividade frente a *P. vulgaris*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* (COSTA, 2009).

SOUZA *et al.* (2010), verificou a atividade do Extrato de Acetato da Folha de *S. cayennensis* onde, *S. pyogenes* foi mais sensível usando o método de difusão em agar e concentrações inibitórias mínimas (MIC) a 25 mm (80; ug / mL). Todas as outras frações não foram ativas mesmo na maior concentração usada no MIC (1000 ug / mL).

Plantas que acumulam flavonoides e alcaloides inibem significativamente ou retardam o crescimento de todas as bactérias testadas (DIXON *et al.*, 1983, p.1-69). O resultado obtido traz grande contribuição uma vez que a população faz uso do chá das folhas para combater diarreia.

6. CONCLUSÕES

Os caracteres morfoanatômicos da folha de *S. jamaicensis* seguem as características gerais da família Verbenaceae e são úteis para sua descrição, fornecendo subsídios a sua caracterização e taxonomia.

Quimicamente, a espécie apresentou um perfil diversificado em seus metabólitos secundários, porém compatível com a maioria dos taxa de Verbenaceae (SOUZA, 2005).

Os testes fitoquímicos apontam que *S. jamaicensis* é uma espécie com alta diversidade química, sendo demonstrado possível presença de alcaloides, saponinas, flavonoides, esteróis e taninos.

Foi possível notar pelo método de sequestro de radicais livres (DPPH) que é um indicativo de atividade antioxidante, que a fração clorofórmica apresentou melhor atividade (6,62 mg/mL), seguido pelas frações, hexânica, acetato de etila e extrato bruto. Os resultados são de extrema importância, uma vez que, na literatura não foram encontradas referências dessa atividade para a espécie. A reação foi visível e positiva em todas as amostras testadas.

A atividade antioxidante apresentada pode está sendo expressa a partir da ação dos flavonoides. Essa classe de metabólitos secundários apresenta desde ação hemolítica e antiviral a antioxidante e antineoplásica (SIMÕES, 1999), sendo essas últimas consideradas como as suas propriedades mais importantes (TREVISAN, 2003).

Com relação às abordagens efetuadas, a possível existência de alcaloides é relevante e certamente coloca-os dentre as mais promissoras fontes de estudos fitoquímicos e farmacológicos tendo em vista a descoberta de novas substâncias ativas.

O teste de letalidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* foi realizado como biondicador de citotoxicidade. Todos os extratos testados foram considerados ativos (LC<1000), sendo que, o extrato hexânico apresentou maior atividade citotóxica (LC50= 211,16). Mediante a expressão dos resultados faz-se necessário cautela quanto à segurança de seu uso.

Popularmente a *Stachytarpheta cayennensis*, é utilizada como antidiarréica, analgésica, antiinflamatória, antipirética, hepatoprotetora, laxante, distúrbios gastrintestinais e para o tratamento de lesões cutâneas. Algumas dessas atividades já foram comprovadas por estudos científicos, entre elas a ação preventiva e curativa de úlceras gástricas (Vela, 1998), atividade antissecretora gástrica (Mesia, 2004), efeito hipoglicemiante (Adebajo, 2007), antidiarréico (Almeida, 1995), antiinflamatório (Penido, 2006) e analgésico (Schapoval, 1998).

No teste de susceptibilidade para avaliação da atividade antibacteriana, o extrato bruto e as frações testadas não apresentaram sensibilidade frente às cepas de *E. coli*

ATTC 29214 e *Salmonella* entérica ATTCC 9120 sendo possível afirmar que o chá das folhas de *S.jamaicensis* comumente utilizado pela população é ineficaz para tratamento de diarreia infecciosa causada pelas cepas testadas.

Os relatos desse trabalho são novos. Levando-se em consideração a falta de conhecimento sobre a diversidade da imensa flora brasileira, inclusive sobre essa espécie e a partir dos resultados encontrados, tais como, a positividade das reações dos testes fitoquímicos e os resultados de atividade biológica, sugere-se a continuidade dos estudos no sentido de isolar e quantificar compostos responsáveis pelos efeitos encontrados podendo trazer grande benefício, tanto para a economia como para a farmacologia de medicamentos, possibilitando ainda o uso e o manejo sustentável desse recurso natural. Sugere-se também a realização de testes de atividade antibacteriana para outras cepas de *E. coli* e *Salmonella*.

REFERÊNCIAS

- 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 Médica**, New York, vol. 73, nº3:241- 250, 2007.
- AGRA, M. F.; BARBOSA FILHO, J. M. Levantamento da flora medicinal da Paraíba: triagem fitoquímica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Rio de Janeiro, v. 71, n. 3, p. 72–76, jul./set., 1990.
- AHMAD I, MEHMOOD Z, MOHAMMAD F. Screening of some indian medicinal plants for phytochemical society of North America on phytochemistry of medicinal plants. I^o Ed., New properties. **Journal Ethnopharmacology** 62183-193, 1998.
- ALMEIDA, A.M.P.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K.; OLIVEIRA, F. Caracterização Farmacognóstica de Óleo essencial e do extrato fluido de gervão: *Stachytarpheta australis*, Moldenke – Verbenaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, vol. 2-4:45-52, 1995.
- ANDERSON, J. E. *et al.* Blind Comparison of Simple Bench-top Bioassays and Human Tumour Cell Cytotoxicities as Antitumor Prescreens. **Phytochemical analysis**, v. 2, p. 107 – 111. 1991.
- ARNASON JT, Mata R, Romero JT. **Proceedings of the thirty fourth annual meeting of the York**, Ed. Plenum Press, 1994, p.363
- BAROSA, J., FERREIRA, A., FONSECA, B. e SOUZA, I. Teste de toxicidade de cobre para *Artemia salina* – **Poluição e ecotoxicologia marinha**, [S.I.], Nov. 2003.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, p. 113-123, 2006.
- BAUER A.W., Kirby W.M.M., Sherris J.C. & Turck M. 1996. Antibiotic susceptibility testing by standardized single method. **Am. J. Clin. Pathol.**45:493-496, 1996.
- BLANCO, L. das C.; et al. Avaliação da atividade antinociceptiva e antiinflamatória de extratos brutos de *Stachytarpheta cayennensis* e *Pleurothyrium bahiense*. **Revista Universitária Rural, Sér. Ciência e Vida**. Seropédica, RJ, EDUR, v. 25, n. 1, jan.-jun, p. 78-84, 2005.
- BRAGA, M. de F. Braga Jovita; et al. Morfoanatomia, histoquímica e perfil fitoquímico de *Priva lappulacea* (L.) Pers. (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n.2, [S.I.], p.516-523, Abr./Jun. 2009.
- BRANDÃO, M.G.L.; Other medicinal plants and botanical products from the first edition of the Brazilian Official Pharmacopeia. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, [S.I.], v.18,n.1,p. 127-134, Jan./Mar. 2008.

BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v.28, p.25-30. 1995.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **RESOLUÇÃO - RDC Nº 26**, 2014: *Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências.*

BOUZADA, L.M.M., et al.. Busca de novas drogas antimicrobianas a partir de vegetais. Departamento de Bioquímica, Parasitologia, Microbiologia e Imunologia – ICB-Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, Brasil, 2006.

CORRÊA, C. B. V. Contribuição ao estudo de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. ex Britt.; Wilson–erva–cidreira. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Rio de Janeiro, v. 73, n. 3, p. 57–64, jul./set, 1992.

COSTA, J. G. M. et al. Composição química e avaliação das atividades antibacteriana e de toxicidade dos óleos essenciais de *Lantana camara* L. e *Lantana* sp. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 19, n. 3, p. 710-714, jul/set. 2009.

DEGANI, A.L; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. **Química Nova**, Cromatografia Nº 7, MAIO 1998

DIXON, R.A.; DEY, P.M.; LAMB, C.J. Phytoalexins: enzymology and molecular biology. **Advanced Enzimology**, n.55, p.1-69, 1983.

DUARTE A. *et al.*, Avaliação da atividade antioxidante, **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 26(2): 446-452, abr.-jun. 2010.

FAURÉ, M.; Lessi, E.; Torres, R.; Videla, L.A. , antioxidante activities of lignans and flavonoids, *Phytochemistry*, v.29, p.3773-3775,1990.

FERREIRA, S.H.. Academia Brasileira de Ciências: medicamentos a base de plantas medicinais,2003disponível em : <http://www.abc.org.br/arquivos/medicamentos.pdf> acesso maio 2013.

FORBES, V. E.; FORBES, T. L. **Ecotoxicology in theory and practice**. Londres: Chapman and Hall, 247 p, 1994..

FONSÊCA, Said Gonçalves da C.; **Farmacotécnica de Fitoterápicos**. Laboratório de Farmacotécnica. Departamento de Farmácia. Fortaleza- Ceará, 2005.

GALVEZ, J.; CRESPO, M.E.;JIMENEZ,J.; SUAREZ, A.; ZARZUELO, A. Inhibitory effects of quercetin on guinea-pig ileum contractions. **Phyto. Res.**, v.10, n.1, p.66-69, 1996.

GALVEZ, J.; CRESPO, M.E.;JIMENEZ,J.; ZARZUELO, A. ; SPIESSENS, C.; DEWITTE, P.; UTRILLA, M.P. Antidiarrheic activity of *Sclerocaryabirrea bark* extract and its active tannin constituent in rats. **Phyto. Res.**, v.5, n.6, p.276-278, 1991.

GALVEZ, J.; *et al.* Antidiarrheic activity of quercitrin in mice and rats. **J.Pharm. Pharmacol.**, v.45, n.2, p.157-159, 1993.

GILBERT, Benjamin; FERREIRA, José Luiz Pinto; ALVES, Lucio Ferreira. **Monografias de plantas medicinais brasileiras e aclimatadas** - Curitiba: Abifito, p.235, 2005.

GOMES, E. C. *et al.* Constituintes do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.(Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Rio de Janeiro, v. 74, n. 2, p. 29–32, abril/jun.1993.

GOMES, E. C.; MIGUEL, O. G.; MOREIRA, E. A. Contribuição ao estudo anatômico da folha de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.–Verbenaceae. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, XI, 1990, João Pessoa. **Resumos...** João Pessoa, p. 3.15, 1990.

GUPTA, M. P. (Ed). **Plantas medicinales iberoamericanas**. 1. ed. CYTED. Santa Fé de Bogotá: Editorial Presencia, p. 557–567, 1995.

INAMDAR, J.A. Epidermal structure and ontogeny of stomata in some Verbenaceae. **Annals of Botany**, v.33, p.55-66, 1969.

JOHANSEN D., Plant microtechnique. New York: **McGraw-Hill Book**.523p.1940.

KRAUS, J. E.; Arduin, M. 1997. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Rio de Janeiro, 1997.

KRINSKY, N.I. The biological properties of carotenoids. **Pure and Applied Chemistry**, v.66,p.1003-1010, 1994.

LEITE, J. P.V. Fitoterapia: Bases Científicas e Tecnológicas/ João Paulo Viana Leite- São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

LORENZI, Harri; MATOS, F. J. de A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, SP:Instituto Plantarum, 544p., 2002.

MALTERUD K. E, *et al.* Antioxidant and radical scavenging effects of anthraquinones and anthrones. **Pharmacology** v. 47, p. 77-85, 1993.

MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. Fortaleza: Edições UFC, p: 45-64, 1997.

MEYER B. N, Ferrigni N. R, Putnam J. E, Jacobsen L. B, Nichols D. E, Mclaughlin J.L. **Brine shrimp: a convenient general bioassay for active-plant constituents**. *Planta Medica* v. 45, p. 31-34, 1982.

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

METCALFE CR, Chalk L. *Anatomy of dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses*. Oxford: Clarendon Press. v. 2., 1950.

GUTIERRE, M.A; Mello, J.C.P; Delaporte, R.H.; Efeitos da intensidade luminosa sobre a morfologia foliar de *Bouchea fluminensis* (Vell) Mold.(Verbenaceae) e sua

importância no controle de qualidade da droga vegetal. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, n.1,[S.I], p.23-33, jan-jun.,2003.

Mathias LA, Emily A. Tapping and Amazonian plethora: four medicinal plants of Marajó Island, Pará - Brazil. **Journal Ethnopharmacol** 40:53-75, 1993.

MING, L. C. *et al.* Constituintes do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.– Verbenaceae. In: **SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL**, XII, Curitiba. Resumos... Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1992b. 296 p. p. 111, 1992.

MOELLERING RC Jr, Gilbert DN Sande MA. O guia de Sanford a antimicrobiol terapia. Ed 36. Hyde Park, VT: **Antimicrobial Therapy** Inc., 2006.

MOREIRA CRR, Costa CG, Lopes TC, Bezerra JT, Guerra RNM, Rebêlo JMM, Ribeiro MNS, Nascimento FRF, Costa JML.Efeito leishmanicida. in vitro de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich) Vahl (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia** 17: 59 -63, 2007.

MUKHERJEE A.; PATIL D.S. D..Effects of Alkaloid Rich Extract of Citrullus colocynthis Fruits on Artemia Salina and Human Cancerous (MCF-7 AND HEPG-2) Cells. **Journal of Pharma scitech**; 1(2):15-19, 2012.

NASCIMENTO, J. E.; MELO, A. F. M.; LIMA E SILVA, T. C.; VERAS FILHO, J.; SANTOS, E. M., ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C.; Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larva de Artemia salina Leach. de três espécies medicinais do gênero Phyllanthus (Phyllanthaceae). **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 29, n.2, p. 145-150, 2008.

NEVES EMN, Rocha FF, Costa EA, Matos LG, Müller AH, Guilhon GMSP, Cortes WS, Vanderlinde FA 2008. Evaluation of antinociceptive and antiinflammatory effects of *Croton pullei* var. *glabrior* Lanj. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia** 18: 344-349.

OLIVEIRA, F.; AKISUE G.; AKISUE, M. K.; **Farmacognosia**, 3ª reimpressão da 1ª edição. 412 p. São Paulo: Editora Atheneu, 2009.

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PARRA, A. Lagarto,,[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**, Vol. 8, n.5, p. 395–400 , 2001.

PENIDO C, Costa KA, Futuro DO, Paiva SR, Kaplan MAC, Figueiredo MR, Henriques MGMO 2.006 propriedades anti-inflamatórias e anti-ulcerosas de *Stachytarpheta cayennensis*. (LC Rich) Vahl J Ethnopharmacol 104: 225-233, 2006. phytochemical society ofNorth America on phytochemistry of medicai plants. I" Ed., New

POTTERAT, O. Antioxidants and free radical scavengers of natural origin. **Current Organic Chemistry**, v.1, p.415, 1997. properties. **J.Ethonopharmacology** 62183-193,1998.properties. **Journal Ethonopharmacology** 62183-193, 1997.

RAO, C. B.; VIJAYAKUMAR, E. K. S.; KRISHNA, R. R. Chemical examination of the stems of *Lippia citriodora* Linn. **Current Science**, Karnataka, v. 48, n. 12, p. 534–535, jun. 1979.

RODRIGUES, I.M.C.; SOUZA FILHO, A.P.S.; FERREIRA, F.A. Estudo Fitoquímico de Senna alata por Duas Metodologias. **Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas**, Viçosa-MG, v.27, n.3, p. 507-513; 2009.

SAMY RP, Ignacimulhu S. Sem A. Screening of Indian medicinal plants for antibacterial.

SASIDHARAN, S.[et al]; Antidiarrheal and antimicrobial activities of *Stachytarpheta jamaicensis* leaves. **Indian J Pharmacology**, v.39, [S.I], p.245-248, 2007.

SCHAPOVAL EES, Inverno de Vargas MR, Chaves CG, Bridi R, Zuanazzi JA, Henriques EM 1998. Atividades anti-inflamatória e antinociceptiva de extratos e compostos isolados de *Stachytarpheta cayennensis*. **J Ethnopharmacology**, Leiden, vol. 60, nº1:53-59, 1998.

SERRANO, C; Ortega, T; Villar, A. M.; Biological activity of traditional medicines from Spain and Guatemala - *Artemia Salina* bioassay: A revision. **Phytotherapy Research** v.10, p. 118-120, 1996.

SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. ; DOURADO, P. S. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 18, n. 4, p. 618-626, out/dez. 2009.

SIMÕES CMO, Schenkel EO, Gosman G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. **Farmacognosia Da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS. Ed. UFSC.; 1999.

SOUSA, C. M. de M.; SILVA, R. H.; JÚNIOR, et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, p. 351-355. 2007.

SOUZA, Pierre André *et al.* Avaliação das atividades antimicrobianas, antioxidantes e phototoxic de extratos e compostos isolados de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl, Verbenaceae. **Revista brasileira de farmacognosia**. Curitiba, v.20, n.6, dezembro de 2010. Disponível a partir do <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102695X2010000600016&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 16 de junho de 2014. Epub 19 de novembro de 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2010005000042>.

Souza, AB et al. Antimicrobial activity of terpenoids from *Copaifera langsdorffii* Desf. against cariogenic bacteria. *Phytotherapy Research*, v.25, n.2, p. 215-20, 2011
TORSSSEL BG. A mechanistic and biosynthetic approach to secondary metabolism. **Natural product chemistry** .New York: Ed. John Willey; 1989. p. 401.

TREVISAN MTS, Macedo FVV. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. **Química Nova**. 2003;26(3):301-4.

VELA, S.M. Mecanismos das ações anti-secretora ácida e antiúlcera gástrica de princípios isolados do gervão-roxo (*Stachytarpheta cayennensis* Vahl). São Paulo, 1998. Disponível em:<http://search.bvsalud.org/regional/resources/mdl-9063095>.