



**JOÃO PEDRO MIRANDA ROCHA**

**VALIDAÇÃO ANALÍTICA PARA DOSEAMENTO DE  
IRIDOIDES TOTAIS EM *Stachytarpheta sellowiana* Schauer.  
(VERBENACEAE) oriundas de diferentes ambientes e processos  
de secagem.**

**LAVRAS – MG  
2021**

**JOÃO PEDRO MIRANDA ROCHA**

**VALIDAÇÃO ANALÍTICA PARA DOSEAMENTO DE  
IRIDOIDES TOTAIS EM *Stachytarpheta sellowiana* Schauer.  
(VERBENACEAE) oriundas de diferentes ambientes e processos  
de secagem.**

Monografia apresentada à Universidade Federal de  
Lavras, como parte das exigências do Curso de Ciências  
Biológicas, para a obtenção do título de Licenciado.

Prof (a). Dr (a). Suzan Kelly Vilela Bertolucci

Orientador (a)

Ms. Thainá Oliveira

Coorientador (a)

**LAVRAS – MG  
2021**

## AGRADECIMENTOS

Primeiro a minha mãe Amada, que em um mundo de dificuldades e desafios, lutou bravamente por minha educação, sempre me incentivando a estudar. Obrigado por ser eternamente meu porto seguro.

A Universidade Federal de Lavras (UFLA), Departamento de Biologia (DBI) e Departamento de Agricultura (DAG), pela oportunidade de e estrutura para realização do curso e dos trabalhos realizados.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsas.

A minha orientadora, professora Suzan Kelly Vilela Bertolucci, que com toda dedicação, paciência, profissionalismo e inteligência, me orientou durante 3 anos de iniciação científica, compartilhando seus conhecimentos. Obrigado por ser uma grande inspiração!

A Thainá Oliveira, que muito mais que uma coorientadora, me ajudou e me incentivou durante o período de trabalho que estive com ela, às risadas, parceria, desafios. Agradeço pelo apoio e levarei a amizade por toda a vida.

Ao Alexandre Alves de Carvalho (UFLA) pela contribuição e considerações na minha monografia.

Aos melhores amigos, Nadine, Gabriel, Giovana e Luanda por estarem sempre comigo, ajudando em minha jornada de diversas formas. Gratidão!

Agradeço em especial a minha família, que apesar das nossas diferenças nunca deixaram de me apoiar, sempre deixaram de lado qualquer desavença e me ajudaram. Quero agradecer por tudo que já fizeram, e dizer quanto são especiais para mim. Agradeço á Deus pela família que tenho!

E finalmente, os funcionários e parceiros do Horto de Plantas Medicinais da UFLA. Dico (Leandro), Paulo, Giulia e Annete, pelos conhecimentos e todo suporte pessoal e acadêmico.

## RESUMO

O gervão (*Stachytarpheta sellowiana*), é uma planta nativa do Brasil, endêmica da região sudeste de Minas Gerais, que apresenta risco de extinção. No gênero *Stachytarpheta*, algumas espécies já são bem descritas em relação a sua atividade biológica, apresentando atividade anti-inflamatória, antinociceptiva, antioxidante, inseticida, fungicida e antibacteriana. Suas atividades biológicas estão relacionadas principalmente aos compostos iridóides e ao verbascosídeo presentes na planta. A validação de métodos analíticos rápidos, confiáveis, econômicos e simples permite o acompanhamento dos teores de metabólitos secundários em plantas, quando ainda não se tem um marcador químico definido. Além disso, métodos espectrofométricos para doseamento de classes de metabólitos são aceitos por compêndios oficiais. Objetivou-se validar o método analítico para a quantificação de iridoides totais de *Stachytarpheta sellowiana* Schauer e aplicar este método em amostras oriundas de diferentes ambientes (canteiro, casa de vegetação, cultivo in vitro e serra do campestre) e submetidas a diferentes processos de secagem (40°C e 60°C em estufa, pleno sol e sombra). Inicialmente, o preparo da amostra foi avaliado frente a diferentes solventes (KOH10%, MeOH 70% e EtOH 70% e suas combinações) ( $n=7$ ). Após a definição das condições extrativas para o preparo da amostra, seguiu-se as etapas de validação para quantificação do teor percentual de iridoides totais em folhas pulverizadas de *S. sellowiana*, expressos em equivalentes de aucubina (mg/100g). A validação do método analítico por espectrofotometria de absorção molecular no UV-vis, seguiu os critérios do guia ICH – International Conference on Harmonisation (ICH, 1996) e da Resolução RE nº 166, de 24 de julho de 2017 da ANVISA (BRASIL, 2017). O método se mostrou seletivo a 622 nm, por não ter apresentado absorção significativa em solução de leitura sem adição do reagente de coloração, sendo linear na faixa de 0,0125 a 0,2 mg/mL,  $R^2=0,9968$ . Apresentou precisão inter-dia (DPR = 1,82%) e intra-dia (DPR = 1,41%), exato com recuperação baixa, média e alta de 94,27%, 95,40% e 95,28% respectivamente, e robusto frente a pequenas variações no comprimento de onda de leitura. Os limites de quantificação e detecção foram 0,0125 mg/mL e 0,0041 mg/mL, respectivamente. Quanto ao fator ambiental, os resultados evidenciaram que amostras da Serra do Campestre, MG de *S. sellowiana* possuem o maior teor de iridoides totais. Para as amostras que passaram por diferentes modos de secagem, a melhor foi 40°C.

**Palavras-chaves:** Gervão-roxo, Validação analítica, Aucubina total, Espectrofotometria

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Stachytarpheta sellowiana</i> Schauer (Verbenaceae) em habitat natural na Serra do Campestre – Lavras, MG.....	11
Figura 2 – <i>Stachytarpheta sellowiana</i> Schauer (Verbenaceae) cultivada em casa de vegetação no DAG, UFLA – Lavras, MG.....	12
Figura 3 – Iridomirmecina.....	15
Figura 4 – Sistema iridano para compostos iridoídeos, numeração = C e R = H ou glicose. Conforme SAMPAIO-SANTOS e KAPLAN, 2001 .....	15
Figura 5 – Biossíntese de iridoídeos a partir do Pirofosfato de geranila (GPP) conforme SOUZA e CHAVES, 2019 .....	16
Figura 6 – 1 - fulvoipolamiida, 2 - ipolamiida, 3 - acteosídeo .....	17
Figura 7 – 2 - acteosídeo, 3 - leucosceptosídeo A, 4 - martinósídeo e 5 - jionosídeo D .....	18
Figura 8 – Simplex centroid design preparado usando misturas de três solventes KOH 10% (A), Metanol 70% (B) e Etanol 70% (C).....	26
Figura 9 – Simplex centroid design preparado usando misturas de três solventes KOH 10%, Metanol 70% e Etanol 70%.....	32
Figura 10 - Gráfico 3D representando as médias das absorvâncias.....	33
Figura 11 - Espectro de varredura UV do extrato de <i>S. sellowiana</i> Schauer sem adição do reagente Trim-Hill, frente ao metanol 70%.....	34
Figura 12 - Espectro de varredura no UV do extrato de <i>S.sellowiana</i> Schauer com adição do reagente Trim-Hill, frente ao reagente de Trim-Hill.....	35

Figura 13 - Média das curvas analíticas de aucubina obtidas por espectrofotometria (622 nm) para a quantificação de iridoides. A equação da reta e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) se referem à média das três curvas.....	36
Figura 14 - Influência do tempo de reação, temperatura, volume de Trim-Hill e comprimento de onda na quantificação de iridoide, expresso em aucubina, em 10 mg de folhas de <i>S.sellowiana</i> Schauer.....	39
Figura 15 - Diferentes habitats no teor de iridoides totais (%) expressos em aucubina de <i>S. sellowiana</i> .....	40
Figura 16 - Influência do tipo de secagem no teor de iridoides totais (%) expressos em aucubina de <i>S. sellowiana</i> .....	43

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições extrativas relatadas na literatura para doseamento de iridóides em diversas espécies de plantas.....	24
Tabela 2 – Proporções em volume das misturas de extração. UFLA, Lavras - MG, 2021.....	25
Tabela 3 – Composição química dos diferentes substratos das origens de amostras de <i>S. sellowiana</i> .....	29
Tabela 4 – Dados empregados na construção da curva analítica de aucubina para o doseamento espectrofotométrico de iridoides.....	36
Tabela 5 - Teores de iridoides totais em folhas de <i>S. sellowiana</i> , expressos em aucubina, obtidos na determinação da precisão intra-corridas e inter-corridas.....	37
Tabela 6: Valores de recuperação de iridoides totais no extrato MetOH 70% de <i>S. sellowiana</i> (média, $n=3$ ).....	38

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>8</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>10</b>
2.1 Aspectos gerais da espécie. ....	10
2.2 Atividades biológicas do gênero Stachytarpheta e espécies.....	13
2.3 Químicas dos Iridoides do gênero Stachytarpheta e espécies. ....	15
2.4 Validações Analíticas. ....	19
2.5 Fatores que influenciam o teor de metabólitos secundários. ....	20
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
3.1 Equipamentos e Reagentes. ....	23
3.2 Obtenção do material vegetal para os ensaios de otimização extrativa e validação analítica. ....	23
3.2.1 Otimização extrativa dos Iridoides. ....	23
3.2.2 Preparo da amostra. ....	26
3.2.3 Reação de coloração e leitura das absorbâncias. ....	26
3.2.4 Validação analítica. ....	27
3.3 Obtenção das amostras oriundas de diferentes ambientes de cultivo. ....	28
3.4 Teor de Iridóides totais frente a diferentes métodos de secagem. ....	30
3.5 Doseamento de Iridoides totais. ....	31
3.6 Análise estatística. ....	31
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>32</b>
4.1 Otimização extrativa de Iridoides. ....	32
4.2 Validação analítica. ....	33
4.3 Fatores ambientais no teor de Iridoides totais. ....	40
4.4 Influência do tipo de secagem no teor de Iridoides totais. ....	43
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>45</b>
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>46</b>
<b>Apêndice A</b> .....	<b>53</b>



## 1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais e fitoterapia sempre ocuparam um papel fundamental no dia a dia das pessoas, em razão ao conhecimento de suas aplicações e possíveis potencialidades terapêuticas. Os efeitos terapêuticos, podem ser inúmeros e eles existem devido ao metabolismo secundário dos vegetais. Esse metabolismo contém vários compostos que são os responsáveis pelas atividades biológicas.

É sabido que, muitas plantas são utilizadas na medicina popular, e dentre elas, destacam-se as da família Verbenaceae, que é composta por cerca de 40 gêneros e aproximadamente 1.200 espécies (FLORA DO BRASIL, 2021). Nessa família, encontramos o gênero *Stachytarpheta* com relatos cientificamente comprovados de potencial medicinal, como anti inflamatória e anti artrítica em *S. jamaicensis* (SULAIMAN et al., 2009) e antinociceptiva e anti bacteriana em *S. urticaefolia* (CHOWDHURY et al., 2004) Para a maioria das espécies do gênero *Stachytarpheta*, suas atividades biológicas estão relacionadas majoritariamente à sua composição química contendo iridoide ipolamiida e verbascosídeos (VICCINI et al., 2008).

Na região de Lavras, Minas Gerais, encontramos uma espécie sem nenhum tipo de pesquisa publicada até a data da escrita desse trabalho, a *Stachytarpheta sellowiana* Schauer. Através de pesquisas bibliográficas foi possível verificar que a mesma é uma espécie ameaçada de extinção, nativa do Brasil, endêmica do cerrado mineiro, (UNIÃO INTERNACIONAL PARA CONSERVAÇÃO DA NATUREZA - IUCN, 2017; FLORA DO BRASIL, 2021), fatores que justificam o estudo da variedade em questão.

Por se tratar de uma pesquisa inédita, muitos processos precisam ser definidos ainda, e um deles é a descoberta dos marcadores químicos que é utilizado como referência no controle de qualidade da matéria prima vegetal e dos medicamentos (SOBRINHO, et al., 2008).

Nesse sentido a validação analítica pode ser útil no estudo de metodologias específicas, ou seja, é a avaliação sistemática de um método por meio de ensaios experimentais de modo a confirmar e fornecer evidências objetivas de que os requisitos específicos para seu uso pretendido são atendidos (BRASIL, 2017).

Para o uso rotineiro de um método analítico é imprescindível que este esteja validado de acordo com os órgãos responsáveis, mostrando dessa forma uma qualidade das medições e

análises químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade (DIAS, 2019).

Existem as técnicas mais utilizadas nas análises qualitativas e quantitativas de amostras vegetais são cromatografia em fase gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC) (NAVES et al., 2014). No entanto, o método de determinação quantitativa por espectrofotometria no UV-Vis ainda se destaca entre estas, por ser uma técnica de baixo custo, de fácil manuseio, rápida e muito adequada às rotinas laboratoriais (ALVES et al., 2015; NAVES et al., 2014).

Estudos prévios indicam que a *Stachytarpheta sellowiana*, pode possuir como compostos majoritários os iridoides. Com isso vê-se a necessidade de avaliar de forma sistemática o método de quantificação de iridoides totais expressos em aucubina pelo método colorimétrico, (TRIM & HILL, 1951) por meio de ensaios experimentais de modo a confirmar e fornecer evidências objetivas de que os requisitos específicos para o uso de princípios ativos para o emprego medicinal sejam atendidos.

Pertinente aos problemas expostos, esse trabalho objetivou encontrar o melhor solvente extrativo e desenvolver e validar um método analítico para a quantificação espectrofotométrica de iridoides totais em *Stachytarpheta sellowiana*, em quatro ambientes de cultivo e submetidas a quatro processos de secagem.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Aspectos gerais da espécie.

A família Verbenaceae é comumente conhecida como a família da verbena ou da veia, é composta por cerca de 40 gêneros e aproximadamente 1.200 espécies. Estas espécies são distribuídas em todo o mundo, principalmente em regiões tropicais, sendo encontradas na natureza em diferentes portes, como árvores, arbustos e herbáceas, apresentando flores em sua grande maioria. Esta família está presente em praticamente todos os ecossistemas terrestres, sendo uma das cinco mais importantes entre as eudicotiledôneas dos campos rupestres (PIMENTA et al., 2007). Além disso, as plantas da família Verbenaceae são bastante conhecidas pelos seus usos na medicina tradicional de muitos países. Várias plantas desta família apresentam relatos de possuírem compostos fitoquímicos bioativos com importantes efeitos farmacológicos (RAHMATULLAH et al., 2011).

Dentro da família Verbenaceae encontramos o gênero *Stachytarpheta*, que possui cerca de 130 espécies. No Brasil encontram-se 79 espécies deste gênero, representando um importante centro de diversidade. Na Cadeia do Espinhaço ocorre mais da metade das espécies brasileiras (44 spp.), 30 de ocorrência em Minas Gerais, sendo 23 endêmicas (ATKINS, 2005). A maioria das espécies são arbustos ou subarbustos ramificados, com cerca de 0,5-1,5 m de altura, embora algumas espécies possam alcançar até 4,0 m. Suas flores são dispostas de forma espiralada ao longo do eixo da inflorescência, de maneira compacta. Apresentam corolas bastante vistosas e facilmente localizadas à distância no campo, comumente azuis, mas podem apresentar várias colorações dependendo da espécie, como vermelhas, lilases, laranjas, brancas ou negras (SALIMENA; GIULIETTI 1998; ATKINS 2005).

*Stachytarpheta sellowiana* Schauer é uma planta nativa e endêmica do Brasil e encontra-se em ameaça de extinção (IUCN, 2017; REFLORA, 2018). É principalmente encontrada na região Sudeste, mais especificamente de Minas Gerais. Seu domínio fitogeográfico é o cerrado, com tipo de vegetação de Campo Rupestre e substrato terrícola. Campo rupestre é uma vegetação campestre que ocorre em áreas montanhosas, basicamente acima de 900 m de altitude, ocupando principalmente trechos de solos litólicos associados a afloramentos de quartzito, arenito ou minérios de ferro e manganês. Associa-se principalmente aos domínios do Cerrado e da Caatinga (REFLORA, 2018).

Quanto a suas características botânicas descritas em ambientes controlados, encontram-se: Sua forma de vida é de subarbustos ramificados variando seu tamanho desde 0,6 - 1,2 m de altura. Suas folhas medem entre 2 – 5cm x 1 - 2 cm, patentes, ápice obtuso, base atenuada, margem inteira próximo a base, porção superior crenada ou serrada. Suas flores se apresentam na forma de Inflorescência com 2,3 - 6 x 3 cm, congesta; com brácteas medindo 0,7 - 0,8 cm de comprimento, lanceoladas; cálice com aproximadamente 1,4 cm comprimento; corola com aproximadamente 1,5 cm comprimento, com estames inseridos na metade do tubo da corola. Fruto cerca de 0,8 cm de comprimento, apiculado, com superfície externa reticulada (FIGURA 1 e 2) (REFLORA, 2018).

**Figura 1** – *Stachytarpheta sellowiana* Schauer (Verbenaceae) em habitat natural na Serra do Campestre – Lavras, MG.



Fonte: Do autor (2021).

**Figura 2** – *Stachytarpheta sellowiana* Schauer (Verbenaceae) cultivada em casa de vegetação no DAG, UFLA – Lavras, MG.



Fonte: Do autor (2021).

Seu caule é do tipo herbáceo, ereto, cilíndrico, com tricomas do tipo glandular; folhas em forma obovalada com filotaxia oposta, subséssil, margens crenadas/serreadas, inteira. A pilosidade das faces adaxial e abaxial apresentam tricomas do tipo glandular, de consistência semi-coriácea. A Inflorescência é tipo racemosa com espigas terminais, brácteas verdes, apressas, persistente com tricomas glandulares. Flores monoclinas, zigomorfas sésseis; cálice tubuloso dentado, verde, tricoma glandular presente persistente; corola azul infundibuliforme; 2 estames férteis, 2 estaminódios inclusos; ovários súpero glabro 2 lóculos. Frutos secos esquizocárpicos, 2 mericarpos unisseminados castanho escuro (REFLORA, 2018).

Esta espécie adaptou-se às condições de fogo. Sua raiz tuberificada apresenta crescimento imediatamente após um incêndio. Acredita-se que a germinação de sementes também pode ser dependente do fogo (ATKINS, 1996).

## 2.2 Atividades biológicas do gênero *Stachytarpheta* e espécies.

O primeiro trabalho descrito no que tange atividade biológica no gênero *Stachytarpheta* foi de DE LUCA e BENAYS , (1981) onde avaliou o efeito inibitório de alimentação nas lagartas *Locusta migratória*, *Schistocerca gregária*, *Spodoptera littoralis* devido a ipolamiida provinda de *Stachytarpheta mutabilis* da América do Sul.

A espécie *Stachytarpheta cayennensis* foi citada em trabalhos de etnobotânica conhecida popularmente como gervão, gervão roxo, rinchão na ilha do marajó (Pará - Brasil), os relatos de comunidades caboclas, eram a utilização de raízes e folhas na forma de chá e tintura no tratamento de hemorróidas, diurético, analgésico, tranquilizador e para problemas bronquiais. (HAMMER & JOHNS, 1993).

Schapoval et al., (1998), demonstrou que extratos etanólicos e *n*-BuOH de folhas secas de *Stachytarpheta cayennensis*, possuíam atividade anti-inflamatória devido ao efeito inibitório da formação de edemas de pata induzidos por carragenina em camundongos. Também foi constatado inibição de bradicinina e histamina induzidas pela contração do íleo de porquinhos-da-índia e atividade antinociceptiva em camundongos por estímulos térmicos . Esses efeitos estão diretamente relacionados com o iridoide ipolamiida e feniletanóide glicosídeo acteosídeo, presentes na planta.

De acordo com as bases científicas Scopus e Web of science, a partir de 2002 até 2020, houve um crescimento de pesquisas relacionadas à atividade biológicas e principalmente farmacológicas no gênero *Stachytarpheta*;

SULAIMAN et al., (2009) avaliando o extrato etanólico de *Stachytarpheta jamaicensis* em camundongos BALB/c demonstrou valores significativos de atividade para os 3 modelos de efeito antinociceptivo sendo eles: contorções abdominais induzidas por ácido acético, estímulos térmicos e testes de lambe as patas induzidos por formalina. Esse efeito de acordo com os autores pode ser explicado pela poder do extrato de inibir prostaglandinas tanto em nível central como periférico Para a avaliação da inibição da inflamação, foram constatados valores significativos para atividade anti-inflamatória em 2 modelos, sendo eles: agudo (formação de edemas de pata induzidos por carragenina) altamente associado com a atividade anti edematosa devido ao extrato inibir a araquidonato COX (GAMACHE, et al.,1981) . e crônico (teste de granuloma com pílula de algodão), durante essa injúria, processos de reparo são associados com a inflamação, como proliferação de macrófagos, neutrófilos, fibroblastos, e multiplicação de pequenos vasos sanguíneos que levam à formação de uma massa avermelhada altamente vascularizada, denominada 'Tecido de granulação' (SULAIMAN et

al., 2009). A capacidade do extrato de reduzir o peso de pelotas granulomatosas sugere seu potencial para o tratamento da inflamação crônica e como uma nova fonte de compostos com atividade anti-articular.

IDU et al., (2006) concluiu que o extrato aquoso de *S. jamaicensis* demonstrou um efeito significativo antihipertensivo dependente da dose. O extrato reduziu a pressão arterial e os batimentos cardíacos de coelhos anestesiados, e o efeito foi gradualmente aumentado de acordo com a dose aumentada. Logo em seguida, IDU et al., (2007) também avaliou a atividade antimicrobiana a partir de extratos aquosos e etanólico da folha, constatando inibição do crescimento de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella aerogenes* e *Proteus mirabilis*. Para atividade antifúngica, THOMAS et al., (2013) demonstrou efeitos significativos através de extratos de éter de petróleo de *S. jamaicensis* em *Curvularia* sp. e *Penicillium* sp.

No que diz respeito a capacidade de atividade antioxidante pelo método DPPH e FRAP (redução do ferro do plasma) foi constatada a partir de extratos metanólicos de *S. jamaicensis*, devido a alta presença de ácidos fenólicos, polifenóis e flavonóides (DILLARD & GERMAN, 2000). Além disso, o extrato etanólico também foi avaliado e provou melhorar a atividade da catalase em ratos diabéticos induzidos por aloxana (ROZIANOOR et al., 2014). Esses resultados obtidos, sugerem que *S. jamaicensis* pode ter um potencial farmacológico no tratamento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo.

Entre essas atividades farmacológicas, *S. jamaicensis* também foi documentada por exibir atividade inseticida (CHARIANDY et al., 1999), larvicida (NAZAR et al., 2009), e anti-helmíntica (ROBINSON et al., 1990). Também foi constatado atividade anti tifóide (IROHA et al., 2010), atividade inibitória da transcriptase reversa de HIV-1 (WORADULAYAPINIJ et al., 2005), bem como para tratar sintomas semelhantes aos do câncer (CAMAL-FUENTES et al., 2011).

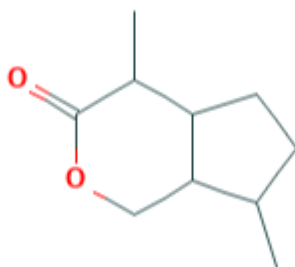
CHOWDHURY, et al., (2004) em *Stachytarpheta urticaefolia* avaliou extratos metanólicos e *n*-hexano de folhas e raízes, que por sua vez mostraram atividade antinociceptiva para contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos albinos. Além disso os extratos administrados de forma intraperitoneal demonstraram atividade abortiva em fêmeas grávidas. Estas atividades foram relacionadas aos compostos ipolamiida e a-spinasterol que foram extraídos da planta. Também foi avaliado o potencial antibacteriano em *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella paratyphi* A, *Salmonella paratyphi*

B, e *Vibrio parahaemolyticus*, foi demonstrado maior efeito em a-spinasterol do que na ipolamiida.

### 2.3 Químicas dos Iridoides do gênero *Stachytarpheta* e espécies.

O termo iridoide veio formalmente do iridodial (forma enol presente na figura 4), substância que ao lado da iridomirmecina foram descritos pela primeira vez no final do século XIX na secreção de defesa da formiga australiana *Iridomyrmex detectus* (EI-NAGGAR, 1980, FILHO, 2007).

**Figura 3** - Iridomirmecina.



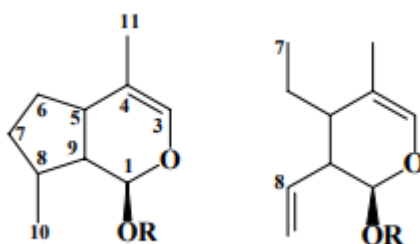
Fonte: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Iridomirmecina#section=Structures>>.

Acesso em 28/05/2021 as 10:00.

Em termos estruturais e moleculares, os iridoides são compostos monoterpenoídicos, possuem um esqueleto iridano (Figura 4), ou seja, possuem uma característica estrutural ciclopentapiranoídica e são distribuídos em diversos grupos de plantas como compostos do metabolismo secundário (WANG et al., 2020).

**Figura 4** - Sistema iridano para compostos iridoides, numeração = C e R = H ou glicose.

Conforme SAMPAIO-SANTOS e KAPLAN, 2001.

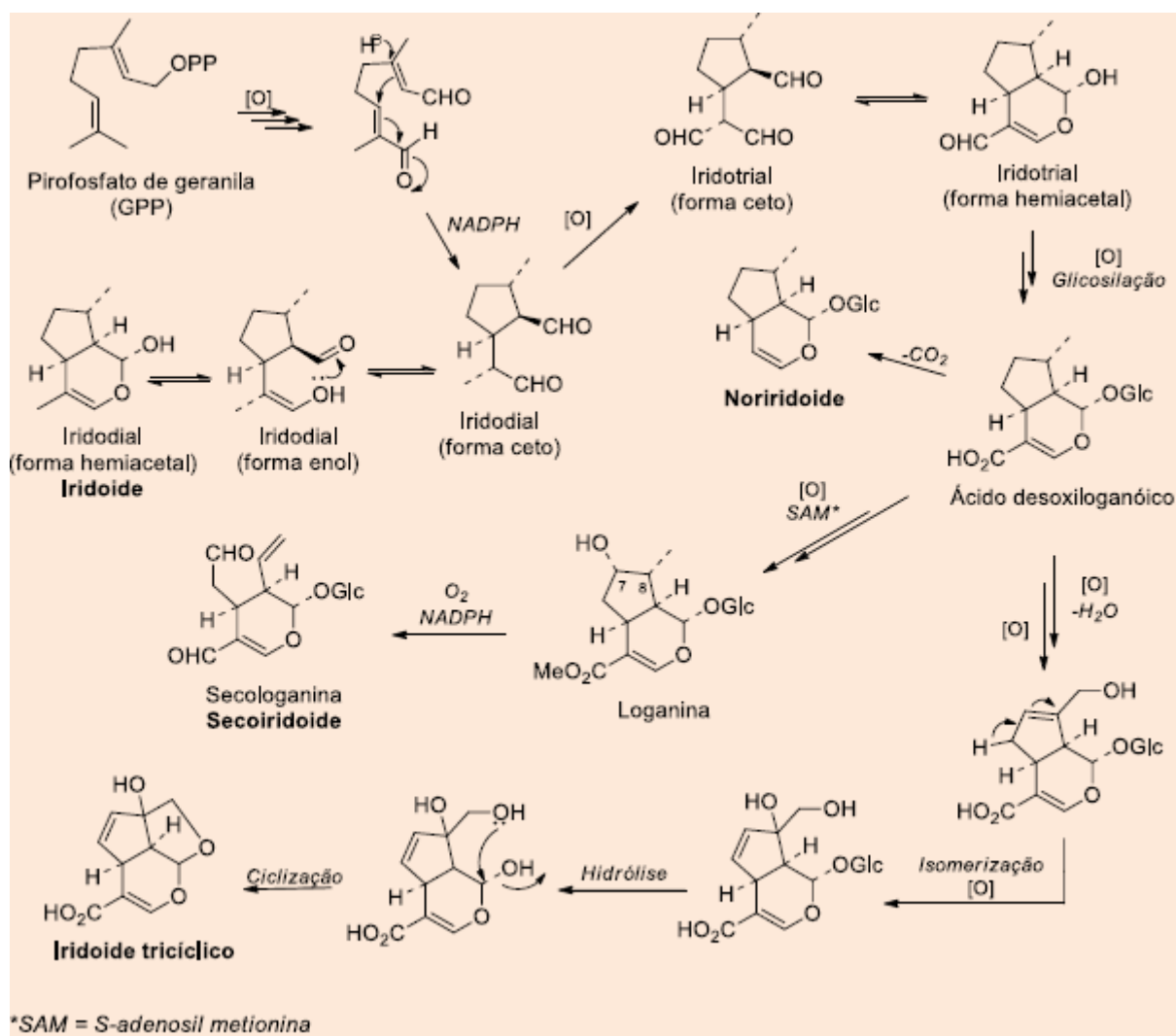


Fonte: (SAMPAIO-SANTOS e KAPLAN, 2001)



Do esqueleto irido inicia pela ciclização alternativa do pirofosfato de geranila (GPP) (Figura 3). O GPP depois de desfosforilado é oxidado e ciclizado por ataque nucleofílico de hidreto com formação do anel ciclopentano, seguido de adição nucleofílica do enol ao aldeído, conduzindo ao anel pirano (SOUSA e CHAVES, 2019). A rota para formação do iridoide loganina, por exemplo, envolve ainda reações de oxidação, glicosilação e metilação. A clivagem oxidativa da ligação C7/C8 do anel ciclopentano da loganina, forma a secologanina, um secoiridoide. Existem ainda os noriridoide, os quais são originados pela descarboxilação oxidativa dos carbonos C-10 ou C-11 dos iridoide. A formação de um iridoide tricíclico, a partir de uma série de reações, que incluem oxidação, isomerização, hidrólise e ciclização (Figura 5).

**Figura 5** – Biossíntese de iridoide a partir do Pirofosfato de geranila (GPP) conforme SOUZA e CHAVES, 2019.

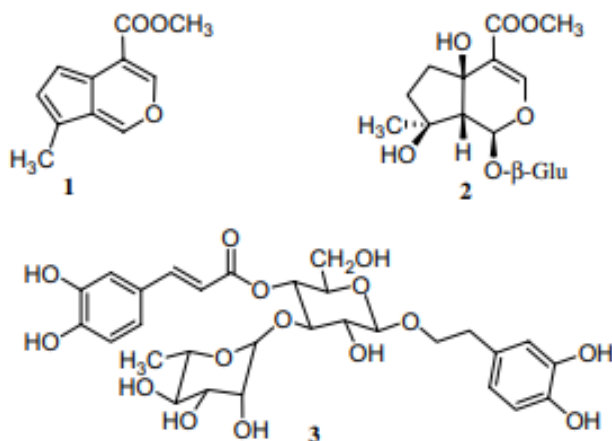


Fonte: SOUZA e CHAVES, 2019.

No gênero *Stachytarpheta* spp., o composto iridoide ipolamiida foi reportado em várias espécies, incluindo *S. jamaicensis* (RODRIGUEZ & CASTRO, 1996), *S. cayennensis* (FUTURO & KAPLAN, 1998; SCHAPOVAL et al., 1998), *S. indica* ( ROENGSUMRAN et al., 2002; GANAPATY et al., 1998), *S. australis* (AKISUE et al., 1981), *S. guyanensis* (GARNER, 1997) e *S. mutabilis* ( DE LUCA, 1980). O composto  $\alpha$ -spinasterol também foi encontrado em *S. jamaicensis* (LIN & CHEN, 1976)

VICCINI et al., (2008) em um estudo da fração extrativa de EtOAc de folhas de *Stachytarpheta glabra* isolou o glicosídeo feniletanóide acteosídeo, iridoide ipolamiida e iridoide fulvoipolamiida (Figura 6) confirmados por difração de raio-X.

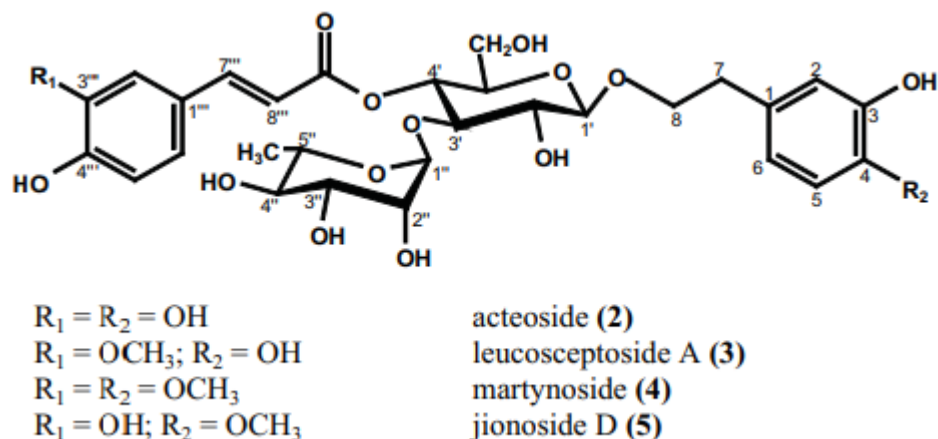
**Figura 6:** 1 - fulvoipolamiida, 2 - ipolamiida, 3 - acteosídeo.



Fonte: VICCINI et al., 2008.

Em outros trabalhos, o extrato EtOAC de *S. cayennensis* através de coluna cromatográfica, foi isolado os compostos, acteosídeo, leucosceptosídeo A, martinósídeo e jionosídeo D (Figura 7) (FROELICH et al., 2008). Para a espécie *S. urticaefolia*, em extrato metanólico foi encontrado o iridoide ipolamiida, e para as raízes  $\alpha$ -spinasterol (CHOWDHURY et al., 2003).

**Figura 7:** 2 - acteosídeo, 3 - leucosceptosídeo A, 4 - martinosídeo e 5 - jionosídeo D



Fonte: FROELICH et al., 2008.

Além disso, (LEITÃO et al., 2005) em um estudo do extrato de raízes de *S. cayennensis* por cromatografia contracorrente (CCC) isolou os compostos martinosídeo, iso verbascosídeo, verbascosídeo, ipolamiida e mais dois iridoides glicosilados. EDEOGA et al., 2005, também constatou os seguintes compostos utilizando a triagem fitoquímica, sendo eles alcalóides, taninos, saponinas, flobatanino, flavonóides, e glicosídeos cardiotônicos.

Em estudos de *S. jamaicensis*, foi constatado através de triagem fitoquímica a presença de taninos, saponinas, terpenoides, flavonoides, fenóis, alcaloides, esteróides e glicosídeos (THANGIAH, 2019). Em outras formas de extração, (ISMADJI et al., 2016) obteve os seguintes compostos através da extração em CO<sub>2</sub> supercrítico: ácido gálico 4.43 mg/L, ácido cafeico 93.64 mg/L, quercetina 19.72 mg/L, catequina 15.39 mg/L e ácido p-cumárico 9.78 mg/L.

No que tange óleos essenciais, *S. gesnerioides* foi constatado em sua composição guaiol (53,5%),  $\alpha$ -pineno (16,1%) e isocariofileno (1,7%) (SOUZA SILVA et al., 2012). Além disso, OSORIO et al., 2014 estudou o óleo essencial de *S. mutabilis* analisados por GC/MS foram identificados os componentes majoritários: 1-octen-3-ol, (Z)-3-hexen-1-ol, (Z)-4-hexen-1-ol, ácido linoleico, ácido palmítico, octan-3-ol e rosifoliol, além de constatar as características físico químicas das folhas, sendo, umidade (73,30%), cinzas (2,67%), gorduras (1,25%), proteínas (3,17%) e carboidratos (19,20%).

Nesse sentido, devido à grande presença de iridoides, principalmente o iridoide ipolamiida no gênero *Stachytarpheta*, a metodologia de quantificação de iridoides totais. Para a quantificação de iridoides totais expressos em aucubina (TRIM & HILL, 1951) em um estudo

da preparação e propriedades químicas da aucubina e asperulosídeo, mostraram que esses compostos possuem espectro de absorção ultravioleta 590-600nm e 600-645nm respectivamente, tanto em solução neutra como em alcalina. As estruturas cromogênicas de ambas são estáveis em solução alcalina e não afeta a capacidade do asperulosídeo de prover sua cor característica quando reagido com ácidos. Isso ocorre porque os iridoides são ácido lábeis, ou seja, produzem produtos de degradação coloridos por hidrólise ácida, e quando adicionados uma pequena quantidade de  $\text{Cu}^{++}$  em ácido acético glacial, produzem soluções azul transparentes que podem ser lidos em espectrofotometria.

#### **2.4 Validações Analíticas.**

Para aplicar um método analítico a um produto diferente, devem ser considerados estudos de validação apropriados com a matriz do novo produto. Validação de um método analítico é o processo de demonstrar que um procedimento analítico é adequado para o seu fim. Esse entendimento é obtido a partir de estudos cientificamente baseados em métodos de desenvolvimento e otimização (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA, 2014).

Os parâmetros para validação de métodos têm sido definidos em diferentes grupos de trabalho de organizações nacionais ou internacionais. Infelizmente, algumas definições são diferentes entre as diversas organizações. Uma tentativa para harmonizar estas diferenças foi feita para aplicações farmacêuticas, através da ICH (“International Conference on Harmonization”), na qual representantes das indústrias e agências reguladoras dos EUA, Europa e Japão definiram parâmetros, requerimentos e, em alguns casos, também metodologias para validação dos métodos analíticos (RIBANI et al., 2004). A norma Q2(R1), “Validation of analytical procedures: text and methodology” da ICH recomendada utilizar para o processo de validação os seguintes parâmetros: especificidade e seletividade, linearidade, precisão, limite de detecção (sensibilidade), limite de quantificação, exatidão e robustez (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION - ICH, 1996). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regulamenta a validação de métodos analíticos através da RE nº 166, que recomenda os mesmos parâmetros, cujas análises são requeridas pelas autoridades de saúde brasileiras para o registro de produtos fitoterápicos (BRASIL, 2017).

A especificidade/seletividade corresponde à capacidade de detecção de substâncias; a linearidade é utilizada para verificar se o método está gerando resultados lineares, que devem ser proporcionais à concentração do analito; a exatidão verifica o quanto o valor real do

analito na amostra está em concordância com o valor estimado pelo processo analítico; a precisão vai avaliar quão próxima estão as várias medidas efetuadas na mesma amostra; o limite de detecção refere-se a menor concentração do analito que pode ser detectada; o limite de quantificação é a menor concentração do analito quantificada na amostra; e a robustez é a capacidade do método em não sofrer alterações mesmo em pequenas variações nos parâmetros analíticos (DIAS, 2019).

As técnicas mais utilizadas nas análises qualitativas e quantitativas de amostras vegetais são cromatografia em fase gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC) (NAVES et al., 2014). No entanto, o método de determinação quantitativa por espectrofotometria no UV-Vis ainda se destaca entre estas, por ser uma técnica de baixo custo, de fácil manuseio, rápida e muito adequada às rotinas laboratoriais (ALVES et al., 2015; NAVES et al., 2014).

## **2.5 Fatores que influenciam o teor de metabólitos secundários.**

Desde o quarto século a.C. existem relatos de normas para a coleta de plantas medicinais. Os carrascos gregos, por exemplo, coletavam suas amostras do veneno cicuta (*Conium maculatum*) pela manhã, quando os níveis de coniina são maiores (SIMÕES et al., 2006). Variações temporais e espaciais no conteúdo total, bem como as proporções relativas de metabólitos secundários em plantas ocorrem em diferentes níveis (sazonais e diárias; intraplanta, inter- e intraespecífica) e, apesar da existência de um controle genético, a expressão pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos (GOBBO-NETO & LOPES, 2007). De fato, os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, portanto, sua síntese é frequentemente afetada por condições ambientais (CARNEIRO et al., 2001).

A época em que uma droga é coletada é um dos fatores de maior importância, visto que a quantidade e, às vezes, até mesmo a natureza dos constituintes ativos não é constante durante o ano. São relatadas, por exemplo variações sazonais no conteúdo de praticamente todas as classes de metabólitos secundários, como óleos essenciais, lactonas sesquiterpênicas, ácidos fenólicos, flavonóides, cumarinas, saponinas, alcalóides, taninos, graxas epicuticulares, iridóides, glucosinolatos e glicosídeos cianogênicos (SIMÕES et al., 2006).

Apesar de cada espécie ter se adaptado ao seu habitat, as plantas frequentemente são capazes de existir em uma considerável faixa de temperatura. A faixa em que ocorrem as variações anuais, mensais e diárias na temperatura é um dos fatores que exerce maior influência em seu desenvolvimento, afetando, portanto, a produção de metabólitos secundários (GOBBO-NETO & LOPES, 2007). No entanto, talvez pelo fato da temperatura ser, de modo geral, uma consequência de outros fatores, como altitude e sazonalidade, não existem muitos estudos sobre sua influência isoladamente na produção de metabólitos secundários.

Fatores fisiológicos críticos, tais como fotossíntese, comportamento estomatal, mobilização de reservas, expansão foliar e crescimento, podem ser alterados por estresse hídrico e, conseqüentemente, levar a alterações no metabolismo secundário (SIMÕES et al., 2006). Na agricultura, a adição de nutrientes, particularmente nitrogênio, é geralmente empregada para aumentar a produção de biomassa (SIMÕES et al., 2006). No entanto, os nutrientes afetam não somente o metabolismo primário, mas também influenciam a produção de diferentes metabólitos secundários.

Fatores mecânicos aos quais as plantas estão susceptíveis, tais como ferimentos, ou mesmo meros estímulos, causados por chuva, granizo, vento, areia, invasão por patógenos e pastagem de herbívoros, também podem influenciar a expressão do metabolismo secundário (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Danos causados a plantas por ferimentos ou ataque de herbívoros ou patógenos frequentemente levam a uma resposta bioquímica, que reduz a aceitabilidade do órgão ou de todo o organismo a ataques futuros (SIMÕES et al., 2006).

No que diz respeito a controle de qualidade, em geral, as espécies apresentam épocas específicas em que contêm maior quantidade do princípio ativo no seu tecido, podendo esta variação ocorrer tanto no período de um dia como em épocas do ano.

Simões et al., (2006) relata que de acordo com o princípio ativo específico da espécie, este pode ser encontrado em maior quantidade dependente do horário. Um exemplo comum citado, foi de que no período da manhã é recomendada a colheita de plantas com óleos essenciais e alcalóides, e no período da tarde plantas com glicosídeos. Além disso também deve ser observada a identificação correta do órgão da planta a ser coletada, pois o conhecimento correto dessa coleta do material leva à obtenção de produtos de melhor qualidade.

A partir do momento da colheita inicia-se um processo de degradação enzimática da planta, o que conseqüentemente ocorre uma degradação dos princípios ativos. Por isso, quanto menor o período de tempo entre a colheita e a secagem, melhor a integridade máxima dos princípios ativos.

A estabilização ou secagem é o próximo passo, na secagem ao sol, além de promover a degradação de princípios ativos, acaba por gerar uma secagem rápida das bordas dos órgãos vegetais e criação de uma crosta relativamente impermeável à água nessas regiões, em pouco tempo o material aparenta estar seco, porém com seu interior úmido. A secagem deve, portanto, ser procedida ao abrigo da luz, em secadores que promovam ambiente limpo, bem ventilado e protegido de quaisquer influências externas, como, ataque de insetos e outros animais. Em secagem à sombra, é um processo demorado e pode ocorrer reabsorção de água da planta, visto as temperaturas baixas. Simões et al., (2006) relata que para folhas e flores o recomendado seria em torno de 38 °C, e para cascas e raízes temperaturas em torno de 60 °C são aceitáveis. Temperaturas acima desses limites aceleram o processo de secagem, promovendo a degradação de muitos princípios ativos.

Para o período de armazenamento, este deve ser o menor possível, pois com o passar do tempo podem ocorrer perdas qualitativas e/ou quantitativas nas substâncias das plantas. Uma opção interessante é a armazenagem das plantas em sacos duplos, um de papelão e outro de plástico transparente, a fim de garantir a resistência e o abrigo à luz.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Equipamentos e Reagentes.**

As leituras de absorção molecular no ultravioleta foram mensuradas em espectrofotômetro TECAN Infinity<sup>®</sup> M200 PRO operado pelo *software* I-control<sup>®</sup> versão 3.37. A substância de referência utilizada nos ensaios foi a Aucubina (HWI Pharma<sup>®</sup>, Alemanha), com grau de pureza de 95,2% (CLAE).

#### **3.2 Obtenção do material vegetal para os ensaios de otimização extrativa e validação analítica.**

Para obtenção das amostras vegetais foi utilizado uma amostra composta formada de folhas coletadas na base, meio e ápice de *Stachytarpheta sellowiana* Schauer em Novembro/2020 no Horto de Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA) - MG, situada nas coordenadas geográficas 21° 14'S 00 W, a 918 m de altitude.

O cultivo das plantas foi conduzido de forma livre em canteiro com solo classificado como sendo do horizonte B do latossolo vermelho distroférico (textura argilosa) com as seguintes características químicas: pH em água= 6,0; P e K = 1,13 e 26,0 mg·dm<sup>-3</sup>; Ca, Mg, Al e H<sup>+</sup> Al = 1,20; 0,20; 0,00 e 1,86 cmol·dm<sup>-3</sup>; saturação de bases V (%) = 44,04; matéria orgânica = 1,41 dag·Kg<sup>-1</sup>; teor de argila = 64 dag·Kg<sup>-1</sup>.

As plantas foram irrigadas duas vezes na semana. Para obtenção das mudas, foram utilizadas estacas semi-lenhosa de plantas de *Stachytarpheta sellowiana*, coletadas na Serra do Campestre em Lavras-MG, situada nas coordenadas geográficas 21° 14'S 00 W, a 918 m de altitude.

As folhas selecionadas foram secas em estufa com circulação de ar fechada a 38±2°C e pulverizadas em micromoinho de facas em malha ultrafina. Folhas pulverizadas foram armazenadas em saco plástico atóxico a 4°C, até as análises.

##### **3.2.1 Otimização extrativa dos Iridoides.**

Foi realizada uma pesquisa nas bases de dados Scopus e Web of Science, empregando-se as palavras-chave 'extraction' and 'iridoids', a fim de identificar quais solventes tem sido utilizados para extração de iridóides na literatura.



**Tabela 1** - Condições extrativas relatadas na literatura para doseamento de iridóides em diversas espécies de plantas.

Espécie	Relação droga:solvente	Solvente extrator	Método extrativo	Método de análise	Referência
<i>Picrorhiza kurrooa</i>	Rizomas	KOH 10% em água destilada	Refluxo	Método aminoácido glicina.	Pushpa Narayanan & K.G. Akamanchi, <b>2003</b> .
<i>Harpagophytum procumbens</i>	Tubérculos selvagens, de estufa, in vitro, brotos de plântulas e calos.	Metanol 50%	Banho Ultrassônico	Método Levieille and Wilson, 2002. Usa-se Harpagosideo no padrão.	M.W. Bairu, S.O. Amoo, J. Van Staden, <b>2011</b> .
<i>Plantago maxima</i> Juss. ex Jacq., <i>Plantago lanceolata</i> L., <i>Plantago major</i> L., <i>Veronica teucrium</i> L., <i>Veronica spicata</i> L., e <i>Veronica incana</i> L.	Folhas secas	Água	Infusão	Método colorimétrico Trim-Hill	Olga N. Nemereshina, Alexey A. Tinkov, Viktor A. Gritsenko & Alexandr A. Nikonorov, <b>2015</b> .
<i>S. alopecuroides</i> , <i>I. helenium</i> , <i>T. chebula</i> , <i>T. bellerica</i> , <i>G. jasminoides</i>	Medicamento fitoterápico	Etanol 70%	Refluxo	Método colorimétrico Trim-Hill	Ch. Erdenechimeg, A. Guiqide, B. Dejidmaa, Ch. Chimedragchaa and S. Purevsuren, <b>2017</b> .

<i>Galium</i> L. 8 espécies (Rubiaceae)	Partes aéreas secas	Metanol 80%	Banho Ultrassônico	Método colorimétrico Trim-Hill	Maja Friščić, Maja Štibrić Bağlama, Milenko Milović, Kroata Hazler Pilepić, Željko Malesš, <b>2018.</b>
---	------------------------	-------------	-----------------------	--------------------------------------	--

Fonte: Do autor (2021).

O ensaio extrativo foi realizado a fim de notar o preparo da amostra para a validação do método espectrofotométrico de quantificação de iridoides totais, descrito no item 4.2. O ensaio foi estabelecido empregando o modelo *simplex centroid design* construído para avaliar os três solventes mais citados na literatura para extração de iridoides, conforme indicado acima na tabela 1.

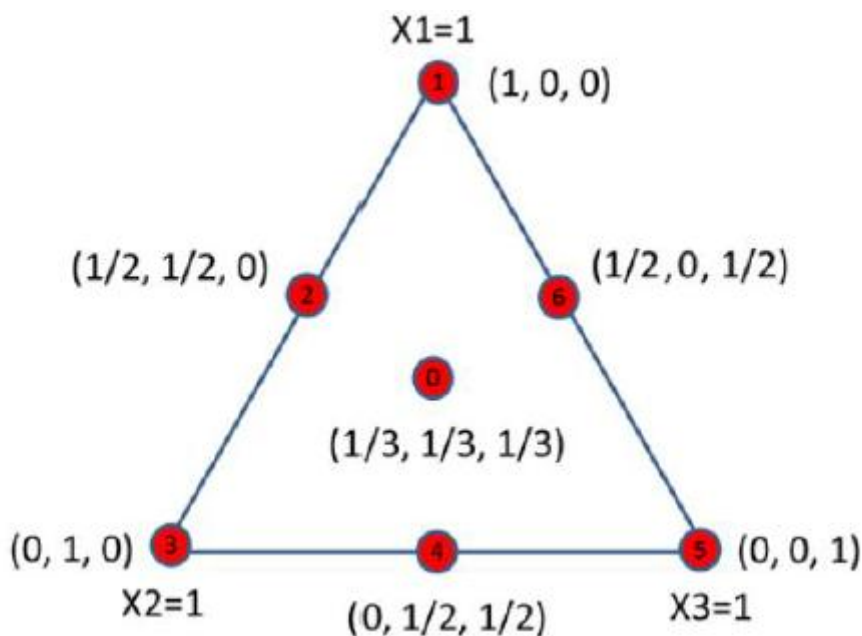
A leitura da absorbância combinada com o modelo estatístico de mistura *simplex centroid design* permite a identificação das interações sinérgicas ou antagônicas entre os diferentes solventes, maximizando ou minimizando o conteúdo de constituinte alvo (BASTOS et al., 2020). O planejamento de misturas de três solventes pode ser expresso como na tabela 2 e figura 8.

**Tabela 2** - Proporções em volume das misturas de extração. UFLA, Lavras - MG, 2021.

<i>Extrato</i>	<i>Solventes</i>		
	<i>KOH 10%</i>	<i>Etanol 70%</i>	<i>Metanol 70%</i>
1	1	0	0
2	0	1	0
3	0	0	1
4	1/2	1/2	0
5	1/2	0	1/2
6	0	1/2	1/2
7	1/3	1/3	1/3

Fonte: Do autor (2021).

**Figura 8.** *Simplex centroid design* preparado usando misturas de três solventes KOH 10% (A), Metanol 70% (B) e Etanol 70% (C).



Fonte: <https://www.weibull.com/hotwire/issue180/hottopics180.htm>

Inicialmente foi empregado uma relação droga:solvente de 25 mg de folhas pulverizadas para 1000  $\mu$ L de solvente com um ciclo de sonicação de 10 minutos. E o ensaio colorimétrico de Trim-Hill foi realizado no comprimento de onda 609 nm.

### 3.2.2 Preparo da amostra.

Para o preparo da amostra, foram utilizados 10 mg de folhas pulverizadas, obtido conforme descrito no item 3.2, os quais foram pesados diretamente no microtubo de 2 mL. Em seguida foi adicionado 1,5 mL de MeOH 70% (Metanol 7:3 Água) e sonicado por 10 minutos. Logo após, os microtubos contendo os extratos foram centrifugados a 12000 rpm durante 10 minutos, o sobrenadante foi coletado e levado a rotaevaporação a 40°C até a secura.

### 3.2.3 Reação de coloração e leitura das absorvâncias.

Para a determinação quantitativa dos iridoides totais foi adicionado ao resíduo da extração (item 3.4) um volume de 1 mL de metanol 70%, seguido de sonicação até dissolução completa (1-2 min). A solução metanólica foi transferida para um balão volumétrico de 10

mL e, em seguida, adicionou-se 9 mL de reativo de Trim-Hill (10 volumes de ácido acético glacial; 1 volume de solução de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,2%; 0,5 volumes de HCl concentrado). Logo em seguida, a solução de leitura foi transferida para tubos de ensaio de vidro e mantidos em banho-maria a 100°C por 5 minutos e, em seguida, arrefecidos em banho de água a 25°C (1-2 minutos). As leituras das absorvâncias a 622 nm foram mensuradas transferindo 280 µL das soluções de leitura para poço de uma microplaca de poliestireno. O branco foi obtido transferindo-se 1 mL de metanol 70% em 9 mL do reativo de Trim-Hill. A coloração azul, indica presença de iridoides.

Para cada solução elaborou-se uma solução de compensação misturando-se 1 mL de solução hidrometanólica 70% da amostra obtida conforme descrito anteriormente, e diluindo para 9 mL de metanol 70%. As leituras das absorções a 622 nm das soluções de compensação foram mensuradas frente ao metanol 70%. O valor de absorvância obtido para a solução de compensação foi então subtraído da leitura obtida pela amostra. As leituras foram realizadas em triplicata e os ensaios em sextuplicata.

### **3.2.4 Validação analítica.**

A validação do método para a determinação do teor de iridóides totais, expressos em Aucubina, foi realizada de acordo com os parâmetros e especificações da International Conference on Harmonization (ICH, 1996) e da resolução RE nº166 de 24 de julho de 2017 da ANVISA (BRASIL, 2017). Foram avaliados os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e limite de quantificação.

*Seletividade:* A seletividade do método foi avaliada a partir dos espectros de absorção molecular no ultravioleta a 622 nm das soluções de leitura com e sem a adição do reagente Trim-Hill. Para atestar a seletividade do método, a solução de leitura sem Trim-Hill não deve apresentar absorção significativa no comprimento de onda da leitura.

*Linearidade:* Foram construídas três curvas de calibração, empregando-se três soluções hidrometanólica a 70% (2,0 mg/mL) de aucubina preparadas em dias consecutivos. As concentrações finais de aucubina nas soluções de leitura foram 0,0125 mg/mL; 0,025mg/mL; 0,05 mg/mL; 0,1 mg/mL e 0,2 mg/mL. A solução de leitura foi composta de 0,5 mL de aucubina nas concentrações finais já indicadas + 4,5 mL do reagente Trim-Hill. As soluções foram mantidas em banho-maria a 100°C durante 5 minutos, em seguida resfriadas em banho de água a 25°C durante 1-2 minutos. Logo após, as leituras foram mensuradas a 622 nm frente ao branco (reagente de Trim-Hill + MeOH 70%). Os dados obtidos foram submetidos à

análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) calculados. Para a determinação quantitativa dos iridóides empregou-se a média das curvas de calibração, após comparação estatística por análise de covariância ( $p < 0,05$ ). As análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism, versão 8.0.1 (2018) da GraphPad Software.

*Precisão:* A precisão intradia foi avaliada pela análise de seis amostras a 100% da concentração de aucubina na curva analítica ( $n=6$ ). Da mesma forma, a precisão inter-dia foi determinada em dois dias consecutivos e por analistas diferentes ( $n=12$ ). Os desvios padrão relativos (DPR) foram calculados para os teores encontrados nas determinações ( $n=6$  e  $n=12$ , respectivamente).

*Exatidão:* A exatidão foi avaliada pela adição de quantidades conhecidas de aucubina às amostras a serem extraídas de *S. sellowiana* Schauer, a fim de determinar a porcentagem de recuperação. Foram adicionadas três concentrações de aucubina, em triplicata para cada nível da curva de calibração. Também foram preparadas, em triplicatas, amostras sem adição do padrão. A recuperação foi determinada empregando-se a equação: % de recuperação = (concentração experimental/concentração teórica) x 100.

*Robustez:* A robustez foi avaliada por variações deliberadas dos seguintes parâmetros analíticos: temperatura a 90°C, volume do reagente de Trim-Hill (8,75 mL; 9,25 mL), tempo de incubação para a leitura (4 e 6 minutos) e comprimento de onda de leitura (620 e 624 nm). Para cada parâmetro, as amostras foram preparadas em sextuplicata. Os dados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Skott-Knott ( $p < 0,05$ ).

*Limite de quantificação:* O limite de quantificação (LQ) foi determinado a partir dos parâmetros da curva analítica, segundo a equação:  $LQ = (s/S) 10$ , em que  $s$  é o desvio padrão do intercepto da curva de regressão e  $S$  é a inclinação da curva.

*Limite de detecção:* Os limites de detecção foi estimado pela equação:  $LD = (s/S) 3,3$ , em que  $s$  é o desvio padrão do intercepto da curva de regressão e  $S$  é a inclinação da curva analítica.

### **3.3 Obtenção das amostras oriundas de diferentes ambientes de cultivo.**

O teor de iridóides totais em *S. sellowiana* foi avaliado em plantas crescidas em quatro ambientes descritos na tabela 3:

**Tabela 3** – Composição química dos diferentes substratos das origens de amostras de *S. sellowiana*.

Substratos	pH	M.O.	K	P	Al	Ca	Mg
	água	%(m/v)	.....mg dm <sup>3</sup> .....		.....cmol/dm <sup>3</sup> .....		
Terra + areia	5,4	1,03	25,89	0	0,07	0,68	0,05
Solo canteiro	6,0	1,41	26	1,13	0,0	1,20	0,20
Solo Serra	5,4	1,1	46,26	1,7	0,1	0,41	0,15
Meio MS/2	5,8	–	10	0,625	–	1,5	0,75

Fonte: Do autor (2021).

Folhas de *S. sellowiana* das plantas dos quatro ambientes foram coletadas em março/2021. As folhas passaram pelo processo de secagem em estufa a 40°C com circulação de ar fechada até peso constante, pulverizadas em micromoinho de facas e utilizadas 10mg para os ensaios. Os ambientes foram descritos abaixo e de acordo com a tabela 3.

1. As plantas cultivadas no canteiro do Horto Medicinal/UFLA descrito no item 3.2;
2. Serra do Campestre - MG, as plantas residiam em solo com as seguintes características químicas: pH em água= 5,4; P e K = 1,70 e 46,26 mg·dm<sup>-3</sup>; Ca, Mg, Al e H<sup>+</sup> Al = 0,41; 0,15; 0,10 e 2,10 cmol·dm<sup>-3</sup>; saturação de bases V (%) = 24,41; matéria orgânica = 1,10 dag·Kg<sup>-1</sup>; teor de areia = 76 dag·Kg<sup>-1</sup>, teor de silte = 16 dag·Kg<sup>-1</sup>, teor de argila = 8 dag·Kg<sup>-1</sup>;
3. Cultivo *in vitro* foi realizado a partir de explantes retirados de plantas matrizes selecionadas mantidas em casa de vegetação do Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da UFLA. As matrizes foram cultivadas em vasos contendo terra argilosa mais compostagem proveniente do horto de plantas medicinais, com aplicação de fungicida sistêmico e de contato periodicamente antes da brotação.

Para a fase de desinfestação, segmentos de *S. sellowiana*, cultivadas na casa de vegetação do Laboratório de Cultura de Tecidos foram lavados em água corrente com detergente por 20 minutos, em seguida, imersos em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) 50% por 15 minutos, sob agitação constante. Posteriormente, passaram por cinco lavagens com água destilada e autoclavada, realizadas dentro da câmara de fluxo laminar, sob condições assépticas. Após a assepsia, segmentos apicais e nodais de aproximadamente 1 cm foram retirados com auxílio de um bisturi e inoculados em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG 1962), suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, solidificado com 5,5 g.L<sup>-1</sup> de ágar e pH ajustado para 5,7±0,1 e autoclavado a 120°C e 1 atm, por 20 minutos. Os tubos de ensaio foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16h luz/ 8h escuro, sob intensidade luminosa de 39 µmol m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, à temperatura de 26±1 °C;

4. Nas plantas cultivadas em vasos na casa de vegetação, foram utilizadas mudas advindas da parte superior de plantas de *Stachytarpheta sellowiana*, coletadas em Lavras-MG, situada nas coordenadas geográficas 21° 14' S 00 W, a 918 m de altitude. Elas foram mantidas em vasos de 10L, com terra argilosa e compostagem e irrigação duas vezes na semana. Também foi aplicado fungicida sistêmico.

### **3.4 Teor de Iridóides totais frente a diferentes métodos de secagem.**

Folhas de *S. sellowiana* foram colhidas aleatoriamente de 15 plantas nativas da Serra do Campestre, às 10h da manhã, em maio de 2021. A Serra do Campestre situa-se nas coordenadas geográficas 21° 14 'S 00 W, a 918 m de altitude. Alíquotas de 8g de folha das plantas frescas foram acondicionadas em sacos de papel kraft e levado aos respectivos tratamentos de secagem: secagem a 40°C, em estufa com circulação de ar; secagem a 60°C, em estufa com circulação de ar fechada; secagem à sombra e secagem ao sol, até peso constante.

A temperatura em cada método de secagem foi mensurada utilizando-se termômetro de máxima e mínima. A secagem ao sol consistiu em expor a parte aérea das plantas no período de 8h às 16h, ao sol. A temperatura média obtida foi de 31±5°C, durante o dia. Na secagem em estufa, o material vegetal foi disposto uniformemente sobre suas prateleiras metálicas. Para isso, utilizou-se uma estufa de secagem com circulação de ar forçada Fanem Mod. 320-SE, regulada nas temperaturas de 40±1°C e 60±1°C. Na secagem à sombra, à temperatura

ambiente, as folhas das plantas foram expostas durante todo o tempo de secagem em local sombreado e ventilado sem a presença de raios solares, cuja temperatura média manteve-se em  $18\pm 5^{\circ}\text{C}$ . Na secagem a sombra e ao sol, o material coletado foi distribuído uniformemente sobre bandejas com moldura de madeira e fundo em tela de sombrite, a fim de permitir a circulação do ar.

De acordo com dados fornecidos pela Estação Climatológica do Departamento de Engenharia da UFLA, a temperatura média do ar nos dias de secagem variou de  $17,4^{\circ}$  a  $29,2^{\circ}\text{C}$  e a umidade relativa média do ar foi de  $54\pm 10\%$ . O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo quatro tratamentos com 3 repetições cada. Imediatamente após a conclusão de cada processo de secagem, foi feita a determinação do teor de iridóides totais.

### 3.5 Doseamento de Iridóides totais.

O preparo das amostras e as leituras das absorvâncias para a determinação dos teores de iridóides totais nas amostras de folhas de *S. sellowiana*, de diferentes ambientes e diferentes formas de secagem, foram obtidos conforme descrito nos itens 3.2. Com base nos parâmetros da curva analítica (item 3.5 – *Linearidade*), chegou-se a equação utilizada para o cálculo dos teores percentuais de iridóides totais (%IT), expressos em aucubina:

$$\%IT = (A_{\text{corrigida}} + 0,0146/7,5597) \times FD \times 10$$

Onde:

A corrigida = absorvância corrigida a 622 nm

FD = Fator de diluição

Para maiores detalhes sobre esse cálculo vide Apêndice A.

### 3.6 Análise estatística.

Os dados foram submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas ao teste de Skott-Knott, ambas a 5% de probabilidade. O programa estatístico SISVAR® (FERREIRA, 2011) foi utilizado para o processamento dos dados.



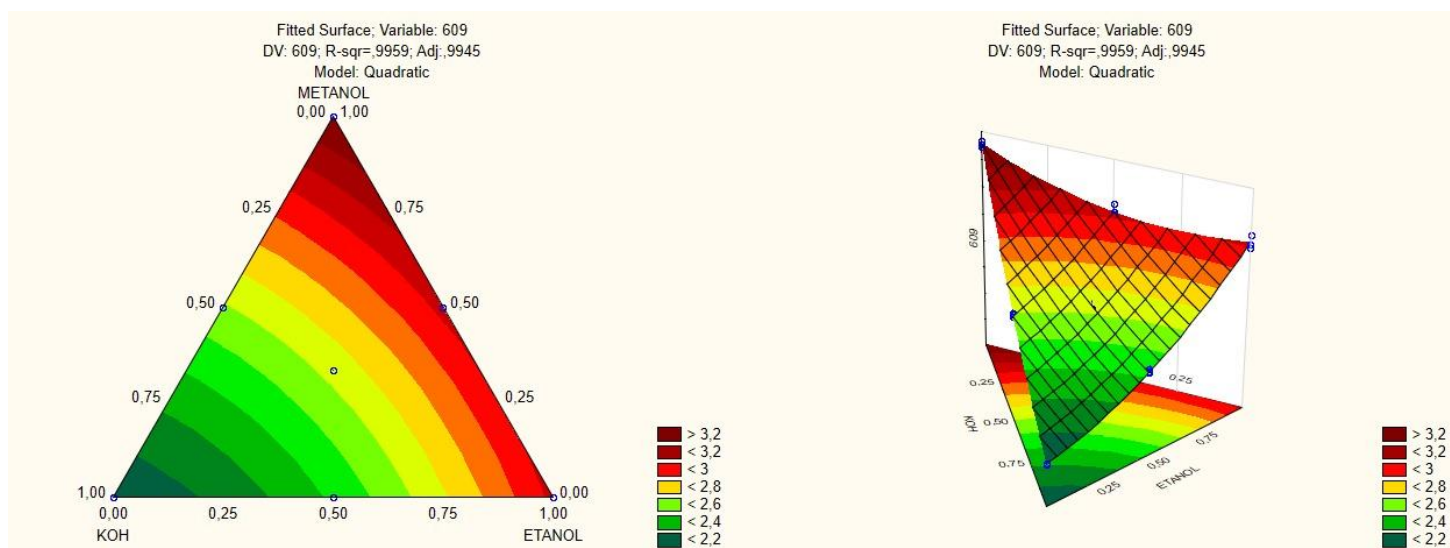
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Otimização extrativa de Iridóides.

O ensaio extrativo foi realizado a fim de notar o preparo da amostra para a validação do método espectrofotométrico de quantificação de iridóides totais, descrito no item 4.2. O ensaio foi estabelecido empregando o modelo *simplex centroid design* construído para avaliar os três solventes mais citados na literatura para extração de iridóides.

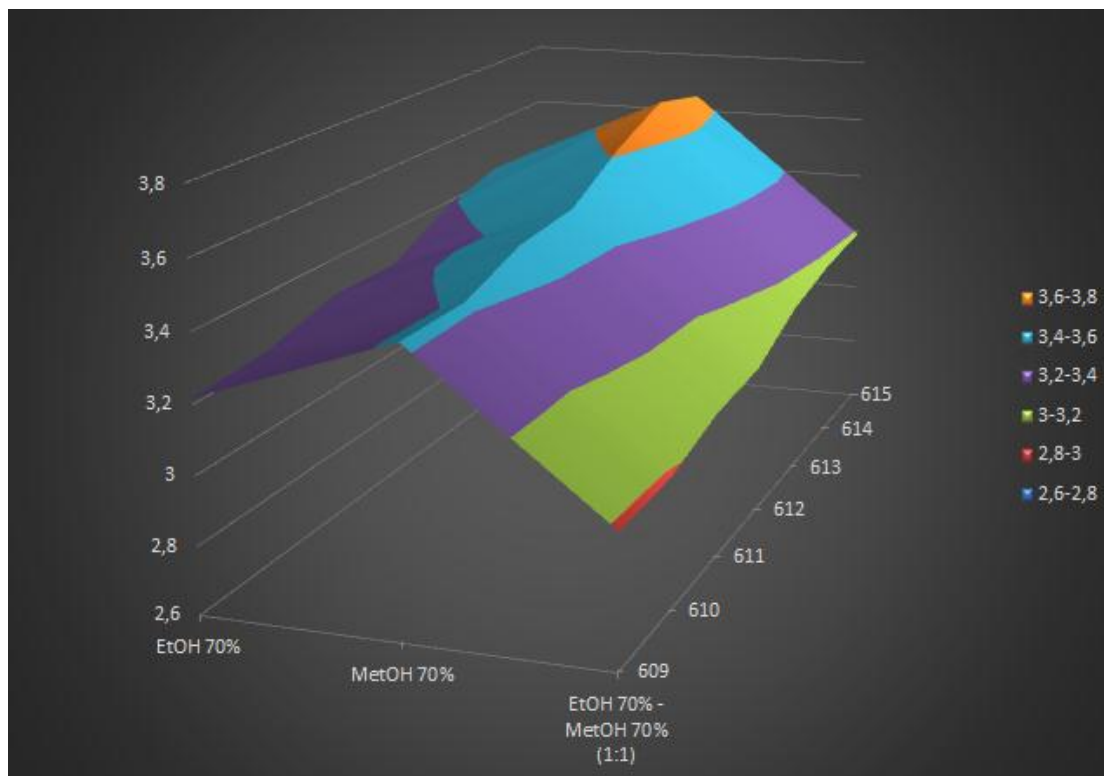
A leitura da absorbância combinada com o modelo estatístico de mistura *simplex centroid design* permite a identificação das interações sinérgicas ou antagônicas entre os diferentes solventes, maximizando ou minimizando o conteúdo de constituintes alvo (BASTOS et al., 2020). O planejamento de misturas de três solventes pode ser expresso como na figura 9.

**Figura 9.** *Simplex centroid design* preparado usando misturas de três solventes KOH 10%, Metanol 70% e Etanol 70%.



Fonte: Do autor (2021).

**Figura 10** - Gráfico 3D representando as médias das absorvâncias.



Fonte: Do autor (2021).

Essa faixa de comprimento de onda foi utilizada devido a estudos de TRIM & HILL (1951), onde comprovaram um espectro de absorção ultravioleta da aucubina e asperulosídeo entre 590-645nm, em conjunto com trabalhos clássicos da literatura onde se utiliza 609nm.

Como mostra a figura 10, os iridoides por possuírem uma afinidade maior aos solventes polares MeOH 70% e EtOH 70%, indicaram maiores absorvâncias. Porém, o solvente escolhido foi o MeOH70% devido ao seu alto potencial de arraste através de ligações de hidrogênio e possíveis moléculas de glicose.

#### **4.2 Validação analítica.**

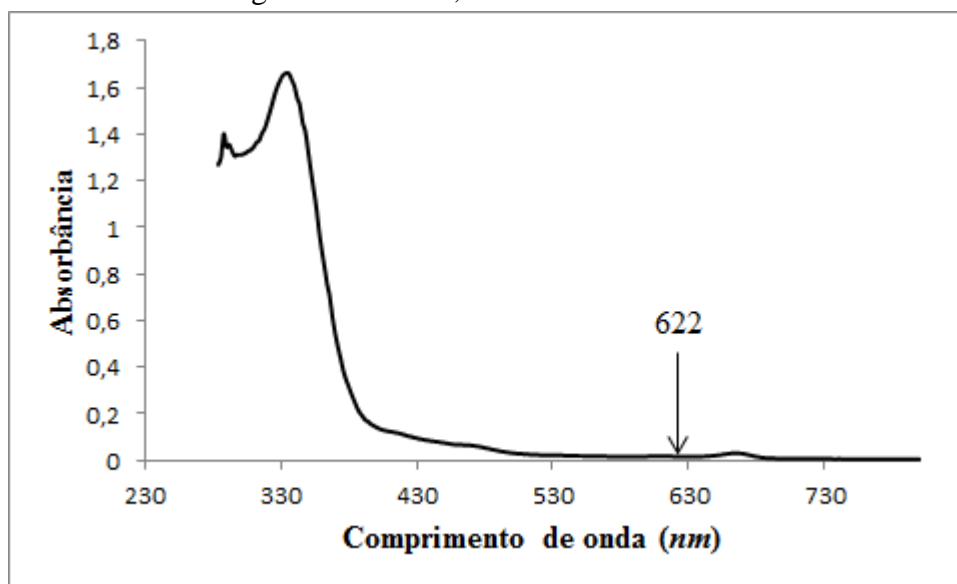
##### *Seletividade*

O ensaio de seletividade foi conduzido com as soluções de leitura de *S. sellowiana* com e sem o reagente de Trim-Hill para verificação de possíveis interferentes nas amostras. Os espectros no ultravioleta registrados para as duas soluções de leitura na faixa de 230 a 800 nm estão representados nas Figuras 11 e 12.

Em trabalhos clássicos da literatura se utilizam a leitura em 609nm para o método TRIM-HILL, (1951). Porém, no espectro da solução de leitura sem adição do reagente de Trim-Hill constatou-se pequena absorção no comprimento de onda de leitura (622 nm). Essa pequena absorção não afeta a seletividade do método, pois a mesma é neutralizada pela solução de compensação, cuja absorbância é descontada da absorbância obtida das soluções de leitura com o reagente colorimétrico.

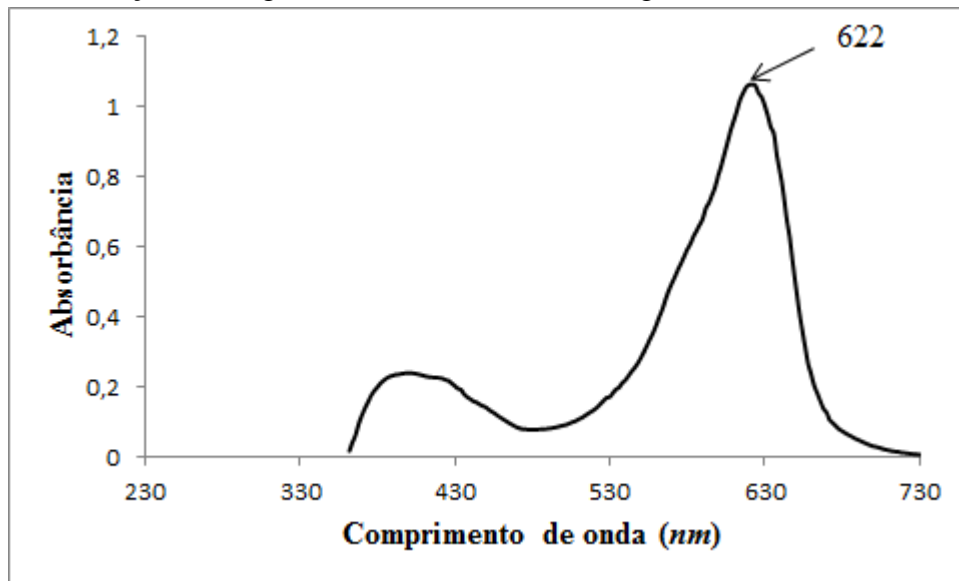
No espectro de varredura obtido para as soluções de leitura com o reagente de Trim-Hill nota-se uma banda intensa e com máximo de absorção a 622 nm, evidenciando que mesmo na presença de interferentes contidos nos extratos é possível quantificar o complexo formado entre o reagente de cor e o produto de degradação da hidrólise ácida das moléculas de iridoides, desde que seja utilizada a solução de compensação para subtrair a coloração dos extratos.

**Figura 11** - Espectro de varredura UV do extrato de *S. sellowiana* Schauer sem adição do reagente Trim-Hill, frente ao metanol 70%.



Fonte: Do autor (2021).

**Figura 12** - Espectro de varredura no UV do extrato de *S.sellowiana* Schauer com adição do reagente Trim-Hill, frente ao reagente de Trim-Hill.



Fonte: Do autor (2021).

#### *Linearidade*

A linearidade foi avaliada através da relação linear entre absorvância e concentração de iridoides totais. Para a construção da curva analítica durante o estudo de linearidade, empregaram-se soluções com concentrações conhecidas de aucubina variando entre 0,0125 a 0,2 mg/mL. As soluções foram preparadas e analisadas em três dias diferentes. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 4.

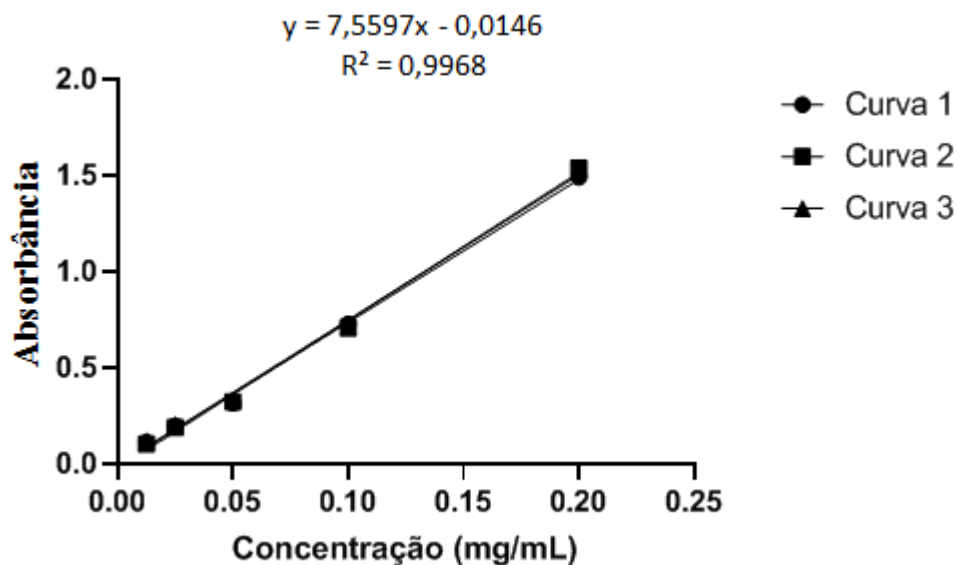
O método espectrofotométrico apresentou linearidade a 622 nm para a faixa de concentração estudada (0,0125 mg/mL a 0,2 mg/mL). A equação de regressão linear média obtida a partir de tres curvas de calibração, foi  $y = 7,5597x - 0,0146$ , em que y é a absorvância (nm) e x a concentração (mg/mL) em equivalente de aucubina. O coeficiente de determinação obtido foi  $R^2 = 0,9968$ , indicando relação linear entre a faixa de concentração da substância de referência versus as absorvâncias a 622 nm (Figura 13). O coeficiente de determinação obtido supera o mínimo estabelecido pela ANVISA (BRASIL, 2017) que considera o valor mínimo aceitável de  $R^2 = 0,99$ .

**Tabela 4** - Dados empregados na construção da curva analítica de aucubina para o doseamento espectrofotométrico de iridoides.

<i>Concentração de aucubina (mg/mL)</i>	<i>Absorbância a 622 nm das repetições</i>		
0,0125	0,1100	0,1003	0,1176
0,025	0,1954	0,1880	0,2009
0,05	0,3140	0,3213	0,3304
0,1	0,7266	0,7078	0,7074
0,2	1,4897	1,5361	1,5269

Fonte: Do autor (2021).

**Figura 13**- Média das curvas analíticas de aucubina obtidas por espectrofotometria (622 nm) para a quantificação de iridoides. A equação da reta e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) se referem à média das três curvas.



Fonte: Do autor (2021).

### *Precisão*

Os resultados dos ensaios de repetibilidade (precisão intra-leituras,  $n=6$ ) e precisão intermediária (inter-leituras,  $n=12$ ) encontram-se na tabela 5. Os valores de desvio padrão

relativo abaixo de 5% indicaram que o método analítico apresenta precisão intra-dia e inter-dias, segundo critérios da ANVISA (BRASIL, 2017).

**Tabela 5** - Teores de iridoides totais em folhas de *S. sellowiana*, expressos em aucubina, obtidos na determinação da precisão intra-corridas e inter-corridas.

<i>Iridoides totais (%)</i>		
<i>Amostra</i>	<i>intra-dia</i>	<i>inter-dia</i>
1	1,6662	1,6662
2	1,6318	1,6318
3	1,6162	1,6162
4	1,6667	1,6667
5	1,6313	1,6313
6	1,5890	1,5890
7	-	1,6143
8	-	1,6099
9	-	1,6061
10	-	1,6183
11	-	1,6170
12	-	1,6120
<b>Teor médio (%)</b>	<b>1,6335</b>	<b>1,6232</b>
<b>DPR (%)</b>	<b>1,8294</b>	<b>1,4196</b>

Fonte: Do autor (2021).

- não determinado. DPR: Desvio padrão relativo.

#### *Exatidão*

Os resultados de exatidão obtidos estão resumidos na tabela 6. Os testes de recuperação foram realizados em três níveis de concentração diferentes: alta, média e baixa, a partir da fortificação do extrato de *S. sellowiana* com uma solução de concentração conhecida de aucubina 2 mg/mL.

As médias do ensaio de recuperação para os níveis baixo, médio e alta de fortificação foram 94,27%, 95,40% e 95,28% respectivamente.

**Tabela 6:** Valores de recuperação de iridoides totais no extrato MetOH 70% de *S. sellowiana* (média,  $n=3$ ).

Nível de fortificação	Quantidade de iridoides totais (mg)				Recuperação <sup>d</sup> (%)	DPR (%)
	Extrato não fortificado <sup>a</sup>	Quantidade adicionada	Quantidade teórica <sup>b</sup>	Quantidade experimental <sup>c</sup>		
1a	0,1540	0,012	0,1660	0,1564	94,29	
1b	0,1540	0,012	0,1660	0,1589	94,70	1,47
1c	0,1540	0,012	0,1660	0,1543	92,93	
2a	0,1540	0,025	0,1790	0,1706	95,30	
2b	0,1540	0,025	0,1790	0,1703	95,15	0,33
2c	0,1540	0,025	0,1790	0,1714	95,77	
3a	0,1540	0,04	0,1940	0,1871	96,42	
3b	0,1540	0,04	0,1940	0,1856	95,65	1,43
3c	0,1540	0,04	0,1940	0,1819	93,77	

Fonte: Do autor (2021).

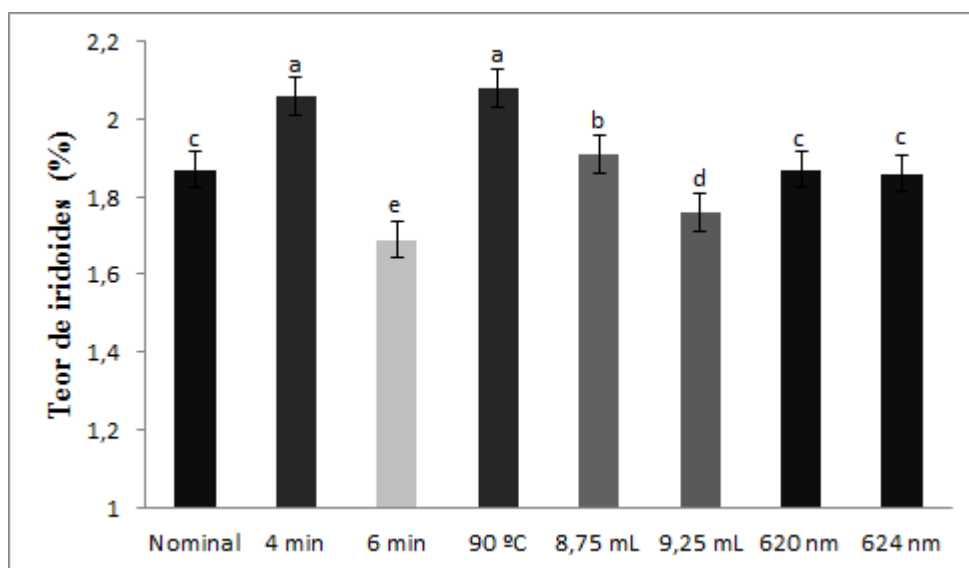
- <sup>a</sup> Quantidade (mg) de iridoide total presente na solução de leitura proveniente do extrato não fortificado.
- <sup>b</sup> Quantidade (mg) de iridoide total na solução de leitura + Quantidade (mg) de iridoide fortificada = Quantidade teórica (mg)
- <sup>c</sup> Quantidade (mg) de iridoide total determinada experimentalmente presente na solução de leitura do extrato fortificado.
- <sup>d</sup> % recuperação = (concentração experimental + concentração teórica) x 100.

### Robustez

Os resultados encontrados no teste de robustez estão apresentados na Figura 14. O teste nominal indica com os parâmetros estabelecidos de 9mL de reagente de TH, 5 minutos de incubação a 100°C.

Verificou-se que o método é robusto frente a pequenas alterações nos comprimentos de onda de leitura 620 e 624. Para os parâmetros de volume de reagente Trim-Hill (8,75 e 9,25 mL) o método diferiu estatisticamente, o que indica que alterando a estequiometria de reação, o resultado não é robusto. Para o tempo de incubação (4 e 6 minutos) e temperatura (90°C) o as análises estatísticas demonstraram que quando se passa de 5 minutos de tempo de incubação, já se começa a obter uma diminuição de conteúdo de iridoides, ou seja uma degradação das amostras. Entretanto, para o tempo de incubação de 4 minutos (2,06 %) e temperatura 90°C, pode se notar que há um aumento de conteúdo de iridoides, sugere-se então uma revalidação do método espectrofotométrico com esses parâmetros.

**Figura 14** - Influência do tempo de reação, temperatura, volume de Trim-Hill e comprimento de onda na quantificação de iridoide, expresso em aucubina, em 10 mg de folhas de *S.sellowiana* Schauer.



Fonte: Do autor (2021).

As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de significância. Desvio padrão e médias ( $n = 6$ ).

### Limite de quantificação



A determinação dos limites de quantificação foi realizada a partir da equação que emprega os parâmetros da curva analítica média. O limite de quantificação foi de 0,0125 mg/mL, caracterizando a alta sensibilidade de quantificação do método.

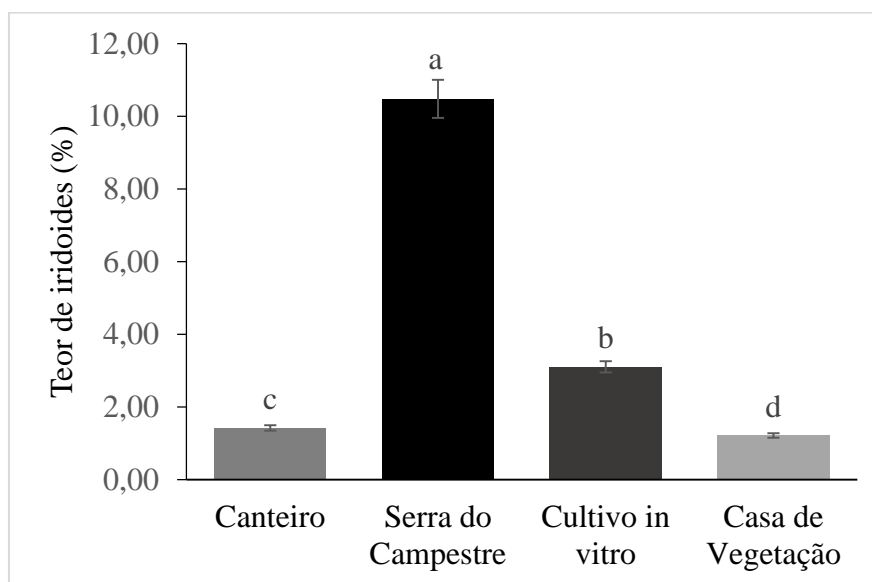
#### *Limite de detecção*

Os limites de detecção foram estimados a partir dos parâmetros obtidos da curva analítica média, conforme descrito no item 3.5. O limite de detecção foi de 0,0041 mg/mL, caracterizando a alta sensibilidade de detecção do método.

### **4.3 Fatores ambientais no teor de Iridoides totais.**

O tipo de ambiente onde encontram-se a planta interfere estatisticamente no percentual de iridoides totais. Fato que pode ser observado através da figura 15. Maiores valores foram encontrados no ambiente da serra do campestre (10,48%). Esse valor é aproximadamente 3,4x maior se comparado com o segundo maior resultado, que é em cultivo in vitro (3,09%), e 8,6x mais que o menor valor, em casa de vegetação (1,21%).

**Figura 15** – Diferentes habitats no teor de iridoides totais (%) expressos em aucubina de *S. sellowiana*.



Fonte: Do autor (2021).

As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de significância. Desvio padrão e médias ( $n = 6$ ).

As amostras coletadas das plantas da Serra do Campestre – MG apresentaram o maior teor percentual de iridoídes totais expressos em aucubina, podendo ser explicada por alguns fatores.

Um dos fatores que se pode notar é a grande quantidade de potássio (K) encontrado em amostras do solo da Serra do Campestre – MG, o que provavelmente pode estar interligado com os resultados expressivos de teor de iridoide. O mineral potássio é um dos maiores ativadores enzimáticos em processos de fixação de carbono, e com isso ele pode ter influenciado a alta produção desses metabólitos secundários (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Também foi possível notar, uma quantidade maior de alumínio no solo da Serra. O alumínio é um elemento altamente tóxico para a planta, impedindo a absorção de nutrientes, e até mesmo pode causar um efeito negativo no enraizamento da planta (MIGUEL et al., 2010).

Nesse sentido, esses efeitos que o alumínio pode ativar uma cascata fisiológica e morfológica da planta, assumindo assim um possível estresse, que dessa forma pode haver um estímulo na produção de mecanismos de defesas, tais como a produção de compostos secundários.

Além disso, várias espécies do gênero *Stachytarpheta* spp. apresentam atividade inseticida (DE LUCA e BENAYS, 1981) e antimicrobiana (THOMAS et al., 2013), relacionadas principalmente com o iridoide ipolamiida. Supõe-se que no habitat natural a planta sofrerá uma série de fatores mecânicos aos quais as estão susceptíveis, tais como ferimentos, ou mesmo meros estímulos, causados por chuva, granizo, vento, areia, invasão por patógenos e pastagem de herbívoros, fatores que também podem influenciar a expressão do metabolismo secundário (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

O cultivo *in vitro* foi o segundo tratamento mais responsivo na produção de iridoídes totais. O iridoide é uma molécula monoterpenoídica, podendo estar principalmente em sua forma glicosilada. Além disso, no meio de cultivo, por não ter troca gasosa com o meio externo, é adicionado glicose ao substrato, contendo uma fonte de luz e energia podendo ser um fator importante na produção desses compostos.

É importante ressaltar que *S. sellowiana* encontra-se em risco de extinção. Nas análises de conteúdo de iridoídes presentes nesse trabalho, pode se concluir que a espécie em cultivo *in vitro* possui potencial para exploração *in vitro* como forma de uso sustentável deste recurso.

Em relação aos menores teores de iridoídes totais, o canteiro seguido pelo cultivo em casa de vegetação apresentaram menores valores. Em ambos os cultivos, as plantas conseguiam todos os recursos necessários disponíveis para um bom desenvolvimento (água, adubação e luz). Entretanto, nas amostras do canteiro, as plantas passaram por diferentes condições climáticas e, além disso, ao fato de estarem em ambiente aberto, houve interferência externa de insetos e agentes polinizantes que podem influenciar na expressão e produção desses metabólitos secundários.

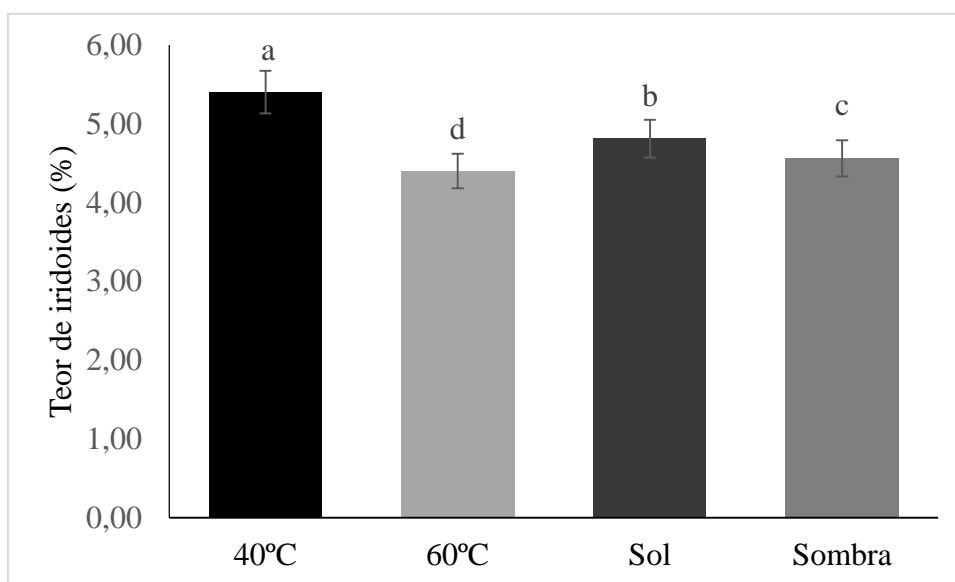
Danos causados a plantas por ferimentos ou ataque de herbívoros ou patógenos frequentemente levam a uma resposta bioquímica, que reduz a aceitabilidade do órgão ou de todo o organismo a ataques futuros (SIMÕES et al., 2006).

As plantas cultivadas em casa de vegetação possuem condições mais favoráveis ainda. Além de não sofrerem com os fatores climáticos, passaram por aplicações de fungicidas sistêmicos, não houve predação de insetos. Portanto nesse habitat não houve um estresse significativo, e a partir disso a planta acaba por não produzir tais compostos do metabolismo secundário.

#### 4.4 Influência do tipo de secagem no teor de Iridoides totais.

No presente estudo, foi realizados os tipos de secagem natural (pleno sol e sombra) e artificial (40°C e 60°C em estufa). Através dessa experimentação, foi possível constatar que existe diferença significativa no teor de iridoides totais. A secagem a 40 graus foi a que obteve um maior rendimento de iridoides (5,4%), seguido pelo método de secagem ao sol (4,81%), sombra (4,56%), e 60 graus (4,4%), apresentados na figura 16.

**Figura 16** – Influência do tipo de secagem no teor de iridoides totais (%) expressos em aucubina de *S. sellowiana*.



Fonte: Do autor (2021).

As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de significância. Desvio padrão e médias ( $n = 6$ ).

Simões et al., (2006) relata que para folhas e flores o recomendado seria em torno de 38 °C, o que neste estudo foi comprovado com a secagem a 40 graus e manteve o peso constante a partir de 2 dias. Temperaturas acima desses limites aceleram o processo de secagem, promovendo a degradação de muitos princípios ativos, como no caso da secagem a 60 graus que se obteve um menor conteúdo de iridoides, durante apenas um dia.

No que tange controle de qualidade o processo de secagem (tipo de secador, sistema de secagem, temperatura e umidade relativa do ar ambiente, etc.) podem tanto contribuir para uma melhor taxa de conteúdos medicinais ou diminuir esses percentuais.

No caso da secagem artificial, ela possui benefícios, como, ambiente e circulação controlada para o material vegetal, garantindo assim um retardo dos processos de deterioração, preservando as características organolépticas e concentrando a % de princípios ativos (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Os tipos de estabilização naturais compreendem a secagem a pleno sol e a sombra, como muitos produtores e agricultores utilizam. Esses métodos devem ser analisados para que tais processos sejam otimizados e produzam respostas para melhor controle de qualidade da matéria prima vegetal.

A estabilização ou secagem ao sol, além de promover a degradação de princípios ativos, acaba por gerar uma secagem rápida das bordas dos órgãos vegetais e criação de uma crosta relativamente impermeável à água nessas regiões, em pouco tempo o material aparenta estar seco, porém com seu interior úmido (SIMÕES et al, 2006). Além disso, na secagem ao sol há também a fotodegradação de compostos influenciando assim em um menor conteúdo de iridoides totais, como apresentados nesse estudo.

No experimento da secagem à sombra, apresentaram também menores conteúdos de iridoides totais, folhas escuras e demorou um período de duas semanas para seu peso se manter constante. Pode se constatar com isso que é um processo demorado e pode ocorrer reabsorção de água na planta, visto as temperaturas baixas, viabilizando assim uma maior degradação enzimática tanto da biomassa como dos metabólitos secundários (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

A secagem deve, portanto, ser procedida ao abrigo da luz, em secadores que promovam ambiente limpo, bem ventilado e protegido de quaisquer influências externas, como, ataque de insetos e outros animais como foi feito no experimento.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para a otimização extrativa, o Metanol 70% se demonstrou o melhor solvente extrativo. Os resultados da validação analítica indicaram que o método espectrofotométrico é seletivo a 622 nm, por não apresentar absorção significativa em solução de leitura sem adição do reagente de coloração, sendo linear na faixa de 0,0125 a 0,2 mg/mL,  $R^2=0,9968$ . O método é preciso, pois fornece desvios menores que 1,82%, exato com recuperação baixa, média e alta de 94,27%, 95,40% e 95,28% respectivamente, e robusto apenas frente a pequenas variações no comprimento de onda de leitura. E apresentou limite de quantificação 0,0125mg/mL e limite de detecção 0,0041 mg/mL

Quanto ao fator ambiental, os resultados evidenciaram que amostras da Serra do Campestre, MG de *S. sellowiana* possuem o maior teor de iridoides totais. Para as amostras que passaram por diferentes modos de secagem, a melhor foi 40°C.

Em futuras pesquisas esse estudo pode ser útil na prospecção fitoquímica da espécie, elucidação estrutural de um possível marcador químico e maior controle de qualidade da matéria prima vegetal.

## 6. REFERÊNCIAS

AKISUE G. et al. Presença de ipolamiida em *Stachytarpheta australis*. **An Farm Quim**. Vol. 21, p.57 - 59, 1981.

ÁLVAREZ, E., et al. Inhibitory effects of leaf extracts of *Stachytarpheta jamaicensis* (Verbenaceae) on the respiratory burst of rat macrophages, **Phytotherapy Research**, vol.18, no.6, pp. 457–462, 2004.

ALVES, I. A. B. dos S. et al. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por espectrofotometria no visível para quantificação de taninos totais na casca do caule de *Simarouba amara* Aubl. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 39, n. 1, p. 37-47, 2015.

AMAECHINA, F. C.; BAFOR, E. E. Bafor. In vitro inhibitory effect of methanol leaf extract of *Stachytarpheta jamaicensis* (Verbenaceae) on non-pregnant rat uterus. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v.15, n.12, p.2557-2562, 2016.

ATAMAN, J. E., et al. Histopathologic effects of *Stachytarpheta jamaicensis* (L.) Vahl. on Wistar rats. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.3, p. 477-482, 2006.

ATKINS, S. The genus *Stachytarpheta* (Verbenaceae) in Brazil. **Kew Bulletin**, n. 60, p. 161-272, 2005.

ATKINS, S.; ALVES, R. J. V.; KOLBECK, J. Plants in Peril, 23 *Stachytarpheta sellowiana*. **Curtis's Botanical Magazine**, v. 13, p.33 – 35, 1996.

BASTOS, L. M. et al. Integrative Approach Based on Simplex-Centroid Design, ESI-MS and Chemometric Analysis for Comprehensive Characterization of Phenolic Compounds from *Endopleura uchi* Bark. **J. Braz. Chem. Soc**. Vol. 31, n.2, p. 351-356, 2020

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília, DF, 2017. Disponível em: <[https://www.in.gov.br/materia/-/asset\\_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/do1-2017-07-25-resolucao-rdc-n-166-de-24-de-julho-de-2017-19194412](https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/do1-2017-07-25-resolucao-rdc-n-166-de-24-de-julho-de-2017-19194412)>. Acesso em: 3 fev. 2021.

União internacional para conservação da natureza - IUCN 2017. *The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2017-3*. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Downloaded on 05 December 2020.

CAAMAL-FUENTES, E., et al. Screening of plants used in Mayan traditional medicine to treat cancer-like symptoms. **Journal of Ethnopharmacology**. Vol.135,no. 3, pp.719–724, 2011.

CARNEIRO, F. B. et al. Variação da quantidade de  $\beta$ -cariofileno em óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng., Lamiaceae, sob diferentes condições de cultivo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Vol. 20(4), p. 600-606, 2001

CHARIANDY, C.M., et al. Screening of medicinal plants from Trinidad and Tobago for antimicrobial and insecticidal properties. **Journal of Ethnopharmacology**. Vol.64, no.3,pp. 265–270, 1999.

CHOWDHURY, R., et al. Bioactivity of Extractives from *Stachytarpheta urticaefolia*. **Pharmaceutical Biology**. Vol. 42:3, p. 262-267, 2004.

DE LUCA, C. Isolation of ipolamiide from *Stachytarpheta mutabilis*. **Fitoterapia**. Vol. 51, p. 279–280, 1980

DE LUCA, C. & BERNAYS, E. Insect antifeedant properties of an iridoid glycoside: ipolamiide. **Experientia**, 37(12), 1289–1290, 1981.

DE LUCA, C., et al. 6 $\beta$ -Hydroxyipolamiide, an iridoid glucoside from *Stachytarpheta mutabilis*. **Phytochemistry**, v.22(5), p.1185-1187, 1983.

DE SOUZA, P. A., et al. Antioxidant activity of natural compounds of *Stachytarpheta cayennensis* by scavenger of mitochondrial reactive oxygen species. **Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.21, n.3, p.420-426, 2011.

DE SOUZA, P. A., et al. Evaluation of antimicrobial, antioxidant and phototoxic activities of extracts and isolated compounds from *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl, Verbenaceae. **Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.20, n.6, p.922-928, 2010.

DIAS, F. R. S. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS. 2019.

DILLARD, C. J. & GERMAN J. B. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. Vol.80, no.12, pp.1744–1756, 2000.

EDEOGA, H. O. Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. **African Journal of Biotechnology**. Vol. 4, p.685-688, 2005

EL-NAGGAR, L.; BEAL, J.L., Iridoids A Review. **Journal of Natural Products**, Columbus, v. 43, n. 6, p. 649-707, 1980.

ERDENECHIMEG, CH., et al. Total phenolic, flavonoid, alkaloid and iridoid content and preventive effect of Lider-7-tang on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. Vol 50(12), .2017.

FERREIRA, D. F. SISVAR - Sistemas de análises de variância para dados balanceados: programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos. Lavras: Ed. UFLA, 2011.



FILHO, J. G. Iridóides glicosilados das raízes de *Lippia alba*(Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae): Obtenção, caracterização e bioatividade. 2007. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, 2007.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for industry:** analytical procedures and methods validation for drugs and biologics. 2014. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm386366.pdf>>. Acesso em: 04 mar. 2021

FROELICH, S., et al. Phenylethanoid glycosides from *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl, Verbenaceae, a traditional antimalarial medicinal plant. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, n.4, p.517-520, 2008.

FUTURO, D. O. & KAPLAN, M. A. C. Analysis of Iridoid Glucosides from *Stachytarpheta cayennensis* by NMR Spectroscopy. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. Vol. 70, p. 755-759, 1998.

GALVEZ, M. et al. Antioxidant Activity of Methanol Extracts Obtained from *Plantago* Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Vol. 53, p. 1927-1933, 2005.

GAMACHE, D.A., et al. Carrageenan-induced brain inflammation. Characterization of the model. **J Neurosurg**. Vol. 65, p. 675–685, 1986.

GANAPATY S. et al. Phytoconstituents from the roots of *Stachytarpheta indica*. **J Med Aromat Plant Sci**. Vol. 20, p. 697 - 699, 1998.

GARNER, J. Chemical study of two Verbenaceae from Guyana: *Stachytarpheta guyanensis* Vahl. and *Stachytarpheta mutabilis* Vahl. **Plantes Medicinales et Phytotherapie**. Vol. 11, p.303-305, 1997.

GOBBO-NETO, L. & LOPES, N. P. PLANTAS MEDICINAIS: FATORES NA INFLUÊNCIA NO CONTEÚDO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS. **Quim. Nova**, Vol. 30, p. 374-381, 2007

HAMMER, M.L.A & JOHNS, E. A. Tapping an Amazônian plethora: four medicinal plants of Marajó Island, Pará (Brazi). **Journal of Ethnopharmacology**. Vol. 40, p. 53-75, 1993.

IDU, M., et al. Some cardiovascular effects of the aqueous extract of the leaves of *Stachytarpheta jamaicensis* L. Vahl. **International Journal of Pharmacology**, Vol.2, no. 2, pp.163–165, 2006.

IDU, M., et al. Preliminary phytochemistry, antimicrobial properties and acute toxicity of *Stachytarpheta jamaicensis* (L.) Vahl. leaves. **Trends in Medical Research**, vol. 2, no. 4, pp. 193–198, 2007.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline. **Validation of analytical procedures: methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/96)**. London: European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 1996.

IROHA, I. R., et al. Screening for anti-typhoid activity of some medicinal plants used in traditional medicine in Ebonyi state, Nigeria. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**. Vol.4,no. 12,pp. 860–864, 2010.

ISMADJI, S. et al. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of bioactive compounds from *Stachytarpheta jamaicensis* (L) Vahl. **International Food Research Journal**. Vol. 23(5), p. 2144-2150, 2016.

LEITAO, G. G. Step-gradient CCC separation of phenylpropanoid and iridoid glycosides from roots of *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) vahl. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**. Vol. 28, p. 2053-2060, 2005

LIN, S. R. & CHEN, A. H. Phytochemical study on *Stachytarpheta jamaicensis*. **Chung-Kuo Nung Yeh Hua Hsueh Hui Chih**. Vol. 14, p. 151–154, 1976.

MIGUEL, P. S. B., et al. Efeitos tóxicos do alumínio no crescimento das plantas: mecanismos de tolerância, sintomas, efeitos fisiológicos, bioquímicos e controles genéticos. **CES Revista**. Vol. 24, 2010.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NARAYANAN, P. & AKAMANCHI, K.G. Colorimetric estimation of total iridoid content of *Picrorhiza kurrooa*. **Journal of Asian Natural Products Research** Vol. 5 (2), pp. 105–111, 2003.

NAZAR, S., et al. Screening of Indian coastal plant extracts for larvicidal activity of *Culex quinquefasciatus*. **Indian Journal of Science and Technology**. Vol.2,no. 3, pp.24–27, 2009.

OKOYE, T. C., et al. Immunomodulatory effects of *Stachytarpheta cayennensis* leaf extract and its synergistic effect with artesunate. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.14, n.1, 2014.

ONIGA, I., et al. Phytochemical Composition, Antioxidant, Antimicrobial and *in Vivo* Anti-inflammatory Activity of Traditionally Used Romanian *Ajuga laxmannii* (Murray) Benth. (“Nobleman’s Beard” – Barba Imparatalui). **Front. Pharmacol.** 9:7, 2017.

OSORIO, D. V. Composición del aceite esencial y caracterización físicoquímica de las hojas de *Stachytarpheta mutabilis* (Jacq.) Vahl. **Avances en Química**. Vol.9, p.15-19, 2014.

PANDIAN, C., et al. Evaluation of wound healing activity of hydroalcoholic extract of leaves of *Stachytarpheta jamaicensis* in streptozotocin induced diabetic rats. **Der Pharmacia Lettre**, v.5, n.2, p.193-200, 2013.

PIMENTA, M. R. et al. Floração, germinação e estaquia em espécies de *Lippia* L. (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 30, n. 2, p. 211-220, 2007.

PRINCELY, S., et al. Preliminary phytochemical screening and antimicrobial activity of aerial parts of *Stachytarpheta indica* L. (Vahl). **Medicinal Plants**, v.5, n.2, p. 96-101, 2013.

<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Iridomirmecina#section=Structures>>. Acesso em 28/05/2021 as 10:00.

RAHMATULLAH, M. et al. Folk medicinal uses of Verbenaceae family plants in Bangladesh. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 8, n. 5S, 2011.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROBINSON, R. D., et al. Inactivation of strongyloides stercoralis filariform larvae *in vitro* by six Jamaican plant extracts and three commercial anthelmintics. **The West Indian Medical Journal**. Vol. 39,no. 4, pp.213–217, 1990.

RODRIGUEZ, S.M. & CASTRO, O. Evaluación farmacológica y química de *Stachytarpheta jamaicensis* (Verbenaceae). **Revista de Biología Tropical**. Vol. 44, p. 353-359, 1996.

ROENGSUMRAN, S. et al. Crystal structure of ipolamiide monohydrate from *Stachytarpheta indica*. **Analytical Sciences**. Vol. 18, p. 1063-1064, 2002.

ROZIANOOR, M. H., et al. Hypoglycemic and antioxidant activities of *Stachytarpheta jamaicensis* ethanolic leaves extract on alloxan-induced diabetic sprague dawley rats. **Biotechnology: An Indian Journal**, v.9, n.10, p.423-428, 2014.

SALIMENA, F.R.P.; GIULIETTI, A. M. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Verbenaceae. **Boletim de Botânica da Univ. de São Paulo: Santa Maria**, v.17, p.155-186, 1998.

SAMPAIO-SANTOS, M. I. & KAPLAN, M. A. C. Biosynthesis Significance of Iridoids in Chemosystematics. **Journal Brazilian Chemistry Soc.**, Vol. 12, No. 2, 144-153, 2001

SCHAPOVAL, E. E. S., et al. Antiinflammatory and antinociceptive activities of extracts and isolated compounds from *Stachytarpheta cayennensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.60, n.1, p.53-59, 1998.

SIMÕES, O. C. M. et al. Farmacognosia. Da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis. Editora da UFSC/ Editora da Universidade UFRGS, 2006.

SIVARANJANI, R., et al. Evaluation of in vitro antioxidant activity and estimation of total phenol and flavonoids contents of various extracts of *Stachytarpheta jamaicensis*. **International Journal of Innovative Drug Discovery**. Vol.4,no. 1, pp.31–37, 2014.

SOUZA SILVA, P. S., et al. *Stachytarpheta gesnerioides* Cham.: chemical composition of hexane fraction and essential oil, antioxidant and antimicrobial activities. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, v.11, n.6, p.542-548, 2012.

SREELATHA, R., et al. In vitro antimicrobial activity of different parts of *Stachytarpheta Urticifolia* (Salisb) Sims. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.6, n.1, p.340-343, 2014.

SOUSA, E. A.; CHAVES, M. H. Iridoides e Atividades Biológicas de Espécies da Tribo Gardenieae: Uma Contribuição Quimiotaxonômica para a Família Rubiaceae. **Ver. Virtual Quim.**, 2019, 11 (6).

SULAIMAN, M. R., et al. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of *Stachytarpheta jamaicensis* (L.) Vahl (Verbenaceae) In Experimental Animal Models. **Medicinal Principles and Practice**. Vol. 18, p. 272-279, 2009.

*Stachytarpheta* in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB15193>>. Acesso em: 07 fev. 2021

THANGIAH, A. S. Phytochemical screening and antimicrobial evaluation of ethanolic-aqua extract of *Stachytarpheta jamaicensis* (L.) vahl leaves against some selected human pathogenic bacteria. **Rasayan Journal of Chemistry**. Vol. 12, p. 300-307, 2019.

TRIM, A.R. and HILL, R. The preparation and Properties of Aucubin, Asperuloside and Some Related Glycosides. **Biochemical Laboratory, University of Cambridge**. v.50, 1951.

TUNDIS, R. et al. Antioxidant and Anti-cholinesterase Activity of *Globularia meridionalis* Extracts and Isolated Constituents. **Natural Product Communications**. Vol. 7(8), p. 1015-1020, 2012.

VELA, S. M., et al. Inhibition of gastric acid secretion by the aqueous extract and purified extracts of *Stachytarpheta cayennensis*. **Planta Medica**, v.63(1), p.36-39, 1997.

VICCINI, L. F., et al. Ipolamiide and fulvoipolarniide from *Stachytarpheta glabra* (Verbenaceae): A structural and spectroscopic characterization. **Journal of Molecular Structure**, v.875(1-3), p. 27-31, 2008.

VIKASARI, S. N., et al. Immunomodulatory effect of water extract of *Stachytarpheta jamaicensis* (L.) Vahl. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v.5, p.62-66, 2015.

OKOYE, T. C., et al. Antimicrobial and antispasmodic activity of leaf extract and fractions of *Stachytarpheta cayennensis*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.3, n.3, p.189-192, 2010.

WANG, C., et al. Iridoids: Research Advances in Their Phytochemistry, Biological Activities, and Pharmacokinetics. **Molecules**, 25, 287, 2020.

WORADULAYAPINIJ, W., et al. In vitro HIV type 1 reverse transcriptase inhibitory activities of Thai medicinal plants and *Canna indica* L. rhizomes. **Journal of Ethnopharmacology**. Vol.101,no. 1–3, pp.84–89, 2005.

## Apêndice A

Obtenção da fórmula para cálculo do teor de iridoides, expressos em aucubina por espectrofotometria no UV-Vis, a partir da equação da reta obtida para a curva analítica.

- Considerando a equação da reta onde o intercepto difere estatisticamente de zero tem-se:

$$[\text{aucubina}] = A_{\text{corrig}} + 0,0146/7,5597$$

Onde: [aucubina] = concentração de aucubina em mg/mL

A<sub>corrig</sub> = absorvância corrigida a 622 nm

Quantidade de Iridoides totais

- Considerando o fator de diluição na solução de leitura (FD), onde as amostras do Horto, Casa de vegetação e Cultura de tecidos = 2, e amostras da serra = 8, foi empregado o seguinte fator de correção (FC).

$$FC = [\text{aucubina}] \times FD$$

- Cálculo do teor de IT expresso em aucubina:

$$\begin{array}{l} FC \text{ ----- massa seca de folha (10 mg)} \\ IT \% \text{ ----- 100 mg de massa seca de folha} \end{array}$$