

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Pâmela Souza Silva

**VERBENACEAE DA SERRA DO CIPÓ: ASPECTOS
BIOSSISTEMÁTICOS, QUÍMICOS E FARMACOLÓGICO**

Juiz de Fora - MG – Brasil
2008

PÂMELA SOUZA SILVA

**VERBENACEAE DA SERRA DO CIPÓ: ASPECTOS
BIOSSISTEMÁTICOS, QUÍMICOS E FARMACOLÓGICO**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Genética/Biotecnologia, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Genética/Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Lyderson Facio Viccini

Juiz de Fora - MG – Brasil
2008

Silva, Pâmela Souza

Verbenaceae da Serra do Cipó: aspectos
biossistemáticos, químicos e farmacológico / Pâmela Souza
Silva ; orientador: Dr. Lyderson Facio Viccini. -- 2008.
206 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)–Instituto
de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora.

1. Verbenaceae. 2. Antioxidantes. 3. Fauna florestal-
Serra do Cipó-Minas Gerais.

CDU 591.9:918.1(815.1)

Pâmela Souza Silva

**VERBENACEAE DA SERRA DO CIPÓ: ASPECTOS
BIOSSISTEMÁTICOS, QUÍMICOS E FARMACOLÓGICO**

Universidade Federal de Juiz de Fora
Mestrado em Ciências Biológicas Área: Genética/Biotecnologia

Aprovada em 22 de fevereiro de 2008

Dr. Lyderson Facio Viccini
Doutor em Genética e Melhoramento pela UFV
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Tânia Maria de Almeida Alves
Doutora em Química pela UFMG
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

Dr. Wagner Campos Ottoni
Doutor em Genética e Melhoramento pela UFV
Universidade Federal de Viçosa

*“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo
começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”
(Chico Xavier 1910-2002)*

*À flor mais linda, minha mãe, Lídia,
ofereço*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom maior, a vida.

À Universidade Federal de Juiz de Fora pela oportunidade de realizar este trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais, pelo apoio financeiro.

À minha mãe, Lídia, pela compreensão, pelo incentivo e pelas palavras doces.

Aos meus tios Luís e Tita, por abrirem as portas da casa e do coração para que eu pudesse morar.

Ao meu amigo e orientador, Prof. Dr. Lyderson Facio Viccini pelo simples fato de tê-lo conhecido. Pela oportunidade e confiança em desenvolver esse belíssimo trabalho. Por ter despertado meu lado bióloga. Pelas conversas intermináveis. Pelos conselhos, as cobranças, os “puxões de orelha”, as brincadeiras e a paciência em todos os momentos. Enfim, por ter me feito uma pessoa melhor.

Ao Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Santos e Profa. Dra. Cíntia Marques Coelho, pela amizade, pelo apoio, pelas contribuições científicas e pessoais.

À Profa. Dra. Nádia Rezende Barbosa, pelo carinho, os conselhos, por tantos ensinamentos. Por ter aberto as portas do NIQUA para o desenvolvimento de parte da dissertação.

À Profa. Dra. Tânia Maria Almeida e Dr. Carlos Zani (FIOCRUZ), pelo incentivo e parceria.

Ao Prof. Dr. Mauro Vieira de Almeida, pela paciência, ensinamentos e apoio.

Ao Prof. Dr. Henrique Teixeira e Profa. Dra. Ana Paula Ferreira, pela parceria.

Ao Prof. Dr. Eduardo Alves (UFLA), por ter colocado seu laboratório à disposição.

À Profa. Dra. Fátima Regina Salimena, por tantos ensinamentos.

Ao eterno amigo Rafael Cypriano Dutra pelas gargalhadas, pelo imenso carinho, respeito e por grandes contribuições técnicas.

De maneira muito especial, à Fernanda Sampaio, Saulo Marçal de Sousa e José Marcello Salabert Campos pela confiança, longas conversas, conselhos decisivos e por terem me incentivado quando quis desistir de tudo. Pela participação e obtenção dos resultados.

À Junya De Lacorte Singulani, pela ajuda, pelo carinho, pelo respeito.

Ao Raphael Trevizani pelas grandes contribuições científicas e pessoais.

À Karina Coutinho Ferraz, pela amizade e força nos momentos mais difíceis.

A todos os amigos do Laboratório de Genética Ana Paula, Camila, Cecília, Clara, Diego, Letícia, Lucas, Priciane, Robert, pelo convívio, auxílio e amizade.

À Carla e Sabine pela ajuda.

A todos os amigos do Departamento de Biologia, Niqua e FFB.

Aos amigos Frederico, Vanessa, Vivian, Lara, Fernanda Gomes, Júlia Góes, Liliane, por ter tornado o caminho mais alegre.

Agradeço a todas as pessoas que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

SILVA, P. S. **Verbenaceae da Serra do Cipó: Aspectos Biossistemáticos, Químicos e Farmacológico.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2008.

A família Verbenaceae ocorre em praticamente todos os ecossistemas terrestres, sendo uma das cinco famílias mais importantes entre as eudicotiledôneas dos campos rupestres. A família apresenta, aproximadamente, 2600 espécies reunidas em 100 gêneros com distribuição pantropical, com poucas espécies ocorrendo nas regiões temperadas. Na Serra do Cipó são encontrados vários gêneros de Verbenaceae, destacando-se *Aegiphila*, *Aloysia*, *Bouchea*, *Lippia*, *Lantana*, *Stachytarpheta*, *Verbena* e *Vitex*. Apesar de alguns gêneros serem bastante estudados, pouco se conhece sobre as espécies brasileiras. O objetivo do presente trabalho foi aprofundar os estudos biossistemáticos de *Aeghipila lhotzkiana*, *Aeghipila sellowiana*, *Aloysia virgata*, *Bouchea fluminensis*, *Lantana aff. fucata*, *Lantana fucata*, *Lippia aristata*, *Lippia aff. microphylla*, *Lippia martiana*, *Lippia salviifolia*, *Stachytarpheta gesnerioides*, *Stachytarpheta glabra*, *Stachytarpheta mexiae*, *Stachytarpheta procumbens*, *Stachytarpheta reticulata*, *Verbena litoralis* e *Vitex polygama* ocorrentes na Serra do Cipó, através de técnicas citogenéticas, palinológicas e por citometria de fluxo (Capítulo 1). Considerando o imenso potencial medicinal atribuído a várias espécies do gênero, foram realizadas análises químicas, bem como ensaios biológicos, na busca por potenciais fontes de antioxidantes naturais (Capítulo 2). Para quinze espécies das dezessete estudadas, este constitui o primeiro relato na literatura sobre sua caracterização cromossômica. Os números cromossômicos variaram de $2n=24$ a $2n=82$. Adicionalmente, esse foi o primeiro relato da estimativa do conteúdo de DNA nuclear para todas as espécies em estudo, variando de 1,14 pg a 10,35 pg. As descrições polínicas foram também inéditas para quatorze espécies analisadas. A família Verbenaceae mostrou uma grande variação na estrutura da exina e na morfologia dos grãos de pólen. Os tamanhos variaram de $P=20,59 \mu\text{m}$ / $E=21,68 \mu\text{m}$ em a $P=129,55 \mu\text{m}$ / $E=93,55 \mu\text{m}$. Este foi o primeiro estudo dos componentes voláteis para nove das espécies estudadas, sendo uma fonte importante para pesquisas posteriores envolvendo ensaios biológicos, uma vez que muitos dos componentes majoritários identificados possuem ação biológica comprovada. O estudo diferenciado de *Stachytarpheta glabra* conduziu à purificação, ao isolamento e identificação dos compostos ipolamiida, acteosídeo e fulvoipolamiida, descritos pela primeira vez para a espécie. A atividade antioxidante demonstrada pelos extratos etanólicos de *Lippia* e *Lantana*, provavelmente, deve-se à ação dos compostos fenólicos, principalmente aos flavonóides identificados na triagem fitoquímica.

Palavras-chaves: Verbenaceae; citogenética; citometria de fluxo; pólen; componentes voláteis; atividade antioxidante; Serra do Cipó - MG.

ABSTRACT

SILVA, P. S. **Verbenaceae from Serra do Cipó: Biosystematics, Chemistrys and Pharmacological Aspects**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2008.

The Verbenaceae family is widely found in practically every terrestrial ecosystem. It is one of the five most important families among the Eudicotyledonous of Campus Rupestres. This family includes 2600 species and 100 genera with a pantropical distribution with few species found in the temperate areas. At Serra do Cipó, several genera of Verbenaceae were reported, such as *Aegiphila*, *Aloysia*, *Bouchea*, *Lippia*, *Lantana*, *Stachytarpheta*, *Verbena* and *Vitex*. In spite of the study of some genera, little is known about the Brazilian species. The objective of the present study was to investigate, using a biosystematic approach, *Aeghipila lhotzkiana*, *Aeghipila sellowiana*, *Aloysia virgata*, *Bouchea fluminensis*, *Lantana aff. fucata*, *Lantana fucata*, *Lippia aristata*, *Lippia aff. microphylla*, *Lippia martiana*, *Lippia salviifolia*, *Stachytarpheta gesnerioides*, *Stachytarpheta glabra*, *Stachytarpheta mexiae*, *Stachytarpheta procumbens*, *Stachytarpheta reticulata*, *Verbena litoralis* and *Vitex polygama* collected at Serra do Cipó, by cytogenetic, palinologic and flow cytometry techniques (Chapter 1). Considering the medicinal potential attributed to several species of the genus, chemical analyses, as well as biological tests were performed in order to prospect for potential sources of natural antioxidants (Chapter 2). For fifteen of seventeen species studied, this is the first report in the literature about the chromosome characterization. The chromosome numbers ranged from $2n = 24$ to $2n = 84$. Additionally, this was the first report of the the nuclear DNA amount for all species studied, ranging from 1.14 pg to 10.35 pg. The pollen structure of fourteen species analyzed was also reported for the first time. The Verbenaceae family showed a wide variation of the exine structure and morphology of pollen grains. The sizes ranged from $P=20.59 \mu\text{m} / E = 21.68 \mu\text{m}$ to $P = 129.55 \mu\text{m} / E = 93.55 \mu\text{m}$. This was the first study of the volatile components for nine of the studied species being an important source for subsequent researches, once many of the major components identified possess proven biological action. The differentiated study of *Stachytarpheta glabra* allowed the purification, isolation and identification of compounds ipolamiide, acteoside and fulvoipolamiide, described for the first time for the species. The antioxidant activity demonstrated by etanolic extracts of *Lippia* and *Lantana* was, probably due to the action of phenolic compounds, especially the flavonoids identified in the phytochemical screening.

Keywords: Verbenaceae; cytogenetic; chromosome number; flow cytometry; pollen; volatile compounds; antioxidant activity; Serra do Cipó - MG.

LISTA DE FIGURAS

Figura 0.1 –	Localização da Cadeia do Espinhaço (áreas acima de 1000 m), seus principais maciços nos estados de Minas Gerais e Bahia (leste do Brasil) e as bacias hidrográficas	23
Figura 1.1 –	Espécies de Verbenaceae coletadas na Serra do Cipó	42
Figura 1.2 –	Diagrama do processo de preparo das amostras para medida do conteúdo de DNA nuclear por citometria de fluxo desenvolvido por Galbraith (1983)	50
Figura 1.3 –	Comportamento meiótico de indivíduos masculinos de <i>Aegiphila lhotzkiana</i>	58
Figura 1.4 –	Comportamento meiótico de indivíduos femininos de <i>A. lhotzkiana</i>	59
Figura 1.5 –	Comportamento meiótico de <i>Aegiphila sellowiana</i>	60
Figura 1.6 –	Comportamento meiótico de <i>Aloysia virgata</i>	61
Figura 1.7 –	Comportamento meiótico de <i>Bouchea fluminensis</i>	62
Figura 1.8 –	Comportamento meiótico de <i>Lantana aff. fucata</i>	63
Figura 1.9 –	Comportamento meiótico de <i>Lantana fucata</i>	64
Figura 1.10 –	Comportamento meiótico de <i>Lippia aff. microphylla</i>	66
Figura 1.11 –	Comportamento meiótico de <i>Lippia aristata</i>	67
Figura 1.12 –	Comportamento meiótico de <i>Lippia martiana</i>	68
Figura 1.13 –	Comportamento meiótico de <i>Lippia salviifolia</i>	69
Figura 1.14 –	Comportamento meiótico de <i>Stachytarpheta gesnerioides</i>	70
Figura 1.15 –	Comportamento meiótico de <i>Stachytarpheta glabra</i>	71
Figura 1.16 –	Comportamento meiótico de <i>Stachytarpheta mexiae</i>	72
Figura 1.17 –	Comportamento meiótico de <i>Stachytarpheta procumbens</i>	73
Figura 1.18 –	Comportamento meiótico de <i>Stachytarpheta reticulata</i>	74
Figura 1.19 –	Comportamento meiótico de <i>Verbena litoralis</i>	75
Figura 1.20 –	Metáfase mitótica de <i>Vitex polygama</i>	76

Figura 1.21 – Histogramas obtidos para estimativa do conteúdo de DNA nuclear de espécies de Verbenaceae	78
Figura 1.22 – Pólen de <i>Aegiphila lhotzkiana</i> e <i>Aegiphila sellowiana</i>	86
Figura 1.23 – Pólen de <i>Aloysia virgata</i>	86
Figura 1.24 – Pólen de <i>Bouchea fluminensis</i>	87
Figura 1.25 – Pólen de <i>Lantana aff. fucata</i> e <i>Lantana fucata</i>	87
Figura 1.26 – Pólen de <i>Lippia aff. microphylla</i> , <i>L. aristata</i> , <i>L. martiana</i> e <i>L. salviifolia</i>	88
Figura 1.27 – Pólen de <i>S. gesnerioides</i> , <i>S. glabra</i> , <i>S. mexiae</i> ; <i>S. procumbens</i> e <i>S. reticulata</i>	89
Figura 1.28 – Pólen de <i>Verbena litoralis</i>	90
Figura 1.29 – Pólen de <i>Vitex polygama</i>	90
Figura 1.30 – Cladograma obtido a partir da análise morfológica de 56 taxa de <i>Stachytarpheta</i>	101
Figura 2.1 – Estrutura da fulvoipolamiida, ipolamiida e acteosídeo	156
Figura 2.2 – Formação da fulvoipolamiida a partir da ipolamiida	164

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Descrição estatística (mínimo, máximo e média) do conteúdo C de DNA nos maiores grupos vegetais, juntamente com o número que essas espécies representam dentro de cada grupo	37
Tabela 1.2 – Espécies de Verbenaceae coletadas na Serra do Cipó – MG	41
Tabela 1.3 – Tamanho usado para coleta de flores visando ao estudo meiótico dos cromossomos para 16 espécies de Verbenaceae da Serra do Cipó	54
Tabela 1.4 – Números cromossômicos de espécies de Verbenaceae da Serra do Cipó	55
Tabela 1.5 – Quantidade de DNA nuclear (2C) de espécies de Verbenaceae	81
Tabela 1.6 – Medidas e classificações polínicas de espécies de Verbenaceae	84
Tabela 1.7 – Números cromossômicos das espécies de <i>Lippia</i> de acordo com cada Seção	98
Tabela 2.1 – Resumo dos experimentos realizados e as espécies de Verbenaceae da Serra do Cipó ensaiadas para cada um deles	118
Tabela 2.2 – Espécies de Verbenaceae analisadas por dois diferentes métodos de fracionamento durante o período seco e período de águas	120
Tabela 2.3 – Rendimento médio em óleo essencial de folhas de espécies de Verbenaceae da Serra do Cipó em duas estações	133
Tabela 2.4 – Compostos identificados no óleo essencial e fração hexânica de <i>Aegiphila lhotzkiana</i>	135
Tabela 2.5 – Compostos identificados no óleo essencial e fração hexânica de <i>Aegiphila sellowiana</i>	136

Tabela 2.6 – Compostos identificados no óleo essencial e fração hexânica de <i>Aloysia virgata</i>	139
Tabela 2.7 – Compostos identificados no óleo essencial e fração hexânica de <i>Lantana aff. fucata</i>	141
Tabela 2.8 – Compostos identificados no óleo essencial e fração hexânica de <i>Lantana fucata</i>	142
Tabela 2.9 – Compostos identificados no óleo essencial e fração hexânica de <i>Lippia aristata</i>	145
Tabela 2.10 – Compostos identificados no óleo essencial e fração hexânica de <i>Lippia aff. microphylla</i> (população de Chapéu do Sol)	146
Tabela 2.11 – Compostos identificados no óleo essencial e fração hexânica de <i>Lippia aff. microphylla</i> (população da estrada da Usina)	148
Tabela 2.12 – Compostos identificados no óleo essencial e fração hexânica de <i>Lippia martiana</i> (flor branca)	150
Tabela 2.13 – Compostos identificados no óleo essencial e fração hexânica de <i>Lippia martiana</i> (flor rosa)	151
Tabela 2.14 – Compostos identificados no óleo essencial e fração hexânica de <i>Lippia salviifolia</i>	152
Tabela 2.15 – Compostos identificados no óleo essencial e fração hexânica de <i>Stachytarpheta gesnerioides</i>	154
Tabela 2.16 – Compostos identificados no óleo essencial e fração hexânica de <i>Vitex polygama</i>	155
Tabela 2.17 – Identificação de grupos de substâncias do metabolismo secundário nas folhas de espécies de <i>Lippia</i> e <i>Lantana</i> .	157
Tabela 2.18 – Rendimento das frações hexânica e etanólica de espécies de <i>Lippia</i> e <i>Lantana</i>	158
Tabela 2.19 – Valores de CI_{50} para atividade antioxidante de espécies de Verbenaceae	159

Tabela 0.1 – Quantidade de DNA, número cromossômico e classificação polínica de dezessete espécies de Verbenaceae da Serra do Cipó – MG	170
Tabela 0.2 – Constituintes majoritários identificados nas folhas das espécies de Verbenaceae da Serra do Cipó – MG	172

LISTA DE ABREVIATURAS

APA – Área de Proteção Ambiental

BHT – butil-hidróxi-tolueno

CCD – Cromatografia de camada delgada

CG/EM – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

Cl₅₀ – Concentração eficaz 50%

cm – centímetro

CV – Coeficiente de variação

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DPPH – 2,2-difenil-1,2-picrilhidrazil

E – Eixo Equatorial

EBE – Extrato bruto etanólico

FE – Fração etanólica

FH – Fração hexânica

g - grama

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

H₃BO₃ - ácido bórico

HCl - ácido clorídrico

HQ - 8-hidroxiquinoleína

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

IK – Índice de *Kovats*

kg – kilograma

KOH - hidróxido de potássio

LUV – Luz ultra-violeta

m – metro

mm – milímetro

M – Molar

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

Mg - magnésio

mg – miligrama

mL – mililitro

ML – Microscopia de Luz

N - Normal

NaOH - hidróxido de sódio

nm – nanômetro

µL – microlitro

µg – micrograma

µm - micrômetro

NaOH - hidróxido de sódio

OE – Óleo essencial

OMS – Organização Mundial da Saúde

P – Eixo Polar

p.a. – para análise

rpm – rotação por minuto

TR – Tempo de Retenção

UFJF – Universidade Federal de Juiz de Fora

UFLA - Universidade Federal de Lavras

λ – Comprimento de onda

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	20
1 Campos Rupestres	20
2 A Serra do Cipó	22
3 A família Verbenaceae: Caracterização, distribuição e importância econômica	24
OBJETIVO GERAL	31
CAPÍTULO 1	
BIOSSISTEMÁTICA DE ESPÉCIES DE VERBENACEAE DA SERRA DO CIPÓ	32
1 INTRODUÇÃO	32
1.1 Caracterização citogenética	32
1.2 Análise do conteúdo de DNA nuclear	36
1.3 Palinologia	38
2 OBJETIVOS	39
3 MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 Coleta do material vegetal	40
3.2 Análise citogenética	45
3.2.1 Estudo meiótico	45
3.2.2 Estudo mitótico	48
3.3 Estimativa do conteúdo de DNA nuclear	49
3.4 Palinologia	51
4 RESULTADOS	54
4.1 Análise citogenética	54
4.2 Estimativa do conteúdo de DNA nuclear	77
4.3 Palinologia	82

5 DISCUSSÃO	91
5.1 Gênero <i>Aegiphila</i>	92
5.2 Gênero <i>Aloysia</i>	94
5.3 Gênero <i>Bouchea</i>	94
5.4 Gênero <i>Lantana</i>	95
5.5 Gênero <i>Lippia</i>	96
5.6 Gênero <i>Stachytarpheta</i>	99
5.7 Gênero <i>Verbena</i>	102
5.8 Gênero <i>Vitex</i>	103
5.9 Número cromossômico, tamanho do genoma e características polínicas em um contexto filogenético	104
6 CONCLUSÃO	106
CAPÍTULO 2	
AVALIAÇÃO QUÍMICA E FARMACOLÓGICA DE ESPÉCIES DE VERBENACEAE DA SERRA DO CIPÓ	108
1 INTRODUÇÃO	108
1.1 A Biodiversidade Brasileira	108
1.2 Fitoquímica de espécies de Verbenaceae	110
1.3 Plantas e Antioxidantes	114
2 OBJETIVOS	117
2.1 Objetivos específicos	117
3 MATERIAL E MÉTODOS	118
3.1 Caracterização química	119
3.1.1 Caracterização dos constituintes voláteis por CG/EM	119
3.1.1.1 Coleta do material vegetal	119

3.1.1.2 Análise do óleo essencial e fração hexânica	120
3.1.2 Isolamento e identificação estrutural dos constituintes majoritários de <i>Stachytarpheta glabra</i> por RMN	123
3.1.2.1 Coleta do material vegetal	123
3.1.2.2 Extração, isolamento e identificação dos componentes majoritários	123
3.1.3 Triagem fitoquímica de espécies de <i>Lippia</i> e <i>Lantana</i>	124
3.1.3.1 Flavonóides	125
3.1.3.2 Leucoantocianidinas	126
3.1.3.3 Taninos	126
3.1.3.4 Cumarinas	127
3.1.3.5 Heterosídeos	127
3.1.3.6 Saponinas	128
3.1.3.7 Alcalóides	129
3.1.3.8 Antraquinonas	129
3.2 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de espécies de <i>Lippia</i> e <i>Lantana</i>	130
3.2.1 Preparação dos extratos	130
3.2.2 Atividade antioxidante (atividade seqüestrante)	131
4 RESULTADOS	132
4.1 Caracterização química	132
4.1.1 Caracterização dos constituintes voláteis por CG/EM	132
4.1.1.1 Gênero <i>Aegiphila</i>	134
4.1.1.2 Gênero <i>Aloysia</i>	138
4.1.1.3 Gênero <i>Lantana</i>	140
4.1.1.4 Gênero <i>Lippia</i>	143
4.1.1.5 Gênero <i>Stachytarpheta</i>	153
4.1.1.6 Gênero <i>Vitex</i>	153

4.1.2 Isolamento e identificação estrutural dos constituintes majoritários de <i>Stachytarpheta glabra</i> por RMN	156
4.1.3 Triagem fitoquímica de espécies de <i>Lippia</i> e <i>Lantana</i>	157
4.2 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de espécies de <i>Lippia</i> e <i>Lantana</i>	158
5 DISCUSSÃO	160
5.1 Caracterização química	160
5.1.1 Caracterização dos constituintes voláteis por CG/EM	160
5.1.2 Isolamento e identificação estrutural dos constituintes majoritários de <i>Stachytarpheta glabra</i> por RMN	164
5.1.3 Triagem fitoquímica de espécies de <i>Lippia</i> e <i>Lantana</i>	165
5.2 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de espécies de <i>Lippia</i> e <i>Lantana</i>	166
6 CONCLUSÃO	168
CONSIDERAÇÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	169
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	174
ANEXOS	201

INTRODUÇÃO GERAL

1 Campos rupestres

A diversidade biológica tem que ser tratada mais seriamente como um recurso global, para ser registrada, usada e, acima de tudo, preservada. Três circunstâncias conspiram para dar a essa matéria uma urgência sem precedentes. Primeiro, o crescimento explosivo das populações humanas está desgastando o meio ambiente de forma muito acelerada, especialmente nos países tropicais. Segundo, a ciência está descobrindo novas utilizações para a diversidade biológica, que podem aliviar o sofrimento humano. Terceiro, grande parte da diversidade está se perdendo irreversivelmente através da extinção causada pela destruição de habitats naturais, também de forma mais acentuada nos trópicos. Particularmente, o Brasil possui uma das floras mais ricas do mundo com mais de 56.000 espécies (GIULIETTI *et al.*, 2005).

É neste cenário que grande destaque vem sendo dado aos campos rupestres, os quais abrigam elevado número de espécies vegetais associadas a um alto grau de endemismo. Segundo Giulietti *et al.* (2000), até o momento foram identificadas para os campos rupestres cerca de 3 mil espécies de plantas vasculares distribuídas em 130 famílias, com possibilidade de que a estimativa final seja de cerca de duas vezes este número. De acordo com Munhoz e Proença (1998), cerca de 33 famílias possivelmente são exclusivas dos cerrados de altitude ou campos rupestres (acima de 900 m), e 12 famílias, possivelmente, são exclusivas de campos rupestres. Entretanto, não existe uma estimativa do número de espécies exclusivas de campos rupestres brasileiros. Existem sim, numerosos casos de espécies endêmicas com ocorrência em uma única serra, ou em mais de uma serra de Minas Gerais e Goiás pertencentes a diferentes famílias (ROMERO, 2002).

O complexo mosaico de tipos de vegetação que caracteriza a região dos campos rupestres é resultado de variações na topografia, declividade e orientação,

além da natureza do substrato e do micro-clima resultante no local. São comuns flutuações diárias extremas de temperatura e umidade, fortes ventos além de altos níveis de insolação. Durante a estação seca, muitas regiões sofrem o efeito de queimadas, o que favorece a seleção de espécies adaptadas a resistir ao fogo (GIULIETTI e PIRANI, 1988).

As espécies nos campos rupestres estão associadas aos habitats específicos dentro do mosaico de habitats, como um conjunto de algumas populações isoladas entre si. As espécies distribuem-se em unidades específicas deste mosaico, explorando determinados nichos. Estas unidades nos campos rupestres podem estar distanciadas entre si por dezenas de metros ou por alguns quilômetros sendo que, qualquer mudança que cause uma diminuição ou impedimento do fluxo gênico entre estas subpopulações, pode levar à diferenciação e conseqüente especiação (VITTA, 2002). Estudos realizados nos gêneros *Proteopsis* (Asteraceae) e *Pleurothallis* (Orchidaceae) revelaram que as populações são geneticamente estruturadas, com a presença de alelos raros restritos a determinadas populações (BORBA e SEMIR, 2001; JESUS *et al.*, 2001). Portanto, mesmo a extinção de uma única população pode acarretar a perda significativa da variação genética e de alelos potencialmente importantes.

A Cadeia do Espinhaço possui uma longa história de ocupação e exploração de recursos minerais, mas por outro lado, a utilização de seus recursos vegetais, seja como alimento ou como medicamento, ainda é pouco explorada e conhecida. De qualquer modo, muitas taxa presentes na região possuem um potencial genético vasto (GIULIETTI, PIRANI e HARLEY, 1997). Famílias como Verbenaceae, Velloziaceae, Orchidaceae e Eriocaulaceae destacam-se pelo grande número de espécies endêmicas, algumas inclusive com ação medicinal comprovada e, muitas vezes, sujeitas ao risco de extinção. De notável relevância nos cenários nacional e internacional, a Cadeia do Espinhaço abriga nascentes de diversos rios que drenam para diferentes bacias, o que se constitui em um ecossistema único no contexto mundial no que se refere à formação geológica e florística. Apresenta altíssimo grau de endemismo e 40% das espécies ameaçadas do Estado de Minas Gerais. Esses fatores, aliados à sua importância como eixo de migrações pré-históricas, justificaram a recomendação, no *workshop* de 1998, da criação de uma Reserva Biosfera que englobe todo o maciço do Espinhaço (DRUMMOND *et al.*, 2005).

Além do uso medicinal, algumas plantas provenientes deste ambiente são

amplamente utilizadas na fabricação de pincéis, vassouras e até como combustível. Algumas como as “sempre-vivas” são largamente exploradas em função do interesse ornamental. Tais usos não são importantes apenas para a comunidade local, mas também garantem que a vegetação nativa seja vista como um bem valioso. Sendo assim, existe a necessidade urgente de catalogar as plantas úteis da área, de testar seus efeitos e suas propriedades de forma não somente a dividir este conhecimento, mas também, para elaborar estratégias de conservação.

2 A Serra do Cipó

A Serra do Cipó está localizada na porção sul da Cadeia do Espinhaço, ou Serra Geral, entre os paralelos 19°10'-19°20'S e 43°30'-43°40'W, e engloba seis municípios de Minas Gerais: Jaboticatubas, Santana do Riacho, Morro do Pilar, Itambé do Mato Dentro, Itabira e Nova União. A porção sul da Cadeia do Espinhaço, atua como divisor de águas de três grandes bacias inseridas cada uma nos grandes biomas do sudeste do Brasil: a leste, a Bacia do Rio Doce, domínio da Mata Atlântica; a oeste, o Rio São Francisco no Cerrado; a norte, a Bacia do Jequitinhonha na Caatinga (Figura 0.1). Trata-se de uma área cuja geologia, vegetação e fauna formam um ecossistema único no planeta, sendo um importante centro de endemismo e de biodiversidade ainda muito pouco explorado cientificamente (DAVIES *et al.*, 1997). Os campos rupestres desta formação são tidos como centro mundial de especiação das famílias Eriocaulaceae e Velloziaceae, como também de subdivisões de certas famílias como Rubiaceae e Melastomataceae (EITEN, 1992).

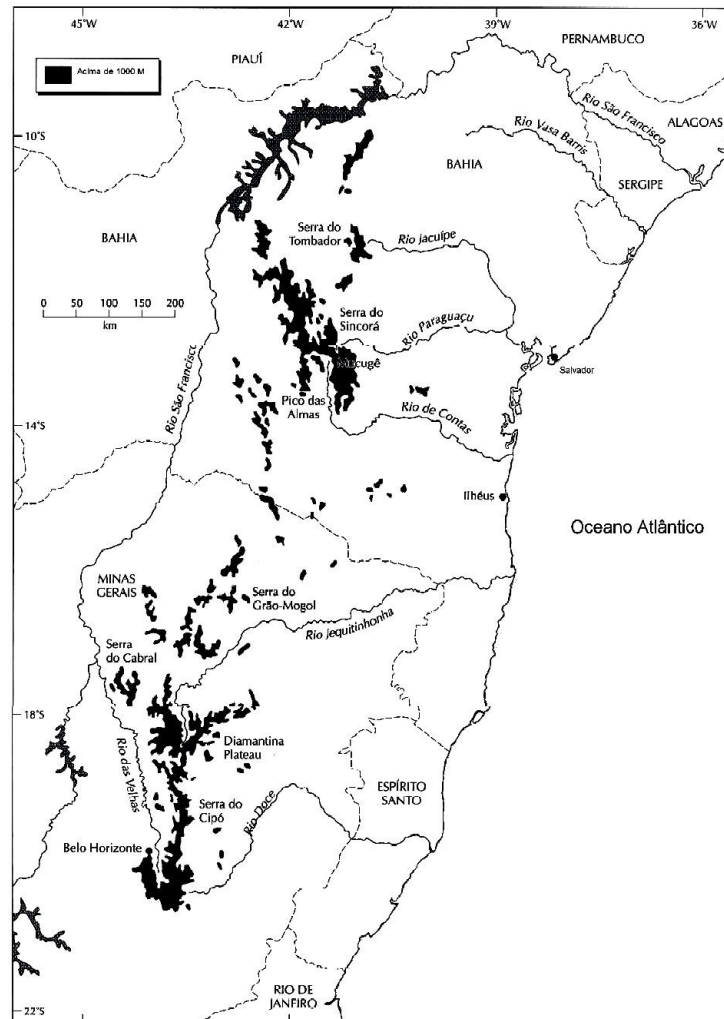


Figura 0.1: Localização da Cadeia do Espinhaço (áreas acima de 1000 m), seus principais maciços nos estados de Minas Gerais e Bahia (leste do Brasil) e as bacias hidrográficas (fonte: DAVIES *et al.*, 1997).

A origem geológica da Serra do Cipó data do Paleozóico, há cerca de 1,7 bilhões de anos, por soerguimentos sucessivos, e caracteriza-se por altitudes de 800 a 1400 m. Os solos da Serra e de toda a Cadeia do Espinhaço são normalmente rasos, arenosos e afloram por toda parte as rochas, que são normalmente quartzitos e arenitos, provavelmente formados pela consolidação da areia depositada no fundo do antigo oceano (JOLY, 1970). Moreira (1965) atribuiu o relevo muito acidentado ao fato de serem rochas muito antigas e que são intensamente trabalhadas pela erosão diferencial. Devido ao intemperismo, as rochas vulcânicas e filíticas produzem um solo argiloso, avermelhado e as rochas quartzíticas um solo arenoso, freqüente em toda a extensão da Cadeia do Espinhaço.

Na vertente leste da Serra destaca-se a vegetação de Mata Atlântica e, na oeste, o Cerrado. Possui na sua porção mais alta, com substrato rochoso mais comum, o quartizito, onde se desenvolve o campo rupestre (RIBEIRO e WALTER, 1998). Na sua região de baixada, vertente oeste, fica caracterizado o cerrado propriamente dito, apresentando áreas abertas (campos) e matas de galeria.

O clima da região é do tipo mesotérmico (Cwb de Köppen) com estações seca e chuvosa bem definidas e precipitação anual em torno de 1400 mm (MARQUES *et al.*, 2000). A temperatura da região tem pouca variação anual e mensal, mas a precipitação mostra-se com larga variação. Ocorrem quatro períodos estacionais bem definidos: a estação seca de maio a setembro; a estação chuvosa de novembro a janeiro; a estação pós-chuvosa de fevereiro a abril e a estação pós-seca em outubro (MADEIRA e FERNANDES, 1999).

3 A Família Verbenaceae: caracterização, distribuição e importância econômica

A família Verbenaceae ocorre em praticamente todos os ecossistemas terrestres, sendo uma das cinco famílias mais importantes entre as eudicotiledôneas dos campos rupestres. De acordo com Cronquist (1981), a família apresenta, aproximadamente, 2600 espécies reunidas em 100 gêneros com distribuição pantropical, com poucas espécies ocorrendo nas regiões temperadas. No Brasil, ocorrem 22 gêneros e aproximadamente 296 espécies (BARROSO *et al.*, 1986). Atualmente, a circunscrição desta família e de Lamiaceae foi redefinida, com a restrição das Verbenaceae apenas para o que tradicionalmente era conhecido como sendo a subfamília Verbenoideae (SOUZA e LORENZI, 2005). Uma vez que nosso trabalho baseou-se no levantamento florístico da família Verbenaceae da Serra do Cipó realizado por Salimena-Pires e Giulietti (1998), seguimos a classificação de Cronquist (1981).

Dentro da família, são encontradas ervas, subarbustos, lianas ou árvores. As principais características morfológicas são folhas opostas ou verticiladas, simples ou compostas. Flores monóclinas ou díclinas por aborto, reunidas em inflorescências

racemosas ou cimosas, brácteas membranáceas ou foliáceas, verdes ou coloridas, planas, côncavas, carenadas; cálice gamossépalo, tubuloso, campanulado ou cilíndrico, denteado ou lobado; corola gamopétala, actinomorfa ou zigomorfa, infundibuliforme ou hipocraterimorfa, tubo reto ou curvo, limbo 5-lobado, raro 4-8-lobado; estames 4, alternos com lobos da corola, freqüentemente didínamo ou 2 perfeitos e 2 estaminódios; gineceu 2-4 carpelar, um dos carpelos geralmente obortivo; ovário súpero; óvulos 1 pro lóculo, anátropos; estilete terminal, geralmente bífido, estigma capitado ou oblíquo, lateral e decurrente. Fruto drupa ou esquizocarpo. Semente sem endosperma.

Na Serra do Cipó são encontrados vários gêneros de Verbenaceae, destacando-se *Aegiphila*, *Aloysia*, *Bouchea*, *Lippia*, *Lantana*, *Stachytarpheta*, *Verbena* e *Vitex*.

O gênero *Aegiphila* se distribui por diversas regiões da América do Sul, com espécies da Guiana até o Rio de Janeiro (PIO CORREA, 1926), apresentando cerca de 120 espécies (STEVENS, 2006). A espécie *Aegiphila sellowiana*, no Brasil, tem sua madeira utilizada para confecção de objetos de uso do cotidiano devido ao fato de ser leve e de ter alta durabilidade (LORENZI, 1992). Uma vez que diversas espécies apresentam distribuição amazônica (SOUZA e LORENZI, 2005), *A. sellowiana* seria uma alternativa de grande importância no reflorestamento heterogêneo de áreas degradadas. Algumas espécies do gênero são conhecidas como tamanqueira e empregadas na medicina popular para tratamento emergencial de indivíduos picados por cobra (PIO CORREA, 1926; LEITÃO *et al.*, 1994), enquanto seus frutos são empregados para o tratamento da escabiose e pediculose (LEITÃO *et al.*, 1996).

O gênero *Aloysia* foi descrito por Ortega e Patau em 1807 e apresenta-se amplamente distribuído nas Américas, desde o Sul dos Estados Unidos e México até o norte da Patagônia, reunindo, aproximadamente, 40 espécies (BOTTA, 1979; TRONCOSO, 1980; OLIVEIRA *et al.*, 2005). As espécies incluídas no gênero apresentam ampla semelhança com o gênero *Lippia*, criando vários sistemas de classificação na família (SALIMENA-PIRES, 1991), ora reunidos em *Lippia*, ora separados em *Aloysia*. Dentro do gênero há relatos de espécies com propriedades medicinais, cujos constituintes químicos possuem propriedades digestiva, estimulante, antigripal, antiespasmódica, antimalárica, além da utilização industrial de sua madeira na fabricação de implementos agrícolas (TRONCOSO, 1974; LOPEZ-PALACIOS, 1977; BOTTA, 1979; BONZANI, FILLIPA e BARBOZA, 1997;

ANDRADA, PASTORIZA e MARTÍNEZ-PULIDO, 1998; BAELMANS *et al.*, 2000; SANDERS, 2001). Zamorano-Ponce *et al.* (2006) reportaram que a infusão das folhas de *A. triphylla* possui propriedades antígenotóxicas devido à ação de compostos polifenólicos. *A. polystachya* tem sido utilizada para o tratamento de doenças respiratórias e gastrointestinais (HELLIÓN-IBARROLA *et al.*, 2005).

O gênero *Bouchea* é limitado em sua distribuição e ocorre, principalmente, no hemisfério oriental, compreendendo cerca de 15 espécies (ROMERO *et al.*, 2002). No Brasil, as espécies desse gênero são usadas em medicina popular como antiemético e no tratamento de distúrbios gástricos (PIO CORREA, 1926; SCHAPOVAL *et al.*, 1998). Foi reportado por Schuquel *et al.* (1996) a ocorrência de esteróides glicosídios e iridóides nas folhas de *B. fluminensis*. O extrato da parte aérea demonstrou atividade antiinflamatória, ao inibir a inflamação aguda, além de efeitos analgésicos periférico e central (COSTA *et al.*, 2003).

Atualmente, o gênero *Lantana*, descrito por Linnaeus em 1753, compreende cerca de 150 taxa (STEVENS, 2006). A maioria das espécies desse gênero é nativa das américas tropical e subtropical, havendo poucas taxa na Ásia e África (MOLDENKE, 1973). Esta distribuição foi ampliada pelo cultivo de várias espécies sob centenas de nomes vulgares (GHISALBERTI, 2000). Destaca-se por apresentar espécies com diversas propriedades medicinais, como estomáquica, estimulante, febrífuga, sudorífera e bronco-dilatadora. Existem relatos da utilização de espécies para controle biológico de insetos e como repelente, além do uso terapêutico no combate a doenças como câncer, malária e úlceras, tratamento da hanseníase, gonorréia e angina (SILVA *et al.*, 2005). O gênero possui ainda espécies com propriedades tóxicas e outras com características ornamentais (LOPEZ-PALACIOS, 1977; WEENEN *et al.*, 1990; HERBERT e MAFFRAND, 1991; MORTON, 1994; DUA *et al.*, 1996; BROUGHTON, 2000; GHISALBERTI, 2000; PEREIRA e BARRETO, 2001; SANDERS, 2001; DAY e MCANDREW, 2002; SOUZA e LORENZI, 2005). Para a espécie *L. trifolia* foram relatadas atividades antiinflamatórias, antinociceptivas (SILVA *et al.*, 2005) e antimicobacteriana (LEITÃO *et al.*, 2006), enquanto *L. camara* revelou atividade antimalárica (CARRILLO-ROSARIO e DÍAZ DE RAMÍREZ, 2006) e eficácia no tratamento de doenças como tétano, reumatismo e ataxia das vísceras (VERMA e VERMA, 2006). Já os óleos essenciais extraídos de *L. achyranthifolia* e *L. aculeata* apresentaram atividade antimicrobiana (SAXENA e SHARMA, 1999; HERNÁNDEZ *et al.*, 2005). Nos últimos anos, também têm sido

realizados estudos sobre a utilização da biomassa de espécies do gênero para o desenvolvimento de móveis, cestos e adubo (VARSHNEY *et al.*, 2006).

O gênero *Lippia* é composto por cerca de 200 espécies (STEVENS, 2006) de ervas, arbustos e pequenas árvores, distribuídas, principalmente, no Brasil, México, América Central, África, Paraguai e Argentina (TRONCOSO, 1974). Um dos principais centros de diversidade do gênero está localizado na Cadeia do Espinhaço (SALIMENA, 2000). No entanto, existem muitos problemas taxonômicos envolvendo as espécies do gênero, uma vez que alguns autores consideram vários outros gêneros com características comuns às espécies de *Lippia*. Diversas espécies são empregadas na medicina popular e muitas apresentam propriedades medicinais comprovadas cientificamente. Pessoa *et al.* (2005) detectaram ação antibacteriana moderada do óleo essencial de *Lippia aff. gracillis*, o que justifica seu emprego na medicina popular como antimicrobiano e antiséptico. O extrato etanólico de *Lippia dulcis* apresentou atividade antiinflamatória em vários modelos animais estudados por Pérez *et al.* (2005). Viljoen *et al.* (2005) observaram a redução na população de *Klebsiella pneumoniae*, *Cryptococcus neoformans* e *Bacillus cereus* quando submetidas ao óleo essencial da espécie sul-africana *L. javanica*. Da mesma forma, o óleo essencial extraído de folhas e flores de *L. chevalieri*, apresentou atividade antibacteriana e antifúngica (MEVY *et al.*, 2007). Os constituintes químicos de *L. alba*, uma das espécies mais bem estudadas do gênero, demonstraram ação sedativa, miorelaxante, antiespasmódica, emenagoga e estomáquica (GOMES *et al.*, 1993; VALE *et al.*, 2002; ZÉTOLA *et al.*, 2002; c.p. OLIVEIRA *et al.*, 2006). Na medicina popular é utilizada como antipirético e antiinflamatório, além de ser usada para tratamento de gripe, desordens hepáticas e menstruais, infecções cutâneas, diarreia, reumatismo e hipertensão (MORTON, 1981; GIRÓN e CÁCERES, 1994; DI STASI *et al.*, 1994; TAVARES *et al.*, 2005). A potente atividade antiulcerogênica de *L. alba* foi demonstrada pela inibição da ulceração gástrica, induzida por indometacina, através da administração oral da infusão da planta (PASCUAL *et al.*, 2001a). *L. alba* foi também ensaiada para tratamento da deficiência cognitiva que acomete os portadores da Doença de Alzheimer. O extrato etanólico das folhas inibiu 12% de atividade da acetilcolinesterase (TREVISAN e MECADO, 2003). Já o extrato aquoso de *L. sidoides* é dotado de acentuado efeito antimicrobiano, antiinflamatório e cicatrizante (COSTA *et al.*, 1998). O óleo essencial extraído de suas folhas apresenta potencial efeito contra larvas de *Aedes aegypti* (CARVALHO

et al., 2003) e *Culex quinquefasciatus* (COSTA *et al.*, 2005), além de demonstrar propriedade gastroprotetora, antioxidante, antiinflamatória tópica (MONTEIRO *et al.*, 2007) e antinociceptiva (MARÇAL *et al.*, 2006). Recentemente, foi demonstrado o seu efeito antimicrobiano contra patógenos orais, importantes no desenvolvimento de cáries e doenças periodontais (BOTELHO *et al.*, 2007). Além disso, Oliveira *et al.* (2006a) demonstraram destacável efeito anti-*Staphylococcus aureus* do óleo essencial de *L. sidoides*, notado por grandes halos de inibição das bactérias isoladas de material clínico. Os componentes de *L. multiflora*, mostraram-se ativos para tratamento da malária (VALENTIN *et al.*, 1995) e hipertensão (NOAMESI, 1977; CHANH *et al.*, 1988), sendo também eficazes no combate à sarna (OLADIMEJI *et al.*, 2000). Além disso, o óleo essencial proveniente de suas folhas, demonstrou significativa atividade antibacteriana e antifúngica (OLADIMEJI *et al.*, 2004), analgésica e antipirética (ABENA *et al.*, 2003). *L. dulcis* é bem estudada, sendo usada, principalmente, no tratamento da tosse, bronquite e asma (COMPADRE *et al.*, 1986). De suas folhas foi extraído a hernandulcina, uma substância 1000 vezes mais doce que a sacarose (PASCUAL *et al.*, 2001b; PÉREZ *et al.*, 2005).

No Brasil, os estudos farmacológicos vêm sendo, principalmente, realizados com *L. alba* e *L. sidoides*, havendo relatos escassos sobre as demais espécies nativas.

Leitão *et al.* (2006) demonstraram o efeito antimicrobiano de duas espécies de *Lippia* nativas do Brasil. Frações em hexano e diclorometano de *L. lacunosa* e *L. rotundifolia* exibiram acentuado efeito contra o *Mycobacterium tuberculosis*.

Além das propriedades medicinais, as folhas da maioria das espécies são utilizadas na preparação de alimentos (MORTON, 1981), enquanto outras, como *L. organoides*, vêm sendo utilizadas no reflorestamento de áreas degradadas pela mineração. Na Venezuela, por exemplo, essa espécie tem sido usada como espécie pioneira em regiões de minério de ferro que foram desativadas ou abandonadas, apresentando-se extremamente adaptada a regiões de minério com seus solos ácidos e pedregosos (GUEVARA, ROSALES e SANOJA, 2005).

O gênero *Stachytarpheta* foi primeiramente descrito por Vahl. (1804) com 12 espécies. Hoje, reúne aproximadamente 133 espécies, a maioria exclusivamente do Novo Mundo - apenas *S. indica* ocorre no Velho Mundo (ATKINS, 2005). Foram registradas 10 espécies na Colômbia, 8 nas Guianas, 7 no Peru, Equador e

Paraguai, 5 na Argentina e 24 na América Central. O gênero foi revisado para o Brasil, onde a maioria das espécies é endêmica, concentrada nos estados de Goiás, Minas Gerais e Bahia, e está representado por 79 espécies, incluindo taxa infra-específicos (ATKINS, 2005). A Cadeia do Espinhaço é o centro de diversidade do gênero, abrigando mais da metade das espécies (ATKINS, 2005). A principal importância econômica deste gênero está relacionada à utilização de algumas espécies na medicina popular (PIO CORREA, 1926; SCHAPOVAL *et al.*, 1998). López-Palacios (1977) citou a utilização de folhas de *S. jamaicensis* para tratamento de úlceras ou como similares ao chá chinês com propriedades tônicas e febrífugas. A mesma espécie é citada por Chariandy *et al.* (1999) como antimicrobiana e inseticida. Uma das espécies mais estudadas é *S. cayennensis* que tem sido amplamente usada como estimulante das funções gastrointestinais, antitérmica, diurética e emoliente, eficiente para tratamento de disfunções hepáticas crônicas incluindo hepatite, desordens renais, helmintíases, hipertensão e para promover a transpiração (LORENZI e MATOS, 2002; PENIDO *et al.*, 2006). Além destes há relatos de sua utilização como antiinflamatório e antiulcerogênico (PENIDO *et al.*, 2006), como inibidor da acidez gástrica (VELA *et al.*, 1997) e como antidiarréico (ALMEIDA *et al.*, 1995). *S. elatior* apresenta propriedades terapêuticas similares àquelas descritas para *S. cayennensis* (LORENZI e MATOS, 2002).

Aproximadamente 250 espécies constituem o gênero *Verbena*, com distribuição tropical e subtropical (STEVENS, 2006). Em geral, são ervas perenes ou anuais e com flores bissexuais (MACFARLANE *et al.*, 2002). Na medicina popular, esse gênero tem destacado uso para tratamento da diarreia, febre, desordens gastrointestinais e algumas doenças sexualmente transmissíveis. Para a espécie *V. officinalis* destaca-se a propriedade antiinflamatória (DEEPAK e HANDA, 2000), enquanto os iridóides isolados das partes aéreas de *V. litoralis* demonstram atividade antibactericida e de modificação do peristaltismo intestinal (CASTRO-GAMBOA e CASTRO, 2004).

O gênero *Vitex* reúne cerca de 250 espécies com distribuição pantropical, apesar de possuir poucos representantes na Ásia e Europa (STEVENS, 2006). No Brasil, o único trabalho realizado, inventariou 10 espécies (SCHAUER, 1847). Os constituintes químicos de algumas espécies de *Vitex* têm sido usados como antiinflamatórios (GAIDHANI, SAHNI E SRIVASTANA, 2001), antimicrobianos (RAGASA *et al.*, 1999), para o tratamento de desordens hepáticas (SRINIVAS *et al.*,

1999) e estomacais (GAIDHANI *et al.*, 2000). A atividade do extrato das cascas de *V. cooperi* contra o *M. tuberculosis* foi demonstrada por Leitão *et al.* (2006).

OBJETIVO GERAL

Aprofundar os estudos biossistemáticos, avaliar a constituição química e o potencial antioxidante das espécies da família Verbenaceae ocorrentes na Serra do Cipó, Minas Gerais.

CAPÍTULO 1

BIOSSISTEMÁTICA DE ESPÉCIES DE VERBENACEAE DA SERRA DO CIPÓ

1 INTRODUÇÃO

1.1 Caracterização citogenética

O completo conhecimento da distribuição do número cromossômico em angiospermas é de importância básica para a pesquisa taxonômica e biosistemática (COLEMAN, 1982). A distinção morfológica entre plantas morfológicamente similares é contraditória, muitas vezes, em função da ausência de caracteres que auxiliem nessa tarefa. Com isso, a análise citogenética tem sido extensivamente reconhecida como uma ferramenta auxiliar para a taxonomia de plantas, visto que o número cromossômico não é influenciado por fatores ambientais, constituindo, portanto, um bom referencial para a caracterização de espécies, assim como para o entendimento da evolução das mesmas (STEBBINS, 1971; SHAN, YAN e PLUMMER, 2003). Desta forma, é crescente o número de trabalhos que utilizam a citogenética como ferramenta auxiliar à taxonomia (SANZO, 2003; SMARDA e KOCI, 2003; CONTERATO *et al.*, 2006).

No que diz respeito à família Verbenaceae, vários problemas taxonômicos envolvendo algumas espécies do gênero têm sido relatados. Como resultado, essas plantas são freqüentemente classificadas de forma incorreta, o que dificulta a determinação do número de espécies por gênero, bem como a determinação da

distribuição geográfica (SILVA, 1999; SALIMENA, 2002). Do ponto de vista citogenético, especificamente sobre os gêneros em estudo, existem alguns relatos, mas muito pouco sobre as espécies brasileiras.

No gênero *Aloysia*, seis espécies foram estudadas, tendo-se encontrado $2n=36$ para *A. polistachya* e *A. virgata* (ANDRADA *et al.*, 1998; BRANDÃO *et al.*, 2006) e *A. ligustrina*, $2n=54$ para *A. gratissima* e *A. lycioides* (CORAZZA-NUNES *et al.*, 1995; ANDRADA, PASTORIZA e MARTÍNEZ-PULIDO, 1998) e $2n=72$ para *A. scorodonioides*. Os números cromossômicos encontrados sugerem um número básico de $x=9$ para o gênero (CORAZZA-NUNES *et al.*, 1995).

Para o gênero *Bouchea*, apenas uma espécie foi caracterizada citogeneticamente com $2n=40$. Assim, Sanders (2001) propôs a hipótese de $x=5$ para o gênero.

O gênero *Lantana*, dentro da família Verbenaceae, é o mais estudado do ponto de vista citogenético. A classificação taxonômica do gênero é difícil devido à instabilidade das espécies e hibridação muito disseminada. Populações do complexo *Lantana camara* na África do Sul foram estudadas por Spies (1983, 1984) que admitiu haverem hibridações potenciais dentro do complexo. O mesmo autor aplicou métodos de taxonomia numérica aos dados citotaxonômicos desse complexo e delimitou 11 citogrupos e três níveis de ploidia. Sanders (1987a) fez estudos cromossômicos em espécies de *Lantana* do Caribe, identificando triplóides, como resultado de hibridação entre taxa diplóide e tetraplóide. Nesse mesmo ano, Sanders (1987b) ainda apresentou os seus estudos de campo com plantas cultivadas de *L. depressa* e *L. ovatifolia*. Através da morfologia das espécies e dos números cromossômicos foi detectada a existência de híbridos triplóides e tetraplóides entre elas. Outros estudos no gênero revelaram que os números somáticos variam de $2n=22$ a $2n=72$, quando cerca de 12 espécies foram analisadas. Além dessa variação interespecífica, o número cromossômico varia dentro de uma mesma espécie, como em *L. camara*, onde foram reportados $2n=22, 33, 44$ e 55 (SEN e SAHNI, 1955; SINGH, 1951; TANDON e CHANDI, 1955). Adicionalmente, a presença de poliplóides reforçou a hipótese de hibridações naturais dentro do gênero. Analisando esses híbridos, os autores concluíram que em *Lantana* o número básico deve ser $x=11$ ou 12 (SANDERS, 1987a,b; OJHA e DAYAL, 1993). Por outro lado, Sinha, Sinha e Sharma (1995) estudaram 20 populações de *Lantana* na Índia e encontraram números somáticos que variaram de 33 a 55 cromossomos e sugeriram

um número básico de 11 cromossomos.

Com relação ao gênero *Lippia*, alguns estudos citogenéticos reportaram o número cromossômico haplóide de 12, 15, 16 e 18 (ANDRADA *et al.*, 1998; BOSE e SHOUDHURY, 1960; COLEMAN, 1982; FILIPPA, 1984). No Caribe e na Índia, algumas espécies apresentaram uma variação de $2n=18$ a $2n=36$ (CHOUDHARY e ROY, 1983; SANDERS, 1987a). No Brasil, um trabalho foi realizado por Viccini *et al.* (2006). Eles estudaram, pela primeira vez, 14 espécies de diferentes seções de *Lippia* na Cadeia do Espinhaço, e observaram que a maioria das espécies apresenta um número haplóide entre 10 e 14 cromossomos. O número cromossômico das espécies demonstrou estreita relação com as seções taxonômicas a que cada uma delas se encontra. A seção mais complexa do ponto de vista taxonômico, *Zapania*, também mostrou maior variação no número cromossômico de $n=10$ a $n=28$ cromossomos. Estes resultados, segundo Viccini *et al.* (2006) estão em conformidade com a variada morfologia da seção, que apresenta diferentes padrões de inflorescências.

No gênero *Stachytarpheta*, Munir (1992) citou Fedorov (1974) como reportando $2n=18$ em *S. cayanensis* e $2n=160$ em *S. indica*. Mais tarde, Sanders (2001) investigou o complexo *S. cayanensis* tendo sido encontrada uma série poliplóide com $2n=18, 48, 56, 112$ e 160 , provavelmente, resultante de diferentes variedades.

Estudos sobre citologia e hibridação de várias espécies de diferentes seções do gênero *Verbena* foram realizados por Dermen (1936), onde foi registrado o número básico de $x=5$ para o gênero. Tal resultado reforça os dados encontrados por Arora (1978), ao descrever 10 cromossomos para a maioria das 13 espécies investigadas. Diferentemente, outros relatos apontam para números cromossômicos somáticos iguais a 14, 28, 42 e 56 sendo $2n=14$ o número mais frequente. Esses dados sugerem que o número básico do gênero deva ser $x=7$ (SANDERS, 2001).

Para o gênero *Vitex*, poucos estudos citogenéticos foram realizados. Os números cromossômicos diplóides variam de 16 a 64, sugerindo que, para o gênero, o número básico seja de $x=8$ (DIIKGRAAF, LEWIS e MITCHELL, 1995). Recentemente, Yuyama, Cavalheiro e Vanzela (2006) realizaram um estudo com *Vitex montevidensis* proveniente do sul do Brasil e descreveram $2n=34$ cromossomos.

Sobre o gênero *Aegiphila*, não foram publicados estudos citogenéticos. Cabe

ressaltar que, mesmo para os gêneros estudados, não existe relato sobre a caracterização citogenética da maioria das espécies brasileiras.

1.2 Análise do conteúdo de DNA nuclear

As tentativas iniciais para estimar as quantidades de DNA no núcleo celular precedem sua descoberta como material central na hereditariedade (DOLEŽEL e BARTOS, 2005). Atualmente, a citometria de fluxo tem sido muito utilizada para estimar o conteúdo de DNA. A aplicação da citometria de fluxo nos estudos com plantas, é marcadamente, inferior àquelas com humanos e animais. Embora o primeiro artigo utilizando a técnica em plantas tenha sido publicado em 1973 (HELLER, 1973), a técnica foi desenvolvida em poucos laboratórios até o início da década de 1980. A emergência da citometria de fluxo em plantas ocorreu mais tarde, em 1983, quando Galbraith e seus colaboradores desenvolveram um método rápido e simples para o isolamento dos núcleos a partir de tecidos vegetais. Uma vez que a técnica permite rápida estimativa do DNA nuclear (DOLEŽEL, 1991), é também usada como ferramenta para a taxonomia de plantas através da avaliação do nível de ploidia, em plantas individuais ou em populações de plantas, ou pela determinação do tamanho do genoma (DOLEŽEL e BARTOS, 2005).

Nas angiospermas, a quantidade de DNA nuclear varia até 2 mil vezes, de 0,065 pg em *Gensilea aurea* e *G. margaretae* (Lentibulariaceae) a 127,4 pg em *Fritillaria assyriaca* (Liliaceae) (Tabela 1.1). Dentro de um mesmo gênero, a quantidade de DNA também pode variar, estando associada, na maioria das vezes, com o nível de ploidia ou ainda, presença de heterocromatina ou cromossomos extranumerários (RESS, 1972).

Do ponto de vista prático, a determinação da quantidade de DNA nuclear pode complementar ou substituir a contagem cromossômica, especialmente quando se trabalha com um número muito grande de indivíduos, como por exemplo, em bancos de germoplasma ou análises de melhoramento genético (SCHIFINO-WITTMANN, 2001). A determinação do número de cromossomos é uma técnica relativamente simples, no entanto, demorada. Sua substituição por uma técnica mais rápida, com indicação do nível de ploidia com um grau aceitável de precisão, permite ampliar a capacidade de geração de dados de alguns estudos, como na manutenção de germoplasma ou na seleção nas progênies de cruzamentos (SCHIFINO-WITTMANN, 2001).

O valor-C de DNA, ou seja, a quantidade de DNA em um núcleo haplóide não replicado, expresso em picogramas ou pares de megabases (1pg = 978 Mpb), é um caráter de significado biológico fundamental e o conhecimento da quantidade de DNA nuclear de um grupo de organismos pode ser útil em vários campos, como na biologia molecular e celular, ecologia, fitogeografia e sistemática (BENNET e LEITCH, 1995).

Apesar da importância, os valores-C são conhecidos para uma pequena fração de todas as espécies de plantas, conforme demonstrado na Tabela 1. Desde 1950, aproximadamente 10 mil estimativas do valor-C foram realizadas cobrindo cerca de 4.700 espécies (BENNETT e LEITCH, 2005).

Tabela 1.1 – Descrição estatística (min-mínimo, max-máximo e média) do conteúdo C de DNA nos maiores grupos vegetais, juntamente com o número que essas espécies representam dentro de cada grupo. Fonte: adaptado de Loureiro, 2007.

Grupo vegetal	Min (pg)	Max (pg)	Média (pg)	Nº de espécies com valor-C	Nº de espécies conhecidas	Espécies com valor-C determinado (%)
Briófitas	0,085	6,42	0,54	176	≈18000	≈1,0
Pteridófitas	0,16	72,68	12,93	67	≈11900	≈0,6
Gminospermas	2,25	32,2	16,99	207	≈730	≈28,4
Angiospermas	0,065	127,4	6,30	4427	≈250000	≈1,8

Diante do pequeno número de espécies vegetais cujo valor-C é conhecido, apenas 1,8% das angiospermas, o 2º *workshop* sobre o tamanho do genoma em plantas, realizado em Kew, em 2003, idealizou que 75% das espécies tivessem seus valores-C estimados até 2008/2009. Este objetivo, no entanto, ainda está longe de ser alcançado (LOUREIRO, 2007).

Dentro da família Verbenaceae, o valor-C foi estimado para *Lantana camara* (2,75 pg), *Tectona grandis* (0,48 pg), *Vitex negundo* (1,62 pg) e *Vitex pinnata* (1,44 pg) (BENNETT e SMITH, 1995; 2005; ZONNEVELD, LEICH e BENNETT, 2005) não havendo relato para as espécies brasileiras.

1.3 Palinologia

Os primeiros trabalhos de descrição polínica datam do início de 1800, desenvolvido por Kölreuter (1811), seguido por Purkinje (1830) e Bischoff (1833). No entanto, as investigações da morfologia polínica e suas relações com a taxonomia foram iniciadas mais tarde. Ao que parece, Steetz (1864), Bentham (1873) e Erdtman (1945, 1952, 1963, 1966). foram os precursores no emprego da palinologia como subsídio à taxonomia. Na família Verbenaceae, é pequeno o número de estudos palinológicos diante da importância taxonômica, numérica e econômica da família. As principais contribuições foram publicadas por Raj (1983), ao investigar as características do pólen de 226 espécies distribuídas em 68 gêneros. Uma vez que na família Verbenaceae ocorrem vários problemas taxonômicos, a palinologia torna-se um importante instrumento para a elucidação desses problemas, além da valiosa contribuição no estudo biossistemático da família. Diferentemente das características morfológicas, utilizadas como parâmetros taxonômicos, a morfologia polínica é pouco influenciada por alterações ambientais, sendo bastante estável. Por essa razão tem sido empregada amplamente na Taxonomia Moderna e em outras áreas do conhecimento, permitindo caracterizar famílias, gêneros e espécies vegetais (MELHEM, 2006).

2 OBJETIVOS

Contribuir para o estudo biossistemático de espécies de Verbenaceae da Serra do Cipó através da caracterização do número cromossômico por técnica citogenética, estimativa da quantidade de DNA nuclear por meio da citometria de fluxo e descrição polínica por Microscopia de Luz (ML) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta do material vegetal

De acordo com os registros de herbário, foram realizadas coletas de material vegetal na Serra do Cipó, na APA do Parque Nacional da Serra do Cipó (Figura 1.1 a, b). Os pontos de coleta basearam-se no levantamento florístico de Verbenaceae da Serra do Cipó realizado por Salimena-Pires e Giulietti (1998). Foram realizadas quatro coletas que ocorreram em agosto de 2004, março de 2005, setembro de 2005 e fevereiro de 2006. Os exemplares “Voucher” de cada coleta foram incorporados ao herbário CESJ - ICB/UFJF, conforme as técnicas usuais. Dependendo do número de indivíduos encontrados em cada população, foram coletadas plantas adultas (contendo parte aérea e subterrânea) que foram transplantadas para a Estação de Experimental de Plantas (EEP) da UFJF. Quando disponíveis, foram coletadas sementes e inflorescências imaturas para serem utilizadas nos estudos citogenéticos e palinológicos.

As dezessete espécies estudadas neste trabalho são mostradas na Tabela 1.2 e pertencem aos gêneros *Aegiphila*, *Aloysia*, *Bouchea*, *Lantana*, *Lippia*, *Stachytarpheta*, *Verbena* e *Vitex*. Algumas das espécies podem ser vistas na Figura 1.1 (c-o).

Tabela 1.2 - Espécies de Verbenaceae coletadas na Serra do Cipó – MG

Gênero	Espécie
<i>Aegiphila</i>	<i>A. Ihotzkiana</i> Cham.
	<i>A. sellowiana</i> Cham.
<i>Aloysia</i>	<i>A. virgata</i> (Ruiz e Pav) Juss.
<i>Bouchea</i>	<i>B. fluminensis</i> (Vell) Moldenke
<i>Lantana</i>	<i>L. aff. fucata</i> Lindl.
	<i>L. fucata</i> Lindl.
<i>Lippia</i>	<i>L. aff. microphylla</i> Cham.
	<i>L. aristata</i> Schauer
	<i>L. martiana</i> Schauer
	<i>L. salviifolia</i> Cham.
<i>Stachytarpheta</i>	<i>S. gesnerioides</i> Cham.
	<i>S. glabra</i> Cham.
	<i>S. mexiae</i> Moldenke
	<i>S. procumbens</i> Moldenke
	<i>S. reticulata</i> Mart. ex. Schauer
<i>Verbena</i>	<i>V. litoralis</i> Kunth.
<i>Vitex</i>	<i>V. polygama</i> Cham.



Figura 1.1 – (a) Aspecto da Serra do Cipó; (b) Campo rupestre; (c) *Aepiphila sellowiana*; (d) *Aloysia virgata*; (e) *Bouchea fluminensis*.



Figura 1.1 (cont...) – (f) *Lantana aff. fucata*; (g) *L. fucata*, (h) *Lippia aristata*; (i) *L. martiana*; (j) *L. salviifolia*.

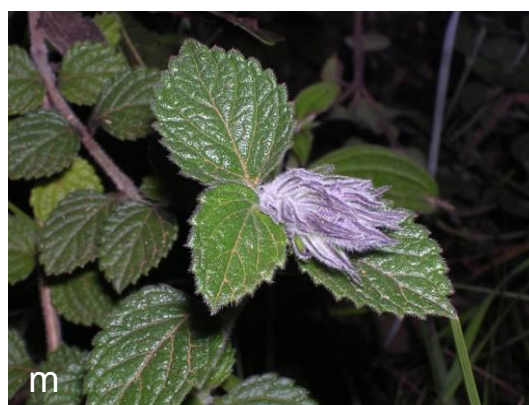


Figura 1.1 (cont...) – (k) *Stachytarpheta glabra*; (l) *S. mexiae*; (m) *S. reticulata*; (n) *Verbena litorialis* e (o) *Vitex polygama*.

3.2 Análise citogenética

3.2.1 Estudo meiótico

Assim como as espécies de *Lippia* estudadas por Viccini *et al.* (2006), a maioria das espécies dos demais gêneros da família Verbenaceae envolvidas no presente trabalho apresentaram características biológicas similares que dificultaram muito o estudo mitótico dos cromossomos. Tais características são a baixa taxa de germinação e a dificuldade de enraizamento em sistema de hidroponia. Essas são, basicamente, as duas maneiras mais usuais para a obtenção de meristemas radiculares, principal tecido utilizado no estudo dos cromossomos mitóticos em plantas. Além disso, é importante acrescentar que, embora abrigue uma riquíssima biodiversidade, muito pouco se conhece sobre a vegetação deste local no que se refere aos aspectos ecofisiológicos, reprodutivos e genéticos. Assim, a investigação do número cromossômico baseou-se no estudo dos cromossomos meióticos. Dessa forma, o estudo não se limita à contagem cromossômica, mas sim permite a análise de todo o comportamento meiótico.

As inflorescências foram fixadas em campo em metanol (p.a.)/ácido acético glacial (p.a.) (3:1, v/v) obedecendo à proporção material/fixador de 1:10, durante período mínimo de 24 horas. Foram selecionados vários tamanhos de flores e, através da técnica de esmagamento, foi identificado o tamanho da flor para os estudos dos cromossomos meióticos através da visualização das fases de divisão no ciclo celular.

As preparações citogenéticas foram realizadas de acordo com Viccini *et al.* (2006), com algumas adaptações. Com o auxílio de um microscópio estereoscópico e de agulhas, cada botão floral umedecido em ácido acético 45%, foi aberto. Após este processo, as anteras foram transferidas para um microtubo adaptado com tela de poliéster (malha 60 μm), onde foram lavadas com água destilada durante 15 minutos.

Posteriormente, foram imersas em solução enzimática (Pectinex Ultra sp–L) durante 2 horas e 40 minutos em banho-maria com temperatura constante de 34°C para a retirada da parede celular. Decorrido este tempo, as anteras foram novamente lavadas em água destilada. Nesta etapa, utilizou-se pipetas de *Pasteur*, a fim de evitar a aderência das anteras na parede do microtubo adaptado. Em seguida, o microtubo adaptado foi imerso em outro de maior capacidade, contendo aproximadamente, 0,5 mL de solução fixadora (metanol (p.a.)/ácido acético (p.a.) 3:1,v/v). A seguir, realizou-se a dissociação do material vegetal utilizando-se de um estilete adaptado, de modo que as células passassem para o microtubo contendo o fixador. O material foi submetido a quatro centrifugações de quatro minutos cada, na velocidade de 2000 rpm, com formação de um *pellet*. Entre cada ciclo o fixador foi trocado. Ao final, o volume total do microtubo foi completado com fixador recém preparado e armazenando em freezer –20°C, até o momento da confecção das lâminas.

Como metodologia alternativa, utilizou-se os ovários das flores femininas de *A. lhotzkiana* para a análise meiótica. Sendo uma espécie dióica torna-se difícil a identificação prévia de indivíduos masculinos e femininos, sem que a planta esteja florida. Como a maioria das plantas transferidas para a Estação Experimental da UFJF era feminina, a análise foi realizada com o órgão feminino da flor (ovários).

Os botões florais, umedecidos com solução de ácido acético 45%, foram abertos com agulhas e alfinetes adaptados e os ovários retirados (separados de estigma e estilete) e transferidos para um microtubo adaptado contendo enzima Pectinex Ultra sp – L, colocado durante 3 horas à temperatura de 34°C em banho-maria. Após a digestão, os ovários foram lavados em água destilada em três sessões de 5 minutos cada. O microtubo adaptado foi imerso em outro de maior capacidade, contendo aproximadamente, 0,5 mL de solução fixadora (metanol (p.a.)/ácido acético (p.a.) 3:1,v/v). A seguir, utilizou-se um estilete adaptado para a dissociação dos ovários, de modo que as células passassem para o microtubo contendo o fixador. O material foi submetido a quatro centrifugações de quatro minutos cada, na velocidade de 2000 rpm, com formação de um *pellet*. Entre cada ciclo trocou-se o fixador. Ao final do processo, completou-se o volume total do microtubo com solução fixadora recém preparada e armazenou-se a solução celular resultante em freezer –20°C, até o momento da confecção das lâminas.

Para confecção das lâminas empregou-se a técnica de secagem ao ar, gotejando-se de 3 a 5 gotas da suspensão celular (obtidas a partir de órgãos femininos ou masculinos da flor) a uma distância de, no mínimo, 30 cm da lâmina limpa a fim de promover melhor espalhamento do material. A lâmina foi mergulhada em solução de ácido acético 45% por 11 segundos para clareamento do citoplasma. Para as espécies *Stachytarpheta glabra* e *Stachytarpheta gesnerioides*, a lâmina foi mergulhada em ácido clorídrico 1M a 60°C por até dois minutos, e então corada com *Giemsa* 5%/ tampão-fosfato pH=6,8, por 5 minutos. Em seguida, foram lavadas 2 vezes consecutivas em água destilada para que o excesso de corante fosse eliminado. Seguiu-se a análise em microscópio óptico (Olimpus .BX 060).

Com o auxílio do sistema de análise de imagem - Image Pro-Plus (Media Cybernetics), as fases meióticas mais representativas foram digitalizadas para documentação e análise.

Para a determinação do número de cromossomos foram avaliadas, no mínimo, 50 células de cada indivíduo. O número de indivíduos analisados variou de acordo com a disponibilidade de material para coleta, o que ocorreu em função do número de indivíduos encontrados no campo e do estágio da floração. Embora tenha sido possível a observação de células meióticas em diferentes estágios de divisão celular, para determinação do número cromossômico considerou-se apenas células em diacinese, que por apresentarem cromossomos relativamente compactados, facilitam a contagem e diminuem a chance de erros, quando comparada às outras fases do ciclo celular encontradas.

3.2.2 Estudo mitótico

Para a espécie *Vitex polygama*, utilizou-se os meristemas apical e lateral para a determinação do número cromossômico, em virtude da inadequação do estágio floral encontrado em campo, por ocasião das coletas. Uma vez que o período de floração da espécie situa-se entre os meses de outubro e novembro, não foram encontradas flores com tamanho apropriado para a contagem cromossômica nos meses de fevereiro/março e setembro em que se procederam as coletas. No início do ano, os indivíduos localizados apresentavam-se em estágio de frutificação, enquanto, no mês de setembro, os indivíduos encontravam-se estéreis, sem a maioria das folhas.

Os meristemas, apical e lateral, foram coletados e submetidos a um pré-tratamento de bloqueio celular que consistiu na submersão dos mesmos em solução de 8-hidroxiquinoleína (8HQ) 3 mM. O tempo de bloqueio foi de 6 horas à temperatura de 4°C em geladeira.

Após o pré-tratamento, os meristemas foram lavados com água destilada durante 15 minutos e fixados em metanol (p.a.)/ácido acético glacial (p.a.) (3:1, v/v) obedecendo à proporção material/fixador de 1:10, durante período mínimo de 24 horas a -20°C. Após este período, os meristemas foram transferidos para um microtubo adaptado com tela de poliéster (malha 60 µm), onde foram lavados com água destilada durante 15 min e, posteriormente, imersos em solução enzimática (Pectinex Ultra sp-L) durante 3 horas em banho-maria com temperatura constante de 34°C para a retirada da parede celular. Decorrido este tempo, os meristemas foram novamente lavados com água destilada. Nesta etapa, utilizou-se pipetas de *Pasteur*, a fim de evitar a aderência dos meristemas na parede do microtubo adaptado. Em seguida, o microtubo adaptado foi imerso em outro de maior capacidade, contendo aproximadamente 0,5 mL de solução fixadora (metanol(p.a.)/ácido acético(p.a.) 3:1,v/v). A seguir, a dissociação do material vegetal foi realizada utilizando-se um estilete adaptado, de modo que as células passassem para o microtubo contendo o fixador. O material foi submetido a quatro centrifugações de quatro minutos cada, na velocidade de 2000 rpm, com formação de um *pellet*. Entre cada ciclo trocou-se a solução fixadora. Ao final do processo,

completou-se o volume total do microtubo com solução fixadora recém preparada e armazenou-se a suspensão celular resultante em freezer -20°C , até o momento da confecção das lâminas.

A confecção das lâminas, bem como suas análises, foram realizadas conforme descrito no item 3.2.1. As células bem coradas e contendo cromossomos mitóticos bem espalhados e com nível de condensação apropriado para a contagem, foram digitalizadas por uma câmera de vídeo acoplada ao microscópio e analisadas por meio do programa de imagem Image-ProPlus (Media Cybernetics).

3.3 Estimativa do conteúdo de DNA nuclear

A determinação do conteúdo de DNA nuclear foi realizada seguindo a metodologia elaborada por Galbraith (1983) (Figura 1.2). Aproximadamente 20-30 mg de folhas frescas jovens para cada amostra e a mesma quantidade de tecido foliar jovem de *Pisum sativum* (padrão interno de referência) foram colocados em placa de *Petri* (dimensões: 90 mm de diâmetro X 15 mm profundidade). Em seguida, foi adicionado 1 mL da solução tampão de isolamento dos núcleos (Tris-base 15 mM, EDTA dissódico 2 mM, tetrahidrocloreto de espermine 0,05 mM, cloreto de potássio 80 mM, cloreto de sódio 20 mM e Tryton X-100 0,01%) (DOLEŽEL, BINAROVÁ e LUCRETTI, 1989).

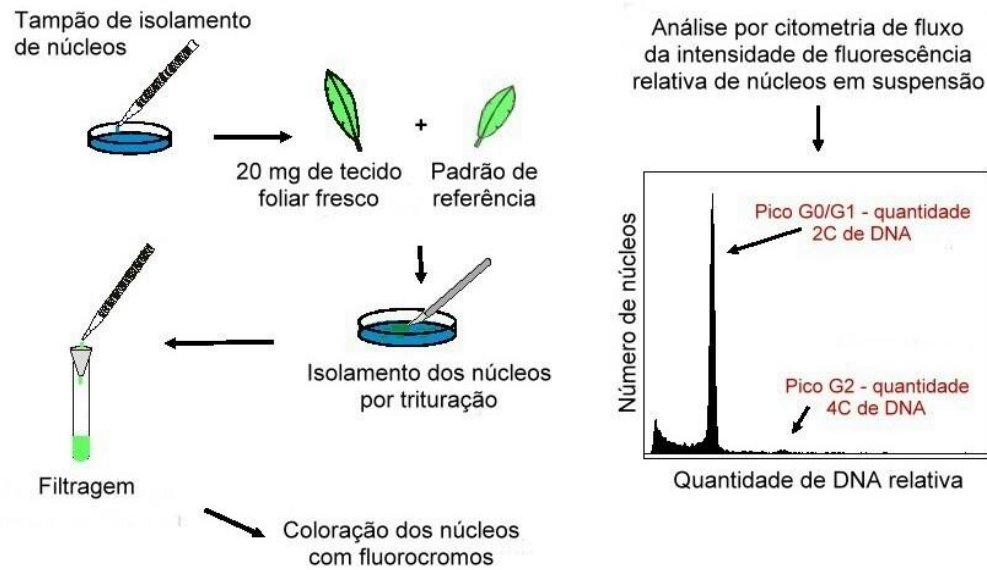


Figura 1.2 – Diagrama do processo de preparo das amostras para medida do conteúdo de DNA nuclear por citometria de fluxo desenvolvido por Galbraith (1983). Fonte: adaptado de Loureiro 2007.

O tecido foliar foi macerado com auxílio de uma lâmina cortante e a solução tampão foi aspirada, com auxílio de uma pipeta de plástico, utilizando gaze hospitalar como elemento filtrante. Posteriormente, a solução contendo os núcleos foi filtrada em uma malha de nylon de 50 μm e coletada em um microtubo. À suspensão nuclear foram adicionados 25 μL de uma solução de coloração de iodeto de propídio 10 mg/mL e 2,5 μL de RNase.

Para cada amostra foram analisados, pelo menos, 10 mil núcleos. A análise foi realizada no citômetro Facscalibur (Becton Dickinson), sendo os histogramas obtidos no software Cell Quest e analisados no software WinMDI 2.8 (disponível em <http://facs.scripps.edu/software.html>). O conteúdo de DNA nuclear (pg) das plantas foi estimado por comparação com a posição em relação ao pico G1 do padrão interno de referência (*Pisum sativum*) como mostrado a seguir:

$$\text{Amostra, 2C de DNA} = \frac{\text{Canal do pico G1 da amostra}}{\text{Canal do pico G1 de Padrão}} \times \text{conteúdo 2C de DNA do padrão (9,09 pg)}$$

Para estimativa da quantidade de DNA de *B. fluminensis* foi utilizado como padrão interno de referência *Glycine max* (2C=2,50 pg), uma vez que o pico G1 de *Pisum sativum* coincidiu com o pico G1 da amostra. Na análise da quantidade de

DNA das espécies, o procedimento descrito foi realizado com três diferentes indivíduos, em triplicata cada um deles. A análise de variância (ANOVA) foi empregada para avaliar a variação do conteúdo de DNA inter e intraespecíficas e o Teste de Tukey ($p < 0,05$) aplicado para detectar as diferenças nos valores médios da quantidade de DNA. Os resultados foram expressos na Tabela 1.4 como média \pm desvio padrão ($n=3$).

3.4 Palinologia

O preparo das amostras e as análises, por Microscopia de Luz (ML) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), dos grãos de pólen das espécies de Verbenaceae foram conduzidas nos Laboratórios de Genética da UFJF e Microscopia da UFLA.

Para ML, as inflorescências foram colocadas previamente em ácido acético glacial por, no mínimo, 24 horas. Foram selecionados os maiores tamanhos de flores, sem que estivessem abertas. Com o auxílio de um microscópio estereoscópico e de agulhas, cada botão floral umedecido em ácido acético 45% foi aberto. Após este processo, as anteras foram transferidas para um microtubo contendo ácido acético glacial. Decorridos, aproximadamente, 10 minutos, as anteras foram maceradas com auxílio de um bastão de aço e centrifugadas a 2500 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi removido do microtubo com auxílio de pipetas de *Pasteur*. O material polínico concentrado no fundo do microtubo (*pellet*) foi acetolísado de acordo com o método de Erdtman (1960). Ao *pellet* foi acrescentado 1 mL de solução acetolítica (anidrido acético:ácido sulfúrico 9:1 (v/v)) recém preparada, seguida por homogeneização do material contido no microtubo com auxílio do bastão de aço. Posteriormente, o microtubo foi colocado em banho-maria a 85°C por 2 minutos. Decorrido este período, o microtubo foi novamente centrifugado por 10 minutos a 2500 rpm. O sobrenadante foi removido do microtubo com auxílio de pipetas de *Pasteur* e o volume foi completado com água destilada, seguido por homogeneização do material com auxílio do bastão. O material foi

centrifugado por 10 minutos a 2500 rpm e o sobrenadante foi removido. Ao *pellet* resultante foi acrescentado 1 mL de água glicerinada 50% e, novamente, homogenizados. O material resultante foi deixado em repouso durante 30 minutos e, posteriormente centrifugado por 10 minutos a 2500 rpm. Todo o sobrenadante foi retirado com auxílio de pipetas de *Pasteur* e pequenas faixas de papel absorvente. Com auxílio de um bisturi, foram cortados pequenos pedaços (dimensões 1mmX1mm) de gelatina glicerinada (100mL de água destilada; 100g de glicerina; 17g de gelatina incolor; 1g de formol). Com uma agulha, um pedaço de gelatina foi encostado no fundo do microtubo, absorvendo parte do material polínico, e em seguida, transferida para um lâmina limpa e coberto com uma lamínula. Esta foi colocada em placa de aquecimento (aproximadamente 50°C) até completa fusão da gelatina e espalhamento sob a lâmina. Foram montadas cinco lâminas de cada espécie e examinadas no microscópio óptico Olympus BX 60. As imagens dos grãos de pólen foram digitalizadas por uma câmera de vídeo acoplada ao microscópio Olympus BX 60 e analisadas por meio do programa de imagem Image-ProPlus (Media Cybernetics). As medidas dos eixos polar (P) e equatorial (E) foram feitas em 25 dos grãos de pólen, enquanto as medidas da exina (ectoexina e endoexina) foram realizadas em 10 grãos de pólen. As classificações foram feitas de acordo com Erdtman (1960) e Punt (1999).

O preparo do material polínico para MEV foi realizado a partir de inflorescências previamente fixadas em ácido acético glacial por, no mínimo, 24 horas. Foram selecionados os maiores tamanhos de flores, sem que estivessem abertas. Com o auxílio de um microscópio estereoscópico e de agulhas, cada botão floral umedecido em ácido acético 45% foi aberto. Após este processo, as anteras foram transferidas para um microtubo adaptado com os lados superior e inferior cobertos com tela de poliéster (malha 60 μm). O microtubo adaptado foi fechado e transferido para outro microtubo (tipo eppendorf) de maior capacidade e coberto com fixador Karnovisk até a etapa subsequente. Após retirada do fixador com auxílio de pipetas de *Pasteur*, o material polínico contido no interior do microtubo adaptado foi lavado três vezes consecutivas com tampão Cacodilato, por 10 minutos cada. Após a lavagem, foram acrescentadas três gotas de Tetróxido de ósmio 0,05 M e deixado em repouso por 4 horas. Decorrido este período, foram realizadas duas lavagens do material durante 10 minutos cada, seguida por desidratação em uma série crescente de concentração de acetona (acetona 25% durante 10 minutos, acetona 50%

durante 10 minutos. acetona 75% durante 10 minutos, acetona 90% durante 10 minutos e acetona 100%, por três vezes, durante 10 minutos cada). Em seguida, o material polínico foi seco no aparelho de Ponto Crítico (CPD 030, Bal-Tec) e os *stubs* montados com fita adesiva contendo carbono com dupla face. Os grãos de pólen foram espalhados sobre o *stub* com auxílio de seringas usando o microscópio estereoscópio (Meiji, Tecno Rz, Japão). Em seguida, os *stubs* foram cobertos com partículas de ouro por 15 minutos em aparelho SCD 050, Bal-Tec. Os grãos de pólen foram analisados e fotografados no microscópio de varredura LEO Evo 40 XVP.

4 RESULTADOS

4.1 Análise citogenética

Os testes realizados para identificação do tamanho usado para o estudo dos cromossomos meióticos são mostrados na Tabela 1.3.

Tabela 1.3 - Tamanho usado para coleta de flores visando ao estudo meiótico dos cromossomos para 16 espécies de Verbenaceae da Serra do Cipó

Espécie	Tamanho do botão floral (mm)	Número médio de flores usadas
<i>Aeghipila sellowiana*</i>	1,1 a 1,8	20
<i>Aegiphila lhotzkiana</i>	1,1 a 1,8	30
<i>Aloysia virgata</i>	0,9 a 1,1	30
<i>Bouchea fluminensis</i>	1,0 a 1,5	60
<i>Lantana aff. fucata</i>	0,6 a 1,0	20
<i>Lantana fucata</i>	0,6 a 1,0	20
<i>Lippia aff. microphylla</i>	0,6 a 0,8	50
<i>Lippia aristata</i>	0,6 a 1,0	20
<i>Lippia martiana</i>	0,6 a 1,0	50
<i>Lippia salviifolia</i>	0,6 a 1,0	50
<i>Stachytarpheta gesnerioides</i>	1,5 a 3,0	70
<i>Stachytarpheta glabra</i>	1,5 a 3,0	100
<i>Stachytarpheta mexiae</i>	1,5 a 3,0	30
<i>Stachytarpheta procumbens</i>	1,5 a 3,0	20
<i>Stachytarpheta reticulata</i>	1,5 a 3,0	20
<i>Verbena litoralis</i>	0,1 a 1,2	100

A partir das metodologias utilizadas para as análises mitóticas e meióticas, foi possível determinar o número cromossômico das 17 espécies de Verbenaceae da

Serra do Cipó. Foram descritos os números cromossômicos obtidos para as 17 espécies estudadas na Tabela 1.4. É importante mencionar ainda que para 15 das 17 espécies estudadas, este constitui o primeiro relato na literatura sobre sua caracterização cromossômica.

Tabela 1.4 - Números cromossômicos de espécies de Verbenaceae da Serra do Cipó - MG

Espécie	Número cromossômico (2n)
<i>Aegiphila lhotzkiana</i>	72
<i>Aeghipila sellowiana</i>	84
<i>Aloysia virgata</i>	36
<i>Bouchea fluminensis</i>	ca 78
<i>Lantana aff. fucata</i>	38
<i>Lantana fucata</i>	24
<i>Lippia aff. microphylla</i>	24
<i>Lippia aristata</i>	24
<i>Lippia martiana</i>	24
<i>Lippia salviifolia</i>	24
<i>Stachytarpheta gesnerioides</i>	54
<i>Stachytarpheta glabra</i>	62
<i>Stachytarpheta mexiae</i>	56
<i>Stachytarpheta procumbens</i>	58
<i>Stachytarpheta reticulata</i>	82
<i>Verbena litoralis</i>	56
<i>Vitex polygama</i>	34

ca: contagem aproximada

No gênero *Aegiphila* foram estudadas duas espécies. Em ambas foi observada meiose anormal, contendo organizações cromossômicas em forma de anel. A partir de diacineses encontradas de *Aegiphila sellowiana*, foi possível determinar $2n=84$ para a espécie. A partir da análise das células meióticas, provenientes de flores femininas e masculinas, o número cromossômico determinado foi de $2n=72$ para *A. lhotzkiana*. Nas lâminas contendo as células da espécie foram encontradas as fases de zigóteno, paquíteno e diacinese nas suspensões dos indivíduos masculinos e paquíteno, diplóteno e metáfase I, foram observadas a partir das suspensões feitas com o ovário (Figuras 1.3 e 1.4). Para *A. sellowiana* foi possível observar as fases de paquíteno, diplóteno, diacinese, anáfase I e anáfase II (Figura 1.5).

No gênero *Aloysia*, somente *A. virgata* foi identificada na Serra do Cipó. Para a espécie, foram encontradas as fases em zigóteno, paquíteno, diplóteno, diacinese e anáfase I (Figura 1.6). A espécie apresentou comportamento meiótico normal, com $2n=36$ cromossomos.

Em *B. fluminensis* foram observadas células em paquíteno, diplóteno, diacinese, anáfase I, telófase I e tétrade (Figura 1.7). A contagem aproximada das células em diacinese foi de $2n=78$ cromossomos.

Para *Lantana aff. fucata*, as fases em zigóteno, paquíteno, diacinese, metáfase I, anáfase I, telófase I e anáfase II (Figura 1.8) demonstraram o comportamento normal da espécie e permitiram definir $2n=38$ cromossomos. Em *L. fucata* foram observados zigóteno, paquíteno, diplóteno, diacinese, metáfase I, anáfase I, telófase I, metáfase II e telófase II (Figura 1.9). Os cromossomos bem condensados e separados na diacinese permitiram a contagem de $2n=24$ cromossomos.

No gênero *Lippia*, além de *Lippia florida*, *L. hermannioides* e *L. sidoides*, ocorrentes na Serra do Cipó e investigadas previamente (VICCINI *et al.*, 2006), mais quatro espécies foram relatadas: *L. aff. microphylla*, *L. aristata*, *L. salviifolia* e *L. martiana*. As análises de *L. aff. microphylla* demonstraram abundância de meiócitos nas fases de zigóteno, paquíteno, diplóteno, diacinese e anáfase I e permitiram a determinação do número cromossômico de $2n=24$ (Figura 1.10). *L. aristata* demonstrou comportamento meiótico normal e número cromossômico $2n=24$. A técnica empregada permitiu a observação de células em zigóteno, paquíteno, diacinese, metáfase I, anáfase I, telófase I e telófase II (Figura 1.11). Para *L.*

martiana as fases paquíteno, diacinese, anáfase I, metáfase II e tétrade (Figura 1.12) evidenciaram um comportamento meiótico normal e um número cromossômico de $2n=24$ cromossomos. A observação de diacineses de *L. salviifolia* permitiu a determinação de $2n=24$ cromossomos. Além desta fase, também foram encontradas as fases de zigóteno, paquíteno, diplóteno, metáfase I, anáfase I e tétrade (Figura 1.13).

A observação das fases de zigóteno, paquíteno, diplóteno e diacinese de *Stachytarpheta gesnerioides* demonstrou comportamento meiótico normal para a espécie e a determinação de $2n=54$ cromossomos (Figura 1.14). Para a espécie *S. glabra* foram verificadas Célula-Mãe do Grão de Pólen (PMC`s) nas fases zigóteno, paquíteno, diacinese, metáfase II. Além dessas foram encontradas metáfases mitóticas com $2n=62$ cromossomos (Figura 1.15). *S. mexiae* apresentou também células meióticas sem anormalidades contendo $2n=56$ cromossomos (Figura 1.16). Já para *S. procumbens* foram encontradas diacineses e metáfases mitóticas (Figura 1.17) com $2n=58$ cromossomos. Para *S. reticulata*, foram observadas células em zigóteno, paquíteno, diplóteno, diacinese, metáfase I e telófase I (Figura 1.18). A contagem do número cromossômico revelou $2n=82$ cromossomos, sem observação de anormalidade nas fases meióticas.

Verbena litoralis apresentou comportamento meiótico normal e as fases zigóteno, paquíteno, diplóteno, diacinese, metáfase I, anáfase I, metáfase II e tétrade foram observadas, possibilitando a contagem de $2n=56$ cromossomos (Figura 1.19).

A partir do tratamento dos meristemas apical e lateral de *Vitex polygama*, pudemos observar várias metáfases com boa condensação cromossômica, o que permitiu a determinação do número cromossômico de $2n=34$ para a espécie (Figura 1.20)

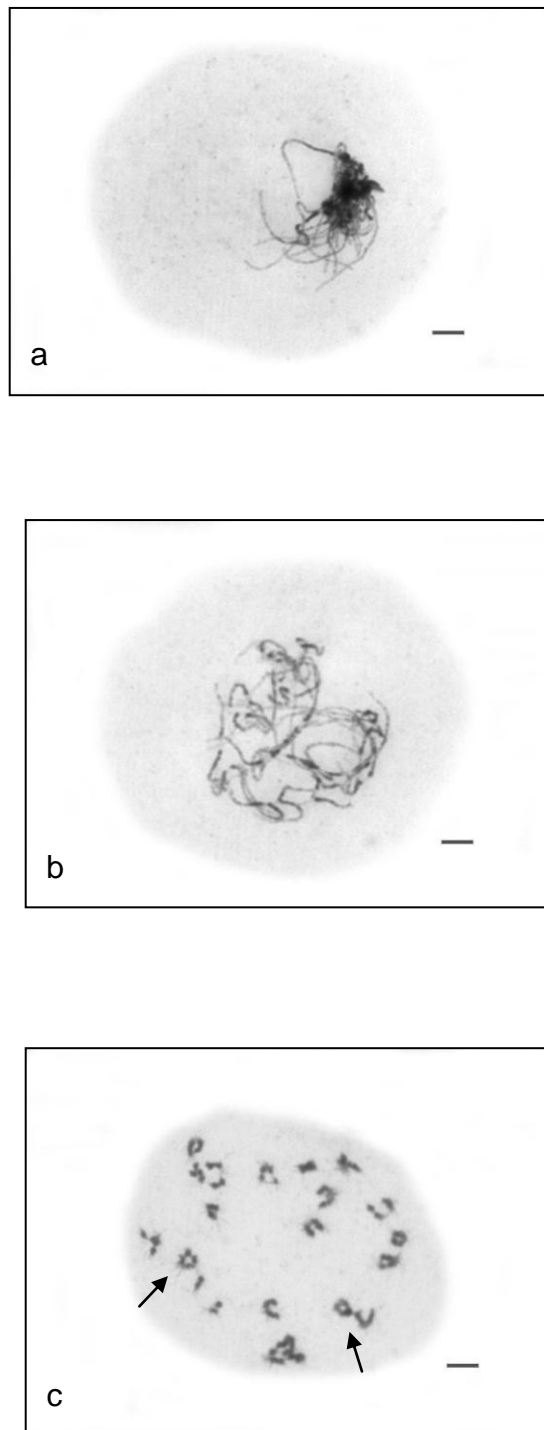


Figura 1.3 – Comportamento meiótico do indivíduos masculinos de *Aegiphila lhotzkiana*. (a) zigóteno; (b) paquíteno; (c) diacinese. As setas indicam anormalidades. Escala 5 μ m

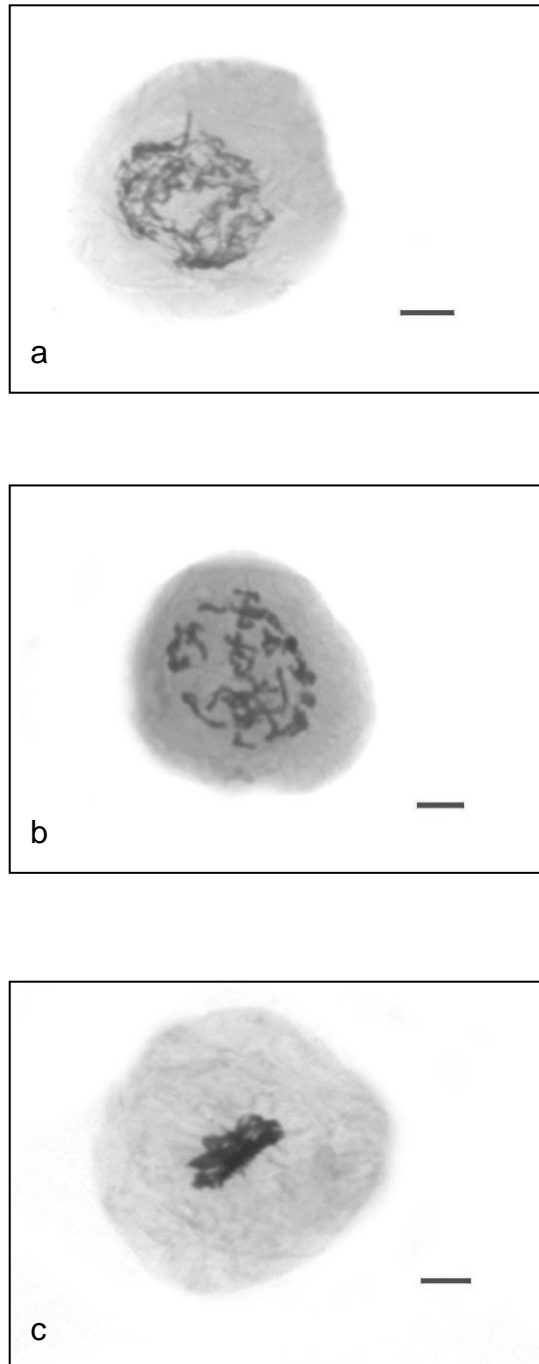


Figura 1.4 – Comportamento meiótico de indivíduos femininos de *A. Ihotzkiana*. (a) paquíteno; (b) diplóteno e (c) metáfase I. Escala 5 μ m

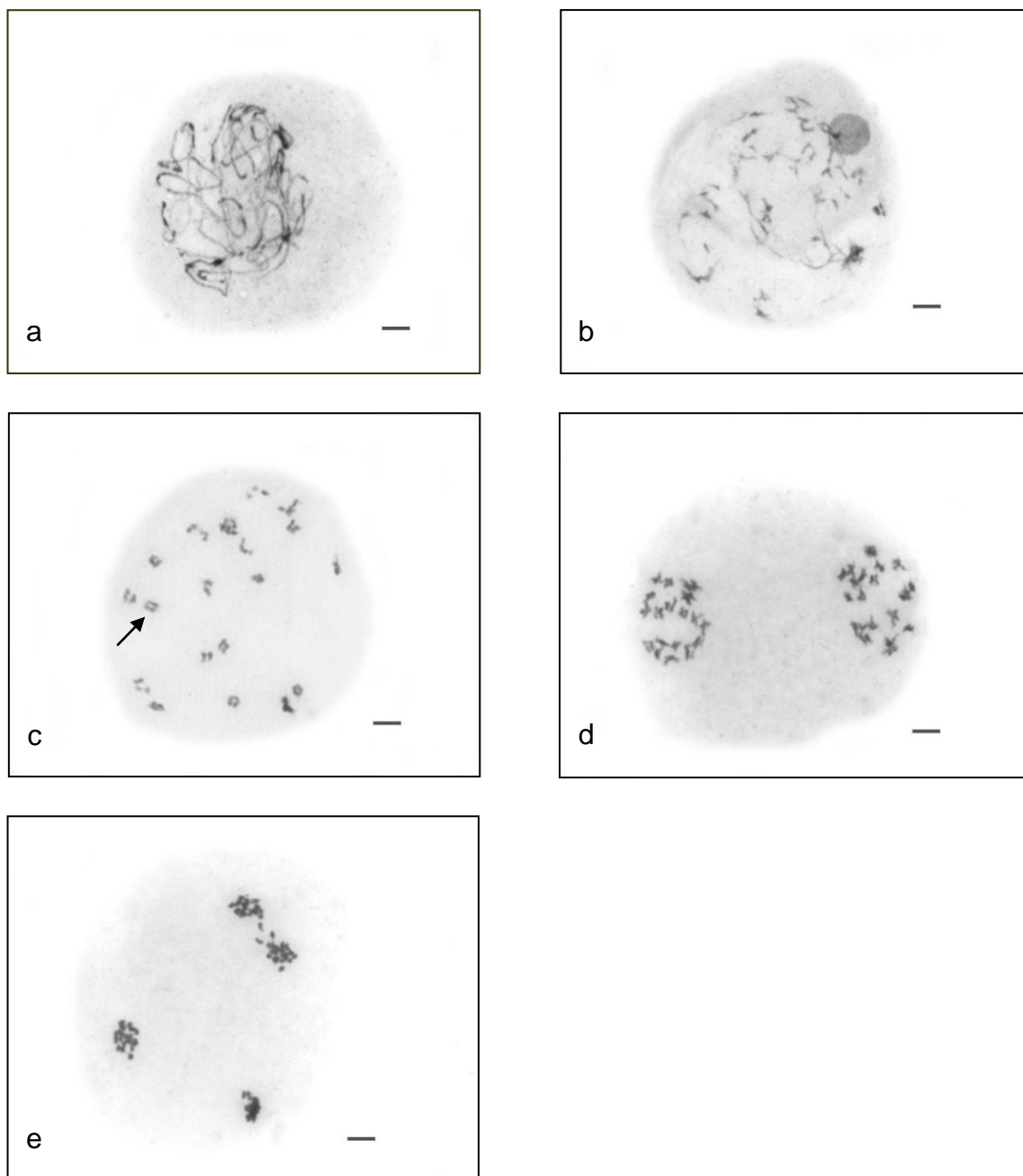


Figura 1.5 – Comportamento meiótico de *Aegiphila sellowiana*. (a) paquíteno; (b) diplóteno; (c) diacinese; (d) anáfase I; (e) anáfase II. A seta indica anormalidade. Escala 5 μ m.

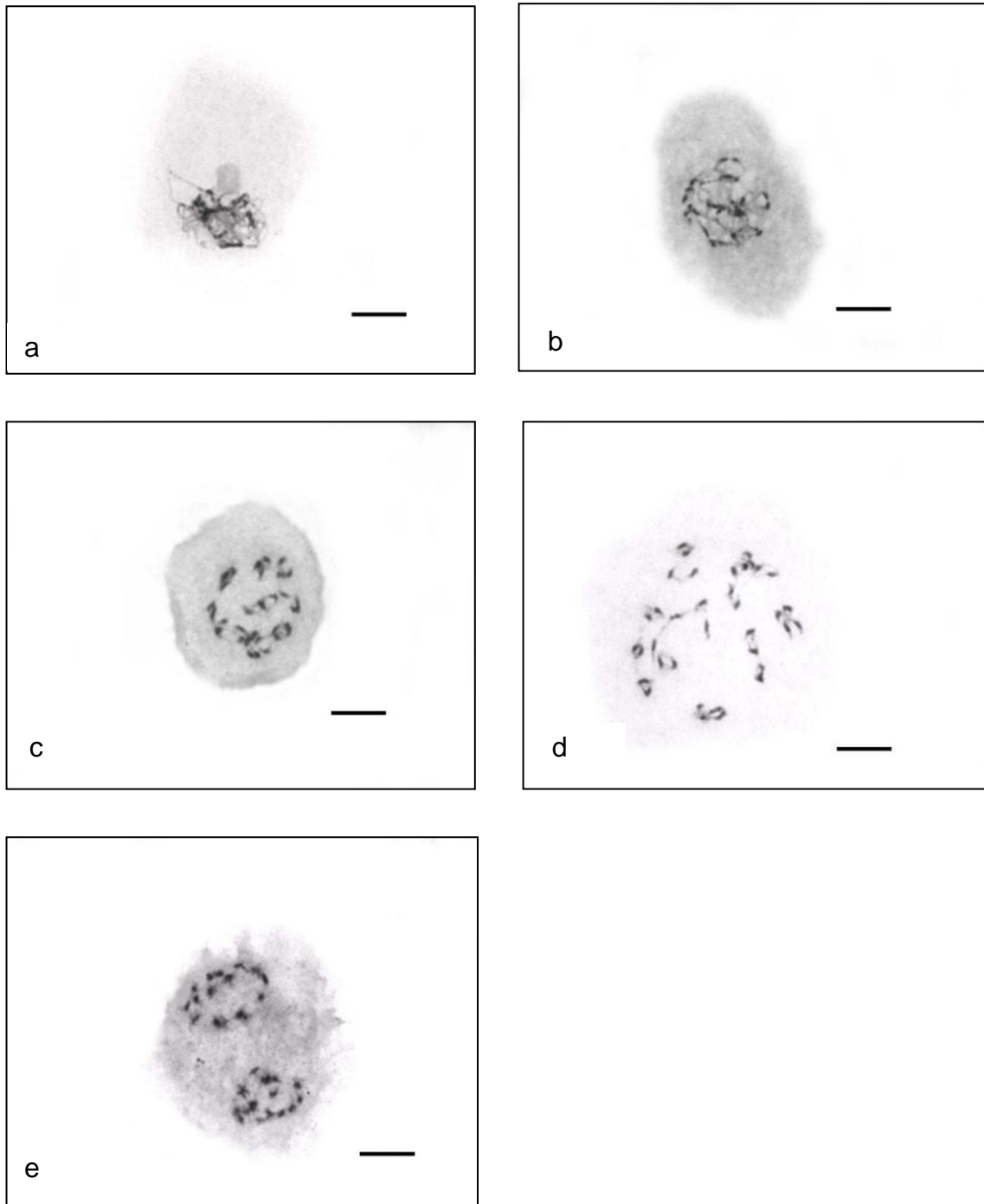


Figura 1.6 - Comportamento meiótico de *Aloysia virgata*. (a) zigóteno, (b) paquíteno, (c) diplóteno, (d) diacinese e (e) anáfase I. Escala 5 μ m.

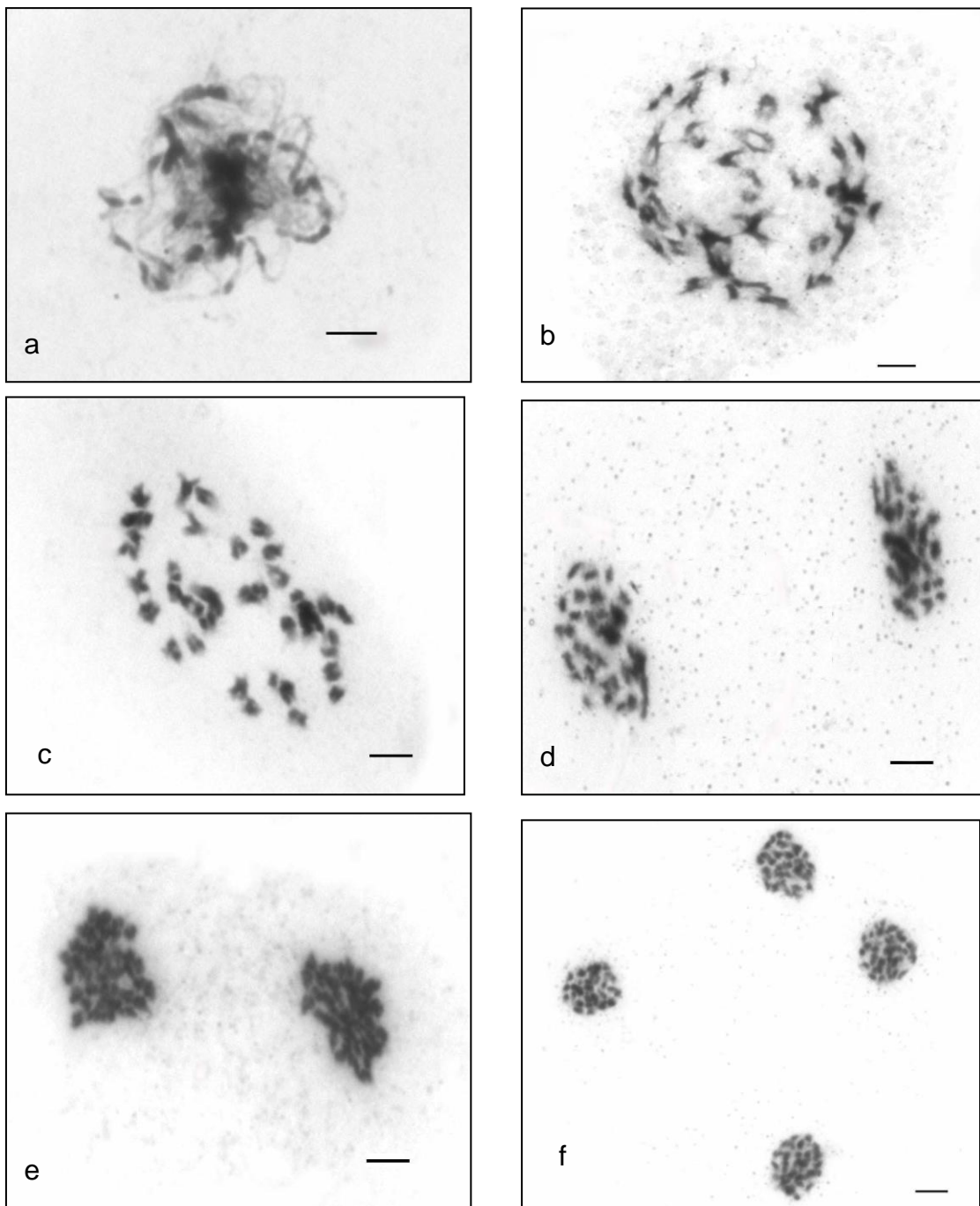


Figura 1.7 - Comportamento meiótico de *Bouchea fluminensis*. (a) paquíteno, (b) diplóteno, (c) diacinese, (d) anáfase I, (e) telófase I e (f) tétrade. Escala 5 μ m

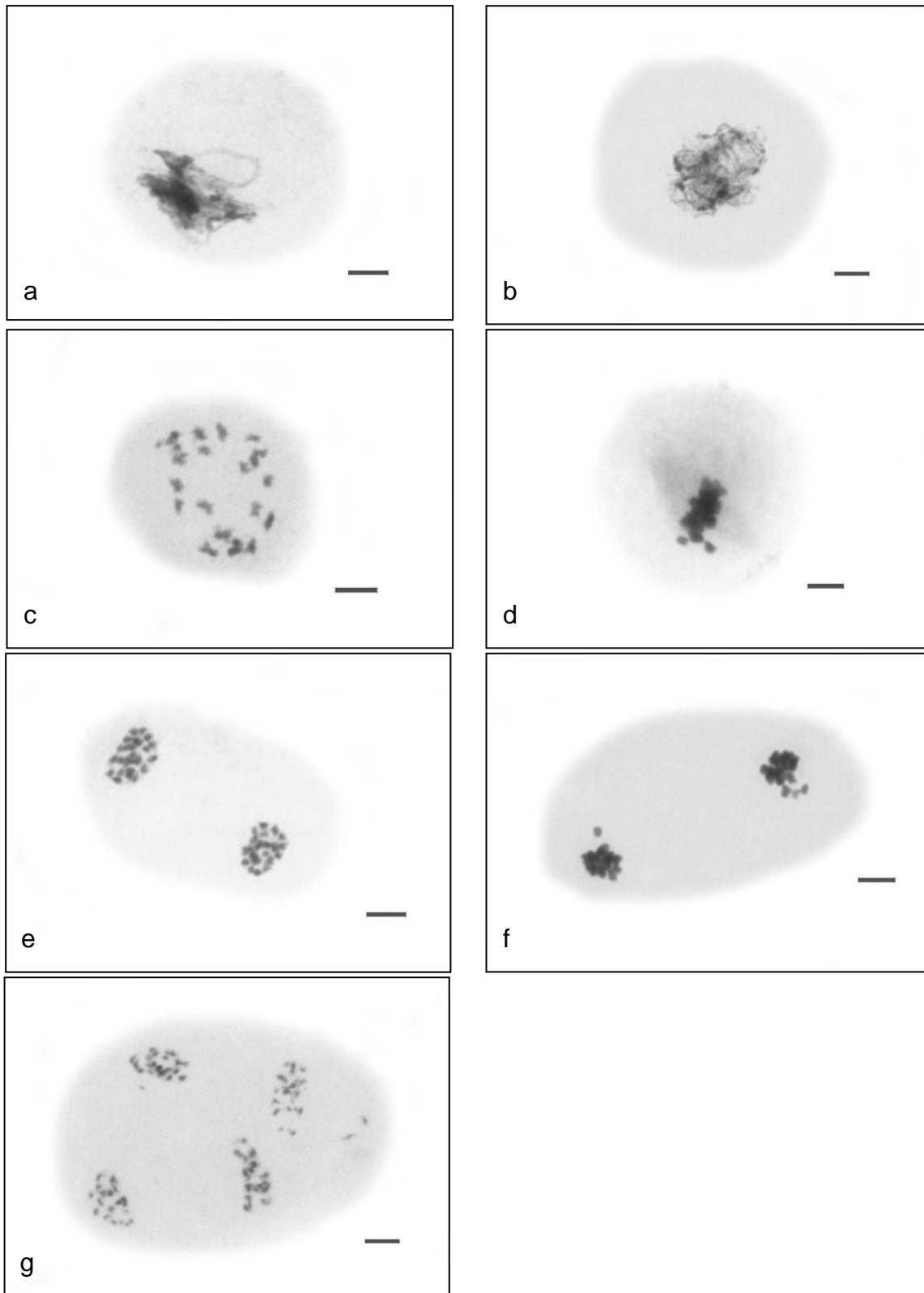


Figura 1.8 – Comportamento meiótico de *Lantana aff. fucata* (a) zigóteno; (b) paquíteno; (c) diacinese; (d) metáfase I; (e) anáfase I; (f) telófase I; (g) anáfase II. Escala 5 μ m.

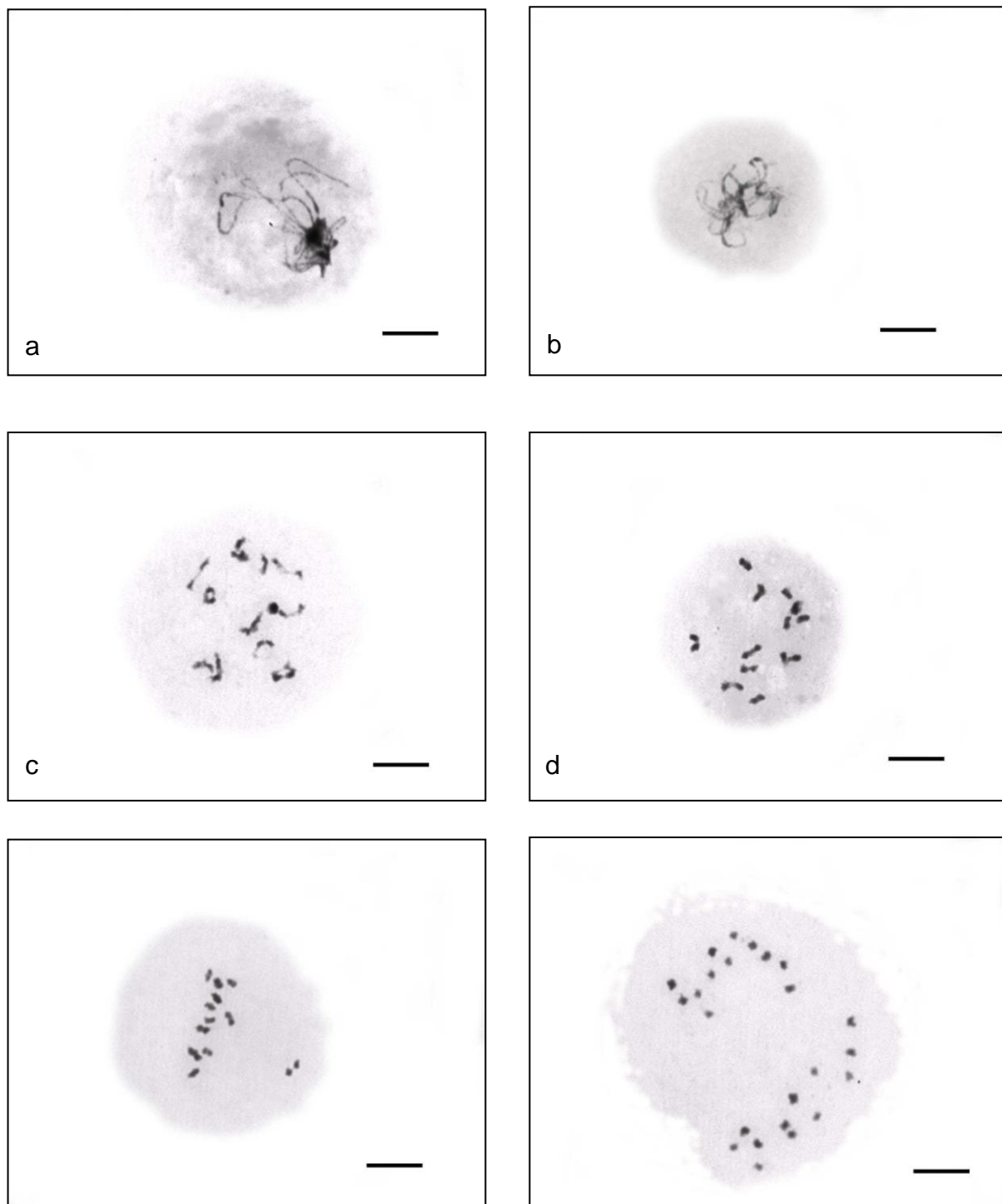


Figura 1.9 – Comportamento meiótico de *Lantana fucata* (a) zigóteno, (b) paquíteno, (c) diplóteno, (d) diacinese, (e) metáfase I, (f) anáfase I. Escala 5 μ m.

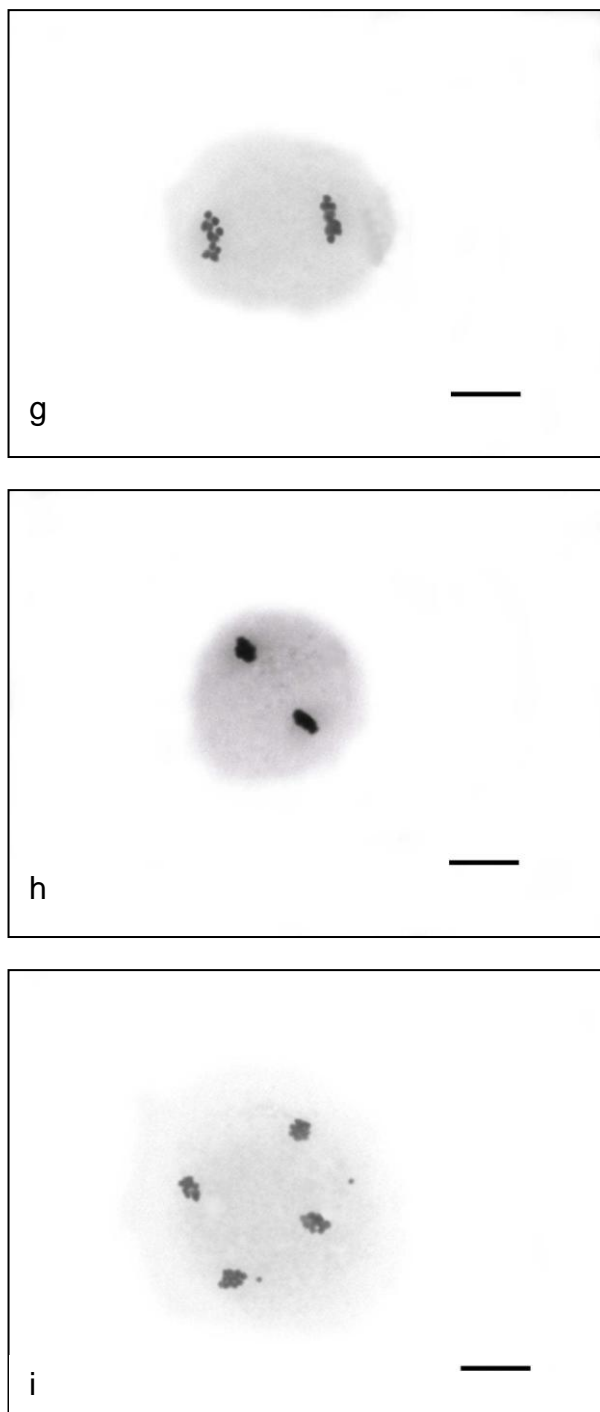


Figura 1.9 (cont...)- Comportamento meiótico de *Lantana fucata*. (g) telófase I, (h) metáfase II e (i) telólase II. Escala 5 μ m.

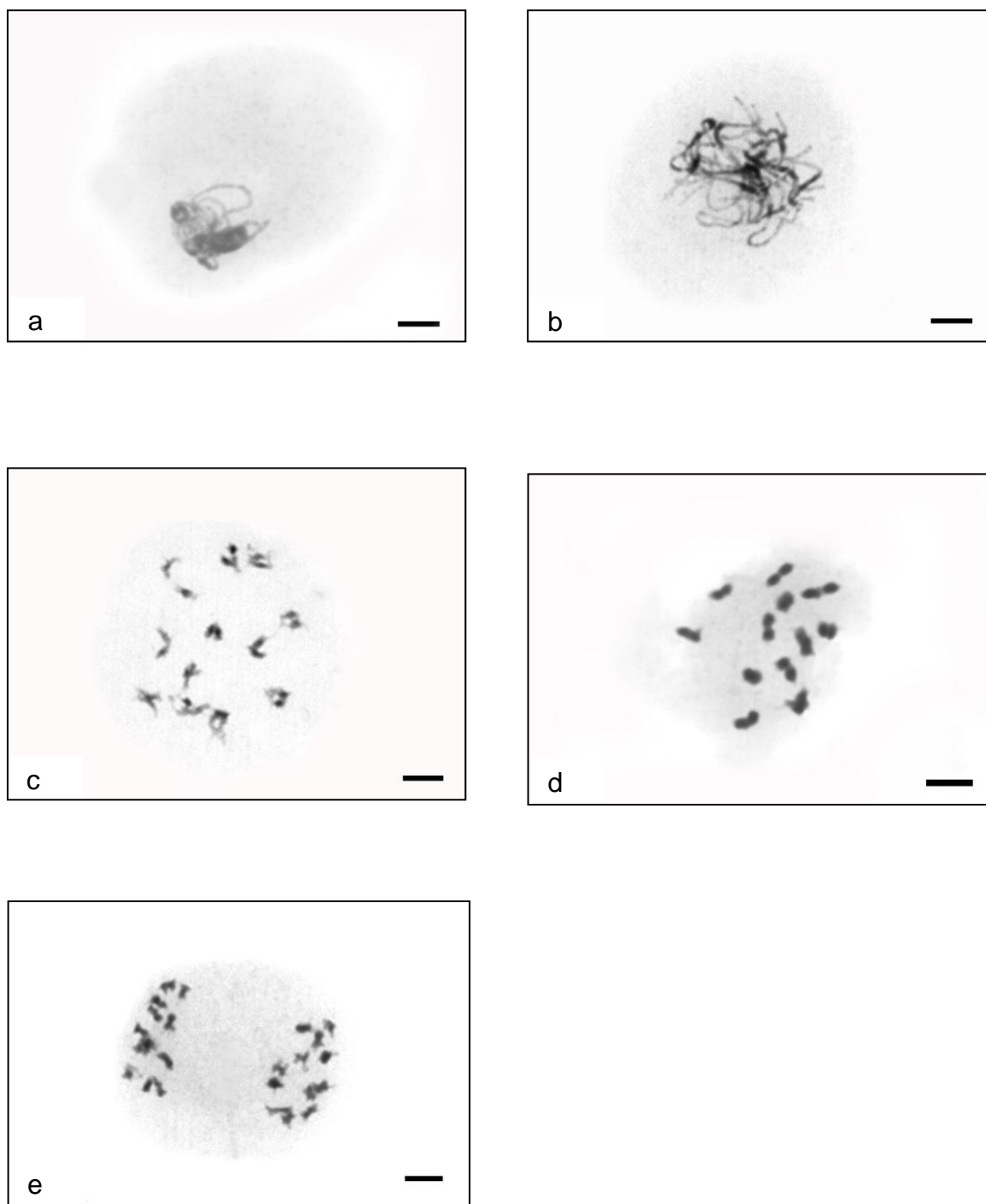


Figura 1.10 – Comportamento meiótico de *Lippia aff. microphylla* (a) zigóteno; (b) paquíteno; (c) diplóteno; (d) diacinese; (e) anáfase I. Escala 5 μ m.

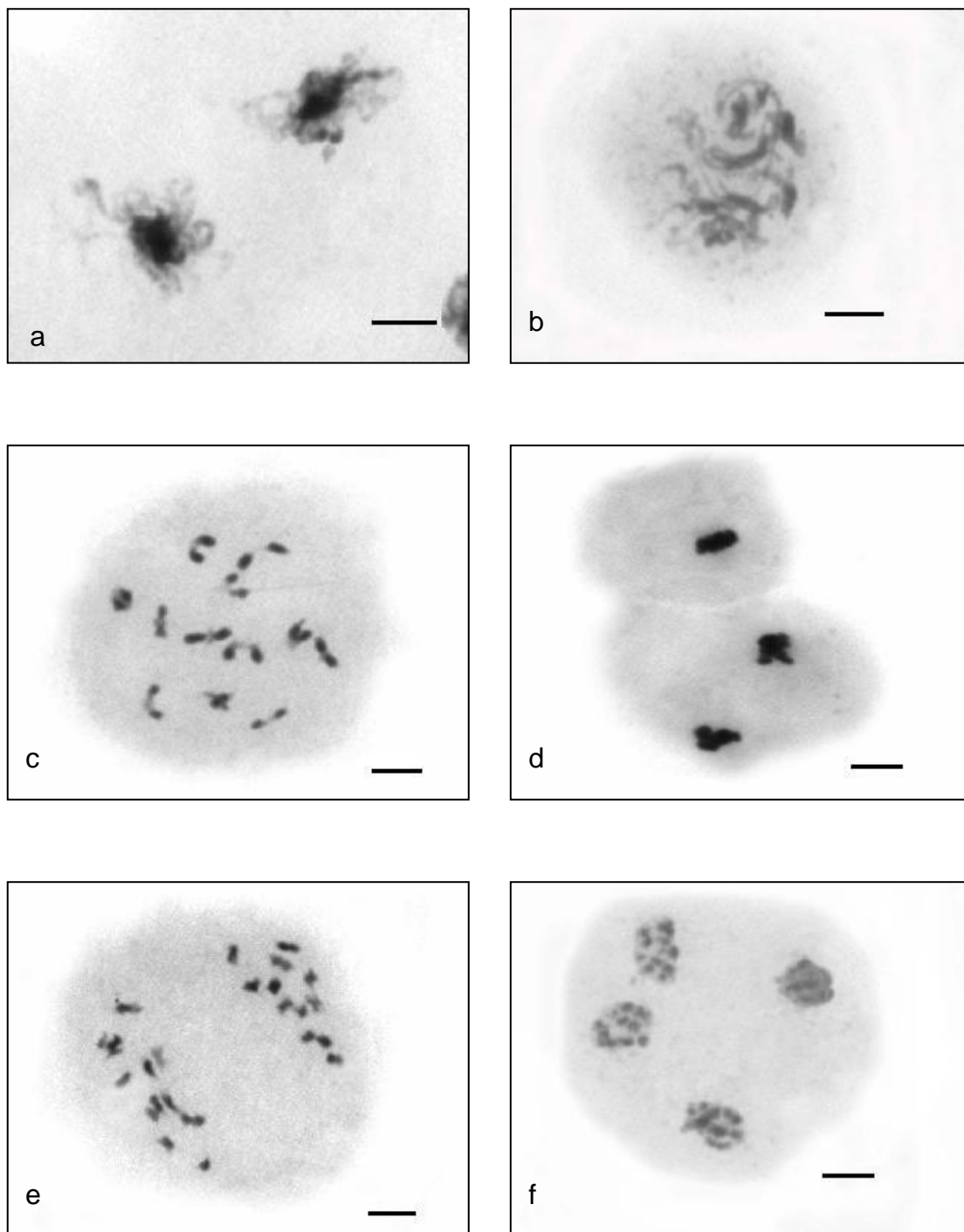


Figura 1.11 - Comportamento meiótico de *Lippia aristata*. (a) zigótenos, (b) paquíteno, (c) diacinese, (d) metáfase I e telófase I, (e) anáfase I, (f) telófase II. Escala 5 μ m.

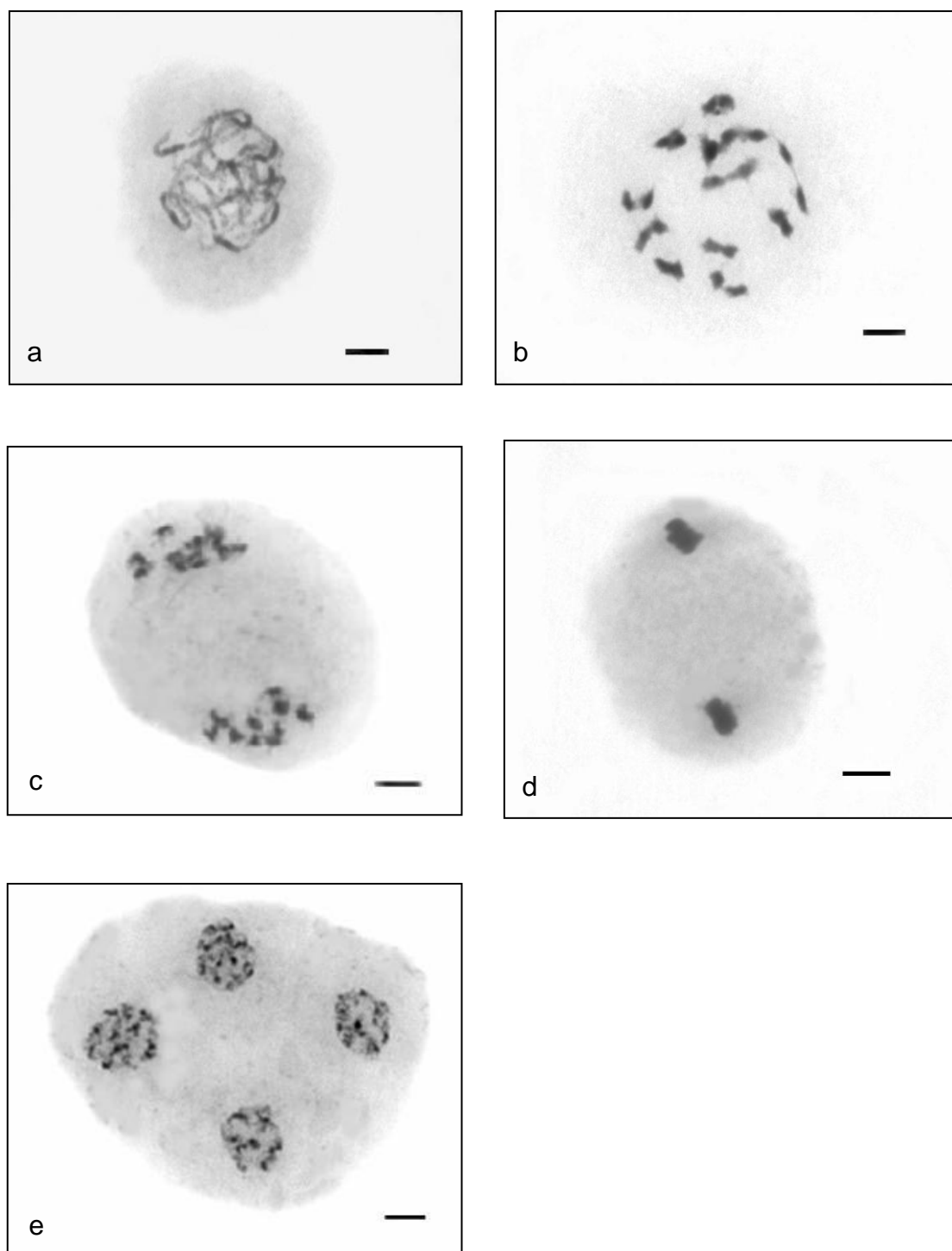


Figura 1.12 – Comportamento meiótico de *Lippia martiana*.(a) paquíteno; (b) diacinese; (c) anáfase I; (d) metáfase II; (e) tétrade. Escala 5 μm.

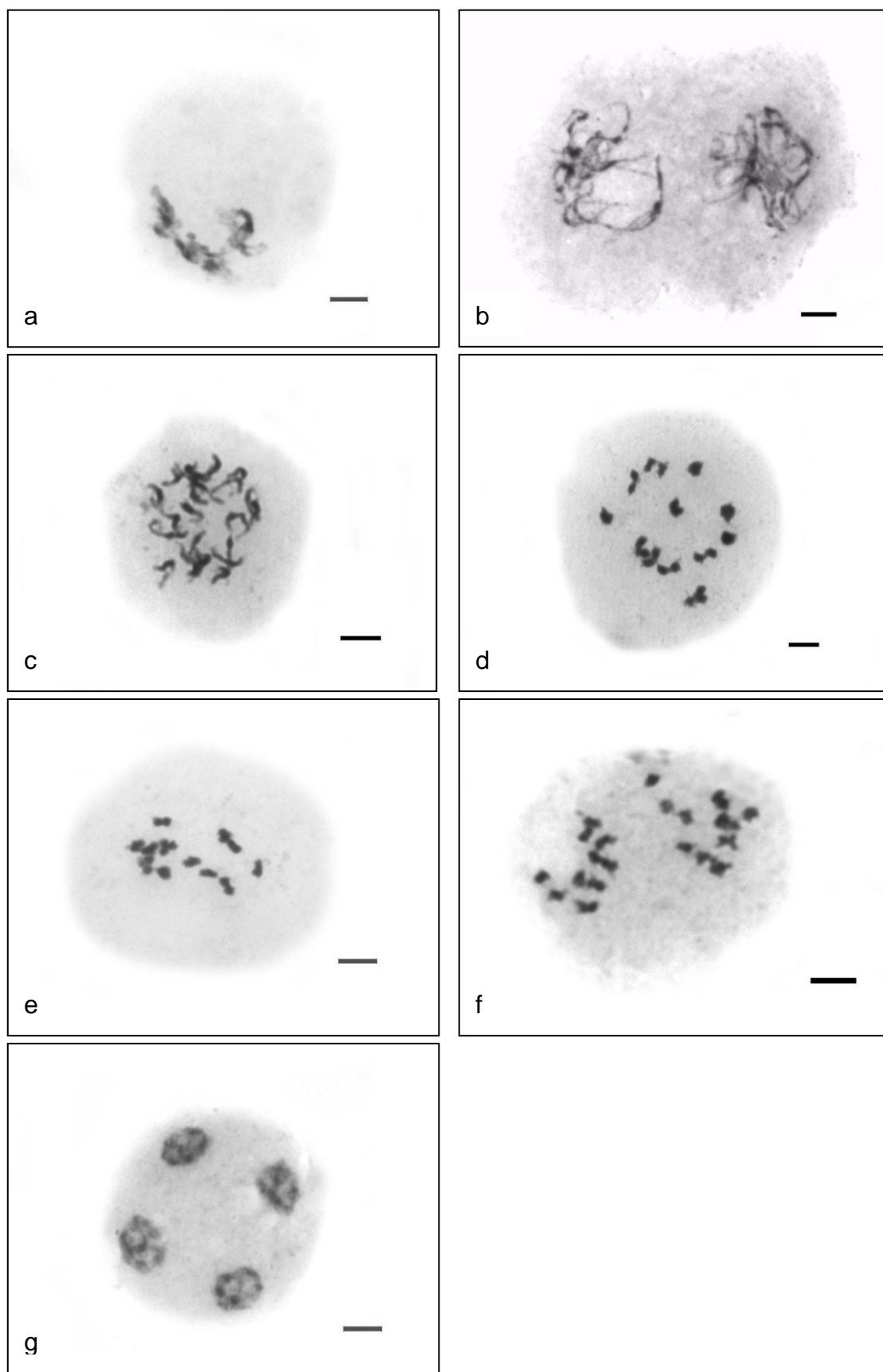


Figura 1.13 - Comportamento meiótico de *Lippia salviifolia* (a) zigóteno (b) paquítenos, (c) diplóteno, (d) diacinese, (e) metáfase I (f) anáfase I, (g) tétrade. Escala 5µm

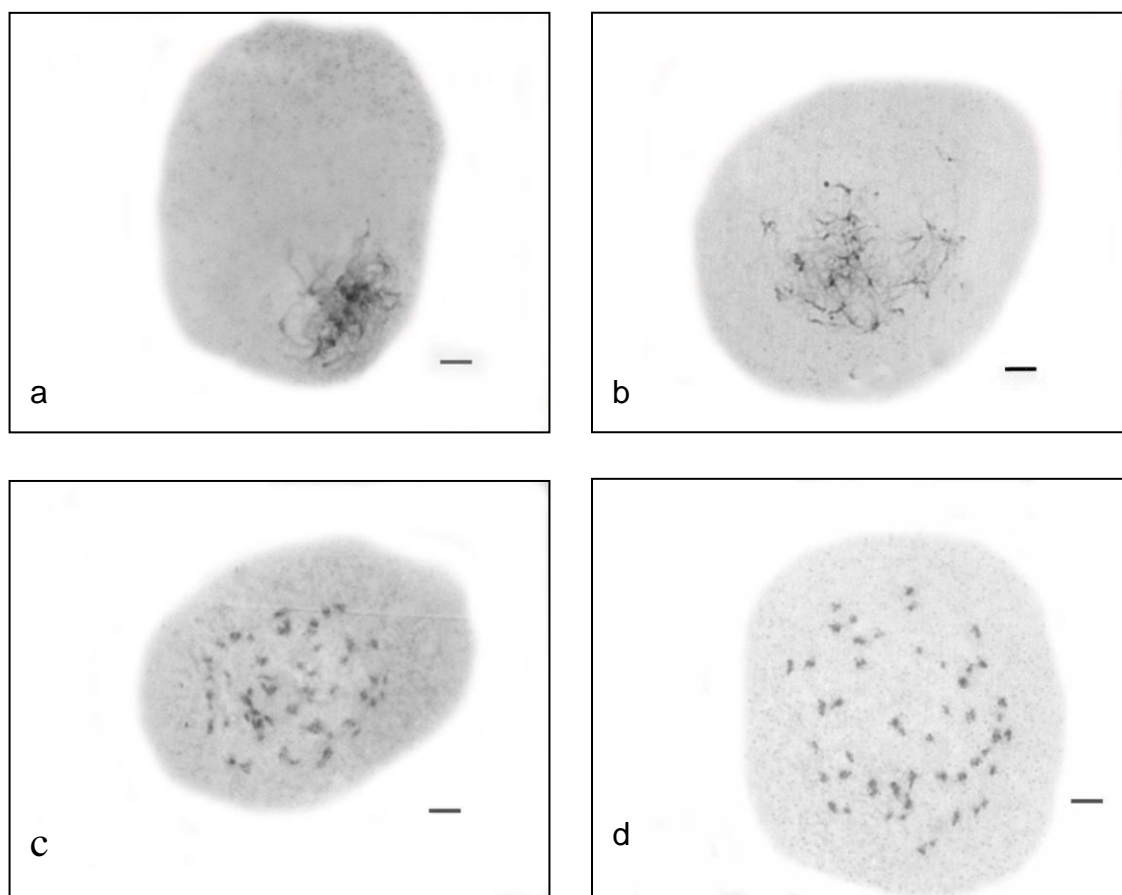


Figura 1.14 – Comportamento meiótico de *Stachytarpheta gesnerioides* (a) zigóteno; (b) paquíteno; (c) diplóteno e (d) diacinese. Escala 5 μ m

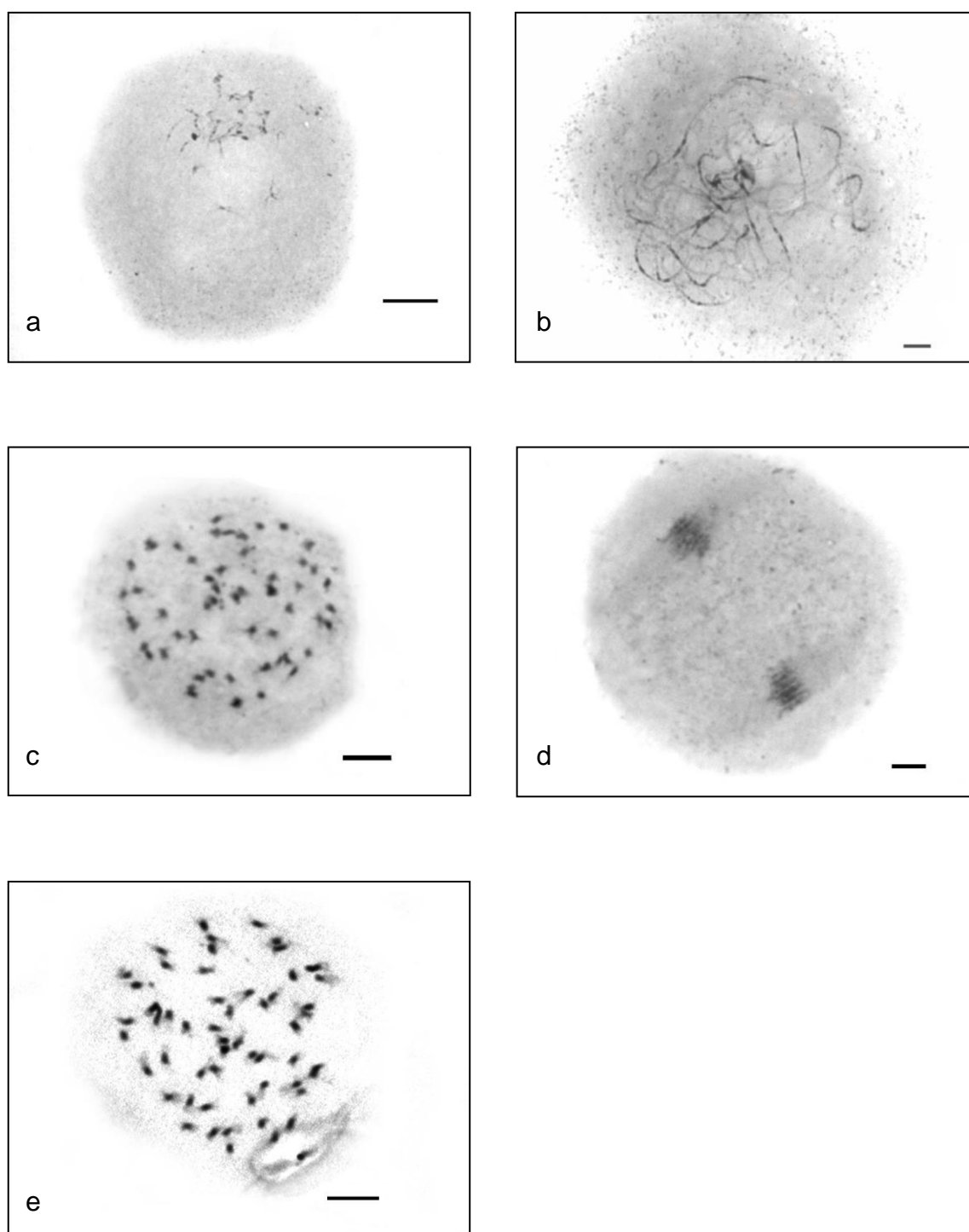


Figura 1.15 - Comportamento meiótico de *Stachytarpheta glabra* (a) zigóteno, (b) paquíteno, (c) diacinese, (d) metáfase II, (e) metáfase mitótica pré-meiótica. Escala 5 μm.

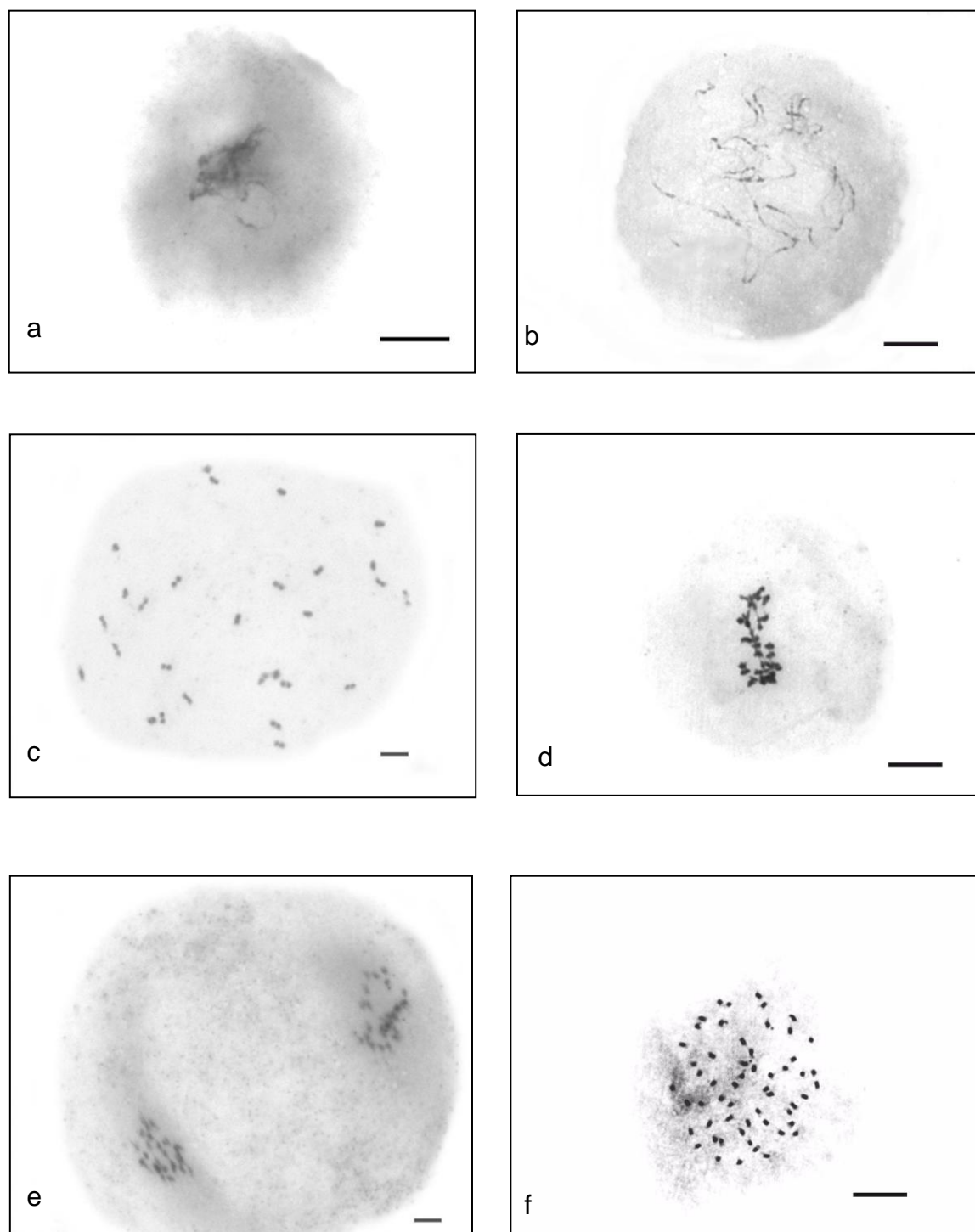


Figura 1.16 - Comportamento meiótico de *Stachytarpheta mexiae* (a) zigóteno, (b) paquíteno, (c) diacinese, (d) metáfase I, (e) metáfase II (f) metáfase mitótica pré-meiótica. Escala 5 μ m.

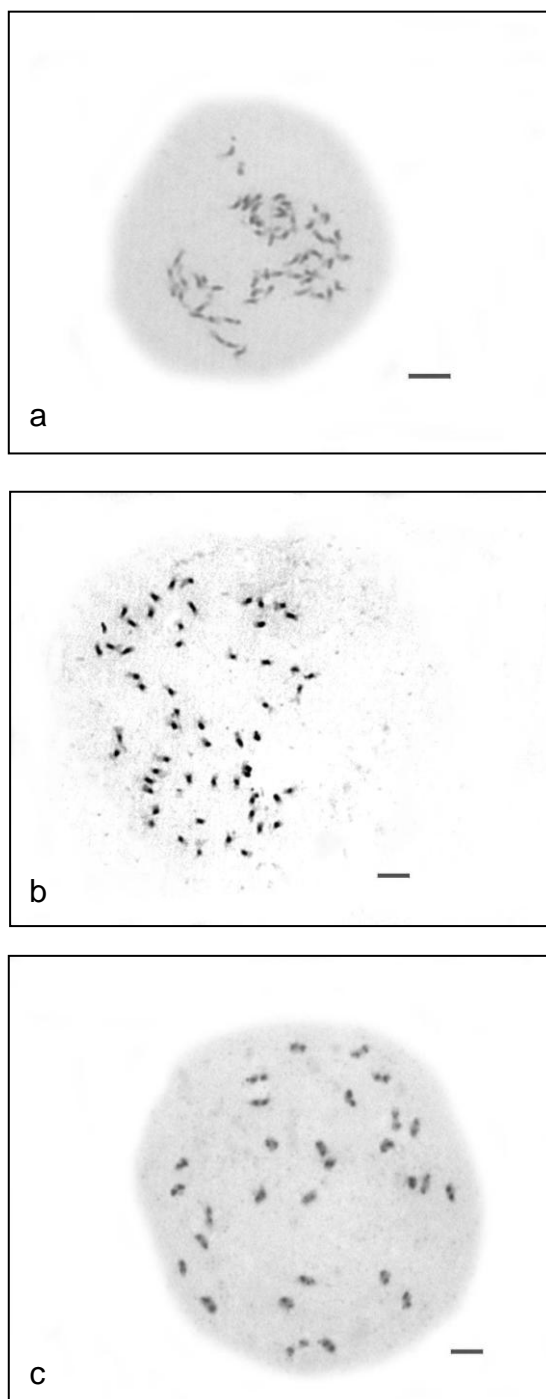


Figura 1.17 – Comportamento meiótico de *Stachytarpheta procumbens* (a , b) metáfases mitóticas pré-meióticas e (c) diacinese. Escala 5 μ m

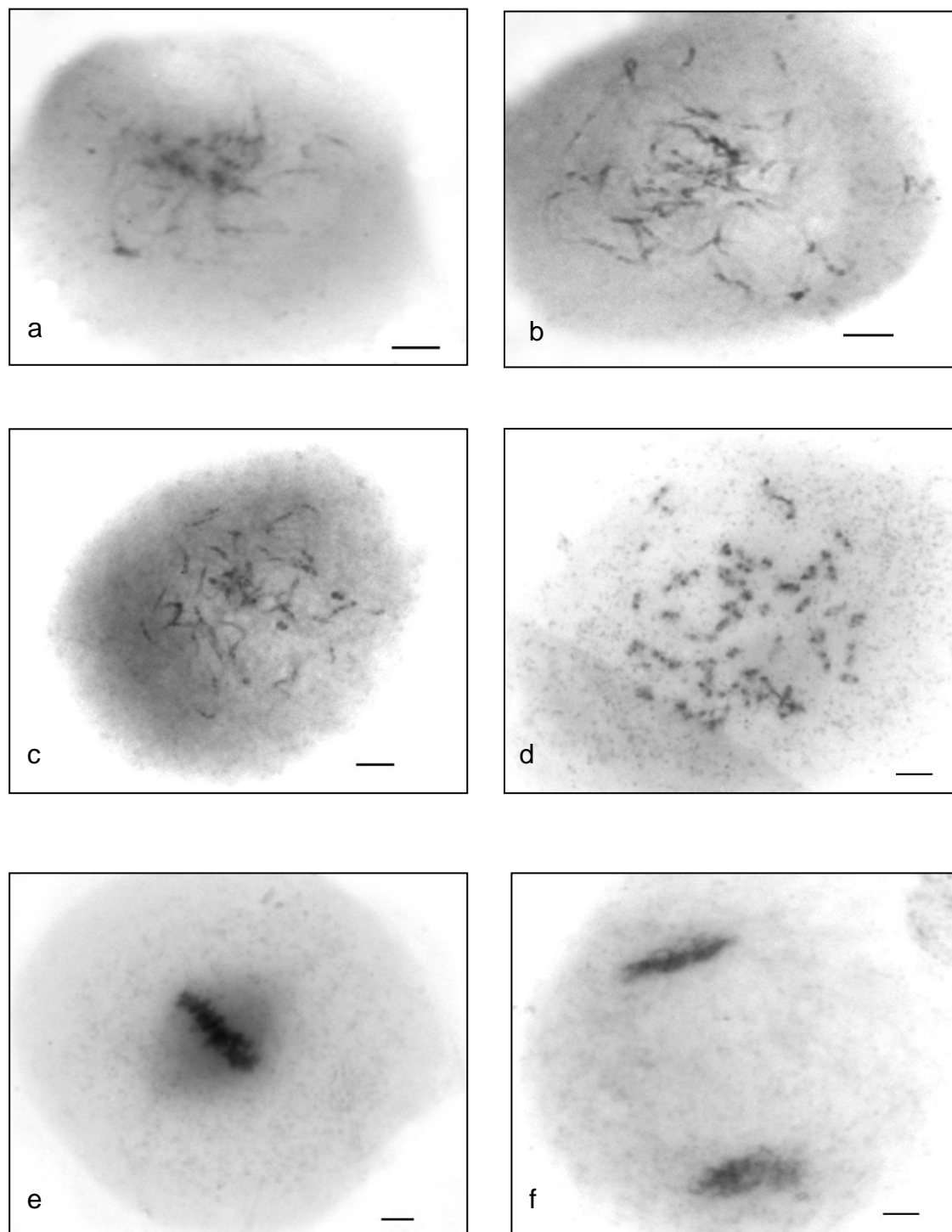


Figura 1.18 - Comportamento meiótico de *Stachytarpheta reticulata*. (a) zigóteno, (b) paquíteno, (c) diplóteno, (d) diacinese, (e) metáfase I, (f) telófase I.

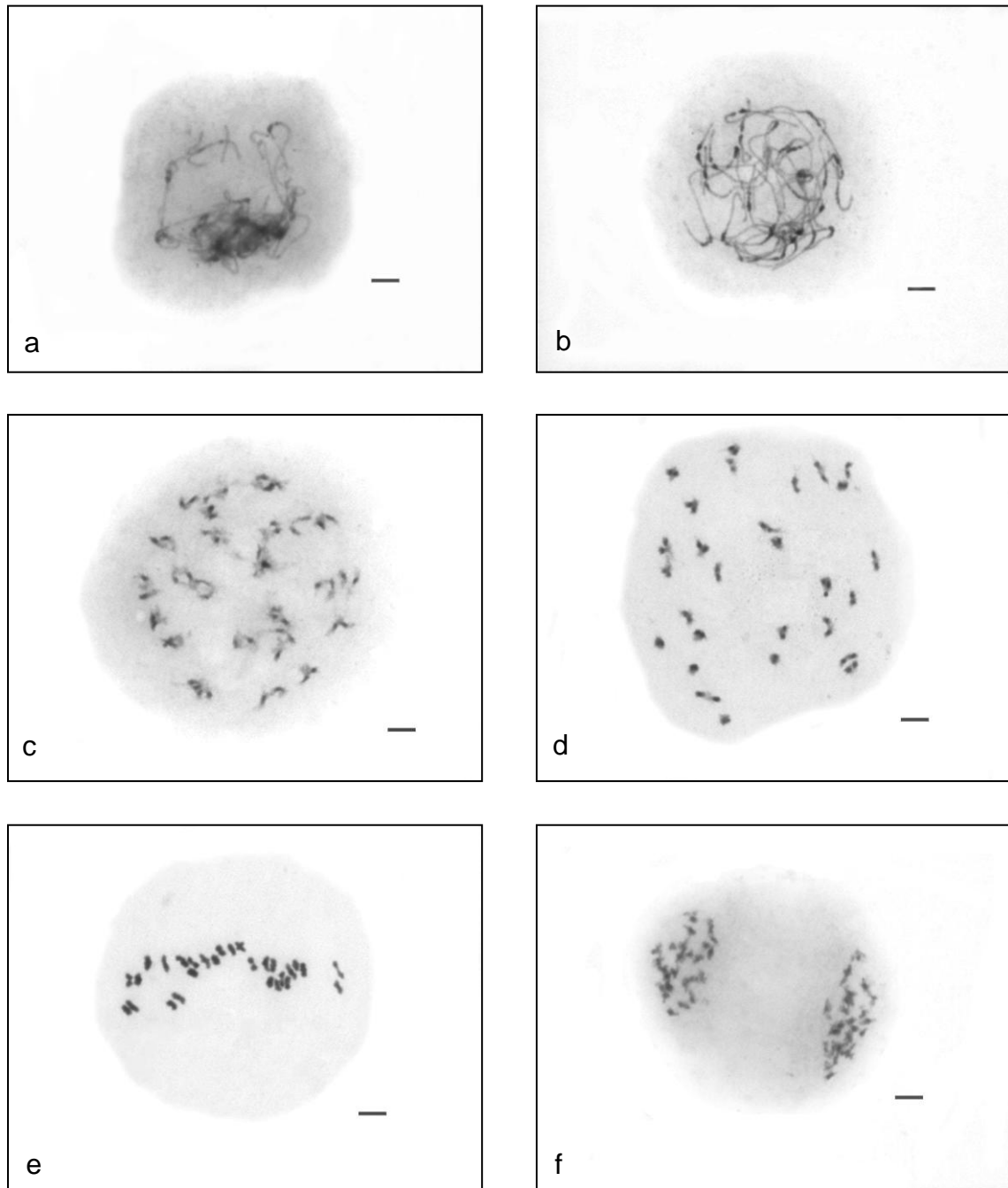


Figura 1.19 – Comportamento meiótico de *Verbena litoralis* (a) zigóteno; (b) paquíteno; (c) diplóteno; (d) diacinese; (e) metáfase I; (f) anáfase I. Escala 5 μ m.

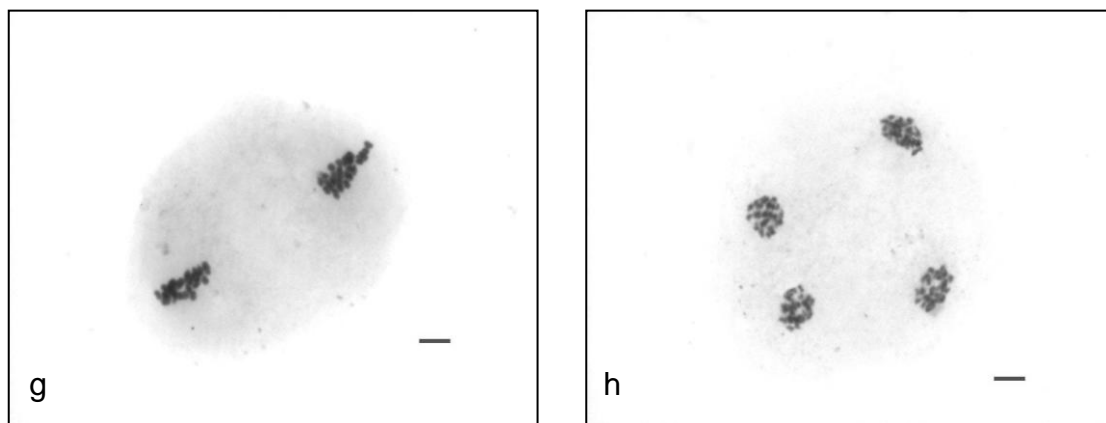


Figura 1.19 (Cont....) – Comportamento meiótico de *Verbena litoralis*, (g) metáfase II; (h) tétrede. Escala 5µm.



Figura 1.20 – Metáfase mitótica de *Vitex polygama*. Escala 5µm

4.2 Estimativa do conteúdo de DNA nuclear

A análise por citometria de fluxo dos núcleos isolados das espécies de Verbenaceae resultaram em histogramas do conteúdo de DNA evidenciando dois picos dominantes correspondendo aos núcleos na fase G₀/G₁ das plantas pesquisadas e do padrão. A Figura 1.21 ilustra os histogramas encontrados para algumas das espécies estudadas. Para a maioria das espécies, o padrão interno utilizado - *Pisum sativum* (2C=9,09 pg)- foi apropriado para estimar a quantidade de DNA, exceto para *Bouchea fluminensis*, em que foi usado *Glycine max* (2C=2,50 pg) como padrão interno de referência.

A metodologia empregada foi satisfatória para o isolamento e coloração dos núcleos, evidenciado pelo baixo *background* e os coeficientes de variação dos histogramas inferiores a 3%. O conteúdo de DNA nuclear 2C estimado para as espécies estudadas pode ser visto na Tabela 1.5. A quantidade de DNA foi uniforme dentro do mesmo indivíduo e dentre os indivíduos da mesma espécie, o que indica a estabilidade do genoma dessas espécies. A análise interespecífica revelou diferença significativa, levando à divisão das 17 espécies dentro de 8 grupos distintos. A quantidade de DNA dentro das espécies variou até 9 vezes, de 1,14 pg em *Vitex polygama* a 10,35 pg em *Bouchea fluminensis*. O grupo 1 é formado apenas por *Vitex polygama*; enquanto o grupo 2 foi formado por 3 espécies de *Stachytarpheta*: *S. glabra*, *S. mexiae* e *S. procumbens*. Por possuir quantidade de DNA intermediária entre *Lantana aff. fucata* e *Lippia aristata*, a espécie *Lantana fucata* foi agrupada tanto em 3, quanto em 4. Os dois maiores grupos, 5 e 6, reúnem em um deles *Lippia aff. microphylla*, *L. martiana*, *L. salviifolia* e *Aloysia virgata*; e no outro *Stachytarpheta gesnerioides*, *S. reticulata*, *Aegiphila lhotzkiana* e *A. sellowiana*, respectivamente. O grupo 7 compreende apenas *Verbena litoralis*, enquanto o último grupo, 8, é formado por *Bouchea fluminensis*, espécie com a maior quantidade de DNA identificada.

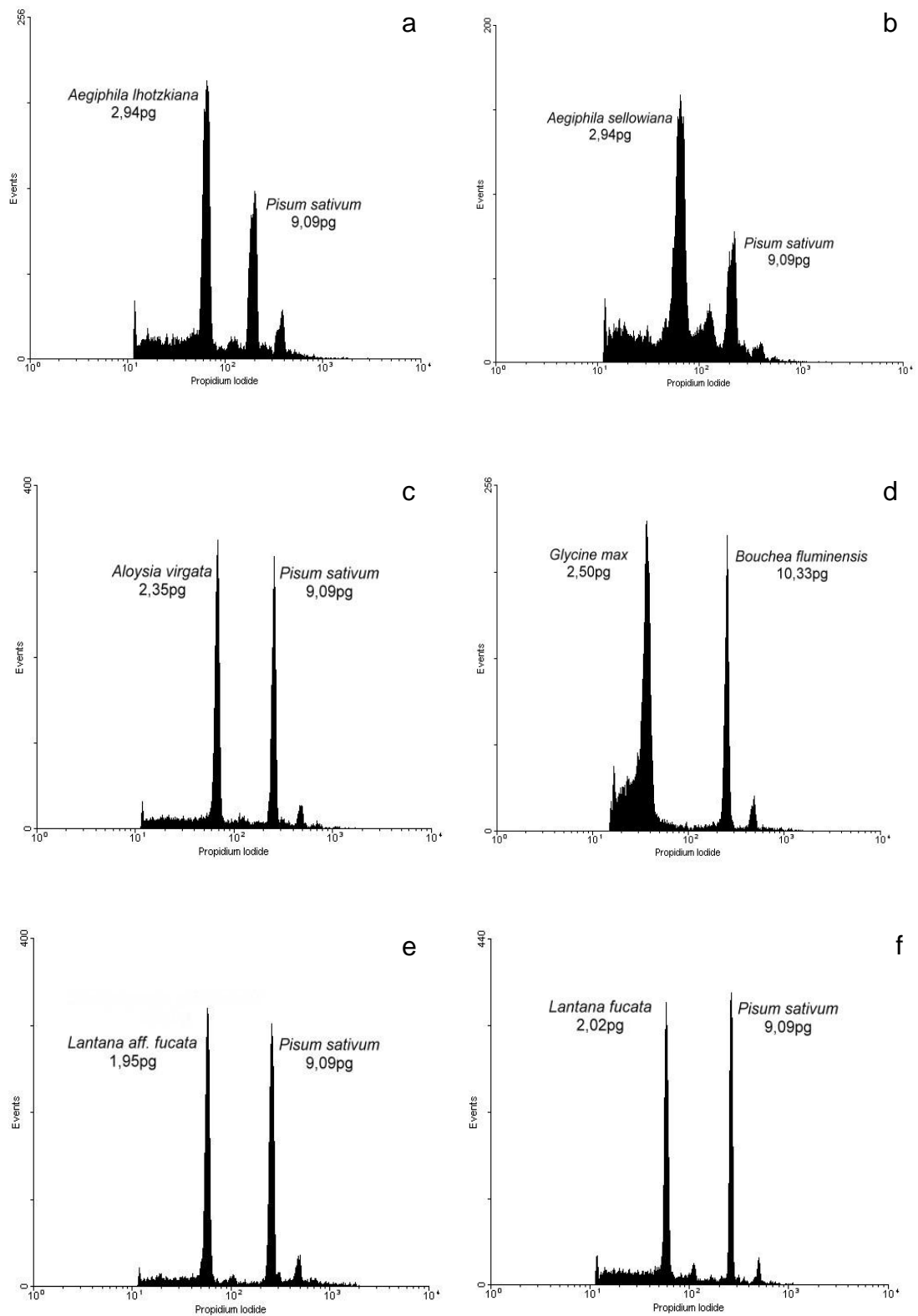


Figura 1.21 - Histogramas obtidos para estimativa do conteúdo de DNA nuclear de (a) *A. Ihotzkiana*; (b) *A. sellowiana*; (c) *A. virgata*; (d) *B. fluminensis*; (e) *L. aff fucata*); (f) *L. fucata*.

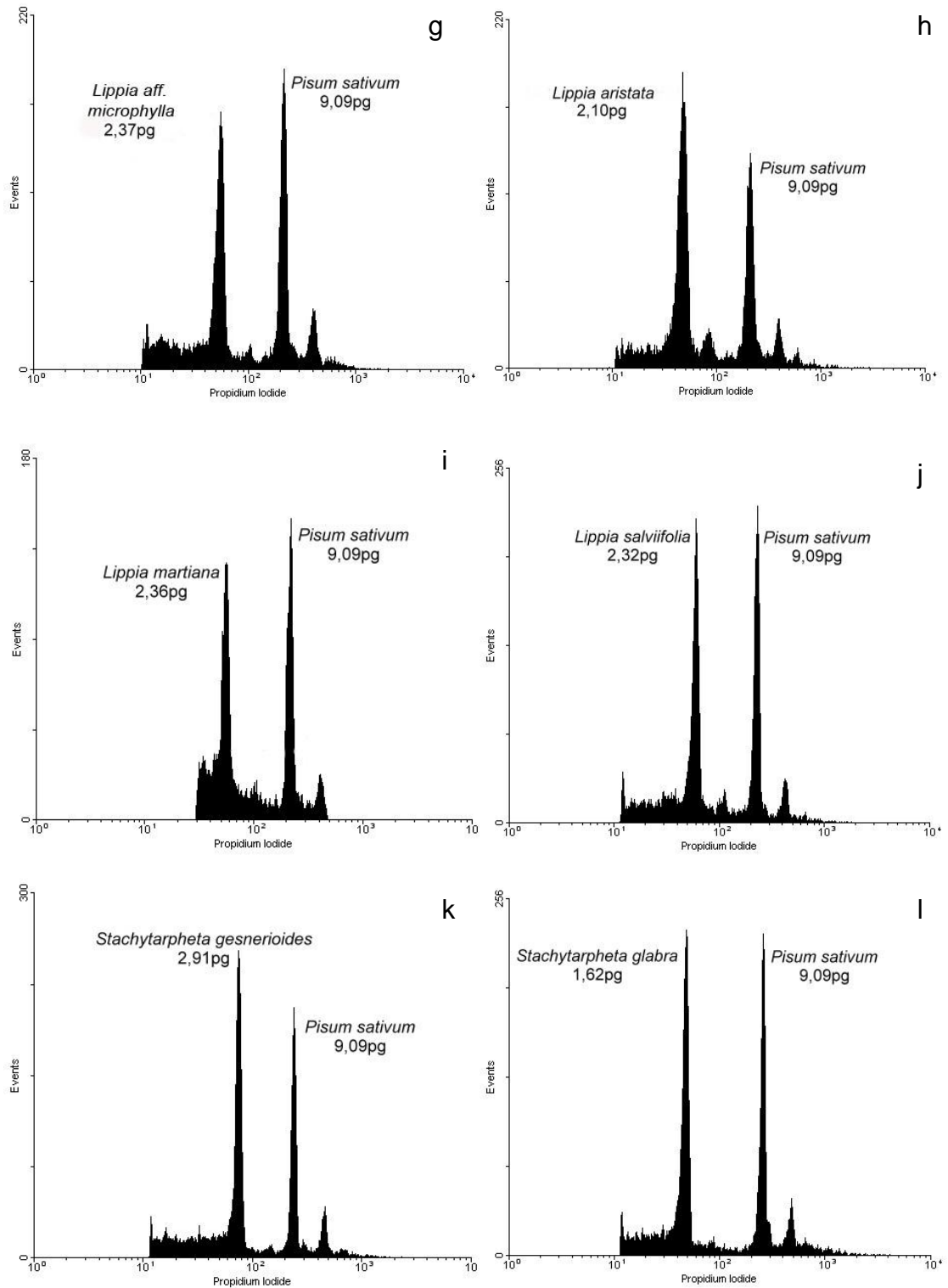


Figura 1.21 (cont...) - Histogramas obtidos para estimativa do conteúdo de DNA nuclear de (g) *L. aff. microphylla*; (h) *L. aristata*, (i) *L. martiana*; (j) *L. salviifolia*; (k) *S. gesnerioides*; (l) *S. glabra*.

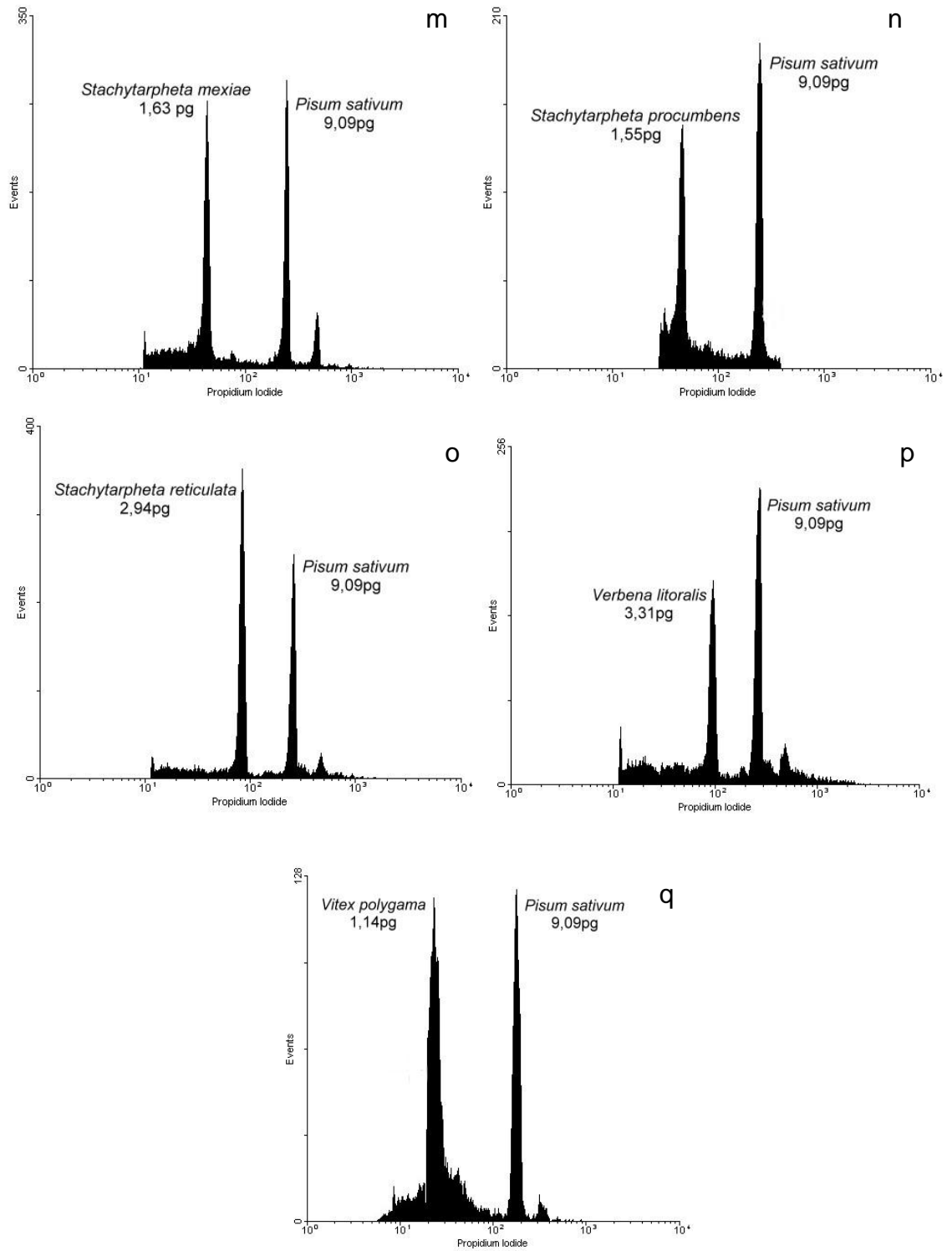


Figura 1.21 (cont...) - Histogramas obtidos para estimativa do conteúdo de DNA nuclear de (m) *S. mexiae*; (n) *S. procumbens*, (o) *S. reticulata*; (p) *V. litoralis* e (q) *V. polygama*.

Tabela 1.5 - Quantidade de DNA nuclear (2C) de espécies de Verbenaceae

	Conteúdo de DNA (pg)				
	Indivíduo 1	Indivíduo 2	Indivíduo 3	Média	
<i>V. polygama</i>	1,09 ± 0,041	1,21 ± 0,005	1,13 ± 0,071	1,14	a 1
<i>S. procumbens</i>	1,61 ± 0,080	1,49 ± 0,040	-	1,55	b
<i>S. glabra</i>	1,60 ± 0,032	1,61 ± 0,051	1,65 ± 0,149	1,62	b 2
<i>S. mexiae</i>	1,63 ± 0,130	1,62 ± 0,095	1,64 ± 0,036	1,63	b
<i>L. aff fucata</i>	1,92 ± 0,072	1,95 ± 0,049	1,99 ± 0,036	1,95	c 3
<i>L. fucata</i>	2,00 ± 0,030	2,08 ± 0,174	1,99 ± 0,165	2,02	c d 4
<i>L. aristata</i>	2,10 ± 0,094	2,06 ± 0,090	2,04 ± 0,049	2,07	d
<i>L. salviifolia</i>	2,33 ± 0,088	2,34 ± 0,077	2,28 ± 0,055	2,32	e
<i>A. virgata</i>	2,36 ± 0,030	2,27 ± 0,037	2,41 ± 0,050	2,35	e 5
<i>L. martiana</i>	2,26 ± 0,093	2,48 ± 0,1485	2,33 ± 0,128	2,36	e
<i>L. aff. microphylla</i>	2,41 ± 0,119	2,41 ± 0,124	2,28 ± 0,055	2,37	e
<i>S. gesnerioides</i>	2,86 ± 0,047	2,95 ± 0,065	2,90 ± 0,030	2,91	f
<i>S. reticulata</i>	2,97 ± 0,005	2,92 ± 0,065	2,93 ± 0,050	2,94	f 6
<i>A. sellowiana</i>	3,00 ± 0,108	2,94 ± 0,055	2,88 ± 0,205	2,94	f
<i>A. lhotzkiana</i>	2,95 ± 0,017	2,87 ± 0,056	2,99 ± 0,070	2,94	f
<i>V. litoralis</i>	3,32 ± 0,051	3,30 ± 0,045	3,29 ± 0,155	3,31	g 7
<i>B. fluminensis</i>	10,35 ± 0,150	10,28 ± 0,090	10,36 ± 0,120	10,35	h 8

Os resultados foram expressos em média + desvio padrão (n=3)

As médias seguidas por, no mínimo, uma letra igual não possuem diferença estatística (Tukey p<0,05)

4.3 Palinologia

As espécies da família Verbenaceae mostraram uma grande variação na morfologia dos grãos de pólen (Figura 1.22 - 1.29). Dentre as 17 espécies estudadas, *Lippia*, *Lantana*, *Aloysia*, *Verbena*, *Vitex* e *Aegiphila* exibiram pequenos grãos de pólen, enquanto os gêneros *Bouchea* e *Stachytarpheta* apresentaram grãos de maiores tamanhos. As medidas polínicas, bem como as classificações de cada espécie são mostradas na Tabela 1.6.

A forma dos grãos de pólen variou de oblato esferoidal em *Aloysia virgata* à prolato em *Bouchea fluminensis* e *Stachytarpheta glabra*.

O número de aberturas identificadas foi de três, no entanto, algumas espécies como *Lantana aff. fucata*, *Lippia martiana*, *Stachytarpheta procumbens* e *Stachytarpheta mexiae* apresentaram de três a quatro aberturas.

Para a maioria das espécies estudadas, pertencentes aos gêneros *Aloysia*, *Lippia*, *Lantana* e *Verbena* foram identificados pólenes tricolporados, e menos freqüentemente, tetracolporados. As espécies dos gêneros *Stachytarpheta*, *Vitex* e *Aegiphila* apresentaram grãos de pólen tricolpados, menos freqüentemente tetracolpados. O pólen da espécie *Bouchea fluminensis* foi classificado com tripororado.

Os menores tamanhos da exina foram identificados nas espécies pertencentes aos gêneros *Lippia* e *Lantana*, enquanto os maiores valores foram observados em *Bouchea fluminensis*. As espécies de *Aloysia*, *Lantana* e *Verbena* apresentaram grãos de pólen com exina psilada (Figura 1.23, 1.25 e 1.28), enquanto àquelas pertencentes ao gênero *Lippia* oscilaram entre psilada e escabrada (Figura 1.26) O pólen de *Stachytarpheta* apresentou-se com exina verrucada (Figura 1.27), que o distinguiu de todos os outros gêneros da família. Os grãos de pólen de *Aegiphila* apresentaram-se com exina equinada (Figura 1.22). Já em *Vitex* a estrutura da exina foi classificada como reticulada, contendo formas irregulares dos retículos, que diminuem de tamanho do equador para o

pólo do grão de pólen (Figura 1.29). Para *Bouchea fluminensis*, a MEV evidenciou a exina de rugulada a escabrada (Figura 1.24).

Tabela 1.6 – Medidas (em μm) e classificações polínicas de espécies de Verbenaceae

Espécie	Eixo polar (P)	Eixo equatorial (E)	Razão (P/E)	Ectoexina	Endoexina	Exina	Aberturas	Forma
<i>A. lhotzkiana</i>	33,97 (30,92-38,86)	32,45 (29,39-35,88)	1,05 (0,92-1,22)	1,16 (1,00-1,38)	0,88 (0,59-1,12)	2,04 (1,71-2,59)	Tricolpado	Prolato esferoidal
<i>A. sellowiana</i>	32,04 (26,76-34,31)	32,15 (28,83-34,23)	1,00 (0,89-1,14)	1,20 (0,90-1,48)	0,65 (0,53-0,82)	1,85 (1,44-2,19)	Tricolpado	Prolato esferoidal
<i>A. virgata</i>	20,59 (17,98-24,87)	21,68 (19,36-24,19)	0,95 (0,83-1,09)	1,03 (0,84-1,29)	0,59 (0,43-0,85)	1,62 (1,31-2,14)	Tricolporado	Oblato esferoidal
<i>B. fluminensis</i>	129,55 (115,40-144,35)	93,55 (83,75-106,74)	1,39 (1,29-1,58)	2,45 (1,74-3,74)	1,58 (1,14-1,97)	4,03 (3,02-4,91)	Tripoporado	Prolato
<i>L. aff. fucata</i>	31,00 (25,51-46,86)	28,33 (18,50-42,16)	1,09 (1,38-0,94)	1,01 (0,79-1,40)	0,85 (0,64-1,03)	1,87 (1,57-2,40)	Tricolporado e tetracolporado	Prolato esferoidal
<i>L. fucata</i>	22,99 (20,66-27,71)	22,83 (20,91-27,80)	1,01 (0,96-1,07)	0,85 (0,5-1,28)	0,65 (0,5-0,85)	1,50 (1,21-1,88)	Tricolporado	Prolato esferoidal
<i>L. aff. microphylla</i>	26,76 (23,60-30,36)	26,69 (23,23-31,38)	1,00 (0,91-1,17)	1,02 (0,89-1,09)	0,74 (0,59-0,94)	1,76 (1,48-2,04)	Tricolporado	Prolato esferoidal
<i>L. aristata</i>	26,49 (23,76-29,86)	26,41 (22,51-29,51)	1,00 (0,92-1,03)	1,07 (0,98-1,19)	0,68 (0,56-0,84)	1,75 (2,03-1,62)	Tricolporado	Esferoidal
<i>L. martiana</i>	23,87 (20,77-28,60)	24,93 (21,47-29,28)	0,96 (0,85-1,06)	0,92 (0,63-1,04)	0,79 (0,61-0,92)	1,72 (1,24-1,95)	Tricolporado e tetracolporado	Prolato esferoidal

Tabela 1.6 (cont...) – Medidas (em μm) e classificações polínicas de espécies de Verbenaceae

Espécie	Eixo polar (P)	Eixo equatorial (E)	Razão (P/E)	Ectoexina	Endoexina	Exina	Aberturas	Forma
<i>L. salviifolia</i>	27,31 (22,15-34,06)	27,42 (20,59-33,25)	1,00 (0,93-1,08)	0,81 (0,71-0,90)	0,68 (0,54-0,87)	1,49 (1,27-1,87)	Tricolporado e tetracolporado	Prolato esferoidal
<i>S. mexiae</i>	93,80 (77,54-106,69)	82,01 (63,82-99,54)	1,14 (1,04-1,38)	1,11 (0,88-1,43)	0,93 (0,72-1,24)	2,05 (1,76-2,56)	Tricolpado e tetracolpado	Subprolato
<i>S. gesneriodes</i>	111,96 (85,35-132,73)	84,13 (70,42-106,11)	1,33 (1,17-1,57)	1,14 (0,88-1,65)	0,98 (0,77-1,24)	2,13 (1,70-2,89)	Tricolpado	Subprolato
<i>S. glabra</i>	121,05 (139,80-110,68)	80,78 (54,29-98,35)	1,50 (1,18-2,45)	1,37 (1,09-1,92)	1,12 (0,75-1,55)	2,48 (1,96-3,47)	Tricolpado	Prolato
<i>S. procumbens</i>	97,55 (82,20-112,06)	76,69 (58,75-90,58)	1,27 (1,02-1,69)	1,16 (0,77-1,77)	1,13 (0,89-1,44)	2,29 (1,66-2,71)	Tricolpado	Subprolato
<i>S. reticulata</i>	133,55 (71,36-166,97)	108,12 (56,88-144,69)	1,24 (1,04-1,66)	1,49 (1,00-1,88)	1,18 (0,83-1,64)	2,66 (1,84-3,52)	Tricolpado	Subprolato
<i>V. litoralis</i>	32,38 (29,09-38,57)	29,14 (24,68-35,91)	1,11 (0,99-1,24)	1,20 (1,03-1,37)	0,92 (0,80-1,37)	2,12 (1,77-2,34)	Tricolporado	Prolato esferoidal
<i>V. polygama</i>	25,46 (22,06-29,95)	20,98 (18,21-23,27)	1,21 (1,09-1,39)	1,05 (0,84-1,21)	0,74 (0,60-0,94)	1,79 (1,50-2,00)	Tricolpado	Subprolato a prolato

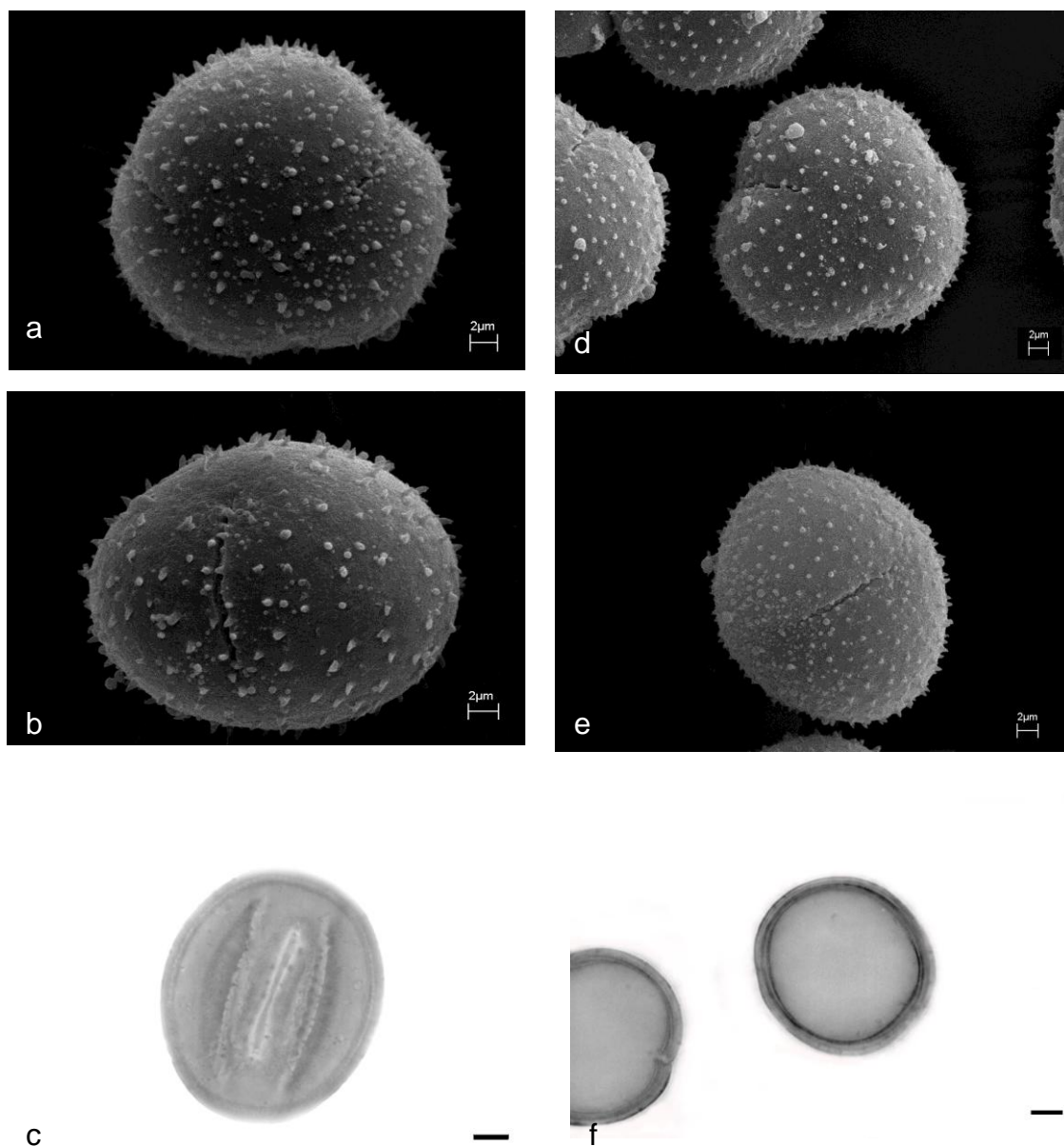


Figura 1.22 – Pólen de *Aegiphila lhotzkiana* (a-c) e *Aegiphila sellowiana* (d-f) (a,d) visão polar por MEV; (b,e) visão equatorial por MEV; (c) visão equatorial por ML, (f) visão polar por ML. Escala 5 μ m

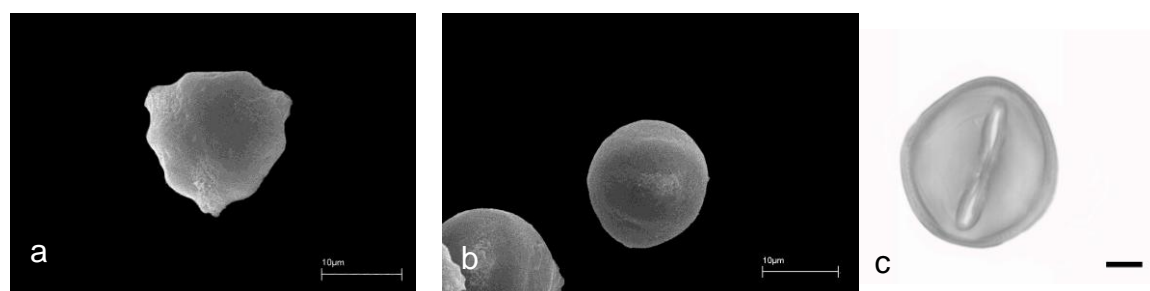


Figura 1.23 - Pólen de *Aloysia virgata* (a) visão polar por MEV, (b) visão equatorial por MEV e (c) visão equatorial por ML. Escala 5 μ m.

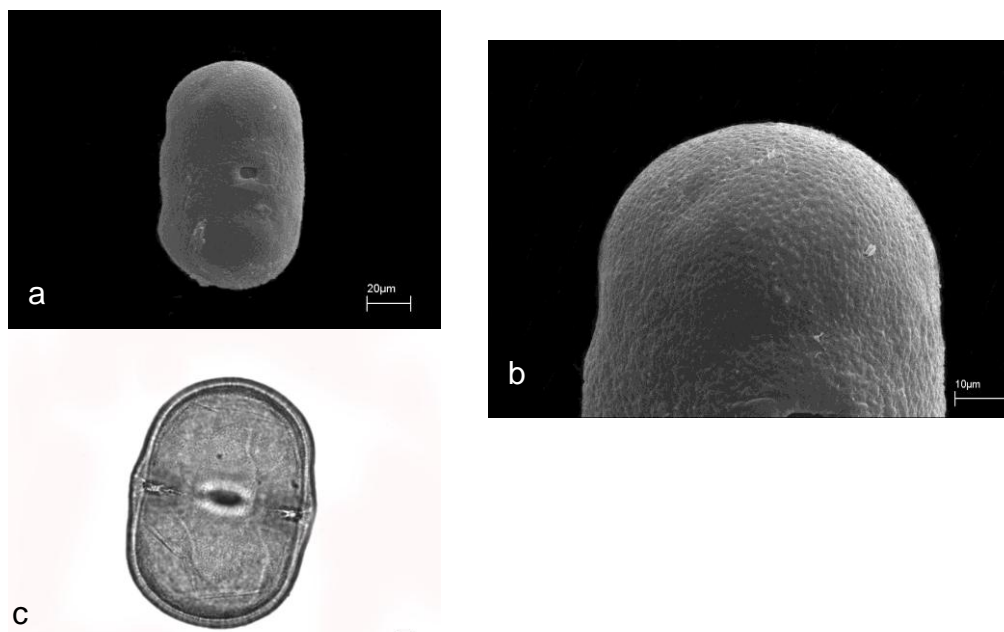


Figura 1.24 - Pólen de *Bouchea fluminensis* (a) visão equatorial por MEV, (b) ampliação da exina e (c) visão equatorial por ML. Escala 10 μm

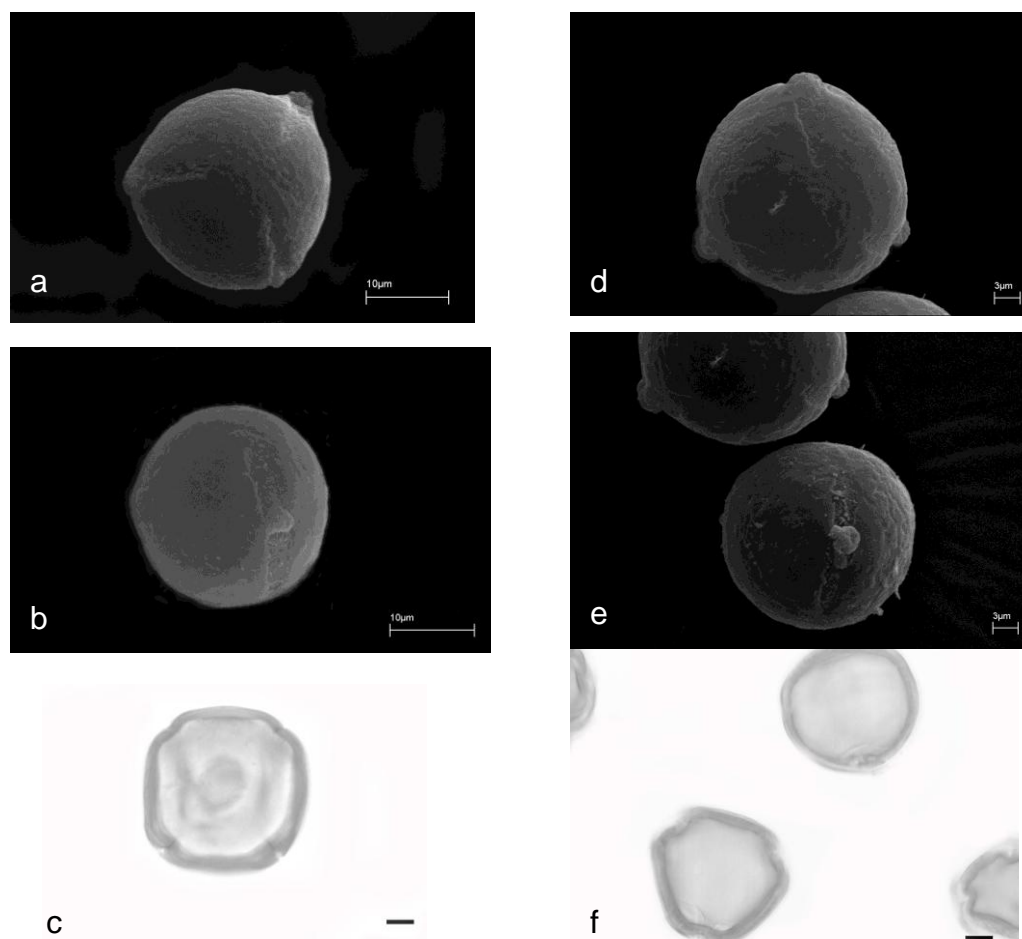


Figura 1.25 - Pólen de *Lantana aff. fucata* (a-c) e *Lantana fucata* (d-f) (a,d) visão polar por MEV; (b,e) visão equatorial por MEV; (c,f) visão polar por ML. Escala 5 μm .

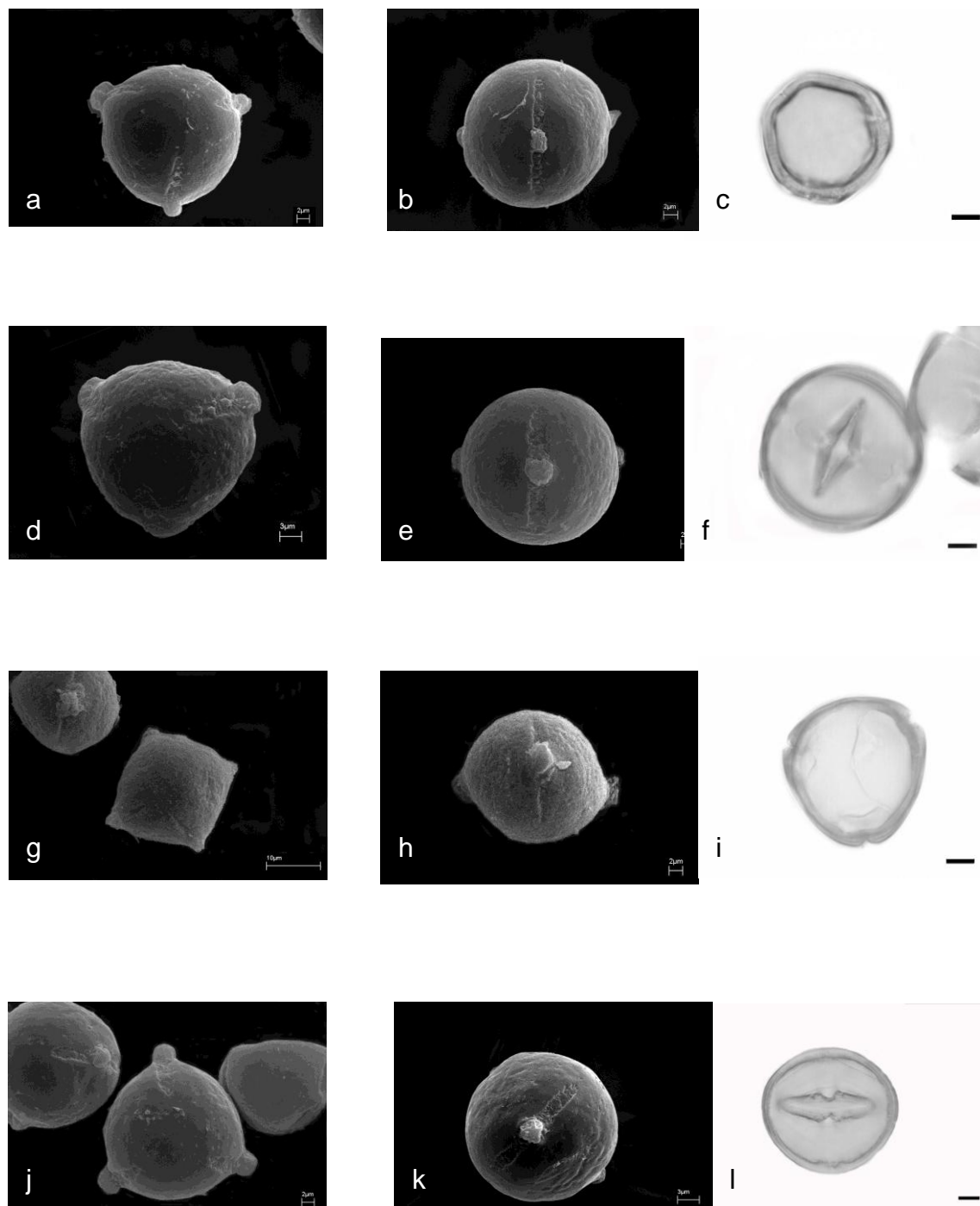


Figura 1.26 – Pólen de *Lippia* aff. *microphylla* (a-c), *L. aristata* (d-f), *L. martiana* (g-i) e *L. salviifolia* (j-l). (a,d,g,j)visão polar por MEV; (b,e,h,k) visão equatorial por MEV; (c,i) visão polar por ML, (f,l) visão equatorial por ML. Escala 5µm.

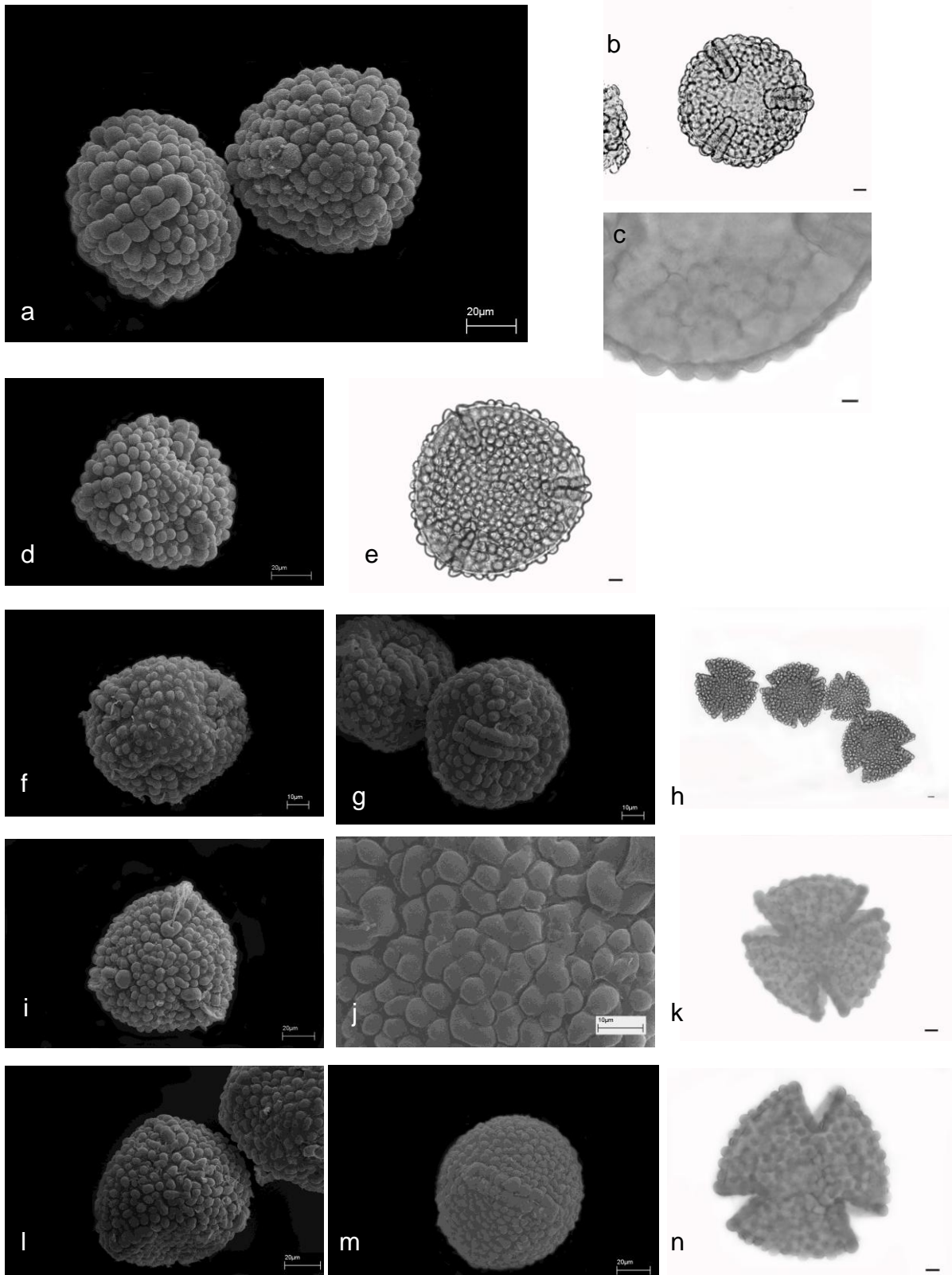


Figura 1.27 – Pólen de *S. gesnerioides* (a-c), *S. glabra* (d-e), *S. mexiae* (f-h); *S. procumbens* (i-k).e *S. reticulata* (l-n). (a) visão polar e equatorial por MEV; (d,f,i,l) visão polar por MEV; (g,m) visão equatorial por MEV; (c,j) ampliação da exina, (b,e,h,k,n) visão polar por ML. Escala 10µm.

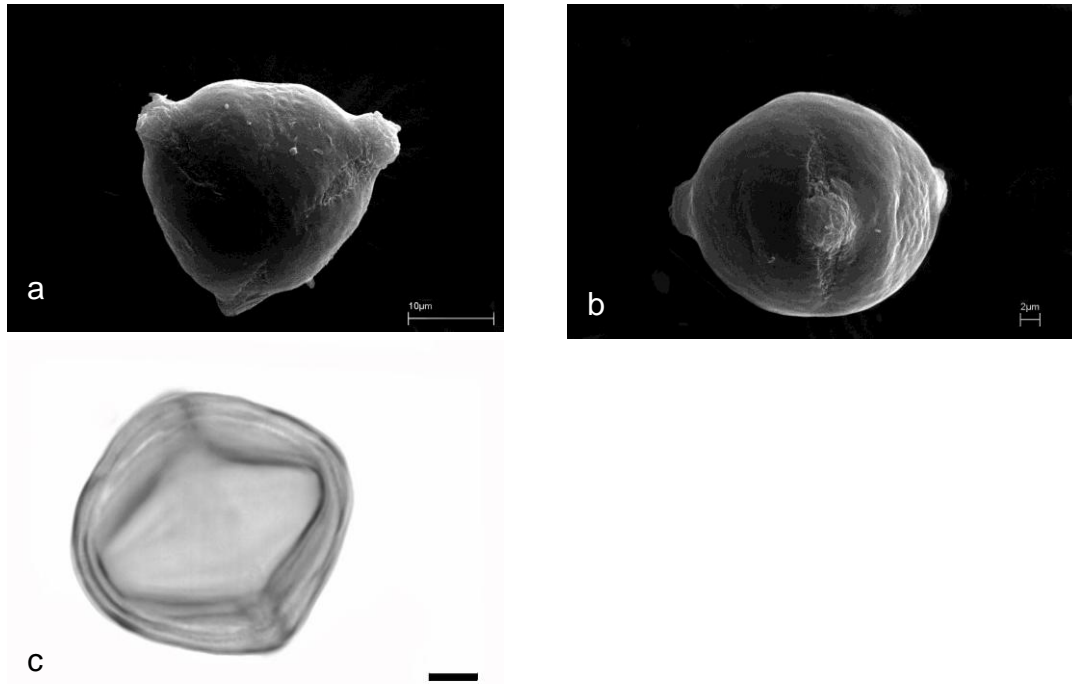


Figura 1.28 - Pólen de *Verbena litoralis* (a) visão polar por MEV, (b) visão equatorial por MEV e (c) visão equatorial por ML. Escala 5µm.

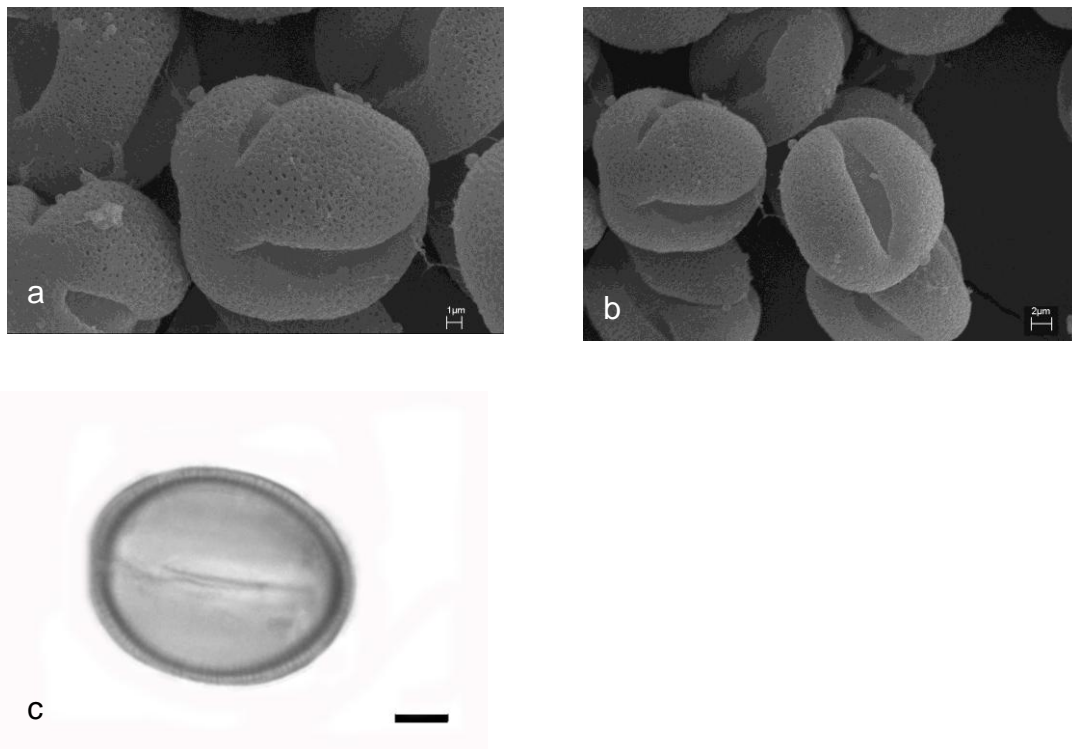


Figura 1.29 - Pólen de *Vitex polygama* (a) visão polar por MEV, (b) visão equatorial por MEV e (c) visão equatorial por ML. Escala 5µm.

5 DISCUSSÃO

A técnica citogenética empregada para preparação das suspensões celulares foi apropriada para análise das flores de tamanho reduzido nas espécies, permitindo a visualização de grande número de meiócitos. Para 15 espécies das 17 estudadas, este constitui o primeiro relato na literatura sobre sua caracterização cromossômica. Os números cromossômicos para as espécies *Lippia salviifolia* e *Aloysia virgata* haviam sido anteriormente descritos por Coleman (1982) e Brandão *et al.* (2006), respectivamente.

Adicionalmente, esse foi o primeiro relato da estimativa do conteúdo de DNA nuclear para as 17 espécies em estudo. Conforme demonstrado por Doležel *et al.* (1994), o uso de folhas jovens permitiu a obtenção de resultados confiáveis, com valores de CV inferiores a 3% e baixo *background*, em todas as amostras analisadas. Marie e Brown (1993) relataram a importância dos valores de coeficientes de variação para uma boa estimativa da quantidade de DNA. Segundo estes autores, este é um critério elementar para a aceitação dos resultados obtidos, e, coeficientes de variação entre 1-2% são apontados como resultados de alta qualidade e em torno de 3% como rotina. Diante desses critérios, os coeficientes de variação obtidos neste trabalho demonstram a qualidade dos resultados obtidos e confiabilidade nas estimativas de quantidade de DNA das espécies estudadas. O CV de 3% permite a detecção entre duas amostras com diferenças de até 6% no conteúdo de DNA (SUDA, 2004). Galbraith *et al.* (1983) definem um coeficiente de variação abaixo de 5% como um critério de aceitação para publicações internacionais, uma vez que para algumas espécies o alto valor do CV é resultado do pequeno genoma da planta ou da elevada quantidade de compostos citosólicos. O uso do tampão de isolamento de núcleos LBO1, contendo mercaptoetanol como agente redutor, foi importante para preservar a suspensão de núcleos da ação dos compostos fenólicos, componentes identificados nas espécies estudadas.

A quantidade de DNA foi uniforme dentro do mesmo indivíduo e dentre os indivíduos da mesma espécie, o que indica a estabilidade do genoma dessas espécies. A análise interespecífica revelou diferença significativa, levando à divisão das 17 espécies dentro de 8 grupos distintos. A quantidade de DNA entre as

espécies variou até 9 vezes, de 1,14 pg em *Vitex polygama* a 10,35 pg em *Bouchea fluminensis*.

As principais contribuições palinológicas na família Verbenaceae foram publicadas por Raj (1983), ao investigar as características do pólen de 226 espécies distribuídas em 68 gêneros, e em menor proporção por Erdtman (1952) e Melhem *et al.* (2003). As descrições polínicas foram também inéditas para 14 das 17 espécies analisadas. *Aloysia virgata*, *Bouchea fluminensis* e *Lantana fucata* haviam sido anteriormente descritas (RAJ,1983; MELHEM *et al.*, 2003). A família Verbenaceae mostrou uma grande variação na morfologia dos grãos de pólen. Os tamanhos variaram de P=20,59 µm/E=21,68 µm em *A. virgata* a P=129,55 µm/E=93,55 µm em *B. fluminensis*. A estrutura da exina variou entre os gêneros, passando por psilada, escabrada, verrucada, equinada, reticulada e rugulada.

A seguir, os dados citogenéticos, palinológicos e de quantidade de DNA serão discutidos dentro de cada um dos gêneros estudados.

5.1 Gênero *Aegiphila*

Os números cromossômicos encontrados para *Aegiphila lhotzkiana* ($2n=72$) e *A. sellowiana* ($2n=84$) sugerem a ocorrência de poliploidia para as espécies. Tal hipótese é reforçada pelo único trabalho envolvendo dados citogenéticos no gênero. Yuyama *et al.* (2006) observaram $2n=42$ cromossomos para cinco populações de *A. sellowiana* oriundas do sul do Brasil. A variação intraespecífica observada em relação à população estudada no presente trabalho indica que uma série poliplóide possa estar presente.

A presença de anormalidades observada nas células meióticas de *Aegiphila lhotzkiana* e *A. sellowiana*, provavelmente, é conseqüência da ocorrência de translocações. As diacineses da espécie demonstraram grande número de organizações cromossômicas em anel, contendo quatro cromossomos cada. Essas organizações sugerem a existência de translocações entre os cromossomos, as quais podem tanto configurar anomalias quanto representarem uma etapa normal do

processo de divisão celular. Um número limitado de espécies de plantas de diferentes famílias possui translocações recíprocas como uma característica de seu sistema genético. Como consequência desse processo, os cromossomos translocados são herdados juntos, comportando-se como um grupo. Entretanto, se ocorrer segregação alternada, gametas balanceados serão produzidos e diferentes complexos gênicos transportados por cromossomos translocados e não translocados segregarão como unidades separadas (GRANT, 1999; AINSWORTH, 2000). Em algumas plantas dióicas, este é o mecanismo responsável pela produção de heterozigose, no mínimo em machos, através da associação das translocações com o sistema de determinação do sexo, sendo uma translocação multivalente uma característica do sexo heterozigoto (BARLOW, 1981). Cerca de 6% das espécies de angiospermas são dióicas (RENNER e RICKLEFS, 1995), e esse processo pode resultar de mutações que afetam diferentes sistemas hormonais ligados ao desenvolvimento da flor (BARLOW, 1981).

Apesar de apresentarem números cromossômicos diferentes, as espécies aqui estudadas demonstraram a mesma quantidade de DNA (2,94 pg), o que sugere igual nível de ploidia. As espécies podem ter surgido a partir de poliploidização seguida de rearranjos estruturais.

Os grãos de pólen das duas espécies são tricolpados, apresentam mesma forma (prolato esferoidal) e pequena variação de tamanho, $P = 33,97 \mu\text{m}$ e $E = 32,45 \mu\text{m}$ para *Aegiphila lhotzkiana* e $P = 32,04 \mu\text{m}$ e $E = 32,15 \mu\text{m}$ para *A. sellowiana*, o que pode ser em parte explicado, por apresentarem mesmo nível de ploidia e, conseqüentemente, mesma quantidade de DNA. As demais espécies estudadas dentro do gênero por Raj (1983), exibem valores do $P = 33-42 \mu\text{m}$ e $E = 36-42 \mu\text{m}$, superiores aos encontrados para as outras duas. Provavelmente, as quatro espécies descritas por Raj contêm quantidade de DNA maior que *A. lhotzkiana* e *A. sellowiana*. Relações positivas entre o conteúdo de DNA e o tamanho do pólen foram mostradas em *Ranunculus*, *Vicia* (BENNETT, 1973) e *Petunia* (WHITE e REES, 1987).

Com relação à exina, a mesma apresenta-se equinada, assim como as demais espécies do gênero.

5.2 Gênero *Aloysia*

No gênero *Aloysia*, somente *A. virgata* é citada como ocorrente na Serra do Cipó, sendo observados $2n=36$ cromossomos. Considerando os números cromossômicos já descritos para as demais espécies do gênero $2n=54$ e 72 (CORAZZA-NUNES *et al.*, 1995; ANDRADA, PASTORIZA e MARTÍNEZ-PULIDO, 1998), a caracterização da espécie suporta a idéia de um número básico $x=9$ para o gênero. Assim, provavelmente, *A. virgata* é uma espécie tetraplóide com $2n=4x=36$.

Como o conteúdo de DNA nuclear foi descrito pela primeira vez para o gênero, não foi possível estabelecer comparação com as demais características analisadas. Quanto ao pólen, as medidas foram $P = 20,59 \mu\text{m}$ e $E = 21,58 \mu\text{m}$, valores bastante próximos aos encontrados por Raj (1983) ao analisar a mesma espécie coletada no Peru. As medidas da espécie estão dentro do intervalo $P = 17-27 \mu\text{m}$ e $E = 18-30 \mu\text{m}$ descritos para as outras cinco espécies do gênero analisadas. Os grãos de pólen são tricolporados e apresentam exina psilada.

5.3 Gênero *Bouchea*

Em *Bouchea fluminensis* a contagem aproximada de $2n=78$ cromossomos foi a primeira para a espécie. Até o momento, havia relato apenas de $2n=40$ para o gênero, com hipótese de $x=5$ (SANDERS, 2001). Embora apresente uma meiose normal esses números sustentam também a hipótese de poliploidia. A origem da espécie pode ter se dado por eventos de poliploidização, seguido de dispoloidia (aneuploidia).

A quantidade $2C$ de DNA nuclear de $10,35 \text{ pg}$ em *Bouchea fluminensis* foi a maior descrição já obtida dentre as espécies da família Verbenaceae, reforçando a hipótese de poliploidia. Igualmente, as dimensões dos grãos de pólen são uma das maiores encontradas, $P = 129,55 \mu\text{m}$ e $E = 93,55 \mu\text{m}$, valores muito próximos aos

descritos por Raj (1983) para *B. fluminensis* coletada em Minas Gerais. Os estudos palinológicos envolvendo outras espécies do gênero, demonstraram variação interespecífica no tamanho dos grãos de pólen, $P = 40-156 \mu\text{m}$ e $E = 65-100 \mu\text{m}$ (ERDTMAN, 1952; RAJ, 1983) e na forma, variando de subprolato a prolato.

O pólen de *Bouchea fluminensis* é tripolorado, com exina de rugulada a escabrada, que o distingue de todos os outros gêneros da família.

A forma da abertura do poro de *Bouchea fluminensis* é retangular, evidenciado por ML e MEV. No entanto, o acesso da espécie descrito por Raj (1983) demonstrou abertura circular. Tais diferenças podem ser devidas a variações intraespecíficas.

5.4 Gênero *Lantana*

Foram identificadas duas espécies do gênero *Lantana*: *L. fucata* e *L. aff. fucata*. Esta não se enquadra nos caracteres morfológicos do tipo conhecido para *L. fucata* e encontra-se em análise (SALIMENA, com. pes.). Os diferentes números cromossômicos encontrados para *L. fucata* e *L. aff. fucata*, $2n=24$ e $2n=38$, respectivamente, reforçam a possibilidade de não serem a mesma espécie. Stebbins (1971) cita que alguns taxonomistas defendem que diferenças cromossômicas representam uma outra característica a ser avaliada, devendo ser tratada como as várias características morfológicas externas utilizadas para taxonomia. Diferenças cromossômicas refletem diferenças na origem da variação genética, enquanto diferenças morfológicas, fisiológicas e químicas refletem diferenças nos produtos da ação gênica, modificados por influências do ambiente.

O número cromossômico encontrado para *Lantana fucata* corrobora a hipótese de um número cromossômico básico para o gênero de $x=12$, enquanto o número cromossômico de *L. aff. fucata* ($2n=38$) não condiz com tal hipótese e pode representar um caso de poliploidia seguido de disploidia. No entanto, o fato de ambas espécies apresentarem mesma quantidade 2C de DNA nuclear, 1,95 pg para *L. aff. fucata* e 2,02 pg para *L. fucata*, pode sugerir o aparecimento de *L. aff. fucata* a

partir de um evento de poliploidização seguido de fissão, uma vez que o número cromossômico foi aumentado, sem alteração significativa na quantidade de DNA.

Paralelamente, para ambas as espécies observou-se formação de bivalentes e ausência de anormalidades na meiose, o que reforça um comportamento diplóide.

As quantidades de DNA estimadas para as espécies do gênero são inferiores àquela descrita para *Lantana camara* (valor-C=2,75pg) (BENNET e LEITCH, 2005). Considerando a grande variação intraespecífica em *L. camara*, $2n=22, 33, 44$ e 55 (SEN e SAHNI, 1955; SINGH, 1951; TANDON e CHANDI, 1955), e o número básico igual a 11 ou 12, provavelmente *L. camara* apresenta maior ploidia que as outras duas analisadas.

Os grãos de pólen das espécies possuem exina psilada e forma prolato esferoidal ($P = 31,00 \mu\text{m}$ e $E = 28,33 \mu\text{m}$ em *Lantana aff. fucata* e $P = 22,99 \mu\text{m}$ e $E = 22,83 \mu\text{m}$ em *L. fucata*). As medidas dentro do gênero variam de $P = 23-43 \mu\text{m}$ e $E = 26-40 \mu\text{m}$ (RAJ, 1983; MELHEM *et al.*, 2003). Os menores valores de medida foram encontrados para o gênero em *L. fucata*. Melhem *et al.* (2003) classificaram o pólen da mesma espécie coletada em Campos do Jordão, São Paulo, como pequeno a médio com $P = 23 \mu\text{m}$ e $E = 26 \mu\text{m}$.

Em *Lantana aff. fucata* foram observados pólenes tricolporados e, menos freqüentemente, tetracolporados. Em *L. camara* também foram identificados pólenes tri e tetracolporados (MELHEM *et al.*, 2003).

5.5 Gênero *Lippia*

Conforme descrito por Viccini *et al.* (2006), as espécies de *Lippia* apresentam características biológicas similares que dificultam muito o estudo mitótico dos cromossomos. Tais características são a baixa taxa de germinação e a dificuldade de enraizamento em sistema de hidroponia. Essas são, basicamente, as duas maneiras mais usuais para a obtenção de meristemas radiculares, principal tecido utilizado no estudo dos cromossomos mitóticos em plantas. Assim, estudamos o número cromossômico baseando no estudo dos cromossomos meióticos. Em todas

as espécies estudadas observamos comportamento meiótico normal, com pareamento dos bivalentes, o que sugere que as plantas são estáveis em seu processo meiótico.

O número cromossômico descrito para *Lippia aristata* corrobora a complexidade na Seção *Zapania*, com grande variação no número cromossômico ($n=10$ a $n=28$), conforme pode ser visto na Tabela 1.7. Por outro lado, *L. aff. microphylla*, *L. martiana* e *L. salviifolia*, pertencentes à Seção *Goniostachyum*, possuem o mesmo número cromossômico que as demais espécies descritas para a mesma seção ($n=12$). Aparentemente, a seção *Goniostachyum* é mais uniforme que *Zapania*, tornando-se importante a revisão desta última seção, como sugerido por Viccini *et al.* (2006). Apesar de até o momento não terem sido identificadas espécies com número haplóide menor que 10 para o gênero *Lippia*, Sanders (2001) propõe a hipótese de $x=5$.

Tabela 1.7 – Números cromossômicos das espécies de *Lippia* de acordo com cada Seção

Espécies	Seção	Número cromossômico (n)	Referência
<i>L. alba</i>	<i>Zapania</i>	15	Bose e Choudhury, 1960
<i>L. aristata</i>		12	-
<i>L. corymbosa</i>		14	Viccini <i>et al.</i> , 2006
<i>L. diamantinensis</i>		26	Viccini <i>et al.</i> , 2006
<i>L. geminata</i>		16	Kumar e Dutt, 1989
<i>L. hermannioides</i>		13	Viccini <i>et al.</i> , 2006
<i>L. lacunosa</i>		28	Viccini <i>et al.</i> , 2006
<i>L. rotundifolia</i>		28	Viccini <i>et al.</i> , 2006
<i>L. rubella</i>		10	Viccini <i>et al.</i> , 2006
<i>L. turbinata</i>		15	Filippa, 1984
<i>L. glandulosa</i>	<i>Goniosthachyum</i>	12	Viccini <i>et al.</i> , 2006
<i>L. martiana</i>		12	-
<i>L. microphylla</i>		12	-
<i>L. pohlyana</i>		12	Viccini <i>et al.</i> , 2006
<i>L. salviifolia</i>		12	Coleman, 1982
<i>L. sidoides</i>		12	Viccini <i>et al.</i> , 2006
<i>L. filifolia</i>		12	Viccini <i>et al.</i> , 2006

Particularmente no caso de *Lippia salviifolia*, os taxonomistas consideram uma possível sinonímia com *L. sidoides*. Como o número cromossômico é o mesmo para ambas espécies, o caráter exclusivamente numérico não contribui para a separação das espécies. No entanto, estudos adicionais com outras técnicas estão em andamento e poderão evidenciar diferenças que pelas técnicas utilizadas até o momento não puderam ser identificadas.

Somado ao fato de possuírem o mesmo número cromossômico, as quatro espécies de *Lippia* analisadas apresentaram pequena variação na quantidade de DNA, o que indica igual nível de ploidia.

Os grãos de pólen das espécies são psilados e tricolporados, ocasionalmente tetracolporados em *Lippia martiana* e *L. salviifolia*. As medidas realizadas para as

quatro espécies dos eixos variam entre $P = 23,87-27,31 \mu\text{m}$ e $E = 24,93-27,42 \mu\text{m}$. Outras quatro espécies do gênero foram analisadas por Raj (1983) apresentando amplitude de valores de medidas contendo àquelas anteriormente citadas: $P = 20-35 \mu\text{m}$ e $E = 18-32 \mu\text{m}$.

5.6 Gênero *Stachytarpheta*

O gênero *Stachytarpheta* foi aquele em que maior número de espécies puderam ser encontradas na Serra do Cipó. Todas as espécies do gênero foram pela primeira vez caracterizadas citogeneticamente, demonstrando comportamento meiótico normal. *S. gesnerioides*, foi relatada pela primeira vez para essa região. A espécie, um subarbusto que pode chegar a 2 m de altura (ATKINS, 2005), apresenta tricomas glandulares, uma característica que não está presente em nenhuma das três variedades descritas para a espécie podendo, por isso, tratar-se de uma nova variedade. Duas das espécies apresentaram populações muito reduzidas e ocorrência muito restrita: *S. mexiae* e *S. procumbens*. Esta última foi localizada apenas em uma área, ao lado da estrada, aumentando o risco de que a população seja comprometida. O porte pequeno, o hábito rasteiro, a existência de uma única população e o pequeno número de indivíduos dificultaram a obtenção de material biológico para análise de *S. procumbens*. Para a espécie *S. reticulata*, foram encontrados maior número de indivíduos na região, enquanto *S. glabra* apresentou distribuição mais ampla dentre todas as espécies do gênero analisadas.

Uma particularidade deste gênero é o pequeno número de células obtidas nas preparações citogenéticas, o que ocasionou a abertura de um número de flores muito superior à realizada para os outros gêneros (Tabela 1.2). As espécies de *Stachytarpheta* apresentam apenas duas anteras funcionais, sendo as outras duas estaminódios atrativos aos polinizadores (ATKINS, 2005).

A estimativa da quantidade 2C de DNA dividiu as espécies de *Stachytarpheta* em dois diferentes grupos: Grupo 2 (*S. mexiae*, *S. glabra* e *S. procumbens*) e Grupo 6 (*S. gesnerioides* e *S. reticulata*), conforme visto na Tabela 1.5. Esses dados

corroboram o agrupamento gerado a partir da análise morfológica das espécies que ocorrem no Brasil realizado por Atkins (2005), demonstrado na Figura 1.30.

O elevado grau de endemismo observado para as espécies do gênero encontradas na Serra do Cipó pode sugerir o parentesco entre elas, levando à elaboração de algumas hipóteses evolutivas.

Conforme evidenciado anteriormente, as espécies *Stachytarpheta glabra*, *S. mexiae* e *S. procumbens* não apresentaram diferenças interespecíficas na estimativa da quantidade 2C de DNA (Grupo 2), variando de 1,55 a 1,63 pg. No entanto, os números cromossômicos encontrados foram diferentes, sendo $2n=56$ para *S. mexiae*, $2n=58$ para *S. procumbens* e $2n=62$ para *S. glabra*. O fato de não existir variação interespecífica reduz a possibilidade de que alguma das espécies tenha surgido através de eventos de hibridação seguido de poliploidização das outras duas. Entretanto, os números cromossômicos 56, 58 e 62 permitem supor a ocorrência de fissões/fusões centroméricas de cromossomos, rearranjos estruturais que modificam o número cromossômico, mas não interferem na quantidade de DNA (SHAN, YAN e PLUMMER, 2003).

Stachytarpheta reticulata e *S. gesnerioides* foram agrupadas juntas por apresentarem quantidades de DNA quase duas vezes superior àquelas do Grupo 2. Para a espécie *S. reticulata*, o valor 2C encontrado foi de 2,94 pg, que somado ao número cromossômico $2n=82$, sugere que esta espécie apresenta ploidia diferente daquelas do Grupo 2. *S. gesnerioides* apresenta número cromossômico de $2n=54$, o que indica nível de ploidia próximo ao das espécies *S. mexiae*, *S. procumbens* e *S. glabra*.

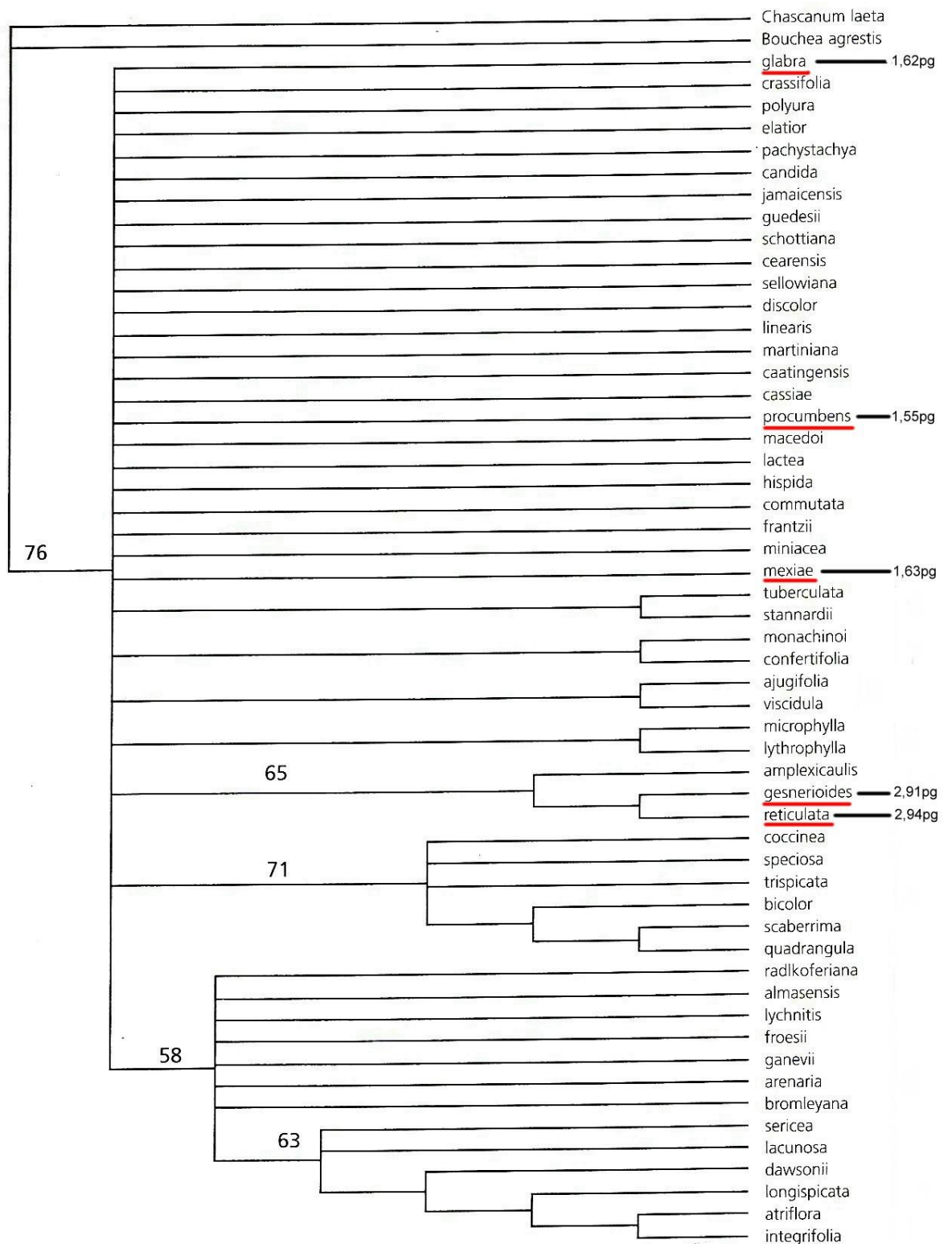


Figura 1.30 – Cladograma obtido a partir da análise morfológica de 56 taxa de *Stachytarpheta*. Os números indicam a quantidade de DNA 2C estimada para cada uma das 5 espécies estudadas. Fonte: adaptado de Atkins 2005.

No entanto, *Stachytarpheta gesnerioides* possui 2,91 pg de DNA. Provavelmente, os cromossomos da espécie são maiores que aqueles observados nas outras três, o que implica no maior tamanho do genoma. Pesquisas nesse sentido já estão em andamento.

Apesar de a Cadeia do Espinhaço ser o centro de diversidade do gênero, abrigando mais da metade das espécies, a revisão do gênero descreveu 79 espécies, concentradas, principalmente, nos estados de Goiás, Minas Gerais e Bahia (ATKINS, 2005). Assim, para a elaboração de hipóteses evolutivas mais consistentes, faz-se necessário o estudo abrangendo maior número de espécies.

O pólen de *Stachytarpheta* é tricolpado, menos freqüentemente tetracolpado, com exina verrucada, que o distingue de todos os outros gêneros da família. Apesar de Raj (1983) ter descrito a morfologia polínica do gênero, a técnica utilizada não permitiu a medida do eixo polar. O diâmetro equatorial descrito foi de 96 -115 μm . Atkins (1991) encontrou grãos de pólen de *S. sericea* com diâmetro equatorial superior a 175 μm .

Dentre as espécies estudadas, a forma dos grãos variaram de subprolato a prolato, com $P= 93,8 - 133,55 \mu\text{m}$ e $E = 76,69 - 108,12 \mu\text{m}$.

5.7 Gênero *Verbena*

No gênero *Verbena*, a contagem foi de $2n=56$ cromossomos para *V. litoralis*, com comportamento meiótico normal e diplóide. O número cromossômico é compatível com o número básico proposto para o gênero de $x=7$ cromossomos, o que sugere a possibilidade da ocorrência de poliploidia para a espécie, uma vez que outras espécies do gênero com $2n=14$ cromossomos foram anteriormente relatadas (SANDERS, 2001).

A quantidade $2C$ de DNA nuclear foi a primeira para o gênero, com 3,31pg.

A análise polínica evidenciou grãos de pólen tricolporados, com $P=32,38 \mu\text{m}$ e $E = 29,14 \mu\text{m}$. Os valores encontrados estão no intervalo daqueles descritos para as espécies estudadas por Erdtman (1952), Raj (1983) e Melhem *et al.* (2003), entre $P=24-44 \mu\text{m}$ e $E = 27-52 \mu\text{m}$.

5.8 Gênero *Vitex*

Para a espécie *Vitex polygama*, não foram encontradas inflorescências com desenvolvimento adequado para a análise meiótica. No entanto, foi possível observar os cromossomos da espécie a partir da análise mitótica. O tratamento dos meristemas apical e lateral e lateral com 8 HQ por 6 horas permitiu a obtenção de cromossomos com excelente condensação e a determinação de $2n=34$ cromossomos. De acordo com o número básico de $x=8$ proposto para o gênero por Diikgraaf, Lewis e Mitchell (1995), *V. polygama* pode ter surgido a partir de um evento de poliploidização (levando a $2n=32$), seguido por disploidia ($2n=34$).

A estimativa da quantidade $2C$ de DNA foi de 1,14 pg para *Vitex polygama*. Para duas outras espécies do gênero haviam relatos na literatura: *Vitex neguno* ($2C=3,24$ pg) e *Vitex pinnata* ($2C=2,88$ pg) (BENNET e SMITH, 1995; 2005). Tais valores sugerem ploidias diferentes entre *V. polygama* e as espécies anteriormente descritas.

Os grãos de pólen da espécie são reticulados, tricolpados e pequenos: $P=25,46 \mu\text{m}$ e $E = 20,98 \mu\text{m}$, com a forma variando de subprolato a prolato.

5.9 Número cromossômico, tamanho do genoma e características polínicas em um contexto filogenético

O processo citogenético mais difundido e característico que afeta a evolução das plantas superiores é a poliploidia, a multiplicação do complemento cromossômico inteiro. Stebbins (1971) estimou que 30 a 35% das angiospermas são poliplóides, enquanto Grant (1963) e Masterson (1994) propõem de 47 e 70%, respectivamente. Na família Verbenaceae, o número básico foi sugerido para grande número de gêneros como $x=8$ ou 9 para *Aloysia* (CORAZZA-NUNES *et al.* 1995, SANDERS 2001), $x=5$ para *Bouchea* (SANDERS 2001), $x=11$ ou 12 para *Lantana* (SANDERS 1987, OJHA e DAYAL 1993, SINHA, SINHA e SHARMA, 1995), $x=5$ para *Lippia* (SANDERS 2001), $x=9$ para *Stachytarpheta* (SANDERS 2001), $x=7$ para *Verbena* (SCHNACK 1964, SANDERS 2001) e $x=8$ para *Vitex* (DIIKGRAAF, LEWIS e MITCHELL, 1995). Assim, a análise cromossômica das 17 espécies de Verbenaceae da Serra do Cipó (Tabela 1.3) sugere que as espécies são poliplóides.

Diante da grande variação do conteúdo de DNA encontrado em plantas (Tabela 1.1), as tentativas para investigar o direcionamento da evolução do tamanho do genoma requerem que os dados sejam vistos dentro de rigorosos padrões filogenéticos. Em angiospermas, os principais estudos foram conduzidos por Leitch, Chase e Bennett. (1998) e Soltis *et al.* (2003), que propuseram categorias distintas de acordo com o tamanho do genoma: “muito pequeno” (Valor C \leq 1,4 pg), “pequeno” (1,4 a 3,5 pg), “intermediário” (3,5 a 14,0 pg), “grande” (14,0 a 35,0 pg) e “muito grande” (\geq 35 pg). Diferentes grupos de plantas são caracterizados por diferentes tamanhos de genoma ancestral. O genoma “muito pequeno” parece ser o ancestral em angiospermas (LEITCH, CHASE e BENNETT, 1998). Grif (2000) mostrou que a ocorrência de poliploidia dentro das famílias depende do tamanho médio do genoma. Segundo o mesmo autor, as famílias com pequeno genoma apresentam alta porcentagem de espécies poliplóides (cerca de 80%), o que

corroborar a hipótese de as espécies estudadas neste trabalho serem poliplóides.

Considerando o aumento do tamanho do genoma como um caráter derivado, dentre os gêneros estudados em Verbenaceae, *Bouchea* parece ser o mais derivado. No gênero *Stachytarpheta*, as espécies *S. gesnerioides* e *S. reticulata* são mais derivadas que *S. mexiae*, *S. glabra* e *S. procumbens*.

Ao estudar 226 espécies da família Verbenaceae, Raj (1983) discute a relação filogenética entre os gêneros, baseando-se no conceito de que a forma de abertura tricolpada é mais primitiva, passando a tricolporada, tripororada e triporada. Similarmente, a linha evolutiva da estrutura da parede polínica e escultura parecem oferecer potencial origem de informações filogenéticas de grande importância. A presença de ornamentações, como verruga, espinho e espículas são consideradas caracteres primitivos (WALKER e DOYLE, 1975).

Considerando a abertura tricolpada um caráter primitivo, os gêneros *Stachytarpheta*, *Vitex* e *Aegiphila* são menos derivados. Dentro da subfamília Verbenoideae, o gênero *Stachytarpheta* emerge como o menos derivado, pois, além da abertura tricolpada, apresenta ornamentações (verrugas) na parede polínica. Os gêneros que apresentam grãos de pólen tricolporados (*Aloysia*, *Lippia*, *Lantana* e *Verbena*) são menos primitivos, no entanto, dentre dos gêneros estudados, *Bouchea* seria o mais derivado por apresentar pólen tripororado.

6 CONCLUSÃO

Para 15 espécies das 17 estudadas, este constitui o primeiro relato na literatura sobre sua caracterização cromossômica. Os números variaram de $2n=24$ em *Lantana fucata*, *Lippia aristata*, *Lippia aff. microphylla* e *Lippia salviifolia* a $2n=84$ em *Aegiphila sellowiana*. Como o número básico sugerido para os gêneros estudados é baixo, assim como pode ser observado para a maioria das plantas, provavelmente as espécies estudadas são poliplóides.

Adicionalmente, esse foi o primeiro relato da estimativa do conteúdo de DNA nuclear para as 17 espécies em estudo. A citometria de fluxo foi eficiente para estimar a quantidade de DNA das espécies de Verbenaceae, com a obtenção de resultados confiáveis (CV abaixo de 3%). A análise interespecífica revelou diferença significativa, levando à divisão das 17 espécies dentro de 8 grupos distintos. O fato de as espécies possuírem tamanho do genoma “muito pequeno”, uma vez que a quantidade $2C$ de DNA variou de 1,14 pg em *Vitex polygama* a 10,35 pg em *Bouchea fluminensis*, corrobora a hipótese de as espécies estudadas neste trabalho serem poliplóides. Considerando o aumento do tamanho do genoma como um caráter derivado, dentre os gêneros estudados em Verbenaceae, *Bouchea* parece ser o mais derivado. No gênero *Stachytarpheta*, as espécies *S. gesnerioides* e *S. reticulata* provavelmente são mais derivadas que *S. mexiae*, *S. glabra* e *S. procumbens*.

As descrições polínicas foram inéditas para 14 das 17 espécies analisadas. A família Verbenaceae mostrou uma grande variação na morfologia dos grãos de pólen. Os tamanhos variaram de $P=20,59 \mu\text{m}$ / $E=21,68 \mu\text{m}$ em *Aloysia virgata* a $P=129,55 \mu\text{m}$ / $E=93,55 \mu\text{m}$ em *Bouchea fluminensis*. A estrutura da exina variou entre os gêneros, passando por psilada, escabrada, verrucada, equinada, reticulada e rugulada. De acordo com as características polínicas, os gêneros *Stachytarpheta*, *Vitex* e *Aegiphila* parecem ser menos derivados que *Aloysia*, *Bouchea*, *Lantana*, *Lippia* e *Verbena*. Dentro da subfamília Verbenoideae, o gênero

Stachytarpheta possivelmente emerge como o menos derivado, pois, além da abertura tricolpada, apresenta ornamentações (verrugas) na parede polínica. Os gêneros que apresentam grãos de pólen tricolporados (*Aloysia*, *Lippia*, *Lantana* e *Verbena*) provavelmente são menos primitivos, no entanto, dentre dos gêneros estudados, *Bouchea* seria o mais derivado por apresentar pólen tripolorado.

O elevado número cromossômico, a quantidade de DNA superior às demais espécies estudadas e o pólen tripolorado e psilado sugerem fortemente que *Bouchea* seja o gênero mais derivado dentre os sete gêneros estudados. No entanto, estudos posteriores envolvendo maior número de representantes por gênero deverão ser realizados a fim de suportar tal hipótese.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO QUÍMICA E FARMACOLÓGICA DE ESPÉCIES DE VERBENACEAE DA SERRA DO CIPÓ

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Biodiversidade Brasileira

O Brasil é o país com maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas (ELISABETSKY e COSTA-CAMPOS, 1996) de um total estimado entre 350.000 e 550.000. Além do uso como substrato para a fabricação de medicamentos, as plantas são também utilizadas em práticas populares e tradicionais como remédios caseiros e comunitários, processo conhecido como medicina tradicional. Até a primeira metade do século XX, o Brasil era essencialmente rural e usava amplamente a flora medicinal, tanto nativa quanto introduzida. Hoje, a medicina popular do país é reflexo das uniões étnicas entre os diferentes imigrantes e os inúmeros povos autóctones que difundiram o conhecimento de ervas locais e de seus usos, transmitidos de geração em geração (LORENZI e MATOS, 2002).

É reconhecida a importância dos produtos naturais, incluindo aqueles derivados de plantas, no desenvolvimento de modernas drogas terapêuticas (CALIXTO, 2000). As plantas medicinais são importantes para a pesquisa farmacológica e o desenvolvimento de drogas, não somente quando seus constituintes são usados diretamente como agentes terapêuticos, mas também como matérias-primas para a síntese, ou modelos para compostos farmacologicamente ativos (WHO, 1998). Estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos atualmente disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, assim subdivididos: 25% de plantas, 12% de microrganismos e 3% de animais (CALIXTO, 2001). Das 252 drogas consideradas básicas e essenciais pela Organização Mundial de Saúde (OMS), 11% são originárias de plantas e um número significativo são drogas sintéticas obtidas de precursores naturais (RATES, 2001). Além disso, nas últimas décadas, o interesse pelas terapias naturais tem aumentado significativamente nos países industrializados e acha-se em expansão o uso de plantas medicinais e fitoterápicos (WHO, 2001).

Apesar de as informações existentes sobre a magnitude do mercado de compostos de origem vegetal serem pouco precisas, estima-se que o mercado mundial de fitoterápicos movimentava cifras de 22 bilhões de dólares anuais (YUNES, 2001). Este quadro tem sido denominado “a revolução dos medicamentos fitoterápicos” (RATES, 2001). Estima-se que 25% dos US\$ 8 bilhões de faturamento da indústria farmacêutica brasileira, registrado em 1996, advêm de medicamentos derivados de plantas (GUERRA e NODARI, 2003). Considera-se que as vendas nesse setor crescem 10% ao ano, com estimativa de ter alcançado a cifra de US\$ 550 milhões no ano de 2001 (KNAPP, 2001). Estados Unidos e Alemanha estão entre os maiores consumidores dos produtos naturais brasileiros. Entre 1994 e 1998, importaram, respectivamente, 1.521 e 1.466 toneladas de plantas que seguem para esses países sob o rótulo genérico de “material vegetal do Brasil”, de acordo com o Ibama (REUTERS, 2002). Neste quadro confronta-se um hemisfério rico em tecnologia mas pobre em recursos genéticos e um hemisfério sul pobre em tecnologia, mas riquíssimo em diversidade biológica. Estima-se que um gene potencialmente útil originado na biodiversidade do hemisfério sul pode representar negócios de US\$ 1 bilhão por ano no norte e que o germoplasma vegetal do sul

contribua com valores estimados em US\$ 66 bilhões por ano somente na economia dos Estados Unidos (MACHADO, 1996).

Para Ferreira (1998), apesar da riqueza da flora brasileira e da ampla utilização de plantas medicinais pela população, existe o consenso da insuficiência de estudos científicos acerca do assunto. Apenas 8% das espécies catalogadas foram estudadas para pesquisas de compostos bioativos e 1.100 espécies foram avaliadas em suas propriedades medicinais (GUERRA e NODARI, 2003).

1.2 Fitoquímica de espécies de Verbenaceae

Diversos gêneros da família Verbenaceae têm sido citados em função, principalmente, de suas propriedades medicinais comprovadas cientificamente. Dentre eles, *Aegiphila*, *Aloysia*, *Bouchea*, *Lantana*, *Lippia*, *Verbena*, *Stachytarpheta* e *Vitex* ocorrem na Serra do Cipó.

Aegiphila é um dos gêneros menos estudados com poucos relatos sobre o isolamento de compostos. O ácido rosmarínico e propanóides foram isolados, respectivamente, de *A. mollis* e *A. obducta* (LEITÃO *et al.*, 1995; PEDERSEN, 2000), enquanto os compostos verbascosídeo e isoverbascosídeo foram identificados em *A. obducta* e *A. Ihotzkiana*. Cinco diterpenos isolados do extrato hexânico de raízes de *A. Ihotzkiana* apresentaram efeito antiproliferativo em linhagens de células tumorais, não sendo identificada citotoxicidade em dois modelos propostos (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2004). Investigações preliminares dos extratos clorofórmicos das cascas de *A. obducta* e *A. Ihotzkiana* culminaram com o isolamento de lupeol, além de grandes quantidades dos ácidos betulônico, betulínico e ursólico, típicos da família Verbenaceae (LEITÃO, KAPLAN e MONACHE, 1992). Das folhas da espécie *A. hirsuta* foram isolados lupeol, lupenona, glutinol e 22-dehidroclerosterol (LEITÃO *et al.*, 1996).

No gênero *Aloysia*, embora existam vários relatos sobre sua utilização medicinal, praticamente não há estudos sobre seus constituintes químicos. A fitoquímica no gênero inclui iridóides glicosídicos e compostos fenólicos como verbascosídio e luteolina 7-glicosídeo (OLIVEIRA *et al.*, 2005). Apesar de o gênero reunir cerca de 120 espécies, poucas espécies apresentam caracterização dos constituintes dos óleos essenciais, como *A. gratissima*, *A. triphylla*, *A. polystachya* e *A. sellowii* (MALIZIA *et al.*, 1999; LORENZI e MATOS, 2002; SIMIONATTO *et al.*, 2005; ROSSATO *et al.*, 2006, DA SILVA *et al.*, 2006). A análise química revelou a presença predominante de citral, além de limoneno, citroneol, geraniol, α e β -pireno, cineol, etil-eugenol e linalol (LORENZI e MATOS, 2002). Mais recentemente, Gil *et al.* (2007) descreveram o geraniol e neral como componentes majoritários do óleo essencial de *A. citriodora*.

Plantas do gênero *Bouchea*, juntamente com espécies do gênero *Stachytarpheta*, são popularmente conhecidas como “gervão” e usadas na medicina popular. Foram identificados iridóides glicosídicos em folhas de *B. fluminensis* (SCHUQUEL *et al.*, 1998; COUBE *et al.*, 2002), além de uma mistura dos ácidos ursólico, oleanólico e micromérico, provavelmente responsáveis pelas atividades antiinflamatória, antioxidante e analgésica atribuídas à espécie (DELAPORTE, 2002; COSTA *et al.*, 2003).

No gênero *Lantana*, a principal espécie investigada é *L. camara*. Os principais componentes químicos conhecidos para a espécie são sabineno, β -cariofileno, cineol, biciclogermacreno, α -humuleno e α -copaeno (FATEMEH, 2002; KHAN *et al.*, 2002), além de terem sido identificados taninos, mucilagens e alcalóides (LORENZI e MATOS, 2002). O ácido camárico, isolado das folhas da espécie, apresentou significativa atividade antiinflamatória (AHMAD *et al.*, 2004). Outras espécies investigadas foram *L. xenica* e *L. montevidensis*, das quais foram isolados, principalmente, cariofileno e flavonóides (JULIANI *et al.*, 2002a; TSUNEATSU *et al.*, 2002). Já os extratos de *L. trifolia*, apresentaram atividade antiinflamatória, antinociceptiva (SILVA *et al.*, 2005) e antimicobacteriana (LEITÃO *et al.*, 2006), no entanto, a composição química de tais extratos não foi analisada.

A maioria das espécies de *Lippia* são aromáticas e, por esta razão, os estudos químicos do gênero são mais relacionados com os componentes do óleo

essencial, existindo poucos estudos para identificação dos componentes não-voláteis (CATALAN e LAMPASONA, 2002). Com base nesses dados, os componentes encontrados com maior frequência no gênero são: limoneno, β -cariofileno, *p*-cimeno, cânfora, linalol, β -pineno e timol (PASCUAL *et al.*, 2001; CATALAN e LAMPASONA, 2002). Para a espécie *L. javanica*, a análise do óleo essencial revelou quimiotipos ricos em mirceno, carvona, piperitenona, linalol e ipsenona, apresentando atividade antimicrobiana de acordo com a composição de cada óleo. *Klebsiella pneumoniae*, *Cryptococcus neoformans* e *Bacillus cereus* tiveram suas populações reduzidas quando submetidas aos óleos essenciais de *L. javanica*, sendo o efeito bacteriostático mais significativo para colônias de *K. pneumoniae* (VILJOEN, 2005). O óleo essencial extraído de folhas e flores de *L. chevalieri*, abundante em sesquiterpenos como β -carifileno, elemol e óxido de cariofileno, apresentou atividade antibacteriana e antifúngica contra seis microrganismos testados (MEVY *et al.*, 2007). Similarmente, o óleo essencial extraído a partir das folhas de *L. origanoides* demonstrou ação antibacteriana, atribuída principalmente ao carvacrol e timol, componentes majoritários do óleo (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Dentro do gênero, *L. alba* é uma das mais bem estudadas, o que pode ser justificado pelo seu difundido uso na medicina popular brasileira. Esta espécie é caracterizada por grande variabilidade morfológica e de composição química do óleo essencial (STASHENKO, JARAMILLO e MARTÍNEZ, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2006b). Até o momento, 12 quimiotipos foram descritos: citral (MATOS *et al.*, 1996), linalol (FRIGHETTO *et al.*, 1998), carvona (MATOS *et al.*, 1996), limoneno (PINO *et al.*, 1997), γ -terpineno (GOMES *et al.*, 1993), citral-mirceno (MATOS, 1996), citral-limoneno (MATOS, 1996), citral- β -cariofileno (CRAVEIRO *et al.*, 1981), citral-germacreno D (ZOGHBI *et al.*, 1998), carvona-limoneno (MATOS, 1996), 1,8-cineol-cânfor (DELLACASSA *et al.*, 1990), 1,8-cineol-limoneno (ZOGHBI *et al.*, 1998), limoneno-piperitona (SENATORE e RIGANO, 2001). No entanto, poucos estudos envolvem os componentes não voláteis da espécie. Isonuomiosídeo, decafeoilverbascosídeo e um iridóide glicosídico (tipo lamiida) foram isolados e identificados nas folhas do quimiotipo mirceno-citral (BARBOSA *et al.*, 2006). Zétola *et al.* (2002) demonstraram o efeito sedativo e miorelaxante do extrato etanólico de *L. alba*, embora não tenha sido identificado

componentes voláteis. Provavelmente, os componentes não voláteis foram responsáveis por tais atividades, uma vez que foi observada a correlação entre o total de flavonóides e os efeitos biológicos avaliados.

Investigações prévias com espécies do gênero *Stachytarpheta* revelaram a ocorrência de iridóides glicosídicos, esteróides, flavonóides, feniletanóides e fenilpropanóides glicosídicos, além de alguns outros compostos fenólicos (CHOWDHURY *et al.*, 2003). Os iridóides glicosídicos são encontrados em grande número de espécies, de diferentes famílias. Várias atividades biológicas têm sido atribuídas à presença de tais componentes, como atividade antimicrobiana, antitumoral, hemodinâmica, colerética, hepatoprotetora e antiinflamatória (ROENGSUMRAN *et al.*, 2002). O composto ipolamiida, um tipo de iridóide glicosídico, foi destruído para grande número de espécies do gênero *Stachytarpheta*, incluindo *S. jamaicensis*, *S. cayennensis*, *S. indica*, *S. australis*, *S. guyanensis* e *S. mutabilis* (CHOWDHURY *et al.*, 2003).

Estudos prévios com espécies de *Verbena* têm evidenciado a presença de flavonóides, como luteolina, quercetina e apigenina (KAWASHTY e EL-GARF, 2000; CHEN *et al.*, 2006). Os iridóides glicosídicos são importantes constituintes encontrados no gênero. O composto verbenobraside A, isolado das folhas de *V. brasiliensis*, demonstrou elevada atividade antioxidante (ONO *et al.*, 2006). Castro-Gamboa e Castro (2004) isolaram das partes aéreas de *Verbena litoralis* dois iridóides que demonstraram moderada atividade *in vitro* contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, bem como conduziram à alteração da atividade intestinal *in vivo* em camundongos.

As espécies do gênero *Vitex*, conhecidas como tarumã, são amplamente usadas na medicina popular. O chá preparado a partir das folhas de *V. polygama* é usado para tratamento de doenças renais. Gallo *et al.* (2008) isolaram das folhas da espécie flavonas com potente ação antiinflamatória, antinociceptiva e antioxidante, justificando o uso na medicina popular para o combate e a prevenção de cálculos renais. O óleo de *V. negundo* tem sido usado para tratamento de bronquite crônica, sendo o β -cariofileno o principal constituinte, seguido pelo β -metilionono e β -farneseno (TAVARES *et al.*, 1999; XIE *et al.*, 2005). Ensaio preliminares indicaram

a marcada presença de sesquiterpenos no óleo essencial de *V. polygama* e *V. cymosa*, dentre eles, fitol e isofitol (LEITÃO, FONSECA e DOS SANTOS, 1999).

1.3 Plantas e Antioxidantes

A oxidação é um processo metabólico que leva à produção de energia necessária para as atividades essenciais das células. Entretanto, o metabolismo do oxigênio nas células vivas também leva à produção de radicais livres (ADEGOKE *et al.*, 1998). Seu excesso, no entanto, apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação de lipídeos de membrana, agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e ao DNA (HUSAIN, CILLARD e CILLARD, 1987). Dessa forma, encontram-se relacionados com várias patologias, tais como artrite, choque hemorrágico, doenças do coração, catarata e disfunções cognitivas (DEAN *et al.*, 1997; CHRISTEN, 2000; HAMILTON *et al.*, 2001). O *stress* oxidativo parece também exercer um papel importante na carcinogênese (WETTASINGHE *et al.*, 2002).

Estudos clínicos e epidemiológicos têm mostrado evidências de que antioxidantes fenólicos são os principais fatores que contribuem para a significativa redução da incidência de doenças crônicas e degenerativas encontradas em populações cujas dietas são ricas na ingestão desses componentes. Dessa forma, a importância da pesquisa por antioxidantes naturais tem aumentado muito nos últimos anos (JAYAPRAKASHA e JAGANMOHAN, 2000)

Para proteger as células dos danos oxidativos, produzidos durante o metabolismo do oxigênio, um sistema antioxidante é usado por organismos aeróbicos. Os principais antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione, ácido ascórbico e tocoferol são importantes para a proteção celular, devido a sua habilidade em eliminar radicais livres, como as espécies reativas de oxigênio (ERO ou ROS – *Reactive Oxygen*

Species) (YOUNG e WOODSIDE, 2001). Existe um interesse crescente nas funções bioquímicas de antioxidantes naturais contidos em vegetais, frutas e plantas medicinais, que podem ser candidatos à prevenção do dano oxidativo, promovendo a saúde (YEN *et al.*, 2001).

Devido ao potencial carcinogênico de antioxidantes sintéticos, os antioxidantes naturais são alvos alternativos para minimizar ou retardar os processos de deterioração oxidativa em alimentos e para o desenvolvimento de alimentos funcionais. Diferentes compostos antioxidantes presentes na dieta desempenham importantes funções em retardar o desenvolvimento de doenças crônicas tais como doenças cardiovasculares, câncer, reações inflamatórias e Mal de Alzheimer. A atividade antioxidante de compostos fenólicos de plantas provavelmente deve-se às suas propriedades redox e estruturas químicas, que possibilitam a estes compostos exercerem a função de neutralizar radicais livres, quelar metais reativos e agirem como captadores de oxigênio no estado singlete e triplete (CHUN *et al.*, 2005).

Compostos fenólicos oriundos do metabolismo secundário das plantas são bons agentes antioxidantes naturais (ATOUI *et al.*, 2005). Os antioxidantes presentes em extratos de plantas vêm atraindo cada vez mais a atenção dos pesquisadores. Extratos de frutas, cereais, e de diferentes vegetais, e seus produtos derivados, têm mostrado atividades antioxidantes efetivas em diferentes sistemas modelos (SUN e HO, 2005).

A atividade antioxidante de compostos orgânicos é dependente de algumas características estruturais, que incluem, na maioria dos casos, a presença de grupamentos fenólicos. Desta forma, flavonóides, fenilpropanóides e outros compostos aromáticos são os principais alvos da busca por antioxidantes.

O uso de extratos de vegetais no tratamento de patologias é um hábito difundido no Brasil, o que pode ser explicado, ao menos em parte, pelo baixo custo e pela crença de que tais produtos não promovem efeitos tóxicos.

Dentro da família Verbenaceae, os gêneros *Lippia* e *Lantana* destacam-se por apresentarem espécies com propriedade antioxidante comprovadas cientificamente. Trabalhos anteriores relataram o efeito antioxidante *in vitro* do óleo essencial de *L. alba* similar às substâncias de referência vitamina E e BHA (terc-butil-4-hidroxianisol) (Stashenko *et al.*, 2004). Monteiro *et al.* (2007) demonstraram a atividade

antioxidante do óleo essencial de *Lippia sidoides*, comparável aos antioxidantes comerciais BHT (butil-hidróxi-tolueno) e vitamina E. A atividade antioxidante de *Lippia graveolens* foi demonstrada por Martinez-Rocha *et al.* (2008). O extrato da espécie mostrou variada constituição de compostos fenólicos e flavonóides, com concentração significativa de ácido rosmarínico. *Lippia berlandieri* também demonstrou grande conteúdo de compostos fenólicos, provavelmente responsáveis pela atividade antioxidante dos extratos preparados a partir das folhas da espécie (ROCHA-GUZMÁN *et al.*, 2006). Os flavonóides mais comuns descritos para as espécies do gênero incluem salvigenina, cupatorina, cupafolina, lutcolina, hispidulina, diosmetina, cismaritina, cirsiolol, pectolina, arigenina, 6-hidroxiuteolina, jaceosidina, nepetina, hispidulina, hidroxiuteolina e nodifloretina (PASCUAL *et al.*, 2001). No gênero *Lantana*, apesar de vários flavonóides terem sido identificados, existem poucos trabalhos na literatura demonstrando sua atividade antioxidante (NAGAO *et al.*, 2002).

A busca por opções terapêuticas para diferentes patologias faz da pesquisa de produtos naturais um campo fértil em opções de moléculas com diferentes atividades biológicas. As plantas apresentam em seus metabólitos secundários uma grande fonte de possíveis fármacos devido à diversidade de moléculas com as mais variadas estruturas e propriedades químicas. A relevância da pesquisa de produtos naturais proporciona a descoberta de novos fármacos e o estudo de plantas que apresentem substâncias que possam agir sobre as diferentes espécies oxidantes geradas em nosso organismo torna-se de grande importância.

2 OBJETIVOS

Identificar os principais constituintes e avaliar o potencial antioxidante das folhas de espécies de Verbenaceae da Serra do Cipó.

2.1 Objetivos específicos

- Determinar por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) o perfil cromatográfico do óleo essencial e fração hexânica das espécies, durante as estações seca e chuvosa;
- Isolar e identificar os constituintes majoritários presentes nas folhas de *Stachytarpheta glabra*;
- Avaliar qualitativamente as classes de contituintes das folhas de espécies do gênero *Lippia* e *Lantana* através das reações de grupos funcionais.
- Avaliar o potencial antioxidante dos extratos de espécies do gênero *Lippia* e *Lantana*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A Tabela 2.1 resume os experimentos realizados com cada uma das espécies, de acordo com os resultados preliminares e com a disponibilidade de material vegetal, a fim de identificar os constituintes majoritários e avaliar o potencial antioxidante das folhas de Verbenaceae da Serra do Cipó.

Tabela 2.1 – Resumo dos experimentos realizados e as espécies de Verbenaceae da Serra do Cipó ensaiadas para cada um deles

Gênero	Espécie	Caracterização química			Avaliação da atividade antioxidante
		(CG/EM)	RMN	Triagem fitoquímica	
<i>Aegiphila</i>	<i>A. lhotzkiana</i>	X	-	-	-
	<i>A. sellowiana</i>	X	-	-	-
<i>Aloysia</i>	<i>A. virgata</i>	X	-	-	-
<i>Bouchea</i>	<i>B. fluminensis</i>	X	-	-	-
<i>Lantana</i>	<i>L. aff. fucata</i>	X	-	X	X
	<i>L. fucata</i>	X	-	-	-
<i>Lippia</i>	<i>L. aff. microphylla</i>	X	-	X	X
	<i>L. aristata</i>	X	-	X	X
	<i>L. martiana</i>	X	-	X	X
	<i>L. salviifolia</i>	X	-	X	X
<i>Stachytarpheta</i>	<i>S. gesnerioides</i>	X	-	-	-
	<i>S. glabra</i>	-	X	-	-
	<i>S. mexiae</i>	X	-	-	-
	<i>S. procumbens</i>	X	-	-	-
	<i>S. reticulata</i>	X	-	-	-
<i>Verbena</i>	<i>V. litoralis</i>	X	-	-	-
<i>Vitex</i>	<i>V. polygama</i>	X	-	-	-

O traço (-) corresponde às análises não realizadas.

3.1 Caracterização química

3.1.1 Caracterização dos constituintes voláteis por CG/EM

3.1.1.1 Coleta do material vegetal

Foram realizadas duas coletas de material vegetal na Serra do Cipó, mais especificamente na APA do Parque Nacional da Serra do Cipó, que ocorreram nos meses de setembro de 2005 e fevereiro de 2006 (período seco e período de águas, respectivamente). Os pontos de coleta basearam-se no levantamento florístico de Verbenaceae da Serra do Cipó realizado por Salimena-Pires e Giuliatti (1998). Os exemplares “Voucher” de cada coleta foram incorporados ao Herbário CESJ (ICB/UFJF) conforme as técnicas usuais. Dependendo do número de indivíduos encontrados em cada população, foram coletadas plantas adultas (contendo parte aérea e subterrânea) que foram transplantadas para a Estação Experimental de Plantas (EEP) da UFJF

Neste trabalho foram estudadas as espécies *Aeghipila lhotzkiana* Cham., *Aeghipila sellowiana* Cham., *Aloysia virgata* (Ruiz e Pav) Juss., *Bouchea fluminensis* (Vell) Moldenke, *Lantana aff. fucata* Lindl., *Lantana fucata* Lindl., *Lippia aristata* Schauer, *Lippia aff. microphylla* Cham., *Lippia martiana* Schau., *Lippia salviifolia* Cham., *Stachytarpheta gesnerioides* Cham., *Stachytarpheta mexiae* Moldenke, *Stachytarpheta procumbens* Moldenke, *Stachytarpheta reticulata* Mart. ex. Schauer, *Verbena litoralis* Kunth. e *Vitex polygama* Cham.

Para duas das espécies em estudo, *Lippia aff. microphylla* e *Lippia martiana*, foram identificadas duas populações durante a coleta que foram mantidas separadas para análise química.

3.1.1.2 Análise do óleo essencial e fração hexânica

A extração do óleo essencial foi conduzida no Laboratório de Farmacognosia na UFJF. As análises cromatográficas do óleo essencial e fração hexânica foram realizadas no Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN), no Instituto Renné Rachou - FIOCRUZ.

A análise das 16 espécies de Verbenaceae foi realizada com base na composição do óleo essencial (OE) e do extrato etanólico particionado em hexano (FH) durante o período seco e do período de águas, de acordo com a flutuação populacional e a quantidade de massa foliar para cada espécie, conforme descrito na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 - Espécies de Verbenaceae analisadas por dois diferentes métodos de fracionamento durante o período seco e período de águas.

Espécies	Período Seco		Período de Águas	
	Óleo essencial	Hexano	Óleo essencial	Hexano
<i>Aegiphila lhotzkiana</i>	X	X	X	X
<i>Aegiphila sellowiana</i>	X	X	X	X
<i>Aloysia virgata</i>	-	X	X	X
<i>Bouchea fluminensis</i>	X	X	X	X
<i>Lantana aff. fucata</i>	-	X	X	X
<i>Lantana fucata</i>	X	X	X	X
<i>Lippia aristata</i>	X	X	X	X
<i>Lippia aff microphylla</i> (Chapéu do Sol)	X	X	X	X
<i>Lippia aff microphylla</i> (Usina)	X	X	X	X
<i>Lippia martiana</i> (flor branca)	X	X	X	X
<i>Lippia martiana</i> (flor rosa)	X	X	-	X
<i>Lippia salviifolia</i>	X	X	X	X
<i>Stachytarpheta gesneriodes</i>	X	X	X	X
<i>Stachytarpheta mexiae</i>	X	X	-	-
<i>Stachytarpheta procumbens</i>	-	X	-	X
<i>Stachytarpheta reticulata</i>	X	X	X	X
<i>Verbena litoralis</i>	X	X	-	X
<i>Vitex polygama</i>	X	X	X	X

O traço (-) corresponde às análises não realizadas.

Análise do óleo essencial

Os óleos essenciais foram extraídos utilizando-se sistema de hidrodestilação (aparelho de *Clevenger*). As folhas (aproximadamente 100g) foram colocadas em balão volumétrico, juntamente com 2 L de água destilada e mantidas em ebulição por 2 horas para folhas frescas ou 4 horas para folhas secas. O óleo obtido foi recolhido em frasco de vidro transparente devidamente rotulado, revestido em papel alumínio e conservado a 4°C para posterior análise. No caso das plantas que produziram pouco óleo, a coluna foi lavada com clorofórmio ou acetato de etila, realizando-se, em seguida, partição em funil de separação e rotaevaporação em temperatura não superior a 30°C.

Para a preparação das amostras para análise por cromatografia gasosa, realizou-se uma diluição das mesmas em 200 µL de hexano (grau HPLC), seguida de cromatografia em camada delgada (CCD) em placa T-6520 em sílica gel com poliéster. Como eluente utilizou-se hexano:acetato de etila 4,7:0,3 (v/v) e como revelador vanilina:ácido sulfúrico seguido de aquecimento.

Das amostras devidamente diluídas do óleo essencial, foi injetado 1 µL em cromatógrafo gasoso contendo coluna capilar Supelco DB 5 (30 m) e Hélio como gás de arraste, acoplado ao espectrômetro de massa Shimadzu QP5050A. O equipamento foi monitorado pelo software *Shimadzu CLASS 5000* nas seguintes condições:

- Temperatura do injetor: 200°C
- Temperatura inicial da coluna: 50°C
- Tempo de permanência na temperatura inicial: 5 min
- Temperatura final da coluna: 200°C
- Tempo de permanência na temperatura final: 5 min
- Velocidade de aquecimento: 4°C/min
- Temperatura da interface: 220°C
- Tempo de espera após a injeção: 5 min
- Tempo de análise: 44,60 min

- Splitt: 20
- Amplitude de detecção no espectrômetro de massas: 30 a 300 m/z

O Índice de *Kovats* (IK) para os componentes do óleo essencial e fração hexânica foi calculado com base em uma curva-padrão de uma série homóloga de n-alcenos (C7 – C22), de acordo com a fórmula a seguir:

$$IK = 100 \times NCHmn + 100 \times \frac{TRO - TRHmn}{TRHmr - TRHmn}$$

Onde,

IK = Índice de *Kovats* ou Índice de retenção de *Kovats*;

NCHmn = N^o de carbono na molécula do hidrocarboneto imediatamente menor;

TRO = Tempo de retenção do componente do óleo essencial;

TRHmn = Tempo de retenção do hidrocarboneto imediatamente menor;

TRHmr = Tempo de retenção do hidrocarboneto imediatamente maior.

A identificação dos constituintes foi baseada na comparação dos IK e espectros de massas de cada substância com aqueles do banco de dados *Shimadzu* e com os dados da literatura (Adams, 1995).

Análise da fração hexânica

Os materiais vegetais (aproximadamente 2 gramas de folhas frescas) das espécies estudadas, foram coletados e imersos em tubo Falcon com aproximadamente 20 mL de etanol 95% (P.A.) sendo este fechado e armazenado em temperatura ambiente, ao abrigo da luz por, no mínimo 24 horas antes da preparação para análise.

Dos extratos etanólicos obtidos, foi retirada uma alíquota de 1 mL que foi transferida para um recipiente de vidro previamente lavado com etanol 95% e

hexano (grau HPLC). Igual volume de água milliQ e hexano foram adicionados. As misturas bifásicas foram homogeneizadas em agitador do tipo vórtex e a fase superior transferida para um microtubo, obtendo-se assim a fração hexânica (FH).

As FH, obtidas no dia da análise, foram injetadas (2 μ L) em CG/EM conforme condições de análise descritas no item 3.1.1.2.1, exceto pelo uso de um *split* 4 para as amostras em hexano. A identificação dos constituintes foi baseada na comparação dos IK e os espectros de massa de cada substância com aqueles do banco de dados *Shimadzu* e com os dados da literatura (Adams, 1995).

3.1.2 Isolamento e identificação estrutural dos constituintes majoritários de *Stachytarpheta glabra* por RMN

3.1.2.1 Coleta do material vegetal

As amostras de *Stachytarpheta glabra* Cham. foram coletadas na Serra do Cipó, na APA do Parque Nacional da Serra do Cipó. O exemplar “Voucher” foi depositado no Herbário CESJ (ICB/UFJF) conforme as técnicas usuais.

3.1.2.2 Extração, isolamento e identificação dos componentes majoritários

Folhas secas de *Stachytarpheta glabra* (72 g) foram submetidas ao processo de hidrodestilação (arraste de vapor, 100°C), utilizando-se aparelho de *Clevenger*

por quatro horas, conforme descrito por Matos (1997). Após a extração, o produto foi armazenado em frasco âmbar e mantido sob refrigeração (*freezer* -20°C) e ao abrigo da luz.

O produto resultante do processo de hidrodestilação foi purificado mediante a passagem por uma coluna de sílica gel usando como eluente acetato de etila/hexano e os produtos isolados foram identificados por análise dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (Bruker 300 MHz) de ^1H e ^{13}C e por comparação com os dados da literatura (BIANCO *et al.*, 1976; DAMTOFT *et al.*, 1984; CHUM *et al.*, 2002).

Folhas secas e pulverizadas (16,1 g) da espécie foram exaustivamente extraídas com etanol 99,3% em aparelho de *Soxhlet* (aproximadamente 80°C). O extrato bruto obtido foi concentrado sob pressão reduzida e, posteriormente, purificado em coluna de sílica gel, usando como eluente acetato de etila/metanol. Os compostos resultantes foram identificados por análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e por comparação com os dados da literatura (BIANCO *et al.*, 1976; DAMTOFT *et al.*, 1984; CHUM *et al.*, 2002).

3.1.3 Triagem fitoquímica de espécies de *Lippia* e *Lantana*

As análises foram conduzidas no Laboratório de Farmacognosia da UFJF e no Núcleo de Identificação e Quantificação Analítica (NIQUA) na Faculdade de Farmácia e Bioquímica da UFJF.

Folhas secas de *Lippia aristata*, *Lippia aff. microphylla*, *L. martiana*, *L. salviifolia* e *Lantana aff. fucata* foram trituradas visando investigar a presença (+) ou ausência (-) de flavonóides, leucoantocianidinas, taninos, cumarinas, heterosídeos, antraquinonas, saponinas e alcalóides por meio de reações de grupos funcionais da molécula (MATOS,1997).

3.1.3.1 Flavonóides

Foram pesados cerca de 2 gramas de folhas secas e trituradas as quais foram transferidas para béqueres, e acrescentados 15 mL de solução de etanol 70%. Estes materiais foram aquecidos em chapa de aquecimento (60°C) (CERAMAC Midi, IKA – Estados Unidos da América) por 30 minutos. Posteriormente, foram filtrados em papel de filtro e os filtrados submetidos às reações para detecção de flavonóides:

- Reação com cloreto de alumínio 5% (AlCl_3): diferentes áreas de um papel de filtro foram umedecidas, com aproximadamente cinco gotas dos extratos obtidos anteriormente sendo acrescentado uma gota de solução etanólica de AlCl_3 a 5%. Fluorescência sob a luz ultravioleta ($\lambda = 365 \text{ nm}$) indica a presença de flavonóides.

- Reação com ácido bórico (H_3BO_3): a 5 mL dos extratos obtidos anteriormente foram adicionados 3 mL de solução de ácido bórico 3% e 1 mL de solução de ácido oxálico 10%, evaporando até a secura em chapa de aquecimento (60°C) (CERAMAC Midi, IKA – Estados Unidos da América). Em seguida, após esfriamento na superfície de trabalho, foram adicionados 10 mL de éter etílico p.a. e observou sob a L.U.V. ($\lambda = 365 \text{ nm}$). O aparecimento de fluorescência amarela-esverdeada indica a presença de flavonóides.

- Reação com hidróxido de sódio (NaOH) 1N: a 5 mL dos extratos obtidos anteriormente foram adicionados 0,5 mL de solução de NaOH 1N. A coloração amarelada indica a presença de flavonóides.

- Reação de *Shinoda*: a 2 mL dos extratos obtidos anteriormente, foram adicionados 2 a 3 fragmentos de magnésio (Mg) metálico e 1 mL de solução de ácido clorídrico concentrado. Coloração rósea avermelhada indica a presença de flavonóides.

3.1.3. 2 Leucoantocianidinas

Foram adicionadas a 2 mL dos extratos alcoólicos, obtidos anteriormente, três gotas de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado. A coloração avermelhada indica a presença de leucoantocianidinas.

3.1.3.3 Taninos

Foram pesados cerca de 1 g das folhas secas trituradas e transferidas para béqueres e adicionados 50 mL de solução de etanol 70%, levando à fervura em chapa de aquecimento (CERAMAC Midi, IKA – Estados Unidos da América) por 5 minutos. Os extratos foram filtrados em papel de filtro e os filtrados submetidos às reações para detecção de taninos:

- Reações de sais de ferro: aos extratos aquosos (2 mL) foram adicionados 5 mL de água destilada e algumas gotas de solução aquosa de cloreto férrico a 2%. Para reação positiva, foram observadas a formação e a coloração dos precipitados. Precipitado de coloração verde indica a presença de taninos condensados, enquanto de cor azul indica taninos hidrolisáveis.

- Reações com alcalóides: ao tubo de ensaio contendo os extratos (2 mL) obtidos anteriormente foi adicionada uma gota de solução de ácido clorídrico 10% e algumas gotas de solução de sal de alcalóides solúvel 0,1%. A formação de precipitado indica a presença de taninos totais.

- Reação com gelatina: ao tubo de ensaio contendo os extratos (2 mL) obtidos anteriormente foi adicionada uma gota de solução de ácido clorídrico a 10% e solução de gelatina 2,5%. A formação de precipitado indica a presença de taninos totais.

3.1.3. 4 Cumarinas

Foram pesados cerca de 1 g das folhas secas e trituradas que foram transferidas para béqueres e adicionado 1 mL de solução de ácido clorídrico 10% e 10 mL de solução de etanol 70%, aquecido durante 2 x 10 minutos em chapa de aquecimento (60°C) (CERAMAC Midi, IKA – Estados Unidos da América). Após filtração em papel de filtro, os volumes foram reduzidos, na chapa de aquecimento (60°C), a 5 mL e extraídos com 10 mL de acetato de etila p.a., em funil de separação. Os extratos em acetato de etila foram concentrados, em chapa de aquecimento, a 5 mL e transferidos para um tubo de ensaio, ao qual foram adicionados 5 mL de solução de hidróxido de potássio (KOH) 5%. Fluorescência azul-esverdeada após exposição à L.U.V. ($\lambda = 365 \text{ nm}$) indica a presença de cumarinas.

3.1.3.5 Heterosídeos

Foram pesados cerca de 2 g das folhas secas e trituradas que foram transferidas para béqueres sendo adicionados 20 mL de solução de etanol 50%. O material foi levado à fervura por 30 minutos, em chapa de aquecimento (60°C) (CERAMAC Midi, IKA – Estados Unidos da América). Em seguida, após repouso na superfície de trabalho, os extratos filtrados em papel de filtro. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes, com a adição de 10 mL de etanol 50% por vez. Ao final, os extratos obtidos foram filtrados com papel de filtro e reunidos nos béqueres. Em seguida, foram adicionados 10 mL de solução saturada de acetato básico de chumbo $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$. Os sobrenadantes, provenientes da adição da solução saturada de acetato básico de chumbo, foram filtrados em papel de filtro e transferidos para funil de separação. Foram adicionados 10 mL de água destilada e extraídos a solução hidroalcoólica com duas porções de 15 mL de clorofórmio p.a. Os extratos clorofórmicos foram reunidos e concentrados, em chapa de aquecimento

(60°C) (CERAMAC Midi, IKA – Estados Unidos da América) até 10 mL, para realização das reações de *Kedde* e *Lieberman-Buchard*.

- Reação de *Kedde*: para esta reação foram evaporados, em chapa de aquecimento (60°C), 3 mL dos extratos clorofórmicos obtidos anteriormente, no qual adicionou-se quatro gotas de solução etanólica 1% de ácido 3,5-dinitrobenzóico e duas gotas de solução de hidróxido de potássio 1N. Coloração vermelha violácea intensa indica a presença de heterosídeos principalmente, lactonas α , β -insaturadas.

- Reação de *Lieberman-Buchard*: para esta reação foram utilizados 5 mL dos extratos clorofórmicos obtidos anteriormente, levando estes até resíduo, em chapa de aquecimento (60°C). Foram adicionados 0,5 mL de anidro acético aos resíduos e transferidos vagarosamente para tubos de ensaio que continham 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. O aparecimento de coloração castanho-avermelhada na interface indica a presença de heterosídeos, principalmente, os que possuem núcleo esteroidal.

3.1.3.6 Saponinas

Foram pesados cerca de 2 g das folhas secas e trituradas que foram transferidas para béqueres e adicionados 80 mL de água destilada. Esses extratos foram neutralizados com 10 mL de solução de carbonato de sódio 20%, e aquecidos até fervura em chapa de aquecimento (60°C) (CERAMAC Midi, IKA – Estados Unidos da América). Estes foram resfriados na superfície de trabalho, filtrados em papel de filtro e transferidos para balões de 100 mL. Dez tubos de ensaio foram numerados. No primeiro tubo foram adicionados 1 mL do extrato e 9 mL de água destilada. No segundo tubo foram adicionados 2 mL do extrato e 8 mL de água destilada e assim sucessivamente, até o décimo tubo que continha 10 mL do extrato. Cada tubo foi vedado com parafilme e agitado manualmente durante 15 segundos. A bateria de tubos permaneceu em repouso por 15 minutos. Espuma persistente por

15 minutos indica a presença de saponinas. Para cada fração foi realizada uma bateria de tubos diferentes.

3.1.3.7 Alcalóides

Foram pesados cerca de 2 g das folhas secas e trituradas que foram transferidas para béqueres sendo adicionados 20 mL de solução de ácido clorídrico 1%. O material foi aquecido por 10 minutos em chapa de aquecimento (60°C) (CERAMAC Midi, IKA – Estados Unidos da América). Após esfriamento na superfície de trabalho, as soluções foram filtradas em papel de filtro para funil de separação e alcalinizados com 10 mL de solução de hidróxido de amônia 10%. Os filtrados alcalinos foram extraídos com duas porções de 10 mL de clorofórmio p.a. e filtrados com papel de filtro para o béquer. O clorofórmio foi evaporado em banho-maria à temperatura de 37°C e os resíduos ressuspensos em 5 mL de solução de ácido clorídrico 1%. Em tubos de ensaio foi adicionado 1 mL dos resíduos ressuspensos e adicionados o reagente de *Dragendorff*. O aparecimento de precipitado marrom indica a presença de alcalóides.

3.1.3.8 Antraquinonas

- Reação de *Borntraeger*: cerca de 0,2 g das folhas secas e trituradas foram transferidas para béqueres. Foram adicionados 10 mL de solução de ácido sulfúrico 2N, e mantidas em ebulição na chapa de aquecimento por 10 minutos. Estes foram resfriados na superfície de trabalho e filtrados com papel de filtro para funil de separação, onde foram adicionados 10 mL de acetato de etila p.a.. Após agitação, as fases em acetato de etila (superior) foram recolhidas e foram adicionados 2 mL de solução de hidróxido de sódio 2N com posterior agitação em vórtex (G560, Scientific Industries – Estados Unidos da América). A presença

de coloração vermelha na camada aquosa (superior) indica a presença de antraquinonas.

3.2 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de espécies de *Lippia* e *Lantana*

A atividade antioxidante de compostos orgânicos é dependente de algumas características estruturais, que incluem, na maioria dos casos, a presença de grupamentos fenólicos. Uma vez que o resultado da triagem fitoquímica mostrou a marcante presença de flavonóides nas folhas de todas as espécies estudadas, tais plantas tornaram-se importantes alvos na busca por antioxidantes naturais.

3.2.1 Preparação dos extratos

Os extratos brutos etanólicos (EBE) de folhas frescas foram preparados por maceração estática, a frio, durante 24 horas em temperatura ambiente, na proporção de 10 gramas de folha : 100 mL de etanol (p.a.) 95%. Após esse período, o EBE foi filtrado, através de papel filtro, para um béquer e particionado em iguais volumes de hexano (p.a.) e água destilada em funil de separação. As frações hexânica (FH) e etanólica (FE) foram recolhidas em balão de fundo redondo e rotaevaporadas a uma temperatura não superior a 30°C, a fim de não serem perdidos os compostos com menor peso molecular.

3.2.2 Atividade antioxidante (atividade seqüestrante)

A atividade seqüestrante de radicais 2,2-difenil-1,2-picrilhidrazil (DPPH) foi determinada de acordo com o método de Sreejavan e Rao (1997), com pequenas modificações. Neste modelo, 1,5 mL da solução etanólica de DPPH 0,05 mM foram adicionados a 500 µL de uma solução etanólica das FH e FE obtidas das folhas das espécies estudadas, nas concentrações de 250; 125; 62,50; 31,25; 15,62; 7,81; 3,90; 1,95; 0,97 µg/mL. Os testes foram realizados em triplicata. Essa reação transcorreu em temperatura ambiente, por 30 minutos no escuro, e em seguida a absorvância foi obtida em espectrofotômetro (UV mini 1240, Shimadzu - Japão) no comprimento de onda (λ) de 517 nm. Para impedir a interferência da cor do extrato na leitura das amostras, foi preparada uma solução inicial contendo 500 µL de amostra e 1,5 mL de etanol (branco), seguida por diluição seriada. Como controle negativo, foi usada a mistura de 500 µL de etanol p.a. e 1,5 mL da solução etanólica de DPPH 0,05 mM. O ácido ascórbico e o butil hidroxitolueno (BHT) foram usados como padrões de referência nas mesmas concentrações (250 – 0,97 µg/mL) que as amostras ensaiadas. A porcentagem de inibição do radical DPPH foi calculada usando a equação:

$$IC_{50} (\%) = 100 \times (A_0 - A_s) / A_0$$

Onde:

A_0 = absorvância do controle negativo e

A_s = absorvância da amostra teste.

O valor de IC_{50} representa a concentração das FH ou FE, obtidas das espécies de *Lippia* e *Lantana*, que causaram 50% de inibição do radical livre DPPH.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização química

4.1.1 Caracterização dos constituintes voláteis por CG/EM

O rendimento de óleo essencial das espécies pode ser visto na Tabela 2.3. Diferentemente das outras espécies analisadas nesse estudo, para *Aegiphila sellowiana* e *Aegiphila lhotzkiana* a extração do OE foi realizada por dois anos consecutivos, durante o período seco, em função da disponibilidade material por ocasião da coleta. No primeiro ano, foram usadas folhas secas, enquanto no segundo, o óleo foi extraído a partir de folhas frescas. Como o rendimento não apresentou significativa diferença entre os dois anos, o rendimento compreende a média dessas análises (Tabela 2.3). As espécies *Bouchea fluminensis*, *Stachytarpheta reticulata*, *S. mexiae* e *Verbena litoralis* não produziram óleo essencial, mesmo quando grande quantidade de material vegetal foi usada para extração. O material vegetal coletado para *Lantana aff. fucata*, durante o período seco, e para *Lippia martiana* (flores rosas), *Stachytarpheta mexiae* e *Verbena litoralis*, no período de águas, foram insuficientes para o processo de extração. Foram identificadas populações com pequeno número de indivíduos de *Stachytarpheta procumbens*, não sendo possível a coleta de suas folhas para análise química.

Tabela 2.3 - Rendimento médio do óleo essencial extraído das folhas de espécies de Verbenaceae da Serra do Cipó coletadas em duas estações

Espécie	Rendimento (%)	
	Período de seca	Período de águas
<i>Aegiphila lhotzkiana</i>	0,060	0,050
<i>Aegiphila sellowiana</i>	0,008	0,007
<i>Aloysia virgata</i>	0,150	0,150
<i>Bouchea fluminensis</i>	*	*
<i>Lantana aff. fucata</i>	-	0,160
<i>Lantana fucata</i>	0,018	0,036
<i>Lippia aristata</i>	0,010	0,020
<i>Lippia aff. microphylla</i> (Chapéu do Sol)	0,010	0,130
<i>Lippia aff. microphylla</i> (Usina)	0,070	0,080
<i>Lippia martiana</i> (flor branca)	0,014	0,160
<i>Lippia martiana</i> (flor rosa)	0,016	-
<i>Lippia salviifolia</i>	0,200	0,280
<i>Stachytarpheta gesnerioides</i>	0,010	0,170
<i>Stachytarpheta mexiae</i>	*	-
<i>Stachytarpheta procumbens</i>	-	-
<i>Stachytarpheta reticulata</i>	*	*
<i>Verbena litoralis</i>	*	-
<i>Vitex polygama</i>	0,030	0,030

O traço (-) corresponde às plantas não coletadas e (*) às plantas que não produziram óleo essencial.

Com a metodologia adotada para análise da FH, as espécies *Bouchea fluminensis*, *Stachytarpheta mexiae*, *S. procumbens*, *S. reticulata* e *Verbena litoralis* não apresentaram perfis cromatográficos ideais para análise dos componentes, independente da época analisada.

Os principais componentes identificados no OE e FH, com seus respectivos tempo de retenção (TR), índice de Kovats (IK) e porcentagem relativa (%), para as espécies *Aegiphila lhotzkiana*, *A. sellowiana*, *Aloysia virgata*, *Lantana aff. fucata*, *Lantana fucata*, *Lippia aristata*, duas populações de *Lippia aff. microphylla* (Usina e Chapéu do Sol), *Lippia martiana* (populações com indivíduos apresentando flores rosa e branca), *L. salviifolia*, *Stachytarpheta gesnerioides* e *Vitex polygama* estão listados nas Tabelas 2.4 a 2.16. Os componentes majoritários (acima de 10%), bem como a porcentagem relativa referente a cada um deles, estão destacados em negrito.

A análise por CG/EM do hexano (grau HPLC), submetido aos mesmos processos de partição que os extratos vegetais, indicou a pureza do solvente e a ausência de substâncias extraíveis nas vidrarias utilizadas.

4.1.1.1 Gênero *Aegiphila*

A análise do OE de *Aegiphila lhotzkiana* demonstrou variada constituição de monoterpenos (Tabela 2.4), como o monoterpeno acíclico linalol e sabineno, o monocíclico α -terpineol, os bicíclicos β -pineno e α -pineno e os álcoois mentol e nerol. No entanto, os compostos majoritários identificados produzidos por *A. lhotzkiana* foram os sesquiterpenos, destacando-se o α e β -cariofileno e o óxido de cariofileno. Quanto ao rendimento do óleo essencial, o período do ano, seco ou chuvoso, não alterou significativamente sua produção.

A análise do perfil cromatográfico da partição em hexano durante o período seco para *Aegiphila lhotzkiana* revelou a presença majoritária de α e β -cariofileno, como observado no OE, além do germacreno D. O óxido de cariofileno, presente no óleo volátil, não foi identificado na FH.

A composição química de *Aegiphila sellowiana* (Tabela 2.5) apresentou grande variação qualitativa e quantitativa quando comparadas as épocas de coleta. Na estação seca, o guaiol foi a substância majoritária identificada no óleo essencial. Já no período de águas, na composição do óleo essencial destacou-se o β -cariofileno e γ -muuroleno. A FH avaliada durante o mesmo período demonstrou perfil cromatográfico semelhante ao OE, destacando-se β -cariofileno e γ -muuroleno, além de α -copaeno. No entanto, a FH demonstrou elevada constituição de monoterpenos, que não foram identificados no óleo.

Tabela 2.4 - Compostos identificados no óleo essencial e fração hexânica de *Aegiphila lhotzkiana*

Composto	IK	PERÍODO DE SECA						PERÍODO DE ÁGUAS					
		Óleo essencial			Óleo essencial*			Óleo essencial			Hexano		
		IKC	TR	%	IKC	TR	%	IKC	TR	%	IKC	TR	%
α-pineno	0939	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,442	2,54
sabineno	0976	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,708	6,15
β-pineno	0980	-	-	-	-	8,729	v	-	-	-	-	8,817	3,14
1-Octen-3-ol	0978	-	8,975	0,78	-	-	-	-	-	-	-	9,017	3,86
linalol	1098	1106,68	13,242	4,16	1106,68	13,242	1,36	-	-	-	-	-	-
mentol	1173	-	-	-	1181,16	15,942	v	-	-	-	-	-	-
α-terpineol	1189	-	-	-	1200,00	16,625	v	-	-	-	-	-	-
nerol	1255	-	-	-	1266,52	18,975	v	-	-	-	-	-	-
α-copaeno	1376	1383,63	22,967	3,19	1383,12	22,950	4,44	-	-	-	-	-	-
β-bourboneno	1384	1393,30	23,292	2,95	1392,29	23,258	1,57	-	-	-	-	-	-
β-elemeno	1391	1400,25	23,525	5,81	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-cariofileno	1418	1430,49	24,492	30,55	1430,74	24,500	30,08	1430,21	24,483	67,21	1430,49	24,492	53,47
α-cariofileno	1454	1465,13	25,600	6,95	1433,08	24,575	10,42	1465,13	25,600	13,92	1465,38	25,608	12,58
Aloaromadendreno	1461	1472,42	25,833	1,16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Germacreno D	1480	1492,77	26,467	3,05	1491,96	26,458	7,53	1492,50	26,475	6,94	1492,75	26,483	15,41
Biclogermacreno	1494	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1509,43	27,000	2,65
Germacreno A	1503	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1517,97	27,258	v
δ – cadineno	1524	1535,64	27,792	0,95	1534,81	27,767	3,95	-	-	-	-	-	-
Não identificado	-	1568,43	28,783	1,74	1568,17	28,775	4,04	-	-	-	-	-	-
Não identificado	-	1574,78	28,975	0,87	1574,52	28,967	5,14	-	-	-	-	-	-
Espatuleno	1576	1596,86	29,642	7,34	1596,86	29,642	2,66	-	-	-	-	-	-
Oxido de cariofileno	1581	1600,72	29,758	24,98	1601,32	29,775	20,62	1599,87	29,733	11,93	-	-	-
Humuleno epóxido II	1606	1627,72	30,533	2,17	1627,72	30,533	2,45	-	-	-	-	-	-
Tau-Cadinol	1640	1658,50	31,417	1,68	1657,90	31,400	5,74	-	-	-	-	-	-

IK: Índice de Kovats; IKC: Índice de Kovats calculado; TR: Tempo de Retenção; (%): Porcentagem relativa; (*) corresponde ao óleo essencial extraído a partir de folhas secas, (v): vestígio; (negrito) corresponde aos componentes majoritários.

Tabela 2.5 - Compostos identificados no óleo essencial e fração hexânica de *Aegiphila sellowiana*

Composto	IK	PERÍODO DE SECA						PERÍODO DE ÁGUAS					
		Óleo essencial			Óleo essencial*			Óleo essencial			Hexano		
		IKC	TR	%	IKC	TR	%	IKC	TR	%	IKC	TR	%
α-pineno	0939	-	7,325	0,13	-	-	-	-	-	-	-	7,458	9,27
sabineno	0976	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,717	3,24
β-pineno	0980	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,825	3,09
1-Octen-3-ol	0978	-	8,983	8,52	-	-	-	-	9,009	6,85	-	9,017	9,07
Octanol-3	0993	1001,17	9,467	1,13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
nonanono	1091	1096,03	12,858	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
linalol	1098	1106,68	13,242	1,41	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mentol	1173	-	-	-	1181,60	15,958	v	-	-	-	-	-	-
Metil salicilato	1190	1206,59	16,858	0,48	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eugenol	1356	1373,21	22,617	0,18	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-copaeno	1376	1383,36	22,958	0,15	1382,52	22,930	2,83	1384,37	22,992	9,17	1384,37	22,992	14,55
β-bourboneno	1384	1393,30	23,292	2,73	1392,05	23,250	v	-	-	-	-	-	-
β-cubebeno	1390	-	-	-	1397,11	23,420	v	-	-	-	-	-	-
β-cariofileno	1418	1430,49	24,492	4,98	1429,17	24,450	5,98	1430,49	24,492	10,13	1430,21	24,483	15,36
α-cariofileno	1454	1465,13	25,600	1,50	1463,98	25,563	3,26	-	-	-	1465,38	25,608	4,56
γ-muuroleno	1477	1492,50	26,475	2,91	1491,71	26,450	3,88	1493,03	26,492	25,01	1493,03	26,492	28,56
germacreno D	1480	1496,15	26,592	1,01	1496,03	26,588	2,65	-	-	-	-	-	-
Ionono-β-(E)	1485	1499,00	26,683	1,96	1500,07	26,717	0,98	-	-	-	-	-	-
Não identificado	-	1503,08	26,808	0,48	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-selineno	1494	1506,68	26,917	2,10	1506,68	26,917	5,52	1508,04	26,958	3,02	1507,78	26,950	5,04
biciclogermacreno	1494	1509,17	26,992	1,53	1509,03	26,988	5,65	-	-	-	1509,70	27,008	7,26
pentadecano	1500	1514,66	27,158	0,38	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β- bisaboleno	1509	1517,44	27,242	0,85	1516,88	27,225	1,19	-	-	-	-	-	-
selineno-7-epi-α	1517	1531,77	27,675	1,05	1530,94	27,650	5,02	-	-	-	-	-	-
cis-calameneno	1521	1535,64	27,792	0,88	-	-	-	-	-	-	-	-	-
δ-cadineno	1524	-	-	-	1535,51	27,788	4,82	-	-	-	-	-	-
bourbonanono-1-nor	1558	1577,83	29,067	0,39	-	-	-	-	-	-	-	-	-
hexenil benzoato (Z)-3	1570	1585,80	29,308	0,45	-	-	-	-	-	-	-	-	-
hexil benzoato N	1576	1590,50	29,450	0,18	-	-	-	-	-	-	-	-	-
espatulenol	1576	1596,86	29,642	2,83	1598,38	29,688	7,37	-	-	-	-	-	-
óxido de cariofileno	1581	1600,73	29,758	6,15	1601,92	29,792	7,89	-	-	-	-	-	-
guaial	1595	1619,99	30,225	15,73	-	-	-	-	-	-	-	-	-

IK: Índice de Kovats; IKC: Índice de Kovats calculado; TR: Tempo de Retenção; (%): Porcentagem relativa; (*) corresponde ao óleo essencial extraído a partir de folhas secas, (negrito) aos componentes majoritários.

Tabela 2.5 (cont...) – Compostos identificados no óleo essencial e fração hexânica de *Aegiphila sellowiana*

Composto	IK	PERÍODO DE SECA						PERÍODO DE ÁGUAS					
		Óleo essencial			Óleo essencial*			Óleo essencial			Hexano		
		IKC	TR	%	IKC	TR	%	IKC	TR	%	IKC	TR	%
humuleno epóxido II	1606	1628,31	30,550	0,57	1628,31	30,550	1,44	-	-	-	-	-	-
Tau-cadinol	1640	1658,77	31,425	0,66	1660,24	31,467	8,12	-	-	-	-	-	-
δ-cadinol	1645	1676,18	31,925	0,65	1665,74	31,625	1,49	-	-	-	-	-	-
α-cadinol	1653	-	-	-	1675,03	31,892	4,36	-	-	-	-	-	-
não identificado	-	-	-	-	1681,13	32,067	1,91	-	-	-	-	-	-
bulnesol	1666	1686,91	32,233	1,69	-	-	-	-	-	-	-	-	-
não identificado	-	1692,13	32,383	0,38	1692,44	32,392	v	-	-	-	-	-	-
β-bisabolol	1671	1700,59	32,625	0,47	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-bisabolol	1683	-	-	-	1700,88	32,633	1,30	-	-	-	-	-	-
Não identificado	-	1721,07	33,183	15,76	1718,65	33,117	1,16	-	-	-	-	-	-

IK: Índice de Kovats; IKC: Índice de Kovats calculado; TR: Tempo de Retenção; (%): Porcentagem relativa; (*) corresponde ao óleo essencial extraído a partir de folhas secas, (v): vestígio; (negrito) corresponde aos componentes majoritários.

4.1.1.2 Gênero *Aloysia*

O óleo essencial extraído das folhas de *Aloysia virgata* durante o período seco revelou a presença de monoterpenos, no entanto, a grande maioria dos compostos identificados, independente da forma de extração ou do período do ano, constituíram-se de sesquiterpenos, destacando-se o β -cariofileno, o germacreno D e o biciclogermacreno (Tabela 2.6).

A destilação das folhas da espécie forneceu 0,15% de óleo essencial (Tabela 2.3). A comparação entre os métodos de extração, demonstra, principalmente, diferenças quantitativas dos componentes majoritários.

Tabela 2.6 - Compostos identificados no óleo essencial e fração hexânica de *Aloysia virgata*

Composto	IK	PERÍODO DE SECA						PERÍODO DE ÁGUAS					
		Óleo essencial			Hexano			Óleo essencial			Hexano		
		IKC	TR	%	IKC	TR	%	IKC	TR	%	IKC	TR	%
α-pineno	0939	-	7,300	0,77	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sabineno	0976	-	8,600	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-pineno	0980	-	8,700	0,65	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7-octen-4-ol		-	8,975	0,50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
δ-elemeno	1339	-	-	-	-	-	-	1345,91	21,700	2,08	1345,16	21,675	3,22
α-copaeno	1376	1382,14	22,917	0,77	1383,63	22,967	3,81	1385,35	23,025	1,56	1384,37	22,992	2,49
β-bourboneno	1384	1391,55	23,233	2,66	1393,30	23,292	4,62	1394,79	23,342	1,82	1394,05	23,317	2,52
β-elemeno	1391	1398,24	23,458	1,96	1400,00	23,517	4,71	1401,56	23,567	6,85	1401,03	23,550	5,62
β-cariofileno	1418	1428,39	24,425	8,50	1429,42	24,458	13,79	1431,27	24,517	7,62	1430,74	24,500	9,34
β-gurjuneno	1432	1437,24	24,708	1,53	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-guaieno	1439	1446,37	25,000	3,52	1447,94	25,050	5,30	1449,24	25,092	3,32	1448,72	25,075	4,54
Não identificado	1454	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1454,19	25,250	0,64
α-humuleno	1454	1463,04	25,533	3,05	-	-	-	1466,17	25,633	1,58	1465,38	25,608	1,62
Aloaromadendreno	1461	1470,86	25,783	1,87	-	-	-	-	-	-	1473,20	25,858	1,15
Germacreno D	1480	1491,71	26,450	23,66	1492,25	26,467	13,14	1493,81	26,517	10,68	1493,53	26,508	12,66
Biciclogermacreno	1494	1508,87	26,983	24,53	1509,17	26,992	12,19	1510,82	27,042	14,48	1510,52	27,033	12,73
δ – guaieno	1505	1516,61	27,217	4,49	1518,53	27,275	17,66	1519,92	27,317	9,67	1519,62	27,308	9,80
γ- cadineno	1513	1529,02	27,592	2,19	-	-	-	1530,38	27,633	1,27	1530,11	27,625	1,14
δ – cadineno	1524	1533,69	27,733	0,85	1535,64	27,796	5,24	1537,29	27,842	4,75	1536,47	27,817	4,64
Germacreno B	1556	-	-	-	1572,73	28,913	7,81	1574,52	28,967	11,66	1573,96	28,950	10,47
Germacreno D-4-ol	1574	1590,24	29,442	0,99	-	-	-	1592,42	29,508	1,86	1591,89	29,492	1,16
Espatulenol	1576	1595,20	29,592	5,68	1595,73	29,608	7,52	-	-	-	1596,56	29,633	3,82
Não identificado		-	-	-	-	-	-	1597,12	29,650	7,22	-	-	-
Óxido de cariofileno	1581	1599,04	29,708	2,29	-	-	-	1601,32	29,775	2,78	1600,73	29,758	1,37
Tau-cadinol	1640	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1639,35	30,867	0,56
Muuroleno-14-hidroxi-α	1775	-	-	-	1648,47	31,129	4,21	1649,79	31,167	4,76	1648,92	31,142	2,99
Não identificado		1657,31	31,383	1,91	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cusinol acetato	1816	-	-	-	-	-	-	1729,33	33,408	4,08	1727,26	33,392	3,32

IK: Índice de Kovats; IKC: Índice de Kovats calculado; TR: Tempo de Retenção; (%): Porcentagem relativa; (v): vestígio; (negrito) corresponde aos componentes majoritários.

4.1.1.3 Gênero *Lantana*

Lantana aff. fucata apresentou alto rendimento (Tabela 2.3) na produção do óleo essencial (0,16%), constituído de monoterpenos como o sabineno, e sesquiterpenos, com destaque para o β -cariofileno (18,82%), o germacreno D (32,82%) e o biciclogermacreno (11,57%), conforme descrito na Tabela 2.7. A análise da partição em hexano fornece resultados comparáveis aos obtidos na extração de óleo essencial durante o período de águas ao considerarmos a presença dos mesmos compostos majoritários. No entanto, houve grande diferença qualitativa quanto aos monoterpenos identificados no óleo e, praticamente, ausentes na fração hexânica. A comparação entre as FH no período seco e de águas não demonstrou significativa diferença qualitativa ou quantitativa.

A produção do óleo essencial de *Lantana fucata* (Tabela 2.3) no período de águas demonstrou maior rendimento (0,036%) que aquele encontrado para o período seco (0,018%). No entanto, a análise do perfil cromatográfico do OE (Tabela 2.8) demonstra que não houve grande variação qualitativa dos componentes majoritários, destacando-se o β -cariofileno, germacreno D e biciclogermacreno. O perfil cromatográfico para a FH no período de chuvas demonstrou, ainda, elevado teor de β -pineno, β -elemeno e δ -guaieno.

Tabela 2.7 - Compostos identificados no óleo essencial e fração hexânica de *Lantana aff. fucata*

Composto	IK	PERÍODO DE SECA			PERÍODO DE ÁGUAS					
		Hexano			Óleo essencial			Hexano		
		IKC	TR	%	IKC	TR	%	IKC	TR	%
α- pineno	0939	-	-	-	-	7,408	0,68	-	-	-
Sabineno	0976	-	-	-	-	8,700	7,41	-	-	-
Limoneno	1031	1032,39	10,583	1,53	1033,09	10,608	2,00	1032,64	10,592	1,60
β- cis - ocimeno	1040	-	-	-	1042,43	10,942	0,62	-	-	-
β- trans - ocimeno	1050	-	-	-	1052,45	11,300	0,75	-	-	-
γ - terpineno	1062	-	-	-	1063,41	11,692	0,29	-	-	-
4- terpinol	1147	-	-	-	1187,12	16,158	0,35	-	-	-
α-copaeno	1376	1585,11	23,017	2,50	1385,11	23,017	1,07	1384,10	22,983	1,89
β- bourboneno	1384	-	-	-	1394,79	23,342	1,13	1394,05	23,317	2,38
β- elemeno	1391	-	-	-	1401,56	23,567	0,99	-	-	-
β- cariofileno	1418	1431,52	24,525	23,88	1431,27	24,517	18,82	1430,49	24,492	19,71
α - humuleno	1454	1466,70	25,650	1,75	1466,45	25,642	2,50	1465,38	25,608	2,26
aloaromadendreno	1461	1473,98	25,883	2,50	1474,27	25,892	1,58	1473,20	25,858	2,09
γ- muurolene	1477	-	-	-	1488,84	26,358	0,51	-	-	-
Germacreno D	1480	1494,59	26,542	47,27	1494,06	26,525	32,82	1493,28	26,500	43,65
Guaieno	1490	-	-	-	1499,28	26,692	0,32	-	-	-
Biciclogermacreno	1494	1511,09	27,050	7,09	1510,82	27,042	11,57	1509,99	27,017	12,22
Germacreno A	1503	-	-	-	1519,92	27,317	1,56	1518,80	27,283	1,71
γ - cadineno	1513	-	-	-	1530,38	27,633	0,48	-	-	-
δ- cadineno	1524	1537,56	27,850	1,84	1537,00	27,833	1,27	1535,90	27,800	1,61
Germacreno B	1556	1574,78	28,975	5,33	1574,22	28,958	3,09	1537,40	28,933	4,27
Espatulenol	1576	-	-	-	1596,86	29,642	2,17	-	-	-
Óxido de cariofileno	1581	-	-	-	1601,32	29,775	1,74	-	-	-
Viridiflorol	1590	1606,27	29,917	1,53	1605,95	29,908	2,91	1605,08	29,883	2,16

IK: Índice de Kovats; IKC: Índice de Kovats calculado; TR: Tempo de Retenção; (%): Porcentagem relativa; (negrito) corresponde aos componentes majoritários.

Tabela 2.8 - Compostos identificados no óleo essencial e fração hexânica de *Lantana fucata*

Composto	IK	PERÍODO DE SECA						PERÍODO DE ÁGUAS					
		Óleo essencial			Hexano			Óleo essencial			Hexano		
		IKC	TR	%	IKC	TR	%	IKC	TR	%	IKC	TR	%
β- pineno	0939	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,708	15,64
β-bourboneno	1384	1393,03	23,283	1,19	-	-	-	1394,79	23,342	2,10	-	-	-
β-elemeno	1391	1400,00	23,517	2,06	-	-	-	1401,28	23,558	0,84	1400,78	23,542	15,14
β-cariofileno	1418	1429,42	24,458	11,92	1430,21	24,483	26,23	1431,27	24,517	32,41	1430,49	24,492	12,03
α-humuleno	1454	1464,60	25,583	6,38	1465,38	25,608	10,77	1466,17	25,633	4,17	-	-	-
aloaromadendreno	1461	1472,17	25,825	1,06	-	-	-	1473,98	25,883	1,25	-	-	-
Germacreno D	1480	1492,25	26,467	15,96	1492,75	26,483	47,46	1493,81	26,517	32,29	1493,03	26,492	20,10
Biciclogermacreno	1494	1509,17	26,992	10,46	1509,70	27,008	15,54	1510,82	27,042	2,48	1509,99	27,017	10,67
δ- guaieno	1505	1518,27	27,267	4,47	-	-	-	1519,92	27,317	1,55	1519,36	27,300	21,17
γ - cadineno	1513	1529,29	27,600	3,99	-	-	-	1530,38	27,633	0,27	-	-	-
δ- cadineno	1524	1535,64	27,792	2,08	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Germacreno B	1556	1572,57	28,908	5,62	-	-	-	1574,22	28,958	9,62	1573,40	28,933	5,21
Germacreno D-4-ol	1574	-	-	-	-	-	-	1592,72	29,517	0,52	-	-	-
Espatuleno	1576	1595,47	29,600	2,42	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Óxido de cariofileno	1581	1599,60	29,725	6,08	-	-	-	1601,32	29,775	6,70	-	-	-
Viridiflorol	1590	1610,03	30,025	3,06	-	-	-	-	-	-	-	-	-

IK: Índice de Kovats; IKC: Índice de Kovats calculado; TR: Tempo de Retenção; (%): Porcentagem relativa; (negrito) corresponde aos componentes majoritários.

4.1.1.4 Gênero *Lippia*

A análise dos perfis cromatográficos de *Lippia aristata* (Tabela 2.9) demonstrou grande similaridade, independente do período analisado ou da forma de extração, quando comparados os componentes majoritários. Foi observada marcada presença de monoterpenos, principalmente α -pineno, β -pineno, sabineno e limoneno. Dentre os sesquiterpenos, identificamos o β -cariofileno e germacreno D como componentes majoritários. Mesmo sendo baixo, o rendimento na produção do óleo essencial (Tabela 2.3) foi maior no período chuvoso (0,02%) quando comparado ao período seco (0,01%).

As duas populações de *Lippia aff. microphylla* (próxima à pousada Chapéu do Sol e outra próxima à estrada da Usina) apresentaram pequenas diferenças quantitativas e qualitativas na composição do óleo ou fração hexânica. *Lippia aff. microphylla* apresentou um perfil químico (Tabelas 2.10 e 2.11) abundante em monoterpenos, como β -pineno, sabineno, α -felandreno, limoneno, β -trans-ocimeno, destacando-se o α -pineno. Os principais sesquiterpenos identificados foram o β -cariofileno, o α -humuleno, o germacreno D e o biciclogermacreno.

Quanto à sazonalidade, observamos a presença do α -felandreno no óleo essencial extraído apenas durante o período seco, nas duas populações identificadas. Houve uma grande variação no rendimento do óleo essencial, destacando-se a alta eficiência na produção do mesmo durante o período de águas pela população de *L. aff. microphylla* da estrada da Usina (Tabela 2.3).

Tanto o OE quanto a FH, extraídos a partir das folhas de *Lippia martiana* (Tabelas 2.12 e 2.13), exibiram elevado teor de α -pineno, 3-careno- δ , α -copaeno e β -cariofileno. A partir da análise comparativa dos cromatogramas e populações contendo indivíduos com flores rosa ou branca observou-se que não existe significativa diferença em suas constituições químicas, exceto pela maior porcentagem de β -cis-ocimeno nos indivíduos com flores brancas. Do ponto de vista quantitativo, a extração de óleo essencial feita durante o período de águas apresentou rendimento dez vezes superior àquele observado no período seco (Tabela 2.3).

Nos perfis cromatográficos de *Lippia salviifolia* destacaram-se os monoterpenos α -pineno, sabineno, β -pineno, mirceno e limoneno (Tabela 2.14). O

nerolidol foi o composto majoritário, o qual detectou-se apreciável percentagem nos óleos essenciais em relação àquela obtida nos extratos em hexano. O óleo essencial de *L. salviifolia* apresentou rendimento superior ao de todas as espécies pesquisadas (Tabela 2.3), sendo maior no período das águas.

Tabela 2.9 - Compostos identificados no óleo essencial e fração hexânica de *Lippia aristata*

Composto	IK	PERÍODO DE SECA						PERÍODO DE ÁGUAS					
		Óleo essencial			Hexano			Óleo essencial			Hexano		
		IKC	TR	%	IKC	TR	%	IKC	TR	%	IKC	TR	%
α- pineno	0939	-	7,342	5,84	-	7,375	11,21	-	7,408	2,32	-	7,450	5,94
Canfeno	0953	-	7,808	0,49	-	-	-	-	7,883	0,18	-	-	-
Sabineno	0976	-	8,633	2,79	-	8,675	1,71	-	8,700	6,83	-	8,717	16,01
β- pineno	0980	-	8,733	0,39	-	-	-	-	8,808	0,32	-	8,817	0,51
Freesiol	0991	-	8,975	0,87	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β- mirceno	0991	-	9,225	0,38	-	-	-	-	9,292	0,45	-	9,292	0,99
α- felandreno	1005	1006,77	9,667	0,62	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Limoneno	1031	1031,69	10,558	13,94	1032,17	10,575	25,05	1033,09	10,608	11,20	1032,64	10,592	15,98
Eucaliptol	1033	1035,46	10,692	1,49	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β- trans - ocimeno	1050	1050,83	11,242	1,38	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Isoterpinoleno	1086	1106,43	13,233	1,25	-	-	-	1107,81	13,283	0,19	-	-	-
1,3,8-p-Mentatrieno	1111	1154,70	14,983	0,18	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Não identificado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1066,90	15,425	1,34
δ- elemeno	1339	-	-	-	-	-	-	1346,14	21,708	0,26	-	-	-
α - copaeno	1376	1383,63	22,967	0,20	-	-	-	1385,11	23,017	0,48	1384,37	22,992	0,63
β- bourboneno	1384	1393,30	23,292	0,15	-	-	-	1394,79	23,342	0,34	-	-	-
β- cubebeno	1390	-	-	-	-	-	-	1399,73	23,508	0,60	1398,99	23,483	0,50
β- cariofileno	1418	1431,27	24,517	30,16	1431,27	24,517	32,70	1431,77	24,533	26,49	1430,49	24,492	21,11
α - humuleno	1454	1465,13	25,600	2,56	1466,17	25,633	1,98	1466,45	25,642	1,84	1464,67	25,617	1,30
aloaromadendreno	1461	1472,70	25,842	0,97	-	-	-	1473,98	25,883	1,09	1473,20	25,858	0,97
Germacreno D	1480	1494,06	26,525	28,52	1493,81	26,517	24,27	1494,59	26,542	36,73	1493,28	26,500	27,42
Biciclogermacreno	1494	1509,43	27,000	3,83	1510,82	27,042	3,06	1511,09	27,050	6,07	1509,99	27,017	3,57
γ - cadineno	1513	1529,29	27,600	0,49	-	-	-	1530,68	27,642	0,20	-	-	-
δ- cadineno	1524	1535,90	27,800	0,37	-	-	-	1537,00	27,833	0,44	-	-	-
Germacreno B	1556	1573,13	28,925	1,33	-	-	-	1574,22	28,958	1,01	-	-	-
Não identificado	-	1591,07	29,467	0,49	-	-	-	1592,42	29,508	0,23	-	-	-
Óxido de cariofileno	1581	1599,87	29,733	0,97	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Guaiol	1595	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1614,97	30,167	0,95

IK: Índice de Kovats; IKC: Índice de Kovats calculado; TR: Tempo de Retenção; (%): Porcentagem relativa; (negrito) corresponde aos componentes majoritários.

Tabela 2.10- Compostos identificados no óleo essencial e fração hexânica de *Lippia aff. microphylla* (população de Chapéu do Sol)

Composto	IK	PERÍODO DE SECA						PERÍODO DE ÁGUAS					
		Óleo essencial			Hexano			Óleo essencial			Hexano		
		IKC	TR	%	IKC	TR	%	IKC	TR	%	IKC	TR	%
α- pineno	0939	-	7,333	6,38	-	7,367	5,41	-	7,408	12,69	-	7,442	6,81
Canfeno	0953	-	7,808	0,89	-	7,842	0,40	-	7,883	1,09	-	7,900	0,42
Sabineno	0976	-	8,625	0,60	-	8,667	0,39	-	8,700	1,10	-	8,700	0,92
β- pineno	0980	-	8,725	1,83	-	8,767	0,95	-	8,800	3,48	-	8,808	1,54
β- mirceno	0991	-	9,217	v	-	9,250	0,29	-	9,292	0,77	-	9,275	0,47
α- felandreno	1005	1006,77	9,667	2,68	-	-	-	-	-	-	-	-	-
δ- 3- careno	1011	-	-	-	-	-	-	1015,16	9,967	1,08	1014,46	9,942	0,66
p-cimeno	1026	1027,75	10,417	0,94	-	-	-	1029,37	10,475	0,40	-	-	-
Limoneno	1031	1033,99	10,533	2,84	1032,17	10,575	1,07	1032,87	10,600	1,51	1032,39	10,583	0,48
β- cis - ocimeno	1040	1040,34	10,867	1,26	1041,48	10,908	0,55	1042,43	10,942	1,35	1041,48	10,908	0,43
β- trans - ocimeno	1050	1050,57	11,233	2,29	1051,52	11,267	0,80	1052,45	11,300	3,10	1051,74	11,275	1,63
γ- terpineno	1062	1061,76	11,633	v	-	-	-	1063,64	11,700	0,60	1062,71	11,667	v
Terpinoleno	1088	-	-	-	-	-	-	1094,18	12,792	0,86	1093,23	12,758	0,47
linalol	1098	1106,21	13,225	1,87	1107,69	13,275	0,44	1107,81	13,283	1,81	1106,68	13,242	0,89
4- terpinol	1177	1185,30	16,092	0,94	-	-	-	1186,90	16,150	0,62	1185,74	16,108	v
Bornil acetato	1285	1294,34	19,958	1,78	1295,75	20,008	0,31	1296,01	20,017	1,22	1295,05	19,983	0,61
α - copaeno	1376	1383,36	22,958	2,43	1384,85	23,008	3,34	1385,11	23,017	2,29	1384,61	23,000	4,79
β- bourboneno	1384	1392,80	23,275	0,9	1394,28	23,325	0,45	1394,79	23,342	0,48	1393,54	23,300	0,89
β- cubebeno	1390	-	-	-	1399,49	23,500	0,32	-	-	-	1398,75	23,475	1,04
β-cariofileno	1418	1429,71	24,467	6,72	1430,99	24,508	9,66	1431,27	24,517	4,14	1430,49	24,492	5,57
β- gurjuneno	1432	1438,56	24,750	0,73	1440,37	24,808	0,45	1440,37	24,808	0,48	1439,59	24,783	0,69
α – bergamoteno	1436	-	-	-	1445,34	24,967	0,20	-	-	-	1444,56	24,942	0,45
α – guaieno	1439	1447,69	25,042	1,52	1449,25	25,092	0,73	1449,25	25,092	0,79	1448,47	25,067	2,35
α - humuleno	1454	1465,38	25,608	17,03	1466,70	25,650	26,22	1466,45	25,642	10,98	1465,38	25,608	1,88
aloaromadendreno	1461	1472,42	25,833	1,35	1473,73	25,875	1,68	1473,98	25,883	1,16	1473,20	25,858	2,54
γ- muurolene	1477	1487,80	26,325	1,73	1489,37	26,375	1,07	1488,84	26,358	1,33	-	-	-
Germacreno D	1480	1492,75	26,483	12,52	1494,31	26,533	27,84	1493,81	26,517	12,84	1496,40	26,600	39,13
β- selineno	1485	1500,60	26,733	0,56	-	-	-	-	-	-	1501,42	26,758	0,72
Biclogermacreno	1494	1509,17	26,992	8,14	1510,82	27,042	11,43	1510,82	27,042	9,47	1511,35	27,058	11,45
δ- guaieno	1505	1517,70	27,250	0,94	1519,36	27,300	0,43	1519,92	27,317	0,50	1518,80	27,283	1,15
γ - cadineno	1513	1526,24	27,508	0,59	-	-	-	1527,90	27,558	0,39	1527,07	27,533	0,48

IK: Índice de Kovats; IKC: Índice de Kovats calculado; TR: Tempo de Retenção; (%): Porcentagem relativa; (v): vestígio; (negrito) corresponde aos componentes majoritários.

Tabela 2.10 (cont...) - Compostos identificados no óleo essencial e fração hexânica de *Lippia aff. microphylla* (população de Chapéu do Sol)

Composto	IK	PERÍODO DE SECA						PERÍODO DE ÁGUA					
		Óleo essencial			Hexano			Óleo essencial			Hexano		
		IKC	TR	%	IKC	TR	%	IKC	TR	%	IKC	TR	%
Não identificado	-	1529,02	27,592	0,93	-	-	-	1530,38	27,633	0,55	1529,55	27,608	0,79
δ- cadineno	1524	1535,64	27,792	3,62	1537,00	27,833	2,25	1537,00	27,833	3,13	1536,47	27,817	3,10
Espatuleno	1576	1595,47	29,600	v	-	-	-	1597,12	29,650	2,18	1595,73	29,608	0,51
Viridiflorol	1590	1601,60	29,783	2,89	-	-	-	1603,06	29,825	3,23	-	-	-
Guaiol	1595	1610,31	30,033	0,94	-	-	-	1611,49	30,067	1,26	-	-	-
Humulene epoxide II	1606	1627,72	30,533	1,60	-	-	-	1628,90	30,567	0,99	-	-	-
Cubenol -1, 10-Di-epi	1614	-	-	-	-	-	-	1633,25	30,692	0,34	-	-	-
1- epi- cubenol	1627	1645,44	31,042	1,04	-	-	-	1647,18	31,092	0,88	-	-	-
T- cadinol	1640	1660,79	31,483	3,06	1662,26	31,525	0,43	1662,26	31,525	3,41	-	-	-
α – epi- muurolol	1641	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1661,11	31,492	1,12
δ- cadinol	1645	1665,15	31,608	0,98	-	-	-	1666,33	31,642	1,13	1665,15	31,608	0,47
Não identificado	-	1673,57	31,850	3,07	1675,31	31,900	0,43	1675,03	31,892	3,37	-	-	-
α - cadinol	1653	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1673,85	31,858	1,34

IK: Índice de Kovats; IKC: Índice de Kovats calculado; TR: Tempo de Retenção; (%): Porcentagem relativa; (v): vestígio; (negrito) corresponde aos componentes majoritários.

Tabela 2.11 - Compostos identificados no óleo essencial e fração hexânica de *Lippia aff. microphylla* (população da estrada da Usina)

Composto	IK	PERÍODO DE SECA						PERÍODO DE ÁGUAS					
		Óleo essencial			Hexano			Óleo essencial			Hexano		
		IKC	TR	%	IKC	TR	%	IKC	TR	%	IKC	TR	%
α- pineno	0939	-	7,383	8,99	-	7,358	7,26	-	-	-	-	7,458	8,04
Canfeno	0953	-	7,825	1,52	-	7,833	0,45	-	-	-	-	7,917	v
Sabineno	0976	-	8,633	0,38	-	8,650	0,40	-	-	-	-	8,717	0,67
β- pineno	0980	-	8,750	2,24	-	8,758	1,61	-	8,800	0,34	-	8,825	1,28
β- mirceno	0991	-	9,225	0,61	-	-	-	-	-	-	-	9,300	2,23
α- felandreno	1005	1007,92	9,708	3,72	-	-	-	-	-	-	-	-	-
δ- 3- careno	1011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1015,38	9,975	7,85
α- terpineno	1018	1018,88	10,100	0,23	-	-	-	-	-	-	-	-	-
p-cimeno	1026	1028,45	10,442	2,14	-	-	-	-	-	-	1029,37	10,475	-
Limoneno	1031	1032,17	10,575	3,08	1031,47	10,550	0,41	-	-	-	1032,87	10,600	0,91
Eucaliptol	1033	1035,66	10,700	0,08	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β- cis - ocimeno	1040	1041,03	10,892	1,40	1041,26	10,900	0,80	-	-	-	1041,96	10,925	0,59
β- trans - ocimeno	1050	1051,97	11,283	4,28	1051,27	11,258	2,21	-	-	-	1052,22	11,292	2,47
Terpinoleno	1088	1092,53	12,733	0,21	-	-	-	-	-	-	1093,93	12,783	2,27
linalol	1098	1107,37	13,267	2,22	-	-	-	-	-	-	1107,37	13,267	0,52
Borneol	1165	1176,33	15,767	0,16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4- terpinol	1177	1185,74	16,108	1,07	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α - terpineol	1189	1200,23	16,633	0,31	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bornil acetato	1285	1295,05	19,983	1,47	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α – cubebeno	1351	1356,33	22,050	0,17	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eugenol	1356	1373,68	22,633	0,13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Yanlgeno	1372	1379,40	22,825	0,15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α - copaeno	1376	1385,11	23,017	4,10	1384,61	23,000	5,45	1385,35	23,025	0,52	1384,85	23,008	3,98
β- bourboneno	1384	1393,30	23,292	0,41	1393,78	23,308	0,49	-	-	-	1394,05	23,317	0,47
β- cubebeno	1390	1398,24	23,458	0,16	1398,99	23,483	0,55	-	-	-	1399,26	23,492	0,86
α - gurjuneno	1409	1420,33	24,167	0,21	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β- cariofileno	1418	1433,61	24,592	13,20	1430,74	24,500	21,88	1431,52	24,525	14,40	1431,52	24,517	9,95
β- gurjuneno	1432	1439,59	24,783	0,47	1439,87	24,792	1,03	-	-	-	1440,12	24,800	0,75
α - bergamoteno	1436	1444,56	24,942	0,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-

IK: Índice de Kovats; IKC: Índice de Kovats calculado; TR: Tempo de Retenção; (%): Porcentagem relativa; (v): vestígio; (negrito) corresponde aos componentes majoritários.

Tabela 2.11 (cont...) - Compostos identificados no óleo essencial e fração hexânica de *Lippia aff. microphylla* (estrada da Usina)

Composto	IK	PERÍODO DE SECA						PERÍODO DE ÁGUAS					
		Óleo essencial			Hexano			Óleo essencial			Hexano		
		IKC	TR	%	IKC	TR	%	IKC	TR	%	IKC	TR	%
α – guaieno	1439	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1448,97	25,083	3,76
Aromadendreno	1439	1450,03	25,117	0,19	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α - humuleno	1454	1468,79	25,717	11,90	1465,92	25,625	3,64	1466,45	25,642	1,28	1465,92	25,625	1,74
aloaromadendreno	1461	1473,98	25,883	0,90	1473,73	25,875	2,23	-	-	-	1473,73	25,875	1,89
γ- muurolene	1477	1489,62	26,383	1,25	1488,59	26,350	1,69	1489,37	26,375	0,74	1489,62	26,383	2,18
Germacreno D	1480	1495,09	26,558	6,22	1493,81	26,517	28,81	1494,06	26,525	31,73	1494,84	26,550	23,63
β- selineno	1485	1499,28	26,692	0,43	-	-	-	-	-	-	1499,28	26,692	0,60
α - selineno	1494	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1501,72	26,767	0,96
Biciclogermacreno	1494	1510,52	27,033	2,66	1510,26	27,025	5,18	1511,09	27,050	21,23	1510,82	27,042	9,84
α - muurolene	1499	1512,74	27,100	0,80	1512,74	27,100	1,43	-	-	-	-	-	-
Germacreno A	1503	-	-	-	-	-	-	1520,45	27,333	0,89	-	-	-
δ- guaieno	1505	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1519,09	27,292	1,49
γ - cadineno	1513	1519,09	27,292	0,39	-	-	-	1528,19	27,567	0,84	-	-	-
Cubebol	1514	1526,80	27,525	0,40	-	-	-	1530,38	27,633	0,80	1527,37	27,542	0,57
δ- cadineno	1524	1537,56	27,850	3,70	1536,73	27,825	4,75	1537,56	27,850	2,21	1536,73	27,825	3,57
α - cadineno	1538	1550,79	28,250	0,20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α - calacoreno	1542	1558,50	28,483	0,18	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Germacreno B	1556	1573,13	28,925	0,54	1573,69	28,942	0,91	1574,22	28,958	0,65	1573,69	28,942	0,58
Óxido de cariofileno	1581	1600,73	29,758	2,05	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Copaen-4-ol- α- β	1584	-	-	-	-	-	-	1597,12	29,650	3,17	1596,56	29,633	0,40
Não identificado	-	-	-	-	-	-	-	1603,34	29,833	4,58	-	-	-
Não identificado	-	1610,90	30,050	0,78	-	-	-	1612,05	30,083	1,99	1610,90	30,050	0,75
Humulene epoxide II	1606	1628,31	30,550	1,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cubenol -1, 10-Di-epi	1614	1638,38	30,667	0,44	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1- epi- cubenol	1627	1646,31	31,067	1,06	-	-	-	-	-	-	1646,87	31,083	0,46
Tau-cadinol	1640	1659,92	31,458	1,04	-	-	-	1660,52	31,475	2,44	1661,35	31,499	1,28
δ- cadinol	1645	1662,26	31,525	1,17	1661,66	31,508	1,00	1662,53	31,533	2,55	-	-	-
Não identificado	-	1666,33	31,642	0,69	1666,33	31,642	0,46	1667,20	31,667	1,09	1665,74	31,625	0,48
Não identificado	-	1675,31	31,900	2,62	1674,72	31,883	1,67	1675,31	31,900	6,52	1672,98	31,833	2,15

IK: Índice de Kovats; IKC: Índice de Kovats calculado; TR: Tempo de Retenção; (%): Porcentagem relativa; (negrito) corresponde aos componentes majoritários.

Tabela 2.12 - Compostos identificados no óleo essencial e fração hexânica de *Lippia martiana* (flor branca)

Composto	IK	PERÍODO DE SECA						PERÍODO DE ÁGUAS					
		Óleo essencial			Hexano			Óleo essencial			Hexano		
		IKC	TR	%	IKC	TR	%	IKC	TR	%	IKC	TR	%
α- pineno	0939	-	7,358	20,08	-	7,367	16,37	-	7,383	24,33	-	7,442	10,64
Canfeno	0953	-	7,808	0,81	-	-	-	-	7,858	0,63	-	7,892	v
β- pineno	0980	-	8,733	3,07	-	8,758	1,35	-	8,775	2,42	-	8,800	1,16
β- mirceno	0991	-	9,225	4,18	-	9,250	3,65	-	9,267	4,67	-	9,275	2,86
δ- 3- careno	1011	1013,29	9,900	6,59	1013,76	9,917	6,37	1014,21	9,933	8,51	1014,46	9,942	4,83
p-cimeno	1026	1027,75	10,417	3,19	-	-	-	1028,90	10,458	0,54	-	-	-
Limoneno	1031	1031,24	10,542	5,05	1031,94	10,567	3,92	1032,39	10,583	7,30	1032,17	10,575	2,98
β- cis - ocimeno	1040	1040,78	10,883	5,41	1041,26	10,900	8,86	1041,73	10,917	12,77	1041,48	10,908	7,66
β- trans - ocimeno	1050	1050,83	11,242	2,55	1051,52	11,267	4,21	1051,75	11,275	5,87	1051,52	11,267	3,80
γ- terpineno	1062	1061,76	11,633	1,81	1062,71	11,667	0,31	1062,83	11,671	0,48	1062,46	11,658	0,34
Terpinoleno	1088	1092,53	12,733	4,19	1093,23	12,758	5,97	1093,48	12,767	7,36	1093,01	12,750	4,66
linalol	1098	1106,21	13,225	1,03	-	-	-	1106,21	13,225	0,41	-	-	-
4- terpinol	1177	1185,05	16,083	1,49	-	-	-	1186,04	16,119	0,80	1185,52	16,100	0,40
α - terpineol	1189	1199,81	16,618	0,65	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α - copaeno	1376	1383,86	22,975	5,48	1384,61	23,000	11,37	1384,37	22,992	3,63	1384,10	22,983	10,63
Geranil acetato	1383	1392,29	23,258	0,44	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-cariofileno	1418	1430,74	24,500	15,78	1430,99	24,508	23,26	1430,49	24,492	11,34	1430,74	24,500	20,40
α - bergamoteno	1436	1443,78	24,917	1,21	1444,81	24,950	1,47	1444,62	24,944	0,36	1443,78	24,917	1,81
α - humuleno	1454	1464,60	25,583	1,49	1465,32	25,625	0,64	1465,38	25,608	0,43	1464,60	25,583	1,52
aloaromadendreno	1461	1472,17	25,825	-	-	-	-	-	-	-	1472,42	25,833	0,62
γ- muurolene	1477	1487,02	26,300	0,44	1488,15	26,336	0,31	-	-	-	1487,02	26,300	0,88
Biclogermacreno	1494	1508,87	26,983	0,91	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α - muurolene	1499	1511,65	27,067	0,88	1513,15	27,117	0,87	1512,48	27,092	0,38	1511,91	27,075	1,46
β- bisabolone	1509	1517,14	27,233	0,57	-	-	-	-	-	-	1517,14	27,233	0,77
δ- cadineno	1524	1535,64	27,792	3,12	1536,73	27,825	6,17	1535,90	27,800	2,53	1535,64	27,792	6,95
Espatuleno	1576	1595,73	29,608	1,06	-	-	-	1601,60	29,783	0,93	-	-	-
Oxido de cariofileno	1581	1599,87	29,733	3,84	-	-	-	-	-	-	1599,87	29,733	0,39
Não identificado	-	1610,03	30,025	1,89	1611,54	30,058	0,45	1610,50	30,042	2,96	1609,75	30,017	0,61

IK: Índice de Kovats; IKC: Índice de Kovats calculado; TR: Tempo de Retenção; (%): Porcentagem relativa, (v): vestígio; (negrito) corresponde aos componentes majoritários.

Tabela 2.13 - Compostos identificados no óleo essencial e fração hexânica de *Lippia martiana* (flor rosa)

Composto	IK	PERÍODO DE SECA						PERÍODO DE ÁGUAS		
		Óleo essencial			Hexano			Hexano		
		IKC	TR	%	IKC	TR	%	IKC	TR	%
α- pineno	0939	-	7,342	9,36	-	7,358	9,84	-	7,425	8,73
Canfeno	0953	-	7,800	1,53	-	7,833	0,96	-	7,892	1,13
Sabineno	0976	-	7,833	v	-	-	-	-	-	-
β- pineno	0980	-	8,725	1,40	-	8,742	v	-	8,800	0,83
β- mirceno	0991	-	9,225	6,74	-	9,242	2,70	-	9,275	2,57
α- felandreno	1005	1006,77	9,667	0,39	-	-	-	-	-	-
δ-3-careno	1011	1013,76	9,917	11,80	1013,76	9,917	7,52	1014,46	9,942	4,77
α- terpineno	1018	1018,66	10,092	0,46	-	-	-	-	-	-
p-cimeno	1026	1027,50	10,408	0,82	-	-	-	-	-	-
Limoneno	1031	1030,99	10,533	2,63	1031,69	10,558	1,31	1032,39	10,583	1,17
Eucaliptol	1033	1035,19	10,683	0,53	-	-	-	-	-	-
β- cis - ocimeno	1040	1041,03	10,892	6,45	1041,26	10,900	2,77	1041,73	10,917	1,93
β- trans - ocimeno	1050	1050,57	11,233	2,46	-	-	-	1051,52	11,267	1,02
γ - terpineno	1062	1061,54	11,625	0,67	-	-	-	-	-	-
Terpinoleno	1088	1093,23	12,758	10,30	1093,23	12,758	4,11	1093,48	12,767	4,32
linalol	1098	1106,21	13,225	2,13	-	-	-	-	-	-
4- terpinol	1177	1185,05	16,083	1,42	-	-	-	-	-	-
α - terpineol	1189	1200,00	16,625	1,85	-	-	-	-	-	-
Longiciclono	1373	1374,93	22,675	0,32	-	-	-	-	-	-
α-copaeno	1376	1383,63	22,967	3,58	1384,61	23,000	14,84	1383,86	22,975	9,38
Geraniol acetato	1383	1392,29	23,258	1,86	-	-	-	-	-	-
cipereno	1398	1419,54	24,142	0,35	-	-	-	1419,79	24,150	1,38
β-cariofileno	1418	1431,27	24,517	15,29	1430,74	24,500	38,43	1430,21	24,483	30,63
α - bergamoteno	1436	1443,50	24,908	0,90	144,81	24,950	3,91	1444,03	24,925	4,03
α - humuleno	1454	1464,60	25,583	1,10	1465,92	25,625	v	1464,88	25,592	2,48
aloaromadendreno	1461	1471,92	25,817	v	-	-	-	-	-	-
β- acoradineno	1466	1502,81	26,808	0,37	-	-	-	1503,37	26,817	1,26
Biclogermacreno	1494	1508,60	26,975	0,51	-	-	-	-	-	-
α - muurolene	1499	1511,35	27,058	0,57	-	-	-	1511,91	27,075	1,34
β- bisabolone	1509	1516,88	27,225	0,32	-	-	-	1517,44	27,242	1,18
δ- cadineno	1524	1535,34	27,783	2,83	1536,47	27,817	8,52	1535,64	27,792	7,64
Oxido de cariofileno	1581	1599,60	29,725	2,83	1602,47	29,808	v	1601,60	29,783	1,48

K: Índice de Kovats; IKC: Índice de Kovats calculado; TR: Tempo de Retenção; (%): Porcentagem relativa, (v): vestígio; (negrito) corresponde aos componentes majoritários.

Tabela 2.14 - Compostos identificados no óleo essencial e fração hexânica de *Lippia salvifolia*

Composto	IK	PERÍODO DE SECA						PERÍODO DE ÁGUAS					
		Óleo essencial			Hexano			Óleo essencial			Hexano		
		IKC	TR	%	IKC	TR	%	IKC	TR	%	IKC	TR	%
α- pineno	0939	-	7,333	0,46	-	7,358	10,85	-	7,392	1,66	-	7,433	2,91
Canfeno	0953	-	7,808	0,05	-	7,833	0,35	-	-	-	-	-	-
Sabineno	0976	-	8,625	0,15	-	8,642	0,76	-	8,683	0,59	-	8,708	1,02
β- pineno	0980	-	8,725	0,38	-	8,750	0,94	-	8,783	0,95	-	8,808	1,32
β- mirceno	0991	-	9,217	0,16	-	9,233	1,64	-	9,275	v	-	-	-
Limoneno	1031	1030,99	10,533	0,45	1031,47	10,550	1,76	1032,39	10,583	1,29	1032,39	10,583	0,76
β- trans - ocimeno	1050	1050,57	11,233	0,13	-	-	-	1051,97	11,283	0,55	1051,75	11,275	0,75
linalol	1098	1106,68	13,242	0,89	1106,68	13,242	0,43	1107,37	13,267	1,10	1106,90	13,250	0,70
4- terpinol	1177	1186,49	16,092	0,27	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α - terpineol	1189	1200,00	16,625	0,06	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Verbenone	1204	1220,29	17,342	0,11	1220,86	17,362	1,18	-	-	-	-	-	-
Verbenil acetato cis	1282	-	-	-	1293,89	19,942	0,85	-	-	-	-	-	-
Verbenil acetato trans	1292	-	-	-	1304,73	20,317	8,52	-	-	-	-	-	-
α – copaeno	1376	1383,63	22,967	0,88	1384,10	22,983	2,59	1384,37	22,992	0,51	1384,10	22,983	1,82
β- bourboneno	1384	1393,03	23,283	0,21	-	-	-	-	-	-	1393,78	23,308	0,71
β- elemeno	1391	1400,00	23,517	0,64	-	-	-	1400,78	23,542	0,49	1400,25	23,525	1,50
β-cariofileno	1418	1432,05	24,542	6,43	1430,21	24,483	7,48	1430,49	24,492	2,50	1430,21	24,483	7,25
α - gurjuneno	1409	1439,09	24,767	0,14	-	-	-	-	-	-	1439,34	24,775	0,53
α - humuleno	1454	1465,92	25,625	3,10	1465,13	25,600	1,19	1465,67	25,617	1,63	1465,38	25,608	5,10
aloaromadendreno	1461	1472,95	25,850	0,91	1473,20	25,858	1,13	1473,48	25,867	0,73	1472,95	25,850	2,37
γ- muurolene	1477	1489,62	26,383	0,43	1488,34	26,342	0,42	-	-	-	1488,59	26,350	0,98
Germacreno D	1480	1495,09	26,558	6,15	1493,28	26,500	17,46	1493,03	26,492	10,28	1493,81	26,517	25,18
β- selineno	1485	1499,00	26,683	0,58	-	-	-	-	-	-	1498,75	26,675	0,93
Biciclogermacreno	1494	1509,70	27,008	1,34	1509,70	27,008	1,34	1509,99	27,017	1,53	1509,70	27,008	3,08
α - muurolene	1499	1512,74	27,100	0,23	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Germacreno A	1503	1519,92	27,317	1,40	1519,09	27,292	2,22	1519,36	27,300	0,92	1518,80	27,283	2,30
γ – cadineno	1513	-	-	-	1530,11	27,625	0,50	1529,85	27,617	0,52	1529,29	27,600	0,68
δ- cadineno	1524	1535,90	27,800	0,78	1536,17	27,808	0,82	1536,17	27,808	0,60	1535,90	27,800	1,09
Nerolidol	1564	1587,76	29,367	57,04	1575,35	28,992	31,94	1575,35	28,992	67,98	1575,61	29,000	29,65
Germacrenol	1574	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1591,59	29,483	0,70
Espatuleno	1576	1603,34	29,833	2,86	-	-	-	-	-	-	1596,03	29,617	0,75

IK: Índice de Kovats; IKC: Índice de Kovats calculado; TR: Tempo de Retenção; (%): Porcentagem relativa; (v): vestígio; (negrito) corresponde aos componentes majoritários.

4.1.1.5 Gênero *Stachytarpheta*

Para o gênero *Stachytarpheta*, apenas *S. gesnerioides* pode ser analisada pelo método proposto, sendo que as demais espécies não produziram separação de fases óleo essencial/água, bem como não apresentaram um perfil cromatográfico que possibilitasse a identificação confiável dos compostos da fração hexânica.

Para *Stachytarpheta gesnerioides* (Tabela 2.15) o guaiol foi identificado como substância principal (>50%), tanto no óleo quanto na fração hexânica, seguido por um composto que não foi identificado através das técnicas disponíveis.

4.1.1.6 Gênero *Vitex*

Em *Vitex polygama* (Tabela 2.16) observamos a predominância de sesquiterpenos, principalmente o β -cariofileno, germacreno D e biciclogermacreno. No período das águas a espécie apresentou marcada presença de monoterpenos, como o α -pineno, β -pineno e β -trans-ocimeno. O β -cariofileno foi o composto majoritário detectado no óleo volátil na estação de águas, não tendo sido identificado no período seco. Apesar de a produção do óleo ter apresentado baixo rendimento, não houve grande variação entre as estações seca e de águas (Tabela 2.3).

Tabela 2.15 - Compostos identificados no óleo essencial e fração hexânica de *Stachytarpheta gesnerioides*

Composto	IK	PERÍODO DE SECA						PERÍODO DE ÁGUAS					
		Óleo essencial			Hexano			Óleo essencial			Hexano		
		IKC	TR	%	IKC	TR	%	IKC	TR	%	IKC	TR	%
α-pineno	0939	-	7,375	0,31	-	7,375	16,09	-	7,408	2,10	-	7,425	4,01
β-pineno	0980	-	-	-	-	8,767	1,46	-	-	-	-	-	-
1-Octen-3-ol	0978	-	8,992	0,46	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Octanol-3	0993	1002,32	9,508	0,23	-	-	-	-	-	-	-	-	-
isocariofileno	1404	1431,27	24,517	1,51	1430,74	24,500	1,71	-	-	-	-	-	-
α-humuleno	1454	1466,45	25,642	1,55	1465,92	25,625	1,55	-	-	-	-	-	-
Não identificado	-	1499,00	26,683	0,45	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Biciclogermacreno	1494	1511,09	27,050	1,26	1510,26	27,025	1,42	-	-	-	-	-	-
β-sesquifelandreno	1524	1539,77	27,917	4,72	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Não identificado	-	1567,07	28,742	2,33	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Não identificado	-	1592,98	29,525	0,36	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Espatuleno	1576	1597,95	29,675	1,28	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxido de cariofileno	1581	1601,92	29,792	0,68	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Guaiol	1595	1625,97	30,483	56,50	1616,71	30,217	53,52	1616,40	30,208	65,98	1615,84	30,192	64,06
Não identificado	-	1633,25	30,692	1,36	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Não identificado	-	1654,70	31,308	1,62	-	-	-	1652,68	31,250	1,15	-	-	-
Não identificado	-	1657,90	31,400	1,28	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Não identificado	-	1665,15	31,608	1,36	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Não identificado	-	1673,57	31,850	1,50	1677,92	31,975	5,97	1677,92	31,975	6,80	1677,05	31,950	7,28
Não identificado	-	1680,81	32,058	6,34	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Não identificado	-	1693,31	32,417	13,16	1688,65	32,283	14,45	1688,37	32,275	18,68	1687,50	32,250	19,45
Não identificado	-	1717,11	33,075	1,75	1714,98	33,017	3,84	1714,68	33,009	2,09	1714,06	32,992	5,19

IK: Índice de Kovats; IKC: Índice de Kovats calculado; TR: Tempo de Retenção; (%): Porcentagem relativa; (negrito) corresponde aos componentes majoritários.

Tabela 2.16 - Compostos identificados no óleo essencial e fração hexânica de *Vitex polygama*

Composto	IK	PERÍODO DE SECA						PERÍODO DE ÁGUAS					
		Óleo essencial			Hexano			Óleo essencial			Hexano		
		IKC	TR	%	IKC	TR	%	IKC	TR	%	IKC	TR	%
α - pineno	0939	-	-	-	-	7,387	5,15	-	7,408	5,51	-	7,450	4,48
β -pineno	0980	-	8,725	0,50	-	8,783	6,48	-	-	-	-	8,825	5,72
β -mirceno	0991	-	-	-	-	-	-	-	9,283	v	-	-	-
3-careno- δ	1011	-	-	-	-	-	-	1015,16	9,967	3,83	-	-	-
limoneno	1031	-	-	-	-	-	-	1033,09	10,608	v	-	-	-
β -cis-ocimeno	1040	-	-	-	-	-	-	1042,43	10,942	0,91	-	-	-
β -trans-ocimeno	1050	-	-	-	-	-	-	1052,67	11,308	6,36	-	-	-
terpinoleno	1088	-	-	-	-	-	-	1094,41	12,800	1,36	-	-	-
Longiciclono	1373	-	-	-	-	-	-	1377,17	22,750	2,90	-	-	-
α - copaeno	1376	1383,12	22,950	1,24	-	-	-	1385,11	23,017	5,61	-	-	-
β - elemeno	1391	1399,73	23,508	0,46	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-cariofileno	1418	1429,71	24,467	11,53	1431,27	24,517	23,71	1431,27	24,517	9,89	1430,74	24,500	22,40
Cis- β -farneseno	1443	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-cariofileno	1454	1464,35	25,575	1,50	-	-	-	1467,23	25,667	38,83	1465,38	25,608	1,79
Aloaromadendreno	1461	1472,17	25,825	0,73	-	-	-	-	-	-	-	-	-
γ - muuroleno	1477	1487,55	26,317	0,96	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Germacreno D	1480	1492,75	26,483	14,23	1494,06	26,525	46,64	1494,06	26,525	8,94	1493,81	26,517	44,39
Biclogermacreno	1494	1509,70	27,008	17,09	1511,09	27,050	18,03	1511,09	27,050	7,13	1510,26	27,025	17,52
β - bisaboleno	1509	1518,27	27,267	1,15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
γ - cadineno	1513	1525,98	27,500	0,82	-	-	-	-	-	-	1527,37	27,542	1,29
Cubebol	1514	1528,72	27,583	0,70	-	-	-	-	-	-	-	-	-
δ - cadineno	1524	1535,34	27,783	2,33	-	-	-	1537,00	27,833	4,73	1535,90	27,800	1,35
Germacreno B	1556	1572,30	28,900	8,75	-	-	-	-	-	-	1573,40	28,933	0,96
Espatuleno	1576	1596,29	29,625	9,56	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Globulol	1583	1602,19	29,800	7,58	-	-	-	1603,06	29,825	v	-	-	-
Viridiflorol	1590	1610,31	30,033	2,76	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tau-Cadinol	1640	1659,05	31,433	6,32	-	-	-	1662,26	31,525	v	-	-	-
Torreyol		1673,85	31,858	6,48	-	-	-		31,892	2,57	-	-	-

IK: Índice de Kovats; IKC: Índice de Kovats calculado; TR: Tempo de Retenção; (%): Porcentagem relativa; (v): vestígio; (negrito) corresponde aos componentes majoritários.

4.1.2 Isolamento e identificação estrutural dos constituintes majoritários de *Stachytarpheta glabra* por RMN

O processo de hidrodestilação das folhas de *Stachytarpheta glabra* resultou na formação de um sólido vermelho, parcialmente solúvel em água e completamente solúvel em clorofórmio. O sólido obtido foi purificado obtendo-se 600 mg do composto puro. Tal substância foi identificada por RMN como um iridóide, a fulvoipolamiida (Figura 2.1, composto 1) .

A partir do extrato etanólico, foram purificados 710 mg do componente ipolamiida (Figura 2.1, composto 2) e 253 mg do acteosídeo (Figura 2.1, composto 3), identificados através dos dados de RMN.

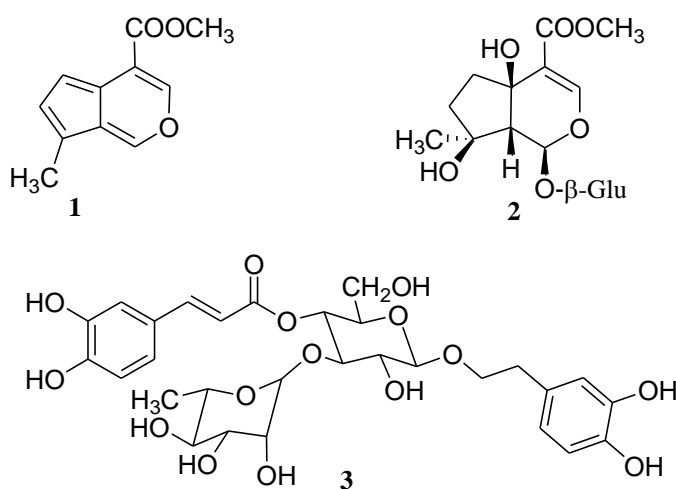


Figura 2.1 - Estrutura da fulvoipolamiida (1); ipolamiida (2) e acteosídeo(3).

4.1.3 Triagem fitoquímica de espécies de *Lippia* e *Lantana*

A análise fitoquímica das folhas das espécies de *Lippia* e *Lantana* (Tabela 2.17) indicou a presença de flavonóides, taninos, saponinas e heterosídeos. Não foi observada a presença de cumarina, enquanto os alcalóides foram identificados apenas para *Lippia salviifolia*. Para a maioria das espécies foram identificadas leucoantocianidinas, exceto para *Lippia martiana* e *Lippia aristata*.

Tabela 2.17 – Identificação de grupos de substâncias do metabolismo secundário nas folhas de espécies de *Lippia* e *Lantana*

Classe de substâncias	Reações químicas	Espécies				
		<i>Lantana aff. fucata</i>	<i>Lippia aristata</i>	<i>Lippia aff. microphylla</i>	<i>Lippia martiana</i>	<i>Lippia salviifolia</i>
Flavonóides	AlCl ₃ 5%	+	+	+	+	+
	H ₃ BO ₃	+	+	+	+	+
	NaOH 1N	-	-	+	+	+
	<i>Shinoda</i>	-	-	+	+	+
Leucoantocianidinas	HCl conc.	+	-	+	-	+
Taninos	Alcalóide	+	+	+	+	+
	Gelatina	+	+	-	+	-
	Sais de ferro	+	+	+	+	+
Heterosídeos	<i>Lieberman-Buchard</i>	-	+	+	-	+
	<i>Kedde</i>	+	-	+	+	-
Cumarinas	KOH 2N	-	-	-	-	-
Saponinas	Índice de espuma	1:500	1:500	1:500	1:333	1:250
Alcalóides	Dragendorff	-	-	-	-	+
Antraquinonas	<i>Bornträger</i>	+	+	+	-	+

(-) não detectado; (+) resultado positivo

4.2 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de espécies de *Lippia* e *Lantana*

Os rendimentos das frações etanólica e hexânica obtidas estão descritos na Tabela 2.18.

Tabela 2.18 – Rendimento das frações hexânica e etanólica de espécies de *Lippia* e *Lantana*

Amostra	Fração	Rendimento (%)
<i>Lippia aristata</i>	Etanólica	5,17
	Hexânica	0,45
<i>Lippia aff. microphylla</i>	Etanólica	11,76
	Hexânica	0,39
<i>Lippia martiana</i>	Etanólica	7,55
	Hexânica	0,22
<i>Lippia salviifolia</i>	Etanólica	7,49
	Hexânica	0,20
<i>Lantana aff. fucata</i>	Etanólica	9,24
	Hexânica	0,24

Os resultados do ensaio de atividade antioxidante das frações hexânica e etanólica das espécies de *Lippia* e *Lantana* foram expressos em percentual de inibição das amostras em relação ao controle, através do qual foi calculada a concentração inibitória de 50% (CI₅₀) do radical livre DPPH, expressa em µg/mL (Tabela 2.19).

Os extratos etanólicos de todas as espécies testadas apresentaram excelente atividade antioxidante (CI₅₀ variando de 2,9 a 10,07 µg/mL) quando comparada às substâncias de referência: ácido ascórbico (CI₅₀=2,5 µg/mL) e BHT (CI₅₀=7,8 µg/mL). *Lantana aff. fucata* foi a espécie que apresentou menor valor de CI₅₀ (2,9 µg/mL).

Tabela 2.19 – Valores de CI_{50} para atividade antioxidante de espécies de Verbenaceae

Amostra	Fração	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Lippia aristata</i>	Etanólica	4,90
	Hexânica	81,70
<i>Lippia aff. microphylla</i>	Etanólica	10,07
	Hexânica	61,90
<i>Lippia martiana</i>	Etanólica	5,00
	Hexânica	57,00
<i>Lippia salviifolia</i>	Etanólica	4,80
	Hexânica	68,20
<i>Lantana aff. fucata</i>	Etanólica	2,90
	Hexânica	75,10
Ácido Ascórbico	-	2,50
BHT	-	7,58

5 DISCUSSÃO

5.1 Caracterização química

5.1.1 Caracterização dos constituintes voláteis por CG/EM

Apesar de o óleo essencial ser a técnica mais usada para estudo dos componentes voláteis, a técnica de hidrodestilação necessita de grande disponibilidade de material vegetal, o que em alguns casos inviabiliza o estudo, devido à pequena quantidade disponível para análise química. Sendo assim, a partição hexânica mostrou-se como uma excelente alternativa ao estudo das substâncias voláteis majoritárias para a maioria das espécies estudadas, principalmente para aquelas do gênero *Lippia*, visto a grande sobreposição dos perfis cromatográficos obtidos pelos dois métodos.

Para as espécies *Bouchea fluminensis*, *Stachytarpheta reticulata*, *S. mexiae* e *Verbena litoralis* não foi possível visualizar a separação óleo essencial/água, em nenhum dos períodos analisados, mesmo quando grande quantidade de material vegetal foi usada para extração. Com a metodologia adotada de partição hexânica do extrato etanólico, as mesmas espécies não apresentaram perfis cromatográficos ideais para análise dos componentes voláteis, independente da época analisada. Tal fato justifica-se pela ausência ou pequena quantidade de óleo essencial produzido por essas espécies.

Trabalhos anteriores com extratos clorofórmicos de *Aegiphila lhotzkiana* demonstraram o isolamento e a identificação de esterol, esterol-glicosídico e acilglicosterol (LEITÃO, KAPLAN e MONACHE, 1992; 1993), provavelmente

responsáveis pela atividade antiinflamatória atribuída à espécie (LEITÃO *et al.*, 1996).

A análise do OE extraído de suas folhas das folhas de *Aegiphila lhotzkiana* apresentou variada constituição de monoterpenos (Tabela 2.4). No entanto, os compostos majoritários identificados produzidos por *A. lhotzkiana* foram os sesquiterpenos α e β -cariofileno e óxido de cariofileno, corroborando o trabalho de Luciano *et al.* (2005) que descreveu pela primeira vez a composição do óleo essencial das folhas de *A. lhotzkiana* do nordeste brasileiro.

A marcada presença do óxido de cariofileno compondo o óleo essencial, e sua ausência na fração hexânica, provavelmente, deve-se à sua formação a partir do β -cariofileno. Tal conversão é comum em folhas mais velhas ou quando decorrido muito tempo entre a extração do óleo e sua análise (PIMENTA, 2002).

Os componentes de *Aegiphila sellowiana* (Tabela 2.5) foram pela primeira vez descritos e apresentaram grande variação qualitativa e quantitativa.

De forma semelhante aos trabalhos realizados por Pino, Marbot e Fuentes (2004) e Ricciardi *et al.* (2005), o presente estudo químico para *Aloysia virgata* (Tabela 2.6) revelou a presença de pequena quantidade de monoterpenos. No entanto, a grande maioria dos compostos identificados se constituíram de sesquiterpenos, destacando-se o β -cariofileno, germacreno D e o biciclogermacreno. A possível ação ligeiramente tóxica da espécie não é descartada, devido à presença do germacreno, que por oxidação, origina uma série de compostos lactônicos que produzem reações citotóxicas ou reações cutâneas (RICCIARDI *et al.*, 2005).

A comparação entre os métodos de extração para *Aloysia virgata*, evidenciada pelas análises relativas à estação das águas, demonstra, principalmente, diferenças quantitativas dos componentes majoritários. Sendo assim, a partição hexânica é uma excelente alternativa ao estudo das substâncias voláteis majoritárias da espécie, considerando a pequena quantidade de material vegetal empregada quando comparado à hidrodestilação. As diferenças entre os períodos seco e de águas são, principalmente, quantitativas, destacando-se o alto teor de δ -guaieeno na estação seca.

O perfil químico de *Lantana fucata* foi pela primeira vez determinado e foi semelhante àqueles já relatados para o gênero *Lantana* (MUHAYIMANA

CHALCHAT e GARRY, 1998; DA SILVA *et al.*, 1999). O perfil cromatográfico para a fração hexânica no período de chuvas mostrou-se diferente dos demais perfis analisados para a mesma espécie, com destacado teor de β -pineno, β -elemeno e δ -guaïeno, podendo tratar-se de um quimiotipo distinto de *L. fucata*. Os dados obtidos no período seco evidenciaram que a partição do extrato etanólico em hexano é um método de extração eficiente de análise da espécie, uma vez que forneceram resultados comparáveis em termos de compostos majoritários ao do óleo essencial.

As espécies *Lantana fucata* e *Lantana aff. fucata* apresentaram grande semelhança química ao compararmos os componentes majoritários presentes no OE e FH (Tabelas 2.7 e 2.8).

Dentro da família Verbenaceae, o gênero *Lippia* destaca-se pela alta produção de compostos voláteis com variada constituição de monoterpenos e sesquiterpenos. A análise da espécie *Lippia aristata* (Tabela 2.9) demonstrou marcada presença de monoterpenos, principalmente α -pineno, β -pineno e limoneno. Dentre os sesquiterpenos, identificamos o β -cariofileno e o germacreno D. Tais dados são concordantes com a literatura, onde o β -cariofileno compõe grande parte do óleo volátil para as espécies estudadas do gênero (PASCUAL, 2001).

As duas populações de *Lippia aff. microphylla* apresentaram perfis químicos (Tabelas 2.10 e 2.11) abundantes em monoterpenos, destacando-se o α -pineno. Os principais sesquiterpenos identificados foram o β -cariofileno, α -humuleno, germacreno D e o biciclogermacreno. A marcada presença dos dois primeiros componentes anteriormente citados sugere atividade antiinflamatória para a espécie (PASSOS *et al.*, 2007).

Apesar de *Lippia aff. microphylla* ter apresentado um perfil abundante em monoterpenos, não foram identificados o timol e o 1,8 cineol, componentes principais óleo essencial extraído das folhas de *L. microphylla* proveniente do nordeste do Brasil (COSTA *et al.*, 2005). A divergência entre esses perfis químicos pode ser devida a fatores ambientais ou genéticos, sendo necessários estudos em ambiente controlado com plantas das duas procedências (POTZERNHEIM, BIZZO e VIEIRA, 2006). Quanto à sazonalidade, observa-se a presença do α -felandreno apenas no óleo essencial extraído durante o período seco, o que sugere que tal substância seja produzida em pequena quantidade, ou não produzida, durante o período de águas.

Para a espécie *Lippia martiana* (Tabelas 2.12 e 2.13) observa-se elevado teor de α -pineno, 3-careno- δ , α -copaeno e β -cariofileno. No campo, foram encontradas populações contendo indivíduos com flores rosa ou branca. A análise comparativa dos cromatogramas demonstra não existir significativa diferença em suas constituições químicas, exceto pela maior porcentagem de β -cis-ocimeno nos indivíduos com flores brancas.

As espécies *Lippia salviifolia* e *Lippia sidoides* apresentam grande semelhança do ponto de vista morfológico, sendo um importante problema taxonômico a ser elucidado. Dentre os monoterpenos identificados para *Lippia salviifolia* (Tabela 2.14), não se identificou o carvacrol e o timol, importantes componentes do óleo essencial de *L. sidoides* (MATOS *et al.*, 1999; NUNES *et al.*, 2005; BOTELHO *et al.*, 2007). Tais variações podem ser devidas a condições ambientais divergentes, como luz, disponibilidade de nutrientes, estação do ano, período do dia, ciclo da planta, como também por fatores genéticos. Em *L. salviifolia*, o nerolidol foi o composto majoritariamente encontrado, tendo-se observado maior percentual deste nos óleos essenciais em relação àquele obtido nas frações hexânicas.

Apesar de os resultados obtidos para extração e análise dos componentes voláteis das espécies de *Stachytarpheta* não terem sido satisfatórios, para *S. gesnerioides* o guaiol foi o composto majoritário identificado tanto no OE quanto na FH (Tabela 2.15).

Vitex polygama apresentou perfil cromatográfico (Tabela 2.16) bastante semelhante e concordante com a literatura para o gênero, destacando-se a produção de sesquiterpenos, conforme descrito por Tavares *et al.* (1999). A marcada presença do β -cariofileno foi também descrita por Leitão, Fonseca e Dos Santos (1999). Por outro lado, o germacreno D e biciclogermacreno não haviam sido identificados no óleo essencial da espécie.

5.1.2 Isolamento e identificação estrutural dos constituintes majoritários de *Stachytarpheta glabra* por RMN

O aspecto diferenciado observado durante o processo de hidrodestilação das folhas de *Stachytarpheta glabra* conduziram ao aprofundamento do estudo de seus componentes. A fulvoipolamiida foi pela primeira vez purificada e identificada. No entanto, a revisão da literatura envolvendo os compostos químicos descritos para o gênero demonstrou apenas a forma do iridóide ligado ao açúcar. Assim, foi utilizada uma técnica alternativa (*Soxhlet*) com o propósito de observar a presença do iridóide glicosídico nas folhas da espécie. Após todo o processo, foram identificados os compostos ipolamiida e acteosídeo, identificados pela primeira vez para a espécie.

Provavelmente, a formação da fulvoipolamiida ocorreu durante o processo de hidrodestilação a partir da ipolamiida, favorecida pela alta temperatura e baixo pH, uma vez que a fulvoipolamiida não foi identificada no extrato etanólico (Figura 2.2).

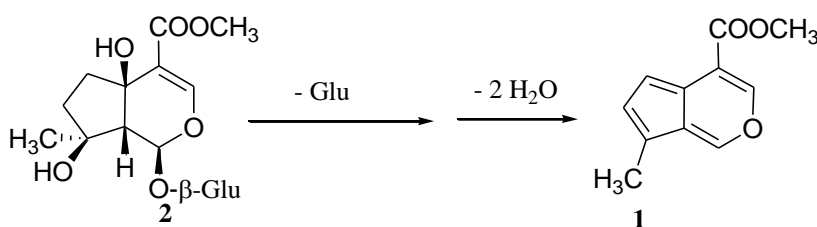


Figura 2.2 - Formação da fulvoipolamiida (1) a partir da ipolamiida (2).

Os iridóides glicosídicos, como a ipolamiida, são importantes marcadores na quimiotaxonomia da família Verbenaceae, principalmente, dentro do gênero *Stachytarpheta*. Investigações prévias revelaram a ocorrência de iridóides glicosídicos, esteróides, flavonóides, feniletanóides e fenilpropanóides glicosídicos, além de alguns outros compostos fenólicos (CHOWDHURY *et al.*, 2003). O composto ipolamiida foi descrito para grande número de espécies do gênero *Stachytarpheta*, incluindo *S. jamaicensis*, *S. cayennensis*, *S. indica*, *S. australis*, *S. guyanensis* e *S. mutabilis* (CHOWDHURY *et al.*, 2003). Várias atividades biológicas

têm sido atribuídas à presença de tais componentes, como antimicrobiana, antitumoral, antiinflamatória, antinociceptiva, hepatoprotetora e laxativa. Além disso, parecem inibir a secreção gástrica e serem ativos para tratamento de imunopatologias relacionadas ao estresse oxidativo (RECIO *et al.*, 1994; MESIA-VELA *et al.*, 1997; SCHAPOVAL *et al.*, 1998; CHOWDHURY *et al.*, 2003, 2004; ALVAREZ *et al.*, 2004; MESIA-VELA *et al.*, 2004).

Assim, testes biológicos com a espécie *Stachytarpheta glabra* deverão ser realizados, uma vez que o estudo químico revela a espécie como uma promissora fonte de produtos bioativos.

5.1.3 Triagem fitoquímica de espécies de *Lippia* e *Lantana*

Os polifenóis foram uma das mais relevantes classes de metabólitos secundários identificados nos gêneros *Lippia* e *Lantana*, conforme pode ser visto na Tabela 2.17. Os flavonóides e as antraquinonas são classes específicas a que pertencem os polifenóis, identificados através de reações particulares dentro de cada grupo. Os flavonóides constituem um grupo de substâncias naturais, que demonstram grande variedade de atividades biológicas (RICHARDSON *et al.*, 1974; PRATT e BIRAC, 1979; RIOS *et al.*, 1992). Essa classe de compostos é amplamente distribuída no reino vegetal. São compostos encontrados em abundância nas angiospermas, apresentando nesse grupo enorme diversidade estrutural (SIMÕES *et al.*, 2003). Tais componentes apresentam efeitos importantes na fisiologia e bioquímica da planta, como ação antioxidante, inibidores enzimáticos e precursores de substâncias tóxicas. Estes compostos estão envolvidos na fotossensibilização e na transferência de energia, em ações de hormônios regulatórios do crescimento da planta, no controle respiratório, na fotossíntese, na morfogênese, na determinação do sexo, bem como na defesa contra patógenos (SMITH e BANKS, 1986). Dentre as atividades biológicas desempenhadas por tal classe de compostos fenólicos, Pratt e

Birac (1979) demonstraram os efeitos antioxidantes da quercetina, quercitrina, miricetina, quercetina 3-monoglicosídeo e quercetina 3-triglicosídeo, extraídos de sementes de diversas plantas. Rios *et al.* (1992) testaram os efeitos de cinco flavonóides glicosilados de *Sideritis javalambrensis* como inibidores da peroxidação de lipídeos nos microsomas. Richardson *et al.* (1974) testaram o efeito de flavonas e derivados de flavonas como antioxidantes em amostras de leite e comprovaram a eficácia de suas ações.

Muitos extratos de plantas, particularmente os que contêm flavonóides, parecem apresentar uma significativa atividade antioxidante, capaz de diminuir os efeitos nocivos gerados pelos radicais livres, e conseqüentemente, o surgimento de doenças a eles associados.

5.2 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de espécies de *Lippia* e *Lantana*

A marcante presença dos compostos fenólicos nas folhas *Lippia aristata*, *Lippia aff. microphylla*, *Lippia martiana*, *Lippia salviifolia* e *Lantana aff. fucata* (Tabela 2.17) sugeriu um potencial efeito antioxidante para as espécies.

Além dos compostos fenólicos, a presença de saponinas é comum a todas as espécies estudadas. O comportamento anfílico das saponinas e a capacidade de formar complexos com esteróides, proteínas e fosfolipídeos de membranas determinam um número variado de propriedades biológicas para essas substâncias, destacando-se a ação sobre membranas celulares ao alterar a sua permeabilidade ou causar sua destruição. Relacionadas com essa ação sobre membranas, estão as atividades hemolítica, ictiotóxica e molusquicida, freqüentemente observadas. Para algumas saponinas, também foi relatada ação espermicida. O mecanismo proposto sugere a ruptura da membrana plasmática do espermatozóide. A atividade anti-helmíntica foi apontada para um número significativo de saponinas, no entanto, a irritação causada nas mucosas tem impedido o desenvolvimento de aplicações

práticas. Além dessas ações, as atividades hipocolesterolemiantes, antiinflamatória e antiviral têm sido sugeridas (SIMÕES *et al.*, 2003).

A busca por opções terapêuticas para diferentes patologias faz da pesquisa de produtos naturais um campo fértil em opções de moléculas com diferentes atividades biológicas. As plantas apresentam em seus metabólitos secundários uma grande fonte de possíveis fármacos devido à diversidade de moléculas com as mais variadas estruturas e propriedades químicas. A relevância da pesquisa de produtos naturais proporciona a descoberta de novos fármacos e o estudo de plantas que apresentem substâncias que possam agir sobre as diferentes espécies oxidantes geradas em nosso organismo torna-se de grande importância.

A elevada atividade antioxidante *in vitro* exibida pelos extratos de *Lippia* e *Lantana* (Tabela 2.19) demonstra que as espécies estudadas podem ser uma importante fonte de antioxidantes naturais e justifica pesquisas futuras visando ao isolamento dos componentes responsáveis por tal efeito.

Provavelmente, a atividade antioxidante demonstrada pelos extratos deve-se à presença dos compostos fenólicos, principalmente aos flavonóides. Muitas ações biológicas destes compostos são atribuídas às suas propriedades antioxidantes e à sua possível influência do estado redox intracelular. O mecanismo preciso exercido pelos flavonóides destas ações benéficas e tóxicas ainda permanece pouco conhecido. Entretanto, alguns estudos têm demonstrado que sua atividade antioxidante clássica deve-se às suas propriedades redox e estruturas químicas, que possibilitam a estes compostos exercerem a função de neutralizar radicais livres, quelar metais reativos e agirem como captadores de oxigênio no estado *singlete* e *tripleto* (CHUM *et al.*, 2005). Segundo Spencer *et al.* (2001) é pouco provável serem essas as únicas explicações para os efeitos celulares benéficos comprovados dos flavonóides.

6 CONCLUSÃO

A partição hexânica do extrato etanólico é uma alternativa eficaz ao estudo das substâncias voláteis majoritárias para a maioria das espécies estudadas, principalmente para aquelas do gênero *Lippia*, visto a grande sobreposição dos perfis cromatográficos obtidos pelos dois métodos de extração.

De forma geral, ao compararmos as análises realizadas durante o período seco e de águas para cada uma das espécies, não foram observadas diferenças significativas. Quanto ao rendimento, pequenas diferenças foram notadas entre os períodos analisados, exceto para *Lippia aff. microphylla*, *Lippia martiana* e *Stachytarpheta gesnerioides*, que apresentaram rendimento consideravelmente maior no período de águas.

O estudo dos componentes voláteis foi inédito para nove das espécies estudadas, sendo uma fonte importante para pesquisas posteriores envolvendo ensaios biológicos com OE e FH, uma vez que muitos dos componentes majoritários identificados possuem ação biológica comprovada. Para outras três espécies já haviam relatos na literatura, mas nenhum com as espécies coletadas na Serra do Cipó.

O estudo diferenciado de *Stachytarpheta glabra* conduziu à purificação, ao isolamento e identificação dos compostos ipolamiida, acteosídeo e fulvoipolamiida, descritos pela primeira vez para a espécie. Uma vez que várias atividades biológicas têm sido atribuídas à presença de tais componentes, testes biológicos com a espécie deverão ser realizados para busca por produtos bioativos.

A atividade antioxidante demonstrada pelos extratos etanólicos de *Lippia* e *Lantana*, comparável aos antioxidantes comerciais BHT e ácido ascórbico, provavelmente, deve-se à presença dos compostos fenólicos, principalmente aos flavonóides identificados na triagem fitoquímica.

CONSIDERAÇÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Em função da inexistência de trabalhos envolvendo as espécies estudadas quanto aos pontos abordados, o estudo biossistemático baseou-se na caracterização clássica das espécies vegetais através da caracterização citogenética, palinológica e da estimativa do conteúdo de DNA nuclear. As principais correlações entre as três características avaliadas podem ser observadas na Tabela 0.1. Os números cromossômicos encontrados variaram de $2n=24$ em *Lantana fucata*, *Lippia aristata*, *Lippia aff. microphylla* e *Lippia salviifolia* a $2n=84$ em *Aegiphila sellowiana*. Como o número básico sugerido para os gêneros estudados é baixo, assim como pode ser observado para a maioria das plantas, provavelmente as espécies estudadas são poliplóides. O fato de as espécies possuírem tamanho do genoma “muito pequeno”, uma vez que a quantidade $2C$ de DNA variou de 1,14 pg em *Vitex polygama* a 10,35 pg em *Bouchea fluminensis*, corrobora a hipótese de as espécies estudadas neste trabalho serem poliplóides, uma vez que famílias com pequeno genoma apresentam alta porcentagem de espécies poliplóides (cerca de 80%) (GRIF, 2000). Considerando o aumento do tamanho do genoma como um caráter derivado, dentre os gêneros estudados em Verbenaceae, *Bouchea* parece ser o mais derivado. No gênero *Stachytarpheta*, as espécies *S. gesnerioides* e *S. reticulata* provavelmente são mais derivadas que *S. mexiae*, *S. glabra* e *S. procumbens*. Adicionalmente, foram estabelecidas algumas relações filogenéticas baseando-se nas características polínicas, conforme sugerido por Walker e Doyle (1975) e Raj (1983). A abertura tricolpada é um caráter primitivo, seguida pela abertura tricolporada e pororada. Assim, os gêneros *Stachytarpheta*, *Vitex* e *Aegiphila* provavelmente são menos derivados que *Aloysia*, *Bouchea*, *Lantana*, *Lippia* e *Verbena*. Dentro da subfamília Verbenoideae, o gênero *Stachytarpheta* possivelmente emerge como o menos derivado, pois, além da abertura tricolpada, apresenta ornamentações (verrugas) na parede polínica. Os gêneros que apresentam grãos de pólen tricolporados (*Aloysia*, *Lippia*, *Lantana* e *Verbena*) provavelmente são menos primitivos, no entanto, dentre dos gêneros estudados, *Bouchea* seria o mais derivado por apresentar pólen tripolorado.

O elevado número cromossômico, a quantidade de DNA superior às demais espécies estudadas e o pólen tripolorado e psilado sugerem fortemente que *Bouchea* seja o gênero mais derivado dentre os sete gêneros estudados. No entanto, estudos posteriores envolvendo maior número de representantes por gênero poderão suportar tal hipótese.

Tabela 0.1 – Quantidade de DNA, número cromossômico e classificação polínica de dezessete espécies de Verbenaceae da Serra do Cipó – MG

Espécie	Quantidade 2C de DNA nuclear (pg)	Número cromossômico (2n)	Classificação polínica	
			Aberturas	Exina
<i>Vitex polygama</i>	1,14	34	Tricolpado	Reticulada
<i>Stachytarpheta procumbens</i>	1,55	58	Tricolpado	Verrucada
<i>Stachytarpheta glabra</i>	1,62	62	Tricolpado	Verrucada
<i>Stachytarpheta mexiae</i>	1,63	56	Tricolpado	Verrucada
<i>Lantana aff fucata</i>	1,95	38	Tricolporado	Psilada
<i>Lantana fucata</i>	2,02	24	Tricolporado	Psilada
<i>Lippia aristata</i>	2,07	24	Tricolporado	Psilada
<i>Lippia salviifolia</i>	2,32	24	Tricolporado	Psilada
<i>Aloysia virgata</i>	2,35	36	Tricolporado	Psilada
<i>Lippia martiana</i>	2,36	24	Tricolporado	Psilada
<i>Lippia aff. microphylla</i>	2,37	24	Tricolporado	Psilada
<i>Stachytarpheta gesnerioides</i>	2,91	54	Tricolpado	Verrucada
<i>Stachytarpheta reticulata</i>	2,94	82	Tricolpado	Verrucada
<i>Aegiphila. sellowiana</i>	2,94	84	Tricolpado	Eqüinada
<i>Aegiphila lhotzkiana</i>	2,94	72	Tricolpado	Eqüinada
<i>Verbena litoralis</i>	3,31	56	Tricolporado	Psilada
<i>Bouchea fluminensis</i>	10,35	78	Tripolorado	Rugulada a escabrada

Através da análise comparativa entre os perfis cromatográficos obtidos a partir do óleo essencial e do extrato etanólico particionado em hexano das espécies de Verbenaceae estudadas, observou-se grande semelhança quantitativa e, principalmente qualitativa, entre os componentes majoritários identificados. A grande maioria dos estudos envolvendo os componentes voláteis de origem vegetal são realizados a partir dos óleos essenciais obtidos a partir do processo de hidrodestilação. No entanto, a técnica necessita de grande disponibilidade de material vegetal, o que em alguns casos inviabiliza o estudo, devido à pequena

quantidade disponível para análise química. Sendo assim, a partição hexânica do extrato etanólico é uma alternativa ao estudo das substâncias voláteis majoritárias para a maioria das espécies estudadas, principalmente para aquelas do gênero *Lippia*, visto a grande sobreposição dos perfis cromatográficos obtidos pelos dois métodos de extração. Para as demais espécies, destacando-se *Bouchea fluminensis*, *Stachytarpheta procumbens*, *Stachytarpheta mexiae*, *S. reticulata* e *Verbena litoralis* o método deve passar por modificações, uma vez que os resultados não foram satisfatórios.

De forma geral, a comparação entre os componentes majoritários identificados nas espécies durante os períodos seco e chuvoso, independente da forma de extração, observa-se que as diferenças são principalmente quantitativas. Quanto ao rendimento, nota-se pequenas diferenças entre os períodos seco e chuvoso, exceto para *Lippia aff. microphylla*, *Lippia martiana* e *Stachytarpheta gesnerioides*, que apresentaram maior rendimento no período chuvoso.

O estudo dos componentes voláteis das onze espécies de Verbenaceae foi inédito para *Aegiphila sellowiana*, *Lantana aff. lundiana*, *L. aff. fucata*, *L. fucata*, *Lippia aff. microphylla*, *L. martiana*, *L. salviifolia*, *Stachytarpheta gesnerioides* e *Vitex sellowiana*, tornando-se uma fonte importante para pesquisas posteriores envolvendo ensaios biológicos tanto com o óleo essencial quanto à fração hexânica, uma vez que muitos dos componentes majoritários identificados apresentam ação biológica comprovada cientificamente (Tabela 0.2). Para as demais espécies já haviam relatos na literatura, mas nenhum com as espécies da Serra do Cipó.

As semelhanças morfológicas entre *Lippia aff. microphylla* e *Lippia microphylla* e entre *Lippia salviifolia* e *Lippia sidoides* são um importante problema taxonômico. Do ponto de vista químico, *Lippia aff. microphylla* apresentou um perfil abundante em monoterpenos, no entanto, não foram identificados o timol e 1,8 cineol, componentes principais óleo essencial extraído das folhas de *L. microphylla* (Costa *et al.*, 2005). Em *Lippia salviifolia* também foi identificada variada constituição de monoterpenos como o α -pineno, sabineno, β -pineno, mirceno e limoneno, não sendo identificados o carvacrol e o timol, importantes componentes do óleo essencial de *L. sidoides* (Matos *et al.*, 1999). A divergência entre esses perfis químicos pode ser devida a fatores ambientais ou genéticos, tornando-se necessários estudos em ambiente controlado com plantas das duas procedências para estabelecer conclusões mais definitivas (Potzernheim *et al.*, 2006).

Os compostos ipolamiida, acteosídeo e fulvoipolamiida foram pela primeira vez identificados para *Stachytarpheta glabra*. Os iridóides glicosídicos, como a ipolamiida, são importantes marcadores na quimiotaxonomia da família Verbenaceae, principalmente, dentro do gênero *Stachytarpheta*. Além disso, já foram descritas várias atividades biológicas para os componentes tais como antimicrobiana, antitumoral, antiinflamatória, antinociceptiva, hepatoprotetora e laxativa. As espécies do gênero são ainda usadas para inibição da secreção gástrica e tratamento de desordens imunopatológicas relacionadas ao estresse oxidativo (Recio *et al.*, 1994; Mesia-Vela *et al.*, 1997; Schapoval *et al.*, 1997; Chowdhury *et al.*, 2003, 2004; Alvarez *et al.*, 2004; Mesia-Vela *et al.*, 2004). Assim, testes biológicos com a espécie *Stachytarpheta glabra* deverão ser realizados, uma vez que o estudo químico revela a espécie como uma promissora fonte de produtos bioativos.

As frações hexânicas e etanólicas das espécies de *Lippia* e *Lantana* apresentaram boa atividade antioxidante, principalmente o extrato etanólicos (CI_{50} entre 2,9 e 10,07 $\mu\text{g/mL}$) quando comparada às substâncias de referência: ácido ascórbico ($CI_{50}=2,5 \mu\text{g/mL}$) e BHT ($CI_{50}=7,8 \mu\text{g/mL}$). O menor valor de CI_{50} foi identificado na fração etanólica de *Lantana aff. fucata* (2,9 $\mu\text{g/mL}$).

Resultados preliminares revelaram elevada atividade antioxidante *in vitro* exibida pelas frações etanólicas e sugerem que as espécies estudadas podem ser uma importante fonte de antioxidantes naturais e justifica pesquisas futuras visando o isolamento dos componentes responsáveis por tal efeito.

Provavelmente, a atividade antioxidante demonstrada pelas frações deve-se à presença dos compostos fenólicos, principalmente aos flavonóides, identificados na avaliação fitoquímica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABENA, A. A.; DIATEWA, N.; GAKOSSO, G.; GBEASSOR, M.; HONDI-ASSAH, TH.; OUAMBA, J. M. 2003. Analgesic, antipyretic and anti-inflammatory effects of essential oil of *Lippia multiflora*. **Fitoterapia**: **74** (3) 231-236.

ADAMS, R. 1995. **Identification of essential oil components by Gas Chromatography Mass Spectroscopy**. San Diego: Academic Press Inc, 469p.

ADEGOKE, G. O.; KUMAR, M. N.; GOPALAKRISHNA, A. G.; VARDARAJ, M. C.; SAMBAIAH, K.; LOKESH, B. R. 1998. Antioxidants and lipid oxidation in food – a critical appraisal. **Journal of Food Science Technology**, **35**: 283-298.

AHMAD, F.; LAU, L.C.; ALI, R.M.; KEAN, O.B. 2004. Anti-inflammatory activity of camaric acid from *Lantana camara*. **Current Topics in Phytochemistry**, **6**: 131-136.

AINSWORTH, C. 2000. Boys and girls come out to play: the molecular biology of dioecious plants. **Annals of Botany**, **86**: 211–221.

ALMEIDA, C.E.; KAMIKOWSKI, M.G.; FOLETO, R.; BALDISSEROTTO, B. 1995. Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. **Revista de Saúde Pública**, **29**: 428–433.

ALVAREZ, E., LEIRO, J.M., RODRIGUEZ, M., ORALLO, F. Inhibitory effects of leaf extracts of *Stachytarpheta jamaicensis* (Verbenaceae) on the respiratory burst of rat macrophages. **Phytotherapy Research**, **18**(6): 457-462.

ANDRADA, A.B.; PASTORIZA, A.; MARTÍNEZ-PULIDO, L.V. 1998. Citogenética en tres especies de Verbenaceas. **Revista de la Facultad de Agronomía de La Universidad del Zulia**, **15**: 312-318.

ARORA, O.P. 1978. Chromosomal differentiation in *Verbena* species. **Cytologia**, **43**: 525-531.

ATKINS, S. 1991. *Stachytarpheta sericea* Atkins (Verbenaceae) and its hybrid with *S. chamissonis* Walp. **Kew Bulletin**, **46**:281-289.

ATKINS, S. 2005. The genus *Stachytarpheta* (Verbenaceae) in Brazil. **Kew Bulletin**, **60** (2), 112p.

ATOUI, A.K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. 2005. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, **89**: 27-36.

BAELMANS, R.; DEHARO, E.; BOURDY, G.; MUÑOZ, V.; QUENEVO, C. SAUVAIN, M.; GINSBURG, H. 2000. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach Part IV. Is a new haem polymerisation inhibition test pertinent for the detection of antimalarial natural products? **Journal of Ethnopharmacology**, **73**: 271-275.

BARBOSA, F.G.; LIMA, M.A.S.; BRAZ-FILHO, R.; SILVEIRA, E.R. 2006. Iridoid and phenylethanoid glycosides from *Lippia alba*. **Biochemical Systematics and Ecology**, **34**: 819-821.

BARLOW, B.A. 1981. *Viscum album* in Japan: chromosomal translocations, maintenance of heterozygosity and the evolution of dioecy. **Botanical Magazine - Tokyo**, **94**: 21-34.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C.L.F. COSTA, C.G.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, H. C. 1986. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**, **3**. Imprensa Universitária. Universidade Federal de Viçosa. 326p.

BENNETT, M. D. 1973. Nuclear characters in plants. **Brookhaven Symposium in Biology**, **25**:344-366.

BENNETT, M.D.; LEITCH, I.J. 1995. Nuclear DNA Amounts in Angiosperms. **Annals of Botany**, **76**: 113-176.

BENNETT, M.D.; LEITCH, I.J. 2005. Nuclear DNA amounts in Angiosperms - progress, problems and prospects. **Annals of Botany**, **95**: 45-90.

BENTHAM, G. 1873. **Compositae**. In: BENTHAM, G. e HOOKER, J.D. (eds) *Genera Plantarum*. London. Lovell Reeve e Co., **2** (1):163-533.

BIANCO A.; GUIISO, M., LAVARONE, C.; MARINNI-BETTOLO, R.; TROGOLO, C. 1976. Iridoids XXI. The stereochemistry of ipolamiide and the structure of its natural 8-O-acetyl derivative ipolamiidoside. **Gazzetta Chimica Italiana**, **106** (1976): 947.

BISCHOFF, G. W. 1833. **Handbuch der botanischen Terminologie und Systemkunde**. I. Nürnberg, 1047p.

BONZANI, N.E.; FILLIPA, E.M.; BARBOZA, G.E. 1997. Particularidades epidérmicas em algumas espécies de Verbenaceae. **Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica**, **68** (2), 47-56.

BORBA, E.L.; SEMIR, J. 2001. Pollinator specificity and convergence in fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: a multiple population approach. **Annals of Botany**, **88**, 75-88.

BOSE, R.B.; CHOUDHURY, J.K. 1960. Cytological studies in *L. alba* (Mill) N. E. Br. **Bulletin of the Botanical Society of Bengal**, **14**: 71-72.

BOTELHO, M.A.; NOGUEIRA, N.A.P.; BASTOS, G.M.; FONSECA, S.G.C.; LEMOS, T.L.G.; MATOS, F.J.A.; MONTENEGRO, D.; HEUKELBACH, J.; RAO, V.S.; BRITO, G.A.C. 2007. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **40**: 349-356.

BOTTA, S.M. 1979. Las especies argentinas del género *Aloysia* (Verbenaceae). **Darwiniana**, **22** (1-3), 67-108.

BRANDÃO, A.D.; VICCINI, O. F.; RECCO-PIMENTEL, S.M. 2006. Caracterização citogenética de *Aloysia virgata* Ruiz e Pavan (Verbenaceae). **56º Congresso Nacional de Botânica**, Resumo, Gramado, RS.

BROUGHTON, S. 2000. Review and evaluation of *Lantana* biocontrol programs. **Biological Control**, **17** (3): 272-286.

CALIXTO, J.B. 2000. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **2**: 179-189.

CALIXTO, J.B.; SCHEUDT, C.; OTUKI, M.; SANTOS, A.R. 2001. Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs. **Expert Opinion Emerging Drugs**, **2**: 261-279.

CARRILLO-ROSARIO, T.; DÍAZ DE RAMÍREZ, A. 2006. Actividad antimalárica de extractos acuosos de *Lantana camara* L., *Verbena littoralis* L. y *Heliotropium indicum* L. en ratones infectados con *Plasmodium berghei*. **Revista de La Facultad de Farmacia**, **48**(1):14-20.

CARVALHO, A.F.U.; MELO, V.M.M.; CRAVEIRO, A.A.; MACHADO, M.I.L.; BANTIM, M.B.; RABELO, E.F. 2003. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* Linn. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **98**: 569-571.

CASTRO-GAMBOA, I.; CASTRO, O. 2004. Iridoids from the aerial parts of *Verbena littoralis* (Verbenaceae). **Phytochemistry**, **65** (16): 2369-2372.

CATALAN, C.A.N.; DE LAMPASONA, M.E.P. 2002. **The chemistry of the genus *Lippia* (Verbenaceae)**. In: Kintzios SE (ed.) *Oregano: the genera *Origanum* and *Lippia**, 1st edn. London: Taylor and Francis, 127–149.

CHARIANDY, C.M.; SEAFORTH, C.E.; PHILIPS, R.H. POLLARD, G.V.; KHAMBAY, B.P. 1999. Screening of medicinal plants from Trinidad and Tobago for antimicrobial and insecticidal properties. **Journal of Ethnopharmacology**, **64**: 265-270.

CHEN, G.M.; ZHANG, J.Y., ZHANG, X.P.; LIU, H.M. 2006. Studies on chemical constituents of flavonoid from *Verbena officinalis*. **Zhong Yao Cai**, **29**(7):677-679.

CHOUDHARY, S.S.; ROY, R.P. 1983. Karyological studies and trend of speciation in some members of Verbenaceae. **Cytologia**, **48**: 735-740.

CHOWDHURY, R.; RASHID, M.U.; KHAN, O.F.; HASAN, C.M. 2004. Bioactivity of extractives from *Stachytarpheta urticaefolia*. **Pharmaceutical Biology**, **42**(3): 262-267.

CHOWDRURY, R.; RASHID, M.U.; KHAN, O.F.; HASAN, C.M. 2003. Ipolamiide and α -spinesterol from *Stachytarpheta urticaefolia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, **31**: 1209-1211.

CHRISTEN, Y. 2000. Oxidative stress and Alzheimer's disease. **American Journal of Clinical Nutrition**, **71**(2): 621S-629S.

CHUN, J.C.; KIM, J.C.; HWANG, I.T.; KIM, S.E. 2002. Acteoside from *Rehmannia glutinosa* nullifies paraquat activity in *Cucumis sativus*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, **72** (3): 153-159.

CHUN, S. S.; VATTEM, D. A.; LIN, Y. T.; SHETTY, K. 2005. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, **40** : 809-816.

COLEMAN, J.R. 1982. Chromosome numbers of angiosperms collected in the state of São Paulo. **Revista Brasileira de Genética**: **3**, 533-549.

COMPADRE, C.M.; ROBBINS, E.F.; KINGHORN, A.D. 1986. The intensely sweet herb, *Lippia dulcis* Trev.: historical uses, field inquiries, and constituents. **Journal of Ethnopharmacology**, **15** (1): 89-106.

CONTERATO, I.F.; WITTMANN, M.T.S. 2006. New chromosome numbers, meiotic behaviour and pollen fertility in American taxa of *Lupinus* (Leguminosae): contributions to taxonomic and evolutionary studies. **Botanical Journal of the Linnean Society**, **150**: 229-240.

CORAZZA-NUNES, M. J.; PAGLIARINI, M. S.; SILVA, N.; SILVA, I. 1995. Hexaploidy and fertility interrelationships in *Aloysia lycioides* (Verbenaceae). **Archives of Biology and Technology**, **38** (2): 627-630.

COSTA, J.G.M.; RODRIGUES, F.F.G., ANGÉLICO, E.C.; SILVA, M.R.; MOTA, M.L.; SANTOS, N.K.A.; CARDOSO, A.L.H.; LEMOS, T.L.G. 2005. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **15**: 304-309.

COSTA, S.M.O.; LEMOS, T.L.G.; MONTE, F.J.Q.; MATOS, F.J.A. 1998. Quinona dimérica (tectol) de *Lippia sidoides* (Verbenaceae). **XV Simpósio de Plantas Mediciniais**, Resumos, Águas de Lindóia.

COSTA, S.M.O.; SANTOS, H.S.; PESSOA, O.D.L.; LEMOS, T.L.G. 2005. Constituents of the essential oil of *Lippia microphylla* Cham. from Northeast Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, **17**(4), 378-379.

COSTA, V.B.; COUBE, C.S.; MARINHO, B.G.; MATHEUS, M.E.; LEITÃO, S.G.; FERNANDES, P.D. 2003. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Bouchea fluminensis*. **Fitoterapia** **74**: 364–371.

COSTA-LOTUFO, L.V.; SILVEIRA, E.R.; BARROS, M.C. PINHEIRO; LIMA, M.A.S.; DE MORAES, M.E.A.; DE MORAES, M.; PESSOA, C. 2004. Antiproliferative effects of abietane diterpenes from *Aegiphila lhotzkyana*. **Planta Medica**, **70**(2): 180-182.

COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. 2002. Contribution to the pharmacognosy of the Brazilian falso-gervao, *Bouchea fluminensis* - bitter index. **Revista Brasileira de Farmácia**, **83**(1/4): 35-38.

CRAVEIRO, A.A.; ALENCAR, J.W.; MATOS, F.J.A.; ANDRADE, C.H.S.; MACHADO, M.I.L. 1981. Essential oils from Brazilian Verbenaceae genus *Lippia*. **Journal of Natural Products**, **44**: 598-601.

CRONQUIST, A. 1981. **An integrated system of classification of flowering plants**. Columbia University Press. New York. 1262p.

DA SILVA, C.C.; VANDRESEN, F.; DE OLIVEIRA, C.M.A.; KATO, L.; TANAKA, C.M.A.; FERREIRA, H.D. 2006. Chemical composition of *Aloysia gratissima* (Gill. et Hook) Tronc. **Biochemical Systematics and Ecology**, **34**(7): 593-595.

DA SILVA, M.H.L.; ANDRADE, E.H.A.; ZOGHBI, M.G.B.; LUZ, A.I.R.; DA SILVA, J.D.; MAIA, J.G.S. 1999. The essential oils of *Lantana camara* L. occurring in north Brazil. **Flavour and Fragrance Journal**, **14**(4): 208-210.

DAMTOFT, S.; JENSEN, S.R.; NIELSEN, B.J. 1984. The identity of the iridoid glucoside tarphetalin with ipolamiide. **Phytochemistry**, **23**: 907.

DAVIES S. D.; HEYWOOD, V.H.; HERRERA-MACBRIDE, O; VILLA-LOBOS, J.; HAMILTON, A.C. 1997. **Centres of Plants Diversity: A Guide of Strategy for their conservation**. The Americas Cambridge, IUCN Publications Unit, vol 3, 578p.

DAY, M.D.; MCANDREW, T.D. 2002. Status of *Charidotis pygmaea* (Coleoptera: Chrysomelidae) as a biological control agent of *Lantana montevidensis* (Verbenaceae) in Australia. **Biological Control**, **23**(1): 27-34.

DEAN, R. T.; FU, S.; STOCKER, R.; DAVIES, M. J. 1997. Biochemistry and pathology of radical mediated protein oxidation. **Biochemistry Journal**, **324**:1–18.

DEEPAK, M.; HANDA, S.S. 2000. Antiinflammatory activity and chemical composition of extracts of *Verbena officinalis*. **Phytotherapy Research**, **14**(6): 463-465.

DELAPORTE, R.H.; SÁNCHEZ, G.M.; CUELLAR, A.C; GIULIANI, A.; PALAZZO DE MELLO, J.C. 2002. Anti-inflammatory activity and lipid peroxidation inhibition of iridoid lamiide isolated from *Bouchea fluminensis* (Vell.) Mold. (Verbenaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, **82** (2-3): 127-130.

DELLACASSA, E.; SOLER, E.; MENÉNDEZ, P.; MOYNA, P. 1990. Essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown and *Aloysia chamaedrifolia* Cham. (Verbenaceae) from Uruguay. **Flavour and Fragrance Journal**, **5**:107–108.

DERMEN, H. 1936. Cytological study and hybridization in two sections of *Verbena*. **Cytologia**, **7**: 160-175.

DI STASI, L.C.; HIRUMA, C.A.; GUIMARÃES, E.M.; SANTOS, C.M. 1994. Medicinal plants popularly used in Brazilian Amazon. **Fitoterapia**, **65**: 529- 540.

DIJKGRAAF, A.C.; LEWIS, G.D.; MITCHELL, N.D. 1995. Chromosome number of the New Zealand puriri, *Vitex lucens* Kirk. **New Zealand Journal of Botany**, **33**: 426-426.

DOLEŽEL, J. 1991. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. **Phytochemical Analysis**, **2**: 143-154.

DOLEŽEL, J.; BARTOS, J. 2005. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, **95**: 99-110.

DOLEŽEL, J.; BINAROVÁ, P.; LUCRETTI, S. 1989. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. **Biologia Plantarum**, **31**:113-120.

DOLEŽEL, J.; DOLEZEROVA, M.; NOVAK, F.J. 1994. Flow cytometry estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *Musa balbisiana*). **Biologia Plantarum**, **36**:351-357.

DRUMMOND, G.M.; MARTINS, C.S.; MACHADO, A.B.M.; SEBAIO, F.A.; ANTONINI, Y. 2005. A conservação de biodiversidade em Minas Gerais. **Biodiversidade em Minas Gerais – Um Atlas para sua conservação. Fundação Biodiversitas**, 2^o Edição, 222p.

DUA, V.K.; GUPTA, N.C.; PANDEY, A.C.; SHARMA, V.P. 1996. Repellency of *Lantana camara* (Verbenaceae) flowers against *Aedes* mosquitoes. **Journal of the American Mosquito Control Association**, **12**: 406-408.

EITEN, 1992. Natural Brazilian vegetation types and their causes. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, **64** (1):34-65.

ELISABETSKY, E.; COSTA-CAMPOS, L. 1996. Medicinal plant genetic resources and international cooperation: the Brazilian perspective. **Journal of Ethnopharmacology**, **51**:111-120.

ERDTMAN, G. 1945. Pollen morphology and plant taxonomy. IV. Labiatae, Verbenaceae and Avicenniaceae. **Sven. Bot. Tidskr.**, **39**: 279-285.

ERDTMAN, G. 1952. **Pollen morphology and plant taxonomy**. Almqvist e Wiksell, Stockholm, 539p.

ERDTMAN, G. 1960. The acetolysis method. A revised description. **Sven. Bot. Tidskr.**, **54**: 561-564.

ERDTMAN, G. 1966. **Pollen morphology and plant taxonomy Angiosperms** (An Introduction to Palynology I). Hafner, New York, N.Y., 533p.

FATEMEH, S. 2002. Essential oil of *Lantana camara* L. occuring in Iran. **Flavour and Fragrance Journal**, **17**(1): 78-80.

FERREIRA, S.H. 1998. **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências. 131p.

FILIPPA, E.M. 1984. El numero cromossomico de *L. turbinata* (Verbenaceae). **Kurtziana**, **17**: 169–170.

FONSECA, E. N.; LEITÃO, S. G.; SANTOS, T. C. 1999. Essential oils from two Brazilian *Vitex* species. **Acta Horticulturae**, **500**: 89-92.

FRIGHETTO, N.; OLIVEIRA, J.G.; SIANI, A.C.; CHAGAS, K.C. 1998. *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br (Verbenaceae) as a source of linalool. **Journal of Essential Oil Research**, **10**: 578–580.

GAIDHANI, S.N.; SAHNI, Y.P.; SRIVASTAVA, D.N. 2000. Anti-ulcerogenic activity of *Vitex negundo* on piroxicam induced gastric ulceration. **Indian Veterinary Medical Journal**, **24**(1): 61-62.

GAIDHANI, S.N.; SAHNI, Y.P.; SRIVASTAVA, D.N. 2001. Anti-inflammatory activity of *Vitex negundo*: Possible mode of action. **Indian Veterinary Medical Journal**, **25**(3): 249-252.

GALBRAITH, D.W.; HARKINS, K.; MADDOX, J.; AYRES, N.; SHARMA, D.; FIROOZABADY, E. 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. **Science**, **220**: 1049–1051.

GALLO, M.B.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; DA SILVA, M.F.; SALIMENAPIRES, F.R. 2008. Compounds from *Vitex polygama* active against kidney diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, **115**(2): 320-322.

GHISALBERTI, E. L. 2000. *Lantana camara* L. (Verbenaceae). **Fitoterapia**, **71**(5): 467-486.

GIL, A.; VAN BAREN, C.M.; DI LEO LIRA, P.M.; BANDONI, A. L. 2007. Identification of the genotype from the content and composition of the essential oil of lemon verbena (*Aloysia citriodora* Palau). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **55**(21):8664-8669.

GIRÓN, L.M.; CÁCERES, A. 1994. **Técnicas Básicas para el Cultivo y Procesamiento de Plantas Medicinales**. CEMAT. Guatemala, p51-52.

GIULIETTI, A.M.; HARLEY, R.M.; QUEIROZ, L.P.; WANDERLEY, M.G.L.; BERG, C.V.D. 2005. **Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. Megadiversidade – Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade no Brasil**, 1(1).

GIULIETTI, A.M.; HARLEY, R.M.; QUEIROZ, L.P.; WANDERLEY, M.G.L.; PIRANI, J.R. 2000. Caracterização e endemismo nos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. In: CAVALCANTI, T.B.; WALTER, B.M.T. (eds.). **Tópicos Atuais de Botânica. Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos**, p.311-318.

GIULIETTI, A.M.; PIRANI, J.R. 1988. Patterns of geographic distribution of some plant species from the Espinhaço Range. In: Heyer, W.E.; Vanzolini, P.E. (eds.). **Proceedings of a workshop on Neotropical distribution patterns**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências.

GIULIETTI, A.M.; PIRANI, J.R.; HARLEY, R.M. 1997. Espinhaço range region. In: Davis, S.D. et al. (eds.). **Centres of Plant Diversity: A Guide and Strategy for their Conservation**. Cambridge: WWF/IUCN, 3, 397-404.

GOMES, E.C.; MING, L.C.; MOREIRA, E.A.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D.; KERBER, V.A.; CONTI, A.; FILHO, A.W. 1993. Constituintes do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, **72** (2): 29-32.

GRANT S.R. 1999. Genetic of gender dimorphism in higher plants. In: **Gender and sexual dimorphism in flowering plants** (eds.) MA Geber, TE Dawson and LF Delph). Springer-Verlag, Berlin, p247–274.

GRANT, V. 1963. **The Origin of Adaptations**. Columbia University Press, New York. 606p.

GRIFF, V.G. 2000. Some aspects of plant karyology and karyosystematics. **International Review of Cytology**, **196**: 131-175.

GUERRA, P.M.; NODARI, O.R. 2003. **Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos**. In: SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (eds.) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5^o Edição. Porto Alegre: Editora UFRGS. Florianópolis: Editora UFSC. 821 p.

GUEVARA, R.; ROSALES, J.; SANOJA, E. 2005. Vegetación pionera sobre rocas, un potencial biológico para la revegetación de áreas degradadas por la minería de hierro. **Interciencia**, **30**(10): 644-651.

HAMILTON, M. L.; REMMEN, H. V.; DRAKE, J. A.; YANG, H.; GUO, Z. M.; KEWITT, K.; WALTER, C. A.; RICHARDSON, A. 2001. Does oxidative damage to DNA increase with age? **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **98**: 10469–10474.

HELLER FO (1973) DNS-Bestimmung an Keimwurzeln von *Vicia faba* L. mit Hilfe der Impulscytophotometrie. **Bericht der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, **86**:437-441.

HELLIÓN-IBARROLA, M.C.; IBARROLA, D.A.; MONTALBETTI, Y.; KENNEDY, M.L.; HEINICHEN, O.; CAMPUZANO, M.; TORTORIELLO, J.; FERNÁNDEZ, S.; WASOWSKI, C.; MARDER, M. 2005. The anxiolytic-like effects of *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke (Verbenaceae) in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, **105**: 400-408.

HERBERT, J. M.; MAFFRAND, J. P. 1991. Verbascoside isolated from *Lantana camara* an inhibitor of protein kinase C. **Journal of Natural Products**, **54**:1595-1600.

HERNÁNDEZ, T.; CANALES, M.; AVILA, J. G.; DURAN, A.; CABALLERO, J.; ROMO DE VIVAR, A.; LIRA, R. 2005. Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). **Journal of Ethnopharmacology**, **88**: 181-188.

HUSAIN, S. R.; CILLARD, J.; CILLARD, P. 1987. Hydroxyl radical scavenger activity of flavonoids. **Phytochemistry**, **26**: 2489-2497.

JAYAPRAKASHA, F. K.; JAGANMOHAN RAO, L. 2000. Phenolic constituents from lichen *Parmotrema stuppeum* (Nyl.). Hale and their antioxidant activity. **Zeitschrift für Naturforschung C**, **55**: 1018-1022.

JESUS, F.F.; SOLFERINI, V.N.; SEMIR, J.; PRADO, P.I. 2001. Local genetic differentiation in *Proteopsis argentea* (Asteraceae), a perennial herb endemic in Brazil. **Plant Systematics and Evolution**, **226**: 59-68.

JOLY, A. B. 1970. **Conheça a vegetação brasileira**. EDUSP e Polígono. São Paulo.

JULIANI, H.R.JR; BIURRUN, F.; KOROCH, A.R.; OLIVA, M.M.; DEMO, M.S.; TRIPPI, V.S.; ZYGADLO, J.A. 2002. Chemical constituents and antimicrobial activity of the essential oil of *Lantana xenica*. **Planta Medica**, **68**(8): 762-764.

KAWASHTY, S. A.; EL-GARF, I.A. 2000. The flavonoid chemosystematics of Egyptian *Verbena* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, **28**: 919-921.

KHAN, M.; SRIVASTAVA, S.K.; SYAMASUNDAR, K.V.; SINGH, M.; NAQVI, A.A. 2002. Chemical composition of leaf and flower essential oil of *Lantana camara* from India. **Flavour and Fragrance Journal**, **17**(1): 75-77.

KNAPP, L. 2001. **Fitoterapia abre novos campos de pesquisa**. Gazeta Mercantil, São Paulo, cad 1, pág 6.

KÖLREUTER, J.G. 1811. Dissertationis de antherarum pulvere continuatio. Sectio quarta. De figura antherarum pulveris. **Mem. Academy Imp. Science St. Petersburg**, **3**: 159-199.

KUMAR, P.; DUTT, B. 1989. Cytogenetic basis of breeding system in some verbenaceous species. **Cytologia**, **54**: 347-353.

LEITÃO, S. G.; SILVA, M.H.; KAPLAN, M. A. C.; MONACHE, F. D. 1994. Phenylpropanoid glucosides from *Aegiphila obcuta*. **Journal of Natural Products**, **57**:1703-1707.

LEITÃO, S. G.; KAPLAN, M.A.C.; MONACHE, F. D. 1992. Sterols and sterol glucosides from two *Aegiphila* species. **Phytochemistry**, **31**(8): 2813-2817.

LEITÃO, S.G.; SILVA, M.H.; KAPLAN, M.A.C.; MONACHE, F.D. 1996. Constituents of some *Aegiphila* species and neutralization of *Crotalus durissus* venom by *Aegiphila lhotzkyana*. **Fitoterapia**, **67**: 377-380.

LEITÃO, S.G.; KAPLAN, M.A.C.; DELLE MONACHE, F.; NYANDAT, E.; RWEKIKI, E. 1995. Antifeedant activity of two phenylpropanoid glucosides from *Aegiphila obducta* against *Chilo partellus* larvae. **Insect Science and its Application**, **16** (3/4): 375-378.

LEITÃO, S.G.; CASTRO, O.; FONSECA, E.N.; JULIÃO, L.S.; TAVARES, E.S.; LEO, R.R.T., VIEIRA, R.C.; OLIVEIRA, D.R.; LEITÃO, G.G.; MARTINO, V.; SULSEN, V.;

BARBOSA, Y.A.G; PINHEIRO, D.P.G.; SILVA, P.E.A.; TEIXEIRA, D.F.; JUNIOR, I.N.; LOURENÇO, M.C.S. 2006. Screening of Central and South American plant extracts for antimycobacterial activity by Alamar Blue test. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **16**(1): 6-11.

LEITÃO, S.G.; KAPLAN, M.A.C.; MONACHE, F.D. 1993. Acylglucosylsterols from two *Aegiphila* species. **Phytochemistry**, **36**(1): 167-170.

LEITCH, I.J.; CHASE, M.W.; BENNETT, M.D. 1988. Phylogenetic analysis of DNA C-values provides evidence for a small ancestral genome size in flowering plants. **Annals of Botany**, **82**:85-94.

LOPEZ-PALACIOS, S. 1977. **Flora de Venezuela**. Talleres graficos universitarios: Merida. 654p.

LORENZI, H. 1992. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, São Paulo. 341p.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. 2002. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. Nova Odessa. São Paulo. 544p

LOUREIRO, J.C.M. 2007. Flow cytometric approaches to study plant genomes. Tese de doutorado. Universidade de Aveiro, Portugal. 246p

LUCIANO, J. H. S.; BARROS, M. C. P.; LIMA, M. A. S.; NASCIMENTO, R. F.; SILVEIRA, E. R. 2005. Volatile composition of leaves from *Aegiphila lhotzkiana* Cham. **Flavour and Fragrance Journal**, **20** (5): 537-538.

MACFARLANE, T.D.; WATSON, L.; MARCHANT, N.G. (eds). 2002. **Western Australian Genera and Families of Flowering Plants**. Western Australian Herbarium.

MACHADO, J. 1996. **Recursos genéticos vegetais e a empresa de sementes**. Campinas: André Tosello. 11p.

MADEIRA A. J.; FERNANDES, WG, 1999. Reproductive phenology of sympatric taxa of *Chamaecrista* (Leguminosae) in Serra do Cipó, Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, **15** (2) : 463-479.

MALIZIA, R.A.; MOLLI, J.S.; ZUMELZU, G.; CARDELL, D.A.; GRAU, R.J.A.; GIBERTI, G.; CRAKER, L.; LORENZ, M.; MATHE, A.; GIULIETTI, A. 1999. Selection of material for cultivation in *Aloysia polystachya* (Gris.) Mold.. **Acta Horticulturae**, **502**: 219-222.

MARÇAL, R.M.; PTAK, D.M.; KREMPSER, R.R., KREMPSER, M.R.; CARDOSO, G.C.; SANTOS, R.B.; BLANK, A. F.; ALVES, P.B. 2006. Antinociceptive effect of the essential oil *Lippia sidoides* on mice. **Planta Medica**, **72** (11).

MARIE, D., BROWN, S. 1993. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. **Biology Cell** **78**: 41-51.

MARQUES, A. R.; GARCIA, Q. S.; RESENDE, J. L. P.; FERNANDES, G. W. 2000. Variations in leaf characteristics of two species of *Miconia* in the Brazilian cerrado under different light intensities. **Tropical Ecology** **41**(1): 47-60.

MARTÍNEZ-ROCHA, A.; PUGA, R.; HERNÁNDEZ-SANDOVAL, L.; LOARCA-PIÑA, G.; MENDOZA, S. 2008. Antioxidant and Antimutagenic Activities of Mexican Oregano (*Lippia graveolens* Kunth). **Plant Foods for Human Nutrition**, **63**(1):1-5.

MASTERSON, J. 1994. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of flowering plants. **Science**, **264**: 421-424.

MATOS, F. J. 1997. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2^o Edição. Fortaleza: Edições UFC. 128p.

MATOS, F. J. A. 1996. As ervas cidreiras do Nordeste do Brasil - Estudo de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae). Parte II - Farmacoquímica. **Revista Brasileira de Farmácia**, **77**(4): 137-141.

MATOS, F.J.A.; MACHADO, M.I.L.; CRAVEIRO, A.A.; ALENCAR, J.W. 1996. The essential oil composition of two chemotypes of *Lippia alba* grown in Northeast Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, **8**: 695-698.

MATOS, F.J.A.; MACHADO, M.I.L.; CRAVEIRO, A.A.; ALENCAR, J.W.; SILVA, M. G.V. 1999. Medicinal plants of Northeast Brazil containing thymol and carvacrol - *Lippia sidoides* Cham. and *L. gracilis* H.B.K. (Verbenaceae). **Journal of Essential Oil Research**, **11**(6): 666-668.

MEAGHER, T.R.; GILLIES, A.C.M.; COSTICH, D.E. 2005. Genome size, quantitative genetics, and the genomic basis for flower size evolution in *Silene latifolia*. **Annals of Botany**, **95**: 247–254.

MELHEM, T.S. 2006. A pesquisa multidisciplinar e os grãos de pólen. Os Avanços da Botânica no Início do Século XXI. **57º Congresso Nacional de Botânica**, Porto Alegre, RS.

MELHEM, T.S.; CRUZ-BARROS, M.A.V.; CORRÊA, A.M.S.; MAKINO-WATANABE, H.; SILVESTRE-CAPELATO, M.S.F.; ESTEVES, V.L.G. 2003. Variabilidade polínica em plantas de Campos do Jordão (São Paulo, Brasil). **Boletim do Instituto de Botânica**, **16**: 77-80.

MESIA-VELA, S.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.; LAPA, A.J. 1997. Inhibition of gastric acid secretion by the aqueous extract and purified extracts of *Stachytarpheta cayennensis*. **Planta Medica**, **63**(1): 36-39.

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

MEVY, J. P.; BESSIERE, J. M.; DHERBOMEZ, M.; MILLOGO, J.; VIANO, J. 2007. Chemical composition and some biological activities of the volatile oils of a chemotype of *Lippia chevalieri* Moldenke. **Food Chemistry**, **101**(2): 682-685.

MOLDENKE, H. N. 1973. Notes on new and noteworthy. **Phytologia**, **25**(4): 220.

MONTEIRO, M.V.B.; DE MELO LEITE, A.K.R.; BERTINI, L.M.; DE MORAIS, S.M.; NUNES-PINHEIRO, D.C.S. 2007. Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, **111**(2): 378-382.

MOREIRA, A.A.N. 1965. **Relevo**. In: IBGE (ed.) Geografia do Brasil-Grande região Leste. Rio de Janeiro, 5: 5-54.

MORTON, J.F. 1981. **Atlas of Medicinal Plants of Middle America**. Vol 1. Springfield. Mincis. USA. 745-750.

MORTON, J.F. 1994. *Lantana*, or red sage (*Lantana camara*, Verbenaceae), notorious weed and popular garden flower: some cases of poisoning in Florida. **Economic Botany**, **48**: 259-270.

MUHAYIAMANA, A.; CHALCHAT, J.C.; GARRY, R.P. 1998. Chemical composition of essential oils of *Lantana trifolia* L. from Rwanda. **Journal of Essential Oil Research**, **10**(5): 547-549.

MUNHOZ, C.B.R.; PROENÇA, C.E.B. 1998. Composição florística do município de Alto Paraíso de Goiás na Chapada dos Veadeiros. **Boletim Herbário Ezechias Paulo Heringer**, **3**: 102-150.

MUNIR, A. A. 1992. A taxonomic revision of the genus *Stachytarpheta* Vahl (Verbenaceae) in Australia. **Journal of the Adelaide Botanical Gardens** **14**: 133-168.

NOAMESI, B.K. 1977. Power tea (*Lippia multiflora*) a potent hypertensive therapy. **West African Journal of Pharmacology and Drug Research**, **4**(1):33-36.

NUNES, R.S.; SENNA, B.A.A.; ALEXSANDRO DA SILVA, J.; PEREIRA DE SANTANA, D. 2005. Analytic methodology validation for thymol level in plant extracts of *Lippia sidoides* Cham by HPLC. **Revista Brasileira de Farmácia**, **86**(3): 87-91.

OJHA, B. M.; DAYAL, N. 1993. Cytological investigations in the genus *Lantana* in India. **Cytologia**, **57**: 9-13.

OLADIMEJI, F.A.; ORAFIDIYA, L.O.; OKEKE, I.N. 2004. Physical properties and antimicrobial activities of leaf essential oil of *Lippia multiflora* Moldenke. **The International Journal of Aromatherapy**, **14**: 162–168.

OLADIMEJI, F.A.; ORAFIDIYA, O.O.; OGUNNIYI, T.A.; ADEWUNMI, T.A. 2000. Pediculocidal and scabicial properties of *Lippia multiflora*. **Journal of Ethnopharmacology**, **72** (1-2): 305-11.

OLIVEIRA, C. M. A. ; SILVA, C. C. ; LEMES, G F ; FERREIRA, H D ; SCHIMITT, E. 2005. Kauranes, Phenylethanoids and Flavone from *Aloysia virgata*. **Biochemical Systematics and Ecology**, **33** (11):1191-1193.

OLIVEIRA, D.R.; LEITÃO, G.G.; BIZZO, H.R.; LOPES, D.; ALVIANO, D.S.; ALVIANO, C.S.; LEITÃO, S.G. 2007. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K.. **Food Chemistry**, **101**: 236–240.

OLIVEIRA, D.R.; LEITÃO, G.G.; SANTOS, S.S., BIZZO, H.R.; LOPES, D.; ALVIANO, C.S.; ALVIANO, D.S.; LEITÃO, S.G. 2006b. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, **108**: 103 - 108.

OLIVEIRA, F.P.; LIMA, E.O.; JÚNIOR, J.P.S.; SOUZA, E.L.; SANTOS, B.H.C.; BARRETO, H.M. 2006a. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **16**(4): 510-216.

ONO, M.; OISHI, K.; ABE, H.; MASUOKA, C.; OKAWA, M.; IKEDA, T.; NOHARA, T. 2006. New iridoid glucosides from the aerial parts of *Verbena brasiliensis*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, **54**(10): 1421-1424.

PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, M.E.; VILLAR, A. 2001a. Antiulcerogenic activity of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae), **1L Farmaco**, **56**: 501.

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ- MATA, D.; VILLAR, A. 2001b. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, **76**, 201- 14.

PASSOS, G. F.; FERNANDES, E. S.; CUNHA, F. M.; FERREIRA, J.; PIANOWSKI, L. F.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. 2007. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**, **21**: 323-333.

PEDERSEN, J.A. 2000. Distribution and taxonomic implications of some phenolics in the family Lamiaceae determined by ESR spectroscopy. **Biochemical Systematics and Ecology**, **28**(3): 229-253.

PENIDO, C.; COSTA, K.A.; FUTURO, D.O.; PAIVA, S.R.; KAPLAN, M.A.C.; FIGUEIREDO, M.R.; HENRIQUES, M.G.M.O. 2006. Anti-inflammatory and anti-ulcerogenic properties of *Stachytarpheta cayennensis* (L.C. Rich) Vahl. **Journal of Ethnopharmacology**, **104**: 225-233.

PEREIRA, J. M.; BARRETO, R. W. 2001. Additions to the mycobiota of the weed *Lantana camara* (Verbenaceae) in southeastern Brazil. **Mycopathologia**, **151**:71-80.

PÉREZ. S.; MECKES. M.; PÉREZ. C.; SUSUNAGA. A.; ZAVALA. M. A. 2005. Anti-inflammatory activity of *Lippia dulcis*. **Journal of Ethnopharmacology**, **102**: 1-4.

PESSOA, O. D. L.; DE CARVALHO, C. B. M.; SILVESTRE, J. O. V. L.; LIMA, M. C. L.; NETO, R. M.; MATOS, F. J. A.; LEMOS, T. L. G. 2005. Antibacterial activity of the essential oil from *Lippia aff. gracilis*. **Fitoterapia**, **76**(7-8): 712-714.

PIMENTA, D.S. 2002. **Contribuição ao cultivo, ecologia e validação do uso de *Echinodorus grandiflorus* (Chamisso & Schlechtendal) Micheli (Chapéu-de-couro)**. Tese de Doutorado em Biologia Celular e Molecular. Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Brasil.

PINO, J. A.; MARBOT, R.; FUENTES, V. 2004. Essential oil of *Aloysia virgata* Juss. from Cuba. **Journal of Essential Oil Research**, **16** (1): 44-45.

PINO, J.A.; LUIZ, A.G.O.; PÉRES, A.R.; JORGE, M.R.; BALUJA, R. 1997. Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. **Revista Cubana de Farmacia**, **30**: 29–35.

PIO CORRÊA, M. C. 1926. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional. 4324p

POTZERNHEIM, M.C.L; BIZZO, H. R.; VIERIA, R.F. 2006. Análise dos óleos essenciais de três espécies de *Piper* coletadas na região do Distrito federal (Cerrado) e comparação com óleos de plantas procedentes da região de Paraty, RJ (Mata Atlântica). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **16**(2): 246-251.

PRATT, D.E.; BIRAC, P.M. 1979. Source of antioxidant activity in soybeans. **Journal of Food Science**, **44**:1720-1722.

PUNT. W. 1999. **Glossary of Pollen and Spore Terminology**. Second and revised edition by Peter Hoen, <http://www.bio.uu.nl/~palaeo/glossary/glos-int.htm>.

PURKINJE, J.E. 1830. **De cellulis antherarum fibrosis nec non de granorum pollinarium formis**. Commentatio phytotomica, Pressburg (Bratislava), 58p.

RAGASA, C. Y.; MORALES, E.; RIDEOUT, J. A. 1999. Antimicrobial compounds from *Vitex negundo*. **Philippine Journal of Science**, **128**: 21-29.

RAJ, B. 1983. A contribution to the pollen morphology of Verbenaceae. **Review of Paleobotany and Palynology**, **39**:343-422.

RATES, S.M.K. 2001. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **11**: 57-69.

RECIO, M.D.C.; GINER, R.M.; MANEZ, S.; RECIOS, J.L. 1994. Structural considerations on the iridoids as anti-inflammatory agents. **Planta Medica**, **60**(3): 232-234.

RENNER, S.S.; RICKLEFS, R.E. 1995. Dioecy and its correlates in the flowering plants. **American Journal of Botany**, **82**: 596-606.

RESS, H. 1972. DNA in higher plant. Brookhaven Symposium Biology, Brookhaven: **Genetics Society of America**, **23**: 394-418.

REUTERS, 2002. <http://br.reuters.com>

RIBEIRO J. F.; WALTER, B.M.T. 1998. Fitofisionomias do Bioma do cerrado. In: SANO S.M.; ALMEIDA, S.P. (eds.) **Cerrado: Ambiente e flora**. Planaltina, Embrapa, 556p.

RICCIARDI ,G. A. L.; TORRES , A. M.; VAN BAREN ,C., DI LEO LIRA, P.; RICCIARDI, A. I. A.; DELLACASSA, E.; LORENZO, D.; BANDONI, A. L. 2005. Essential oil of *Aloysia virgata* var. *platyphylla* (Briquet) Moldenke from Corrientes (Argentina). **Flavour and Fragrance Journal**, **20** (6): 645-649.

RICHARDSON, G.A.; EL-RAFEY, M.S.; LONG, M.L. 1974. Flavones and flavone derivatives as antioxidants. **Journal of Dairy Science**, **30**:143-397.

RIOS, J.L.; MAÑEZ, S.; PAYA, M.; ALCARAZ, M.J. 1992. Antioxidant activity of flavonoids from *Sideritis javalambrensis*. **Phytochemistry**, **31**(6): 1947-1950.

ROENGSUMRAN, S.; SOOKKONGWAREE, K.; JAIBOON, N.; CHAICHIT, N.; PETSON, A. 2002. Crystal structure of ipolamiide monohydrate from *Stachytarpheta indica*. **Analytical Sciences**, **18**(9):1063-1064.

ROMERO, M.E.M.; MARTINZE, S.; ATKINS, S.; ROTMAN, A. D. 2002. Morfologia de las inflorescências em Verbenaceae, Verbenoideae III: *Tribu Lantaneae. **Darwiniana**, **400** (1-4): 1-15.

ROMERO, R. 2002. Diversidade da flora dos campos rupestres de Goiás, sudoeste e sul de Minas Gerais. In.: ARAÚJO, E.L.; MOURA, A.N.; SAMPAIO, E.S.B.; GESTINARI, L.M.S.; CARNEIRO, J.M.T. (eds.) **Biodiversidade, conservação e uso sustentável da flora do Brasil**. UFRPE, SBB. 298p.

ROSSATO, M.; ATTI DOS SANTOS, A.C.; SERAFINI, L.A.; AGOSTINI, F.; PANSERA, M.R.; WASUM, R.; BARBIERI, R.L. 2006. Evaluation of essential oil from *Aloysia sellowii* (Briquet) Moldenke (Verbenaceae) from Southern Brazil. **Química Nova**, **29**(2): 200-202.

SALIMENA, F. R. G. 2000. **Revisão taxonômica de *Lippia* L., sect. *Rhodolippia* Schauer (Verbenaceae)**. São Paulo, SP: USP. Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo. 208p.

SALIMENA, F.R.G. 2002. New synonyms and typifications in *Lippia* sect. *Rhodolippia* (Verbenaceae). **Darwiniana**, **40**: 121-125.

SALIMENA-PIRES, F. R. 1991. **Verbenaceae da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil**. São Paulo, SP: USP. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo. 302p.

SALIMENA-PIRES, F.R.; GIULIETTI, A.M. 1998. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Verbenaceae. **Boletim de Botânica**, **17**: 155-186. Universidade de São Paulo.

SANDERS, R. W. 1987b. Identify of *Lantana depressa* and *Lantana ovatifolia*. Verbenaceae of Florida, USA and Bahamas. **Systematic Botany**, **12**(1): 44-60.

SANDERS, R.W. 1987a. Taxonomic significance of chromosome observations in Caribbean species of *Lantana*. Verbenaceae. **American Journal of Botany**, **74**(6): 914-920.

SANDERS, R.W. 2001. The genera of Verbenaceae in the southeastern United States. **Harvard Papers in Botany**. **5** (2): 303-358.

SANZO, A.M. 2003. Chromosome studies in Andean taxa of *Alstroemeria* (Alstroemeriaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, **138**: 451-459.

SAXENA, V.K.; SHARMA, R.N. 1999. Antimicrobial activity of the essential oil of *Lantana aculeata*. **Fitoterapia**, **70**: 67-70.

SCHAPOVAL, E.E.S.; VARGAS, M.R.W.; CHAVES, C.G.; BRIDI, R.; ZUANAZZI, J.A.; HENRIQUES, A.T.; DE-VARGAS, M.R.W. 1998. Antiinflammatory and antinociceptive of extracts and isolated compounds from *Stachytarpheta cayennensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, **60**(1): 53-59.

SCHAUER, J.C. 1847. Verbenaceae, in A.P. de Candolle. **Prodomus Systematis Naturalis Regnis Vegetabilis**, **11**: 522-700.

SCHIFINO-WITTMANN, M.T. 2001. Determinação da quantidade de DNA nuclear em plantas. **Ciência Rural**, **31**: 897-902.

SCHNACK, B. 1964. Bases naturales de la separacion generica de *Verbena* y *Glandularia* (Verbenaceas). **Comision de Investigacion Cientifica Notas**, **2**: 1-13.

SCHUQUEL, I.T.A.; MALHEIROS, A.; SARRAGIOTTO, M.H.; VIDOTTI, G.J. 1998. Iridoid glucosides from *Bouchea fluminensis*. **Phytochemistry**, **49**(8): 2409-2411.

SEN, N.K.; SAHNI, V.M. 1955. Triploid, tetraploid and pentaploid *Lantana camara*. **Science Culture**, **20**: 558-559

SENATORE, F.; RIGANO, D. 2001. Essential oil of two *Lippia* spp. (Verbenaceae) growing wild in Guatemala. **Flavour and Fragrance Journal**, **16**: 169-171.

SHAN, F.; YAN, G.; PLUMMER, J. A. 2003. Karyotype evolution in the genus *Boronia* (Rutaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, **142**: 309-320.

SILVA, G.N.; MARTINS, F.R. ; MATHEUS, M.E.; LEITÃO, S.G., FERNANDES, P.D. 2005. Investigation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Lantana trifolia*. **Journal of Ethnopharmacology** ,**100**: 254–259.

SILVA, T.R.S. 1999. **Redelimitação e revisão taxonômica do gênero *Lantana* L (Verbenaceae) no Brasil**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Paulo, Brasil. 176p.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. 2003. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (eds.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5^o Edição. Porto Alegre: Editora UFRGS. Florianópolis: Editora UFSC. 821p.

SINGH, B. 1951. Chromosome numbers in some flowering plants. **Current Science**, **20**:105.

SINHA, S.; SINHA, B.; SHARMA, A. 1995. Chromosome composition of *Lantana camara* L.: karyotype, basic number and DNA diversity. **Nucleus**, **38**(1-2):16-22.

SMARDA, P.; KOCI, K. 2003. Chromosome number variability in Central European members of the *Festuca ovina* and *F. pallens* groups (sect. *Festuca*). **Folia Geobotanica**, **38**: 65-95.

SMITH, D.A.; BANKS, S.W. 1986. Formation and biological properties of isoflavonoid phytoalexins. In: CODY, V.; MIDDLETON, E.; HARBORNE, J.B. (eds.). **Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationships**. New York: Alan R. Liss, Inc., p.113-124.

SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; BENNETT, M.D.; LEITCH, I.J. 1988. Evolution of genome size in the Angiosperms. **American Journal of Botany**, **90**: 1596-1603.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. 2005. **Botânica Sistemática. Guia ilustrado para identificação das Famílias de Angiospermas da flora Brasileira, baseado em APG II**, Nova Odesa Instituto Plantarum. 640p

SPENCER, J.P.E., SCHROETER, H., RECHNER, A.R., RICE-EVANS, C. 2001. Bioavailability of flavan-3-ols and procyanidins: gastrointestinal Flavonoids 845 tract influences and their relevance to bioactive forms in vivo. **Antioxidants and Redox Signaling**, **3**:1023–1039.

SPIES, J. J. 1983-1984. Hybridization potential of *Lantana camara* (Verbenaceae). Garcia de Orta, **Série Botânica**, **6**(1-2):145-150.

SPIES, J.J. 1983. A cytotaxonomic study of *Lantana camara* (Verbenaceae) from South Africa. **South African Journal of Botany**, **3**: 231-250.

SRINIVAS, K.; RAO, S.S.; RAO, M.E.B.; CHOUDHURY, K.A. 1999. Hepatoprotective activity of *Vitex negundo*. **Indian Journal of Natural Products**, **15**(2): 29-31.

STASHENKO, E.E.; JARAMILLO, B.E.; MARTÍNEZ, J.R. 2004 Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. **Journal of Chromatography A**, **1025**: 93–103.

STEBBINS, G.L. 1971. **Chromosomal evolution in higher plants**. J.W. Arrowsmith Ltd. 216p.

STEETZ, J. 1864. Crystallopollen and Ambassa. In: PETERS, W.C.H. (ed). *Naturwissenschaftliche Reise nach Mossambique auf Befehl seiner Majestät des Königs Friedrich Wilhelm IV*. **Botanik**, **6**(2): 363-364.

STEVENS, P. F. 2006 (2001 onwards). **Angiosperm Phylogeny Website**. Version 7. www.mobot.org/mobot/research/apweb

SUDA, J. 2004. **An employment of flow cytometry into plant biosystematics**. PhD Thesis, Charles University, Czech Republic. Available at <http://www.ibot.cas.cz/fcm/suda/presentation/disertation.pdf>.

SUN, T.; HO, C. T. 2005. Antioxidant activities of buckwheat extracts. **Food Chemistry**, **90**: 743-749.

TANDON, S.L.; CHANDI, A.S. 1955. Basic chromosome number of *Lantana camara* L. **Current Science**, **4**:124–125.

TAVARES, E. S.; LOURENCINI, R.; LEITÃO, S. G.; VIANA, V. R. 1999. Anatomia foliar e análise preliminar do óleo essencial de *Vitex polygama* Cham. (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, **80**(3/4): 78-82.

TAVARES, E.S.; JULIÃO, L.S.; LOPES, D.; BIZZO, H.R.; LAGE, C.L.S.; LEITÃO, S.G. 2005. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **15**(1): 1-5.

TREVISAN, M.T.S.; MECADO, F.V.V. 2003. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. **Química Nova**, **26**: 301-304.

TRONCOSO, N. S. 1974. Los generos de Verbenaceas de sudamerica extra-tropical (Argentina, Chile, Bolívia, Paraguai, Uruguai y sur de Brasil). **Darwiniana**, **18** (3-4), 295-412.

TRONCOSO, N. S. 1980. Novedades taxonomicas en los *Lantana* y *Lippia* (Verbenaceas). **Hickenia**, **1**(42): 227- 231.

TSUNEATSU, N.; FUMIKO, A.; JUNEI, K.; HIKARU, O. 2002. Antiproliferative constituents in plants. 10 Flavones from the leaves of *Lantana montevidensis* BRIQ and consideration of structure-activity relationship. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, **25**(7): 875-879.

VALE, T.G.; FURTADO, E.C.; SANTOS, J.R.; J.G.; VIANNA, G.S.B. 2002. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N.E.Brown. **Phytomedicine**, **9**: 709-714.

VALENTIN, A.; PÉLISSIER, Y.; BENOIT, F.; MARION, C.; KONE, D.; MALLIE, M.; BASTIDE, J.M.; BESSIÈRE, J. M. 1995. Composition and antimalarial activity *in vitro* of volatile components of *Lippia multiflora*. **Phytochemistry**, **40**(51): 1439-1442.

VARSHNEY, V.K.; GUPTA, P.K.; NAITHANI, S.; KHULLAR, R.; BHATT, A.; SONI, P.L. 2006. Carboxymethylation of α -cellulose isolated from *Lantana camara* with respect to degree of substitution and rheological behavior. **Carbohydrate Polymers**, **63**: 40–45.

VELA, S.M.; SOUCCAR, C.; LANDMAN, L.M.T.R.; LAPA, A.J. 1997. Inhibition of gastric acid secretion by the aqueous extract and purified extracts of *Stachytarpheta cayanensis*. **Planta Medica**, **63**: 36-39.

VERMA, R.K; VERMA, S.K. 2006. Phytochemical and termiticidal study of *Lantana camara* var. *aculeata* leaves. **Fitoterapia**, **77**(6): 466–468.

VICCINI, L.F.; PIERRE, P.M. O.; PRAÇA, M.M.; SOUZA DA COSTA, D. C.; DA COSTA ROMANEL, E.; SOUSA, S.M.; PEREIRA PEIXOTO, P.H.; GONÇALVES SALIMENA, F.R. 2006. Chromosome numbers in *Lippia* (Verbenaceae). **Plant Systematics and Evolution**, **256**: 171-178.

VILJOEN, A. M.; SUBRAMONEY, S.; VUUREN, S. F.; BAŞER, K. H. C.; DEMIRCI, B. 2005. The composition, geographical variation and antimicrobial activity of *Lippia javanica* (Verbenaceae) leaf essential oils. **Journal of Ethnopharmacology**, **96**(1-2): 271-277.

VITTA, F.A. 2002. Diversidade e conservação da flora nos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço em Minas Gerais. In.: ARAÚJO, E.L.; MOURA, A.N.; SAMPAIO, E.S.B.; GESTINARI, L.M.S.; CARNEIRO, J.M.T. (eds.). **Biodiversidade, conservação e uso sustentável da flora do Brasil**. UFRPE, SBB. 298p.

WALKER, J.W.; DOYLE, J.A. 1975. The bases of angiosperm phylogeny: Palynology. **Annals of the Missouri Botanical Gardens**, **62**: 664-723.

WEENEN, H.; NKUNYA, H.H.; BRAY, D.H.; MWASUMBI, L.B.; KINABO, L.S.; KILIMALI, V.A.E.B. 1990. Antimalarial activity of tanzanian medicinal plants. **Planta Medica**, **56**: 368-370.

WETTASINGHE, M.; BOLLING, B.; PLHAK, L.; PARKIN, K. 2002. Screening for Phase II Enzyme inducing and antioxidant activities of common vegetables. **Journal of Food Science**, **67** (7): 2583-2588.

WHITE, J.; RESS, H. Chromosome weights and measures in *Petunia*. **Heredity** **58**:139-143.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 1998. **Regulatory situation of herbal medicines: a Worldwide review**. Geneva, 45p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2002. **Tradicional Medicine Strategy**. Geneva, 65p.

XIE, J.; SUN, B.; ZHENG, F.; YU, M. 2005. Components of extract from leaf and stem of *Vitex negundo* L. var. *heterophylla* (Franch.) Rehd. by supercritical CO₂ fluid. **School of Chemical and Environmental Engineering, Beijing Technology and Business University**, 26(8): 281-283.

YEN, G. C.; LAI, H. H.; CHOU, H. Y. 2001. Nitric oxide scavenging and antioxidant effects of *Uraria crinita* root. **Food Chemistry**, 74: 471-478.

YOUNG, I. S.; WOODSIDE, J. V. 2001. Antioxidants in health and disease. **Journal of Clinical Pathology**, 54, 176–186.

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

YUYAMA, P.M.; CAVALHEIRO, A.L.; VANZELA, A.L.L. 2006. Análise cariotípica em três espécies arbóreas da família Verbenaceae ocorrentes na bacia do rio Tibagi, Paraná. Anais **52º Congresso Brasileiro de Genética**, Foz do Iguaçu, PR.

ZAMORANO-PONCE, E.; MORALES, C.; RAMOS, D.; SEPÚLVEDA, C.; CARES, S.; RIVERA, P.; FERNÁNDEZ, J.; CARBALLO, M.A. 2006. Anti-genotoxic effect of *Aloysia triphylla* infusion against acrylamide-induced DNA damage as shown by the comet assay technique Mutation Research. **Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 603: 145-150.

ZÉTOLA, M.; DE LIMA, T.C.M.; SONAGLIO, D.; GONZÁLEZ-ORTEGA, G.; LIMBERGER, R.P.; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L. 2002. CNS activities of liquid and spray-dried extracts from *Lippia alba*/Verbenaceae (Brazilian false melissa). **Journal of Ethnopharmacology**, 82: 207-215.

ZOGHBI, M.G.B.; ANDRADE, E.H.A.; SANTOS, A.S.; SILVA, M.H.L.; MAIA, J.G.S. 1998. Essential oils of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown growing wild in Brazilian Amazon. **Flavour and Fragrance Journal**, 14: 411–414.

ZONNEVELD, B.J.M., LEITCH, I.J.; BENNETT, M.D. 2005. First nuclear DNA amounts in more than 300 angiosperms. **Annals of Botany**, **96**: 229-244.

ANEXO A – Artigo publicado

Ipolamiide and fulvoipolamiide from *Stachytarpheta glabra* (Verbenaceae): A structural and spectroscopic characterization

Lyderson F. Viccini^a, Pâmela S. Silva^a, Mauro V. de Almeida^b, Maurício F. Saraiva^b, Paulo Henrique P. Peixoto^c, Fátima Regina G. Salimena^c, Renata Diniz^b, Bernardo L. Rodrigues^d, Ian Scowen^e, Howell G.M. Edwards^e, Luiz F.C. de Oliveira^{b,*}

^a Departamento de Biologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brazil

^b Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brazil

^c Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brazil

^d Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brazil

^e Division of Chemical and Forensic Sciences, University Analytical Centre, School of Life Sciences, University of Bradford, Bradford, Yorkshire BD71DP, UK

Received 29 January 2007; received in revised form 26 March 2007; accepted 28 March 2007

Available online 12 April 2007

Abstract

The phenylethanoid glycoside acteoside and the iridoids ipolamiide and 4-methoxycarbonyl-7-methylcyclopenta[*c*]pyran (fulvoipolamiide) were isolated from the leaves of *Stachytarpheta glabra*. The solid state structure of fulvoipolamiide was confirmed by X-ray diffraction studies. The molecules of fulvoipolamiide are displayed in layers parallel to the crystallographic axis *a*. This molecule is planar with electron delocalization in the fused ring system and the pyran rings of adjacent layers in the solid state structure are involved in a π – π stacking interaction. Raman spectroscopy has also been used to characterize the most important bands present in the spectra of fulvoipolamiide and ipolamiide, and comparison made with literature allows the assignment of some key markers, specially the bands in the 1600–1700 cm^{-1} range.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Stachytarpheta glabra*; Verbenaceae; Ipolamiide; Iridoids; Raman; Crystal structure

1. Introduction

Verbenaceae is included in the order Lamiales and is widely found in practically every terrestrial ecosystem. It is one of the five most important families among the Eudicotyledonous of *Campylophytes*. This family includes 1035 species and 36 genera with a pantropical distribution few species are found in the temperate areas [1]. Several genera have been investigated due to their medicinal properties, of which *Lantana*, *Lippia* and *Stachytarpheta* [2] are noteworthy. The genus *Stachytarpheta* (Verbenaceae) includes nearly 90 species distributed in tropical and sub-

tropical America [3]. Some species are traditionally used in folk medicine as a purgative, vermifuge, expectorant, diuretic, emmenagogue, sore-throat gargles and as a general tonic [4]. Previous studies have reported the isolation of the iridoids lamiide and ipolamiide in some species including *S. jamaicensis*, *S. cayennensis*, *S. indica*, *S. australis*, *S. mutabilis* and *S. urticifolia* [5–14]. These constituents have been shown to possess several biological activities such as antimicrobial, antitumoral, anti-inflammatory, antinociceptive, hepatoprotective and laxative. They are also used for inhibition of gastric secretion and for treatment of immunopathological diseases related to oxidative stress [11,14–19]. *Stachytarpheta glabra* Cham. is a shrub 0.5–1.0 m high which is widespread in tropical and subtropical America. In Brazil it can be found in Minas

* Corresponding author. Tel.: +55 32 3229 3310; fax: +55 32 3229 3314.
E-mail address: luiz.oliveira@ufjf.edu.br (L.F.C. de Oliveira).

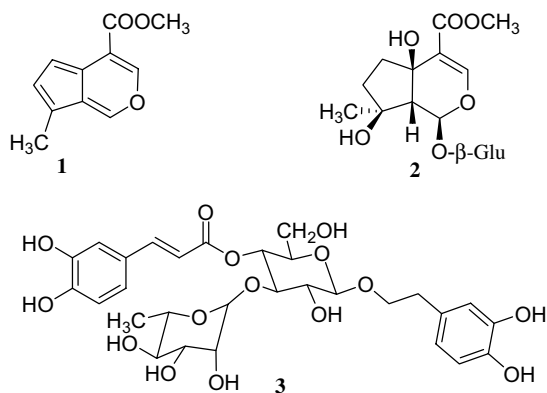


Fig. 1. Chemical structures of fulvoipolamiide (1), ipolamiide (2) and acteoside (3).

Gerais, Bahia and Rio de Janeiro states. Although the *Stachytarpheta* genus is significantly important in folk medicine, some species such as *S. glabra* have never been studied phytochemically hitherto. As part of an ongoing program to isolate compounds with biological activities from the *Stachytarpheta* genus and specifically *S. glabra*, in this paper we report the isolation and structural elucidation of fulvoipolamiide **1** and ipolamiide **2** (Fig. 1) which have been characterized in the solid state and in solution by means of Raman spectroscopy and X-ray diffraction techniques.

2. Experimental

2.1. Plant material

Samples of *S. glabra* Cham. were collected in Minas Gerais state, Brazil and identified by Dr. Fátima Regina Gonçalves Salimena (Dep. Botânica, UFJF). A voucher specimen (CESJ 42977) has been deposited at the Herbarium CESJ of the Universidade Federal de Juiz de Fora, Brazil.

2.2. General experimental procedures

Dried leaves of *S. glabra* (72.0 g) were submitted to a hydrodistillation extraction process for 4 h using a Clevenger-type apparatus to give a crude red solid material after solvent removal. This crude residue was chromatographed on silica gel using hexane/ethyl acetate as an eluent to give 600 mg of **1** (mp from EtOH–H₂O 89–91 °C; lit. [20] mp from MeOH–H₂O 85–87 °C). Dried and pulverized leaves from the same source (16.1 g) were also exhaustively extracted with ethanol 99.3% in a Soxhlet apparatus. The ethanol extract was evaporated to yield 4.53 g of a syrupy residue. This material was applied to a column of silica gel and eluted with ethyl acetate containing increasing amounts of methanol to give 2 fractions. These fractions were further chromatographed, eluting with CH₂Cl₂:MeOH mixed solvent to furnish specimens **2** (710 mg) and **3** (253 mg).

2.3. X-ray diffraction data

Single crystal X-ray diffraction data of specimens **1** and **2** were obtained. Compound **2** has been previously described in the literature [13]. Single crystal X-ray data were collected in a Nonius Kappa CCD diffractometer with MoK α ($\lambda = 0.71073$ Å) at room temperature. Data collection and reduction were performed by DENZO and SCALEPACK programs [21]. The structure was solved and refined using SHELXL-97 [22]. The final R and R_w values were 0.0749 and 0.1661, respectively. CCDC 602636 contains the supplementary crystallographic data for this compound. These data can be obtained free of charge at www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html or from the Cambridge Crystallographic Data Centre, 12, Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK [Fax: (internat.) 1 44-1223/336-033; E-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk].

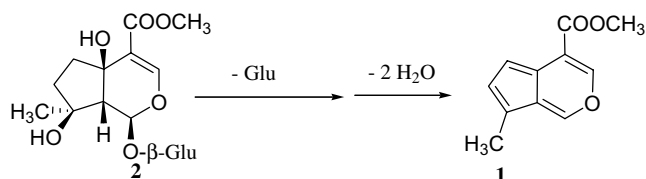
2.4. Raman measurements

Fourier-transform Raman spectra were obtained using a Bruker IFS66/FRA 106 instrument with Nd³⁺/YAG laser operating at 1064 nm with 4 cm⁻¹ spectral resolution and 500 spectral scans accumulated to improve the signal-to-noise ratio; laser powers were maintained at 50 mW or less at the samples to prevent possible damage to the biological materials. Wavenumbers of strong/sharp bands are accurate to ± 1 cm⁻¹ or better, and all spectra were recorded in triplicate for all samples to demonstrate that no thermal or photodecomposition had occurred during the spectroscopic analyses.

3. Results and discussion

The crude red material from the hydrodistillation process was chromatographed to furnish compound **1** as red crystals as reported previously [20]. A straightforward formation pathway giving rise to **1** can be envisaged starting from the known iridoid ipolamiide **2**, or some derivative, previously reported as a constituent of *Stachytarpheta* genus. As shown in Scheme 1, the loss of one molecule of glucose and two of water from **2** yields compound **1**.

Since the formation of compound **1** could have been accomplished during the Clevenger hydrodistillation process, a new extraction using ethanol 99.3% as solvent in a Soxhlet extractor was performed. Interestingly, in this crude extract, after solvent removal, the presence of compound **1** was not observed. This crude ethanolic extract



Scheme 1. Formation pathway of **1** from ipolamiide **2**.

was subjected to column chromatography to afford the major components ipolamiide **2** and acteoside **3**. The structures of these three known compounds were identified by comparison of their ^1H and ^{13}C NMR spectroscopic data with those of reported values in the literature [20,23,24]. For example, in the ^1H NMR spectrum of compound **1** two signals can be observed at δ 2.39 and 3.96, corresponding to the hydrogen atoms of CH_3 groups. Signals at δ 6.85, 6.93, 8.10 and 8.15, attributable to the aromatic ring hydrogens, can also be observed. In the ^{13}C NMR spectrum of this compound, signals are observed at δ 12.2 and 52.1, corresponding to the CH_3 groups; and signals at δ 112.0–144.0 regions can be attributed to the aromatic carbons. A signal at δ 166.3 is also observed, corresponding to the carbonyl group.

Additionally, the structures of **1** and **2** were also confirmed by X-ray analysis; here, the crystal structure of **1** is described for the first time but that of compound **2** was previously investigated by Roengsumran and co-workers [13]. Crystal data are displayed in Table 1 and the ortep [25] view of crystal structures is shown in Fig. 2. The molecules of compound **1** are displayed in layers parallel to the crystallographic axis *a*, with layer distances of about 3.5 Å. An $\text{O}\cdots\text{HC}$ van der Waals interaction is observed between molecules of the same layer with an $\text{O}\cdots\text{C}$ distance of 3.251(5) Å. Although the molecules of the same layer present the same orientation with respect to each other, in adjacent layers the molecules are inverted in relation to each other. The molecules are planar and no methyl hydrogen atoms are located in special positions on the mirror plane *m* of space group $P2_1/m$. The average C–C ring and C–C bond distance are, respectively, 1.400(5) Å and 1.498(6) Å, and the largest C–C bond distance in the rings is about 1.467(5) Å, indicating the presence of electronic delocalization in the ring systems. The pyran rings of adjacent layers are involved in a π – π stacking interaction [26]

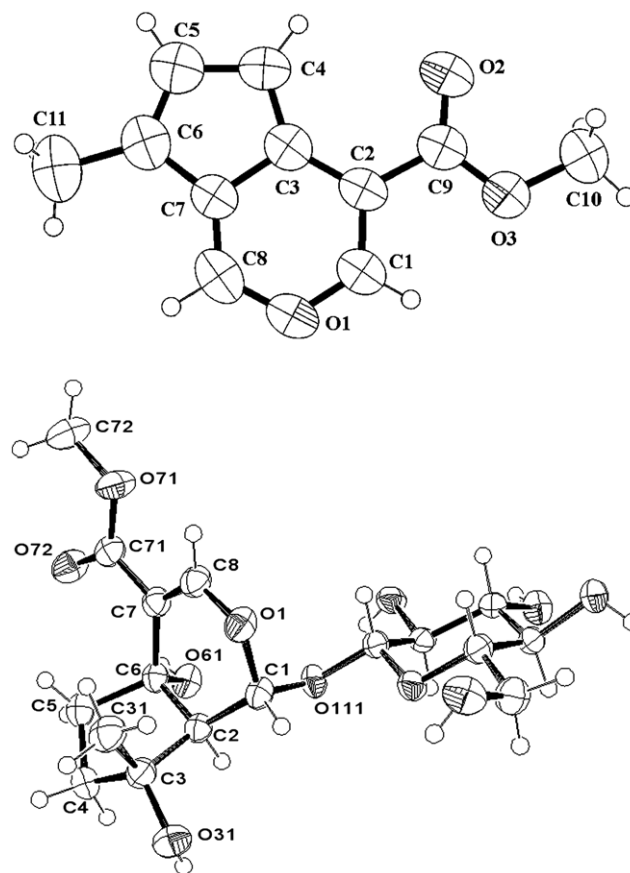


Fig. 2. Ortep [25] view of crystal structure of fulvoipolamiide (**1**, top) and ipolamiide (**2**, down). The ellipsoids are displayed with 50% probability level.

where the centroid–centroid and centroid–plane distances are, respectively, 3.54 and 3.36 Å, presenting a horizontal shift around of 1.00 Å.

The crystal structure of compound **2** has been described earlier [13]. This compound does not have electronic delocalization in the rings due to its non-planarity, unlike compound **1**. The average C–C ring bond distance here is 1.534(2) Å, which is significantly larger than that observed for compound **1**. This compound has a single water of hydration molecule involved in 3 medium-strength hydrogen bonds, for which the average of $\text{O}\cdots\text{O}$ distance is 2.752(4) Å. The ester group is also involved in medium-strength hydrogen bonding to the hydroxyl group of neighboring molecules where the $\text{O}\cdots\text{O}$ distance is 2.791(4) Å. Selected bond distances of both compounds are listed in Table 2.

Raman spectra of compounds **1** and **2**, obtained with 1064 nm excitation, can be seen in Fig. 3a and b. The assignments of the main vibrational bands have been carried out, based on similar molecules [27–29] in the literature. The Raman spectra of both compounds are quite different, arising from the structural differences between fulvoipolamiide (**1**) and ipolamiide (**2**); this can be attributed to the electronic delocalization in compound **1** which also gives rise to the red colour of this compound. In the

Table 1
Crystal data of compounds **1** and **2**

Compound	1	2
Formula	$\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_3$	$\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{O}_{12}$
Formula weight	190.19	424.40
Crystal system	Monoclinic	Orthorhombic
Space group	$P2_1/m$	$P2_12_12_1$
<i>a</i> (Å)	8.248(2)	7.8831(2)
<i>b</i> (Å)	6.719(2)	10.3629(3)
<i>c</i> (Å)	8.662(2)	24.4899(6)
β (°)	95.08(1)	90.00
<i>V</i> (Å ³)	478.2(2)	2000.62(9)
<i>Z</i>	2	4
<i>d</i> _{calc.} (g cm ⁻³)	1.321	1.409
Refl. Meas./unique	4388/1137	31624/4210
Obs. refl. [<i>I</i> _o > 2 <i>s</i> (<i>I</i> _o)]	449	3488
Parameters	86	334
<i>R</i>	0.075	0.029
<i>wR</i>	0.166	0.069
<i>S</i>	0.914	1.087
RMS peak (e ⁻ Å ⁻³)	0.044	0.032

Table 2
Selected bond distances (Å) and bond angles (°) of compounds **1** and **2**

	(1)	(2)		(1)	(2)
C1–C2	1.362(6)	1.512(2)	C1–O1	1.346(5)	1.436(2)
C2–C3	1.419(6)	1.549(2)	C8–O1	1.364(5)	1.355(2)
C3–C4	1.359(6)	1.527(2)	C9–O2	1.208(5)	
C4–C5	1.442(5)	1.523(2)	C9–O3	1.307(5)	
C5–C6	1.337(7)	1.557(2)	C71–O71		1.338(2)
C6–C7	1.436(6)	1.514(2)	C72–O71		1.440(2)
C7–C8	1.315(6)	1.331(2)	C71–O72		1.213(2)
C1–O1–C8	118.9(6)	116.2(1)	C4–C5–C6	111.5(9)	106.0(1)
O1–C1–C2	123.6(8)	114.0(1)	C5–C6–C7	106.0(8)	
C1–C2–C3	118.4(8)	116.6(1)	C3–C7–C6	107.5(7)	
C2–C3–C7	116.3(7)		C3–C7–C8	120.5(7)	
C4–C3–C7	107.1(7)		C7–C8–O1	122.2(8)	126.8(2)
C3–C4–C5	107.9(8)	103.8(1)			

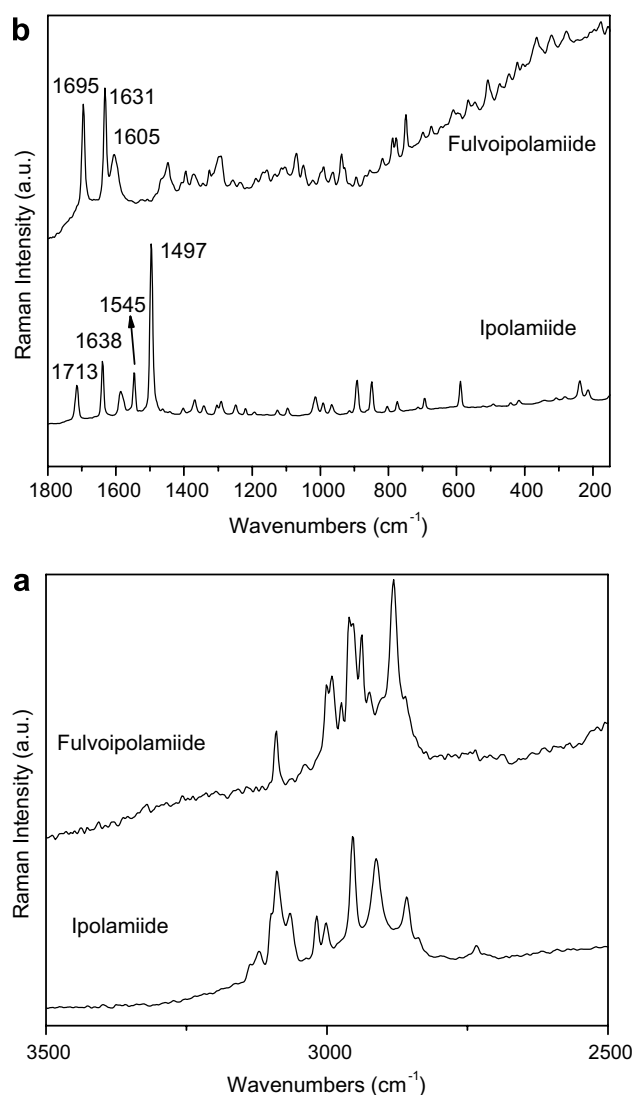


Fig. 3. Fourier transform Raman spectra of fulvoipolamiide (**1**) and ipolamiide (**2**), excited at 1064 nm, splitted in two regions: 3500–2500 cm^{-1} (a) and 1800–150 cm^{-1} (b).

high wavenumber region (Fig. 3a), compound **1** presents some medium intense bands related to CH_3 mode stretching, whereas in compound **2**, in addition there are also

present CH_2 groups and carbohydrate species. However, the biggest differences between these two spectra can be seen in the 1400–1700 cm^{-1} regions, for which the Raman spectra of benzofuran [28] provides clarification. The bands observed at 1631 and 1605 cm^{-1} in the Raman spectrum of fulvoipolamiide (**1**) are clearly present in the spectrum of benzofuran, and they can be assigned as carbon–carbon stretching modes, termed ν_7 and ν_8 modes in the Klots and Collier investigation [28]. The intense band at 1695 cm^{-1} of benzofuran is not present in the Raman spectrum, and seems to be related to the carboxyl moiety stretching mode. Fig. 3 depicts the Raman spectrum of ipolamiide, which contains the substituted iridoid ring and also a glucose unit. The most intense band, that at 1497 cm^{-1} , can be assigned to a coupled $\text{C}=\text{O}$ and $\text{C}=\text{C}$ stretching vibration, as well some contribution from the CH_2 bending mode of a β -glucose species which has a medium intensity band in the Raman spectrum of glucose around 1470 cm^{-1} [30]. The observed bands in the wavenumber region between 1600–1700 cm^{-1} can be interpreted as key bands of such a compound, according to Schulz et al. [31,32], who characterized the iridoid glycoside (harpagoside) by means of Raman spectroscopy and assigned them to $\text{C}=\text{C}$ and $\text{C}=\text{O}$ modes of the iridoid structure. It is worth noting that in this region (around 1600 cm^{-1}) the $\text{C}=\text{O}$ stretching vibration mode must have a higher contribution to the mode description than the $\text{C}=\text{C}$ vibration. The band at 1713 cm^{-1} can be assigned to the almost pure carbonyl stretching mode of this compound and some of the low intensity bands observed in the spectrum can be attributed to the carbohydrate modes, as for instance those at 1368 and 1290 cm^{-1} related to COH and CCH stretching modes, and those at 1094 and 1016 cm^{-1} related to CC stretching from the cyclic ring and HCO modes [33].

4. Conclusions

Fulvoipolamiide (**1**) and ipolamiide (**2**), isolated from leaves of *S. glabra*, have been characterized by means of X-ray diffraction and Raman spectroscopy. The crystal structure of **1** is described here for the first time, and the data show that the molecule is planar and is arranged in layers parallel to the crystallographic axis *a*. The molecules in the same layer have the same orientation, however in adjacent layers the molecules are inverted in relation to each other. The $\text{C}-\text{C}$ ring bond distances are very similar to each other, indicating the electronic delocalization in these rings. The pyran rings of adjacent layers are involved in a $\pi-\pi$ stacking interaction [26] where centroid–centroid and centroid–plane distances are, respectively, 3.54 and 3.36 Å. Compound **2** does not exhibit electronic delocalization in the rings and from this, is ascribed the colour difference between the two compounds, compound **2** being colourless although **1** is red. Fulvoipolamiide contains one hydration water molecule that is involved in three medium-strength hydrogen bonds, for which the average $\text{O}\cdots\text{O}$ distance is 2.752(4) Å. The ester group is also involved in

medium strength hydrogen bonding to the hydroxyl groups of neighboring molecule, where the O...O distance is 2.791(4) Å. Raman spectroscopic measurements for compounds **1** and **2** indicate some key bands that can be used for reliable analysis and discrimination for both compounds, mainly those at 1695 and 1631 cm⁻¹ for compound **1** and 1713 and 1497 cm⁻¹ for compound **2**, assigned as $\nu(\text{C}=\text{O})$ and $\nu(\text{C}=\text{O})$ and $\nu(\text{C}=\text{C})$ for both compounds, respectively.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge CNPq, FAPEMIG and FINEP (Brazilian agencies) for financial support.

References

- [1] W.S. Judd, C.S. Campbell, E.A. Kellogg, P.F. Stevens, *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach*, Sinauer Associates, Massachusetts, USA, 1999, pp. 464.
- [2] F.R.G. Salimena, *Revisão taxonômica de Lippia L., sect. Rhodolippia Schauer (Verbenaceae)*, D. Sc. Thesis, Universidade de São Paulo, Brazil, 2000.
- [3] P.F. Stevens, (2001 onwards) Angiosperm Phylogeny Website. Version 6, May 2005 [and more or less continuously updated since]. Available from: <<http://www.mobot.org/mobot/research/apweb/>>, Accessed 08 Dec., 2005.
- [4] R.W. Sanders, *Harvard Papers in Botany* 5 (2001) 303.
- [5] B. Tantisewie, O. Sticher, *Phytochemistry* 14 (1975) 1462.
- [6] F.H. Jawad, N.J. Doorenbosx, P.C. Chengt, *Egypt J. Pharm. Sci.* 18 (1977) 511.
- [7] C. De Luca, *Fitoterapia* 51 (1980) 279.
- [8] G. Akisue, M.A. De Alvarenga, D.A.D. Barros, O.R. Gottlieb, *An. Farm. Quim. São Paulo* 21 (1981) 57.
- [9] S.M. Rodriguez, O. Castro, *Rev. Biol. Trop.* 44 (1996) 353.
- [10] D.O. Futuro, M.A.C. Kaplan, *An. Acad. Bras. Cienc.* 70 (1998) 755.
- [11] E.E.S. Schapoval, M.R.W. Vargas, C.G. Chaves, R. Bridi, J.A. Zuanazzi, A.T. Henriques, *J. Ethnopharmacol.* 60 (1998) 53.
- [12] S. Ganapaty, G.J. Babu, K.C. Naidu, *J. Med. Aromat. Plant Sci.* 20 (1998) 697.
- [13] S. Roengsumran, K. Sookkongwaree, N. Jaiboon, N. Chaichit, A. Petsom, *Anal. Sci.* 18 (2002) 1063.
- [14] R. Chowdhury, M.U. Rashid, O.F. Khan, C.M. Hasan, *Biochem. Syst. Ecol.* 31 (2003) 1209.
- [15] M.D.C. Recio, R.M. Giner, S. Manez, J.L. Rios, *Planta Med.* 60 (1994) 232.
- [16] S. Mesia-Vela, C. Souccar, M.T. Lima-Landman, A.J. Lapa, *Planta Med.* 63 (1997) 36.
- [17] R. Chowdhury, M.U. Rashid, O.F. Khan, C.M. Hasan, *Pharm. Biol.* 42 (2004) 262.
- [18] E. Alvarez, J.M. Leiro, M. Rodriguez, F. Orallo, *Phytother. Res.* 18 (2004) 457.
- [19] S. Mesia-Vela, C. Souccar, M.T. Lima-Landman, A.J. Lapa, *Phyto-medicine* 11 (2004) 616.
- [20] A. Bianco, M. Guiso, C. Iavarone, R. Marinni-Bettolo, C. Trogolo, *Gazz. Chim. Ital.* 106 (1976) 947.
- [21] Z. Otwinowski, W. Minor, *Methods Enzymol.* 276 (1997) 307.
- [22] G.M. Sheldrick, SHELXL-97 – A Program for Crystal Structure Refinement, University of Goettingen, Germany 1997.
- [23] S. Damtoft, S.R. Jensen, B.J. Nielsen, *Phytochemistry* 23 (1984) 907.
- [24] J.C. Chun, J.C. Kim, I.T. Hwang, S.E. Kim, *Pest. Biochem. Physiol.* 72 (2002) 153.
- [25] L.J. Farrugia, *J. Appl. Cryst.* 30 (1997) 565.
- [26] D. Braga, C. Bazzi, F. Grepionie, J.J. Novoa, *New J. Chem.* 23 (1999) 577.
- [27] W.B. Collier, I. Magdó, T.D. Klots, *J. Chem. Phys.* 110 (1999) 5710.
- [28] T.D. Klots, W.B. Collier, *Spectrochim. Acta Part A* 51 (1995) 1291.
- [29] W.B. Collier, *J. Chem. Phys.* 88 (1988) 7295.
- [30] L.F.C. de Oliveira, R. Colombara, H.G.M. Edwards, *App. Spectrosc.* 56 (2002).
- [31] M. Baranska, H. Schulz, R. Siuda, M.A. Strehle, P. Rösch, J. Popp, E. Joubwert, M. Manley, *Biopolymers* 77 (2005) 1.
- [32] H. Schulz, M. Baranska, *Vib. Spectrosc.* 43 (2007) 13.
- [33] A. Mokrane, P. Friant-Michel, A. Cartier, J.-L. Rivail, *J. Mol. Struct. Theochem.* 395–396 (1997) 71.