

Kátia Pereira dos Santos

Perfil químico e atividades biológicas de *Hyptis* Jacq. seção *Peltodon* de ocorrência nos domínios fitogeográficos dos Cerrados e Tropical Atlântico.



Chemical profile and biological activities of *Hyptis* Jacq. section *Peltodon* of occurrence in the phytogeographical domains of Cerrados and Tropical Atlantic.

São Paulo

2018

Kátia Pereira dos Santos

**Perfil químico e atividades biológicas de *Hyptis* Jacq. seção *Peltodon*
de ocorrência nos domínios fitogeográficos dos Cerrados e Tropical
Atlântico.**

**Chemical profile and biological activities of *Hyptis* Jacq. section
Peltodon of occurrence in the phytogeographical domains of Cerrados
and Tropical Atlantic.**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências
da Universidade de São Paulo, para a
obtenção de Título de Doutor em Ciências
Biológicas, na Área de Botânica.

Orientadora: Profa Dra Cláudia Maria Furlan

dos Santos, Kátia Pereira
Perfil químico e atividades biológicas de *Hyptis* Jacq.
seção *Peltodon* de ocorrência nos domínios fitogeográficos
dos Cerrados e Tropical Atlântico. 137 f.

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica.

1. Substâncias fenólicas. 2. Lamiaceae. 3. Domínios
fitogeográficos. 4. Antioxidantes. 5. Anti-HIV-1.
I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências.
Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profª Dra Cláudia Maria Furlan

Orientadora

*À toda minha família,
em especial à mais linda flor do meu jardim, Iris.*

Agradecimentos

Agradeço imensamente a todos que de alguma forma contribuíram para o resultado desse trabalho.

Em especial, à minha orientadora e amiga Claudia Maria Furlan por todos os ensinamentos fitoquímicos e não fitoquímicos. Obrigada pelos conselhos e compreensão nas horas em que precisei.

À minha maior inspiração Iris dos Santos Mendonça. Obrigada por ter nos escolhido!

À minha família que foi imprescindível para o encerramento desta etapa. Em especial ao meu pai José Geraldo dos Santos, à minha mãe Vera Lúcia Pereira dos Santos e minha sogra Maria Antônia Ribeiro Dias a quem pude confiar o meu bem mais precioso. Um dia retribuirei tudo o que fizeram e fazem por nós. Muito obrigada!

Agradeço ao meu parceiro de caminhada Fernando Ribeiro Mendonça por me dar suporte quando sempre preciso. Dias melhores virão. Te amo!

À Cintia-Luz e à Lucimar Barbosa da Motta pelo auxílio nas coletas.

Aos meus amigos frutos do trabalho, mas que levarei para a vida toda: Aline, Fernanda A., Fernanda R., Dalila, Janayne, Mourisa, Richard e Wilton. Obrigada!

Aos demais colegas do Laboratório de Fitoquímica.

Aos professores do laboratório, Antonio Salatino, Maria Luíza Salatino, Deborah Santos e Marcelo! Obrigada por todas as contribuições e momentos de descontração.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) pela concessão de licença para coletas e transporte. À diretoria, administração e funcionários do Instituto Ambiental do Paraná, Parque Estadual do Cerrado, Parque Nacional da Chapada dos Guimarães e Reserva Biológica de Mogi Guaçu.

À FAPESP pelo apoio financeiro e à Capes/Proex pela bolsa concedida e financiamento de Congressos. Ao Instituto de Biociências pela infraestrutura.

Sumário

Introdução geral: escolha do tema, abordagens propostas e características dos locais e espécies vegetais.....	1
1. Um breve histórico sobre as plantas medicinais	1
2. <i>Hyptis</i> Jacq. (Lamiaceae)	5
2.1. <i>Hyptis</i> Jacq. seção <i>Peltodon</i>	8
3. Domínios fitogeográficos do Brasil	9
4. Influência de fatores abióticos no metabolismo secundário	12
5. Questões que pretendemos responder ao final do trabalho.....	15
5.1. Objetivos.....	15
6. Caracterização das espécies e locais de coleta.....	15
7. Dados meteorológicos dos locais de coleta.....	22
Capítulo 1. Perfil químico de <i>Hyptis</i> Jacq. seção <i>Peltodon</i>	25
<i>Abstract</i>	25
Resumo.....	25
1.1. Introdução.....	26
1.1.1. Composição química de Lamiaceae Martinov	26
1.2. Material e Métodos.....	30
1.2.1. Composição química	30
1.2.2. Análises estatísticas	31
1.3. Resultados e discussão	31
1.3.1. Composição química	31
1.3.2. A fitofisionomia influencia o perfil químico dos extratos de <i>Hyptis</i> seção <i>Peltodon</i> ?	44
1.4. Considerações finais.....	53
Capítulo 2. Potencial antioxidante de <i>Hyptis</i> Jacq. seção <i>Peltodon</i>	55
<i>Abstract</i>	55
Resumo.....	55
2.1. Introdução.....	56
2.1.1. Potencial antioxidante de espécies vegetais	56
2.2. Material e métodos	58
2.2.1. Material vegetal	58
2.2.2. Ensaio antioxidantes.....	58
2.2.3. Análises estatísticas	60
2.3. Resultados e discussão	61
2.3.1. Potencial antioxidante de <i>Hyptis</i> seção <i>Peltodon</i>	61

2.3.2. Variações no potencial antioxidante nos domínios fitogeográficos dos Cerrados e Tropical Atlântico.....	66
2.4. Considerações finais.....	73
Capítulo 3. Potencial anti-HIV-1 de <i>Hyptis</i> Jacq. seção <i>Peltodon</i>	75
<i>Abstract</i>	75
Resumo.....	75
3.1. Introdução.....	76
3.1.1. AIDS no mundo e aspectos do ciclo de vida do vírus HIV	76
3.2. Material e métodos	78
3.2.1. Produção dos extratos, fases e isolados para avaliação de potencial anti-HIV-1	78
3.2.2. Avaliação do efeito anti-HIV-1 pela inibição da atividade da transcriptase reversa.....	79
3.2.3. Avaliação do efeito anti-HIV-1 pela inibição da atividade da protease	79
3.3. Resultados e discussão	80
3.4. Considerações finais.....	88
Discussão geral e conclusões	91
Resumo.....	93
<i>Abstract</i>	95
Referências bibliográficas.....	97
Anexo	125

Introdução geral: escolha do tema, abordagens propostas e características dos locais e espécies vegetais

1. Um breve histórico sobre as plantas medicinais

Desde os primórdios da medicina, substâncias derivadas de animais, plantas e microrganismos têm sido utilizadas no tratamento e cura de diversas doenças (Koehn e Carter 2005; Schmidt et al. 2008). Especificamente o uso de plantas medicinais pela população como terapia alternativa no tratamento de doenças, tem sido uma prática comum desde milhares de anos antes da era presente (a.p.) (Dutra et al., 2016).

Com base nisso, um estudo realizado por Hardy et al. (2012) sugere que os Neandertais não se alimentavam somente de proteína animal, mas também de uma série de vegetais cozidos. Além disso, também percebiam o valor nutricional e medicinal de alguns deles. Tal pesquisa foi baseada na análise de placas dentárias fossilizadas, que datam de 47 e 51 mil anos (a.p.), de cinco Neandertais provenientes da gruta de *El Sidrón*, nas Astúrias. A metodologia dessa pesquisa foi realizada combinando técnicas avançadas de análises químicas com a análise morfológica dos microfósseis vegetais, o que possibilitou aos pesquisadores identificar na placa dentária dos Neandertais: grânulos de amido, carboidratos e vestígios de nozes, ervas e verduras. O fato mais interessante foi a identificação de fragmentos de duas plantas: o milefólio e a camomila, que além de não possuírem valor nutricional, contém um desagradável sabor amargo. Tais espécies vegetais são conhecidas por possuírem azuleno, substância conhecida pela sua ação anti-inflamatória e antifebril; e cumarinas, substâncias que aliviam os edemas. Com essas observações sugere-se que os Neandertais que viviam em El Sidrón tinham um conhecimento sofisticado do seu meio natural, incluindo a capacidade de selecionar e utilizar certas plantas pelo seu valor nutricional e medicinal, mostrando assim que a medicina tradicional é uma prática muito mais antiga do que imaginávamos (Hardy et al., 2012).

Entretanto, acredita-se que a evolução do conhecimento das plantas medicinais teve início efetivamente a partir do século I com o grego Dioscórides, que buscou conhecer as plantas que até então eram usadas no tratamento e cura de diversos males. Em sua obra *De Materia Médica*, ele reuniu desenhos e informações etnobotânicas sobre espécies vegetais utilizadas na parte oriental da região mediterrânea e parte da Ásia ocidental. Por um longo período, o conhecimento de tais plantas foi baseado nesta importante obra até o surgimento de um trabalho de identificação destas mesmas espécies, no ano de 1735 (século XVIII), pelo naturalista sueco Carlos Lineu (ou Carl von Linné ou Carolus Linnaeus). Em sua obra *Species plantarum*, Lineu procurou criar um sistema de classificação das plantas afim de facilitar sua identificação e conseqüentemente abrir novos caminhos para posteriores pesquisas (Camargo, 2014).

Devido aos grandes avanços tecnológicos na área de química e farmacologia no século XIX, Friedrich Serturmer, em 1806, foi pioneiro ao isolar o alcaloide morfina da papoula (*Papaver somniferum* L.) (Hamilton e Baskett 2000; Li e Vederas 2009). A partir daí, iniciou-se uma busca contínua por outros medicamentos derivados de plantas. Em 1824, Pierre-Jean Robiquet isolou também da papoula, o alcaloide codeína, um antitússico. Em 1848, George Merck Fraz isola o alcaloide papaverina, utilizado como antiespasmódico. Outros exemplos importantes de constituintes ativos isolados de plantas medicinais incluem a atropina isolada de *Atropa belladonna* L. por Mein em 1831; a cafeína obtida por Runge em 1820 de *Coffea arabica* L.; a digoxina isolada por Claude-Adolphe Nativelle em 1869 de *Digitalis lanata* Ehrh.; e o curare (relaxante muscular) isolado por Winstersteiner e Dutcher em 1943 de *Chondrodendron tomentosum* Ruiz & Pav., entre muitos outros exemplos (Dutra et al., 2016).

O marco histórico no desenvolvimento global da indústria farmacêutica foi a descoberta da salicina (analgésica e antipirética) por Rafaele Piria, em 1832, isolada de *Salix alba* L. Em 1839, foi elucidada a primeira modificação estrutural da salicina, produzindo o ácido salicílico que passou a ser utilizado no tratamento de artrite reumatoide. Do ácido salicílico, Felix Hoffman sintetizou a aspirina (ácido acetilsalicílico) em 1897. Assim, nasceu a famosa e poderosa indústria farmacêutica da Bayer na Alemanha, bem como a primeira patente na área de drogas (Mackowiak, 2000; Dutra et al., 2016).

O Prêmio Nobel de Medicina de 2015 foi compartilhado pela descoberta de duas terapias baseadas em produtos naturais: a artemisinina e a ivermectina. O extrato bruto das folhas de *Artemisia annua* L., conhecido na Medicina Tradicional Chinesa como *qinghaosu*, foi capaz de inibir completamente o parasita da malária de roedores *Plasmodium berghei* e mais tarde foi igualmente eficaz quando administrado em humanos (Tu, 2011). A avermectina foi descoberta no início dos anos 70 por meio de uma triagem de produtos derivados do solo com potencial medicinal (Campbell et al., 1983). O produto da fermentação de *Streptomyces avermitilis*, uma bactéria do solo, avermectina foi altamente eficaz na eliminação de larvas parasitas sendo então modificada a em ivermectina, a fim de potencializar seu efeito e assegurar seu uso em humanos e animais. Juntos, esses exemplos tem destaque na história da busca de produtos naturais por suas propriedades medicinais e os diversos alvos que se beneficiaram de tais pesquisas (Cary e Peterlin, 2018).

No ano de 2016, Newman e Cragg reuniram dados de 34 anos de pesquisas (1981 a 2014) envolvendo produtos naturais como fonte de novas drogas. Em todos esses anos, um total de 1.562 drogas foram aprovadas para uso farmacêutico sendo que 320 moléculas, ou seja, 21% são provenientes de espécies vegetais (Newman e Cragg, 2016).

Em virtude da importância das plantas com potencial medicinal, programas de pesquisa têm sido desenvolvidos no mundo, como a *National Cooperative Natural Products Drug Discovery*

Groups, sob o amparo do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos e o Programa de Pesquisas com Plantas Medicinais (PPPM), organizado pela Central de Medicamentos do Brasil (CEME), que visam ampliar os conhecimentos fisiológicos, fitoquímicos e taxonômicos de grupos de plantas medicinais, bem como encontrar novas substâncias com potencial fitoterápico e estabelecer sua eficácia e formas de controle e comercialização (Calixto, 2005).

No Brasil, no ano de 2006, o governo federal criou a “Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos” por meio do Decreto nº 5.813 (Brasil, 2006), ao qual, em 2008, foi aprovado o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Além de garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional, tal programa também visa regulamentar todas as etapas da cadeia produtiva deste tipo de medicamento, além de ampliar e melhorar as condições para a pesquisa científica nesse segmento, protegendo o patrimônio genético e o conhecimento tradicional associado às plantas com propriedades medicinais.

Inserido na “Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos” encontra-se o RENISUS (Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde - SUS) que atualmente possui uma lista de 71 gêneros e espécies de plantas medicinais, sendo que dentre estas, 42 são nativas do Brasil: cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), abacaxi [*Ananas comosus* (L.) Merr.], cajuru [*Arrabidaea chica* (Bonpl.) B. Verl.], carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.], pata-de-vaca (*Bauhinia* spp. L.), picão (*Bidens pilosa* L.), andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.), guaçatonga (*Casearia sylvestris* Sw.), *Copaifera* spp., erva-baleeira (*Cordia* spp.), *Costus* spp., *Croton* spp., verônica (*Dalbergia subcymosa* Ducke), alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.), espinheira-santa (*Maytenus* spp.), guaco (*Mikania* spp.), melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia* L.), alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.), babaçu [*Orbignya speciosa* (Mart. Ex Spreng.) Barb. Rodr.], maracujá (*Passiflora* spp.), *Persea* spp., *Phyllanthus* spp., tanchagem (*Plantago major* L.), *Polygonum* spp., alecrim-de-são-josé (*Portulaca pilosa* L.), goiabeira (*Psidium guajava* L.), cáscara sagrada (*Rhamnus purshiana* DC.), salgueiro-branco (*Salix alba* L.), aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi), marupazinho (*Eleutherine plicata* Herb.), mulungú (*Erythrina mulungu* Mart. Ex Benth.), pitanga (*Eugenia uniflora* L.), pinhão-roxo (*Jatropha gossypifolia* L.), chambá (*Justicia pectoralis* Jacq.), jurubeba (*Solanum paniculatum* L.), arnica-brasileira (*Solidago microglossa* DC.), barbatimão-verdadeiro [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville], ipê-roxo (*Tabebuia avellanadae* Lorentz ex Griseb.), cravo-de-defunto (*Tagetes minuta* L.), trevo-dos-prados (*Trifolium pratense* L.), unha-de-gato [*Uncaria tomentosa* (Willd.) DC.], alumã *Vernonia* spp..

Ao falarmos em plantas medicinais vale a pena termos em mente algumas definições. Segundo a Organização Mundial da Saúde, “*planta medicinal é uma espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos* (World Health Organization, 2003). Chama-se planta

fresca aquela coletada no momento de uso e planta seca a que foi precedida de secagem, equivalendo a droga vegetal (Brasil, 2006).”

Ainda segundo as definições da Organização Mundial da Saúde (2003), “*as drogas à base de plantas são principalmente inteiras, fragmentadas ou cortadas, plantas, partes de plantas, algas, fungos, líquens em estado não processado, geralmente em forma seca mas por vezes frescas. Certos exsudados que não foram submetidos a um tratamento específico também são considerados fitoterápicos. As drogas fitoterápicas são precisamente definidas pelo nome científico botânico de acordo com o sistema binomial (gênero, espécie, variedade e autor)”*.

A fim de melhorar o enquadramento regulatório de plantas medicinais no Brasil, foi realizada uma revisão do padrão nacional e internacional no que diz respeito a medicamentos à base de plantas. A Anvisa verificou que o Brasil vem alterando seus padrões legais para medicamentos à base de plantas, com base na harmonização com os requisitos praticados internacionalmente e as características do mercado brasileiro, facilitando o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e seus produtos para a população brasileira (Bezerra Carvalho et al., 2014).

A grande maioria das espécies vegetais nunca foi analisada química e farmacologicamente e por isso, a conservação de áreas de vegetação nativa torna-se um assunto de extrema importância, visto que estes locais podem abrigar um vasto potencial farmacológico ainda inexplorado (Gurib-Fakim, 2006).

O Brasil resguarda aproximadamente 20 a 22% de embriófitas do planeta (Dutra et al., 2016), com mais de 46 mil espécies vegetais, sendo 30 de gminospermas, 1.253 de samambaias e licófitas, 1.524 de briófitas e 32.830 de angiospermas (<http://www.sibbr.gov.br>). Desse modo, o Brasil possui uma flora riquíssima, considerada uma fonte inesgotável de metabólitos secundários de interesse (Gottlieb et al., 1998; Valli et al., 2013).

Os cientistas brasileiros vêm fazendo grandes esforços para estudar a biodiversidade brasileira, especialmente entre as embriófitas. De fato, mais de 10 mil artigos envolvendo espécies vegetais foram publicados em revistas científicas internacionais entre 2011 e 2013. Entretanto, apesar desses esforços, da extensa biodiversidade brasileira e do grande interesse da população no uso da medicina tradicional, atualmente o mercado brasileiro de fitoterápicos é pouco relevante, representando cerca de 261 milhões de dólares americanos. Isso representa menos de 5% do mercado global de medicamentos brasileiros, estimado em cerca de 28 bilhões de dólares americanos em 2014 (Dutra et al., 2016).

Ao realizar uma busca de periódicos no “google acadêmico” (mês de maio de 2018) entre os anos de 2016 e 2017, utilizando o termo *medicinal plants*, são disponibilizados aproximadamente 102.000 artigos a respeito do assunto. Se filtrarmos essa busca para: *brazilian medicinal plants*, verificamos que 22,7%, ou seja, aproximadamente 23.200 artigos publicados nos últimos dois anos

referem-se ao potencial biológico de espécies brasileiras. Deste último, 14,4% ou 3.340 artigos equivalem ao potencial biológico de representantes de Lamiaceae.

2. *Hyptis* Jacq. (Lamiaceae)

Atualmente, Lamiaceae possui cerca de 236 gêneros e 6.900 a 7.200 espécies. As plantas dessa família são caracterizadas pelo porte herbáceo, arbustivo ou arbóreo, frequentemente aromáticas e com grande abundância de óleos voláteis. Em corte transversal o caule geralmente apresenta formato quadrangular. Seus representantes apresentam folhas opostas, geralmente decussadas; inflorescências geralmente compostas de cimeiras terminais ou axilares, com flores bissexuadas, comumente zigomorfas, com 2 ou 4 estames e filetes adnatos à corola; geralmente possuem 2 carpelos, com ovário súpero e 2 óvulos por carpelo; o disco nectarífero geralmente é presente; fruto em forma de drupa ou esquizocarpo e endosperma escasso ou ausente (Silva-Luz et al., 2012).

Muitos membros de Lamiaceae são amplamente cultivados, devido não só às suas qualidades aromáticas, mas também à sua facilidade de cultivo. Seus usos vão desde fins alimentícios, como as sementes de chia (*Salvia hispanica* L.), até aos ornamentais como o cóleus (*Solenostemon* Thonn. spp.). Originalmente, o nome da família era Labiatae, pois as flores geralmente possuem pétalas fundidas em um lábio superior e um lábio inferior. Embora, este ainda seja considerado um nome alternativo aceitável, a maioria dos botânicos utiliza Lamiaceae ao se referir a esta família (Raja, 2012).

Tratando-se de pesquisas que tem como objetivo avaliar o potencial biológico, facilmente encontramos representantes de Lamiaceae descritos na literatura. É o caso por exemplo do poejo (*Cunila galioides* Benth.), alfazema (*Lavandula officinalis* Chaix), cordão-de-frade (*Leonotis nepetifolia* (L.) R.Br.), rubim ou mamangava (*Leonurus sibiricus* L.), melissa ou cidreira (*Melissa officinalis* L.), hortelã (*Mentha* sp.), alfavaca (*Ocimum selloi* Benth.), manjerona (*Origanum vulgare* L.), boldo (*Plectranthus barbatus* Andrews), alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), anador ou fontol (*Salvia mycrophilla* Kunth), sálvia (*Salvia officinalis* L.), pulmonária (*Stachys byzantina* K.Koch.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.) (Mahady et al., 2005; Wang e Huang, 2005; Castillo-Juárez et al., 2009; Fernandes e Boff, 2017).

Segundo Harley e colaboradores (2004), dos 236 gêneros que compõem Lamiaceae, os maiores em número de espécies são *Salvia* L. (900 spp.), *Clerodendrum* L. (500 spp.), *Scutellaria* L. (360 spp.), *Stachys* L. e *Plectranthus* L'Hér (300 spp. cada), *Hyptis* Jacq. (280 spp.), *Teucrium* L. e *Vitex* L. (250 spp. cada), *Thymus* L. (220 spp.) e *Nepeta* L. (200 spp.). Entretanto, vários estudos utilizando técnicas genômicas vêm mudando a circunscrição de alguns gêneros, por exemplo, *Clerodendrum* L. que, conforme citado já foi um gênero de mais de 400 espécies, em 2010 foi

reduzido para cerca de 150 (McKay e Blumberg, 2002; Raja, 2012). O mesmo ocorreu com *Hyptis*, que em 2012 foi apontado por Harley e Pastore como um grupo monofilético com base em estudos moleculares (Pastore, 2010) com a circunscrição de espécies a gêneros próximos e redução do tamanho de *Hyptis*. Por este motivo, várias espécies conhecidas por serem usadas na medicina popular para o tratamento de diversas doenças estão atualmente incluídas em gêneros próximos como por exemplo as espécies mais estudadas: *H. suaveolens* e *H. pectinata*, atualmente circunscritas a *Mesosphaerum* P. Brownie, também pertencente à subtribo Hyptidinae (Harley e Pastore, 2012).

Hyptis Jacq. é um gênero pertencente à subfamília Nepetoideae (Dumort.) Luerssen, tribo Ocimeae Dumort., subtribo Hyptidinae Endlicher. O gênero é composto por herbáceas, arbustos e subarbustos anuais ou perenes fortemente aromáticos, de hábito variável, hastes quadrangulares, capítulos de cimose com um involúcro de bractéolas e suportados isoladamente nas axilas de brácteas foliáceas ou reduzidas e, às vezes, formando inflorescências complexas. Flores pedunculadas a sésseis geralmente pequenas, com cálices estreitos e cilíndricos, muitas vezes aumentadas em frutos, geralmente com lobos sub-iguais; estames epipélicos, corola pequena frequentemente branca ou ocasionalmente lilás e com lábio posterior manchado, tubo cilíndrico; sementes ovoides ou estreitamente elipsoides (Basílio et al., 2006; Harley e Pastore, 2012).

O interesse fitoquímico, biológico e farmacológico de *Hyptis* iniciou-se em 1952, quando *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. sinônimo de *Mesosphaerum suaveolens* (L.) Kuntze, uma entre as primeiras espécies de *Hyptis* estudadas quimicamente, teve seu óleo volátil utilizado para o tratamento de várias infecções (Nayak e Guha 1952). Desde então, o interesse pelo gênero foi ocorrendo devido aos seus usos na medicina tradicional, apresentando diversas propriedades medicinais e sendo utilizado como condimentos, por exemplo *Hyptis oblongifolia* Benth e *Hyptis pectinata* (L.) Poit. sinônimo de *Mesosphaerum pectinatum* (L.) Kuntze (Pereda-Miranda e Delgado, 1990; Pereda-Miranda et al., 1993), repelentes de insetos como *Hyptis spicigera* Lam. sinônimo de *Cantinoa americana* (Aubl.) Harley & J.F.B. Pastore (Pereda-Miranda e Delgado 1990, Kini et al., 1993) e fungicida, como *Hyptis ovalifolia* Benth. sinônimo de *Gymneia interrupta* (Pohl ex enth.) Harley & J.F.B. Pastore (Souza et al. 2003).

Quanto aos usos de *Hyptis* na medicina popular, várias espécies foram relatadas como efetivas para o tratamento de gripe e constipação, embora a maioria já reportada esteja circunscrita a outros gêneros, como *Hyptis fruticosa* Salzm. Ex Benth. sinônimo de *Eplingiella fruticosa* (Salzm. ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore; doenças respiratórias como *Hyptis macrostachys* Benth. sinônimo de *Leptohyptis macrostachys* (Benth.) Harley & J.F.B. Pastore; distúrbios estomacais, intestinais e bactericidas como *Hyptis martiusii* Benth. sinônimo de *Medusantha martiusii* (Benth.) Harley & J.F.B. Pastore; cólicas e doenças do fígado como *M. pectinatum*; distúrbios nasais como *Hyptis*

umbrosa Salzm. ex Benth. sinônimo de *Mesosphaerum sidifolium* (L'Hérit.) Harley & J.F.B. Pastore; e para combater a febre como *M. suaveolens* (Judd et al., 2002; Agra et al., 2008; Coutinho et al., 2008).

O gênero também foi comumente utilizado no tratamento de infecções gastrointestinais, como analgésicos e antifúngicos (De Oliveira et al., 2004; Silva et al., 2006). Estudos avaliaram o potencial farmacológica do extrato aquoso das folhas de *M. suaveolens* (Santos et al., 2007), bem como do extrato em solventes orgânicos (hexano, clorofórmio ou acetato de etila) e aquoso das folhas de *M. pectinatum* (Bispo et al., 2001; Lisboa et al., 2006) indicando efeitos analgésicos, anti-edematogênicos e reduzida toxicidade aguda em animais de laboratório. Em *M. pectinatum* foram encontrados diversos terpenoides, como monoterpenos, sesquiterpenos e triterpenos, além de lactonas sesquiterpênicas. A espécie apresentou potencialmente moluscicida, antimicrobiana, anti-edematogênica e antinociceptiva. Em *M. suaveolens* também foram descritos diterpenos. A espécie apresentou potencial antimicrobiano, antifúngico, antitumoral, hipoglicemiante, hipotensivo, vasodilatador, espasmogênico e, contraditoriamente, espasmolítico (Basílio et al., 2006).

H. lacustris A.St.-Hil. ex Benth. é tradicionalmente usada por uma tribo do Peru chamada Yanasha para o tratamento de feridas causadas por leishmaniose cutânea. Neste uso extremamente tradicional, os Yanasha cortam a folha e aplicam o exsudato sobre a área afetada uma vez ao dia até que se obtenha a cura (Céline et al., 2009). *Hyptis capitata* Jacq. é usada de forma semelhante pela tribo Anak Dalam da província de Jambi na Indonésia onde o exsudato de suas folhas é aplicado em feridas externas e também ingeridos para tratamento de feridas internas (Rupa et al., 2017).

Nos dias de hoje os estudos continuam. Entre os anos de 2016 e 2017, aproximadamente 350 artigos foram publicados relatando os diversos potenciais biológicos que são encontrados em *Hyptis* e espécies afins. Alguns deles são: efeito anti-hiperalgésico (Quintans-Júnior et al., 2017) e antioxidante de *M. pectinatum* (Serafini et al., 2017); efeito analéptico, analgésico, anti-eczemático, antiprurítico, alérgico, antiprotozoário (Leishmania), antifúngico, antiparasitário e anti-inflamatório de *M. suaveolens* (Azhagu et al., 2017); efeito anti-acetilcolinesterase e tóxico de *Hyptis dilatata* Benth. (Almeida et al., 2017).

O Brasil é o principal centro de diversidade de *Hyptis* (Harley et al. 2010; Harley, 2012), com a ocorrência de espécies em diferentes formações vegetativas, especialmente no grande domínio Tropical Atlântico e no domínio dos Cerrados. De acordo com Harley (2012), dentre as Lamiaceae, *Hyptis* é o gênero com maior número de espécies ocorrendo no Brasil, sendo 69% endêmicas. As análises moleculares de Harley e Pastore (2012) propõem uma redução considerável de espécies para o gênero *Hyptis* e a inclusão de *Peltodon* Pohl como uma seção, resultando em monofilia para *Hyptis*. Portanto, atualmente, *Hyptis* encontra-se subdividido em 10 seções e conta com cerca de 140 espécies, que ocorrem nas regiões tropicais e subtropicais, desde a América do Norte ao Caribe

e ao Sul até a Argentina, com poucas espécies de ocorrência no Velho Mundo (Harley e Pastore, 2012).

2.1. *Hyptis* Jacq. seção *Peltodon*

Hyptis seção *Peltodon* são caracterizadas por serem subarbustos ou ervas, muitas vezes fortemente geoxílicos (tronco principal subterrâneo e apenas os ramos terminais emergindo do solo), não aromáticos; folhas simples, dentadas, muitas vezes buladas (com a superfície contendo bolhas arredondadas ou globulares); inflorescência solitária, de muitas flores, axilar ou terminal, capítulo longo-pediculado, brácteas e bractéolas persistentes, involucradas, ovaladas, verdes ou coloridas; flores sésseis; cálice tubular, reto, actinomórfico, tornando-se campanulado em fruto, 5-lóbulos, lóbulos subulados, rígido, ereto com ápices se espalhando e minuciosamente foliáceos, muitas vezes colorido; corola com 2 lábios, 5-lóbulos (2/3), creme a amarelo e/ ou vináceos, lobos do lábio posterior triangular, lábio anterior com lobo mediano alongado, lóbulos laterais voltados para baixo, tubo da corola estreito, alargando-se acima; estames inseridos a partir do tubo, filamentos peludos; estilo sem estilopódio; disco fracamente desenvolvido; semente arredondada, fracamente trigonais, ligeiramente mucilaginosos (Harley et al., 2004).

Hyptis seção *Peltodon* compreende cinco espécies, ocorrendo principalmente em regiões de Cerrado ou outras formações savânicas similares ou nas margens da Mata Atlântica, no leste e sul do Brasil, estendendo-se até o Leste do Paraguai e Argentina. Todas nativas, entretanto, não endêmicas (Harley et al., 2010). São elas: *Hyptis campestris* Harley & J. F. B. Pastore, *Hyptis comaroides* (Briq.) Harley & J. F. B. Pastore, *Hyptis meridionalis* Harley & J. F. B. Pastore, *Hyptis pusilla* (Pohl) Harley & J. F. B. Pastore e *Hyptis radicans* (Pohl) Harley & J. F. B. Pastore (Harley e Pastore, 2012).

Uma característica comum das espécies pertencentes à esta seção e que foi fundamental para a identificação das mesmas em campo foram os lobos do cálice com um apêndice conspicuo expandido e achatado no ápice (Figura 1) (Harley et al., 2004).

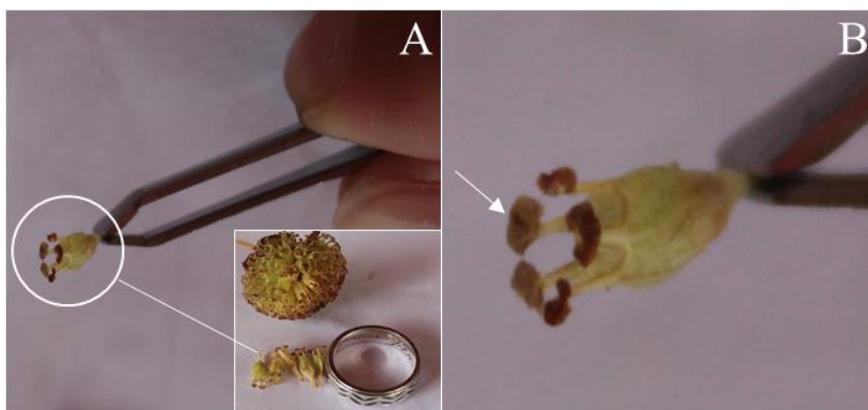


Figura 1 – A: Cálice de *Hyptis* seção *Peltodon*; B: Detalhe para o achatamento do ápice do cálice de *Hyptis* seção *Peltodon* (Fotos: Furlan C., Santos K).

A princípio, um dos objetivos do trabalho era o de coletar todas as cinco espécies da seção nos dois domínios fitogeográficos propostos: Cerrados e Tropical Atlântico. Entretanto, durante as expedições, verificamos que de acordo com nossas buscas, certas espécies ocorriam somente em um ou outro domínio, como foi o caso de *H. comaroides* e *H. campestris*, sendo a primeira encontrada no domínio Tropical Atlântico e a segunda em Cerrado, fato este que já havia sido relatado por Harley e Pastore (2012). *H. radicans* e *H. meridionalis* foram encontradas nos dois domínios e a espécie *H. pusilla* não foi encontrada em campo.

3. Domínios fitogeográficos do Brasil

Em 1986, Heinrich Walter apresenta uma definição de biomas que, segundo Coutinho (2006) é a definição mais moderna, principalmente levando em conta sua abordagem ecológica e prática. Portanto, conforme definido por Walter, considera-se como bioma uma área do espaço geográfico, com dimensões até superiores a um milhão de quilômetros quadrados, representada por um tipo uniforme de ambiente, identificado e classificado de acordo com o macroclima, a fitofisionomia, o solo e a altitude, os principais elementos que caracterizam os diversos ambientes continentais (Walter 1986). Essa definição engloba pontos importantes e que são determinantes na distribuição da vida na Terra: como a influência marcante da temperatura, fatores que são associados aos gradientes latitudinais e altitudinais e a vegetação como componente determinante da aparência geral do bioma no ambiente terrestre (Walter, 1986; Coutinho, 2006; Santos e Brandimarte, 2014).

O geólogo Aziz Ab'Saber definiu que um domínio morfoclimático e fitogeográfico é um conjunto especial de certa ordem de grandeza territorial onde haja um esquema coerente de feições de relevo, tipos de solo, formas de vegetação e condições climático-hidrológicas. De acordo com essa definição, Aziz Ab'Saber considera seis, os grandes domínios paisagísticos e macroecológicos do Brasil: domínio das terras baixas florestadas da Amazônia, domínio das depressões interplanáticas semiáridas do Nordeste, domínio dos “mares de morros” florestados (onde está inserido o domínio Tropical Atlântico), domínio dos chapadões recobertos por Cerrados (onde está inserido o domínio dos Cerrados), domínio dos planaltos das araucárias e domínio das pradarias mistas do Rio Grande do Sul (Ab'Saber, 1977; 2003).

Segundo Coutinho (2006), os termos biomas e domínio não são sinônimos pois o bioma é um tipo de ambiente bem mais uniforme em suas características gerais e em seus processos ecológicos, enquanto que o domínio é muito mais heterogêneo. Portanto, em uma interpretação pessoal, pela ordem de magnitude encontramos primeiramente os grandes domínios, seguido pelos biomas e inseridas nos biomas, as diferentes fitofisionomias vegetais.

Para a definição do local de coleta, adotamos os termos “Domínio Tropical Atlântico” e “Domínio dos Cerrados” proposto por Ab'Saber (1977, 2003) que aqui chamaremos de “domínio

fitogeográfico” pois foram definidos a partir das características do clima, relevo e vegetação. Como os biomas estão geralmente inseridos nos grandes domínios, ou seja, são partes menores destes, conforme mencionado anteriormente, utilizamos a classificação do IBGE para, por sua vez, determinar a fitofisionomia no qual as espécies do presente estudo estão inseridas. Portanto, achamos coerente e optamos por adotar os termos “domínios fitogeográficos” e “fitofisionomias” quando nos referirmos aos locais de coleta. Entretanto, em alguns trechos do texto a seguir, o termo bioma também será encontrado.

Dentro do grande domínio Tropical Atlântico, a Mata Atlântica é um complexo de formações variadas que inclui florestas úmidas, florestas de araucária e florestas costeiras. Este domínio tem um índice de precipitação com valores anuais médios variando entre 1.800 e 3.600 mm. A temperatura e a precipitação variam de acordo com a altitude. Por exemplo, a cada 100 metros, a temperatura pode diminuir em 0,6 graus e a precipitação aumentar até 200 mm. A temperatura média anual na costa é de 22°C, mas pode atingir valores abaixo de zero no topo da montanha de Agulhas Negras (Itatiaia-RJ), que tem 2.800 m de altura. A precipitação anual média no nível do mar é de 1.600 mm. Neste domínio fitogeográfico, ocorrem cerca de 20.000 espécies de angiospermas. Além disso, possui um alto grau de endemismo e é considerado um dos cinco pontos mais importantes da biodiversidade no planeta, permanecendo apenas 7% de sua cobertura original e sendo portanto, considerado um dos 25 *hotspots* de biodiversidade do mundo (Myers et al., 2000; Santos e Brandimarte, 2014).

O Decreto Federal 750/93 (Brasil, 1993) considera floresta Atlântica “*as formações florestais e ecossistemas associados inseridos no domínio Tropical Atlântico, com as respectivas delimitações estabelecidas pelo Mapa de biomas do Brasil do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (disponível em www.ibge.gov.br): floresta ombrófila densa, floresta ombrófila mista, floresta ombrófila aberta, floresta estacional semidecidual, floresta estacional decidual, manguezais, restingas, campos de altitude, brejos interioranos e encaves florestais do Nordeste*”. Excetuando-se as fitofisionomias de manguezais, restingas, brejos interioranos e encaves florestais do Nordeste, falaremos brevemente sobre as demais.

A floresta ombrófila densa (ou floresta tropical pluvial) está presente em toda a faixa litorânea, desde o Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul. Essa fitofisionomia ocorre sob um clima ombrófilo sem períodos biologicamente secos durante o ano e excepcionalmente com até 2 meses de baixa umidade sendo que, mesmo nesses casos, há uma alta umidade concentrada em ambientes de serras. Tal paisagem é constituída por espécies arbóreas de grande e médio porte, sendo este último mais comum em encostas marítimas. As temperaturas médias oscilam entre 22°C e 25°C (IBGE, 2004a; 2004b).

A floresta ombrófila mista (ou floresta de Araucária) ocorre desde o sul de São Paulo até o Rio Grande do Sul e disjunções na Serra da Mantiqueira entre o sul de Minas Gerais e São Paulo. Este tipo de vegetação é exclusivo do Planalto Meridional Brasileiro e ocorre sob um clima ombrófilo, com temperatura média de 18°C e de 3 a 6 meses com médias inferiores a 15°C. Sua formação arbórea é caracterizada pela presença de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze e sua estrutura é bastante variada (IBGE, 2004a, 2004b).

A floresta ombrófila aberta ocorre na faixa litorânea da Paraíba, Pernambuco e Alagoas, no nordeste/leste de Minas Gerais e centro-sul do Espírito Santo. Tal fitofisionomia é composta por árvores mais espaçadas, com estrato arbustivo pouco denso e caracterizado ora pelas arbóreas rosuladas, ora pelas lianas lenhosas. Pode apresentar períodos de seca de 2 a 4 meses, com temperaturas médias entre 24°C e 25°C (IBGE, 2004a, 2004b).

A floresta estacional semidecidual (ou floresta tropical subcaducifolia), ocorre em manchas isoladas no nordeste do país desde o Rio Grande do Norte até a Bahia e no Rio Grande do Sul, em grandes extensões na faixa leste abrangendo Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo. No lado oeste abrange o noroeste do Paraná, sul do Mato Grosso do Sul, oeste de São Paulo e se estende numa estreita faixa pelo vale do Rio Paranaíba, na divisa de Goiás com Minas Gerais. Tal fitofisionomia é caracterizada pelas estações chuvosa e seca na área tropical (temperatura média de 21°C), com curto período seco acompanhado de acentuada queda na temperatura na área subtropical (temperatura média de 15°C). Devido à isso, ocorre a estacionalidade foliar de 20% a 50% dos elementos arbóreos dominantes que por sua vez, estão adaptados às estações frias ou secas (IBGE, 2004a, 2004b).

A floresta estacional decidual (ou floresta tropical caducifolia), ocorre na Bahia e no nordeste de Minas Gerais na faixa de transição com o bioma Caatinga e no sul do país, oeste de Santa Catarina, noroeste e centro do Rio Grande do Sul. Tal fitofisionomia é semelhante à anterior variando apenas na decidualidade foliar que passa a ser maior do que 50% em períodos frios ou secos justamente por estes perdurarem por mais tempo, tanto em área tropical quanto em área subtropical (IBGE, 2004a, 2004b).

Dentro do grande domínio dos Cerrados, o Cerrado é o bioma mais importante do Brasil Central e é caracterizado por diferentes paisagens com variada vegetação, solo, clima e topografia. Assim como a Mata Atlântica, o Cerrado também faz parte dos 25 *hotspots* de biodiversidade do mundo. É um bioma tropical com estações bem definidas: a estação seca durante o inverno e a estação chuvosa no verão. A temperatura média anual é de 25°C, e pode chegar a 40°C em um curto período de alguns dias. A precipitação anual é de cerca de 1.200 a 1.800 mm. A característica principal do Cerrado é o seu solo pobre, que determina a fisionomia da vegetação. Além da deficiência de vários minerais no solo, existe uma alta concentração de alumínio, um elemento

tóxico para a maioria das plantas. Apesar da aparência árida e pobre, este possui uma rica biodiversidade, sendo considerado o bioma de savana mais diversificado do planeta, apresentando mais de 10.000 espécies vegetais (Myers et al., 2000; Klink e Machado, 2005; Santos e Brandimarte, 2014).

A vegetação do bioma Cerrado apresenta fitofisionomias que englobam formações florestais, de savanas e campestres. As formações florestais são representadas por áreas em que predominam espécies arbóreas, onde há formação de dossel contínuo ou descontínuo. Tal formação por sua vez, engloba variadas fitofisionomias, sendo elas: a mata ciliar e a mata de galeria são associadas à cursos d'água, ocorrendo em terrenos bem ou mal drenados; a mata seca e o cerradão que ocorrem nos interflúvios, em terrenos bem drenados (Ribeiro e Walter, 1998).

A formação de savana refere-se a áreas com árvores e arbustos espalhados sobre um estrato gramíneo, sem formação de dossel contínuo. Esse tipo de formação engloba quatro tipos fitofisionômicos principais: o Cerrado sentido restrito que caracteriza-se pela presença dos estratos arbóreo e arbustivo-herbáceo definidos, com árvores distribuídas aleatoriamente sobre o terreno em diferentes densidades; o parque de Cerrado onde a ocorrência de árvores é concentrada em locais específicos do terreno; o Palmeiral, que pode ocorrer tanto em áreas bem ou mal drenadas, onde há a presença marcante de determinada espécie de palmeira arbórea, e vereda que também caracteriza-se pela presença de uma única espécie de palmeira: o buriti, entretanto esta ocorre em menor densidade que em um Palmeiral. Além disso, a vereda é circundada por um estrato arbustivo-herbáceo característico (Ribeiro e Walter, 1998).

O termo de formações campestres envolve áreas com predomínio de espécies herbáceas e algumas arbustivas, sendo escassa a presença de árvores na paisagem (Ribeiro e Walter, 1998). Estas englobam três tipos fitofisionômicos principais: o campo sujo que caracteriza-se pela presença de arbustos e subarbustos em meio ao estrato herbáceo; o campo rupestre possui característica similar ao campo sujo, diferenciando-se tanto pelo substrato, composto por afloramentos de rocha, quanto pela composição florística, geralmente endêmica; no campo limpo a presença de arbustos e subarbustos é praticamente inexistente (Ribeiro e Walter, 1998).

Favorecidos pelos diferentes domínios fitogeográficos que ocorrem no Brasil, além do grande e heterogêneo espaço territorial, somos, portanto, detentores de uma grande diversidade biológica e provavelmente de grande potencial fitoquímico, o que intensifica ainda mais a importância dos estudos realizados com plantas da flora do Brasil (Moura e Emery, 2001).

4. Influência de fatores abióticos no metabolismo secundário

Atualmente, sabe-se que muitos dos metabólitos secundários estão diretamente envolvidos nos mecanismos que permitem a adaptação das plantas ao seu habitat (Santos, 2004; Miranda et al.,

2013). Dessa forma, e pensando-se em espécies de uso medicinal, espera-se que o potencial biológico também sofra variações de acordo com os fatores bióticos e abióticos.

O estresse biótico trata-se de uma condição imposta por outros organismos. Já o estresse abiótico é decorrente de um excesso ou déficit no ambiente físico-químico (Shinozaki et al., 2015) que reduzem o crescimento e o rendimento abaixo dos níveis ótimos (Cramer et al., 2011). As respostas das plantas às tensões abióticas são dinâmicas e complexas (Cramer, 2010; Skirycz e Inzé, 2010); ambos são elásticos (reversíveis) e plásticos (irreversíveis).

As plantas, quando expostas a situações desfavoráveis no ambiente, como déficit ou excesso de água, estresse térmico, deficiência de oxigênio e poluição do ar, resultam em um certo grau de estresse e expressam apenas uma fração de seu potencial genético. Consequentemente, as mesmas se adaptam a condições desfavoráveis através de uma resistência ao estresse que por sua vez, é geneticamente determinada (Drew, 1998; Taiz e Zeiger, 1998; Cisneros-Zevallos, 2003; Skirycz e Inzé, 2010; Pezzopane, et al., 2015).

Kutchan (2001) comenta que os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o meio ambiente e que, devido a isso, a síntese dessas substâncias é, muitas vezes, afetada por condições ambientais como altitude, disponibilidade de água e macro e micronutrientes no solo, temperatura relativa do ar e pH do solo. Apesar da influência reconhecida dos fatores ambientais no desenvolvimento da planta, há poucos estudos que mostram as relações e as aclimações fisiológicas das plantas ao meio ambiente (Kutchan, 2001).

Os estresses abióticos afetam as rotas biossintéticas dos três principais grupos de metabólitos secundários: terpenos, substâncias fenólicas e compostos nitrogenados. Sabe-se que estas substâncias atuam na defesa das plantas contra herbívoros e patógenos, como atrativos para polinizadores e animais dispersores de sementes, além de auxiliar na absorção da radiação ultravioleta excessiva ou a reduzir o crescimento de plantas competidoras adjacentes, entre outros (Gershenzon, 1998; Taiz e Zeiger, 1998; Gouinguene e Turlings, 2002; Cisneros-Zevallos, 2003; 5, Vitti e Brito, 2003; Gobbo-Neto e Lopes 2007; Shinozaki et al., 201).

Outros estudos indicam uma correlação positiva entre a intensidade da radiação solar e a concentração e/ ou composição e a produção de substâncias fenólicas como: flavonoides (Markham et al., 1998; Tattini et al., 2004), taninos (Dudt e Shure, 1994) e antocianinas (Jeong et al., 2004); bem como terpenoides (Karousou et al., 1998).

De acordo com Dudai e colaboradores (1992), o potencial biológico de óleos voláteis de plantas da mesma espécie pode variar consideravelmente entre populações que ocorrem ao longo de um gradiente ambiental. Fatores como temperatura e luminosidade afetam profundamente os níveis e a composição desses óleos voláteis.

Algumas plantas respondem à herbivoria, liberando uma mistura específica de voláteis que atraem inimigos naturais de seus herbívoros. Em plantas de milho (*Zea mays* L.), essa mistura de voláteis é composta principalmente por terpenoides e indol (Gouinguene e Turlings, 2002). Esses autores testaram o efeito da umidade do ar, temperatura, luz e taxa de fertilização do solo na emissão de voláteis induzidos em plantas jovens de milho e o que eles observaram foi que os níveis desses voláteis aumentavam quando as plantas se encontravam em solo seco quando comparado ao solo úmido. Para a umidade do ar, a liberação ideal foi encontrada em torno de 60% de umidade relativa. Temperaturas entre 22°C e 27°C levaram a uma maior emissão do que temperaturas mais baixas ou mais altas. Quanto à intensidade de luz, não houve liberação de voláteis no escuro enquanto que um aumento na intensidade de luz apresentou constante liberação de voláteis. A fertilização também teve um forte efeito positivo pois a emissão de voláteis foi mínima quando as plantas cresciam sob baixa nutrição. Mudanças em todos os fatores abióticos, exceto a umidade do ar, causaram alterações pequenas, mas significativas, na qualidade dos compostos na mistura de odores induzida.

Uma forte associação também é observada entre biossíntese de antocianinas e o estresse em plantas. Tanto os fatores de estresse bióticos quanto os abióticos como: herbívoros, fungos e vírus, temperaturas extremas, alta luminosidade, radiação UV, desequilíbrios de nutrientes minerais, seca, salinidade, anoxia, exposição ao ozônio e herbicidas, podem aumentar os níveis de antocianina em brotos e raízes vegetativas (Gould e Lister, 2006).

Esses estudos indicam que existe um potencial no uso de estresses para induzir o acúmulo de metabólitos direcionados, aumentando assim o potencial genético de frutas e vegetais e produzindo produtos com propriedades benéficas para a saúde. No entanto, existem poucas referências na literatura que relatam o uso de condições controladas para aumentar o acúmulo de tais substâncias (Cisneros-Zevallos, 2003). Por exemplo Kalt e colaboradores (1999), mostraram que o armazenamento de diferentes tipos de bagas a temperaturas maiores que 0°C causou uma indução na síntese de fenólicos, aumentando assim o potencial antioxidante total de morangos e framboesas.

De acordo com Gobbo-Neto e Lopes (2007), o estudo sobre a influência de fatores ambientais na produção de metabólitos secundários geralmente é limitado a um grupo restrito de espécies, muitas das quais são comercialmente importantes, com características previamente selecionadas.

A extração e purificação de metabólitos secundários, requerem um processo complexo e demorado, e mesmo assim, o rendimento do produto desejável muitas vezes fica aquém das expectativas. Consequentemente, encontrar abordagens práticas para intensificar o processo e aumentar o rendimento representa um sério desafio para os pesquisadores.

Segundo Yang e colaboradores (2018), até agora, muitos estudos sobre a pesquisa das espécies de plantas de maior rendimento e otimização das condições de cultivo foram realizados,

mas poucos enfatizaram diretamente a adaptabilidade dos metabólitos secundários das plantas em resposta a perturbações e estímulos ambientais.

Dessa forma, é de extrema importância a utilização de plantas ainda não conhecidas e promissoras para estudos de prospecção de substâncias farmacologicamente ativas, a fim de ampliarmos o conhecimento de espécies nativas, além de verificar possíveis variações fitoquímicas (quantitativa e/ou qualitativa) entre espécies coletadas em domínios fitogeográficos distintos, otimizando assim o conhecimento de sua composição e isolamento de substâncias de interesse.

5. Questões que pretendemos responder ao final do trabalho

A evolução dos metabólitos secundários de plantas é atualmente vista dentro de uma perspectiva filogenética (Agrawal, 2007): a maquinaria biossintética necessária para produzir a defesa da planta deve ser bem conservada e essa origem deve ser monofilética. Entretanto, surgem algumas questões que gostaríamos de responder com o resultado deste trabalho:

1. Uma espécie que ocorre em diferentes domínios fitogeográficos e/ ou fitofisionomias, apresenta diferentes níveis de metabólitos secundários?
2. E se assim for, também representará uma diferença em seu potencial biológico?

5.1. Objetivos

Hyptis constitui um gênero altamente promissor para estudos de prospecção de substâncias farmacologicamente ativas, favorecidos pela grande diversidade de espécies que ocorrem nos domínios fitogeográficos brasileiros, sendo escolhido como modelo para responder as questões acima propostas.

O objetivo geral deste trabalho foi a expansão das análises fitoquímicas e do potencial biológico de quatro espécies de *Hyptis* pertencentes à seção *Peltodon*, bem como verificar uma possível variação fitoquímica (quantitativa e/ou qualitativa) entre as espécies estudadas e coletadas não só em diferentes domínios, mas em diferentes fitofisionomias. Além disso, avaliamos o potencial antioxidante e anti-HIV de seus extratos e fases.

6. Caracterização das espécies e locais de coleta

Para a determinação dos pontos de coletas para as quatro espécies, o primeiro passo foi consultar a plataforma *speciesLink* (<http://splink.cria.org.br/>), onde foi possível obter informações como local, coordenadas, descrição da planta e características do ambiente de acordo com registros de coletas anteriores, inclusive fotos de exsicatas. Esse banco de dados possui aproximadamente 9 milhões de registros e é alimentado pelos herbários que disponibilizam informações sobre suas coleções.

Após a consulta inicial pela plataforma *speciesLink*, foi realizada a busca dos mesmos locais no mapa de biomas do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2004a) a fim de determinar classificação do domínio fitogeográfico no qual a espécie está inserida. Da mesma forma, consultamos também o mapa de vegetação do IBGE (IBGE, 2004b) para a determinação da fitofisionomia do local de coleta. Além disso, próximo à cada local de coleta, existem estações meteorológicas cujo os dados de temperatura e precipitação foram disponibilizados pelos órgãos responsáveis.

O mapa de biomas e de vegetação do IBGE tornou-se uma ferramenta minuciosamente fundamentada, especialmente após um estudo realizado por Arruda e colaboradores (2017), o qual teve como objetivo caracterizar o espaço ambiental dos biomas mais representativos do Brasil e prever sua cobertura, utilizando indicadores climáticos e indicadores relacionados ao solo, resultando em dados altamente coerentes com a cobertura real do país que por sua vez é baseada em uma junção de vários estudos realizados ao longo do tempo.

As espécies alvo do presente estudo foram coletadas entre os meses de novembro (2014) e maio (2015) para coincidir com a época chuvosa e consequente floração das espécies. Em média, foram coletados cinco indivíduos de uma mesma população para cada espécie, totalizando 57 amostras. Exsiccatas foram preparadas no momento de cada coleta e posteriormente identificadas e depositadas pela especialista Cíntia Luíza da Silva-Luz no Herbário do Instituto de Biociências (SPF) (Tabela 1).

Em posse das autorização de acesso e de remessa de amostra de componente do patrimônio genético número 010894/2014-4 obtida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e licença para transporte de material biológico número 47075 obtida pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), foram coletadas folhas, caules e flores (quando presentes) das espécies *H. campestris*, *H. comaroides*, *H. meridionalis* e *H. radicans*, todas pertencentes à seção *Peltodon*.

A Tabela 1 nos informa detalhes sobre as coletas como: espécie e autor, número do voucher após depósito no herbário SPF da Universidade de São Paulo, domínio fitogeográfico e fitofisionomia do local de coleta, data e número de indivíduos coletados, cidade e estado.

A partir deste trecho do presente trabalho, ao serem apresentados resultados em tabelas, iremos nos referir às espécies e aos locais de coleta pelas abreviações utilizadas na Tabela 1. Além disso, essas abreviações serão lembradas nos rodapés de cada página, quando for conveniente.

Tabela 1 – Espécies de *Hyptis* seção *Peltodon* coletadas nos Estados de São Paulo, Paraná e Mato Grosso entre novembro (2014) e maio (2015) e abreviações que serão utilizadas ao longo do texto.

Espécie ¹	Voucher	Domínio fitogeográfico ^{2,3,4}	Fitofisionomia do local de coleta	Data coleta	Cidade/ Estado	Abreviações			
						Espécie	Local de coleta	Domínio fitogeográfico	Fitofisionomia
<i>H. campestris</i> Harley & J. F. B. Pastore	Santos 31	Cerrado	Cerradão ⁵	18/04/2015	Chapada dos Guimarães (Buriti)/ MT	Hcamp	Bur	C	ce
	Santos 8	Cerrado	Mata seca ⁵	11/03/2015	Pirassununga/ SP		Pir	C	ms
	Santos 39	Cerrado	Cerradão ⁵	20/04/2015	Chapada dos Guimarães (Distrito Rio da Casca)/ MT		RC	C	ce
<i>H. comaroides</i> (Briq.) Harley & J. F. B. Pastore	Santos 21	Tropical Atlântico	Campo com ação antrópica ⁶	27/01/2015	Curitiba/ PR	Hcom	Cur	TA	cam/at
<i>H. meridionalis</i> Harley & J. F. B.	Santos 45	Tropical Atlântico	Floresta ombrófila mista com ação antrópica ⁶	21/05/2015	Balsa Nova/ PR	Hmer	BN	TA	om/at
	Santos 46	Cerrado	Savana ⁵	22/05/2015	Jaguariaíva/ PR	Hmer	Jag	C	sav
<i>H. radicans</i> (Pohl) Harley & J. F. B. Pastore	Silva-Luz 308	Cerrado e Tropical Atlântico	Floresta estacional semidecidual ⁶	21/11/2014	Avaré/ SP	Hrad	Av	ZT (zona de transição)	es
	Santos 14	Cerrado	Mata seca ⁵	08/01/2015	Mogi Guaçu/ SP		MG	C	ms
	Santos 15	Tropical Atlântico	Floresta ombrófila mista ⁶	26/01/2015	Campina Grande do Sul/ PR		CGS	TA	om
	Santos 3	Tropical Atlântico	Floresta estacional semidecidual ⁶	10/12/2014	Mogi das Cruzes/ SP		MC	TA	es
	Silva-Luz 295	Tropical Atlântico	Floresta ombrófila densa ⁶	27/11/2014	Santo André/ SP		SA	TA	od

¹: Harley e Pastores (2012); ^{2,3,4}: Aziz Ab'Saber (1977, 2003); IBGE (2004a); ⁵: Ribeiro e Walter (1998), ⁶: IBGE (2004b).

H. campestris tem sua ocorrência confirmada nos Estados de Rondônia, Tocantins, Bahia, Maranhão, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo e Paraná (Harley et al., 2010) e foi coletada nos Estados de São Paulo e Mato Grosso em regiões de Cerrado com fitofisionomia de cerradão e mata seca, respectivamente. *H. campestris* possui flor amarelada com estames vináceos e folhas opostas e alongadas (Figura 2).

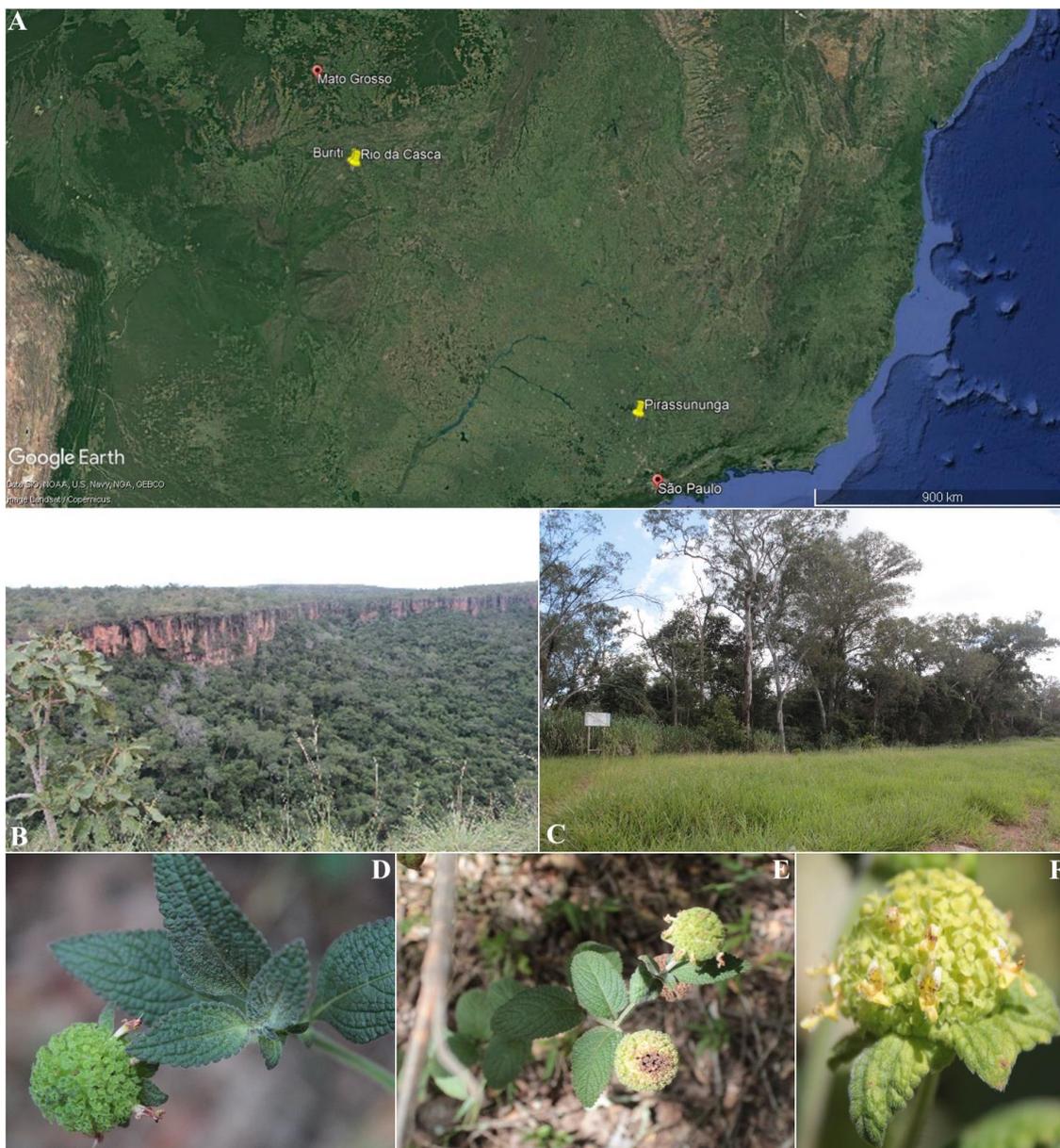


Figura 2 – *Hyptis campestris*: A. Locais de coleta: Rio da Casca (RC); Buriti (Bur); Pirassununga (Pir); Fitofisionomia dos locais de coleta: B. Cerradão (Chapada dos Guimarães - MT) e C. Mata seca (Pirassununga - SP); Características morfológicas de *H. campestris*: D. Folhas alongadas e opostas, E e F. Inflorescência com flor amarelada com estames vináceos (Fotos: Furlan C., Santos K. P.).

H. comaroides ocorre nos Estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina (Harley et al., 2010) e para este trabalho foram coletadas populações no Estado do Paraná em área afetada por ação antrópica. *H. comaroides* possui flor rosa claro com estames avermelhados e folhas opostas grandes, coriáceas e pedúnculo bem alongado e hábito rastejante (Figura 3).



Figura 3 – *Hyptis comaroides*: A. Local de coleta: Curitiba (Cur); Fitofisionomia do local de coleta: B e C – Campo com ação antrópica (Curitiba - PR); Características morfológicas de *H. comaroides*: D – Inflorescência com flor rosa claro com estames avermelhados, E – folhas opostas grandes e coriáceas, F – pedúnculo bem alongado (Fotos: B, C, E e F: Furlan C., Santos K. P.; D: Instituto Darwiniano).

H. meridionalis ocorre nos Estados de São Paulo e Paraná (Harley et al., 2010) e suas coletas foram realizadas no Estado do Paraná em regiões de Mata e Cerrado com o tipo de fitofisionomia de floresta ombrófila mista com ação antrópica e savana. *H. meridionalis* possui flor branca com estames amarelados e folhas opostas alongadas e coriáceas (Figura 4).

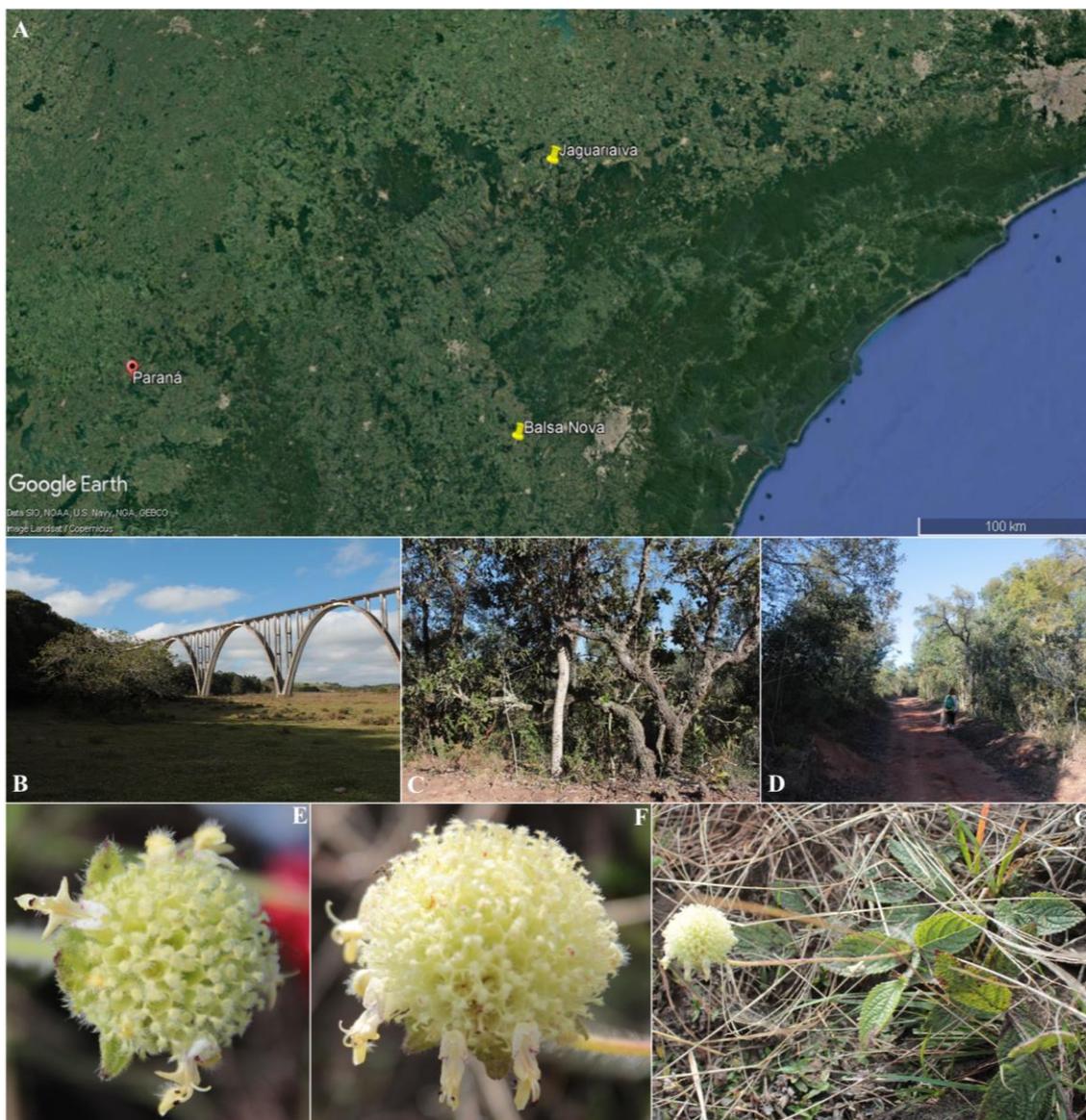


Figura 4 – *Hyptis meridionalis*: A. Locais de coleta: Balsa Nova (BN); Jaguariaíva (Jag); Fitofisionomia dos locais de coleta: B – Floresta ombrófila mista com ação antrópica (Balsa Nova - PR), C e D – Savana (Jaguariaíva - PR); Características morfológicas de *H. meridionalis*: E e F. Inflorescência com flor branca com estames amarelados; G. folhas alongadas, opostas e coriáceas (Fotos: Furlan C., Santos K. P.).

H. radicans tem sua ocorrência confirmada nos Estados de Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina (Harley et al., 2010) e para esta pesquisa sua coleta foi realizada nos Estados de São Paulo e Paraná. Tal espécie ocorre em variadas fitofisionomias como a floresta estacional semidecidual, floresta ombrófila densa e mista, e mata seca podendo ser considerada uma espécie generalista. Possui flor amarelada com estames vináceos, folhas opostas e hábito rastejante (Figura 5).



Figura 5 – *Hyptis radicans*: A. Locais de coleta: Avaré (Av); Campina Grande do Sul (CGS); Mogi das Cruzes (MC); Mogi Guaçu (MG), Santo André (SA); Fitofisionomia dos locais de coleta: B e C. Floresta estacional semidecidual (Mogi das Cruzes - SP e Avaré - SP, respectivamente), D. Mata seca (Mogi Guaçu - SP), E. Floresta ombrófila densa (Santo André - SP), F. Floresta ombrófila mista (Campina Grande do Sul – PR); Características morfológicas e hábito de *H. radicans*: G. Inflorescência com flor amarelada com estames vináceos, H. folhas opostas, I. hábito rastejante (Fotos: Furlan C., Santos K. P.).

7. Dados meteorológicos dos locais de coleta

Os dados de temperatura e precipitação acumuladas dos períodos e locais de coleta foram disponibilizados pelos seguintes órgãos: Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), Estação Meteorológica da Universidade de São Paulo *campus* Pirassununga, Centro Nacional de Monitoramento e Alertas de Desastres Naturais (CEMADEN), Sistema Meteorológico do Paraná (SIMEPAR) e Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas da Universidade de São Paulo (USP – IAG) (Tabela 2). Vale ressaltar, que os dados climáticos obtidos são correspondentes aos trinta dias que antecederam a coleta das espécies vegetais.

Tabela 2 – Dados meteorológicos dos locais de coleta para o período dos 30 dias que antecederam a coleta.

Espécie, local de coleta, domínio fitogeográfico e fitofisionomia	Data de coleta	Temperatura média (°C)	Precipitação acumulada (mm)	Precipitação média (mm)	Estação meteorológica
Hcamp (Bur, C, ce)	18/04/2015	24,8	212,4	0,3	ICMbio e CEMADEN
Hcamp (Pir, C, ms)	11/03/2015	24,0	1,6	0,1	USP - Pirassununga
Hcamp (RC, C, ce)	20/04/2015	23,2	212,4	0,3	INMET e CEMADEN
Hcom (Cur, TA, cam/ at)	27/01/2015	23,0	6,0	0,2	CEMADEN e INMET
Hmer (BN, TA, om/ at)	21/05/2015	15,3	7,5	0,2	INMET
Hmer (Jag, C, sav)	22/05/2015	16,8	12,8	0,4	SIMEPAR
Hrad (Av, ZT, es)	21/11/2014	21,7	2,3	0,1	CEMADEN e INMET
Hrad (MG, C, ms)	08/01/2015	24,5	10,1	0,3	CEMADEN e INMET
Hrad (CGS, TA, om)	26/01/2015	22,1	3,4	0,1	CEMADEN e INMET
Hrad (MC, TA, es)	10/12/2014	21,1	3,4	0,1	INMET
Hrad (SA, TA, od)	27/11/2014	27,1	151,6	5,6	USP - IAG

Hcamp: *H. campestris*, Hcom: *H. comaroides*, Hmer: *H. meridionalis*, Hrad: *H. radicans*; Bur: Buriti (MT), Pir: Pirassununga (SP), RC: Rio da Casca (MT), Cur: Curitiba (PR), BN: Balsa Nova (PR), Jag: Jaguariaíva (PR), CGS: Campina Grande do Sul (PR), MC: Mogi das Cruzes (SP), SA: Santo André (SP), Av: Avaré (SP), MG: Mogi Guaçu (SP); C: cerrado, TA: Tropical Atlântico; ce: cerradão, ms: mata seca, camp/at: campo com ação antrópica, om/at: floresta ombrófila mista com ação antrópica, sav: savana, es: floresta estacional semidecidual, om: floresta ombrófila mista, od: floresta ombrófila densa; INMET: Instituto Nacional de Meteorologia, ICMBio: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, USP: Estação Meteorológica da Universidade de São Paulo *campus* Pirassununga, CEMADEN: Centro Nacional de Monitoramento e Alertas de Desastres Naturais, SIMEPAR: Sistema Meteorológico do Paraná, USP: Universidade de São Paulo, IAG: Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas.

As temperaturas médias variaram de 15°C a 27°C, sendo as médias mais baixas registradas no estado do Paraná durante as coletas de *H. meridionalis*. Para *H. radicans*, espécie que foi coletada em mais locais, a variação da temperatura média foi maior, com coletas apresentando média dos últimos 30 dias de 21°C e outras com média de 27°C. O fator precipitação foi o que mais variou

entre as coletas, com valores mínimos de precipitação acumulada de 1,6 mm e máximo de 212,4 mm. Para todas as espécies coletadas em mais do que uma área, houve variação da precipitação acumulada de acordo com o local, como por exemplo *H. campestris* coletada em Buriti (C, ce), Pirassununga (C, ms) e Rio da Casca (C, ce) que apresentaram valores médios acumulados de 212,40 mm, 1,58 mm e 212,40 mm, respectivamente; e *H. radicans* coletada em 5 locais diferentes com diferentes valores médios de precipitação acumulada, sendo o menor em Avaré (2,29 mm) e o maior em Santo André (151,60 mm).

Neste capítulo, esperamos ter possibilitado ao leitor, uma breve introdução sobre diversos aspectos que serão abordados ao longo desse trabalho, principalmente sobre as espécies alvo do estudo, domínios fitogeográficos, biomas e fitofisionomias em que ocorrem; além dos fatores abióticos que afetam a produção de metabólitos secundários nas plantas, destacando assim o quão importante serão as produções geradas com esta pesquisa.

Esta tese foi dividida em 3 (três) capítulos. No capítulo 1 abordaremos a composição química das espécies alvo do estudo coletadas em diferentes locais e se há ou não alguma interferência de fatores ambientais em seus perfis químicos. Os capítulos 2 e 3 abordarão como tais amostras reagiram frente aos ensaios de potencial biológico antioxidante e anti-HIV e, ainda, se tais potenciais terão ou não alguma relação com a fitofisionomia de seu local de coleta.

Capítulo 1. Perfil químico de *Hyptis* Jacq. seção *Peltodon*

Abstract

Only 20% of *Hyptis sensu* Harley and Pastore (2012) was reported regarding their chemical composition, being most of these species studied in relation to volatile oil composition. Polar substances were reported only for 6,1% of the 144 *Hyptis* spp. The objective of this study was to contribute with new data on the chemistry of *Hyptis*, and to verify a possible variation in the chemical profile among species of natural occurrence in different phytogeographic domains: Brazilian Savannah and Tropical Atlantic. *Hyptis* section *Peltodon* presented phenolic composition similar to species of the subfamily Nepetoideae, showing the presence of caffeic acid, rosmarinic acid, and nepetoidins. The phytophysionomy, and consequently the meteorological data, did not seem to influence the chemical profile, since there was a different interspecific variation among species. We must consider that other abiotic factors, besides biotic ones, can contribute to this variation. Although, data shown a moderate positive correlation between the accumulated precipitation and the content of flavonoid.

Resumo

Apenas 20% de *Hyptis sensu* Harley e Pastore (2012) foram pesquisados quanto à sua composição química, sendo a maioria destas espécies estudadas em relação à composição do óleo volátil. Substâncias polares foram reportadas apenas para 6,1% das 144 espécies pertencentes ao gênero. O objetivo deste estudo foi contribuir com novos dados fitoquímicos para *Hyptis* spp., e verificar uma possível variação no perfil químico entre espécies coletadas em domínios fitogeográficos distintos: Cerrados e Tropical Atlântico. *Hyptis* seção *Peltodon* apresentou composição fenólica semelhante à de espécies da subfamília Nepetoideae, destacando-se a presença do ácido cafeico, ácido rosmarínico e nepetoidinas. A fitofisionomia e conseqüentemente, os dados meteorológicos, parecem não influenciar o perfil químico, visto que houve uma variação interespecífica diferente entre as espécies. Devemos levar em conta que outros fatores abióticos, além dos bióticos, podem contribuir para esta variação, entretanto, vimos que há uma moderada correlação positiva entre a precipitação acumulada e teor de flavonoides.

1.1.Introdução

1.1.1. Composição química de Lamiaceae Martinov

As espécies pertencentes à Lamiaceae produzem uma grande variedade de metabólitos especiais, entretanto, é inegável que a maioria das pesquisas com tais compostos seja um pouco restrita às substâncias apolares como os óleos voláteis (Sedano-Partida et al., 2018) produzidos na superfície das folhas e inflorescências e que são objeto de interesse econômico para uso medicinal, cosmético e alimentício. Segundo Hegnauer (1989), desde 1965, inúmeras pesquisas fitoquímicas envolvendo Lamiaceae vem contribuindo para a elucidação das substâncias apolares como os próprios óleos voláteis, triterpenos e diterpenos.

Alguns representantes de Lamiaceae ricos em óleos voláteis, pertencem aos gêneros *Pogostemon* Desf. (patchouli, subfamília Lamioideae Harley), *Sideritis* L. (subfamília Lamioideae) e *Prostanthera* Labill. (subfamília Prostantheroideae Luerksen) (Hegnauer, 1989).

Entretanto, Hegnauer (1989) enfatiza que a produção de óleos voláteis parece não se tratar de uma característica de Lamiaceae como um todo, sendo mais comum a presença dessa classe de substâncias na subfamília Nepetoideae (Dumortier) Luerksen (Harley et al., 2004). Os óleos voláteis de Nepetoideae são compostos principalmente de monoterpenos como a mentona e o timol, sesquiterpenos como o cariofileno, e fenilpropanoides voláteis como o eugenol e metil-chavicol (estragol) em espécies de *Ocimum* L. (Grayer et al., 1996; Harley et al., 2004).

Em algumas subfamílias como em Lamioideae, Viticoideae Briq., Ajugoideae Kostelezky e Scutellarioideae (Dumortier) Caruel, no lugar de óleos voláteis, a maioria das espécies produz iridoides, que são lactonas monoterpênicas, às quais frequentemente são adicionados açúcares, e por isso, tais substâncias são também chamadas de iridoides glicosilados (Harley et al., 2004).

Acredita-se que a presença de iridoides em Lamiaceae seja uma característica plesiomórfica enquanto que a produção de óleos voláteis, uma característica apomórfica. Isso porque os iridoides estão geralmente presentes em famílias mais basais, como as Verbenaceae J. St.-Hil. e Scrophulariaceae Juss., que por sua vez, raramente apresentam óleos voláteis (Harley et al., 2004).

A ocorrência de iridoides glicosilados em Lamiaceae foi descrita pela primeira vez por Kooiman (1972) e foram muito úteis como marcadores taxonômicos para a família (Hegnauer, 1989; Wink, 2003). Entretanto, substâncias dessa classe tais como a aucubina, catalpol e harpagosídeo também são comumente encontrados em outras famílias, como por exemplo Verbenaceae (Castro-Gamboa e Castro, 2004), Scrophulariaceae (Gowan et al., 1995), Loganiaceae R. Br. Ex Mart. (Zhang et al., 2003), Rubiaceae Juss. (Lopes et al., 2004), Apocynaceae Juss. (Silva et al., 2007), Gentianaceae Juss. (Bergeron et al., 1997), Menyanthaceae Dumort. (Junior, 1991), Oleaceae Hoffmanns. & Link (Jensen, 2002), Caprifoliaceae Juss. (Kumar et al., 2000),

Plantaginaceae Juss. (Bowers et al., 1992), Pedaliaceae R. Br. (Potterat et al., 1988), algumas Caprifoliaceae Juss. (Liu et al., 2006), entre outras.

Iridoides foram também registados em alguns membros das Nepetoideae, tais como *Nepeta cataria* L., conhecida como a “erva-do-gato”, e *Satureja vulgaris* (L.) Fritsch, que não estão mais relacionados com as Lamioideae. Como os iridoides também são comuns em Verbenaceae (próxima evolutivamente à Lamiaceae), um provável cenário evolutivo sugere que os genes que codificam o caminho para os iridoides tenham evoluído de um ancestral de Verbenaceae e Lamiaceae. A ausência de iridoides na maioria dos membros das Nepetoideae, incluindo as espécies do presente estudo, pode ser devido a uma inativação dos genes correspondentes (Wink, 2003).

A ocorrência de iridoides e óleos voláteis em Lamiaceae está altamente correlacionada com as características do pólen e, por consequência, com a classificação feita por Erdtman (1945), que subdividiu a família em Lamioideae *sensu lato* e Nepetoideae baseando-se nos dois principais tipos de pólen/núcleos observados por Leitner (1942): grãos tricolpados/ binucleados e hexacolpados/ trinucleados, respectivamente (Pedersen, 2000; Harley et al., 2004). Tomás-Barberán e colaboradores (1988) também relatam as diferenças químicas que suportam esta classificação subfamiliar: a subfamília Lamioideae produz iridoides glicosilados, mas não produz ácido rosmarínico e é pobre em terpenoides voláteis, enquanto a subfamília Nepetoideae produz ácido rosmarínico, não produz iridoides glicosilados e é geralmente rica em terpenoides voláteis.

Constituintes terpenoídicos fazem parte da química de Lamiaceae em geral. A classe mais comumente encontrada é a dos diterpenos dos tipos labdanos, neoclerodanos, abietanos, primaranos e entauranos, presentes nas subfamílias Viticoideae, Ajugoideae, Prostantheroideae, Scutellarioideae, Lamioideae e Nepetoideae (Hegnauer, 1989; Alvarenga et al., 2001). Diterpenoides do tipo abietano são característicos da subfamília Nepetoideae e são encontrados em muitos gêneros como *Salvia* L., *Lepechinia* Willd., *Meriandra* Benth., *Horminum* L., *Nepeta* L., *Hyptis*, *Fuerstia* T. C. E. Fr., *Hoslundia* Vahl, *Orthosiphon* Benth., *Tetradenia* Benth., *Plectranthus* L'Hér, *Aeollanthus* Mart. ex Spreng., *Dauphinea* Hedge e *Isodon* (Schrad. ex Benth.) Spach (Harley et al., 2004).

Compostos nitrogenados como alcaloides e glicosídeos cianogênicos já foram relatados em Lamiaceae entretanto em baixas quantidades (Hegnauer, 1989). Betaínas também já foram descritas nas subfamílias Lamioideae e Ajugoideae em quantidades relativamente altas. Entretanto, baixas quantidades desses compostos foram observadas na subfamília Nepetoideae (Blunden et al., 1996; Harley et al., 2004).

Menos pesquisadas em Lamiaceae, entretanto não menos importantes, as substâncias fenólicas são relativamente pouco conhecidas. Estudos mostram que as espécies dessa família produzem uma grande variedade de substâncias dessa classe que são, muitas vezes acumuladas nas

plantas em altas concentrações. As classes mais comuns de fenólicos encontradas em Nepetoideae são os ésteres de ácido cafeico e os flavonoides (Harley et al., 2004).

A classe dos flavonoides é de grande importância dentro das substâncias fenólicas e seus representantes são caracterizados pela presença de dois anéis aromáticos C₆ (A e B) conectados por um anel benzênico C₃ (C) (Figura 1.1) (Taiz e Zeiger, 2013).

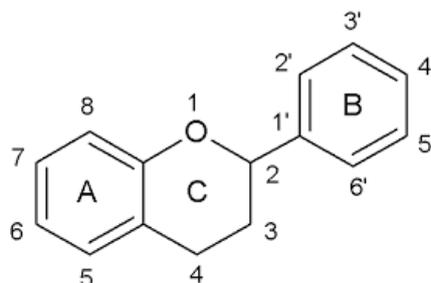


Figura 1.1 – Estrutura básica de um flavonoide.

Para dar início à biossíntese dos flavonoides, a fenilalanina amônia-liase catalisa a desaminação não oxidativa do aminoácido fenilalanina em ácido cinâmico, sendo esta, a primeira reação da via geral dos fenilpropanoides. O ácido cinâmico é hidroxilado pela cinamato-4-hidroxilase em ácido 4-cumárico, que é então ativado para a 4-coumaroil-coenzima A (CoA) pela ação do 4-cumarato:CoA ligase (4CL). A atividade de 4CL leva à formação de 4-coumaroil-CoA, um composto central do metabolismo dos fenilpropanoides, que por sua vez leva a um dos precursores na síntese de flavonoides e estilbenos. Com a ação da chalcona sintase (CHS) e adição de três moléculas de malonil-CoA ao 4-hidroxicinamoil-CoA entra na via dos flavonoides, sendo a naringenina importante precursor para a síntese das outras classes de flavonoides. A estrutura final da flavanona é formada apenas quando as chalconas são estereoespecificamente isomerizadas em naringenina pela chalcona isomerase, uma reação conhecida por ocorrer espontaneamente em ambientes alcalinos. Em uma rota metabólica alternativa, a ação de estilbeno-sintases (STS), com o auxílio de três moléculas de malonil-CoA, guia a cascata até a via geral dos estilbenos com a produção de resveratrol, por exemplo. CHS e STS usam o mesmo sítio ativo semelhante à cetosintase (KS) para catalisar a condensação repetitiva de unidades de acetato a uma molécula derivada de CoA (4-coumaroil-CoA), tipicamente produzindo os produtos aromáticos mono- e bicíclicos resveratrol e naringenina, respectivamente (Choi et al., 2011). As transferases modificam o esqueleto de flavonoides com açúcares, grupos metila e/ ou porções acilas, modulando a atividade fisiológica do flavonoide alterando sua solubilidade, reatividade e interação com alvos celulares (Manach et al., 2004; Ferreyra et al., 2012) além de fornecer o potencial para produzir muitas estruturas diferentes.

As regiões da América do Sul amazônica e oriental são, na maioria das vezes, compostas por formações geológicas mais antigas e, portanto, possuem uma flora muito característica dominada pela subfamília Nepetoideae, tribo Ocimeae e subtribo Hyptidinae. Dentro da subtribo Hyptidinae encontra-se o grande gênero *Hyptis* (Harley et al., 2004).

Estudos anteriores realizados no laboratório de Fitoquímica, apontaram a presença de alguns constituintes fenólicos em *Hyptis lacustris* A. St.-Hil. ex Benth. como ácido clorogênico, ácido cafeico, rutina, ácido rosmarínico, apiina e luteolina. Também para esta espécie, foi relatada a presença das nepetoidinas A e B, além de outros derivados flavonoídicos, derivados do ácido cinâmico e derivados do ácido clorogênico (Sala-Carvalho, 2017). Também em *Hyptis radicans* (Pohl) Harley & J. F. B. Pastore e *Hyptis multibracteata* Benth. foi relatada a presença das mesmas classes de constituintes fenólicos: ácidos fenólicos, flavonoides, derivados do ácido clorogênico, derivados do ácido cinâmico, nepetoidinas e ácido rosmarínico (Sedano-Partida, 2018).

Com o objetivo de reunir todas as informações já descritas a respeito da constituição química e do potencial biológico de *Hyptis sensu* Harley e Pastore (2012), foi realizado por Sedano-Partida e colaboradores (2018), um trabalho de revisão da literatura utilizando as palavras *Hyptis* e *Peltodon*. 879 artigos foram encontrados no *SciFinder*, 528 no *Web of Science* e 96 no *SciELO*. Apesar de Sedano-Partida e colaboradores (2018) terem obtido um número relativamente alto de trabalhos através dessa busca, apenas 20% de *Hyptis sensu* Harley e Pastore (2012) foram pesquisados, sendo a maioria das espécies estudada em relação à composição do óleo volátil (Sedano-Partida et al., 2018).

Substâncias não-voláteis, ou seja, com característica polar, foram reportadas apenas para 6,1% das 144 espécies pertencentes ao gênero: *Hyptis atrorubens* Poit., *Hyptis brevipes* Poit., *Hyptis capitata* Jacq., *H. lacustris*, *Hyptis lanceolata* Poir., *H. multibracteata*, *H. radicans*, *Hyptis ramose* Pohl ex Benth. e *Hyptis rhomboidea* M. Martens & Galeotti (Sedano-Partida et al., 2018). Isso indica que o restante das espécies de *Hyptis* ainda não foi estudado quanto aos constituintes fenólicos.

Para tanto, este capítulo teve como objetivo apresentar novos dados fitoquímicos, com enfoque em constituintes polares, para quatro espécies de *Hyptis*, dentre as cinco pertencentes à seção *Peltodon*. Como objetivos específicos, este estudo verificou a possível variação no perfil químico (quantitativa e/ou qualitativamente) entre espécies coletadas em domínios fitogeográficos distintos: Cerrados e Tropical Atlântico.

1.2. Material e Métodos

1.2.1. Composição química

Fragmentos de caule, folhas e flores (quando presentes) de quatro a seis indivíduos de *Hyptis campestris* Harley & J. F. B. Pastore, *Hyptis comaroides* (Briq.) Harley & J. F. B. Pastore, *Hyptis meridionalis* Harley & J. F. B. Pastore, *Hypyis pusilla* (Pohl) Harley & J. F. B. Pastore e *H. radicans* foram secos em estufa a 40°C por 1 semana. O material seco (10 g para cada indivíduo coletado) foi triturado e o pó obtido foi extraído por maceração em etanol 70% por sete dias a temperatura ambiente, com troca do solvente a cada dois dias. O extrato bruto hidroalcoólico foi seco em rotaevaporador e liofilizado para obtenção do rendimento. Parte do extrato liofilizado (1 g) foi solubilizada em etanol 50% e particionada em funil de separação utilizando os solventes: hexano, diclorometano e acetato de etila (Ruiz et al., 2005; Reginatto, 2017).

Conforme mencionado anteriormente, este trabalho enfatizou à caracterização das substâncias polares presentes nos extratos e fases. Para tanto, a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de arranjo de diodos [(CLAE-DAD) LC1260 - Agilent Technologies] foi feita com detecção a 352 nm (que evidencia constituintes flavonoídicos) e a 280 nm (que permite a análise de outros fenólicos que não somente flavonas e flavonóis). Foi utilizada coluna Zorbax C-18 (150 x 4.6 mm, 3.5 µm) a 45°C. O gradiente de solventes utilizado foi ácido acético 0,1% em água ultrapura (AcOH; Synth[®]) e acetonitrila (CH₃CN; J. T. Backer[®]) começando com 10% de CH₃CN em AcOH (0-6 min) e aumentando para 15% de CH₃CN (6-7 min), isocrático (7-22 min), aumentando para 50% de CH₃CN (22-32 min), aumentando para 100% de CH₃CN (32-42 min) e, finalmente isocrático (42-50 min). O fluxo dos solventes foi de 1 mL min⁻¹ (dos Santos et al., 2018).

Para a quantificação dos constituintes individualmente, foram utilizadas as áreas dos picos do cromatograma das amostras obtido por CLAE-DAD, comparadas às curvas de calibração dos padrões luteolina (Indofine Chemical Company[®]) (para derivados flavonoídicos) e ácido *p*-cumárico (Sigma-Aldrich[®]) (para derivados cinâmicos) com concentrações entre 1,5 a 150 µg mL⁻¹ (para curvas consultar o Anexo). Nesta etapa, vale ressaltar que foram excluídos constituintes sem espectro UV-visível, ou seja, com baixa resolução, e aqueles que não estavam presentes em menos da metade dos indivíduos das respectivas populações. Todas as amostras foram preparadas na concentração de 2 mg mL⁻¹.

Para a identificação preliminar dos constituintes das amostras por seus espectros de absorção UV-visível e tempos de retenção, foram utilizadas amostras autênticas de flavonoides obtidas por CLAE-DAD no mesmo método citado anteriormente. Tais substâncias presentes nos extratos brutos e a maioria também nas fases.

As fases com maior variedade de substâncias, foram submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM-EM) na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo em equipamento Shimadzu acoplado aos detectores SPD-20 Shimadzu e Bruker Daltonics Esquire 3000 Plus, utilizando coluna Zorbax SB-C18 (150 x 4.6 mm, 3.5 μ m, Agilent, USA) nas mesmas condições de solventes e fluxo descritos anteriormente. Para a espectrometria de massas as condições foram: fonte ESI+ 500V, voltagem capilar 4000V, nebulizador a 30 psi, gás secante a 300°C e fluxo de 7 L min⁻¹. Aquisição realizada em módulo negativo.

1.2.2. Análises estatísticas

Foram realizadas análises estatísticas no programa *R Project for Statistical Computing* versão 3.4.4, onde iniciamos todas as análises com um gráfico do tipo *boxplot* com a intenção de verificar possíveis *outliers*. Para análises com mais de dois grupos, inicialmente testamos as premissas para o teste paramétrico Anova, que são: distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e variâncias iguais ou homocedasticidade (Teste de Barlett). Atendendo às premissas, utilizamos o Anova com o teste *post hoc* de Tukey para determinar as diferenças significantes entre as médias. Nos casos em que houve distribuição normal, mas não houve homocedasticidade, realizamos o Anova com o teste t de Welch que considera a heterocedasticidade dos dados. Para os casos em que a distribuição não foi normal, realizamos tratamento dos dados (log10) para que fosse possível a utilização do teste paramétrico Anova. Entretanto, se mesmo com o tratamento nos dados, não foi observada distribuição normal, empregamos a análise não-paramétrica Kruskal Wallis e teste *post hoc* de Dunn.

Nos casos em que foram comparados apenas dois grupos, empregamos a análise de distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e variâncias iguais ou homocedasticidade (Teste F) e atendendo às premissas empregamos o teste t para amostras independentes. Para os casos em que a distribuição não foi normal e/ou não houve homocedasticidade, realizamos tratamento dos dados (log10) para que fosse possível a utilização do teste t. Entretanto, se mesmo com o tratamento nos dados, não foi observada distribuição normal e homocedasticidade, empregamos a análise não-paramétrica Wilcoxon (2 amostras) (Arango, 2009).

Quando conveniente, foi empregado o coeficiente de correlação de Pearson, um tipo de medida que nos informa o grau de correlação linear entre duas variáveis numéricas (Vieira, 2008).

1.3. Resultados e discussão

1.3.1. Composição química

Após o procedimento de extração e partição, quatro fases foram concentradas e liofilizadas para a obtenção de seus rendimentos: fase hexano (FH), fase diclorometano (FD), fase acetato de etila (FAE) e fase hidroalcoólica (FHA) (Figura 1.2). Considerando-se as várias localidades de

coleta, foram 11 extratos brutos produzidos em n amostral de pelo menos 4 indivíduos, totalizando 55 extratos brutos analisados. Para cada extrato bruto, quatro fases de partição foram produzidas, o que resultou em aproximadamente 275 amostras analisadas.

Conforme podemos observar na Tabela 2.1, com relação ao rendimento do extrato bruto das espécies coletadas observou-se média de 15,2%. As populações de *H. campestris* apresentaram extratos com rendimento médio de 12,2%, para *H. comaroides* o rendimento foi de 15,2%, *H. meridionalis* foi em média 12,7% e *H. radicans* apresentou 17,9% de rendimento médio do extrato bruto.

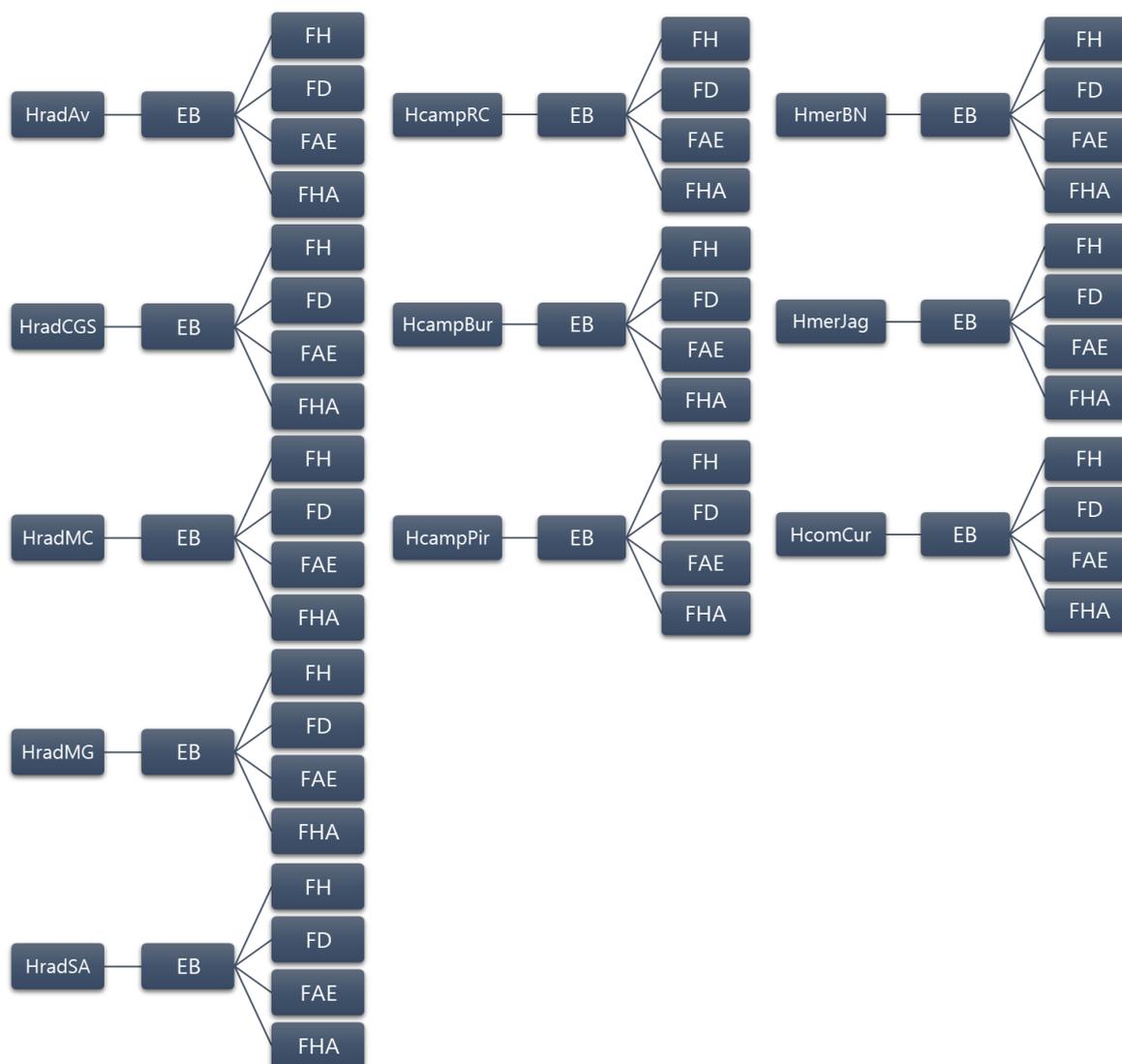


Figura 1.2 – Fluxograma da produção de extratos e fases de *Hyptis* seção *Peltodon*. Hcamp: *H. campestris*, Hcom: *H. comaroides*, Hmer: *H. meridionalis*, Hrad: *H. radicans*. Localidades de coleta: Bur: Buriti (MT), Pir: Pirassununga (SP), RC: Rio da Casca (MT), Cur: Curitiba (PR), BN: Balsa Nova (PR), Jag: Jaguariaíva (PR), CGS: Campina Grande do Sul (PR), MC: Mogi das Cruzes (SP), SA: Santo André (SP), Av: Avaré (SP), MG: Mogi Guaçu (SP); EB: extrato bruto, FH: fase hexano, FD: fase diclorometano, FAE: fase acetato de etila, FHA: fase hidroalcoólica.

O cálculo do rendimento foi feito considerando a massa vegetal seca inicial submetida à maceração (10 g). De acordo com a Tabela 1.1, a fase acetato de etila foi a fase com menor rendimento comparada as outras 3 fases para todas as espécies analisadas, enquanto a fase hidroalcoólica foi a que apresentou maior rendimento, refletindo o método inicial de extração que utilizou um solvente com caráter mais polar (etanol 70%). A partição foi eficiente para a separação preliminar dos constituintes do extrato bruto, com a migração de substâncias mais apolares para as fases hexano e diclorometano.

Tabela 1.1 – Rendimento (%) dos extratos brutos e fases de *Hyptis* seção *Peltodon*.

Espécie, local de coleta, domínio fitogeográfico e fitofisionomia	EB	FH	FD	FAE	FHA
Hcamp (Bur, C, ce)	10,3 ±1,4 ^a	3,1 ±0,4 ^b	3,9 ±1,0 ^a	0,7 ±0,3 ^b	4,9 ±1,2 ^b
Hcamp (Pir, C, ms)	12,7 ±1,2 ^a	4,4 ±0,6 ^a	2,9 ±0,7 ^{ab}	1,3 ±0,1 ^a	7,1 ±1,1 ^a
Hcamp (RC, C, ce)	13,6 ±4,2 ^a	3,9 ±0,7 ^{ab}	2,5 ±0,8 ^b	1,9 ±0,5 ^a	3,8 ±0,5 ^b
Hcom (Cur, TA, cam/ at)	15,2 ±1,1	3,4 ±0,2	2,2 ±0,3	0,9 ±0,1	6,2 ±0,3
Hmer (BN, TA, om/ at)	12,2 ±2,4 ^a	2,7 ±0,2 ^a	1,8 ±0,1 ^b	1,8 ±0,3 ^a	5,1 ±0,1 ^b
Hmer (Jag, C, sav)	13,2 ±1,5 ^a	2,9 ±0,3 ^a	2,3 ±0,1 ^a	1,5 ±0,1 ^a	5,4 ±0,2 ^a
Hrad (Av, ZT, es)	21,5 ±1,2 ^a	2,6 ±0,4 ^b	2,8 ±0,3 ^a	2,5 ±1,0 ^a	3,6 ±1,6 ^b
Hrad (MG, C, ms)	16,4 ±2,4 ^{bc}	4,1 ±0,2 ^a	3,3 ±1,1 ^a	2,8 ±0,8 ^a	3,5 ±1,5 ^b
Hrad (CGS, TA, om)	17,3 ±1,0 ^{bc}	1,4 ±0,5 ^c	2,5 ±0,9 ^a	1,5 ±0,8 ^a	6,4 ±1,0 ^a
Hrad (MC, TA, es)	14,8 ±2,7 ^c	3,4 ±0,3 ^a	2,8 ±0,0 ^a	2,0 ±0,6 ^a	5,4 ±0,8 ^{ab}
Hrad (SA, TA, od)	19,8 ±1,4 ^{ab}	4,1 ±0,4 ^a	2,5 ±0,5 ^a	2,5 ±1,1 ^a	4,3 ±1,8 ^{ab}

Hcamp: *H. campestris*, H. com: *H. comaroides*, Hmer: *H. meridionalis*, Hrad: *H. radicans*; Bur: Buriti (MT), Pir: Pirassununga (SP), RC: Rio da Casca (MT), Cur: Curitiba (PR), BN: Balsa Nova (PR), Jag: Jaguariaíva (PR), CGS: Campina Grande do Sul (PR), MC: Mogi das Cruzes (SP), SA: Santo André (SP), Av: Avaré (SP), MG: Mogi Guaçu (SP); C: cerrado, TA: Tropical Atlântico; ce: cerradão, ms: mata seca, camp/at: campo com ação antrópica, om/at: floresta ombrófila mista com ação antrópica, sav: savana, es: floresta estacional semidecidual, om: floresta ombrófila mista, od: floresta ombrófila densa; EB: extrato bruto, FH: fase hexano, FD: fase diclorometano, FAE: fase acetato de etila, FHA: fase hidroalcoólica. Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes para cada espécie e extrato ou fase (média n = 5; p<0,05).

Os resultados das análises por CLAE-DAD e CLAE-EM-EM encontram-se na Tabela 1.2, que nos mostra o perfil de constituintes fenólicos em *Hyptis* seção *Peltodon*. Como esse trabalho teve como um dos objetivos realizar um *screening fitoquímico* devido à escassez de estudos com tais espécies, tentamos fazer com que a integração englobasse a maioria das substâncias detectadas. Todos os resultados bem como suas interpretações, foram obtidos graças às condições do método, integrações e dos comprimentos de onda analisados, ou seja, existem fatores limitantes que não nos possibilitou a elucidação de 100% das substâncias presentes nas amostras. Vale ressaltar que os

resultados apresentados na Tabela 1.2 referem-se apenas aos extratos brutos pois, como mencionado acima, a maioria das substâncias presentes nos extratos também estão presentes nas fases.

Os estudos dos flavonoides por espectroscopia revelam que a maioria dos flavonóis e flavonas exibe duas bandas principais de absorção: Banda I (300 – 550 nm) que representa a absorção do anel B e Banda II (240-285 nm) que corresponde à absorção do anel A, sendo que pode ocorrer variações no padrão de absorção dependendo dos grupos funcionais ligados ao esqueleto de um determinado flavonoide (Markham, 1982).

Tabela 1.2 – Constituintes fenólicos majoritários do extrato bruto hidroalcoólico de *Hyptis* spp. analisados por CLAE-DAD e CLAE-EM-EM.

Tr (min)	Uv-visível	[M-H]- (m/z)	MS2- (m/z)	Sugestão	
1	6,5 ±0,0	320, 308 (om)	178,96	135,01	Ácido caféico ^{a,b,c}
2	9,3 ±0,1	336, 270	593,14	575,66; 474,59; 385,42; 355,61; 504,32	Vicenina-2 ^c
3	9,5 ±0,0	334, 270			Derivado de apigenina ^b
4	10,2 ±0,0	324 (om), 304, 294 (om), 250			ni
5	10,3 ±0,0	338, 270	563,18	545,95; 504,29; 474,60; 444,87; 385,39; 355,67	Isoescaftosídeo ^c
6	10,9 ±0,1	338, 270	563,13	504,31; 474,57; 444,84; 385,39; 355,63	Escaftosídeo ^c
7	11,5 ±0,1	336, 308 (om), 272	563,17	504,34; 474,57; 444,84; 385,38; 355,67	Vicenina-1 ^c
8	11,9 ±0,0	336, 270	563,19	504,33; 474,61; 444,83; 385,40; 355,66	Vicenina-3 ^c
9	13,4 ±0,0	336, 308 (om), 272	431,07	343,69; 313,56; 285,22	Vitexina ^{a,b,c}
10	13,6 ±0,0	336, 270	431,09	343,71; 313,60	Isovitexina ^c
11	13,8 ±0,0	344, 272, 260 (om)	477,08	478,50; 317,61	Cirsimarina ^c
12	14,5 ±0,2	352, 310 (om), 264 (om), 256	462,68	301,34	Quercetina hexosídeo ^{b,c}
13	14,6 ±0,3	334, 280			Derivado flavonoidico ^b
14	15,2 ±0,2	348, 266 (om), 254			Derivado de luteolina ^b
15	16,8 ±0,6	354, 310 (om), 262 (om), 256			Derivado de quercetina ^b
16	19,9 ±0,2	326, 310 (om)	359,09	161,31; 179,61; 197,80	Ácido rosmarínico ^{a,b,c}
17	22,1 ±0,5	338, 286 (om), 268			Derivado de apigenina ^b
18	22,7 ±0,0	328 (om), 310, 294 (om), 254	537,16	494,41; 341,71; 297,33	Ácido litospérmico A ^{b,c,d}
19	26,1 ±0,0	332, 272			Derivado flavonoidico ^b
20	27,0 ±0,2	334, 310, 286, 254			ni
21	27,4 ±0,0	328 (om), 310, 294 (om), 254	717,19	358,09	Ácido litospérmico B ^{b,c}
22	27,4 ±0,0	336, 270			Derivado flavonoídico ^b
23	27,6 ±0,1	348, 282			Derivado flavonoídico ^b
24	27,6 ±0,1	338, 284 (om), 268, 254 (om)			Derivado de apigenina ^b
25	28,3 ±0,0	350 (om), 314, 304 (om), 266, 262 (om)			Derivado de campferol ^b
26	28,8 ±0,0	330, 284			Derivado flavonoidico ^b
27	28,9 ±0,0	356, 314 (om), 262 (om), 256			Quercetina ^{a,b}
28	29,0 ±0,0	332, 278			Derivado flavonoidico ^b
29	29,3 ±0,0	350, 300 (om), 262 (om), 256	462,68	301,34	Quercetina hexosídeo ^{b,c}
30	29,6 ±0,0	336, 282			Derivado flavonoídico ^b
31	29,6 ±0,1	324, 302 (om)			Cafeato de etila ^{b,d}
32	30,4 ±0,0	336, 284 (om), 268	431,16	287,22	Luteolina ramnosídeo ^{b,c}
33	30,5 ±0,0	324, 256			Derivado flavonoídico ^b
34	30,6 ±0,0	338, 300 (om), 266			Apigenina ^{a,b}
35	31,2 ±0,0	338, 316 (om), 250			Nepetoidina B ^{b,d}
36	31,6 ±0,1	324, 308 (om)			Derivado clorogênico ^b
37	32,5 ±0,0	342, 284			Derivado flavonoidico ^b
38	33,0 ±0,0	364, 314 (om), 264 (om), 256			Ramnetina ^{a,b}
39	33,3 ±0,0	344, 296 (om), 268 (om), 250			Derivado de luteolina ^b

Tabela 1.2 – continuação.

Tr (min)	Uv-visível	[M-H] ⁻ (<i>m/z</i>)	MS2- (<i>m/z</i>)	Sugestão
40	33,8 ±0,0	332, 286		Cirsimaritina ^{b,d}
41	33,8 ±0,0	346 (om), 324, 306 (om), 272		ni
42	33,9 ±0,0	326, 278		Derivado flavonoidico ^b
43	34,3 ±0,0	348, 292 (om), 272, 258 (om)		Derivado de luteolina ^b
44	34,4 ±0,0	332, 292 (om), 282		Derivado flavonoidico ^b
45	34,7 ±0,0	336, 302 (om), 266		Derivado de apigenina ^b
46	34,8 ±0,0	324, 278		Derivado flavonoidico ^b
47	35,2 ±0,0	346, 296 (om), 266 (om), 250		Derivado de luteolina ^b
48	35,4 ±0,0	332, 284		Derivado flavonoidico ^b
49	35,8 ±0,0	340, 276		Derivado flavonoidico ^b
50	37,0 ±0,0	342, 294 (om), 268 (om), 250		Derivado de luteolina ^b

Tr: tempo de retenção. ^a: sugestão de identificação pela comparação do tempo de retenção com o padrão injetado no mesmo método; ^b: sugestão de identificação pelo espectro Uv-visível comparado com o padrão injetado no mesmo método além de referências bibliográficas (Markham, 1982); ^c: sugestão de identificação pelo espectro de fragmentação de massas comparado aos das bases de dados *online*; ^d: identificação por ressonância magnética nuclear (resultados cedidos gentilmente pela Dra. Martha Dalila Sedano-Partida); ni: substâncias não identificadas.

A sugestão para a identificação das substâncias foi feita utilizando uma combinação de informações como espectro UV-visível, tempo de retenção, espectro de massas, além de resultados de ressonância magnética nuclear reportados anteriormente e cedidos gentilmente pela Dra. Martha Dalila Sedano-Partida (Sedano-Partida, 2018).

De acordo com os resultados da Tabela 1.2, foram integradas 50 substâncias majoritárias e podemos afirmar que no geral *Hyptis* seção *Peltodon* possui em sua maioria, flavonas derivadas de apigenina e luteolina, corroborando resultados já reportados anteriormente para diversos representantes de Lamiaceae (Grayer et al., 2001) (para espectros UV-visível e estruturas consultar o Anexo).

Os dois principais tipos de ésteres de ácido cafeico encontrados em Lamiaceae são o ácido rosmarínico e o feniletil cafeoilglicosídeo (Harley et al., 2004) sendo este segundo comum como o acteosídeo ou verbascosídeo. Entretanto esse segundo grupo de substâncias não foi reportado para Nepetoideae, mas sim para a maioria das outras subfamílias de Lamiaceae (Harley et al., 2004; Pedersen, 2000). Ambos funcionam como importantes marcadores quimiosistemáticos no nível de subfamília e sua ocorrência, assim como os iridoides e óleos voláteis parece estar diretamente associada ao tipo de pólen (Erdtman, 1945, Pedersen, 2000).

Um estudo muito relevante realizado por Pedersen (2000), teve como objetivo verificar se a ocorrência de fenólicos teria significância taxonômica em Lamiaceae. Foram utilizadas 365 espécies pertencentes a 110 gêneros em uma triagem por meio da técnica de espectroscopia de ressonância de *spin* eletrônico (ESR). A técnica é ideal para detectar e distinguir compostos como o ácido rosmarínico, o ácido clorogênico e os verbascosídeos, frequentemente relatados em

Lamiaceae. Com este estudo foi confirmada a presença do ácido rosmarínico em todas as espécies estudadas pertencentes à Nepetoideae, as quais, por sua vez, apresentam grãos de pólen hexacolpados. Por outro lado, os verbascosídeos foram observados nas espécies pertencentes à Lamioideae, as quais apresentam grãos de pólen tricolpados (Pedersen, 2000).

A presença do ácido rosmarínico (éster de ácido cafeico com ácido 3,4-hidroxifenilático) em Lamiaceae é restrita à Nepetoideae, visto que tal substância foi encontrada em grande porcentagem das espécies e gêneros desta subfamília (Petersen e Simmonds, 2003). O ácido rosmarínico, quando presente nas espécies de Nepetoideae, pode constituir mais de 3% de sua massa seca e é conhecido pelo seu alto potencial antioxidante (Harley et al., 2004). Entretanto, tal substância não pode ser considerada um marcador quimiotaxonômico para a subfamília, uma vez que é encontrada em outras 39 famílias de embriófitas, desde as mais basais como de antóceros e samambaias até mais derivadas de angiospermas como Boraginaceae (Petersen e Simmonds, 2003; Kim et al., 2015).

É muito comum encontrar estudos relatando a presença de derivados fenólicos em espécies de Lamiaceae, especialmente derivados de ácido cinâmico e clorogênico, mas também de outros ácidos fenólicos. Como exemplos, foi relatado que os flavonoides e os ácidos fenólicos em *Rosmarinus officinalis* L. são seus principais constituintes químicos; *Lavandula angustifolia* Mill. apresenta ácido cafeico e ácido rosmarínico; para *Stachys officinalis* (L.) Trevis. ex Briq. foram relatados ácido cafeico, ácidos rosmarínico e clorogênico; *Orthosiphon spicatus* Benth. apresenta ácidos rosmarínico e cafeico, além de ácidos glicólico e benzoico (Cunha et al., 2012). Em *Hyphenia salzmannii* (Benth.) Harley, alguns derivados fenólicos já relatados foram o ácido *p*-metoxicinâmico (Messana et al., 1990), alguns fenilpropanoides glicosilados, ácido clorogênico, ácido protocateico, hidroquinona e timohidroquinona (Pedersen, 2000). Em algumas poucas espécies de Nepetoideae, parece haver uma substituição do ácido rosmarínico por um outro éster de ácido cafeico: o ácido clorogênico (Harley et al., 2004).

O ácido litospermico A (substância **18**) foi isolado de *Lithospermum ruderale* Dougl. ex Lehm. (Boraginaceae) pela primeira vez em 1974 (Kelley et al., 1975). Sua estrutura é uma conjugação do ácido rosmarínico e um ácido cafeico, diferentemente do ácido litospermico B, onde encontramos um dímero de ácido rosmarínico (Petersen e Simmonds, 2003). O ácido litospermico A foi detectado em uma população de *H. campestris* e em todas as populações de *H. radicans*, entretanto o ácido litospermico B (substância **21**), também chamado de ácido salvianólico, foi detectado em algumas populações de *H. radicans* como as de Mogi Guaçu (SP, C, ms), Mogi das Cruzes (SP, TA, es) e Santo André (SP, TA, od). Tal substância juntamente com o ácido litospermico A, constituem uns dos numerosos derivados do ácido rosmarínico também descritos para Nepetoideae (Petersen e Simmonds, 2003; Kim et al., 2015;).

A Tabela 1.3 nos mostra o teor de constituintes fenólicos majoritários do extrato bruto hidroalcoólico de *Hyptis* spp, por espécie e local de coleta e também será utilizada para discussão nos próximos capítulos. Entre as espécies de *Hyptis* seção *Peltodon*, *H. campestris* foi a que apresentou maior número de constituintes fenólicos, sendo detectadas, em média, 25 substâncias em seu extrato bruto. Em *H. meridionalis* foram detectadas em média, 12 substâncias e em *H. comaroides* e *H. radicans* foram detectadas 15 substâncias (Tabela 1.3).

Além disso, o ácido cafeico (substância **1**) e o ácido rosmarínico (substância **16**), conforme esperado, foram encontrados em todas as espécies analisadas neste estudo sendo este último, encontrado em outras espécies de *Hyptis* reportadas anteriormente, como *H. atrorubens* (Abedini et al., 2013), *H. brevipes* e *H. lanceolata* (Pedersen, 2000); *H. capitata* (Almtorp et al., 1991); *H. lacustris*, *H. lappulacea* e *H. multibracteata* (dos Santos et al., 2018).

Em Lamiaceae, o tipo mais comum de flavonoides são as flavonas *O*-glicosiladas frequentemente hidroxiladas na posição 6. As flavonas glicosiladas e hidroxiladas na posição 8 ocorrem em casos mais raros sendo, inclusive, usadas como importantes marcadores taxonômicos para níveis infragenéricos, especialmente no nível de seção, como ocorre em *Sideritis* (Barberan, 1985; Gil et al., 1993; Harley et al., 2004; Fraga, 2012), *Teucrium* L. (Harborne et al., 1986; Harley et al., 2004) e *Lavandula* L. (Upson et al., 2000; Harley et al., 2004).

Em *Hyptis* seção *Peltodon*, principalmente em *H. campestris*, destacou-se a presença de flavonas *C*-glicosiladas como por exemplo as substâncias derivadas de apigenina **2**, **5**, **6**, **7**, **8**, **9**, **10**, **11** (Tabela 1.2) que equivalem respectivamente à vicenina-2 (apigenina-6,8-di-*C*-glucosídeo), isoescaftosídeo (apigenina-6-*C*-arabnosila-8-*C*-glucosídeo), escaftosídeo (apigenina-6-*C*-glucosil-8-*C*-arabnosídeo), vicenina-1 (apigenina-6-*C*-xilossil-8-*C*-glucosídeo), vicenina-3 (apigenina-6-*C*-glucosil-8-*C*-xilossilídeo), vitexina (apigenina-8-*C*-glucosídeo), isovitexina (apigenina-6-*C*-glucosídeo) e cirsimarina (cirsimaritina-4'-glucosídeo). Segundo o trabalho de revisão realizado por Sedano-Partida e colaboradores (2018) não há, até o momento, relatos da presença de tais substâncias em *Hyptis* spp.

Tabela 1.3 - Constituintes fenólicos (mg g⁻¹) majoritários do extrato bruto hidroalcoólico de *Hyptis* spp. analisados por CLAE-DAD (352 nm e 280 nm).

Substância**	Hcamp			Hcom		Hmer			Hrad				
	Bur (C, ce)	Pir (C, ms)	RC (C, ce)	Cur (TA, cam/at)		BN (TA, om/at)	Jag (C, sav)		Av (ZT, es)	MG (C, ms)	CGS (TA, om)	MC (TA, es)	SA (TA, od)
1	0,4 ±0,0	0,8 ±0,1	0,6 ±0,1	1,8 ±0,1		1,3 ±0,2	1,4 ±0,2		2,3 ±0,5	2,1 ±0,4	3,1 ±0,5	3,9 ±0,2	3,1 ±0,6
2	1,8 ±0,4	0,4 ±0,1	2,1 ±0,7			*	0,4 ±0,2		0,5 ±0,1	0,4 ±0,1	0,5 ±0,1	0,4 ±0,1	0,6 ±0,1
3						0,3 ±0,0	1,0 ±0,5						
4									0,9 ±0,2	1,3 ±0,3	1,2 ±0,1	1,4 ±0,3	1,8 ±0,3
5	1,7 ±0,2	0,4 ±0,1	*	*					*	*	*	*	*
6	7,7 ±1,5	4,3 ±0,4	9,4 ±3,0	2,1 ±0,6					1,0 ±0,3	0,9 ±0,1	1,0 ±0,1	0,8 ±0,2	1,5 ±0,2
7	0,5 ±0,1	0,3 ±0,0	0,5 ±0,1						*	*	*	*	*
8	0,5 ±0,1	0,3 ±0,0	0,6 ±0,2						*	*	*	*	0,4 ±0,0
9	3,2 ±1,2	*	3,1 ±1,4						*				*
10	2,8 ±1,3	*	2,8 ±1,4	*		*	*						
11				4,4 ±0,7		9,4 ±2,2	1,0 ±0,3						
12	0,9 ±0,3	0,7 ±0,1	1,8 ±1,1	2,1 ±0,6		*	*		0,7 ±0,3				*
13							1,2 ±0,2						
14													1,3 ±0,7
15			0,8 ±0,1										
16	1,3 ±0,2	4,9 ±1,3	2,2 ±0,8	20,0 ±4,0		12,7 ±1,3	11,2 ±3,0		3,2 ±1,3	8,0 ±1,9	6,9 ±2,7	16,1 ±3,0	12,2 ±1,0
17	1,0 ±0,1		1,0 ±0,1							*	2,0 ±0,4	*	*
18			2,0 ±0,3						1,4 ±0,4	7,7 ±2,4	5,4 ±0,9	6,6 ±1,3	8,4 ±1,7
19						0,4 ±0,1	0,6 ±0,1		0,3 ±0,2				
20	4,7 ±2,4	2,1 ±0,4	3,9 ±0,6	2,1 ±0,9		2,4 ±0,4	0,9 ±0,5						
21										0,7 ±0,3		0,6 ±0,1	0,6 ±0,1
22									*	0,4 ±0,2	1,4 ±0,3		
23				4,5 ±1,7		5,0 ±1,4	1,5 ±0,3						
24	1,8 ±0,9	*	1,1 ±0,2	*									
25	1,4 ±0,7	2,4 ±0,9	1,5 ±1,1	2,1 ±0,6		5,4 ±0,2	1,4 ±0,5				0,3 ±0,1	0,3 ±0,2	*
26							2,6 ±1,0		*		1,2 ±0,4	2,2 ±1,1	
27	3,1 ±0,8		2,2 ±1,1	0,7 ±0,2		*	*		*		*	*	*
28									2,5 ±0,7	1,0 ±0,3			3,1 ±2,2
29				1,2 ±0,5		*	*						
30				*		3,2 ±1,0	3,8 ±1,9						
31									4,0 ±0,6	1,5 ±0,8	3,2 ±0,8	4,9 ±1,3	3,4 ±0,8

Tabela 1.3 – continuação.

Substância**	Hcamp			Hcom		Hmer			Hrad				
	Bur (C, ce)	Pir (C, ms)	RC (C, ce)	Cur (TA, cam/at)		BN (TA, om/at)	Jag (C, sav)		Av (ZT, es)	MG (C, ms)	CGS (TA, om)	MC (TA, es)	SA (TA, od)
32	1,9 ±1,4		1,8 ±1,3	1,5 ±0,8					3,5 ±0,7		0,7 ±0,4	1,2 ±0,5	2,2 ±0,9
33										1,0 ±0,3	1,3 ±0,6		
34	0,6 ±0,2	*	0,8 ±0,0						*	0,6 ±0,3	1,8 ±0,4	*	*
35		0,1 ±0,0	1,0 ±0,7	1,0 ±0,2		1,7 ±2,3	1,0 ±0,7		5,3 ±1,2	2,8 ±1,0	1,3 ±0,8	3,5 ±0,2	4,0 ±1,1
36											1,5 ±0,8	1,7 ±0,9	1,9 ±0,7
37	0,3 ±0,1	0,3 ±0,1	0,6 ±0,3										
38				0,3 ±0,0									
39	0,3 ±0,1												
40				0,5 ±0,3					*	1,0 ±0,5	0,5 ±0,1	0,6 ±0,2	0,7 ±0,1
41	1,6 ±0,3	1,3 ±0,4	1,2 ±0,3										
42									0,5 ±0,2	*	*	*	*
43	0,3 ±0,1	*	*										
44						*	0,5 ±0,0						
45	0,7 ±0,3	0,5 ±0,2	0,8 ±0,1	0,4 ±0,3		0,5 ±0,1							
46									0,8 ±0,2	*	*	*	*
47	2,0 ±0,5	3,3 ±1,0	2,6 ±1,2										
48									*	0,4 ±0,2		*	*
49	0,9 ±0,2	0,2 ±0,1	0,6 ±0,2										
50	6,1 ±0,8	2,1 ±0,8	4,2 ±0,8										

Hcamp: *H. campestris*, Hcom: *H. comaroides*, Hmer: *H. meridionalis*, Hrad: *H. radicans*; Localidades: Bur: Buriti (MT), Pir: Pirassununga (SP), RC: Rio da Casca (MT), Cur: Curitiba (PR), BN: Balsa Nova (PR), Jag: Jaguariaíva (PR), CGS: Campina Grande do Sul (PR), MC: Mogi das Cruzes (SP), SA: Santo André (SP), Av: Avaré (SP), MG: Mogi Guaçu (SP); C: cerrado, TA: Tropical Atlântico; ce: cerradão, ms: mata seca, camp/at: campo com ação antrópica, om/at: floresta ombrófila mista com ação antrópica, sav: savana, es: floresta estacional semidecidual, om: floresta ombrófila mista, od: floresta ombrófila densa. Média ±desvio padrão. *:Substâncias não detectadas no extrato bruto, mas presentes em outras fases. **: Para sugestão de substância ou classe ver Tabela 1.2.

Entretanto, em Lamiaceae, já foi reportada a presença das substâncias aqui encontradas como a vicenina-2 em *Teucrium* spp. (Harborne et al., 1986; Tomás-Barberán et al., 1988), *Ocimum gratissimum* L. (Casanova et al., 2014), *Lavandula dentata* L. (Upson et al., 2000), *Mentha pulegium* L. (Zekri et al., 2013). Husain e Markham (1981) referem-se à vicenina-2 como uma glicoflavona. Foram eles que encontraram tal substância pela primeira vez em Lamiaceae ao estudar os gêneros *Origanum* L., *Thymus* L. e *Hyssopus* L., entretanto, verificaram que essa substância era restrita à apenas algumas seções do gênero *Origanum* L. como a seção *Majorana* (Miller) T. Vogel; e de *Thymus* L. como as seções *Pseudothymbra* Benth., *Vulgares* Velen. e *Zygis* Willk. Em *Hyssopus* L. a vicenina-2 foi reportada nas três espécies do gênero.

Em *Leucocyclus* Boiss. (Asteraceae), substâncias como a isovitexina e uma série de derivados de iso-orientina, foram relatadas juntamente com di-C-glicosil-apigeninas com a vicenina-3, escaftosídeo, isoescaftosídeo e di-C-glicosil-luteolinas nas folhas (Valant-Vetschera, 1985). Em *Hyptis* seção *Peltodon*, além das di-C-glicosil-apigeninas citadas também foi detectada a isovitexina (substância **10**) e derivados de luteolina (substâncias **14**, **32**, **39**, **43**, **47** e **50**), sendo que estes últimos não foram observados em *H. meridionalis*.

Outros derivados glicosilados de apigenina como a vicenina-1 já foram reportados em Lamiaceae como por exemplo em *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. (Sulaiman et al., 2018) entretanto, não foram encontrados relatos da presença de vicenina-3.

O escaftosídeo e seu isômero também já foram reportados anteriormente em algumas espécies de Lamiaceae como por exemplo em *Isodon lophanthoides* var. *gerardianus* (Benth.) H. Hara (Feng et al., 2016) e *Vitex polygama* L. (Gallo et al., 2008). Entretanto, pelo retorno de manuscritos após buscas em ferramentas de pesquisas de artigos acadêmicos, sua distribuição parece ser um pouco mais restrita em Lamiaceae quando comparada à vicenina-2, por exemplo.

Hossain e colaboradores (2010) descreveram a composição fenólica de cinco espécies de Lamiaceae utilizadas como especiarias: alecrim, orégano, sálvia, manjerição e tomilho. No referido estudo, a classe dos flavonoides foi a mais representativa, sendo identificada a apigenina, luteolina e seus derivados glicosilados, além da galocatequina, floridzina, quercetina e rutina (Hossain et al., 2010).

Tomás-Barberán e colaboradores (1988) já haviam reportado em Lamiaceae, mais especificamente na subfamília Nepetoideae, a presença de flavonas glicosiladas derivadas de apigenina e a luteolina, além do crisoeriol. De acordo com o estudo, em Nepetoideae não foi reportada a presença de 8-hidroxi-flavonas, corroborando, portanto, os dados aqui obtidos.

Os flavonoides agliconas e muitas vezes altamente metoxilados que ocorrem em Lamiaceae (Grayer et al., 2001), geralmente estão associados a espécies produtoras de óleos voláteis e/ou diterpenos na superfície da planta e, devido a esse fato, são também chamados de flavonoides “de

superfície” (Harley et al., 2004). Típica de Lamiaceae, a flavona cirsimaritina ou 5,4'-dihidroxi-6,7-dimetoxiflavona é um exemplo de flavonoide frequentemente referido como “de superfície” por conta do padrão de substituição 5-hidroxi-6,7-dimetoxi do anel A. Foi isolada de *Centaurea scoparia* Sieb. (Asteraceae) pela primeira vez em 1995 (Youssef e Frahm, 1995; Harley et al., 2004), mas também reportada em *Teucrium* spp. (Harborne et al., 1986) e agora em *Hyptis*.

Além do flavonoide cirsimaritina (substância **40**) encontrado em *H. radicans* e *H. comaroides*, nesta última espécie também foi detectada a cirsimarina ou cirsimaritina-4'-O-glucosídeo (substância **11**), também reportada em *Teucrium arduini* L. (Lamiaceae) (Harborne et al., 1986).

Algumas substâncias aqui descritas como o ácido litospérmico A (substância **18**), o cafeato de etila (substância **31**) e a nepetoidina B (substância **35**) já haviam sido reportadas para *H. radicans*, após a elucidação de suas estruturas por ressonância magnética nuclear por nosso grupo de pesquisa (Sedano-Partida, 2018).

Assim como a cirsimaritina, os ésteres de ácido cafeico: nepetoidina A e nepetoidina B são frequentes em Lamiaceae, sendo ambos característicos das espécies pertencentes a subfamília Nepetoideae. Sua presença foi reportada em outras espécies de *Hyptis* como *H. lanceolata* (Pedersen, 2000), *H. ramosa* (Grayer et al., 2003), *H. rhomboidea* (Tsai e Lee, 2014), *H. lacustris* (Sala-Carvalho, 2017) e *H. multibracteata* (Sedano-Partida, 2018). A distribuição desses fenólicos é de grande importância taxonômica, uma vez que outras subfamílias de Lamiaceae não possuem essas substâncias em sua composição. Devido a isso, acredita-se que as nepetoidinas possam constituir um marcador taxonômico para a subfamília Nepetoideae (Grayer et al., 2003).

Os padrões de hidroxilação e metilação dos flavonoides de superfície servem, muitas vezes, como característica para o nível hierárquico de tribo. Um exemplo disso é um padrão de substituição 5,7-dihidroxi-6,8-dimetoxi (como encontrado na nevadensina) que é característico da tribo Ocimeae, subtribo Ociminae (Grayer et al., 2001; Harley et al., 2004). O gênero *Scutellaria* produz um grande número de flavonoides de superfície que são característicos e restritos a este gênero e apresentam, na maioria os casos, um anel B não substituído ou uma oxigenação em 2' (Harley et al., 2004).

Comparando com os dados obtidos neste trabalho, os poucos estudos de substâncias não-voláteis de *Hyptis* relatam a presença de derivados metoxilados de apigenina em *H. capitata* (Almtorp et al., 1991) e *H. rhomboidea* (Tsai e Lee, 2014), entretanto, não há relatos da presença de luteolina (Sedano-Partida et al., 2018).

Para facilitar a comparação das espécies analisadas, reunimos os 50 constituintes detectados via CLAE-DAD nas seguintes classes fenólicas: derivados flavonoídicos, derivados cinâmicos e derivados clorogênicos. Por se tratar de substâncias características da família e subfamília, o ácido

rosmarínico e a nepetoidina B constituíram dois outros grupos representativos das quantidades de substâncias fenólicas no extrato bruto (Tabela 1.4).

H. campestris apresentou maior diversidade de substâncias em seu extrato bruto, sendo os derivados flavonoídicos os componentes majoritários. *H. comaroides*, apesar de não apresentar elevada diversidade de constituintes em seu extrato bruto, foi a espécie que apresentou o maior teor de ácido rosmarínico, mas também o segundo maior teor de derivados flavonoídicos. *H. radicans* foi a espécie que apresentou menor teor de derivados flavonoídicos, mas em contrapartida, apresentou alto teor de derivados clorogênicos e nepetoidina B. Quanto ao ácido rosmarínico, *H. comaroides* e *H. meridionalis* foram as duas espécies com os maiores teores desse constituinte. Apesar desses resultados mostrarem uma variação entre as classes de constituintes fenólicos entre as espécies, o teor de substâncias fenólicas total não variou significativamente entre elas (Tabela 1.4).

Tabela 1.4 - Teor de substâncias fenólicas agrupadas por classes de constituintes no extrato bruto de *Hyptis* seção *Peltodon* analisados por CLAE-DAD e expressos em mg g⁻¹.

Classe de substâncias	EB			
	Hcamp	Hcom	Hmer	Hrad
Derivados flavonoídicos	29,5 ±13,4 ^a	16,9 ±9,0 ^{ab}	15,4 ±7,1 ^b	7,1 ±3,9 ^c
Ácido rosmarínico	2,8 ±1,8 ^c	20,0 ±4,0 ^a	12,8 ±1,6 ^{ab}	8,9 ±5,1 ^b
Derivados clorogênicos	1,1 ±1,0 ^b	1,8 ±0,1 ^b	1,3 ±0,2 ^b	11,8 ±3,2 ^a
Derivados cinâmicos	-	-	-	-
Nepetoidina B	0,1 ±0,0 ^b	1,0 ±0,2 ^{ab}	0,9 ±0,5 ^{bc}	3,4 ±1,6 ^a
ni	4,6 ±1,4 ^a	2,1 ±0,9 ^b	1,6 ±0,9 ^b	1,3 ±0,4 ^b
Total de constituintes fenólicos	37,9 ±14,8 ^a	40,6 ±14,7 ^a	29,5 ±8,4 ^a	30,4 ±8,5 ^a

Hcamp: *H. campestris*, H. com: *H. comaroides*, Hmer: *H. meridionalis*, Hrad: *H. radicans*. EB: extrato bruto, FH: fase hexânica, FD: fase de diclorometano, FAE: fase acetato de etila, FHA: fase hidroalcoólica. Derivados flavonoídicos: valores expressos em miligramas de substâncias equivalentes a luteolina por grama de extrato (mg EL g⁻¹). ácido rosmarínico, derivados clorogênicos e derivados cinâmicos: valores expressos em miligramas de substâncias equivalentes à ácido *p*-cumárico por grama de extrato (mg Ep g⁻¹). Análises estatísticas realizadas entre espécies (intraespecífica) e por extrato ou fase sendo que médias com letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,05).

Discutindo um pouco mais especificamente sobre a fitoquímica de *Hyptis* seção *Peltodon*, foram pesquisados artigos dos últimos dez anos. Além disso, buscamos informações pelos respectivos sinônimos mais recentes de cada espécie, ou seja: *Peltodon radicans*, *P. tomentosus*, *P. rugosus* e *P. longipes*; que equivalem respectivamente a *H. radicans*, *H. campestris*, *H. meridionalis* e *H. comaroides*.

Os poucos trabalhos encontrados com *H. radicans*, também conhecida popularmente como paracari, hortelã-do-mato, hortelã-brava, mentrasto, meladinha, rabugem-de-cachorro, são estudos

etnofarmacológicos, como o realizado recentemente por Ricardo e colaboradores (2017) que relata o uso popular de tal espécie para tratamento de asma e picada de cobra, sendo inclusive citada por Von Martius em “*Materiae Medicae*” e na 1ª Edição da Farmacopéia Oficial Brasileira (Brandão et al., 2009).

Em outro trabalho de revisão etnofarmacológica realizado por Scio e colaboradores (2012), *H. radicans* tem reportado o uso de suas partes aéreas para diversas finalidades na medicina popular como: expectorante, coqueluche, asma, espirros, carminativo, inflamações dos rins e do fígado (Rodrigues e Carvalho, 2001), dermatites, picadas de escorpiões e cobras (da Costa et al., 2008), antiespasmódico, sifilítico, anti-inflamatório em formulações (Medeiros et al., 2007), parasitose e diurético. Suas ações medicinais foram associadas à presença de triterpenos e flavonoides (Scio et al., 2012).

Nessas pesquisas bibliográficas, mais uma vez verificamos a importância do presente estudo, pois, apesar de dentro da seção *Peltodon* termos espécies facilmente encontradas pelo Brasil, como é o caso de *H. radicans*, os trabalhos são extremamente escassos, principalmente no que diz respeito ao perfil químico. O mesmo ocorre para *H. campestris*, que não possui relatos fitoquímicos na literatura. Entretanto, seu uso na medicina popular é documentado como antitússico, nas gripes e resfriados e como vermífugo (Rodrigues e Carvalho, 2001). Para *H. meridionalis* e *H. comaroides*, também não foram encontrados trabalhos fitoquímicos e etnofarmacológicos. Para essa última espécie, apesar de não ser citada em estudos etnofarmacológicos, possui alguns estudos fitoquímicos, onde foi relatada a presença de diterpenos abietanos (Fronza et al., 2011; Agostini-Costa et al., 2012) além de ácido gálico, ácidos clorogênico, cafeico, elágico e rosmarínico, quercetina e campferol (Kuhn et al., 2015).

Parte dos resultados desta tese foi recentemente combinada a de outras espécies de *Hyptis* analisadas pelo grupo de pesquisa, sendo este, o trabalho mais recente sobre o gênero. Nele foi discutida a presença de diversas substâncias fenólicas como ácidos fenólicos, flavonoides, derivados do ácido clorogênico e derivados do ácido cinâmico (dos Santos et al., 2018), também discutidas neste capítulo.

Para a análise quantitativa dos diferentes constituintes presentes nas fases de *Hyptis* seção *Peltodon* (Tabela 1.5), os resultados foram obtidos pela comparação das populações para uma mesma espécie. Para a separação dos constituintes do extrato bruto hidroalcoólico foram selecionados quatro solventes: hexano, de baixa polaridade; diclorometano, de média para baixa polaridade; acetato de etila, de média para alta polaridade (Collins et al., 2006). Conforme apresentado na Tabela 1.5, a fase hexânica, em função da menor polaridade do solvente utilizado, apresentou o menor teor de derivados flavonoídicos, para todas as espécies se comparada com as demais fases. Esse resultado era esperado, uma vez que partimos de um extrato hidroalcoólico

(polar) para iniciar a partição. Sabe-se que substâncias polares são solúveis em solventes polares e vice-versa (Collins et al., 2006). Esse resultado indica que a maceração em etanol 70% foi eficiente na extração de substâncias de caráter mais polar. Resultado similar se observa na fase diclorometano que foi importante para a separação de substâncias do extrato bruto com caráter um pouco mais polar em comparação com as particionadas utilizando hexano.

As fases diclorometano e acetato de etila foram as que apresentaram maiores teores de substâncias fenólicas totais, assim como de cada classe fenólica, quando comparadas as fases hexano e hidroalcoólica. Isso indica que as substâncias presentes no extrato bruto possuem caráter de polaridade intermediária. A partição utilizando hexano útil para retirar do extrato bruto as substâncias mais apolares, como clorofilas por exemplo, proporcionando uma limpeza do extrato bruto e concentrando as substâncias de interesse em outras fases.

1.3.2. A fitofisionomia influencia o perfil químico dos extratos de *Hyptis* seção *Peltodon*?

Até o momento, a intenção foi caracterizar e discutir o perfil químico das espécies de *Hyptis* seção *Peltodon* independente da região onde foram coletadas. Neste subitem discutiremos a possível influência dos fatores meteorológicos (como temperatura e índice de precipitação) nos teores de constituintes fenólicos dos extratos brutos das espécies coletadas em ambos os domínios fitogeográficos propostos. Para isso, utilizamos os resultados da composição dos extratos brutos, pois, novamente, além de englobar a maior parte das substâncias que estão presentes nas fases, a composição destas últimas, conforme observado, é resultado do método de partição e não do ambiente.

H. campestris foi coletada em três locais diferentes e, portanto, os resultados apresentados refletem as diferenças entre as populações sob um mesmo domínio fitogeográfico. As espécies *H. meridionalis* e *H. radicans* são as de ocorrência em ambos os domínios, e, dessa forma, foram as utilizadas para as discussões sobre a influência do domínio fitogeográfico no perfil químico das espécies. Para facilitar a discussão dos resultados, apresentamos a Tabela 1.6 onde os dados meteorológicos de cada local de coleta estão reunidos aos teores de cada classe de substâncias fenólicas detectadas nos extratos brutos de *Hyptis* seção *Peltodon*.

Tabela 1.5 – Teor de substâncias fenólicas (mg g⁻¹) agrupadas por classes de constituintes no extrato bruto hidroalcoólico e fases de *Hyptis* seção *Peltodon* analisados por CLAE-DAD.

Classe de substâncias	EB												
	Hcamp			Hcom			Hmer			Hrad			
	Bur (C, ce)	Pir (C, ms)	RC (C, ce)	Cur (TA, cam/at)	BN (TA, om/at)	Jag (C, sav)	Av (ZT, es)	MG (C, ms)	CGS (TA, om)	MC (TA, es)	SA (TA, od)		
Derivados flavonoídicos	37,8 ±8,8 ^a	14,5 ±3,6 ^b	35,9 ±10,9 ^a	16,9 ±9,0	21,7 ±4,0 ^a	10,2 ±4,1 ^b	9,0 ±2,3 ^a	4,1 ±1,6 ^b	10,3 ±2,5 ^a	4,4 ±1,3 ^b	7,1 ±2,4 ^{ab}		
Ácido rosmarínico	1,3 ±0,2 ^b	4,3 ±0,4 ^a	2,2 ±0,8 ^b	20,0 ±4,0	12,2 ±0,3 ^a	11,2 ±3,0 ^a	3,2 ±1,3 ^c	8,0 ±1,9 ^b	6,9 ±2,7 ^{bc}	15,0 ±2,2 ^a	12,2 ±1,0 ^a		
Derivados clorogênicos	0,4 ±0,0 ^c	0,8 ±0,1 ^b	2,5 ±0,3 ^a	1,8 ±0,1	1,3 ±0,1 ^a	1,4 ±0,2 ^a	7,4 ±1,4 ^b	12,3 ±3,1 ^{ab}	12,6 ±2,9 ^a	13,6 ±2,5 ^{ab}	15,5 ±1,9 ^a		
Derivados cinâmicos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Nepetoidina B	-	0,1 ±0,0 ^a	1,0 ±0,7 ^a	1,0 ±0,2	0,7 ±0,3 ^a	1,0 ±0,6 ^a	5,3 ±1,2 ^a	2,8 ±1,0 ^{bc}	1,3 ±0,8 ^c	3,5 ±0,2 ^{ab}	4,0 ±1,1 ^{ab}		
ni	6,2 ±2,5 ^a	3,4 ±0,6 ^b	5,1 ±0,9 ^{ab}	2,1 ±0,9	2,6 ±0,3 ^a	0,7 ±0,1 ^b	0,9 ±0,2 ^b	1,3 ±0,3 ^{ab}	1,2 ±0,1 ^{ab}	1,2 ±0,5 ^{ab}	1,8 ±0,3 ^a		
Total de constituintes fenólicos	45,5 ±11,2 ^a	22,2 ±5,1 ^b	46,1 ±12,5 ^a	40,6 ±14,7	38,7 ±4,0 ^a	24,6 ±4,9 ^b	25,8 ±2,5 ^b	26,4 ±5,4 ^b	31,9 ±8,3 ^{ab}	33,3 ±5,3 ^{ab}	40,5 ±4,1 ^a		
Classe de substâncias	FH												
	Hcamp			Hcom			Hmer			Hrad			
	Bur (C, ce)	Pir (C, ms)	RC (C, ce)	Cur (TA, cam/at)	BN (TA, om/at)	Jag (C, sav)	Av (ZT, es)	MG (C, ms)	CGS (TA, om)	MC (TA, es)	SA (TA, od)		
Derivados flavonoídicos	2,1 ±0,1 ^a	2,1 ±0,3 ^a	1,7 ±0,3 ^a	-	-	-	0,5 ±0,1 ^a	0,3 ±0,0 ^a	0,5 ±0,1 ^a	0,3 ±0,1 ^a	0,2 ±0,0 ^a		
Ácido rosmarínico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Derivados clorogênicos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Derivados cinâmicos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Nepetoidina B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
ni	-	0,2 ±0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Total de constituintes fenólicos	2,1 ±0,1 ^{ab}	2,3 ±0,3 ^a	1,8 ±0,2 ^b	-	-	-	0,5 ±0,1 ^a	0,3 ±0,0 ^a	0,5 ±0,1 ^a	0,3 ±0,1 ^a	0,2 ±0,0 ^a		
Classe de substâncias	FD												
	Hcamp			Hcom			Hmer			Hrad			
	Bur (C, ce)	Pir (C, ms)	RC (C, ce)	Cur (TA, cam/at)	BN (TA, om/at)	Jag (C, sav)	Av (ZT, es)	MG (C, ms)	CGS (TA, om)	MC (TA, es)	SA (TA, od)		
Derivados flavonoídicos	34,4 ±12,6 ^b	22,1 ±0,9 ^b	68,8 ±26,4 ^a	30,2 ±22,7	23,3 ±1,3 ^a	7,9 ±1,7 ^b	18,0 ±6,4 ^a	8,5 ±4,3 ^a	16,5 ±3,6 ^a	12,0 ±5,4 ^a	16,4 ±7,2 ^a		
Ácido rosmarínico	-	-	-	4,6 ±2,4	-	-	-	3,1 ±1,1 ^b	3,2 ±1,1 ^b	-	9,3 ±3,5 ^a		
Derivados clorogênicos	-	1,2 ±0,1	-	3,3 ±0,9	2,3 ±0,5 ^a	2,3 ±0,6 ^a	6,3 ±1,7 ^b	3,4 ±0,9 ^c	8,6 ±1,1 ^a	7,5 ±0,9 ^{ab}	9,4 ±1,2 ^a		
Derivados cinâmicos	-	-	-	2,6 ±0,7	1,7 ±0,3 ^a	2,0 ±0,4 ^a	2,3 ±1,0 ^a	2,7 ±0,7 ^a	3,6 ±0,8 ^a	4,6 ±1,7 ^a	2,5 ±0,9 ^a		
Nepetoidina B	-	-	-	-	-	-	1,0 ±0,5 ^a	-	0,8 ±0,4 ^a	1,0 ±0,6 ^a	-		
ni	3,3 ±1,7 ^a	4,7 ±1,0 ^a	4,6 ±2,1 ^a	-	-	-	-	-	0,6 ±0,2 ^a	-	0,4 ±0,2 ^a		
Total de constituintes fenólicos	37,7 ±12,8 ^{ab}	18,7 ±12,1 ^b	73,3 ±27,7 ^a	38,9 ±22,2	20,5 ±11,4 ^a	12,3 ±1,2 ^a	27,6 ±7,7 ^{ab}	16,5 ±4,6 ^b	31,4 ±4,3 ^a	23,7 ±7,6 ^{ab}	30,7 ±3,0 ^a		

Tabela 1.5 – continuação.

Classe de substâncias	FAE												
	Hcamp			Hcom		Hmer			Hrad				
	Bur (C, ce)	Pir (C, ms)	RC (C, ce)	Cur (TA, cam/at)	BN (TA, om/at)	Jag (C, sav)	Av (ZT, es)	MG (C, ms)	CGS (TA, om)	MC (TA, es)	SA (TA, od)		
Derivados flavonoídicos	95,9 ±16,6 ^a	35,0 ±7,0 ^b	53,9 ±18,8 ^b	45,1 ±7,0	28,2 ±4,6 ^a	13,7 ±2,5 ^b	7,5 ±3,3 ^{ab}	5,1 ±1,4 ^{bc}	14,1 ±6,1 ^a	3,4 ±0,6 ^c	8,8 ±2,3 ^{ab}		
Ácido rosmarínico	7,3 ±0,9 ^{ab}	18,3 ±10,0 ^a	5,0 ±1,8 ^b	57,9 ±14,5	47,8 ±9,2 ^a	63,3 ±19,7 ^a	8,9 ±4,7 ^a	23,6 ±9,3 ^a	18,9 ±7,1 ^a	24,6 ±6,6 ^a	27,2 ±9,8 ^a		
Derivados clorogênicos	1,5 ±0,5 ^a	2,5 ±1,0 ^a	-	6,6 ±1,7	4,4 ±0,5 ^b	6,9 ±1,4 ^a	3,0 ±1,4 ^b	12,0 ±2,3 ^a	6,8 ±3,0 ^b	4,4 ±0,9 ^b	15,8 ±2,7 ^a		
Derivados cinâmicos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Nepetoidina B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
ni	5,6 ±3,7 ^a	1,8 ±1,2 ^a	5,6 ±1,2 ^a	-	3,7 ±2,8 ^a	0,6 ±0,2 ^b	0,6 ±0,2 ^b	1,3 ±0,3 ^{ab}	2,7 ±2,0 ^a	0,7 ±0,2 ^b	1,7 ±0,3 ^{ab}		
Total de constituintes fenólicos	109,5 ±18,0 ^a	57,6 ±15,7 ^b	64,5 ±19,8 ^b	109,6 ±19,3	83,2 ±9,0 ^a	84,2 ±19,1 ^a	17,8 ±9,9 ^b	29,1 ±17,3 ^{ab}	41,4 ±14,5 ^{ab}	25,9 ±13,7 ^{ab}	53,5 ±10,0 ^a		
Classe de substâncias	FHA												
	Hcamp			Hcom		Hmer			Hrad				
	Bur (C, ce)	Pir (C, ms)	RC (C, ce)	Cur (TA, cam/at)	BN (TA, om/at)	Jag (C, sav)	Av (ZT, es)	MG (C, ms)	CGS (TA, om)	MC (TA, es)	SA (TA, od)		
Derivados flavonoídicos	8,8 ±1,8 ^a	3,0 ±1,3 ^b	5,1 ±2,3 ^b	5,9 ±1,8	3,6 ±0,6 ^a	1,1 ±0,4 ^b	0,5 ±0,3 ^{ab}	-	0,5 ±0,2 ^{ab}	0,3 ±0,1 ^b	1,0 ±0,0 ^a		
Ácido rosmarínico	-	-	-	7,1 ±1,6	-	-	-	-	-	3,7 ±0,4 ^a	4,0 ±1,2 ^a		
Derivados clorogênicos	-	-	-	-	-	-	-	6,8 ±3,2 ^{ab}	-	5,0 ±1,3 ^b	9,9 ±1,4 ^a		
Derivados cinâmicos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Nepetoidina B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
ni	3,5 ±0,8 ^a	0,5 ±0,2 ^b	1,3 ±1,0 ^b	-	0,6 ±0,2	-	0,4 ±0,2 ^c	1,1 ±0,2 ^{ab}	0,7 ±0,0 ^{bc}	1,0 ±0,4 ^{ac}	1,5 ±0,3 ^a		
Total de constituintes fenólicos	11,1 ±1,9 ^a	3,3 ±1,6 ^b	5,7 ±3,0 ^b	13,0 ±3,0	4,0 ±0,9 ^a	1,1 ±0,4 ^b	1,0 ±0,2 ^b	6,6 ±4,1 ^a	0,8 ±0,4 ^b	5,2 ±0,2 ^a	15,4 ±2,6 ^a		

Hcamp: *H. campestris*, H. com: *H. comaroides*, Hmer: *H. meridionalis*, Hrad: *H. radicans*; Bur: Buriti (MT), Pir: Pirassununga (SP), RC: Rio da Casca (MT), Cur: Curitiba (PR), BN: Balsa Nova (PR), Jag: Jaguariáiva (PR), CGS: Campina Grande do Sul (PR), MC: Mogi das Cruzes (SP), SA: Santo André (SP), Av: Avaré (SP), MG: Mogi Guaçu (SP); C: cerrado, TA: Tropical Atlântico; ce: cerradão, ms: mata seca, camp/at: campo com ação antrópica, om/at: floresta ombrófila mista com ação antrópica, sav: savana, es: floresta estacional semidecidual, om: floresta ombrófila mista, od: floresta ombrófila densa; EB: extrato bruto, FH: fase hexânica, FD: fase de diclorometano, FAE: fase acetato de etila, FHA: fase hidroalcolica. Derivados flavonoídicos: valores expressos em miligramas de substâncias equivalentes a luteolina por grama de extrato (mg EL g⁻¹). ácido rosmarínico, derivados clorogênicos e derivados cinâmicos: valores expressos em miligramas de substâncias equivalentes à ácido *p*-cumárico por grama de extrato (mg Ep g⁻¹). Análises estatísticas realizadas entre populações da mesma espécie (interespecífica) e por extrato ou fase sendo que médias com letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,05).

Tabela 1.6 - Dados meteorológicos e teor de substâncias fenólicas (mg g⁻¹) dos extratos brutos de *Hyptis* seção *Peltodon*.

Espécie, local de coleta, domínio fitogeográfico e fitofisionomia	Temperatura (°C)	Precipitação acumulada (mm)	Precipitação média (mm)	Derivados flavonoídicos	Ácido rosmarínico	Derivados clorogênicos	Nepetoidina B	ni	Total de constituintes fenólicos	
Hcamp (Bur, C, ce)	24,8	212,4	0,3	37,8 ±8,8 ^a	1,3 ±0,2 ^b	0,4 ±0,0 ^c	-	-	6,2 ±2,5 ^a	45,5 ±11,2 ^a
Hcamp (Pir, C, ms)	24,0	1,6	0,1	14,5 ±3,6 ^b	4,3 ±0,4 ^a	0,8 ±0,1 ^b	0,1 ±0,0 ^a	3,4 ±0,6 ^b	22,2 ±5,1 ^b	
Hcamp (RC, C, ce)	23,2	212,4	0,3	35,9 ±10,9 ^a	2,2 ±0,8 ^b	2,5 ±0,3 ^a	1,0 ±0,7 ^a	5,1 ±0,9 ^{ab}	46,1 ±12,5 ^a	
Hcom (Cur, TA, cam/ at)	23,0	6,0	0,2	16,9 ±9,0	20,0 ±4,0	1,8 ±0,1	1,0 ±0,2	2,1 ±0,9	40,6 ±14,7	
Hmer (BN, TA, om/ at)	15,3	7,5	0,2	21,7 ±4,0 ^a	12,2 ±0,3 ^a	1,3 ±0,1 ^a	0,7 ±0,3 ^a	2,6 ±0,3 ^a	38,7 ±4,0 ^a	
Hmer (Jag, C, sav)	16,8	12,8	0,4	10,2 ±4,1 ^b	11,2 ±3,0 ^a	1,4 ±0,2 ^a	1,0 ±0,6 ^a	0,7 ±0,1 ^b	24,6 ±4,9 ^b	
Hrad (Av, ZT, es)	21,7	2,3	0,1	9,0 ±2,3 ^a	3,2 ±1,3 ^c	7,4 ±1,4 ^b	5,3 ±1,2 ^a	0,9 ±0,2 ^b	25,8 ±2,5 ^b	
Hrad (MG, C, ms)	24,5	10,1	0,3	4,1 ±1,6 ^b	8,0 ±1,9 ^b	12,3 ±3,1 ^{ab}	2,8 ±1,0 ^{bc}	1,3 ±0,3 ^{ab}	26,4 ±5,4 ^b	
Hrad (CGS, TA, om)	22,1	3,4	0,1	10,3 ±2,5 ^a	6,9 ±2,7 ^{bc}	12,6 ±2,9 ^a	1,3 ±0,8 ^c	1,2 ±0,1 ^{ab}	31,9 ±8,3 ^{ab}	
Hrad (MC, TA, es)	21,1	3,4	0,1	4,4 ±1,3 ^b	15,0 ±2,2 ^a	13,6 ±2,5 ^{ab}	3,5 ±0,2 ^{ab}	1,2 ±0,5 ^{ab}	33,3 ±5,3 ^{ab}	
Hrad (SA, TA, od)	27,1	151,6	5,6	7,1 ±2,4 ^{ab}	12,2 ±1,0 ^a	15,5 ±1,9 ^a	4,0 ±1,1 ^{ab}	1,8 ±0,3 ^a	40,5 ±4,1 ^a	

Hcamp: *H. campestris*, H. com: *H. comaroides*, Hmer: *H. meridionalis*, Hrad: *H. radicans*; Bur: Buriti (MT), Pir: Pirassununga (SP), RC: Rio da Casca (MT), Cur: Curitiba (PR), BN: Balsa Nova (PR), Jag: Jaguariaíva (PR), CGS: Campina Grande do Sul (PR), MC: Mogi das Cruzes (SP), SA: Santo André (SP), Av: Avaré (SP), MG: Mogi Guaçu (SP); C: cerrado, TA: Tropical Atlântico; ce: cerradão, ms: mata seca, camp/at: campo com ação antrópica, om/at: floresta ombrófila mista com ação antrópica, sav: savana, es: floresta estacional semidecidual, om: floresta ombrófila mista, od: floresta ombrófila densa; EB: extrato bruto, FH: fase hexânica, FD: fase de diclorometano, FAE: fase acetato de etila, FHA: fase hidroalcolica. Análises estatísticas realizadas por espécie e por extrato ou fase sendo que médias com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$); ni: teor de substâncias não identificadas.

Apesar de ter sido encontrada apenas no domínio fitogeográfico dos Cerrados, *H. campestris* foi coletada em regiões de Cerrado geograficamente distintas, nos estados de São Paulo e Mato Grosso. A população de Pirassununga (SP, C, ms) se difere das demais quanto ao teor total de constituintes fenólicos, apresentando aproximadamente a metade do valor observado para as populações coletadas no Mato Grosso. Essa diferença no valor total reflete a diferença observada principalmente para a classe dos derivados flavonoídicos, também menor na população de Pirassununga. Entretanto, essa população apresentou os maiores teores de ácido rosmarínico quando comparada às populações do Mato Grosso, sendo pouco mais que o dobro quando comparado às duas outras populações. Essas observações são interessantes pois apesar de todas as populações estarem inseridas no domínio fitogeográfico dos Cerrados, há diferenças nos teores fenólicos que parecem refletir a fitofisionomia, influenciada pelos dados meteorológicos e edáficos, em cada local. Pirassununga foi a região com menor precipitação média ou acumulada se comparada a qualquer outra área de coleta deste estudo (Tabela 1.6), o que pode ter influenciado na menor produção de flavonoides e maiores teores de ácido rosmarínico.

Segundo Harb e colaboradores (2015), variedades de uva coletadas em regiões semi-árida e temperada apresentaram diferentes teores de metabólitos primários, principalmente aminoácidos, mas não mostraram diferenças significativas nos teores de flavonoides, indicando que o fatores do ambiente teriam efeito insignificante sobre metabólitos secundários. Obata e Fernie (2012) salientam a importância da reconfiguração da rede metabólica quando sobre estresse ambiental de forma a manter a homeostases, assim como a produção de substâncias importantes para a resposta ao estresse, o que muitas vezes não é percebido quando analisados os conteúdos totais de metabólitos. Também é importante lembrar que a condição de menor pluviosidade para espécie em questão pode não significar um fator de estresse, já que esse é o seu ambiente de ocorrência natural resultado de sua adaptação ao longo de seu histórico evolutivo. Saldanha (2017) ao estudar *Myrcia bela* em diferentes regiões de Cerrado, verificou que o perfil químico de folhas parece seguir um padrão geográfico, sofrendo, portanto, maior influência das condições do solo e menor influência genética, mostrando que o solo pode modular, além da própria fisionomia do Cerrado, a composição química das populações nele inseridas.

Para *H. meridionalis* pode-se observar diferenças bem marcantes no teor total de constituintes fenólicos de seu extrato bruto quando coletada em diferentes domínios fitogeográficos. A população de Balsa Nova (PR, TA, om/ at) apresentou teores mais elevados de constituintes fenólicos totais quando comparada à população coletada em Jaguariáiva (PR, C, sav). A classe de substância que exerceu maior influência para tal aumento foi a classe dos derivados flavonoídicos que, no domínio fitogeográfico Tropical Atlântico apresentou o dobro do valor encontrado no domínio fitogeográfico dos Cerrados.

Falando um pouco sobre os dados meteorológicos, nos trinta dias antecedentes à coleta, a temperatura em ambos os locais não sofreu muitas variações, entretanto, o índice de precipitação acumulada para o período foi maior em Jaguariaíva, região de Cerrado e a distribuição da chuva, dado obtido pela precipitação média, indica que choveu, em média ao longo dos 30 dias, o dobro nessa região do que na região do domínio Tropical Atlântico. O ácido rosmarínico, ácido clorogênico e as nepetoidinas estavam presentes em ambas as populações e não apresentaram diferenças em seus teores.

Quanto ao teor total de constituintes fenólicos do extrato bruto de *H. radicans*, as populações de Santo André (SP, TA, od), mais precisamente na Serra do mar, região de Paranapiacaba, de Campina Grande do Sul (PR, TA, om) e de Mogi das Cruzes (SP, TA, es) foram as que apresentaram maiores teores fenólicos. Um fato interessante é que tais populações estão inseridas no domínio fitogeográfico Tropical Atlântico em fitofisionomias florestais. Entretanto, quando consideramos os teores de constituintes flavonoídicos não observamos o mesmo resultado, havendo variações não relacionadas ao domínio fitogeográfico. Por exemplo, as populações de Avaré (SP, ZT, es), Campina Grande do Sul (PR, TA, om) e Santo André (SP, TA, od) foram as que apresentaram maiores teores de derivados flavonoídicos, enquanto as populações de Mogi Guaçu (C, ms) e Mogi das Cruzes (TA, es) apresentaram os menores teores.

O teor de ácido rosmarínico parece ter influenciado no incremento total de constituintes fenólicos da população de *H. radicans* de Mogi das Cruzes (SP, TA, es) e de Santo André (SP, TA, od), já que seu teor foi o maior observado na relação interspecífica. As populações de *H. radicans*, com exceção da de Avaré (SP, ZT, es), apresentaram teores de derivados clorogênicos relativamente altos quando comparados aos teores de derivados flavonoídicos. Quanto ao teor de nepetoidinas, as populações de *H. radicans* de Mogi das Cruzes (SP, TA, es), Santo André (SP, TA, od) e Avaré (SP, ZT, es) apresentaram os maiores teores. Apesar de todos os resultados apresentados anteriormente, as populações de *H. radicans* não apresentaram grandes variações no teor total de constituintes fenólicos, sendo, portanto, observadas somente flutuações no teor de certas classes de substâncias fenólicas dependendo da fitofisionomia e dados meteorológicos do local de coleta.

Em três cultivares de *Olea europaea* L. impactadas com déficit hídrico, foi observado um aumento no teor total de constituintes fenólicos e flavonoides (Edziri et al., 2018), corroborando os resultados aqui reportados para a população de *H. meridionalis* de Balsa Nova (PR, TA, om/ at) que apesar do menor índice de precipitação acumulada quando comparada à população de *H. meridionalis* de Jaguariaíva (PR, C, sav), apresentou maior teor total de constituintes fenólicos e de derivados flavonoídicos.

Utilizando os dados dos extratos brutos como matriz principal, a Tabela 1.7 nos possibilita correlacionar as diferentes classes de substâncias com os fatores climáticos como temperatura e precipitação acumulada e média. Nessa análise de correlação (Pearson) utilizamos os dados referentes a todas as espécies (com exceção das substâncias não identificadas), pois o intuito foi avaliar se o microclima influenciou nos teores fenólicos.

A correlação positiva mais forte observada ($r = 0,753$) foi entre o teor total de constituintes fenólicos e a precipitação acumulada, indicando que quanto maior a pluviosidade maior o teor de de substâncias fenólicas. A segunda maior correlação foi encontrada entre a precipitação acumulada e o teor de flavonoides ($r = 0,724$), mostrando uma correlação moderada entre esses parâmetros. Essa correlação pode explicar o maior teor de derivados flavonoídicos nas populações de *H. campestris* de Buriti (MT, C, ce) e Rio da Casca (MT, C, ce) onde também observamos os maiores índices de precipitação acumulada, mesmo estando em região do domínio dos Cerrados.

As correlações negativas moderadas observadas foram entre o teor de derivados flavonoídicos e o teor de ácido rosmarínico, derivados clorogênicos e nepetoidinas. Isso leva-nos a crer que, uma vez que ocorra o incremento de derivados flavonoídicos, as outras classes de substâncias fenólicas analisadas neste estudo, sofrem uma redução. Isso pode estar relacionado a um possível desvio no uso do substrato ácido *p*-cumárico, um dos precursores na síntese de flavonoides, mas também importante precursor para a síntese de ácido cafeico e seus derivados (Dewick, 2009).

Um fato que deve ser levado em consideração, é o de que estamos analisando flutuações nas precipitações dentro da estação do verão e parte do outono, ou seja, da estação chuvosa (novembro de 2014 a maio de 2015).

Estudos que avaliam a influência de fatores abióticos na composição química de espécies vegetais são escassos na literatura e a maioria reporta a influência de tais fatores no incremento de substâncias voláteis. Sampaio e Da Costa (2018) ao estudar *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (Asteraceae), compararam dados de análises químicas de óleos voláteis com dados ambientais (clima e solo) de diferentes regiões, com o objetivo de observar a existência ou ausência de um padrão sazonal e uma possível relação com os fatores ambientais na produção desses metabólitos secundários. De fato, tais pesquisadores relataram uma variação na produção na classe dos terpenos, sendo estes influenciados por diferentes condições ambientais (Sampaio e Da Costa, 2018).

Southwell e Bourke (2001), quantificaram dois constituintes flavonoídicos em *Hypericum perforatum* L. (erva de São João) em estações seca e úmida e verificaram um aumento no conteúdo de tais constituintes na estação úmida. Diferentemente, quando *Hypericum brasiliense* Choisy foi submetido ao estresse hídrico, apresentou aumento nos teores de compostos fenólicos como quercetina, rutina, 1,5-dihidroxixantona e isouliginosina B (Nacif de Abreu e Mazzafera, 2005).

Tabela 1.7 – Coeficientes de correlação simples de Pearson (r) para as variáveis presentes na Tabela 1.6, exceto substâncias não identificadas (ni).

Variáveis	Temperatura no mês de coleta (°C)	Precipitação acumulada (mm)	Precipitação média (mm)	Derivados flavonoídicos	Ácido rosmarínico	Derivados clorogênicos	Nepetoidina B	Total de constituintes fenólicos
Temperatura no mês de coleta (°C)	1,00							
Precipitação acumulada (mm)	0,47	1,00						
Precipitação média (mm)	0,41	0,35	1,00					
Derivados flavonoídicos	0,08	0,69	-0,18	1,00				
Ácido rosmarínico	-0,19	-0,40	0,19	-0,31	1,00			
Derivados clorogênicos	0,36	-0,11	0,47	-0,50	0,16	1,00		
Nepetoidina B	0,13	-0,13	0,40	-0,46	0,08	0,45	1,00	
Total de constituintes fenólicos	0,28	0,55	0,19	0,67	0,27	0,09	-0,13	1,00

Interpretação dos valores de r (+ou-): correlação pequena ou nula: 0,00 a 0,25 ou -0,25 a 0,00; correlação fraca: 0,25 a 0,50 ou -0,50 a -0,25; correlação moderada: 0,50 a 0,75 ou -0,75 a -0,50; correlação forte: 0,75 a 1,00 ou -1 a -0,75; correlação perfeita: 1,00 ou -1 (Vieira, 2008).

Alguns trabalhos já revelaram variações quantitativas de flavonoides agliconas como por exemplo apigenina, luteolina e quercetina quando coletados e analisados ao longo de um ano (Clark e Clark, 1990). No referido trabalho, foi observado que a flavona apigenina atingiu seu maior teor na estação seca, diferentemente da flavona luteolina que atingiu seu maior teor no início da estação chuvosa.

A irradiação solar global e a temperatura têm uma alta variação intersazonal na região sul do Brasil. É na região Sul que os menores valores de irradiação global são observados no Brasil, notadamente no litoral norte do estado de Santa Catarina, litoral do Paraná e litoral sul de São Paulo (Pereira et al., 2006). Estudos correlacionam positivamente a intensidade de radiação solar e a concentração e/ou composição de substâncias fenólicas como flavonoides (Markham et al., 1998; Tattini et al., 2004), taninos (Dudt e Shure, 1994) e antocianinas (Jeong et al., 2004). No entanto, segundo Gobbo-Neto e Lopes (2007), estudos já mostraram resultados conflitantes em relação aos teores de substâncias fenólicas e a influência dos fatores ambientais, de forma que a direta correlação nem sempre pode ser aplicada.

Parece muito difícil estabelecer uma correlação clara entre a concentração de substâncias fenólicas e fatores abióticos. Por exemplo, efeitos de curto prazo da seca parecem aumentar a produção de metabólitos especiais, enquanto no longo prazo um efeito oposto foi observado (Medina E., 1984; Mattson e Haack, 1987; Horner, 1990; Waterman e Mole, 1994; Gobbo-Neto e Lopes, 2007). Em geral, para o estresse abiótico, parece que a produção de metabólitos depende do grau de estresse, o que significa que a duração e a intensidade do estresse são importantes para determinar a resposta da planta.

Sabe-se que o crescimento e a produtividade das plantas são afetados pelos vários fatores de estresse bióticos e abióticos. O déficit hídrico é um dos principais estresses abióticos, que afeta negativamente o crescimento e o rendimento das culturas. Essas mudanças são principalmente relacionadas a funções metabólicas alteradas, uma delas é a perda ou a síntese reduzida de pigmentos fotossintéticos que por sua vez estão intimamente associadas ao rendimento da biomassa das plantas (Jaleel et al., 2009). Entretanto, os dados obtidos no presente estudo mostraram que populações da mesma espécie não apresentaram diferenças em seus rendimentos (Tabela 1.1) que pudessem ser relacionadas ao ambiente.

Com o objetivo de otimizar a coleta de *Lavandula angustifolia* (Lamiaceae) devido à sua grande importância econômica nos setores de perfumaria, cosmético, fabricação de alimentos, aromaterapia e indústria farmacêutica; um grupo de pesquisadores da Itália resolveu testar diferentes condições ecológicas em populações de lavanda, sendo que estas possuem seu ótimo fitossociológico na região sub-mediterrânea. Tais autores partiram do pressuposto que gradientes latitudinais e de altitude devem afetar a diversificação de espécies em populações alpinas

periféricas. Os resultados mostraram variações qualitativas e quantitativas interespecíficas no teor de terpenos, principalmente ao longo do gradiente latitudinal, concluindo portanto que populações de lavanda situadas em locais periféricos montanhosos seriam a melhor opção para a melhoria da qualidade e produtividade dos cultivos desta espécie (Demasi et al., 2018).

Verma e Shukla (2015) em um levantamento bibliográfico, discutem o impacto do provável papel de vários fatores genéticos, ontogênicos, morfogenéticos e ambientais na biossíntese de metabólitos secundários bem como a flutuação em seus conteúdos quando analisados de geração em geração. Da mesma forma, não temos conhecimento da idade de cada espécimen/ população coletada, talvez a influência desta possa explicar as flutuações interespecíficas observadas com relação ao perfil químico verificadas no presente estudo.

Relacionando os resultados deste capítulo com os encontrados na literatura, acreditamos que a conclusão de maior importância é a necessidade de cautela ao nos referirmos à palavra “estresse”, principalmente levando em conta as diferentes fitofisionomias em que a espécie vegetal se encontra. Isso porque talvez, o que pensamos ser um estresse hídrico, como o que acontece nas fitofisionomias dos Cerrados, pode ser considerada uma situação natural da população ali ocorrente, fruto de seu histórico evolutivo. Quando comparamos a mesma espécie vegetal em diferentes fitofisionomias, o teor de algumas substâncias pode variar, mas em geral, a qualidade de seus constituintes permanece a mesma. Essas descobertas pensamos ser úteis no caso da busca de substâncias de interesse e mudanças do ótimo fisiológico para o incremento ou não de determinada substância.

1.4. Considerações finais

Na introdução deste capítulo, vimos que Lamiaceae é uma família de interesse econômico para uso medicinal, cosmético e alimentício. Entretanto, a maior parte dos estudos reportados para essa família está restrita aos óleos voláteis e outras substâncias apolares.

Vimos também que apenas 6,1% das espécies de *Hyptis sensu* Harley e Pastore (2012) foram analisadas quanto às suas substâncias polares, justificando assim a importância deste trabalho.

Entre as espécies de *Hyptis* seção *Peltodon*, *H. campestris* destacou-se por conter um maior número de constituintes fenólicos e maior teor de derivados flavonoídicos em seu extrato bruto.

Hyptis seção *Peltodon* apresentou composição química semelhante à de espécies da subfamília Nepetoideae em relação à constituição fenólica, destacando-se a presença do ácido cafeico, ácido rosmarínico e nepetoidinas, corroborando estudos anteriores.

A extração hidroalcolica foi eficiente na obtenção de substâncias de polaridade intermediária, alvos desse estudo. *Hyptis* seção *Peltodon* possui em sua maioria, substâncias

derivadas da flavona apigenina, sendo que a presença de flavonas C-glicosiladas no extrato bruto pode sugerir o uso das mesmas como importantes marcadores taxonômicos no nível de seção.

A relação da fitofisionomia e conseqüentemente, dos dados meteorológicos com a composição fitoquímica das espécies aqui estudadas parece não seguir um mesmo padrão, visto que houve uma variação interespecífica diferente para cada espécie. Devemos levar em conta que outros fatores abióticos, além dos bióticos, podem contribuir para esta variação, entretanto, vimos que há uma moderada correlação estabelecida positivamente entre a precipitação acumulada e teor de derivados flavonoídicos e, conseqüentemente, o teor total de constituintes fenólicos.

Atualmente, sabe-se que muitos dos metabólitos especiais estão diretamente envolvidos nos mecanismos que permitem a adaptação das plantas ao seu habitat (Santos, 2004, Miranda et al., 2013). Além disso, o potencial biológico pode variar dependendo da influência dos fatores abióticos como por exemplo os fatores edafoclimáticos, que podem afetar a produção de metabólitos especiais (Gobbo-Neto e Lopes, 2007). “A adaptabilidade das plantas às tensões ambientais é um comportamento ecológico generalizado na natureza. Como um comportamento fenotípico e explícito, a adaptabilidade morfológica da planta ao ambiente é relativamente fácil de observar e reconhecer, enquanto que, como um comportamento intrínseco e implícito, a adaptabilidade bioquímica da planta é relativamente difícil de ser descoberta e ainda não totalmente compreendida” (Yang et al., 2018).

Capítulo 2. Potencial antioxidante de *Hyptis* Jacq. seção *Peltodon*

Santos, Kátia Pereira dos, Martha Dalila Sedano-Partida, Wilton Ricardo Sala-Carvalho, Beatriz Ortega San Juan Loureiro, Cíntia Luíza da Silva-Luz, Claudia Maria Furlan. 2018. “Biological Activity of *Hyptis* Jacq. (Lamiaceae) Is Determined by the Environment.” *Industrial Crops and Products* 112: 705–15. doi:10.1016/j.indcrop.2017.12.065.

Abstract

Reactive species are formed during natural metabolic processes, or are derived from exogenous physical and chemical sources. However, nowadays, it is known that several factors contribute to the instability between the formation of reactive species and our antioxidant defenses, causing oxidative stress. Substances regarded as antioxidants, such as phenolic compounds, can prevent or reduce the extent of the oxidative damage. The objective of this study was to evaluate the antioxidant potential of crude extracts of *Hyptis* spp. and to verify the possible influence of different phytophysiognomies in the biological potential of these species. As results, we reported that the species that presented highest antioxidant potential in most of the assays were *H. comaroides* and *H. meridionalis*. The phytogeographic domain seem to influence the antioxidant potential of the species, populations nature occurring in the Atlantic Tropical domain were more active than those occurring in Brazilian Savannah and, consequently, are better candidates as source of natural antioxidants.

Resumo

Espécies reativas são formadas durante os processos metabólicos naturais ou são provenientes de fontes exógenas físicas e químicas. Entretanto, hoje em dia, sabe-se que vários fatores contribuem para o desequilíbrio entre a formação de espécies reativas e nossas defesas antioxidantes, causando o estresse oxidativo. Substâncias consideradas antioxidantes, como por exemplo os fenólicos, podem prevenir ou reduzir a extensão do dano oxidativo. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial antioxidante dos extratos brutos de *Hyptis* spp. e verificar possíveis diferenças no potencial nas espécies de ocorrência em fitofisionomias distintas. Como resultado, vimos que as espécies que apresentaram maior potencial antioxidante na maioria dos ensaios foram *H. comaroides* e *H. meridionalis*. Os domínios fitogeográficos parecem influenciar o potencial antioxidante das espécies, populações que ocorrem no domínio Tropical Atlântico são mais ativas do que as do Cerrado e, conseqüentemente, são melhores candidatas como fonte de antioxidantes naturais.

2.1. Introdução

2.1.1. Potencial antioxidante de espécies vegetais

Aproximadamente 5% ou mais do oxigênio inalado (O_2) são convertidos em espécies reativas de oxigênio (ERO), como por exemplo o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^{\bullet}), pela redução univalente de O_2 (Gupta e Sharma, 2006; Maxwell, 1995). Além das espécies reativas de oxigênio, existem também as espécies reativas de nitrogênio, os radicais derivados de tióis (RS^{\bullet}), as espécies reativas de cloro, as espécies reativas de carbono e complexos de metais de transição, principalmente Fe, Cu, Mn e Cr (Rahman et al., 2006; Halliwell e Gutteridge, 2007; Vasconcelos et al., 2007; Oliveira et al., 2009).

Espécies reativas são formadas continuamente durante os processos metabólicos - naturais ou em decorrência de doenças - ou são provenientes de fontes exógenas físicas e químicas (Oliveira et al., 2009). Entretanto, hoje em dia, sabe-se que vários fatores contribuem para o desequilíbrio entre a formação de espécies reativas e nossas defesas antioxidantes, causando o estresse oxidativo (Cerqueira et al., 2007). Alguns desses fatores são por exemplo, hábitos de vida considerados inapropriados (consumo de álcool, tabagismo, dieta inadequada, exercício físico realizado de forma extrema e exposição à radiação não ionizante ultravioleta e outras ondas curtas); condições ambientais impróprias (temperatura elevada e poluição ambiental, domiciliar e ocupacional); envelhecimento e estados psicológicos que provoquem estresse emocional. Patologias crônicas (*diabetes mellitus*, hipertensão arterial, câncer, entre outras) e patologias degenerativas (Mal de Alzheimer e Mal de Parkinson) vem sendo cada vez mais frequentemente associadas ao estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 2007; Oliveira et al., 2009; Martins et al., 2016). Numerosos estudos vêm investigando os fatores desencadeantes dessas doenças, a fim de compreender os mecanismos de ação dos radicais livres, bem como descobrir substâncias eficazes para prevenir e até mesmo reverter a ocorrência de danos oxidativos.

Substâncias consideradas antioxidantes, quando presentes em concentrações ideais em relação aos substratos oxidáveis, previnem ou reduzem a extensão do dano oxidativo (Vaya e Aviram, 2001; Halliwell e Gutteridge, 2007; Vicentino e Menezes, 2007; Oliveira et al., 2009).

Os antioxidantes tanto naturais (enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase) quanto sintéticos (BHA e BHT), têm se mostrado altamente eficazes no controle do excesso da produção de radicais livres, bem como na prevenção de seus efeitos danosos e no suporte aos mecanismos antioxidantes e desintoxicantes do organismo (Yeh e Yen, 2006; Valko et al., 2007; Holst e Williamson, 2008; Kapravelou et al., 2015; Martins et al., 2016).

Algumas espécies vegetais e até compostos isolados podem não apresentar potencial antioxidante através de estudos *in vitro*, entretanto um forte potencial antioxidante é observado quando estudos *in vivo* são realizados, e vice-versa. Isso porque, os antioxidantes, sendo eles

naturais ou sintéticos, sofrem inúmeras reações bioquímicas ao longo da ingestão, digestão e absorção pelo organismo. Portanto, apesar dos avanços atuais, a biodisponibilidade efetiva dos diferentes antioxidantes não está totalmente definida: enquanto muitos deles são ingeridos em sua forma ativa, outros precisam ser metabolizados para serem biologicamente ativos, ou até se tornarem inativos; além disso, a co-ingestão de outros nutrientes, como também vários fatores endógenos, e as variações inter e intra-individuais, afetam sua biodisponibilidade em relação à dose ingerida (Martins et al., 2016).

Além do potencial uso na medicina preventiva, os antioxidantes despertam interesse na indústria devido a sua capacidade de conservar produtos de base lipídica. Os óleos, gorduras e alimentos gordurosos sofrem processos oxidativos que levam à produção de compostos indesejáveis que oxidam nutrientes importantes como proteínas e vitaminas, além de alterar a textura e funcionalidade dos alimentos por meio da insolubilização de suas proteínas, modificando também as características organolépticas dos alimentos (Ferrer-Gallego et al., 2017; Ganiari et al., 2017; Piñeros-Hernandez et al., 2017; Wang et al., 2018). Atualmente, é crescente o interesse pela substituição total ou parcial de antioxidantes sintéticos por aqueles de origem natural pelas indústrias alimentícia, farmacêutica, e, mais recentemente, cosmética. Além disso, é possível observar uma tendência atual dos consumidores à busca por produtos formulados com ingredientes naturais, mesmo que tenham custo mais elevado, pois estes são vistos como um dos fatores que contribuem para o aumento da qualidade de vida.

Um dos grupos de metabólitos especiais mais amplamente distribuído na natureza é o das substâncias fenólicas. Mais de 8.000 substâncias deste grupo já foram descritas em plantas, podendo funcionar como pigmentos, dando a aparência colorida aos alimentos, ou como produtos geralmente derivados de reações de defesa da planta contra o estresse ambiental. Esses compostos estão envolvidos no potencial antioxidante atuando como quelantes de metais, sequestrando ou inativando ERO, formando estruturas intermediárias estáveis e, assim, limitando a iniciação ou propagação de radicais livres (Brand-Williams et al., 1995; Zheng e Wang, 2001; Moon e Shibamoto, 2009; Chen et al., 2016).

Conhecidas espécies de Lamiaceae já tiveram sua capacidade antioxidante descrita como por exemplo o alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), a salvia (*Salvia officinalis* L.), o tomilho (*Thymus vulgaris* L.), o orégano (*Origanum vulgare* L.), o manjericão (*Ocimum basilicum* L.), a erva-cidreira (*Melissa officinalis* L.) e o hortelã (*Mentha* spp). (Couladis et al., 2003; Javanmardi, 2003; Kosar et al., 2003; Matkowski e Piotrowska, 2006; Yanishlieva et al., 2006, Benabdallah et al., 2016, García-Risco et al., 2017).

Nos últimos dez anos, diversos ensaios espectrofotométricos foram adotados para medir a capacidade antioxidante de alimentos, sendo os mais populares o ensaio do ABTS [ácido 2,2-azino-

bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)], DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), entre outros como capacidade de absorção de radicais peroxil (ORAC) e capacidade de redução férrica (FRAP) (Floegel et al., 2011).

A abordagem que relaciona fatores abióticos com a composição química, bem como o potencial biológico de espécies vegetais é relativamente recente. Oh e colaboradores (2009) relatam que plantas de alface são capazes de se adaptar a ambientes de estresse hídrico ativando a expressão dos genes fenilalanina amônia-liase (PAL), γ -tocoferol metil transferase (γ -TMT) e L-galactose desidrogenase (L-GalDH), envolvidos na biossíntese de compostos fenólicos, α -tocoferol e ácido ascórbico, respectivamente, aumentando assim, o que eles denominaram de “metabolismo antioxidante” da planta (Oh et al., 2009).

O objetivo deste capítulo foi avaliar o potencial dos extratos brutos de *Hyptis* seção *Peltodon* como antioxidantes. Além disso, comparamos esse potencial nas espécies de ocorrência em fitofisionomias distintas, afim de compreender e relacionar a produção de metabólitos especiais com a variação entre ambientes nos grandes domínios fitogeográficos: Cerrados e Tropical Atlântico.

2.2. Material e métodos

2.2.1. Material vegetal

Os extratos brutos testados foram produzidos conforme descrito metodologia descrita no Capítulo 1 (ver página 30).

2.2.2. Ensaio antioxidantes

2.2.2.1. Ensaio de capacidade sequestradora do DPPH*

O ensaio de capacidade sequestradora do DPPH* seguiu o método original (Brand-Williams et al., 1995), adaptado por Furlan e colaboradores (2015). Uma solução de 0,20 mM de DPPH* foi misturada aos extratos diluídos em 10% de DMSO nas concentrações de 1,70 a 45,45 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para cada 20 μL de amostra foram adicionados 200 μL da solução de DPPH e a absorbância foi avaliada após 20 minutos de reação (515 nm) em leitor de microplacas BioTek modelo Synergy™ H1 Hybrid Multi-Mode Reader. Os resultados foram calculados utilizando Trolox (12,5-200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e ácido rosmarínico (15-150 $\mu\text{g mL}^{-1}$) como controles positivos. 10% de DMSO foi utilizado como controle negativo. A porcentagem de inibição foi calculada como $[\text{Acn} - \text{As} / \text{Acn} \times 100]$, onde Ac é Acn absorbância do controle negativo, As é a absorbância das amostras (Dudoneé et al., 2009).

2.2.2.2. Ensaio da capacidade sequestradora do ABTS*

O ensaio de capacidade sequestradora do ABTS* foi avaliado de acordo com o método original, adaptado por Santos e colaboradores (2016). Primeiro, foi preparada uma solução ABTS* 7 mM em água ultrapura e uma solução de persulfato de potássio 2,6 mM. Para a formação do radical

ABTS, essas soluções foram misturadas em uma proporção de 1: 1 e mantida no escuro em temperatura ambiente por 12 a 16 horas. No momento do teste, 1 mL da solução de ABTS* foi diluído em 30 mL de metanol. Para cada 20 µL de amostras (em concentrações de 1,25-33,33 µg mL⁻¹ diluídas em DMSO 10%) foram adicionados 280 µL da solução diluída de radicais ABTS, sendo a mistura incubada por 2 horas à temperatura ambiente, no escuro e a absorbância detectada a 734 nm em leitor de microplacas BioTek modelo Synergy™ H1 Hybrid Multi-Mode Reader. Os resultados foram calculados utilizando Trolox (10-150 µg mL⁻¹) e ácido rosmarínico (6-60 µg mL⁻¹) como controles positivos. 10% de DMSO foi utilizado como controle negativo. A porcentagem de inibição calculada como $[A_{cn} - A_s / A_{cn} \times 100]$, onde A_{cn} é a absorbância do controle negativo e A_s é a absorbância das amostras (Dudoneé et al., 2009).

2.2.2.3. Redução de ferro (III) para ferro (II) (FRAP)

O ensaio de redução de ferro (III) para ferro (II) foi avaliada de acordo com o método original, adaptado por Furlan e colaboradores (2015) utilizando 25 µL de cada extrato (em concentrações de 0,62-16,66 µg mL⁻¹), 10 µL de água ultrapura e 265 µL do reagente FRAP (utilizando o reagente TPTZ, 2,4,6-Tris (2-piridil)-s-triazina). A mistura foi incubada durante 30 min a 37 °C e a absorbância medida a 595 nm em leitor de microplacas BioTek modelo Synergy™ H1 Hybrid Multi-Mode Reader. Os resultados foram calculados utilizando o Trolox (10-200 µg mL⁻¹) e ácido rosmarínico (6-60 µg mL⁻¹) como controles positivos. 10% de DMSO foi utilizado como controle negativo. A porcentagem de inibição foi calculada como $[A_s / A_{cp} \times 100]$, onde A_s é a absorbância das amostras testadas, A_{cp} é a absorbância da concentração máxima do controle positivo utilizado (Dudoneé et al., 2009).

2.2.2.4 Capacidade quelante de metais

A capacidade dos extratos como quelantes de metais foi avaliada segundo o método descrito por Min e colaboradores (2011), utilizando-se 10 µL de cada extrato (em concentrações de 1,25-33,33 µg mL⁻¹) em 130 µL de tampão acetato 10%, 10 µL de sulfato de amônio ferroso e 10 µL de solução de ferrozine 61 mM. A absorbância foi medida a 562 nm em leitor de microplacas BioTek modelo Synergy™ H1 Hybrid Multi-Mode Reader. Os resultados foram calculados utilizando ácido gálico (10-300 µg mL⁻¹) como controle positivo. 10% de DMSO foi utilizado como controle negativo. A porcentagem de inibição calculada como $[A_{cn} - A_s / A_{cn} \times 100]$, onde A_{cn} é a absorbância do controle negativo e A_s é a absorbância das amostras (Dudoneé et al., 2009).

2.2.2.5. Capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC)

A capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC) foi avaliada de acordo com o método adaptado por Santos e colaboradores (2016), usando a resposta fluorescente em 485 nm de comprimento de onda de excitação e 520 nm de emissão. 25 µL de cada amostra em tampão fosfato

(em concentrações de 0,06-1,95 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foram misturados a 150 μL de solução de fluoresceína (48 nM). As microplacas foram incubadas a 37 °C durante 20 min. Após a adição de 25 μL de AAPH 75 mM [diidrocloreto de 2,2'-Azobis (2-metilpropionamidina)], a fluorescência foi medida em intervalos de 2 minutos durante 120 minutos em leitor de microplacas BioTek modelo Synergy™ H1 Hybrid Multi-Mode Reader. Os valores de ORAC foram calculados usando a equação de regressão linear de Trolox (6,25-100 μM) e ácido rosmarínico (0,5-8 μM) como controles positivos. 10% de DMSO foi utilizado como controle negativo. A capacidade antioxidante foi baseada no cálculo da área sob a curva (AUC), usando a fórmula $(\text{AUC}) = 1 + f_1 / f_0 + f_2 / f_0 + f_3 / f_0 + \dots + f_i / f_0$, em que f_0 é a leitura inicial da fluorescência a 0 min, e f_1 é a leitura da fluorescência no tempo 1. A Net AUC foi obtida subtraindo a AUC do controle negativo da AUC da amostra. A porcentagem de inibição foi calculada como $[\text{NETs} / \text{NETcp} \times 100]$, onde NETs é a NET AUC das amostras testadas, NETcp é a NET AUC da concentração máxima do controle positivo utilizado (Dudoneé et al., 2009). (Dudoneé et al., 2009).

Para todos os ensaios antioxidantes, as amostras foram analisadas em triplicatas e o potencial antioxidante de cada uma foi expresso em miligramas de equivalentes a Trolox por grama de extrato seco e miligramas de equivalentes a ácido rosmarínico por grama de extrato seco (mg ET g^{-1} e mg EAR g^{-1} , respectivamente). No caso do ensaio ORAC, o potencial antioxidante de cada amostra foi expresso em micromol equivalentes a Trolox por grama de extrato seco e micromol equivalentes a ácido rosmarínico por grama de extrato seco ($\mu\text{Mol ET g}^{-1}$ e $\mu\text{Mol EAR g}^{-1}$, respectivamente). Além disso, as porcentagens de potencial antioxidante das amostras em suas diferentes concentrações foram utilizadas para calcular a concentração efetiva de cada amostra para atingir 50% da capacidade antioxidante ($\text{CE}_{50} \mu\text{g mL}^{-1}$), plotando-se esses dados em curvas de regressão (para curvas consultar o Anexo).

2.2.3. Análises estatísticas

Foram realizadas análises estatísticas no programa *R Project for Statistical Computing* versão 3.4.4, onde iniciamos todas as análises com um gráfico do tipo *boxplot* com a intenção de verificar possíveis *outliers*. Para análises com mais de dois grupos, inicialmente testamos as premissas para o teste paramétrico Anova, que são: distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e variâncias iguais ou homocedasticidade (Teste de Barlett). Atendendo às premissas, utilizamos o Anova com o teste *post hoc* de Tukey para determinar as diferenças significantes entre as médias. Nos casos em que houve distribuição normal, mas não houve homocedasticidade, realizamos o Anova com o teste t de Welch que considera as heterocedasticidade dos dados. Para os casos em que a distribuição não foi normal, realizamos tratamento dos dados (\log_{10}) para que fosse possível a utilização do teste paramétrico Anova. Entretanto, se mesmo com o tratamento nos dados, não foi observada distribuição normal, empregamos a análise não-paramétrica Kruskal Wallis e teste *post hoc* de Dunn.

Nos casos em que foram comparados apenas dois grupos, empregamos a análise de distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e variâncias iguais ou homocedasticidade (Teste F) e atendendo às premissas empregamos o teste t para amostras independentes. Para os casos em que a distribuição não foi normal e/ou não houve homocedasticidade, realizamos tratamento dos dados (log10) para que fosse possível a utilização do teste t. Entretanto, se mesmo com o tratamento nos dados, não foi observada distribuição normal e homocedasticidade, empregamos a análise não-paramétrica Wilcoxon (2 amostras) (Arango, 2009).

Quando conveniente, foi empregado o coeficiente de correlação de Pearson, um tipo de medida que nos informa o grau de correlação linear entre duas variáveis numéricas (Vieira, 2008).

Também foi realizada análise multivariada como a análise de componente principal (PCA). Para tanto, foi utilizado o software *Fitopac* versão 2.1 empregando de correlação em um tipo de gráfico *Biplot* com 2 eixos.

2.3. Resultados e discussão

2.3.1. Potencial antioxidante de *Hyptis* seção *Peltodon*

Os resultados de capacidade antioxidante de *Hyptis* seção *Peltodon* foram calculados utilizando-se dois parâmetros:

1. Quantidade (em mg) de substâncias antioxidantes presentes nas amostras e equivalentes aos controles positivos Trolox e ácido rosmarínico; o uso de dois padrões reside no fato de que a maioria dos trabalhos utiliza apenas o padrão Trolox, facilitando as comparações, entretanto como os extratos brutos de todas as espécies apresentam o ácido rosmarínico em sua composição, o acrescentamos pela sua reconhecida capacidade antioxidante, além de melhor representar a classe de substâncias presentes nas amostras;

2. concentrações efetivas de cada amostra para se atingir 50% da capacidade antioxidante (CE₅₀).

Para iniciar a discussão dos resultados de capacidade antioxidante faremos semelhante ao capítulo 1, onde primeiramente caracterizamos as espécies sem levar em conta a influência do ambiente. Para tanto, a Tabela 2.1, mostram o potencial antioxidante dos extratos brutos de *Hyptis* seção *Peltodon* nos ensaios DPPH^{*}, ABTS^{*}, FRAP e ORAC em relação aos padrões Trolox e ácido rosmarínico, bem como a concentração efetiva dos extratos brutos para se atingir 50% da capacidade antioxidante (CE₅₀) nos mesmos ensaios. Vale ressaltar que para o ensaio quelante de metais, *Hyptis* seção *Peltodon* se mostrou inativo e, portanto, tal resultado não consta nas tabelas.

Para o potencial de sequestro de espécies reativas de oxigênio (radicais livres ou não), metodologias que avaliam a capacidade antioxidante de um extrato analisam se as substâncias podem reagir de forma a consumir da solução um radical estável, por exemplo o DPPH^{*} e o ABTS^{*}.

O ensaio do ABTS* é extremamente interessante para ser aplicado a extratos vegetais, uma vez que a absorção no comprimento de onda em 734 nm elimina a interferência de cores provenientes do extrato (Li et al., 2008). A redução dos radicais DPPH e ABTS é seguida pelo monitoramento da diminuição de sua absorbância em um comprimento de onda característico (Brand-Williams et al., 1995) e os extratos que apresentam atividade positiva podem ser considerados potenciais sequestradores de radicais livres, característica interessante para a indústria alimentícia, por exemplo (Kumar e Pandey, 2013).

Estudos com alimentos revelaram que ensaios com ABTS* possuem forte correlação positiva com o ensaio ORAC, fenólicos e o teor de flavonoides. O referido trabalho relata que o potencial antioxidante detectado pelo ensaio ABTS* foi significativamente maior para frutas, verduras e bebidas em comparação com o ensaio DPPH*, assim como observado neste estudo (Tabela 2.1). Ainda segundo esses autores, os antioxidantes altamente pigmentados e hidrofílicos foram melhor refletidos pelo ensaio ABTS* do que pelo ensaio DPPH*, sugerindo que o ensaio ABTS*, quando comparado ao DPPH*, pode ser mais útil para detectar a capacidade antioxidante em uma variedade de alimentos (Floegel et al., 2011).

Tabela 2.1 - Capacidade antioxidante dos extratos brutos de *Hyptis* seção *Peltodon* nos ensaios DPPH*, ABTS*, FRAP e ORAC em relação aos padrões Trolox e ácido rosmarínico.

Ensaio	Trolox			
	Hcamp	Hcom	Hmer	Hrad
DPPH*	133,0 ±31,9 ^b	321,1 ±5,8 ^a	289,9 ±32,0 ^a	155,1 ±43,4 ^b
ABTS*	304,4 ±73,1 ^c	581,5 ±94,9 ^a	518,5 ±78,5 ^a	387,0 ±63,2 ^b
FRAP*	429,1 ±58,3 ^b	677,0 ±21,1 ^a	395,1 ±40,8 ^b	273,8 ±95,9 ^c
ORAC**	5320,1 ±1867,3 ^a	6454,9 ±3278,4 ^a	5274,5 ±1112,2 ^a	4618,3 ±2412,9 ^a
Ensaio	Ácido rosmarínico			
	Hcamp	Hcom	Hmer	Hrad
DPPH*	102,7 ±23,2 ^b	258,8 ±2,3 ^a	226,3 ±28,2 ^a	119,7 ±34,3 ^b
ABTS*	205,4 ±37,7 ^b	308,6 ±38,5 ^a	282,5 ±26,7 ^a	232,7 ±28,3 ^b
FRAP*	101,6 ±16,8 ^b	171,0 ±8,6 ^a	104,4 ±14,9 ^b	71,7 ±22,2 ^c
ORAC**	233,5 ±78,9 ^a	335,5 ±45,5 ^a	290,1 ±44,5 ^a	224,6 ±97,7 ^a

Hcamp: *H. campestris*, H. com: *H. comaroides*, Hmer: *H. meridionalis*, Hrad: *H. radicans*. *: Resultados expressos em miligramas de substâncias equivalentes a Trolox/ grama de extrato seco (mg ET g⁻¹) ou miligramas de substâncias equivalentes a ácido rosmarínico/ grama de extrato seco (mg EAR g⁻¹). **: Resultados expressos em micromol de substâncias equivalentes a Trolox/ grama de extrato seco (µM ET g⁻¹) ou micromol de substâncias equivalentes a ácido rosmarínico/ grama de extrato seco (µM EAR g⁻¹). Análises estatísticas realizadas entre espécies (intraespecífica) e por ensaio sendo que médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,05).

Outra forma de atuação antioxidante é o poder da substância no que diz respeito à redução de metais, especialmente ferro, um metal oxidante (Halliwell e Gutteridge, 2007). O método do poder redutor do ferro (FRAP) baseia-se na medida direta da habilidade dos antioxidantes das amostras reduzirem, em meio ácido (pH 3,6), o Fe^{3+} a Fe^{2+} . Uma vez reduzido, o Fe^{2+} produzido reage com o TPTZ presente na solução de teste, formando um complexo de intensidade azul que é medido colorimetricamente. Quanto maior o poder redutor da amostra, maior será a intensidade de azul observada (Benzie e Strain, 1996).

O ensaio ORAC foi originalmente desenvolvido por Cao e colaboradores (1993) e consiste em medir a capacidade do antioxidante em sequestrar radicais peroxila que são gerados por uma fonte radicalar: o AAPH quando a 37°C . A queda na fluorescência indica a extensão do dano causado pela reação da fluoresceína com os radicais gerados. O efeito protetor de uma amostra contendo antioxidante é mensurado pelo cálculo da área sob a curva de decaimento da fluorescência de uma determinada amostra. O ensaio ORAC permite o monitoramento do tempo e do grau de inibição durante o andamento da reação (Cao et al., 1993; Ou et al., 2001; Tomei e Salvador, 2007). Radicais peroxila são os radicais livres predominantes encontrados após a oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos sob condições fisiológicas. Assim, os valores ORAC são considerados por alguns como referência para a eficácia antioxidante, devido à sua relevância biológica (Shahidi e Zhong, 2015).

Assim como as metodologias amplamente empregadas para avaliar o potencial antioxidante, algumas substâncias autênticas são comumente utilizadas como controles positivos das reações. Um dos padrões utilizados neste trabalho, o Trolox, análogo solúvel em água do α -tocoferol, é utilizado pela sua alta capacidade antioxidante. O grupo carboxila presente no interior de sua estrutura, o torna solúvel em água, o que faz com que sua utilização seja mais vantajosa em relação a antioxidantes de caráter apolar, como por exemplo o α -tocoferol, solúvel em lipídeos (Poljšak e Raspor, 2008).

Nos parâmetros de miligramas equivalentes aos padrões Trolox e ácido rosmarínico (Tabela 2.1), as espécies que apresentaram maior potencial antioxidante em todos os ensaios foram *H. comaroides* e *H. meridionalis*, entretanto, o extrato bruto de *H. campestris* também se revelou um potencial redutor de ferro. No ensaio ORAC, todas as espécies apresentaram potencial para redução do radical peroxila.

Os resultados de CE_{50} (Tabela 2.2) corroboram os resultados anteriores pois podemos observar que os menores valores são observados para *H. comaroides* e *H. meridionalis*. Vale ressaltar que os valores obtidos para este parâmetro são inversamente proporcionais aos valores de equivalentes exibidos nas duas tabelas anteriores, portanto, quanto menor a CE_{50} da amostra, maior a capacidade antioxidante exercida por ela. Este parâmetro é o que revela a real capacidade

antioxidante da amostra testada, uma vez que contabiliza o potencial em diferentes concentrações, resultando em curvas dose-resposta. Além disso, este parâmetro pode sugerir, ainda, quais amostras seriam mais indicadas para um uso comercial, podendo-se estimar quanto efetivamente é necessário em massa de uma substância e, conseqüentemente de massa vegetal, para se obter uma determinada intensidade de resposta.

Tabela 2.2 – Concentração efetiva de extratos brutos de *Hyptis* seção *Peltodon* para se atingir 50% da capacidade antioxidante (CE₅₀) nos ensaios DPPH*, ABTS**, FRAP e ORAC.

Ensaio	CE ₅₀				
	Hcamp	Hcom	Hmer	Hrad	Trolox AR
DPPH*	72,4 ±12,5 ^a	29,5 ±1,7 ^c	34,2 ±3,9 ^c	52,7 ±9,9 ^b	9,4 7,5
ABTS**	19,2 ±3,8 ^a	8,8 ±0,8 ^c	9,9 ±1,1 ^c	15,5 ±2,8 ^b	4,3 2,2
FRAP*	16,3 ±4,8 ^a	6,2 ±0,3 ^c	8,3 ±1,0 ^c	11,4 ±1,7 ^b	3,1 0,9
ORAC**	1,5 ±0,4 ^a	1,0 ±0,2 ^b	1,1 ±0,3 ^{ab}	1,7 ±0,6 ^a	1,6 0,1

Hcamp: *H. campestris*, H. com: *H. comaroides*, Hmer: *H. meridionalis*, Hrad: *H. radicans*. *CE₅₀ expressa em µg mL⁻¹. **CE₅₀ expressa em uMol mL⁻¹. Análises estatísticas realizadas entre espécies (intraespecífica) e por ensaio sendo que médias com letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,05). AR: ácido rosmarínico.

Uma análise de correlação (Tabela 2.3) foi realizada a fim de verificarmos qual classe de substância poderia explicar o maior potencial antioxidante observado para algumas amostras. Para essa análise, utilizamos os valores de quantificações (mg g⁻¹) para as classes de fenólicos detectadas e os valores de CE₅₀, que indicam a capacidade antioxidante da amostra. O que observamos foi que os resultados de potencial antioxidante não se correlacionaram fortemente aos teores de substâncias fenólicas totais. É importante salientar que como utilizamos os valores de CE₅₀ devemos interpretar as correlações de modo inverso, ou seja, a menor CE₅₀ indica maior potencial e, portanto, correlações negativas são as que melhor caracterizam a relação composição vs. atividade. Dessa forma, esta análise indicou uma moderada correlação entre as CE₅₀ e os teores de ácido rosmarínico, evidenciando a importância desse constituinte para a maior atividade antioxidante do extrato. Em outras palavras, maiores conteúdos de ácido rosmarínico resultaram em menores CE₅₀ em todos os ensaios antioxidantes realizados, com exceção do ensaio ORAC que apresentou uma fraca correlação com o conteúdo de ácido rosmarínico.

As substâncias fenólicas possuem, em sua estrutura, vários grupos benzeno, tendo, em geral, alguns grupos hidroxila substituintes (Ángel e González, 1999). Os átomos de hidrogênio do grupo hidroxila adjacente (*orto*-difênil), localizado em várias posições dos anéis, as ligações duplas dos anéis benzênicos e a presença da carbonila (-C=O) de algumas moléculas de flavonoides, garantem a essas substâncias alta capacidade antioxidante (Hrazdina et al., 1970; Rice-Evans et al., 1996; Silva et al., 2002).

O potencial antioxidante de ácidos fenólicos e polifenóis também está relacionada a sua capacidade de liberar homoliticamente hidrogênio da ligação O-H e formar radicais estáveis tanto por ressonância química quanto por hiperconjugação. O padrão de hidroxilação e/ ou metoxilação influencia o potencial antioxidante dessas moléculas e pode retardar reações oxidativas em sistemas biológicos. Embora os ácidos fenólicos tenham sido relatados como menos eficientes na eliminação de radicais do que outras classes fenólicas (Hsieh et al., 2005; Farhoosh et al., 2016), algumas variações estruturais como a introdução de diferentes grupos de doação/ retirada de elétrons de várias posições do anel fenólico, podem promover maior capacidade antioxidante (Shahidi et al., 1992; Farhoosh et al., 2016).

Tabela 2.3 – Coeficientes de correlação simples de Pearson (r) para as variáveis de composição química por classes de substâncias fenólicas (exceto a classe das substâncias não identificadas; mg g⁻¹) e a atividade antioxidante (CE₅₀ µg mL⁻¹).

Variáveis	Derivados flavonoídicos	Ácido rosmarínico	Derivados clorogênicos	Nepetoidina B	Total de constituintes fenólicos	DPPH*	ABTS*	FRAP	ORAC
Derivados flavonoídicos	1,00								
Ácido rosmarínico	-0,31	1,00							
Derivados clorogênicos	-0,50	0,16	1,00						
Nepetoidina B	-0,46	0,08	0,45	1,00					
Total de constituintes fenólicos	0,67	0,27	0,09	-0,13	1,00				
DPPH*	0,19	-0,68	-0,05	-0,05	-0,08	1,00			
ABTS*	0,06	-0,67	0,02	0,01	-0,18	0,94	1,00		
FRAP	0,12	-0,68	0,03	0,14	-0,11	0,90	0,87	1,00	
ORAC	-0,35	-0,32	0,13	0,37	-0,39	0,55	0,66	0,56	1,00

Interpretação dos valores de r (+ou-): correlação pequena ou nula: 0,00 a 0,25 ou -0,25 a 0,00; correlação fraca: 0,25 a 0,50 ou -0,50 a -0,25; correlação moderada: 0,50 a 0,75 ou -0,75 a -0,50; correlação forte: 0,75 a 1,00 ou -1 a -0,75; correlação perfeita: 1,00 ou -1 (Vieira, 2008).

Flavonoides e outros derivados fenólicos são conhecidos por atuarem na captura e neutralização de espécies oxidantes como por exemplo o O²⁻ e OH⁻, muitas vezes atuando por sinergismo com outros agentes antioxidantes como as vitaminas C e E. Os flavonoides também podem atuar ligando-se a íons metálicos, impedindo-os de atuarem como catalisadores na produção de radicais livres. Devido a essas ações, às substâncias fenólicas são atribuídas diversas propriedades como quelante de ferro, sequestradora de radicais livres, estimulante de enzimas com capacidade antioxidante como a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD), entre outras (Zuanazzi et al., 2017).

Os ácidos fenólicos são geralmente divididos em dois grupos principais: derivados do ácido benzoico, contendo sete átomos de carbono (C₆-C₁) e derivados do ácido cinâmico, compreendendo nove átomos de carbono (C₆-C₃). Estes compostos existem predominantemente como ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos e podem ocorrer nas suas formas livres ou conjugadas

(Teixeira et al., 2013). Dados recentes apoiam sua aplicação benéfica como agentes preventivos e/ou terapêuticos contra o estresse oxidativo, que está relacionado ao surgimento de várias doenças, como aterosclerose, lesão inflamatória e câncer (Fresco et al., 2006; Razzaghi-Asl et al., 2013). A eficácia antioxidante dos ácidos hidroxicinâmicos parece ser dependente de suas características estruturais relacionada à presença de função(s) hidroxila(s) na estrutura aromática (Rice-Evans et al., 1996; Razzaghi-Asl et al., 2013).

Ácidos clorogênicos (CGA) são ésteres de ácidos hidroxicinâmicos e o ácido quinico. CGA mais comum é o formado pela esterificação do ácido cafeico em ácido quinico na posição 5 (Clifford et al., 2003; Razzaghi-Asl et al., 2013). Derivados de ácido clorogênico possuem uma variedade de potenciais biológicos que vão desde antifúngicas (Bowles e Miller, 1994; Ma et al., 2007), antivirais (Jassim e Naji, 2003; Wang et al., 2009) e neuroprotetores (Li et al., 2008), para efeitos antidiabéticos (Paynter et al., 2006; Karthikesan et al., 2010) e redução do colesterol (de Sotillo e Hadley, 2002; Razzaghi-Asl et al., 2013).

Entretanto, observando a tabela de correlação de Pearson (Tabela 2.3), houve pequena correlação entre a atividade antioxidante e o teor de derivados clorogênicos. Para as outras classes fenólicas também foram observadas baixas correlações. As diferenças observadas entre as amostras também podem estar relacionadas ao sinergismo entre os constituintes presentes no extrato.

Martins e colaboradores (2016), enfatizaram a importância de estudos como este e comentaram que o potencial antioxidante dos extratos vegetais é um dos temas mais relevantes dentro da comunidade científica. No entanto, ensaios *in vitro* são o alerta mais comum sobre a importância de continuar a pesquisa *in vivo* (Dai e Mumper, 2010; Larrosa et al., 2010; Rubió et al., 2013).

2.3.2. Variações no potencial antioxidante nos domínios fitogeográficos dos Cerrados e Tropical Atlântico.

Os resultados deste subtópico estão apresentados nas Tabelas 2.4, 2.5 e 2.6. Ao longo do texto, os resultados serão discutidos interespecificamente, ou seja, dentro de uma mesma espécie analisaremos os perfis das populações. Para facilitar a organização dos resultados, iniciaremos a discussão por espécies com populações que ocorrem nos dois domínios fitogeográficos propostos.

Com relação à capacidade antioxidante de *H. meridionalis* para os ensaios DPPH* e ABTS*, ambas as populações apresentaram alto potencial, independente do padrão utilizado como equivalência, entretanto, ao fazer a comparação entre as duas amostras, a população de Balsa Nova (TA, om/ at) apresentou maior potencial, sendo seu extrato bruto melhor sequestrador de radicais livres do que o da população de Jaguaraiáva (C, sav). Para os outros dois ensaios antioxidantes, FRAP e ORAC, não houve diferença no potencial antioxidante entre os extratos obtidos a partir das populações de Balsa Nova (TA, om/ at) e Jaguaraiáva (C, sav). Entretanto, no ensaio ORAC,

quando utilizamos o ácido rosmarínico como padrão de equivalência, a população de Balsa Nova (TA, om/ at) apresentou uma maior capacidade antioxidante quando comparada à população de Jaguariaíva (C, sav), sendo, portanto, melhor sequestradora de radicais peroxila quando comparada à população de Jaguariaíva (C, sav) (Tabela 2.5).

Tabela 2.4 – Capacidade antioxidante dos extratos brutos de *Hyptis* seção *Peltodon* nos ensaios DPPH*, ABTS*, FRAP e ORAC em relação ao padrão Trolox (mg g⁻¹).

Espécie, local de coleta, domínio fitogeográfico e fitofisionomia	DPPH*	ABTS*	FRAP*	ORAC**
Hcamp (Bur, C, ce)	140,0 ±11,5 ^a	329,2 ±91,6 ^a	444,0 ±20,4 ^a	5127,4 ±1525,6 ^a
Hcamp (Pir, C, ms)	112,8 ±9,5 ^a	261,3 ±38,4 ^a	386,0 ±16,3 ^a	4516,6 ±2340,7 ^a
Hcamp (RC, C, ce)	131,2 ±23,2 ^a	284,5 ±41,9 ^a	210,9 ±164,5 ^a	6613,6 ±1305,9 ^a
Hcom (Cur, TA, cam/ at)	326,3 ±29,8	581,5 ±94,9	718,7 ±95,0	6454,9 ±3278,4
Hmer (BN, TA, om/ at)	318,2 ±23,8 ^a	568,0 ±1,0 ^a	405,7 ±32,8 ^a	9259,5 ±4526,0 ^a
Hmer (Jag, C, sav)	266,3 ±11,3 ^b	446,3 ±24,3 ^b	388,1 ±47,0 ^a	4915,5 ±1080,3 ^a
Hrad (Av, ZT, es)	121,2 ±18,6 ^c	297,6 ±31,9 ^c	149,1 ±15,3 ^b	2896,4 ±293,3 ^c
Hrad (MG, C, ms)	145,8 ±6,2 ^{bc}	359,6 ±4,6 ^{bc}	244,6 ±6,3 ^{ab}	2204,4 ±783,7 ^c
Hrad (CGS, TA, om)	174,5 ±18,7 ^b	388,7 ±29,9 ^{ab}	336,1 ±128,2 ^a	7312,9 ±2328,1 ^a
Hrad (MC, TA, es)	226,8 ±2,3 ^a	441,3 ±6,1 ^a	326,0 ±58,4 ^a	3617,7 ±1312,5 ^c
Hrad (SA, TA, od)	117,6 ±21,1 ^c	442,7 ±48,7 ^a	288,3 ±44,1 ^{ab}	5822,5 ±1629,0 ^b

*: Resultados expressos em miligramas de substâncias equivalentes a Trolox/ grama de extrato seco (mg ET g⁻¹). **: Resultados expressos em micromol de substâncias equivalentes a Trolox/ grama de extrato seco (µM ET g⁻¹). Análises estatísticas realizadas entre populações da mesma espécie (interespecífica) e por ensaio sendo que médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,05). Hcamp: *H. campestris*, H. com: *H. comaroides*, Hmer: *H. meridionalis*, Hrad: *H. radicans*; Bur: Buriti (MT), Pir: Pirassununga (SP), RC: Rio da Casca (MT), Cur: Curitiba (PR), BN: Balsa Nova (PR), Jag: Jaguariaíva (PR), CGS: Campina Grande do Sul (PR), MC: Mogi das Cruzes (SP), SA: Santo André (SP), Av: Avaré (SP), MG: Mogi Guaçu (SP); C: cerrado, TA: Tropical Atlântico; ce: cerradão, ms: mata seca, camp/at: campo com ação antrópica, om/at: floresta ombrófila mista com ação antrópica, sav: savana, es: floresta estacional semidecidual, om: floresta ombrófila mista, od: floresta ombrófila densa; EB: extrato bruto, FH: fase hexânica, FD: fase de diclorometano, FAE: fase acetato de etila, FHA: fase hidroalcolica.

Analisando os resultados em concentração efetiva para atingir 50% da atividade antioxidante (CE₅₀), a diferença no potencial antioxidante entre as populações de *H. meridionalis* é confirmada para todos os ensaios realizados (Tabela 2.6). A população de ocorrência no domínio Tropical Atlântico apresenta significativamente maior potencial antioxidante quando comparada à população de ocorrência no domínio dos Cerrados.

Para *H. radicans*, considerando os valores de CE₅₀ (Tabela 2.6), observamos que as populações de Mogi das Cruzes (TA, es), Campina Grande do Sul (TA, om) e Santo André (TA, od) foram as que apresentaram maior capacidade antioxidante, para a maioria dos ensaios testados.

É muito interessante notar que as populações de *H. radicans* que apresentaram maior potencial antioxidante encontram-se em fitofisionomias inseridas no domínio Tropical Atlântico, assim como observado para *H. meridionalis*.

Tabela 2.5 – Capacidade antioxidante dos extratos brutos de *Hyptis* seção *Peltodon* nos ensaios DPPH*, ABTS*, FRAP e ORAC em relação ao padrão ácido rosmarínico (mg g⁻¹).

Espécie, local de coleta, domínio fitogeográfico e fitofisionomia	DPPH**	ABTS**	FRAP*	ORAC**
Hcamp (Bur, C, ce)	104,8 ±32,4 ^a	220,9 ±41,8 ^a	105,8 ±6,3 ^a	254,8 ±79,1 ^a
Hcamp (Pir, C, ms)	91,1 ±6,3 ^a	200,4 ±42,7 ^a	89,0 ±5,2 ^a	187,0 ±90,7 ^a
Hcamp (RC, C, ce)	103,8 ±15,6 ^a	188,7 ±20,3 ^a	83,2 ±56,9 ^a	259,8 ±47,0 ^a
Hcom (Cur, TA, camp/ at)	258,3 ±22,0	308,6 ±38,5	165,5 ±53,4	378,8 ±104,6
Hmer (BN, TA, om/ at)	252,6 ±16,0 ^a	303,8 ±16,5 ^a	110,5 ±19,7 ^a	520,4 ±196,9 ^a
Hmer (Jag, C, sav)	204,3 ±10,5 ^b	264,9 ±19,5 ^b	99,3 ±8,2 ^a	276,4 ±43,2 ^b
Hrad (Av, ZT, es)	92,0 ±16,7 ^c	195,0 ±8,3 ^c	38,5 ±2,7 ^b	128,1 ±6,5 ^b
Hrad (MG, C, ms)	108,2 ±4,4 ^c	211,6 ±12,5 ^{bc}	62,5 ±0,3 ^{ab}	157,0 ±96,0 ^b
Hrad (CGS, TA, om)	138,2 ±11,7 ^b	231,7 ±10,8 ^{ab}	85,8 ±24,7 ^a	327,1 ±69,4 ^a
Hrad (MC, TA, es)	177,1 ±7,7 ^a	250,4 ±13,5 ^a	89,6 ±6,5 ^a	234,7 ±74,0 ^b
Hrad (SA, TA, od)	92,8 ±15,8 ^c	251,2 ±12,2 ^a	79,9 ±8,4 ^a	267,2 ±42,1 ^b

*: Resultados expressos em miligramas de substâncias equivalentes a ácido rosmarínico/ grama de extrato seco (mg EAR g⁻¹). **: Resultados expressos em micromol de substâncias equivalentes a ácido rosmarínico/ grama de extrato seco (µM EAR g⁻¹). Análises estatísticas realizadas entre populações da mesma espécie (interespecífica) e por ensaio sendo que médias com letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,05). Hcamp: *H. campestris*, H. com: *H. comaroides*, Hmer: *H. meridionalis*, Hrad: *H. radicans*; Bur: Buriti (MT), Pir: Pirassununga (SP), RC: Rio da Casca (MT), Cur: Curitiba (PR), BN: Balsa Nova (PR), Jag: Jaguariaíva (PR), CGS: Campina Grande do Sul (PR), MC: Mogi das Cruzes (SP), SA: Santo André (SP), Av: Avaré (SP), MG: Mogi Guaçu (SP); C: cerrado, TA: Tropical Atlântico; ce: cerradão, ms: mata seca, camp/at: campo com ação antrópica, om/at: floresta ombrófila mista com ação antrópica, sav: savana, es: floresta estacional semidecidual, om: floresta ombrófila mista, od: floresta ombrófila densa; EB: extrato bruto, FH: fase hexânica, FD: fase de diclorometano, FAE: fase acetato de etila, FHA: fase hidroalcoólica.

H. comaroides foi coletada em apenas um local, entretanto fazendo uma comparação com as demais espécies, apresentou seu potencial antioxidante semelhante ao de *H. meridionalis*. Vale lembrar que as duas espécies apresentaram semelhanças em seu perfil químico como por exemplo no teor de ácido rosmarínico (Capítulo 1, Tabela 1.3).

De acordo com a literatura, em ensaios *in vivo*, polifenóis como ácido rosmarínico e flavonoides exercem efeitos citoprotetores ao aumentar a produção de prostaglandinas endógenas, reduzindo a secreção de histamina, inibindo o desenvolvimento de *Helicobacter pylori* e reduzindo a formação de espécies reativas de oxigênio (Alimi et al., 2011; Awaad et al., 2013; Yesilada et al., 2014). Tais moléculas podem aumentar a atividade de enzimas antioxidantes como SOD, glutathione

peroxidase (GPx) e glutiona redutase (GR), assim como quelar ferro e íons cobre, e inibir a reação de Fenton. Além disso, podem interferir no transporte de elétrons e nas reações de oxirredução, bem como reduzir os radicais lipídicos (Harborne e Williams, 2000; Zheng e Wang, 2001). Esses potenciais biológicos são principalmente correlacionados com a presença de grupos hidroxila doadores de elétrons e ligações duplas (De Lira Mota et al., 2009), como observado para rutina e quercetina, dois flavonóis (Pietta, 2000).

Tabela 2.6 – Concentração efetiva de extratos brutos de *Hyptis* seção *Peltodon* para se atingir 50% da capacidade antioxidante (CE₅₀) nos ensaios DPPH*, ABTS*, FRAP* e ORAC**.

Espécie, local de coleta, domínio fitogeográfico e fitofisionomia	DPPH*	ABTS*	FRAP*	ORAC**
Hcamp (Bur, C, ce)	65,5 ±10,7 ^a	16,3 ±2,4 ^b	12,6 ±1,8 ^b	1,3 ±0,2 ^b
Hcamp (Pir, C, ms)	80,3 ±0,9 ^a	23,1 ±0,6 ^a	16,8 ±1,0 ^{ab}	2,0 ±0,3 ^a
Hcamp (RC, C, ce)	72,7 ±13,8 ^a	17,9 ±2,7 ^b	19,5 ±5,6 ^a	1,3 ±0,2 ^b
Hcom (Cur, TA, cam/ at)	28,7 ±2,4	8,8 ±0,8	5,9 ±0,8	1,0 ±0,2
Hmer (BN, TA, om/ at)	30,5 ±2,1 ^b	8,9 ±0,7 ^b	7,5 ±0,8 ^b	0,8 ±0,2 ^b
Hmer (Jag, C, sav)	37,3 ±1,4 ^a	10,5 ±0,3 ^a	8,9 ±0,6 ^a	1,3 ±0,1 ^a
Hrad (Av, ZT, es)	70,9 ±10,5 ^a	19,4 ±1,3 ^a	20,7 ±2,5 ^a	2,3 ±0,2 ^a
Hrad (MG, C, ms)	58,7 ±1,6 ^b	16,8 ±0,0 ^{ab}	12,6 ±0,8 ^{ab}	2,2 ±0,8 ^b
Hrad (CGS, TA, om)	50,5 ±4,8 ^{bc}	15,6 ±1,1 ^b	12,6 ±1,4 ^{ab}	1,2 ±0,2 ^c
Hrad (MC, TA, es)	40,2 ±0,3 ^c	14,0 ±1,9 ^{bc}	9,6 ±1,1 ^{ab}	1,5 ±0,2 ^c
Hrad (SA, TA, od)	48,1 ±3,5 ^{bc}	11,9 ±1,0 ^c	10,6 ±1,0 ^b	1,3 ±0,1 ^c
Padrão Trolox	9,4	-	4,3	-
Padrão AR	7,5	-	2,2	-

*CE₅₀ expressa em ug mL⁻¹. **CE₅₀ expressa em uMol mL⁻¹. Análises estatísticas realizadas entre populações da mesma espécie (interespecífica) e por ensaio sendo que médias com letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,05). AR: ácido rosmarínico. Hcamp: *H. campestris*, H. com: *H. comaroides*, Hmer: *H. meridionalis*, Hrad: *H. radicans*; Bur: Burity (MT), Pir: Pirassununga (SP), RC: Rio da Casca (MT), Cur: Curitiba (PR), BN: Balsa Nova (PR), Jag: Jaguariáiva (PR), CGS: Campina Grande do Sul (PR), MC: Mogi das Cruzes (SP), SA: Santo André (SP), Av: Avaré (SP), MG: Mogi Guaçu (SP); C: cerrado, TA: Tropical Atlântico; ce: cerradão, ms: mata seca, camp/at: campo com ação antrópica, om/at: floresta ombrófila mista com ação antrópica, sav: savana, es: floresta estacional semidecidual, om: floresta ombrófila mista, od: floresta ombrófila densa; EB: extrato bruto, FH: fase hexânica, FD: fase de diclorometano, FAE: fase acetato de etila, FHA: fase hidroalcoólica.

Sevgi e colaboradores (2015) avaliaram a capacidade antioxidante de dez ácidos fenólicos: ácidos cafeico, clorogênico, cinâmico, ferulico, gálico, *p*-hidroxibenzoico, protocatecuico, rosmarínico, siríngico e vanílico, frente à quatro metodologias diferentes: o sistema β-caroteno/ácido linoleico, o sequestro de DPPH*, o poder redutor e o efeito quelante de metais. Segundo os autores, o ácido rosmarínico foi a substância que apresentou a maior capacidade antioxidante em todas as metodologias.

Observando os resultados do potencial antioxidante das diferentes populações de acordo com o parâmetro CE₅₀ (Tabela 2.6), podemos notar que os extratos brutos das espécies de *Hyptis* seção *Peltodon*, independentemente do local de coleta, se revelam promissores. Segundo Cos e colaboradores (2006) extratos brutos são geralmente considerados interessantes se os valores de CE₅₀ estiverem abaixo de 100 µg mL⁻¹, uma vez que constituem uma mistura complexa de constituintes. Os valores de CE₅₀ é muito importante pois permite compararmos os resultados das amostras com os padrões já conhecidos pela sua alta capacidade antioxidante. Nos ensaios DPPH[•], ABTS[•] e FRAP poucas amostras tiveram valores de CE₅₀ próximo ao valor dos padrões comerciais, entretanto, no ensaio ORAC, com exceção da população de *H. campestris* de Pirassununga (C, ms), e as populações de *H. radicans* de Avaré (ZT, es) e Mogi Guaçu (C, ms), as amostras apresentaram valores de CE₅₀ próximo ao valor apresentado pelo Trolox.

Atualmente, na literatura, há apenas um trabalho publicado com capacidade antioxidante de *H. campestris*, *H. meridionalis* e *H. comaroides* que foi desenvolvido por nosso grupo de pesquisa (dos Santos et al., 2018). *H. radicans* já foi avaliada quanto ao seu potencial de sequestro de DPPH[•] e FRAP sendo possível, portanto, fazermos algumas comparações. No presente trabalho, o menor valor de CE₅₀ quando observamos os resultados de DPPH[•] e FRAP de *H. radicans* foi 40,2 µg mL⁻¹ e 9,6 µg mL⁻¹, respectivamente, atribuído à população de Mogi das Cruzes (TA, es). Scio e colaboradores (2012), ao realizarem um ensaio de sequestro de DPPH[•], encontraram CE₅₀ de 4,5 µg mL⁻¹ para capacidade de sequestro do DPPH[•] e 23,2 µg mL⁻¹ para potencial redutor de ferro. Esperando encontrar resultados aproximados, pensamos em o que poderia ter causado essa diferença de valores. Um ponto que talvez possa ser levado em consideração é o local de coleta que, no trabalho de Scio e colaboradores (2012) foi Juiz de Fora, Minas Gerais.

A fim de melhor discutir as correlações observadas e facilitar ainda mais a visualização de todos os resultados deste subtópico, realizamos uma análise de componente principal (PCA) apresentada na Figura 2.1. Dessa forma, conseguimos ter uma visão geral de todos os resultados apresentados até este trecho do trabalho, além de confirmar as correlações discutidas.

Primeiramente, é importante observar que a Figura 2.1 mostra claramente as diferenças químicas entre as espécies, já que as populações da mesma espécie, mesmo coletadas em diferentes locais, aparecem agrupadas, ou seja, apresentam o mesmo perfil químico.

Conforme a Tabela 2.7, o eixo 1 apresenta como variável determinante para a separação das populações, seu potencial antioxidante. As amostras posicionadas no lado positivo desse eixo são as que apresentaram maior potencial antioxidante, sendo elas *H. comaroides* (Cur, TA, cam/ at) e *H. meridionalis* de ambos os locais, mas com a população de Balsa Nova (TA, om/ at) apresentando o maior potencial. O ácido rosmarínico também está posicionado no lado positivo o eixo 1, indicando a correlação existente entre tal substância e a capacidade antioxidante da amostra.

No eixo 2, as variáveis determinantes para a separação das amostras foram o teor de derivados flavonoídicos (negativamente correlacionado) e os teores de derivados clorogênicos e nepetoidina B (positivamente correlacionados). No lado negativo do eixo 2, estão as populações de *H. campestris*, corroborando os dados da Tabela 1.3 (ver Capítulo 1) onde tal espécie apresentou maior variedade de derivados flavonoídicos e maior teor dessa classe de fenólicos correlacionando-se também com o índice de precipitação acumulada. Apesar disso, as populações de *H. campestris*, de acordo com a PCA, apresentam fraca correlação com os ensaios antioxidantes.

Segundo um levantamento bibliográfico realizado Yang e colaboradores (2018), a síntese e o acúmulo de metabólitos secundários dependem criticamente das condições ambientais. Para a maioria das espécies vegetais, os fatores abióticos podem afetar significativamente alguns processos associados ao crescimento e desenvolvimento das plantas, até mesmo sua capacidade de sintetizar metabólitos secundários, levando à mudança geral no perfil fitoquímico que por sua vez, desempenha um papel estratégico na produção de substâncias bioativas (Pavarini et al., 2012; Verma e Shukla, 2015).

Resumidamente, os metabólitos secundários de plantas podem ser gerados gradualmente em resposta ao estresse ambiental e, portanto, o mesmo pode ser visto como um comportamento vegetal que é em parte a capacidade de adaptação e sobrevivência em resposta a estímulos ambientais durante a vida (Metlen et al., 2009), sendo essenciais para estabelecer relações ecológicas entre plantas e outros organismos.

Yang e colaboradores (2018) afirmam que a síntese de alguns produtos naturais pode ser alterada por diversos fatores abióticos. Como é sabido, alguns metabólitos secundários encontraram aplicações comerciais como drogas, cosméticos, inseticidas entre outros. Prospectivamente, o uso de estresses ambientais pode fornecer uma maneira potencial e lucrativa de aumentar o acúmulo de compostos bioativos, melhorar a qualidade e reduzir as pressões de colheita excessiva de plantas medicinais. Entretanto, um fator individual geralmente pode interagir com outros fatores (por exemplo, uma alta irradiação é frequentemente acompanhada de temperatura elevada e deficiência hídrica). Dessa forma, futuras pesquisas são essenciais a fim de investigar e melhor compreender os efeitos sinérgicos de múltiplos fatores ambientais no metabolismo secundário vegetal.

Análise de componente principal (PCA)

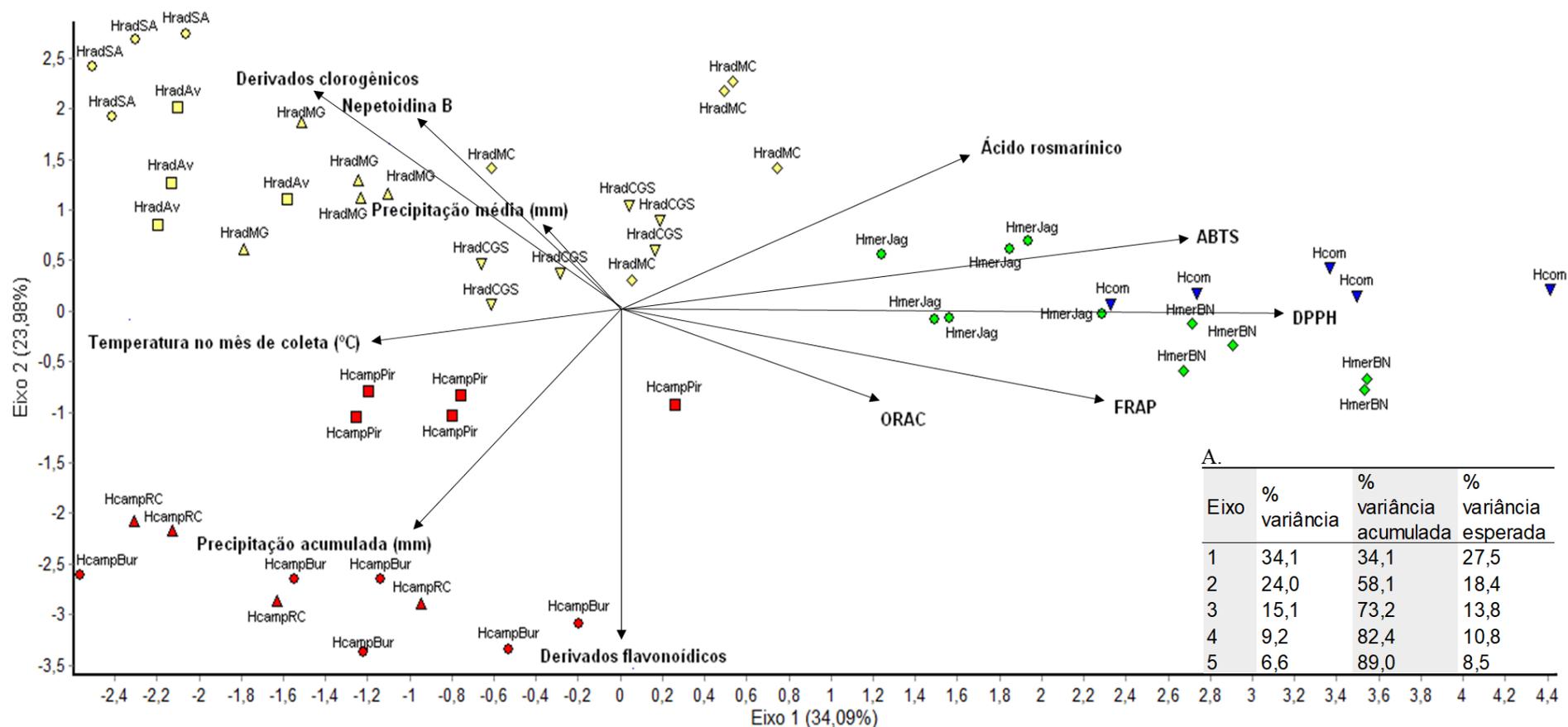


Figura 2.1 - Análise de componente principal de 10 variáveis relacionadas à temperatura no mês de coleta (°C), precipitação no mês de coleta (mm), teor de derivados flavonoidicos, ácido rosmarínico, derivados clorogênicos, nepetoidinas A e/ou B e potencial antioxidante do extrato bruto de *Hyptis* seção *Peltodon* frente aos ensaios do DPPH*, ABTS*, FRAP e ORAC. Hcamp: *H. campestris*, H. com: *H. comaroides*, Hmer: *H. meridionalis*, Hrad: *H. radicans*; Bur: Buriti (MT), Pir: Pirassununga (SP), RC: Rio da Casca (MT), Cur: Curitiba (PR), BN: Balsa Nova (PR), Jag: Jaguariaíva (PR), CGS: Campina Grande do Sul (PR), MC: Mogi das Cruzes (SP), SA: Santo André (SP), Av: Avaré (SP), MG: Mogi Guaçu (SP); C: cerrado, TA: Tropical Atlântico; ce: cerradão, ms: mata seca, camp/at: campo com ação antrópica, om/at: floresta ombrófila mista com ação antrópica, sav: savana, es: floresta estacional semidecidual, om: floresta ombrófila mista, od: floresta ombrófila densa; EB: extrato bruto, FH: fase hexânica, FD: fase de diclorometano, FAE: fase acetato de etila, FHA: fase hidroalcolica. A: Porcentagem de variância explicada pela análise e porcentagem de variância esperada estimada pelo teste da vara quebrada.

Tabela 2.7 – Coeficientes de correlação entre as variáveis utilizadas na análise de componente principal e os eixos 1 e 2 (Figura 2.1).

Variáveis	Eixo 1	Eixo 2
Temperatura no mês de coleta (°C)	-0,35	-0,01
Precipitação acumulada (mm)	-0,24	-0,36
Precipitação média (mm)	-0,17	0,25
Derivados flavonoídicos	0,01	-0,54
Ácido rosmarínico	0,31	0,32
Derivados clorogênicos	-0,21	0,42
Nepetoidina B	-0,17	0,42
DPPH	0,50	0,04
ABTS	0,43	0,17
FRAP	0,37	-0,12
ORAC	0,20	-0,14

2.4. Considerações finais

Este capítulo avaliou o potencial antioxidante dos extratos brutos de *Hyptis* seção *Peltodon* e se espécies coletadas em diferentes fitofisionomias apresentam diferentes potenciais antioxidantes. A abordagem que relaciona fatores abióticos com a composição química, bem como o potencial biológico de espécies vegetais é relativamente recente.

As espécies que apresentaram maior potencial antioxidante na maioria dos ensaios foram *H. comaroides* e *H. meridionalis*, entretanto, o extrato bruto de *H. campestris* também se revelou um potencial redutor de ferro.

Com relação ao potencial antioxidante das espécies coletadas em diferentes fitofisionomias, podemos fazer as seguintes observações:

1. A população de *H. campestris* de Pirassununga, quando comparada às populações dessa espécie coletadas em Mato Grosso, apresentou diferente CE₅₀ nos ensaios ABTS* E ORAC, e isso talvez possa ser explicado pelos fatores meteorológicos e/ ou fitofisionômicos do local de coleta, uma vez que as três populações se encontram no domínio dos Cerrados.

2. A população de *H. meridionalis* de Balsa Nova (TA, om/ at) apresentou o maior potencial antioxidante nos ensaios DPPH* e ABTS*, sendo seu extrato bruto melhor sequestrador de radicais livres do que o da população de Jaguariaíva (C, sav);

3. As populações de *H. radicans* que apresentaram maior potencial antioxidante encontram-se em fitofisionomias inseridas no domínio Tropical Atlântico, assim como observado para *H. meridionalis*.

Portanto, com relação ao potencial antioxidante das espécies coletadas nos dois domínios fitogeográficos, concluímos que para o grupo estudado e para as substâncias analisadas, populações

que ocorrem no domínio Tropical Atlântico são mais ativas e, conseqüentemente, melhores candidatas para uso como fonte de antioxidantes naturais.

H. comaroides comparada com as demais espécies, apresentou seu potencial antioxidante semelhante ao de *H. meridionalis*, ressaltando que as duas espécies apresentaram semelhanças em seu perfil químico como por exemplo o teor de ácido rosmarínico.

As espécies vegetais possuem uma infinidade de substâncias com propriedades bioativas, e entre elas está o potencial antioxidante intrínseco, que tem sido relacionado principalmente com a presença de substâncias fenólicas em sua composição. Apesar disso, os mecanismos de ação desses fitoquímicos, seus efeitos *in vivo*, sua biodisponibilidade e bioeficácia ainda são informações escassas e carentes de estudo (Martins et al., 2016).

Capítulo 3. Potencial anti-HIV-1 de *Hyptis* Jacq. seção *Peltodon*

Abstract

After more than 30 years, AIDS continues to be one of the most serious global health challenges. Globally, HIV remains the fifth leading cause of death among adults and the leading cause of death for women aged 15-49. It is undeniable that the available drug-combination therapy for anti-HIV has promoted longer time and quality of life for patients. On the other hand, the emergence of virus resistance, in addition to the side effects and long-term treatment are the main causes for the failure of antiretroviral therapy. It is urgent the discovery of new drugs for the treatment of cancer, HIV, infectious diseases, as well as other diseases, requiring multidisciplinary exploitation; natural sources have played a vital role in this process. The objective of this study was to evaluate the anti-HIV-1 potential of *Hyptis* spp. In addition, we compared the anti-HIV-1 potential of species naturally occurring in distinct phytogeographies: Brazilian Savannahs and Tropical Atlantic. *H. comaroides* and *H. meridionalis* showed promising anti-HIV-1 activity, acting mainly inhibiting the reverse transcriptase activity. These results seem not to be influenced by the collection site of the species. Substances, when isolated, presented less activity than the crude extracts, suggesting the existence of synergism among constituents present in the phases and crude extracts.

Resumo

Após mais de 30 anos, a AIDS continua a ser um dos mais sérios desafios mundiais à saúde. Globalmente, o HIV continua a ser a quinta principal causa de morte entre adultos e a principal causa de morte de mulheres entre 15 e 49 anos. É inegável que a terapia combinada de medicamentos anti-HIV atualmente disponível promoveu maior tempo e qualidade de vida aos pacientes. Por outro lado, o surgimento de resistência ao vírus HIV, além dos efeitos colaterais e longo prazo do tratamento são as principais causas para o fracasso da terapia antirretroviral. A necessidade urgente da descoberta de novos fármacos para o tratamento de câncer, HIV, doenças infecciosas, bem como uma série de outras doenças, exige uma exploração vigorosa multidisciplinar, e as fontes naturais vem desempenhando um papel imprescindível neste processo. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial anti-HIV-1 de *Hyptis* seção *Peltodon*. Além disso, comparamos esse potencial nas espécies de ocorrência em fitofisionomias distintas: Cerrados e Tropical Atlântico. *H. comaroides* e *H. meridionalis* apresentaram atividade promissora como agentes anti-HIV-1, atuando principalmente na inibição da enzima transcriptase reversa sendo que tais resultados não parecem sofrer influência do local de coleta da espécie. As substâncias majoritárias das fases mais ativas, quando isoladas, apresentaram menor atividade, sugerindo a existência de sinergismo entre os constituintes presentes nas fases e extratos brutos.

3.1. Introdução

3.1.1. AIDS no mundo e aspectos do ciclo de vida do vírus HIV

A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) é uma doença pandêmica que tem como agente etiológico o vírus HIV (Human immunodeficiency virus), um retrovírus pertencente à subfamília *Lentivirinae*. Retrovírus são vírus que contêm RNA como material genético (Gallo e Montagnier, 1988). O alvo principal do vírus HIV durante a infecção é o linfócito T CD4+. Devido a isso, o quadro clínico da AIDS é caracterizado em função da contagem sanguínea de linfócitos T CD4+ no indivíduo infectado além da caracterização das condições clínicas relacionadas à infecção pelo HIV (Fauci, 1987).

A AIDS continua sendo um grande problema de saúde mundial que já causou cerca de 25 milhões de mortes e conseqüentemente profundas mudanças demográficas nos países mais afetados nos últimos 27 anos. Globalmente, havia cerca de 33 milhões de pessoas vivendo com o HIV em 2008. Os jovens entre os 15 e os 24 anos representam cerca de 45% das novas infecções pelo HIV em todo o mundo (Singh e Bodiwala, 2010).

Após mais de 30 anos, a AIDS continua a ser um dos mais sérios desafios mundiais à saúde. Globalmente, o HIV continua a ser a quinta principal causa de morte entre adultos e a principal causa de morte de mulheres entre 15 e 49 anos (Unaid, 2016). Em 2015, 36,7 milhões de pessoas viviam com HIV. Apesar da queda geral no número de pessoas recém-infectadas pelo vírus, 2,1 milhões de pessoas o adquiriram em 2015. Apenas em 2015, 1,1 milhão de pessoas morreram de causas relacionadas à AIDS em todo o mundo e 17 milhões dos infectados tiveram acesso à terapia antirretroviral (Unaid, 2016). No Brasil, em 2014, estima-se que existiam cerca de 734 mil pessoas vivendo com HIV. De acordo com o Ministério da Saúde, desde o início da epidemia, em 1980, até junho de 2011, foram registrados 608.230 casos de AIDS (condição em que a doença já se manifestou). Somente em 2014 estima-se que ocorreram 44 mil novas infecções, e 16 mil mortes relacionadas à AIDS (Unaid, 2016).

O ciclo de replicação do vírus HIV envolve uma série de eventos que se iniciam com a ligação da partícula viral a receptores específicos na superfície da célula alvo, sendo essa interação mediada por uma glicoproteína do envelope do vírus. A proteína responsável pelo reconhecimento do HIV por suas células alvo é a gp120 e o principal co-receptor para HIV-1 é o CD4, uma proteína tipo imunoglobulina (Ig) expressa na superfície de células T e macrófagos primários. Para que ocorra a ligação do vírus à membrana celular da célula alvo, somente a interação gp120-CD4 não é suficiente, ocorrendo daí a mobilização de um grupo de quimiocinas, essenciais ao reconhecimento da célula alvo. Após a ligação à membrana celular, uma série de mudanças conformacionais promovem a fusão vírus-célula. Após essa etapa, o capsídeo do vírion é então desencapado ocorrendo assim a liberação do conteúdo do capsídeo (RNA genômico e enzimas virais) para o

citoplasma da célula afetada. É nesse momento que a transcriptase reversa (RT) participa da síntese de uma cópia de DNA de fita dupla formando um complexo nucleoprotéico que é rapidamente transportado para o núcleo da célula hospedeira. Por ação de enzimas como a integrase, ocorre a integração do cDNA do genoma viral no DNA cromossômico. Uma vez que o pró-vírus é integrado ao DNA hospedeiro, RNAs virais são transcritos e transportados para o citoplasma onde serão traduzidos. A tradução dos mRNAs virais fornece uma série de proteínas e poliproteínas que, após uma série de modificações, atuam na montagem do vírus. Os vírions são inicialmente montados próximos à membrana celular e neste momento são compostos de um envelope glicoproteico, RNA genômico e poliproteínas virais. Neste processo, denominado “brotamento”, as partículas virais passam por uma modificação morfológica conhecida como maturação. É na maturação que ocorre a clivagem de certas poliproteínas pela enzima protease, dando origem a outras enzimas e a proteínas estruturais do capsídeo, completando o ciclo de replicação do HIV. Os vírions maduros, por sua vez, são capazes de infectar um linfócito adjacente (Peçanha et al., 2002; Singh e Bodiwala, 2010; Andrae-Marobela et al., 2013).

É inegável que a terapia combinada de medicamentos anti-HIV atualmente disponível promoveu maior tempo e qualidade de vida aos pacientes diagnosticados com HIV/Aids. Por outro lado, o surgimento de resistência ao vírus HIV, além dos efeitos colaterais e longo prazo do tratamento são as principais causas para o fracasso da terapia antirretroviral (ART).

Segundo Kharytonchyk e colaboradores (2016), um dos principais contribuintes para a variação genética do HIV-1 são erros da transcriptase reversa. Algumas mutações ocorrem porque a transcriptase reversa não possui uma exonuclease de revisão de 3' a 5', o que pode estender as incompatibilidades. No entanto, a transcriptase reversa também é capaz de “retirar” nucleotídeos terminais numa extensão limitada revertendo os possíveis erros (Arion et al., 1998; Sarafianos et al., 2009). Esta reação contribui para a resistência à azidotimidina (AZT), e os resultados da transcrição reversa *in vitro* sugerem que ela também contribua para a fidelidade da replicação (Bampi et al., 2006).

Portanto, sabendo que a mutação do vírus é um processo talvez “inevitável”, além de procurar desvendar mais etapas sobre o seu mecanismo de ação, é também interessante o foco em pesquisas que tem como objetivo encontrar moléculas candidatas para baratear custos do tratamento, além de torná-lo mais acessível e principalmente ter menor efeito colateral do que o coquetel oferecido atualmente.

Para tanto, produtos naturais tem sido uma fonte de sucesso na descoberta de novos medicamentos anti-HIV. Muitas substâncias com tal efeito vêm sendo sintetizadas a partir de produtos naturais e as descobertas são cada vez mais promissoras. A maior parte delas inibe a ação do vírus em quase todas as fases de seu ciclo de vida (Wang et al., 2004). Tais substâncias incluem

os alcaloides, polissacarídeos sulfatados, polifenóis como os flavonoides, cumarinas derivados *O*-cafeoil, lignanas e taninos, triterpenos, lectinas, floroglucínóis, lactonas, iridoídes, depsídonas, proteínas inativadoras de ribossomo, saponinas, xantonas, naftodiantronas, fotossensibilizadores, fosfolipídeos, quininas, peptídeos, entre outros (Ng et al., 1997; Vlietinck et al., 1998; Yang e Cragg, 2001; Cary e Peterlin, 2018).

Segundo Peçanha e colaboradores (2002), diversas etapas do ciclo replicativo do HIV foram identificadas como alvos para intervenção terapêutica. Muitos estudos vêm sendo conduzidos a fim de descobrir novas drogas que atuem como inibidores de transcriptase reversa, protease e integrase, inibidores de adsorção viral, inibidores da fusão vírus-célula e inibidores do escapeamento viral. Entretanto, os estudos atuais estão voltados aos inibidores de transcriptase reversa (Andréola, 2009; Lee et al., 2010; César et al., 2011; Kwon et al., 2012), protease e integrase (Brik and Wong, 2003; Andréola, 2009; Filho et al., 2010; Hu et al., 2012) e inibidores de replicação (Bedoya et al., 2010; Leteane et al., 2012).

A necessidade urgente da descoberta de novos fármacos para o tratamento de câncer, HIV, doenças infecciosas, bem como uma série de outras doenças, exige uma exploração vigorosa multidisciplinar, e é claro que as fontes naturais vem desempenhando um papel imprescindível neste processo (Newman e Cragg, 2016).

O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial anti-HIV-1 dos extratos brutos fases de *Hyptis* seção *Peltodon*. Além disso, novamente comparamos esse potencial nas espécies de ocorrência em fitofisionomias distintas: Cerrados e Tropical Atlântico.

3.2. Material e métodos

3.2.1. Produção dos extratos, fases e isolados para avaliação de potencial anti-HIV-1

Os extratos e fases analisadas foram obtidos e quantificados conforme as metodologias descritas no Capítulo 1 (ver página 30). Entretanto, como os *kits* para os ensaios anti-HIV-1 utilizados nesse trabalho são restritos à certa quantidade de amostras, além do fato de possuírem um alto custo, realizamos as análises apenas com um indivíduo para cada local de coleta.

Amostras que resultaram em alta atividade foram selecionadas para o isolamento de seus constituintes. Para o isolamento de substâncias alvo as amostras foram retomadas em DMSO 10% e submetidas à CLAE-DAD semi-preparativa no sistema Agilent 1200, com coluna de fase reversa Zorbax Eclipse XDB C18 (9,4 x 250 mm x 5 µm) a 40°C. Como fase móvel foram usados ácido acético 0,1% (AcOH, Synth®) e acetonitrila (CH₃CN, J. T. Backer®), começando a metodologia com 15% de CH₃CN (0 min) e aumentando para 100% (20-25 min), com 5 min de *post-run* na sequência. O fluxo de solvente foi de 4,18 mL min⁻¹. O volume de amostra injetada foi de 200 µL

por injeção. Após o isolamento as amostras foram liofilizadas e avaliadas quanto ao seu grau de pureza utilizando CLAE-DAD descrita no Capítulo 1 (ver página 30).

3.2.2. Avaliação do efeito anti-HIV-1 pela inibição da atividade da transcriptase reversa

Foi avaliada a capacidade anti-HIV-1 dos extratos brutos, fases após partição e substâncias isoladas de *Hyptis* seção *Peltodon*, pelo efeito inibidor sobre a transcriptase reversa. Os ensaios foram realizados por meio de método colorimétrico que tem a vantagem de não necessitar do uso de radioisótopos, como as técnicas tradicionais com [3H]-dTTP. A atividade foi medida com o uso do *Kit* Reverse Transcriptase Assay colorimetric Roche cat. No.11468120910, conforme instruções do fabricante. As amostras foram testadas em duplicata, em sete diferentes concentrações entre 6,25 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em DMSO (dimetilsulfoxido) 10% e para cada 20 μL da amostra foram adicionados 200 μL da solução com marcação de digoxigenina (DIG) na concentração de 200 μM . As soluções foram incubadas por 2 h a 37°C. Após, foram adicionados a cada amostra, 200 μL da solução anti-DIG-POD e posteriormente o substrato ABST. Como inibidor de transcriptase reversa HIV-1 foi utilizado o antiviral Foscarnet sódico (ou Foscavir®). Foi feita leitura da absorbância em 405 nm/490 nm (A405/490) (Wang *et al.*, 2008) em leitor de microplacas BioTek modelo Synergy™ H1 Hybrid Multi-Mode Reader. A inibição da atividade anti-HIV-1 foi calculada usando a fórmula [(Absorbância do controle negativo – Absorbância da amostra)/(Absorbância do controle negativo)] x 100. Para cada amostra foi construída uma curva de regressão (para curvas consultar o Anexo) entre a porcentagem de atividade e a concentração de amostra utilizada, encontrando-se os valores de MIC₅₀.

3.2.3. Avaliação do efeito anti-HIV-1 pela inibição da atividade da protease

Foi avaliada a capacidade anti-HIV-1 pelo efeito inibidor sobre a enzima protease de HIV-1. A atividade foi medida com o uso do *Kit* fluorométrico de triagem para inibidor de Protease HIV-1 (BioVision), conforme instruções do fabricante, com algumas modificações. As amostras foram testadas em duplicata, em sete diferentes concentrações entre 6,25 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em tampão de ensaio e para cada 10 μL da amostra foram adicionados 80 μL da solução de reação preparada diluindo a enzima em 70 μL de tampão de diluição. Após 15 minutos em temperatura ambiente, adicionamos 10 μL de solução de substrato de protease que por sua vez foi feita diluindo 1 μL de substrato de protease em 9 μL de tampão de ensaio. A fluorescência foi medida em 330 nm de emissão e 450 de excitação em modo cinético durante 3 horas a 37°C em leitor de microplacas BioTek modelo Synergy™ H1 Hybrid Multi-Mode Reader. Foram escolhidos dois pontos dentro do intervalo linear e foram obtidos seus valores correspondentes a fluorescência (RFU₁ e RFU₂). Foi calculada a inclinação da curva para todas as amostras, incluindo o branco, dividindo as “nets

ΔRFU ” ($\text{RFU}_2 - \text{RFU}_1$) pelo tempo ΔT ($T_2 - T_1$). Com tais valores foi calculada a porcentagem que por sua vez foram utilizados para o cálculo da MIC_{50} , nos casos em que foi possível a obtenção e curva logarítmica (para curvas consultar o Anexo).

3.3. Resultados e discussão

O ensaio de inibição da enzima transcriptase reversa foi escolhido com base em testes preliminares realizados no laboratório de fitoquímica onde *H. radicans* e *H. comaroides* mostraram-se altamente promissoras na inibição da atividade da enzima transcriptase reversa (HIV-1) (Sedano Partida et al., 2014; Partida et al., 2015). Os resultados das análises realizadas com os extratos brutos estão apresentados na Tabela 3.1. Estes resultados sugerem alto potencial inibitório de *H. meridionalis* e *H. comaroides* frente à enzima transcriptase reversa. Na Tabela 3.2 podemos encontrar os resultados da análise das espécies por ambiente.

Tabela 3.1 - Inibição da enzima transcriptase reversa HIV-1 do extrato bruto de *Hyptis* seção *Peltodon* expressa em MIC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

Espécie	EB
Hcamp	377,3 \pm 92,3
Hcom	17,9 -
Hmer	17,7 \pm 9,0
Hrad	223,7 \pm 45,4

Hcamp: *H. campestris*, Hcom: *H. comaroides*, Hmer: *H. meridionalis*, Hrad: *H. radicans*; EB: extrato bruto.

Conforme citado anteriormente, várias espécies pertencentes a Lamiaceae apresentam algum tipo de potencial biológico, entretanto, não há relatos na literatura sobre o potencial biológico de *H. comaroides* e *H. meridionalis*, espécies que apresentaram extratos brutos com alta atividade de inibição da atividade da transcriptase reversa (HIV-1): MIC_{50} de 17,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 17,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Sabe-se que, geralmente, extratos brutos são considerados ativos se os valores de MIC_{50} estiverem abaixo de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, assim como substâncias isoladas são consideradas ativas quando sua MIC_{50} é menor do que 25 μM (Cos et al., 2006; Brusotti et al., 2014).

Yamasaki e colaboradores (1998), testaram 46 espécies de Lamiaceae frente à uma cultura celular infectada com o vírus HIV-1 que por sua vez foi isolado de um paciente infectado. Algumas espécies apresentaram atividade antiviral bem próximas às das espécies deste estudo como por exemplo *Lavandula angustifolia* Mill. (MIC_{50} : 123 $\mu\text{g mL}^{-1}$), *Mentha spicata* L. (MIC_{50} : 117 $\mu\text{g mL}^{-1}$), *Ocimum basilicum* L. (MIC_{50} : 76 $\mu\text{g mL}^{-1}$), *Ocimum basilicum* cv “cinnamon” (MIC_{50} : 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$), *Origanum majorana* L. (MIC_{50} : 140 $\mu\text{g mL}^{-1}$), *Origanum vulgare* L. (MIC_{50} : 79 $\mu\text{g mL}^{-1}$), *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq. (MIC_{50} : 24 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e *Thymus quinquecostatus* Celak. (MIC_{50} :

128 $\mu\text{g mL}^{-1}$). De acordo com esses resultados, os autores enfatizaram que as atividades não se devem às substâncias apolares pois os extratos com maiores teores de tais substâncias não apresentaram atividade anti-HIV-1. Com isso, sugerem que o efeito inibitório da replicação do HIV-1 deu-se principalmente devido aos compostos polares e mais solúveis em água que faziam parte dos extratos aquosos e hidroalcoólicos (70%) dessas espécies, assim como observado para as espécies de *Hyptis* testadas no presente estudo.

Tabela 3.2 - Inibição da enzima transcriptase reversa HIV-1 do extrato bruto e fases de *Hyptis* seção *Peltodon* expressa em MIC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

Espécie, local de coleta, domínio fitogeográfico e	EB	Fases		Padrão
		FAE	FHA	
Hcamp (Bur, C, ce)	358,2	-	-	-
Hcamp (Pir, C, ms)	477,6	-	-	-
Hcamp (RC, C, ce)	296,0	-	-	-
Hcom (Cur, TA, cam/ at)	17,9	-	38,7	-
Hmer (BN, TA, om/ at)	11,4	-	22,1	-
Hmer (Jag, C, sav)	24,1	64,5	-	-
Hrad (Av, ZT, es)	176,2	-	-	-
Hrad (MG, C, ms)	545,8	-	-	-
Hrad (CGS, TA, om)	90,9	-	-	-
Hrad (MC, TA, es)	185,8	-	-	-
Hrad (SA, TA, od)	119,6	-	-	-
Foscarnet [®]	-	-	-	0,3

Hcamp: *H. campestris*, Hcom: *H. comaroides*, Hmer: *H. meridionalis*, Hrad: *H. radicans*; Bur: Buriti (MT), Pir: Pirassununga (SP), RC: Rio da Casca (MT), Cur: Curitiba (PR), BN: Balsa Nova (PR), Jag: Jaguariaíva (PR), CGS: Campina Grande do Sul (PR), MC: Mogi das Cruzes (SP), SA: Santo André (SP), Av: Avaré (SP), MG: Mogi Guaçu (SP); C: cerrado, TA: Tropical Atlântico; ce: cerradão, ms: mata seca, camp/at: campo com ação antrópica, om/at: floresta ombrófila mista com ação antrópica, sav: savana, es: floresta estacional semidecidual, om: floresta ombrófila mista, od: floresta ombrófila densa; EB: extrato bruto, FAE: fase acetato de etila, FHA: fase hidroalcoólica.

Tal resultado nos levou a pensar que *H. comaroides* e *H. meridionalis* seriam interessantes candidatos para o isolamento de substâncias com potencial anti-HIV-1. A fase mais ativa para ambas as espécies foi a hidroalcoólica (FHA), sendo esta escolhida para o isolamento de seus constituintes majoritários: vicenina-2 e cirsimarina (substâncias **2** e **11**, respectivamente, Tabela 1.2, Capítulo 1). Além disso, ao observar tal potencial, também testamos a mistura desses extratos brutos simplesmente unindo 1 mg de cada extrato e solubilizando em 2 mL de DMSO 10%. Entretanto, conforme podemos observar na Tabela 3.3, as substâncias isoladas não foram igualmente ativas aos seus extratos brutos de origem.

A vicenina-2 foi descrita pela primeira vez em 1986 por Darbour e colaboradores em *Ballota foetida* Lam. (Lamiaceae). Apesar de não haver relatos dessa substância em *Hyptis*, ela pode ser encontrada na composição de diversas espécies de Lamiaceae como por exemplo *Ocimum gratissimum* Forssk. (Casanova et al., 2014), *Thymus vulgaris* L. e *Origanum vulgare* L. (Regnault-

Roger et al., 2004), sendo, desta forma, relatada pela primeira vez em espécies de *Hyptis*, conforme relatado no Capítulo 1.

Tabela 3.3 - Inibição da enzima transcriptase reversa HIV-1 (MIC_{50} ; $\mu\text{g mL}^{-1}$) da mistura e isolados obtidos de *Hyptis comaroides* e *H. meridionalis*.

Substância ^{**}	Amostra	MIC_{50}
-	Ácido rosmarínico ^P	-
-	Mistura	44,0
2	Vicenina-2	85,8
11	Cirsimarina	44,3
35 [*]	Nepetoidina B	-
40 [*]	Cirsimaritina	-

^{**}: Numeração equivalente às substâncias presentes na Tabela 1.2 do Capítulo 1.

^{*}: Substâncias isoladas e gentilmente cedidas pela Dra. Martha Dalila Sedano-Partida.

^P: Padrão comercial.

A cirsimarina foi descrita pela primeira vez em 1979 por Yun e Chang em *Cirsium pendulum* Fisch (Asteraceae). Assim como a substância anterior, até o momento, a cirsimarina não foi reportada em *Hyptis* mas sim em uma espécie da mesma família: *Teucrium arduini* L. (Lamiaceae) (Vukovic et al., 2011), sendo também frequentemente reportada em *Microtea debilis* Sw. (Microteaceae) (Hasrat et al., 1997).

Para a vicenina-2 e para a cirsimarina, os valores de MIC_{50} encontrados em $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 3.3), correspondem a 144,8 μM e 92,9 μM , respectivamente. Conforme citado anteriormente, substâncias isoladas são consideradas ativas quando sua MIC_{50} é menor do que 25 μM (Cos et al., 2006; Brusotti et al., 2014). Apesar das duas substâncias isoladas não apresentarem um potencial anti-HIV-1 efetivo, tentamos estabelecer uma relação estrutura-atividade, uma vez que a cirsimarina apresentou o dobro da capacidade antiviral, em ambos os ensaios, quando comparada à vicenina-2.

Os flavonoides são substâncias fenólicas hidroxiladas e a atribuição de suas atividades farmacológicas está diretamente ligada à conformação de sua estrutura. A natureza química dos flavonoides depende da sua classe estrutural, do seu grau de hidroxilação e outras substituições, conjugações e grau de polimerização (Heim et al., 2002). Devido a isso, é importante que seja observada a diferença estrutural entre as duas substâncias.

A cirsimarina, além ser um monoglicosídeo substituído em 4', apresenta duas metoxilas (OCH_3) em sua estrutura, sendo uma na posição 6 e a outra na posição 7 (Figura 3.1, A). Já a vicenina-2, uma C-diglicosídeo, não possui metoxilas em sua estrutura (Figura 3.1, B).

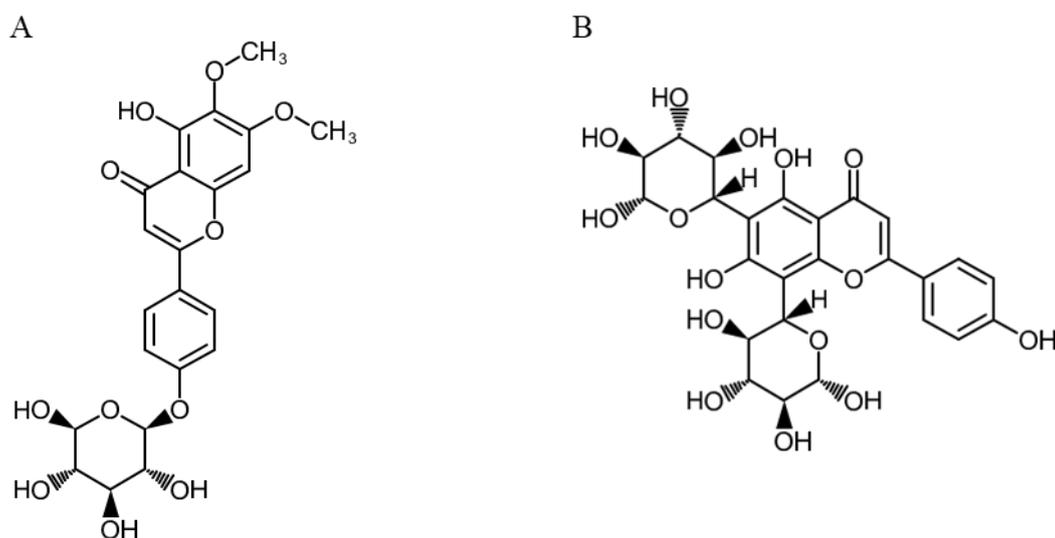


Figura 3.1 – Estrutura química da cirsimarina (A) e vicenina-2 (B).

Wu e colaboradores (2003) investigaram a atividade anti-HIV de cinco classes de flavonoides agliconas: flavonas, flavanonas, flavanas, chalconas, além de dois outros derivados flavonoídicos. A flavona dimetoxilada analisada no referido estudo, não apresentou atividade antiviral. Entretanto, pela primeira vez na literatura, esses autores revelaram uma potente atividade de uma chalcona (2-metoxi-3-metil-4,6-dihidroxi-5-(30-hidroxi) cinamoilbenzaldeído) apresentando inclusive a mesma MIC_{50} ($0,022 \mu\text{g mL}^{-1}$) que o padrão AZT. Interessantemente, outra chalcona testada com uma hidroxila ao invés de um grupo metoxila em C2, se mostrou inativa. Dessa forma, foi inferido que um grupo metoxila em C2 no esqueleto de chalconas pode ser imprescindível para a atividade anti-HIV (Wu et al., 2003). Tais estudos talvez possam explicar, apesar da baixa atividade antiviral, o maior resultado anti-HIV-1 apresentado pela cirsimarina quando comparada ao da vicenina-2.

Não foi encontrado na literatura nenhum relato sobre qualquer atividade anti-HIV-1 da cirsimarina, entretanto, felizmente, diversos estudos com flavonoides vêm sendo reportados afim de entender melhor sua ação antiviral. Cole e colaboradores (2016) testaram 33 flavonoides frente à atividade anti-HIV, concluindo que compostos que continham uma conformação α - ou β -hidroxicarbonila eram tipicamente mais potentes, relacionando novamente a estrutura da molécula com atividade antiviral.

Também foram testadas duas outras substâncias isoladas de *Hyptis* pela Dra. Matha Dalila Sedano-Partida, a cirsimaritina e a nepetoidina B, assim como o ácido rosmarínico obtido comercialmente. Nenhuma delas apresentou potencial antirretroviral.

Para o ensaio de inibição da enzima protease (Tabela 3.4), foram selecionadas as amostras que apresentaram MIC_{50} menor de $90 \mu\text{g mL}^{-1}$ no ensaio anti-RT.

Tabela 3.4 - Inibição da enzima protease HIV-1 de amostras de *Hyptis* Jacq. seção *Peltodon* expressa em porcentagem de atividade para a concentração de 100 µg mL⁻¹ e MIC₅₀ (µg mL⁻¹).

Espécie, local de coleta, domínio fitogeográfico e fitofisionomia	EB		Fases				Mistura		Isolados	
	%	MIC ₅₀	FAE		FHA		%	MIC ₅₀	%	MIC ₅₀
			%	MIC ₅₀	%	MIC ₅₀				
Hcom (Cur, TA, cam/ at)	54,4	12,9	-	-	47,1	21,1	-	-	-	-
Hmer (BN, TA, om/ at)	56,9	11,2	-	-	100,0	4,8	-	-	-	-
Hmer (Jag, C, sav)	53,5	-	64,4	4,9	-	-	-	-	-	-
Mistura	-	-	-	-	-	-	68,1	-	-	-
Vicenina-2	-	-	-	-	-	-	-	-	54,5	-
Cirsimarina	-	-	-	-	-	-	-	-	84,7	-
Pepstatina	-	-	-	-	-	-	-	-	91,3	1,6*

Hcom: *H. comaroides*, Hmer: *H. meridionalis*, Cur: Curitiba (PR), BN: Balsa Nova (PR), Jag: Jaguariaíva (PR); C: cerrado, TA: Tropical Atlântico; cam/at: campo com ação antrópica, om/at: floresta ombrófila mista com ação antrópica, sav: savana, EB: extrato bruto, FAE: fase acetato de etila, FHA: fase hidroalcoólica. *MIC₅₀ conhecida expressa em µM.

Podemos notar que os extratos brutos de *H. comaroides* (Cur, TA, cam/ at) e *H. meridionalis* de Balsa Nova (TA, om/ at), com maior potencial de inibição da enzima transcriptase reversa (Tabela 3.2) também foram ativos na inibição da enzima protease. Em alguns casos como o extrato bruto de *H. meridionalis* de Jaguariaíva (C, sav) e as substâncias isoladas, não foi possível o cálculo da MIC₅₀ pois as menores concentrações já haviam atingido a porcentagem de 50% de atividade, sendo importante a repetição do ensaio utilizando menores concentrações da amostra.

Vale mencionar que o extrato bruto hidroalcoólico de *H. comaroides* (Cur, TA, cam/ at) e *H. meridionalis* (de ambos os locais coletados) não apresentaram atividade citotóxica na concentração de 100 µg mL⁻¹ frente à linhagem de células RAW 264,7 de camundongos no ensaio de redução do MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazólio]}, resultado gentilmente cedido pela Dra. Martha Dalila Sedano-Partida.

Para melhor interpretação e discussão dos dados, a Tabela 3.5 nos permite fazer uma comparação dos resultados de tais atividades com o teor de constituintes fenólicos dos extratos brutos, assim como das fases e das substâncias isoladas. Podemos observar que os extratos brutos com maior potencial anti-HIV-1: *H. comaroides* (Cur, TA, cam/ at) e *H. meridionalis* de Balsa Nova (TA, om/ at) não são os que apresentam os maiores teores de constituintes fenólicos totais. Entretanto, *H. comaroides* (Cur, TA, cam/ at) e *H. meridionalis* (de ambos os locais coletados) apresentam teores mais elevados de ácido rosmarínico quando comparados com as demais espécies, exceto *H. radicans* de Mogi das Cruzes (TA, es) e Santo André (TA, od).

Tabela 3.5 – Teor de constituintes fenólicos nos extratos brutos, fases e isolados de *Hyptis* seção *Peltodon* analisados por CLAE-DAD e expressos em mg g⁻¹.

Espécie, local de coleta, domínio fitogeográfico e fitofisionomia	Tipo da amostra	Classes e total de constituintes fenólicos					
		Derivados flavonoídicos	Ácido rosmarínico	Derivados clorogenicos	Nepetoidina B	ni	Total
Hcamp Bur (C, ce)	EB	47,4	1,5	0,3	-	7,3	56,5
Pir (C, ms)	EB	19,1	4,0	0,7	0,1	3,5	27,5
RC (C, ce)	EB	41,3	1,9	2,1	-	5,4	50,7
Hcom Cur (TA, cam/at)	EB	7,6	14,2	10,0	1,2	1,2	34,1
Hmer BN (TA, om/at)	EB	26,1	12,6	1,6	0,6	4,4	45,2
Jag (C, sav)	EB	8,8	13,5	1,8	1,6	1,1	26,9
Hrad Av (ZT, es)	EB	8,6	3,4	6,5	5,2	0,6	24,2
MG (C, ms)	EB	2,4	6,8	8,2	-	1,1	18,4
CGS (TA, om)	EB	8,1	3,4	11,0	-	1,2	23,7
MC (TA, es)	EB	10,7	12,1	16,4	-	1,6	40,9
SA (TA, od)	EB	13,6	11,6	15,6	5,2	1,7	47,7
Mistura	EB	14,6	8,8	0,7	-	3,2	27,4
Hcom Cur (TA, cam/at)	FHA	4,1	4,7	-	-	-	8,7
Hmer BN (TA, om/at)	FHA	3,3	-	-	-	0,6	3,9
Jag (C, sav)	FAE	12,6	84,1	7,3	-	0,8	104,8
Vicenina-2	isolado	18,2	-	-	-	-	18,2
Cirsimarina	isolado	131,8	-	-	-	-	131,8

Hcamp: *H. campestris*, H. com: *H. comaroides*, Hmer: *H. meridionalis*, Hrad: *H. radicans*; Bur: Buriti (MT), Pir: Pirassununga (SP), RC: Rio da Casca (MT), Cur: Curitiba (PR), BN: Balsa Nova (PR), Jag: Jaguaíva (PR), CGS: Campina Grande do Sul (PR), MC: Mogi das Cruzes (SP), SA: Santo André (SP), Av: Avaré (SP), MG: Mogi Guaçu (SP); C: cerrado, TA: Tropical Atlântico; ce: cerradão, ms: mata seca, cam/at: campo com ação antrópica, om/at: floresta ombrófila mista com ação antrópica, sav: savana, es: floresta estacional semidecidual, om: floresta ombrófila mista, od: floresta ombrófila densa. EB: extrato bruto; FAE: fase acetato de etila, FHA: fase hidroalcolica; ni: substâncias não-identificadas.

De fato, o ácido rosmarínico, apresenta uma série de atividades biológicas e farmacológicas reportadas na literatura, conforme revisado por Al-dhabi e colaboradores (2014). Entre tais atividades está a atividade antiviral do ácido rosmarínico após uma etapa de nitração (Dubois et al., 2008). Mazumder e colaboradores (1997) já haviam relatado atividade anti-HIV-1 ao testar análogos à curcumina, entre eles, o ácido rosmarínico, que apresentou potente atividade frente à enzima integrase (HIV-1). Entretanto, no presente trabalho, ao testarmos a capacidade anti-HIV-1 do padrão comercial de ácido rosmarínico nas concentrações de 0,10 a 533,33 μM frente à enzima transcriptase reversa, não observamos atividade de inibição da mesma.

Singh e Bodiwala (2010) em seu trabalho de revisão que abrange os recentes avanços em produtos naturais anti-HIV, mencionam diversas classes de constituintes fenólicos com capacidade antiviral. Alguns deles estão em fase avançada de pesquisa clínica como por exemplo o calanolídeo A, derivados de canfanoil (DCK) e ácidos dicafeoilquínicos (DCQAs) (Saklani e Kutty, 2008). Ainda entre os constituintes fenólicos, os ácidos clorogênicos e seus derivados tem sido relatados como inibidores da enzima integrase (Robinson et al., 1996) e protease (Matsuse et al., 1997).

Em revisão realizada por Andrae-Marobela e colaboradores (2013), os polifenóis são destacados como agentes anti-HIV multialvo agindo em diversos momentos do ciclo de vida do vírus. Ao analisar diversos trabalhos de pesquisas com focos em atividade anti-HIV de polifenóis, esse grupo de pesquisadores concluiu que flavonoides tendem a atuar em uma grande variedade de alvos, mediando uma gama diversificada de atividades anti-HIV. Entretanto, a eficácia dessas atividades não é tão alta, sugerindo, portanto, uma análise minuciosa dos efeitos sinérgicos que poderiam potencializar a ação anti-HIV de tais substâncias. Atividades sinérgicas anti-HIV-1 podem ser promissoras, devido ao fato de que os flavonoides apresentam índices terapêuticos (razão entre a dose tóxica e a dose capaz de produzir a resposta clinicamente desejada) geralmente bastante favoráveis. Tal resultado pode ser uma possível explicação para o fato de que os extratos brutos apresentam maior atividade quando comparados às fases ou até mesmo às substâncias isoladas (Tabelas 3.2 e 3.3). Dessa forma, esses autores sugerem que o resultado do sinergismo de diferentes tipos de flavonoides pode fornecer um meio para as indústrias no desenvolvimento de agentes anti-HIV.

Por definição, o sinergismo é a ação combinada entre dois ou mais fatores que contribuem para o resultado de um processo ou atuação. Desde os primeiros registros históricos, combinações de drogas têm sido usadas para tratar doenças, sendo que os medicamentos tradicionais chineses, especialmente fitoterápicos, são os principais exemplos conhecidos. À medida que as técnicas de isolamento e a capacidade de síntese química avançam, as combinações de drogas têm sido mais definidas e sofisticadas possibilitando, assim, a ampliação desse conhecimento. Durante o século passado, muitas tentativas foram feitas para mensurar as relações dose-efeito de cada fármaco

isoladamente e suas combinações, a fim de determinar se uma combinação de fármacos ganharia ou não um efeito sinérgico (Chou, 2006).

Apenas recentemente a medicina moderna vem compreendendo a rapidez com que os patógenos e as células cancerígenas podem desenvolver resistência a drogas isoladas, levando à administração de coquetéis de drogas para contornar ou retardar a resistência. De acordo com Carmona e Pereira (2013), as plantas utilizam essa estratégia desde muito cedo em sua evolução. Ao confiar em combinações de moléculas multialvo, as plantas possuem complexos fitoquímicos de interação aperfeiçoados ao longo da evolução para realizar muitas tarefas complementares (Koehn e Carter, 2005; Lila e Raskin, 2005).

Ferreira e colaboradores (2010) reuniram diversos estudos sobre flavonoides presentes no extrato de *Artemisia annua* L. (Asteraceae) como a eupatina, silibina, quercetina, apigenina, luteolina e campferol, para atuarem em sinergismo com diversos agentes anticâncer como por exemplo o paclitaxel (Limtrakul et al., 2005; Zhou et al., 2008). A silibina combinada ao paclitaxel aumentou a sensibilidade das células tumorais em doentes com resistência ao tratamento convencional, aumentando a eficácia deste último (Zhou et al., 2008).

Limtrakul e colaboradores (2005) utilizaram a vimblastina para investigar a capacidade da quercetina, campferol, genisteína, genistina e daidzeína em sensibilizar as células tumorais resistentes (MDR KB-V1, adenocarcinoma endocervical relacionado ao papilomavírus humano) aos efeitos da citotoxicidade de fármacos antineoplásicos. Empregando o ensaio MTT, os flavonoides quercetina, campferol, genisteína e daidzeína, a 10 e 30 μM aumentaram a sensibilidade das células KB-V1 à vimblastina e diminuíram a resistência relativa da vinblastina nas mesmas células. O campferol e a daidzeína em uma concentração de 30 μM causaram uma diminuição significativa da MIC_{50} da vimblastina nas células KB-V1 resistentes. Um outro exemplo foi a combinação da cisplatina associada à luteolina, que resultou em aumento em sua atividade terapêutica anticâncer sendo, portanto, a luteolina, considerada um potencial quimiossensibilizador na terapia do câncer (Shi et al., 2007).

Segundo Cushnie e Lamb (2011), além de atividades diretas e sinérgicas, os flavonoides também inibem vários fatores de virulência bacteriana, incluindo receptores de sinal de detecção, além de enzimas e toxinas. Evidências destes efeitos moleculares em nível celular incluem a inibição *in vitro* da formação de biofilme, a inibição da ligação bacteriana ao hospedeiro e a neutralização da toxicidade para células humanas em cultura.

Quanto à atividade antiviral, a atividade sinérgica do flavonoide baicaleína com o antirretroviral ribavirina contra infecções pelo vírus *influenza* A (H1N1) em cultura celular e em camundongos foi investigada pela primeira vez em 2011, relatando resultados promissores. *In vitro*, a máxima sinergia em concentrações mais baixas de baicaleína (0,125 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e ribavirina (12,5

$\mu\text{g mL}^{-1}$) foi observada, e a expressão reduzida do gene da proteína da matriz viral sugeriu que as combinações entre as drogas causaram maior inibição do que a ribavirina isolada (Chen et al., 2011).

Apesar de inúmeros trabalhos apontando os efeitos sinérgicos dos metabólitos especiais com drogas já conhecidas, as substâncias isoladas ainda são o maior interesse da indústria farmacêutica devido à maior facilidade de síntese e conseqüentemente maior valor agregado que pode ser atribuído às moléculas sintéticas.

Asres e colaboradores (2005) apontam os flavonoides como promissores agentes anti-HIV, inibindo a atividade da transcriptase reversa, induzindo interferons, inativando proteases virais e inibindo a expressão de co-receptores virais (como CCR2b e CCR3). Entretanto, o mecanismo molecular para esses efeitos antivirais de flavonoides ainda não é claro.

Harborne e Williams (2000) relatam em seu trabalho de revisão que alguns flavonoides parecem ter atividade inibitória direta no vírus como ocorre para a baicalina, isolada de *Scutellaria baicalensis* Georgi (Lamiaceae) (Li et al., 2000). Outros flavonoides atuam inibindo as enzimas necessárias para a replicação viral como duas biflavonas: robustaflavona e hinociflavona, que são ativas contra a transcriptase reversa com valores MIC_{50} de 65 μM (Lin et al., 1997). Além disso, a quercetina 3-(2''-galoilarabinopiranosídeo) isolada de *Acer okamotoanum* Nakai (Sapindaceae) é ativa contra a integrase do HIV-1 com um valor de MIC_{50} de 18,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Kim et al., 1998).

Por outro lado, Cary e Peterlin (2018) concluem que os produtos naturais contêm combinações de ingredientes ativos que podem mitigar os efeitos tóxicos dos compostos ativos primários. Muitas plantas medicinais tradicionais são consumidas como extrato bruto ou chá, que são comprovadamente eficazes na forma não processada/ não purificada. Esta mistura de ocorrência natural pode ser mais eficaz do que o composto isolado único como é o caso de *Euphorbia kansui* T.N. Liou ex S.B. Ho, onde a presença de substâncias anti-inflamatórias no extrato bruto pode diminuir os efeitos colaterais tóxicos do potente composto ativo. A base de práticas médicas antigas e o uso de extratos brutos de plantas podem até se revelar uma estratégia melhor do que criar uma droga baseada em um único ingrediente ativo isolado (Cary e Peterlin, 2018).

3.4. Considerações finais

Os extratos brutos de *H. comaroides* e *H. meridionalis* apresentaram atividade promissora como agentes anti-HIV-1, atuando principalmente na inibição da enzima transcriptase reversa. Tais resultados não parecem sofrer influência do local de coleta da espécie.

Apesar das substâncias isoladas não se mostrarem tão efetivas quanto os extratos brutos e fases, para ambos os ensaios, a cirsimarina apresentou maior potencial anti-HIV-1 quando

comparada à vicenina-2, provavelmente devido à conformação de sua molécula que, no caso da cirsimarina apresenta duas metoxilas.

As substâncias majoritárias das fases mais ativas, quando isoladas, apresentaram menor atividade, sugerindo a existência de sinergismo entre os constituintes presentes nas fases e extratos brutos.

Discussão geral e conclusões

Como resultados desse trabalho vimos que *Hyptis* seção *Peltodon* apresentou composição química semelhante às espécies da subfamília Nepetoideae em relação à constituição fenólica, destacando a presença do ácido cafeico, ácido rosmarínico e nepetoidinas, corroborando estudos já existentes.

Também reportamos que *Hyptis* seção *Peltodon* possui flavonoides derivados da flavona apigenina, sendo que a identificação de flavonas C-glicosiladas nos extratos brutos sugere o uso das mesmas como importantes marcadores taxonômicos no nível de seção.

Vimos que as espécies que apresentaram maior potencial antioxidante e anti-HIV-1 foram *H. comaroides* e *H. meridionalis*, com destaque para *H. meridionalis* coletada no domínio Tropical Atlântico.

Voltamos então às perguntas apresentadas no início desta tese: uma espécie que ocorre em diferentes domínios fitogeográficos e/ou fitofisionomias, apresenta diferentes níveis de metabólitos secundários? E se assim for, também representará uma diferença em seu potencial biológico?

Há vários estudos na literatura que relacionam o aumento e/ou diminuição de classes de metabólitos secundários frente aos estresses ambientais. O que vimos no presente trabalho foi o perfil químico de diferentes populações da mesma espécie, inseridas em diferentes fitofisionomias, podendo este apresentar flutuações de certas classes de substâncias, entretanto não apresentando grandes variações nos seus teores totais de constituintes fenólicos. Cremos que a coleta em diferentes domínios fitogeográficos pode não refletir uma situação de estresse para as populações já ali estabelecidas.

Também notamos que *H. campestris*, encontrada apenas em fitofisionomias de Cerrado, destacou-se por conter um maior número de constituintes fenólicos e maior teor de derivados flavonoídicos no extrato bruto. Entretanto, a relação da fitofisionomia e consequentemente, dos dados meteorológicos com a composição fitoquímica das espécies aqui estudadas parecem não seguir um mesmo padrão, visto que houve uma variação diferente nas populações, para cada espécie. Devemos levar em conta que outros fatores bióticos, além dos abióticos, podem contribuir para esta variação. De qualquer forma, vimos que há uma correlação estabelecida positivamente entre a precipitação acumulada e teor de derivados flavonoídicos.

Com relação ao potencial antioxidante das espécies coletadas nos dois domínios fitogeográficos propostos concluímos que para o grupo estudado e para as substâncias analisadas, populações que se encontram no domínio Tropical Atlântico são as melhores candidatas. Com relação ao potencial anti-HIV-1, ao analisar espécies coletadas em diferentes domínios fitogeográficos, como foi o caso de *H. radicans* e *H. meridionalis*, a primeira parece não ter variação

na capacidade antiviral independentemente do local de coleta. Entretanto, com relação a *H. meridionalis*, a população presente no domínio Tropical Atlântico, apresentou maior potencial antirretroviral. Porém, um estudo mais detalhado com várias populações, se faz necessário para confirmação.

A abordagem que relaciona fatores abióticos com a composição química, bem como o potencial biológico de espécies vegetais é relativamente recente. Vimos aqui que há uma variação na síntese de metabólitos secundários de acordo com o ambiente, entretanto variam de espécie para espécie, portanto um conhecimento prévio do perfil químico da espécie é necessário se o objetivo é prospectar substâncias de interesse, principalmente se a intenção é melhorar a qualidade e reduzir as pressões de colheita excessiva de espécies com aplicações comerciais como drogas, cosméticos, inseticidas entre outros.

Este estudo visou principalmente a expansão das análises fitoquímicas e do potencial biológico de quatro espécies de *Hyptis* pertencentes à seção *Peltodon* e creio que obtivemos êxito em atingir esse objetivo. Entretanto, futuras pesquisas sempre serão necessárias a fim de investigar e compreender melhor os efeitos sinérgicos de múltiplos fatores ambientais no metabolismo secundário bem como no potencial biológico de espécies vegetais.

Resumo

Desde os primórdios da medicina, substâncias derivadas de animais, plantas e microrganismos têm sido utilizadas no tratamento e cura de diversas doenças. Especificamente o uso de plantas medicinais pela população como terapia alternativa no tratamento de doenças, tem sido uma prática comum desde milhares de anos antes da era presente (a.p.). Atualmente, sabe-se que muitos dos metabólitos secundários estão diretamente envolvidos nos mecanismos que permitem a adaptação das plantas ao seu habitat. Dessa forma, e pensando-se em espécies de uso medicinal, é esperado que o potencial biológico também sofra variações de acordo com os fatores bióticos e abióticos. *Hyptis* (Lamiaceae) constitui um gênero altamente promissor para estudos de prospecção de substâncias farmacologicamente ativas, favorecidos pela grande diversidade de espécies que ocorrem nos domínios fitogeográficos brasileiros, sendo, portanto, escolhido como modelo para responder às questões deste trabalho. O objetivo geral foi a expansão das análises fitoquímicas e do potencial biológico de quatro espécies de *Hyptis* pertencentes à seção *Peltodon*, além de verificar uma possível variação fitoquímica (quantitativa e/ou qualitativa) entre as espécies estudadas e coletadas não só em diferentes domínios, mas em diferentes fitofisionomias. Como resultado, *Hyptis* seção *Peltodon* apresentou composição química semelhante às espécies da subfamília Nepetoideae em relação à constituição fenólica, destacando a presença do ácido cafeico, ácido rosmarínico e nepetoidinas, corroborando estudos já existentes. Também reportamos que *Hyptis* seção *Peltodon* possui flavonoides derivados da flavona apigenina, sendo que identificação de flavonas C-glicosiladas nos extratos brutos sugerem o uso das mesmas como importantes marcadores taxonômicos no nível de seção. As espécies que apresentaram maior potencial antioxidante e anti-HIV-1 foram *H. comaroides* e *H. meridionalis*. Com relação às espécies coletadas nos dois domínios fitogeográficos propostos concluímos que para o grupo estudado e para as substâncias analisadas, populações que se encontrem no domínio Tropical Atlântico são as melhores candidatas como fonte de antioxidantes naturais. Entretanto, futuras pesquisas são necessárias a fim de investigar e compreender melhor os efeitos sinérgicos de múltiplos fatores ambientais no metabolismo secundário bem como no potencial biológico de espécies vegetais.

Palavras-chave: substâncias fenólicas; Lamiaceae; domínios fitogeográficos; antioxidantes; anti-HIV-1.

Abstract

Since the beginning of medicine, substances derived from animals, plants, and microorganisms have been used in the treatment and cure of various diseases. The use of medicinal plants by the population as an alternative therapy in the treatment of diseases has been a common practice for thousands of years before the present (b.p.). Nowadays we know that many of the plant secondary metabolites are directly involved in the mechanisms that allow adaptation to their habitat. Considering species of medicinal use, it is expected that the biological potential also suffers variations according to the biotic and abiotic factors. *Hyptis* (Lamiaceae) is a highly promising genus for prospective studies of bioactive substances, favored by the great diversity of species that occur in the Brazilian phytogeographical domains, being therefore chosen as a model to answer the questions of this work. The objective of this study was to contribute with chemical data and the biological potential of four *Hyptis* species belonging to the *Peltodon* section, as well as to verify a possible phytochemical variation (quantitative and/or qualitative) between species naturally occurring in two different phytogeographical domains. As results of this work, *Hyptis* section *Peltodon* presented phenolic composition similar to species of the subfamily Nepetoideae, with the presence of caffeic acid, rosmarinic acid, and nepetoidins, corroborating existing studies. We also reported that *Hyptis* section *Peltodon* possesses flavonoids derived from the flavone apigenin, and the identification of C-glycosylated flavones in the crude extracts suggest the use of these as important taxonomic markers at the section level. We observed that in general, the species that presented the highest antioxidant and anti-HIV-1 potential were *H. comaroides* and *H. meridionalis*. Regarding the influence of the phytogeographic domains we concluded that for the group studied and for the substances analyzed, populations that occurs in the Tropical Atlantic domain are the best candidates as source of natural antioxidants. Future research, however, is necessary to better understand the synergistic effects of multiple environmental factors on secondary metabolism, as well as the biological potential of plant species.

Keywords: phenolic compounds; Lamiaceae; phytogeographical domains; antioxidants; anti-HIV-1.

Referências bibliográficas

- Ab'Saber, A.N., 1977. Domínios morfoclimáticos na América do Sul - Primeira aproximação (No. 52), Geomorfologia. São Paulo.
- Ab'Saber, A.N., 2003. Os domínios de natureza no Brasil : potencialidades paisagísticas. Natureza.
- Abedini, A., Roumy, V., Mahieux, S., Biabiany, M., Standaert-Vitse, A., Rivière, C., Sahpaz, S., Bailleul, F., Neut, C., Hennebelle, T., 2013. Rosmarinic Acid and Its Methyl Ester as Antimicrobial Components of the Hydromethanolic Extract of *Hyptis atrorubens* Poit. (Lamiaceae). Evidence-Based Complement. Altern. Med. 2013, 1–11. doi:10.1155/2013/604536
- Agostini-Costa, T. da S., Vieira, R.F.V., Bizzo, H.R., Silveira, D., Gimenes, M.A., 2012. Secondary Metabolites, Chromatography and Its Applications. InTech.
- Agra, M. de F., Silva, K.N., Basílio, I.J.L.D., Freitas, P.F. de, Barbosa-Filho, J.M., 2008. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. Rev. Bras. Farmacogn. 18, 472–508. doi:10.1590/S0102-695X2008000300023
- Agrawal, A.A., 2007. Macroevolution of plant defense strategies. Trends Ecol. Evol. 22, 103–109. doi:10.1016/j.tree.2006.10.012
- Al-dhabi, N.A., Arasu, M.V., Park, C.H., Park, S.U., 2014. Recent studies on rosmarinic acid and its biological and pharmacological activities. EXCLI J. 13, 1192–1195.
- Alimi, H., Hfaiedh, N., Bouoni, Z., Sakly, M., Ben Rhouma, K., 2011. Evaluation of antioxidant and antiulcerogenic activities of *Opuntia ficus indica* f. *inermis* flowers extract in rats. Environ. Toxicol. Pharmacol. 32, 406–416. doi:10.1016/j.etap.2011.08.007
- Almeida, P.S., Mozombite, D.M.S., Filho, A.A. de M., Laranjeira, A.G. de A., Melo, A.C.G.R. de, Martins, R.M.G., Takahashi, J.A., Ferraz, V.P.F., Duarte, O.R.D., Tadei, W.P.T., 2017. Chemical composition, antiacetylcholinesterase inhibition and toxicity activities of essential oil from *Hyptis dilatata* (Lamiaceae) flowers. J. Med. Plants Res. 11, 275–283. doi:10.5897/JMPR2017.6343
- Almtorp, G.T., Hazell, A.C., Torrsell, K.B.G., 1991. A lignan and pyrone and other constituents from *Hyptis capitata*. Phytochemistry 30, 2753–2756. doi:10.1016/0031-9422(91)85137-O
- Alvarenga, S.A.V., Gastmans, J.P., Rodrigues, G. do V., Moreno, P.R.H., Emerenciano, V. de P., 2001. A computer-assisted approach for chemotaxonomic studies — diterpenes in Lamiaceae.

Phytochemistry 56, 583–595. doi:10.1016/S0031-9422(00)00424-6

- Andrae-Marobela, K., Ghislain, F.W., Okatch, H., Majinda, R.R.T., 2013. Polyphenols: a diverse class of multi-target anti-HIV-1 agents. *Curr. Drug Metab.* 14, 392–413.
- Andréola, M.L., 2009. Therapeutic potential of peptide motifs against HIV-1 reverse transcriptase and integrase. *Curr. Pharm. Des.* 15, 2508–19.
- Ángel, M.H., González, E.A.P., 1999. Plantas que contienen polifenoles. Antioxidantes dentro del estilo de vida. *Rev. Cuba. Investig. Biomed.* 18, 12–14.
- Arango, H.G., 2009. Bioestatística: teórica e computacional: com banco de dados reais em disco., 3. ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Arion, D., Kaushik, N., McCormick, S., Borkow, G., Parniak, M.A., 1998. Phenotypic Mechanism of HIV-1 Resistance to 3'-Azido-3'-deoxythymidine (AZT): Increased Polymerization Processivity and Enhanced Sensitivity to Pyrophosphate of the Mutant Viral Reverse Transcriptase †. *Biochemistry* 37, 15908–15917. doi:10.1021/bi981200e
- Arruda, D.M., Fernandes-Filho, E.I., Solar, R.R.C., Schaefer, C.E.G.R., 2017. Combining climatic and soil properties better predicts covers of Brazilian biomes. *Sci. Nat.* 104, 32. doi:10.1007/s00114-017-1456-6
- Asres, K., Seyoum, A., Veeresham, C., Bucar, F., Gibbons, S., 2005. Naturally derived anti-HIV agents. *Phyther. Res.* 19, 557–581. doi:10.1002/ptr.1629
- Awaad, A.S., Al-Jaber, N.A., Moses, J.E., El-Meligy, R.M., Zain, M.E., 2013. Antiulcerogenic Activities of the Extracts and Isolated Flavonoids of *Euphorbia cuneata* Vahl. *Phyther. Res.* 27, 126–130. doi:10.1002/ptr.4872
- Azhagu, R.R., Gomathi, M., Prakasam, A., Priya, K., Narayanayyar, V., Mahesh, P., Subramanian, S.S., 2017. Preliminary phytochemical analysis and biological activity of *Hyptis suaveolens* (L.) (Lamiaceae). *Pharma Innov. J.* 6, 1032–1038.
- Bampi, C., Bibillo, A., Wendeler, M., Divita, G., Gorelick, R.J., Le Grice, S.F.J., Darlix, J.-L., 2006. Nucleotide Excision Repair and Template-independent Addition by HIV-1 Reverse Transcriptase in the Presence of Nucleocapsid Protein. *J. Biol. Chem.* 281, 11736–11743. doi:10.1074/jbc.M600290200
- Barberan, F., 1985. An HPLC study of flavones from some Spanish *Sideritis* species. *Phytochemistry* 24, 1285–1288. doi:10.1016/S0031-9422(00)81116-4

- Basílio, I.J.L.D., Agra, M.D.F., Rocha, E.A., Leal, C.K. a, Abrantes, H.F., 2006. Estudo farmacobotânico comparativo das folhas de *Hyptis pectinata* (L.) Poit. e *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae). *Acta Farm. Bonaer.* 25, 518–525.
- Bedoya, L.M., Abad, M.J., Sánchez-Palomino, S., Alcami, J., Bermejo, P., 2010. Ellagitannins from *Tuberaria lignosa* as entry inhibitors of HIV. *Phytomedicine* 17, 69–74. doi:10.1016/j.phymed. 2009.08.008
- Benzie, I.F., Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239, 70–6. doi:10.1006/abio.1996.0292
- Bergeron, C., Marston, A., Gauthier, R., Hostettmann, K., Pharmacognosie, I. De, Lausanne, U. De, Lausanne, C.-, 1997. Iridoids and secoiridoids from *Gentiana linearis*. *Phytochemistry* 44, 633–637.
- Bezerra Carvalho, A.C., Ramalho, L.S., de Oliveira Marques, R.F., Silvério Perfeito, J.P., 2014. Regulation of herbal medicines in Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 158, 503–506. doi:10.1016/j.jep. 2014.08.019
- Bispo, M.D., Mourão, R.H.V., Franzotti, E.M., Bomfim, K.B.R., Arrigoni-Blank, M. d. F., Moreno, M.P.N., Marchioro, M., Antonioli, A.R., 2001. Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. *J. Ethnopharmacol.* 76, 81–86. doi:10.1016/S0378-8741(01)00172-6
- Blunden, G., Yang, M., Yuan, Z.-X., Smith, B.E., Patel, A., Cegarra, J.A., JR, I.M., Janicsak, G., 1996. Betaine distribution in the Labiatae. *Biochem. Syst. Ecol.* 24, 71–81.
- Bowers, M.D., Collinge, S.K., Gamble, S.E., Schmitt, J., 1992. Effects of genotype, habitat, and seasonal variation on iridoid glycoside content of *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae) and the implications for insect herbivores. *Oecologia* 91, 201–207. doi:10.1007/BF00317784
- Bowles, B.L., Miller, A.J., 1994. Caffeic Acid Activity Against *Clostridium botulinum* Spores. *J. Food Sci.* 59, 905–908. doi:10.1111/j.1365-2621.1994.tb08154.x
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.* 28, 25–30. doi:10.1016/S0023-6438(95)80008-5
- Brandão, M.G.L., Cosenza, G.P., Grael, C.F.F., Netto Junior, N.L., Monte-Mór, R.L.M., 2009. Traditional uses of American plant species from the 1st edition of Brazilian Official Pharmacopoeia. *Rev. Bras. Farmacogn.* 19, 478–487. doi:10.1590/S0102-

695X2009000300023

- Brasil, 2006. Decreto n. 5.813, de 22 de jun. de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras diretrizes.
- Brasil, 1993. Decreto n. 750/93, de 10 de fev. de 1993. Dispõe sobre o corte, a exploração e a supressão de vegetação primária ou nos estágios avançado e médio de regeneração da Mata Atlântica, e dá outras providências.
- Brik, A., Wong, C., 2003. HIV-1 protease: mechanism and drug discovery. *Org. Biomol. Chem.* 1, 5–14.
- Calixto, J.B., 2005. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. *J. Ethnopharmacol.* 100, 131–134. doi:10.1016/j.jep.2005.06.004
- Camargo, M.T.L. A., 2014. *As plantas medicinais e o sagrado.*, 1st ed. Icone, São Paulo.
- Campbell, W., Fisher, M., Stapley, E., Albers-Schonberg, G., Jacob, T., 1983. Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. *Science* (80-.). 221, 823–828. doi:10.1126/science.6308762
- Cao, G., Alessio, H.M., Cutler, R.G., 1993. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* 14, 303–311. doi:10.1016/0891-5849(93)90027-R
- Carmona, F., Pereira, A.M.S., 2013. Herbal medicines: old and new concepts, truths and misunderstandings. *Rev. Bras. Farmacogn.* 23, 379–385. doi:10.1590/S0102-695X2013005000018
- Cary, D.C., Peterlin, B.M., 2018. Natural Products and HIV/AIDS. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 34, 31–38. doi:10.1089/aid.2017.0232
- Casanova, L.M., Da Silva, D., Sola-Penna, M., De Magalhães Camargo, L.M., De Moura Celestrini, D., Tinoco, L.W., Costa, S.S., 2014. Identification of chicoric acid as a hypoglycemic agent from *Ocimum gratissimum* leaf extract in a biomonitoring *in vivo* study. *Fitoterapia* 93, 132–141. doi:10.1016/j.fitote.2013.12.024
- Castillo-Juárez, I., González, V., Jaime-Aguilar, H., Martínez, G., Linares, E., Bye, R., Romero, I., 2009. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *J. Ethnopharmacol.* 122, 402–405. doi:10.1016/j.jep.2008.12.021
- Castro-Gamboa, I., Castro, O., 2004. Iridoids from the aerial parts of *Verbena littoralis* (Verbenaceae). *Phytochemistry* 65, 2369–2372. doi:10.1016/j.phytochem.2004.07.008
- Céline, V., Adriana, P., Eric, D., Joaquina, A., Yannick, E., Augusto, L.F., Rosario, R., Dionicia,

- G., Michel, S., Denis, C., Geneviève, B., 2009. Medicinal plants from the Yanesha (Peru): Evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. *J. Ethnopharmacol.* 123, 413–422. doi:10.1016/j.jep.2009.03.041
- Cerqueira, F., Medeiros, M. de, Augusto, O., 2007. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Quim. Nova* 30, 441–449.
- César, G.-Z.J., Alfonso, M.-G.G., Marius, M.-M., Elizabeth, E.-M., Angel, C.-B.M., Maira, H.-R., Guadalupe, C.-L.M., Manuel, J.-E., Ricardo, R.-C., 2011. Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase, toxicological and chemical profile of *Calophyllum brasiliense* extracts from Chiapas, Mexico. *Fitoterapia* 82, 1027–34. doi:10.1016/j.fitote.2011.06.006
- Chen, L., Dou, J., Su, Z., Zhou, H., Wang, H., Zhou, W., Guo, Q., Zhou, C., 2011. Synergistic activity of baicalein with ribavirin against influenza A (H1N1) virus infections in cell culture and in mice. *Antiviral Res.* 91, 314–320. doi:10.1016/j.antiviral.2011.07.008
- Chen, L., Teng, H., Xie, Z., Cao, H., Cheang, W.S., Skalicka-Woniak, K., Georgiev, M.I., Xiao, J., 2016. Modifications of dietary flavonoids towards improved bioactivity: An update on structure–activity relationship. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 8398, 1–15. doi:10.1080/10408398.2016.1196334
- Choi, Oksik, Cheng-Zhu Wu, Sun Young Kang, Jong Seog Ahn, Tai-Boong Uhm, and Young-Soo Hong. 2011. “Biosynthesis of Plant-Specific Phenylpropanoids by Construction of an Artificial Biosynthetic Pathway in *Escherichia Coli*.” *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 38 (10): 1657–65. doi:10.1007/s10295-011-0954-3.
- Chou, T.C., 2006. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol. Rev.* 58, 621–681. doi:10.1124/pr.58.3.10
- Cisneros-Zevallos, L., 2003. The Use of Controlled Postharvest Abiotic Stresses as a Tool for Enhancing the Nutraceutical Content and Adding-Value of Fresh Fruits and Vegetables. *J. Food Sci.* 68, 1560–1565.
- Clifford, M.N., Johnston, K.L., Knight, S., Kuhnert, N., 2003. Hierarchical Scheme for LC-MSⁿ Identification of Chlorogenic Acids. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2900–2911. doi:10.1021/jf026187q
- Cole, A.L., Hossain, S., Cole, A.M., Phanstiel, O., 2016. Synthesis and bioevaluation of substituted chalcones, coumaranones and other flavonoids as anti-HIV agents. *Bioorganic Med. Chem.* 24, 2768–2776. doi:10.1016/j.bmc.2016.04.045

- Collins, C.H., Braga, G.L., Bonato, P.S., 2006. Fundamentos de cromatografia. Editora Unicamp, Campinas.
- Cos, P., Vlietinck, A.J., Berghe, D. Vanden, Maes, L., 2006. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* 'proof-of-concept.' J. Ethnopharmacol. 106, 290–302. doi:10.1016/j.jep.2006.04.003
- Couladis, M., Tzakou, O., Verykokidou, E., Harvala, C., 2003. Screening of some Greek aromatic plants for antioxidant activity. Phyther. Res. 17, 194–195. doi:10.1002/ptr.1261
- Coutinho, H.D.M., Costa, J.G.M., Siqueira-Júnior, J.P., Lima, E.O., 2008. *In vitro* anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA strains. Rev. Bras. Farmacogn. 18, 670–675. doi:10.1590/S0102-695X2008000500005
- Coutinho, L.M., 2006. O conceito de bioma. Acta Bot. Brasilica 20, 13–23. doi:10.1590/S0102-33062006000100002
- Cramer, G.R., 2010. Abiotic stress and plant responses from the whole vine to the genes. Aust. J. Grape Wine Res. 16, 86–93. doi:10.1111/j.1755-0238.2009.00058.x
- Cramer, G.R., Urano, K., Delrot, S., Pezzotti, M., Shinozaki, K., 2011. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. BMC Plant Biol. 11, 163. doi:10.1186/1471-2229-11-163
- Cushnie, T.P.T., Lamb, A.J., 2011. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. Int. J. Antimicrob. Agents 38, 99–107. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.02.014
- da Costa, H.N.R., dos Santos, M.C., Alcântara, A.F. de C., Silva, M.C., França, R.C., Piló-Veloso, D., 2008. Constituintes químicos e atividade antiedematogênica de *Peltodon radicans* (Lamiaceae). Quim. Nova 31, 744–750.
- Dai, J., Mumper, R.J., 2010. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. Molecules 15, 7313–7352. doi:10.3390/molecules15107313
- Darbour, N., Baltassat, F., Raynaud, J., 1986. Sur la présence d'un O-hétéroside et d'un C-hétéroside d'apigénine dans les feuilles de *Ballota foetida* Lamk. (Labiées). Pharmazie 605–606.
- De Lira Mota, K.S., Dias, G.E.N., Pinto, M.E.F., Luiz-Ferreira, Â., Souza-Brito, A.R.M., Hiruma-Lima, C.A., Barbosa-Filho, J.M., Batista, L.M., 2009. Flavonoids with gastroprotective activity. Molecules 14, 979–1012. doi:10.3390/molecules14030979

- De Oliveira, C.M.A., Silva, M.D.R.R., Kato, L., Da Silva, C.C., Ferreira, H.D., Souza, L.K.H., 2004. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Hyptis ovalifolia* Benth. (Lamiaceae). J. Braz. Chem. Soc. 15, 756–759. doi:10.1590/S0103-50532004000500023
- de Sotillo, D.V.R., Hadley, M., 2002. Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of: cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (fa/fa) Zucker rats. J. Nutr. Biochem. 13, 717–726. doi:10.1016/S0955-2863(02)00231-0
- Demasi, S., Caser, M., Lonati, M., Cioni, P.L., Pistelli, L., Najar, B., Scariot, V., 2018. Latitude and Altitude Influence Secondary Metabolite Production in Peripheral Alpine Populations of the Mediterranean Species *Lavandula angustifolia* Mill. Front. Plant Sci. 9. doi:10.3389/fpls.2018.00983
- Dewick, P.M., 2009. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. John Wiley & Sons, New York.
- Dhanalakshmi, S., Agarwal, P., Glode, L.M., Agarwal, R., 2003. Silibinin sensitizes human prostate carcinoma DU145 cells to cisplatin- and carboplatin-induced growth inhibition and apoptotic death. Int. J. Cancer 106, 699–705. doi:10.1002/ijc.11299
- dos Santos, K.P., Sedano-Partida, M.D., Sala-Carvalho, W.R., Loureiro, B.O.S.J., da Silva-Luz, C.L., Furlan, C.M., 2018. Biological activity of *Hyptis* Jacq. (Lamiaceae) is determined by the environment. Ind. Crops Prod. 112, 705–715. doi:10.1016/j.indcrop.2017.12.065
- Drew, M., 1998. Stress physiology, in: Taiz, L., Zeiger, E. (Eds.), Plant Physiology. Sunderland, MA, pp. 725–757.
- Dubois, M., Bailly, F., Mbemba, G., Mouscadet, J.F., Debyser, Z., Witvrouw, M., Cotelle, P., 2008. Reaction of rosmarinic acid with nitrite ions in acidic conditions: Discovery of nitro- and dinitrorosmarinic acids as new anti-HIV-1 agents. J. Med. Chem. 51, 2575–2579. doi:10.1021/jm7011134
- Dudai, N., Putievsky, E., Ravid, U., Palevitch, D., Halevy, A.H., 1992. Monoterpene content in *Origanum syriacum* as affected by environmental conditions and flowering. Physiol. Plant. 84, 453–459. doi:10.1111/j.1399-3054.1992.tb04690.x
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M., Mérillon, J.M., 2009. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(5), 1768–74. doi:10.1021/jf803011r

- Dudt, J.F., Shure, D.J., 1994. The Influence of Light and Nutrients on Foliar Phenolics and Insect Herbivory. *Ecology* 75, 86–98.
- Dutra, R.C., Campos, M.M., Santos, A.R.S., Calixto, J.B., 2016. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacol. Res.* 112, 4–29. doi:10.1016/j.phrs.2016.01.021
- Edziri, H., Jaziri, R., Aissaoui, F., Verschaeve, L., Flamini, G., Chehab, H., Laameri, S., Chihaoui, B., Mahjoub, Z., Sfina, H., Abdrrahman, A., Mastouri, M., Boujnah, D., 2018. Impact of water deficit on physiological parameters, bioactive content and antioxidant activity of three olive cultivars. *South African J. Bot.* 118, 268–273. doi:10.1016/j.sajb.2018.07.031
- Erdtman, G., 1945. Pollen morphology and plant taxonomy IV. Labiatae, Verbenaceae, and Avicenniaceae. *Sven. Bot. Tidskr.* 29, 279–285.
- Farhoosh, R., Johnny, S., Asnaashari, M., Molaahmadibahraseman, N., Sharif, A., 2016. Structure–antioxidant activity relationships of o-hydroxyl, o-methoxy, and alkyl ester derivatives of p-hydroxybenzoic acid. *Food Chem.* 194, 128–134. doi:10.1016/j.foodchem.2015.08.003
- Fauci, A., 1987. AIDS: immunopathogenic mechanisms and research strategies. *Clin Res* 35, 503–510.
- Feng, C.-P., Tang, H.-M., Huang, S., Hou, S.-Z., Liang, J., Huang, W., Lai, X.-P., 2016. Evaluation of the effects of the water-soluble total flavonoids from *Isodon lophanthoides var. gerardianus* (Benth.) H. Hara on apoptosis in HepG2 cell: Investigation of the most relevant mechanisms. *J. Ethnopharmacol.* 188, 70–79. doi:10.1016/j.jep.2016.04.042
- Fernandes, P., Boff, P., 2017. Medicinal plants in the family farms of rural areas in southern Brazil : ecological and ethnobotanical aspects 16, 493–505.
- Ferreira, J.F.S., Luthria, D.L., Sasaki, T., Heyerick, A., 2010. Flavonoids from *Artemisia annua* L. as Antioxidants and Their Potential Synergism with Artemisinin against Malaria and Cancer. *Molecules* 15, 3135–3170. doi:10.3390/molecules15053135
- Ferrer-Gallego, R., Pérez-Gregorio, R., Hernández-Hierro, J.M., Quijada-Morín, N., García-Estévez, I., 2017. Polyphenols and Food Quality. *J. Food Qual.* 2017, 1–2. doi:10.1155/2017/1640519
- Ferreira, M.L.F., Rius, S.P., Casati, P., 2012. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Front. Plant Sci.* 3, 1–15. doi:10.3389/fpls.2012.00222
- Filho, J.R., de Sousa Falcão, H., Batista, L.M., Filho, J.M.B., Piuvezam, M.R., 2010. Effects of

- plant extracts on HIV-1 protease. *Curr. HIV Res.* 8, 531–44.
- Floegel, A., Kim, D.-O., Chung, S.-J., Koo, S.I., Chun, O.K., 2011. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J. Food Compos. Anal.* 24, 1043–1048. doi:10.1016/j.jfca.2011.01.008
- Fraga, B.M., 2012. Phytochemistry and chemotaxonomy of *Sideritis* species from the Mediterranean region. *Phytochemistry* 76, 7–24. doi:10.1016/j.phytochem.2012.01.018
- Fronza, M., Murillo, R., Ślusarczyk, S., Adams, M., Hamburger, M., Heinzmann, B., Laufer, S., Merfort, I., 2011. In vitro cytotoxic activity of abietane diterpenes from *Peltodon longipes* as well as *Salvia miltiorrhiza* and *Salvia sahendica*. *Bioorg. Med. Chem.* 19, 4876–4881. doi:10.1016/j.bmc.2011.06.067
- Furlan, C.M., Santos, K.P., Sedano-Partida, M.D., Motta, L.B. da, Santos, D.Y.A.C., Salatino, M.L.F., Negri, G., Berry, P.E., van Ee, B.W., Salatino, A., 2015. Flavonoids and antioxidant potential of nine Argentinian species of Croton (Euphorbiaceae). *Brazilian J. Bot.* 38, 693–702. doi:10.1007/s40415-014-0115-9
- Gallo, M.B.C., Vieira, P.C., Fernandes, J.B., da Silva, M.F. das G.F., Salimena-Pires, F.R., 2008. Compounds from *Vitex polygama* active against kidney diseases. *J. Ethnopharmacol.* 115, 320–322. doi:10.1016/j.jep.2007.09.020
- Gallo, R.C., Montagnier, L., 1988. AIDS in 1988. *Sci. Am.* 259, 40–51.
- Ganiari, S., Choulitoudi, E., Oreopoulou, V., 2017. Edible and active films and coatings as carriers of natural antioxidants for lipid food. *Trends Food Sci. Technol.* 68, 70–82. doi:10.1016/j.tifs.2017.08.009
- García-Risco, M.R., Mouhid, L., Salas-Pérez, L., López-Padilla, A., Santoyo, S., Jaime, L., Ramírez de Molina, A., Reglero, G., Fornari, T., 2017. Biological Activities of Asteraceae (*Achillea millefolium* and *Calendula officinalis*) and Lamiaceae (*Melissa officinalis* and *Origanum majorana*) Plant Extracts. *Plant Foods Hum. Nutr.* 72, 96–102. doi:10.1007/s11130-016-0596-8
- Gershenzon, J., 1998. Plant defenses: surface protection and secondary metabolites., in: Taiz, L., Zeiger, E. (Eds.), *Plant Physiology*. Sunderland, MA, pp. 347–376.
- Gil, M.I., Ferreres, F., Marrero, A., Tomás-Lorente, F., Tomas-Barberan, F.A., 1993. Distribution of flavonoid aglycones and glycosides in *Sideritis* species from the canary islands and madeira. *Phytochemistry* 34, 227–232. doi:10.1016/S0031-9422(00)90809-4

- Gobbo-Neto, L., Lopes, N.P., 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim. Nov.* 30, 374–381.
- Gottlieb, O.R., Borin, M.R.D.M.B., Pagotto, C.L.A.C., Zocher, D.H.T., 1998. Biodiversidade: o enfoque interdisciplinar brasileiro. *Cien. Saude Colet.* 3, 97–102. doi:10.1590/S141381231998000200009
- Gouinguene, S.P., Turlings, T.C.J., 2002. The Effects of Abiotic Factors on Induced Volatile Emissions in Corn Plants. *PLANT Physiol.* 129, 1296–1307. doi:10.1104/pp.001941
- Gould, K.S., Lister, C., 2006. Flavonoid Functions in Plants, in: Andersen, Ø.M., M.K.R. (Ed.), *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. CRC Press is an imprint of Taylor & Francis Group, NW, pp. 397–443.
- Gowan, E., Lewis, B.A., Turgeon, R., 1995. Phloem transport of antirrhinoside, an iridoid glycoside, in *Asarina scandens* (Scrophulariaceae). *J. Chem. Ecol.* 21, 1781–1788. doi:10.1007/BF02033676
- Grayer, R.J., Eckert, M.R., Veitch, N.C., Kite, G.C., Marin, P.D., Kokubun, T., Simmonds, M.S., Paton, A.J., 2003. The chemotaxonomic significance of two bioactive caffeic acid esters, nepetoidins A and B, in the Lamiaceae. *Phytochemistry* 64, 519–528. doi:10.1016/S0031-9422(03)00192-4
- Grayer, R.J., Kite, G.C., Goldstone, F.J., Bryan, S.E., Paton, A., Putievsky, E., 1996. Intraspecific taxonomy and essential oil chemotypes in sweet basil, *Ocimum basilicum*. *Phytochemistry* 43, 1033–1039. doi:10.1016/S0031-9422(96)00429-3
- Grayer, R.J., Veitch, N.C., Kite, G.C., Price, A.M., Kokubun, T., 2001. Distribution of 8-oxygenated leaf-surface flavones in the genus *Ocimum*. *Phytochemistry* 56, 559–567. doi:10.1016/S0031-9422(00)00439-8
- Gupta, V., Sharma, S., 2006. Plants as natural antioxidants. *Nat. Prod. Rad* 5, 326–334.
- Gurib-Fakim, A., 2006. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol. Aspects Med.* 27, 1–93. doi:10.1016/j.mam.2005.07.008
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford.
- Hamilton, G.R., Baskett, T.F., 2000. History of Anesthesia: In the arms of Morpheus: the development of morphine for postoperative pain relief. *Can. J. Anesth.* 47, 367–374.

- Harborne, J.B., Tomás-Barberán, F.A., Williams, C.A., Gil, M.I., 1986. A chemotaxonomic study of flavonoids from european *Teucrium* species. *Phytochemistry* 25, 2811–2816. doi:10.1016/S0031-9422(00)83747-4
- Harborne, J.B., Williams, C.A., 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481–504. doi:10.1016/S0031-9422(00)00235-1
- Hardy, K., Buckley, S., Collins, M.J., Estalrich, A., Brothwell, D., Copeland, L., García-Taberner, A., García-Vargas, S., de la Rasilla, M., Lalueza-Fox, C., Huguet, R., Bastir, M., Santamaría, D., Madella, M., Wilson, J., Cortés, A.F., Rosas, A., 2012. Neanderthal medics? Evidence for food, cooking, and medicinal plants entrapped in dental calculus. *Naturwissenschaften* 99, 617–26. doi:10.1007/s00114-012-0942-0
- Harley, R., França, F., Santos, É.P., Santos, J.S. dos, 2010. Lamiaceae, in: *Catálogo de Plantas e Fungos Do Brasil. Volume 2. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro*, pp. 1130–1146.
- Harley, R., Pastore, J., 2012. A generic revision and new combinations in the Hyptidinae (Lamiaceae), based on molecular and morphological evidence. *Phytotaxa* 58, 1–55.
- Harley, R.M., 2012. Checklist and key of genera and species of the Lamiaceae of the Brazilian Amazon. *Rodriguésia* 63, 129–144. doi:10.1590/S2175-78602012000100010
- Harley, R.M., Atkins, S., Budantsev, A.L., Cantino, P.D., Conn, B.J., Grayer, R., Harley, M.M., Kok, R. de, Krestovskaja, T., Morales, R., Paton, A.J., Upson, T., Ryding, O., 2004. Labiateae, in: Kadereit, J.W. (Ed.), *The Families and Genera of Vascular Plants*. Springer, pp. 167–276.
- Hasrat, J.A., Pieters, L., Claeys, M., Vlietinck, A., De Backer, J.-P., Vauquelin, G., 1997. Adenosine-1 Active Ligands: Cirsimarín, a Flavone Glycoside from *Microtea debilis* 1. *J. Nat. Prod.* 60, 638–641. doi:10.1021/np970025k
- Hegnauer, R., 1989. Labiateae, in: *Chemotaxonomie Der Pflanzen. Lehrbücher Und Monographien Aus Dem Gebiete Der Exakten Wissenschaften*. Birkhäuser, Basel, p. 579.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* 13, 572–584.
- Holst, B., Williamson, G., 2008. Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19, 73–82. doi:10.1016/j.copbio.2008.03.003
- Horner, J.D., 1990. Nonlinear effects of water deficits on foliar tannin concentration. *Biochem. Syst. Ecol.* 18, 211–213. doi:10.1016/0305-1978(90)90062-K

- Hossain, M.B., Rai, D.K., Brunton, N.P., Martin-Diana, A.B., Barry-Ryan, C., 2010. Characterization of phenolic composition in Lamiaceae spices by LC-ESI-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* 58, 10576–10581. doi:10.1021/jf102042g
- Hrazdina, G., Borzell, A.J., Robinson, W.B., 1970. Studies on the Stability of the Anthocyanidin-3,5-Digucosides. *Am. J. Enol. Vitic.* 21, 201–204.
- Hsieh, C.L., Yen, G.C., Chen, H.Y., 2005. Antioxidant activities of phenolic acids on ultraviolet radiation-induced erythrocyte and low density lipoprotein oxidation. *J. Agric. Food Chem.* 53, 6151–6155. doi:10.1021/jf050707a
- Hu, G., Li, X., Li, Y., Sun, X., Liu, G., Li, W., Huang, J., Shen, X., Tang, Y., 2012. Inhibitors of HIV-1 Integrase-Human LEDGF/p75 Interaction Identified from Natural Products via Virtual Screening. *Chinese J. Chem.* 30, 2752–2758. doi:10.1002/cjoc.201200897
- Husain, S.Z., Markham, K.R., 1981. The glycoflavone vicenin-2 its distribution in related genera within the Labiatae. *Phytochemistry* 20, 1171–1173. doi:10.1016/0031-9422(81)83062-2
- IBGE, 2004a. MAPA de biomas do Brasil: primeira aproximação. Rio de Janeiro: IBGE, 2004a. 1 mapa, color. Escala 1:5 000 000. Projeção policônica.
- IBGE, 2004b. MAPA de vegetação do Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, 2004b. 1 mapa, color. Escala 1:5 000 000. Projeção policônica.
- Jaleel, C.A., Manivannan, P., Wahid, A., Farooq, M., Somasundaram, R., Panneerselvam, R., 2009. Drought Stress in Plants: A Review on Morphological Characteristics and Pigments Composition. *Int J Agric* 11, 100–105.
- Jassim, S.A.A., Naji, M.A., 2003. Novel antiviral agents: A medicinal plant perspective. *J. Appl. Microbiol.* 95, 412–427. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.02026.x
- Javanmardi, J., 2003. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food Chem.* 83, 547–550. doi:10.1016/S0308-8146(03)00151-1
- Jensen, S., 2002. Chemotaxonomy of the Oleaceae: iridoids as taxonomic markers. *Phytochemistry* 60, 213–231. doi:10.1016/S0031-9422(02)00102-4
- Jeong, S.T., Goto-Yamamoto, N., Kobayashi, S., Esaka, M., 2004. Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. *Plant Sci.* 167, 247–252. doi:10.1016/j.plantsci.2004.03.021
- Judd, W., Campbell, C., Kellogg, E., Stevens, P., Donoghue, M., 2002. *Plant systematics: a*

- phylogenetic approach, Second. ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Junior, P., 1991. Exaltoside and 7-Epiexaltoside, Two Novel Acylated Secoiridoid Glucosides from *Villarsia exaltata* *. *Planta Med.* 57, 181–183. doi:10.1055/s-2006-960061
- Kalt, W., Forney, C.F., Martin, A., Prior, R.L., 1999. Antioxidant Capacity, Vitamin C, Phenolics, and Anthocyanins after Fresh Storage of Small Fruits. *J. Agric. Food Chem.* 47, 4638–4644. doi:10.1021/jf990266t
- Kapravelou, G., Martínez, R., Andrade, A.M., López Chaves, C., López-Jurado, M., Aranda, P., Arrebola, F., Cañizares, F.J., Galisteo, M., Porres, J.M., 2015. Improvement of the antioxidant and hypolipidaemic effects of cowpea flours (*Vigna unguiculata*) by fermentation: results of *in vitro* and *in vivo* experiments. *J. Sci. Food Agric.* 95, 1207–1216. doi:10.1002/jsfa.6809
- Karousou, R., Grammatikopoulos, G., Lanaras, T., Manetas, Y., Kokkini, S., 1998. Effects of enhanced UV-B radiation on *Mentha spicata* essential oils. *Phytochemistry* 49, 2273–2277. doi:10.1016/S0031-9422(98)00385-9
- Karthikesan, K., Pari, L., Menon, V.P., 2010. Protective effect of tetrahydrocurcumin and chlorogenic acid against streptozotocin-nicotinamide generated oxidative stress induced diabetes. *J. Funct. Foods* 2, 134–142. doi:10.1016/j.jff.2010.04.001
- Kelley, C.J., Mahajan, J.R., Crooks, L., Neubert, L., Breneman, W.R., Carmack, M., 1975. Polyphenolic Acids of *Lithospermum ruderale* Dougl. ex Lehm.(Boraginaceae). 1. Isolation and Structure Determination of Lithospermic Acid. *J. Org. Chem.* 40, 1804–1815. doi:10.1021/jo00900a028
- Kharytonchyk, S., King, S.R., Ndongmo, C.B., Stilger, K.L., An, W., Telesnitsky, A., 2016. Resolution of Specific Nucleotide Mismatches by Wild-Type and AZT-Resistant Reverse Transcriptases during HIV-1 Replication. *J. Mol. Biol.* 428, 2275–2288. doi:10.1016/j.jmb.2016.04.005
- Kim, G.-D., Park, Y.S., Jin, Y.-H., Park, C.-S., 2015. Production and applications of rosmarinic acid and structurally related compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 2083–2092. doi:10.1007/s00253-015-6395-6
- Kim, H.J., Woo, E.-R., Shin, C.-G., Park, H., 1998. A New Flavonol Glycoside Gallate Ester from *Acer okamotoanum* and Its Inhibitory Activity against Human Immunodeficiency Virus-1 (HIV-1) Integrase. *J. Nat. Prod.* 61, 145–148. doi:10.1021/np970171q
- Klink, C.A., Machado, R.B., 2005. Conservation of the Brazilian Cerrado. *Conserv. Biol.* 19, 707–

713. doi:10.1111/j.1523-1739.2005.00702.x

- Koehn, F.E., Carter, G.T., 2005. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 206–20. doi:10.1038/nrd1657
- Kooiman, P., 1972. The occurrence of iridoid glycosides in the Labiatae. *Acta Bot. Neerl.* 21, 417–427.
- Kosar, M., Dorman, H.J.D., Bachmayer, O., Baser, K.H.C., Hiltunen, R., 2003. An improved on-line HPLC-DPPH* method for the screening of free radical scavenging compounds in water extracts of Lamiaceae plants. *Chem. Nat. Compd.* 39, 161–166. doi:10.1023/A:1024853628326
- Kuhn, A.W., Tedesco, M., Boligon, A.A., Frescura, V.D.-S., Athayde, M.L., Tedesco, S.B., 2015. Genotoxic and chromatographic analyses of aqueous extracts of *Peltodon longipes* Kunth ex Benth. (hortelã-do-campo). *Brazilian J. Pharm. Sci.* 51, 533–540. doi:10.1590/S1984-82502015000300005
- Kumar, S., Pandey, A.K., 2013. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *ScientificWorldJournal.* 2013, 162750. doi:10.1155/2013/162750
- Kumar, S., Sati, O.P., Semwal, V.D., Nautiyal, M., Sati, S., Takeda, Y., 2000. Iridoid glycosides from *Lonicera quinquelocularis*. *Phytochemistry* 53, 499–501. doi:10.1016/S0031-9422(99)00426-4
- Kutchan, T.M., 2001. Ecological Arsenal and Developmental Dispatcher. The Paradigm of Secondary Metabolism. *PLANT Physiol.* 125, 58–60. doi:10.1104/pp.125.1.58
- Kwon, H.S., Park, J.A., Kim, J.-H., You, J.C., 2012. Identification of anti-HIV and anti-reverse transcriptase activity from *Tetracera scandens*. *BMB Rep.* 45, 165–70.
- Larrosa, M., García-Conesa, M.T., Espín, J.C., Tomás-Barberán, F.A., 2010. Ellagitannins, ellagic acid and vascular health. *Mol. Aspects Med.* 31, 513–539. doi:10.1016/j.mam.2010.09.005
- Lee, S.-A., Hong, S.-K., Suh, C.-I., Oh, M.-H., Park, J.-H., Choi, B.-W., Park, S.-W., Paik, S.-Y., 2010. Anti-HIV-1 efficacy of extracts from medicinal plants. *J. Microbiol.* 48, 249–52. doi:10.1007/s12275-009-0176-9
- Leitner, J., 1942. Ein Beitrag zur Kenntniss der Pollenkorner der Labiatae. *OG sterr Bot. Z.* 91, 29.
- Leteane, M.M., Ngwenya, B.N., Muzila, M., Namushe, A., Mwinga, J., Musonda, R., Moyo, S.,

- Mengestu, Y.B., Abegaz, B.M., Andrae-Marobela, K., 2012. Old plants newly discovered: *Cassia sieberiana* D.C. and *Cassia abbreviata* Oliv. Oliv. root extracts inhibit in vitro HIV-1c replication in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by different modes of action. *J. Ethnopharmacol.* 141, 48–56. doi:10.1016/j.jep.2012.01.044
- Li, B.Q., Fu, T., Dongyan, Y., Mikovits, J.A., Ruscetti, F.W., Wang, J.M., 2000. Flavonoid baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276, 534–538. doi:10.1006/bbrc.2000.3485
- Li, H.-B., Wong, C.-C., Cheng, K.-W., Chen, F., 2008. Antioxidant properties *in vitro* and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT - Food Sci. Technol.* 41, 385–390. doi:10.1016/j.lwt.2007.03.011
- Li, J.W.-H., Vederas, J.C., 2009. Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? *Science* (80-.). 325, 161–165. doi:10.1126/science.1168243
- Li, Y., Shi, W., Li, Y., Zhou, Y., Hu, X., Song, C., Ma, H., Wang, C., Li, Y., 2008. Neuroprotective effects of chlorogenic acid against apoptosis of PC12 cells induced by methylmercury. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 26, 13–21. doi:10.1016/j.etap.2007.12.008
- Lila, M., Raskin, I., 2005. Health related Interactions of Phytochemicals. *J. Food Sci.* 70, R20–R27.
- Limtrakul, P., Khantamat, O., Pintha, K., 2005. Inhibition of P-glycoprotein function and expression by kaempferol and quercetin. *J. Chemother.* 17, 86–95. doi:10.1179/joc.2005.17.1.86
- Lin, Y.-M., Anderson, H., Flavin, M.T., Pai, Y.-H.S., Mata-Greenwood, E., Pengsuparp, T., Pezzuto, J.M., Schinazi, R.F., Hughes, S.H., Chen, F.-C., 1997. *In Vitro* Anti-HIV Activity of Biflavonoids Isolated from *Rhus succedanea* and *Garcinia multiflora*. *J. Nat. Prod.* 60, 884–888. doi:10.1021/np9700275
- Lisboa, A.C.C.D., Mello, I.C.M., Nunes, R.S., dos Santos, M.A., Antonioli, A.R., Marçal, R.M., Cavalcanti, S.C. de H., 2006. Antinociceptive effect of *Hyptis pectinata* leaves extracts. *Fitoterapia* 77, 439–442. doi:10.1016/j.fitote.2006.06.001
- Liu, R.H., Zhang, W.D., Gu, Z.B., Zhang, C., Su, J., Xu, X.K., 2006. Two new iridoids from roots of *Patrinia scabra* Bunge. *Nat. Prod. Res.* 20, 866–870. doi:10.1080/14786410500463494
- Lopes, S., von Poser, G.L., Kerber, V.A., Farias, F.M., Konrath, E.L., Moreno, P., Sobral, M.E., Zuanazzi, J.A.S., Henriques, A.T., 2004. Taxonomic significance of alkaloids and iridoid glucosides in the tribe Psychotrieae (Rubiaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 32, 1187–1195.

doi:10.1016/j.bse.2004.04.015

- Ma, C.M., Kully, M., Khan, J.K., Hattori, M., Daneshtalab, M., 2007. Synthesis of chlorogenic acid derivatives with promising antifungal activity. *Bioorganic Med. Chem.* 15, 6830–6833. doi:10.1016/j.bmc.2007.07.038
- Mackowiak, P. a, 2000. Brief History of Antipyretic Therapy. *Clin. Infect. Dis.* 31, S154–S156. doi:10.1086/317510
- Mahady, G.B., Pendland, S.L., Stoia, A., Hamill, F.A., Fabricant, D., Dietz, B.M., Chadwick, L.R., 2005. *In Vitro* susceptibility of *Helicobacter pylori* to botanical extracts used traditionally for the treatment of gastrointestinal disorders. *Phyther. Res.* 19, 988–991. doi:10.1002/ptr.1776
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 727–47.
- Markham, K. R., 1982. Techniques of flavonoid identification. Vol. 31. London: Academic press.
- Markham, K.R., Tanner, G.J., Caasi-Lit, M., Whitecross, M.I., Nayudu, M., Mitchell, K.A., 1998. Possible protective role for 3', 4' - dihydroxyflavones Induced by enhanced UV-B in a UV-tolerant rice cultivar. *Phytochemistry* 49, 1913–1919. doi:10.1016/S0031-9422(98)00438-5
- Martins, N., Barros, L., Ferreira, I.C.F.R., 2016. *In vivo* antioxidant activity of phenolic compounds: Facts and gaps. *Trends Food Sci. Technol.* 48, 1–12. doi:10.1016/j.tifs.2015.11.008
- Matkowski, A., Piotrowska, M., 2006. Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae. *Fitoterapia* 77, 346–353. doi:10.1016/j.fitote.2006.04.004
- Matsuse, I.T., Nakabayashi, T., Lim, Y.A., Hussein, G.M.E., Miyashiro, H., Kakiuchi, N., Hattori, M., Stardjo, S., Shimotohno, K., 1997. A human immunodeficiency virus protease inhibitory substance from *Swietenia mahagoni*. *Phyther. Res.* 11, 433–436. doi:10.1002/(SICI)1099-1573(199709)11:6<433::AID-PTR122>3.0.CO;2-#
- Mattson, W.J., Haack, R.A., 1987. The role of drought stress in provoking outbreaks of phytophagous insects. *Insect Outbreaks.*
- Maxwell, S.R.J., 1995. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs* 49, 345–361.
- Mazumder, A., Neamati, N., Sunder, S., Schulz, J., Pertz, H., Eich, E., Pommier, Y., 1997. Curcumin analogs with altered potencies against HIV-1 integrase as probes for biochemical

- mechanisms of drug action. *J. Med. Chem.* 40, 3057–3063. doi:10.1021/jm970190x
- McKay, D.L., Blumberg, J.B., 2002. The role of tea in human health: an update. *J. Am. Coll. Nutr.* 21, 1–13.
- Medeiros, K.C.P., Monteiro, J.C., Diniz, M.F.F.M., Medeiros, I.A., Silva, B.A., Piuvezam, M.R., 2007. Effect of the activity of the Brazilian polyherbal formulation: *Eucalyptus globulus* Labill, *Peltodon radicans* Pohl and *Schinus terebinthifolius* Radd in inflammatory models. *Rev. Bras. Farmacogn.* 17, 23–28. doi:10.1590/S0102-695X2007000100006
- Medina E., O.E. and . D.M., 1984. Water stress and light intensity effects on growth and nocturnal acid accumulation in a terrestrial CAM bromeliad (*Bromelia humilis* Jacq.) under natural conditions. *Oecologia* 70, 441–446.
- Messana, I., Ferrari, F., de Moraes e Souza, M.A., Gács-Baitz, E., 1990. (–)-Salzol, an isopimarane diterpene, and a chalcone from *Hyptis salzmanii*. *Phytochemistry* 29, 329–332. doi:10.1016/0031-9422(90)89065-H
- Metlen, K.L., Aschehoug, E.T., Callaway, R.M., 2009. Plant behavioural ecology: dynamic plasticity in secondary metabolites. *Plant. Cell Environ.* 32, 641–653. doi:10.1111/j.1365-0402.2008.01910.x
- Min, B., McClung, A.M., Chen, M.-H., 2011. Phytochemicals and antioxidant capacities in rice brans of different color. *J. Food Sci.* 76, C117-26. doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01929.x
- Miranda, G.S., Santana, G.S., Machado, B.B., Coelho, F.P., Carvalho, C.A., 2013. Atividade antibacteriana *in vitro* de quatro espécies vegetais em diferentes graduações alcoólicas. *Rev. Bras. Plantas Med.* 15, 104–111. doi:10.1590/S1516-05722013000100015
- Moon, J., Shibamoto, T., 2009. Antioxidant Assays for Plant and Food Components Antioxidant Assays for Plant and Food Components 57, 1655–1666. doi:10.1021/jf803537k
- Moura, K. De, Emery, F., 2001. Trypanocidal activity of isolated naphthoquinones from *Tabebuia* and some heterocyclic derivatives: a review from an interdisciplinary study. *J. Braz. Chem. Soc.* 12, 325–338.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A.B., Kent, J., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403, 853–858. doi:10.1038/35002501
- Nacif de Abreu, I., Mazzafera, P., 2005. Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. *Plant Physiol. Biochem.* 43, 241–248. doi:10.1016/j.plaphy.2005.01.020

-
- Newman, D.J., Cragg, G.M., 2016. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* 79, 629–661. doi:10.1021/acs.jnatprod.5b01055
- Ng, T., Huang, B., Fong, W., Yeung, H., 1997. Anti-human immunodeficiency virus (anti-HIV) natural products with special emphasis on HIV reverse transcriptase inhibitors. *Life Sci.* 61, 933–949.
- Oh, M.-M., Trick, H.N., Rajashekar, C.B., 2009. Secondary metabolism and antioxidants are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce. *J. Plant Physiol.* 166, 180–191. doi:10.1016/j.jplph.2008.04.015
- Oliveira, A. de, Valentim, I., Goulart, M., 2009. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Quim. Nova* 32, 689–702.
- Ou, B., Hampsch-woodill, M., Prior, R.L., 2001. Development and validation of an improved Oxygen Radical Absorbance Capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem* 49, 4619–4626. doi:10.1021/jf010586o
- Partida, M., Santos, K., Loureiro, B., Furlan, C., 2015. Anti-HIV activity of *Hyptis* Jacq. (Lamiaceae). *Planta Med.* 81, 1. doi:10.1055/s-0035-1565465
- Pastore, J.F.B., 2010. Filogenia molecular da subtribo Hyptidinae Endl. (Labiatae) e suas implicações taxonômicas. Tese de Doutorado. Universidade estadual de Feira de Santana.
- Pavarini, D.P., Pavarini, S.P., Niehues, M., Lopes, N.P., 2012. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. *Anim. Feed Sci. Technol.* 176, 5–16. doi:10.1016/j.anifeedsci.2012.07.002
- Paynter, N.P., Yeh, H.-C., Voutilainen, S., Schmidt, M.I., Heiss, G., Folsom, A.R., Brancati, F.L., Kao, W.H.L., 2006. Coffee and Sweetened Beverage Consumption and the Risk of Type 2 *Diabetes Mellitus*: The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Am. J. Epidemiol.* 164, 1075–1084. doi:10.1093/aje/kwj323
- Peçanha, E., Antunes, O., Tanuri, A., 2002. Estratégias farmacológicas para a terapia anti-AIDS. *Quim. Nova* 25, 1108–1116.
- Pedersen, J.A., 2000. Distribution and taxonomic implications of some phenolics in the family Lamiaceae determined by ESR spectroscopy. *Biochem. Syst. Ecol.* 28, 229–253.
- Pereda-Miranda, R., Delgado, G., 1990. Triterpenoids and Flavonoids from *Hyptis albida*. *J. Nat. Prod.* 53, 182–185. doi:10.1021/np50067a028
-

- Pereda-Miranda, R., Hernández, L., Villavicencio, M.J., Novelo, M., Ibarra, P., Chai, H., Pezzuto, J.M., 1993. Structure and Stereochemistry of Pectinolides A-C, Novel Antimicrobial and Cytotoxic 5,6-Dihydro- α -pyrones from *Hyptis pectinata*. *J. Nat. Prod.* 56, 583–593. doi:10.1021/np50094a019
- Pereira, E.B., Martins, F.R., Abreu, S.L. De, Rütther, R., 2006. Brazilian Atlas of Solar Energy.
- Petersen, M., Simmonds, M.S.J., 2003. Rosmarinic acid. *Phytochemistry* 62, 121–125. doi:10.1016/S0031-9422(02)00513-7
- Pietta, P.G., 2000. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* 63, 1035–1042. doi:10.1021/np9904509
- Piñeros-Hernandez, D., Medina-Jaramillo, C., López-Córdoba, A., Goyanes, S., 2017. Edible cassava starch films carrying rosemary antioxidant extracts for potential use as active food packaging. *Food Hydrocoll.* 63, 488–495. doi:10.1016/j.foodhyd.2016.09.034
- Poljšak, B., Raspor, P., 2008. The antioxidant and pro-oxidant activity of vitamin C and trolox *in vitro*: a comparative study. *J. Appl. Toxicol.* 183–188. doi:10.1002/jat
- Potterat, O., Msonthi, J.D., Hostettmann, K., 1988. Four iridoid glucosides and a phenylpropanoid glycoside from *Sesamum angolense*. *Phytochemistry* 27, 2677–2679. doi:10.1016/0031-9422(88)87042-0
- Quintans-Júnior, L.J., Brito, R.G., Quintans, J.S.S., Santos, P.L., Camargo, Z.T., Barreto, P.A., Arrigoni-Blank, M.F., Lucca-Júnior, W., Scotti, L., Scotti, M.T., Kolker, S.J., Sluka, K.A., 2017. Nanoemulsion Thermoreversible Pluronic F127-Based Hydrogel Containing *Hyptis pectinata* (Lamiaceae) Leaf Essential Oil Produced a Lasting Anti-hyperalgesic Effect in Chronic Noninflammatory Widespread Pain in Mice. *Mol. Neurobiol.* 1–11. doi:10.1007/s12035-017-0438-1
- Rahman, I., Biswas, S.K., Kode, A., 2006. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *Eur. J. Pharmacol.* 533, 222–239. doi:10.1016/j.ejphar.2005.12.087
- Raja, R.R., 2012. Medicinally Potential Plants of Labiatae (Lamiaceae) Family: An Overview. *Res. J. Med. Plant* 6, 203–213. doi:10.3923/rjmp.2012.203.213
- Razzaghi-Asl, N., Garrido, J., Khazraei, H., Borges, F., Firuzi, O., 2013. Antioxidant Properties of Hydroxycinnamic Acids: A Review of Structure- Activity Relationships. *Curr. Med. Chem.* 20, 4436–4450. doi:10.2174/09298673113209990141
- Reginatto, F.H., 2017. Introdução à análise fitoquímica., in: Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. (Eds.), *Farmacognosia: Do Produto Natural Ao*

Medicamento. Artmed, Porto Alegre, p. 486.

- Regnault-Roger, C., Ribodeau, M., Hamraoui, A., Bateau, I., Blanchard, P., Gil-Munoz, M.I., Barberan, F.T., 2004. Polyphenolic compounds of Mediterranean Lamiaceae and investigation of orientational effects on *Acanthoscelides obtectus* (Say). *J. Stored Prod. Res.* 40, 395–408. doi:10.1016/S0022-474X(03)00031-6
- Ribeiro, J.F., Walter, B.M.T., 1998. Fitofisionomias do bioma Cerrado, in: Sano, S.M., Almeida, S.P. de (Eds.), *Cerrado: Ambiente e Flora*. pp. 89–166.
- Ricardo, L.M., Paula-Souza, J. de, Andrade, A., Brandão, M.G.L., 2017. Plants from the Brazilian Traditional Medicine: species from the books of the Polish physician Piotr Czerniewicz (Pedro Luiz Napoleão Chernoviz, 1812–1881). *Rev. Bras. Farmacogn.* 27, 388–400. doi:10.1016/j.bjp. 2017.01.002
- Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20, 933–956.
- Robinson, W.E., Reinecke, M.G., Abdel-Malek, S., Jia, Q., Chow, S. a, 1996. Inhibitors of HIV-1 replication that inhibit HIV integrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 6326–6331. doi:10.2307/ 39304
- Rodrigues, V.E.G., Carvalho, D.A. de, 2001. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais do domínio do Cerrado na região do Alto Rio Grande-Minas Gerais. *Ciência e Agrotecnologia* 25, 102–123.
- Rubió, L., Motilva, M.-J., Romero, M.-P., 2013. Recent Advances in Biologically Active Compounds in Herbs and Spices: A Review of the Most Effective Antioxidant and Anti-Inflammatory Active Principles. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 53, 943–953. doi:10.1080/10408398.2011.574802
- Ruiz, A.L.T.G., Magalhães, E.G., Magalhães, A.F., Faria, A.D., Amaral, M.C.E., Serrano, D.R., Zanotti-Magalhães, E.M., Magalhães, L.A., 2005. Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (Cyperaceae). *Rev. Bras. Farmacogn.* 15, 98–102. doi:10.1590/S0102-695X2005000200005
- Rupa, D., Sulistyaningsih, Y.C., Dorly, Ratnadewi, D., 2017. Identification of secretory structure, histochemistry and phytochemical compounds of medicinal plant *Hyptis capitata* Jacq. *Biotropia (Bogor)*. 24, 94–103. doi:10.11598/btb.2017.24.2.499
- Saklani, A., Kutty, S., 2008. Plant-derived compounds in clinical trials. *Drug Discov. Today* 13,

161–171. doi:10.1016/j.drudis.2007.10.010

- Sala-Carvalho, W.R., 2017. Estudo in vitro dos potenciais antioxidante, antimicrobiano e anti-HIV de extratos de *Hyptis lacustris* A. St.-Hil. ex Benth. (Lamiaceae). Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo.
- Saldanha, L., 2017. Plantas medicinais: isolamento bioguiado de princípios ativos e variações de perfil químico no Cerrado brasileiro baseado em metabolômica. Tese de Doutorado. Universidade do Estado de São Paulo (UNESP).
- Sampaio, B.L., Da Costa, F.B., 2018. Influence of abiotic environmental factors on the main constituents of the volatile oils of *Tithonia diversifolia*. Rev. Bras. Farmacogn. 28, 135–144. doi:10.1016/j.bjp.2018.02.005
- Santos, D.Y.A.C., Brandimarte, A.L., 2014. Biomas e biodiversidade: biomas brasileiros (Cap. 5) em Diversidade Biológica, História da vida na Terra e Bioenergética. UNIVESP, São Paulo.
- Santos, K.P., Sedano-Partida, M.D., Motta, L.B., Cordeiro, I., Furlan, C.M., 2016. Antioxidant activity of flavonoids from *Croton sphaerogynus* Baill. Brazilian J. Bot. 39, 1021–1030. doi:10.1007/s40415-016-0302-y
- Santos, T.C., Marques, M.S., Menezes, I.A.C., Dias, K.S., Silva, A.B.L., Mello, I.C.M., Carvalho, A.C.S., Cavalcanti, S.C.H., Antonioli, Â.R., Marçal, R.M., 2007. Antinociceptive effect and acute toxicity of the *Hyptis suaveolens* leaves aqueous extract on mice. Fitoterapia 78, 333–336. doi:10.1016/j.fitote.2007.01.006
- Sarafianos, S.G., Marchand, B., Das, K., Himmel, D.M., Parniak, M.A., Hughes, S.H., Arnold, E., 2009. Structure and Function of HIV-1 Reverse Transcriptase: Molecular Mechanisms of Polymerization and Inhibition. J. Mol. Biol. 385, 693–713. doi:10.1016/j.jmb.2008.10.071
- Schmidt, B., Ribnicky, D.M., Poulev, A., Logendra, S., Cefalu, W.T., Raskin, I., 2008. A natural history of botanical therapeutics. Metabolism. 57, S3–S9. doi:10.1016/j.metabol.2008.03.001
- Scio, E., Mendes, R.F., Motta, E.V.S., Bellozi, P.M., Aragão, D.M.O., Mello, J., Fabri, R.L.F., Moreira, J.R.M., de Assis, I.V.L., Bouzada, M.L.M., 2012. Antimicrobial and antioxidant activities of some plant extracts. Phytochemicals as nutraceuticals - Global approaches to their role in nutrition and health. InTech.
- Sedano-Partida, M.D., 2018. Chemical and biological potential of *Hyptis* Jacq. (Lamiaceae). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- Sedano-Partida, M.D., Sala-Carvalho, W.R., Santos, K.P., Furlan, C.M., 2018. *Hyptis* Jacq.: a

general chemical profile review. *Fitoterapia* (submetido).

- Sedano Partida, M., Lombello, R., Furlan, C., 2014. Anti-HIV activity of extracts from *Hyptis radicans* (Lamiaceae). *Planta Med.* 80, 1. doi:10.1055/s-0034-1395101
- Serafini, M., Vergne, D., Menezes, P., Santos, J., Rabelo, T., Saravanan, S., Alves, P., Costa, E., Jesus, H., Salvador, M., Gelain, D., Moreira, J., Rocha, R., Araújo, A., Quintans-Júnior, L., 2017. Characterization and Evaluation of the Antioxidant Activity of Calamusenone, a Major Component of *Hyptis pectinata* (L.) Poit Essential Oil. *Lett. Drug Des. Discov.* 14, 1–1. doi:10.2174/1570180814666170309130728
- Sevgi, K., Tepe, B., Sarikurkcu, C., 2015. Antioxidant and DNA damage protection potentials of selected phenolic acids. *Food Chem. Toxicol.* 77, 12–21. doi:10.1016/j.fct.2014.12.006
- Shahidi, F., Janitha, P.K., Wanasundara, P.D., 1992. Phenolic antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 32, 67–103. doi:10.1080/10408399209527581
- Shahidi, F., Zhong, Y., 2015. Measurement of antioxidant activity. *J. Funct. Foods* 18, 757–781. doi:10.1016/j.jff.2015.01.047
- Shi, R., Huang, Q., Zhu, X., Ong, Y.-B., Zhao, B., Lu, J., Ong, C.-N., Shen, H.-M., 2007. Luteolin sensitizes the anticancer effect of cisplatin via c-Jun NH2-terminal kinase-mediated p53 phosphorylation and stabilization. *Mol. Cancer Ther.* 6, 1338–1347. doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0638
- Shinozaki, K., Uemura, M., Bailey-Serres, J., Bray, E.A., Weretilnyk, E., 2015. Responses to abiotic stress, in: Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L. (Eds.), *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. John Wiley & Sons, Berkeley and Zurich, p. 1264.
- Silva-Luz, C.L. da, Gomes, C.G., Pirani, J.R., Harley, R.M., 2012. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Lamiaceae. *Bol. Botânica* 30, 109. doi:10.11606/issn.2316-9052.v30i2p109-155
- Silva, A.B.L., Dias, K.S., Marques, M.S., Menezes, I. a. C., Santos, T.C., Mello, I.C.M., Lisboa, A.C.C.D., Cavalcanti, S.C.H., Marçal, R.M., Antonioli, A.R., 2006. Avaliação do efeito antinociceptivo e da toxicidade aguda do extrato aquoso da *Hyptis fruticosa* Salmz. ex Benth. *Rev. Bras. Farmacogn.* 16, 475–479. doi:10.1590/S0102-695X2006000400006
- Silva, J.R.D.A., Amaral, A.C.F., Silveira, C.V. Da, Rezende, C.M., Pinto, A.C., 2007. Quantitative determination by HPLC of iridoids in the bark and latex of *Himatanthus sucuuba*. *Acta Amaz.* 37, 119–122. doi:10.1590/S0044-59672007000100014
- Silva, M.M., Santos, M.R., Carçoço, G., Rocha, R., Justino, G., Mira, L., 2002. Structure-antioxidant

- activity relationships of flavonoids: A re-examination. *Free Radic. Res.* 36, 1219–1227. doi:10.1080/198-1071576021000016472
- Singh, I.P., Bodiwala, H.S., 2010. Recent advances in anti-HIV natural products. *Nat. Prod. Rep.* 27, 1781–800. doi:10.1039/c0np00025f
- Skirycz, A., Inzé, D., 2010. More from less: plant growth under limited water. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21, 197–203. doi:10.1016/j.copbio.2010.03.002
- Southwell, I. a, Bourke, C. a, 2001. Seasonal variation in hypericin content of *Hypericum perforatum* L. (St. John's Wort). *Phytochemistry* 56, 437–441. doi:10.1016/S0031-9422(00)00411-8
- Souza, L.K., Oliveira, C.M. de, Ferri, P.H., Oliveira Júnior, J.G. de, Souza Júnior, A.H. de, Fernandes, O. de F.L., Silva, M. do R.R., 2003. Antimicrobial activity of *Hyptis ovalifolia* towards dermatophytes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98, 963–965. doi:10.1590/S0074-02762003000700018
- Sulaiman, C.T., Deepak, M., Balachandran, I., 2018. Spectrophotometric and tandem mass spectroscopic analysis of Indian borage (*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.) for its polyphenolics characterization. *Beni-Suef Univ. J. Basic Appl. Sci.* doi:10.1016/j.bjbas.2018.04.004
- Taiz, L.; Zeiger, E. *Fisiologia vegetal*. 5ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954 p.
- Taiz, L., Zeiger, E., 1998. *Plant Physiology*, 2nd ed. Sinauer Associates Publishers, Sunderland, Massachusetts.
- Tattini, M., Galardi, C., Pinelli, P., Massai, R., Remorini, D., Agati, G., 2004. Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. *New Phytologist*, 163(3), 547-561.
- Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido, E.M., Garrido, J., Borges, F., 2013. Hydroxycinnamic Acid Antioxidants: An Electrochemical Overview. *Biomed Res. Int.* 2013, 1–11. doi:10.1155/2013/251754
- Tomás-Barberán, F.A., Grayer-Barkmeijer, R.J., Gil, M.I., Harborne, J.B., 1988. Distribution of 6-hydroxy-, 6-methoxy- and 8-hydroxyflavone glycosides in the Labiatae, the Scrophulariaceae and related families. *Phytochemistry* 27, 2631–2645. doi:10.1016/0031-9422(88)87034-1
- Tomei, R.R., Salvador, M.J., 2007. Metodologias Analíticas Atuais Para Avaliação Da Atividade Antioxidante De Produtos Naturais. XI Encontro Lat. Am. Iniciação Científica e VII Encontro

Lat. Am. Pós-Graduação – Univ. do Val. do Paraíba 11, 1963–1967.

- Tsai, S.-F., Lee, S.-S., 2014. Neolignans as xanthine oxidase inhibitors from *Hyptis rhomboidea*. *Phytochemistry* 101, 121–127. doi:10.1016/j.phytochem.2014.01.016
- Tu, Y., 2011. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. *Nat. Med.* 17, 1217–1220. doi:10.1038/nm.2471
- Upson, T.M., J. Grayer, R., Greenham, J.R., A. Williams, C., Al-Ghamdi, F., Chen, F.-H., 2000. Leaf flavonoids as systematic characters in the genera *Lavandula* and *Sabaudia*. *Biochem. Syst. Ecol.* 28, 991–1007. doi:10.1016/S0305-1978(00)00013-2
- Valant-Vetschera, K., 1985. C- glycosylflavones in roots and aerial parts of some *Achillea* species. *Biochem. Syst. Ecol.* 13, 119–121. doi:10.1016/0305-1978(85)90069-9
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44–84. doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001
- Valli, M., dos Santos, R.N., Figueira, L.D., Nakajima, C.H., Castro-Gamboa, I., Andricopulo, A.D., Bolzani, V.S., 2013. Development of a Natural Products Database from the Biodiversity of Brazil. *J. Nat. Prod.* 76, 439–444. doi:10.1021/np3006875
- Vasconcelos, S.M.L., Goulart, M.O.F., Moura, J.B.D.F., Manfredini, V., Benfato, M.D.S., Kubota, L.T., 2007. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim. Nova* 30, 1323–1338. doi:10.1590/S0100-40422007000500046
- Vaya, J., Aviram, M., 2001. Nutritional Antioxidants Mechanisms of Action, Analyses of Activities and Medical Applications. *Curr. Med. Chem. Endocr. Metab. Agents* 1, 99–117. doi:10.2174/1568013013359168
- Verma, N., Shukla, S., 2015. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* 2, 105–113. doi:10.1016/j.jarmap.2015.09.002
- Vicentino, A.R.R., Menezes, F. de S., 2007. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. *Rev. Bras. Farmacogn.* 17, 384–387. doi:10.1590/S0102-695X2007000300014
- Vieira, S., 2008. *Introdução à Bioestatística*, 4^a. ed. Elsevier, Rio de Janeiro.

- Vitti, A. M. S., Brito, J. O. 2003. Óleo essencial de eucalipto. Documentos florestais, 17, 1-26.
- Vlietinck, a J., De Bruyne, T., Apers, S., Pieters, L. a, 1998. Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Planta Med.* 64, 97–109. doi:10.1055/s-2006-957384
- Vukovic, N., Sukdolak, S., Solujic, S., Mihailovic, V., Mladenovic, M., Stojanovic, J., Stankovic, M.S., 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of *Teucrium arduini* essential oil and cirsimarín from Montenegro. *J. Med. Plants Res.* 5, 1244–1250.
- Walter, H. 1986. Vegetação e zonas climáticas: tratado de ecologia global. In *Vegetação e zonas climáticas: tratado de ecologia global*. EPU.
- Wang, G.-F., Shi, L.-P., Ren, Y.-D., Liu, Q.-F., Liu, H.-F., Zhang, R.-J., Li, Z., Zhu, F.-H., He, P.-L., Tang, W., Tao, P.-Z., Li, C., Zhao, W.-M., Zuo, J.-P., 2009. Anti-hepatitis B virus activity of chlorogenic acid, quinic acid and caffeic acid *in vivo* and *in vitro*. *Antiviral Res.* 83, 186–190. doi:10.1016/j.antiviral.2009.05.002
- Wang, J.-H., Tam, S.-C., Huang, H., Ouyang, D.-Y., Wang, Y.-Y., Zheng, Y.-T., 2004. Site-directed PEGylation of trichosanthin retained its anti-HIV activity with reduced potency *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317, 965–71. doi:10.1016/j.bbrc.2004.03.139
- Wang, Y.-C., Huang, T.-L., 2005. Screening of anti-*Helicobacter pylori* herbs deriving from Taiwanese folk medicinal plants. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 43, 295–300. doi:10.1016/j.femsim.2004.09.008
- Wang, Y.-Z., Fu, S.-G., Wang, S.-Y., Yang, D.-J., Wu, Y.-H.S., Chen, Y.-C., 2018. Effects of a natural antioxidant, polyphenol-rich rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract, on lipid stability of plant-derived omega-3 fatty-acid rich oil. *LWT* 89, 210–216. doi:10.1016/j.lwt.2017.10.055
- Waterman, P.G., Mole, S., 1994. *Analysis of Phenolic Plant Metabolites.*, 1st ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Wink, M., 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64, 3–19. doi:10.1016/S0031-9422(03)00300-5
- World Health Organization, 2003. WHO guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants. Geneva.
- Wu, J.H., Wang, X.H., Yi, Y.H., Lee, K.H., 2003. Anti-AIDS agents 54. A potent anti-HIV chalcone and flavonoids from genus *Desmos*. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 13, 1813–1815.

doi:10.1016/S0960-894X(03)00197-5

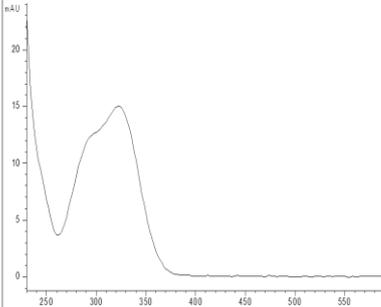
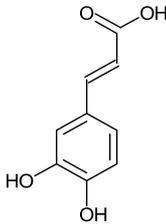
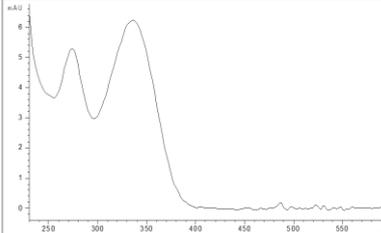
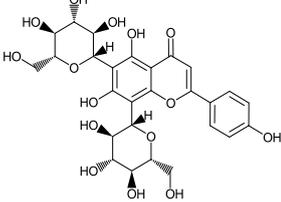
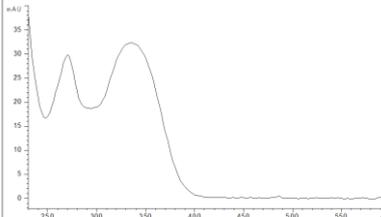
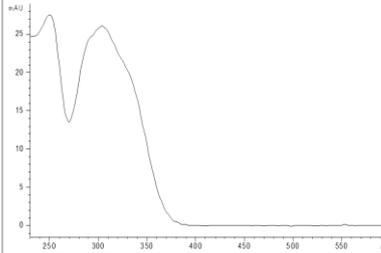
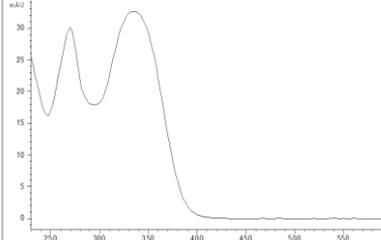
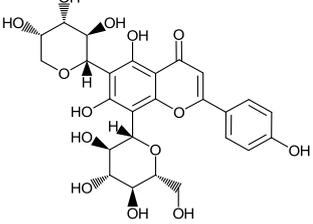
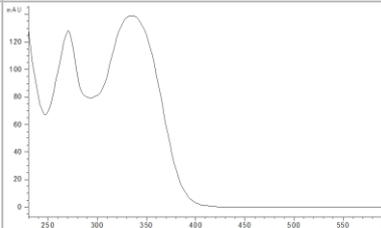
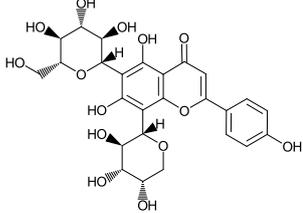
- Yamasaki, K., Nakano, M., Kawahata, T., Mori, H., Otake, T., Ueda, N., Oishi, I., Inami, R., Yamane, M., Nakamura, M., Murata, H., Nakanishi, T., 1998. Anti-HIV-1 Activity of Herbs in Labiatae. *Biol. Pharm. Bull.* 21, 829–833. doi:10.1248/bpb.21.829
- Yang, L., Wen, K.-S., Ruan, X., Zhao, Y.-X., Wei, F., Wang, Q., 2018. Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors. *Molecules* 23, 762. doi:10.3390/molecules23040762
- Yang, S., Cragg, G., 2001. Natural product-based anti-HIV drug discovery and development facilitated by the NCI developmental therapeutics program. *J. Nat. Prod.* 64, 265–277.
- Yanishlieva, N. V., Marinova, E., Pokorný, J., 2006. Natural antioxidants from herbs and spices. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 108, 776–793. doi:10.1002/ejlt.200600127
- Yeh, C.T., Yen, G.C., 2006. Modulation of hepatic phase II phenol sulfotransferase and antioxidant status by phenolic acids in rats. *J. Nutr. Biochem.* 17, 561–569. doi:10.1016/j.jnutbio.2005.10.008
- Yesilada, E., Gürbüz, İ., Toker, G., 2014. Anti-ulcerogenic activity and isolation of the active principles from *Sambucus ebulus* L. leaves. *J. Ethnopharmacol.* 153, 478–483. doi:10.1016/j.jep.2014.03.004
- Youssef, D., Frahm, A., 1995. Constituents of the Egyptian *Centaurea scoparia*; III. Phenolic Constituents of the Aerial Parts. *Planta Med.* 61, 570–573. doi:10.1055/s-2006-959378
- Yun, H.S., Chang, I.M., 1978. Separation and identification of cirsimarin from *Cirsium pendulum* Fisch. *Saengyak Hakhoe Chi* 9, 145–147.
- Zekri, N., Amalich, S., Boughdad, A., Alaoui, M., Belghiti, E., Zair, T., 2013. Phytochemical study and insecticidal activity of *Mentha pulegium* L. oils from Morocco against *Sitophilus Oryzae*. *Mediterr. J. Chem.* 2, 607–619. doi:http://dx.doi.org/10.13171/mjc.2.4.2013.08.11.23
- Zhang, X., Xu, Q., Xiao, H., Liang, X., 2003. Iridoid glucosides from *Strychnos nux-vomica*. *Phytochemistry* 64, 1341–1344. doi:10.1016/S0031-9422(03)00501-6
- Zheng, W., Wang, S.Y., 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agric. Food Chem.* 49, 5165–70.
- Zhou, L., Liu, P., Chen, B., Wang, Y., Wang, X., Internati, M.C., Wachtel, M.S., Frezza, E.E., 2008. Silibinin restores paclitaxel sensitivity to paclitaxel-resistant human ovarian carcinoma

cells. *Anticancer Res.* 28, 1119–1127.

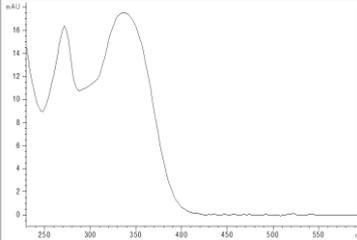
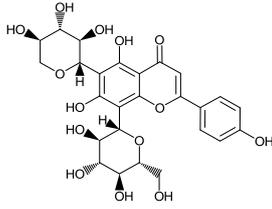
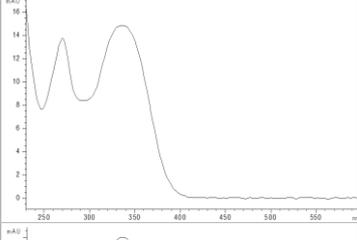
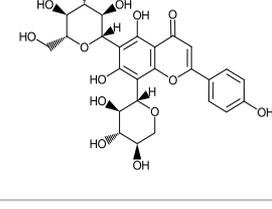
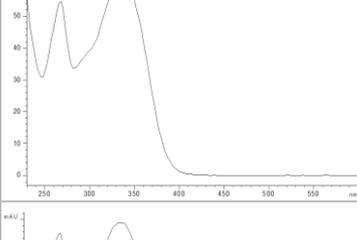
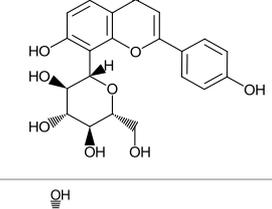
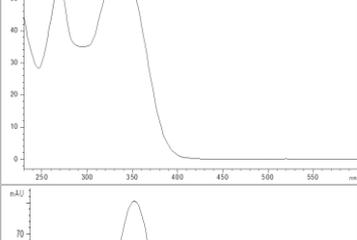
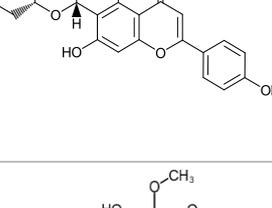
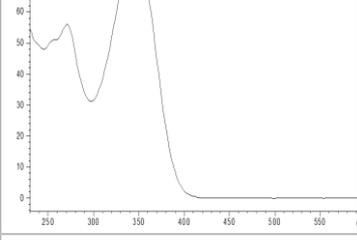
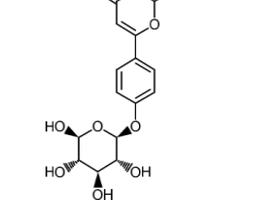
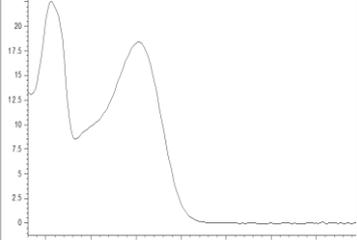
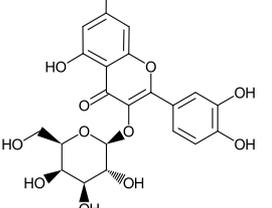
Zuanazzi, J.A.S., Montanha, J.A., Zucolotto, S.M., 2017. Flavonoides, in: Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., de Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. (Eds.), *Farmacognosia: Do Produto Natural Ao Medicamento*. Artmed, Porto Alegre, p. 486.

Anexo

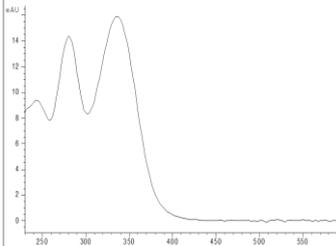
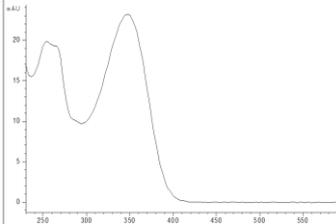
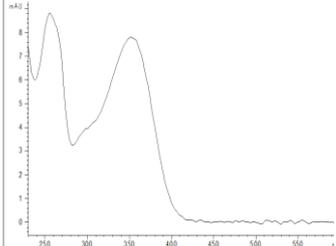
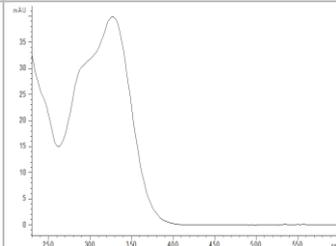
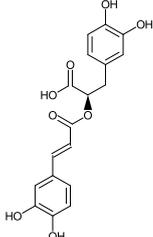
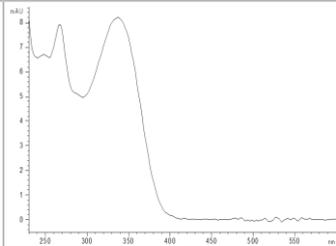
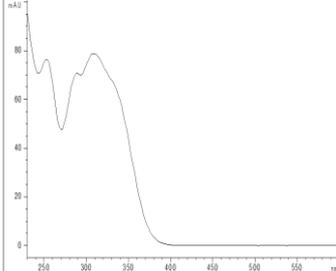
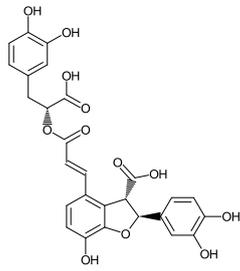
A1 - Espectros de absorção UV-visível dos 50 constituintes do extrato bruto de *Hyptis* spp. detectados por CLAE-DAD e suas estruturas químicas.

Substância*	Sugestão	Uv-visível	Estrutura química
1	Ácido cafêico		
2	Vicenina-2		
3	Derivado de apigenina		
4	ni		
5	Isoescaftosídeo		
6	Escaftosídeo		

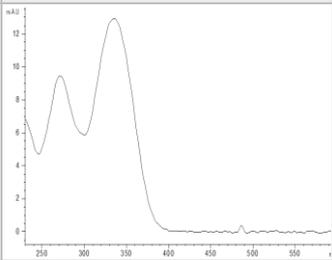
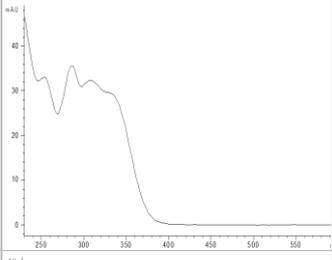
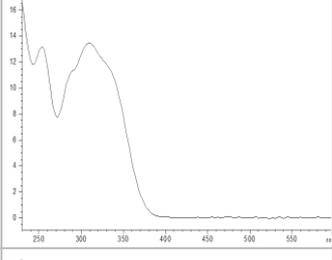
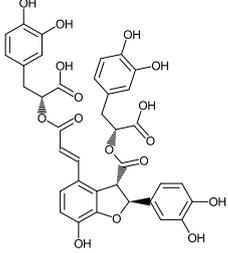
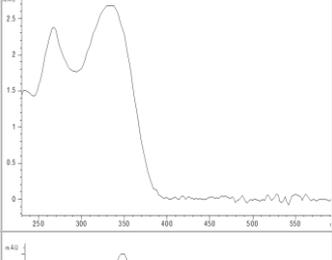
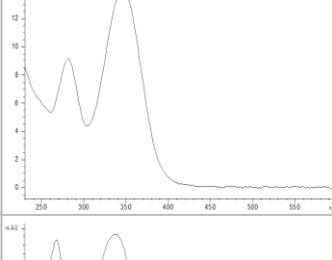
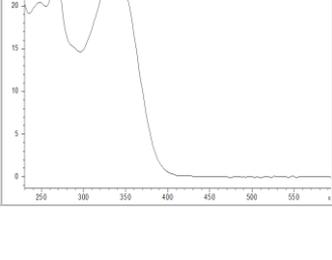
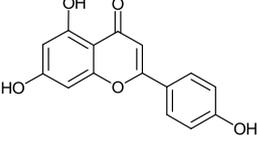
A1 – continuação.

Substância*	Sugestão	Uv-visível	Estrutura química
7	Vicenina-1		
8	Vicenina-3		
9	Vitexina		
10	Isovitexina		
11	Cirsimarina		
12	Quercetina hexosídeo		

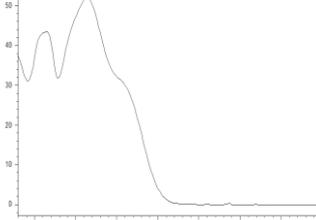
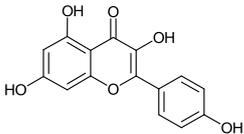
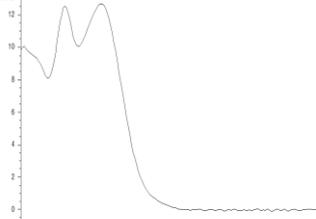
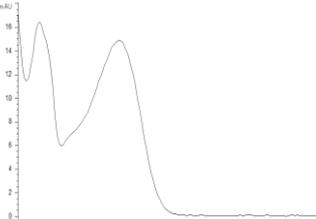
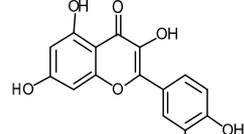
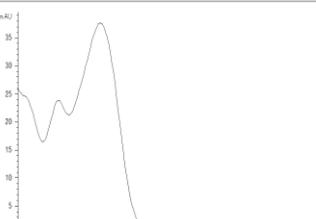
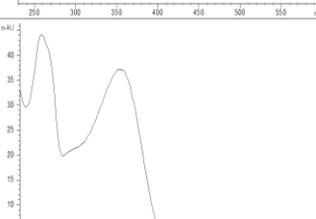
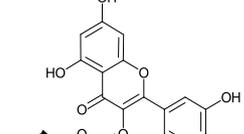
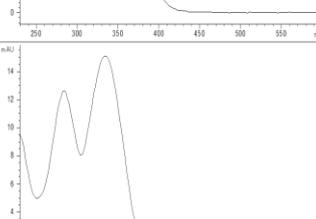
A1 – continuação.

Substância*	Sugestão	Uv-visível	Estrutura química
13	Derivado flavonoídico		
14	Derivado de luteolina		
15	Derivado de quercetina		
16	Ácido rosmarínico		
17	Derivado de apigenina		
18	Ácido litospérmico A		

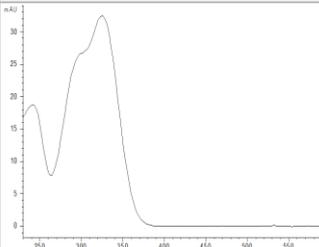
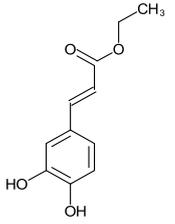
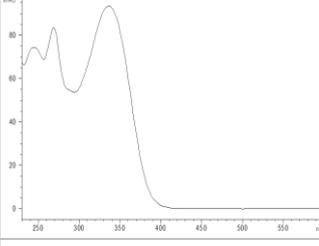
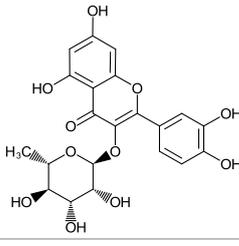
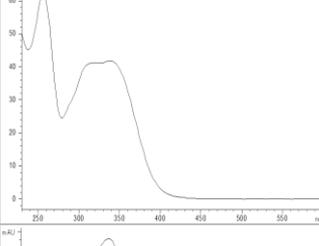
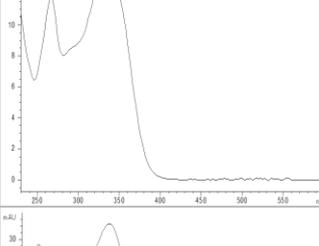
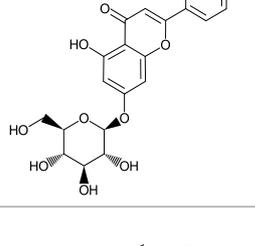
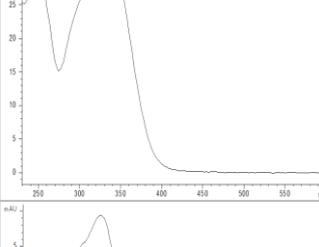
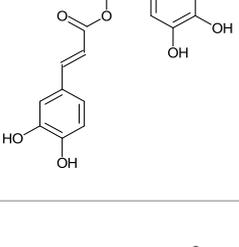
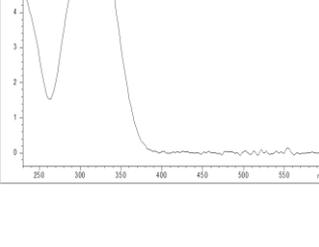
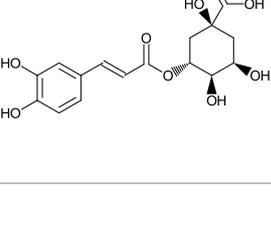
A1 – continuação.

Substância*	Sugestão	Uv-visível	Estrutura química
19	Derivado flavonoídico		
20	ni		
21	Ácido litospérmico B		
22	Derivado flavonoídico		
23	Derivado flavonoídico		
24	Derivado de apigenina		

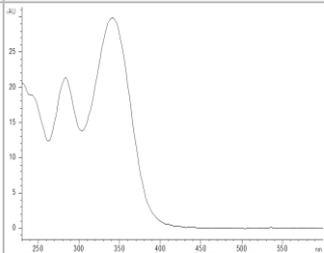
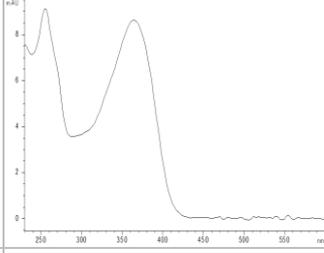
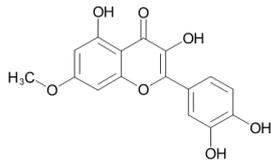
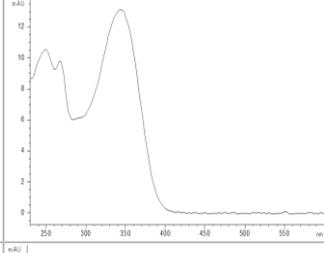
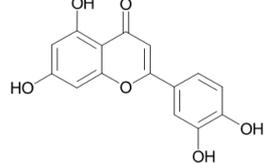
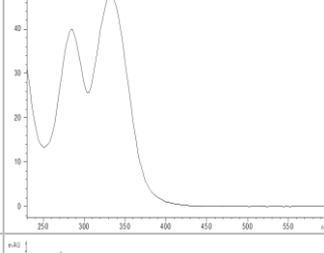
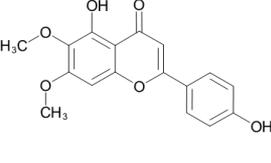
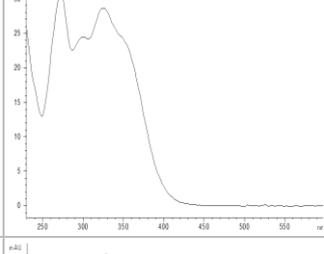
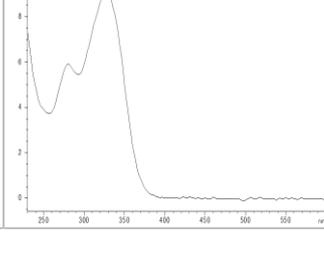
A1 – continuação.

Substância*	Sugestão	Uv-visível	Estrutura química
25	Derivado de campferol		
26	Derivado flavonoídico		
27	Quercetina		
28	Derivado flavonoídico		
29	Quercetina hexosídeo		
30	Derivado flavonoídico		

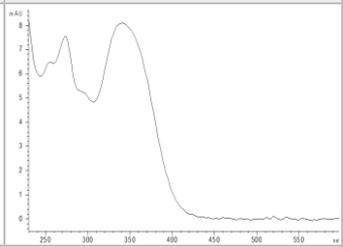
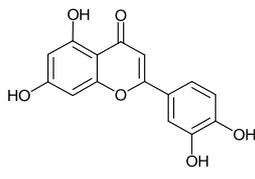
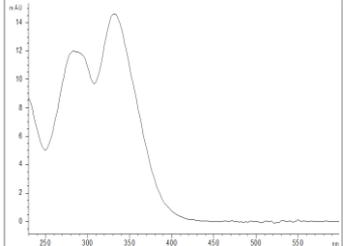
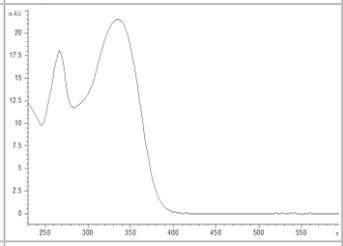
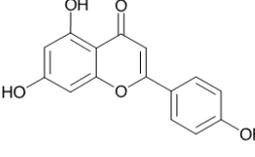
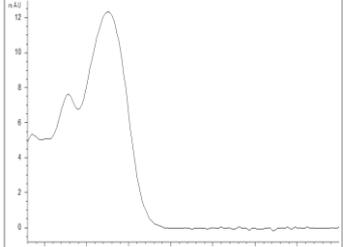
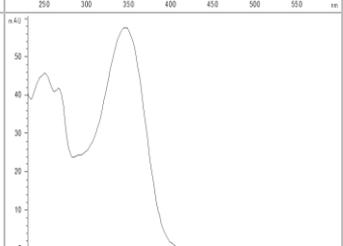
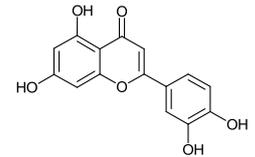
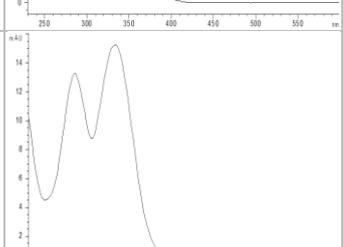
A1 – continuação.

Substância*	Sugestão	Uv-visível	Estrutura química
31	Cafeato de etila		
32	Luteolina ramnosídeo		
33	Derivado flavonoídico		
34	Apigenina		
35	Nepetoidina B		
36	Derivado clorogênico		

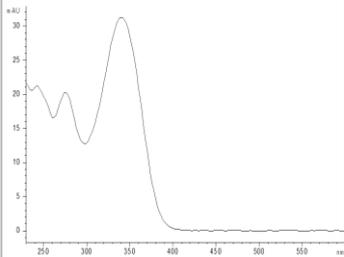
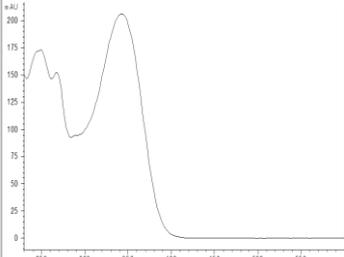
A1 – continuação.

Substância*	Sugestão	Uv-visível	Estrutura química
37	Derivado flavonoídico		
38	Ramnetina		
39	Derivado de luteolina		
40	Cirsimaritina		
41	ni		
42	Derivado flavonoídico		

A1 – continuação.

Substância*	Sugestão	Uv-visível	Estrutura química
43	Derivado de luteolína		
44	Derivado flavonoídico		
45	Derivado de apigenina		
46	Derivado flavonoídico		
47	Derivado de luteolína		
48	Derivado flavonoídico		

A1 – continuação.

Substância*	Sugestão	Uv- visível	Estrutura química
49	Derivado flavonoídico		
50	Derivado de luteolina		

*: Sugestão de substância presente na Tabela 1.2 do Capítulo 1.

A2 – Curvas de calibração utilizadas para doseamento das substâncias majoritárias dos extratos, fases, isolados e mistura de *Hyptis* spp.

Substância referência	Equação da reta	r^2	Concentração mínima	Concentração máxima	Equipamento
Luteolina	$y = 21439x$	0,999	4,5 ng mL ⁻¹	450 ng mL ⁻¹	CLAE
<i>p</i> -cumárico	$y = 27131x$	0,996	4,5 ng mL ⁻¹	450 ng mL ⁻¹	CLAE

A3 - Curvas de calibração utilizadas para cálculo de miligramas de substâncias equivalentes ao padrão por grama de amostra seca.

Substância referência	Equação da reta	r^2	Concentração mínima	Concentração máxima	Equipamento	Ensaio
Trolox	$y = -0,2674x + 1,1155$	0,996	0,25 µg mL ⁻¹	4 µg mL ⁻¹	BioTek modelo DPPH [*]	
Ácido rosmarínico	$y = -0,3312x + 1,0998$	0,995	0,30 µg mL ⁻¹	3 µg mL ⁻¹	BioTek modelo DPPH [*]	
Trolox	$y = -0,3174x + 0,9406$	0,982	0,20 µg mL ⁻¹	4 µg mL ⁻¹	BioTek modelo ABTS [*]	
Ácido rosmarínico	$y = -0,7851x + 1,0144$	0,996	0,06 µg mL ⁻¹	1,20 µg mL ⁻¹	BioTek modelo ABTS [*]	
Trolox	$y = 0,5213x + 0,0965$	0,981	0,1 µg mL ⁻¹	2 µg mL ⁻¹	BioTek modelo FRAP	
Ácido rosmarínico	$y = 1,8495x + 0,1175$	0,998	0,06 µg mL ⁻¹	0,6 µg mL ⁻¹	BioTek modelo FRAP	
Ácido gálico	$y = -0,1656x + 0,6233$	0,963	5 µg mL ⁻¹	100 µg mL ⁻¹	BioTek modelo Quelante de ferro	
Trolox	$y = 12699x - 0,4517$	0,999	1,4 µM	31,1 µM	BioTek modelo ORAC	
Ácido rosmarínico	$y = 189524x + 1,6283$	1,000	3,9 µM	41,0 µM	BioTek modelo ORAC	

A4 - Curvas de atividade antioxidante utilizadas para cálculo de EC₅₀ dos padrões.

Padrões	Ensaio									
	DPPH [*]		ABTS [*]		FRAP		Quelante de metais		ORAC	
	Equação da reta	r^2	Equação da reta	r^2	Equação da reta	r^2	Equação da reta	r^2	Equação da reta	r^2
Trolox	$y = 5,2306x + 0,8193$	0,996	$y = 11,678x - 0,6122$	0,996	$y = 13,326x + 8,993$	0,997	-	-	$y = 32,617x - 1,4502$	1,00
Ácido rosmarínico	$y = 6,2729x + 2,895$	0,985	$y = 23,929x - 3,0562$	0,996	$y = 45,331x + 9,5956$	0,998	-	-	$y = 371,07x + 3,7172$	1,00
Ácido gálico	-	-	-	-	-	-	-	$y = 25,114x + 4,5207$	0,9583	-

A5 - Curvas de atividade antioxidante utilizadas para o cálculo de EC₅₀ dos extratos de *Hyptis* spp.

Extratos	Ensaio							
	DPPH*		ABTS*		FRAP*		ORAC*	
	Equação da reta	r ²	Equação da reta	r ²	Equação da reta	r ²	Equação da reta	r ²
HcampBurN1	y = 0,8172x-1,127	0,99	y = 3,238x+2,1719	0,99	y = 2,9735x+14,232	1,00	y = 46,06x+3,4418	1,00
HcampBurN2	y = 0,7235x-1,7045	1,00	y = 2,4617x+4,3466	0,99	y = 2,4409x+14,444	1,00	y = 37,834x-2,3637	0,98
HcampBurN3	y = 1,0546x-1,2984	1,00	y = 3,6049x+3,3896	1,00	y = 3,535x+14,891	1,00	y = 38,299x+8,461	0,94
HcampBurN4	y = 0,7393x-0,2773	0,99	y = 2,6061x+4,9809	0,99	y = 2,778x+14,482	1,00	y = 38,993x+1,357	1,00
HcampBurN5	y = 0,6542x-0,2055	0,97	y = 2,5345x+4,6377	0,99	y = 2,577x+14,436	1,00	y = 33,096x+2,1615	0,99
HcampBurN6	y = 0,3972x-0,7649	1,00	y = 1,8136x+3,0284	0,99	y = 1,4524x+13,745	1,00	y = 32,497x-2,2747	0,96
HcampPirN1	y = 0,6508x-1,5485	0,99	y = 2,1315x+2,5777	0,99	y = 2,1528x+13,956	1,00	y = 23,529x-3,9636	1,00
HcampPirN2	y = 0,645x-2,0902	0,99	y = 2,0806x+0,8094	0,99	y = 2,006x+13,972	1,00	y = 23,65x-8,4673	1,00
HcampPirN3	y = 0,8323x-0,2534	1,00	y = 2,6322x+4,3244	0,99	y = 3,1765x+14,752	1,00	y = 23,95x+9,5121	0,98
HcampPirN4	y = 0,5286x+0,6624	1,00	y = 2,0924x+1,1722	0,99	y = 2,3051x+14,011	1,00	y = 25,885x+3,6172	0,99
HcampPirN5	y = 0,7107x-7,4931	1,00	y = 2,1106x+1,2886	0,99	y = 2,1011x+14,175	1,00	y = 22,894x+6,2985	0,99
HcampRCN1	y = 0,8609x-0,4421	0,99	y = 3,2055x+3,653	1,00	y = 2,9438x+14,423	1,00	y = 36,328x+3,2232	1,00
HcampRCN2	y = 0,6438x-0,6284	0,99	y = 2,3251x+4,6394	0,99	y = 1,8965x+7,808	1,00	y = 29,217x+6,1347	0,94
HcampRCN3	y = 0,7711x+0,1755	1,00	y = 2,6033x+5,6958	0,99	y = 2,2902x+7,6251	1,00	y = 44,215x+4,3905	0,99
HcampRCN4	y = 0,576x-1,3485	0,96	y = 2,2745x+3,5487	0,99	y = 1,7009x+7,4278	1,00	y = 30,707x+6,6286	0,99
HcomCurN1	y = 1,6922x+2,4061	1,00	y = 5,3746x+4,4442	1,00	y = 5,5674x+14,332	1,00	y = 60,763x+6,9521	1,00
HcomCurN2	y = 1,7144x+1,1862	1,00	y = 5,3011x+4,351	1,00	y = 6,1187x+13,948	1,00	y = 62,672x-1,0956	1,00
HcomCurN3	y = 1,9236x+1,4279	1,00	y = 5,5355x+6,3936	0,98	y = 8,0141x+13,961	1,00	y = 58,02x-6,9719	1,00
HcomCurN4	y = 1,522x+1,6207	1,00	y = 5,0611x+0,8738	1,00	y = 5,2403x+15,272	1,00	y = 41,828x-1,7454	1,00
HcomCurN5	y = 1,7033x-0,5055	1,00	y = 5,2605x-0,061	1,00	y = 5,9452x+14,452	1,00	y = 50,637x-4,6956	1,00
HmerBNN1	y = 1,7538x+0,6526	0,99	y = 5,3552x+5,4814	0,99	y = 5,2307x+7,9152	1,00	y = 57,44x+14,329	0,99
HmerBNN2	y = 1,7036x+0,1709	1,00	y = 5,1895x+5,5572	1,00	y = 5,152x+6,9433	1,00	y = 63,894x+12,437	0,99
HmerBNN3	y = 1,525x+1,4549	1,00	y = 4,7961x+5,2671	1,00	y = 5,8221x+8,1333	1,00	y = 56,72x+2,6506	0,98
HmerBNN4	y = 1,7347x-1,1435	1,00	y = 5,304x+5,1105	1,00	y = 6,3587x+9,6445	1,00	y = 48,65x-2,2278	1,00
HmerBNN5	y = 1,5904x-2,4432	0,99	y = 4,6105x+3,6768	1,00	y = 5,2685x+9,3561	1,00	y = 47,453x-1,5551	1,00
HmerJagN1	y = 1,4534x-0,7172	1,00	y = 4,7613x-0,4585	1,00	y = 4,9682x+9,6736	1,00	y = 37,815x-2,6865	1,00
HmerJagN2	y = 1,2808x-0,2246	1,00	y = 4,1558x+1,4093	1,00	y = 4,4544x+9,3485	1,00	y = 36,538x-3,088	1,00
HmerJagN3	y = 1,4063x-1,4628	1,00	y = 4,3698x+5,631	0,99	y = 4,2405x+11,325	1,00	y = 42,281x-2,549	1,00
HmerJagN4	y = 1,4275x-4,0577	1,00	y = 4,3762x+3,4884	1,00	y = 5,0633x+7,7531	1,00	y = 40,984x-0,8056	0,99
HmerJagN5	y = 1,4203x-3,5886	1,00	y = 4,2817x+3,5119	1,00	y = 4,5456x+7,8275	1,00	y = 43,795x+0,6035	1,00
HmerJagN6	y = 1,417x-3,1153	1,00	y = 4,2664x+4,5875	1,00	y = 4,368x+8,1145	1,00	y = 44,515x+2,0514	1,00
HradAvN1	y = 0,6128x-1,7196	1,00	y = 2,2627x+2,7281	0,99	y = 1,903x+7,2193	1,00	y = 20,785x-0,873	1,00
HradAvN2	y = 0,9815x-8,132	1,00	y = 2,6584x+2,6972	0,99	y = 2,4312x+6,8193	1,00	y = 25,623x-0,5819	1,00
HradAvN3	y = 0,7291x-2,3824	1,00	y = 2,3557x+ 3,4375	0,99	y = 1,8773x+6,8156	1,00	y = 21,54x-0,704	1,00
HradAvN4	y = 0,7648x-1,9771	1,00	y = 2,3953x+4,2236	0,99	y = 2,2106x+6,8795	1,00	y = 22,341x-2,1004	1,00
HradMGN1	y = 0,6715x+0,8177	1,00	y = 2,4857x+0,6975	1,00	y = 2,4671x+8,1824	1,00	y = 17,687x-6,7692	0,98
HradMGN2	y = 0,817x+0,2001	1,00	y = 2,7873x+3,0038	1,00	y = 3,538x+7,1781	1,00	y = 23,425x-7,3633	1,00
HradMGN3	y = 0,8784x-0,5559	0,99	y = 2,6642x+5,0959	0,99	y = 3,1809x+7,9324	1,00	y = 20,666x-2,7959	0,95
HradMGN4	y = 0,8138x+2,5136	1,00	y = 3,5422x+0,6649	1,00	y = 3,5736x+7,7956	1,00	y = 41,233x-3,3855	1,00
HradMGN5	y = 0,8692x-0,2274	0,99	y = 2,7737x+3,3279	0,99	y = 3,1449x+8,033	1,00	y = 34,958x-0,9854	0,99

A5 – continuação.

Extratos	Ensaio							
	DPPH*		ABTS*		FRAP*		ORAC*	
	Equação da reta	r ²						
HradCGSN1	y = 0,863x+1,6087	1,00	y = 3,4348x+0,8207	1,00	y = 2,9738x+7,3787	1,00	y = 40,175x+7,6274	1,00
HradCGSN2	y = 1,1064x-2,0925	0,99	y = 2,7563x+6,5269	0,99	y = 3,9251x+7,4971	0,99	y = 46,427x+7,48	1,00
HradCGSN3	y = 0,9272x-1,6721	0,98	y = 2,6954x+5,4834	0,99	y = 3,0588x+7,5682	1,00	y = 33,913x+3,5356	1,00
HradCGSN4	y = 0,9694x-0,6199	1,00	y = 2,7287x+5,5996	0,99	y = 2,8236x+13,115	1,00	y = 33,865x+1,4731	0,97
HradCGSN5	y = 1,094x-0,6567	1,00	y = 3,545x-0,3171	0,99	y = 3,1159x+13,561	1,00	y = 36,891x+4,4802	1,00
HradCGSN6	y = 1,0974x+0,0814	1,00	y = 2,7646x+4,3487	0,99	y = 3,0586x+13,876	1,00	y = 34,643x+7,1478	1,00
HradMCN1	y = 0,9714x+0,144	0,99	y = 2,8479x+3,8025	0,98	y = 3,8729x+6,9082	1,00	y = 36,207x+0,7982	1,00
HradMCN2	y = 1,2313x+0,1615	1,00	y = 2,8596x+7,1931	0,96	y = 4,1374x+8,0635	1,00	y = 38,304x-0,8536	0,99
HradMCN3	y = 1,2957x-0,8837	1,00	y = 4,1005x+1,6993	0,99	y = 4,8024x+8,0762	1,00	y = 41,31x-7,1209	0,99
HradMCN4	y = 1,3116x-0,6607	1,00	y = 2,8452x+8,0809	0,95	y = 4,9887x+7,7194	1,00	y = 31,748x-6,7982	1,00
HradMCN5	y = 1,2309x+0,4023	1,00	y = 4,0478x+1,1447	1,00	y = 4,3509x+8,6606	1,00	y = 33,682x-10,226	1,00
HradSAN1	y = 1,0312x-0,8219	1,00	y = 4,1115x+3,3498	1,00	y = 3,8859x+7,4628	1,00	y = 34,438x-1,838	1,00
HradSAN2	y = 1,1524x+0,1987	1,00	y = 4,458x+1,6894	1,00	y = 4,597x+7,7723	1,00	y = 38,569x-1,1107	1,00
HradSAN3	y = 1,0148x+0,6831	1,00	y = 4,1615x-1,1991	0,99	y = 3,7913x+7,7647	1,00	y = 34,883x-5,5001	0,98
HradSAN4	y = 0,9615x+0,6501	1,00	y = 4,0131x-2,8083	0,99	y = 3,8666x+6,8114	1,00	y = 37,979x+5,3481	1,00

* Baseado no controle positivo Trolox.

A6 - Curvas de atividade anti-HIV-1 (transcricase reversa) utilizadas para cálculo de MIC₅₀ dos extratos, fases, mistura e isolados de *Hyptis* spp.

Amostra	Equação da reta	r ²
HradCGS	y = 30,848ln(x)-89,121	0,97
HcomFHA	y = 25,417ln(x)-42,91	0,91
HmerBNFHA	y = 25,762ln(x)-29,796	0,90
HmerJagFHA	y = 37,551ln(x)-105,45	0,99
HmerJagFH	y = 9,0943ln(x)-17,342	0,91
HmerJagFAE	y = 18,303ln(x)-26,242	0,99
HcomFHA	y = 42,831ln(x)-114,77	0,97
HcampBur	y = 108,31ln(x)-586,97	0,99
HcampPir	y = 82,599ln(x)-459,29	0,99
HcampRC	y = 109,45ln(x)-572,82	0,99
HcomEB	y = 16,206ln(x)+3,2905	0,97
HmerBNEB	y = 18,622ln(x)+4,6179	1,00
HmerJag	y = 21,875ln(x)-19,576	0,93
HradAvEB	y = 28,347ln(x)-96,592	0,88
HradMGEB	y = 11,971ln(x)-43,753	1,00
HradMCEB	y = 35,621ln(x)-136,11	0,96
HradSAEB	y = 35,496ln(x)-119,82	0,98
HcomEB	y = 28,97ln(x)-69,992	0,92
Foscarnet	y = 20,199ln(x)+78,233	0,98

A7 - Curvas de atividade anti-HIV-1 (protease) utilizadas para cálculo de MIC₅₀ dos extratos, fases, mistura e isolados de *Hyptis* spp.

Amostra	Equação da reta	r ²
HcomEB	$y = 19,247\ln(x)+0,723$	0,87
HcomFHA	$y = 11,191\ln(x)+15,873$	0,80
HmerBNEB	$y = 13,701\ln(x)+16,846$	0,83
HmerBNFHA	$y = 16,333\ln(x)+24,278$	0,87
HmerJagFAE	$y = 15,812\ln(x)+24,804$	0,89