

São Paulo, 25 de agosto de 2014.

Projeto de doutorado:

Análises químicas e atividades biológicas de *Hyptis* Jacq. sect. *Peltodon* de ocorrência nos biomas cerrado e mata atlântica.

Mestranda: Kátia Pereira dos Santos

Orientadora: Cláudia Maria Furlan

Laboratório de Fitoquímica

Departamento de Botânica

Instituto de Biociências

USP

Resumo

Há milhares de anos e em diversos locais por todo o mundo, as plantas são utilizadas como alimento e cura para diversos males que acometem a humanidade. Tais poderes curativos presentes nos vegetais ocorrem graças às substâncias provenientes do metabolismo secundário. Atualmente, sabe-se que muitos dos metabólitos secundários estão diretamente envolvidos nos mecanismos que permitem a adequação das plantas ao seu habitat. Além disso, as intensidades de atividade biológica podem variar dependendo de fatores abióticos. Considerando-se a grande variedade de substâncias reconhecidas como metabólitos secundários e a grande diversidade vegetal brasileira, estudos que visam à identificação e descrição de novas substâncias são importantes. Lamiaceae é uma família botânica com distribuição cosmopolita que inclui cerca de 300 gêneros e 7500 espécies. São muito conhecidas por seus constituintes aromáticos, e seus óleos voláteis são objeto de interesse econômico para uso medicinal, cosmético e alimentício. *Hyptis* Jacq. foi apontado como um grupo parafilético, com base em estudos moleculares e, por este motivo, várias espécies conhecidas por serem usadas na medicina popular para o tratamento de diversas doenças foram atualmente incluídas em gêneros próximos a *Hyptis* (todos pertencentes à Tribo Hyptidinae). Para a tribo já foi reportada a presença de alcaloides, terpenoides, flavonoides e saponinas. Em um estudo preliminar realizado no laboratório de fitoquímica do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, espécies como *Hyptis radicans* e *Hyptis multibracteata* apresentaram extratos com um alto potencial antioxidante e alta atividade de inibição da enzima transcriptase reversa (anti-HIV). Devido à esses resultados preliminares mostrarem-se muito promissores, estudaremos cinco espécies de *Hyptis* pertencentes à seção *Peltodon* tendo como objetivo geral do trabalho, a expansão das análises fitoquímicas e de atividades biológicas. Além disso, os objetivos específicos são verificar uma possível variação fitoquímica (quantitativa e/ou qualitativa) entre as cinco espécies estudadas e coletadas nos biomas cerrado e mata atlântica bem como avaliar o potencial antioxidante e anti-HIV de diferentes extratos e frações, assim como do óleo volátil das espécies pertencentes à seção *Peltodon*.

1. Introdução

O uso de plantas com fins curativos remonta ao princípio da história da Humanidade, que sempre recorreu à natureza para a busca de alimento e cura para suas enfermidades. A história da botânica sempre esteve muito próxima à da medicina. Até o século XIX, as plantas eram as principais fontes de recursos para o tratamento das doenças. Grandes nomes da medicina foram também importantes botânicos, como Theophrastus, Hippocrates e Dioscorides. Este último é autor de "*De Materia Medica*", no século I, uma das obras médicas mais consultadas até o século XVIII (Eadie, 2004). Apesar da elevada competitividade dos fármacos obtidos por síntese, substâncias obtidas de plantas continuam tendo enorme importância para a indústria farmacêutica. Muitos medicamentos de alto valor ainda são sintetizados utilizando-se substâncias de origem vegetal, como o Buscopan®, que é obtido modificando-se a estrutura da escopolamina, um alcaloide comum em Solanaceae.

Apesar da imensa variedade de características encontradas nos seres vivos, as vias de síntese de substâncias como carboidratos, proteínas, gorduras e ácidos nucleicos são as mesmas em todos os organismos, salvo algumas pequenas diferenças. É vital para todos os organismos, a transformação e conversão de compostos orgânicos que permitem a realização de atividades essenciais para a vida, como a reprodução e o crescimento (Dewick, 2009).

Chamamos de metabolismo o conjunto de reações que tem como finalidade a formação e construção dos tecidos de uma planta através de caminhos chamados vias metabólicas. Tais reações envolvem processos como a atuação de substâncias químicas mediadas por enzimas, além de serem minuciosamente controlados, e tendo como objetivo principal, a formação de produtos essenciais para a manutenção da vida da planta (Dewick, 2009).

Vários autores costumam dividir o metabolismo vegetal em primário e secundário. Embora na prática essa divisão seja difícil, caracteriza-se metabolismo primário como os processos comuns e pouco variáveis à grande parte dos vegetais e que levam à síntese de carboidratos, proteínas, gorduras e ácidos nucleicos. Tais sínteses ocorrem por vias conhecidas como glicólise, ciclo de Krebs e ciclo do ácido carboxílico que têm como resultado a liberação de energia originada de compostos orgânicos através de reações

oxidativas. Tal energia também é obtida através da β -oxidação de ácidos graxos e degradação de produtos que não são essenciais para a planta (Dewick, 2009; Taiz & Zeiger, 2009).

Um dos principais componentes do meio externo cuja interação é mediada por substâncias do metabolismo secundário são os fatores bióticos. Desse modo, produtos secundários estão relacionados à proteção contra herbivoria, ataque de patógenos, competição entre plantas e atração de organismos benéficos como polinizadores, dispersores de sementes e microrganismos simbioses. Contudo, produtos secundários também possuem ação protetora em relação a estresses abióticos, como aqueles associados com mudanças de temperatura, conteúdo de água, níveis de luz, exposição à radiação UV e deficiência de nutrientes minerais (Taiz & Zeiger, 2009). Devido a essas relações estabelecidas entre as plantas e o meio ambiente, principalmente às interações estabelecidas com os fatores bióticos, pesquisadores começaram a imaginar que várias dessas substâncias poderiam ter aplicação biológica e foi por isso que entre os séculos XIX e XX, iniciaram-se as pesquisas sobre as atividades medicinais por metabólitos secundários. Os estudos de ecologia química foram de extrema importância, pois providenciaram relatos de substâncias envolvidas nessas interações planta-meio ambiente (e.g. Coley *et al.* 2003; Donaldson & Gates, 2004; Albuquerque & Mello, 2012).

O metabolismo secundário geralmente é definido como o responsável pela grande variedade de substâncias químicas apresentadas pelas plantas, porém específicos para alguns grupos de plantas viventes. As substâncias provenientes de tal metabolismo podem caracterizar-se como espécie-específica (Dewick, 2009; Taiz & Zeiger, 2009).

Produtos do metabolismo primário são utilizados como blocos construtores para o metabolismo secundário que, por sua vez, apresentam quatro principais vias para formação de substâncias: via do malonato, via do chiquimato, via do mevalonato e via do metiliteritrol fosfato. Os produtos originados a partir da via do malonato são provenientes de uma molécula precursora, a acetil-CoA. Esta molécula pode ser formada tanto pela descarboxilação oxidativa do ácido pirúvico (produto da via glicolítica), quanto pela β -oxidação de ácidos graxos. Entre os produtos finais desta via podemos citar os ácidos graxos e seus derivados constituintes de ceras cuticulares, algumas substâncias fenólicas, entre outros. O ácido chiquímico é produzido pela combinação de substâncias também provenientes do metabolismo primário, o fosfoenolpiruvato (PEP) e a eritrose-4-fosfato.

Entre os metabólitos produzidos a partir desta via estão uma grande variedade de substâncias fenólicas, tais como derivados do ácido cinâmico, ligninas, taninos e, ainda, os alcaloides aromáticos (Dewick, 2009; Taiz & Zeiger, 2009).

O ácido mevalônico é formado a partir de três moléculas de acetil-coA e é responsável pela biossíntese de numerosas substâncias conhecidas como terpenoides e esteroides. O isopreno é uma unidade precursora formada por cinco átomos de carbono sendo os terpenoides, derivados de tal substância por possuírem quantidades variáveis de isopreno. Tal variação nas quantidades de isopreno é utilizada para a criação artificial de classes de terpenoides: monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30) e carotenóides (C40) (Vickery & Vickery, 1981; Dewick, 2009).

O metileritritol fosfato é formado a partir da combinação de dois intermediários da via glicolítica: o ácido pirúvico e o gliceraldeído-3-fosfato. Juntamente com a via do ácido mevalônico, esta via é responsável pela biossíntese de terpenoides e esteroides. Ambas as vias contribuem para a síntese de terpenoides, mas a localização de cada uma delas é particular. A via do mevalonato, a primeira a ser descrita na literatura, ocorre no citoplasma e parece estar envolvida com a síntese, principalmente, de triterpenos e esteroides. Já a via do metileritritol fosfato foi descrita mais recentemente e ocorre nos plastídios, levando a síntese preferencialmente de diterpenos e carotenoides (Dewick, 2009).

Considerando-se a grande variedade de substâncias reconhecidas como metabólitos secundários e a grande diversidade vegetal brasileira, estudos que visam à identificação e descrição de novas substâncias são importantes.

Em virtude da importância das plantas com potencial medicinal, programas de pesquisa têm sido desenvolvidos no mundo, como a National Cooperative Natural Products Drug Discovery Groups, sob o amparo do National Cancer Institute dos Estados Unidos e o Programa de Pesquisas com Plantas Medicinais (PPPM), organizado pela Central de Medicamentos (CEME), que visam ampliar os conhecimentos fisiológicos, fitoquímicos e taxonômicos de grupos de plantas medicinais, bem como encontrar novas substâncias com potencial fitoterápico e estabelecer sua eficácia e formas de controle e comercialização (Calixto, 2005).

As florestas tropicais possuem mais da metade das espécies de plantas estimadas por alguns autores, em cerca de 500.000. Dentre estas, menos de 5% vêm sendo estudados quanto a seu potencial medicinal (Conte 1996, Cechinel Filho & Yunes 1998). Segundo Rodriguez & West (1995), o número de constituintes químicos ativos das espécies tropicais é de três a quatro vezes maior do que nas plantas que habitam climas temperados. O Brasil resguarda aproximadamente 30% das florestas tropicais do planeta, variando de 40 mil a 200 mil espécies vegetais e, dentre estas, por volta de 10 mil têm efeitos medicinais (Cechinel Filho & Yunes 1998). Desse modo, o Brasil possui uma flora riquíssima, considerada uma fonte inesgotável de metabólitos secundários de interesse (Gottlieb *et al.* 1996). Entretanto, com exceção da Amazônia, poucos estudos em plantas com propriedades medicinais têm sido realizados com a flora da Mata Atlântica, Caatinga e Cerrado (Vieira *et al.* 1999).

Atualmente, sabe-se que muitos dos metabólitos secundários estão diretamente envolvidos nos mecanismos que permitem a adequação das plantas ao seu habitat (Santos, 2004). Além disso, as intensidades de atividade biológica podem variar dependendo de fatores abióticos.

Segundo Dudai *et al.* (1992), a atividade biológica dos óleos voláteis de plantas de uma mesma espécie pode variar consideravelmente em populações dessa mesma espécie vegetal que ocorrem ao longo de um gradiente ambiental. Fatores como temperatura e luminosidade afetam profundamente os níveis e a composição dos óleos voláteis.

Fatores edafoclimáticos também podem afetar a produção de metabólitos secundários (Gobbo-Neto & Lopes, 2007). Estudos indicaram uma correlação positiva entre a intensidade de radiação solar e a concentração e/ou a composição e a produção de substâncias fenólicas tais como flavonoides (Markham *et al.* 1998, Tattini *et al.* 2004), taninos (Dudt & Shure 1994) e antocianinas (Jeong *et al.* 2004); além de substâncias terpenoídicas (Karousou *et al.* 1998).

Kutchan (2001) comenta que os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente ao seu redor e que, devido à isso, sua síntese é frequentemente afetada por condições ambientais como altitude, disponibilidade de água e de macro e micronutrientes no solo, temperatura relativa do ar e pH do solo. Apesar da reconhecida influência dos fatores ambientais no

desenvolvimento vegetal, são escassos os estudos que mostram as relações e adaptações fisiológicas das plantas ao ambiente.

Segundo Gobbo-Neto & Lopes (2007), os estudos sobre influência de fatores ambientais na produção de metabólitos secundários geralmente têm se limitado a um grupo restrito de espécies, muitas das quais são comercialmente importantes, com características previamente selecionadas.

Lamiaceae é uma família botânica com distribuição cosmopolita que inclui cerca de 300 gêneros e 7500 espécies. As plantas dessa família são, geralmente, herbáceas e arbustivas, sendo menos frequente o porte arbóreo. São muito conhecidas por seus constituintes aromáticos, e seus óleos voláteis são objeto de interesse econômico para uso medicinal, cosmético e alimentício.

Hyptis Jacq. foi apontado por Harley & Pastore (2012) como um grupo parafilético, com base em estudos moleculares e, por este motivo, várias espécies conhecidas por serem usadas na medicina popular para o tratamento de diversas doenças foram atualmente incluídas em gêneros próximos a *Hyptis* (todos pertencentes à Tribo Hyptidinae). Nesse estudo, os autores propõem uma redução considerável de espécies para o gênero e a inclusão de *Peltodon*, resultando em monofilia para *Hyptis*. Subdividido em 10 seções, conta com cerca de 140 espécies, que ocorrem nas regiões tropicais e subtropicais, desde a América do Norte ao Caribe e ao Sul até a Argentina, com poucas espécies de ocorrência no Velho Mundo (Harley & Pastore, 2012). O grupo é composto por ervas ou arbustos fortemente aromáticos, com caule quadrangular e estames epipétalos (Basílio et al., 2006; Harley & Pastore, 2012).

Acredita-se que uma série de doenças como câncer, artrite, arterosclerose, diabetes, malária, AIDS e doenças do coração, tenham um componente importante de estresse oxidativo, com a presença de espécies reativas de oxigênio (do inglês ROS – reactive oxygen species). Sabe-se também que as ROS estão diretamente relacionadas com processos responsáveis pelo envelhecimento do corpo (Brenna & Pagliarini, 2001; Yildirim, Mavi & Kara, 2001).

A atividade antioxidante de substâncias fenólicas como flavonoides, taninos condensados e/ou hidrolisáveis, fenilpropanoides e ácidos fenólicos provenientes dos vegetais (portanto classificados como naturais), é caracterizada pela propriedade de

óxido-redução que lhes é atribuída, a qual pode desempenhar uma importante função na neutralização de ROS (Antunes & Canhos, 1984; Simão, 1985; Fennema, 1993; Brenna & Pagliarini, 2001; Zheng & Wang, 2001).

Para a tribo já foi reportada a presença de alcaloides, terpenoides, flavonoides e saponinas. Em um estudo preliminar realizado no laboratório de fitoquímica do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, espécies como *Hyptis radicans* e *Hyptis multibracteata* apresentaram extratos com um alto potencial antioxidante e alta atividade de inibição da enzima transcriptase reversa (anti-HIV).

As espécies de *Hyptis* são aromáticas e comumente utilizadas no tratamento de infecções gastrointestinais, como analgésicos e antifúngicos (Oliveira et al., 2004; Silva et al., 2006). Estudos avaliaram a atividade farmacológica do extrato aquoso das folhas de *Hyptis suaveolens* (Santos et al., 2007), bem como do extrato em solventes orgânicos (hexano, clorofórmio ou acetato de etila) e aquoso das folhas de *Hyptis pectinata* (Bispo et al., 2001; Lisboa et al., 2006) indicando efeitos analgésicos, antiedematogênicos e reduzida toxicidade aguda em animais de laboratório. Em *Hyptis pectinata* foram encontrados diversos terpenoides, como monoterpenos, sesquiterpenos e triterpenos, além de lactonas sesquiterpênicas. A espécie apresentou atividades moluscicida, antimicrobiana, anti-edematogênica e antinociceptiva. Em *Hyptis suaveolens* também foram descritos diterpenos. A espécie apresentou atividades antimicrobiana, antifúngica, antitumoral, hipoglicemiante, hipotensiva, vasodilatadora, espasmogênica e, contraditoriamente, espasmolítica (Basílio et al., 2006). Atualmente, ambas espécies foram circunscritas a *Mesosphaerum*.

Atualmente são descritas na literatura atividades antinociceptivas e antiedematogênicas tanto para os extratos como para o óleo volátil. Entretanto, poucas são as espécies estudadas com comprovada ação medicinal. Um exemplo é *Hyptis capitata*, cuja composição química é descrita como contendo principalmente triterpenos como o ácido ursólico. Na composição de óleos voláteis podem ser citados: alfa e beta pinenos, canfeno, mentol, cimeno, e chavicol (Fonnegra & Jiménez, 2007).

Dos comentários acima, depreende-se que *Hyptis* constitui um gênero altamente promissor para estudos de prospecção de substâncias naturais farmacologicamente

ativas, favorecidos pela grande diversidade de espécies que ocorrem em biomas brasileiros.

Este trabalho possibilita relacionar os diferentes biomas com as variações fitoquímicas das espécies de *Hyptis* pertencentes a seção *Peltodon*, bem como proporciona a oportunidade de descrição de novas substâncias com potencial farmacológico como atividades antioxidantes e anti-HIV-1. Pretende-se, com esta proposta, verificar se há variações qualitativas e quantitativas dos principais constituintes químicos em espécies que ocorrem em dois biomas diferenciados pelas condições climáticas e edáficas: cerrado e mata atlântica.

2. Objetivo geral

Expansão das análises fitoquímicas e de atividades biológicas para cinco espécies de *Hyptis* pertencentes à seção *Peltodon*.

Como objetivos específicos deste trabalho estão:

- Verificar uma possível variação fitoquímica (quantitativa e/ou qualitativa) entre as espécies estudadas e coletadas nos biomas cerrado e mata atlântica.
- Avaliar o potencial antioxidante e anti-HIV de diferentes extratos e frações, assim como do óleo volátil, obtidos a partir de cinco espécies de *Hyptis* pertencentes à seção *Peltodon*.

3. Metodologia

3.1 Material biológico

As coletas serão realizadas com ajuda da especialista Cintia Luíza da Silva de acordo com seu local de ocorrência (Tabela 1). Serão coletados folhas, caules e flores (quando presentes) de três populações. Uma amostra exemplar de cada espécie será depositada no Herbário da Universidade de São Paulo (SPF).

Tabela 1 – Locais de ocorrência de *Hyptis* sect. *Peltodon*.

Espécies	Autor	Locais de ocorrência	Biomas
----------	-------	----------------------	--------

			Mata Atlântica	Cerrado
<i>Hyptis campestris</i>	Pohl	Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Paraná	x	x
<i>Hyptis comaroides</i>	A.St.-Hil. ex Benth.	Mato Grosso, Paraná	x	x
<i>Hyptis meridionalis</i>	Tolmatchew	Paraná	x	x
<i>Hyptis pusilla</i>	Pohl	Mato Grosso, Goiás, Tocantins, Bahia, Paraná, Minas Gerais	x	x
<i>Hyptis radicans</i>	Pohl	Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro	x	x

3.2 Produção dos extratos e triagem fitoquímica

Fragmentos de caule, folhas e flores (Figura 1) das cinco espécies dos dois biomas serão secos em estufa a 40°C por 1 semana. O material seco (mínimo de 10 g) será triturado e o pó obtido será extraído por maceração em etanol por sete dias a temperatura ambiente. O extrato bruto etanólico será seco em rotaevaporador e liofilizado para obtenção do rendimento. Parte do extrato liofilizado será particionado com hexano para originar duas frações: uma mais apolar (hexânica) e outra mais polar (etanólica). As frações serão concentradas e liofilizadas para a obtenção de seus rendimentos.



Figura 1 – A: *Hyptis comaroides*; B: *Hyptis pusilla*; C e E: *Hyptis radicans*; D: *Hyptis campestris* (Imagens: Herbário Virtual Saint- Hilaire <http://hvsh.cria.org.br/index>).

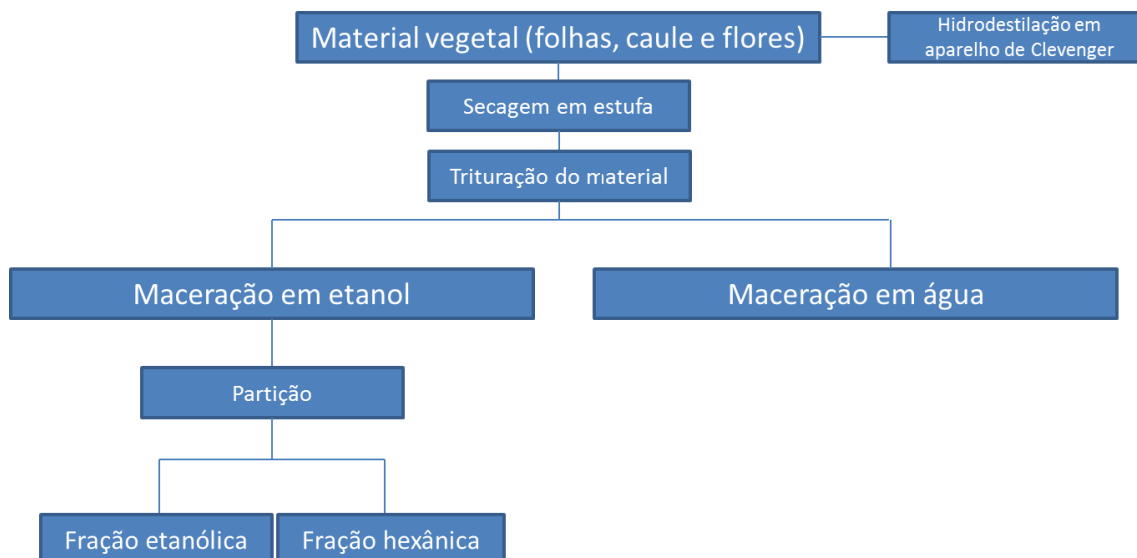


Figura 2 – Esquema da produção de extratos e frações de espécies de *Hyptis* sect. *Peltodon*.

A caracterização das substâncias presentes nos extratos e frações será realizada através de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), dependendo da polaridade do extrato.

A análise via CLAE será feita com detecção a 352 nm (que evidenciará constituintes flavonoídicos), a 280 nm (que permitirá a análise de outros fenólicos que não somente flavonas/flavonois) e 240 nm para análise de iridoides segundo metodologia de Chen *et al.* (2007); coluna Zorbax SB-C18 (250 X 4.6 mm, 5 mm, Agilent, USA). Solventes: ácido acético 0,4% **(A)** e acetonitrila **(B)**.

Serão utilizadas amostras autênticas de ácido gálico, catequinas, ácido elágico, rutina, apigenina e loganina para a identificação preliminar dos constituintes por seus espectros de absorção UV-Vis e tempos de retenção. Em seguida, os extratos serão enviados à Central Analítica IQ-USP para análise em CLAE/EM e obtenção dos espectros de massas. Para a quantificação dos constituintes individualmente, serão utilizadas as áreas dos picos no cromatograma (CLAE) comparadas a curvas de calibração obtidas com as amostras autênticas.

Amostras frescas (10 g) serão submetidas à hidrodestilação utilizando-se aparelho do tipo Clevenger por seis horas para obtenção de óleos voláteis, e o extrato obtido será recolhido em éter etílico. Para a identificação dos constituintes, o óleo volátil será submetido à CG/EM, em coluna capilar de sílica (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm) DB-5HT

utilizando-se a metodologia de Sylvestre *et al.* (2006). As concentrações relativas dos óleos voláteis serão determinadas por análises em CG, usando-se detector de ionização de chamas (FID).

Uma mistura padrão de *n*-alcanos (Sigma-Aldrich C8-C20) será utilizada para verificar o desempenho do sistema CG/EM e calcular o índice de retenção linear (IRL) de cada composto na amostra. O padrão (1 µL) desses alcanos será injetado no sistema CG/EM, operando nas mesmas condições de análise dos óleos, e seus respectivos tempos de retenção serão utilizados como padrão externo de referência para o cálculo do IRL, juntamente com os tempos de retenção de cada composto de interesse. O IRL de cada componente será calculado conforme a seguinte equação:

$$\text{IRL} = 100 \times [((t_c - t_n)/(t_{n+1} - t_n)) + n] \text{ (Viegas \& Bassoli, 2007)}$$

Onde: IRL - índice de retenção linear; t_c - tempo de retenção do composto de interesse; t_n - tempo de retenção do hidrocarboneto anterior ao composto de interesse; t_{n+1} - tempo de retenção do hidrocarboneto posterior; n - número de carbonos do hidrocarboneto anterior.

Todos os valores de IRL obtidos serão comparados com os valores presentes em Adams (2009).

3.3 Quantificações de substâncias

3.3.1 Quantificação de fenóis totais

Os extratos e frações serão analisados com relação à quantidade de substâncias fenólicas utilizando o método de Folin-Ciocalteu segundo Saldanha (2013) com modificações. Uma alíquota de 100 µL das amostras serão adicionados a 150 µL de Folin - Ciocalteu (previamente diluído em água 0,667: 9,333 48 v/v) e, em seguida, 50 µL de carbonato de sódio 10%. Após 60 minutos em temperatura ambiente a absorbância será medida a 760 nm. O conteúdo de fenóis totais será expresso em mg/g de extrato equivalentes a ácido gálico utilizando a equação baseada na curva de calibração do ácido gálico (1 a 40 µg/mL). Os brancos serão feitos utilizando metanol.

3.3.2 Quantificação de flavonas/flavonóis

Os extratos e frações serão analisados com relação à quantidade de substâncias flavonoídicas utilizando o método de Min *et al.* (2011). Uma alíquota de 25 µL das

amostras será adicionada a 100 µL de H₂O ultrapura e 7,5 µL de nitrito de sódio 5%. Após 5 minutos serão adicionados 15 µL de cloreto de alumínio 10%. Após 5 minutos serão adicionados 50 µL de NaOH 1M e 50 µL de H₂O ultrapura e após, a absorbância será medida a 515 nm. O conteúdo de flavonas/flavonóis será expresso em mg/g de extrato equivalentes a quercetina (flavonóis) ou apigenina (flavona) utilizando a equação baseada na curva de calibração de tal padrão (0,1 a 3 mg/mL). Os brancos serão feitos utilizando metanol.

3.3.3 Quantificação de proantocianidinas (taninos condensados)

Os extratos e frações serão analisados com relação à quantidade de taninos utilizando o método de Min *et al.* (2011). Uma alíquota de 40 µL das amostras serão adicionados a 100 µL de solução metanólica a 20% de H₂SO₄ e 100 µL de solução metanólica a 1% de vanilina. Após 30 minutos a temperatura de 30°C a absorbância será medida a 495 nm. O conteúdo de taninos condensados será expresso em mg/g de extrato equivalentes a tanino de quebracho utilizando a equação baseada na curva de calibração de tal padrão (0,1 a 3 mg/mL). Os brancos serão feitos utilizando metanol.

3.4 Testes *in vitro*

Tanto os extratos brutos (resultantes da maceração) quanto todas as frações, serão submetidos a análises de suas atividades biológicas em diferentes concentrações. Para todos os testes serão utilizados ácido ascórbico, ácido *p*-cumárico, quercetina e Trolox como controles positivos e metanol como controle negativo.

3.4.1 Ensaios de atividade antioxidante

3.4.1.1 Teste do sequestro do radical DPPH

Os ensaios de atividade de sequestro do radical DPPH seguirão o protocolo descrito por Rufino *et al.* (2007), que utilizam uma solução de DPPH 0,06 mM. Os extratos e frações serão pesados e diluídos em metanol até atingir as concentrações desejadas (100-1000 µg/mL). A análise será feita em leitor para microplacas do tipo ELISA a 517 nm, com triplicatas para as amostras e uso de controles positivos e negativos. Para cada 20 µL de amostra (ou dos controles) serão adicionados 200 µL da solução de DPPH sendo avaliada a absorbância após 20 minutos de reação. O cálculo da atividade de sequestro do DPPH

utilizará a fórmula $[(\text{Absorbância da amostra} - \text{Absorbância do controle negativo})/(\text{Absorbância do controle negativo})] \times 100$. Os resultados também serão expressos como equivalentes de quercetina e trolox em mmol por grama de extrato.

3.4.1.2 Sistema β -caroteno/ácido linoleico

Para a avaliação da atividade antioxidante através do sistema β -caroteno/ácido linoléico será utilizada a metodologia de Duarte-Almeida *et al.* (2006), com adaptações. Será preparada uma mistura reativa de 21 μL de ácido linoléico, 84 μg de Tween 40, 210 μL solução de β -caroteno a 2 mg/mL (em clorofórmio) e 500 μL de diclorometano. O solvente será evaporado sob nitrogênio até secar, sendo adicionados 25 mL de água previamente saturada de oxigênio (30 minutos). Espera-se que a absorbância da solução reativa esteja entre 0,6 e 0,7 a 470 nm. Para a reação serão misturados 250 μL da solução reativa e 10 μL da amostra (ou controles). As amostras serão mantidas a 45°C e as leituras (em triplicatas) serão feitas com intervalos de 15 min durante 120 min.

Os resultados serão calculados pela porcentagem de inibição da oxidação, calculada em relação ao decaimento da absorbância do controle (Ac). A queda da absorbância das amostras (Aam) será correlacionada com a queda do controle, obtendo-se a porcentagem da inibição da oxidação (% I) através da equação: $[(\text{Absorbância inicial do controle} - \text{Absorbância final do controle}) - (\text{Absorbância inicial da amostra} - \text{Absorbância final da amostra})/(\text{Absorbância inicial do controle} - \text{Absorbância final do controle})] \times 100$. Os resultados também serão expressos como equivalentes de trolox em mmol por grama de extrato.

3.4.1.3 Atividade quelante de ferro

A atividade dos extratos como quelantes de metais será avaliada segundo o método descrito por Min *et al.* (2011), utilizando-se 10 μL de cada extrato em 130 μL de tampão acetato 10%, 10 μL de sulfato de amônio ferroso e 10 μL de solução de ferrozine 61 mM. A absorbância será medida a 562 nm. Os resultados serão expressos como equivalentes de ácido gálico e trolox em mmol por grama de extrato.

3.4.1.4 Atividade redutora de ferro (III) a ferro (II)

A atividade dos extratos na redução de ferro (III) será avaliada segundo o método descrito por Dorman *et al.* (2004), utilizando-se 1 mL de cada extrato em tampão fosfato (0.2 M, pH 6.6) e uma solução aquosa de ferrocianeto de potássio $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 1%. A

mistura será incubada por 30 min a 50°C e posteriormente serão adicionados 2,5 mL de ácido tricloroacético 10%. Após centrifugação, a uma alíquota de 2,5 mL do sobrenadante serão misturados 2,5 mL de água e 0,5 mL de cloreto férrico [FeCl₃] 0.1%. A absorbância será medida a 700 nm. Os resultados serão expressos como equivalentes de ácido ascórbico e trolox em mmol por grama de extrato.

3.4.1.5 Degradação sítio não-específica do radical hidroxila mediada pela 2-Deoxy-D-ribose

A habilidade dos extratos em inibir sítio não-específico do radical hidroxila mediante peroxidação será avaliada segundo procedimento descrito por Dorman *et al.* (2004). A solução reativa será preparada usando-se 500 µL de extrato em tampão KH₂PO₄-KOH (50 mM, pH 7.4), 100 µL de uma solução 28 mM de 2-deoxy-D-ribose, 200 µL da solução contendo 100 µM de FeCl₃ e 104 mM de EDTA (1:1 v/v), 100 µL de 1 mM H₂O₂ e 100 µL de ácido ascórbico (1.0 mM). Os tubos serão agitados e incubados a 37 °C e serão adicionados 50 µL de BHT 2%, seguido de 1 mL de TCA 2.8% e 1 mL de TBA 1%. As amostras serão agitadas e incubadas em banho-maria, adicionando-se 2 mL de n-butanol. A absorbância será avaliada a 532 nm. A porcentagem de inibição será calculada utilizando-se a fórmula: $[(\text{Absorbância do controle} - \text{Absorbância da amostra}) / (\text{Absorbância do controle})] \times 100$. Os resultados também serão expressos como equivalentes de trolox em mmol por grama de extrato.

3.4.1.6 Degradação sítio-específica do radical hidroxila mediada pela 2-Deoxy-D-ribose

Para esta análise, o protocolo descrito no item *d* será utilizado e o EDTA será substituído por tampão.

3.4.1.7 ORAC (oxygen radical absorbance capacity)

A capacidade antioxidante dos extratos também será avaliada pelo método ORAC seguindo-se o protocolo descrito por Min *et al.* (2011). A resposta fluorescente será determinada a 485 nm de comprimento de onda de excitação e 520 nm de emissão. Trolox será utilizado como controle positivo. 25 µL de cada amostra ou padrão serão misturados a 150 µL de solução de fluoresceína (67,95 nM de concentração final). As placas serão incubadas a 37°C por 20 min. Após a adição de 25 µL de AAPH (37,71 mM de concentração final), a fluorescência será medida em intervalos de 2 min por 70 min. Os

valores ORAC serão calculados usando a equação de regressão linear da curva construída com Trolox (6,25 a 50 µM). Os valores ORAC serão expressos em equivalentes de trolox em mmol por grama de extrato.

Segundo a metodologia de Mavundza *et al.* (2010), para todos os testes antioxidantes, a porcentagem de atividade antioxidante será plotada contra as concentrações testadas (µg/mL) para a determinação da concentração mínima efetiva capaz de eliminar 50% do radical no ensaio (MEC₅₀).

3.4.2 Avaliação do efeito anti-HIV

3.4.2.1 Atividade de inibição da atividade da transcriptase reversa (HIV-1)

Será avaliada a atividade anti-HIV pelo efeito inibidor sobre a transcriptase reversa de HIV-1. Os ensaios serão realizados por meio de método colorimétrico que tem a vantagem de não necessitarem do uso de radioisótopos, como as técnicas tradicionais com [3H]-dTTP. A atividade será medida com o uso do Kit ELISA RT (Roche), conforme instruções do fabricante. As amostras serão dissolvidas em DMSO (dimetilsulfoxido) e para cada 20 µL da amostra serão acrescidos 200 µL da solução DIG (solução com marcação de digoxigenina) na concentração de 200 µM. As soluções serão incubadas por 2 h a 37°C. Após, serão adicionados a cada amostra, 200 µL da solução anti-DIG-POD e posteriormente o substrato ABST. Como inibidor de transcriptase reversa HIV- 1 será utilizado o antiviral Foscarnet. Será feita leitura da absorbância em 405 nm/490 nm (A405/490) em leitor de microplacas ELISA (Wang *et al.*, 2008). A atividade de inibição da atividade anti-HIV1 será calculada usando a formula $[(\text{Absorbância do controle negativo} - \text{Absorbância da amostra})/(\text{Absorbância do controle negativo})] \times 100$.

3.4.2.2 Atividade de inibição de proteases

O protocolo proposto por Mushi *et al.* (2012) será utilizado. A protease HIV-1-PR será diluída em tampão de acetato de sódio (pH 5.0, 50 mM, EDTA.2Na 1 mM e 2-mercaptoetanol 2 mM). Essa solução será misturada com glicerol na proporção de 3:1. O substrato para a protease (Arg-Val-Nle-(pNO₂-Phe)-Glu-Ala-Nle-NH₂) será diluído em tampão acetato de sódio (pH 5.0, 50 mM). 2 µL do extrato e 4 mL de solução HIV-1 PR (0.025 mg/mL) serão adicionados a solução que contem 2 mL de tampão e 2 mL da solução de substrato (2 mg/mL), incubando-se a 37 °C por 1 hora. A reação será

interrompida por aquecimento 90 °C por 1 minuto. Posteriormente, 20 mL de água estéril serão acrescentados e uma alíquota de 10 mL e será analisada por HPLC usando uma coluna RP-18 (4.6 x 150 mm, 5 mm), acetronitrila (15-40%) e ácido trifluoroacético (TFA) 2% em água como fases móveis. O perfil de eluição será monitorado a 280 nm. A atividade de inibição sobre HIV-1-PR será calculada usando-se a fórmula: $[(\text{área do pico do controle negativo} - \text{área do pico da amostra}) / (\text{área do pico do controle negativo})] \times 100$.

Em todos os ensaios biológicos serão realizadas análises em triplicatas para cada concentração testada. Após se obter as médias para os tratamentos será realizada uma análise estatística utilizando Anova (Tukey's multiple comparison test), sendo considerados diferentes os valores médios para $p < 0.001$ quando comparados aos controles negativos e positivos.

4. Plano de trabalho e cronograma

Os primeiros anos de trabalho serão dedicados à coleta das espécies, preparo do material, extratos e frações. Em seguida serão iniciados os testes de bioatividade com previsão de um ano e meio de trabalho. Os resultados do projeto deverão ser compilados e discutidos com a equipe a cada três meses a fim de facilitar a elaboração de relatórios, painéis, trabalhos científicos e da dissertação e tese.

Atividades	1º ano											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Coleta do material												
Extrações												
Quantificação de fenóis totais												
Quantificação de flavonoides totais												
Quantificação de taninos condensados totais												
Compilação de resultados												
Congressos												
	2º ano											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Coleta do material												
Extrações												
CLAE/EM, CG/EM												
Quantificação de fenóis totais												
Quantificação de flavonoides totais												
Quantificação de taninos condensados totais												
Compilação de resultados												
Congressos												

	3º Ano											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Atividades Biológicas												
Compilação de resultados												
Congressos												
	4º Ano											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Atividades Biológicas												
Compilação de resultados												
Preparo de dissertação, artigos e defesa												

5. Referências Bibliográficas

- Adams, R.P. 2009. Identification of essential oil components by gas chromatography-mass spectrometry (4a. ed.). Allured Business Media, Carol Stream.
- Albuquerque, U. P., Ramos, M. A., & Melo, J. G. (2012). New strategies for drug discovery in tropical forests based on ethnobotanical and chemical ecological studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 140(1), 197–201.
- Antunes, A. J.; Canhos, V. Aditivos em Alimentos. Campinas: Editora da UNICAMP, 1984.
- Basílio, I.J.L.D.; Agra, M.F.; Rocha, E.A. 2006. Estudo Farmacobotânico Comparativo das Folhas de *Hyptis pectinata* (L.) Poit. e *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae). *Acta Farm. Bonaerense* 25: 518-25.
- Bispo, MD; Mourao, RHV; Franzotti, EM; Bomfim, KBR; Arrigoni-Blank, M.F.; Moreno, M.P.N.; Marchioro, M; Antonioli, A.R. 2001. Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology* 76 :81–86.
- Brenna, O.V.; Pagliarini, E. 2001. Multivariate analyses of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines. *J. Agric. Food Chemistry*. Chicago: v.49, p. 4841-4844.
- Calixto, J.B. 2005. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. *Journal of Ethnopharmacology* 100: 131-134.
- Cechinel Filho, V. & Yunes, R.A. 1998. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova* 21: 99-105.
- Chen, C.Y.; Qi, L.W.; Li, H.J.; Li, P.; Yi, L.; Ma, H.L.; Tang, D. 2007. Simultaneous determination of iridoids, phenolic acids, flavonoids and saponins in Flos Lonicerae and Flos Lonicerae Japonicae by HPLC-DAD-ELSD coupled with principal component analysis. *J. Sep. Sci.* 30: 3181-3192.
- Conte, L.A. 1996. Shaman pharmaceuticals' approach to drug development. In : M.J. Balick, E. Elisabetsky & A.S. Laird (eds.). *Medicinal resources of the Tropical Forest - biodiversity and its importance to human health*. New York: Columbia University Press, p. 94-100.
- Coley, P., Heller, M., & Aizprua, R. (2003). Using ecological criteria to design plant collection strategies for drug discovery. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 1(8), 421–428.
- Dewick, P.M. 2009. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. 3rd ed. London: John Wiley & Sons, 539 p.
- Donaldson, J. R., & Cates, R. G. (2004). Screening for Anticancer Agents from Sonoran Desert Plants: A Chemical Ecology Approach. *Archives Of Physiology And Biochemistry*, 42(7), 478–487.

- Duarte-Almeida, J.M.; Santos, R.J.; Genovese, M.I.; Lajolo, F.M. 2006. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 26: 446-452.
- Dudt, J.F. & Shure, D.J. 1994. The influence of light and nutrients on foliar phenolics and insect herbivory. *Ecology* 75: 86-98.
- Dorman, H.J.; Bachmayer, O.; Kosar, M.; Hiltunen, R. 2004. Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 762-770.
- Dudai, N., Putievsky, E., Ravid, U., Palevitch, D. & Halevy, A.H. 1992. Monoterpene content in *Origanum syriacum* as affected by environmental conditions and flowering. *Physiologia Plantarum* 84: 453-459.
- Eadie, M.J. 2004. The antiepileptic *Materia Medica of Pediacus Dioscorides*. *Journal of Clinical Neuroscience* 11 (7): 697-701.
- Fenemma, O.R. Química de los alimentos. 2.ed. Zaragoza: Acribia, 1993.
- Fonnegra, G.R.; Jiménez, R.S.L. 2007. Plantas Medicinales Aprobadas en Colombia. 2ª Ed. Editorial Universidad de Antioquia. p.66.
- Gobbo-Neto, L.; Lopes, N.P. 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabolitos secundários. *Química Nova* 30: 374-381.
- Harley, R.M.; Pastore, J.F.B. 2012. A generic revision and new combinations in the Hyptidinae (Lamiaceae), based on molecular and morphological evidence. *Phytotaxa* 58: 1-55.
- Jeong, S.T., Goto-Yamamoto, N., Kobayashi, S. & Esaka, M. 2004. Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. *Plant Science* 167: 247-252.
- Karousou, R., Grammatikopoulos, G., Lanas, T., Manetas, Y. & Kokkini, S. 1998. Effects of enhanced UV-B radiation on *Mentha spicata* essential oil. *Phytochemistry* 49: 2273-2277.
- Kutchan, T.M. 2001. Ecological Arsenal and Developmental Dispatcher. The Paradigm of Secondary Metabolism. *Plant Physiology* 125, 58-60.
- Lisboa, A.C.; Mello, I.C.; Nunes, R.S.; Dos Santos, M.A.; Antonioli, A.R.; Marçal, R.M.; Cavalcanti, S.C. 2006. Antinociceptive effect of *Hyptis pectinata* leaves extracts. *Fitoterapia* 77:439-42.
- Markham, K.R., Tanner, G.J., Caasi-Lit, M., Whitecross, M.I., Nayudu, M. & Mitchell, K.A. 1998. Possible protective role for 3', 4'-dihydroxy flavones induced by enhanced UV-B in a UV-tolerant rice cultivar. *Phytochemistry* 49: 1913-1919.
- Mavundza, E. Tshikalange, T.E; Lall, N.; Hussein, A.A.; Mudau, F.N.; Meyer, J.J. M. 2010. Antioxidant activity and cytotoxicity effect of flavonoids isolated from *Athrixia phylicoides*. *Journal of Medicinal Plants Research* 4, 2584-2587.
- Menezes, I.A.; Marques, M.S.; Santos, T.C.; Dias, K.S.; Silva, A.B.; Mello, I.C.; Lisboa, A.C.; Alves, P.B.; Cavalcanti, S.C.; Marçal, R.M.; Antonioli, A.R. 2007. Antinociceptive effect and acute toxicity of the essential oil of *Hyptis fruticosa* in mice. *Fitoterapia* 78:192-195.
- Min, B.; McClung, A.M.; Chen, M-H. 2011. Phytochemicals and antioxidant capacities in rice brans of different color. *Journal of Food Science* 76: 117-126.
- Mushi, N.F.; Mbwapo, Z.H.; Innocent, E.; Tewtrakul, S. 2012. Antibacterial, anti-HIV-1 protease and cytotoxic activities of aqueous ethanolic extracts from *Combretum adenogonium* Steud. Ex. A. Rich (Combretaceae). *BMC Complementary and Alternative Medicine* 12: 163.

- 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.
- Pignal M., Romaniuc-Neto S., De Souza S., Chagnoux S. & Lange Canhos D. A. 2013. Saint-Hilaire virtual herbarium, a new upgradeable tool to study Brazilian botany. Adansonia, sér. 3, 35 (1): 7-18. <http://dx.doi.org/10.5252/a2013n1a1>
Imagens: <http://hvsh.cria.org.br/index> site consultado na data de 08/08/2013 as 11:30 a.m.
- Rodriguez, E. & West, J.E. 1995. International research on biomedicines from the tropical rainforest. Interciencia 20: 140-143.
- Rufino, M.M.; Eslesbão, A.R.; Sousa de Brito, E.; Maia de Moraes, S.; Sampaio, C.G.; Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F.D. 2007. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. Comunicado técnico on line. ISSN 1679-6535. Fortaleza, CE.
- Saldanha, L.L. 2013. Prospecção química e avaliação das atividades antioxidante e alelopática de *Myrcia bella* Cambess. Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Botânica).
- Santos, R.I. 2004. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: C.M.O. Simões, E.P. Schenkel, G. Gosmann, J.C.P. Mello, L.A. Mentz & P.R. Petrovik (orgs.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: Editora da UFSC, pp. 403-434.
- Santos, T.C.; Marques, M.S.; Menezes, I.A.C.; Dias, K.S.; Silva, A.B.L.; Mello, I.C.M.; Carvalho, I.C.S.; Cavalcanti, S.C.H.; Antonioli, A.R.; Marçal, R.M. 2007. Antinociceptive effect and acute toxicity of the *Hyptis suaveolens* leaves aqueous extract on mice. *Fitoterapia* 78:333-336.
- Simão, A. M. Aditivos para alimentos sob o aspecto toxicológico. São Paulo: Nobel, 1985.
- Simões, C.M.O. et al. (Ed.). 2010. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6 ed. Porto Alegre: Editora UFRGS, 1104p.
- Silva, A.; Dias, K.; Marques, M.; Menezes, I.; Santos, T.; Mello, I.; Lisboa, A.; Cavalcanti, S.; Marçal, R.; Antonioli, A. 2006 Avalia do efeito antinociceptivo e da toxicidade aguda do extrato aquoso de *Hyptis fruticosa* Salmz. Ex Benth. Revista Brasileira de Farmacognosia 16: 475-479.
- Sylvestre, M.; Pichette, A.; Longtin, A.; Nagau, F.; Legault, J. 2006. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. Journal of Ethnopharmacology 103: 99-102.
- Taiz L., Zeiger E. (2009) Fisiologia Vegetal. 4ª edição. ed. Artmed, 819 p.
- Tattini, M., Galardi, C., Pinelli, P., Massai, R., Remorini, D. & Agati, G. 2004. Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. New Phytologist 163: 547-561.
- Vickery M. L.; Vickery B. 1981. Secondary Plant Metabolism. London and Basingstoke: Mc Millan, 334 p.
- Vieira, R.F. 1999. Conservation of medicinal and aromatics plants in Brazil. In : J. Janick (ed.). Perspectives on new crops and new uses . ASHS Press, Alexandria, p. 152-159.
- Viegas, M.C.; Bassoli, D.G. 2007. Utilização do índice de retenção linear para caracterização de compostos voláteis em café solúvel utilizando GC-MS e coluna HP-INNOWAX. Quimica Nova 8: 2031-2034.
- Wang, R.R; Gu, Q.; Wang, Y.H.; Zhang, X.M.; Yang, L.M.; Zhou, J.; Chen, J.; Zheng, Y. 2008. Anti-VIH-1 activities of compounds isolated from the medicinal plant *Rhus chinensis*. Journal of Ethnopharmacology 117: 249-256.

- Yildirim, A.; Mavi, A.; Kara, A.A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. J. Agric. Food Chemistry. Chicago: v.49, p. 4083-4089, 2001.
- Zheng, W.; Wang, S.Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. J. Agric. Food Chemistry. Chicago: v.49, p. 5165-5170, 2001. Visão Acadêmica, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, Jan.- Jun./ 2004.