

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIA  
Programa de Pós- Graduação em Engenharia Química

P

P

E

Q



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Triagem fitoquímica e avaliação da  
atividade antioxidante da espécie  
*Hyptis pectinata***

*Monyk Melo Costa*

*Orientador: Prof. Dr. Nelson Medeiros de Lima Filho*

*Co-orientadora: Profa. Dra. Otidene Rossiter Sá da Rocha*

Recife/PE

Março /2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**  
**MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**Triagem fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante da  
espécie *Hyptis Pectinata***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Engenharia Química da  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE,  
como requisito para a obtenção do título de  
Mestre em Engenharia Química, orientada pelo  
Prof. Dr. Nelson Medeiros de Lima Filho.

Área de concentração: Engenharia de Processos Químicos e Bioquímica  
Linha de Pesquisa: Processos Bioquímicos  
Orientadores: Prof. Dr. Nelson Medeiros de Lima Filho  
Profa. Dra. Otidene Rossiter Sá da Rocha

**Monyk Melo Costa**

**Recife**

**2016**

Catálogo na fonte  
Bibliotecária Valdicéa Alves, CRB-4 / 1260

- C837t Costa, Monyk Melo.  
Triagem fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante da espécie  
*Hyptis Pectinata* / Monyk Melo Costa - 2016.  
84folhas. Il.; Tab.; Abr.; Sig.; e Simb.
- Orientador: Prof. Dr. Nelson Medeiros de Lima Filho.  
Coorientadora: Profª. Otidene Rossiter Sá da Rocha.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG.  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2016.  
Inclui Referências.
1. Engenharia Química. 2. *Hyptis pectinata*. 3. Metabólitos secundários.  
4. modelos termodinâmicos. 5. Atividade antioxidante. I. Lima Filho,  
Nelson Medeiros de(Orientador). II. Rocha, Otidene Rossiter Sá da  
(Coordenadora). III. Título.

UFPE

660.2CDD (22. ed.)

BCTG/2016 - 289

**MONYK MELO COSTA**

**TRIAGEM FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA ESPÉCIE *HYPTIS*  
*PECTINATA***

**Linha de pesquisa: Processos Bioquímicos**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco, defendida e aprovada em 15 de março de 2016 pela banca examinadora constituída pelos seguintes membros:

---

Prof.<sup>o</sup> Dr. Nelson Medeiros de Lima Filho/DEQ-UFPE  
(Orientador)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Otidene Rossiter Sá da Rocha/DEQ-UFPE  
(Co-Orientadora)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Glória Maria Vinhas/DEQ-UFPE  
(Examinadora Interna)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Olga Martins Marques/DEQ-UFPE  
(examinadora Externa)

### **Dedicatória**

Aos meus pais, Marco e Aparecida por todo  
amor e incentivo.

Ao meu irmão Marco Hamilton, pelo seu apoio,  
compreensão e paciência.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por estar sempre me guiando, e pela graça recebida de encerrar mais uma etapa na minha vida, renovando os meus caminhos para um novo amanhecer.

Aos meus pais Maria Aparecida e Marco Hamilton por todo o seu amor, pela compreensão nos momentos mais difíceis e no estímulo de lutar por meus ideais tão necessários para seguir adiante.

Ao meu irmão Marco Filho por está sempre apoiando minhas decisões.

A Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Otidene Rocha pelas orientações e dedicação nesse trabalho e por suas palavras amigas nos momentos difíceis.

A Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Nelson Medeiros pelas orientações e sugestões.

Ao Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Karla por disponibilizar equipamentos necessários às análises e também pela atenção e ajuda na utilização dos mesmos.

A minha amiga Greicy Kelly, por ser o ombro amigo nos momentos difíceis, o porto seguro.

A Amiga, Jaqueline Larissa, pelo companheirismo e apoio em todos os momentos.

As amigas Rafaela Amaral e Juliana Arruda pelos incentivos e ajuda durante toda essa jornada.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

E às dificuldades que surgiram, pois ao serem superadas, tornam essa conquista mais valiosa e gratificante.

## RESUMO

As plantas medicinais são utilizadas pelo homem desde o início da história e atualmente empregadas como recursos na medicina alternativa por grande parte da população mundial. Esse uso deve-se à facilidade de acesso às plantas em relação aos medicamentos alopáticos. O objetivo deste trabalho foi, primariamente, desenvolver uma análise fitoquímica sobre as partes de raiz, caule e folhas da espécie *Hyptis Pectinata*, investigando seus constituintes químicos. Além disso, foi identificado o potencial antioxidante da planta, frente ao radical livre, DPPH através dos métodos desenvolvidos por Zang et al. e Soler-Rivas. A partir da técnica do Hcl-butanol seguindo a metodologia de Terril a quantidade de taninos condensados disponíveis, ligados a proteína e a fibra foi avaliada. Com esse estudo foi possível analisar a presença de compostos secundários como Taninos, Flavonas, Flavonóis, Xantonas, Catequinas. Foi observado um alto teor de taninos ligados a proteína de 10,94%, ligados a fibra de 3,22% e total disponível de 1,04% quando comparado a outras espécies taniníferas. A atividade antioxidante também foi avaliada a partir da metodologia de Sanchez-Vioque et al. e Saiga et al. para quelante de cobre, no entanto para os íons cobre a reação foi insatisfatória. Para otimizar os resultados foi desenvolvido planejamento experimental e modelagem cinética a partir dos resultados obtidos. Obtendo como valores para as constantes de velocidade global e da ordem de reação foram obtidas para as quatro concentrações de extrato avaliadas com os seguintes resultados encontrados:  $k' = 2,99 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ ;  $k'1 = 2,67 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ ;  $k' = 2,29 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ ;  $k'$  e  $\alpha = 1,2$  em relação ao consumo de DPPH nas respectivas concentrações:  $194,8 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $324,5 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $454,7 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; e  $584,4 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ . O modelo representou bem o comportamento cinético da reação com erros de aproximadamente 2,62%; 4,56%; 5,73% e 12,58% para as respectivas concentrações utilizadas.

**Palavras-chave:** *Hyptis Pectinata*, metabólitos secundários, atividade antioxidante.

## ABSTRACT

Medicinal plants are used by man since the beginning of history and currently employed as resources in alternative medicine for much of the world's population. This use is due to the ease of access to the plants in relation to allopathic drugs. The objective was primarily to develop a phytochemical analysis of the root parts, stems and leaves of the species *Hyptis Pectinata* investigating its chemical constituents. Furthermore, the plant was identified antioxidant potential, the opposite free radical, DPPH by two different methods. From the HCl-butanol technique the amount of condensed tannins available, linked to the protein and the fiber was evaluated. With this study, we analyze the presence of secondary compounds such as tannins, flavones, Flavonols, xanthones, catechins. a high tannin content related protein equal to 10.94%, linked fiber equal to 3.22% and the total available equal to 1.04% was observed. The antioxidant activity of the leaves remained higher in the higher concentration used in the time of 60 minutes for the two methods. The antioxidant activity was evaluated from the copper chelate approach, however for the copper ions reaction was unsatisfactory.

Keywords: *Hyptis pectinata*. secondary metabolites. antioxidant activity.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Espécie <i>Hyptis pectinata</i> .....	9
<b>Figura 2</b>	Diferentes compostos fenólicos.....	14
<b>Figura 3</b>	Via do ácido chiquímico, rota biossintética de compostos fenólicos em alguns alcalóides. ....	15
<b>Figura 4</b>	Estrutura dos taninos hidrolisáveis.....	17
<b>Figura 5</b>	Estrutura química de taninos condensados.....	18
<b>Figura 6</b>	Estabilização do DPPH.....	25
<b>Figura 7</b>	Bairro Cacimbas II. ....	30
<b>Figura 8</b>	Espécie <i>Hyptis Pectina</i> coletada no sítio sementeira.....	31
<b>Figura 9</b>	Partes da planta antes da secagem em estufa: A – folhas, B – raiz, C – caule. ....	32
<b>Figura10</b>	Fluxograma do procedimento experimental para a prospecção fitoquímica utilizado nos extratos de raiz, caule e folhas de <i>H. pectina</i> .....	33
<b>Figura11</b>	Processo de filtração do extrato.....	39
<b>Figura 12</b>	Processo de filtragem em Sephadex.....	38
<b>Figura 13</b>	Tubos de falcon contendo 0,25g do extrato das folhas mais solução.....	39
<b>Figura 14</b>	Tubos de falcon o extrato mais a solução após as repetições.....	40
<b>Figura 15</b>	Concentrações finais de 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,5, 0,3 mg/mL das três.....	44
<b>Figura 16</b>	Leitura de absorbância a 517 nm para as folhas da espécie.....	44
<b>Figura 17</b>	Reação entre o extratos da espécie e o quelante de cobre.....	57
<b>Figura 18</b>	Gráfico de Pareto dos valores dos efeitos de todas as variáveis estudadas.....	59
<b>Figura 19</b>	Comportamento cinético das amostras folhas de <i>Hyptis pectinata</i> a partir da concentração, determinado espectrofotometricamente a 515 nm pela reação com solução metanólica de DPPH.....	61
<b>Figura 20</b>	Comportamento cinético das amostras do caule de <i>Hyptis pectinata</i> a partir da concentração, determinado espectrofotometricamente a 515nm pela reação com solução metanólica de DPPH.....	62
<b>Figura 21</b>	Comportamento cinético das amostras do raiz de <i>Hyptis pectinata</i> a partir da concentração, determinado espectrofotometricamente a 515 nm pela reação com solução metanólica de DPPH.....	63
<b>Figura 22</b>	Comportamento cinético das amostras de <i>Hyptis pectinata</i> determinado espectrofotometricamente a 515 nm pela reação com solução metanólica de DPPH.....	64
<b>Figura23</b>	Determinação do valor de EC50.....	66
<b>Figura 24</b>	Comparação entre os valores das concentrações experimentais e calculadas a partir do modelo cinético proposto para o consumo de	

	DPPH. Condições operacionais: [Extrato] <sub>0</sub> =194,8µg.mL <sup>-1</sup> ; T=30°C.....	69
<b>Figura 25</b>	Comparação entre os valores das concentrações experimentais e calculadas a partir do modelo cinético proposto para o consumo de DPPH. Condições operacionais: [Extrato] <sub>0</sub> = 194,8µg.mL <sup>-1</sup> ; T = 30°	69
<b>Figura 26</b>	Comparação entre os valores das concentrações experimentais e calculadas a partir do modelo cinético proposto para o consumo de DPPH. Condições operacionais: [Extrato] <sub>0</sub> = 454,4µg.mL <sup>-1</sup> ; T = 30°C.....	70
<b>Figura 27</b>	Comparação entre os valores das concentrações experimentais e calculadas a partir do modelo cinético proposto para o consumo de DPPH. Condições operacionais: [Extrato] <sub>0</sub> = 584,4µg.mL <sup>-1</sup> ; T= 30°C.....	70
<b>Figura 28</b>	Curva de calibração utilizadas para estimar a concentração da fração de taninos condensados solúveis (ECT) através do método do HCl-Butanol.....	74
<b>Figura 29</b>	Curvas de calibração utilizadas para estimar a concentração das frações de taninos condensados ligado à proteína (PBCT) e fibra (FBCT) através do método HCl-Butanol nas folhas de Hyptis Pectinata.....	74
<b>Figura 30</b>	Curvas de calibração utilizadas para estimar a concentração das frações de taninos condensados ligado à proteína (PBCT) e fibra (FBCT) através do método HCl-Butanol nas folhas de Hyptis Pectinata.....	74

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Metodologia para avaliar a presença de antocianinas, antocianidinas e flavonoides.....	34
<b>Tabela 2</b>	Metodologia para avaliar a presença de leucoantocianidinas, catequinas e flavononas.....	35
<b>Tabela 3</b>	Valores reais e respectivos valores codificados para as variáveis independentes.....	42
<b>Tabela 4</b>	Valores codificados das variáveis independentes e número totais de ensaios do planejamento fatorial $2^3$ com réplica.....	43
<b>Tabela 5</b>	Rendimento dos extratos do caule, folha e raiz de <i>Hyptis pectinata</i> . ....	47
<b>Tabela 6</b>	Resultado da prospecção fitoquímica dos extratos do <i>H. pectinata</i> . ....	48
<b>Tabela 7</b>	Valores médios entre 5 repetições para taninos condensados através da metodologia do HCl-Butanol, para folhas de <i>Hyptis Pectinata</i> .....	53
<b>Tabela 8</b>	Fração de taninos em g/Kg de leguminosas nativas através da metodologia do HCl-butanol, conforme locais de coleta.....	54
<b>Tabela 9</b>	Resultado dos ensaios obtidos para o planejamento experimental $2^3$ .....	57
<b>Tabela 10</b>	Fatores de significância estatística no planejamento fatorial de $2^3$ .....	58
<b>Tabela 11</b>	Valores dos efeitos principais e interações calculados para planejamento.....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	ácido 2,2-azino-bis-3-etilbenzolina-6-sulfônico
CE <sub>50</sub>	concentração do extrato que consome 50% de radical livre
CoQ <sub>10</sub>	tipo de melatonina reduzida
DNA	ácido deoxyribonucleico
DMT	N-N-dimetiltriptamina
ECT	taninos condensados extraíveis
EUA	Estados Unidos da América
IP	porcentagem de inibição
IAA	índice de atividade antioxidante
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
OH	hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORAC	oxygen radical absorbance capacity
Ph	potencial hidrogeniônico
ROS	célula reativa a partir do oxigênio
RMN	ressonância Magnética Nuclear
RNS	célula reativa a partir do nitrogênio
RSA	atividade de eliminação dos radicais
SUS	Sistema Único de Saúde
TBA	ácido tiobarbiturico
TRAP	total radical-trapping antioxidante parameter
UV	radiação ultravioleta
EGCG	epigallocatequina galato

## LISTA DE SIMBOLOS

$\text{CHCl}_3$	Clorofórmio
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
$\text{FeCl}_3$	Cloreto Férrico
$\text{KIO}_3$	Iodato de Potássio
HCl	Ácido Clorídrico
$\text{H}_2\text{SO}_4$	Ácido Sulfúrico
$\text{NaSO}_4$	Sulfato de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
$\text{H}_2\text{O}_2$	Peróxido de hidrogênio
HClO	Ácido hipocloroso

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	3
2.1 PLANTAS MEDICINAIS.....	3
2.1.1 Concepção científica sobre as plantas medicinais.....	4
2.2 ESTUDO DA FAMÍLIA LAMIACEAE.....	7
2.2.1 O gênero Hyptis.....	7
2.4 IMPORTÂNCIAS DOS COMPOSTOS SECUNDÁRIOS PRESENTES NAS PLANTAS.....	10
2.5 A IMPORTÂNCIA DOS TANINOS.....	14
2.5.1 Taninos e sua atividade biológica.....	17
2.5.2 Determinação do teor de taninos.....	18
2.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	19
2.7 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	20
2.8 MÉTODO DE DESCOLORAÇÃO DO RADICAL 2,2-DIFENIL-1-PICRIL-HIDRAZIL.....	21
2.9 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL APLICADO AO TRABALHO.....	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO.....	28
3.2. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	29
3.3 PREPARAÇÃO DO EXTRATO ALCOÓLICO.....	30
3.4 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA.....	30
3.4.1. Teste para fenóis e taninos.....	31
3.4.2. Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides.....	32
3.4.3 Teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavononas.....	32
3.4.4 Teste para triterpenóides Liebermann-Buchard.....	33
3.4.5 Teste para saponinas.....	33
3.4.6 Teste para flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas.....	34
3.4.7 Teste para alcalóides.....	34
3.4.8 Teste para antroquinona, cumarina e antrona.....	34
3.5 QUANTIFICAÇÃO DE TANINOS.....	35

3.5.1 Padrões de purificação para análise de taninos condensados (TC) .....	35
3.5.2 Diluição para realizar o preparo de amostras de taninos condensados extraídos (ECT) .....	36
3.5.2.1 Análise espectrofotométrica .....	38
3.5.3 Extração de taninos condensados ligados à proteína (PBCT) .....	38
3.5.4 Extração de taninos condensados ligados a fibra (FBCT).....	39
3.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE UTILIZANDO QUELANTE DE COBRE ....	39
3.7 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL .....	39
3.8. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE UTILIZANDO DPPH PARA MAIORES CONCENTRAÇÕES .....	40
3.9 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE UTILIZANDO O RADICAL DPPH PARA MENORES CONCENTRAÇÕES (FOLHAS) .....	42
3.9.1 Análise estatística .....	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	44
4.1 RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO .....	44
4.2 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA .....	44
4.2.1 Teste para fenóis e taninos.....	46
4.2.2 Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides .....	46
4.2.3 Teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavononas .....	47
4.2.4 Teste para triterpenóides liebermann-buchard.....	47
4.2.5 Teste para saponinas .....	48
4.2.6 Teste para alcalóides .....	48
4.2.7 Teste para antroquinona, cumarina e antrona .....	48
4.3 QUANTIFICAÇÃO DE TANINOS CONDENSADOS .....	49
4.3.1 Padrões de purificação para análise de taninos condensados (TC) .....	49
4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE A PARTIR DA QUELANTE DE COBRE ....	52
4.5 PLANEJAMENTO FATORIAL 2 <sup>3</sup> PARA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	53
4.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE UTILIZANDO DPPH PARA MAIORES CONCENTRAÇÕES .....	57
4.6.1 Folhas .....	57
4.6.2 Caule.....	58
4.6.3 Raiz.....	59
4.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE UTILIZANDO DPPH PARA MENORES CONCENTRAÇÕES .....	60

4.7.1 Modelagem Cinética.....	62
4.7.2 Determinação dos tipos de cinéticas de reação .....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	72



## 1.INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais e seus derivados por diferentes culturas em todo mundo como agentes terapêuticos para o tratamento das mais diversas doenças é tão antigo quanto a humanidade. Existem relatos de sua utilização, por povos onde hoje localiza-se o território chinês, há mais de 2500 anos A.C. (PETROVSKA, 2012). Mas é nos dias atuais, com o envelhecimento da população, o alto custo apresentado por fármacos sintéticos e seus efeitos adversos, que os produtos naturais vem se tornando uma grande fonte de pesquisas de novas substâncias com potencial atividade terapêutica (KOEHN; CARTER, 2005; PETRONILHO, 2012).

Segundo Ferro (2006), as plantas medicinais são definidas como aquelas capazes de produzir princípios ativos que possam alterar o funcionamento de órgãos e sistemas, restabelecendo e mantendo o equilíbrio do organismo nos casos de enfermidades. A maioria das plantas pode apresentar efeito medicinal desconhecido por nós, na quase maioria dos casos.

O país tem uma flora extremamente rica, com cerca de 55 mil espécies vegetais catalogadas, sendo que 10 mil podem ser consideradas medicinais, aromáticas e úteis (BARATA LES, 1995).

Dentre as espécies vegetais catalogadas no Brasil, encontra-se a *Hyptis pectinata* (L.) Poit que pertence ao gênero *Hyptis* que está incluído na família Lamiaceae. Essa família possui cerca de 250 gêneros e 6970 espécies (JUDD et al, 1999) de distribuição cosmopolita, mas centrada, principalmente, na região mediterrânea (BORDIGNON, 1990). O gênero *Hyptis* é composto por ervas e arbustos. Possui cerca de 400 espécies, distribuídas desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina (FALCÃO; MENEZES, 2003).

A *Hyptis pectinata* (L.) Poit tem despertado interesses por parte de pesquisadores em realizar estudos na busca do conhecimento da composição química das folhas e suas propriedades farmacológicas (FALCÃO; MENEZES, 2003). Essa espécie é conhecida vulgarmente por sambacaitá, sendo encontrada e amplamente utilizada na região nordeste do Brasil para tratamento de distúrbios gástricos; cicatrização de feridas; inflamação; infecções fúngicas e bacterianas; além de apresentar atividade antiedematogênica e antinociceptiva (BISPO et al., 2001). A obtenção dessa

planta com suas partes comumente utilizadas na medicina popular advêm principalmente do extrativismo (SILVA-MANN et al., 2003).

Diante dos expostos este trabalho tem como objetivo:

- Realizar a triagem fitoquímica das partes (folhas, caule e raiz) da espécie *Hyptis pectinata* (L.) Poit
- Quantificar de taninos presentes nas folhas da espécie *Hyptis pectinata* (L.) Poit utilizando HCl-butanol.
- Avaliar o potencial antioxidante do extrato da espécie *Hyptis pectinata* (L.) Poit a partir da radical livre DPPH.
- Verificação do potencial antioxidante do extrato da espécie *Hyptis pectinata* (L.) Poit para quelante de cobre
- Modelar de forma cinética a avaliação antioxidante com menores concentrações.

## **2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1 PLANTAS MEDICINAIS**

As plantas medicinais sempre tiveram grande importância na cultura, na medicina e na alimentação das sociedades no mundo. As populações, por meio de seus “curadores” e do uso autônomo dessas plantas, acumularam experiências e vasto conhecimento a esse respeito. Todavia, as realizações científicas das últimas décadas e sua ampla socialização incentivaram a monocultura do saber científico nas práticas profissionais de saúde, que desacreditizam, saberes e práticas populares da sociedade (SANTOS, 2013).

Atualmente, as plantas medicinais são utilizadas por grande parte da população mundial, como um recurso medicinal alternativo para o tratamento de diversas enfermidades, uma vez que em muitas comunidades, representam um recurso mais acessível em relação aos medicamentos alopáticos (BEVILACQUA, 2010). As plantas medicinais são utilizadas pelo homem desde o início de sua história e muito antes do surgimento da escrita a humanidade já utilizava ervas para fins medicinais (BARATA, 2005; TOSCANO RICO, 2011). Seu uso na recuperação da saúde cresce progressivamente em vários países, desde as formas mais simples de tratamento local, provavelmente utilizada pelo homem das cavernas, até as formas tecnologicamente sofisticadas da fabricação industrial empregadas pelo homem moderno. Apesar das enormes diferenças entre as duas maneiras de uso, em ambos os casos o homem percebeu, de alguma forma, a existência de algo nas plantas que tem a propriedade de provocar reações benéficas ao organismo (LORENZI; MATOS, 2008).

No Brasil, os primeiros europeus que aqui chegaram logo se depararam com uma imensa quantidade de plantas medicinais em uso pelas inúmeras tribos que aqui viviam. Por intermédio dos pajés, o conhecimento das ervas locais e seus usos eram transmitidos e aprimorados de geração em geração (LORENZI; MATOS, 2008).

Grande parte da população mundial tem confiança nos métodos tradicionais relativos aos cuidados diários com a saúde e cerca de 80% dessa população, principalmente dos países em desenvolvimento, confiam nos derivados de plantas medicinais para seus cuidados com a saúde. Aproximadamente 25% de todas as

prescrições médicas são formulações baseadas em substâncias derivadas de plantas ou análogos sintéticos derivados destas (GURIB-FAKIM, 2006).

A utilização de produtos naturais, particularmente da flora, com fins medicinais, nasceu com a humanidade. Indícios do uso de plantas medicinais e tóxicas foram encontrados nas civilizações mais antigas, sendo considerada uma das práticas mais remotas utilizadas pelo homem para cura, prevenção e tratamento de doenças, servindo como importante fonte de compostos biologicamente ativos (ANDRADE; CARDOSO; BASTOS, 2007).

Atualmente, com os avanços ocorridos no meio técnico-científico, contudo no âmbito das ciências da saúde, foram surgindo novas maneiras de tratar e curar as doenças. No Brasil, segundo Badke (2011), mesmo como incentivo da indústria farmacêutica para a utilização de medicamentos industrializados, grande parte da população ainda se utiliza de práticas complementares para cuidar da saúde, como o uso das plantas medicinais, empregada para aliviar ou mesmo curar algumas enfermidades. Atualmente, as mudanças econômicas, políticas e sociais que eclodiram no mundo influenciaram não só na saúde das pessoas como também nas bases tradicionais e nos modelos de cuidado.

No Nordeste do Brasil, onde se insere o local do presente estudo, apesar da grande influência dos meios de comunicação e do número crescente de farmácias na região, o uso de plantas medicinais ainda é frequente, tanto no meio rural e urbano, sendo comum principalmente neste último, a presença de raizeiros, detentores de conhecimentos tradicionais transmitidos através de gerações, que cuidam da saúde comunitária através do uso de recursos naturais e da espiritualidade em pontos estratégicos de algumas cidades (MOSCA; LOIOLA, 2009).

### **2.1.1 Concepção científica sobre as plantas medicinais**

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 1979), plantas medicinais são todas as plantas que contêm em um ou mais de seus órgãos substâncias que podem ser utilizadas com propósitos terapêuticos ou que sejam precursoras de semi-síntese químico-farmacêutica. Ainda nesse sentido, Morgan (1994), afirma que toda planta que contém um ou mais princípios ativos em sua composição e que são úteis à

saúde dos seres humanos, são consideradas plantas medicinais.

O tratamento feito com uso de plantas medicinais é denominado de fitoterapia, e os fitoterápicos são os medicamentos produzidos a partir dessas plantas. Sendo assim, a fitoterapia é caracterizada pelo tratamento com o uso de plantas medicinais e suas diferentes formas farmacêuticas, sem a utilização de princípios ativos isolados (SCHENKEL; GOSMAN; PETROVICK, 2000) permitindo que o ser humano se reconecte com o ambiente, acessando o poder da natureza para ajudar o organismo a normalizar funções fisiológicas prejudicadas, restaurar a imunidade enfraquecida, promover a desintoxicação e o rejuvenescimento (FRANÇA, 2008).

O uso de plantas medicinais e a fitoterapia podem ser considerados conhecimentos populares, pois juntas, agregam um conjunto de características direcionadas ao melhor aproveitamento desses recursos terapêuticos. O conhecimento a respeito das características das plantas, da cura de doenças, da terapêutica e toxicidade é oriundo da prática, sendo repassado de maneira difusa no cotidiano. A classificação das plantas medicinais, particularmente, é marcada por analogias, que evidencia o alto grau de observação, dando origem ao conhecimento (RICARDO, 2009)

Devido a este fator, as plantas medicinais continuam ocupando lugar de destaque no arsenal terapêutico. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 80% da população mundial usam recursos da medicina popular para suprir necessidades de assistência médica privada, podendo girar em torno de aproximadamente 22 bilhões de dólares (COSTA; 1998; YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001).

As plantas medicinais têm contribuído fortemente para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas por meio de seus metabólitos secundários. Estes são conhecidos por atuar de forma direta ou indireta no organismo, podendo inibir ou ativar importantes alvos moleculares e celulares, por exemplo: interferindo na produção de mediadores inflamatórios (metabólitos do ácido araquidônico, peptídeos, citocinas, aminoácidos excitatórios, entre outros) (CALIXTO, 2005).

Contudo, as informações técnicas ainda são insuficientes para a maioria das plantas medicinais, de modo a garantir qualidade, eficácia e segurança de uso das mesmas. A domesticação, a produção, os estudos biotecnológicos e o melhoramento genético de plantas medicinais podem oferecer vantagens, uma vez que torna possível obter uniformidade e material de qualidade que são fundamentais para a eficácia e segurança (CALIXTO, 2000).

No século XIX o empirismo da alquimia foi suplantado pela química

experimental que permitiu a síntese laboratorial de novas substâncias orgânicas. Esse fato foi um dos fatores determinantes da revolução industrial e tecnológica que desencadeou a produção acelerada de novos medicamentos e, à medida que derivados mais puros e concentrados de plantas se tornaram disponíveis, os médicos priorizaram as drogas sintéticas e passaram a desconsiderar o papel importante da fitoterapia (BRATMAN, 1998; SIMÕES; SCHENKEL; SIMON, 2001).

Atualmente, percebe-se o interesse governamental e profissional em associar o avanço tecnológico ao conhecimento popular e ao desenvolvimento sustentável visando a uma política de assistência em saúde eficaz, abrangente, humanizada e independente da tecnologia farmacêutica (FRANÇA, 2008).

Pacientes começaram a ter acesso aos medicamentos fitoterápicos pelo Sistema Único de Saúde (SUS), no Brasil, em 2007, com a disponibilização pelas secretarias estaduais e municipais de saúde da *Maytenus ilicifolia* (Espinheira-santa), utilizada no tratamento de úlceras e gastrites, e da *Mikania glomerata* (Guaco), indicada para os sintomas da gripe. Em 2008, o Governo Federal do Brasil aprovou o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. O programa tem como objetivo garantir à população o acesso seguro e o uso racional a plantas medicinais e aos fitoterápicos.

São diretrizes do programa a promoção da pesquisa, desenvolvimento e inovação; a regulamentação e produção de fitoterápicos e insumos à base de plantas medicinais e o cultivo e manejo dessas plantas. Também integram essas diretrizes a distribuição pelo SUS; a comercialização pelo setor privado; a capacitação de recursos humanos e a orientação aos usuários. (ANVISA, 2015)

A iniciativa, além de melhorar o acesso da população a tratamentos integrativos e complementares, seguros e eficazes, promove o uso sustentável da biodiversidade brasileira, o fortalecimento da agricultura familiar e o desenvolvimento tecnológico e industrial da saúde.

No ano de 2015, o programa ganhou reforço com o repasse pelo Ministério da Saúde de R\$ 6,7 milhões a 12 municípios em sete estados, para apoiar o projeto Arranjos Produtivos Locais de Plantas Medicinais e Fitoterápicos no SUS (SUS, 2015).

Verifica-se assim que os segmentos acima citados demonstram preocupação quanto ao desenvolvimento de técnicas de isolamento e identificação, produção e cultivo de drogas (origem vegetal), biogênese de princípios ativos e outros métodos que levam ao melhoramento de seus produtos (GURIB-FAKIM, 2006).

## 2.2 ESTUDO DA FAMÍLIA LAMIACEAE

A família Lamiaceae engloba 236 gêneros e aproximadamente 7.000 espécies de ervas, arbustos e menos frequentemente árvores. As espécies estão amplamente distribuídas nas regiões tropicais, mas estão ausentes em regiões frias (HARLEY, 2004).

Existem cerca de 500 no Brasil, distribuídas em 38 gêneros (SOUZA e LORENZI, 2012). A família Lamiaceae compreende plantas ricas em óleos essenciais destinados às indústrias na produção de fármacos, perfumes e cosméticos, como lavanda (*Lavandula angustifolia*) e boldo-brasileiro (*Plectranthus barbatus*). Algumas espécies também são cultivadas como plantas ornamentais, por exemplo, sálvia (*Salvia splendens*) (SOUZA e LORENZI, 2012).

Na medicina popular, a família Lamiaceae ocupa o terceiro lugar em ordem de importância, com muitas espécies apresentando substâncias biologicamente ativas (HARLEY et al., 2004). *Salvia officinalis* L. apresenta propriedades benéficas para a saúde, como a proteção gástrica (MAYER et al., 2009) e a redução da atividade inflamatória intestinal (JUHÁS et al., 2008). Também foi observada nesta espécie a ação hipoglicemiante no tratamento experimental de animais com diabetes na forma leve e na prevenção do diabetes (LIMA, 2006). Outra espécie importante para a saúde é *Rosmarinus officinalis* L., que possui componentes bioativos com atividades antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias, antitumorais e quimiopreventivas (AFONSO, SANT'ANA, MANCINI-FILHO, 2010).

### 2.2.1 O gênero *Hyptis*

O gênero *Hyptis* é composto por cerca de 350 espécies exclusivamente neotropicais, distribuídas desde o sul dos Estados Unidos e Caribe até a Argentina, excluindo-se somente o extremo sul. Algumas espécies invasoras são bem estabelecidas na Ásia, África e norte da Austrália. (FALCÃO, 2003). No Brasil, é o gênero com o maior número de espécies da família Lamiaceae, com 69,5% de espécies endêmicas (HARLEY, 2012), e apresenta uma grande diversidade morfológica nos campos cerrados do Brasil Central, mais especificamente nos estados de Minas Gerais, Bahia e

Goiás (FALCÃO, 2003).

O *Hyptis pectinata* (L.) Poit., *Hyptis martiusii*, *Hyptis fruticosa* e *Hyptis suaveolens* (L.) Poit., são encontradas principalmente na região nordeste do Brasil. As plantas são herbáceas com folhas cruzadas opostas e lâminas inteiras. As flores estão agrupadas em inflorescências e são aromáticas, pequenas, hermafroditas, pentâmeras, zigomorfas e bilabiadas (ARRIGONI-BLANK et al., 2005).

O metabolismo especial das plantas do gênero *Hyptis* é de notável variabilidade, apresentando predominância de óleos essenciais, que têm muito valor junto a diversas comunidades que as usam pelas propriedades terapêuticas (OLIVEIRA et al., 2011). Na medicina popular muitas espécies desse gênero são utilizadas para o tratamento de infecções gastrointestinais, câimbras, dores e no tratamento de infecções da pele (BOTREL et al., 2010).

Estudos realizados com algumas espécies desse gênero apresentaram atividades biológicas como anti-hiperglicêmico (MISHRA et al., 2011), antiulcerogênico (CALDAS et al., 2011), hipotensor (SANTOS et al., 2007), efeito espasmolítico (ALMTORP; HAZELL; TORSSELL, 1991), anti-inflamatório e antinociceptiva (RAYMUNDO et al., 2011), dentre outras.

Devido à notável importância econômica e o potencial farmacológico dos óleos essenciais de espécies do gênero *Hyptis*, são necessários estudos objetivando a caracterização e identificação dos seus componentes.

### 2.3 A ESPÉCIE *HYPTIS PECTINATA*

*Hyptis pectinata* (Figura 1), popularmente conhecida como sambacaitá ou “canudinho”, é uma planta herbácea com folhas aromáticas e com linhas cruzadas, seu extrato é obtido a partir das folhas, do caule e da raiz. (BISPO, et. al. 2001).





**Figura 1:** *Hyptis pectinata* (L). Poit.. **A.** ramo florido; **B.** cálice; **C.** flor isolada. ]

Fonte: BISPO, (2001)

A administração do extrato aquoso de *H. Pectinata* em ratos revelou efeitos antinociceptivo e antiedematogênico, com baixa toxicidade e para o tratamento de inflamação, infecções bacterianas, dor e câncer (BISPO et al., 2001; ARRIGONI-BLANK et al., 2008). Num outro trabalho, o extrato aquoso de *H. Pectinata* na concentração de 100 mg/kg produziu regeneração hepática em ratos com hepatectomia parcial de 67% (SILVA et al., 2002). Ainda, em ratos parcialmente hepatectomizados, o extrato aquoso de *H. Pectinata* em associação à terapia a laser intraoperativa estimulou a regeneração hepática e provocou redução na função respiratória de mitocôndrias hepáticas sem alterar sua atividade fosforilativa (MELO, 2005). O uso de extrato aquoso liofilizado de *H. Pectinata* na concentração de 100 mg/kg melhorou o índice de regeneração hepática e de 200 mg/kg apresentou proteção hepática em ratos hepatectomizados (MELO et al., 2006).

O uso de extrato aquoso de plantas de *H. Pectinata* de origens diferentes interferiu na ação de vários mediadores químicos de inflamação, desde histaminas a prostaglandinas, indicando provável influência genética na composição das plantas. Dessa forma, ficou evidenciado que *H. Pectinata* possui substância anti-inflamatória em sua composição (ARRIGONI-BLANK et al., 2005). O extrato aquoso administrado em

ratos demonstrou ação no sistema nervoso central, por meio de efeito antidepressivo, contudo sem que tenham sido isolados os compostos responsáveis por esse efeito (BUENO, 2006). A composição dos óleos essenciais pode variar de acordo com o local da coleta e o estágio de desenvolvimento da planta. Foram isolados 33 compostos no óleo essencial de *H. Pectinata*, sendo 96% monoterpenos (BISPO et al., 2001).

Num outro trabalho, 99% dos compostos encontrados foram sesquiterpenoides, conhecidos por apresentarem atividade antimicrobiana (SANTOS et al., 2008). Nascimento et al.(2008) isolaram como principais compostos fenólicos no óleo essencial de *H. Pectinata* os sesquiterpenoides  $\beta$ -cariofileno (28%), óxido de cariofileno (28%) e  $\beta$ -pireno (7%), conhecidos por apresentarem atividade antimicrobiana. O uso do óleo essencial de *H. Pectinata* em ratos produziu efeitos analgésicos tanto periféricos, caracterizado pela redução no número de contorções após a administração de ácido acético a 0,6%, como centrais, evidenciados pelo atraso no tempo de reação ao contato com placa quente (ARRIGONI-BLANK et al., 2005). Em testes microbiológicos, o óleo essencial apresentou atividade mais efetiva contra leveduras que bactérias Gram negativas, e inibiu bactérias Gram positivas apenas em grandes concentrações (SANTOS et al., 2008).

O óleo essencial, rico no composto químico  $\beta$ -cariofileno, apresentou efeito larvícida contra *Aedes aegypti*, mas não tão poderoso quando comparado com *Lippia gracilis Schauer* (Verbenaceae) (SILVA., 2008). Em estudo in vitro, o óleo essencial de *H. Pectinata* inibiu o crescimento de *Streptococcus mutans* de forma semelhante a clorexidina (NASCIMENTO et al., 2008). Dentre os componentes químicos de *H. Pectinata*, foi elucidada a estrutura de  $\alpha$ -pironas e 2-furanona, pertencentes ao metabolismo secundário normalmente associadas com *Hyptis* (BOALINO, 2003).

## 2.4 IMPORTÂNCIAS DOS COMPOSTOS SECUNDÁRIOS PRESENTES NAS PLANTAS

Entende-se por metabolismo secundário de plantas, o conjunto de processos metabólicos que originam compostos que não possuem uma distribuição universal nos vegetais, por não serem necessários a todas as plantas (PERES, 2008). Diferente do primário, o metabolismo secundário não é essencial para o desenvolvimento do vegetal, mas é imprescindível para a sobrevivência de uma espécie dentro de um ecossistema,

viabilizando a adaptação do indivíduo no ambiente, respondendo pelas relações e interações entre planta-ambiente (MONTANARI, 2002).

As substâncias, produtos desse metabolismo secundário das plantas, são conhecidas principalmente como “princípios ativos”. Esses metabólitos ainda não possuem suas funções fisiológicas completamente elucidadas, no entanto sua produção é associada à defesa da planta contra herbivoria, ataque de patógenos, radiação solar (MONTANARI, 2002), ou ainda atuando na competição entre plantas e atração de organismos benéficos como polinizadores, dispersores de sementes e microrganismos simbioses (PERES, 2008) e também em alelopatias (SANTOS, 2002).

Esses metabólitos, além de muito diversificados, possuem interessantes propriedades biológicas. Muitas importantes comercialmente para os setores alimentício, agrônomo, de perfumaria e principalmente farmacêutico, o qual visa principalmente o grande número de substâncias farmacologicamente ativas. A surpreendente variedade de metabólitos secundários vegetais vêm despertando o interesse de pesquisadores de vários campos da ciência que buscam neles uma promissora fonte de moléculas potencialmente úteis ao homem (SANTOS, 2002).

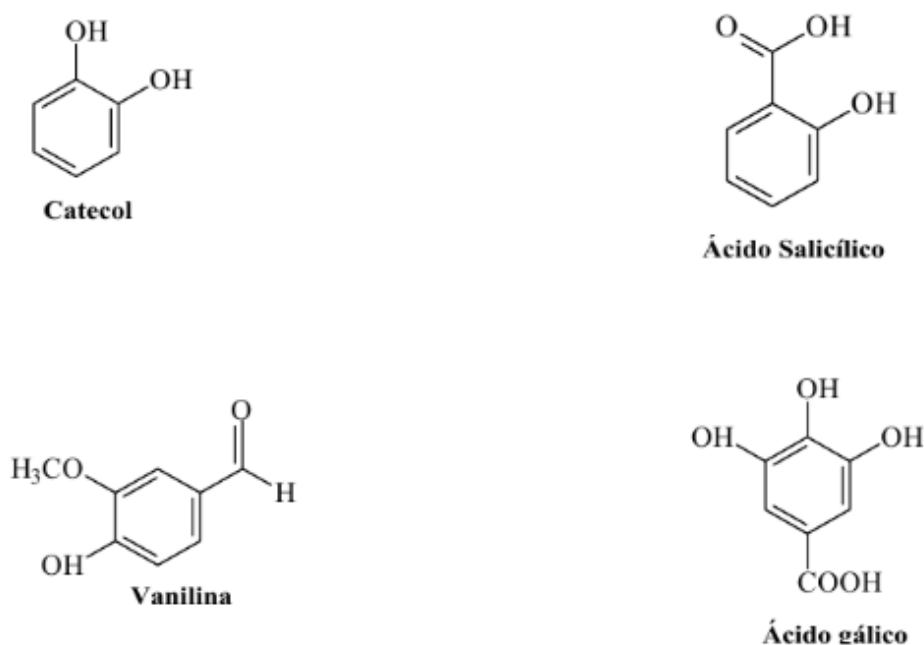
A abrangente atuação dos metabólitos secundários dos vegetais, desde produção de substâncias farmacologicamente ativas até a interferência na interação entre vegetais em um sistema de produção, mostra a importância e a necessidade do conhecimento sobre esses compostos.

Existem três grandes grupos de metabólitos secundários: terpenos, compostos fenólicos e alcalóides.

Os terpenos são obtidos a partir do ácido mevalônico (no citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto) (PERES, 2008), estão envolvidos em diferentes funções nos vegetais, desde a composição de alguns óleos essenciais de plantas (monoterpenos), o que confere características como a atração de polinizadores; ação inseticida e antimicrobiana (sesquiterpenos), dentre outras (OLIVEIRA, 2008). Vários terpenos já são conhecidos e utilizados pelo homem pelas suas propriedades inseticidas, e aromáticas dos óleos essenciais derivados dos monoterpenos (VIEGAS, 2003).

Os compostos fenólicos pertencem a uma classe de compostos com estruturas bastante diversificadas e possuem pelo menos um anel aromático no qual, pelo menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (OH-) (CARVALHO et al., 2002). Os compostos fenólicos tendem a se solubilizar em água e podem estar ligados a

açúcares. São compostos instáveis, facilmente oxidáveis em pH alcalino. Do ponto de vista farmacológico possuem atividade anti-séptica, antiinflamatória e podem inibir atividade enzimática (BRUNETON, 1991). A ligação das hidroxilas com o anel aromático lhes confere poder anti-oxidante. Existem cerca de cinco mil fenóis, dentre eles, destacam-se os flavonóides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis. (ÂNGELO e JORGE, 2007). A Figura 2 mostra alguns exemplos de compostos fenólicos.



**Figura 2:** Diferentes compostos fenólicos.

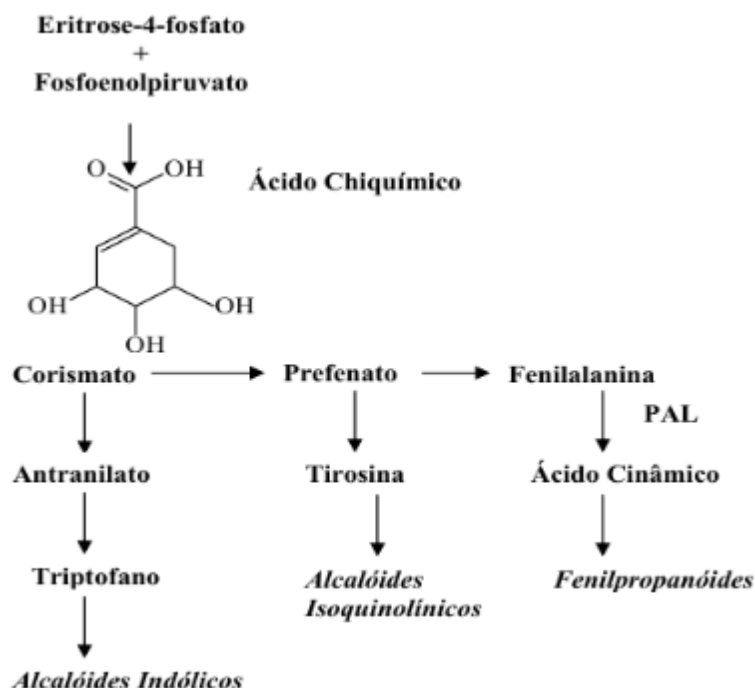
Fonte: (CARVALHO et al., 2002)

Sobre os alcalóides, a definição mais aceita é a descrita por Pelletier (1983) que diz que um alcalóide é uma substância orgânica cíclica contendo um nitrogênio (N) em um estado de oxidação negativo e cuja distribuição é limitada entre os organismos vivos. São compostos farmacologicamente ativos e encontrados predominantemente em angiospermas (HENRIQUES et al., 2002).

Essa classe de compostos é conhecida pela presença de substâncias que possuem acentuado efeito no sistema nervoso, sendo muitas delas largamente utilizadas como venenos ou alucinógenos. (PERES, 2008).

Os alcalóides são classificados de acordo com sua origem biossintética. (Figura

3) e de modo geral são formados a partir de aminoácidos.



**Figura 3:** Via do ácido chiquímico, rota biossintética de compostos fenólicos em alguns alcalóides.

Fonte: PERES, (2008).

Um dos mais importantes metabólitos secundários são taninos compostos polifenólicos, que podem ser caracterizados pela presença de grupamentos hidroxilas ligados a um anel benzênico (fenol) que podem ter outros compostos ligados a ele como ácidos orgânicos e açúcares. Podem ser classificados em taninos hidrolisáveis e condensados, dependendo das suas propriedades e estrutura química (GUIMARÃES - BEELEN et al., 2006).

Os taninos hidrolisáveis podem ser facilmente degradados por ação enzimática ou química, e são formados por uma parte central constituído por um açúcar ligado por ligações ésteres a uma parte fenólica. Normalmente a parte fenólica pode ser o ácido gálico (galotaninos), ácido hexahidroxi difênico (elagitaninos) ou outros ácidos fenólicos derivados da oxidação do ácido gálico (SCALBERT, 1991). Porém, este metabólito está presente em pequenas quantidades nos vegetais, e os dados referentes aos produtos da degradação dos taninos hidrolisáveis são limitados, pois as pesquisas têm um enfoque

maior no nível de toxidade e efeitos anti-nutricionais destes compostos (CARVALHO, 2007; GUIMARÃES -BEELEN et al., 2006; WAGHORN, 2008).

Já os taninos condensados ou proantocianidinas são mais abundantes nos vegetais do que os taninos hidrolisáveis são constituídos por polímeros de flavan-3-ols (catequina) ou flavan 3,4 diols (leucoantocianidina) que conferem atributos diferenciais aos alimentos tais como adstringência, odor e cor. As unidades fundamentais dos componentes constituintes dos taninos condensados são ligadas entre si por meio de ligações C-C que não são susceptíveis à degradação enzimática anaeróbica (MONAGAS et al., 2010), e são existentes na natureza em diversos graus de polimerização e hidroxilação, onde estes fatores vão caracterizar o peso molecular e, consequentemente, a bioatividade e impacto na digestão (NAUMANN et al., 2013).

## 2.5 A IMPORTÂNCIA DOS TANINOS

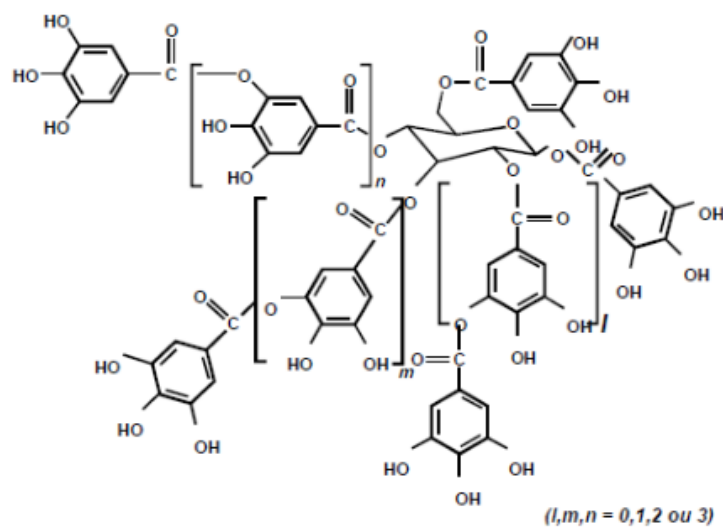
Os taninos e saponinas já foram identificados como princípios ativos de vários extratos vegetais pesquisados pela farmacognosia mundial. Uma vertente de pesquisas dentro da farmacognosia que tem sido utilizada com o objetivo de facilitar o processo de descoberta de novas substâncias é a etnofarmacologia. A etnofarmacologia é o ramo da Etnobiologia/Etnobotânica que associa informações obtidas de comunidades que fazem o uso da flora medicinal com estudos químicos/farmacológicos realizados em laboratórios especializados. Não é o interesse principal isolar todos os compostos ou um composto em particular, e sim identificar os compostos responsáveis pela ação farmacológica (ELISABETSHY, 2001). Assim, tem se interesse em conhecer os principais princípios ativos das plantas com potencial de uso tanto na medicina humana, quanto na animal.

Os compostos tânicos são responsáveis pela adstringência de muitos frutos e outros produtos vegetais. A adstringência ocorre devido à precipitação de glicoproteínas salivares, levando à perda do poder lubrificante (BRUNETON, 1991). São compostos fenólicos, e portanto são altamente reativos quimicamente que formam ligações de hidrogênio, intra e intermoleculares (MONTEIRO et al. 2005). Estes compostos são facilmente oxidáveis, tanto por enzimas vegetais específicas quanto por influência de metais, como cloreto férrico, o que ocasiona o escurecimento de suas soluções

(MELLO; SANTOS, 2001).

Possuem a habilidade de formar complexos insolúveis em água com alcalóides, gelatina e outras proteínas, características nas quais são baseados os principais testes de detecção. A complexação entre taninos e proteínas é a base para suas propriedades como fator controlador de insetos, fungos e bactérias, assim como para seus principais usos industriais (Ex: manufatura do couro). São compostos do metabolismo secundário vegetal ou metabolismo especial e são importantes nas interações entre a planta e seu ecossistema.

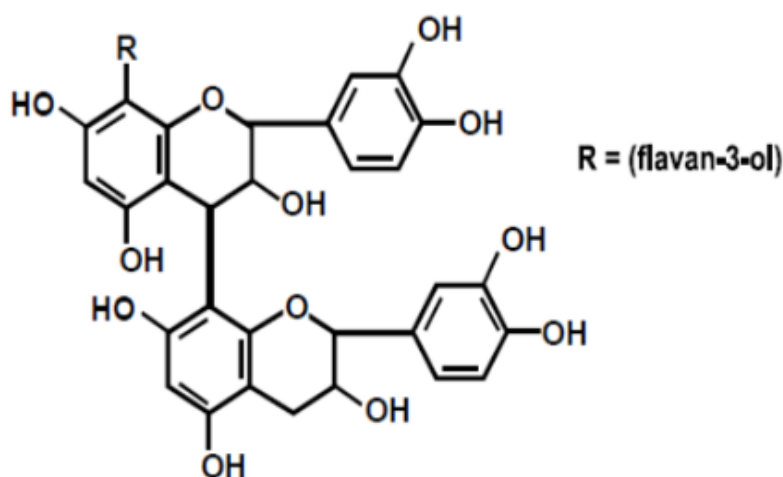
Os taninos são divididos de acordo com a estrutura química em dois grandes grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Os taninos hidrolisáveis que estão presentes nas famílias *Choripetalae* das dicotiledôneas, dicotiledôneas herbáceas e lenhosas (MELLO; SANTOS, 2001). Algumas árvores desta classe, como o castanheiro e o carvalho são utilizadas como fontes industriais de tanino. Taninos hidrolisáveis (Figura 4) possuem um grupo poliál central (em sua maioria, é  $\beta$ -D-glicose, mas também o ácido quínico, outros fenóis e outros glicósidos); e hidroxilas esterificadas pelo ácido gálico (parte fenólica) (KHANBABAEE; REE, 2001).



**Figura 4:** Estrutura dos taninos hidrolisáveis.

Fonte: NAKAMURA et al.(2003)

Já os taninos condensados ou proantocianidinas estão distribuídos por diversas famílias do reino vegetal, em geral, em plantas lenhosas. São polímeros de flavan-3-ol e/ou flavan-3,4-diol (Figura 5), produtos do metabolismo do fenilpropanol (HEIL et al., 2002). As proantocianidinas são assim denominadas pelo fato de apresentarem pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas, como cianidina e delphinidina. As moléculas têm grande variação estrutural, resultante de padrões de substituições entre unidades flavânicas, diversidade de posições das ligações e a estereoquímica (MELLO; SANTOS, 2001).



**Figura 5:** Estrutura química de taninos condensados.

Fonte: LEKHA e LONSANE (1997)

Na alimentação humana, os elagitaninos são encontrados apenas em grupos restritos de alimentos tais como framboesa, morango, castanha, avelã e caju. Estes taninos foram encontrados, também, em partes não comestíveis de plantas, como as folhas. É possível encontrar taninos elágicos em vinhos envelhecidos em barricas de madeira de carvalho, como resultado da sua difusão da madeira durante o estágio de produção em barricas (CLIFFORD et al., 2000).



### 2.5.1 Taninos e sua atividade biológica

As aplicações de drogas com taninos estão relacionadas, principalmente, com suas propriedades adstringentes. Por via interna exercem efeito antidiarréico e anti-séptico; por via externa impermeabilizam as camadas mais expostas da pele e mucosas, protegendo assim as camadas subjacentes (BRUNETON, 1991). Ao precipitar proteínas, os taninos propiciam um efeito antimicrobiano e antifúngico. Em processos de cura de feridas, queimaduras e inflamações, os taninos auxiliam formando uma camada protetora (complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo) sobre tecidos epiteliais lesionados, podendo, logo abaixo dessa camada, o processo curativo ocorrer naturalmente. Provavelmente, devido à habilidade de ligar-se às proteínas e outras macromoléculas, os taninos também apresentam atividades tóxicas.

Ayres e colaboradores (1997) verificaram que a rápida mortalidade de insetos tratados com taninos condensados parece ser devido à atividade tóxica destes compostos e não pela inibição da digestibilidade. Contudo, isto não ocorre sempre, por exemplo, a catequina apresenta maior toxicidade que os taninos, embora esta tenha pouca afinidade por proteínas.

Um outro mecanismo de toxicidade, que pode envolver os taninos, deve-se ao fato desses complexarem-se com facilidade a íons metálicos. Sistemas biológicos, incluindo microrganismos, necessitam de íons metálicos como cofatores enzimáticos. Por exemplo, ratos tratados com bebidas ricas em compostos fenólicos tiveram redução da absorção de ferro (SCALBERT, A, 1991).

Apresentam atividade antioxidante natural, em função de serem doadores de elétrons, característica que leva a estabilização das espécies reativas de oxigênio como os radicais hidroxilas (HO). A presença de vários grupamentos hidroxila e anéis aromáticos nos taninos condensados impossibilita que estes compostos tenham função pró-oxidante de acordo com Rield e Hagerman (2001); Duthie (1993).

Várias doenças degenerativas como câncer, esclerose múltipla, arteroesclerose e o próprio processo de envelhecimento estão associados a altas concentrações intercelulares de radicais livres (MELLO, 2001).

Estudos recentes mostram que vários taninos atuam como captadores de radicais, os quais interceptam o oxigênio ativo formando radicais estáveis (MELLO, 2001).

Chung e colaboradores (1998) sugerem que os taninos parecem ter duplo efeito,

por um lado, beneficiam a saúde devido a seu efeito quimiopreventivo contra carcinogênese ou atividades antimicrobianas, por outro lado, estão envolvidos possivelmente na formação de cânceres, hepatotoxicidade ou efeitos antinutricionais. Taninos das espécies *Quercus suber* L. e *Q. coccifera* L. apresentaram efeito gastroprotetor, variando entre 66 e 91%. As propriedades antimicrobianas dos taninos são bem conhecidas e documentadas. Moléculas de taninos estão sendo testadas com a intenção de se descobrir uma droga eficiente contra o HIV.

### **2.5.2 Determinação do teor de taninos**

Os taninos vegetais têm sido quantificados por diversos tipos de ensaios, como precipitação de metais ou proteínas e por métodos colorimétricos, sendo esses últimos mais comuns. Os métodos mais apropriados para determinação de taninos são os ensaios com precipitação de proteínas (HAGERMAN, 1997). Alguns ensaios colorimétricos são usados para quantificar grupos de taninos específicos, muito embora estes métodos sejam amplamente usados para analisar taninos de uma maneira geral, como no caso de taninos hidrolisáveis.

Para quantificar taninos condensados os métodos mais utilizados são o butanol-HCl e o vanilina (DAHLGREN, 2000. MORAIS, 1999. AGOSTINI-COSTA, 2003). De acordo com Schofield e colaboradores (2001) o método vanilina depende da reação da vanilina com os taninos condensados para formação de complexos coloridos. O sucesso deste ensaio depende do tipo do solvente usado, da concentração e natureza do ácido, do tempo da reação, temperatura e concentração da vanilina. O maior problema para o método vanilina parece ser a reatividade de subunidades de polímeros de taninos, o que caracteriza a falta de especificidade, para taninos condensados. A raiz das dificuldades analíticas está na complexidade e variabilidade das estruturas dos taninos condensados.

Por essas moléculas apresentarem uma grande variabilidade de estruturas, tanto em taninos condensados como hidrolisáveis, alta reatividade de suas subunidades com materiais oxidativos e complexação com macromoléculas, o processo de isolamento, identificação e quantificação torna-se bastante complexo.

## 2.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A oxidação consiste na transferência de elétrons de um átomo para outro e representa uma parte essencial da vida aeróbia e do nosso metabolismo, uma vez que o oxigênio é o último aceitador no sistema de fluxo de elétrons, pelo qual se produz energia na forma de ATP (TRIPOLI, et al., 2007). Contudo, neste fluxo, podem surgir problemas quando há transferência de elétrons sem pares, formando-se radicais livres de oxigênio, conhecidos como espécies reativas de oxigênio, entre as quais se distinguem o superóxido, peróxil, alcooxil, hidroxilo, e o óxido nítrico. Nos organismos vivos existem ainda outros tipos de espécies reativas de oxigênio (ROS) para além destas mas não radicalares, entre os quais o oxigênio, peróxido de hidrogênio e o ácido hipocloroso (TRIPOLI, et al., 2007).

Sabe-se que as espécies reativas de oxigênio têm diferentes funções nos organismos vivos. Algumas são positivas e estão relacionadas com a produção de energia, regulação do crescimento celular ou síntese de compostos biológicos (TRIPOLI, et al., 2007). Por outro lado, quando estão em excesso podem também provocar danos nos lípidos das membranas celulares, proteínas dos tecidos, enzimas e DNA, uma vez que são capazes de induzir a oxidação destas moléculas. Estes danos têm um papel importante no envelhecimento e algumas doenças degenerativas como doenças do coração, cataratas, disfunção cognitiva e cancro (TRIPOLI, et al., 2007).

A progressão de várias desordens clínicas agudas e crônicas sugere que as substâncias antioxidantes podem ter efeitos benéficos para a saúde como agentes profiláticos. Apesar destes efeitos protetores para a saúde terem sido primariamente atribuídos a antioxidantes amplamente conhecidos, as vitaminas A, C, E, e os carotenóides constituem alguns antioxidantes bem conhecidos, obtidos na alimentação. Além destas, outras substâncias contribuem para os benefícios da saúde associados ao consumo de vegetais e frutas.

Podem ser encontradas na bibliografia muitas referências aos estudos que evidenciam a capacidade antioxidante de compostos fenólicos de origem natural (TRIPOLI, et al., 2007 ; AKKOL, et al., 2008). Os humanos evoluíram com sistemas antioxidantes que os protegem contra os radicais livres através de antioxidantes produzidos no corpo. Estes incluem defesas enzimáticas, como a peroxidase, catalase, superóxido dismutase, e defesas não enzimáticas, como glutathione, ácido di-

hidrolipóico, e melatonina CoQ10 reduzida.

Este sistema endógeno de defesa não é completamente eficiente contra os agentes oxidantes uma vez que existem também outras situações fisiopatológicas que levam a produção de um excesso de espécies reativas de oxigênio (ROS) no organismo, das quais se destacam: fumo de tabaco, poluentes do ar, radiação ultravioleta (UV) ou uma dieta rica em ácidos polisaturados. Desta forma os antioxidantes provenientes da dieta alimentar tornam-se bastante importantes na diminuição dos efeitos oxidativos ao longo da vida.

## 2.7 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Existe uma grande diversidade de métodos para determinar a atividade antioxidante. Estes métodos são baseados em procedimentos químicos ou físico-químicos, que são utilizados para monitorizar o processo de oxidação.

Os vários métodos existentes para avaliar a atividade antioxidante podem ser classificados em três grupos (ALMELA, et al., 2006;):

- i. Métodos indiretos: fenóis totais; reação de Briggs-Rauscher (BBR-Briggs-Rauscher reaction) e metil linoleato;
- ii. Métodos que utilizam metabolitos da oxidação de lípidos: Rancimat; produtos voláteis, ácido tiobarbiturico (TBA-thiobarbituric acid);
- iii. Métodos baseados na capacidade para eliminar radicais: parâmetro antioxidante de eliminação total de radicais (TRAP- total radical-trapping antioxidante parameter); capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC- oxygen radical absorbance capacity); poder antioxidante pela redução do íon ferro; ácido 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS); 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH); espectroscopia RMN (Ressonância Magnética Nuclear).

A aplicação de diferentes técnicas na determinação da atividade antioxidante de um extrato pode levar a resultados dispersos, dependendo da complexidade do extrato que é muitas vezes constituído por uma mistura de compostos com diferentes grupos funcionais, polaridade e comportamento químico. É então importante num estudo deste tipo, aplicar vários métodos de forma a obter resultados mais abrangentes (TEPE e

SOKMEN, 2007).

No entanto, os métodos mais comuns, para a determinação da atividade *in vitro* de compostos de origem natural, são os que envolvem as reações com radicais e, dentro destes, os mais usualmente utilizados são os que envolvem as reações com os radicais ABTS (ácido 2,2-azino-bis-3-etilbenzolína-6-sulfônico) e DPPH (radical 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazil).

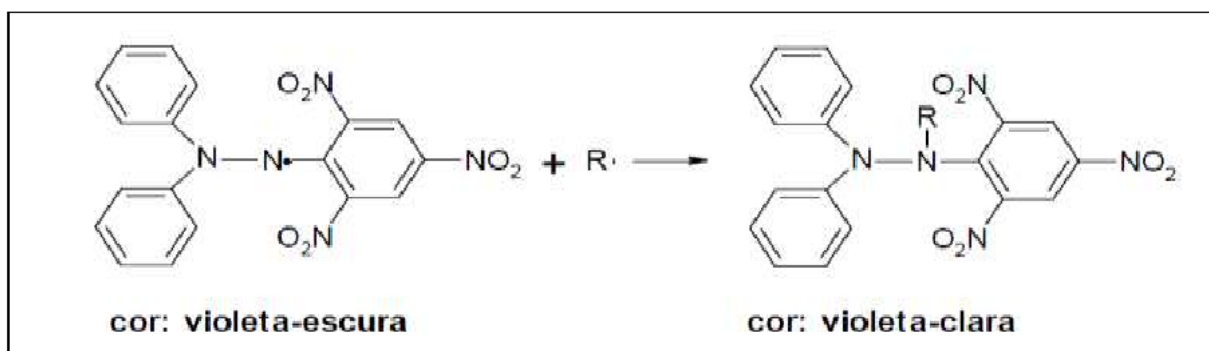
Estes métodos são muitos populares devido à sua simplicidade e rapidez de reação.

## 2.8 MÉTODO DE DESCOLORAÇÃO DO RADICAL 2,2-DIFENIL-1-PICRIL-HIDRAZIL

O método de DPPH é um método simples utilizado para medir a capacidade de antioxidantes de eliminar radicais livres (TORRES DE PINEDO, et al., 2007). O método original de Descoloração do radical 2,2-difeníl-1-picril-hidrazil (DPPH) foi proposto por Blois em 1958 (BLOIS, 1958; BRAND-WILLIAMS, et al., 1995;) mas o método mais utilizado atualmente foi desenvolvido por Brand-Williams et al., em 1995.

O DPPH é um radical livre, estável a temperatura ambiente, devido à deslocalização de um par de elétrons em toda a molécula. Este par de elétrons é responsável pelo fato de as moléculas de DPPH não dimerizarem, como acontece com a maioria dos radicais livres.

O DPPH apresenta uma solução de cor violeta em metanol ou etanol. Um dos seus máximos de absorção encontra-se por volta dos 515nm (MOLYNEUX, 2004). Este método baseia-se na transferência de um elétron ou radical de hidrogênio entre a espécie antioxidante e o radical livre DPPH<sup>+</sup>. A redução do radical provoca então a diminuição da absorvância da solução, a qual pode ser observada por um espectrofotômetro. Quando uma solução de DPPH é misturada com uma substância com capacidade de doar hidrogênios, a molécula de DPPH passa à forma reduzida e perde a cor violeta característica, passando a exibir uma cor amarela pálida devido a presença do grupo picril, conforme a Figura 6 (MOLYNEUX, 2004).



**Figura 6:** Estabilização do radical livre DPPH

Fonte: (BRAND-WILLIAMS, et al., 1995)

Existem inúmeras referências na bibliografia (BLOIS, 1958; BRAND-WILLIAMS, et al., 1995; MOLYNEUX, 2004; TORRES DE PINEDO, et al., 2007) sobre a utilização do método de DPPH para a determinação da atividade antioxidante de substâncias nas mais diversas matrizes.

A simplicidade, rapidez e sensibilidade deste método permite a análise de várias amostras num certo espaço de tempo, e a detecção de substâncias capazes de eliminar radicais, mesmo quando presentes em baixas concentrações (CORREIA, et al., 2005).

### **2.8.1 Cinética e mecanismos da atividade antioxidante usando o DPPH segundo a metodologia de Brand-Williams**

Brand-Williams et al.(1995) propuseram o método envolvendo a utilização do 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH), no qual compostos antioxidantes reagem com o radical estável em uma solução de metanol ou etanol. A redução do DPPH é acompanhada pelo monitoramento do decréscimo na absorbância em comprimento de onda característico durante a reação. Em sua forma radical, o DPPH apresenta absorbância a 517 nm, mas sob redução por um antioxidante (AH) ou uma espécie radical (R) a absorbância diminui.

A capacidade de sequestro do radical livre DPPH pela amostra é determinada pela habilidade de transferência de hidrogênio para o radical livre estável DPPH. Este método pode ser utilizado para avaliar a atividade antioxidante de compostos específicos ou de um extrato em um curto período de tempo. Portanto, este método tem

sido uma ferramenta útil para avaliar a capacidade antioxidante de vegetais (BORGUINI, 2006).

Existem substâncias antioxidantes que reagem de forma particular com o DPPH implicando em uma cinética diferenciada. Podemos citar os compostos que reagem lentamente, como o BHT e BHA, os compostos de cinética rápida, que levam poucos segundos, como o ácido ascórbico, e o de cinética intermediária, com reações entre 5 e 30 min, como o  $\alpha$ -tocoferol (CARPES, 2008).

Assim, podem ocorrer três tipos de comportamento cinético entre compostos com atividade antioxidante: substâncias que reagem rapidamente com o DPPH, chegando ao final da reação em menos de um minuto (cinética rápida); substâncias que finalizam a reação em até 30 minutos (cinética intermediária) e substâncias de cinética lenta que demoram mais de uma hora para completar a reação (cinética lenta) (BRAND-WILLIAMS, 1995; VEDANA, 2008).

Em uma reação antioxidante estequiométrica, a exata concentração inicial de DPPH $\cdot$ ,  $C_{0DPPH\cdot}$  (mol/L), pode ser calculada a partir da regressão linear (Equação 1).

$$C_{0DPPH\cdot} = 7.99 \times 10^{-5} \times A_{515} + 2.06 \times 10^{-7} \quad (1)$$

Sendo a absorbância (A) lida a 515nm até a reação atingir um patamar. Para cada MR (reação molar), o restante é determinado pela percentagem de DPPH $\cdot$  graficamente e EC<sub>50</sub> lido no gráfico como MR que reduz a metade da concentração inicial de DPPH.

Na determinação dos parâmetros cinéticos da reação, a taxa (V) de uma reação completa entre os mol do DPPH e os mol do antioxidante (AH), em função do tempo (t) é definida da seguinte forma (Equação 2):

$$\begin{aligned} v &= -dC_{DPPH\cdot} / (\sigma \times dt) \\ &= k \times C_{DPPH\cdot}^x \times C_{AH}^y \end{aligned} \quad (2)$$

em que C é a concentração, k a constante de velocidade, e X e Y as ordens com

respeito às formas reativas.

## 2.9 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL APLICADO AO TRABALHO

Geralmente um dos problemas mais comumente encontrados na realização de experimentos, está na determinação da influência de uma ou mais variáveis sobre o sistema em estudo. No planejamento de qualquer experimento, a primeira etapa a ser feita é decidir quais são os fatores interferentes e a influência das variáveis controladas pelo experimentador, assim como as respostas de interesse. Os fatores podem ser qualitativos ou quantitativos. Deve-se definir, também, o objetivo do experimento para se optar pelo tipo de planejamento mais adequado.

O Planejamento Fatorial é uma ferramenta estatística que permite determinar se as variáveis escolhidas para serem estudadas em um sistema, têm ou não influência sobre a resposta desse sistema. Permite, também, avaliar e quantificar o nível dessa influência e a existência de interação entre as variáveis (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

O objetivo esperado, utilizando-se planejamentos fatoriais baseados em princípios estatísticos, é extrair do sistema em estudo o máximo de informação útil, fazendo um número mínimo de experimentos. A essência de um bom planejamento consiste em projetar um experimento de forma que ele seja capaz de fornecer exatamente o tipo de informação procurada.

Werkema & Aguiar (1996) enfatizam que, para realizar um experimento de forma eficiente, deve ser utilizada uma abordagem científica para o seu planejamento. Esta abordagem é identificada por meio do termo planejamento estatístico de experimentos, que se refere ao procedimento de planejar um experimento de forma que dados apropriados sejam coletados em tempo e custo mínimos. A análise destes dados por meio de técnicas estatísticas resultará em conclusões confiáveis.

### 2.9.1 Planejamento fatorial em dois níveis



Um caso particular é o planejamento fatorial com  $k$  fatores e 2 níveis, que é denominado planejamento fatorial  $2^k$ . Os fatores e os níveis são pré-determinados, configurando esse planejamento como um modelo de efeitos fixos. Para que a análise seja objetiva, as hipóteses de normalidade devem ser satisfeitas. Esse tipo de planejamento é usado normalmente nos estágios iniciais da pesquisa, permitindo o estudo de diversos fatores com um número reduzido de experimentos.

Como há somente dois níveis para análise de cada fator, assume-se que a variável de resposta apresente comportamento linear entre esses níveis.

É necessário especificar os níveis (superior e inferior) em que cada variável será estudada, ou seja, estabelecer os valores dos fatores empregados nos experimentos. Os níveis inferior e superior são representados por (-) e (+), respectivamente.

Um planejamento fatorial requer a execução de experimentos para todas as possíveis combinações dos níveis dos fatores. Em geral, se houver  $n_1$  níveis na variável 1,  $n_2$  na variável 2,...,  $n_k$  na variável  $k$ , o planejamento fatorial terá  $n_1 \times n_2 \times \dots \times n_k$  ensaios diferentes.

Um planejamento fatorial em que todas as variáveis são estudadas em apenas dois níveis é portanto o mais simples de todos eles. Havendo  $k$  fatores, isto é,  $k$  variáveis controladas pelo experimentador, o planejamento de dois níveis irá requerer a realização de  $2 \times 2 \times \dots \times 2 = 2^k$  ensaios diferentes. Costuma-se então representar um planejamento fatorial de dois níveis e  $k$  variáveis por  $2^k$  (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

Segundo Fernandes Jr. (2002), os experimentos fatoriais  $2^k$  são amplamente utilizados principalmente pelos seguintes motivos:

- a) A interpretação dos resultados é bastante intuitiva;
- b) O número de ensaios envolvidos na realização desses experimentos, por fator estudado, é relativamente pequeno;
- c) Esses experimentos podem ser aumentados, com a inclusão de novos níveis e/ou fatores, quando for necessário realizar uma avaliação mais detalhada do fenômeno que está sendo estudado.

Barros Neto; Scarminio; Bruns (2001) explicam que quando um efeito de uma

variável depende do nível de outra, diz-se que estas variáveis interagem e pode-se calcular o efeito de interação entre elas. A existência da interação torna incorreta a análise isolada do efeito de um único fator. Se o comportamento de um fator não é o mesmo nos dois níveis do outro fator, diz-se que existe interação entre os fatores. O efeito da interação entre dois fatores é definido como a metade da diferença entre os efeitos de um fator nos dois níveis do outro fator. Quando a interação é muito significativa, os efeitos principais correspondentes apresentam pouco sentido prático.

No modelo estatístico a repetição dos experimentos permite estimar o erro experimental, sendo que a importância de uma interação para um modelo deve decrescer com o número de fatores envolvidos na sua definição (FERNANDES JR, 2002).

### **2.9.2 Método do valor P (probabilidade)**

Segundo Lourenço Filho (1969), na investigação de um determinado fenômeno, em que existe uma coleção de dados estatísticos, sob a forma de uma lista de resultados de um experimento ou de observações relacionadas ao experimento, quando se deseja saber se o fenômeno pode ser adequadamente descrito através de um modelo teórico envolvendo probabilidades, considera-se a hipótese de que o modelo sugerido é adequado. Nesta hipótese pode-se computar as probabilidades dos vários eventos relacionados com o experimento. Os autores denominam hipótese nula, denotada pelo símbolo  $H_0$ , como a hipótese a ser validada pelo teste, pois a atenção deve ser orientada em relação a ela, conduzindo-se o raciocínio para tal. A hipótese contrária a  $H_0$  é denominada de hipótese alternativa, representada por  $H_1$ . Aceitar  $H_0$  significa rejeitar  $H_1$ , enquanto que rejeitar  $H_0$  significa aceitar  $H_1$ .

O valor P (ou valor de probabilidade) é a probabilidade de se obter um valor da estatística amostral de teste no mínimo tão extremo como o que resulta dos dados amostrais, na suposição de a hipótese nula ser verdadeira. Enquanto a abordagem tradicional do teste de hipóteses resulta em uma conclusão do tipo “rejeitar/não rejeitar”, os valores P dão o grau de confiança ao rejeitarmos uma hipótese nula. Os valores P são interpretados da seguinte forma:

- a)  $P < 0,01$  – Elevada significância estatística (evidência muito forte contra

hipótese nula);

b)  $0,01 \leq P \leq 0,05$  – Estatisticamente significativa (evidência adequada contra a hipótese nula);

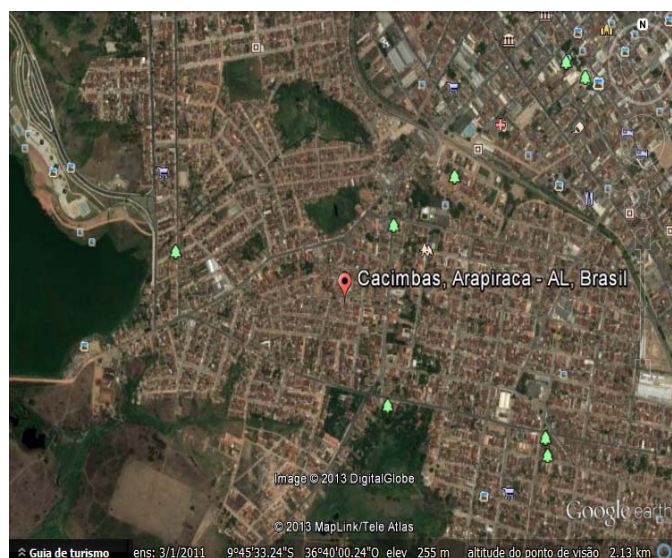
c)  $P > 0.05$  – Evidência insuficiente contra a hipótese nula.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO

A espécie *Hyptis pectinata* é caracterizada em herbário com a numeração 25118 pertencente à família Lamiaceae do grupo A-373. (HERBÁRIO IAC).

As partes da planta da espécie *Hyptis pectinata* (L.) Poit foram coletadas no Sítio Sementeira pertencente ao bairro Cacimbas II no município de Arapiraca (Alagoas – Brasil) (Figura 7).



**Figura 7:** Bairro Cacimbas II.

Fonte: Google Earth

Na Figura 8 está representada a espécie *Hyptis pectinata* (L.) Poit utilizada no presente trabalho.



**Figura 8:** Espécie *Hyptis pectina* coletada no sítio sementeira.

### 3.2. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

A identificação da espécie foi baseada em dados taxonômicos usuais.

Após a coleta, as partes da planta (raiz, caule e folhas) foram separadas, lavadas para o processo de secagem em estufa (modelo MA-037) a 37°C, com renovação e circulação de ar por 48 horas até completa desidratação.



**Figura 9:** Partes da planta antes da secagem em estufa: A – folhas, B – raiz, C – caule.

### 3.3 PREPARAÇÃO DO EXTRATO ALCOÓLICO

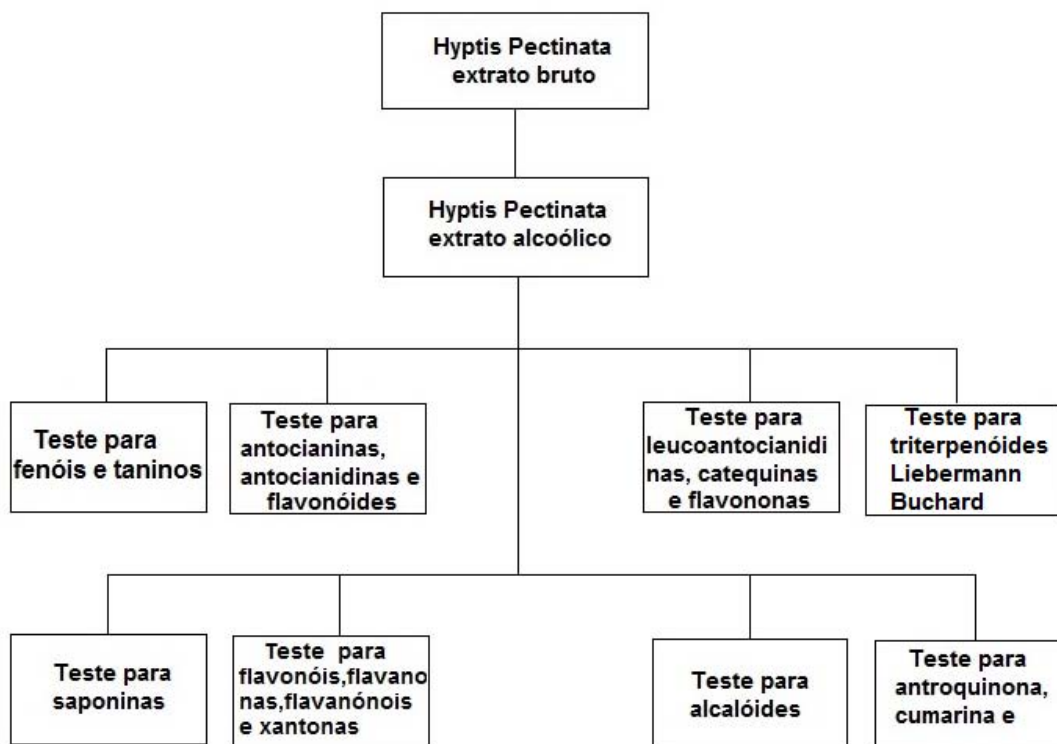
A raiz, o caule e as folhas, depois de secos, foram reduzidos á pó através de maceração exaustiva e extraídos por cinco dias em 100 mL de etanol a 90%. Após este período, o material foi filtrado e concentrado em rota-evaporador (Büchi 461) sob pressão reduzida a uma temperatura de 50 °C, resultando nos extratos hidroalcóolicos, que foram então submetidos à prospecção fitoquímica, segundo a metodologia (MATOS, 1997).

### 3.4 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

Os extratos da planta foram submetidos à prospecção fitoquímica, seguindo-se procedimentos descritos na literatura (MATOS, 1997; WAGNER & BLADT, 1995). Os métodos utilizados nessa abordagem são apenas qualitativos, e a presença de um constituinte pode mascarar a cor indicativa do outro, e tem como base as reações de coloração ou formação de precipitado.

Esta metodologia teve como objetivo detectar a presença de diversos constituintes químicos presentes nos extratos da raiz, caule e folhas da *H. pectinata*. Para a realização dos testes, sete porções de 5 mL de cada extrato da planta foram

dissolvidos em etanol e colocados em tubos de ensaio numerados de 1 a 7, sendo então 7 tubos para raiz, caule e folhas, totalizando 21 tubos, onde cada tubo foi utilizado para um determinado teste referente a prospecção fitoquímica, a Figura 10 esquematiza o processo de cada parte da planta.



**Figura 10:** Fluxograma do procedimento experimental para a prospecção fitoquímica utilizado nos extratos de raiz, caule e folhas de *H. pectinata*.

### 3.4.1. Teste para fenóis e taninos

Foram utilizados 5 mL de cada extrato de *Hyptis pectinata* e adicionadas três gotas de solução alcoólica de  $\text{FeCl}_3$  1 mol.L<sup>-1</sup>. Os mesmos foram agitados e a variação de cor e/ou formação de precipitado, observado. O resultado obtido foi comparado com um teste em branco (três tubos), usando-se água e  $\text{FeCl}_3$ .

A coloração variando entre azul e vermelho é indicativo de fenóis. A formação de um precipitado azul escuro indica a presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis) e de cor verde a presença de taninos flobabênicos (taninos condensados ou catéquicos).

A solução de cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) foi preparada adicionando-se 9 g deste reagente a 50 mL de água destilada contendo 2 mL de ácido clorídrico ( $\text{HCl}$ )  $3 \text{ mol.L}^{-1}$ . Em seguida, o volume da mistura foi completado para 100 mL com etanol em um balão volumétrico. A solução de  $\text{HCl}$   $3 \text{ mol.L}^{-1}$  foi obtida pela mistura de 33,3 mL do ácido clorídrico concentrado (37%) em água destilada suficiente para 100 mL de solução, em um balão volumétrico (MATOS, 1997; WAGNER & BLADT, 1995).

### 3.4.2. Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides

Seguindo a metodologia de Matos (1997), Wagner e Bladt (1995), tomou-se os tubos numerados de 2 a 4. Acidulou-se até pH 3 com  $\text{HCl}$   $3 \text{ mol.L}^{-1}$  e os tubos 3 e 4 foram alcalinizados respectivamente a pH 8,5 e 11 com  $\text{NaOH}$   $1 \text{ mol.L}^{-1}$ . Para se obter a solução de  $\text{NaOH}$   $1 \text{ mol.L}^{-1}$ , 4 g do reagente foram dissolvidos em 100 mL de água destilada. A interpretação dos resultados foi feita como mostrado na Tabela 1.

**Tabela 1:** Metodologia para avaliar a presença de antocianinas, antocianidinas e flavonoides.

Constituintes	COR		
	Ácido pH=3	Alcalino pH=8,5	Alcalino pH=11
antocianinas e antocianidinas	Vermelha	Lilás	Azul-púrpura
flavonas, flavonóis e xantonas	-	-	Amarela
chalconas e auronas	Vermelha	-	Vermelho Púrpuro
Flavanonóis	-	-	Vermelho/Laranja

Fonte: MATOS (1997)

### 3.4.3 Teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavononas

De acordo com a metodologia Matos (1997), Wagner e Bladt (1995), foram utilizados 5 mL dos extratos e acidulados por adição de  $\text{HCl}$   $3 \text{ mol.L}^{-1}$  até pH 1-3 e alcalinizados com  $\text{NaOH}$   $1 \text{ mol.L}^{-1}$  até pH 11, separadamente. Os tubos foram aquecidos cuidadosamente e a mudança de coloração foi observada. A interpretação dos



resultados foi feita como mostrado na Tabela 2.

**Tabela 2:** Metodologia para avaliar a presença de leucoantocianidinas, catequinas e flavononas.

Constituintes	COR	
	Meio Ácido	Meio Alcalino
Leucoantocianidinas	Vermelha	-
Catequinas (Taninos catéquicos)	Pardo-amarelada	-
Flavononas	-	Vermelho/laranja

Fonte: MATOS (1997)

### 3.4.4 Teste para triterpenóides Liebermann-Buchard

Seguindo a metodologia de Matos (1997), Wagner e Bladt (1995), foram adicionados 10 mL de solução etanólica de cada extrato em béqueres. Os extratos foram secos em banho-maria. Extraíu-se o resíduo seco de cada bequer três vezes com porções de 1-2mL de  $\text{CHCl}_3$ . Os extratos foram separados em tubos diferentes e adicionado algumas gotas de  $\text{CHCl}_3$ . A solução clorofórmica foi filtrada e coberta com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, sendo transferida para um tubo de ensaio. Foi adicionado 1 mL de anidrido acético e o tubo foi levemente agitado. Foram adicionadas três gotas de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. O tubo foi levemente agitado, sendo observado o aparecimento de cores. A coloração azul seguida da verde permanente é um indicativo da presença de esteróides livres. A coloração parda até vermelha indica triterpenóides pentacíclicos livres.

### 3.4.5 Teste para saponinas

Os resíduos insolúveis em clorofórmio, separados no teste anterior, foram solubilizados em água destilada e filtrados para tubo de ensaio. A solução foi fortemente agitada, por dois a três minutos até ser observada a formação de espuma, persistente e

abundante (colarinho) que indica a presença de saponinas (MATOS, 1997; WAGNER & BLADT, 1995).

#### **3.4.6 Teste para flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas**

Seguindo a metodologia Matos (1997), Wagner e Bladt (1995), foram adicionados alguns miligramas de magnésio granulado e 0,5 mL de HCl concentrado. O término da reação foi indicado pelo fim da efervescência. Observou-se por comparação a mudança na cor da mistura. O aparecimento ou intensificação da cor vermelha foi indicativo da presença de flavonóis, flavanonas, flavanonóis e/ou xantonas, livres ou seus heterosídeos.

#### **3.4.7 Teste para alcalóides**

Para o teste de alcalóides adotou-se a metodologia estabelecida por Matos, 1997, Wagner e Bladt, (1995). Em uma solução de álcool com o extrato de *H. pectinata* (20 mL) foi adicionado  $\text{NH}_4\text{OH}$  até alcançar pH 11. As bases orgânicas foram extraídas em três porções de 10, 20 e 30 mL de uma mistura éter-clorofórmio em funil de separação. A fração éter-clorofórmio coletada foi tratada com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro para eliminação do excesso de água. O filtrado foi separado e as bases orgânicas foram extraídas com pequenas porções de HCl diluído. A solução éter-clorofórmio foi descartada, enquanto a solução aquosa ácida obtida foi dividida em três tubos de ensaio que receberam, respectivamente, três gotas dos reagentes de precipitação de alcalóides: “Hager”, “Mayer” e “Dragendorf”.

#### **3.4.8 Teste para antroquinona, cumarina e antrona**

Foram marcados os pontos com os extratos-teste em placas cromatográficas que foram eluídas em clorofórmio. As placas foram borrifadas com uma solução de hidróxido de potássio a 10% e observou-se a presença das cores indicativas em luz UV

365nm. A cor vermelha indica antraquinona, a amarela indica antrona e a azul indica cumarina (MATOS, 1997; WAGNER & BLADT, 1995).

### 3.5 QUANTIFICAÇÃO DE TANINOS

#### 3.5.1 Padrões de purificação para análise de taninos condensados (TC)

A quantificação de taninos foi realizada seguindo a metodologia de Terril, (1992). Preparou-se uma mostra composta de 20g de todos os tratamentos, misturou-se a amostra composta em 350ml de uma solução de concentração 7:3 (Acetona e água destilada).

Após decantar, foi realizada a filtração e a solução filtrada foi colocada em um funil separador com 250-300ml de éter. Agitando um funil com tampa por 40 segundos manualmente e esperou-se separar as concentrações para então filtrar. Coletou-se a fase inferior descartando-se a fase superior. Esse procedimento foi realizado 3 vezes (Figura 11).



**Figura 11:** Processo da filtração em três etapas: 1ª, 2ª e 3ª.

Então a solução foi levada para o exaustor para volatilização do éter e acetona por aproximadamente 12 horas. A solução foi submetida a uma nova filtragem antes de passar no Sephadex. Hidratou-se o Sephadex com água em um bequer, em seguida foi filtrada uma quantidade generosa de metanol/água através de Sephadex em um funil de

Büchnner

Então foi realizada a filtração através do Sephadex, (Figura 12). Descartando-se o filtrado, em seguida o extrato que ficou retido no Sephadex passou por uma lavagem com acetona e água (7:3) para que então fosse dissociado.



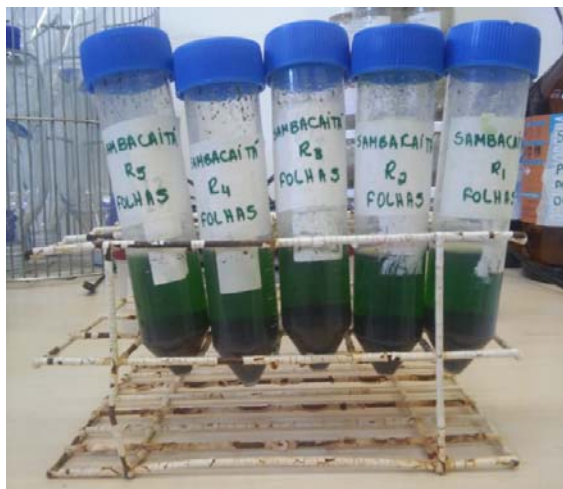
**Figura 12:** Processo de filtração em resina (Sephadex).

Reservou-se o filtrado em exaustor para volatilização da acetona e em seguida o levou ao freezer a temperatura de - 80°C por 12 horas. Por fim o filtrado foi levado ao liofilizador por uma semana antes da leitura de absorbância. Essa foi liofilizada para recuperar o tanino condensado purificado, este é cristalino e é usualmente quase branco ao marrom claro. Pequenas quantidades (geralmente 0,1 mg – 0,25 mg) são recuperados, por essa razão são usados com moderação.

### **3.5.2 Diluição para realizar o preparo de amostras de taninos condensados extraídos (ECT)**

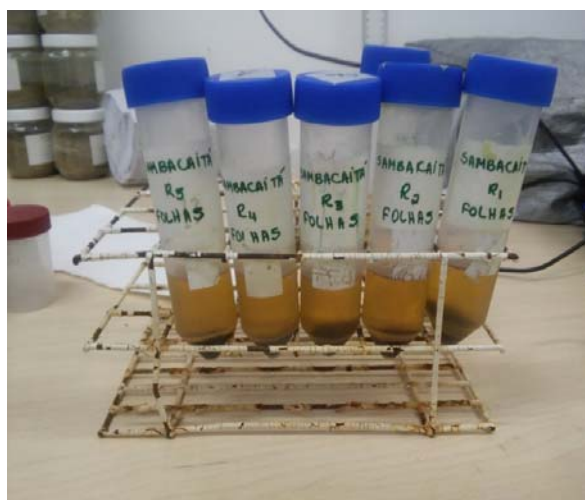
Para avaliar a quantidade de taninos extraíveis presentes nas folhas de *H. Pectinata* foi seguindo a metodologia de Terril, (1992). Pesou-se 0,25g do material moído a 1mm (cada amostra) em seguida colocado em tubos de Falcon. Adicionou-se 10mL de solução (70% acetona/30% éter) e 10mL de éter, agitou-se em vortex por 20 segundos (Figura 13), (Vortex mixer, modelo: KMC - 1300v) Centrifugou-se por 15min

a 5,000 rpm a 22°C (ThermoFisher. Modelo: D-37520)



**Figura 13:** Tubos de falcon contendo 0,25g do extrato das folhas mais solução.

Em seguida, centrifugou-se somente os tubos de Falcon com o resíduo sólido no fundo e o restante de acetona, para haver melhor decantação dos pellets – (15min de centrifugação a 5000 rpm, 22°C). A fase alcoólica superior foi retirada e descartada, esse procedimento foi repetido 3 vezes (Figura 14).



**Figura 14:** Tubos de falcon o extrato mais a solução após as repetições.

Foi coletada a fase aquosa e colocada em um recipiente plástico e reservada em exaustor para volatilizar o éter e acetona, em seguida após a volatilização total foi colocada a fase aquosa em balões volumétricos de 25mL aferindo-se com H<sub>2</sub>O até o menisco.

### **3.5.2.1 Análise espectrofotométrica**

Após colocar cada amostra em balão volumétrico de 25mL e aferir com H<sub>2</sub>O destilada, cada solução foi filtrada com papel filtro. Foi utilizado 0,75 mL desta fase aquosa + 3,5mL de HCl – Butanol e colocado em tubos de ensaio para em seguida fazer a leitura em espectrofotômetro.

Seguindo a metodologia de Terril et al (1992), os tubos foram colocados em banho Maria a 100°C por 45 minutos juntamente com o branco. Após a retirada das amostras do banho-maria, foram colocadas em banho de gelo e em seguida transferidas para as cubetas para a leitura da absorbância, aplicou-se os resultados na curva padrão (figura 28) em anexo. (Anexo 1)

### **3.5.3 Extração de taninos condensados ligados à proteína (PBCT)**

Para avaliar a quantidade de taninos condensados ligados a proteína presentes nas folhas de *H. Pectinata* foi seguindo a metodologia de Terril et al (1992). Utilizou-se o tubo de Falcon que ficou com o resíduo sólido do experimento anterior e adicionou-se 10mL de SDS/Mercaptoetanol, em seguida o tubo foi fechado e homogenizado em vortex. Em seguida levado para banho-maria por 1h e 15min à 100°C. Após a retirada do banho Maria, colocou-se imediatamente em banho de gelo para resfriar a amostra.

Os tubos de Falcon foram colocados para centrifugar por 15min (5000 rpm, 22°C). Após retirar da centrifuga a porção líquida foi retirada e colocada em balões de 25mL, deixando no tubo apenas os resíduos sólidos. Então foram adicionados 10mL de SDS/Mercaptoetanol, levados ao banho maria novamente por 1h e 15min e posteriormente centrifugados.

Na segunda repetição foi coletada a fração líquida e colocada em balão volumétrico de 25ml junto com a 1ª porção e aferiu-se com SDS/Mercaptoetanol passando em seguida em vortex. Retirou-se 0,75ml dessa solução e adicionou-se 3,5ml HCL-Butanol + amostra branca. Em seguida levou-se ao banho maria por 45 minutos.

Foi resfriado em banho de gelo e feita a leitura de absorbância utilizando os valores da curva de calibração.

#### **3.5.4 Extração de taninos condensados ligados a fibra (FBCT)**

Para avaliar a quantidade de taninos condensados ligados a fibra presentes nas folhas de *H. Pectinata* foi seguindo a metodologia de Terril et al (1992). Utilizando o extrato referente as folhas da espécie, o resíduo sólido do tubo de Falcon e foram adicionados 30ml de HCl – Butanol. Levou-se ao banho-maria por 45 minutos a 100°C, em seguida resfriou-se e centrifugou-se por 15 minutos. Após esse procedimento o líquido foi e realizada a leitura de absorbância.

### **3.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE UTILIZANDO QUELANTE DE COBRE**

Seguindo a metodologia de Sanchez-Vioque et al. (2012) e Saiga et al. (2003), foram utilizados 2 mL de Tampão Acetato de Na (pH 6,0, 50 Mm) e adicionados as amostras das três partes da plantas nas concentrações de 500 µL., juntamente com 50 µL de CuSO<sub>4</sub> (5Mm). Em seguida as amostras foram incubadas por 30 minutos. Após isso foi adicionado 50 µL de violeta de Pirocatecol (4mM), e novamente as amostras foram incubadas por 30 minutos. E depois foi realizada a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 632 nm.

### **3.7 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL**

Os experimentos foram realizados em triplicata, e as variáveis estudadas foram:

a temperatura, a concentração do extrato e o tempo. Os valores reais e respectivos valores codificados podem ser vistos na Tabela 3.

**Tabela 3:** Valores reais e respectivos valores codificados para as variáveis independentes.

Valores codificados	Temperatura (°C)	Concentração(mg/mL)	Tempo de reação (min)
-1	20	5,0	30
1	30	10	90

Foi montado um planejamento fatorial completo  $2^3$ . O número de experimentos foi duplicado por terem sido realizados em réplica, como mostra a Tabela 4.

Para o desenvolvimento do planejamento experimental, foi utilizado o programa computacional: Programa Statistica<sup>TM</sup>

**Tabela 4:** Valores codificados das variáveis independentes e número totais de ensaios do planejamento fatorial  $2^3$  com réplica.

Ensaio	Temperatura(°C)	Concentração (mg/mL)	Tempo (minutos)
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+
9	-	-	-
10	+	-	-
11	-	+	-
12	+	+	-
13	-	-	+
14	+	-	+
15	-	+	+
16	+	+	+

### 3.8. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE UTILIZANDO DPPH PARA MAIORES CONCENTRAÇÕES



O teste foi realizado seguindo o método descrito por Zhang e Li (2011). Aliquotas de uma solução estoque do extrato (1 mg/mL) foram adicionadas à solução de DPPH. em concentrações finais de extrato 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,5, 0,3 mg/mL, o procedimento foi realizado para as três partes da planta, como mostra a Figura 15.



**Figura 15:** Concentrações finais de extrato 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,5, 0,3 mg/mL das três partes da planta.

Como controle, metanol foi adicionado à solução de DPPH em volumes iguais aos usados para os extratos nas diferentes concentrações. A solução foi deixada entre os tempos de 0, 30, 60 e 90 minutos para as folhas, e para as partes caule e raiz a solução de extrato e DPPH foi deixada em repouso no escuro por 30 minutos para ser realizada a leitura posteriormente. A absorbância foi monitorizada a 517 nm (Figura 16).



**Figura 16:** Leitura de absorvância a 517 nm para as folhas da espécie.

### 3.9 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE UTILIZANDO O RADICAL DPPH PARA MENORES CONCENTRAÇÕES (FOLHAS)

O teste da atividade antioxidante foi realizado pelo modelo modificado de Soler-Rivas e colaboradores (2000). O efeito antioxidante do extrato bruto sobre o radical do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila, 3 mL), foi avaliado com auxílio de espectrofotômetro na faixa de absorvância de 515 nm. Alíquotas de uma solução estoque do extrato (1 mg/mL) foram adicionadas à solução de DPPH resultando em concentrações finais de 194,8 µg/mL, 324,7 µg/mL, 454,4 µg/mL e 584,4 µg/mL.. Como controle metanol foi adicionado à solução de DPPH em volumes iguais aqueles usados para os extratos nas diferentes concentrações. Essas soluções foram analisadas por uma hora, sendo verificada sua absorvância nos tempos 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos. Os dados foram expressos como percentagem de inibição (IP) do radical DPPH e os valores de CE<sub>50</sub>, concentração do extrato que consome 50% de radical livre, calculados a partir de curvas cinéticas.

O índice de atividade antioxidante (IAA) foi calculado de acordo com a Equação 3 proposta por Scherer e Godoy (2009), onde:

$$IAA = \text{Concentração final DPPH} / CE_{50} \quad (3)$$

A atividade antioxidante é considerada pobre quando  $IAA < 0,5$ , moderada quando IAA esta entre 0,5 e 1,0, forte quando AAI esta entre 1,0 e 2,0, e muito forte quando  $IAA > 2,0$ .

A atividade de eliminação dos radicais foi calculada a partir Equação 4 :

$$RSA (\%) = (A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{controle}} \times 100 \quad (4)$$

onde  $A_{\text{amostra}}$  foi a absorbância da amostra e o  $A_{\text{controle}}$  absorbância do controle.

### 3.9.1 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e as médias e desvios padrões foram calculados. Os dados foram analisados através de Análise de Variância (ANOVA) para determinar a significância das médias das diferentes amostras. Os programas utilizados foram GraphPad, Prisma 5 e GraphPad InStat 3.0.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO

Após maceração exaustiva, foram obtidos os extratos brutos para as partes da planta analisadas na forma de uma massa mucilaginosa (Tabela 5)

**Tabela 5.** Rendimento dos extratos do caule, folha e raiz de *Hyptis pectinata*.

Parte da planta	Massa obtida para o extrato bruto seco da planta (g)
Caule	0,174
Folha	0,086
Raiz	0,056

### 4.2 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

Este teste é de grande importância, pois, permite o reconhecimento preliminar do comportamento químico dos extratos, facilitando a escolha do material a ser utilizado, possibilitando ao pesquisador adaptar técnicas de fracionamento de extratos, isolamento e caracterização de substâncias puras, de acordo com o isolamento e purificação dos constituintes mais interessantes (MATOS, 1997).

O extrato da porção folhas adquiriu tom esverdeado indicando a presença de taninos flavobênicos, enquanto que o do caule e raiz adquiriram tom amarelado indicando a presença de flavonoides como: flavonas, e xantonas. A análise fitoquímica indicou a presença de grupos de metabólitos secundários relevantes (Tabela 6).

**Tabela 6.** Resultado da prospecção fitoquímica dos extratos do *H. pectinata*.

Constituintes Químicos	Extratos		
	RAIZ	CAULE	FOLHA
Fenóis	-	-	-
Taninos	+	+	+
Flavonas	-	+	+
Flavonóis	-	+	+
Xantonas	-	+	+
Flavanonóis	-	-	-
Catequinas	-	+	+
Flavanonas	-	-	-

Fonte: MATOS (1997)

Os resultados demonstram que as três partes da espécie analisada apresentaram uma variedade de compostos secundários.

Observou-se a presença de alguns compostos fenólicos na espécie. Flavonas, Flavonóis, Xantonas e Flavanonóis estiveram presentes no caule e folhas. Entretanto não foram identificados Fenóis e flavononas na *Hyptis Pectinata*.

Considerando que substâncias como os compostos fenólicos podem ser responsáveis pelo efeito de proteção contra os riscos de muitos processos patológicos e exercem atividade antioxidante, os resultados obtidos estimulam a continuidade dos estudos para avaliar a ação antioxidante de substâncias isoladas da espécie estudada neste trabalho.

Estudos com outras espécies como a *Lippia sidoides* relataram a presença de flavonoides, quinonas, triterpenos, lignanas, esteroides livres e glicosilados e ácidos orgânicos, a referida espécie tem uso comprovado na medicina popular, principalmente como antisséptico e antimicrobiano. As folhas e flores constituem a parte medicinal desta planta. Seu óleo essencial possui elevado valor comercial, tendo o timol e o carvacrol como constituintes principais, os quais apresentam propriedades antisséptica, antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, anti-inflamatória e larvívica (PASCUAL, et al 2001; COSTA, et al 2002).

#### 4.2.1 Teste para fenóis e taninos

Os extratos apresentaram mudança de cor nas soluções referente às folhas, variando para verde indicando a presença de taninos flavobênicos (taninos condensados ou catéquicos). Para Fenóis o teste não apresentou resultados positivos, assim indicando sua ausência.

Devido a presença de taninos e vários outros compostos fenólicos, as espécies de *Hyptis* são comumente utilizadas no tratamento de infecções gastrointestinais, como analgésicos e antifúngicos (OLIVEIRA et al., 2004; SILVA, 2008). Estudos avaliaram a atividade farmacológica do extrato aquoso das folhas de *Hyptis suaveolens* (SANTOS et al., 2007), indicando efeitos analgésicos, antiedematogênicos e reduzida toxicidade aguda em animais de laboratório. Os resultados obtidos, Tabela 6, mostram a possibilidade da espécie *Hyptis pectinata* apresentar as mesmas atividades farmacológicas pois pertence ao mesmo gênero e possui os mesmos constituintes responsáveis pelas atividades registradas.

Segundo Monteiro et al, (2006) as espécies *Myracrodruon urundeuva* e *Anadenanthera colubrina*, mostraram ter grande potencialidade para a indústria farmacêutica, pois flavonóides, como os taninos, isolados das cascas de *M. urundeuva* mostraram eficiente efeito analgésico e cicatrizante, dessa forma indicando que a espécie estudada *Hyptis Pectinata* pode apresentar esses efeitos.

#### 4.2.2 Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides

As diferentes classes de compostos foram determinadas de acordo com a Tabela 1 proposta por Matos (1997).

A partir da determinação dos compostos pode-se considerar que os extratos das folhas, caule de raiz de *Hyptis pectinata* contêm flavonas, flavonóides e xantonas, pois o extrato adquiriu cor amarelada.

Produtos que contenham em seus constituintes, flavonóides e flavonas, apresentam atividades antioxidantes, antiinflamatória, antibacteriana e tanante que tem um grande potencial de exploração na área cosmética (PERRUCHON, 2002). Sendo

assim a presença de flavonóides na *Hyptis pectinata* pode indicar atividade antioxidante, antiinflamatória e antibacteriana.

A espécie *Psidium guajava* que tem efeito espasmolítico no tratamento de diarreia (LOZOYA et al, 2002), e esse está associado aos flavonóides (MORALES et al, 1994). Os compostos fenólicos como flavonas, flavonoides e xantonas presentes em suas folhas estão associados a sua potente atividade antioxidante como também ao efeito anticoagulante prevenindo doenças cardiovasculares, além disso atua na inibição da proteína tirosina fosfatase prevenindo a hiperglicemia (LOZOYA et al, 2002), podendo assim a espécie *Hyptis pectinata* também apresentar efeito espasmolítico, além de preventivo contra a hiperglicemia.

#### **4.2.3 Teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavononas**

O teste foi positivo para as catequinas, de acordo com a Tabela 2 descrita na metodologia de Matos (1997), pois o extrato apresentou cor pardo-amarela.

Os flavonoides e as catequinas, assim como no presente trabalho, também são os principais componentes químicos da *Camellia sinensis*, planta popularmente conhecida como chá-verde, sendo potentes oxidantes, sequestrantes de radicais livres, quelantes de metais e inibidores de peroxidação (SCHMITZ, et. al. 2005), isso indica que *Hyptis pectinata* também pode apresentar um bom potencial antioxidante.

#### **4.2.4 Teste para triterpenóides liebermann-buchard**

Os testes indicaram a ausência de triterpenóides nos extratos das partes da planta. O resultado era esperando, as espécies do gênero *Hyptis* apresentam em sua maior composição monoterpenos, assim como foi avaliado na espécie *Hyptis pectinata*.

#### 4.2.5 Teste para saponinas

Os testes indicaram a ausência de saponinas nas partes avaliadas da planta. Este fato não diminui o poder antioxidante da espécie estudada, já que Bruneton (1991) associa as saponinas como responsáveis apenas pela atividade hemolítica, que faz parte do sistema de proteção do vegetal contra ataques de predadores (insetos, vírus, fungos e bactérias).

#### 4.2.6 Teste para alcalóides

Após a realização deste teste foi possível a observação de um precipitado sólido branco, característico, indicando a presença de alcaloides. O teste foi positivo para as três partes da planta.

A espécie *Hyptis canun* pertencente ao mesmo gênero da espécie *Hyptis pectinata*, apresenta como propriedade medicinal a ação antifúngica, antiulcerativa, analgésica, anticancerígena, antimicrobiana (FERRI; FERREIRA, 1992). Todas as propriedades medicinais referidas devem-se à presença de substâncias químicas que têm como principais grupos de metabólitos secundários os alcalóides e flavanóides (STASI et al., 1996). Sendo os alcaloides, metabólitos secundário presentes também na espécie *Hyptis pectinata*, atribui a possibilidade de apresentar as mesmas atividades medicinais da espécie *Hyptis canun*.

Extratos de *Sarcococa saligna*, planta rica em alcaloides que apresentam propriedades analgésicas e alucinógenas, tem larga aplicação médica (GILANI et al., 2005), assim indicando que são propriedades que podem ser encontradas na espécie *Hyptis pectinata*.

#### 4.2.7 Teste para antroquinona, cumarina e antrona

Foram observadas mudanças na coloração das folhas, variando para vermelho



indicando a presença de antroquinona. Já o extrato do caule apresentou variação para a cor verde e azul indicando assim a presença de cumarina. Já a solução referente a raiz, apresentou mudança para a cor amarela indicando a presença de antrona, como referido na metodologia de Matos (1997)

A atividade antiulcerogênica de um vegetal pode ser atribuída a presença de cumarinas em sua composição, como é o caso do alecrim, pertencente a família Lamiaceae a qual pertence também *H. pectinata* (BIGHETTI, *et al.* 2005), podendo *Hyptis pectinata* apresentar atividade antiulcerogênica.

### 4.3 QUANTIFICAÇÃO DE TANINOS CONDENSADOS

#### 4.3.1 Padrões de purificação para análise de taninos condensados (TC)

Para a comparação dos métodos de quantificação de taninos condensados (proantocianidina), foram utilizados o método do HCl-butanol (Terrill *et al.*, 1992). As curvas padrão da espécie estudada foi comparada com a curva de calibração obtida com o extrato das folhas.

É importante a obtenção de curva de calibração específica para cada amostra utilizada, em função da especificidade dos tipos de taninos condensados presentes na espécie.

Os valores médios absolutos encontrados na Tabela 7 foram estimados através das curvas padrão em anexo (Anexo 1) (Figura 29).

**Tabela 7** : Valores médios entre 5 repetições para taninos condensados através da metodologia do HCl-Butanol, para folhas de *Hyptis Pectinata*.

TESTE REALIZADO	CONCENTRAÇÃO DE TANINOS DETERMINADOS (g/kg)	DP <sup>1</sup>
ECT*	10,04	1,5
PBCT*	100,94	8,7
FBCT*	30,22	1,7

<sup>1</sup> DESVIO PADRÃO

ECT – Taninos condensados solúveis;

PBCT – Taninos condensados ligado à proteína;

FBCT – Taninos condensados ligado à fibra.

Diante disso, observa-se na Tabela 7 que as concentrações médias encontradas para todas as frações foram maiores para os taninos condensados ligados a proteína. Segundo Huang et al. (2011) e Naumann et al. (2014), onde, os taninos condensados com maior peso molecular exibem maior eficiência de ligação com proteínas e carboidratos do que os taninos com peso molecular menor.

Relacionando os resultados obtidos para a espécie *Hyptis Pectinata* com as principais plantas taníferas, pode-se observar que a concentração de taninos ligados a proteína presentes de acordo com a Tabela 8 adaptada por Raiane (2015) na espécie *Hyptis Pectinata* são satisfatórios, apresentando valores relevantes. A concentração de taninos ligados a proteína se mostrou menor apenas para a Jurema preta.

**Tabela 8:** Fração de taninos em g/Kg de leguminosas nativas através da metodologia do HCl-butanol, conforme locais de coleta.

Frações	Estados			EPM <sup>1</sup>
	Arcoverde/PE	Delmiro Gouveia/AL	Patos/PB	
Jurema Preta/Folhas com hastes				
ECT	124,80	159,04	118,88	25,16
PBCT	28,20	30,70	15,00	8,43
FBCT	10,24	4,77	4,41	2,89
Jurema Preta/Casca				
ECT	393,28	304,80	284,06	50,07
PBCT	143,14	96,54	104,26	24,98
FBCT	13,99	17,81	12,10	3,63
Angico vermelho/Folhas com hastes				
ECT	19,86	33,12	44,30	11,05
PBCT	10,36	9,96	18,74	4,83
FBCT	5,85	3,88	11,77	3,73
Angico vermelho/Casca				
ECT	146,60	138,38	154,28	17,55
PBCT	8,64	16,64	19,42	5,76
FBCT	2,21c	11,78	6,20	4,44

<sup>1</sup>Erro Padrão Médio

ECT – Taninos condensados solúveis;

PBCT – Taninos condensados ligado à proteína;

FBCT – Taninos condensados ligado à fibra.

Através da análise da Tabela 8, pode-se concluir que a porcentagem de taninos ligados a proteína da espécie *Hyptis Pectinata* apresentou valor maior que três das quatro espécies citadas na tabela. Os autores responsáveis pelos dados contidos na Tabela 8 vêm estudando a metodologia dos fenóis precipitáveis por proteína na tentativa de alcançar um melhor entendimento sobre a variação no comportamento das ligações dos taninos condensados principalmente com proteínas.

Na qual seria importante para conhecer a relação dose-resposta de taninos condensados com os diversos efeitos sobre a metanogênese, atividade anti-helmíntica e no aumento da disponibilidade de proteína bruta da forragem e proteína metabolizável para o animal (NAUMANN et al., 2014).

As folhas de *M. urundeuva* e cascas de *A. colubrina* no período chuvoso apresentam maiores teores destes compostos (MONTEIRO et. al, 2006) assim como encontrado em *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e *S. polyphyllum* Mart. as

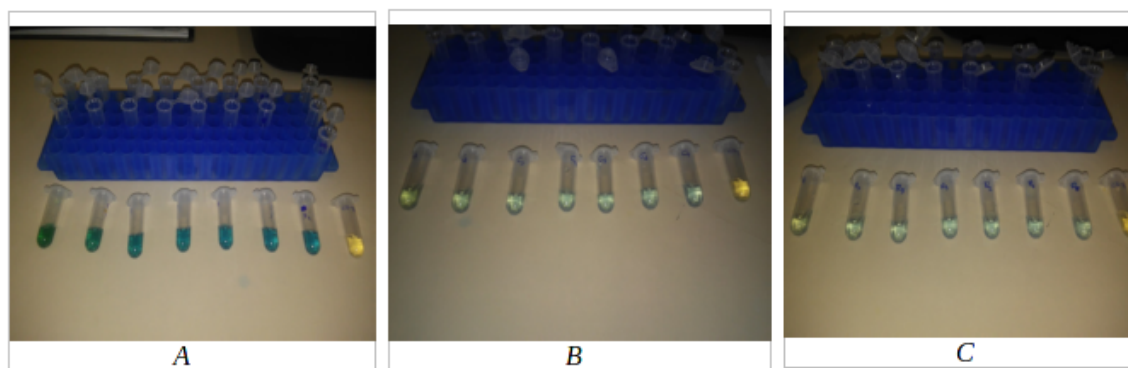
quais têm maiores produções de fenóis totais e taninos nesta mesma época (JACOBSON et al, 2005). Esta grande quantidade de compostos fenólicos na cascas de *M. urundeuva* garantem uma maior resistência a degradação químico-biológica (QUEIROZ, 2002).

A presença de taninos em *Phyllanthus amarus* Schumach e Thonnfoi relacionada com o efeito antioxidante da espécie que atua na inibição de lesões gástricas e ação antiinflamatória (RAPHAEL e KUTTAN, 2003). Outros exemplos da função dos taninos foram registrados por estudos realizados com as cascas de *Rhizophora mangle* L. para úlceras gástricas (BERENGUER et al, 2006) e ferimentos (FERNANDEZ et al, 2002). Segundo Hiruma-Lima et al (2006) os taninos presentes nas cascas de *Qualea grandiflora* Mart são responsáveis por estimular a secreção do muco estomacal que é importante para a proteção gástrica. Para Vasconcelos et al (2008) a presença de taninos e flavonóides em *Mouriri pusa* Gardner aumenta a regeneração da mucosa gástrica.

O barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) é uma planta medicinal do bioma Cerrado bastante utilizada pela população devido as suas propriedades medicinais e taníferas. As atividades farmacológicas do barbatimão no processo cicatricial estão diretamente ligadas aos altos teores de taninos condensados (TEIXEIRA, SORES, SCOLFORO, 2015).

#### 4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE A PARTIR DA QUELANTE DE COBRE

A capacidade de quelação dos íons cobre não apresentou resultados significativos, pois observa-se que não ocorreu a mudança de coloração com a adição do cobre (Figura 17). Tal fato mostra que no extrato etanólico das folhas, caule e raiz não reagiram por ação de inibidores por quelação de cobre. Por isso, os testes de quelação dos íons cobre são insignificantes a capacidade de inibir os radicais livres nos testes *in vitro*.



**Figura 17:** Reação entre as extratos alcoólicos das partes de *Hyptis Pectinata*, A – folhas, B – caule, C – raiz com o quelante de cobre.

Por se tratar de um extrato bruto etanólico, existem inúmeras substâncias que podem ser responsáveis pela capacidade antioxidante; por isso, os resultados descritos neste trabalho estimulam a continuidade dos estudos dos compostos presentes no extrato etanólico com a intenção de isolar e identificar as substâncias responsáveis pela ação antioxidante e inibidora.

#### 4.5 PLANEJAMENTO FATORIAL $2^3$ PARA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O planejamento foi utilizado para a avaliação da atividade antioxidante referente as folhas, que segue a metodologia de Zang e Li (2011). O resultado dos ensaios para o planejamento experimental  $2^3$  podem ser observados na Tabela 9. Os ensaios foram feitos em duplicata e os experimentos 9 a 16 são as repetições dos experimentos 1 a 8.

**Tabela 9:** Resultado dos ensaios obtidos para o planejamento experimental 2<sup>3</sup>

Ensaio	Temperatura(°C)	Concentração(mg/mL)	Tempo (minutos)	Leitura de Absorbância ( 517 nm)
1	20	5,0	30	0,211
2	30	5,0	30	0,195
3	20	10,0	30	0,549
4	30	10,0	30	0,558
5	20	5,0	90	0,262
6	30	5,0	90	0,246
7	20	10,0	90	0,575
8	30	10,0	90	0,541
9	20	5,0	30	0,212
10	30	5,0	30	0,212
11	20	10,0	30	0,558
12	30	10,0	30	0,637
13	20	5,0	90	0,245
14	30	5,0	90	0,245
15	20	10,0	90	0,541
16	30	10,0	90	0,606

Os dados da tabela 10 apresentam as variáveis independentes que tem maior significância estatística e obedece, basicamente, o método do valor P para um fator. Para valores de  $P < 0,01$  estes fatores terão elevada significância estatística. Para valores de P no intervalo entre 0,01 e 0,05, inclusive, os fatores serão estatisticamente significantes.

Observa-se pela Tabela 9 que dentre as variáveis estudadas, a variável concentração foi a única que apresentou significancia estatística. As demais variáveis e as interações entre as variáveis apresentaram-se estatisticamente não significantes.

**Tabela 10:** Fatores de significância estatística no planejamento fatorial de 2<sup>3</sup>.

Fatores	Fator P
Temperatura (°C)	0,455072
Concentração (mg/mL)	0,000000
Tempo (min)	0,277977
Temperatura x Concentração	0,210168
Temperatura x Tempo	0,620940
Concentração x Tempo	0,0987448
Temperatura x Concentração x Tempo	0,620940

A tabela 11 apresenta valores da estimativa dos efeitos para todos os fatores,

com exceção do valor da média (constante), o ajuste do fator de um nível baixo para um alto (-1 para +1) provoca um efeito que pode ser positivo ou negativo e de intensidade igual ao valor dos efeitos estimados.

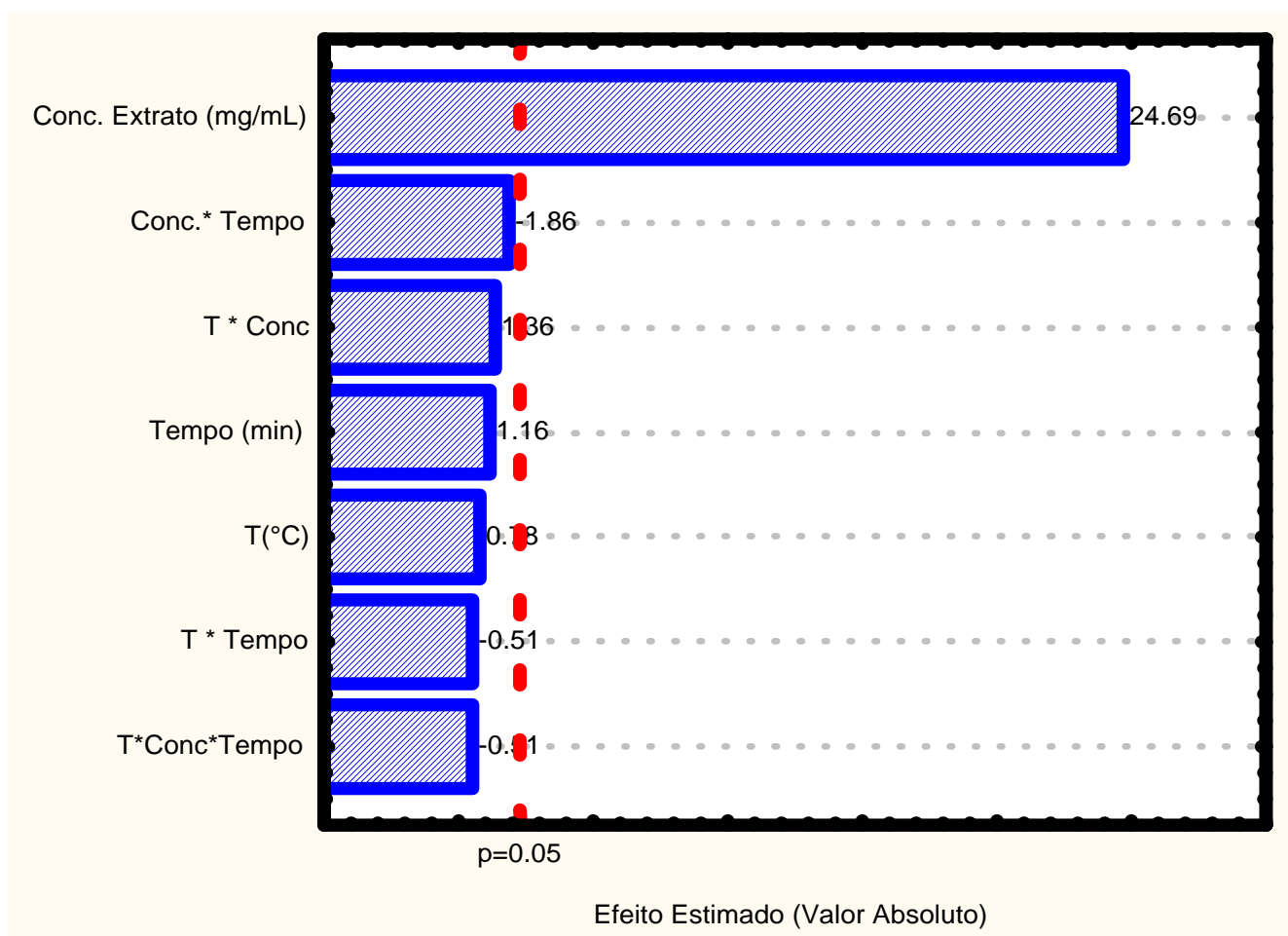
Nota-se que a variável Concentração, que é a de maior significância estatística, é também a que possui maior efeito para um ajuste, sendo o mesmo um ajuste positivo.

**Tabela 11:** Valores dos efeitos principais e interações calculados para o planejamento

<b>Variáveis Independentes</b>	<b>Efeitos Estimados</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Limite de Confiança -95%</b>	<b>Limite de confiança de 95%</b>
Média (constante)	0,399563	0,006927	0,383589	0,415536
Temperatura °C	0,010875	0,013854	-0,021071	0,042821
Concentração (mg/mL)	0,342125	0,013854	0,310179	0,374071
Tempo (min)	0,016125	0,013854	-0,015821	0,048071
Temperatura x concentração	0,018875	0,013854	-0,013071	0,050821
Temperatura x Tempo	0,007125	0,013854	-0,039071	0,024821
Concentração x Tempo	0,025875	0,013854	-0,057821	0,006071
Temperatura x concentração x tempo	0,007125	0,013854	-0,039071	0,024821

Nota: Os efeitos estimados são os resultados da média aritmética entre as colunas referentes aos Limites de confiança  $\pm 95\%$ .

A Figura 18 apresenta uma carta de Pareto para os efeitos de todas as variáveis estudadas e suas interações. No eixo Y têm-se as variáveis independentes ou as interações entre variáveis. No eixo X têm-se o valor absoluto do Efeito Estimado, calculado pela razão entre os efeitos estimados e seus respectivos desvios padrões, valores estes obtidos da Tabela 9. Todos os valores que aparecem na carta de Pareto que se situem à direita do valor P de 0,05 são de elevada significância estatística ou estatisticamente significantes. Estes valores concordam com os dados da Tabela 10.



**Figura 18:** Gráfico de Pareto dos valores dos efeitos de todas as variáveis estudadas.

Dessa forma observa-se a partir da Carta de Pareto que a concentração foi a variável que apresentou efeito significativo. As variáveis tempo e temperatura e a interação entre as variáveis não apresentaram significância estatística.

O efeito da variável concentração foi positivo, e mesmo em baixas concentrações apresentou resultado satisfatório.

Tendo em vista a importância da variável concentração e com o intuito de verificar a menor concentração que apresentasse capacidade de sequestro do radical, realizado um estudo da atividade antioxidante com diversas concentrações ao longo do tempo.

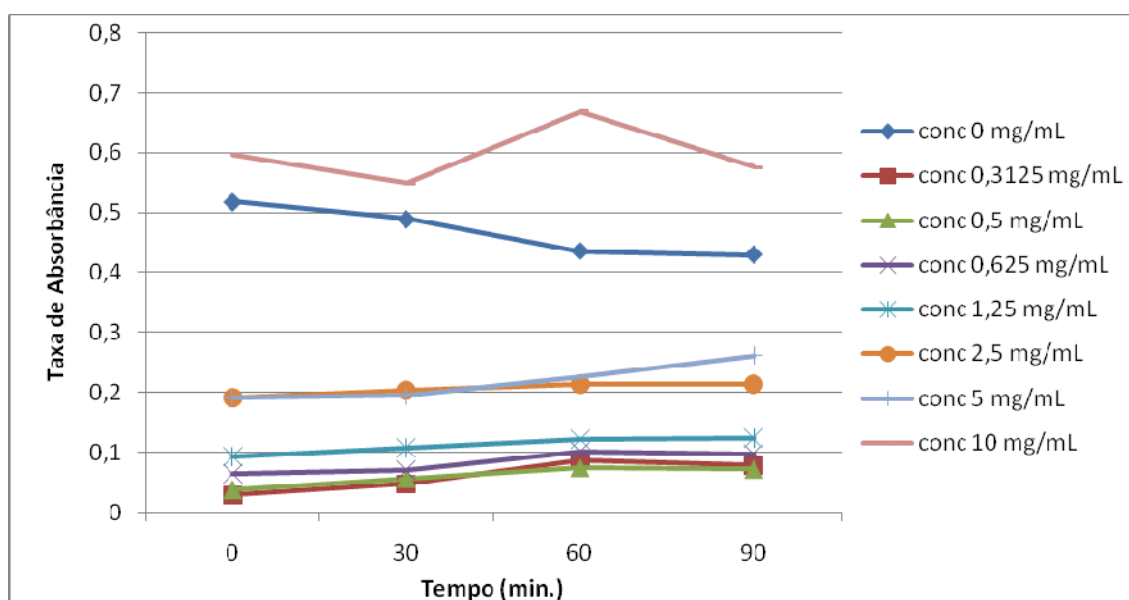


## 4.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE UTILIZANDO DPPH PARA MAIORES CONCENTRAÇÕES

### 4.6.1 Folhas

A avaliação da atividade antioxidante seguiu a metodologia de Zhang e Li (2011). A partir das análises estatísticas anteriores observou-se que entre as concentrações analisadas, as maiores concentrações mostraram efeito antioxidante favorável, diminuindo de forma considerável a concentração de radicais livres. Entretanto o aumento da concentração de extrato interferiu a leitura da absorbância, devido a maior concentração de clorofila presente no vegetal, assim dificultando na sua avaliação. Desse modo, as concentrações de extrato estudadas foram inferiores a 10 mg/mL.

Na Figura 19 está apresentado o comportamento do extrato em diferentes concentrações relacionada a atividade antioxidante em função do tempo.



**Figura 19:** Comportamento cinético das amostras folhas de *Hyptis pectinata* a partir da concentração, determinado espectrofotometricamente a 515 nm pela reação com solução metanólica de DPPH.

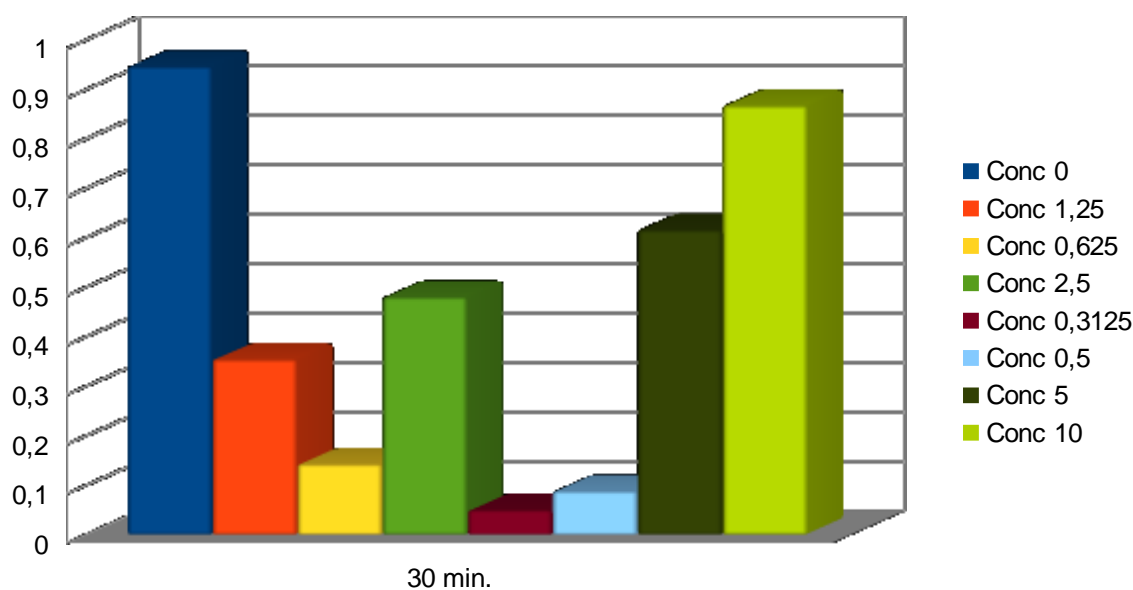
De acordo com a análise da Figura 19, pode-se observar que menores concentrações ainda apresentaram um considerável potencial de inibição de radicais livres, que foi crescente com a decorrência do tempo.

A avaliação dos constituintes químicos da espécie *Hyptis platanifolia* sugerem a presença de flavonoides e de atividade antioxidante favorável. Esses resultados podem estar relacionados à presença significativa de terpenos e flavonoides nos extratos de folhas de *H. platanifolia* (DAISY e CARLA; 2012), assim como a atividade antioxidante da espécie *Hyptis pectinata* também pode está associado aos compostos secundários presentes em sua composição, já avaliados neste trabalho.

Estes resultados são compatíveis com a química do gênero *Hyptis* visto que, segundo uma revisão sobre o gênero *Hyptis* realizada por Falcão e Menezes (2003), as substâncias de origem biossintética mista, como os flavonóides, estão presentes nas plantas desse gênero, mesmo que em menor ocorrência.

#### 4.6.2 Caule

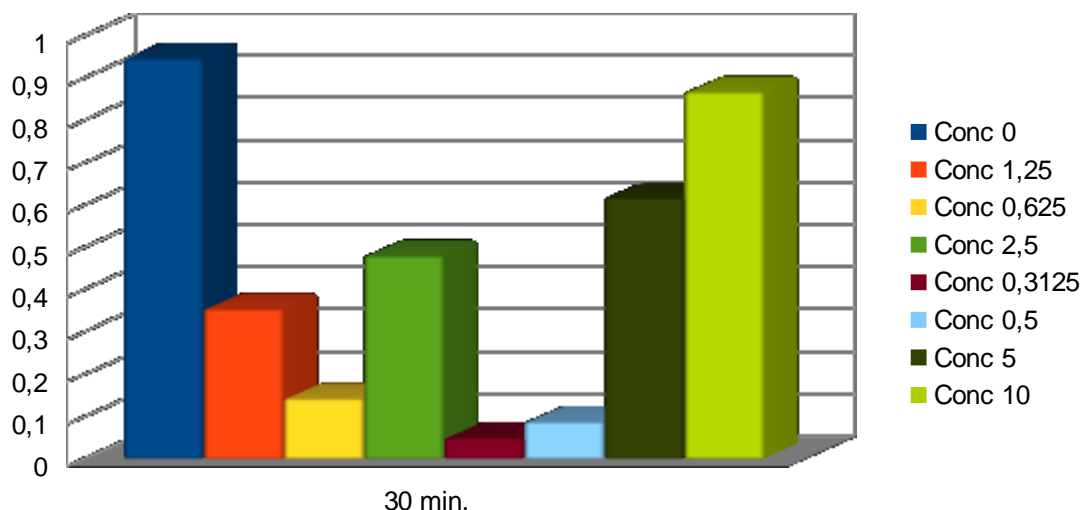
Os testes para o caule da espécie *Hyptis pectinata* foram realizados 30 minutos após o início da reação entre a solução alcoólica do extrato do caule e o DPPH. Foi possível observar que até as menores concentrações de extrato apresentaram atividade antioxidante favorável, já os resultados para as concentrações maiores, apesar de apresentar resultado positivo, sofreram interferência da concentração de clorofila presente no extrato, como mostra a Figura 20.



**Figura 20:** Avaliação da atividade antioxidante das amostras do extrato do caule de *Hyptis pectinata* em diferentes, determinado espectrofotometricamente a 515 nm pela reação com solução metanólica de DPPH.

#### 4.6.3 Raiz

Os testes para raiz da espécie *Hyptis pectinata* foram realizados 30 minutos após o início da reação entre a solução alcoólica do extrato e o DPPH. Foi possível observar que as menores concentrações apresentaram atividade antioxidante favorável, já as concentrações maiores, assim como as folhas e caule, também sofreram interferência da concentração de clorofila presente no extrato, como mostra a Figura 21.



**Figura 21:** Avaliação da atividade antioxidante das amostras do extrato do caule de *Hyptis pectinata* em diferentes, determinado espectrofotometricamente a 515 nm pela reação com solução metanólica de DPPH.

Entre as análises das três partes da espécie, as folhas apresentaram melhor atividade antioxidante, justificando o motivo pelo qual é a parte mais utilizada em tratamentos fitoterápicos.

Geralmente esta atividade tem sido correlacionada com a presença de flavonóides, classe esta presente nas folhas e caule das amostras analisadas (Tabela 6).

Rajani e Ashok (2009) em estudo semelhante para caule e raiz de *B.variegata* também evidenciaram atividade antioxidante pelo mesmo método de DPPH e comparação com outros. Alguns estudos in vitro demonstram que a atividade antioxidante dos flavonóides é maior que a das vitaminas E e C (NEVES, ALECAR, CARPES, 2008).

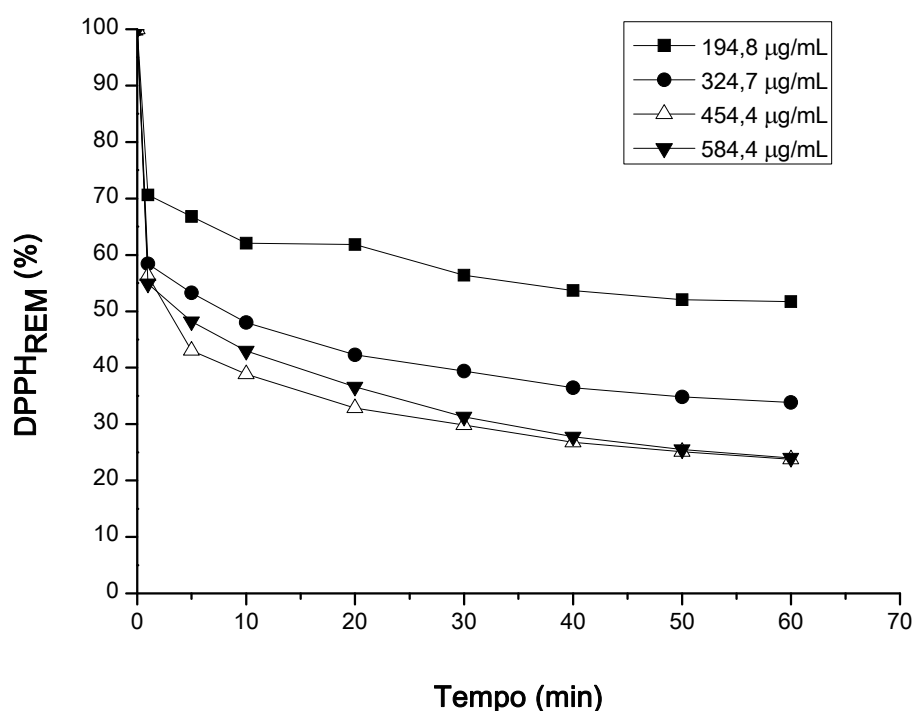
#### 4.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE UTILIZANDO DPPH PARA MENORES CONCENTRAÇÕES

A avaliação da atividade antioxidante para as folhas seguiu a metodologia de Soler-Rivas e colaboradores (2000). Para esse teste a fração folhas de *Hyptis pectinata*

foram utilizados pelo fato de ser a folha a parte da planta mais utilizada pela população, este apresentou índice de atividade antioxidante (IAA) igual a 2,5, sendo considerado como muito forte, segundo a classificação proposta por Scherer & Godoy (2009).

O comportamento cinético da reação do DPPH com extrato e com o controle foi demonstrado através da curva de dose-resposta relativa ao decréscimo da porcentagem remanescente de DPPH (% DPPHREM) em função do tempo (min) (Figura 22).

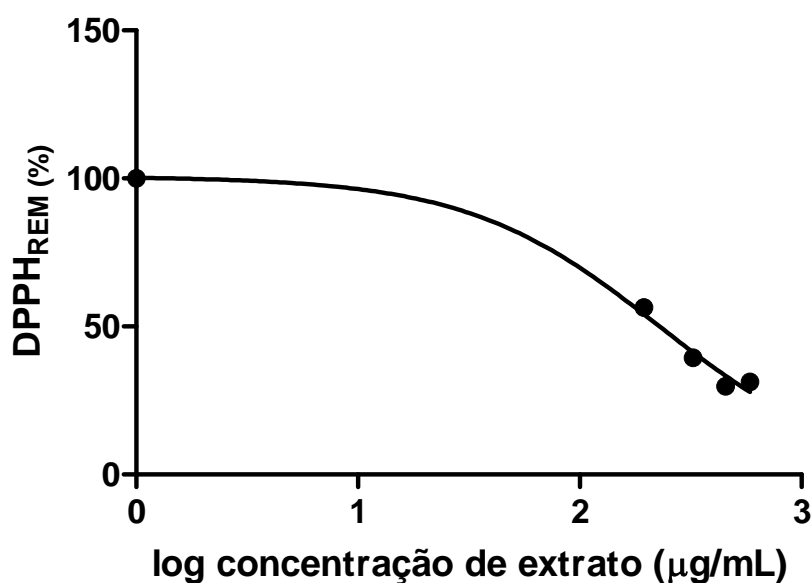
As quantidades do extrato testada de *Hyptis pectinata* necessária para fazer com que a concentração inicial do DPPH decresça em 50% (EC<sub>50</sub>) foram 194,8 µg/mL, 324,7 µg/mL, 454,4 µg/mL e 584,4 µg/mL.



**Figura 22:** Comportamento cinético das amostras de *Hyptis pectinata* determinado espectrofotometricamente a 515 nm pela reação com solução metanólica de DPPH.

Observou-se que a amostra apresentou cinética rápida, atingindo praticamente o máximo de consumo do DPPH no primeiro minuto, com uma porcentagem de DPPH remanescente em torno de 24%, indicando atividade antioxidante acima de 70%. Esta atividade é considerada satisfatória, já que em comparação com os índices de DPPH remanescente da espécie *Lillium longiflorum* foram de apenas 8,8% para a raiz,

enquanto caule e folha apresentam valores de 53 e 58,4% (VEDANA, 2008). Vale ressaltar que a concentração EC<sub>50</sub> apresentou alta atividade nas menores concentrações sendo EC<sub>50</sub>  $\pm$  1,5 mg/mL. Este valor é calculado através da representação gráfica da inibição percentual do radical DPPH• em função da concentração do antioxidante como mostra a Figura 23 (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).



**Figura 23:** Gráfico para determinação do valor de EC<sub>50</sub>  $\pm$  1,5 mg/mL

#### 4.7.1 Modelagem Cinética

A cinética da capacidade de sequestro do radical DPPH no extrato etanólico das folhas, caule e raiz da espécie *Hyptis pectinata* (L.) Poit foi avaliado a partir de seu possível potencial de atividade antioxidante através da metodologia do DPPH e de quelante de cobre. Para as concentrações de controle de 194,8 µg.mL<sup>-1</sup>; de 324,7 µg.mL<sup>-1</sup>; de 454,5 µg.mL<sup>-1</sup> e de 584,4 µg.mL<sup>-1</sup> de antioxidante, obtidos com os ciclos de extração a 30°C.

#### 4.7.2 Determinação dos tipos de cinéticas de reação

Com base na proposta de um mecanismo simplificado para a reação de extração da folha de *Hyptis pectinata*, em que se baseia na reação entre o DPPH\* e um antioxidante (AH), e sendo a reação monitorada a partir do consumo do DPPH<sub>REM</sub>. Levando-se em conta a hipótese da reatividade do DPPH com um antioxidante de forma efetiva, postulou-se a proposta de modelo fenomenológico baseado na constatação dos resultados experimentais em relação ao consumo do DPPH de forma direta com os AH formados (Equação 5).



E para fins de quantificação da evolução cinética dos diferentes componentes, a reversibilidade da reação foi desconsiderada ao final da mesma. E o balanço de massa foi expresso a partir da taxa de reação (r) de uma reação completa entre moles de DPPH\* e moles de antioxidante (AH), como uma função do tempo (t) segundo a Equação 6:

$$r = - \frac{\partial C_{\text{DPPH}^*}}{\partial t} = k C_{\text{DPPH}^*}^{\alpha} \times C_{\text{AH}}^{\beta} \quad (6)$$

Em que  $C_i$  é a concentração,  $k$  a constante de velocidade, e  $\alpha$  e  $\beta$  as ordens com respeito às formas reativas. E se esta reação foi reversível, poderá ser definida como se segue Equação 7:

$$r = - \frac{\partial C_{\text{DPPH}^*}}{\partial t} = k C_{\text{DPPH}^*}^{\alpha} \times C_{\text{AH}}^{\beta} - k_{-1} \pi_i C_{P_i}^{\rho} \quad (7)$$

K e K-1 são as constantes de velocidade para reação direta e reações reversa e o produto da matemática entre as concentrações da reação produtos  $P_i$  (ordens  $\rho$ ), Equação 8.

$$\pi_i C_{P_i}^{\rho} \quad (8)$$

As ordens são representativas da etapa mecanicista que limita a velocidade de toda a reação. A determinação da ordem  $\alpha$  em relação ao DPPH• foi possível a partir utilização do método de isolamento (ordem método degeneração). Na prática, este método foi utilizado partindo do princípio que o composto anti-radical em estudo representa uma cinética de comportamento lento. Inicialmente, se verificou que  $C_{AH}$  é mais do que 50 vezes a de  $C_{DPPH\bullet}$ , então a variação de concentração  $C_{AH}$ , praticamente permanece constante durante a reação.

Como o monitoramento foi realizado pelo consumo do DPPH, considerado como o reagente limitante do processo, tem-se a partir do avanço da reação que, logo a Equação 6, podem ser escrita como a Equação 9 e a Equação 10:

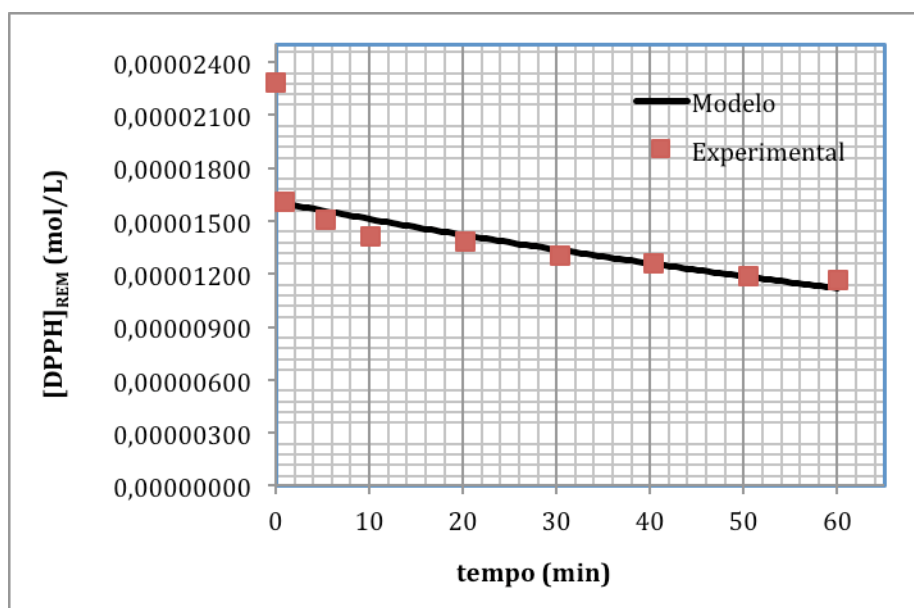
$$-\frac{dC_{DPPH\bullet}}{dt} = k' C_{DPPH\bullet}^{\alpha} C_{AH}^{\beta} \quad (9)$$

$$k' = k C_{AH}^{\beta} \quad (10)$$

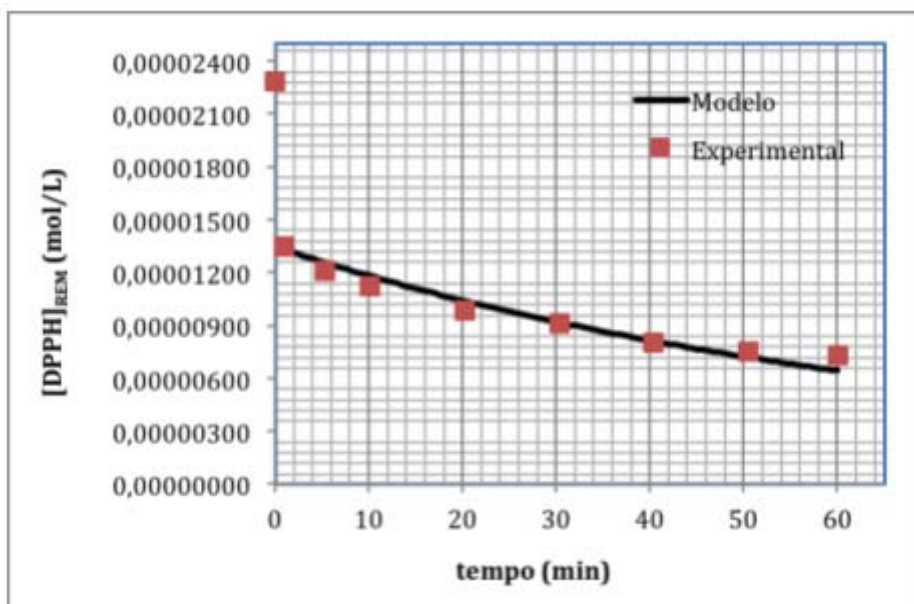
Considerando que  $k'$ ,  $\alpha$  e  $\beta$  são as respectivas constantes cinética envolvida na quantificação da extração de antioxidante, monitorada a partir do consumo do DPPH, a partir da aplicação aplicando a teoria da degeneração para o reagente (AH) em excesso. A equação diferencial foi resolvida numericamente por um método de integração numérica do tipo Runge Kutta de 4ª ordem, seguido da aplicação de um método de otimização Box (2006), procurando-se minimizar a função objetivo ( $f_0$ ), definida como a diferença quadrática, entre os valores experimentais e calculados das concentrações dos componentes da reação. Comparações entre os valores teóricos e experimentais para o consumo de DPPH, nas suas respectivas condições operacionais, que são mostradas nas Figuras 24, 25, 26 e 27, indicando bom ajuste do modelo proposto e quantificando-se desvios médios da ordem de  $10^{-2}$ .

Obtendo os seguintes valores para as constantes cinéticas de velocidade global e da ordem de reação para as quatro concentrações de extrato avaliadas:  $k' = 2,99 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ ;  $k' = 2,67 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ ;  $k' = 2,29 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ ;  $k'$  e  $\alpha = 1,2$  em relação ao consumo de DPPH nas respectivas concentrações:  $194,8 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $324,5 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $454,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; e  $584,4 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

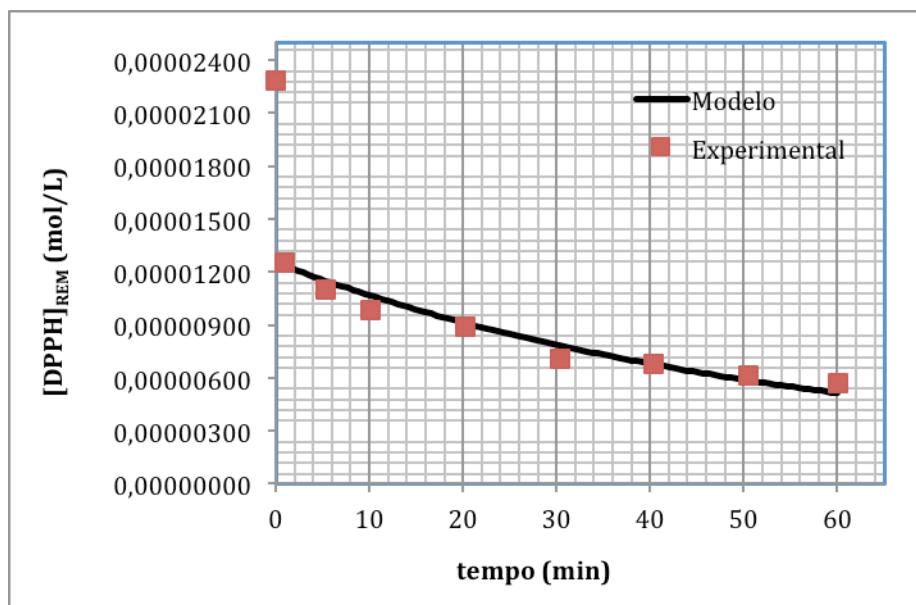




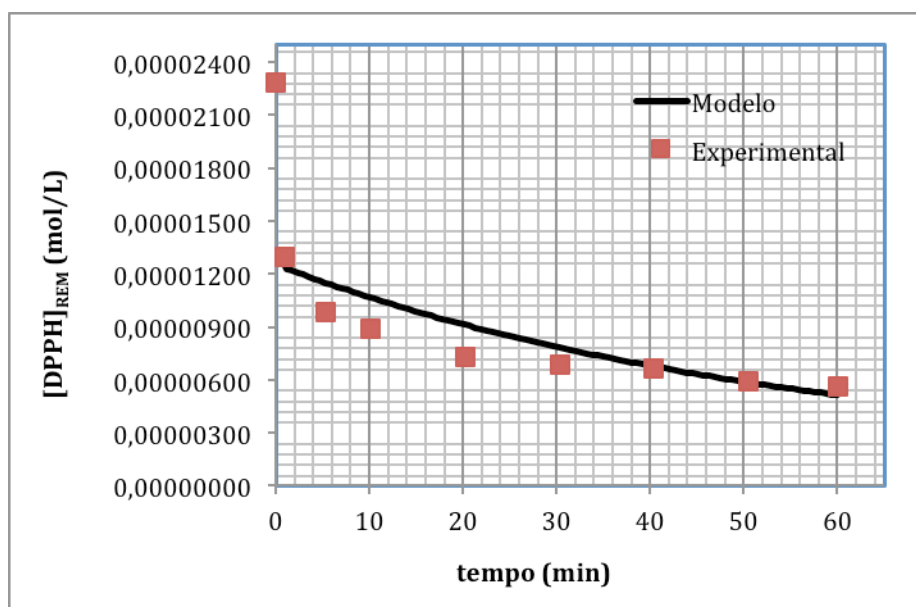
**Figura 24:** Comparação entre os valores das concentrações experimentais e calculadas a partir do modelo cinético proposto para o consumo de DPPH. Condições operacionais:  $[\text{Extrato}]_0 = 194,8 \mu\text{g g.mL}^{-1}$ ;  $T = 30^\circ\text{C}$ .



**Figura 25:** Comparação entre os valores das concentrações experimentais e calculadas a partir do modelo cinético proposto para o consumo de DPPH. Condições operacionais:  $[\text{Extrato}]_0 = 324,7 \mu\text{g g.mL}^{-1}$ ;  $T = 30^\circ\text{C}$ .



**Figura 26:** Comparação entre os valores das concentrações experimentais e calculadas a partir do modelo cinético proposto para o consumo de DPPH. Condições operacionais:  $[\text{Extrato}]_0 = 454,4 \mu\text{g g.mL}^{-1}$ ;  $T = 30^\circ\text{C}$ .



**Figura 27:** Comparação entre os valores das concentrações experimentais e calculadas a partir do modelo cinético proposto para o consumo de DPPH. Condições operacionais:  $[\text{Extrato}]_0 = 584,4 \mu\text{g g.mL}^{-1}$ ;  $T = 30^\circ\text{C}$ .

## 5. CONCLUSÃO

As principais conclusões obtidas foram:

- A partir da prospecção fitoquímica pode-se constatar a presença de importantes metabólicos secundários, responsáveis por atividades biológicas, assim possibilitando a existência de outras atividades biológicas, como a capacidade de sequestrar radicais livres.
- Pode-se observar a presença de taninos nas três partes da espécie, assim sendo possível a sua quantificação. A porcentagem de taninos complexados em proteínas (PBCT) encontrada nesse trabalho foi maior do que as porcentagens de outras espécies consideradas pela literatura como de elevado teor de taninos já estudadas.
- Na avaliação da atividade antioxidante utilizando DPPH observou-se na metodologia Hang, Li, Miao, e Jiang (2011) as maiores concentrações foram influenciadas pelo alto teor de clorofila presente no extrato, inviabilizando o resultado. No entanto as menores concentrações apresentaram atividade antioxidante considerável no tempo de 60 minutos.
- Na avaliação da atividade antioxidante para folhas utilizando DPPH na metodologia Soler-Rivas, et al (2000) observou-se um consumo de 70% do DPPH em um intervalo de 60 minutos, sendo que nos primeiros minutos de reação o extrato consumiu mais de 40% do radical livre, mostrando assim o seu poder de sequestro de radicais livres é potente e eficiente. Sendo mais favorável para as maiores concentrações. Neste caso a cinética se mostrou favorável, no primeiro minuto de reação o radical livre foi consumido em 30%.
- Um modelo matemático foi desenvolvido para representar a cinética da reação do consumo do DPPH com base no mecanismo simplificado, e considerando AH (compostos antioxidantes) em excesso. Os valores da constante de velocidade global e da ordem de reação foram obtidas para as quatro concentrações de extrato avaliadas

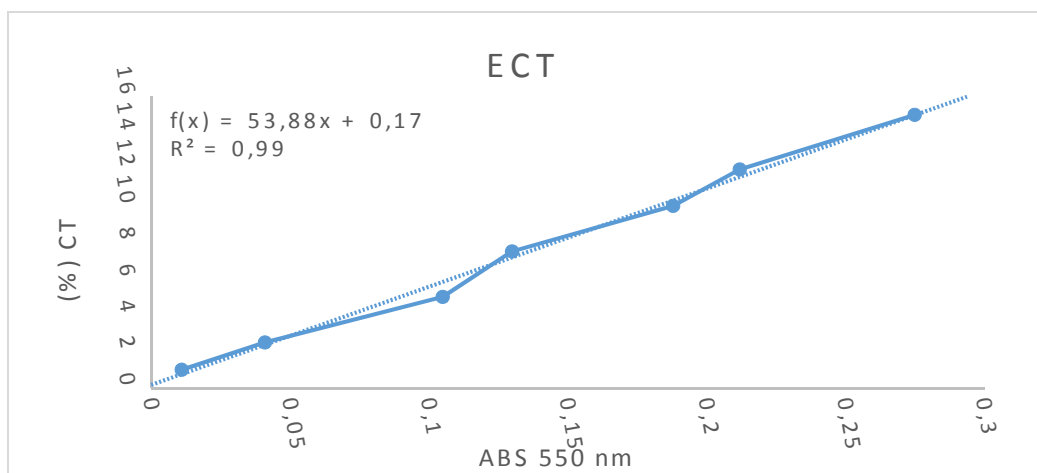
com os seguintes resultados encontrados:  $k' = 2,99 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ ;  $k' = 2,67 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ ;  $k' = 2,29 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ ;  $k'$  e  $\alpha = 1,2$  em relação ao consumo de DPPH nas respectivas concentrações:  $194,8 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $324,5 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $454,7 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; e  $584,4 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ . O modelo representou bem o comportamento cinético da reação com erros de aproximadamente 2,62%; 4,56%; 5,73% e 12,58% para as respectivas concentrações utilizadas.

### **Perspectivas futuras**

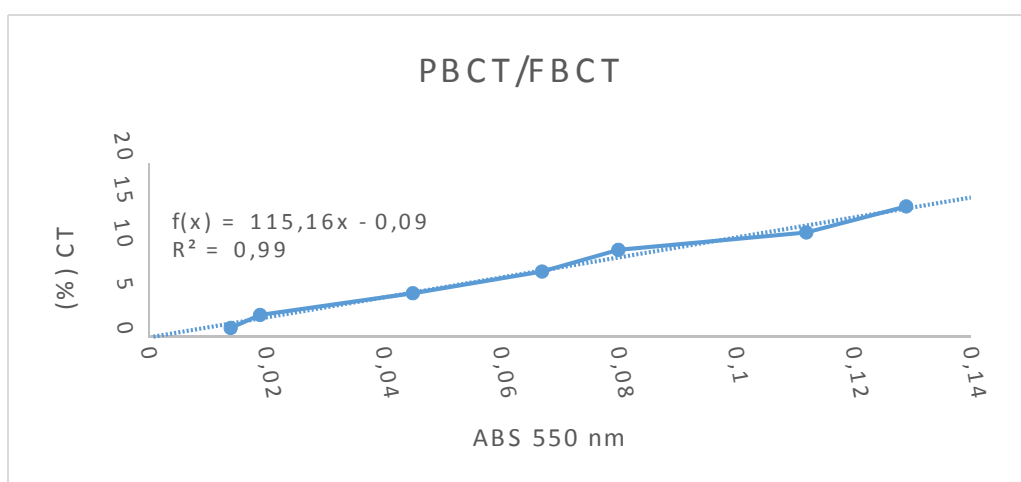
- A continuidade do estudo químico e biológico desta planta torna-se importante, uma vez que é uma das representantes de um gênero botânico com relevância etnofarmacológica e econômica. A continuidade do estudo das frações mais ativas de *H. pectinata*, em futuros trabalhos, poderá aumentar a perspectiva de isolamento de novos compostos antioxidantes.

## APÊNDICE

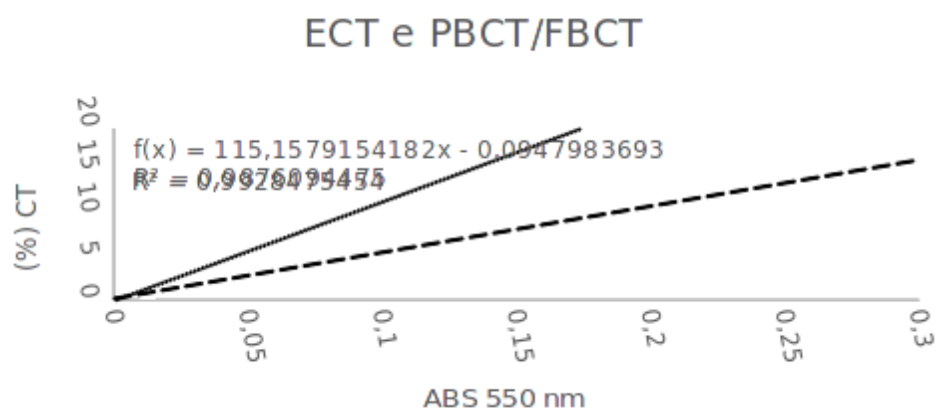
## ANEXO 1



**Figura 28:** Curva de calibração utilizadas para estimar a concentração da fração de taninos condensados solúveis (ECT) através do método do HCl-Butanol.



**Figura 29:** Curvas de calibração utilizadas para estimar a concentração das frações de taninos condensados ligados à proteína (PBCT) e fibra (FBCT) através do método HCl-Butanol nas folhas de *Hyptis Pectinata*



**Figura 30:** Curvas de calibração utilizadas para estimar a a concentração da fração de taninos condensados solúveis (ECT) e do tanino condensado ligado a fração proteica e fibrosa da planta (PBCT e FBCT) utilizando o método do HCl butanol

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFONSO, M. S.; SANT'ANA, L. S.; MANCINI-FILHO, J. Interação entre antioxidantes naturais e espécies reativas de oxigênio nas doenças cardiovasculares: perspectivas para a contribuição do alecrim (*Rosmarinus officinalis*L.). **Nutrire**, v.35, n. 1, p.129-148, 2010.
- AGOSTINI-COSTA, T. S.; LIMA, A.; LIMA, M. V.; **Quim. Nova**, 26, 763, 2003-  
AGUILAR, F.J. et al. Investigation on the hypoglycemic effects of extracts of four Mexican medicinal plants in normal and alloxan-diabetic mice. **Phytotherapy Research**, n. 16, p.383-386, 2002.
- ALMELA, L.; Sanchez-Munoz, B.; Fernandez-Lopez, J.A.; Roca, M.J.; Rabe, V. **Journal of Chromatography**, 1120, pp.221-229, 2006.
- ALMTORP, G. T.; HAZELL, A. C.; TORSSELL, K. B. G. A lignan and pyrone and other constituents from *Hyptis capitata*. **Phytochem.**, v. 30, p. 2753-2756, 1991.
- ALVES, R. R. N.; VIEIRA, W.L.S.; SANTANA, G. G.; VIEIRA, K.S.; MONTENEGRO, P. F. G. Herpetofauna Used in Traditional Folk Medicine: Conservation Implications. In: R. R. N. Alves, I. L. Rosa.. (Org.). Animals in Traditional Folk Medicine: Implications for Conservation. Animals in Traditional Folk Medicine: Implications for Conservation. **Berlin: Springer-Verlag**, p. 109-133, 2012.
- ANGELO, P.M. e JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Instituto Adolfo Lutz**. v.66, n.1, p. 1-9, 2007.
- ARRIGONI-BLANK M.F., SILVA-MANN R., CAMPOS D.A., SILVA P.A., ANTONIOLLI A.R., CAETANO L.C., SANT'ANA A.E.G e BLANK A.F. Morphological, agronomical and pharmacological characterization of *Hyptis pectinata* (L.) Poit germplasm. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** **15**, 298-303. 2005.
- ANDRADE, S.F.; CARDOSO, L.G.; BASTOS, J.K. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnoicacid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. **Journal of Ethnopharmacoly**, v.109, n. 3, p. 464-471, 2007.
- ANVISA. [portal.anvisa.gov.br/](http://portal.anvisa.gov.br/). Acessado: 29 de janeiro 2016
- AKKOL, E.K.; Goger,F.; Kosar,M; Baser,K.H.C. Phenolic composition and biological activities of *Salvia halophila* and *Salvia virgata* from Turkey. **Food Chemistry**, 108, pp.942-949, 2008.
- AYRES, M. P.; CLAUSEN, T. P.; MACLEAN, S. F.; REDMAN, A. M.; REICHARDT, P. B.; **Ecology**, 78, 1696, 1997.
- BADKE, M. R.; BUDÓ, M. L. D.; SILVA, F. M.; RESSEL, L. B. Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. **Escola Anna Nery**. v.15 n.1. Rio de



Janeiro, 2011

BARATA LES, QUEIROZ S. R. R. **Contribuição efetiva ou potencial do Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT) para aproveitamento econômico sustentável da biodiversidade.** Campinas: [s.n.]. 1995.

BARATA, L. Empirismo e ciência: Fonte de novos Fitomedicamentos. **Revista Ciência e Cultura**, 2005, vol.57 nº 4, pp. 4-5

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria.** Campinas: Editora da UNICAMP, 401p, 2001.

BEVILACQUA, H. G. C. R. Planejamento de horta medicinal e comunitária. Divisão Tec. Esc. Municipal de Jardinagem / Curso de Plantas medicinais - São Paulo, Disponível em <http://www.google.com.br/q=nuplan+plantas+medicinais>, 2010.

BERENGUER, B., SÁNCHEZ, L. M., QUÍLEZ, A., LÓPEZ-BARREIRO, M., HARO, O., GÁLVEZ, J. e MARTÍN, M. J.. Protective and antioxidant effects of *Rhizophora mangle* L. against NSAID-induced gastric ulcers. **Journal of Ethnopharmacology** v. 103, p.194–200, 2006.

BIGHETTI, A. E.; ANTÔNIO, M. A.; KOHN, L. K.; REHDER, V. L. G.; FOGGIO, M. A.; POSSENTI, A., VILELA, L.; CARVALHO, J. E. Antiulcerogenic activity of a crude hydroalcoholic extract and coumarin isolated from *Mikania laevigata* Schultz Bip. **Phytomedicine**, v. 12, p. 72-77, 2005.

BISPO, M. D.; MOURÃO, R. H. V.; FRANZOTTI, E. M. ; BOMFIM, K. B. R.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; MORENO, M. P. N.; MARCHIORO, M.; ANTONIOLLI, A. R. Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, 76, 1, 81-86.2001.

BLOIS, M.S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical . **Nature**, 181, pp.1199-1200, 1958.

BOALINO, D. M.  $\alpha$ -Pyrones and a 2(5H)-furanone from *Hyptis pectinata*. **Phytochemistry**, v.64, p.1303-1307, 2003.

BORGUINI, R. G. **Avaliação do potencial antioxidante e de algumas características físicoquímicas do tomate (*Lycopersicon esculentum*) orgânico em comparação ao convencional.** Tese de Doutorado, 178f., 2006.

BORDIGNON, S. A. L. **O Gênero *Hyptis* Jacq. (Labiatae) no Rio Grande do Sul.** Tese de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 123, 1990.

BOTREL, P.P.; PINTO, J.E.B.; ARAÚJO, A.C.C.; BERTOLUCCI, S.K.V. Variações no teor e na composição volátil de *Hyptis marruboides* Epl. cultivada no campo e em casa de vegetação. **Química nova**, v. 33, n. 1, p. 33-37, 2010.

BOX, M. J. A. New method of constrained optimization and comparison with other methods. *Comp. J.*, V8, p42-52-1965.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portal da Saúde: Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME). 2013 Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2012/prt0533\\_28\\_03\\_2012.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2012/prt0533_28_03_2012.html)>. Acesso em: Fev de 2015.

BRUNETON, J.; **Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia**, Ed. Acribia, SA: Espanha, 1991.

BRATMAN, S. **Guia prático de medicina alternativa: uma avaliação realista dos métodos alternativos de cura**. Rio de Janeiro: Campus, 1998

BRAND-WILLIAMS, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technology*, 28, pp.25–30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Plantas de Interesse ao SUS. Brasília, 2013. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=30277](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=30277)>. Acesso em: Jan de 2016

BRUNETON, J.; **Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia**. AS/Espanha: Ed. Acribia, 594p 1991.

BRUNETON, J. TRITERPENES AND STEROIDS. IN: BRUNETON, J. *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*. Londres: Intercept Ltd, v.2, cap. X, p. 661-719. 1999

BUENO, A. X. Effects of the aqueous extract from *Hyptis pectinata* leaves on rodent central nervous system. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n. 3, p.317-323, 2006.

BUT, P. P. H.; TAM, Y. K.; LUNG, L. C. Ethnopharmacology of rhinoceros horn. II antipyretic effects of prescriptions containing rhinoceros horn and water buffalo horn. **Journal of Ethnopharmacology**, 33: 45–50, 1991.

CALDAS, G. F.; COSTA, I. M. A.; SILVA, J. B.; NÓBREGA, R. F.; RODRIGUES, F. F.; COSTA, J. G.; WANDERLEY, A. G. Antiulcerogenic activity of the essential oil of *Hyptis martiusii* Benth. (Lamiaceae). **J. Ethnopharmacol.**, v. 137, p. 886-892, 2011.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131-134, 2005.

CARPES. Avaliação do potencial antioxidante do pólen apícola produzido na Região

Sul do Brasil. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1660-1664, 2008.

CARVALHO, E.B.de. **Estudos da interação entre proteínas e taninos: Influência da presença de Polissacarídeos** [online]. 2007. 193 f. Tese (Doutorado em Química) -Departamento de Química, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto. Disponível em: [http://www.fc.up.pt/fcup/contactos/teses/t\\_020380030.pdf](http://www.fc.up.pt/fcup/contactos/teses/t_020380030.pdf). Acesso em: 10 ago. 2015.

CARVALHO, J.C.T., GOSMANN, G., SCHENKEL, E.P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMAN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A. PETROVICK, P.R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 4ªed. Porto Alegre/Florianópolis. Editora da Universidade, p.443-461. 2002.

CHUNG, K.; WEI, C.; JOHNSON, M. G.; **Trends Food Sci. Technol.**, 9, 168. 1998.

CLIFFORD, M. N.; SCALBERT, A. Ellagitannins –nature, occurrence and dietary burden. Journal of the Science of Food and Agriculture [online], v.80 , p.1118–1125. 2000 Disponível em: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7%3C1118::AID-JSFA570%3E3.0.CO;2-9/abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7%3C1118::AID-JSFA570%3E3.0.CO;2-9/abstract). Acesso em: 10 ago. 2011.

COSTA, S. M. O.; LEMOS, T. L. G.; PESSOA, O. D. L.; ASSUNÇÃO, J. C. C.; BRAZ-FILHO, R.; Rev. Bras. **Farmacogn.** 12, 66, 2002.

COSTA, A.F.E. et al. **Plantas medicinais utilizadas por pacientes atendidos nos ambulatórios do Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará. Pesq. Med. Fortaleza**, v. 1, n. 2, p. 20-25, 1998.

CORREIA, H.; GONZÁLEZ-PARAMÁS, A.; AMARAL, M.T.; SANTIOS-BUELGA, C.BATISTA, M.T. **Characterisation of polyphenols by HPLC-PAD-ESI/MS and antioxidant activity in Equisetum telmateia**. Phytochemical Analysis, 16, pp.380-387, 2005.

DAHLGREN, A.; YU, Z.; **J. Chem. Ecol.** 26, 2119, 2000.

DAYSE A. A SILVA; CARLA C. M., **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antioxidante in vitro de frações dos extratos diclorometano e acetato de etila de folhas de *hyptis platanifolia***. Dissertação (Mestrado) - Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

DEURENBERGER, R. H.; VINK, C.; KALENIC, S.; FRIEDRICH, A. W.; BRUGGEMAN, C. A.; STOBBERINGH, E. E. The molecular evolution of methicillin - resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology and Infection**, 13:222-235, 2007.

DE BACKER, D.; CHRISTIAENS, T.; DE SUTTER, A.; STOBBERINGH, E.; VERSCHRAEGEN, G. Evolution of bacterial susceptibility pattern of *Escherichia coli* in uncomplicated urinary tract infections in a country with high antibiotic consumption: a comparison of two surveys with a 10 year interval. **Journal of Antimicrobial**

**Chemotherapy**, 62:364-368, 2008.

DUTHIE, G. G. Lipid peroxidation. **European Journal of Clinical Nutrition** , v.47, p. 759-764, 1993.

ELISABETSHY, E. **Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas**, 2001.

FALCÃO, D.Q.; MENEZES, F.S. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.84, p. 68-74, 2003.

FERNANDES JR, W. E. **Planejamento experimental aplicado a um novo separador líquido-líquido utilizado no tratamento de águas residuais contaminadas com petróleo**. 117 f. Dissertação (Mestrado) - Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2002.

FERNANDEZ, O., CAPDEVILAB, J. Z., DALLAB, G., MELCHOR, G. Efficacy of *Rhizophora mangle* aqueous bark extract in the healing of open surgical wounds. **Fitoterapia** v. 73, p. 564–568, 2002.

FERRI, P.H; FERREIRA H.D. **Fitoquímica das folhas de *Hyptis Benth.*** In: Semana de Química, Goiânia: Departamento de Química Orgânica, p.1 – 32, 1992.

FERRO, D. **Fitoterapia: conceitos clínicos**. Editora Atheneu, São Paulo, 2006.

FRANÇA, I.S.X. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 61, n. 2, p. 201-208, 2008.

GILANI, A.H., GHAY UR, M.N., KHALID,A., HAQ, Z., CHOUDHARY, M.I., RHAMAN, A.. **Pre-sence of antipasmodic, antidiarrheal, antisecretory, calcium antagonist and acetylcholines-terase inhibitory steroidal alkaloids**. in *Sarcococca saligna*, 2005.

GUIMARÃES-BEELLEN, P. M.; BERCHIELLI, T. T.; BEELEN, R.; MEDEIROS, A. N. Influence of condensed tannins from Brazilian semi-arid legumes on ruminal degradability, microbial colonization and ruminal enzymatic activity in Saanen goats. **Small Ruminant Research**. Amsterdam, v. 61, p. 35-44, 2006.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday. **Molecular Aspect of Medicine**, n. 27, p. 1-93, 2006.

HAGERMAN, A. E.; ZHAO, Y.; JOHNSON, S.; **Antinutrients and Phytochemicals in Food**, 12, 209, 1997.

HARLEY, R. M.; ATKINS, S.; BUDANTSEV, A. L.; CANTINO, P. D.; CONN, B. J.; GRAYER, R.; HARLEY, M. M. DE KO K, R.; KRESTOVSKAJA, T.; MORALES, R.; PATON, A. J.; RYDING, O.; UPSON, T. Lamiaceae. In: KUBITZKI, K.; KA DEREIT, J. W. (eds.), **The Families and Genera of Vascular Plants**, vol.7. Springer Verlag, Berlin, pp. 167-275, 2004.

HARLEY, R. M. Checklist and key of genera and species of the Lamiaceae of the Brazilian Amazon. **Rodriguésia**, v. 63, n. 1, p. 129-144, 2012.

HEIL, M.; BAUMANN, B.; ANDARY, C.; LINSÉNMAIR, K. E.; MCKEY, D. Extraction and quantification of “condensed tannins” as a measure of plant anti-herbivore defence. **Revisiting an old problem. Naturwissenschaften**. v.89. p. 519-524, 2002.

HERBÁRIO IAC. Disponível no site: [herbário.iac.sp.gov.br](http://herbário.iac.sp.gov.br). Acesso em 03 de MARÇO de 2016.

HENRIQUES, A.T., KERBER, V.A., MORENO, P.R.H. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMAN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A. PETROVICK, P.R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 4ªed. Porto Alegre/Florianópolis. Editora da Universidade, p.651-666. 2002.

HIRUMA-LIMA, C. A., SANTOS, L.C., KUSHIMA, H., PELLIZZON, C.H., SILVEIRA, G.G., VASCONCELOS, P.C.P., VILEGASB, W. e SOUZA BRITO, A.R.M.. Qualea grandiflora, a Brazilian “Cerrado” medicinal plant presents an important antiulcer activity. **Journal of Ethnopharmacology** v. 104, p. 207–214, 2006

HUANG, X. D.; LIANG, J. B.; TAN, H. Y. et al. Protein-binding affinity of Leucaena Condensed Tannins of differing molecular weights. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, p.10677-10682, 2011.

JACOBSON, T. K. B., GARCIA, J., SANTOS, S. C., DUARTE, J. B., FARIAS, J. G. e KLIEMANN, H. J.. Influência de fatores edáficos na produção de fenóis totais e taninos de duas espécies de barbatimão (*Stryphnodendron* sp.). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 35 n. 3, p. 163-169, 2005.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. **Plant Systematics. A phylogenetic approach**. Inglaterra, Sinauer Associates Inc. 383-385. 1999.

JUHÁS, S. et al. Effects of borneol and thymoquinone on TNBS-induced colitis in mice. **Folia Biologica (Praha)**, n. 54, p.1-7, 2008.

KEITH, C. T.; Borisy, A. A.; Stockwel, B. R. Multicomponent therapeutics for networked systems. **Nature Revista Drug Discovery**, 4:71-78, 2005.

KHANBABAEE, K.; van REE, T. Tannins: Classification and Definition. **Natural Product. Reports**, Londres, v.18, n.6, p.641-649, 2001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/B101061L>. Acesso em: 16 ago. 2011.

KOEHN, F.E. CARTER, G.T. “**The Evolving Role of Natural products in Drug Discovery**”, *Nature Reviews- Drug Discovery* 4(3):206-220. 2005.

- LEV, E. Traditional healing with animals (zootherapy): medieval to present-day Levantine practice. **Journal of Ethnopharmacology**, 85:107-118, 2003
- LEKHA, P. K.; LONSANE, B. K. Production and application of Tannic Acyl Hydrolase: State of the art. Advances in **Applied Microbiology**, v. 44, 1997.
- LIMA, C. F. Metformin-like effect of *Salvia officinalis*(common sage): is it useful in diabetes prevention. **British Journal of Nutrition**, n. 96, p.326-333, 2006.
- LOURENÇO FILHO, R.; PAIVA, A. F. **Estatística**. Belo Horizonte, Universidade federal de Minas Gerais (Edições Engenharia, V.II), 1969.
- LOPES, C.R. **Folhas de chá**. Viçosa: UFV, 2005.
- LORENZI, H. e MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. ed. Nova Odessa: Plantarum. 2008.
- LOZOYA, X.; REYES-MORALES, H.; CHÁVEZ-SOTO, M. A.; MATÍNEZ-GARCÍA, M. C.; SOTO-GONZÁLEZ, Y.; DOUBOVA, S. V. Intestinal anti-spasmodic effect of a phytodrug of *Psidium guajava* folia in the treatment of acute diarrheic disease. **J.Ethnopharmacol.**, Limerick, v. 83, p. 19-24, 2002.
- MATOS, F.J.A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. Fortaleza: Edições UFC. 1997.
- MAYER T., Schieber A., Kammerer R.D., Carle R. Residues of grape (*Vitisvinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. **Food Chemistry**, 112, pp.551-559, 2009.
- MEBS, D.; OMORI-SATOH, T.; TAMAKAWA, Y.; NAGAOKA, Y. Erinacin, an antihemorrhagic factor from the European hedgehog, *Erinaceus europaeus*. **Toxicon**, 34: 1313 –1316, 1996
- MELLO, J. C.P.; SANTOS, S. C. Taninos. In: SIMÕES, C.M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre: Ed.UFRGS/Ed.UFSC, cap. 24, p.517-543. 2001.
- MELO, G. B. et al. Enhancement of liver regeneration by the association of *Hyptis pectinata* with laser therapy. **Digestive Diseases and Sciences**,v. 50, n. 5, p.949-954, 2005.
- MELLO, J. P. C.; SANTOS, S. C. **Em Farmacognosia: da planta ao medicamento**; Simões, C. M. O.; Schenckel, E. P., orgs.; Ed. UFSC: Porto Alegre; 3a ed., 2001.
- MELO, G. B. et al. **Proliferative effect of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* on liver regeneration after partial hepatectomy in rats**. *Acta Cirúrgica Brasileira* v. 21, n. 1, p.33-36, 2006.



MISHRA, S. B.; VERMA A.; MUKERJEE, A.; VIJAYAKUMAR, M. Anti-hyperglycemic activity of leaves extract of *Hyptis suaveolens* L. Poit in streptozotocin induced diabetic rats. **Asian Pac. J. Trop. Med**, v. 4, p. 689-693, 2011.

MONTANARI Jr., I. Aspectos da produção comercial de plantas medicinais nativas. 2002. Disponível no site: <http://www.cpqba.unicamp.br/plmed/index.html>. Acesso em 15 de Fevereiro de 2008.

MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U. O.; ARAÚJO, E.L. Taninos: uma abordagem da química a ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MONTEIRO J.M., ALBUQUERQUE U.P., LINS NETO E.M.F., ARAUJO E.L. e AMORIM E.L.C.. Use patterns and knowledge of medicinal species among two rural communities in Brazil's semi-arid northeastern region. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 173-186, 2006.

MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; QUEIROZ, C. R. A. A.; J. Braz. **Chem. Soc.** 10, 447, 1999.

MORGAN, R. Enciclopédia das ervas e plantas medicinais. São Paulo: Hemus, 1994.

MOLYNEUX,P; Songklanakarin. Journal of Science education and Technology, 26, pp.211-219, 2004.

MONAGAS, M.; QUINTANILLA-LÓPEZ, J. E.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C. et al. MALDI-TOF MS analysis of plant proanthocyanidins. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.51, p.358-372, 2010.

MORALES, M. A.; LOZOYA, X. Calcium-antagonist effects of quercetin on aortic smooth-muscle. **Planta Med.**, Stuttgart, v. 60, n. 4, p. 313-7, 1994.

MONTEIRO J.M., ALBUQUERQUE U.P., LINS NETO E.M.F., ARAUJO E.L. e AMORIM E.L.C.. Use patterns and knowledge of medicinal species among two rural communities in Brazil's semi-arid northeastern region. **Journal of Ethnopharmacology** v. 105, p. 173-186, 2006

MOSCA, V. P.; LOIOLA, M.I.B. Uso Popular De Plantas Medicinais No Rio Grande Do Norte, Nordeste Do Brasil. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 4. Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró, Brasil, 2009.

NAKAMURA, Y.; TSUJI, S.; TONOGAI, Y. Method for analysis of tannic acid and its metabolites in biological samples: Application to tannic acid metabolism in the rat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 25 [online], v.51, n.1, p.331-339, 2003. Disponível em: [http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf020847%](http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf020847%0) Acesso: 2 set. 2015.

NASCIMENTO, P. F. C. et al. *Hyptis pectinata* essential oil: chemical composition and anti-*Streptococcus mutans* activity. **Oral Diseases**, v. 14, p.485-489, 2008.

NAUMANN, H. D.; TEDESCHI, L. O.; MUIR, J. P. et al. Effect of molecular weight of condensed tannins from warm-season perennial legumes on ruminal methane

production in vitro. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.50, p.154-162, 2013.

NAUMANN, H. D.; HAGERMAN, A. E.; LAMBERT, B. D. et al. Molecular weight and protein-precipitating ability of condensed tannins from warm-season perennial legumes, **Journal of Plant Interactions**, v.9, n.1, p.212-219, 2014.

NEVES LC, ALENCAR SM, CARPES ST. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonóides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. Braz. **J. Food Technol.**, 2(15), 2008.

OLIVEIRA, C.M.A.; SILVA, M.D.R.; KATO, L.; SILVA, C.C. 2004. Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Hyptis ovalifolia* Benth. (Lamiaceae). J. Braz. Chem. Soc. 15:756-759

OLIVEIRA, R.B. Terpenos e terpenóides. Disponível no site: [www.geocities.com.br/plantas](http://www.geocities.com.br/plantas) tóxicas. Acesso em: 15 de Fevereiro de 2008.

OLIVEIRA, A. D. L. de. Estudo químico e avaliação biológica do óleo essencial de *Hyptis martiusii* Benth. (Lamiaceae). **Dissertação (Mestrado em Bioprospecção Molecular) Universidade Regional do Cariri –URCA**, 2011.

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ MATA, D.; VILLAR, A.; J. **Ethnopharmacol.** 76, 201.2, 2001.

PELLETIER SW. ALKALOIDS, **Chemical and biological, perspectives**. Nove Iorque: John Wiley And Sons, 1983 In: Bhat, S V, Nagasampagi, BA, Sivakumar M. Chemis try of Natural Products. 4ª Ed. Nova Delhi: Narosa Publishing House, p. 237. 2007.

PERES, L.E.P. Metabolismo Secundário. Disponível no site: <http://www.ciagri.usp.br/~lazaropp>. Acesso em: 15 de Fevereiro de 2008.

PERRUCHON S. Estudo das propriedades dos flavonóides para cosméticos através do relacionamento função-estrutura. **Cosmetics e Toiletries** 14: 74, 2002.

PETROVSKA, B. B. **Historical review of medicinal plants' usage**. **Pharmacogn Rev**, v. 6, n. 11, p. 1-5, 2012.

PETRONILHO, S. **In vitro and in vivo studies of natural products: A challenge for their valuation. The case study of chamomile (Matricaria recutita L.)**. Industrial Crops and Products, v. 40, p. 1-12, 2012.

PIERONI, A.; QUAVE, C.; NEBEL, S.; HEINRICH, M. Ethnopharmacy of the ethnic Albanians (Arbereshe) of northern Basilicata, Italy. **Fitoterapia** , 73: 217-241, 2002.

QUEIROZ, C. R. A. A., MORAIS, S. A. L. e NASCIMENTO, E. A.. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). **Revista Árvore**, v. 26, n. (4), p. 485-492, 2002.

RAPHAEL, K. R. e KUTTAN, R. Inhibition of experimental gastric lesion and inflammation by *Phyllanthus amarus* extract. **Journal of Ethnopharmacology** v. 87, p. 193–197, 2003



RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, 39:603-613, 20, n. 4, p.751-762, 2001.

RAIANE T. **Potencial taninífero da jurema preta e do angico vermelho avaliado por diferentes métodos**, Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

RAJANI GP, ASHOK P. In vitro antioxidant and antihyperlipidemic activities of *Bauhinia variegata* Linn. **Indian J Pharmacol.**, 41(5):227–232, 2009.

RAYMUNDO, L. J.; GUIHON, C. C.; ALVIANO, D. S.; MATHEUS, M. E.; ANTONIOLLI, A. R.; CAVALCANTI, S. C.; ALVES, P. B.; ALVIANO, C. S.; FERNANDES, P. D. Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the *Hyptis pectinata* (L.) Poit essential oil. **J. Ethnopharmacol.**, v. 134, n. 12, p. 725-732, 2011.

REDESFITO, Laboratórios reforçam apostas no segmento fitoterápico. Disponível em: <<http://www2.far.fiocruz.br/redesfito/v2/?p=3064>>. Acesso em: Jan de 2016

RICARDO, L. M. Uso de Plantas Medicinais: o Sistema Único de Saúde e a autonomia dos saberes comuns. Ministério da Saúde. **Fundação Oswaldo Cruz**. Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca. Rio de Janeiro, 2009.

RIELD, K. M. E HAGERMAN, A.E. Tannin -Protein complexes as radical scavengers and radical Sinks. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.10, p. 4917-4923, 2001.

SAIGA A, TANABE S, NISHIMURA T. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *J. Agric. Food Chem.* 51, 3661–3667. <http://dx.doi.org/10.1021/jf021156g>. 2003.

SANT'ANA, A. E. G. **Em Biodiversidade, Conservação e Uso Sustentável da Flora do Brasil**; Araújo, E. L.; Moura, A. N.; Sampaio, E. S. B.; Gestinari, L. M. S.; Carneiro, J. M. T., eds.; Imprensa Universitária: UFRPE, Recife, 2002.

SALVAT, A, A.; ANTONNACCI, L.; FORTUNATO, R. H.; SUAREZ, E. Y. Screenng of some plants from northern argentina for their antimicrobial activty. **Letters in Applied Microbial**,32:293-297, 2001.

SÁNCHEZ-VIOQUE R, POLISSIOU M, ASTRAKA K, DE LOS MOZOSPASCUAL M, TARANTILIS P, HERRAIZ-PEÑALVER D, SANTANAMÉRIDAS O. **Polyphenol composition and antioxidant and metal chelating activities of the solid residues from the essential oil industry.** *Ind. Crop. Prod.* 49, 150–155. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.04.053>. 2013.

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.; ANTONIOLLI, A.R.; MARÇAL, R.M. Antinociceptive effect and toxicity of the *Hyptis suaveolens* leaves aqueous extract on mice. **Fitoterapia**, v. 78, p.333-336, 2007.

SANTOS, R.L. et al. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Rev. Bras. Plantas Med.**, v.13, n.4, p.486-91, 2011. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v13n4/a14v13n4.pdf>>. Acesso em: 23 jun. 2014.

SANTOS, R.I. Metabolismo Básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMAN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A. PETROVICK, P.R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 4ªed. Porto Alegre/Florianópolis. Editora da Universidade, p.333-365. 2002.

SANTOS, P. O. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hyptis pectinata* L. Poit. **Química Nova**, v.31, n. 7, p. 1648-1652, 2008.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry** [online], v.30, p.3875 -3883, 1991. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/003194229183426L> Acesso em 1 set. 2011.

SCARPA, A. Pre-scientific medicines: their extent and value. **Society of Science Medicine**, 15A:317-326, 1981.

SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; PETROVICK, P. R. **Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos**. 2000.

SCHERER R., GODOY H.T. Antioxidant activity index (AAI) by 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chemistry** 112, 654-658, 2009.

SCHMITZ, W. **O chá-verde e suas ações como quimioprotetor**. Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina, v. 26, n. 2, p. 119-130, jul./dez. 2005.

SCHOFIELD, P.; PELL, A. N.; MBUGUA, D. M.; *Animal Feed Science and Technology* 2001, 91, 21.

SHIN, S.; PYUN, M. Anti-candid effects of estragole in combination with ketaconazole or amphotericin B. **Phytoterapy**, 18:827-830, 2004.

SILVA, W. J.; DÓRIA, G.A.A.; MAIA, R. T.; NUNES, R. S.; CARVALHO, G. A.; BLANK, A. F.; **Diabetes** 46, S14-S18. 2002.

SILVA-MANN, R.; COSTA, A. G.; SILVA, P. A.; BLANK, A. F.; MENDONÇA, M. C.; CARVALHO FILHO, J. L. S.; DANTAS, I. B.; AZEVEDO, V. G.; ARRIGONI-BLANK, M. F. Avaliação de componentes de produção de sambacaitá no primeiro corte. **Horticultura brasileira**, v. 21, n. 2, p. 1-4, 2003.

SILVA, W. J. Effects of essential oil on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. **Bioresource Technology**, v. 99, p.3251-3255, 2008.

SIMÕES, C. M.O. (Ed.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. ed. Porto Alegre: Ed.UFSC, 2003.

STASI, C.L.D. **Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar.** São Paulo. p.109-126, 1996.

SIAI ZHANG, MI SUN, TANG LI, QIHAI WANG, JIANHUA HAO, YI HAN, XIAOJIAN HU, MING ZHOU, SHENGXIANG LIN. **Structure Analysis of a New Psychrophilic Marine Protease.** [PLoS One](#), 2011.

SIMÕES, C.M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 3 ed. Porto Alegre:Ed. UFGRS/Ed. UFSC, 2001. cap.6, p.87-99

SOLER-RIVAS C, Espín JC, Wichers HJ. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. **Phytochem Analysis** 11: 1-9, 2000.

SOUSA, E. O.; SILVA, N. F.; RODRIGUES, F. F. G.; CAMPOS, A. R.; LIMA, S. G.; COSTA, J. G. M. Chemical composition and resistance modifying effect of *Lantana camara* lin. **Pharmacognosy magazine**, 6: 79-82, 2010.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil**, baseado em APG III. 3ª Ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 768 p, 2012.

SUS;2015. [portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/entenda-o-sus](http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/entenda-o-sus). ACESSADO: 30 de Janeiro de 2016.

TEIXEIRA, M.L.; SOARES, A.R.; SCOLFORO, J.R.S. Variação do teor de tanino da casca de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* Mart. Coville) em 10 locais de Minas Gerais. **Cienc. Prat.**, v.14, p.229-232, 2015.

TERRILL, T.H., A.M. Rowan, G.B. Douglas, and T.N. Barry. Determination of extractable and bound condensed tannins concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains. **J. Sci. Food e Agric.** 58: 321-329, 1992.

TEPE, B.; SOKMEN, A., Screening of the antioxidative properties and total phenolic contents of three endemic *Tanacetum* subspecies from Turkish flora. **Bioresource Tecchnology** ,98, pp.3076- 3079. 2007.

TORRES DE PINEDO, A.; PENALVER, P.;MORALES, J.C. Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidants: structure-activity relationship.**Food Chemistry**, 103, pp.55-61, 2007

TOSCANO RICO, J. M. **Plantas Mediciniais.** Academia das Ciências de Lisboa, Instituto de Estudos Acadêmicos para Seniores, Lisboa, 2011

TRIPOLI,E.; Guardia M.L.; Giammanco S.;Majo D.D.; Giammanco, M. Flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. **Food Chemistry**, 104, pp.466-479. 2007.

VASCONCELOS, P.C.P., KUSHIMA, H., ANDREO, M., HIRUMA-LIMA, C.A., VILEGAS, W., TAKAHIRA, R.K. e PELLIZZON, C.H... Studies of gastric mucosa regeneration and safety promoted by Mouriri pusa treatment in acetic acid ulcer model.

**Journal of Ethnopharmacology** v. 115, p.293–301, 2008.

VARALDO, P. E. Antimicrobial resistance and susceptibility testing: an evergreen topic. **Journal of Antibacterial Chemotherapy**, 50:1- 4, 2002.

VEDANA, M. I. S. **Efeito do processamento na atividade antioxidante da uva**. Dissertação de Mestrado, 85 f., 2008.

VIEGAS Jr., C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**. vol. 26, n. 3, p. 390-400, 2003.

WAGHORN, G. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production - Progress and challenges. **Animal Feed Science and Technology**, v.147, p.116-139, 2008.

WAGNER H., BLADT S., **Plant drug analysis - a thin layer chromatography atlas**. Berlin: Springer, 1995.

WERKEMA, M.C.C.; AGUIAR, S. **Otimização estatística de processos: como determinar a condição de operação de um processo que leva ao alcance de uma meta de melhoria**. Belo Horizonte – Brasil, Fundação Cristiano Otoni. Série Ferramentas da Qualidade, vol.9. 1996.

Oç~[

ZANG, F. X.; GUO, B. Z.; WANG, H. Y. The spermatocidal effects of earthworm extract and its effective constituents. **Soil Biology and Biochemistry**, 24: 1247 – 1251, 1992.

ZHANG, Y.; LI, W.; YANG, Y.; TIAN, Y.; XU, X.; CHEN, Y.; MU, L.; ; FANG, L.; *INT. J. Pharm.* 408, 157, 2011.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n.1, p. 147-152, 2001