



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

JUHAN AUGUSTO SCARDELATO PEREIRA

Avaliação da variabilidade do metabolismo secundário em
***Cordia verbenacea* DC.**

Araraquara

2017

JUHAN AUGUSTO SCARDELATO PEREIRA

**Avaliação da variabilidade do metabolismo secundário em
Cordia verbenacea DC.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de Araraquara como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos

**Araraquara
2017**

Ficha Catalográfica

Elaborada por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Pereira, Juhan Augusto Scardelato
P436a Avaliação da variabilidade do metabolismo secundário em *Cordia verbenacea* DC / Juhan Augusto Scardelato Pereira. – Araraquara, 2017.
157 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento em Fármacos e Medicamentos.

Orientador: André Gonzaga dos Santos.

1. *Cordia verbenacea*. 2. Flavonoides. 3. Triterpenos. 4. Variabilidade química. 5. Quimiometria.
6. Variabilidade química. I. Santos, André Gonzaga dos, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

JUHAN AUGUSTO SCARDELATO PEREIRA

**Avaliação da variabilidade do metabolismo secundário em *Cordia
verbenacea* DC**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de Araraquara como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Araraquara, 31 de março de 2017.

BANCA EXAMINADORA



ANDRÉ GONZAGA DOS SANTOS (Orientador)



DANILO LUIZ FLUMIGNAN



ÍLIO MONTANARI JUNIOR



VANDERLAN DA SILVA BOLZANI



ALBERTO JOSE CAVALHEIRO

Dedico este trabalho à minha mãe, Regina, atribuindo-lhe todo meu sucesso, aos ensinamentos morais e intelectuais que me dedicou.

Ao meu irmão, Jhansen, pois mesmo com as inúmeras brigas nunca deixou de ser meu melhor amigo e uma das pessoas que sempre contarei para estar ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Aos meus avós, Luís e Maria, por terem sido como pais para mim; sinto muita sua falta. Muito obrigado por tudo o que fizeram durante o pouco tempo que estivemos juntos.

Ao meu Padrasto, Dirley, por ser a figura paterna que tive em minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos, pela orientação incondicional e amizade.

Aos professores, Dr. Alberto José Cavalheiro e Dr. Cristiano Soleo de Funari, pelas orientações na qualificação deste trabalho.

Aos Técnicos Caio e Jussara, que sempre me ajudaram muito além de suas funções e com os quais criei laços de amizade.

Ao professor Dr. Danilo Luiz Flumignan pela sua orientação durante o período de trabalho no Instituto Federal de São Paulo – Campus Matão.

Ao professor Dr. Ílio Montanari Júnior, por todo suporte e ajuda prestada durante as coletas no CPQBA – Unicamp.

Ao professor Dr. Hector C. Goicoechea, por toda amizade e orientação durante meu período sanduíche na Universidad Nacional Del Litoral em Santa Fé – Argentina.

A todos os amigos Fernando, Gabi, Célia, Ana, Cissa, Felipe, Danilo, Rogério, Rafael, Ricardo, Emerson, Bruno e em especial ao Flávio por toda a ajuda durante os vários momentos complicados desta etapa.

A casa mitre, Dener, Samara, Isa, Natt e Susan, minha “família” durante o período sanduíche na Argentina.

Ao Bonny, Babby, Michinha (Nânico), Luffy e Hanna por todos os momentos de alegria que me proporcionaram durante minha vida.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).
Processos nº 2013/24298-9 e 2016/10519-1.

*"Não tem nada a ver com ser possível ou não,
eu faço porque quero"*

Monkey D. Luffy (One Piece)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Cordia verbenacea</i> DC. (Fonte: próprio autor)	21
Figura 2 - Estrutura química da artemetina. Fonte: próprio autor.....	22
Figura 3 - Estruturas químicas de metabólitos secundários identificados em <i>C. verbenacea</i> . A: cordialina A; B: cordialina B; C: 7,4'-diidroxí-5'-carboximetóxi isoflavona; D: 7,4'-diidroxí-5'-metil isoflavona; E: ácido rosmarínico; F: ácido caféico; G: ácido gálico; H: ácido clorogênico. Fonte: próprio autor.....	24
Figura 4 - Estruturas químicas de metabólitos secundários do óleo essencial de folhas de <i>C. verbenacea</i> . A: α -humuleno; B: <i>trans</i> -cariofileno; C: allo-aromadendreno; D: α -pineno, E: 1,8-cineole; F: δ -elemeno; G: β -elemeno; H: δ -cadineno; I: β -bisaboleno. Fonte: próprio autor.	25
Figura 5 - Espécimes de <i>C. verbenacea</i> no campo experimental do CPQBA-UNICAMP (Paulínia-SP).....	28
Figura 6 - Espécimens de <i>Cordia verbenacea</i> DC. no campo experimental do CPQBA-UNICAMP	34
Figura 7 - Curva analítica da cordialina A obtida em CLAE-DAD.....	39
Figura 8 - Curva analítica da substância isolada da subfração F.4.1.30 em CLAE-DAD	40
Figura 9 - Curva analítica da substância diidroxipentametoxiflavona em CLAE-DAD	41
Figura 10 - Curva analítica da substância <i>trans</i> -cariofileno em CG-EM.....	42
Figura 11 - Curva analítica da substância α -humuleno em CG-EM.....	43
Figura 12 - Cromatoplaça das frações EFS-teste. Amostras, da esquerda para direita: F.1, F.2, F.3, F.4, F.6, F.5 e F.MetOH. Fase móvel: hexano/acetato de etila/isopropanol 70:28:2. Revelador: anisaldeído sulfúrico. Círculos pontilhados indicam manchas visualizadas sob luz UV (365 nm).....	44
Figura 13 - Cromatoplaça das frações EFS. Amostras, da esquerda para direita: F.1.1, F.1.2, F.2.1, F.2.2, F.3.1, F.3.2, F.4.1, F.4.2, F.5.1, F.5.2 e F.etOH. Fase móvel clorofórmio/acetato de etila 60:40. Revelador: ácido sulfúrico 10%.	46
Figura 14 - Cromatograma por CLAE-UV do extrato etanólico (1,0 mg/mL, MeOH). Gradiente exploratório: 5-100 % de metanol em 30 min, mais 100% de metanol por 5 min; coluna Thermo Scientific® C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m), $\lambda_{m\acute{a}x}$ = 254 nm, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20 μ L	46
Figura 15 - Cromatogramas em CLAE-UV (gradiente exploratório) das frações 1.1, 1.2, 2.1, 2.2 e 3.1 (1,0 mg/mL, MeOH). Gradiente exploratório: 5-100 % de metanol em 30 min, mais 100% de metanol por 5 min; coluna Thermo Scientific® C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m), $\lambda_{m\acute{a}x}$ = 254 nm, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20 μ L	47
Figura 16 - Cromatoplaças das frações EFS. Amostras, da esquerda para direita: F.3.1, F.3.2, F.4.1, F.4.2, F.5.1, F.5.2. Fase móvel: clorofórmio/acetato de etila/metanol 55:35:10. Revelador: ácido sulfúrico 10%.....	49
Figura 17 - Cromatoplaças da fração 4.1: otimização de condições de transferência de CCD para CC. Amostras, da esquerda para a direita: A: $R_f < 0,5$. B: $0,2 < R_f < 0,8$. Fase móvel: A: benzeno/acetato de etila/metanol 60:38:2 e B: benzeno/acetato de etila/metanol 55:35:10. Revelador: ácido sulfúrico 10%.....	50
Figura 18 - Espectro no UV/Vis de F 4.1 (0,062 mg mL ⁻¹ Metanol) do extrato etanólico de <i>C. verbenacea</i>	50
Figura 19 - Cromatoplaças das subfrações da F.4.1. Amostras, da esquerda para a direita: 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46. Fase móvel: benzeno/acetato de etila/metanol 55:35:10. Revelador: ácido sulfúrico 10%.....	51
Figura 20 - Cromatogramas em CLAE-UV das subfrações: A: 4.1.18, B: 4.1.24 e C: 4.1.30 (1,0 mg/mL, MeOH). Condições de análises: A: 68 % de metanol de 0-55 min.; vazão de 0,4 mL/min; detector com comprimento de onda em 254 nm.; B: 67% de metanol de 0-35 min. vazão de 0,4 mL/min; detector com comprimento de onda em 254 nm.; C: 83% de metanol de 0-78 min.; vazão de 0,4 mL/min; $\lambda_{m\acute{a}x}$ =254 nm.....	52

Figura 21 - Cromatogramas em CLAE-UV de substâncias purificadas das subfrações F.4.1.18, F.4.1.24 e F.4.1.30. A: Substância com 91,0% de pureza isolada da F.4.1.18; B: Substância com 97,9% de pureza isolada da F.4.1.24; C: Substância com 96,0% de pureza isolada da F.4.1.30 e D: Substância com 97,3% de pureza isolada da F.4.1.30 Condições de análise: Concentração de 1,0 mg/mL em metanol. Condições cromatográficas – coluna Ace® C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm); volume de injeção: 20 µL; $\lambda_{\text{máx}}$ = 254 nm; vazão de 0,4 mL/min; fase móvel (modo isocrático): A - 68 % de metanol por 55 min; B: 67% de metanol por 35 min; C e D: 83% de metanol por 78 min.	53
Figura 22 - Espectro no UV da cordialina A (0,0375 mg/mL, metanol).	54
Figura 23 - Espectro de absorção no IV da cordialina A (KBr).	54
Figura 24 - Estrutura química de cordialina A.	56
Figura 25 - Espectro de RMN de ^1H de cordialina A obtido a 300 MHz em CDCl_3 (10 mg/mL).	57
Figura 26 - Expansão do espectro de RMN de ^1H de cordialina A obtido a 300 MHz em CDCl_3 (10 mg/mL).	58
Figura 27 - Espectro de RMN de ^{13}C de cordialina A obtido a 75 MHz em CDCl_3 (25 mg/mL).	59
Figura 28 - Espectro UV de substância purificada da subfração F.4.1.30 pico 1 (0,05 mg mL ⁻¹ , metanol).	60
Figura 29 - Espectro de absorção no IV da <i>cis</i> -cordialina A (KBr).	61
Figura 30 - Estrutura química da <i>cis</i> -cordialina A.	62
Figura 31 - Espectro de RMN de ^1H da <i>cis</i> -cordialina A obtido a 300 MHz em CDCl_3 (18 mg/mL).	63
Figura 32 - Expansão do espectro de RMN de ^1H da <i>cis</i> -cordialina A obtido a 300 MHz em CDCl_3 (18 mg/mL).	64
Figura 33 - Espectro de RMN de ^{13}C da <i>cis</i> -cordialina A obtido a 75 MHz em CDCl_3 (18 mg/mL).	65
Figura 34 - Espectro no UV da 4',5-diidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona ou 2',5-diidroxi-4',3,5',6,7-pentametoxiflavona (0,0125 mg mL ⁻¹ , metanol).	66
Figura 35 - Estrutura química das flavonas.	66
Figura 36 - Espectro de absorção no IV da 4',5-diidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona ou 2',5-diidroxi-4',3,5',6,7-pentametoxiflavona (pastilha de KBr).	67
Figura 37 - Estrutura química da 4',5-diidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona (A) ou 2',5-diidroxi-4',3,5',6,7-pentametoxiflavona (B).	69
Figura 38 - Espectro de RMN de ^1H de 4',5-diidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona ou 2',5-diidroxi-4',3,5',6,7-pentametoxiflavona obtido a 300 MHz em CDCl_3 (17 mg/mL).	70
Figura 39 - Expansão do espectro de RMN de ^1H de 4',5-diidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona ou 2',5-diidroxi-4',3,5',6,7-pentametoxiflavona obtido a 300 MHz em CDCl_3 (17 mg/mL).	71
Figura 40 - Espectro de RMN de ^{13}C de 4',5-diidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona ou 2',5-diidroxi-4',3,5',6,7-pentametoxiflavona obtido a 75 MHz em CDCl_3 (17 mg/mL).	72
Figura 41 - Espectro de RMN de ^1H de artemetina obtido a 600 MHz em CDCl_3 (1,7 mg/mL).	73
Figura 42 - Estrutura química da artemetina.	74
Figura 43 - Rendimento do extrato (mg/1 g de droga vegetal) de 27 espécimens (análise populacional) de <i>C. verbenacea</i>	75
Figura 44 - Rendimento dos extratos dos espécimens do estudo circadiano de <i>C. verbenacea</i>	75
Figura 45 - Rendimento dos extratos dos espécimens do estudo circadiano de <i>C. verbenacea</i>	76
Figura 46 - Rendimento dos extratos dos espécimens de <i>C. verbenacea</i> do estudo sazonal. Os espécimens 2II5 e 3II5 não apresentaram rendimento no mês de maio/2016 a Nov/2016 devido a insuficiência de massa foliar para obtenção do extrato etanólico.	76

Figura 47 - Amplitude térmica e temperatura média no dia da coleta de novembro/2014 a novembro/2016.....	77
Figura 48 - Pluviosidade mensal acumulada dos meses de novembro/2014 a novembro/2016.....	77
Figura 49 - Média do Rendimento dos extratos das espécimens de <i>C. verbenacea</i> do estudo sazonal. Os espécimens 2II5 e 3II5 não apresentaram rendimento no mês de maio/2016 a Nov/2016 devido a insuficiência de massa foliar para obtenção do extrato etanólico.....	78
Figura 50 - Média do endimento dos extratos dos espécimens do estudo circadiano (1).....	78
Figura 51 - Média do rendimento dos extratos dos espécimens do estudo circadiano (2)	78
Figura 52 - Cromatograma em CLAE-UV do EetOH de <i>C. verbenacea</i> . Condições de análise: 0-10': 6 a 20%; 10-13': 20 a 35%; 13-60': 35 a 68%; 60-62': 68 a 100%; 62-70': 100% acetonitrila; coluna: Ace [®] C18 (250x4.6mm; 5µm); Injeção de 20 µL; λ-254 nm; vazão de 1,0 mL/min.	80
Figura 53 - Cromatogramas de 27 espécimens de <i>C. verbenacea</i> obtidos por CLAE-DAD. Condições de análise: 0-10': 8 a 20%; 10-13': 20 a 35%; 13-60': 35 a 68%; 60-62': 68 a 100%; 62-70': 100% acetonitrila; coluna: Ace [®] C18 (250x4,6 mm; 5 µm); Injeção de 20 µL; λ-254 nm; vazão de 1,0 mL/min.	81
Figura 54 - Gráfico obtido utilizando resultados de análises por CLAE-DAD através de análises de componentes principais (PCA) de 27 extratos de <i>C. verbenacea</i> do estudo populacional. Códigos dos espécimens: (1- 1I4, 2- 1VI1, 3- 1IV4, 4- 2I2, 5- 2II5, 6- 2III3, 7- 2IV5, 8- 3I4, 9- 3II1, 10- 3II5, 11- 3IV1, 12- 5I2, 13- 5II4, 14- 5IV1, 15- 5IV3, 16- 13I1, 17- 13I5, 18- 13II4, 19- 13VI2, 20- 25I3, 21- 25II5, 22- 25III2, 23- 25IV5, 24- 26I3, 25- 26I5, 26- 26IV1, 27- 26IV5).....	82
Figura 55 - Gráfico de loadings obtido utilizando resultados de análises por CLAE-DAD através de análises de componentes principais (PCA) de 27 extratos de <i>C. verbenacea</i> do estudo populacional. Destaques para as 4 substâncias isoladas: 1- 4',5-diidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona; 7- artemetina, 10- <i>cis</i> -cordialina A e 13 - cordialina A.	83
Figura 56 - Comparação de dois cromatogramas: A- Pop mist 27 (mistura de 27 espécimens diferentes) e B - espécimen 2I2, obtidos por CLAE-DAD de extratos de <i>C. verbenacea</i> . Condições de análise: 0-10': 8 a 20%; 10-13': 20 a 35%; 13-60': 35 a 68%; 60-62': 68 a 100%; 62-70': 100% acetonitrila; coluna: Ace [®] C18 (250x4,6 mm; 5 µm); Injeção de 20 µL; λ-254 nm; vazão de 1,0 mL/min. Setas na vertical: substâncias com menor teor em relação aos demais espécimens; Setas na horizontal: substâncias com maior teor em relação aos demais espécimens.	84
Figura 57 - Dendograma obtido utilizando resultados de análises por CLAE-DAD através de análises de agrupamentos hierárquicos (HCA) de 27 extratos de <i>C. verbenacea</i> , onde observamos 5 grandes grupos e o extrato da espécimen 2I2 referente ao número 4 isolado das demais. Códigos dos espécimens: (1- 1I4, 2- 1VI1, 3- 1IV4, 4- 2I2, 5- 2II5, 6- 2III3, 7- 2IV5, 8- 3I4, 9- 3II1, 10- 3II5, 11- 3IV1, 12- 5I2, 13- 5II4, 14- 5IV1, 15- 5IV3, 16- 13I1, 17- 13I5, 18- 13II4, 19- 13VI2, 20- 25I3, 21- 25II5, 22- 25III2, 23- 25IV5, 24- 26I3, 25- 26I5, 26- 26IV1, 27- 26IV5).....	85
Figura 58 - Gráfico obtido utilizando resultados de análises por CLAE-DAD através de análises de componentes principais (PCA) dos 7 espécimens do estudo circadiano com destaque aos agrupamentos para 5 coletas de cada espécimen.	86
Figura 59 - Gráfico de loadings obtido utilizando resultados de análises por CLAE-DAD através de análises de componentes principais (PCA) de 7 espécimens de <i>C. verbenacea</i> do estudo circadiano. Destaques para as 4 substâncias isoladas: 1- diidroxipentametoxiflavona; 9- artemetina, 13- <i>cis</i> -cordialina A e 16- cordialina A.	86
Figura 60 - Dendograma obtido utilizando resultados de análises por CLAE-DAD através de análises de agrupamentos hierárquicos (HCA) das 5 coletas das 7 espécimens do estudo circadiano.	87
Figura 61 - Gráfico obtido utilizando resultados de análises por CLAE-DAD através de análises de componentes principais (PCA) das 13 coletas de cada uma das 7 espécimens do estudo sazonal.	88

Figura 62 - Gráfico de <i>loadings</i> obtido utilizando resultados de análises por CLAE-DAD através de análises de componentes principais (PCA) de 7 espécimens de <i>C. verbenacea</i> do estudo sazonal. Destaques para as 4 substâncias isoladas: 1- diidroxipentametoxiflavona; 9- artemetina, 12- <i>cis</i> -cordialina A e 16- cordialina A.....	88
Figura 63 - Dendograma obtido utilizando resultados de análises por CLAE-DAD através de análises de agrupamentos hierárquicos (HCA) das 13 coletas das 7 espécimens do estudo sazonal.....	89
Figura 64 - Concentração de substâncias isoladas encontradas nos extratos etanólicos de espécimens de <i>C. verbenacea</i> do estudo populacional.....	90
Figura 65 - Concentração de cordialina A no extrato etanólico de espécimens de <i>C. verbenacea</i> do estudo circadiano.....	91
Figura 66 - Concentração de <i>cis</i> -cordialina A do extrato etanólico de espécimens de <i>C. verbenacea</i> do estudo circadiano.....	91
Figura 67 - Concentração de cordialina A do extrato etanólico de espécimens de <i>C. verbenacea</i> do estudo circadiano 2.....	91
Figura 68 - Concentração de <i>cis</i> -cordialina A do extrato etanólico de espécimens de <i>C. verbenacea</i> do estudo circadiano 2.....	92
Figura 69 - Concentração de cordialina A no extrato etanólico de espécimens de <i>C. verbenacea</i> do estudo sazonal. Os espécimens 2II5 e 3II5 não apresentaram teor no mês de maio/2016 a Nov/2016 devido a insuficiência de massa foliar para obtenção do extrato etanólico.....	93
Figura 70 - Concentração de <i>cis</i> -cordialina A do extrato etanólico de espécimens de <i>C. verbenacea</i> do estudo sazonal. Os espécimens 2II5 e 3II5 não apresentaram teor no mês de maio/2016 a Nov/2016 devido a insuficiência de massa foliar para obtenção do extrato etanólico.....	93
Figura 71 - Média do rendimento de <i>cis</i> -cordialina A dos espécimens do estudo circadiano (1).....	94
Figura 72 - Média do rendimento de <i>cis</i> -cordialina A dos espécimens do estudo circadiano (2).....	94
Figura 73 - Média do rendimento de cordialina A dos espécimens do estudo circadiano (1).....	94
Figura 74 - Média do rendimento de cordialina A dos espécimens do estudo circadiano (2).....	95
Figura 75 - Média do rendimento de <i>cis</i> -cordialina A dos espécimens do estudo sazonal.....	95
Figura 76 - Média do rendimento de cordialina A dos espécimens do estudo sazonal.....	95
Figura 77 - Concentração de diidroxipentametoxiflavona no extrato etanólico de espécimens de <i>C. verbenacea</i> do estudo circadiano.....	96
Figura 78 - Concentração de diidroxipentametoxiflavona no extrato etanólico de espécimens de <i>C. verbenacea</i> do estudo circadiano 2.....	96
Figura 79 - Concentração de diidroxipentametoxiflavona no Extrato etanólico de espécimens de <i>C. verbenacea</i> do estudo sazonal. Os espécimens 2II5 e 3II5 não apresentaram rendimento no mês de maio/2016 a Nov/2016 devido a insuficiência de massa foliar para obtenção do extrato etanólico.....	97
Figura 80 - Média do rendimento da diidroxipentametoxiflavona dos espécimens do estudo circadiano (1).....	98
Figura 81 - Média do rendimento da diidroxipentametoxiflavona dos espécimens do estudo circadiano (2).....	98
Figura 82 - Média do rendimento da diidroxipentametoxiflavona dos espécimens do estudo sazonal.....	98
Figura 83 - Rendimento de óleo essencial (mL/30 g de droga vegetal) de 27 espécimens (análise intraespecífica) de <i>C. verbenacea</i>	99
Figura 84 - Óleo essencial obtido de espécimens de <i>C. verbenacea</i> referentes à análise populacional, com diferentes colorações.....	99

Figura 85 - Rendimento do óleo essencial dos espécimens do estudo sazonal de <i>C. verbenacea</i> . Os espécimens 2II5 e 3II5 não apresentaram rendimento no mês de março/2016 devido a insuficiência de massa foliar para extração do óleo essencial.	100
Figura 86 - Rendimento do óleo essencial dos espécimens do estudo circadiano (1).	101
Figura 87 - Rendimento do óleo essencial dos exemplares do estudo circadiano (2) de <i>C. verbenacea</i>	101
Figura 88 - Média do rendimento de óleo essencial dos espécimens do estudo circadiano (1).	104
Figura 89 - Média do rendimento de óleo essencial dos espécimens do estudo circadiano (2).	104
Figura 90 - Média do rendimento de óleo essencial dos espécimens do estudo sazonal.	104
Figura 91 - Cromatoplasmas referentes à análise dos óleos essenciais dos 27 espécimes de <i>C. verbenacea</i> do estudo populacional. Condições cromatográficas: sílica gel; fase móvel tolueno:acetato de etila 92:8; revelador: anisaldeído sulfúrico; distância de eluição: 9 cm. (a) - amostras, da esquerda para direita: α -humuleno, <i>trans</i> -cariofileno (padrões), 1I4, 1VI1, 1VI4, 2I2, 2II5 2III3, 2IV5, 3I4, 3II1, 3II5, 3IV1, 5I2, 5II4, 5VI1, 5VI1, 13I1, 13II5, 13III4, 13VI2. (b) - amostras, da esquerda para direita α -humuleno, <i>trans</i> -cariofileno (padrões), 25I2, 25II5, 25III2, 25IV5, 26I3, 26I3, 26I5, 26IV1, 26IV5.	106
Figura 92 - Cromatoplasmas referentes à análise dos óleos essenciais dos 27 espécimes de <i>C. verbenacea</i> do estudo populacional. Condições cromatográficas: sílica gel; fase móvel hexano; revelador: anisaldeído sulfúrico; distância de eluição: 9 cm. (a) - amostras, da esquerda para direita: α -humuleno, <i>trans</i> -cariofileno (padrões), 1I4, 1VI1, 1VI4, 2I2, 2II5 2III3, 2IV5, 3I4, 3II1, 3II5, 3IV1, 5I2, 5II4, 5VI1, 5VI1, 13I1, 13II5, 13III4, 13VI2. (b) - amostras, da esquerda para direita α -humuleno, <i>trans</i> -cariofileno (padrões), 25I2, 25II5, 25III2, 25IV5, 26I3, 26I3, 26I5, 26IV1, 26IV5.	107
Figura 93 - Matriz construída para análise por PCA e HCA dos dados obtidos por CCD do óleo essencial de 27 espécimens de <i>C. verbenacea</i> . Os fatores de retenção (R_t) de cada banda observada foram expressos como variáveis e o preenchimento da matriz foi realizado com informações se a banda existe (expressa pelo número 1) ou não (expressa pelo número 0).	108
Figura 94 - Gráfico obtido através das análises de componentes principais (PCA) dos óleos essenciais de <i>C. verbenacea</i> , onde observamos 3 grandes grupos e dois óleos essenciais isoladas (13I5 e 25I3).	108
Figura 95 - Dendograma obtido utilizando através de análises de agrupamentos hierárquicos (HCA) dos óleos de <i>C. verbenacea</i> , onde observamos 3 grandes grupos. Fonte: Autoria própria.	109
Figura 96 - Gráfico obtido através dos mínimos quadrados parciais (PLS) dos óleos essenciais de <i>C. verbenacea</i> por CCD, onde observamos a separação e agrupamentos dos óleos azuis em relação aos óleos amarelos devido as diferenças em seus perfis químicos.	110
Figura 97 -Cromatograma em CG-EM do óleo essencial de <i>C. verbenacea</i> .Condições de análise: 60 a 246° C - 3° C/ min; temperatura do injetor: 240° C; split: 1/20; coluna Rtx-5MS (30m x 0,25 mm d.i.; 0,25 μ m filme interno).	110
Figura 98 - Expansão do Cromatograma em CG-EM do óleo essencial de <i>C. verbenacea</i> .Condições de análise: 60 a 246° C - 3° C/ min; temperatura do injetor: 240° C; split: 1/20; coluna Rtx-5MS (30m x 0,25 mm d.i.; 0,25 μ m filme interno).	111
Figura 99 - Cromatogramas de 27 espécimens de <i>C. verbenacea</i> obtidos por CG-EM. Condições de análise: 60 a 246° C - 3° C/ min, temperatura do injetor: 240° C, split: 1/20, coluna Rtx-5MS (30m x 0,25 mm d.i.; 0,25 μ m filme interno), gás de arraste hélio.	112
Figura 100 - Gráfico obtido através das análises de componentes principais (PCA) dos óleos essenciais de <i>C. verbenacea</i> obtidos por CG-EM do estudo populacional, onde observamos a separação dos óleos essenciais de cor azul em relação aos óleos de cor amarela. (1- 1I4, 2- 1VI1, 3- 1IV4, 4- 2I2, 5- 2II5, 6- 2III3, 7- 2IV5, 8- 3I4, 9- 3II1, 10- 3II5, 11- 3IV1, 12- 5I2, 13- 5II4, 14- 5IV1, 15- 5IV3, 16- 13I1, 17- 13I5, 18- 13II4, 19- 13VI2, 20- 25I3, 21- 25II5, 22- 25III2, 23- 25IV5, 24- 26I3, 25- 26I5, 26-26IV1, 27- 26IV5.	113

- Figura 101** - Dendograma obtido através de análises de agrupamentos hierárquicos (HCA) dos óleos de *C. verbenacea* obtidos por CG-EM do estudo populacional, com destaque para separação em grupos dos óleos de cor azul em relação aos óleos de cor amarela. (1- 1I4, 2- 1VI1, 3- 1IV4, 4- 2I2, 5- 2II5, 6- 2III3, 7- 2IV5, 8- 3I4, 9- 3II1, 10- 3II5, 11- 3IV1, 12- 5I2, 13- 5II4, 14- 5IV1, 15- 5IV3, 16- 13I1, 17- 13I5, 18- 13II4, 19- 13VI2, 20- 25I3, 21- 25II5, 22- 25III2, 23- 25IV5, 24- 26I3, 25- 26I5, 26-26IV1, 27- 26IV5..... 114
- Figura 102** - Gráfico de loadings obtido através das análises de componentes principais (PCA) dos óleos essenciais por CG-EM do estudo populacional, onde observamos com destaque para as substâncias presentes nos óleos com coloração azul/esverdeada (elemeno, camazuleno e espatulenol) e as substâncias marcadores dos óleos essenciais obtidos de *C. verbenacea* (α -pineno, α -humuleno e *trans*-cariofileno)..... 115
- Figura 103** - Cromatogramas de 7 óleos essenciais com coloração azul de espécimes de *C. verbenacea* obtidos por CG-EM. Condições de análise: 60 a 246° C - 3° C/ min, temperatura do injetor: 240° C, split: 1/20, coluna Rtx-5MS (30m x 0,25 mm d.i.; 0,25 μ m filme interno). Com destaque para as substâncias específicas encontradas apenas nos óleos de cor azul (elemeno, camazuleno e espatulenol)..... 115
- Figura 104** - Gráfico obtido através dos mínimos quadrados parciais (PLS) dos óleos essenciais de *C. verbenacea* por CG-EM, onde observamos a separação e agrupamentos dos óleos azuis em relação aos óleos amarelos devido as diferenças em seus perfis químicos..... 116
- Figura 105** - Gráfico obtido através das análises de componentes principais (PCA) dos óleos essenciais de *C. verbenacea* obtidos por CG-EM do estudo circadiano, observando os agrupamento de cada uma das 7 espécimes estudadas em relação as 5 coletas obtidas, com destaque para o agrupamento dos dois espécimes (1I4 e 3II5) que possuem óleo de cor azul/esverdeada. Legenda: 1I4 (1 ao 5); 2II5 (6 ao 10); 3II5 (11 ao 15); 5IV3 (16 ao 20); 13I5 (21 ao 25); 25IV5 (26 ao 30); 26IV1 (31 ao 35)..... 117
- Figura 106** - Gráfico de loadings obtido através das análises de componentes principais (PCA) dos óleos essenciais por CG-EM do estudo circadiano, onde observamos com destaque para as substâncias presentes nos óleos com coloração azul/esverdeada (elemeno, camazuleno e espatulenol) e as substâncias marcadores dos óleos essenciais obtidos de *C. verbenacea* (α -pineno, α -humuleno e *trans*-cariofileno)..... 117
- Figura 107** - Dendograma obtido através de análises de agrupamentos hierárquicos (HCA) dos óleos de *C. verbenacea* obtidos por CG-EM do estudo circadiano, com destaque para separação dos óleos de cor azul em relação aos óleos de cor amarela. Legenda: 1I4 (1 ao 5); 2II5 (6 ao 10); 3II5 (11 ao 15); 5IV3 (16 ao 20); 13I5 (21 ao 25); 25IV5 (26 ao 30); 26IV1 (31 ao 35). 118
- Figura 108** - Gráfico obtido através das análises de componentes principais (PCA) dos óleos essenciais de *C. verbenacea* obtidos por CG-EM do estudo sazonal, observando os agrupamento de cada uma das 7 espécimes estudadas em relação as 13 coletas obtidas. Legenda: 1I4 (1 ao 13); 2II5 (14 ao 21); 3II5 (22 ao 29); 5IV3 (30 ao 42); 13I5 (43 ao 55); 25IV5 (56 ao 68); 26IV1 (69 ao 81). 119
- Figura 109** - Gráfico de loadings obtido através das análises de componentes principais (PCA) dos óleos essenciais por CG-EM do estudo sazonal, onde observamos com destaque para as substâncias presentes nos óleos com coloração azul/esverdeada (elemeno, camazuleno e espatulenol) e as substâncias marcadores dos óleos essenciais obtidos de *C. verbenacea* (α -pineno, α -humuleno e *trans*-cariofileno). 119
- Figura 110** - Dendograma obtido através de análises de agrupamentos hierárquicos (HCA) dos óleos de *C. verbenacea* obtidos por CG-EM do estudo sazonal. observando os agrupamento de cada uma das 7 espécimes estudadas em relação as 13 coletas obtidas. Legenda: 1I4 (1 ao 13); 2II5 (14 ao 21); 3II5 (22 ao 29); 5IV3 (30 ao 42); 13I5 (43 ao 55); 25IV5 (56 ao 68); 26IV1 (69 ao 81). 120
- Figura 111** - Concentração de substâncias isoladas encontradas nos óleos essenciais de espécimes de *C. verbenacea* do estudo populacional..... 121

Figura 112 - Concentração de <i>trans</i> -cariofileno no óleo essencial de espécimens de <i>C. verbenacea</i> do estudo circadiano.....	121
Figura 113 - Concentração de α -humuleno no óleo essencial de espécimens de <i>C. verbenacea</i> do estudo circadiano.....	122
Figura 114 - Concentração de <i>trans</i> -cariofileno no óleo essencial de espécimens de <i>C. verbenacea</i> do estudo circadiano 2.....	122
Figura 115 - Concentração de α -humuleno no óleo essencial de espécimens de <i>C. verbenacea</i> do estudo circadiano 2.....	122
Figura 116 - Concentração de <i>trans</i> -cariofileno no óleo essencial de espécimens de <i>C. verbenacea</i> do estudo sazonal.	123
Figura 117 - Concentração de α -humuleno no óleo essencial de espécimens de <i>C. verbenacea</i> do estudo sazonal.	123
Figura 118 - Média do rendimento de <i>trans</i> -cariofileno dos espécimens do estudo circadiano (1).....	124
Figura 119 - Média do rendimento de <i>trans</i> -cariofileno dos espécimens do estudo circadiano (2).....	124
Figura 120 - Média do rendimento de α -humuleno dos espécimens do estudo circadiano (1).....	124
Figura 121 - Média do rendimento de α -humuleno dos espécimens do estudo circadiano (2).....	125
Figura 122 - Média do rendimento de <i>trans</i> -cariofileno dos espécimens do estudo sazonal.....	125
Figura 123 - Média do rendimento de α -humuleno dos espécimens do estudo sazonal.....	125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos da literatura científica de estudos que avaliaram fatores que influenciam na produção de metabólitos secundários em plantas medicinais.	20
Tabela 2 - Condições de análises por CCD das frações da EFS-teste e EFS.	30
Tabela 3 - Condições de fase móvel em CLAEprep (modo isocrático) utilizadas na purificação de substâncias das subfrações 4.1.18, 4.1.24 e 4.1.30.	33
Tabela 4 - Informações climáticas e observações das coletas sazonais e circadianas.	35
Tabela 5 - Dados das análises da cordialina A em CLAE-DAD para construção da curva analítica.	39
Tabela 6 - Dados das análises da <i>cis</i> -cordialina A em CLAE-DAD para construção da curva analítica.	40
Tabela 7 - Dados das análises da diidroxipentametoxiflavona em CLAE-DAD para construção da curva analítica.	41
Tabela 8 - Dados das análises do <i>trans</i> -cariofileno em CG-EM para construção da curva analítica.	42
Tabela 9 - Dados das análises do α -humuleno em CG-EM para construção da curva analítica.	43
Tabela 10 - Dados das análises das frações da EFS-teste por CCD.	45
Tabela 11 - Dados das análises das frações da EFS por CCD.	45
Tabela 12 - Balanço de massas das subfrações da F.4.1 após serem reunidas.	51
Tabela 13 - Bandas de absorção no IV de cordialina A.	55
Tabela 14 - Dados espectrométricos de RMN obtidos para a cordialina A a 300 MHz para ^1H e a 75 MHz para ^{13}C em CDCl_3	56
Tabela 15 - Dados espectrométricos de RMN obtidos para a <i>cis</i> -cordialina A a 300 MHz para ^1H e a 75 MHz para ^{13}C , em CDCl_3	62
Tabela 16 - Bandas de absorção no IV da 4',5-diidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona ou 2',5-diidroxi-4',3,5',6,7-pentametoxiflavona.	67
Tabela 17 - Dados espectrométricos de RMN obtidos para a 4',5-diidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona ou 2',5-diidroxi-4',3,5',6,7-pentametoxiflavona a 300 MHz para ^1H e a 75 MHz para ^{13}C em CDCl_3	68
Tabela 18 - Dados espectrométricos de RMN obtidos para a artemetina a 600 MHz para ^1H em CDCl_3	74
Tabela 19 - Condições de gradiente avaliadas no desenvolvimento de método de análise por CLAE-DAD do EtOH.	79
Tabela 20 - Coloração do óleo essencial de 27 espécimens de <i>C. verbenacea</i>	100
Tabela 21 - Coloração do óleo essencial das espécimens do estudo sazonal de <i>C. verbenacea</i>	102
Tabela 22 - Coloração dos óleos essenciais dos espécimens dos estudos circadiano (1) e (2) de <i>C. verbenacea</i>	103
Tabela 23 - Proposta de identificação de componentes do OE a partir de análises por CG-EM.	111

RESUMO

Cordia verbenacea DC. pertence à família Boraginaceae, a qual contém aproximadamente 100 gêneros com mais de 2.000 espécies. Ocorre ao longo de todo litoral brasileiro, sendo comum na Floresta Tropical Atlântica e possuindo vários nomes populares, sendo o mais comum erva-baleeira. É utilizada tradicionalmente para tratar vários processos inflamatórios. O laboratório Aché® desenvolveu um medicamento fitoterápico anti-inflamatório tópico à base do óleo essencial de *C. verbenacea* (Acheflan®) e a espécie está presente no Formulário Nacional de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira. Considerando a relevância de estudos de variabilidade química para espécies medicinais e a ausência destes dados na literatura para *C. verbenacea* propomos realizar um estudo da dinâmica do metabolismo da espécie focado nas variações sazonal, circadiana e populacional. As folhas de *C. verbenacea* foram coletadas, secas, trituradas e submetidas à maceração com etanol (1:15 m/v). Posteriormente, foi realizada uma extração em fase sólida com o extrato etanólico seco obtendo-se 10 frações, as quais foram analisadas por CCD e CLAE-UV. A fração 4.1 foi escolhida para cromatografia em coluna originando 120 subfrações, das quais três estavam semipurificadas. Utilizando a técnica de CLAE preparativa foram purificadas quatro substâncias, sendo três obtidas com mais de 95 % de pureza (CLAE-UV). As substâncias foram analisadas por técnicas espectrométricas (UV, IV e RMN), sendo identificados os triterpenos cordialina A e *cis*-cordialina A e dois flavonoides, 4',5-diidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona ou 2',5-diidroxi-4',3,5',6,7-pentametoxiflavona e a artemetina. Um método por CLAE-DAD foi desenvolvido e aplicado na análise dos extratos etanólicos dos estudos populacional, circadiano e sazonal, incluindo a obtenção de seus perfis cromatográficos e a quantificação das substâncias purificadas. Os estudos populacional, circadiano e sazonal evidenciaram diferenças quantitativas em relação as substâncias majoritárias após a análise cromatográfica, sendo a substância diidroxipentametoxiflavona encontrada em maior quantidade no espécimen 13II4 do estudo populacional, já no estudo circadiano o horário das 04:30 h apresentou maior rendimento e no estudo sazonal maior tendência de produção deste flavonoide no período de janeiro a março de 2015/2016, enquanto que para os triterpenos o espécimen 3IV1 apresentou maior rendimento no estudo populacional e os espécimens 2II5 e 3II5 maior rendimento no estudos circadiano e sazonal, sendo os períodos de março a maio de 2015 e janeiro a março de 2016 os de maior tendência de produção desses triterpenos. A análise quimiométrica evidenciou uma diferença quantitativa dos metabólitos não voláteis entre os espécimens. A análise estatística utilizando ANOVA evidenciou que o rendimento do extrato e o teor dos triterpenos e flavonoide são afetados pelos períodos do ano. Foram obtidos os óleos essenciais dos 27 espécimens do estudo populacional e dos sete espécimens dos estudos circadiano e sazonal. O teor de óleo essencial na droga vegetal e sua coloração (amarelo claro, amarelo, esverdeado e azul) variaram entre os espécimens analisados. A análise por CCD também evidenciou diferenças significativas entre eles. Os dados obtidos por CCD dos 27 espécimens do estudo populacional foram utilizados em análises por PCA e HCA, observando-se agrupamento dos espécimes de óleo de cor azul/esverdeados em relação aos demais óleos de cor amarela. Esses agrupamentos também foram verificados nas PCA e HCA obtidas com dados por CG-EM, evidenciando que a amostra do óleo essencial do espécimen 13I5 possui maior tendência de produção do *trans*-cariofileno e do α -humuleno. Os óleos de cor azul/esverdeados evidenciaram a presença de três substâncias específicas: elemeno, camazuleno e espatulenol. A análise estatística utilizando ANOVA evidenciou que o rendimento do óleo essencial e o teor de seus componentes são afetados pelos períodos do ano, mas não pelo ritmo circadiano.

Palavras chave: *Cordia verbenacea*, flavonoides, triterpenos, variabilidade química, cromatografia, quimiometria.

ABSTRACT

Cordia verbenacea DC. belongs to the Boraginaceae family which contains about 100 genera with more than 2,000 species. *C. verbenacea* is popularly named *erva-baleeira* and occurs throughout the Brazilian coast including the Atlantic Rainforest. It is traditionally used to treat various inflammatory processes and was employed by Aché[®] laboratory for the development of Acheflan[®], an anti-inflammatory topical medicine containing the essential oil of *C. verbenacea*. Considering the relevance of chemical variability studies for medicinal plants we propose to develop a study of the metabolism dynamics focused on seasonal, circadian and population variations. The leaves of *C. verbenacea* were collected, dried, crushed and macerated with ethanol (1:15 m/v). The solid phase extraction with ethanolic extract yielded 10 fractions which were analyzed by TLC and HPLC. Fraction 4.1 was selected for column chromatography yielding 120 subfractions. Four compounds were isolated using preparative HPLC-UV and three compounds presented high purity ($\leq 95\%$; HPLC-UV) and were analyzed by spectrophotometric techniques (UV, IR, NMR). Compounds were identified as the triterpenes cordialin A and *cis*-cordialin A and the flavonoides 4',5-dihydroxy-2',3,5',6,7-pentamethoxyflavone or 2',5-dihydroxy-4',3,5',6,7-pentamethoxyflavone and artemetin. An HPLC-DAD method was developed for the analysis of the ethanolic extract. The ethanolic extracts of seasonal, circadian and population studies were analyzed by HPLC-DAD. All these studies showed quantitative differences in relation to the majority compounds, being the substance dihydroxypentamethoxyflavone found in a larger quantity in specimen 13II4 of the population study, already in the circadian study the time of 04:30 h had a higher yield and in the seasonal study a greater trend of production of this flavonoid in the period from January to March of 2015/2016, while for the triterpenes the specimen 3IV1 presented higher yield in the population study and the specimens 2II5 and 3II5 greater yield in the circadian and seasonal studies, being the periods of March to May of 2015 and January to March of 2016 the ones of greater tendency of production of these triterpenes. The statistical analysis using ANOVA showed that the yield of the extract and the content of triterpenes and flavonoid were affected by the periods of the year. Essential oils were obtained from the 27 specimens from the population study and the seven specimens from the circadian and seasonal studies. The essential oil content in the plant drug and its color (light yellow, yellow, green and blue) differed among the specimens. The TLC analysis also showed significant differences among the oils. Data obtained by TLC analyzes of the 27 specimens of the population study were used in PCA and HCA analyzes that showed two groups of oils - blue / green oil specimens and yellow color oil specimens. These clusters were also verified in PCA and HCA obtained with GC-MS data, evidencing that the sample of the 13I5 of the specimen has a greater trend of production of *trans*-caryophyllene and α -humulene. The blue/green oils showed the presence of 3 specific compounds: elemene, camazulene and spatulenol. The statistical analysis using ANOVA showed that the yield of the essential oil and the content of its components were affected by the periods of the year, but not by circadian rhythm.

Keywords: *Cordia verbenacea*. Flavonoids. Triterpenes. Chemical variability. Chromatography. Chemometric.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Variabilidade química em plantas medicinais	18
2.2 Cordia verbenacea DC.	20
3 OBJETIVO	27
3.1 Objetivos específicos	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Obtenção e fracionamento do extrato etanólico das folhas de C. verbenacea (EetOH) para a purificação de metabólitos secundários	28
4.1.1 Coleta do material vegetal	28
4.1.2 Preparo do material vegetal	29
4.1.3 Obtenção do extrato etanólico para purificação de metabólitos secundários	29
4.1.4 Fracionamento do extrato EetOH através de extração em fase sólida (EFS)	29
4.1.4.1 EFS-teste	29
4.1.4.2 EFS em maior escala	29
4.1.4.2.1 Análises cromatográficas das frações EFS-teste e EFS	30
4.1.5 Fracionamento da fração F.4.1 por cromatografia em coluna (CC)	31
4.1.5.1 Análises cromatográficas das subfrações obtidas por CC	31
4.1.6 Purificação de metabólitos secundários a partir de frações obtidas por CC com o emprego de CLAEprep	32
4.1.6.1 Análise de pureza dos metabólitos secundários purificados por CLAEprep	33
4.1.7 Determinação estrutural dos metabólitos secundários purificados	33
4.2 Obtenção e análise dos extratos etanólicos de folhas de C. verbenacea dos estudos de variabilidade química populacional, sazonal e circadiana	33
4.2.1 Obtenção dos extratos para as análises de variabilidade química	33
4.2.2 Obtenção dos extratos etanólicos para análises populacional, sazonal e circadiana	36
4.2.3 Desenvolvimento de método de análise para os extratos etanólicos	36
4.2.4 Coleta e preparo do material vegetal para obtenção dos óleos essenciais	36
4.2.5 Obtenção do óleo essencial	36
4.2.6 Análise dos óleos essenciais	37
4.3 Análise Multivariada de dados e ANOVA	37
4.5 Aquantificação das substâncias isoladas do extrato etanólico	38
4.6 Quantificação de substâncias isoladas do óleo essencial	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 Fracionamento do extrato etanólico e isolamento/purificação de metabólitos secundários	44
5.1.1 Análise por CCD das frações obtidas na EFS-teste	44
5.1.2 Análise por CCD das frações obtidas na EFS	45
5.1.3 Análise por CLAE-DAD das frações obtidas na EFS	46
5.2 Purificação de substâncias	49
5.2.1 Cromatografia em Coluna (CC)	49
5.2.2 Purificação de metabólitos secundários por CLAE-UV preparativa	52
5.2.3 Determinação estrutural da cordialina A obtida da subfração F.4.1.30	53
5.2.4 Triterpeno identificado da cis-cordialina A obtida da subfração F.4.1.30	60
5.2.5 Determinação estrutural da substância purificada obtida da subfração F.4.1.24 (Pico 1) - diidroxipentametoxiflavona	66
5.2.5 Determinação estrutural da substância purificada obtida da subfração F.4.1.18 – artemetina	73
5.3 Análises dos extratos etanólicos	74
5.3.1 Desenvolvimento do método de análise para os extratos etanólicos	78
5.3.2 Análises dos estudos populacional, circadiano e sazonal utilizando ferramentas quimiométricas	80
5.3.3 Quantificação das substâncias isoladas do extrato etanólico de C. verbenacea	89
5.4 Análise dos óleos essenciais de folhas de C. verbenacea dos estudos de variabilidade química populacional, sazonal e circadiana	99
5.4.1 Análise dos óleos essenciais de folhas de C. verbenacea dos estudos populacional, sazonal e circadiano utilizando ferramentas quimiométricas	105
5.4.2 Quantificação de substâncias isoladas do óleo essencial de folhas de C. verbenacea	120
6 CONCLUSÃO	126
REFERÊNCIAS	127
ANEXOS	131

INTRODUÇÃO

Inúmeras espécies de plantas medicinais são amplamente usadas pela população, algumas possuem estudos químicos e/ou farmacológicos que oferecem suporte para a sua utilização, outras são empregadas baseadas apenas em conhecimento empírico ou tradicional (SIMÕES et al., 2010). Porém, a natureza e a quantidade de metabólitos especiais ou secundários produzidos durante o desenvolvimento do vegetal podem ser afetadas por temperatura, precipitação, ventos, altitude, solo, época de coleta, entre outros (LIMA et al., 2003). Assim, a compreensão do processo de variabilidade metabólica nas plantas não se restringe a abordagens ecofisiológicas. A variação da concentração de princípios ativos (metabólitos secundários) em medicamentos fitoterápicos ou em fitoterápicos (preparações tradicionais) pode determinar a alteração de sua segurança e/ou eficácia.

Cordia verbenacea DC. popularmente conhecida como erva-baleeira, é um planta arbustiva e perene, encontrada ao longo de todo litoral brasileiro, principalmente na faixa entre os estados de Santa Catarina, Paraná e São Paulo (LADEIRA, 2002), que possui preparações populares (tradicionais) empregando soluções hidroetanólicas (partes aéreas) amplamente utilizadas para tratar vários processos inflamatórios sendo aplicadas topicamente. Também é indicada para artrite, reumatismo e problemas de coluna, quando administrada internamente na forma de chá (PINTO et al., 2009). Além de já existir um medicamento fitoterápico a base de seu óleo essencial no mercado.

Desta forma, considerando a importância de estudos de variabilidade química para espécies medicinais e a ausência desses dados na literatura para *C. verbenacea*, foi proposto realizar um estudo da dinâmica do metabolismo da espécie focado nas variações sazonal, circadiana e intrapopulacional, devido ao seu amplo uso popular e a falta de conhecimento sobre o comportamento da espécie sob as várias condições ambientais as quais é exposta constantemente. Para tanto, foram empregadas técnicas analíticas cromatográficas com o objetivo de obterem-se os perfis químicos, identificar e quantificar metabólitos secundários da espécie.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Variabilidade química em plantas medicinais

Em sua grande maioria as substâncias ativas dos vegetais são classificadas como metabólitos secundários, apresentando duas importantes características: grande variedade estrutural e o fato de apresentarem atividade biológica (SANDES & DI BLASI, 2000; VEIGA-JUNIOR *et al.*, 2005). Tais substâncias são biossintetizadas nos vegetais a partir do metabolismo primário (carboidratos, aminoácidos, lipídeos e ácidos nucleicos) e incluem classes químicas como alcaloides, terpenos, compostos fenólicos (ex. flavonoides, taninos, ácidos fenólicos), glicosídeos cianogênicos, dentre outros.

Alguns destes metabólitos são encontrados nos óleos essenciais de espécies vegetais. Os óleos essenciais são líquidos voláteis lipossolúveis, às vezes com aromas e de composição química bastante complexa, podem ser encontrados em diversas partes das plantas, principalmente folhas e flores e em estruturas especializadas, como os tricomas glandulares e estruturas secretoras internas (canais secretores, cavidades secretoras e células secretoras). São principalmente constituídos de monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanoides e outras substâncias de baixa massa molecular (CRAVEIRO & QUEIROZ, 1993).

O conhecimento que envolve a química dos produtos naturais, em especial do metabolismo secundário, constitui-se uma ciência que engloba diversas áreas, pois a composição química desses produtos é influenciada diretamente por fatores bióticos (herbivorismo, ação antrópica, alelopatias e outros) e por fatores abióticos (condições climáticas, radiação luminosa e outros). Assim sendo, os compostos químicos que mais sofrem alterações no metabolismo vegetal são os metabólitos secundários, sejam qualitativas ou quantitativas, com o objetivo de uma melhor adaptação da planta às condições ambientais às quais está exposta. Porém, não somente fatores ambientais podem influenciar na produção dos metabólitos secundários, os fatores genéticos tem sua gama de influência, pois as plantas acumulam uma incrível diversidade de compostos fitoquímicos que desempenham um papel importante na interação da planta com o meio ambiente, como por exemplo, proteção e algumas plantas podem sofrer mutações que prejudicam parcialmente a função de várias vias metabólicas, prejudicando assim a formação de vários metabólitos secundários (GROTEWOLD, 2005).

Assim, nem sempre as plantas seguem um mesmo padrão de comportamento, ou seja, plantas cultivadas para fins comerciais ou de subsistência podem ter seu metabolismo diferenciado das encontradas em habitat natural, o que justifica a aplicação de conhecimento das ciências agrárias, como a composição química do solo, ação antrópica,

fatores climáticos, meteorológicos, entre outros (BARROS et al., 2009; GOBBO-NETO & LOPES, 2007; HARBORNE, 1977).

O estudo da composição química de produtos vegetais possibilita a identificação de substâncias com propriedades tóxicas, terapêuticas e conhecimento de novas estruturas moleculares. Desta forma, este conhecimento auxilia também no controle de qualidade de fitoterápicos, contribuindo para o uso racional de plantas medicinais e ampliando o conhecimento quimiotaxonômico de várias espécies vegetais (LORENZI & MATOS, 2002; PINTO et al., 2002).

A composição química dos óleos essenciais sofre variações com as diversas pressões ambientais (LARCHER, 2000). Por exemplo, em *Lippia sidoides* Cham. foram detectados diferentes monoterpenos como constituintes majoritários provenientes de espécimes coletados em duas áreas distintas. Os indivíduos de Fortaleza-CE produziram mais timol e os de Apodi-RN o carvacrol. Sousa et al. (2004) descreveram que o hortelã-pimenta (*Mentha x piperita* L.) contém cerca de 1 a 3% de óleo essencial que apresenta uma variação considerável na sua composição química, podendo ser atribuída a fatores intrínsecos e extrínsecos.

Assim, como acontece com o óleo essencial, a composição de outros metabólitos secundários nas plantas é resultado do balanço entre sua formação e sua transformação, que ocorrem durante o crescimento, em decorrência principalmente de fatores genéticos, ontogenéticos e ambientais. Alterações ambientais como sazonalidade, ritmo circadiano, radiação, temperatura, altitude, tipo de solo, disponibilidade hídrica, ataque por patógenos e mesmo a idade da planta, interferem qualitativa e/ou quantitativamente no teor dos princípios ativos presentes no vegetal (BOTREL et al., 2010; GOBBO-NETO et al., 2007; PEIXOTO SOBRINHO et al., 2012).

Um exemplo de influência sazonal é o caso de *Digitalis obscura* L. que apresenta menor concentração de cardenolídeos na primavera e uma fase de rápido acúmulo no verão, seguida por uma fase de decréscimo no outono (ROCA-PÉREZ et al., 2004). Akrou et al. (2003) estudaram a variação sazonal do óleo essencial de *Artemisia campestris* L., coletadas em quatro locais diferentes da Tunísia, em três períodos do ano, e observaram uma maior quantidade de óleo essencial no mês de agosto (1,2 %) e uma menor quantidade no mês de novembro (0,65 %). Boira & Blanquer (1998) estudaram a relação entre o clima e os fatores edáficos em três quimiotipos de *Thymus piperella* L. localizadas em províncias espanholas, notando que o quimiotipo *p*-cimeno-timol está relacionado fortemente aos fatores bioclimáticos que incluem o balanço hídrico nas plantas e no solo. Podemos ver outros exemplos na tabela 1.

Tabela 1 - Exemplos da literatura científica de estudos que avaliaram fatores que influenciam na produção de metabólitos secundários em plantas medicinais.

Planta medicinal	Nome Popular	Metabólito Secundário	Influência Ambiental	Referência Bibliográfica
Diversas espécies	-----	Monoterpenos e sesquiterpenos	Luz, temperatura, nutrientes e água	Lima <i>et al.</i> , 2003
<i>Blepharocalyx salicifolius</i> (Kunth) O. Berg	Guamirim, Cambuim ou Murta	Componentes do óleo essencial	Ciclo fenológico	Godinho, 2011
<i>Origanum dayi</i> Post	Orégano	Componentes do óleo essencial	Solo	Amzallag <i>et al.</i> , 2005
<i>Lychnophora ericoides</i> Mart.	Arnica	Componentes do óleo essencial	Ritmo circadiano	Pavarini, 2011
<i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC.	Carqueja	Saponinas	Ritmo sazonal	Borella <i>et al.</i> , 2006
<i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil.	Erva-mate	Metilxantinas	Ritmo sazonal	Schubert <i>et al.</i> , 2006
<i>Maytenus aquifolium</i> Mart.	Espinheira-santa	Triterpenos, flavonoides e outros polifenóis	Ritmo sazonal	Yariwake <i>et al.</i> , 2005

A relevância da compreensão do processo de variabilidade metabólica nas plantas não se restringe a abordagens ecofisiológicas. A variação da concentração de princípios ativos (metabólitos secundários) em medicamentos fitoterápicos ou em fitoterápicos (preparações tradicionais) pode determinar a perda de sua segurança e/ou eficácia. A garantia da qualidade destes produtos envolve não somente aspectos abordados para os medicamentos chamados sintéticos, mas também a padronização das condições de *cultivo* (local de cultivo, manejo) e de colheita (período do dia, época do ano, idade da planta), o que se torna mais evidente na medida em que evoluem os estudos sobre variabilidade metabólica em vegetais (PASSREITER *et al.*, 1998).

2.2 *Cordia verbenacea* DC.

Cordia verbenacea DC. (Figura 1) pertence a família *Boraginaceae*, a qual contém aproximadamente 100 gêneros, com mais de 2.000 espécies distribuídas em todo planeta. Seus maiores centros de ocorrência são as regiões do mediterrâneo e Estados Unidos da América. No Brasil, a família está representada por nove gêneros e aproximadamente 150 espécies. Os gêneros incluem *Auxemma* Miers, *Cordia* L., *Heliotropium* L., *Lepidocordia*

Ducke, *Moritzia* DC. ex Meisn., *Patagonula* L., *Rotula* Lour., *Thaumatocaryon* Baill. e *Tournefortia* L. (MELO & LEMOS, 2008).



Figura 1 - *Cordia verbenacea* DC. (Fonte: próprio autor)

O gênero *Cordia* L. é composto por cerca de 250 espécies e provavelmente é o grupo mais complexo dentro da família *Boraginaceae*, sendo encontradas espécies desde a América Central até a Argentina. Na medicina popular, as espécies do gênero *Cordia*, são utilizadas para o tratamento de diversas doenças, seu uso etnofarmacológico inclui aplicações antimicrobiana, anti-inflamatória, anti-helmíntico, analgésica e diurética tratamento do sistema digestivo, respiratório, urogenital, cardíaco, vascular e doenças do sangue (MATIAS *et al.*, 2015).

Na região sudeste, o gênero *Cordia* é representado por 26 espécies, dentre elas, as tipicamente brasileiras são a *Cordia corymbosa* G. Don, utilizada no tratamento de feridas, *Cordia curassavica* Auct. Ex Fresen, com propriedades antifúngica, larvicida e usada no tratamento de resfriados, dores de cabeça, doenças parasitárias e de pele, *Cordia salicifolia* Cham, que apresenta atividades antiviral, diurética e além de ser usada no tratamento da obesidade e *Cordia verbenacea* DC.(Figura 1), espécie cujos estudos comprovaram as ações anti-inflamatória, antiúlcera e cicatrizante (BARROSO *et al.*, 2002).

Cordia verbenacea DC., também foi nomeada como *Cordia salicina* D.C., *Cordia curassavica* (Jacq.) Roem. & Schult., *Cordia cylindrostachya* (Ruiz & Pav.) Roem. & Schult., *Lithocardium fresenii* Kuntze, *Lithocardium salicinum* (A. DC.) Kuntze e *Lithocardium verbenaceum* Kuntze (DE CARVALHO JR *et al.*, 2004). Possui várias denominações devido a controvérsias sobre sua classificação por botânicos, devido a sua grande variação morfológica. O gênero *Cordia* é dividido em três subgêneros ou seções: *Cordia*, *Varronia* e *Myxa* (MILLER & GOTTSCHILING, 2007). *C. verbenacea* encontra-se na seção *Varronia*

(MONTANARI Jr., 2011). Porém, estudos e análises de DNA, dados morfológicos, observações de campo, estudos em herbários e literatura, resultaram em uma nova classificação, na qual a seção *Varronia* passa para o *status* de gênero (BORHIDI et al., 1988; GOTTSCHING et al., 2005; MILLER & GOTTSCHLING, 2007). Atualmente *Varronia* é a designação de gênero, mas ainda não há consenso sobre essa espécie. Borhidi et al. (1988) indicaram o nome *Varronia verbenacea*, mas esta classificação é contestada por Miller & Gottschling (2007). Desta forma, considerando que as discussões em torno da nova classificação da espécie ainda estão em andamento e que a nomenclatura utilizada na quase totalidade dos trabalhos científicos é *Cordia verbenacea* DC., adotou-se esta classificação no presente trabalho.

C. verbenacea é uma planta arbustiva, perene, com folhas de disposição paralelas e internas. As flores são pequenas de corolas brancas e reunidas em inflorescências escorpioides e vistosas. As partes aéreas apresentam forte odor desprendido pelo manuseio (LORENZI; MATOS, 2002). Ocorre ao longo de todo litoral brasileiro, mas mais comumente encontrada no trecho compreendido entre os Estados de Santa Catarina, Paraná e São Paulo (Floresta Tropical Atlântica), possuindo vários nomes populares como “maria-preta”, “maria-milagrosa” e “catinga-de-barão”, sendo o mais comum “erva-baleeira”, ou simplesmente “baleeira” (LADEIRA, 2002).

As preparações tradicionais empregando soluções hidroetanólicas de *C. verbenacea* (partes aéreas) são amplamente utilizadas topicamente para tratar vários processos inflamatórios. Também é indicada para artrite, reumatismo e problemas de coluna, quando administrada oralmente na forma de chá (PINTO et al., 2009). Os princípios ativos já identificados compreendem atualmente componentes do óleo essencial e os flavonoides, como a flavona artemetina (Figura 2) (BAYEUX et al., 2002; MATIAS et al., 2010; SERTIE et al., 1990).

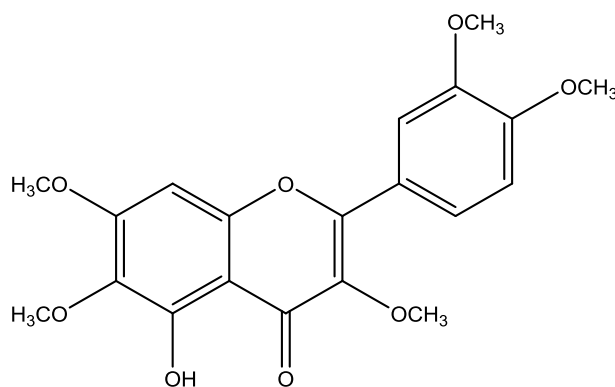


Figura 2 - Estrutura química da artemetina.
Fonte: próprio autor

Sertié *et al.* (1988), relataram que o extrato hidroalcoólico liofilizado de folhas de *C. verbenacea* apresentou atividade anti-inflamatória, aliada a um efeito protetor da mucosa gástrica e uma toxicidade baixa, com $DL_{50} = 131,6 \text{ mg kg}^{-1}$, sendo 100 vezes maior do que a DE_{50} ($1,24 \text{ mg kg}^{-1}$) quando administrado via oral em camundongos. Posteriormente, isolaram o flavonoide artemetina de suas folhas e demonstraram sua ação anti-inflamatória em estudos farmacológicos.

Ensaio de triagem fitoquímica realizados com folhas de *C. verbenacea* indicaram a presença de compostos fenólicos, flavonoides, xantonas, esteroides, saponinas, ácidos graxos e alcaloides (ROLDÃO *et al.*, 2008; SCARDELATO, 2013). Várias substâncias já foram isoladas da *C. verbenacea* (Figura 3): Velde *et al.* (1982) isolaram de *C. verbenacea* dois triterpenos do tipo damarano denominados cordialinas A e B; Ameira *et al.* (2009) identificaram em uma fração do extrato metanólico, também das folhas, as isoflavonas 7,4'-diidroxí-5'-carboximetóxi isoflavona e 7,4'-diidroxí-5'-metil isoflavona; cabendo ressaltar que os dados espectrométricos não foram apresentados no artigo, mas apenas foi feita uma citação das técnicas utilizadas (EM, RMN de ^1H e IV). A flavona artemetina (5-hidróxi-3,6,7,3',4'-pentametoxiflavona) foi isolada do extrato dos ramos de *C. verbenacea* (BAYEUX *et al.*, 2002; SERTIE *et al.*, 1990). Além das substâncias citadas acima, foram isoladas e identificadas outras substâncias das folhas de *C. verbenacea* como ácido rosmarínico, ácido cafeico, ácido gálico e ácido clorogênico (TICLI *et al.*, 2005; MATIAS *et al.*, 2013a e 2013b).

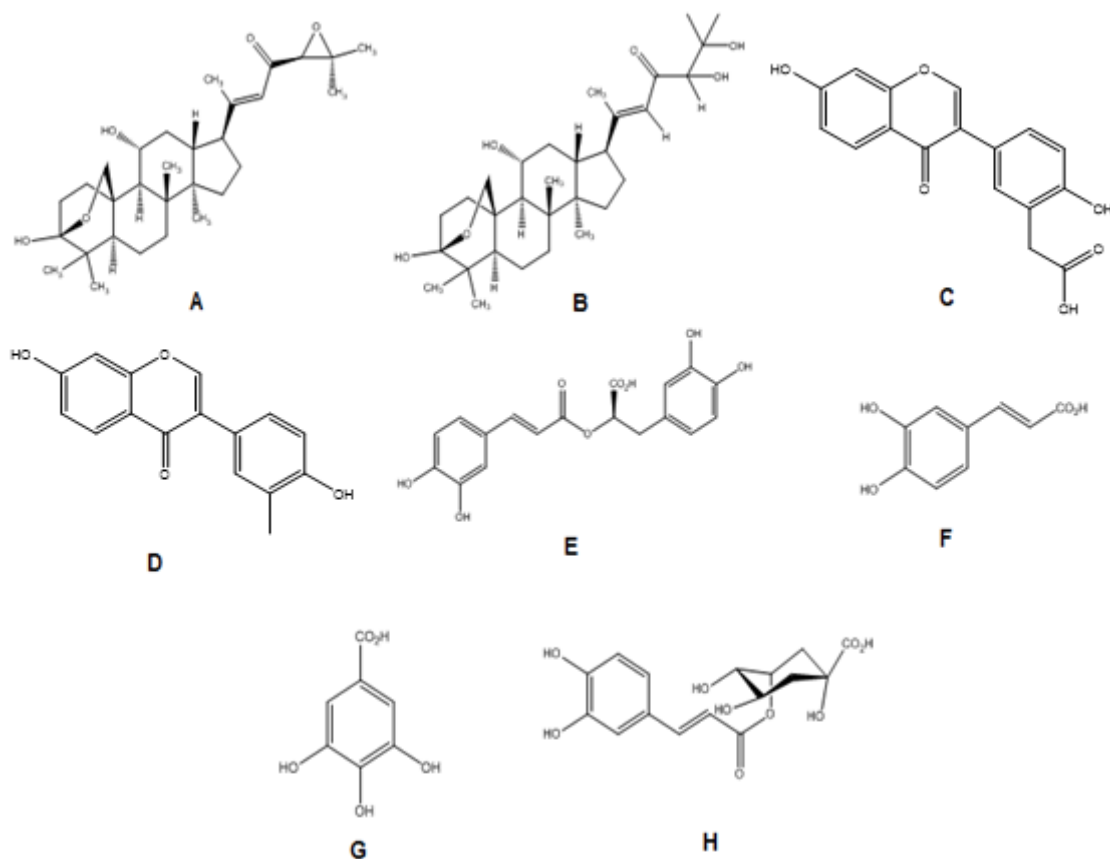


Figura 3 - Estruturas químicas de metabólitos secundários identificados em *C. verbenacea*. A: cordialina A; B: cordialina B; C: 7,4'-dihidroxi-5'-carboximetóxi isoflavona; D: 7,4'-dihidroxi-5'-metil isoflavona; E: ácido rosmarínico; F: ácido caféico; G: ácido gálico; H: ácido clorogênico. Fonte: próprio autor.

O óleo essencial das folhas contém monoterpenos e sesquiterpenos, sendo o α -pineno seu constituinte principal (29,7 %), além de conter *trans*-cariofileno (25,3 %), alloaromadendreno (10,0 %) e α -humuleno (4,6 %) (DE CARVALHO JR. *et al.*, 2004), e outras substâncias como 1,8-cineol, δ -elemeno, β -elemeno, δ -cadineno e β -bisaboleno (MEDEIROS *et al.*, 2007; DE SOUZA *et al.*, 2011; PINHOL *et al.*, 2012). Com o isolamento da molécula α -humuleno, presente no óleo essencial das folhas de *C. verbenacea*, foram feitos progressos para comprovação da eficácia contra processos inflamatórios (PIANOWSKI, 2005). Fernandes *et al.* (2007) isolaram dois sesquiterpenos do óleo essencial de *C. verbenacea*, α -humuleno e *trans*-cariofileno, podendo verificar nos modelos experimentais usados, que estes dois compostos possuíam um efeito anti-inflamatório marcante quando administrados por via oral. A figura 4 demonstra várias substâncias já identificadas em partes-aéreas de *C. verbenacea* e de seu óleo essencial.

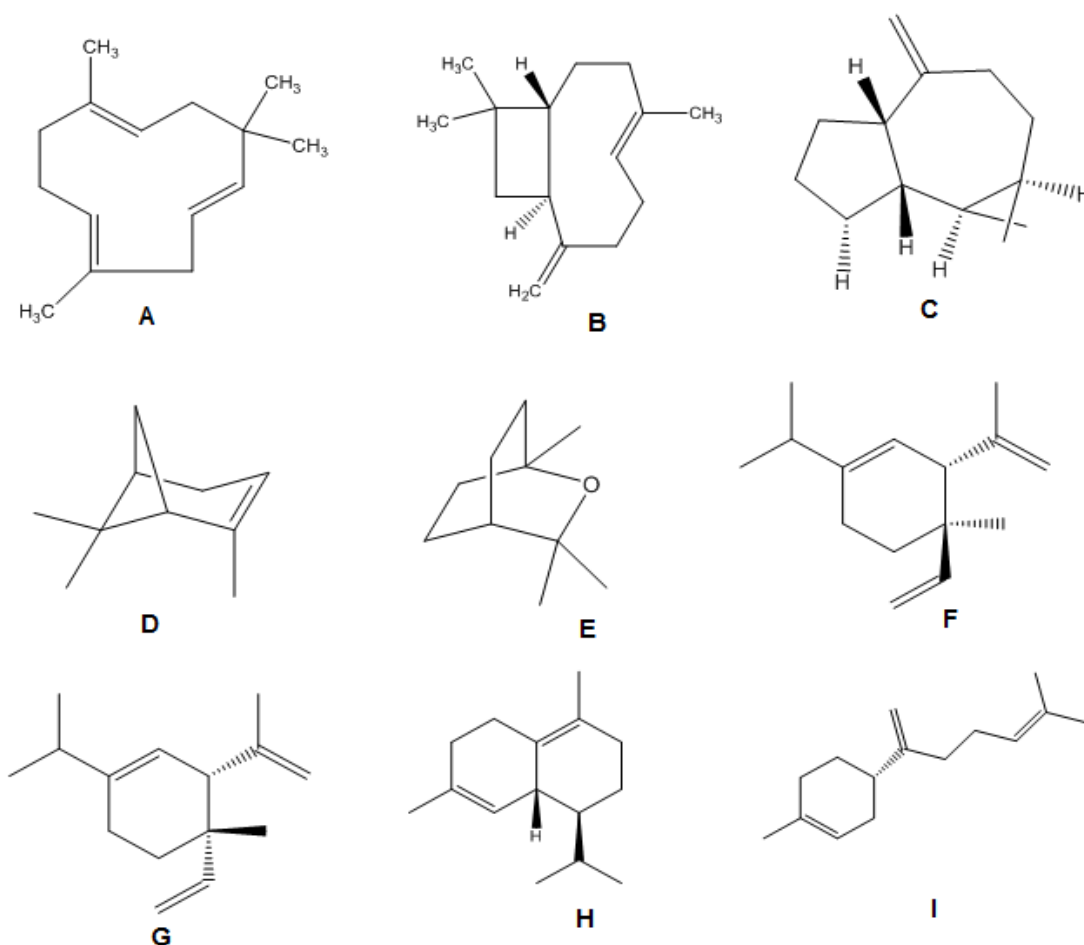


Figura 4 - Estruturas químicas de metabólitos secundários do óleo essencial de folhas de *C. verbenacea*. A: α -humuleno; B: *trans*-cariofileno; C: allo-aromadendreno; D: α -pineno, E: 1,8-cineole; F: δ -elemeno; G: β -elemeno; H: δ -cadineno; I: β -bisaboleno. Fonte: próprio autor.

Assim, o Laboratório Farmacêutico Aché®, considerando o conhecimento etnofarmacológico sobre *C. verbenacea*, desenvolveu o Acheflan®, anti-inflamatório fitoterápico indicado para tratar tendinite crônica e dores miofaciais, o qual se tornou conhecido por ter sido o primeiro medicamento fitoterápico desenvolvido com tecnologia 100% nacional. O produto, que foi lançado em junho de 2005, é apresentado nas formas farmacêuticas de aerosol e de creme, cada uma contendo 5,0 mg do óleo essencial de erva-baleeira, padronizado em 2,3-2,9 % do monoterpeneo α -humuleno (COUTINHO, 2009; SANTOS, 2010), possuindo uma patente sobre a composição e formulação a base do óleo essencial de *C. verbenacea* (BR 102015012438-4 A2).

No entanto, além do já conhecido efeito anti-inflamatório, estudos relataram outras ações farmacológicas para *C. verbenacea* como em um estudo realizado por Hernández *et al.*, 2003 com o extrato hexânico contra 14 linhagens de bactérias comumente causadoras de problemas intestinais mostrou eficácia contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, constatando que seu uso popular é procedente para distúrbios gastrointestinais. A atividade

antifúngica e a toxicidade do extrato etanólico foram testadas concluindo que o extrato etanólico de *C. verbenacea* possui atividade moderada sobre *Candida albicans* e *C. krusei* e que possui alta toxicidade em bioensaios realizados com *Artemia salina* (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Já o extrato metanólico de *C. verbenacea* foi usado para verificar a sua ação fototóxica contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Os resultados sugeriram que o extrato metanólico de *C. verbenacea*, na presença de luz, pode ser eficaz no tratamento de infecções causadas por bactérias (MATIAS *et al.*, 2010). Por fim, Kwiecinski *et al.* (2010) investigaram a atividade anticâncer do extrato supercrítico de *C. verbenacea*, onde foi avaliado a citotoxicidade e a apoptose de células de carcinoma de Ehrlich causada pela aplicação deste extrato, onde, concluíram que o extrato apresenta importante atividade anticarcinogênica.

Além disso, *C. verbenacea* faz parte da lista composta por 71 plantas com potencial terapêutico indicadas pelo SUS (Sistema Único de Saúde) para estudos e do Formulário Nacional de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2011; 2006).

De forma geral, a análise dos dados da literatura demonstra que *C. verbenacea* é uma espécie vegetal com uso tradicional cujos extratos e óleo essencial apresentaram ação anti-inflamatória, havendo um medicamento fitoterápico à base de seu óleo essencial com esta indicação, mas que ainda é pouco estudada do ponto de vista de seu metabolismo secundário, especialmente com relação aos metabólitos não voláteis.

3 OBJETIVO

Avaliar a variabilidade química sazonal, circadiana e intra-específica de metabólitos secundários não voláteis e voláteis em folhas de *Cordia verbenacea* DC.

3.1 Objetivos específicos

- a) Purificar e determinar as estruturas químicas de metabólitos secundários das folhas de *C. verbenacea* para seu uso como padrões cromatográficos nas análises de variabilidade.
- b) Desenvolver e aplicar métodos cromatográficos na análise de metabólitos voláteis e não voláteis de *C. verbenacea*.
- c) Comparar através de análise estatística multivariada os perfis químicos de metabólitos secundários dos diferentes indivíduos, bem como avaliar as diferenças entre épocas e horários distintos de colheita.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção e fracionamento do extrato etanólico das folhas de *C. verbenacea* (EetOH) para a purificação de metabólitos secundários

4.1.1 Coleta do material vegetal

Inicialmente foram coletadas folhas de um espécime de *Cordia verbenacea* do campo experimental do CPQBA-UNICAMP (Figura 5), no Distrito de Betel em Paulínia-SP, sendo depositada sua exsicata no Herbário de São José do Rio Preto (IBILCE/UNESP) sob o número 31235 e Autorização de Acesso ao Patrimônio Genético (CNPq) está no anexo 1. A coleta foi realizada no dia 31/10/2013 às 12:00 h (temperatura 27° C, umidade relativa do ar 65%, nublado). Posteriormente foram coletadas 27 espécimens destinadas ao estudo populacional e 7 espécimens foram coletadas destinadas aos estudos circadiano e sazonal (itens 4.2 e 4.3).



Figura 5 - Espécimes de *C. verbenacea* no campo experimental do CPQBA-UNICAMP (Paulínia-SP).

4.1.2 Preparo do material vegetal

As folhas foram conduzidas à secagem em estufa de circulação de ar à 40° C, por 3 dias (SCARDELATO, 2013). Parte do material vegetal seco, destinado às extrações etanólicas (maceração e ultrassom) foi triturada em moinho de facas e armazenada em frasco de vidro com tampa e sob-refrigeração. As drogas vegetais íntegras (secas) foram destinadas a extração do óleo essencial.

4.1.3 Obtenção do extrato etanólico para purificação de metabólitos secundários

O método escolhido para obtenção do extrato etanólico das folhas foi a maceração, realizada em 3 etapas, sendo a primeira de 24 h e as duas subseqüentes de 48 h, a 35° C, sob agitação ocasional e utilizando 1 Kg de droga vegetal pulverizada. A relação droga vegetal: solvente total foi de 1:15 (g/mL), utilizando 5 L em cada etapa. As soluções extrativas obtidas foram filtradas, reunidas, secas em capela sob vazão de ar e em dessecador com sílica gel sob pressão reduzida, originando o extrato etanólico seco.

O rendimento do extrato seco em relação à droga vegetal utilizada para o processo de maceração foi de 13 % ou seja, 130 g de resíduo seco. Esse extrato foi utilizado para os processos de fracionamento, purificação de substâncias e desenvolvimento do método de análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

4.1.4 Fracionamento do extrato EetOH através de extração em fase sólida (EFS)

4.1.4.1 EFS-teste

Foram utilizados 800 mg de extrato seco misturados com a fase estacionária (1:1, m/m) e aplicados em coluna de vidro contendo sílica gel (12 x 2 cm; 60-200 µm). A eluição (V_{eluente} : 80,0 mL) foi realizada sob pressão reduzida como segue: 1. Hex (fração: EFS-teste1); 2. Hex/AcOEt 8:2 (fração: EFS-teste 2); 3. Hex/AcOEt 6:4 (fração: EFS-teste 3); 4. Acetato de etila (fração: EFS-teste 4); 5. AcOEt/MeOH 95:5 (fração: EFS-teste5); 6. AcOEt/MeOH 85:5 (fração: EFS-teste 6); 7. Metanol (fração: EFS-teste 7). O volume de coleta de cada fração foi de 80 mL.

4.1.4.2 EFS em maior escala

Foram utilizados 30 g de extrato seco misturados com a fase estacionária (1:1, m/m) e aplicados em coluna de vidro contendo sílica gel (12 x 10 cm; 60-200 µm). A eluição

(V_{eluente}: 1800 mL) foi realizada sob vácuo como segue: 1. Hex/AcOEt 8:2 (frações: EFS 1.1 e 1.2); 2. Hex/AcOEt 6:4 (frações: EFS 2.1 e 2.2); 3. Acetato de etila (frações: EFS 3.1 e 3.2); 4. AcOEt/MeOH 90:10 (frações: EFS 4.1 e 4.2); 5. Metanol (frações: EFS 5.1 e 5.2). O volume de coleta de cada fração foi de 900 mL dividido em duas partes de 450 mL cada.

4.1.4.2.1 Análises cromatográficas das frações EFS-teste e EFS

a) Cromatografia em camada delgada (CCD)

A técnica de cromatografia em camada delgada (CCD) seguiu inicialmente condições descritas em Wagner et al. (1996) quanto às fases móveis e reveladores utilizados para análise dos metabólitos secundários. Durante os testes, a força de eluição e a seletividade das fases móveis foram otimizadas para se obter uma melhor resolução cromatográfica. Como fase estacionária foi utilizada sílica gel (placas de vidro 5, 10 ou 20 x 20 cm; 0,25 mm). As cromatoplasmas foram observadas sob luz visível e UV (254 e 365 nm), além de serem reveladas com reveladores distintos conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2 - Condições de análises por CCD das frações da EFS-teste e EFS.

Fase móvel (v/v)	Revelador	Classe de metabólitos secundários alvo
n-butanol/ácido acético/água (60:37:3)	NP-PEG ¹	Flavonoides e outros fenólicos
	H ₂ SO ₄ 10 % ²	todas
hexano/acetato de etila/isopropanol (70:28:2)	anisaldeído sulfúrico ²	terpenos (manchas roxas)
acetato de etila/ácido fórmico/água (90:5:5)	solução etanólica de FeCl ₃ 1%	taninos e outros fenólicos
	H ₂ SO ₄ 10 % ²	todas
clorofórmio/acetato de etila (60:40)	H ₂ SO ₄ 10 % ²	todas

¹ nebulização seguida de observação em luz UV (365 nm)

² nebulização seguida de aquecimento à 110° C por 10 min

b) Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no UV/Vis (CLAE-UV)

Para a análise por CLAE-UV as frações e o extrato EtOH passaram por um pré-tratamento: 10,0 mg de cada amostra foram dissolvidos em 1,0 mL de metanol: água 95:05 (v/v) e submetidos a uma EFS num cartucho SampliQ® (C18; 45 µm; 500 mg; 6 mL) que foi ativado com metanol e condicionado com metanol: água 95:05 (v/v). Após a aplicação da amostra, a coluna foi eluída com 4,0 mL de metanol: água 95:05 (v/v). O eluato foi seco num dessecador com sílica gel, sob pressão reduzida, dissolvido em metanol (1,0 mL) e filtrado através de membrana de PVDF (0,22 µm; PerkinElmer® PVDF Syring Filters). As análises de

uma alíquota de 20 µL de cada fração foram realizadas em cromatógrafo Perkin Elmer® Flexar® UV/Vis utilizando coluna de fase reversa C18 (250 x 4,6 mm; com partículas de 5 µm), em condições de gradiente exploratório: 5-100 % de metanol em 30 min, mais 100% de metanol por 5 min; vazão de 1,0 mL/min; detector com comprimento de onda em 250 nm.

4.1.5 Fracionamento da fração F.4.1 por cromatografia em coluna (CC)

Para o isolamento e purificação de substâncias foram realizados inicialmente testes em CCD para determinar uma condição de fase móvel onde o R_f das manchas principais se encontrasse abaixo de 0,5 (Figura 8a) e uma condição de R_f entre 0,2 e 0,8 (Figura 8b), para realizar uma transferência de CCD para CC, utilizando um aumento da força de eluição em progressão geométrica dos eluentes na CC iniciando com benzeno/acetato de etila/metanol 60:38:2 e finalizando com benzeno/acetato de etila/metanol 55:35:10, seguindo o trabalho de Still e colaboradores (1978) com algumas modificações. O uso do benzeno foi necessário devido a sua melhor resolução em relação aos outros solventes menos tóxicos, devido a uma melhor separação das bandas cromatográficas.

Posteriormente, foi realizada uma varredura espectrométrica em UV/VIS para visualizar o perfil da fração F.4.1, onde foram observadas bandas com $\lambda_{\text{máx}}$ 255 e 348 nm, as quais são características de flavonoides.

Para cromatografia em coluna da fração escolhida, foram utilizados 400 mg da fração F.4.1 misturados com a modo estacionária (1:1, m/m) e aplicados em coluna de vidro contendo sílica gel (20 x 5,4 cm; 40-63 µm). A eluição (V_{eluate} : 750,0 mL) foi realizada sob pressão. Fases móveis: 1. benzeno/acetato de etila 90:10; 2 benzeno/acetato de etila/metanol 60:38:2; 3. benzeno/acetato de etila/metanol 58:39:3; 4. benzeno/acetato de etila/metanol 55:40:5; 5. benzeno/acetato de etila/metanol 55:35:10 e 5. metanol; foram recolhidos 37,5 mL em cada frasco totalizando 120 subfrações.

4.1.5.1 Análises cromatográficas das subfrações obtidas por CC

a) CCD

As 120 subfrações foram analisadas por CCD utilizando a seguinte condição: sílica gel; benzeno/acetato de etila/metanol (55:35:10); concentração das amostras: 1 mg/mL (acetato de etila); volume de aplicação: 10 µL; revelação: nebulização com solução de ácido sulfúrico 10 % seguida de aquecimento a 110° C por 10 min.

b) CLAE-UV

As subfrações escolhidas que apresentavam o menor número de bandas possíveis na análise por CCD (4.1.18, 4.1.24 e 4.1.30) dentre as 120 foram analisadas por CLAE-UV. O pré-tratamento das subfrações foi idêntico ao descrito no item 4.1.4.2.1. As análises de uma alíquota de 20 µL de cada amostra foram realizadas em cromatógrafo Perkin Elmer® Flexar® UV/Vis utilizando coluna de fase reversa C18 (250 x 4,6 mm; com partículas de 5 µm), vazão de 0,4 mL/min e com detector com comprimento de onda em 254 nm. As condições de fase móvel em modo isocrático avaliadas foram: 68 % de metanol de 0-55 min; 67 % de metanol de 0-35 min; e 83% de metanol de 0-78 min.

4.1.6 Purificação de metabólitos secundários a partir de frações obtidas por CC com o emprego de CLAEprep

As subfrações 4.1.18, 4.1.24 e 4.1.30 foram submetidas à separação por CLAEprep. As informações obtidas do método isocrático do item 4.1.5.1 serviram de base para o estabelecimento da condição mais satisfatória para o escalonamento para CLAEprep. As condições analíticas foram escalonadas considerando-se mesmo comprimento de coluna, tipo de FE, comprimento de onda de detecção e FM. A vazão foi calculado com base na relação:

$$F_p = (F_{an} \times d_p^2)/d_{an}^2$$

Onde:

F_p – vazão no modo semipreparativo; F_{an} - vazão no modo analítico;

d_p – d.i. coluna semipreparativa; d_{an} - d.i. coluna analítica

O pré-tratamento das frações consistiu em uma EFS em coluna de vidro preenchida com sílica C18 (2 x 1,4 cm, 40-63 µm) e com eluição sob pressão com MeOH/H₂O (95:05, v/v, 25,0 mL). As amostras resultantes foram secas sob vazão de ar e em dessecador com sílica gel, solubilizadas em MeOH/H₂O (95:05, v/v; 15,0 mg/mL) e filtradas em membrana (PVDF; 0,22 µm). A purificação foi realizada em cromatógrafo Perkin Elmer® Flexar® UV/Vis acoplado a uma coluna semipreparativa Agilent Eclipse XDB C-18 (250 x 21,20 mm; 7 µm), com vazão de 8,0 mL/min e detecção em 254 nm. As informações sobre as frações (massa usada no pré-tratamento, volume e número de injeções) e sobre a fase móvel são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Condições de fase móvel em CLAEprep (modo isocrático) utilizadas na purificação de substâncias das subfrações 4.1.18, 4.1.24 e 4.1.30.

Fração (m _{total}) ¹	Fase Móvel (tempo final)	V _{inj} (nº injeções)
F.4.1.18 (16,7 mg)	68% metanol (45 min)	1 mL (6)
F.4.1.24 (26,7 mg)	67% metanol (50 min)	1 mL (2)
F.4.1.30 (148,4 mg)	78% metanol (50 min)	1 mL (10)

¹ massa utilizada no pré-tratamento

4.1.6.1 Análise de pureza dos metabólitos secundários purificados por CLAEprep

A pureza das substâncias foi verificada através do índice de pureza obtido pela análise por CLAE-DAD.

4.1.7 Determinação estrutural dos metabólitos secundários purificados

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) unidimensionais de ¹H e ¹³C e os mapas de contorno bidimensionais HMBC, COSY e HSCQ foram obtidos a 300 MHz para ¹H e a 75 MHz para ¹³C em um espectrômetro Bruker® Fourier 300 (**7,0 T**); utilizou-se CDCl₃ como solvente e clorofórmio como referência interna. Os espectros no infravermelho (IV) foram obtidos em disco de KBr num espectrofotômetro Shimadzu® IR-Prestige-21. Os espectros no ultravioleta (UV) foram obtidos (0,0375 mg mL⁻¹; metanol) num espectrofotômetro Shimadzu® UV-1800.

4.2 Obtenção e análise dos extratos etanólicos de folhas de *C. verbenacea* dos estudos de variabilidade química populacional, sazonal e circadiana

4.2.1 Obtenção dos extratos para as análises de variabilidade química

Para a análise intraespecífica ou populacional foram coletadas folhas de 27 espécimens de *C. verbenacea* (1I4, 1VI1, 1VI4, 2I1, 2II5, 2II3, 2IV5, 3I4, 3II1, 3II5, 3IV1, 5I2, 5II4, 5VI1, 5VI3, 13I1, 13I5, 13II4, 13VI2, 25I3, 25II5, 25II2, 25IV5, 26I3, 26I5, 26IV1, 26IV5), em agosto de 2013, no campo experimental do CPQBA – UNICAMP, no Distrito de Betel em Paulínia-SP (coordenadas aproximadas de 22°47'15.91"S 47°06'42.87"O) (Figura 6). O material vegetal foi processado separadamente conforme item 4.1.2 e armazenado em sacos de polietileno colocados dentro de sacos de papel *kraft* em geladeira.



Figura 6 - Espécimens de *Codia verbenacea* DC. no campo experimental do CPQBA-UNICAMP

Para a análise sazonal foram realizadas coletas de folhas a cada dois meses de 7 espécimens (1I4, 2II5, 3II5, 5VI3, 13I5, 15I3, 16IV1), seguindo os mesmos procedimentos de secagem e armazenamento. Foram realizadas 13 coletas para a análise da variabilidade sazonal (as informações de cada coleta foram descritas na Tabela 4). As coletas circadianas foram realizadas em dois períodos do ano durante 24 horas, cada coleta foi realizada a cada 6 horas devido à quantidade de massa foliar de cada espécimen não ser tão relevante, seguindo os mesmos procedimentos de secagem e armazenamento.

Tabela 4 - Informações climáticas e observações das coletas sazonais e circadianas.

Coleta sazonal	Data¹	Temperatura média, umidade relativa e nebulosidade²	Observações
1	12/11/2014 (primavera)	25 °C, 30 %, Nublado	Todos os espécimens apresentavam folhas de aspecto jovem e crescimento foliar.
2	15/01/2015 (Verão)	27,9 °C, 40 %, Nublado	Todos os espécimens apresentavam inflorescência e frutos, além de possuírem várias folhas jovens (crescimento foliar).
3	18/03/2015 (verão)	23,2 °C, 65 %, Totalmente Nublado	Todos os espécimens apresentavam grande quantidade foliar e coloração de verde intenso e inflorescência.
4	12/05/2015 (Outono)	16,8 °C, 78,6 %, Nublado	Os espécimens sofreram ataque de insetos e apresentavam poucas inflorescências.
5 ³	07/07/2015 (Inverno)	13,4 °C, 74,6 %, Nublado	Os espécimens apresentavam brotos, frutos e inflorescências
6	10/09/2015 (Inverno)	18,1 °C, 75,4 %, Nublado	Os espécimens apresentavam brotos, frutos e inflorescências
7	12/11/2015 (Primavera)	27,6 °C, 37 %, Nublado	Os espécimens sofreram ataque de insetos e apresentavam folhas de coloração forte.
8 ³	12/01/2016 (Verão)	24,7 °C, 61,7 %, Nublado	Os espécimens sofreram graves ataques de insetos e grande queda foliar.
9	18/03/16 (Verão)	24,6 °C, 45,7 %, Nublado	Os espécimens sofreram ataques de insetos, possuíam pouca quantidade foliar e os espécimens 2II5 e 3II5 possuíam quantidade insuficiente de folhas, as quais foram coletadas apenas para produção de extrato.
10	13/05/16 (Outono)	20,3 °C, 52,8 %, Céu aberto	Os espécimens apresentavam inflorescências, menos os espécimens 2II5 e a 3II5 que estavam secas.
11	06/07/16 (Inverno)	20,2 °C, 36,1 %, Nublado	Os espécimens apresentavam inflorescências, menos os espécimens 2II5 e a 3II5 que estavam secas.
12	26/09/16 (Primavera)	18,2 °C, 57,0 %, Nublado	Os espécimens apresentavam inflorescências, menos os espécimens 2II5 e a 3II5 que estavam secas.
13	18/11/16 (Primavera)	24,0 °C, 39,9 %, Nublado	Os espécimens apresentavam inflorescências e crescimento foliar, menos os espécimens 2II5 e a 3II5 que estavam secas.

¹Horário de coleta: entre 10:00 e 12:00 h²Condições climáticas obtidas do Centro de Pesquisa Meteorológicas e Climáticas Aplicadas a Agricultura – CEPAGRI-UNICAMP.³Coletas circadianas

4.2.2 Obtenção dos extratos etanólicos para análises populacional, sazonal e circadiana

Os extratos das análises populacional, sazonal e circadiana foram obtidos com 1,0 g da droga vegetal através de extração com etanol utilizando-se as seguintes condições: proporção droga vegetal: etanol 1:30 (g/mL), em banho de ultrassom por 30 min. As soluções extrativas foram filtradas e secas em capela sob vazão de ar e, finalmente, em dessecador com sílica gel sob pressão reduzida.

4.2.3 Desenvolvimento de método de análise para os extratos etanólicos de folhas de *C. verbenacea*

Foi realizada uma análise preliminar do extrato etanólico, seguindo inicialmente condições descritas por Matias e colaboradores (2013) com algumas modificações, por CLAE-UV para avaliar se a resolução obtida entre os pares de picos do cromatograma seria adequada. Condição de análise cromatográfica inicial: Coluna C18 (4.6mm × 250 mm; 5 µm); 0-30': 5 a 60%; 30-35': 60 a 71%; 35-55': 71 a 100%; 55-60': 100% metanol. Esta condição inicial sofreu várias alterações de forma empírica com troca do solvente de metanol para acetonitrila e modificações nos gradientes. Foi realizado no Instituto Federal de São Paulo – Campus Matão, coma supervisão do Prof. Dr. Danilo Luis Flumignan.

4.2.4 Coleta e preparo do material vegetal para obtenção dos óleos essenciais

A coleta e o preparo do material vegetal para obtenção dos óleos essenciais foram realizadas segundo item 4.2.1.

4.2.5 Obtenção do óleo essencial

Os óleos essenciais da droga vegetal íntegra dos 27 espécimes foram obtidos por hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger, utilizando 30 g de material seco. O óleo essencial obtido dos 7 espécimes do estudos circadiano e sazonal seguiu o mesmo procedimento.

4.2.6 Análise dos óleos essenciais

a) CCD

A CCD dos óleos essenciais do estudo populacional (5,0 mg/mL, AcOEt) foi desenvolvida em placas de alumínio cobertas com sílica gel (10 x 10 cm x 0,25 mm), utilizando como fases móveis tolueno: acetato de etila 92:8 e hexano, e como revelador anisaldeído sulfúrico. Distância total de eluição (D): 9 cm. O uso do tolueno como componente da fase móvel justifica-se pela ótima resolução obtida e ressalta-se que tal solvente foi utilizado em pequeno volume (cerca de 200 mL).

b) Cromatografia em fase gasosa acoplada espectrometria de massas (CG-EM)

Foi realizada uma análise preliminar do óleo essencial (mistura dos 7 espécimens do estudo sazonal) por CG-EM para avaliar se a resolução obtida entre os pares de picos do cromatograma utilizando o método descrito por Adams (2007) seria adequada. Condições cromatográficas: gradiente de temperatura de 60 a 246° C - 3° C/ min, temperatura do injetor de 240° C, razão de *split* 1/20, coluna Rtx-5MS (30m x 0,25 mm d.i.; 0,25 µm filme interno. Foi realizado no Instituto Federal de São Paulo – Campus Matão, coma supervisão do Prof. Dr. Danilo Luis Flumignan.

4.3 Análise Multivariada de dados e ANOVA

Para realização de uma análise estatística multivariada de dados utilizando ferramentas quimiométricas foi desenvolvido um projeto BEPE/Fapesp (Processo: 2016/10519-1) intitulado “*Cordia verbenacea* DC.: Aplicação de técnicas quimiométricas para avaliação do estudo populacional, circadiano e sazonal” para um estágio na Universidad Nacional Del Litoral, localizada em Santa Fé na Argentina, onde foi aprimorado o conhecimento do uso de ferramentas quimiométricas para análise dos perfis químicos de metabólitos secundários dos diferentes espécimens de *C. verbenacea*, avaliando diferenças químicas populacionais, sazonais e circadianas. O estágio foi orientado pelo Prof. Dr. Héctor C. Goicoechea (Laboratório de Desenvolvimento Analítico e Quimiométrico). O softwares utilizados foram o Matlab – PCA Tolbox 1.2 e o Past3.

A análise multivariada é uma técnica quimiométrica bastante empregada para verificar a existência de similaridades entre as amostras, que corresponde às semelhanças na composição química entre elas. O número de variáveis nos estudos de reconhecimento de padrões é grande e a representação gráfica de todo o conjunto de dados facilita a

interpretação dos resultados. A análise por agrupamento hierárquico (HCA) e a análise de componentes principais (PCA) tem como objetivo aumentar a compreensão do conjunto de dados, examinando a presença ou ausência de agrupamentos naturais entre as amostras. São classificados como exploratórios ou não supervisionados, visto que nenhuma informação com relação à identidade das amostras é levada em consideração.

A análise de componentes principais (PCA) é amplamente aplicada no tratamento de conjuntos de dados de alta complexidade. A utilização da PCA visa preservando a maior quantidade de informação (variância) possível. Já, a análise de agrupamento hierárquico (HCA) é uma técnica que busca agrupar as amostras em classes, baseando-se na similaridade das amostras de uma mesma classe e nas diferenças entre as amostras de classes diferentes (SANTOS, 2013). Além da PLS (método dos quadrados mínimos parciais) que foi utilizada no estudo populacional dos óleos essenciais, que é uma técnica de tratamento de bloco de variáveis.

Para ambas as análises cromatogramas obtidos por CLAE-DAD e CG-EM, foram analisados e utilizados como variáveis o tempo de retenção de cada pico, juntamente com sua área, desta forma foram elaboradas tabelas que posteriormente foram convertidas em matrizes, desta forma pode-se obter os agrupamentos e as variáveis que colaboram com as diferenças químicas encontradas.

Além da análise multivariada de dados, foi realizada uma análise estatística utilizando ANOVA, utilizando o software Excel 2007.

4.5 Aquantificação das substâncias isoladas do extrato etanólico

a) Cordialina A

A curva analítica da cordialina A é apresentada abaixo (Figura 7 e Tabela 5), sendo que as concentrações foram corrigidas considerando sua pureza cromatográfica (97,3%).

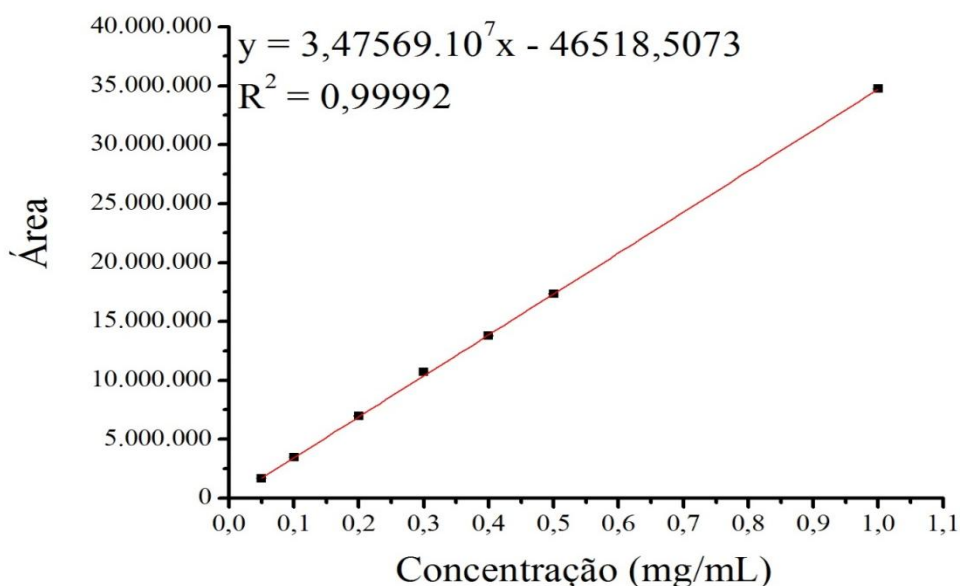


Figura 7 - Curva analítica da cordialina A obtida em CLAE-DAD.

Tabela 5 - Dados das análises da cordialina A em CLAE-DAD para construção da curva analítica.

Concentração	t _R	Média da área dos picos ±	Concentração -) ¹
0,05	53,2	1.688.248 ± 1.313,8	0,0487
0,10	53,1	3.482.707 ± 5.191,6	0,0973
0,20	53,0	6.954.325 ± 20.173,7	0,1946
0,30	53,2	10.717.604 ± 41.702,3	0,2919
0,40	53,1	13.808.996 ± 9.176,8	0,3892
0,50	53,0	17.339.277,5 ± 17.907,5	0,4865
1,00	53,0	34.752.776 ± 44.713,2	0,9730

¹Concentração calculada considerando pureza de 97,3 %.

A partir da equação da reta ($y = 3,4759.10^7 x - 46518,5073$) foi possível calcular a concentração de cordialina A nos extratos etanólicos utilizando os valores de área obtidos nos cromatogramas dos extratos, bem como calcular a % (m/m) de cordilaina A nos extratos etanólicos, considerando a massa inicial de 10,0 mg de amostra utilizada no pré-tratamento.

b) *cis*-cordialina A

A curva analítica da *cis*-cordialina A é apresentada abaixo (Figura 8 e Tabela 6), sendo que as concentrações foram corrigidas considerando sua pureza cromatográfica (96,0 %).

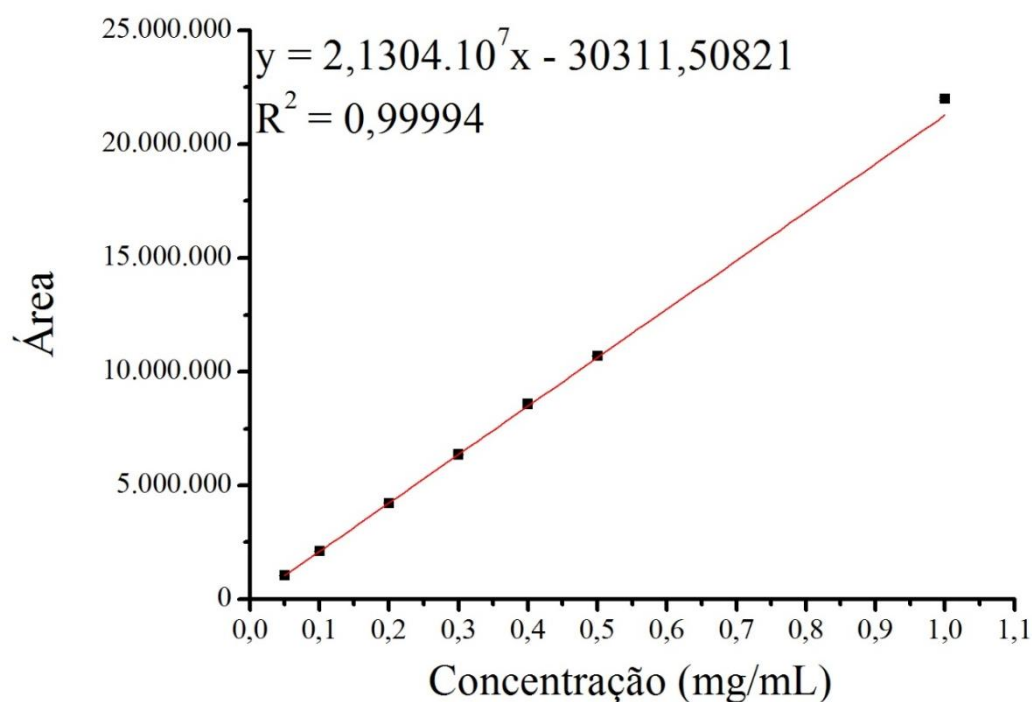


Figura 8- Curva analítica da substância isolada da subfração F.4.1.30 em CLAE-DAD

Tabela 6 - Dados das análises da *cis*-cordialina A em CLAE-DAD para construção da curva analítica.

Concentração (mg/mL)	t _R (min)	Média da área dos picos ± DPM	Concentração corrigida (mg/mL) ¹
0,05	49,1	1.035.091,5 ± 583,4	0,048
0,10	48,9	2.105.066,5 ± 737,5	0,096
0,20	48,9	4.220.917 ± 848,5	0,192
0,30	49,1	6.361.005,5 ± 8.138,1	0,288
0,40	48,9	8.580.578 ± 5.174,6	0,384
0,50	49,1	10.690.788 ± 10.286,9	0,480
1,00	48,9	21.998.124,5 ± 72.851,1	0,960

¹Concentração calculada considerando pureza de 96,0 %.

A partir da equação da reta ($y = 2,1304 \cdot 10^7 x - 30311,50921$) foi possível calcular a concentração da *cis*-cordialina A nos extratos etanólicos utilizando os valores de área obtidos nos cromatogramas dos extratos etanólicos, bem como calcular a % (m/m) da *cis*-cordialina A nos extratos, considerando a massa inicial de 10,0 mg de amostra utilizada no pré-tratamento.

c) diidroxipentametoxiflavona

A curva analítica da diidroxipentametoxiflavona é apresentada abaixo (Figura 9 e Tabela 7), sendo que as concentrações foram corrigidas considerando sua pureza cromatográfica (97,9%).

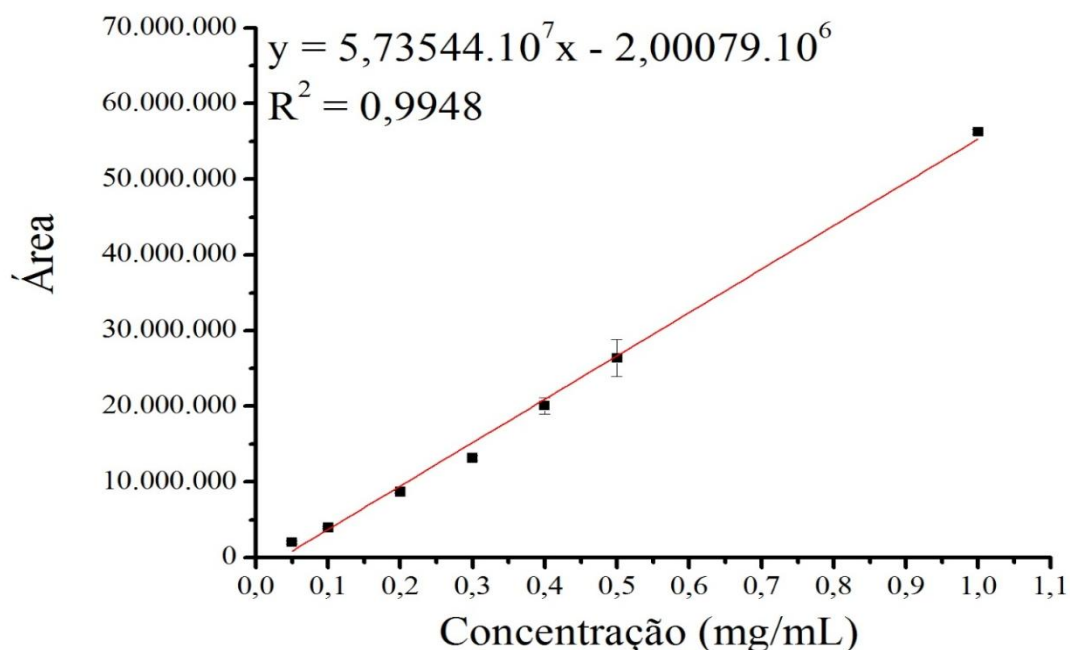


Figura 9 - Curva analítica da substância diidroxipentametoxiflavona em CLAE-DAD

Tabela 7 - Dados das análises da diidroxipentametoxiflavona em CLAE-DAD para construção da curva analítica.

Concentração (mg/mL)	t _R (min)	Média da área dos picos ± DPM	Concentração corrigida*(mg/mL) ¹
0,050	30,7	2.001.231,5 ± 202.889,4	0,0489
0,10	30,8	3.950.046 ± 173.655,5	0,0979
0,20	30,8	8.696.064 ± 185.301,6	0,1958
0,30	31,1	13.157.415 ± 318.871,2	0,2937
0,40	30,8	20.067.143,5 ± 1.081.844,4	0,3916
0,50	30,8	26.381.749 ± 2.481.820,3	0,4895
1,00	30,9	56.288.646,5 ± 326.299,4	0,9790

¹Concentração calculada considerando pureza de 97,9 %.

A partir da equação da reta ($y = 5,73544.10^7 x - 2,00079.10^6$), foi possível calcular a concentração da diidroxipentametoxiflavona nos extratos etanólicos utilizando os valores de área obtidos nos cromatogramas dos extratos, bem como calcular a % (m/m) da diidroxipentametoxiflavona total no extrato, considerando a massa inicial de 10,0 mg de amostra utilizada no pré-tratamento.

4.6 Quantificação de substâncias isoladas do óleo essencial

As curvas analíticas do *trans*-cariofileno e do α -humuleno foram obtidas através das concentrações *versus* os valores das áreas dos picos nos cromatogramas.

a) *trans*-cariofileno

A curva analítica do *trans*-cariofileno é apresentada abaixo (Figura 10 e Tabela 8), sendo que as concentrações foram corrigidas considerando sua pureza cromatográfica (97,9%).

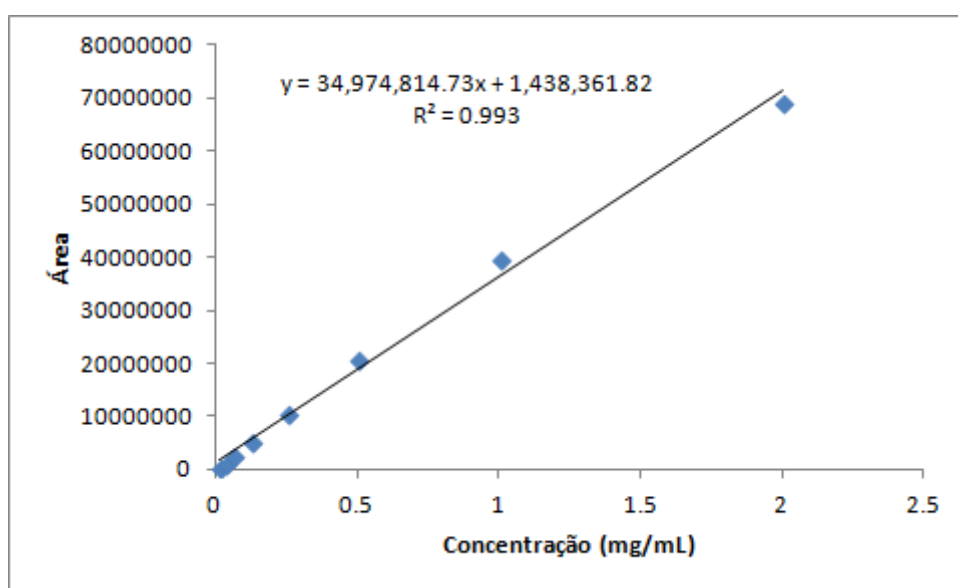


Figura 10 - Curva analítica da substância *trans*-cariofileno em CG-EM

Tabela 8 - Dados das análises do *trans*-cariofileno em CG-EM para construção da curva analítica.

Concentração (mg/mL)	t _R (min)	Média da área dos picos ± DPM	Concentração corrigida*(mg/mL) ¹
0,015	26,2	543700±12020,8	0,01539
0,031	26,2	1227649±39327,9	0,03078
0,062	26,3	2781415±40050,5	0,0615
0,125	26,2	5536633±72976,9	0,1230
0,250	26,2	10816280±16085,3	0,2460
0,500	26,3	20888385±16348,3	0,4920
1,000	26,3	39931789±697748,2	0,9850
2,000	26,3	69133822±165184,3	1,9700

¹Concentração calculada considerando pureza de 98,5 %.

A partir da equação da reta $y = 34,974,814.73x + 1,438,361.82$, foi possível calcular a concentração da substância isolada *trans*-cariofileno nos óleos essenciais utilizando os valores de área obtidos nos cromatogramas dos óleos, bem como calcular a % (m/m) da *trans*-cariofileno total nos óleos.

b) α -humuleno

A curva analítica do α -humuleno é apresentada abaixo (Figura 11 e Tabela 9), sendo que as concentrações foram corrigidas considerando sua pureza cromatográfica (97,9%).

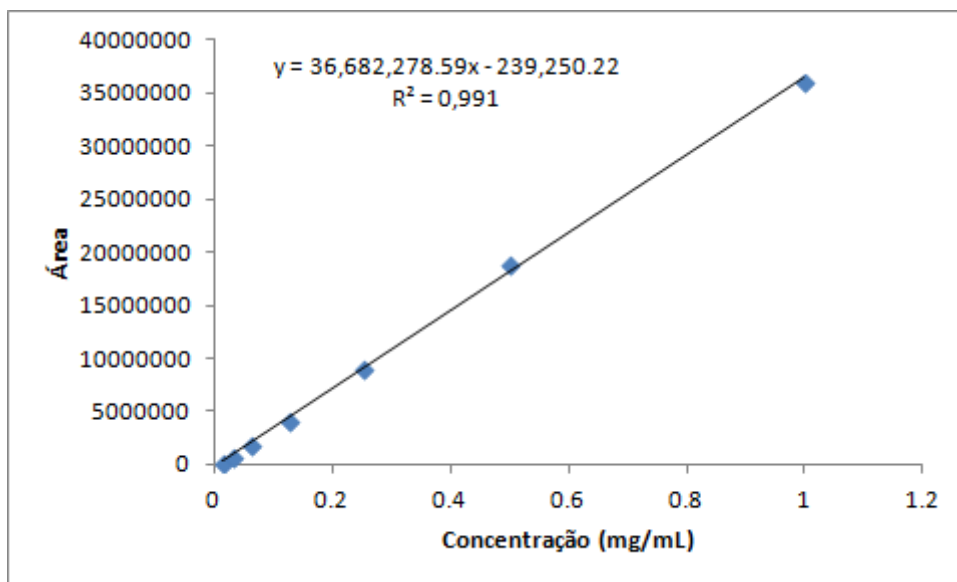


Figura 11 - Curva analítica da substância α -humuleno em CG-EM

Tabela 9 - Dados das análises do α -humuleno em CG-EM para construção da curva analítica.

Concentração (mg/mL)	t _R (min)	Média da área dos picos ± DPM	Concentração corrigida*(mg/mL) ¹
0,015	27,6	236132±9284,3	0,015
0,031	27,6	709918±16710,3	0,03
0,062	27,6	1895264±9473,1	0,06
0,125	27,6	4245374±39270,6	0,12
0,250	27,6	9076051±20346,3	0,24
0,500	27,6	18931925±252731,3	0,48
1,000	27,7	36021982±176602,7	0,96

¹Concentração calculada considerando pureza de 96,0 %.

A partir da equação da reta $y = 36,682,278.59x - 239,250.22$, foi possível calcular a concentração da substância isolada α -humuleno nos óleos essenciais utilizando os valores de área obtidos nos cromatogramas dos óleos, bem como calcular a % (m/m) da α -humuleno total nos óleos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Fracionamento do extrato etanólico e isolamento/purificação de metabólitos secundários

5.1.1 Análise por CCD das frações obtidas na EFS-teste

Foram obtidas 7 frações – F.1 (5,3 mg), F.2 (231,1 mg), F.3 (57,5 mg), F.4 (92,8 mg), F.5 (23,1 mg), F.6 (30,1 mg) e F.MetOH (122,6 mg) - correspondentes aos 7 eluentes usados, que foram analisadas por CCD com diferentes fases móveis e com uso de reveladores seletivos para terpenos (anisaldeído sulfúrico), taninos (solução etanólica de cloreto férrico 1 %) e flavonoides (NP-PEG), além de solução de ácido sulfúrico 10%, revelador geral (Figura 12 e Tabela 10), para verificar se houve o fracionamento do EetOH. Todas as amostras foram preparadas na concentração de 5 mg/mL (acetato de etila).

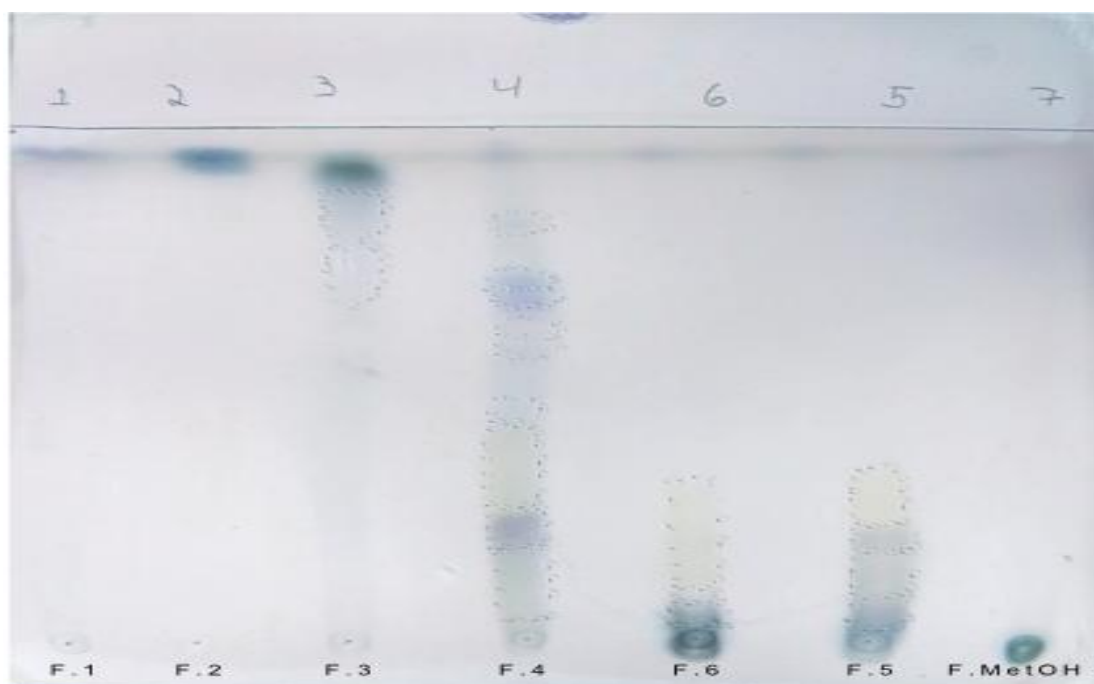


Figura 12 - Cromatoplaça das frações EFS-teste. Amostras, da esquerda para direita: F.1, F.2, F.3, F.4, F.6, F.5 e F.MetOH. Fase móvel: hexano/acetato de etila/isopropanol 70:28:2. Revelador: anisaldeído sulfúrico. Círculos pontilhados indicam manchas visualizadas sob luz UV (365 nm).

Tabela 10 - Dados das análises das frações da EFS-teste por CCD.

Fase Móvel	Revelador	Cromatoplaca
n-butanol/ácido	NP-PEG	Anexo 2
acético/água (60:37:3)	H ₂ SO ₄ 10%	Anexo 3
hexano/acetato de etila/isopropanol (70:28:2)	anisaldeído sulfúrico	Figura 4
acetato de etila/ácido fórmico/água (90:5:5)	Solução etanólica de FeCl ₃ 1%	Anexo 5
	H ₂ SO ₄ 10%	Anexo 6
clorofórmio/acetato de etila (60:40)	H ₂ SO ₄ 10%	Anexo 7

5.1.2 Análise por CCD das frações obtidas na EFS

Foram obtidas 11 frações - F.1.1 (2,12 g), F.1.2 (2,99 g), F.2.1 (2,26 g), F.2.2 (3,91 g), F.3.1 (1,45 g), F.3.2 (3,0 g), F.4.1 (1,12 g), F.4.2 (1,22 g), F.5.1 (2,34), F.5.2 (6,61 g) e F.etOH (1,65 g) - que posteriormente foram analisadas por CCD com diferentes fases móveis conforme descrito na tabela 11 (todas as amostras foram preparadas na concentração de 5 mg/mL em acetato de etila). Através destas análises foi possível verificar a eficiência da separação e o perfil de cada fração em diferentes condições cromatográficas.

Tabela 11 - Dados das análises das frações da EFS por CCD.

Fase Móvel	Revelador	Cromatoplaca
clorofórmio/ acetato de etila (60:40)	H ₂ SO ₄ 10%	Figura 13
hexano/acetato de etila (95:5)	H ₂ SO ₄ 10%	Anexo 7
n-butanol/ácido acético/ água (60:37:3)	NP-PEG	Anexo 8
hexano/acetato de etila/isopropanol (70:28:2)	H ₂ SO ₄ 10%	Anexo 9
acetato de etila/ácido fórmico/água (95:5:5)	H ₂ SO ₄ 10%	Anexo 10

A análise por CCD demonstrou que para as frações 1.1 e 1.2 a melhor fase móvel é hexano/acetato de etila (95:5), para as frações 2.1, 2.2 e 3.1 hexano/acetato de etila/isopropanol (70:28:2), para as frações 3.2, 4.1, 4.2 clorofórmio/acetato de etila/metanol (55:35:10) e para as frações 5.1, 5.2 e EtOH acetato de etila/ácido fórmico/água (95:5:5). Na figura 13 é possível observar que as frações obtidas apresentaram diferentes perfis cromatográficos, demonstrando a eficiência do fracionamento do extrato por EFS.

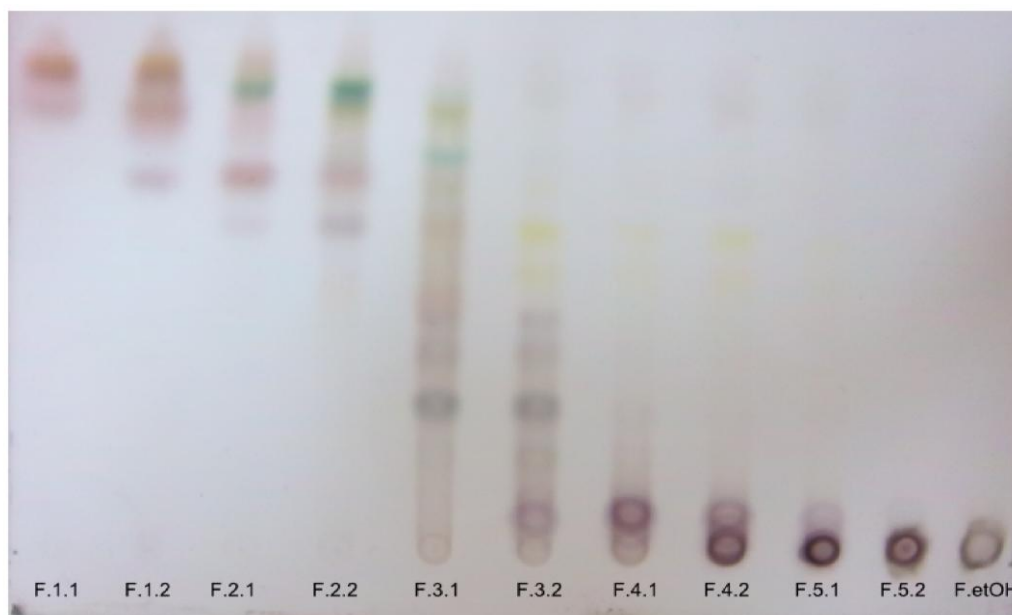


Figura 13 - Cromatoplaça das frações EFS. Amostras, da esquerda para direita: F.1.1, F.1.2, F.2.1, F.2.2, F.3.1, F.3.2, F.4.1, F.4.2, F.5.1, F.5.2 e F.etOH. Fase móvel clorofórmio/ acetato de etila 60:40. Revelador: ácido sulfúrico 10%.

5.1.3 Análise por CLAE-DAD das frações obtidas na EFS

O fracionamento do EetOH (cromatograma na Figura 14) também foi avaliado por CLAE-DAD. Esta análise também confirmou a obtenção de frações com perfis químicos distintos. A fração 4.1 (1,12 g) foi selecionada para purificação de substâncias por conter os 3 constituintes majoritários do EetOH e apresentar perfil químico relativamente simples conforme podemos verificar na análise por CLAE-UV (Figura 15) e por CCD (Figura 16), no qual, as bandas estão entre R_f 0,8 e 0,5, demonstrando uma boa resolução e separação das bandas.

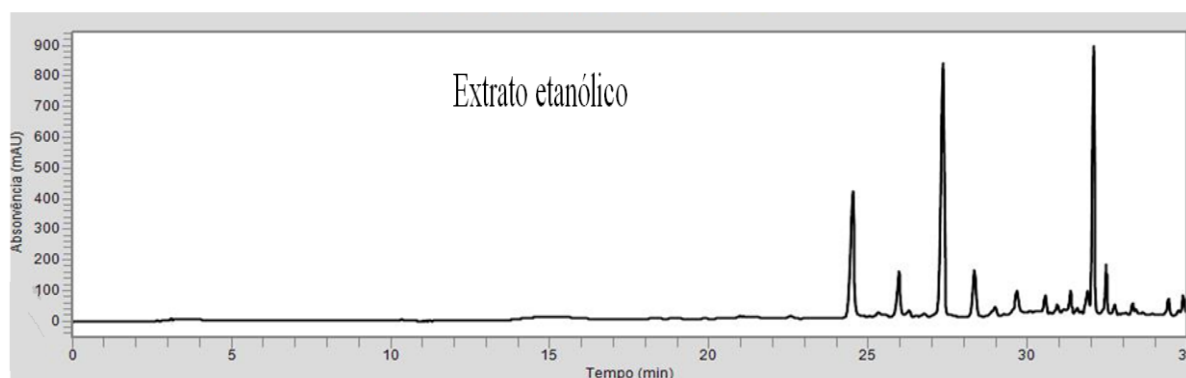


Figura 14 - Cromatograma por CLAE-UV do extrato etanólico (1,0 mg/mL, MeOH). Gradiente exploratório: 5-100 % de metanol em 30 min, mais 100% de metanol por 5 min; coluna Thermo Scientific® C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m), $\lambda_{\text{máx}}$ = 254 nm, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20 μ L

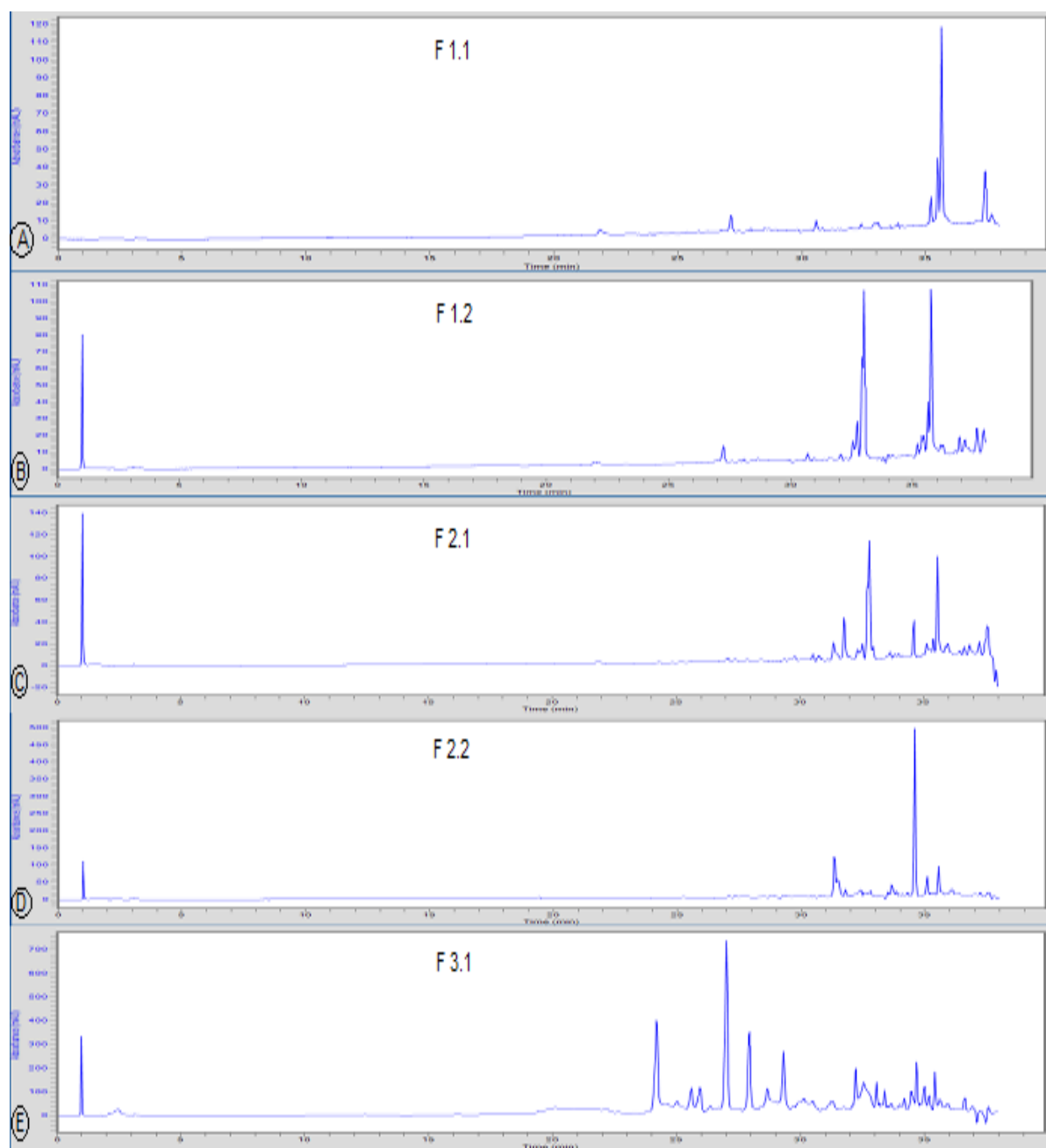


Figura 15a - Cromatogramas em CLAE-UV (gradiente exploratório) das frações 1.1, 1.2, 2.1, 2.2 e 3.1 (1,0 mg/mL, MeOH). Gradiente exploratório: 5-100 % de metanol em 30 min, mais 100% de metanol por 5 min; coluna Thermo Scientific® C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m), $\lambda_{\text{máx}}$ = 254 nm, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20 μ L

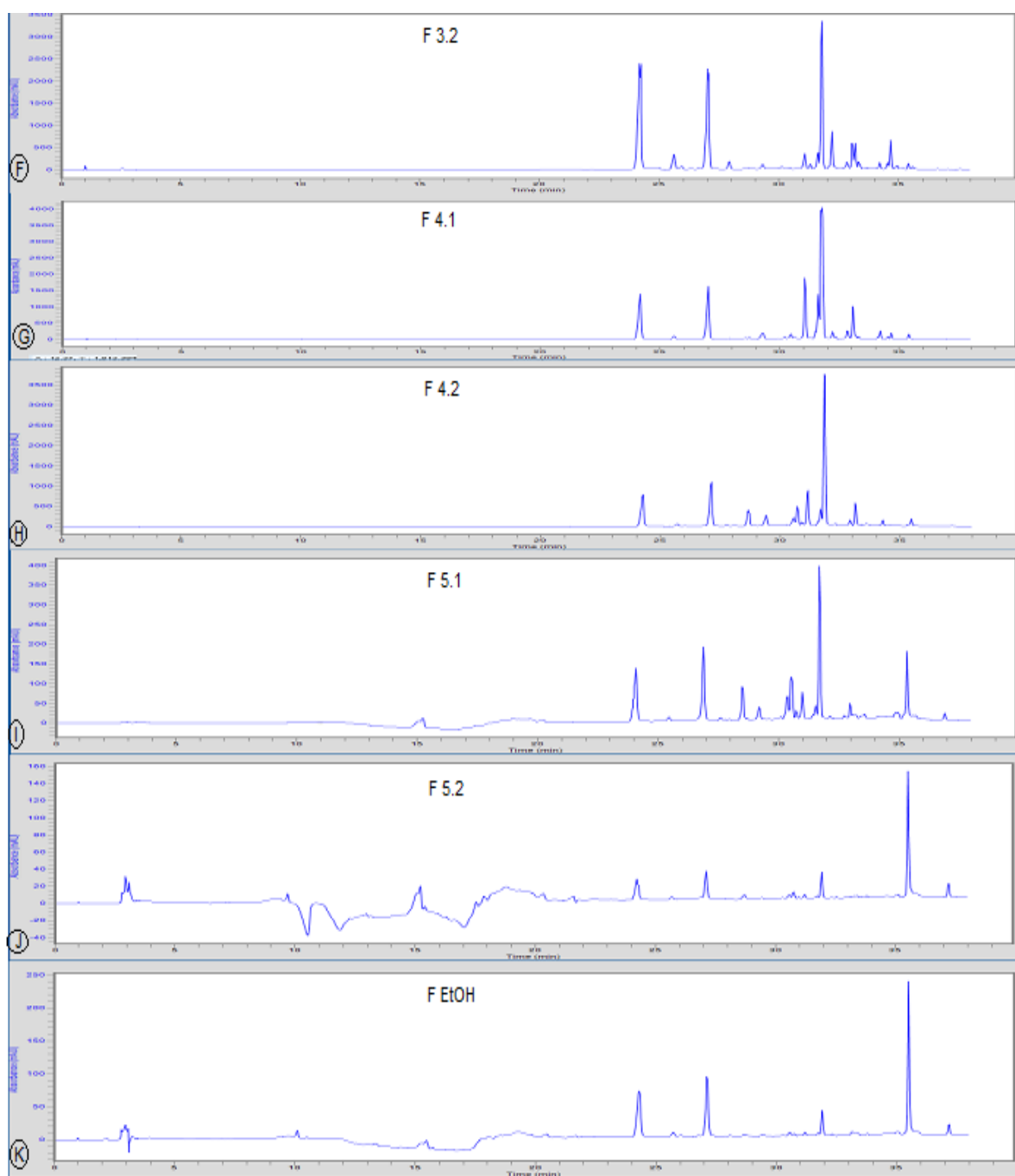


Figura 15b: Cromatogramas em CLAE-UV (gradiente exploratório) das frações Gradiente exploratório: 5-100 % de metanol em 30 min, mais 100% de metanol por 5 min; coluna Thermo Scientific® C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m), $\lambda_{\text{máx}}$ = 254 nm, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20 μ L.

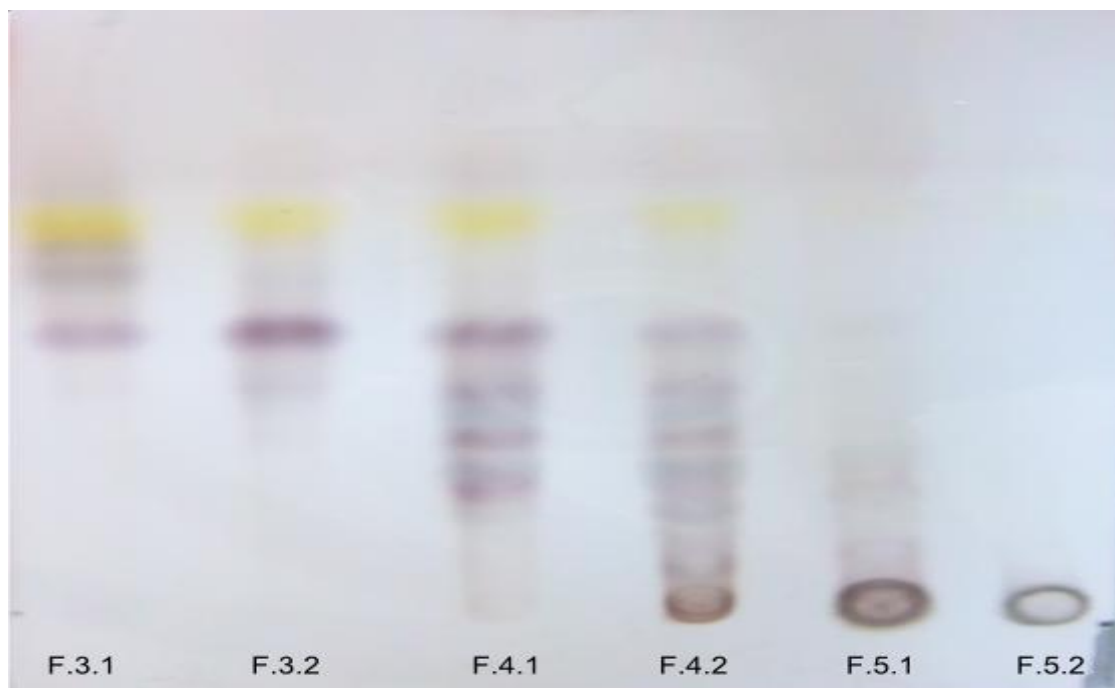


Figura 16 - Cromatoplasmas das frações EFS. Amostras, da esquerda para direita: F.3.1, F.3.2, F.4.1, F.4.2, F.5.1, F.5.2. Fase móvel: clorofórmio/acetato de etila/metanol 55:35:10. Revelador: ácido sulfúrico 10%.

5.2 Purificação de substâncias

5.2.1 Cromatografia em Coluna (CC)

A fração 4.1 foi escolhida para o isolamento e purificação de substâncias devido a apresentar um perfil cromatográfico mais simples. Sendo assim foram realizados inicialmente testes em CCD para determinar uma condição de fase móvel onde o R_f das manchas principais se encontrasse abaixo de 0,5 (Figura 17a) e uma condição de R_f entre 0,2 e 0,8 (Figura 17b), para realizar uma transferência de CCD para CC, utilizando um aumento da força de eluição em progressão geométrica dos eluentes na CC iniciando com benzeno/acetato de etila/metanol 60:38:2 e finalizando com benzeno/acetato de etila/metano 55:35:10, seguindo o trabalho de Still e colaboradores (1978) com algumas modificações.

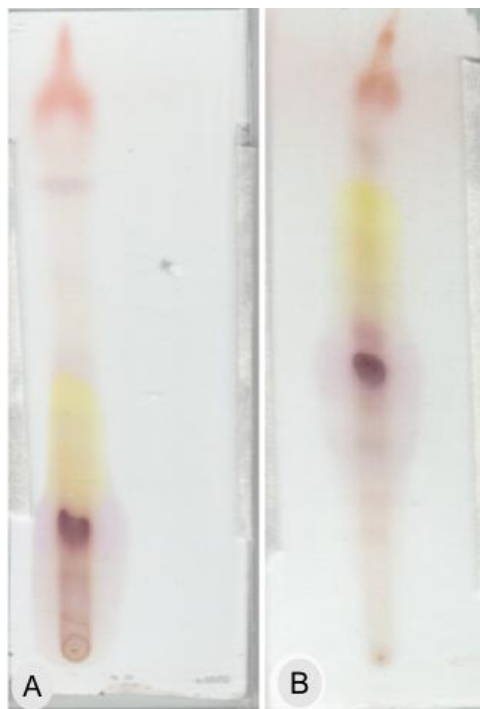


Figura 17 - Cromatoplasas da fração 4.1: otimização de condições de transferência de CCD para CC. Amostras, da esquerda para a direita: A: $R_f < 0,5$. B: $0,2 < R_f < 0,8$. Fase móvel: A: benzeno/acetato de etila/metanol 60:38:2 e B: benzeno/acetato de etila/metanol 55:35:10. Revelador: ácido sulfúrico 10%.

Posteriormente, foi realizado uma varredura espectrométrica em UV/VIS para visualizar o perfil da Fração 4.1 (Figura 18), onde foram observadas bandas com $\lambda_{\text{máx}}$ 255 e 348 nm, as quais são características de compostos fenólicos, especialmente de flavonoides. Com relação à banda com $\lambda_{\text{máx}}$ em 255 nm, a mesma é típica dos triterpenos do tipo damarano presentes em *C. verbenacea*, chamados de cordialina A e B.

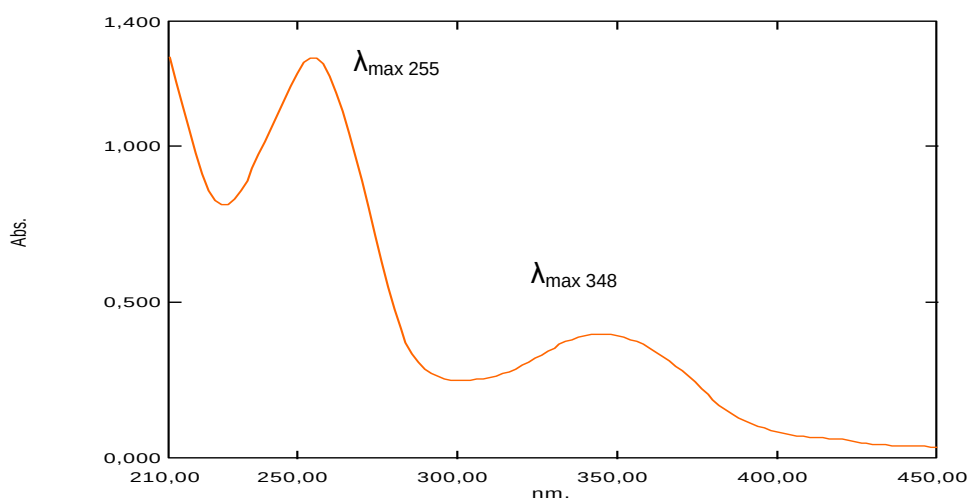


Figura 18 - Espectro no UV/Vis de F 4.1 (0,062 mg mL⁻¹ Metanol) do extrato etanólico de *C. verbenacea*.

As 120 subfrações foram analisadas por CCD e foi observado que as subfrações 18, 19, 20, 21, 22 e 23 (Figura 19) apresentaram uma única mancha amarela forte, 24 e 25 uma mancha mais abaixo amarelo claro e a subfração 30 uma única mancha de coloração roxa. Posteriormente foram reunidas (Tabela 12) as frações 18,19, 20,21, 22 e 23 tornando-se uma única subfração denominada F.4.1.18 (16,7 mg), as subfrações 24 e 25 também juntaram-se formando a F.4.1.24 (26,7 mg) e a fração 30 foi nomeada como F.4.1.30 (148,4 mg).

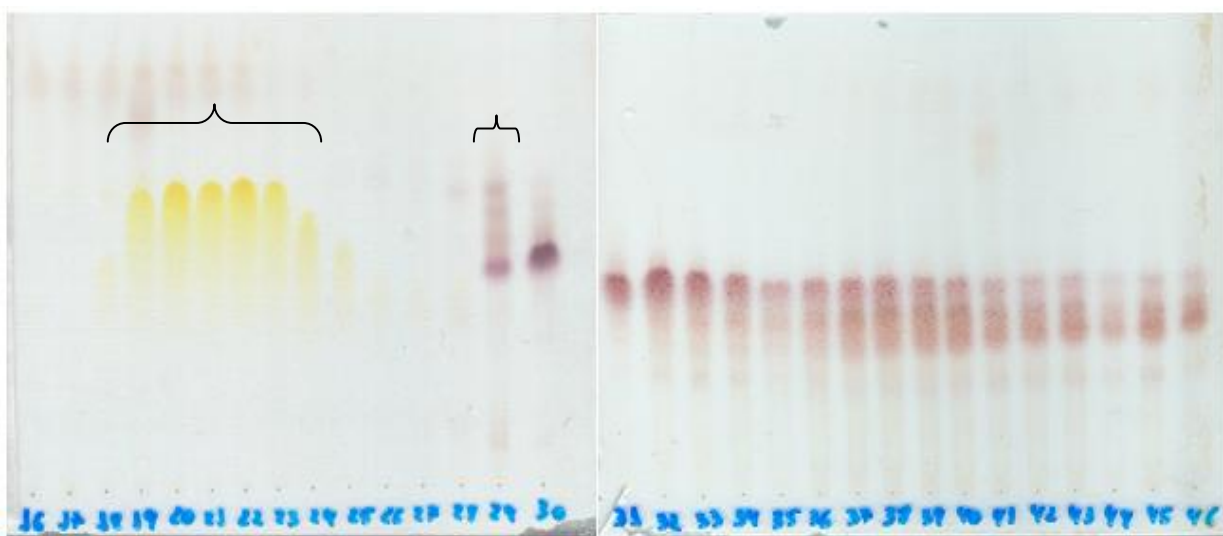


Figura 19 - Cromatoplas das subfrações da F.4.1. Amostras, da esquerda para a direita: 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46. Fase móvel: benzeno/acetato de etila/metanol 55:35:10. Revelador: ácido sulfúrico 10%.

Tabela 12 - Balanço de massas das subfrações da F.4.1 após serem reunidas.

SUBFRAÇÃO	MASSA (mg)	% (m/m) da F.4.1
1-17	3,1	0,75
18-23	16,7	4,1
24-25	26,7	6,7
26-27	69,8	17,5
28-29	3,2	0,8
30-31	148,4	37,1
32	22,8	5,7
33-34	34,4	8,6
36-120	64,4	16,1
Total	389,5	97,35

As subfrações F.4.1.18, F.4.1.24 e F.4.1.30 foram analisadas por CLAE-UV (Figura 20), já se encontravam semipurificadas e adequadas para a purificação final por CLAE-UV preparativa.

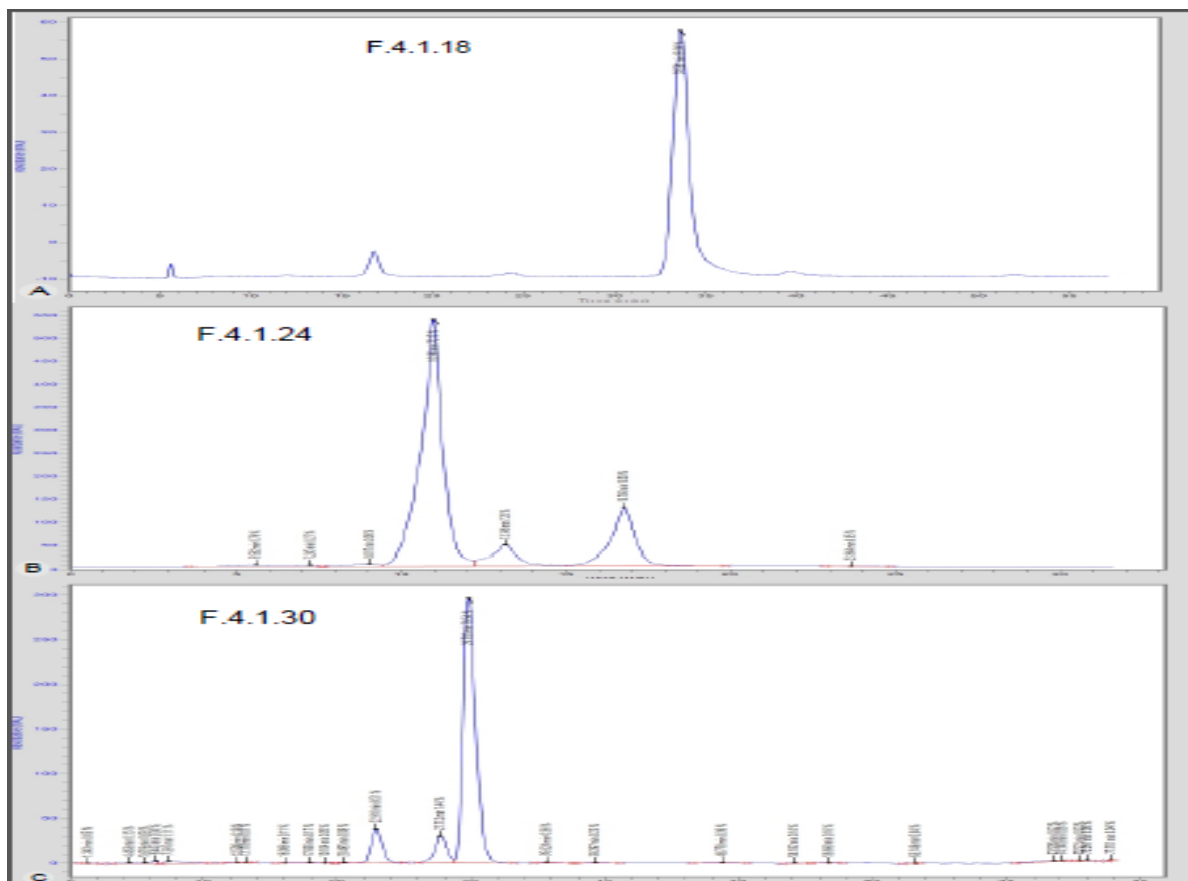


Figura 20 - Cromatogramas em CLAE-UV das subfrações: A: 4.1.18, B: 4.1.24 e C: 4.1.30 (1,0 mg/mL, MeOH). Condições de análises: A: 68 % de metanol de 0-55 min.; vazão de 0,4 mL/min; detector com comprimento de onda em 254 nm.; B: 67% de metanol de 0-35 min. vazão de 0,4 mL/min; detector com comprimento de onda em 254 nm.; C: 83% de metanol de 0-78 min.; vazão de 0,4 mL/min; $\lambda_{\text{máx}}=254$ nm.

5.2.2 Purificação de metabólitos secundários por CLAE-UV preparativa

Após a separação por CLAEprep foram obtidas 4 substâncias, sendo 3 com mais de 95 % de pureza no UV (254 nm) como observado nos cromatogramas da Figura 21. Duas substâncias foram obtidas da subfração 4.1.30 as quais apresentaram 97,3% (4,8 mg) e 96,0 % (30,0 mg) de pureza, respectivamente. Já para as subfrações 4.1.18 e 4.1.24 foi obtida apenas uma substância de cada com 91,0% (1,6 mg) e 97,9% (7,1 mg) de pureza, respectivamente.

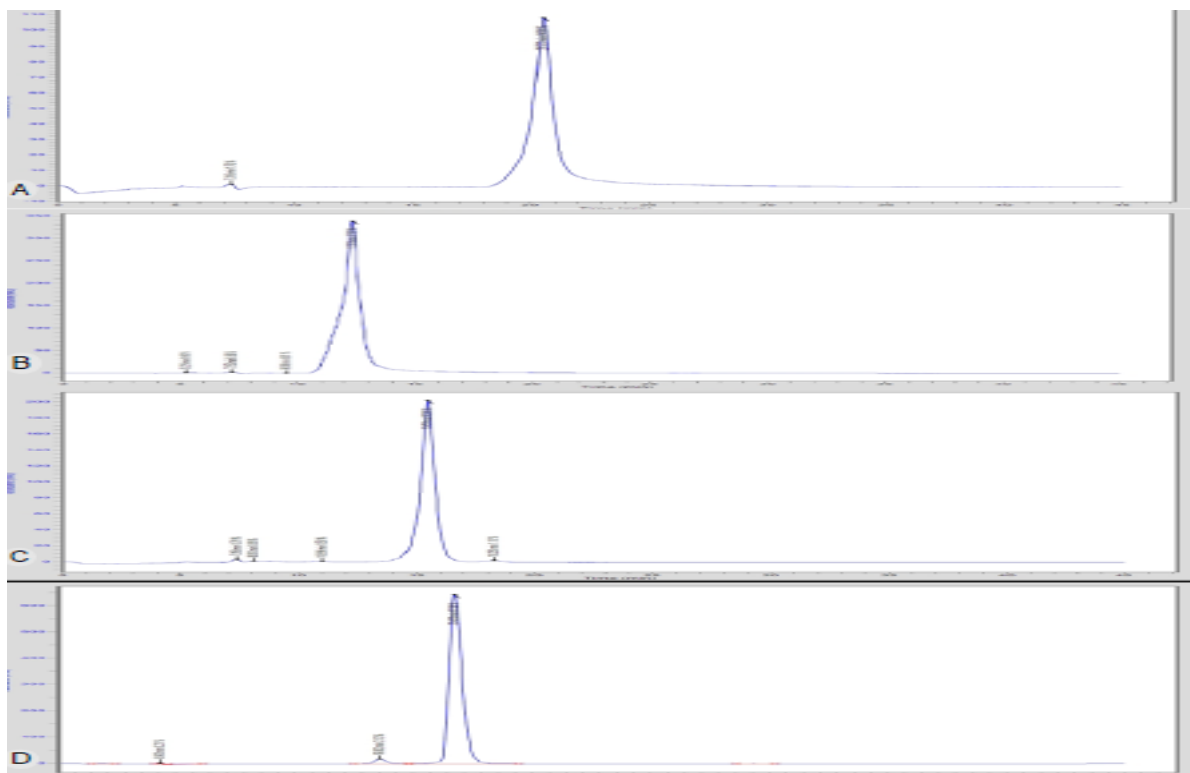


Figura 21 - Cromatogramas em CLAE-UV de substâncias purificadas das subfrações F.4.1.18, F.4.1.24 e F.4.1.30. A: Substância com 91,0% de pureza isolada da F.4.1.18; B: Substância com 97,9% de pureza isolada da F.4.1.24; C: Substância com 96,0% de pureza isolada da F.4.1.30 e D: Substância com 97,3% de pureza isolada da F.4.1.30. Condições de análise: Concentração de 1,0 mg/mL em metanol. Condições cromatográficas – coluna Ace® C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m); volume de injeção: 20 μ L; $\lambda_{\text{máx}}$ = 254 nm; vazão de 0,4 mL/min; fase móvel (modo isocrático): A - 68 % de metanol por 55 min; B: 67% de metanol por 35 min; C e D: 83% de metanol por 78 min.

5.2.3 Determinação estrutural da cordialina A obtida da subfração F.4.1.30

A análise dos dados espectrométricos (Figuras 22 a 27 e Tabelas 13 e 14) obtidos e sua comparação com dados da literatura (VELDE et al., 1982) permitiram identificar a substância purificada a partir da subfração F.4.1.30 como cordialina A (Figura 24), um triterpeno do tipo damarano previamente isolado de folhas de *C. verbenacea*. A cordialina A foi purificada como um pó branco.

A banda de absorção no UV com $\lambda_{\text{máx}}$ = 255 nm é consistente com a presença de uma cetona α,β -insaturada como a que apresenta a cordialina A em sua cadeia lateral (Figura 24). As bandas de absorção observadas no IV são coerentes com a presença dos grupos hidroxila (3.452 e 1.065 cm^{-1}), cetona (1.670 e 1.239 cm^{-1}), éter (1.065 cm^{-1}) e com a dupla ligação trissubstituída (1.600 e 805 cm^{-1}) na estrutura química da cordialina A (Figura 24 e Tabela 14).

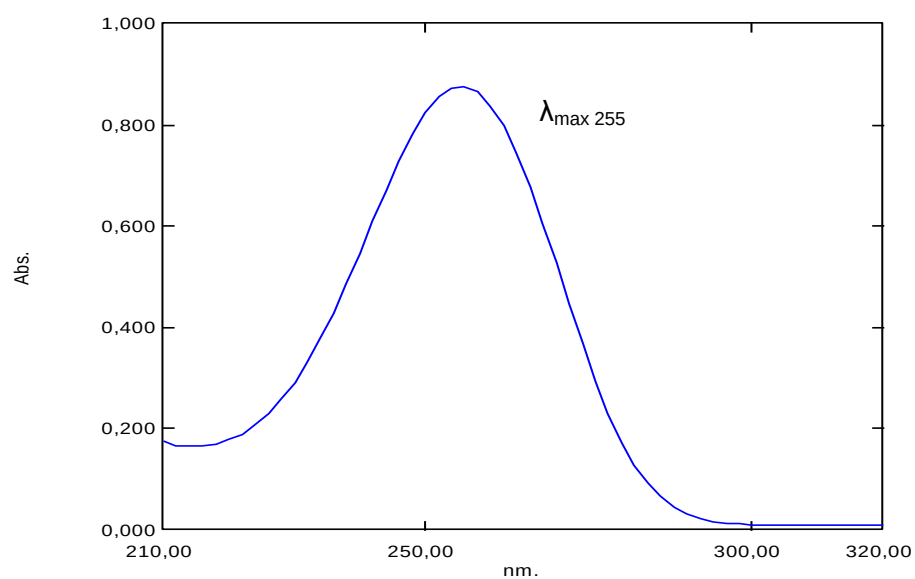


Figura 22 - Espectro no UV da cordialina A (0,0375 mg/mL, metanol).

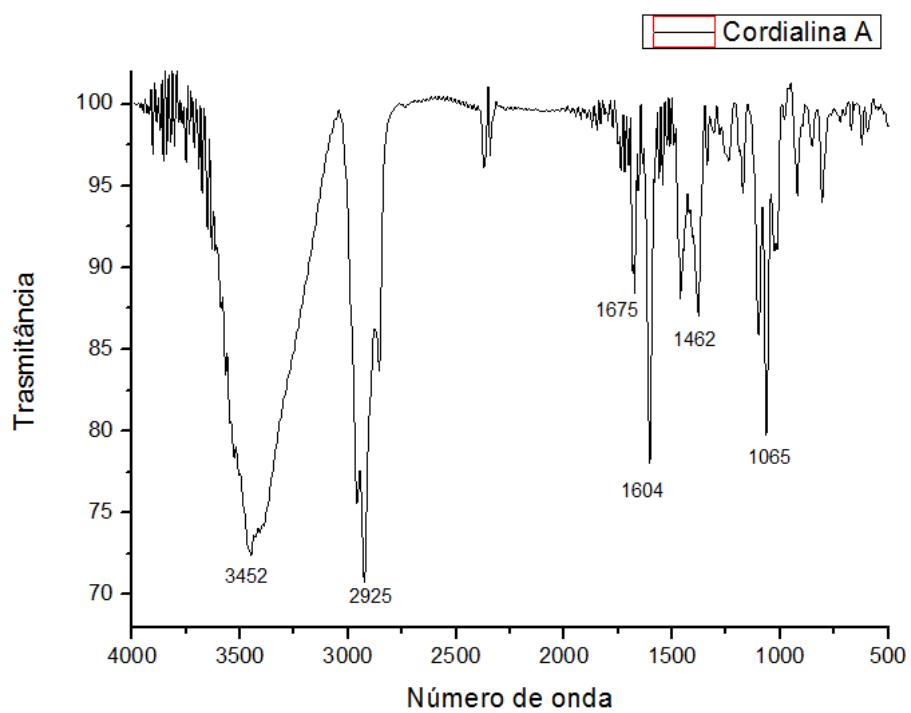


Figura 23 - Espectro de absorção no IV da cordialina A (KBr).

Tabela 13 - Bandas de absorção no IV de cordialina A.

Cordialina A cm^{-1}	Literatura cm^{-1}	Atribuições
3452	3400	** $\nu_{\text{S}} \text{—O—H}$
2955	2962	** $\nu_{\text{ass}} \text{—C—CH}_3$
2925	2914	** $\nu_{\text{S}} \text{—C—CH}_2$
2855	2854	** $\nu_{\text{S}} \text{—C—CH}_2$
1675	1670	* $\nu_{\text{S}} \text{C=O}$
1604	1600	* $\nu_{\text{S}} \text{C=C}$
1462	1460	** $\delta_{\text{ass}} \text{—C—CH}_3$
1379	1375	** $\delta_{\text{S}} \text{—C—CH}_3$
1239	1250	** $\nu_{\text{S}} \text{C-C(=O)-C}$
1100	1300-1100	** $\nu_{\text{S}} \text{C-C(=O)-C}$
1065	1070	** $\nu_{\text{S}} (\text{C-O})$
805	810	** $\nu_{\text{S}} \text{C-C=C-H}$ trissubstituído

* (VELDE & LAVIE, 1982); ** (SILVERSTEIN et al., 2005)

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou 30 sinais (Tabela 14) com valores praticamente idênticos aos relatados para a cordialina A por Velde et al. (1982). A análise dos sinais obtidos no espectro de RMN de ^1H , bem como das correlações observadas nos mapas de contorno HSQC, COSY, HMBC e NOE1D (Tabela 14 e Anexos 11 a 14) foram consistentes com a estrutura química proposta. Alguns hidrogênios que não tiveram seus sinais no espectro de RMN de ^1H atribuídos no artigo de Velde et al. (1982) foram atribuídos neste trabalho (Tabela 14) a partir dos dados do mapa de contornos HSQC, da observação das multiplicidades dos sinais e dos de valores de J . A configuração *E* da ligação dupla em C-22 foi confirmada com base no efeito nuclear Overhauser (espectro NOE1D, Anexo 15) observado entre H-22 (δ 6,27 s) e H-24 (δ 3,33 s) e H-17 (δ 2,38 td; 10,5 e 5,7 Hz).

Tabela 14 - Dados espectrométricos de RMN obtidos para a cordialina A a 300 MHz para ^1H e a 75 MHz para ^{13}C em CDCl_3 .

C	$\delta^{13}\text{C}^1$	$\delta^1\text{H J (Hz)}^1$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H J (Hz)}$	HMBC	COSY
1	29,8 <i>t</i>	3,12 <i>td</i> (12,5; 6,0)	30,0 <i>t</i>	3,11 <i>td</i> (12,7; 5,9)	----	1,67; 2,11
2	37,8 <i>t</i>	nd ²	37,9 <i>t</i>	nd	----	----
3	98,7 <i>s</i>	----	98,6 <i>s</i>	----	0,95; 1,01	----
4	36,1 <i>s</i>	----	36,1 <i>s</i>	----	4,15	----
5	50,9 <i>d</i>	nd	50,9 <i>d</i>	1,31 <i>dl</i> (3,3)	4,15	----
6	19,4 <i>t</i>	nd	19,4 <i>t</i>	1,67 <i>dd</i> (12,3; 3,3) 1,48 <i>m</i>	----	1,31; 3,11
7	34,3 <i>t</i>	nd	34,4 <i>t</i>	nd	0,95	----
8	39,9 <i>s</i>	----	39,9 <i>s</i>	----	0,95; 1,56; 1,48	----
9	50,0 <i>d</i>	nd	50,1 <i>d</i>	1,56 <i>d</i> (11,0)	----	----
10	41,0 <i>s</i>	nd	41,0 <i>s</i>	nd	1,00; 0,95; 0,90	----
11	70,5 <i>d</i>	3,65 <i>td</i> (10,5; 4,2)	70,8 <i>d</i>	3,65 <i>td</i> (11,0; 3,9)	----	----
12	36,9 <i>t</i>	nd	37,2 <i>t</i>	1,85 <i>td</i> (11,2; 3,9)	----	2,38
13	44,8 <i>d</i>	nd	44,7 <i>d</i>	nd	0,95	----
14	49,0 <i>s</i>	----	49,0 <i>s</i>	----	0,95	----
15	31,7 <i>t</i>	nd	31,7 <i>t</i>	nd	0,95	----
16	27,9 <i>t</i>	nd	27,8 <i>t</i>	nd	----	----
17	51,5 <i>d</i>	2,40 <i>td</i> (11,0; 6,0)	51,4 <i>d</i>	2,38 <i>td</i> (10,5; 5,7)	----	1,85
18	15,4 <i>q</i>	0,95 <i>s</i>	15,4 <i>q</i>	0,95 <i>s</i>	----	----
19	67,8 <i>t</i>	$\alpha\text{-H}$ 4,15 <i>dd</i> (8,5; 0,7) $\beta\text{-H}$ 4,32 <i>dd</i> (8,5; 2,0)	67,9 <i>t</i>	4,15 <i>dd</i> (8,5; 1,0) 4,31 <i>dd</i> (8,5; 2,5)	----	----
20	164,8 <i>s</i>	----	164,6 <i>s</i>	----	2,11	----
21	17,3 <i>q</i>	2,12 <i>sl</i>	17,3 <i>q</i>	2,11 <i>sl</i>	6,27	6,27; 3,11
22	120,4 <i>d</i>	6,28 <i>sl</i>	120,5 <i>d</i>	6,27 <i>sl</i>	2,11	----
23	195,7 <i>s</i>	----	195,7 <i>s</i>	----	6,27; 3,33; 2,11	----
24	66,4 <i>d</i>	3,34 <i>s</i>	66,4 <i>d</i>	3,33 <i>s</i>	1,42; 1,26	1,26
25	61,2 <i>s</i>	----	61,2 <i>d</i>	----	3,33; 1,42; 1,26	----
26	24,9 <i>q</i>	1,42 <i>s</i>	25,0 <i>d</i>	1,42 <i>s</i>	3,33; 1,26	----
27	18,6 <i>q</i>	1,27 <i>s</i>	18,7 <i>q</i>	1,26 <i>s</i>	1,42	3,33
28	26,4 <i>q</i>	1,03 <i>s</i>	26,4 <i>q</i>	1,03 <i>s</i>	----	1,85
29	18,8 <i>q</i>	1,01 <i>s</i>	18,9 <i>q</i>	1,00 <i>s</i>	----	----
30	16,8 <i>q</i>	0,90 <i>s</i>	16,9 <i>q</i>	0,90 <i>s</i>	----	----

Dados da Literatura: ¹VELDE & LAVIE, 1982, ²nd: não determinado

A determinação da estrutura química da cordialina A (Figura 21) foi obtida através dos dados espectrométricos apresentados acima.

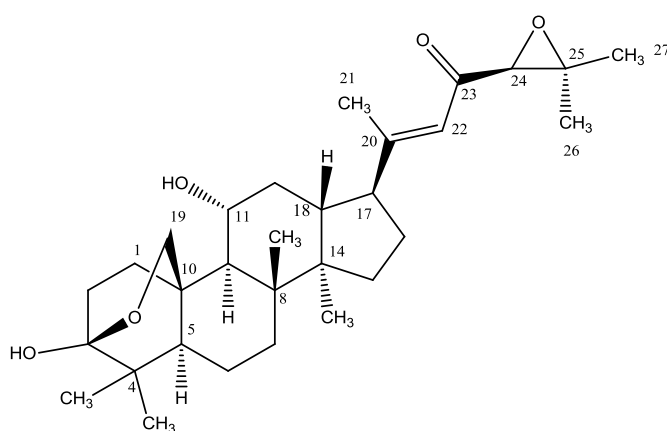


Figura 24 - Estrutura química de cordialina A.

Figura 25 - Espectro de RMN de ^1H de cordialina A obtido a 300 MHz em CDCl_3 (10 mg/mL).

Figura 26 - Expansão do espectro de RMN de ^1H de cordialina A obtido a 300 MHz em CDCl_3 (10 mg/mL).

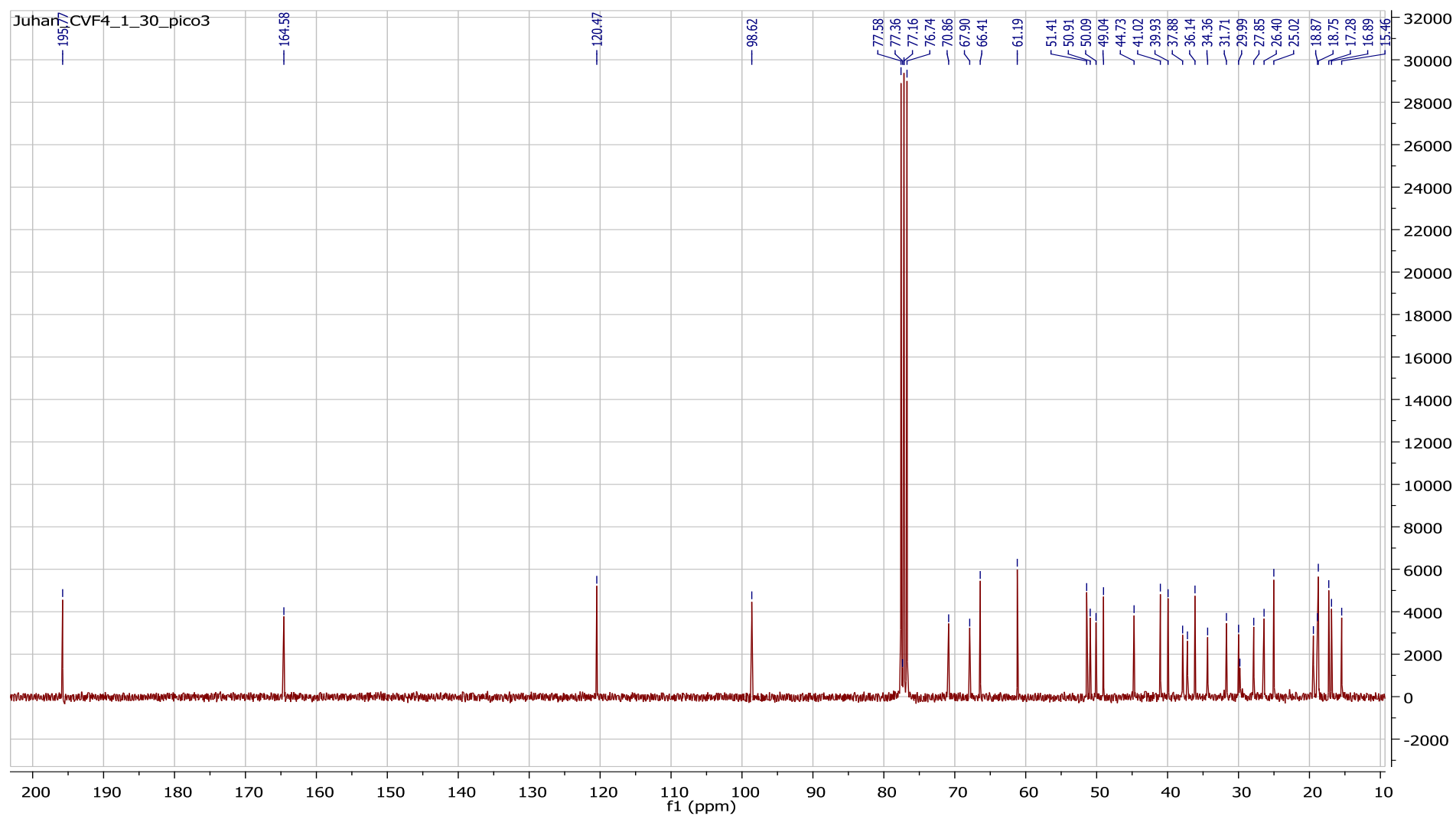


Figura 27 - Espectro de RMN de ^{13}C de cordialina A obtido a 75 MHz em CDCl_3 (25 mg/mL).

5.2.4 Triterpeno identificado como *cis*-cordialina A obtido da subfração F.4.1.30

Outro triterpeno isolado (pó branco) teve sua estrutura química determinada a partir dos dados dos espectros de RMN unidimensionais de ^1H e ^{13}C e dos mapas de contorno bidimensionais HMBC, COSY e HSCQ obtidos a 300 MHz para ^1H e a 75 MHz para ^{13}C (Figuras 27, 28, 29 e anexos 15, 16). Os espectros no UV e IV (Figuras 28 e 29) apresentaram bandas semelhantes às da cordialina A.

A banda de absorção no UV com $\lambda_{\text{máx}} = 256 \text{ nm}$ é consistente com a presença de uma cetona α,β -insaturada como a que apresenta a *cis*-cordialina A em sua cadeia lateral. As bandas de absorção observadas no IV são coerentes com a presença dos grupos hidroxila (3.52 cm^{-1}), cetona (1.690 cm^{-1}) e com a dupla ligação trissubstituída (907 cm^{-1}) na estrutura química da cordialina A

Os dados de RMN de ^{13}C obtidos também foram muito semelhantes aos da cordialina A, sendo que para o núcleo damarano foram quase idênticos. Diferenças nos valores de δ_{C} e δ_{H} foram observadas nas posições 17, 21 e 22, o que sugeriu uma modificação na configuração da ligação dupla em C-20. No caso deste triterpeno, a configuração *E* da ligação dupla em C-20 foi confirmada com base no efeito nuclear Overhauser (espectro NOE1D, Anexo 17) observado entre H-22 (δ 6,29 d; 1,1 Hz) e H-21 (δ 1,87 d; 1,0 Hz). A *cis*-cordialina A é uma substância inédita na literatura científica.

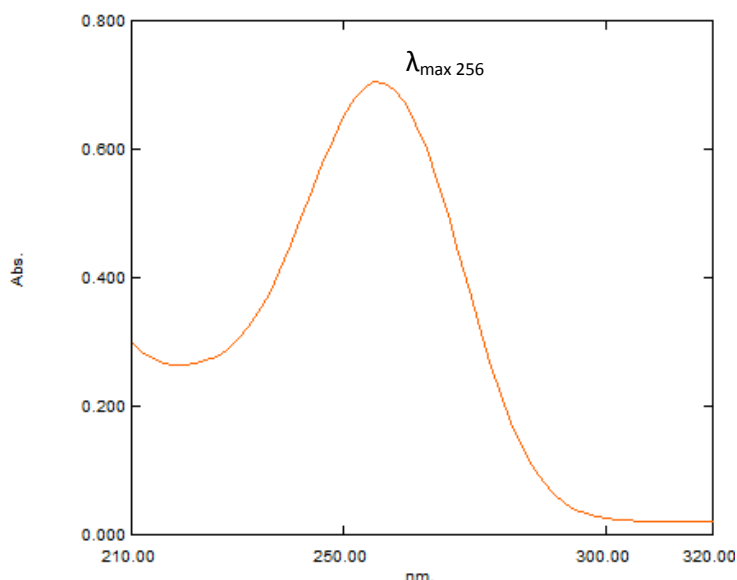


Figura 28 - Espectro UV de substância purificada da subfração F.4.1.30 pico 1 (0,05 mg mL⁻¹, metanol).

O espectro do IV é verificado na Figura 29 e os dados de RMN encontram-se na Tabela 15 a qual apresenta os carbonos já identificados e os que ainda faltam ser relacionados a

molécula, além de suas correlações com os hidrogênios. Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , HMBC e HSCQ, da *cis*-cordialina A são demonstrados nas Figuras 31, 32, 33 e anexos 15, 16.

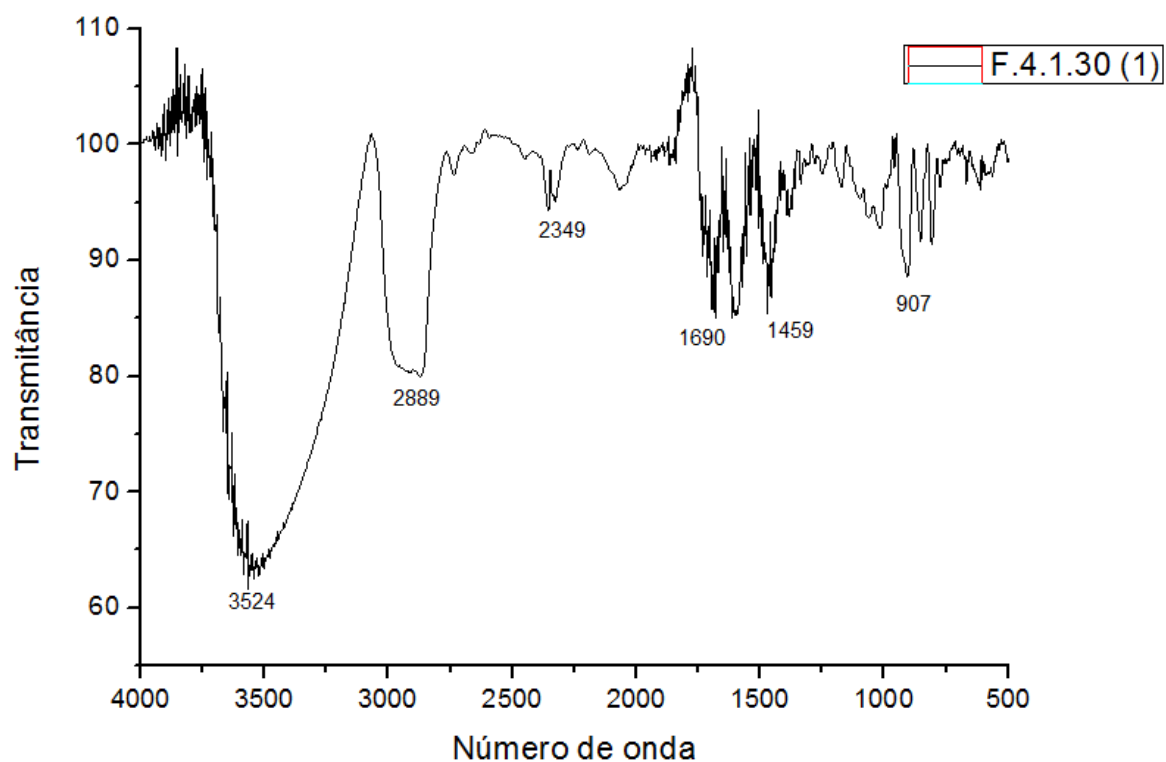


Figura 29 - Espectro de absorção no IV da *cis*-cordialina A (KBr).

Tabela 15 - Dados espectrométricos de RMN obtidos para a *cis*-cordialina A a 300 MHz para ^1H e a 75 MHz para ^{13}C , em CDCl_3 .

C	$\delta^{13}\text{C}^1$	$\delta^1\text{H J (Hz)}^1$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H J (Hz)}$	HMBC
1	30,0 <i>t</i>	3,11 <i>td</i> (12,7; 5,9)	30,1 <i>t</i>	2,15 <i>m</i>	----
2	37,9 <i>t</i>	nd	37,9 <i>t</i>	nd	----
3	98,6 <i>s</i>	----	98,5 <i>s</i>	----	1,05; 1,02
4	36,1 <i>s</i>	----	36,1 <i>s</i>	----	----
5	50,9 <i>d</i>	1,31 <i>dl</i> (3,3)	50,9 <i>d</i>	nd	----
6	19,4 <i>t</i>	1,67 <i>dd</i> (12,3; 3,3) 1,48 <i>m</i>	19,5 <i>t</i>	nd	----
7	34,4 <i>t</i>	nd	34,4 <i>t</i>	nd	0,95
8	39,9 <i>s</i>	----	40,0 <i>s</i>	----	----
9	50,1 <i>d</i>	1,56 <i>d</i> (11,0)	50,3 <i>d</i>	1,59 <i>s</i>	1,05
10	41,0 <i>s</i>	nd	41,0 <i>s</i>	nd	1,05
11	70,8 <i>d</i>	3,65 <i>td</i> (11,0; 3,9)	71,2 <i>d</i>	3,61 <i>td</i> (10,6; 4,1)	----
12	37,2 <i>t</i>	1,85 <i>td</i> (11,2; 3,9)	37,3 <i>t</i>	3,12 <i>td</i> (13,4; 5,8)	----
13	44,7 <i>d</i>	nd	41,6 <i>d</i>	4,12 <i>d</i> (7,0)	1,86
14	49,0 <i>s</i>	----	49,1 <i>s</i>	----	0,95
15	31,7 <i>t</i>	nd	31,7 <i>t</i>	nd	0,96
16	27,8 <i>t</i>	nd	27,0 <i>t</i>	nd	----
17	51,4 <i>d</i>	2,38 <i>td</i> (10,5; 5,7)	45,0	1,84 <i>m</i>	0,95
18	15,4 <i>q</i>	0,95 <i>s</i>	15,5 <i>q</i>	0,95 <i>s</i>	----
19	67,9 <i>t</i>	4,15 <i>dd</i> (8,5; 1,0) 4,31 <i>dd</i> (8,5; 2,5)	68,0 <i>t</i>	4,17 <i>dd</i> (8,5; 1,2) 4,31 <i>dd</i> (8,5; 2,4)	----
20	164,6 <i>s</i>	----	164,3	----	3,33; 1,25
21	17,3 <i>q</i>	2,11 <i>sl</i>	20,8	1,87 <i>d</i> (1,0)	----
22	120,5 <i>d</i>	6,27 <i>sl</i>	122,9	6,29 <i>d</i> (1,1)	1,87
23	195,7 <i>s</i>	----	195,3	---	6,29; 3,33
24	66,4 <i>d</i>	3,33 <i>s</i>	66,5	3,33 <i>s</i>	1,41; 1,25
25	61,2 <i>d</i>	----	61,1	----	3,33; 1,41; 1,25
26	25,0 <i>d</i>	1,42 <i>s</i>	25,0	1,42 <i>s</i>	0,95
27	18,7 <i>q</i>	1,26 <i>s</i>	18,9	1,01 <i>s</i>	1,05
28	26,4 <i>q</i>	1,03 <i>s</i>	26,4 <i>q</i>	1,02 <i>s</i>	----
29	18,9 <i>q</i>	1,00 <i>s</i>	18,7 <i>q</i>	1,25 <i>s</i>	----
30	16,9 <i>q</i>	0,90 <i>s</i>	16,9 <i>q</i>	0,94 <i>s</i>	----

¹Dados da de RMN de ¹³C e ¹H obtidos para a cordialina A (Tabela 11). ²nd: não determinado.

A determinação da estrutura química do triterpeno isolado foi obtida com os dados apresentados acima (Figura 30), sendo a metila (C-21) vista na posição *cis*, ocasionando assim um valor diferente ao C-17 em relação a C-17 da cordialina A.

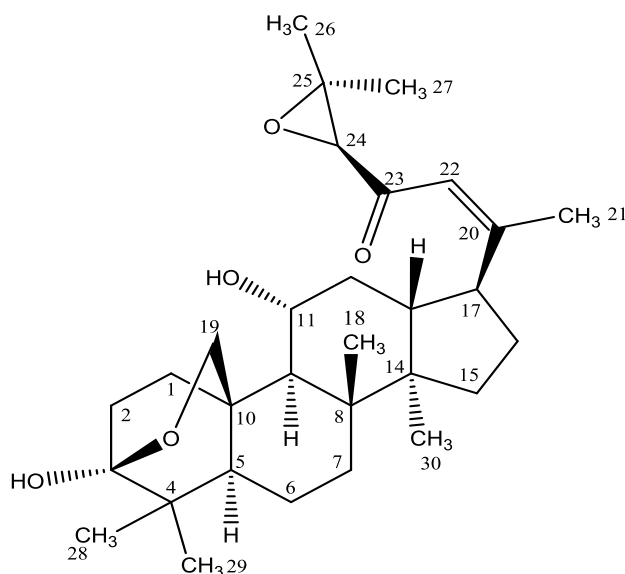


Figura 30 - Estrutura química da cis-cordialina A

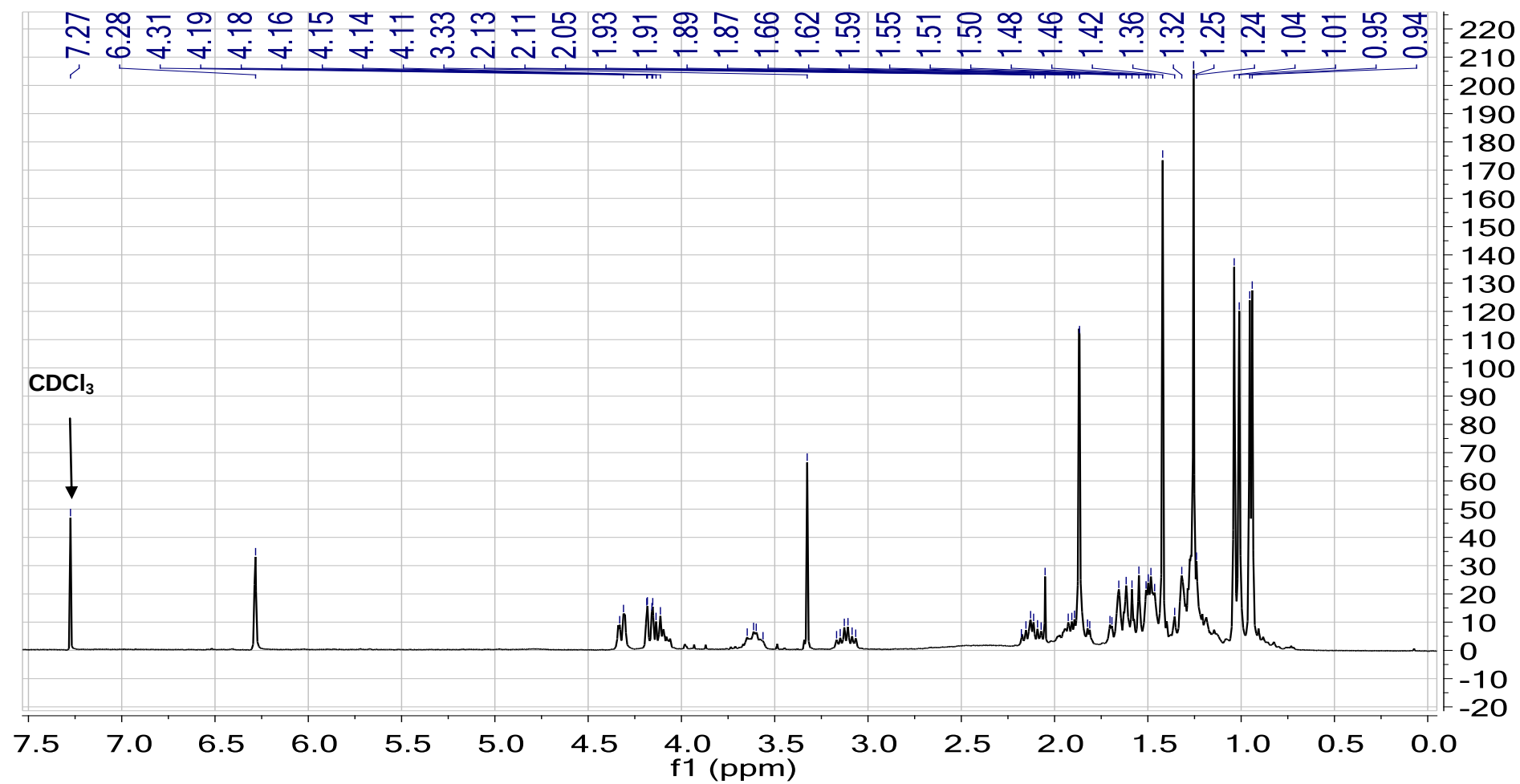


Figura 31 - Espectro de RMN de ¹H da *cis*-cordialina A obtido a 300 MHz em CDCl₃ (18 mg/mL).

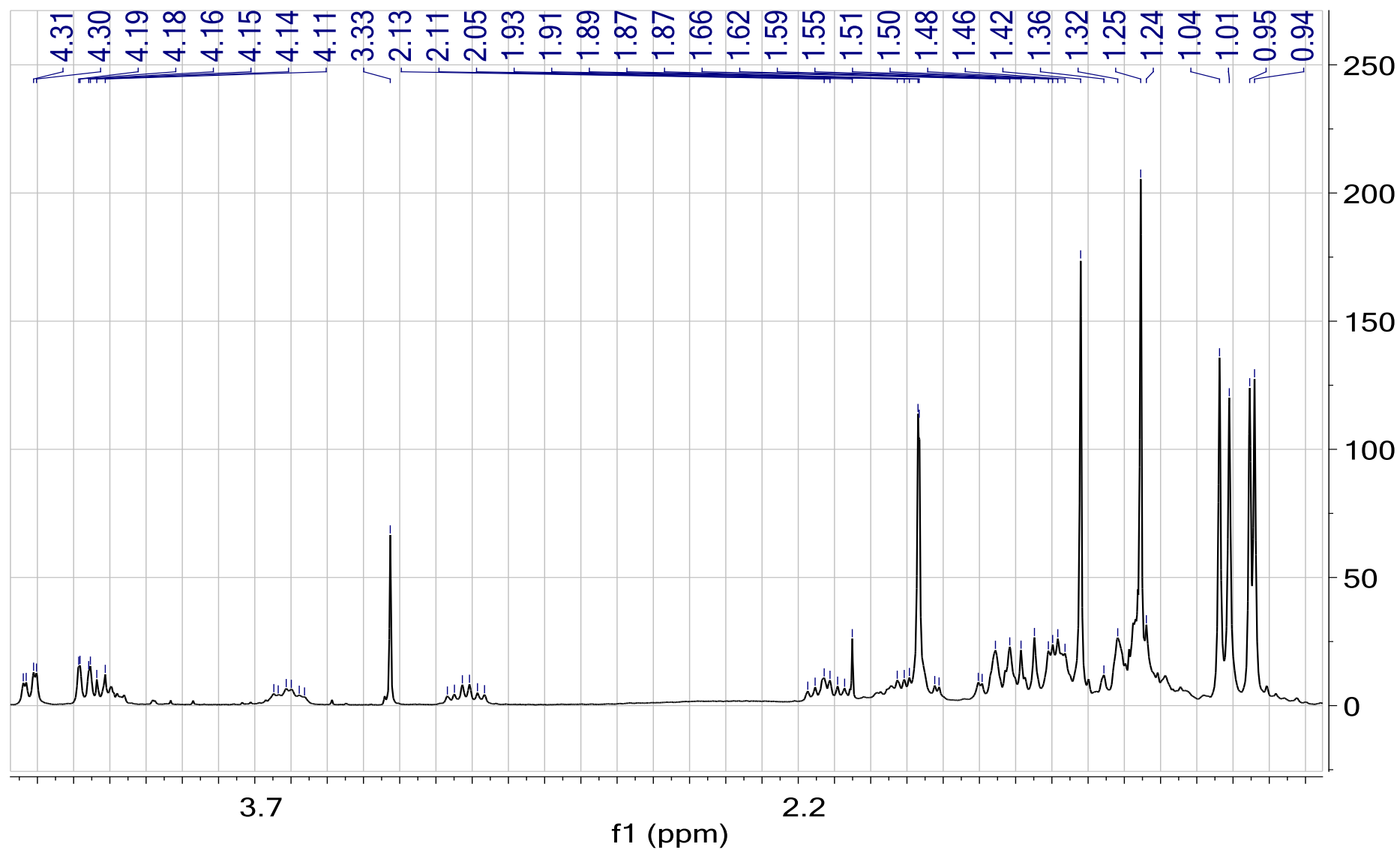


Figura 32 – Expansão do espectro de RMN de ^1H da *cis*-cordialina A obtido a 300 MHz em CDCl_3 (18 mg/mL).

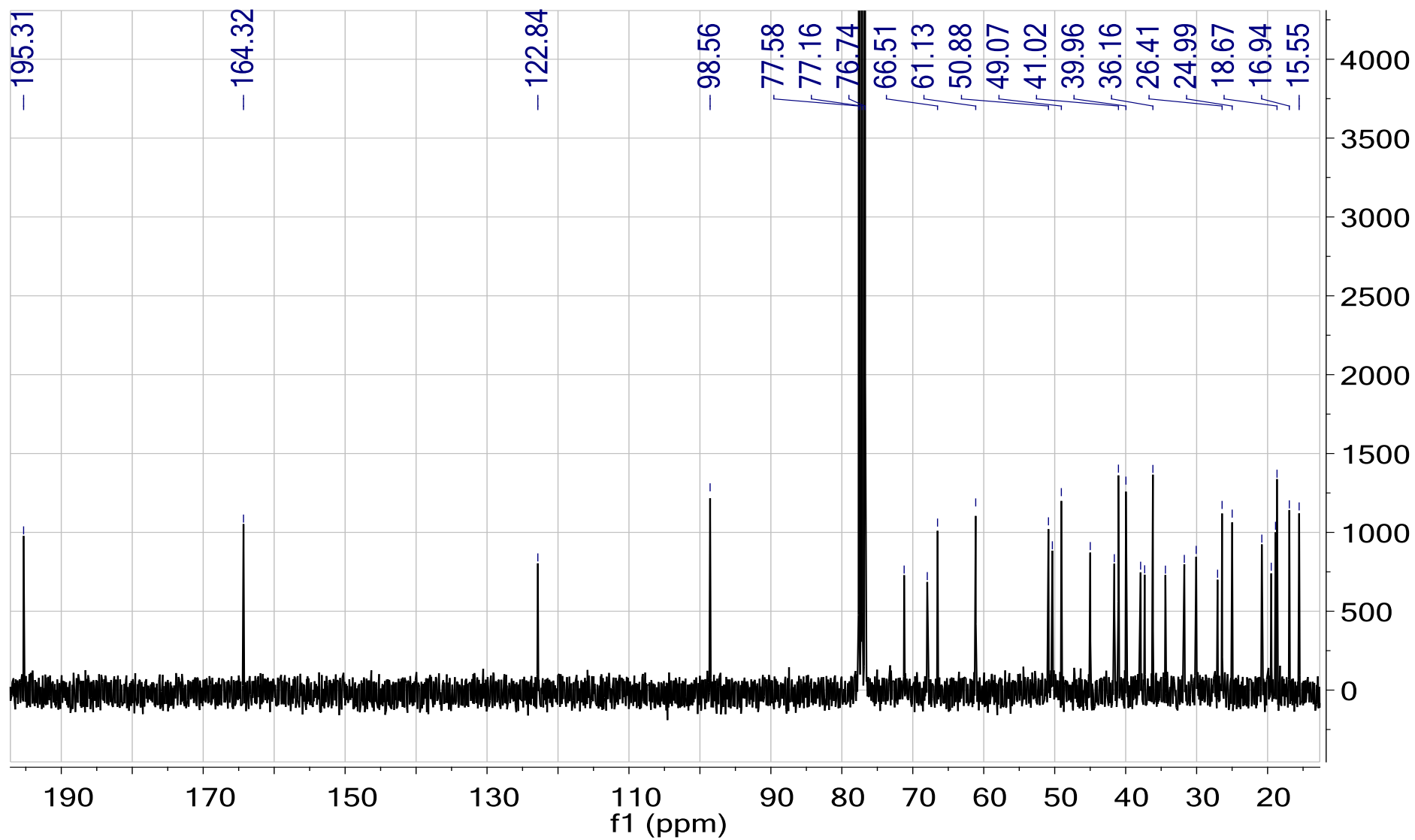


Figura 33 - Espectro de RMN de ^{13}C da *cis*-cordialina A obtido a 75 MHz em CDCl_3 (18 mg/mL).

5.2.5 Determinação estrutural da substância purificada obtida da subfração F.4.1.24 (Pico 1) - diidroxipentametoxiflavona

A diidroxipentametoxiflavona foi purificada como um pó amarelo. A análise do seu espectro no UV/Vis (Figura 34) corrobora com a sugestão de uma flavona (Figura 32), caracterizada pela presença de duas bandas com valores de $\lambda_{\text{máx}}$ de 260 e 346 nm. As flavonas possuem 2 bandas majoritárias de absorção no UV na região compreendida entre 240-400 nm. A faixa de 300-380 nm refere-se à banda I, associada à absorção do anel B ou sistema cinamoil (Figura 35). Enquanto isto, a banda II (240-280 nm) envolve a absorção do anel A ou sistema benzoil, de acordo com Mabry et al. (1970).

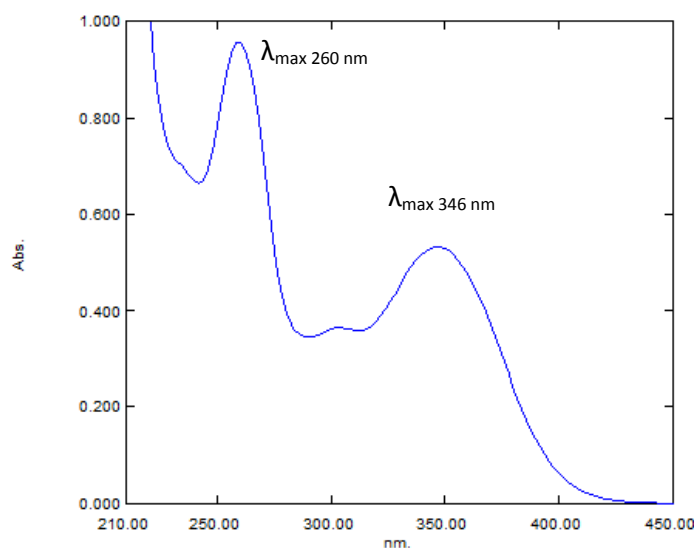


Figura 34 - Espectro no UV da 4',5-diidroxí-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona ou ou 2',5-diidroxí-4',3,5',6,7-pentametoxiflavona ($0,0125 \text{ mg mL}^{-1}$, metanol).

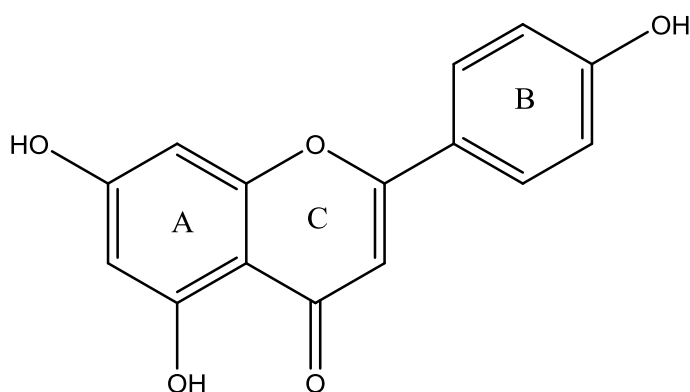


Figura 35 - Estrutura química das flavonas.

Os dados da análise por IV (Figura 36) estão descritos na Tabela 16. Foram observadas bandas de absorção em regiões referentes a deformações de ligações de grupos hidroxila, éter carbonila, além de ligações duplas (alceno e aromática) na molécula, coerentes com a estrutura química da 4',5-diidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona ou 2',5-diidroxi-4',3,5',6,7-pentametoxiflavona.

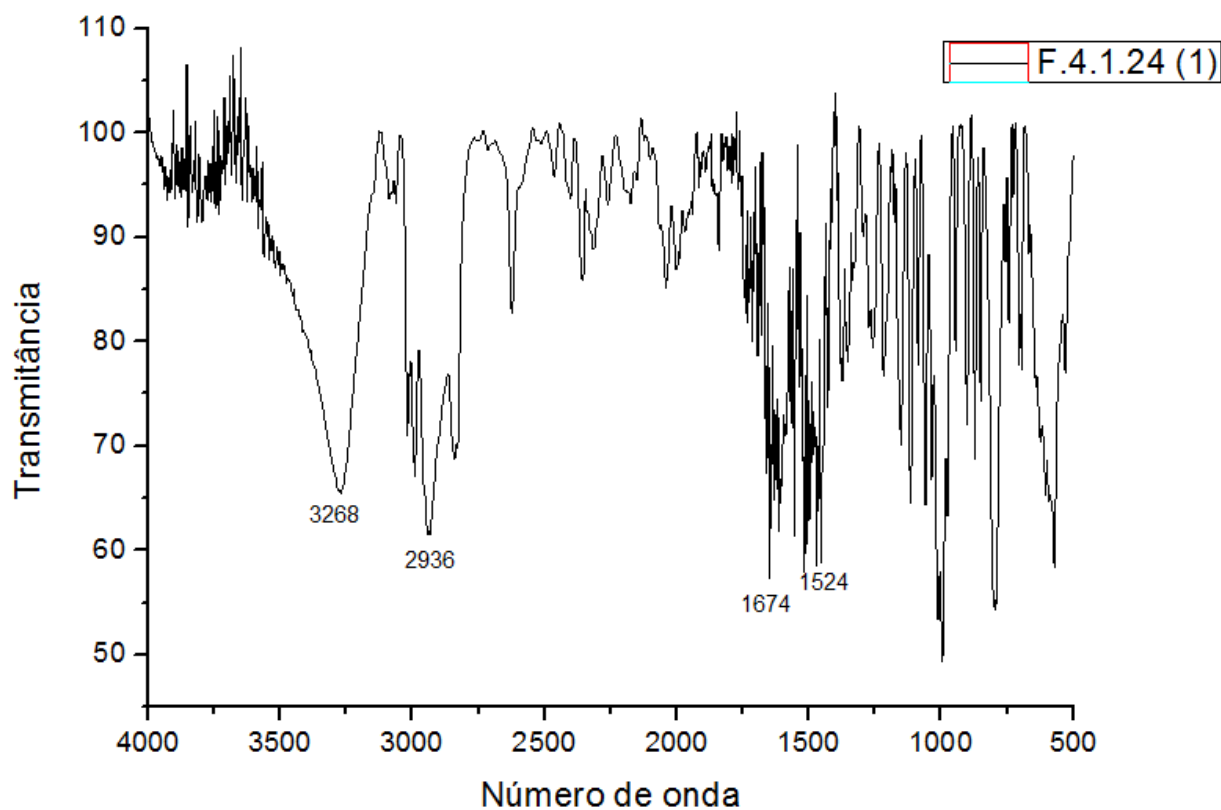


Figura 36 - Espectro de absorção no IV da 4',5-diidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona ou 2',5-diidroxi-4',3,5',6,7-pentametoxiflavona (pastilha de KBr).

Tabela 16 - Bandas de absorção no IV da 4',5-diidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona ou 2',5-diidroxi-4',3,5',6,7-pentametoxiflavona.

Cordialina A cm^{-1}	Literatura cm^{-1}	Atribuições ¹
3268	3244	ν_s O-H
3073	3052	ν_s C-H de aromáticos
2936	2914	ν_s C-H
2842	2900	ν_s aromáticos
1674	1600-1800	ν_s C=O
1524	1600	ν_s C=C
1121	1100-1300	ν_s C-C(=O)-C
1055	1070	ν_s C-O

¹(SILVERSTEIN et al., 2005)

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 40) mostrou 20 sinais, o que é coerente com um esqueleto de um flavonoide – núcleo fundamental $\text{C}_6\text{C}_3\text{C}_6$ – pentametoxilado.

Os sinais observados nos espectros de RMN (Tabela 17) em δ 62,3 *q*, 61,0 *q*, 56,2 *q*, 56,5 *q* e 56,8 *q* para ^{13}C e 3,88 *s*, 3,92 *s*, 3,93 *s*, 3,93 *s* e 3,96 *s* para ^1H (Figura 38 e 39) evidenciaram a presença dos 5 grupos metoxilas. Os sinais com valores de deslocamentos químicos no espectro de RMN de ^{13}C típicos de carbonos aromáticos oxigenados em δ 152,9 *s* e 151,3 *s* foram atribuídos a carbonos ligados a hidroxilas fenólicas; os sinais dos hidrogênios destas duas hidroxilas foram observados em δ 12,37 *s* e 7,89 *s/l*. As posições dos grupos substituintes (5 metoxilas e 2 hidroxilas) nos anéis aromáticos (A e B) foram atribuídas com base na multiplicidade dos hidrogênios remanescentes nos anéis aromáticos (todos singletos), nas correlações obtidas a partir do mapa de contornos HMBC (Anexo 18) e na comparação com dados de RMN de ^{13}C de flavonas polimetoxiladas descritas na literatura (IINUMA et al., 1986). Os sinais com valores de deslocamentos químicos de δ 103,1 *d* e 111,0 *d* observados no espectro de RMN de ^{13}C e em δ 6,62 *s* (1H) e 7,10 *s* (1H) no espectro de RMN de ^1H foram atribuídos às posições 3' e 6' do anel B. Os sinais em δ 6,51 *s* no espectro de RMN de ^1H e em δ 90,8 *d* no espectro de RMN de ^{13}C correspondem ao carbono não substituído do anel A (C8) e seu respectivo hidrogênio (H8). O sinal com valor de deslocamento químico de δ 177,6 *s* no espectro de RMN de ^{13}C mostrou a presença da carbonila e os sinais em δ 136,7 *s* (C3) e 156,1 *s* (C2) são referentes à ligação dupla no anel C. A tabela 13 traz dados espectrométricos obtidos para a 4',5-diidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona ou 2',5-diidroxi-4',3,5',6,7-pentametoxiflavona a 300 MHz para ^1H e 75 MHz para ^{13}C .

Tabela 17 - Dados espectrométricos de RMN obtidos para a 4',5-diidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona ou 2',5-diidroxi-4',3,5',6,7-pentametoxiflavona a 300 MHz para ^1H e a 75 MHz para ^{13}C em CDCl_3 .

C	$\delta^{13}\text{C}^1$	$\delta^1\text{H J (Hz)}^1$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H J (Hz)}$	HMBC
2	155,4 <i>s</i>	----	156,1 <i>s</i>	----	7,1
3	140,4 <i>s</i>	----	136,7 <i>s</i>	----	3,88
4	179,0 <i>s</i>	----	177,6 <i>s</i>	----	6,51
5	153,0 <i>s</i>	----	152,9 <i>s</i>	----	3,92; 6,51; 12,37
6	132,6 <i>s</i>	----	132,6 <i>s</i>	----	3,92; 6,51; 12,37
7	158,7 <i>s</i>	----	159,2 <i>s</i>	----	3,96; 6,51
8	90,6 <i>d</i>	6,67 <i>s</i>	90,8 <i>d</i>	6,51 <i>s</i> (1H)	----
9	155,4 <i>s</i>	----	153,0 <i>s</i>	----	6,51
10	113,1 <i>s</i>	----	106,5 <i>s</i>	----	6,51; 12,37
1'	107,1 <i>s</i>	----	108,8 <i>s</i>	----	6,62; 7,10
2'	152,9 <i>s</i>	----	154,0 <i>s</i>	----	6,62; 7,10
3'	99,9 <i>d</i>	6,43 <i>s</i>	103,1 <i>d</i>	6,62 <i>s</i> (1H)	----
4'	152,9 <i>s</i>	----	151,3 <i>s</i>	----	6,62; 7,10
5'	140,4 <i>s</i>	----	143,7 <i>s</i>	----	3,93; 6,62; 7,1
6'	110,2 <i>d</i>	6,94 <i>s</i>	111,0 <i>d</i>	7,10 <i>s</i> (1H)	----
OMe	60,9 <i>q</i>	3,79 <i>s</i>	62,3 <i>q</i>	3,88 <i>s</i> (3H)	----
OMe	60,6 <i>q</i>	3,80 <i>s</i>	61,0 <i>q</i>	3,92 <i>s</i> (3H)	----
OMe	56,3 <i>q</i>	3,81 <i>s</i>	56,2 <i>q</i>	3,96 <i>s</i> (3H)	----
OMe	56,4 ou 56,8 <i>q</i>	** nd	56,5 ou 56,8 <i>q</i>	3,93 <i>s</i> (3H)	----
OMe	56,4 ou 56,8 <i>q</i>	nd	56,6 ou 56,8 <i>q</i>	3,93 <i>s</i> (3H)	----
4' ou 2'-OH	----	----	----	7,89 <i>s/l</i> (1H)	----
5-OH	----	----	----	12,36 <i>s</i> (1H)	----

*Dados da Literatura: IINUMA et al, 1986, **nd: não determinado

Estas análises permitiram que fosse identificada a 4',5-diidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona ou 2',5-diidroxi-4',3,5',6,7-pentametoxiflavona (Figura 37), a qual não possui relatos na literatura de isolamento de material vegetal. O único relato encontrado foi no trabalho de linuma e colaboradores (1986), no qual foi sintetizada em laboratório a partir da substância brinckellina, isolada de *Brinckellia veronicaefolia* e *B. chlorolepis* por Roberts e colaboradores (1984).

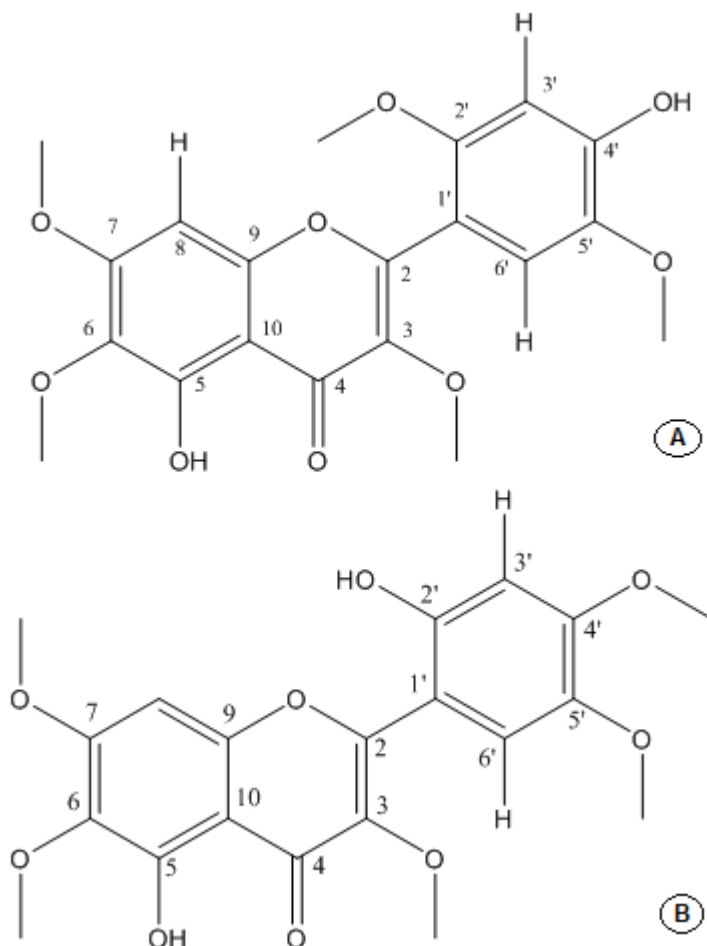


Figura 37 - Estrutura química da 4',5-diidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona (A) ou 2',5-diidroxi-4',3,5',6,7-pentametoxiflavona (B).

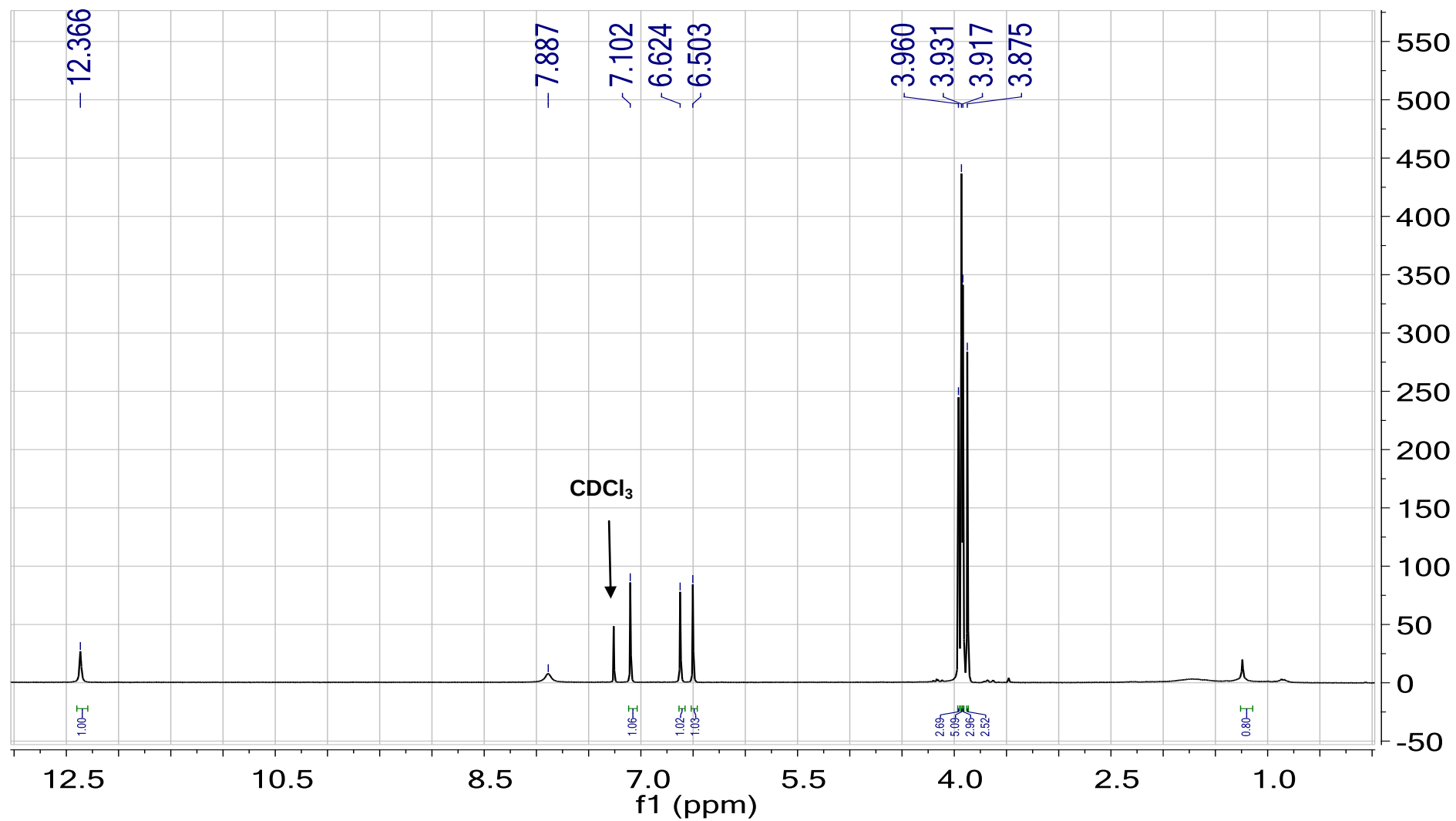


Figura 38 - Espectro de RMN de ¹H de 4',5-dihidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona ou 2',5-dihidroxi-4',3,5',6,7-pentametoxiflavona obtido a 300 MHz em (17 mg/mL)

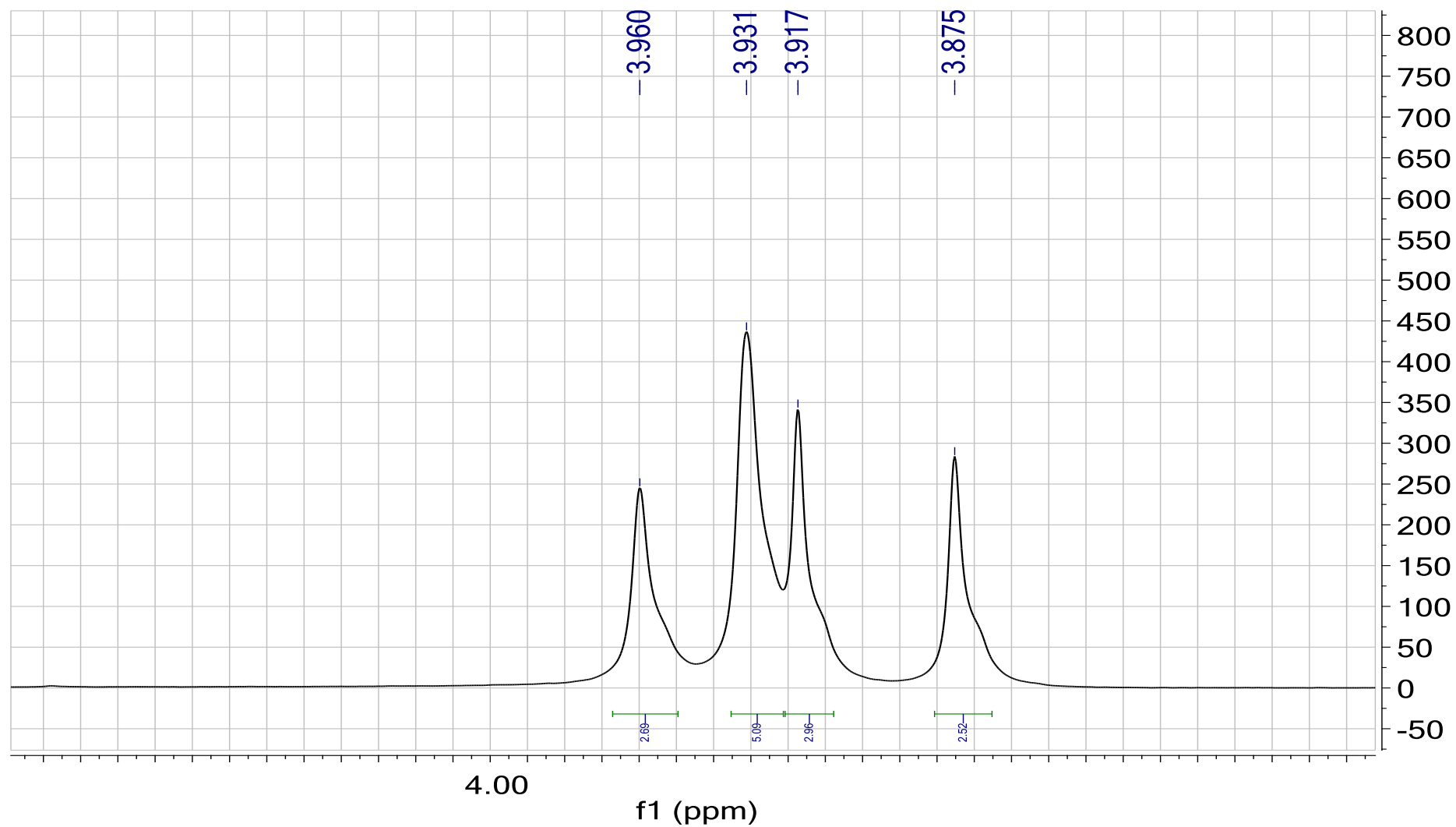


Figura 39 – Expansão do espectro de RMN de ^1H de 4',5-diidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona ou 2',5-diidroxi-4',3,5',6,7-pentametoxiflavona obtido a 300 MHz em CDCl_3 (17 mg/mL)

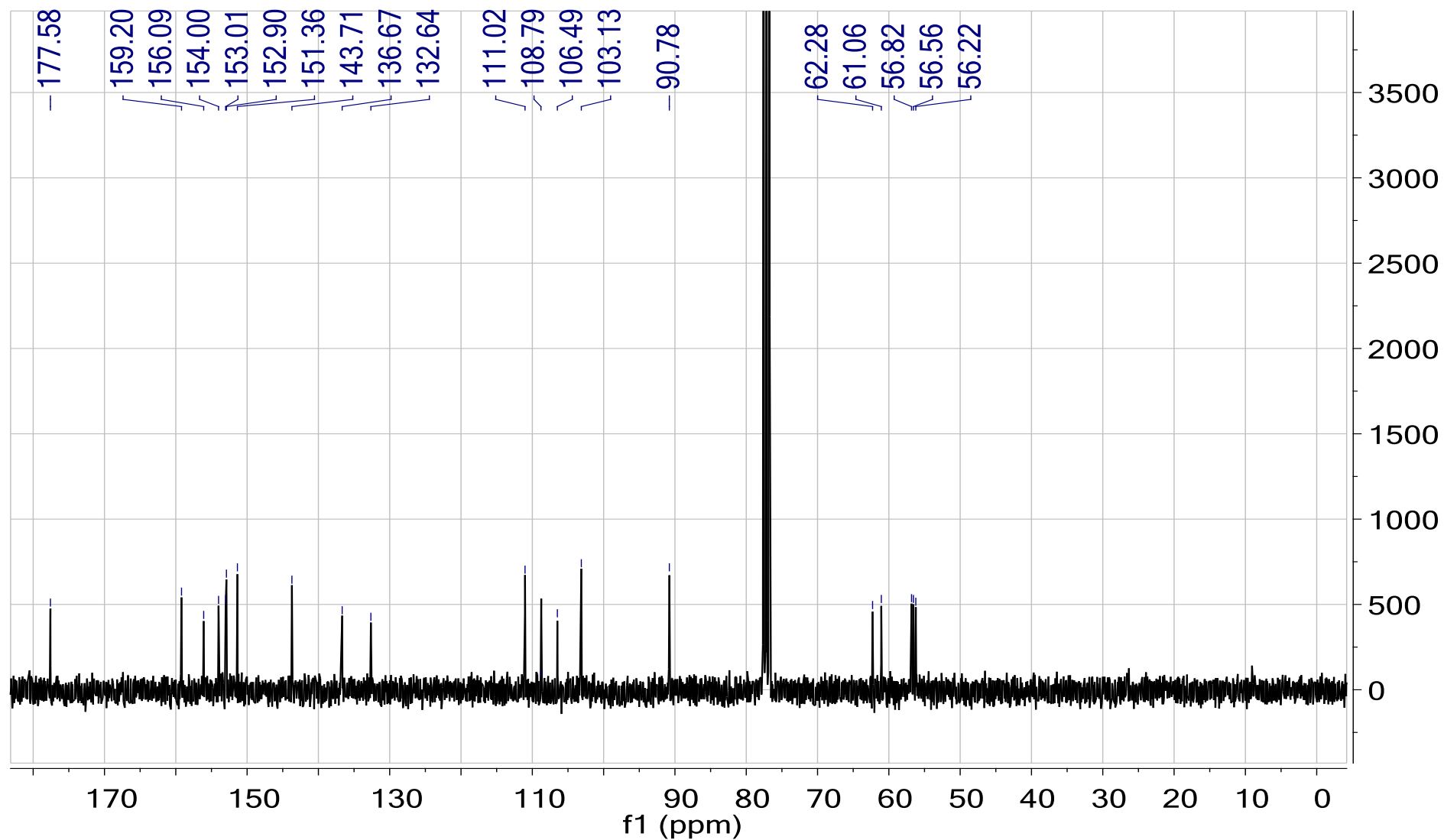


Figura 40 - Espectro de RMN de ^{13}C de 4',5-diidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona ou 2',5-diidroxi-4',3,5',6,7-pentametoxiflavona obtido a 75 MHz em CDCl_3 (17 mg/mL).

5.2.5 Determinação estrutural da substância purificada obtida da subfração F.4.1.18 – artemetina

O espectro de RMN de ^1H da substância purificada a partir da subfração F.4.1.18 (Figura 41 e Tabela 18) também é coerente com um esqueleto de um flavonoide do tipo aglicona – núcleo fundamental $\text{C}_6\text{C}_3\text{C}_6$ – pentametoxilado. Os sinais observados nos espectros de RMN de ^1H com valores de δ_{H} 3,87 s, 3,93 s, 3,97 s, 3,97 s e 3,98 s evidenciaram a presença dos 5 grupos metoxilas. A posição dos substituintes no núcleo flavônico foi atribuída com base nas multiplicidades observadas para H-8, H-2', H-5' e H-6', bem como no valor de δ_{H} observado em 12,61 s, típico da presença de grupo hidroxila em C-5, devido à ligação intramolecular do hidrogênio da hidroxila com o oxigênio da carbonila em C-4. Além disso, os dados dos espectros de NOE1D (Anexos 19 ao 22) permitiram observar o efeito nuclear Overhauser entre H-5' e H-6', entre H-8 e os hidrogênios do grupo $-\text{OCH}_3$ com δ_{H} 3,97 s, entre H-2' e os hidrogênios de outro grupo $-\text{OCH}_3$ com δ_{H} 3,97 s e entre H-5' e os hidrogênios do grupo $-\text{OCH}_3$ com δ_{H} 3,98 s. Assim, foi possível identificar a substância isolada como o flavonoide artemetina (Figura 42), metabólito secundário já relatado em *C. verbenacea*.

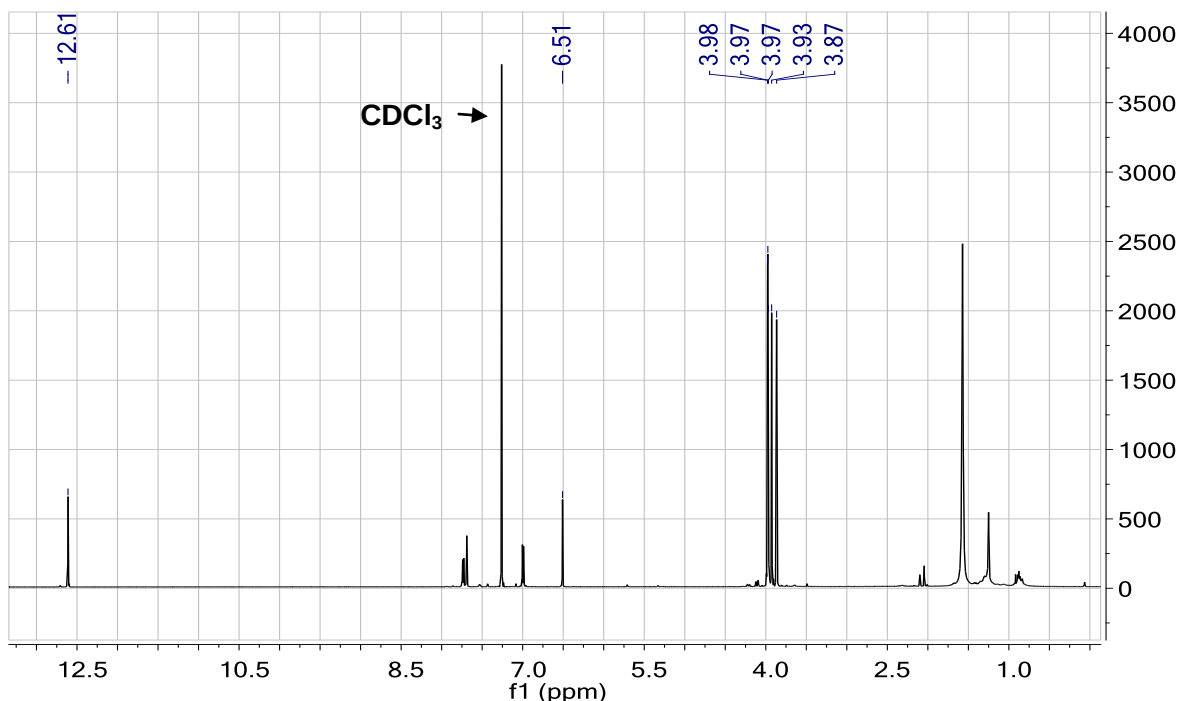


Figura 41 - Espectro de RMN de ^1H de artemetina obtido a 600 MHz em CDCl_3 (1,7 mg/mL)

Tabela 18 - Dados espectrométricos de RMN obtidos para a artemetina a 600 MHz para ^1H em CDCl_3 .

C	$\delta^{13}\text{C}^1$	$\delta^1\text{H J (Hz)}^1$	$\delta^1\text{H J (Hz)}$	NOE1D
2	155,2 s	----	----	----
3	138,0 s	----	----	----
4	178,9 s	----	----	----
5	152,33 s	----	----	----
6	132,5 s	----	----	----
7	158,8 s	----	----	----
8	90,4 d	6,83 s	6,51 s (1H)	3,97
9	152,8 s	----	----	----
10	106,60 s	----	----	----
1'	122,9 s	----	----	----
2'	110,9 s	7,63 d	7,69 d (1H)	3,97
3'	148,8 d	----	----	----
4'	151,5 s	----	----	----
5'	111,4 s	7,11 d	7,00 d (1H)	3,98
6'	122,2 d	7,68 dd	7,73 dd (1H)	7,00
OMe	60,1 q	3,74 s	3,87 s (3H)	----
OMe	60,8 q	3,91 s	3,93 s (3H)	----
OMe	56,3 q	3,85 s	3,97 s (3H)	----
OMe	56,1 q	3,81 s	3,97 s (3H)	----
OMe	56,0 q	3,73 s	3,98 s (3H)	----
5- OH	----	12,50 s	12,61 s (1H)	----

¹Dados da Literatura: MARTINEZ et al, 1987.

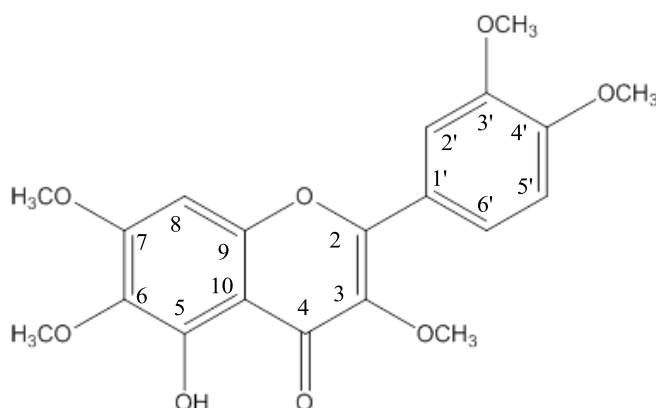


Figura 42 - Estrutura química da artemetina.

5.3 Análises dos extratos etanólicos

Os rendimentos das extrações realizadas para o estudo populacional são demonstrados na figura 43 e sua média geral foi de 51,8 mg de extrato etanólico/ 1 g de droga vegetal ou de cerca de 5,2 % (m/m), sendo o espécimen 3II5 o que apresentou maior rendimento (84,5 mg) e o espécimen 3IV1 o menor rendimento (41,1 mg).

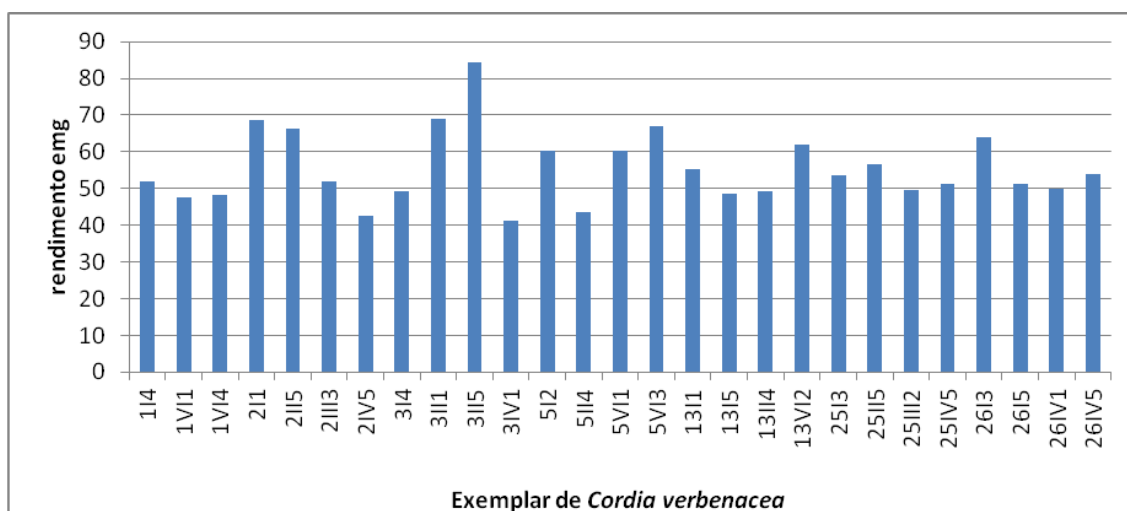


Figura 43 - Rendimento do extrato (mg/1 g de droga vegetal) de 27 espécimens (análise populacional) de *C. verbenacea*.

Tanto o rendimento dos extratos para o estudos circadianos (Figuras 44 e 45) quanto para o estudo sazonal (Figuras 46) mostraram diferenças entre os espécimens escolhidos para tais estudos, isso já pode ser um indicativo de diferença entre eles em relação a produção de metabólitos secundários. Também foi observada uma maior quantidade de extrato no horário das 04:30 h, para o estudo circadiano 1 (julho/2015); no entanto ao realizar a repetição do estudo circadiano (circadiano 2) em outro período do ano (janeiro/2016), observou-se um maior rendimento no horário das 22:30 h. Isso pode servir como indicativo de que as espécimens estudadas não seguem um padrão de produção de metabólitos secundários ao longo do dia possivelmente devido ao estresse por repetidas coletas ou mesmo por se tratarem de dias chuvosos, o que pode ter interferido na produção dos metabólitos o que ocasionou uma não repetição no horário das 10:30 h.

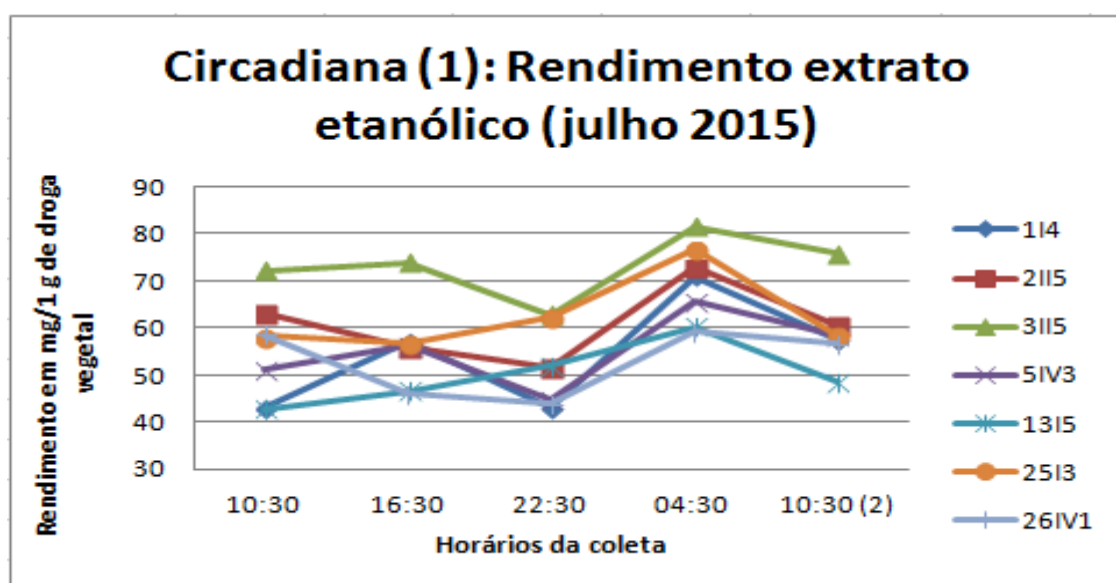


Figura 44 - Rendimento dos extratos dos espécimens do estudo circadiano de *C. verbenacea*.

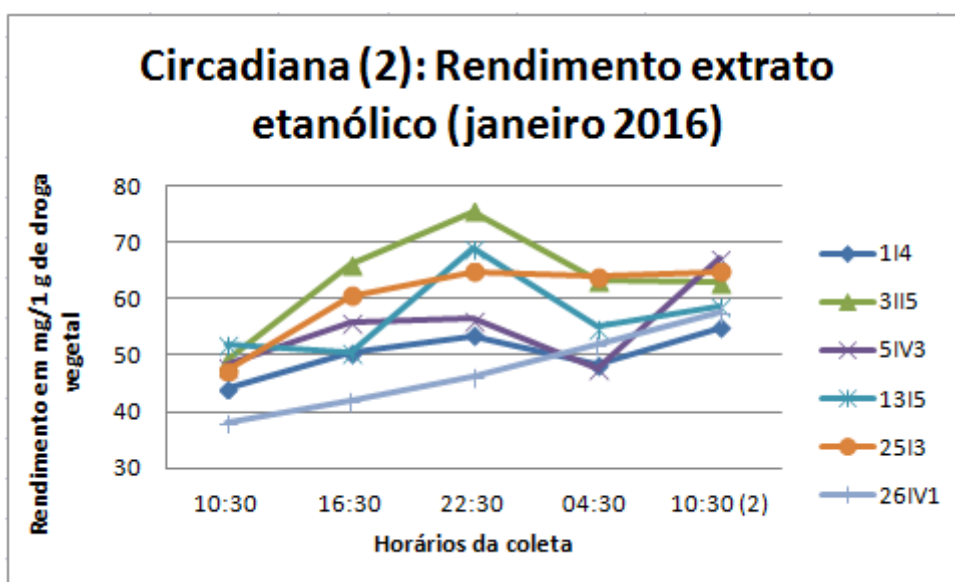


Figura 45 - Rendimento dos extratos dos espécimens do estudo circadiano de *C. verbenacea*.

Para o rendimento dos extratos no estudo sazonal (Figura 46) observamos uma variação com máximos de produção nos meses de janeiro, maio e novembro de 2015 e março e maio de 2016, que são meses de extremos, com temperaturas mais elevadas e mais frias e com variação do índice pluviométrico, sendo os meses de janeiro e março e novembro com índices mais elevados e os meses de maio com índices menores, como observado nas figuras 47 (temperatura) e 48 (índice pluviométrico), segundo dados experimentais do Centro de Pesquisa Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura – CEPAGRI, UNICAMP. Os espécimes 2II5 e 3II5 tiveram seus estudos realizados somente até o mês de março/2016, devido à morte das plantas.

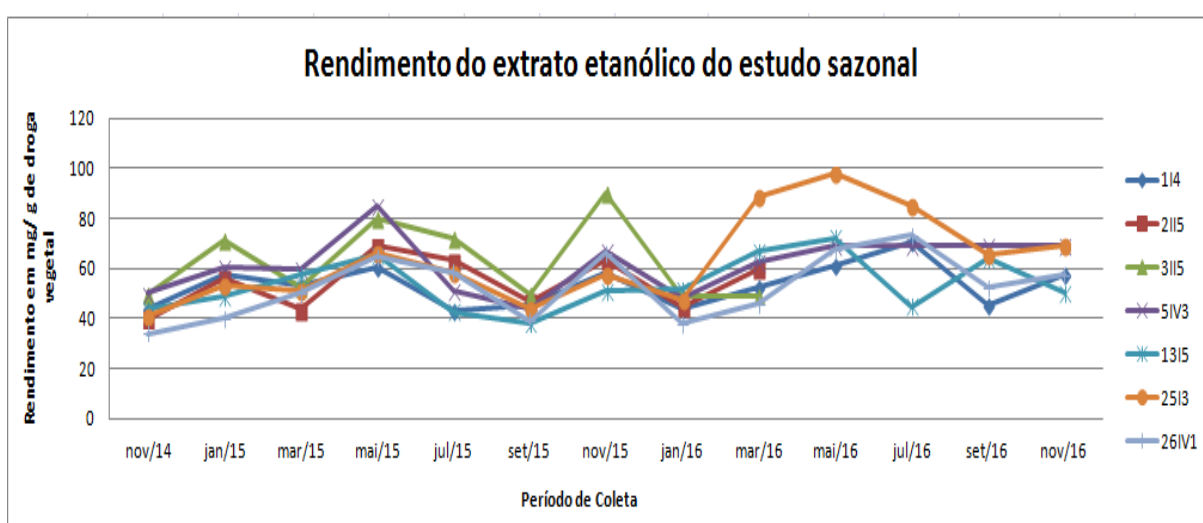


Figura 46 - Rendimento dos extratos dos espécimens de *C. verbenacea* do estudo sazonal. Os espécimes 2II5 e 3II5 não apresentaram rendimento no mês de maio/2016 a Nov/2016 devido à insuficiência de massa foliar para obtenção do extrato etanólico.

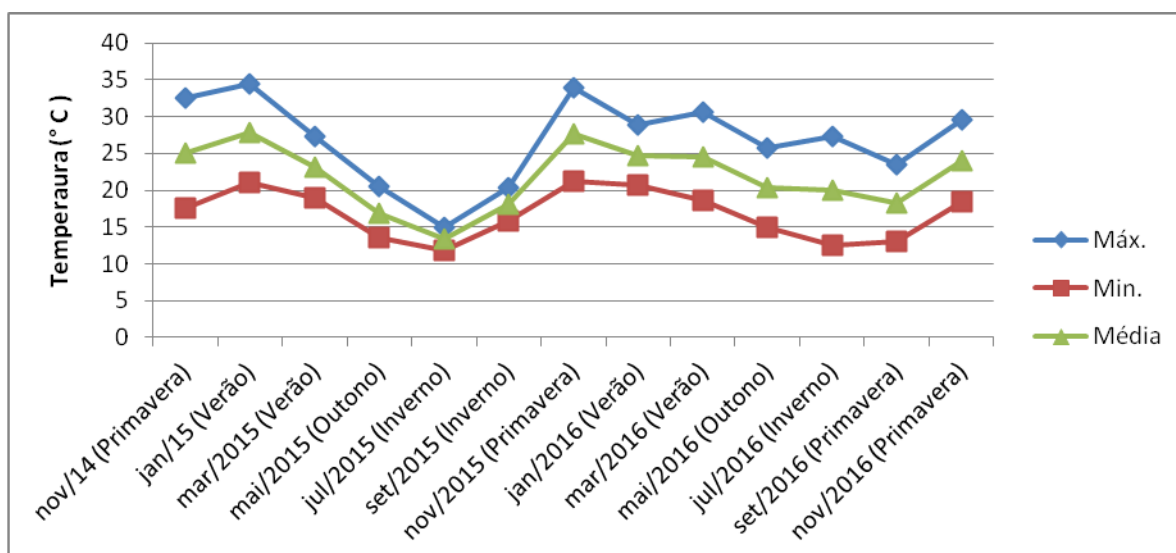


Figura 47 - Amplitude térmica e temperatura média no dia da coleta de novembro/2014 a novembro/2016.

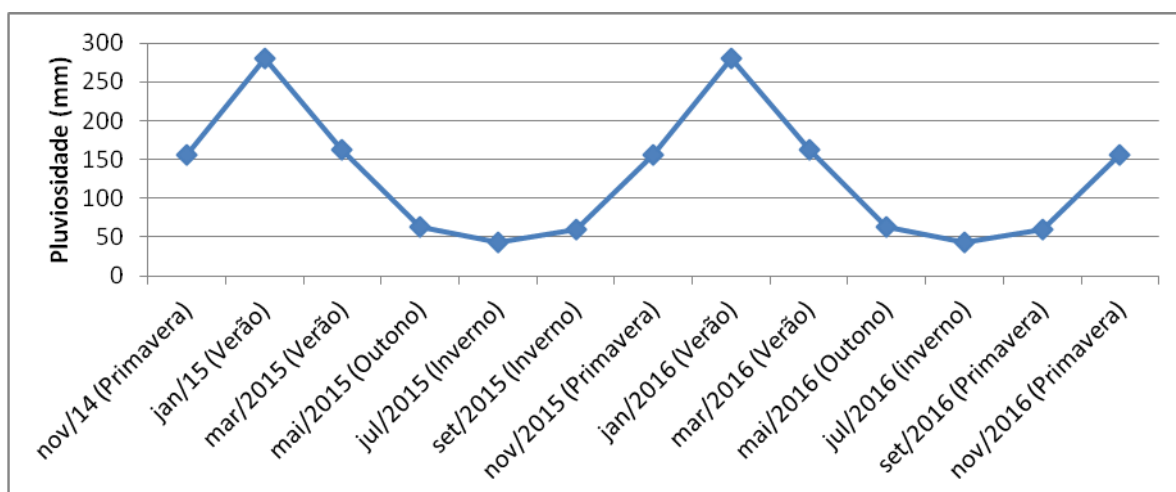


Figura 48 - Pluviosidade mensal acumulada dos meses de novembro/2014 a novembro/2016.

Sendo assim, foi realizada uma análise estatística (ANOVA) para verificar a influência do horário de coleta e da época do ano no rendimento do extrato. No estudo sazonal (Figura 49), observou-se um $P < 0.05$, o que demonstra que os períodos do ano em que as plantas são coletadas influenciam significativamente na produção de extratos. No entanto, o estudo circadiano demonstrou significância entre o rendimento do extrato em relação ao horário de coleta apenas para o primeiro estudo (Anexo 50), possuindo valores de $P < 0,05$, porém o segundo (Anexo 51) estudo apresentou valor de $P > 0.05$, o que demonstra que as plantas do estudo não seguem uma tendência entre a produção de extrato em relação ao horário de coleta.

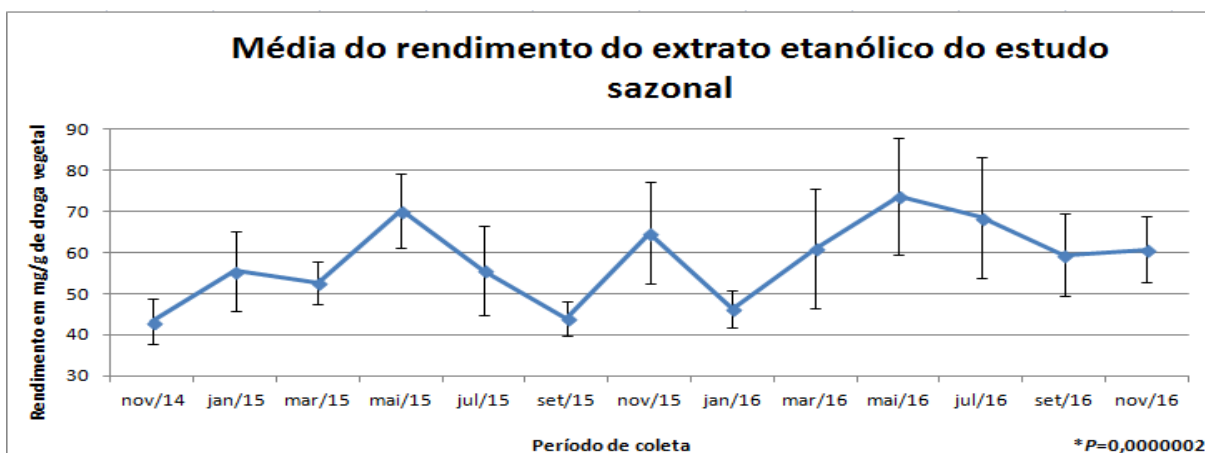


Figura 49 - Média do Rendimento dos extratos das espécimens de *C. verbenacea* do estudo sazonal. Os espécimens 2II5 e 3II5 não apresentaram rendimento no mês de maio/2016 a Nov/2016 devido a insuficiência de massa foliar para obtenção do extrato etanólico.

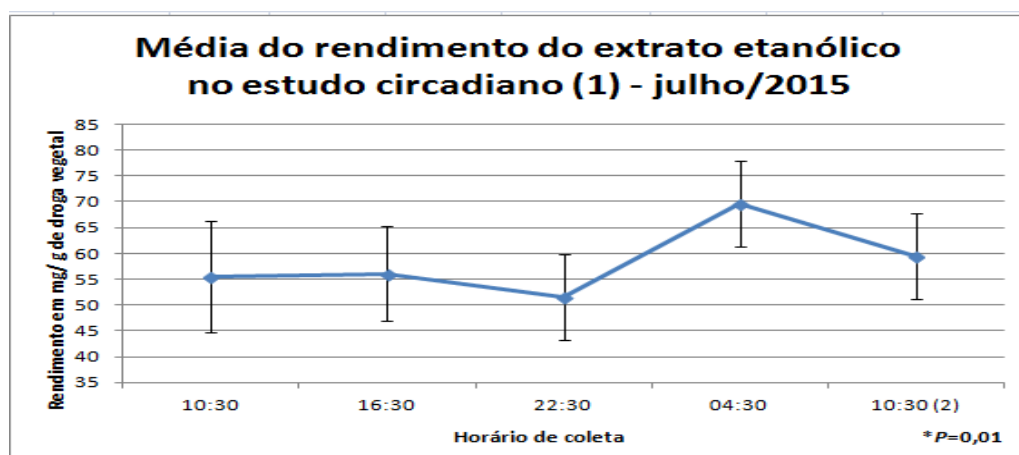


Figura 50 - Média do endimento dos extratos dos espécimens do estudo circadiano (1)

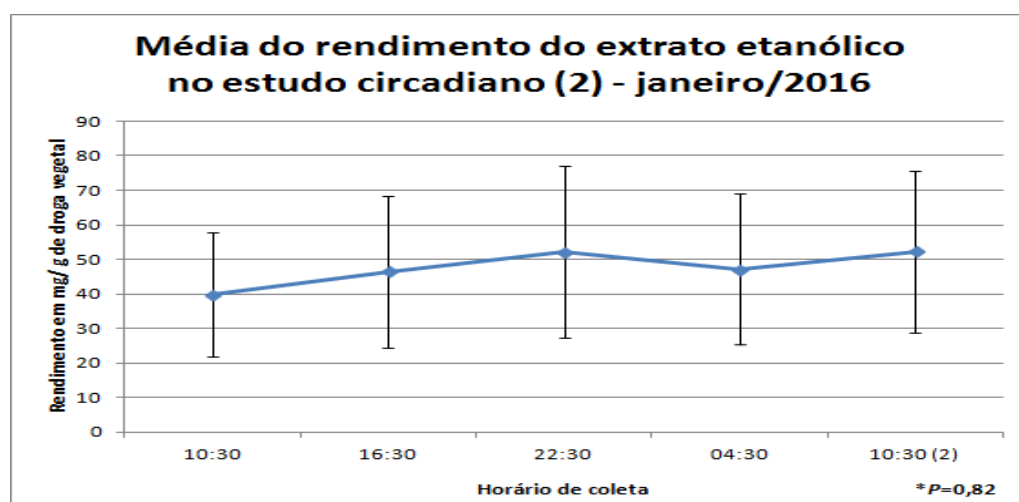


Figura 51 - Média do rendimento dos extratos dos espécimens do estudo circadiano (2)

5.3.1 Desenvolvimento do método de análise para os extratos etanólicos

Para análise cromatográfica dos extratos etanólicos dos estudos sazonal, circadiano e populacional, o método de análise cromatográfica foi desenvolvido seguindo inicialmente

condições descritas por Matias e colaboradores (2013), as quais foram otimizadas conforme a tabela 19 para se obter uma melhor condição de análise e separação dos picos, o que foi conseguido com o método Acetonitrila 12, como podemos verificar no cromatograma da Figura 52. O extrato etanólico bruto, pré-tratado foi utilizado no desenvolvimento do método em um cromatógrafo Perkin Elmer® Flexar® DAD acoplado a uma coluna Thermo Scientific® C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), com leitura de absorvância em 254 nm, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20 µL e como fase móvel misturas de metanol/água ou acetonitrila/água. Porém, ao iniciar as análises no cromatógrafo Shimadzu® DAD utilizando a coluna ACE® C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), o método sofreu uma pequena alteração na qual passou a se iniciar o método com 6% de acetonitrila e não com 8% (Acetonitrila 12), sendo este método final chamado de Acetonitrila 14 (Figura 52).

Tabela 19 - Condições de gradiente avaliadas no desenvolvimento de método de análise por CLAE-DAD do EtOH

NOME	ETAPAS DO GRADIENTE				
	1	2	3	4	5
Metanol 1	0-30` - 5 a 60%	30-35` - 60 a 71%	35-55` - 71 a 100%	55-60` 100% (isocrático)	
Metanol 2	0-10` - 10 a 30%	10-15` - 30 a 60%	15-45` - 60 a 100%	45-55` 100% (isocrático)	
Metanol 3	0-10` - 20 a 30%	10-15` - 30 a 60%	15-45` - 60 a 100%	45-55` 100% (isocrático)	
Acetonitrila 1	0-10` - 7 a 20%	10-15` - 20 a 50% de	15-45` - 50 a 100% de	45-55` 100% (isocrático)	
Acetonitrila 2	0-10` - 7 a 20%	10-15` - 20 a 40%	15-45` - 40 a 100%	45-55` 100% (isocrático)	
Acetonitrila 3	0-10` - 5 a 20%	10-15` - 20 a 50%	15-55` - 50 a 100%	55-65` 100% (isocrático)	
Acetonitrila 4	0-10` - 8 a 20%	10-13` - 20 a 40%	13-53` - 40 a 100%	53-60` 100% (isocrático)	
Acetonitrila 5	0-10` - 8 a 20%	10-13` - 20 a 40%	13-53` - 40 a 90%	53-60` 100% (isocrático)	
Acetonitrila 6	0-10` - 8 a 20%	10-13` - 20 a 40%	13-53` - 40 a 80%	53-60` 100% (isocrático)	
Acetonitrila 7	0-10` - 8 a 20%	10-13` - 20 a 40%	13-53` - 40 a 75%	53-60` 100% (isocrático)	
Acetonitrila 8	0-10` - 8 a 20%	10-13` - 20 a 40%	13-58` - 40 a 75%	53-60` 100% (isocrático)	
Acetonitrila 9	0-10` - 8 a 20%	10-13` - 20 a 40%	13-60` - 40 a 75%	53-60` 100% (isocrático)	
Acetonitrila 10	0-10` - 8 a 20%	10-13` - 20 a 40%	13-60` - 40 a 70%	53-60` 100% (isocrático)	
Acetonitrila 11	0-10` - 8 a 20%	10-13` - 20 a 38%	13-60` - 38 a 68%	60-62` 68 a 100%	62-72` 100% (isocrático)
Acetonitrila 12	0-10` - 8 a 20% de Acetonitrila	10-13` - 20 a 35% de Acetonitrila	13-60` - 35 a 68% de Acetonitrila	60-62` 68 a 100% de Acetonitrila	62-72` 100% de acetonitrila (isocrático)
Acetonitrila 13	0-10` - 8 a 20% de Acetonitrila	10-13` - 20 a 35%	13-60` - 35 a 65%	60-62` 65 a 100%	62-72` 100% de (isocrático)
**Acetonitrila 14	0-10` - 6 a 20% de Acetonitrila	10-13` - 20 a 35% de Acetonitrila	13-60` - 35 a 68% de Acetonitrila	60-62` 68 a 100% de Acetonitrila	62-72` 100% de acetonitrila (isocrático)

¹ métodos chamados de metanol utilizaram como fase móvel metanol/água e métodos chamados de acetonitrila usaram acetonitrila/água; demais condições de análise estão descritas no texto acima.

Posteriormente os extratos etanólicos dos estudos populacional, circadiano e sazonal, foram analisados utilizando o método desenvolvido por CLAE-UV (método Acetonitrila 14). A figura 52 apresenta um cromatograma obtido através do extrato bruto etanólico, com o método usado para os estudos populacional, sazonal e circadiano e aponta as substâncias isoladas quantificadas e identificadas. O cromatograma obtido demonstrou resolução adequada para os picos majoritários e mesmo para a maioria dos picos minoritários.

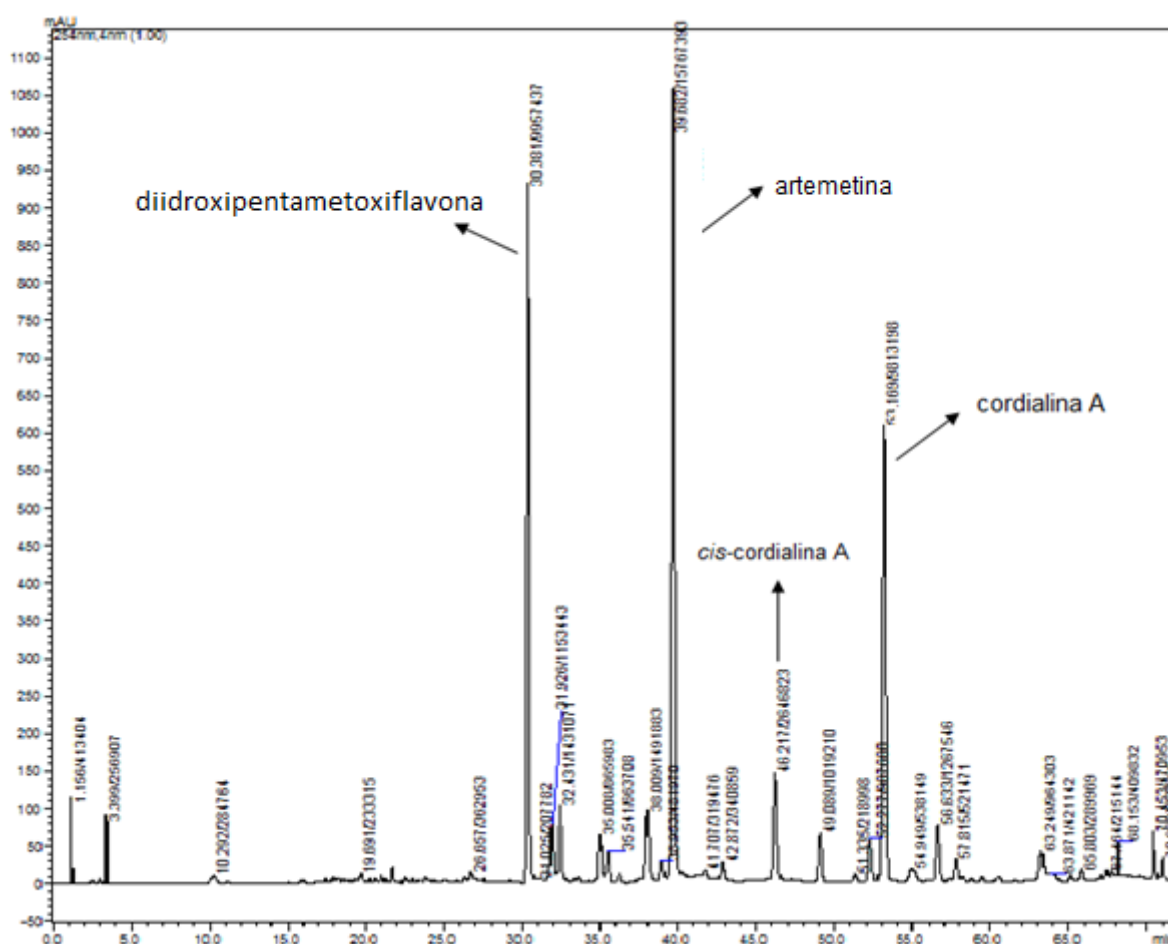


Figura 52 - Cromatograma em CLAE-UV do EetOH de *C. verbenacea*. Condições de análise: 0-10': 6 a 20%; 10-13': 20 a 35%; 13-60': 35 a 68%; 60-62': 68 a 100%; 62-70': 100% acetonitrila; coluna: Ace[®] C18 (250x4.6mm; 5µm); Injeção de 20 µL; λ-254 nm; vazão de 1,0 mL/min.

5.3.2 Análises dos estudos populacional, circadiano e sazonal utilizando ferramentas quimiométricas

Os cromatogramas resultantes da análise dos 27 espécimens do estudo populacional são apresentados na figura 53. Foi possível observar diferenças quantitativas nos perfis químicos dos espécimens. Com destaque para o espécimen 212 que apresentou um perfil cromatográfico diferente dos demais 26 espécimens.

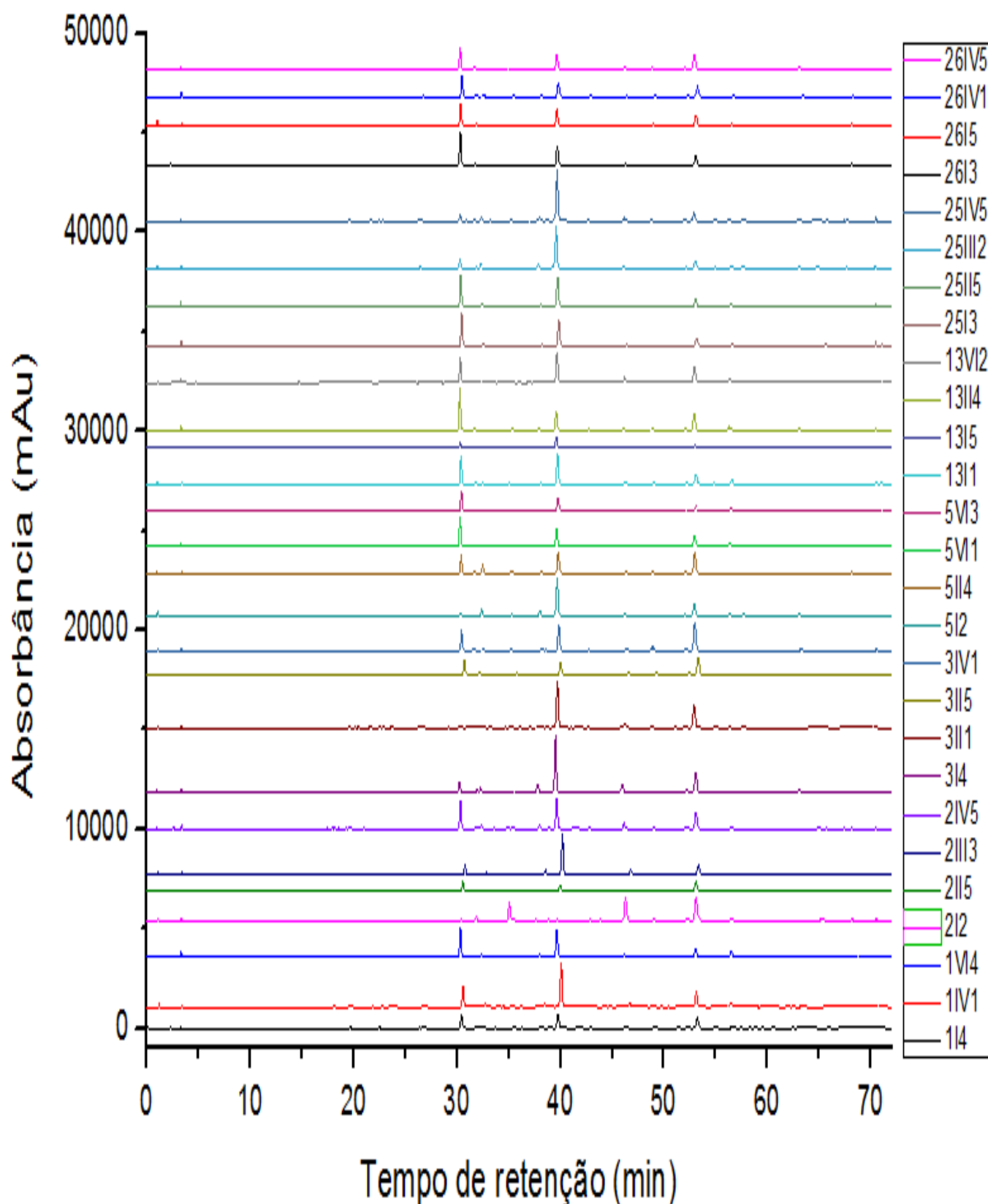


Figura 53 - Cromatogramas de 27 espécimes de *C. verbenacea* obtidos por CLAE-DAD. Condições de análise: 0-10': 8 a 20%; 10-13': 20 a 35%; 13-60': 35 a 68%; 60-62': 68 a 100%; 62-70': 100% acetonitrila; coluna: Ace® C18 (250x4,6 mm; 5 µm); Injeção de 20 µL; λ-254 nm; vazão de 1,0 mL/min.

Os dados obtidos por CLAE foram transferidos para um programa de análise multivariada (Matlab – PCA Tolbox 1.2) no qual foi criada uma matriz com 17 colunas as quais são relacionadas aos tempos de retenção de cada pico e que servem como variáveis e com 27 linhas relacionadas a cada espécimen de *C. verbenacea* estudado. Desta forma, obteve-se uma PCA, com gráficos de *scores* (Figura 54) e *loadings* (Figura 55), observando-se agrupamentos entre vários espécimens por possuírem similaridades, porém com diferenças quantitativas entre as substâncias. Os espécimens 1- 1I4, 15- 5IV3, 17- 13I5, 24- 26I3, 25- 26I5, 26-26IV1, 27- 26IV5 apresentaram uma maior tendência de produção do flavonoide diidroxipentametoxiflavona (variável 1) enquanto os espécimens 8- 3I4, 12- 5I2, 22- 25II2 e 23- 25IV5 apresentaram maior tendência de produção da artemetina (variável 7), conforme análise dos gráficos de *scores* e de *loadings*. Para amostra 2I2 referente ao número 4, destaca-se das demais pela diferença relacionada às variáveis que observamos no gráfico de loading: 2 (31,96 min.), 4 (35,58 min.), 10 (46,36 min.), 11 (49,17 min.), 12 (52,36 min.) e 13 (53,25 min.), sendo as variáveis 10 e 13 referentes a *cis*-cordialina A e cordialina A respectivamente, o que sugere uma tendência de maior produção desses triterpenos no espécimen 2I2.

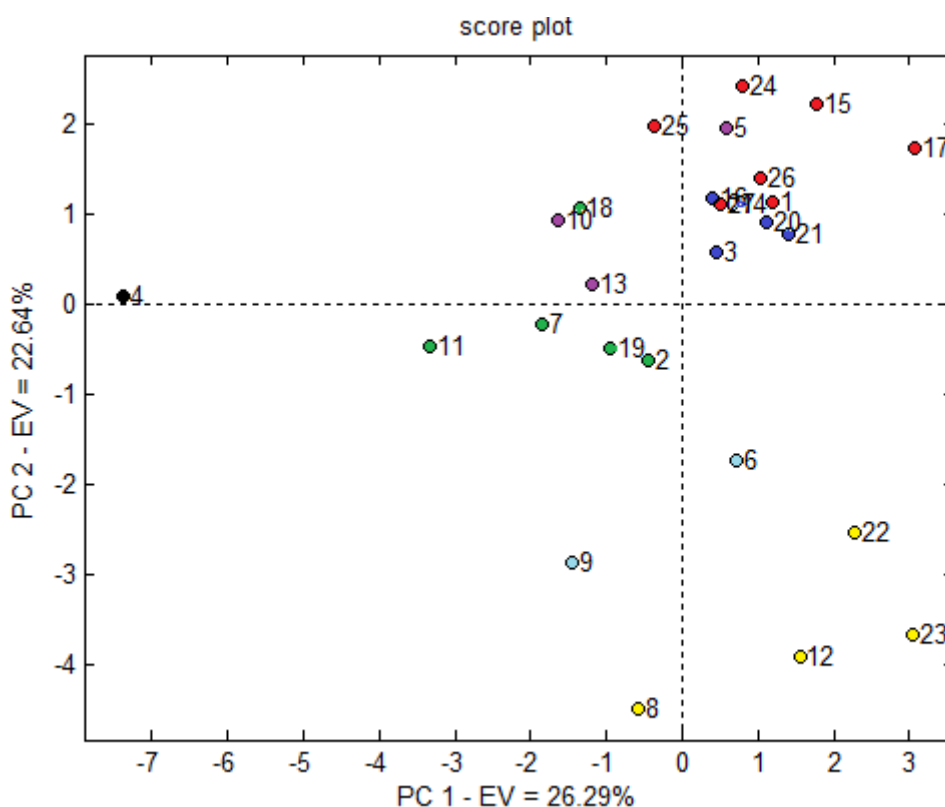


Figura 54 - Gráfico obtido utilizando resultados de análises por CLAE-DAD através de análises de componentes principais (PCA) de 27 extratos de *C. verbenacea* do estudo populacional. Códigos dos espécimens: (1- 1I4, 2- 1VI1, 3- 1IV4, 4- 2I2, 5- 2II5, 6- 2III3, 7- 2IV5, 8- 3I4, 9- 3II1, 10- 3II5, 11- 3IV1, 12- 5I2, 13- 5II4, 14- 5IV1, 15- 5IV3, 16- 13I1, 17- 13I5, 18- 13II4, 19- 13VI2, 20- 25I3, 21- 25II5, 22- 25III2, 23- 25IV5, 24- 26I3, 25- 26I5, 26-26IV1, 27- 26IV5

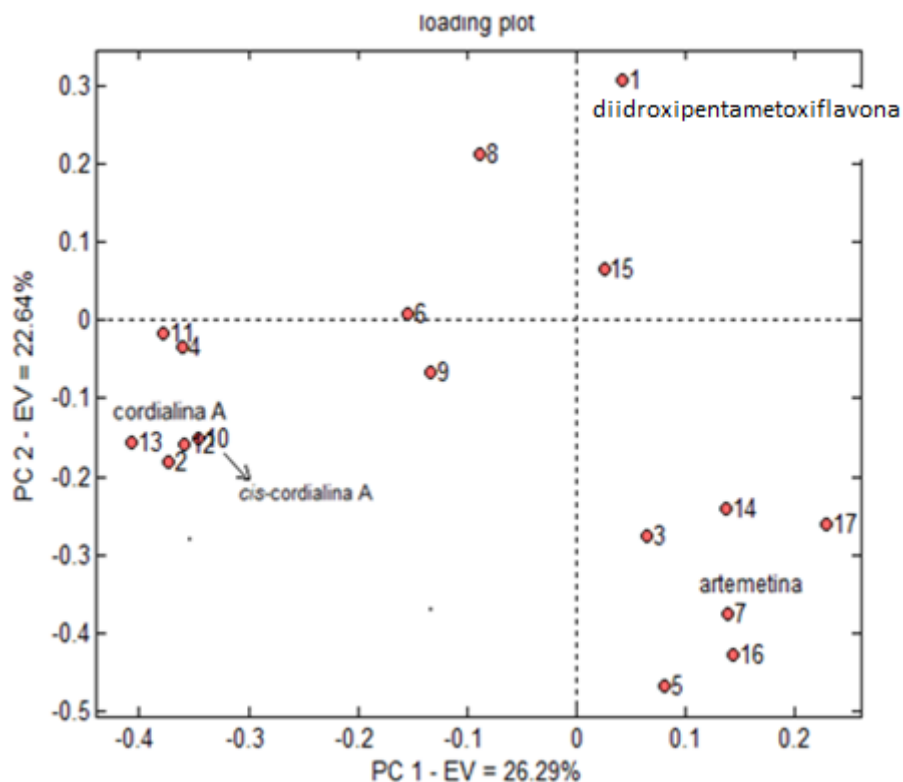


Figura 55 - Gráfico de *loadings* obtido utilizando resultados de análises por CLAE-DAD através de análises de componentes principais (PCA) de 27 extratos de *C. verbenacea* do estudo populacional. Destaques para as 4 substâncias isoladas: 1- 4',5-diidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona; 7- artemetina, 10- *cis*-cordialina A e 13 - cordialina A.

Essa diferença da espécimen 212 (4) é muito evidente quando comparado seu cromatograma com qualquer outro cromatograma de algum dos espécimens estudados (Figura 56). Tal diferença esta relacionada a uma diferença em relação aos componentes majoritários observados nos outros 26 espécimens.

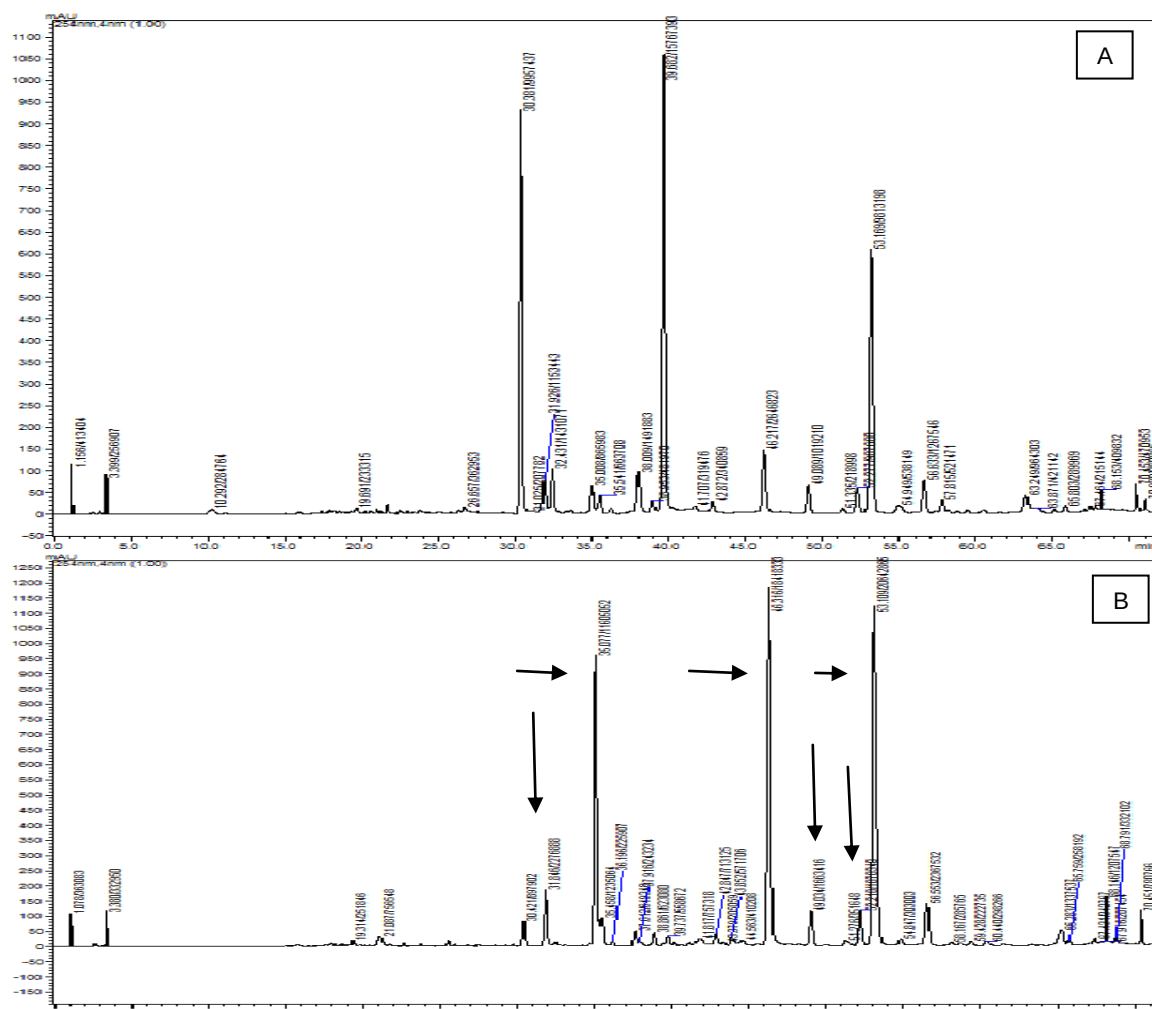


Figura 56 - Comparação de dois cromatogramas: **A**- Pop mist 27 (mistura de 27 espécimens diferentes) e **B** - espécimen 212, obtidos por CLAE-DAD de extratos de *C. verbenacea*. Condições de análise: 0-10': 8 a 20%; 10-13': 20 a 35%; 13-60': 35 a 68%; 60-62': 68 a 100%; 62-70': 100% acetonitrila; coluna: Ace[®] C18 (250x4,6 mm; 5 µm); Injeção de 20 µL; λ-254 nm; vazão de 1,0 mL/min. Setas na vertical: substâncias com menor teor em relação aos demais espécimens; Setas na horizontal: substâncias com maior teor em relação aos demais espécimens.

Foi também obtido um dendrograma de HCA (Figura 57), no qual se pode observar que o espécimen 212 se diferencia significativamente dos demais espécimens, enquanto observamos os agrupamentos dos outros 26 espécimens, formando 5 grupos. Como o agrupamento dos espécimens 1- 114, 15- 5IV3, 17- 13I5, 24- 26I3, 25- 26I5, 26-26IV1, 27- 26IV5, que possuem maior tendência de produção da diidroxipentametoxiflavona (variável 1) em relação aos demais espécimens e dos espécimens 12- 5I2, 22- 25II2 e 23- 25IV5 com maior tendência de produção da artemetina (variável 7).

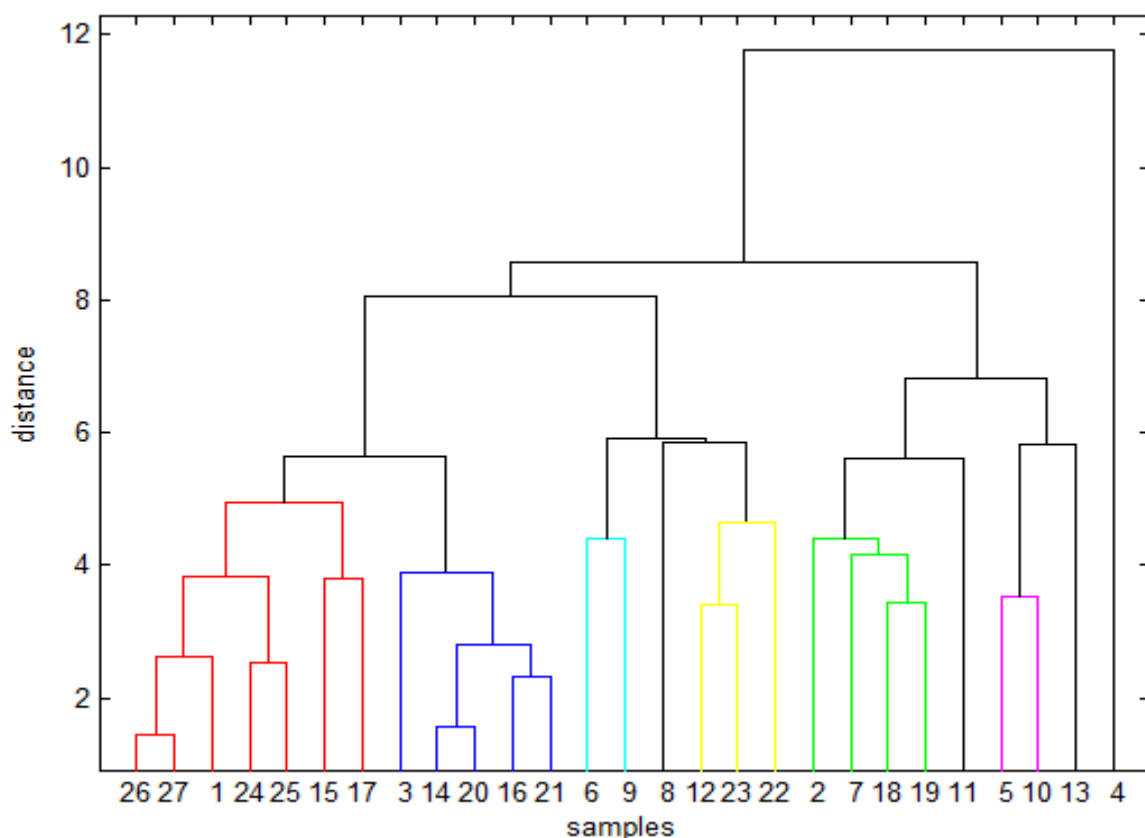


Figura 57 - Dendrograma obtido utilizando resultados de análises por CLAE-DAD através de análises de agrupamentos hierárquicos (HCA) de 27 extratos de *C. verbenacea*, onde observamos 5 grandes grupos e o extrato da espécimen 212 referente ao número 4 isolado das demais. Códigos dos espécimens: (1- 1I4, 2- 1VI1, 3- 1IV4, 4- 2I2, 5- 2II5, 6- 2III3, 7- 2IV5, 8- 3I4, 9- 3II1, 10- 3II5, 11- 3IV1, 12- 5I2, 13- 5II4, 14- 5IV1, 15- 5IV3, 16- 13I1, 17- 13I5, 18- 13II4, 19- 13VI2, 20- 25I3, 21- 25II5, 22- 25III2, 23- 25IV5, 24- 26I3, 25- 26I5, 26-26IV1, 27- 26IV5).

Já, no estudo circadiano, não foram observadas diferenças em relação aos horários de coleta. No entanto, novamente pode-se afirmar uma diferença entre os espécimens conforme podemos observar na PCA (Figura 58), em que os espécimens se separam em grupos mediante as coletas realizadas. Quando analisado o gráfico de PCA juntamente com o gráfico de *loadings* (Figura 59), verifica-se que os espécimens 2II5 e 3II5 possuem uma maior tendência de produção dos triterpenos *cis*-cordialina A (variável 13) e cordialina A (variável 16), enquanto que os espécimens 1I4 e 26IV1 uma maior tendência para os flavonoides, diidroxipentametoxiflavona (variável 1) e artemetina (variável 9), respectivamente. Essa tendência de produção das substâncias isoladas em cada um dos espécimens analisados no estudo circadiano e sazonal pode-se verificar no item 5.3.3.

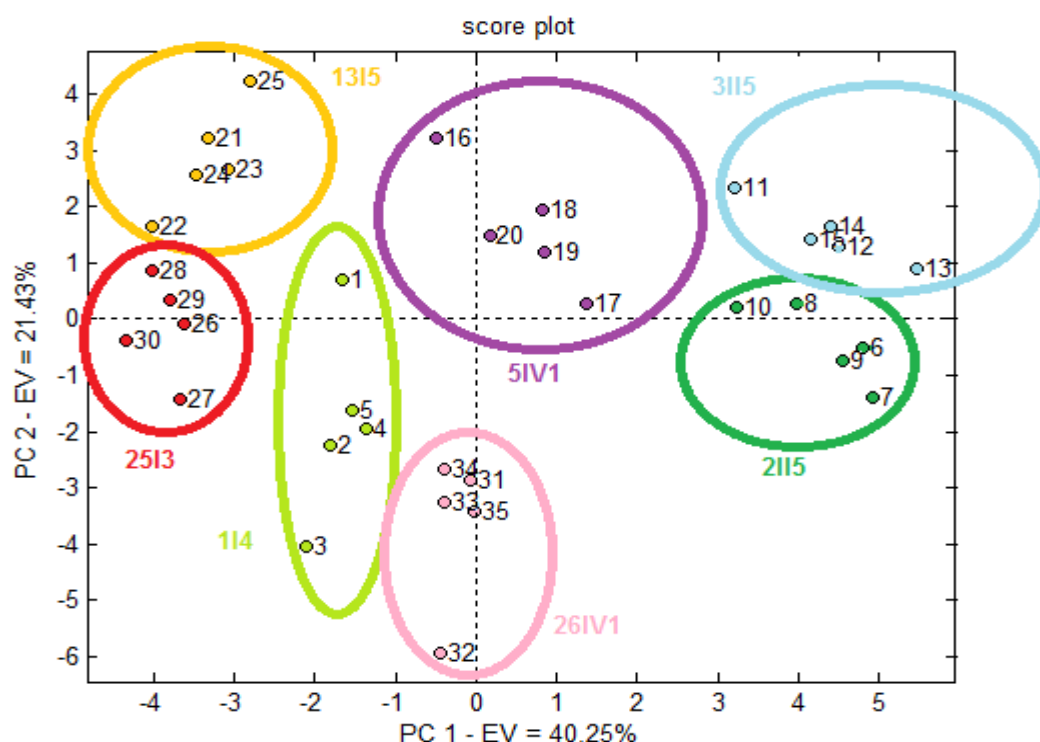


Figura 58 - Gráfico obtido utilizando resultados de análises por CLAE-DAD através de análises de componentes principais (PCA) dos 7 espécimens do estudo circadiano com destaque aos agrupamentos para 5 coletas de cada espécimen.

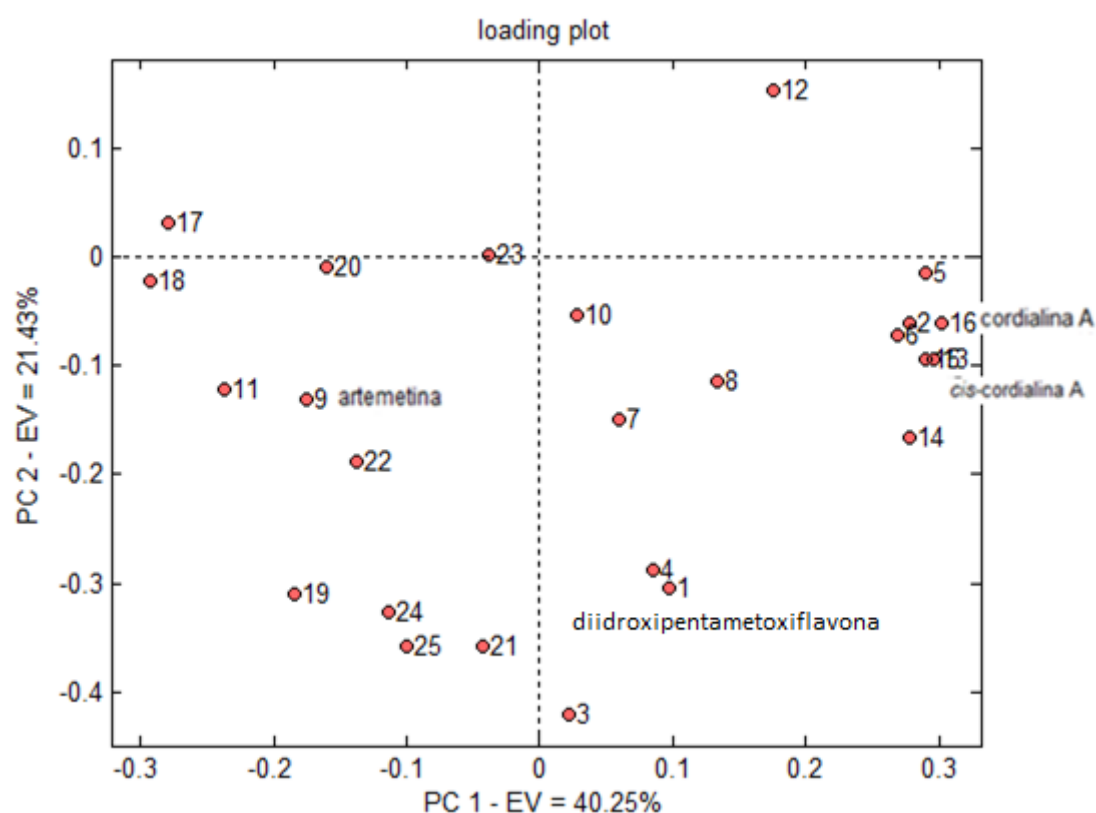


Figura 59 - Gráfico de *loadings* obtido utilizando resultados de análises por CLAE-DAD através de análises de componentes principais (PCA) de 7 espécimens de *C. verbenacea* do estudo circadiano. Destaques para as 4 substâncias isoladas: 1- diidroxipentametoxiflavona; 9- artemetina, 13- *cis*-cordialina A e 16- cordialina A.

Os dados de PCA são novamente expostos no dendograma de HCA (figura 60), onde novamente verificamos agrupamentos entre as coletas do mesmo espécimen. Como no caso do espécimen 1I4 com agrupamento relacionado aos números 1, 2, 4 e 5, com a coleta de número 3 estando uma posição de diferente dos demais 6 espécimens estudadas e o agrupamento das coletas do espécimen 3II5 que está relacionada aos números 11, 12, 13, 14 e 15 no dendograma, demonstrando que os espécimens possuem diferenças entre si. Os cromatogramas encontram-se nos Anexos 26 ao 32.

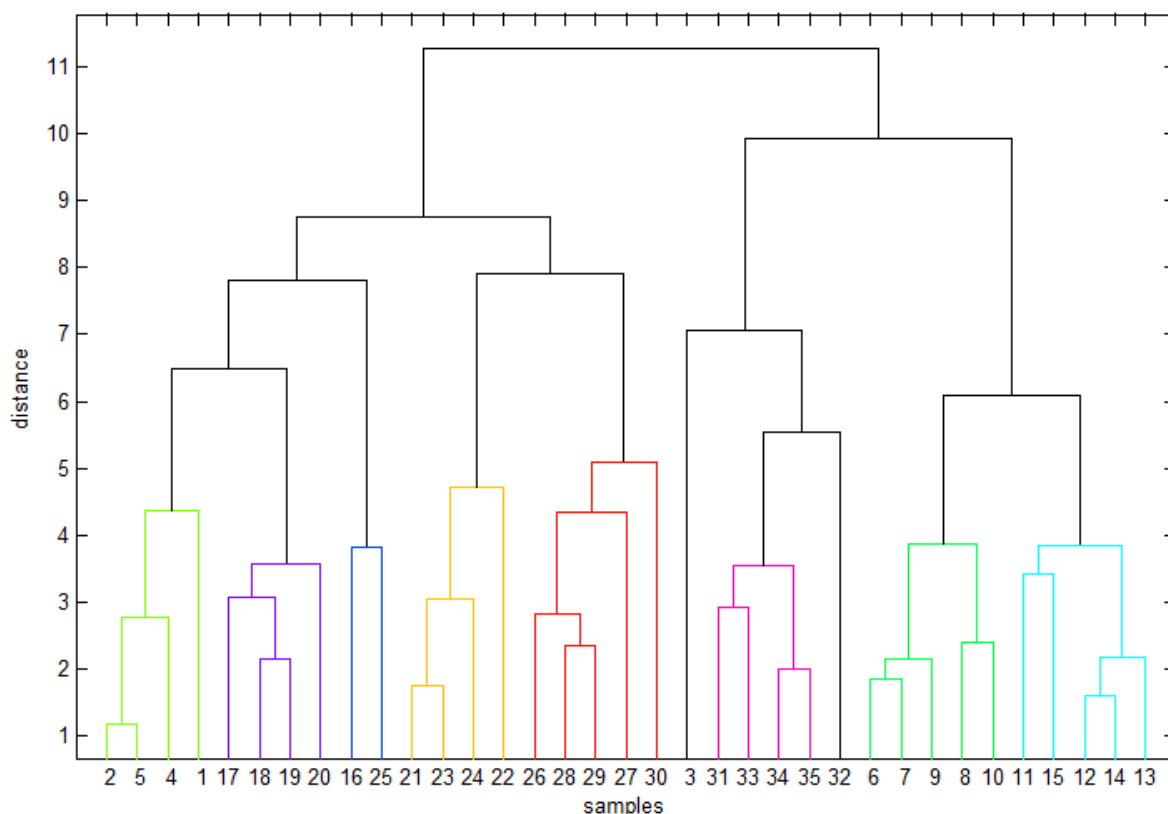


Figura 60 - Dendrograma obtido utilizando resultados de análises por CLAE-DAD através de análises de agrupamentos hierárquicos (HCA) das 5 coletas das 7 espécimens do estudo circadiano.

No estudo sazonal, os resultados seguiram a mesma lógica do circadiano, que foram as diferenças entre as espécimens coletadas, porém as variáveis ao longo do ano não surtem efeito em relação ao perfil químico dos espécimens estudados, conforme verificamos na PCA (Figura 61). No gráfico de PCA temos as 13 coletas do estudo sazonal para os espécimens 1I4 (1 ao 13), 5IV3 (32 ao 44), 13I5 (45 ao 57), 25I3 (58 ao 70) e 26IV1 (71 ao 83) e de 9 coletas dos espécimens 2II5 (14 ao 22) e 3II5 (23 ao 31) e quando comparadas com o gráfico de *loadings* (Figura 62) verifica-se que os espécimens 2II5 e 3II5 tem uma maior tendência de produção dos triterpenos *cis*-cordialina A e cordialina A, enquanto que o espécimen 25I3 possui uma maior tendência para os flavonoide artemetina e o espécimen 26IV1 pra o flavonoide diidroxipentametoxiflavona. Essa tendência de produção das

substâncias em cada um dos espécimens analisados no estudo circadiano e sazonal, pode-se verificar no item 5.3.3.

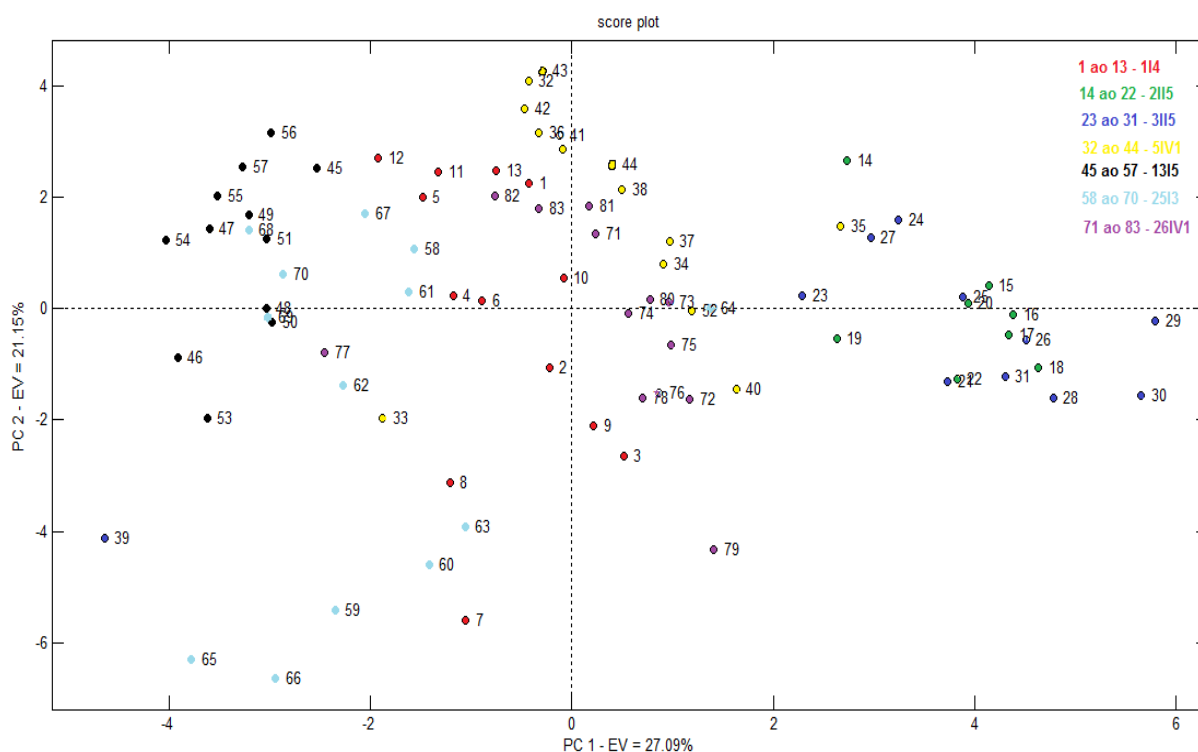


Figura 61 - Gráfico obtido utilizando resultados de análises por CLAE-DAD através de análises de componentes principais (PCA) das 13 coletas de cada uma das 7 espécimens do estudo sazonal.

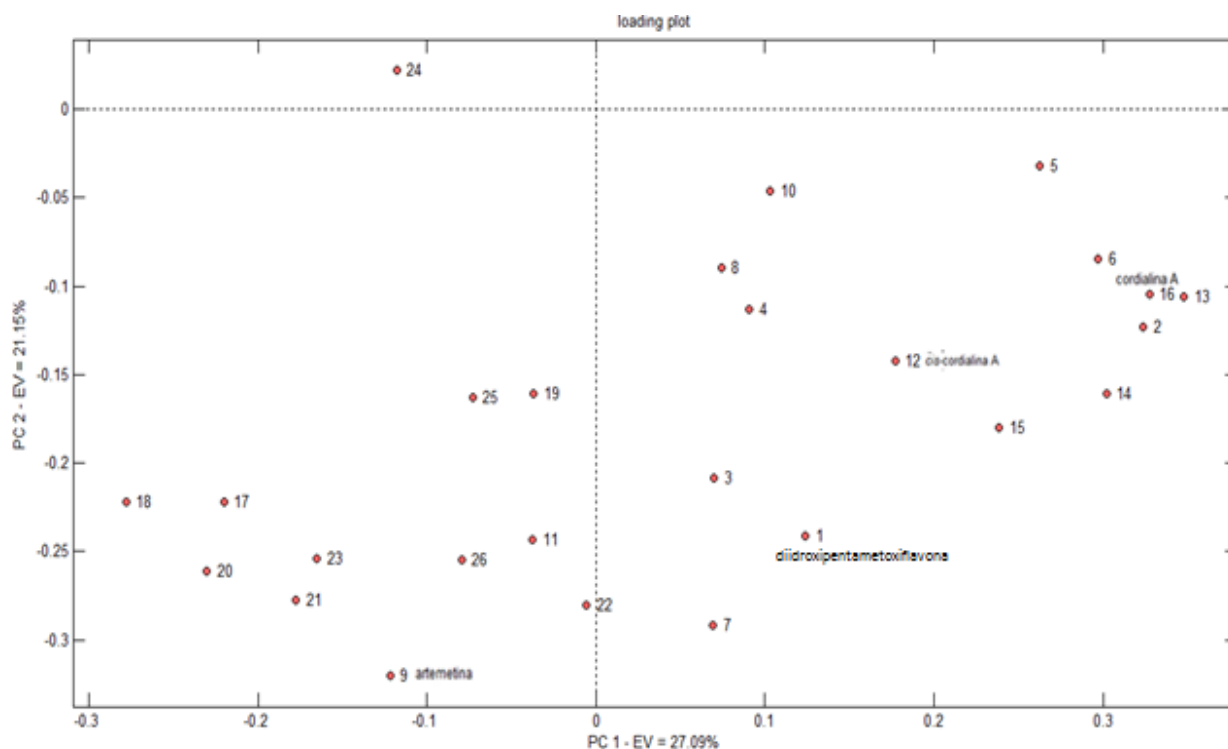


Figura 62 - Gráfico de *loadings* obtido utilizando resultados de análises por CLAE-DAD através de análises de componentes principais (PCA) de 7 espécimens de *C. verbenacea* do estudo sazonal. Destaques para as 4 substâncias isoladas: 1- diidroxipentametoxiflavona; 9- artemetina, 12- cis-cordialina A e 16- cordialina A.

O dendodograma de HCA (Figura 63) evidencia os agrupamentos já observados no gráfico de PCA, demonstrando o grupo de coleta de cada espécimen em relação a produção de determinada substância conforme foi verificado em comparação com o gráfico de loadings. Os cromatogramas encontram-se nos anexos 23 ao 36.

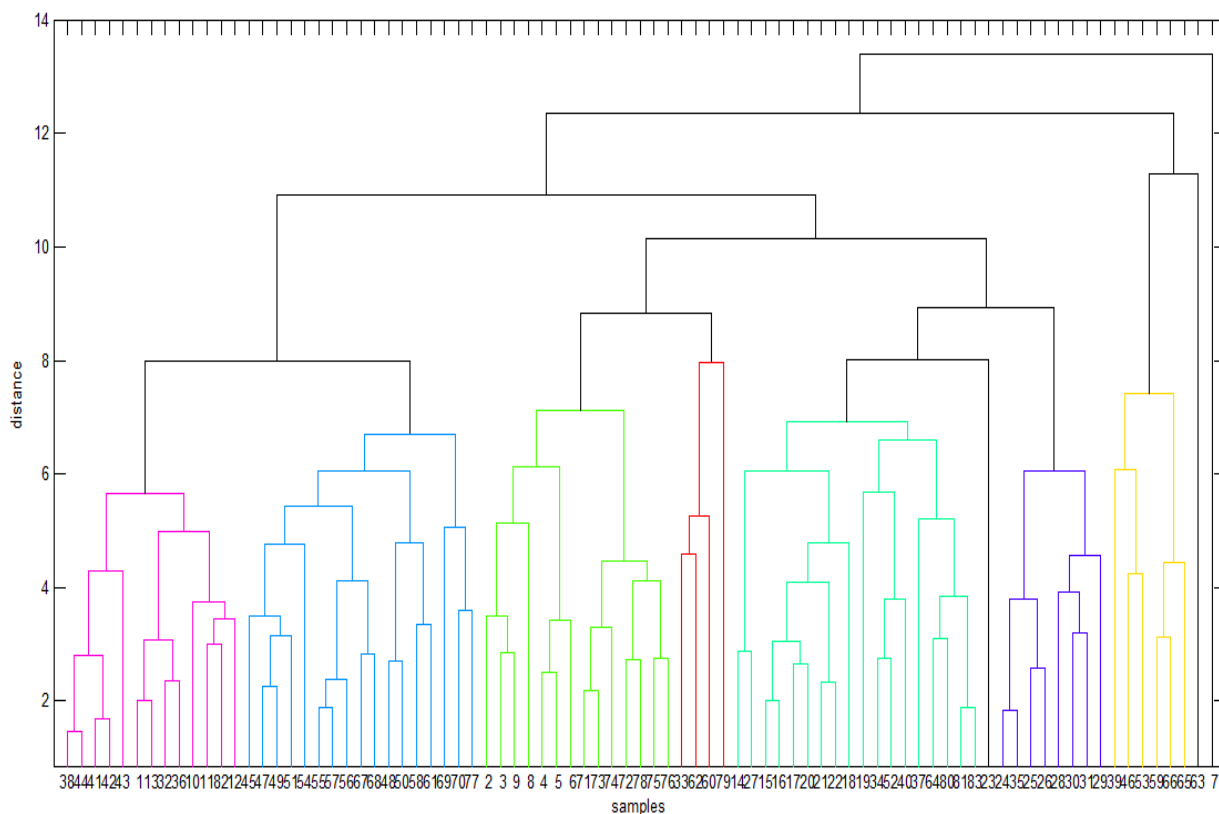


Figura 63 - Dendrograma obtido utilizando resultados de análises por CLAE-DAD através de análises de agrupamentos hierárquicos (HCA) das 13 coletas das 7 espécimens do estudo sazonal.

5.3.3 Quantificação das substâncias isoladas do extrato etanólico de *C. verbenacea*

As curvas analíticas da cordialina A, da *cis*-cordialina A e da diidroxipentametoxiflavona foram obtidas através das concentrações *versus* os valores das áreas dos picos nos cromatogramas. As curvas analíticas foram usadas para quantificação dessas substâncias para o estudo populacional (Figura 64), no qual se pode notar uma variação em relação aos diferentes espécimens analisados. Assim, foi possível verificar uma variação quantitativa significativa de metabólitos não voláteis (substâncias isoladas) na população estudada. Em relação ao triterpeno cordialina A, 16 espécimens (1I4, 1IV1, 2I1, 2II5, 2IV5, 2III3, 3I4, 3II1, 3II5, 3IV1, 5I2, 5II4, 13VI2, 25III2, 25IV5 e 26IV5) apresentaram maior teor, já no caso do flavonoide diidroxipentametoxiflavona, 11 espécimens (1IV4, 5VI1, 5VI3, 14I5, 13I1, 13III4, 25I3, 25II5, 26I3, 26I5 e 26IV1) apresentaram maior teor, porém, a *cis*-cordialina A sempre esteve em menor presença em todos os espécimens do estudo.

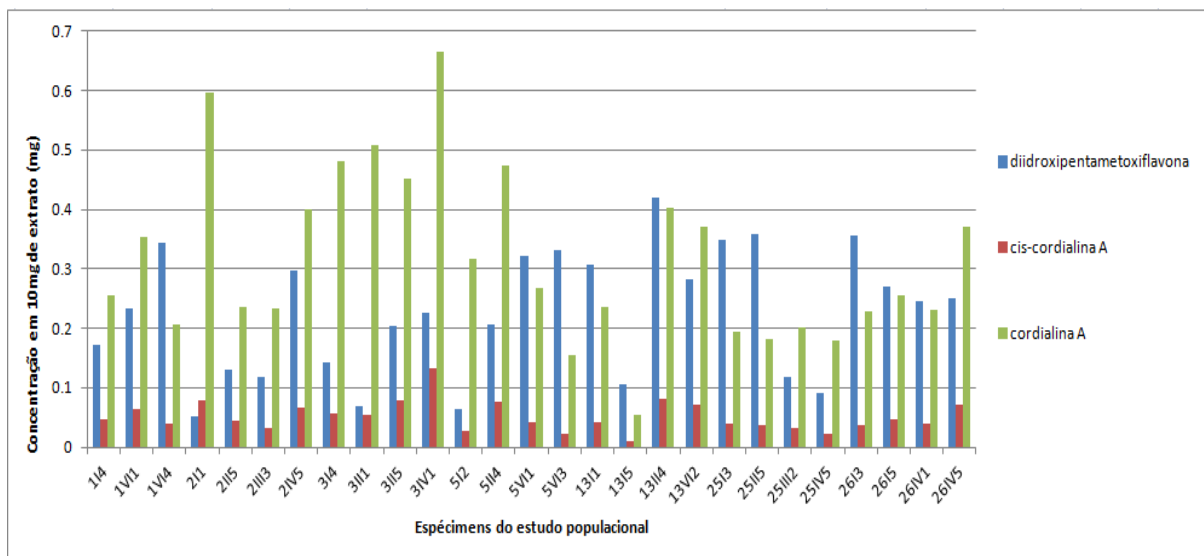


Figura 64 - Concentração de substâncias isoladas encontradas nos extratos etanólicos de espécimens de *C. verbenacea* do estudo populacional.

Nos estudos circadiano e sazonal podemos verificar uma similaridade entre a produção de cordialina A e a *cis*-cordialina A, pois ambas são biossintetizadas pela mesma via metabólica dos terpenos (Figuras 65, 66, 67 e 68). Porém, não foi possível determinar um padrão em relação ao horário de coleta com a produção destes metabólitos secundários, pois cada uma das plantas analisadas segue uma tendência diferente em relação a produção destes triterpenos isolados. Além do fato de que na repetição do estudo circadiano (Figuras 67 e 68) pode-se observar um comportamento diferente do primeiro estudo em relação aos triterpenos podendo estar associado a um estresse causado pelas coletas em ao longo do dia. Foi também confirmada a tendência de maior produção dos triterpenos para os espécimens 2II5 e 3II5 como já discutido anteriormente nas análises quimiométrica, pois conforme demonstrado nos estudos circadianos o espécimen 2II5 tem um pico de produção de 0,79 mg para cordialina A e de 0,23 mg para *cis*-cordialina A, enquanto que o espécimen 3II5 de 0,72 mg para cordialina A e de 0,22 mg para *cis*-cordialina A. No entanto, não foi possível a repetição do estudo para estes dois espécimens (2II5 e 3II5) devido a morte da planta entre o período de uma análise para outra.

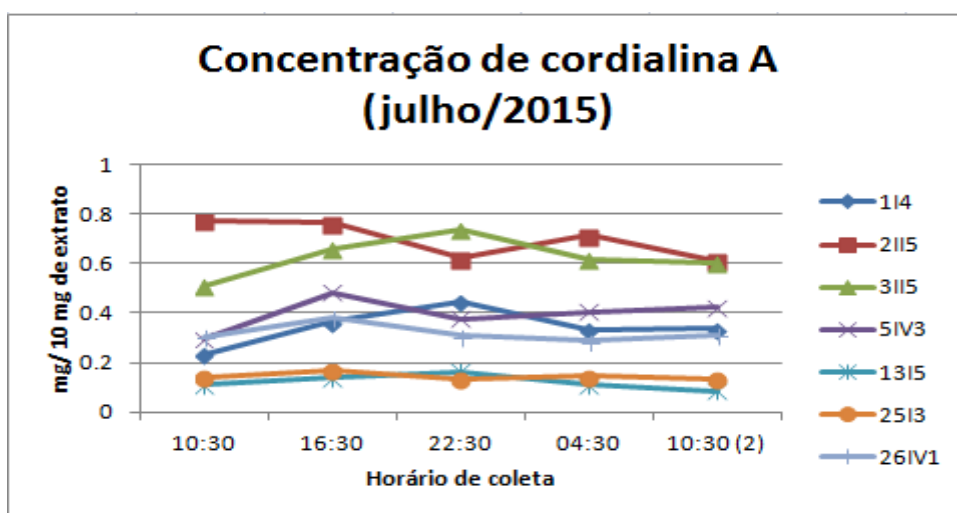


Figura 65 - Concentração de cordialina A no extrato etanólico de espécimens de *C. verbenacea* do estudo circadiano.

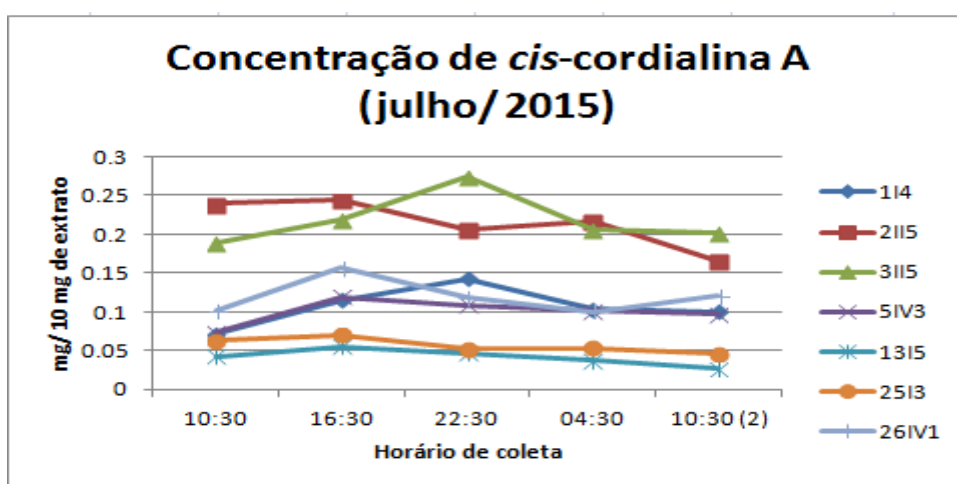


Figura 66 - Concentração de *cis*-cordialina A do extrato etanólico de espécimens de *C. verbenacea* do estudo circadiano.

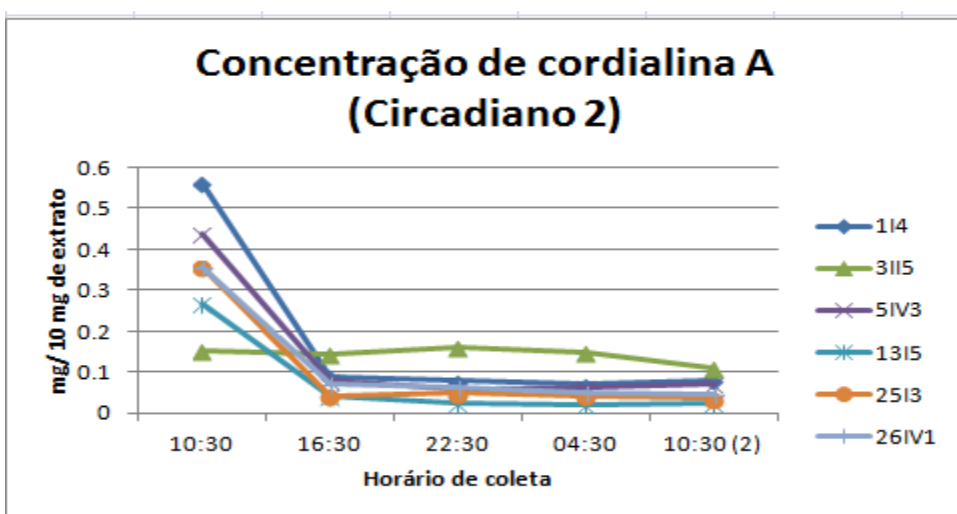


Figura 67 - Concentração de cordialina A do extrato etanólico de espécimens de *C. verbenacea* do estudo circadiano 2.

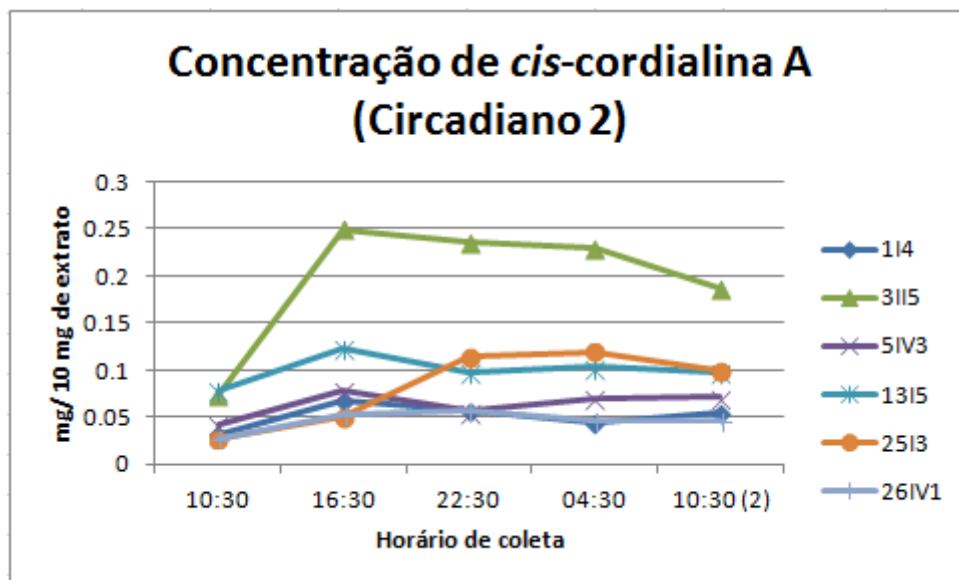


Figura 68 - Concentração de *cis*-cordialina A do extrato etanólico de espécimens de *C. verbenacea* do estudo circadiano 2.

Porém, para o estudo sazonal (Figuras 69 e 70) verificamos uma tendência de maior produção, dos triterpenos analisados, nos meses de março e maio de 2015 e janeiro de 2016 para a maioria das plantas analisadas. Esta maior produção pode estar relacionada com a queda na temperatura e no índice pluviométrico, porém o espécimen 2II5 foge completamente da tendência de produção dos demais, tendo seu pico de produção no mês de julho para a cordialina A. No entanto, a produção do outro triterpeno, a *cis*-cordialina A, é maior de janeiro a maio, porém nesse período se tem uma queda na temperatura e índice pluviométrico, estando relacionado com as demais plantas, que demonstram melhores produções dessas substâncias durante a queda de temperatura e chuvas no ano. Pois em estudo realizado por Yariwake e colaboradores (2005) da variabilidade química sazonal em *Maytenus aquifolium* Mart. (Celastraceae), conhecida como espinheira-santa, através da análise das substâncias presentes nas folhas, ao longo das quatro estações em dois anos, evidenciou que na amostra coletada na primavera um maior teor de flavonoides e fenóis totais, e a amostra do inverno apresentou um maior teor de triterpenos. Desta forma, podemos assim relacionar que nos meses de temperaturas mais amenas se possui um maior teor para flavonoides e nos meses mais frio uma maior produção de triterpenos, fato este que corrobora com os dados apresentados pela quantificação dos dois triterpenos isolados e quantificados nos estudos circadiano em dois diferentes períodos do ano e sazonal. O estudo foi conclusivo para os dados observados na análise quimiométrica do estudo sazonal, onde foi observada uma maior tendência de produção dos triterpenos analisados para os espécimens 2II5 e 3II5 conforme pode-se observar nos gráficos de sazonalidade acima.

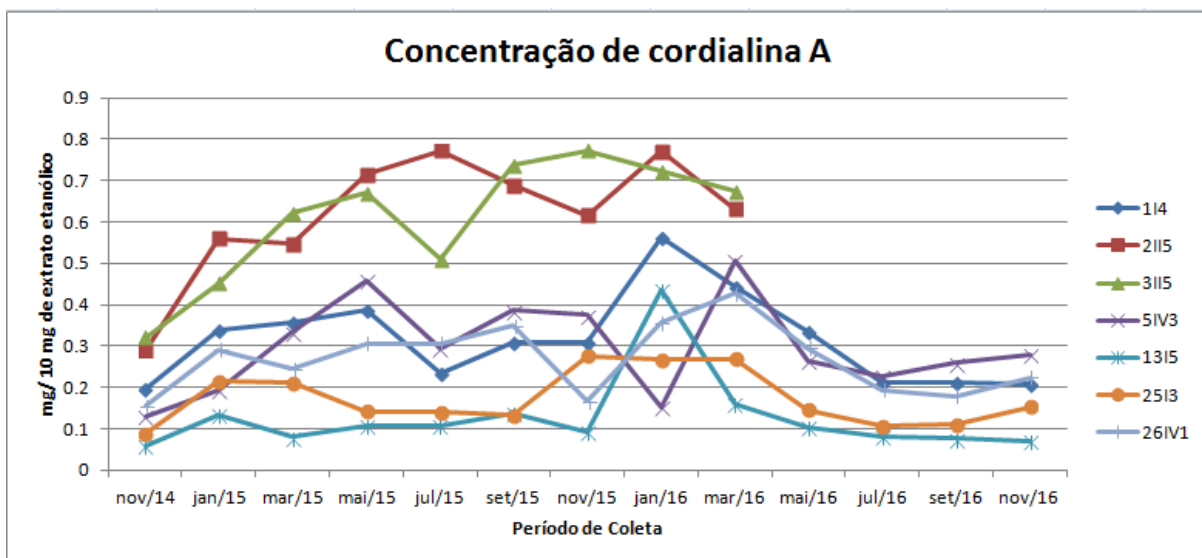


Figura 69 - Concentração de cordialina A no extrato etanólico de espécimens de *C. verbenacea* do estudo sazonal. Os espécimens 2II5 e 3II5 não apresentaram teor no mês de maio/2016 a Nov/2016 devido a insuficiência de massa foliar para obtenção do extrato etanólico.

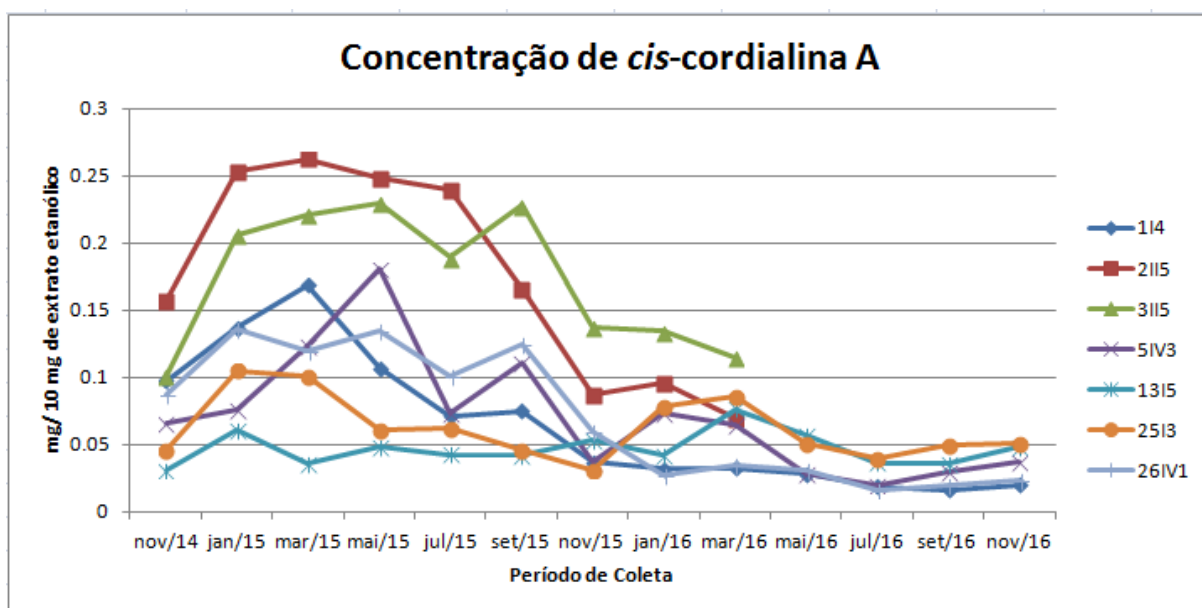


Figura 70 - Concentração de cis-cordialina A do extrato etanólico de espécimens de *C. verbenacea* do estudo sazonal. Os espécimens 2II5 e 3II5 não apresentaram teor no mês de maio/2016 a Nov/2016 devido a insuficiência de massa foliar para obtenção do extrato etanólico.

Ao se realizar uma análise estatística (ANOVA) para verificar a influência do horário de coleta e época do ano no teor dos triterpenos, constatou-se que o horário de coleta (estudos circadianos 1 e 2, Figuras 71 a 74), não são significativos em relação a produção destas substâncias, possuindo $P > 0,05$. No entanto, no estudo sazonal (Figuras 75 e 76), observou-se um $P < 0,05$, o que demonstra que o período do ano em que as plantas são coletadas influencia significativamente no teor dos triterpenos.

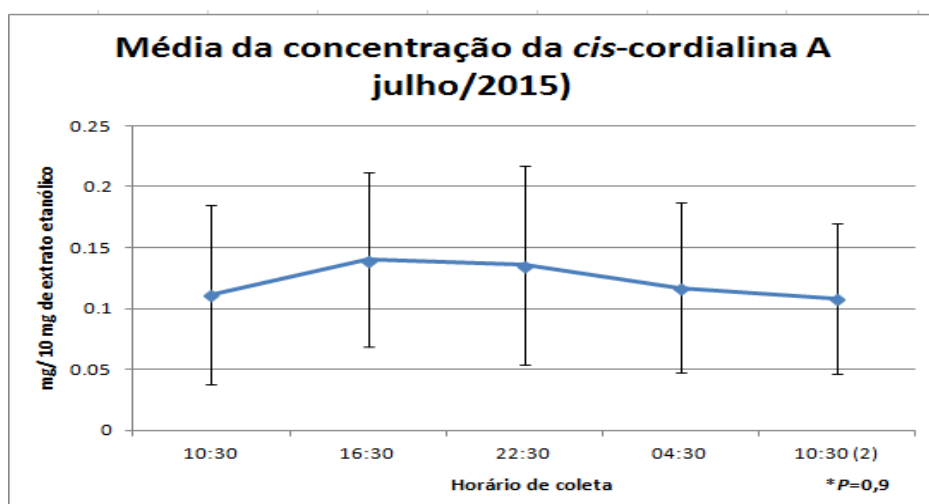


Figura 71 - Média do rendimento de *cis*-cordialina A dos espécimens do estudo circadiano (1)

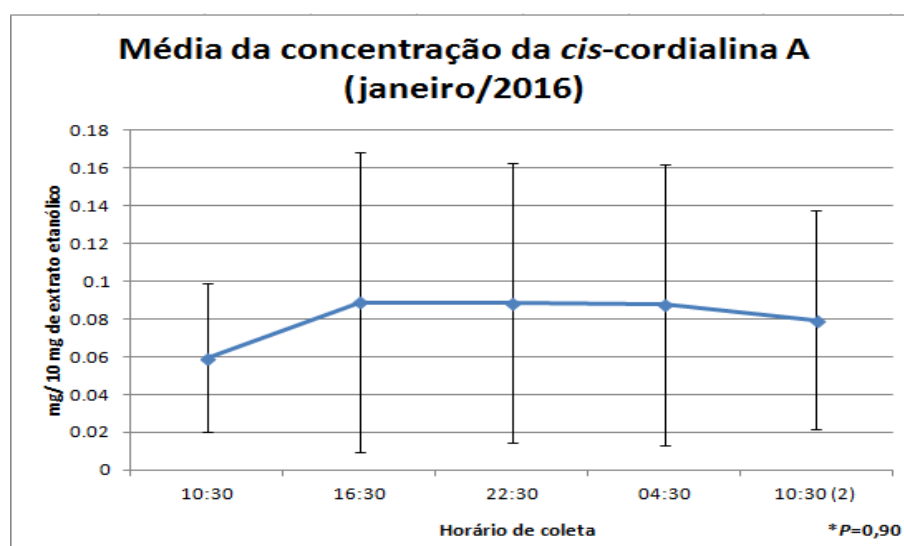


Figura 72 - Média do rendimento de *cis*-cordialina A dos espécimens do estudo circadiano (2)

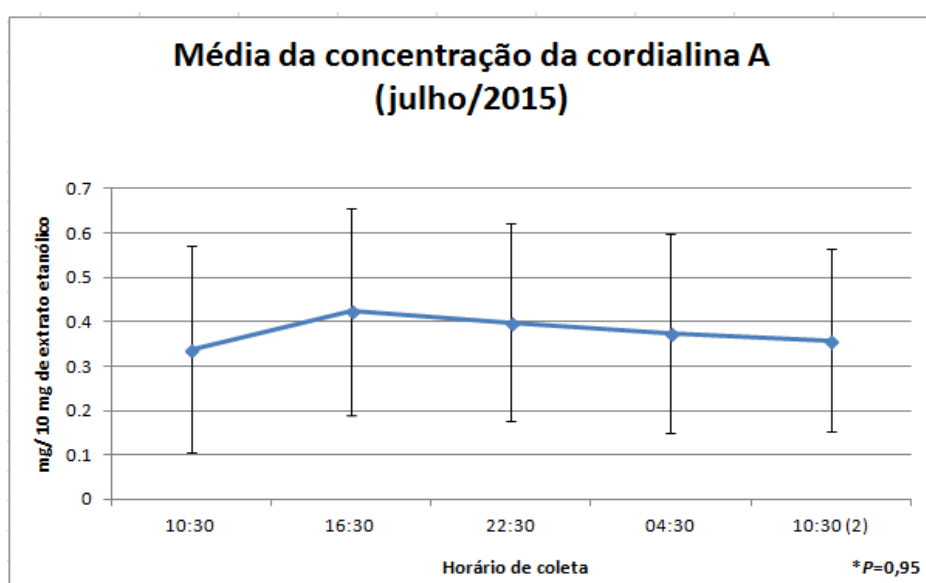


Figura 73 - Média do rendimento de cordialina A dos espécimens do estudo circadiano (1)

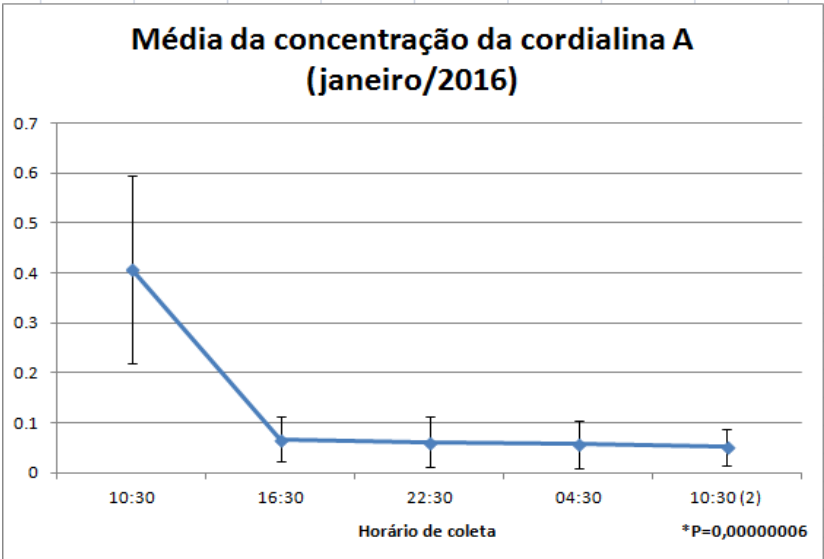


Figura 74 - Média do rendimento de cordialina A dos espécimens do estudo circadiano (2)

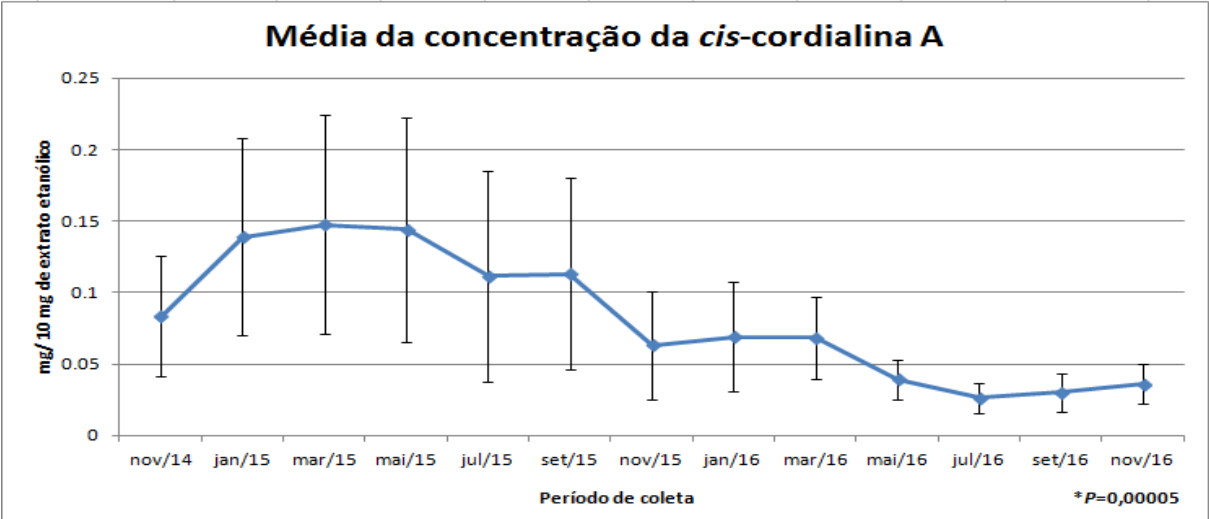


Figura 75 - Média do rendimento de *cis*-cordialina A dos espécimens do estudo sazonal

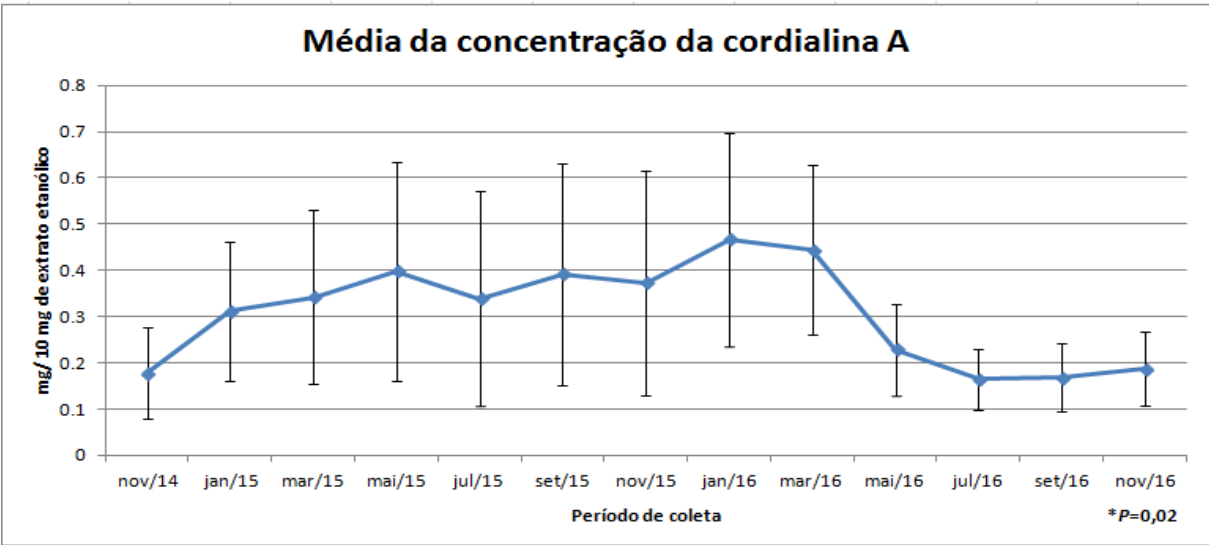


Figura 76 - Média do rendimento de cordialina A dos espécimens do estudo sazonal

Foi quantificada também outra substância isolada do extrato etanólico de *C. verbenacea*, desta vez um flavonoide (diidroxipentametoxiflavona) (Figuras 77, 78 e 79).

Para o estudo circadiano (Figura 77) foi verificado uma maior quantidade desse metabólito secundário no horário das 16:30 h, horário esse de transição de uma temperatura mais elevada para uma temperatura mais amena em relação aos demais horários de coleta. Na repetição do estudo circadiano (Figura 78) pode-se observar a tendência de alguns dos espécimens de apresentar maior teor da substância do horário das 16:30 h.

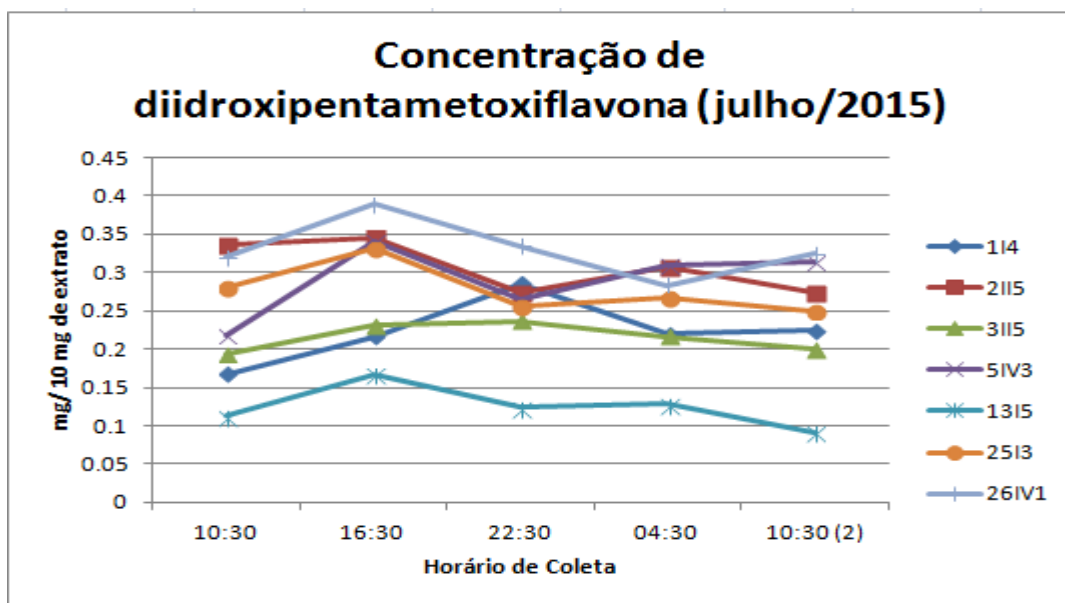


Figura 77 - Concentração de diidroxipentametoxiflavona no extrato etanólico de espécimens de *C. verbenacea* do estudo circadiano.

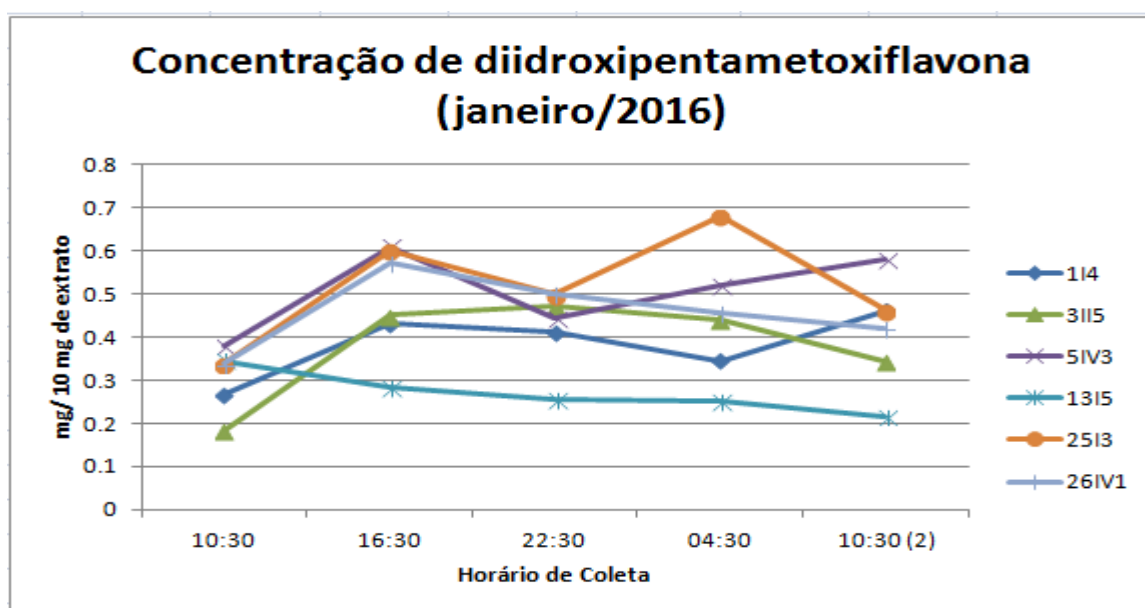


Figura 78 - Concentração de diidroxipentametoxiflavona no extrato etanólico de espécimens de *C. verbenacea* do estudo circadiano 2.

Já para o estudo sazonal (Figura 79) foi verificado uma maior tendência de produção desse metabólito entre os meses de janeiro a março de 2015 e janeiro a março de 2016, estando também relacionado ao período de transição de temperaturas mais elevadas para temperaturas mais amenas. Ambos os estudos circadiano e sazonal para o flavonoide analisado foi conclusivo para os dados observados na análise quimiométrica, onde foi observada uma maior tendência de produção deste flavonoide para os espécimens 25I3 e 26IV1

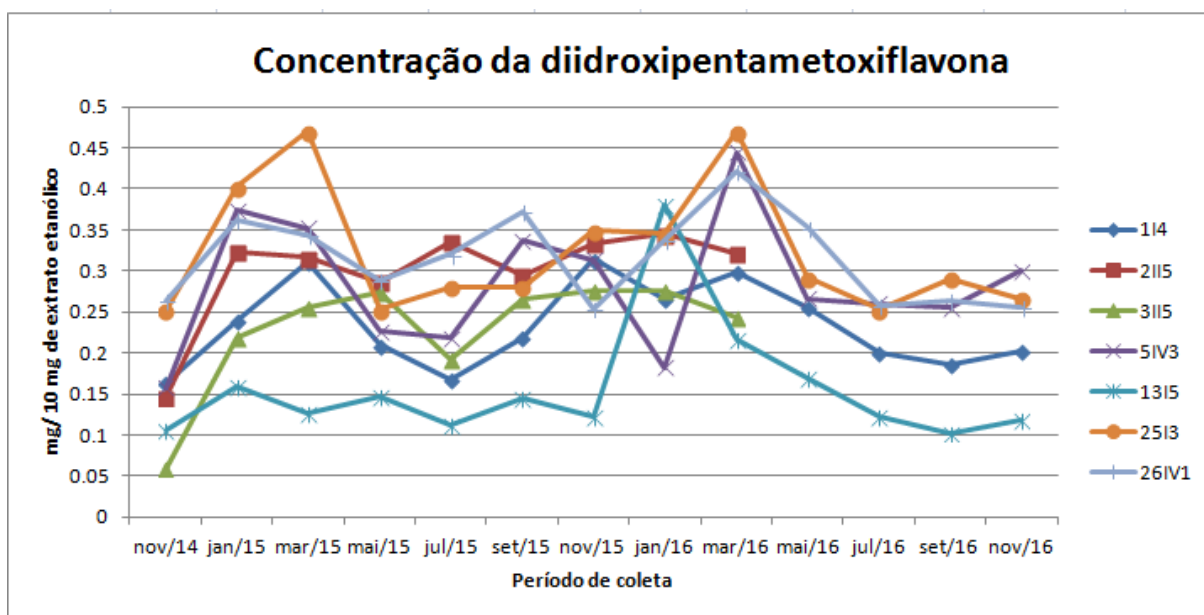


Figura 79 - Concentração de diidroxipentametoxiflavona no Extrato etanólico de espécimens de *C. verbenacea* do estudo sazonal. Os espécimens 2II5 e 3II5 não apresentaram rendimento no mês de maio/2016 a Nov/2016 devido a insuficiência de massa foliar para obtenção do extrato etanólico.

. Ao realizar-se uma análise estatística (ANOVA) para verificar a influência do horário de coleta e da época do ano no teor da diidroxipentametoxiflavona, constatou-se que o horário de coleta (estudos circadianos 1 e 2) (Figuras 80 e 81), não foi significativo em relação a produção desta substância, possuindo $P > 0.05$. No entanto, no estudo sazonal (Figura 82), observou-se um $P < 0.05$, o que demonstra que os períodos do ano em que as plantas são coletadas influenciam significativamente na produção deste flavonoide.

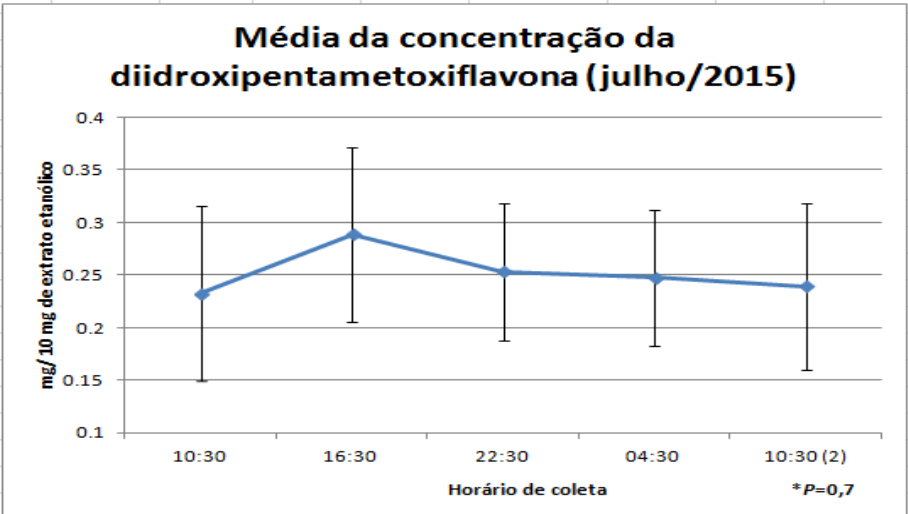


Figura 80 - Média do rendimento da dihidroxipentametoxiflavona dos espécimens do estudo circadiano (1)

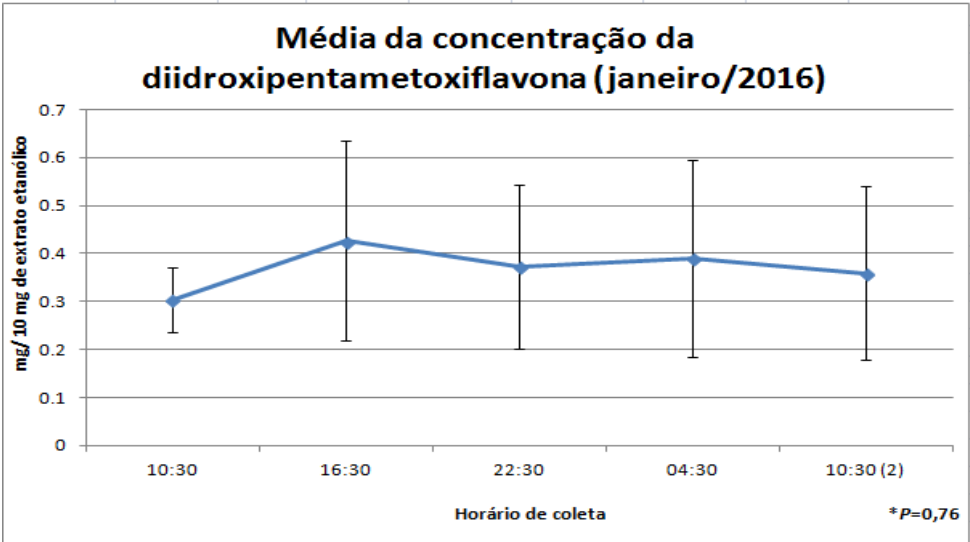


Figura 81 - Média do rendimento da dihidroxipentametoxiflavona dos espécimens do estudo circadiano (2)

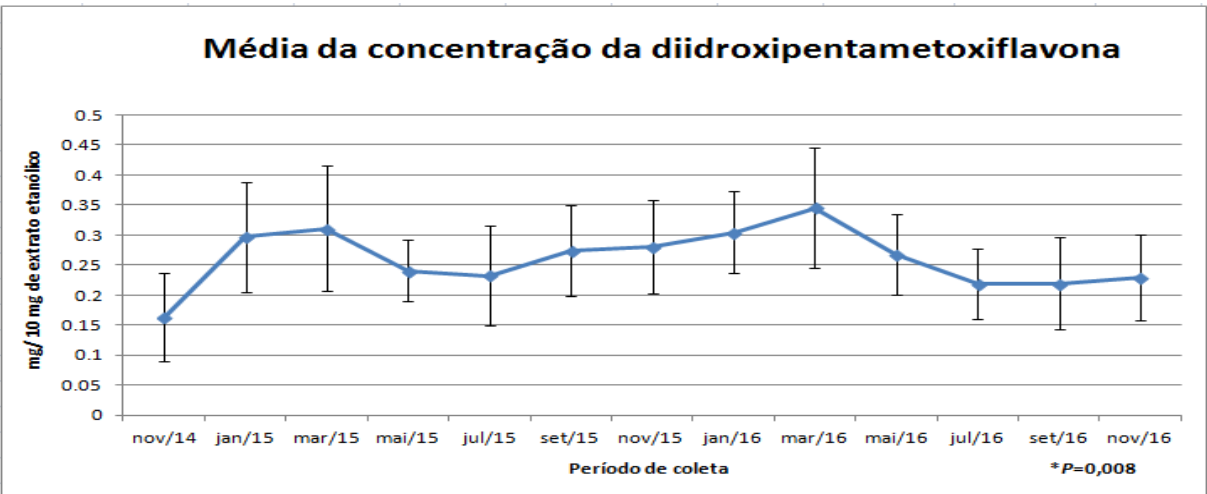


Figura 82 - Média do rendimento da dihidroxipentametoxiflavona dos espécimens do estudo sazonal.

5.4 Análise dos óleos essenciais de folhas de *C. verbenacea* dos estudos de variabilidade química populacional, sazonal e circadiana

O rendimento de óleo essencial dos 27 espécimes foi variável como apresentado no gráfico abaixo (Figura 83).

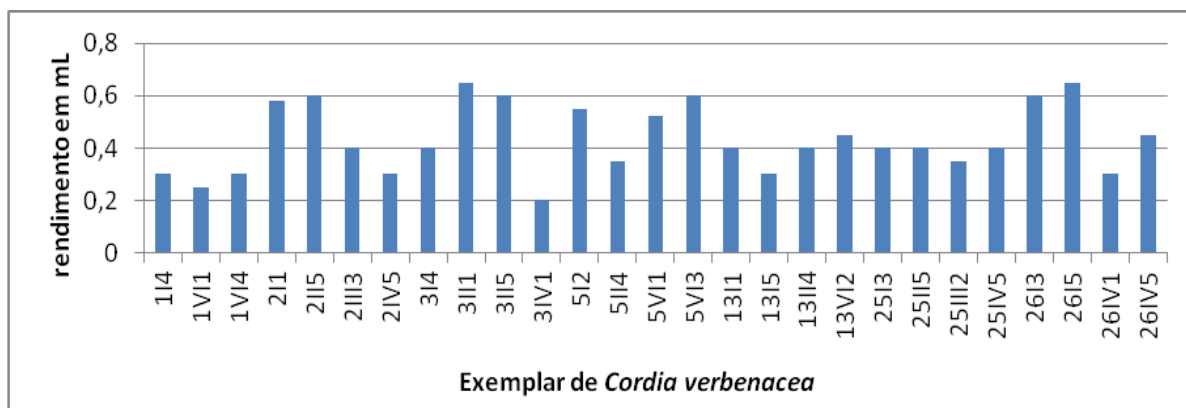


Figura 83 - Rendimento de óleo essencial (mL/30 g de droga vegetal) de 27 espécimens (análise intraespecífica) de *C. verbenacea*.

A análise do gráfico acima já demonstra uma diferença entre os espécimens, diante do rendimento do óleo essencial obtido de cada planta, onde pode-se observar o espécimen 3IV1 com menor rendimento (0,2 mL/30 g ou 0,7 mL/100 g) e os espécimens 3II1 e 26I5 com os maiores rendimentos (0,65 mL/30 g ou 2,2 mL/100 g cada). Além disso, foi observada diferença de coloração do óleo essencial de cada um dos espécimens (Figura 84 e Tabela 20), variando de amarelo claro, amarelo, esverdeado e azul. Essas duas diferenças são sinais de uma variabilidade química entre os 27 espécimens do estudo intraespecífico. Montanari Júnior (2011) em um estudo com 37 espécimens de *C. verbenacea* já havia evidenciado as várias tonalidades de colorações dos óleos essenciais, porém não determinou os fatores para essa diferença.

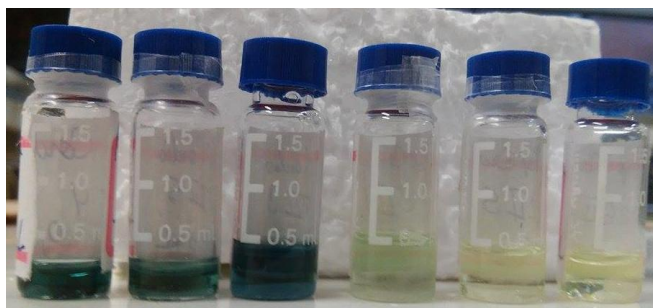


Figura 84 - Óleo essencial obtido de espécimens de *C. verbenacea* referentes à análise populacional, com diferentes colorações.

Tabela 20 - Coloração do óleo essencial de 27 espécimes de *C. verbenacea*.

Espécime de <i>C. verbenacea</i>	Coloração do óleo essencial
1I4 **	Azul
1VI1	Azul
1VI4	Azul
2I1	Amarelo claro
2II5 **	Amarelo claro
2III3	Amarelo
2IV5	Amarelo
3I4	Amarelo claro
3II1	Amarelo claro
3II5 **	Azul
3IV1	Amarelo claro
5I2	Amarelo
5II4	Amarelo claro
5VI1	Azul
5VI3 **	Azul
13I1	Amarelo claro
13II5 **	Amarelo claro
13III4	Amarelo claro
13VI2	Amarelo claro
25I3 **	Amarelo claro
25II5	Azul
25III2	Amarelo claro
25IV5	Amarelo claro
26I3	Amarelo claro
26I5	Amarelo claro
26IV1 **	Amarelo claro
26IV5	Amarelo claro

** Espécimens escolhidas para o estudo sazonal.

Os teores de óleo essencial dos 7 espécimens utilizados nos estudos de sazonalidade e circadiano também apresentaram diferenças, conforme apresentados nos gráficos abaixo (Figuras 85, 86 e 87). Pode-se observar que nos estudos circadianos se tem um maior teor de dos óleos no horário das 04:30 da manhã, enquanto que no estudo sazonal verifica-se maiores teores nos meses de janeiro e julho de 2015 e janeiro e maio de 2016.

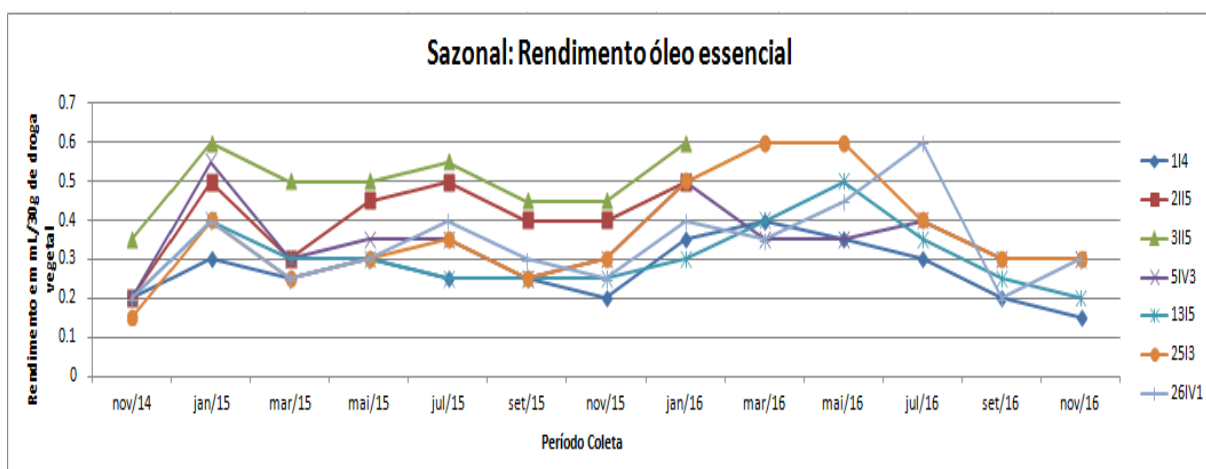


Figura 85 - Rendimento do óleo essencial dos espécimens do estudo sazonal de *C. verbenacea*. Os espécimens 2II5 e 3II5 não apresentaram rendimento no mês de março/2016 devido a insuficiência de massa foliar para extração do óleo essencial.

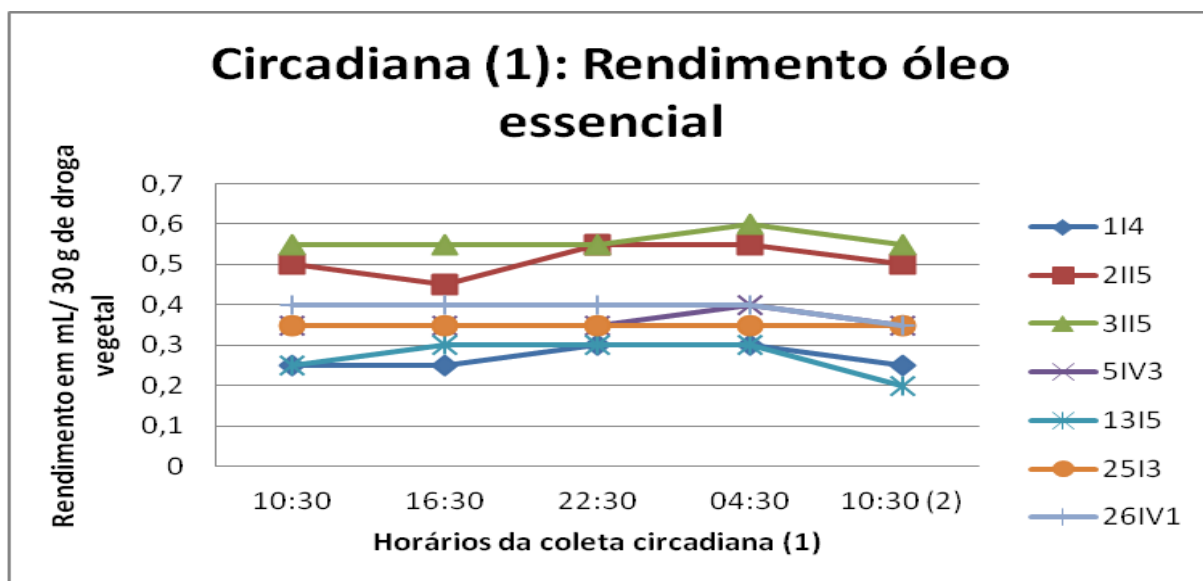


Figura 86 - Rendimento do óleo essencial dos espécimens do estudo circadiano (1).

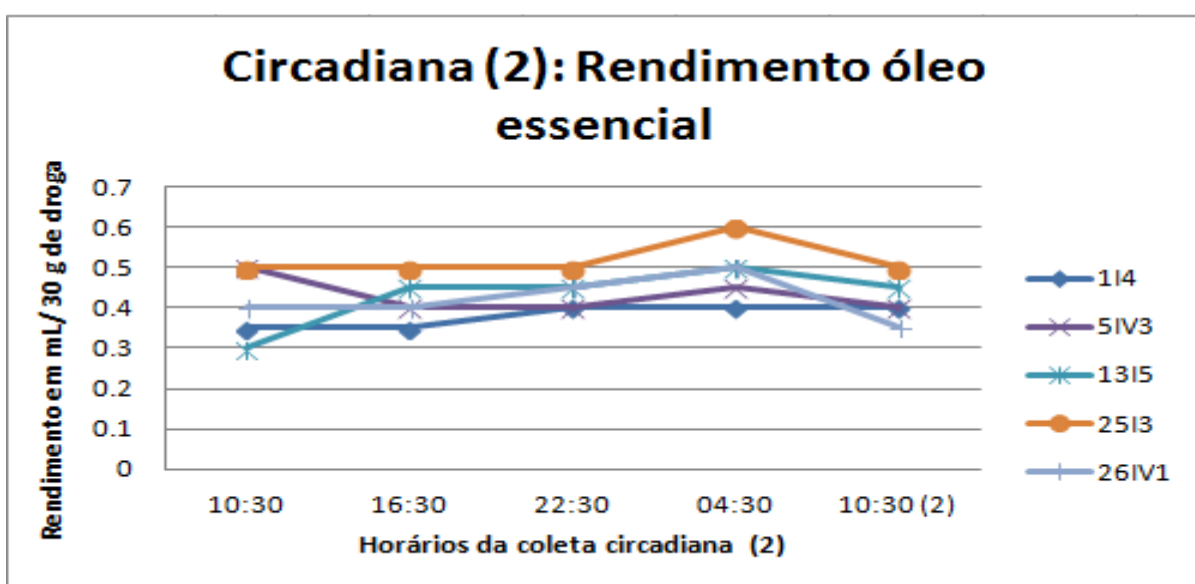


Figura 87 - Rendimento do óleo essencial dos exemplares do estudo circadiano (2) de *C. verbenacea*.

Durante cada extração de óleo essencial, foi verificado que os óleos possuíam colorações diferentes, e em algumas espécimens do estudo sazonal estas colorações sofreram alterações ao longo das coletas, como o espécimens 1I4 o qual teve coloração azul na primeira coleta e esverdeada nas demais e o espécimens 5VI3 que nas coletas 2 e 4 apresentou coloração esverdeada, enquanto que nas demais coleta sua coloração foi amarelo claro (Tabela 21).

Tabela 21 - Coloração do óleo essencial das espécimens do estudo sazonal de *C. verbenacea*.

Coleta	1I4	2II5	3II5	5VI3	13I5	25I3	26IV1
1-nov/14	Azul	Amarelo Claro	Esverdeado	Amarelo Claro	Amarelo Claro	Amarelo Claro	Amarelo
2-jan/15	Esverdeado	Amarelo Claro	Esverdeado	Esverdeado	Amarelo Claro	Amarelo Claro	Amarelo Claro
3-mar/15	Esverdeado	Amarelo Claro	Esverdeado	Amarelo Claro	Amarelo Claro	Amarelo Claro	Amarelo Claro
4-mai/15	Esverdeado	Amarelo Claro	Esverdeado	Esverdeado	Amarelo Claro	Amarelo Claro	Amarelo Claro
5-jul/15	Esverdeado	Amarelo Claro	Esverdeado	Amarelo Claro	Amarelo Claro	Amarelo Claro	Amarelo Claro
6-set/15	Esverdeado	Amarelo Claro	Esverdeado	Amarelo Claro	Amarelo Claro	Amarelo Claro	Amarelo Claro
7-nov/15	Esverdeado	Amarelo Claro	Esverdeado	Amarelo Claro	Amarelo Claro	Amarelo Claro	Amarelo Claro
8-jan/16	Esverdeado	Amarelo Claro	Esverdeado	Amarelo Claro	Amarelo Claro	Amarelo Claro	Amarelo Claro
9-mar/16	Esverdeado	*nd	*nd	Amarelo Claro	Amarelo Claro	Amarelo Claro	Amarelo Claro
10-mai/16	Esverdeado	nd	nd	Amarelo Claro	Amarelo Claro	Amarelo Claro	Amarelo Claro
11 - jul/16	Esverdeado	nd	*nd	Amarelo Claro	Amarelo Claro	Amarelo Claro	Amarelo Claro
12 - set/16	Esverdeado	nd	nd	Amarelo Claro	Amarelo Claro	Amarelo Claro	Amarelo Claro
13 - nov/16	Esverdeado	nd	nd	Amarelo Claro	Amarelo Claro	Amarelo Claro	Amarelo Claro

*nd: quantidade insuficiente de folhas necessárias para extração do óleo essencial

Quanto aos teores de óleos essenciais, ocorreu um maior rendimento nos meses de janeiro e julho de 2015 e janeiro e maio de 2016, podendo estar relacionados aos períodos de maior índice pluviométrico e temperaturas mais elevadas.

Ming e colaboradores (2002) em um estudo sazonal, durante 15 meses, da produção de óleo essencial de *Piper aduncum* L., observaram menor rendimento no teor de óleo essencial no mês de agosto. A queda na temperatura e demais componentes climáticos podem reduzir os metabolismos primário e secundário das plantas, ocasionando uma economia de energia e o metabolismo secundário é preterido (TAIZ & ZEIGER, 1998).

O estudo circadiano também demonstrou diferença de coloração entre os óleos essenciais dos espécimens (Tabela 22). Em relação aos teores dos óleos essenciais, pode-se observar, um maior rendimento no horário das 04:30 h, tanto para o estudo circadiano (1) quanto para o estudo sazonal (2) podendo estar relacionado com o aumento da temperatura após o horário das 04:30 h com o aparecimento do sol. Porém, entra em desacordo com trabalho realizado por Souza e colaboradores (2009) no qual é relatado que o horário das 6:00 h é o qual a planta possui menor teor de óleo essencial de *C. verbenacea* e o horário das 7:00 h é o de maior teor devido a irradiação solar. Sendo assim pode-se concluir que o teor de óleo essencial não está relacionado ao horário de coleta mas sim a diferença de local onde a planta está inserida, sendo necessário um estudo

relacionado a cada local para se verificar o melhor horário para se realizar a colheita e posterior obtenção do óleo essencial.

Tabela 22 - Coloração dos óleos essenciais dos espécimens dos estudos circadiano (1) e (2) de *C. verbenacea*.

Espécimens	Circadiano (1)	Circadiano (2)
1I4	Esverdeado	Esverdeado
2II5	Amarelo claro	nd*
3II5	Esverdeado	nd*
5IV3	Amarelo claro	Amarelo claro
13I5	Amarelo claro	Amarelo claro
25I3	Amarelo claro	Amarelo claro
26IV1	Amarelo claro	Amarelo claro

*nd: quantidade insuficiente de folhas necessárias para extração do óleo essencial

Para estudo circadiano (2) dois espécimens (2II5 e 3II5) sofreram interferência como o não crescimento foliar e ataque de insetos, dificultando sua coleta e a obtenção de uma quantidade necessária para a extração do óleo essencial. Dessa forma, as análises para a repetição do estudo circadiano não contaram com estes espécimens.

Alguns autores relatam que em condições estressantes as plantas podem ter uma maior produção de óleo essencial (SIANI et al, 2000; MING, 1998; MORVILLO & GIL, 2004). De acordo com Corrêa Júnior e colaboradores (1994) ocorre uma elevação na densidade das estruturas secretoras na produção de óleo. Esses fatores podem estar relacionados às plantas do estudo, pois a coleta circadiana oferece grande estresse a as plantas em questão devido à coleta de folhas durante 24 h. Em relação ao estudo sazonal o período de maior produção de óleo essencial é também o período onde a planta está sujeita ao maior índice de chuvas e maiores temperaturas, tais fatores também podem ter ocasionado estresse às plantas estudadas.

Ao realizar-se uma análise estatística (ANOVA) para verificar a influência do horário de coleta e da época do ano nos teores dos óleos essenciais, constatou-se que o horário de coleta (estudos circadianos 1 e 2) (Anexos 88 e 89), não são significativos em relação aos teores de óleos essenciais, possuindo $P > 0.05$. No entanto, no estudo sazonal (Anexo 90), observou-se um $P < 0.05$, o que demonstra que o período do ano em que as plantas são coletadas influencia significativamente nos teores de óleo essencial.

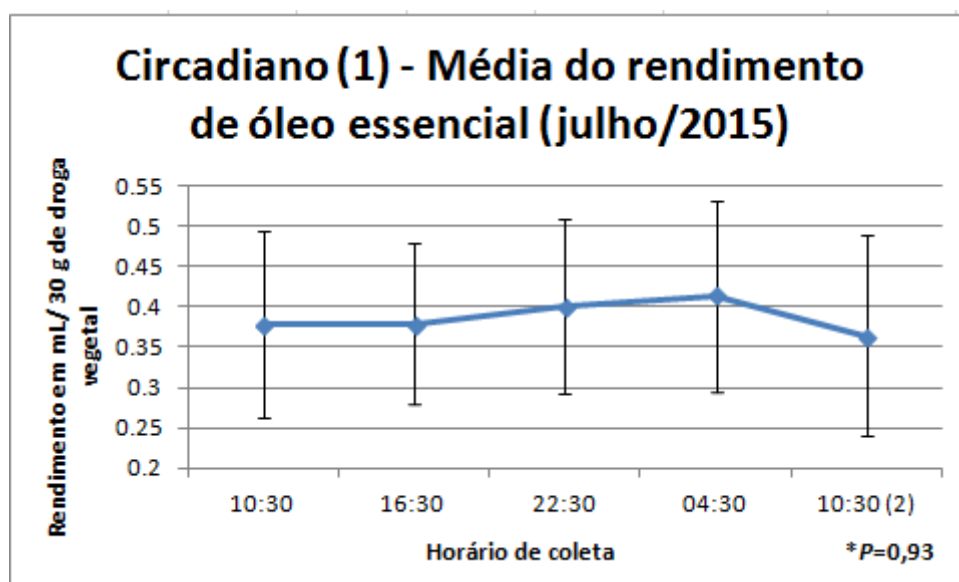


Figura 88 - Média do rendimento de óleo essencial dos espécimens do estudo circadiano (1).

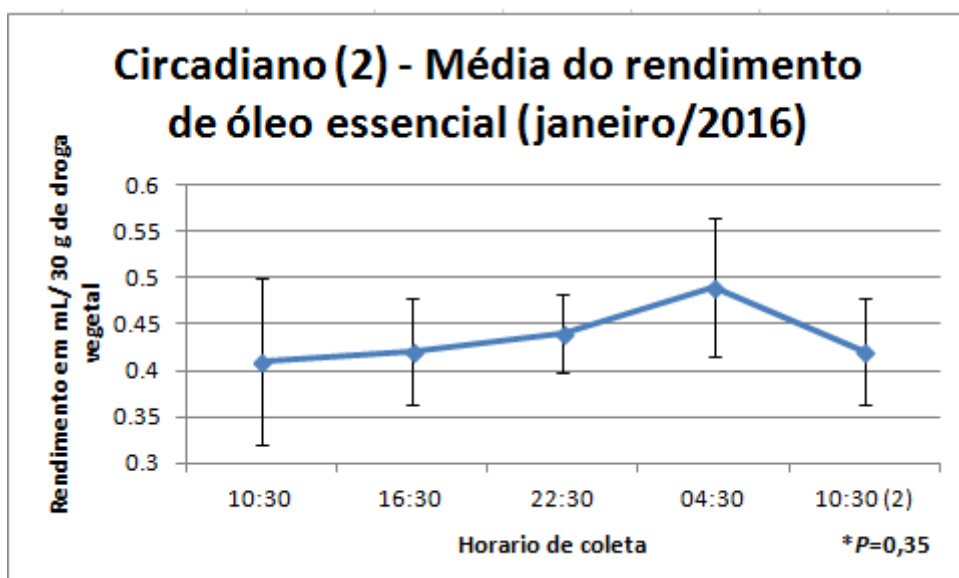


Figura 89 - Média do rendimento de óleo essencial dos espécimens do estudo circadiano (2).

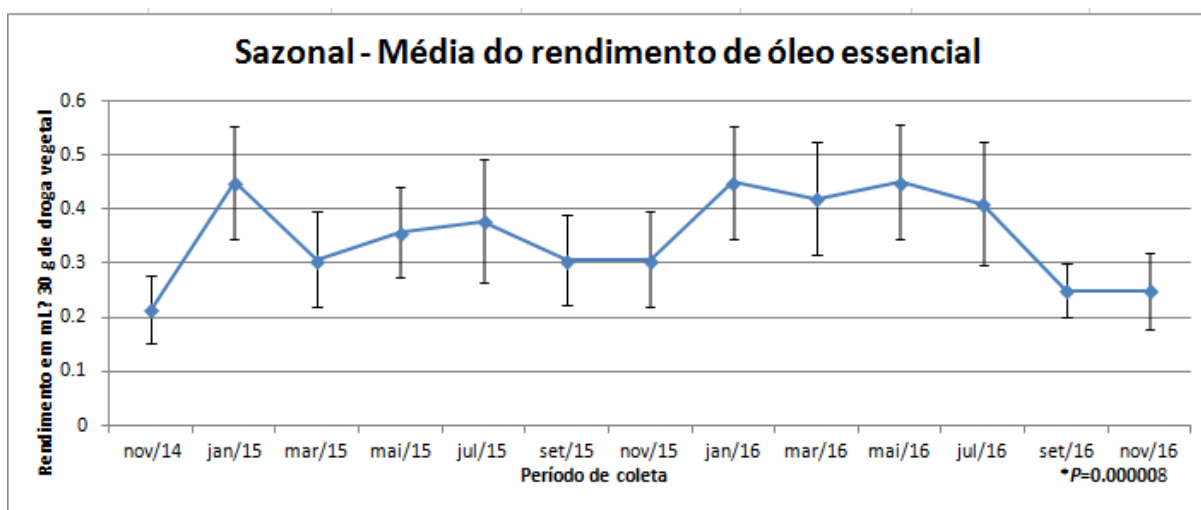


Figura 90 - Média do rendimento de óleo essencial dos espécimens do estudo sazonal.

5.4.1 Análise dos óleos essenciais de folhas de *C. verbenacea* dos estudos populacional, sazonal e circadiano utilizando ferramentas quimiométricas

Na análise dos óleos essenciais por cromatografia em camada delgada (CCD) em fase normal foram empregadas duas condições de fase móvel: (1) para a obtenção de um perfil cromatográfico dos óleos essenciais (Figuras 91); e (2) para a identificação dos padrões α -humuleno e *trans*-cariofileno (Figuras 92). A condição (2) foi necessária uma vez que os padrões apresentaram $R_f = 1$ na condição (1) (Figura 91), já que ambos são sesquiterpenos hidrocarbonetos e, portanto, apresentam baixa polaridade; por isso, a necessidade de utilizar hexano como fase móvel para analisá-los.

A análise dos óleos essenciais por CCD evidenciou algumas diferenças na composição química, verificando-se uma banda de coloração azul em cada um dos óleos essenciais dos espécimens cujo óleo essencial possuía coloração azul/esverdeada. Esta análise evidenciou também oito perfis químicos diferentes de óleos essenciais, onde observamos o seguinte agrupamento, através da observação da presença ou ausência de cada banda: grupo A - 1I4, 1V1, 1VI4, 25II5; grupo B - 2I2, 2II5, 5II4, 13II5, 13VI2, 26I5, 26IV1; grupo C - 2III3, 3I2; Grupo D - 3II1, 5I2, 25II2, 25IV5; grupo E - 2IV5, 5VI1, 5VI3; grupo F - 3IV1, 13I1, 13II4, 26IV5; grupo G - 3II5; grupo D - 25I2.

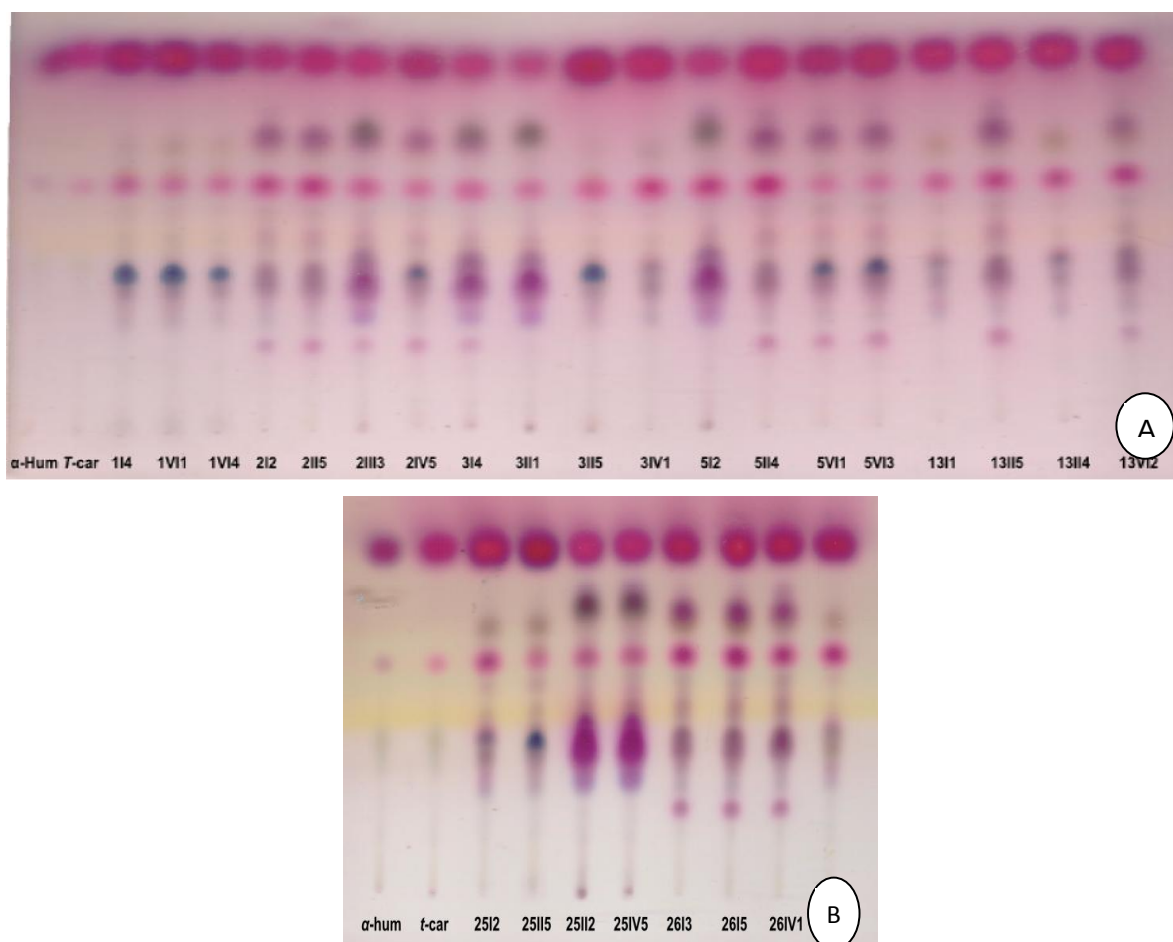


Figura 91 - Cromatoplasas referentes à análise dos óleos essenciais dos 27 espécimes de *C. verbenacea* do estudo populacional. Condições cromatográficas: sílica gel; fase móvel tolueno:acetato de etila 92:8; revelador: anisaldeído sulfúrico; distância de eluição: 9 cm. (a) - amostras, da esquerda para direita: α -humuleno, *trans*-cariofileno (padrões), 1I4, 1VI1, 1VI4, 2I2, 2II5, 2III3, 2IV5, 3I4, 3II1, 3II5, 3IV1, 5I2, 5II4, 5VI1, 5VI3, 13I1, 13II5, 13II4, 13VI2. (b) - amostras, da esquerda para direita α -humuleno, *trans*-cariofileno (padrões), 25I2, 25II5, 25III2, 25IV5, 26I3, 26I5, 26IV1, 26IV5.

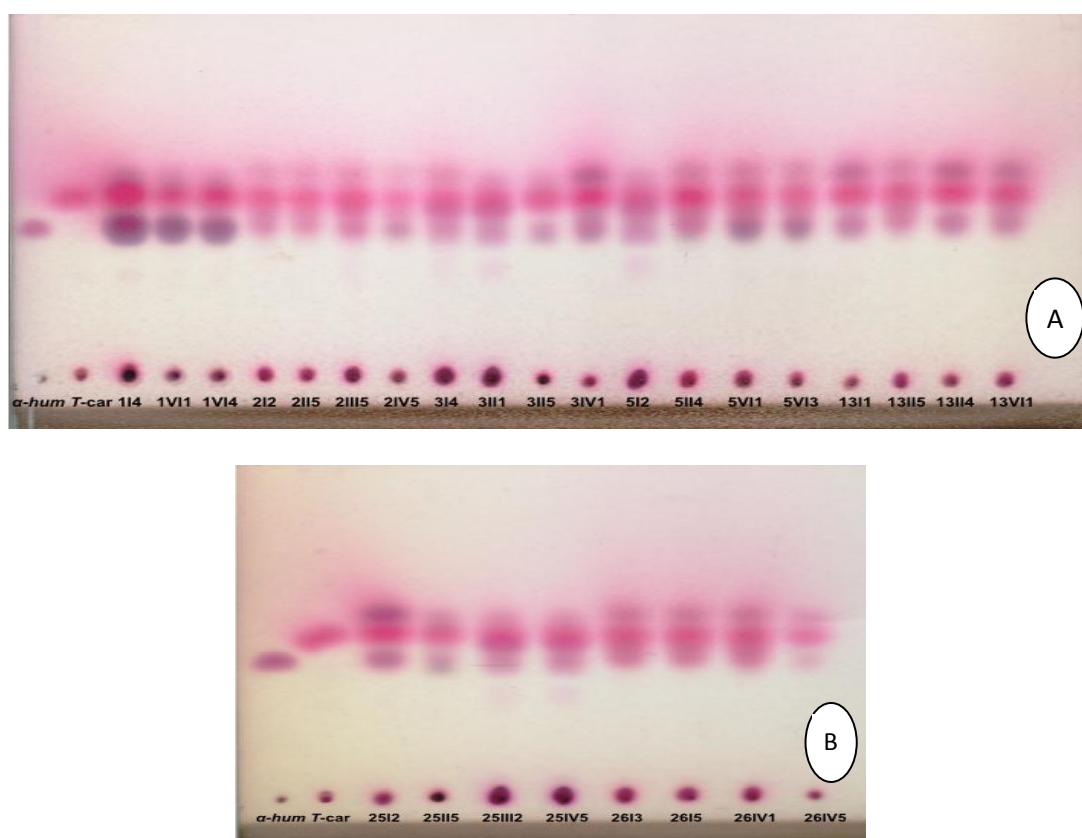


Figura 92 - Cromatoplasas referentes à análise dos óleos essenciais dos 27 espécimes de *C. verbenacea* do estudo populacional. Condições cromatográficas: sílica gel; fase móvel hexano; revelador: anisaldeído sulfúrico; distância de eluição: 9 cm. (a) - amostras, da esquerda para direita: α -humuleno, *trans*-cariofileno (padrões), 1I4, 1VI1, 1VI4, 2I2, 2II5, 2III3, 2IV5, 3I4, 3II1, 3II5, 3IV1, 5I2, 5II4, 5VI1, 5VI1, 13I1, 13II5, 13II4, 13VI2. (b) - amostras, da esquerda para direita α -humuleno, *trans*-cariofileno (padrões), 25I2, 25II5, 25III2, 25IV5, 26I3, 26I3, 26I5, 26IV1, 26IV5.

Os dados obtidos nas análises cromatográficas dos extratos e dos óleos essenciais respectivamente por CLAE-DAD e por CG-EM foram analisados através do uso de ferramentas quimiométricas, permitindo o agrupamento e a separação dos dados multivariados através das características obtidas pelas técnicas cromatográficas utilizadas, com a finalidade de obter-se um entendimento mais completo e sistematizado dos resultados analíticos. As figuras 93, 94, 95 e 96 demonstram uma análise dos dados obtidos em CCD dos óleos essenciais de *C. verbenacea*, utilizando os fatores de retenção (R_f) de cada banda observada como variáveis. Posteriormente, foi criada uma tabela apenas com a informação se a banda existia (expressa pelo número 1) ou não (expressa pelo número 0) na amostra e os dados foram tratados em um software livre (Past3) que realiza análises de dados multivariados como PCA e HCA. Consequentemente, podemos observar 3 grandes grupos os quais possuem similaridades das amostras dentro deles e 2 amostras que possuem perfis diferentes das demais, possibilitando assim, uma conclusão de diferenciação química entre as amostras.

R _f (tolueno: acetato 93:7)	0.19	0.27	0.31	0.32	0.35	0.39	0.41	0.47	0.54	0.66	0.68	0.7	0.74	0.77	bandas (Hexano 100%)	0,43 (α-humuleno)	0,52 (trans-cariofileno)	0,55
1I4	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1		1		1
1VI1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1		1		1
1VI4	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1		1		1
2II1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1		1		1
2II5	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1		1		1
2III3	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1		1		1
2IV5	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1		1		1
3I4	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1		1		1
3II1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1		1		1
3II5	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1		1		1
3IV1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1		1		1
5I2	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1		1		1
5II4	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1		1		1
5VI1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1		1		1
5VI3	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1		1		1
13I1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1		1		1
13I5	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1		1		1
13II4	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1		1		1
13VI2	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1		1		1
25I3	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1		1		1
25II5	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1		1		1
25III2	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1		1		1
25IV5	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1		1		1
26I3	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1		1		1
26I5	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1		1		1
26IV1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1		1		1
26IV5	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1		1		1

Figura 93 - Matriz construída para análise por PCA e HCA dos dados obtidos por CCD do óleo essencial de 27 espécimes de *C. verbenacea*. Os fatores de retenção (R_f) de cada banda observada foram expressos como variáveis e o preenchimento da matriz foi realizado com informações se a banda existe (expressa pelo número 1) ou não (expressa pelo número 0).

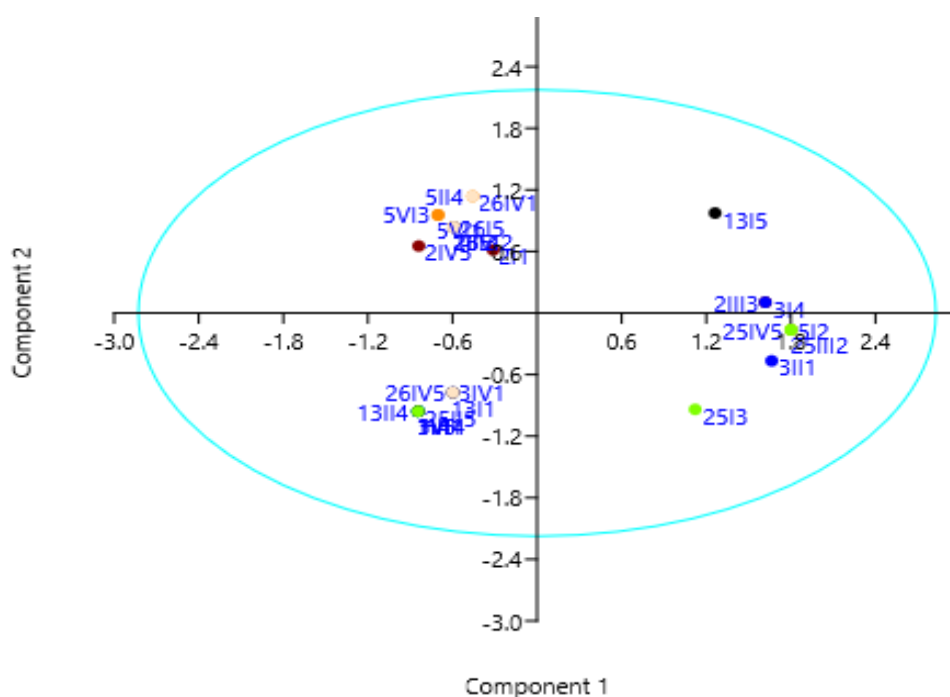


Figura 94 - Gráfico obtido através das análises de componentes principais (PCA) dos óleos essenciais de *C. verbenacea*, onde observamos 3 grandes grupos e dois óleos essenciais isoladas (13I5 e 25I3).

Ao analisar o gráfico de PCA (Figura 94) e o dendrograma de HCA (Figura 95) e comparar os agrupamentos com os valores de R_f observados, foi possível verificar quais

bandas eram comuns a todos os espécimens e quais determinaram diferenças químicas entre os grupos.

Para os espécimens 3II5, 1VI4, 1VI1, 1I4, 13II5, 25II5, 3IV1, 13I5 e 26IV5 uma característica comum é a ausência das bandas com R_f de 0,19 e 0,27. Já o agrupamento que possui os espécimens 5VI1, 5VI3, 2II5, 2IV5, 13VI2, 26I3, 26I5, 2I1, 5II4 e 26IV1, se relaciona por possuir 3 a 5 bandas comuns com valores de R_f 0,19/0,31/0,35/0,68/0,74. O terceiro agrupamento 2III3, 3I4, 3II1, 5I2, 25III2 e 25IV5 é o que possui uma maior similaridade entre os espécimens, pois além de possuírem as bandas comuns a todos os espécimens analisados, possuem outras 4 bandas em comum relacionadas aos R_f 0,27/0,32/0,39/0,70. No entanto, os espécimens 25I3 e 13I5 são os que possuem uma combinação totalmente diferente dentre os espécimens do estudo populacional. Para uma maior afirmação da separação dos óleos azuis/esverdeados, foi realizada uma PLS (Figura 96) onde os dados foram supervisionados, sendo uma parte das amostras servindo como padrões e as demais intercaladas na análise, podendo-se concluir que os óleos possuem diferença significativa entre os espécimens estudados.

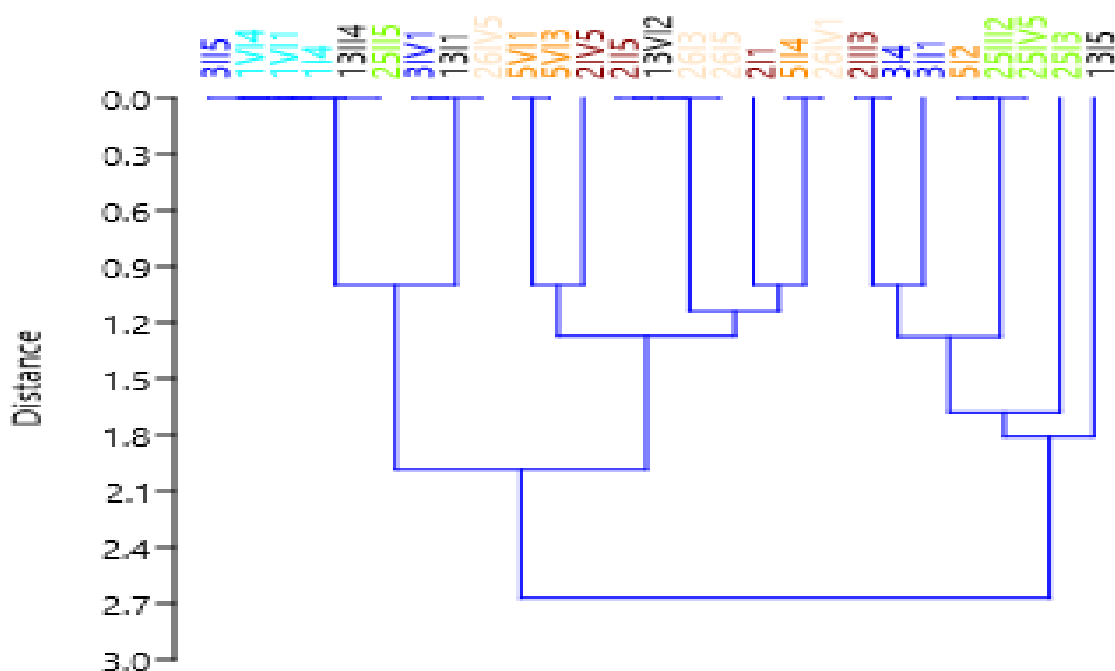


Figura 95 - Dendrograma obtido utilizando através de análises de agrupamentos hierárquicos (HCA) dos óleos de *C. verbenacea*, onde observamos 3 grandes grupos. Fonte: Autoria própria.

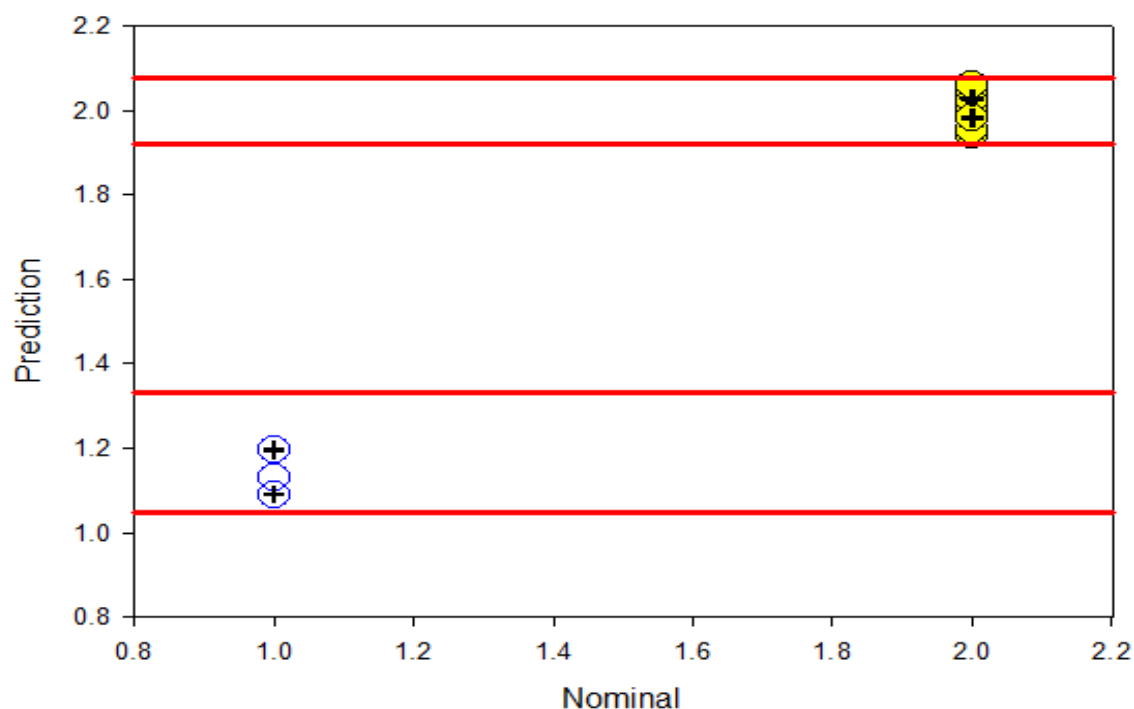


Figura 96 - Gráfico obtido através dos mínimos quadrados parciais (PLS) dos óleos essenciais de *C. verbenacea* por CCD, onde observamos a separação e agrupamentos dos óleos azuis em relação aos óleos amarelos devido as diferenças em seus perfis químicos.

Estes dados foram confirmados posteriormente com as análises dos 27 óleos essenciais por CG-EM, evidenciando as diferenças já observadas na CCD e também se verificando diferenças nas constituições das substâncias majoritárias em cada óleo essencial. O método de análise empregado demonstrou resolução adequada entre os picos observados no cromatograma (Figura 97) para a identificação (similaridade de espectros de massas) e quantificação (normalização das áreas) dos componentes. Três picos majoritários observados correspondem ao α -pineno, α -humuleno e (*E*)-cariofileno, sendo os dois últimos responsáveis pela atividade anti-inflamatória do OE e identificados com o uso de padrões. Na figura 98 estão apontadas as substâncias *trans*-cariofileno e α -humuleno utilizadas para suas quantificações nos óleos essenciais analisados.

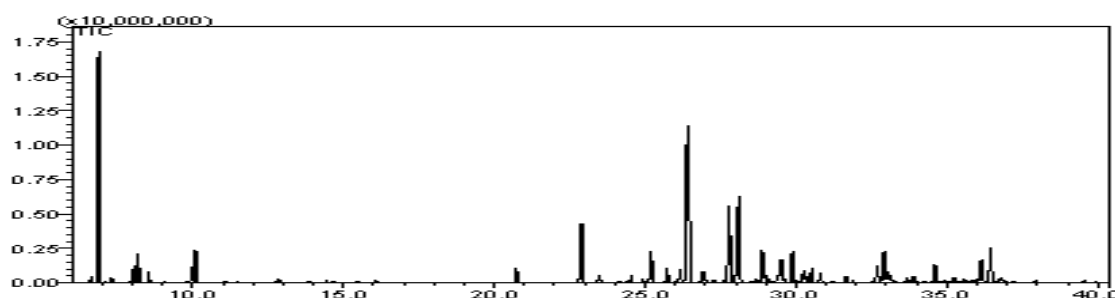


Figura 97 -Cromatograma em CG-EM do óleo essencial de *C. verbenacea*.Condições de análise: 60 a 246° C - 3° C/ min; temperatura do injetor: 240° C; split: 1/20; coluna Rtx-5MS (30m x 0,25 mm d.i.; 0,25 μ m filme interno).

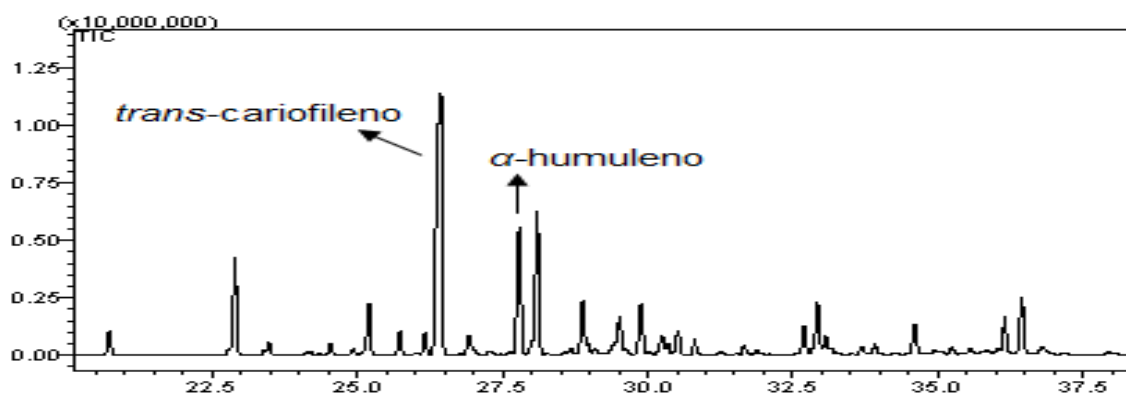


Figura 98 – Expansão do Cromatograma em CG-EM do óleo essencial de *C. verbenacea*. Condições de análise: 60 a 246° C - 3° C/ min; temperatura do injetor: 240° C; split: 1/20; coluna Rtx-5MS (30m x 0,25 mm d.i.; 0,25 µm filme interno).

A tabela 23 demonstra a identificação das substâncias do óleo essencial através de similaridade por espectrometria de massas, na qual, podemos observar que os compostos α -pineno, *trans*-cariofileno, α -humuleno e aloaromadendreno, são os de maior porcentagem em relação aos demais, tais compostos são também marcadores químicos do óleo de *C. verbenacea*.

Tabela 23 - Proposta de identificação de componentes do OE a partir de análises por CG-EM

CG			Proposta de identificação
Pico	tR (min)	Área (%)	
1	6,91	14,64	α -pineno
2	8,07	0,66	sabineno
3	8,21	1,20	β -pineno
4	10,00	0,97	biciclo[3.1.1]hept-2-eno
5	10,11	1,47	cineol
6	22,91	3,27	biciclo[4.1.0]hept-2-eno
7	25,22	1,93	ciclohexano
8	26,46	15,09	<i>trans</i> -cariofileno
9	27,81	4,74	α -humuleno
10	28,12	5,75	aloaromadendreno
11	28,90	1,93	1,6-ciclododecadieno
12	29,54	1,40	elemeno
13	29,91	1,81	α -bisaboleno
14	32,71	0,96	espatulenol
15	32,94	2,00	ácido 10-12-pentacosadiinoico
16	34,62	0,96	β -voltireneno
17	36,17	1,39	bergamotol
18	36,47	1,99	santalol

Posteriormente, os óleos essenciais do estudo populacional (Figura 99), foram analisados utilizando o método descrito por observado acima o qual foi descrito por Addans, 2007. Onde, podemos destacar os espécimens 1I4, 1IV1, 1IV4, 2IV5, 3II5, 5IV1, 5IV3 e 25II5 que se diferenciam em relação ao seu perfil cromatográfico dos demais espécimens.

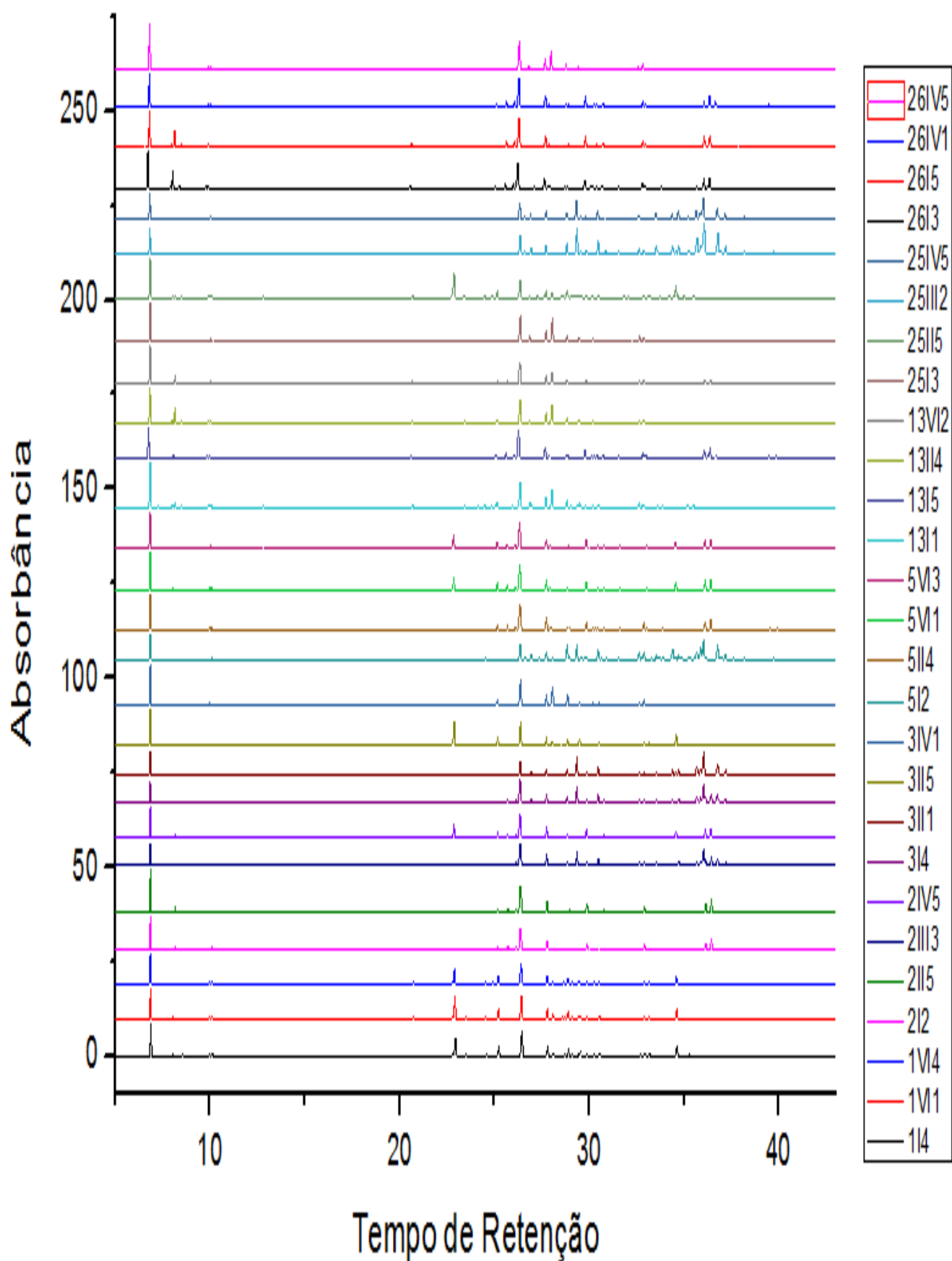


Figura 99 - Cromatogramas de 27 espécimens de *C. verbenacea* obtidos por CG-EM. Condições de análise: 60 a 246° C - 3° C/ min, temperatura do injetor: 240° C, split: 1/20, coluna Rtx-5MS (30m x 0,25 mm d.i.; 0,25 um filme interno), gás de arraste hélio.

Assim, com o intuito de confirmação e agrupamento dos dados obtidos foram realizadas as análises multivariadas PCA e HCA (Figura 100 e 101) e uma PLS (Figura 102). Foi possível observar a evidente separação dos óleos essenciais de coloração azul/esverdeada em relação aos óleos essenciais de cor amarela, confirmando assim os resultados obtidos por CCD. Além do agrupamentos dos óleos de cor azul/esverdeado, outros agrupamentos observados na PCA e HCA através de dados de CG-EM, se relacionam com dados obtidos por CCD, como o agrupamento dos espécimens 2III3 (6), 3I4 (8), 3II1 (9), 25IV5 (23), 25III2 e 5I2 (12). Os outros grupos possuem alguns espécimens se agrupando diferentemente da CCD, no entanto 24 das 27 espécimens do estudo populacional agrupam-se de forma equivalente tanto na CCD quanto em CG-EM.

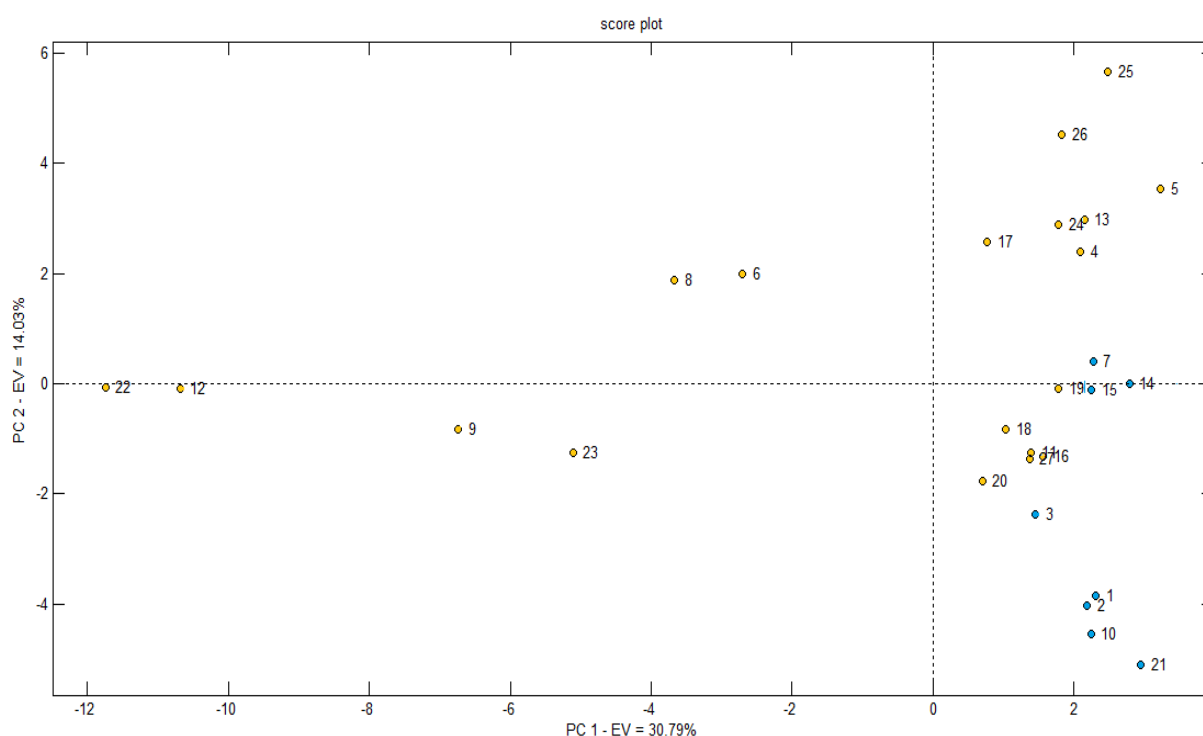


Figura 100 - Gráfico obtido através das análises de componentes principais (PCA) dos óleos essenciais de *C. verbenacea* obtidos por CG-EM do estudo populacional, onde observamos a separação dos óleos essenciais de cor azul em relação aos óleos de cor amarela. (1- 1I4, 2- 1VI1, 3- 1IV4, 4- 2I2, 5- 2II5, 6- 2III3, 7- 2IV5, 8- 3I4, 9- 3II1, 10- 3II5, 11- 3IV1, 12- 5I2, 13- 5II4, 14- 5IV1, 15- 5IV3, 16- 13I1, 17- 13I5, 18- 13II4, 19- 13VI2, 20- 25I3, 21- 25II5, 22- 25III2, 23- 25IV5, 24- 26I3, 25- 26I5, 26-26IV1, 27- 26IV5).

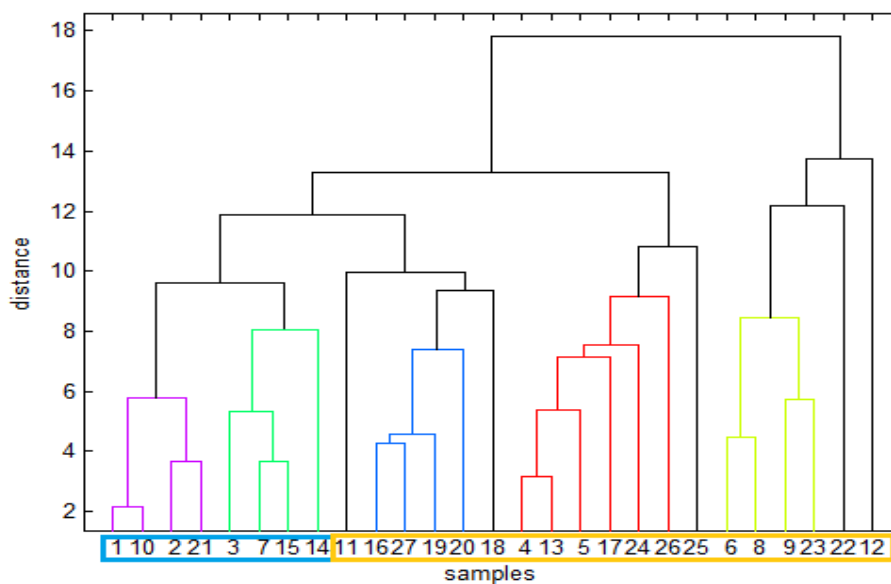


Figura 101 - Dendrograma obtido através de análises de agrupamentos hierárquicos (HCA) dos óleos de *C. verbenacea* obtidos por CG-EM do estudo populacional, com destaque para separação em grupos dos óleos de cor azul em relação aos óleos de cor amarela. (1- 1I4, 2- 1VI1, 3- 1IV4, 4- 2I2, 5- 2II5, 6- 2III3, 7- 2IV5, 8- 3I4, 9- 3II1, 10- 3II5, 11- 3IV1, 12- 5I2, 13- 5II4, 14- 5IV1, 15- 5IV3, 16- 13I1, 17- 13I5, 18- 13II4, 19- 13VI2, 20- 25I3, 21- 25II5, 22- 25III2, 23- 25IV5, 24- 26I3, 25- 26I5, 26-26IV1, 27- 26IV5).

O gráfico de *loadings* (Figura 102) ajudou na confirmação de que os óleos essenciais de coloração azul (1I4, 1IV1, 1IV4, 2IV5, 3II5, 5IV1, 5IV3 e 25II5) possuem três picos com tempo de retenção em 22,9, 25,2 e 34,6 min, que correspondem ao elemeno, camazuleno e espatulenol (Figura 103). Estas substâncias não foram identificadas nos demais óleos essenciais. A coloração azul ou esverdeada destes óleos essenciais deve-se a presença do camazuleno, que é um artefato formado durante a hidrodestilação a partir da substância matricina e que apresenta ação anti-inflamatória (SIMÕES et al, 2010). Novamente, o gráfico de PLS (Figura 104), que se trata de uma análise estatística supervisionada, confirma a separação de cada indivíduo relacionando a coloração dos óleos em azul/esverdeado e amarelo.

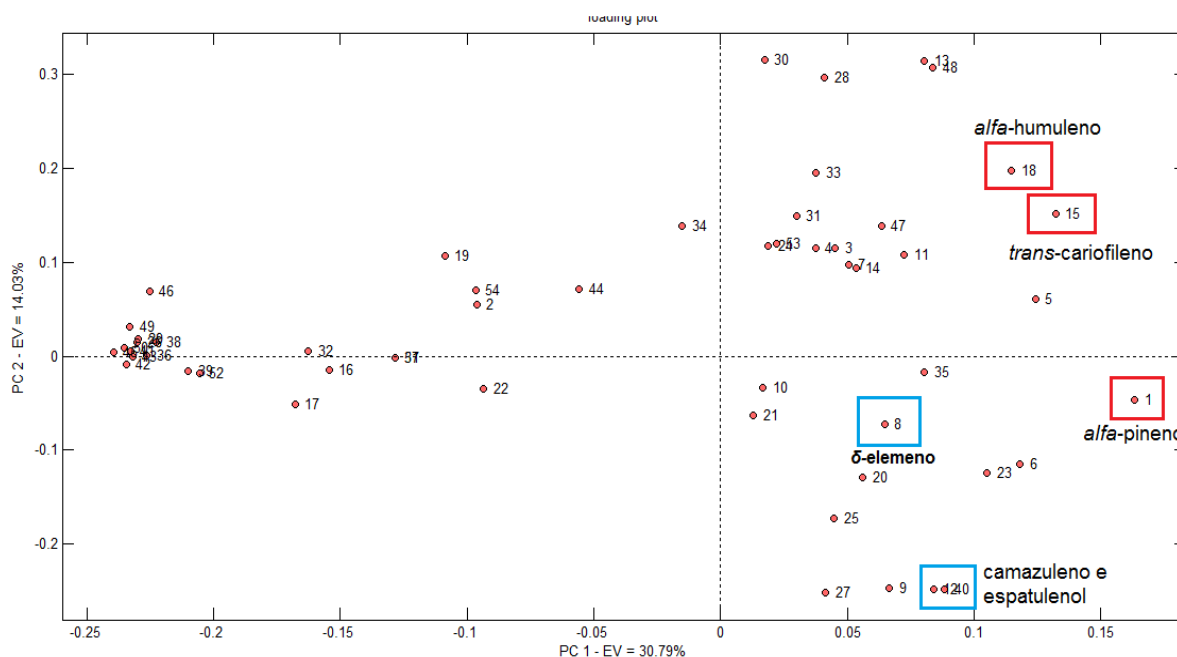


Figura 102 - Gráfico de *loadings* obtido através das análises de componentes principais (PCA) dos óleos essenciais por CG-EM do estudo populacional, onde observamos com destaque para as substâncias presentes nos óleos com coloração azul/esverdeada (elemeno, camazuleno e espatulenol) e as substâncias marcadores dos óleos essenciais obtidos de *C. verbenacea* (α -pineno, α -humuleno e *trans*-cariofileno).

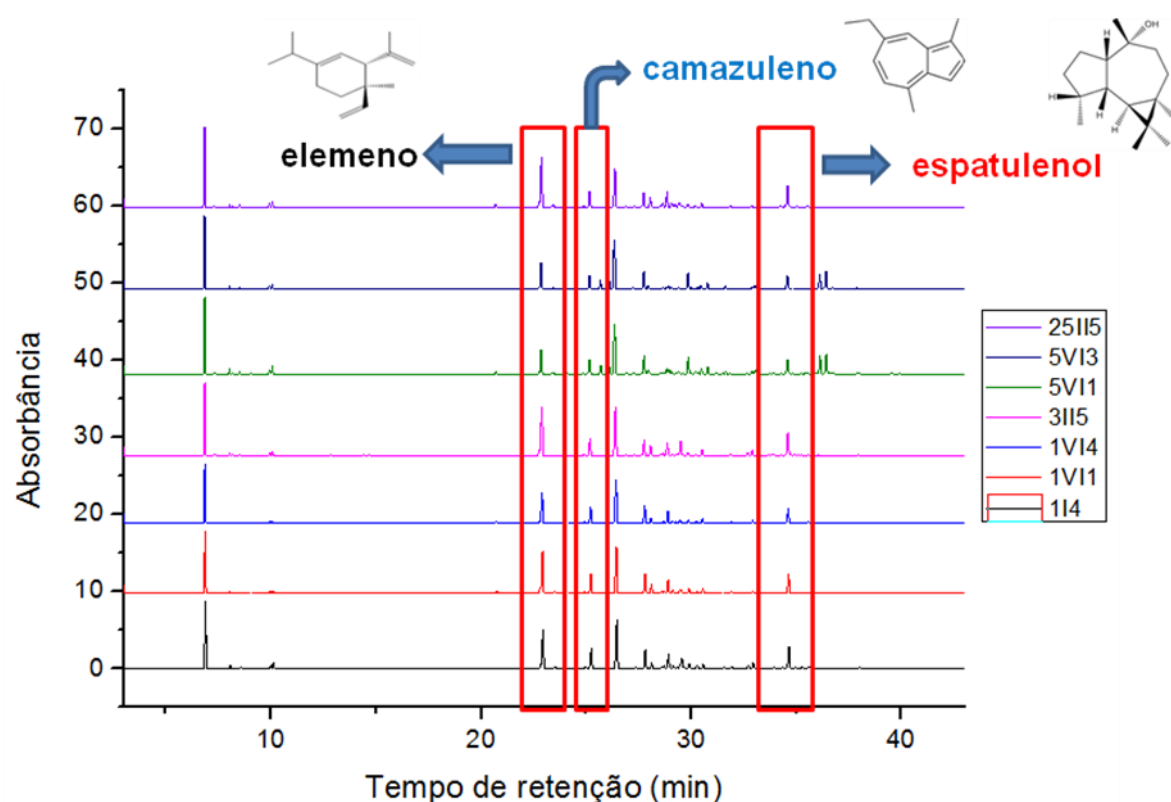


Figura 103 - Cromatogramas de 7 óleos essenciais com coloração azul de espécimens de *C. verbenacea* obtidos por CG-EM. Condições de análise: 60 a 246° C - 3° C/ min, temperatura do injetor: 240° C, split: 1/20, coluna Rtx-5MS (30m x 0,25 mm d.i.; 0,25 μ m filme interno). Com destaque para as substâncias específicas encontradas apenas nos óleos de cor azul (elemeno, camazuleno e espatulenol)

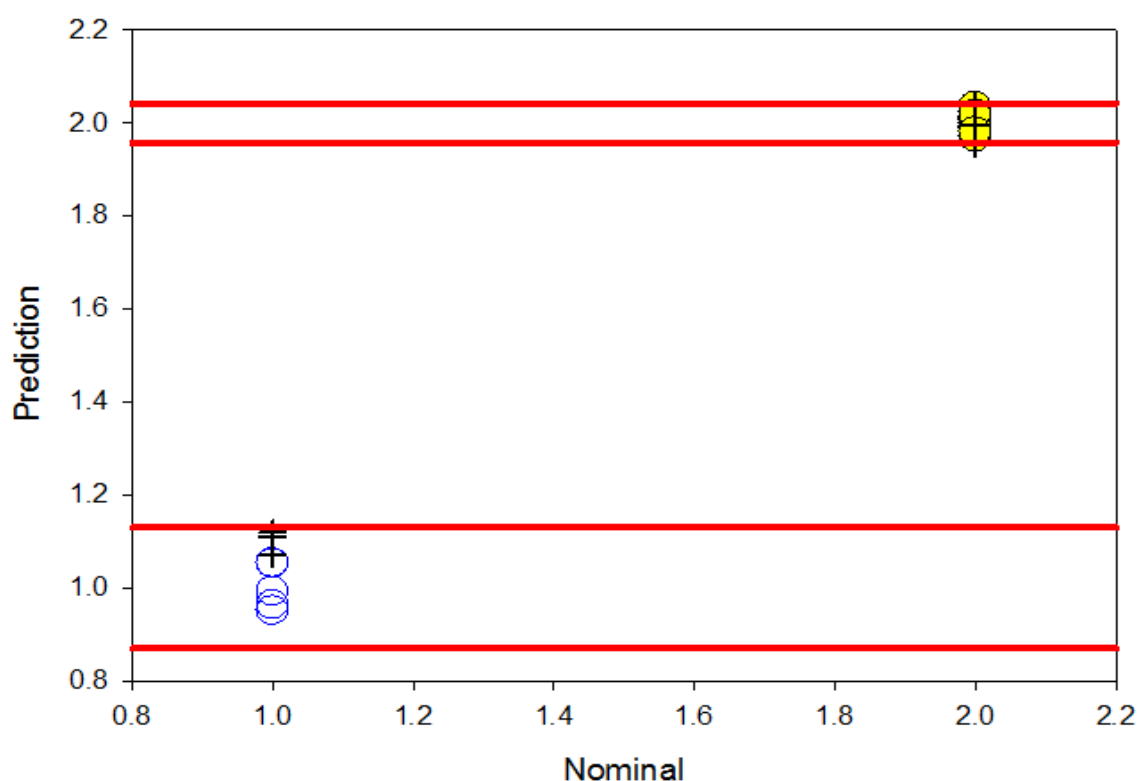


Figura 104 - Gráfico obtido através dos mínimos quadrados parciais (PLS) dos óleos essenciais de *C. verbenacea* por CG-EM, onde observamos a separação e agrupamentos dos óleos azuis em relação aos óleos amarelos devido as diferenças em seus perfis químicos.

No estudo circadiano dos óleos essenciais, no gráfico de PCA (Figura 105), pode-se verificar uma separação entre os 7 espécimens estudados em relação as 5 coletas do dia, nos quais os espécimens 1I4 e 3II5 que possuem óleo de colocão azul/esverdeado se agrupam entre si e quando analisadas em conjunto com o gráfico de *loadings* (Figura 106), constatou-se a tendência de produção das substâncias elemeno (variável 6), camazuleno (variável 11) e espatulenol (variável 32), conforme já havia sido verificado no estudo populacional. Já, os óleos dos espécimens 2II5, 5IV3 e 26IV1 formam um agrupamento, e os espécimens 13I5 e 25IV5 ficam isolados dos demais. No entanto o espécimen 13I5 possui uma maior tendência de produção dos marcadores α -humuleno (variável 16) e *trans*-cariofileno (variável 14), enquanto que o espécimen 25IV5 uma maior tendência de produção da substância α -pineno (variável 1).

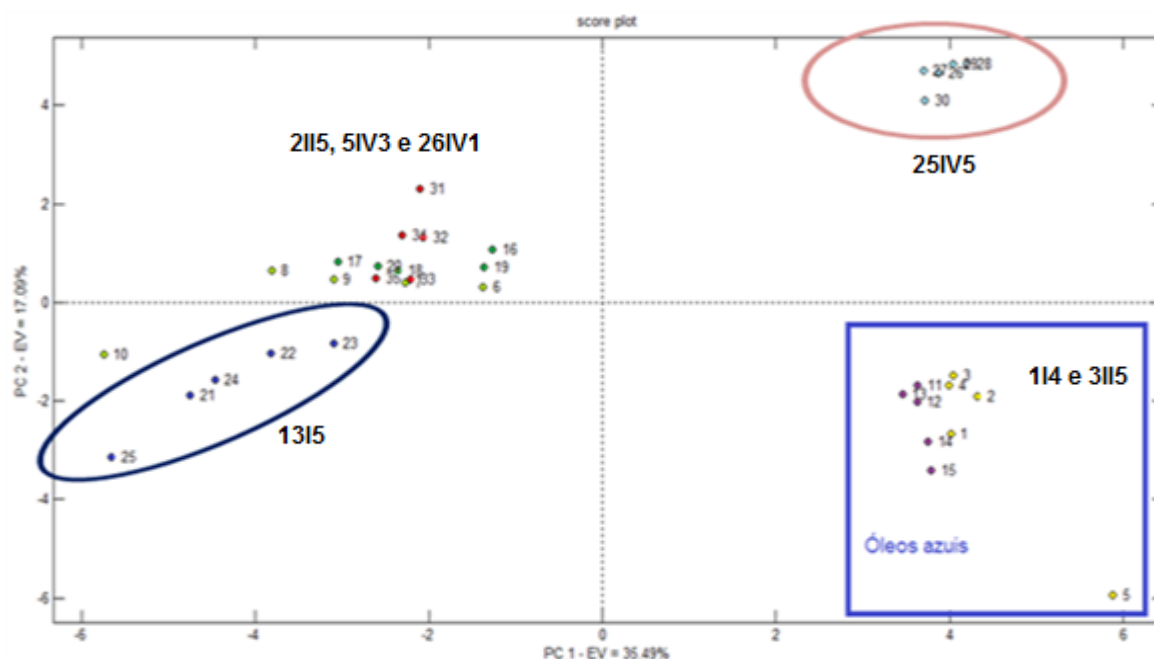


Figura 105 - Gráfico obtido através das análises de componentes principais (PCA) dos óleos essenciais de *C. verbenacea* obtidos por CG-EM do estudo circadiano, observando os agrupamento de cada uma das 7 espécimes estudadas em relação as 5 coletas obtidas, com destaque para o agrupamento dos dois espécimes (1I4 e 3II5) que possuem óleo de cor azul/esverdeada. Legenda: 1I4 (1 ao 5); 2II5 (6 ao 10); 3II5 (11 ao 15); 5IV3 (16 ao 20); 13I5 (21 ao 25); 25IV5 (26 ao 30); 26IV1 (31 ao 35).

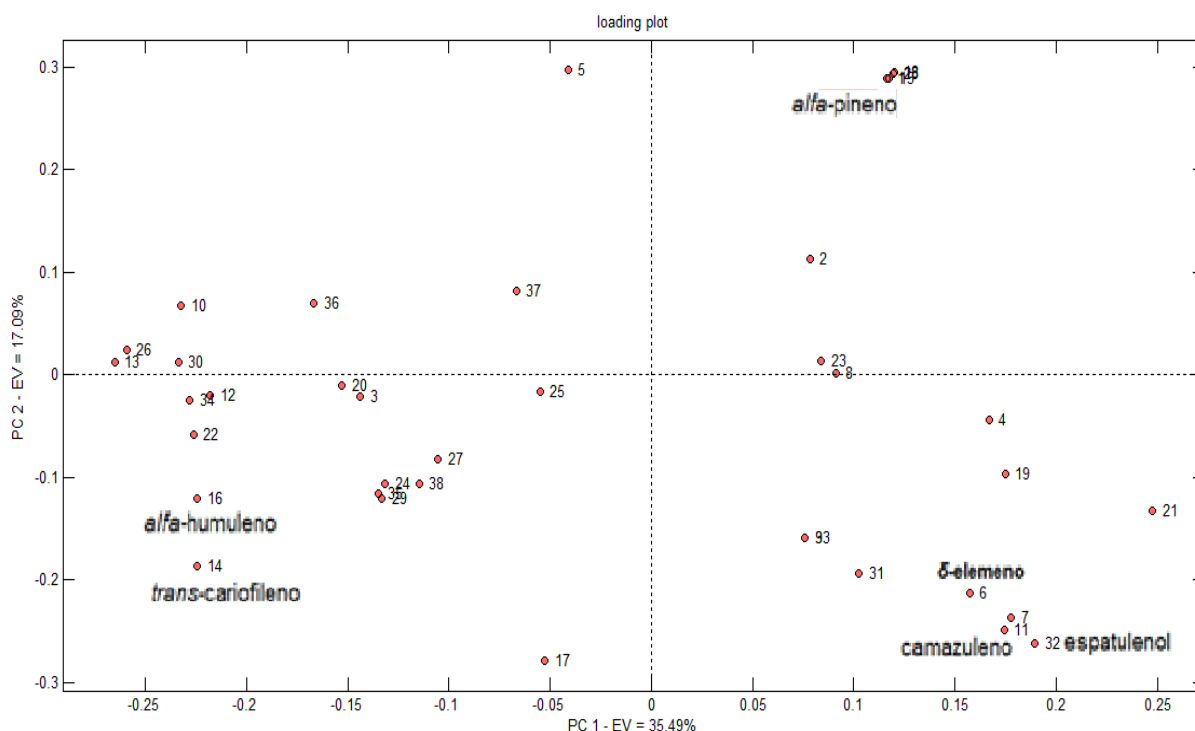


Figura 106 - Gráfico de *loadings* obtido através das análises de componentes principais (PCA) dos óleos essenciais por CG-EM do estudo circadiano, onde observamos com destaque para as substâncias presentes nos óleos com coloração azul/esverdeada (elemeno, camazuleno e espatulenol) e as substâncias marcadores dos óleos essenciais obtidos de *C. verbenacea* (α -pineno, α -humuleno e *trans*-cariofileno).

Foi também obtido um dendrograma de HCA (Figura 107), no qual se pode observar o agrupamento entre os espécimens 1I4 (1 ao 4) e 3II5 (11 ao 15), que são espécimens com óleos de coloração azul/esverdeado. Observou-se em um grupo a parte o espécimen 13I5 (21 ao 25), que possui uma maior tendência de produção dos principais marcadores (α -humuleno e *trans*-cariofileno) do óleo essencial de *C. verbenacea*. E o agrupamento do espécimen 25IV5 (26 ao 30), que possui uma tendência de outro marcador, o α -pineno.

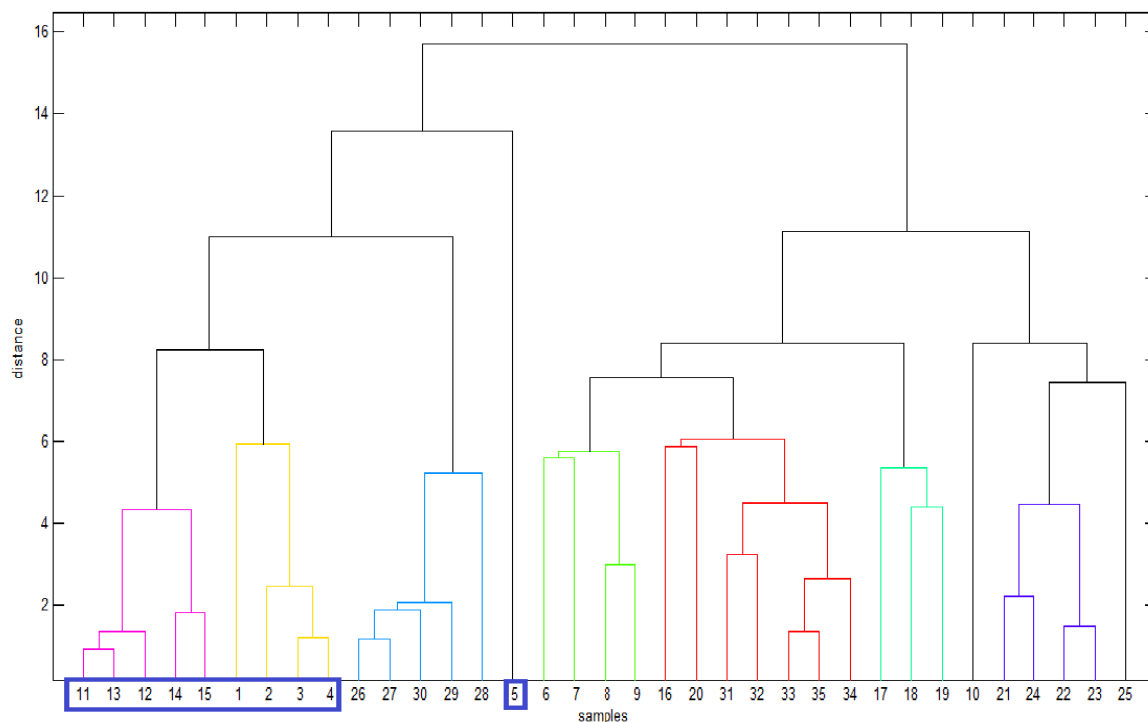


Figura 107 - Dendrograma obtido através de análises de agrupamentos hierárquicos (HCA) dos óleos de *C. verbenacea* obtidos por CG-EM do estudo circadiano, com destaque para separação dos óleos de cor azul em relação aos óleos de cor amarela. Legenda: 1I4 (1 ao 5); 2II5 (6 ao 10); 3II5 (11 ao 15); 5IV3 (16 ao 20); 13I5 (21 ao 25); 25IV5 (26 ao 30); 26IV1 (31 ao 35).

Finalmente foi realizado o estudo sazonal dos óleos essenciais. No gráfico de PCA (Figura 108), pode-se verificar uma separação entre os 7 espécimens estudados em relação as 13 coletas ao longo de 2 anos, nos quais os espécimens 1I4 e 3II5 que possuem óleo de coloração azul/esverdeado se agrupam entre si e quando analisadas em conjunto com o gráfico de *loadings* (Figura 109), constata-se a tendência de produção das substâncias elemeno (variável 6), camazuleno (variável 11) e espatulenol (variável 32), conforme já havia sido verificado no estudo populacional e circadiano. Já, os óleos dos espécimens 2II5, 5IV3 e 13I5 formam um agrupamento com tendência de produção para o α -humuleno (variável 16) e *trans*-cariofileno (variável 14). Já os espécimens 25I3 e 26IV1 ficam espalhados sem uma tendência de agrupamentos pelo gráfico.

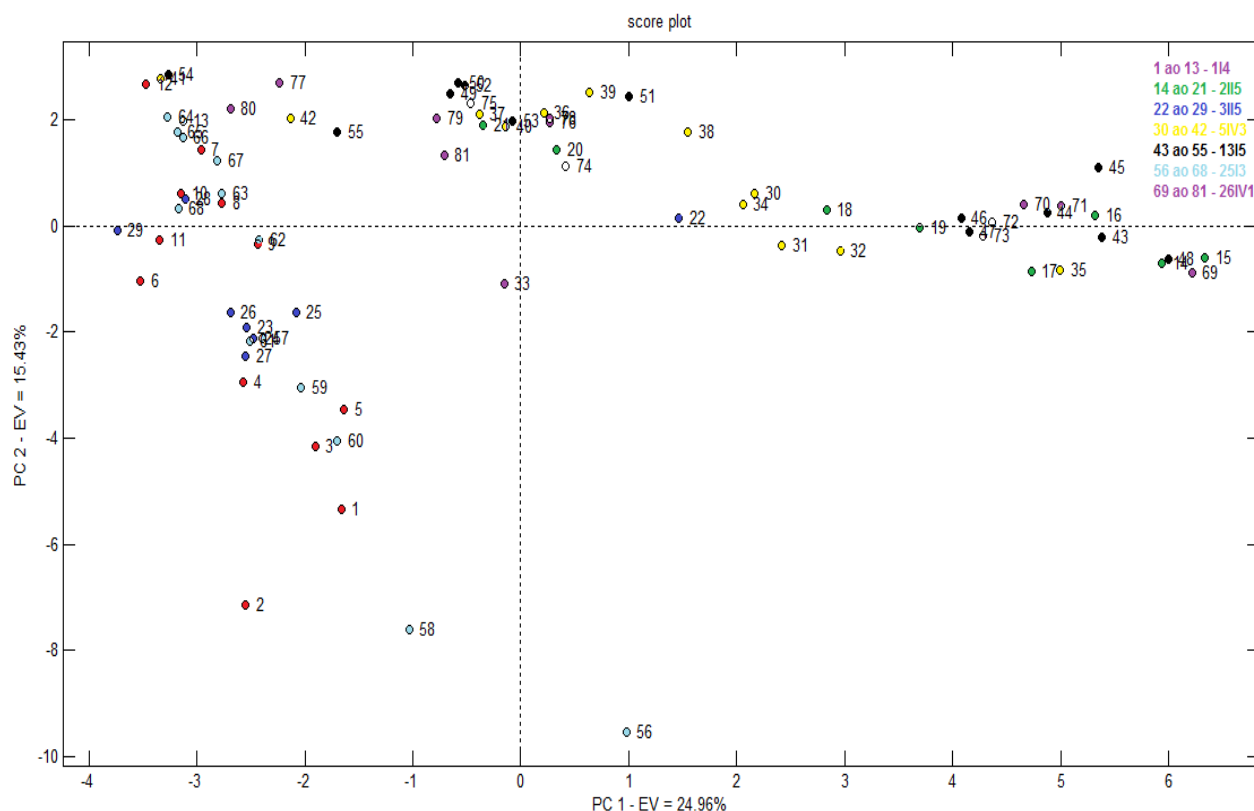


Figura 108 - Gráfico obtido através das análises de componentes principais (PCA) dos óleos essenciais de *C. verbenacea* obtidos por CG-EM do estudo sazonal, observando os agrupamento de cada uma das 7 espécimes estudadas em relação as 13 coletas obtidas. Legenda: 1I4 (1 ao 13); 2II5 (14 ao 21); 3II5 (22 ao 29); 5IV3 (30 ao 42); 13I5 (43 ao 55); 25I3 (56 ao 68); 26IV1 (69 ao 81).

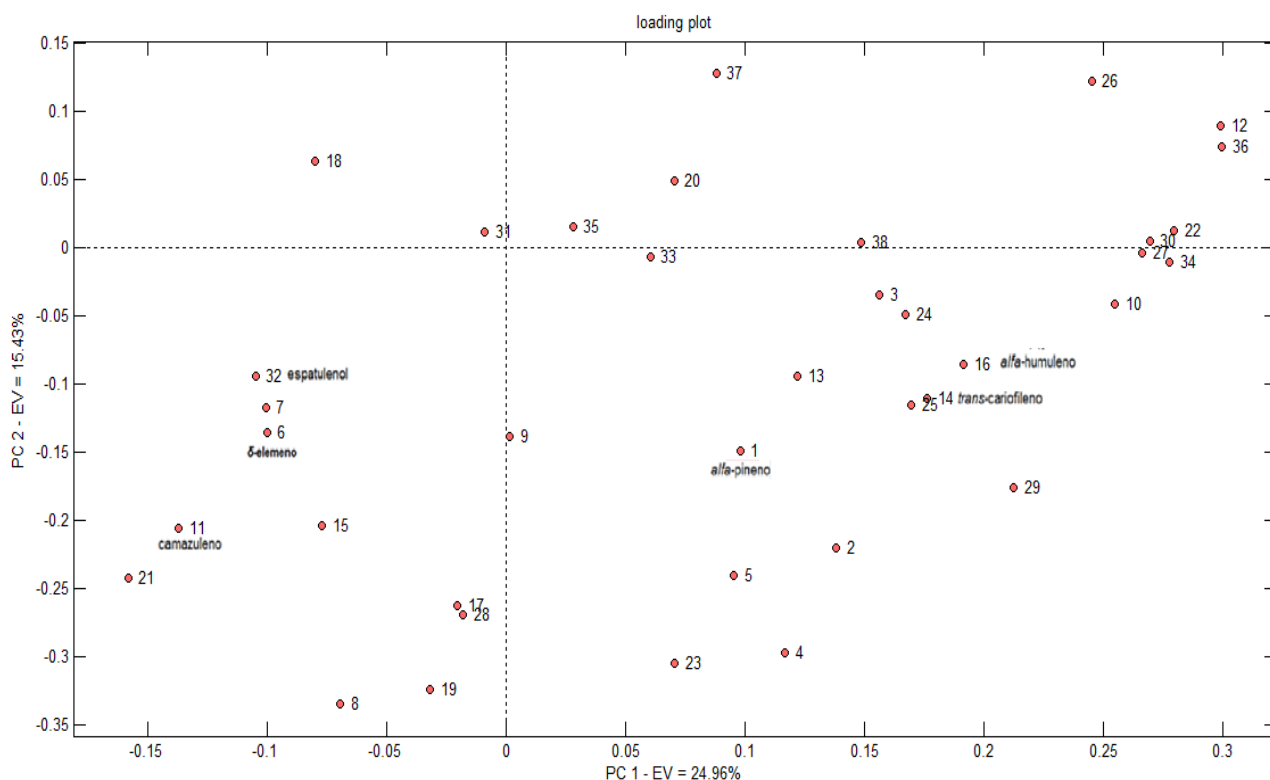


Figura 109 - Gráfico de *loadings* obtido através das análises de componentes principais (PCA) dos óleos essenciais por CG-EM do estudo sazonal, onde observamos com destaque para as substâncias presentes nos óleos com coloração azul/esverdeada (elemeno, camazuleno e espatulenol) e as substâncias marcadoras dos óleos essenciais obtidos de *C. verbenacea* (α -pineno, α -humuleno e *trans*-cariofileno).

O dendodograma de HCA (Figura 110) evidencia os agrupamentos já observados no gráfico de PCA, demonstrando o grupo de coleta de cada espécimen em relação a produção de determina substância conforme foi verificado em comparação com o gráfico de *loadings*. Os cromatogramas encontram-se nos anexos 37 ao 50.

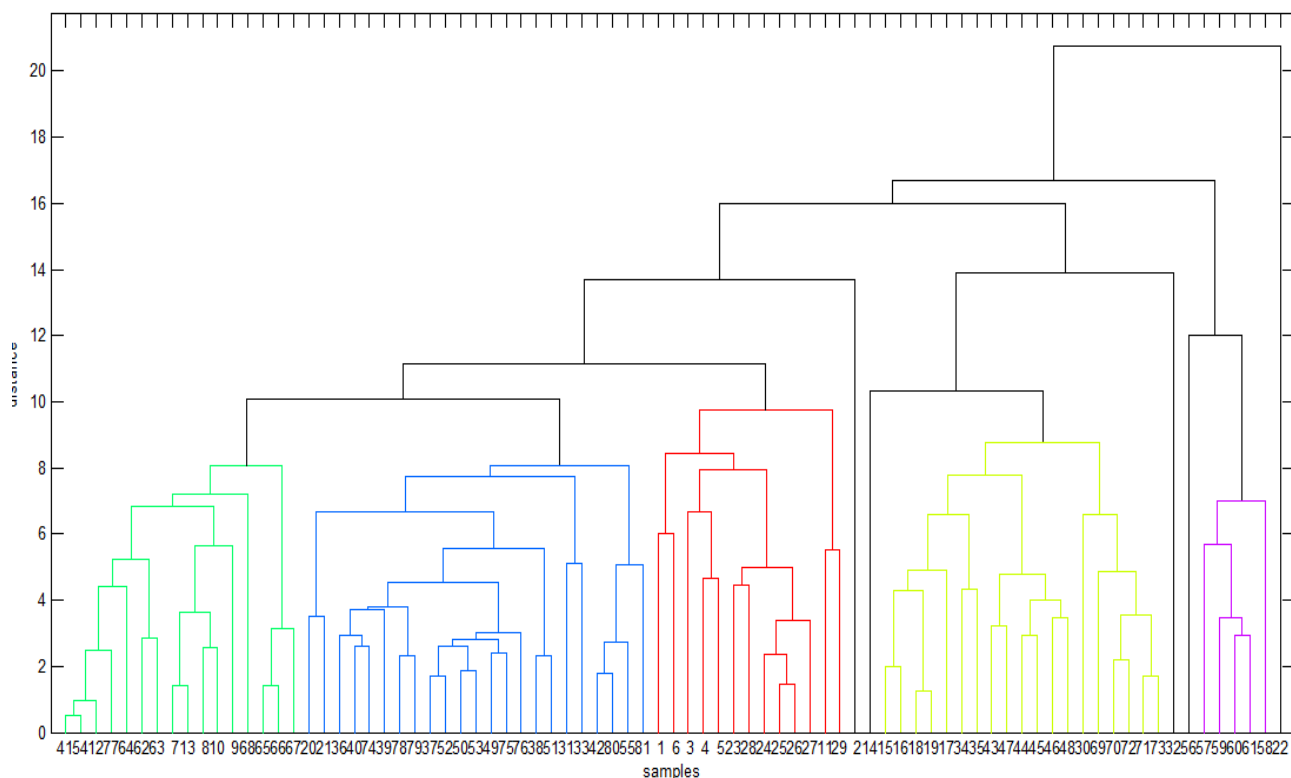


Figura 110 - Dendrograma obtido através de análises de agrupamentos hierárquicos (HCA) dos óleos de *C. verbenacea* obtidos por CG-EM do estudo sazonal, observando os agrupamentos de cada uma das 7 espécimes estudadas em relação às 13 coletas obtidas. Legenda: 1I4 (1 ao 13); 2II5 (14 ao 21); 3II5 (22 ao 29); 5IV3 (30 ao 42); 13I5 (43 ao 55); 25IV5 (56 ao 68); 26IV1 (69 ao 81).

5.4.2 Quantificação de substâncias isoladas do óleo essencial de folhas de *C. verbenacea*.

Posteriormente, as curvas analíticas foram usadas para quantificação dessas substâncias para o estudo populacional (Figura 111), no qual se pode notar uma variação em relação aos diferentes espécimes analisados, assim como já havia sido notada em relação aos seus extratos. Assim, foi possível verificar uma variação quantitativa de metabólitos voláteis (substâncias isoladas) na população estudada. Sendo o espécimen 3II1 com o menor teor de *trans*-cariofileno e α -humuleno (0,48 mg e 0,13 mg) e o espécimen 2II5 o de maior teor para *trans*-cariofileno e α -humuleno (1,5 mg e 0,41 mg).

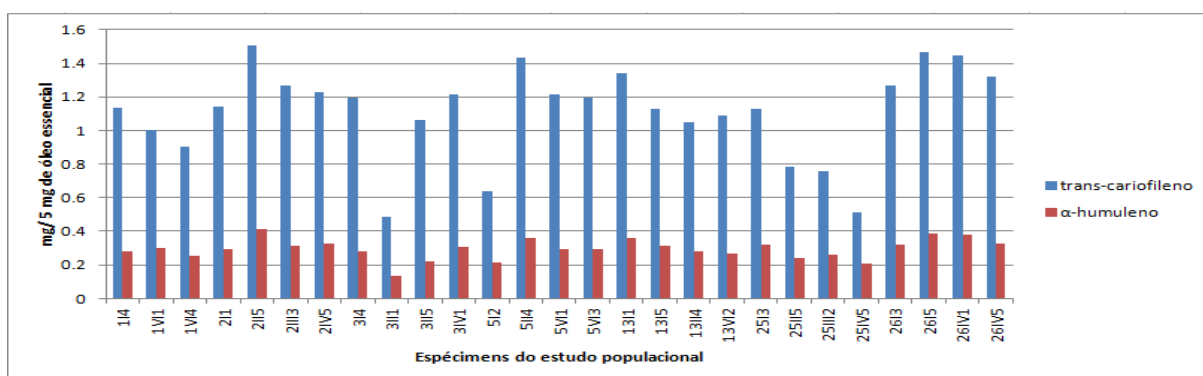


Figura 111 - Concentração de substâncias isoladas encontradas nos óleos essenciais de espécimens de *C. verbenacea* do estudo populacional.

Já para os estudos circadiano (1) (Figuras 112 e 113) e sazonal (Figuras 116 e 117) podemos verifica uma similaridade entre a produção de *trans*-cariofileno e α -humuleno, pois ambos seguem uma tendência de concentração nos determinados horários de coleta ou período de coleta. Porém não foi possível determinar uma tendência de produção destes metabólitos em relação ao período do ano e horário de coleta. Esta mesma dificuldade se repetiu no estudo circadiano 2 (Figuras 114 e 115) , no qual, não se pode observar uma tendência de produção destas substâncias em relação ao horário de coleta. Também, foi observada uma diminuição nos teores de ambas as substâncias do ano de 2015 para o ano de 2016, além da não repetição do teor em relação ao horário das 10:30 h nos estudos circadianos. O espécimen 26 IV1 possui maior teor de *trans*-cariofileno e α -humuleno nos estudos circadiano e sazonal, o que reforça sua tendência de maior produção destas susbtâncias conforme verificado no estudo quimiométrico. Os cromatogramas dos estudos sazonal e circadiano do óleo essencial de *C. verbenacea* encontram-se dos anexos 37 ao 50.

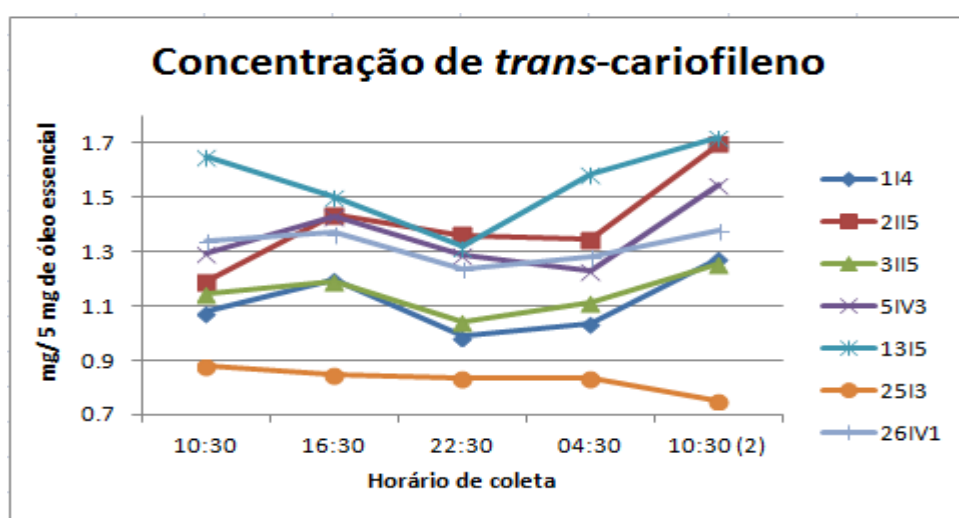


Figura 112 - Concentração de *trans*-cariofileno no óleo essencial de espécimens de *C. verbenacea* do estudo circadiano.

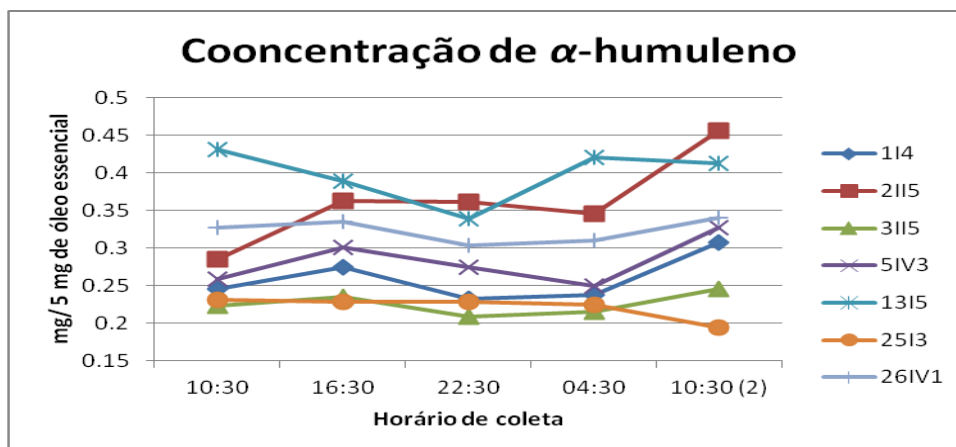


Figura 113 - Concentração de α -humuleno no óleo essencial de espécimes de *C. verbenacea* do estudo circadiano.

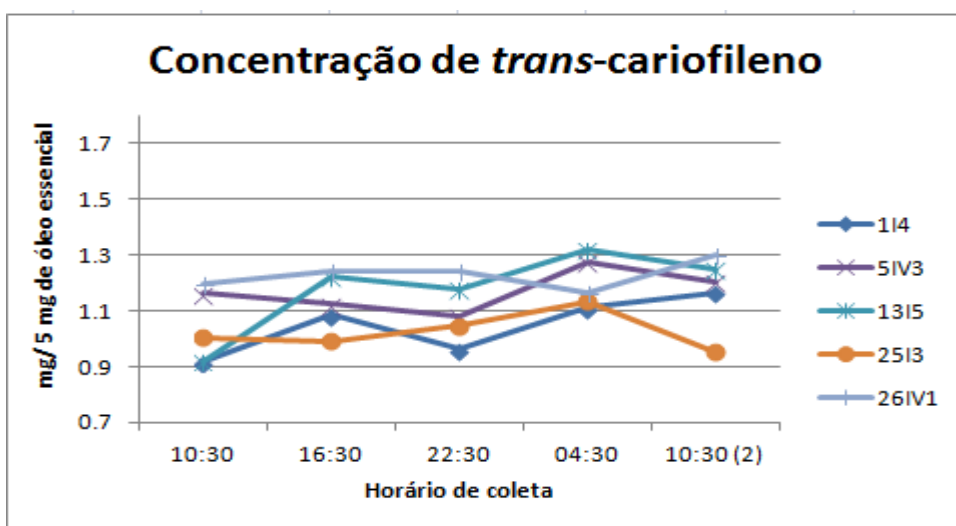


Figura 114 - Concentração de *trans*-cariofileno no óleo essencial de espécimes de *C. verbenacea* do estudo circadiano 2.

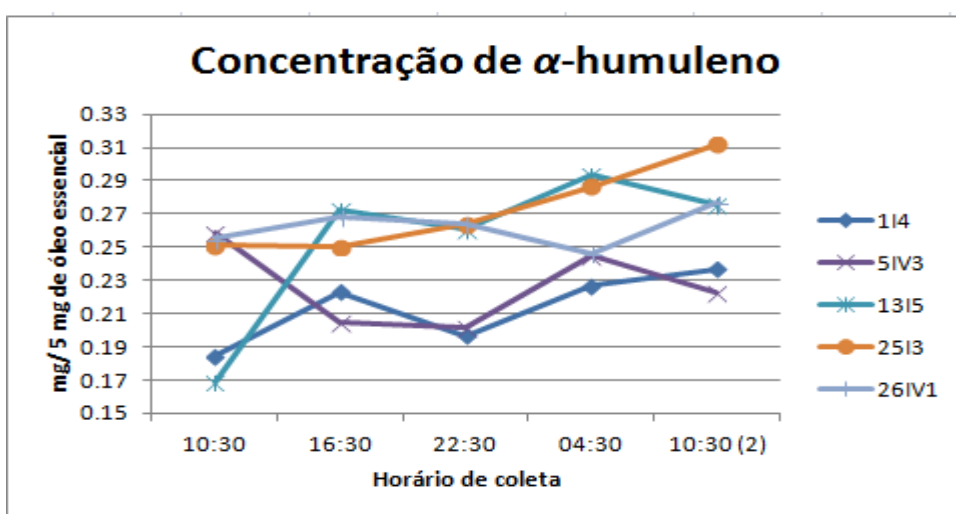


Figura 115 - Concentração de α -humuleno no óleo essencial de espécimes de *C. verbenacea* do estudo circadiano 2.

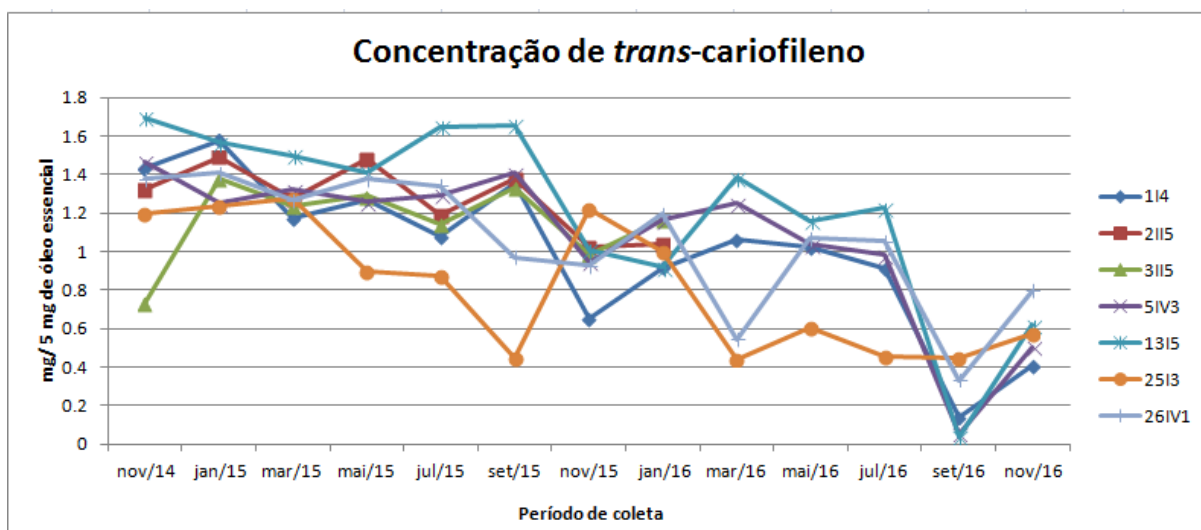


Figura 116 - Concentração de *trans*-cariofileno no óleo essencial de espécimens de *C. verbenacea* do estudo sazonal.

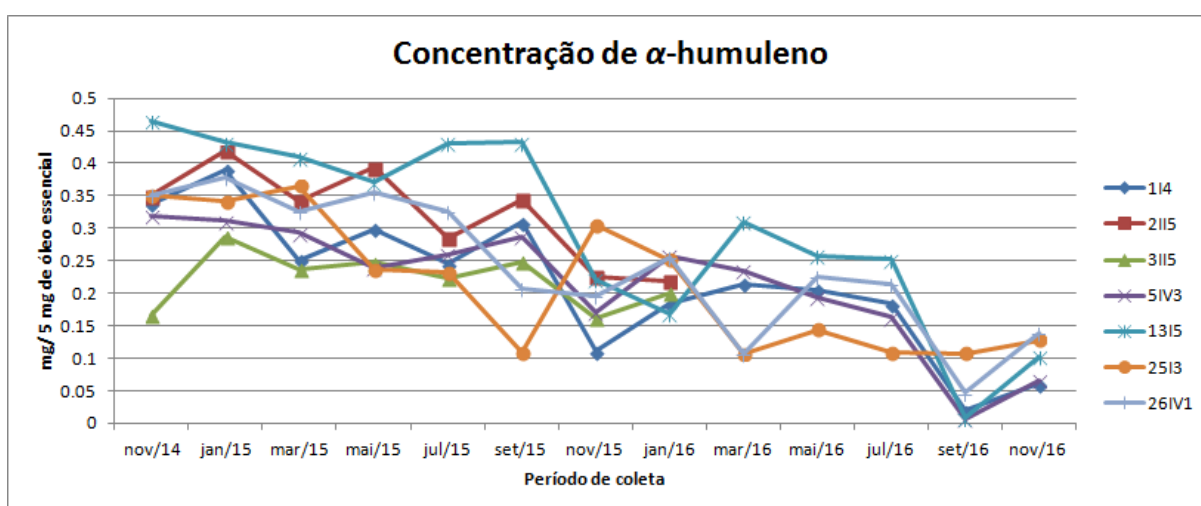


Figura 117 - Concentração de α -humuleno no óleo essencial de espécimens de *C. verbenacea* do estudo sazonal.

Assim, foi realizada uma análise estatística (ANOVA) para verificar a influência do horário de coleta e da época do ano nos teores de α -humuleno e *trans*-cariofileno e constatou-se que o horário de coleta (estudos circadianos 1 e 2) (Figuras 118 a 121), não são significativos em relação aos teores de *trans*-cariofileno e α -humuleno, possuindo $P > 0.05$. No entanto, o estudo sazonal, observou-se um $P < 0.05$ para *trans*-cariofileno (Anexo 122) e $P < 0.05$ para α -humuleno (Anexo 123), o que demonstra que o período do ano em que as plantas são coletadas influenciam significativamente nos teores das substâncias isoladas do óleo essencial.

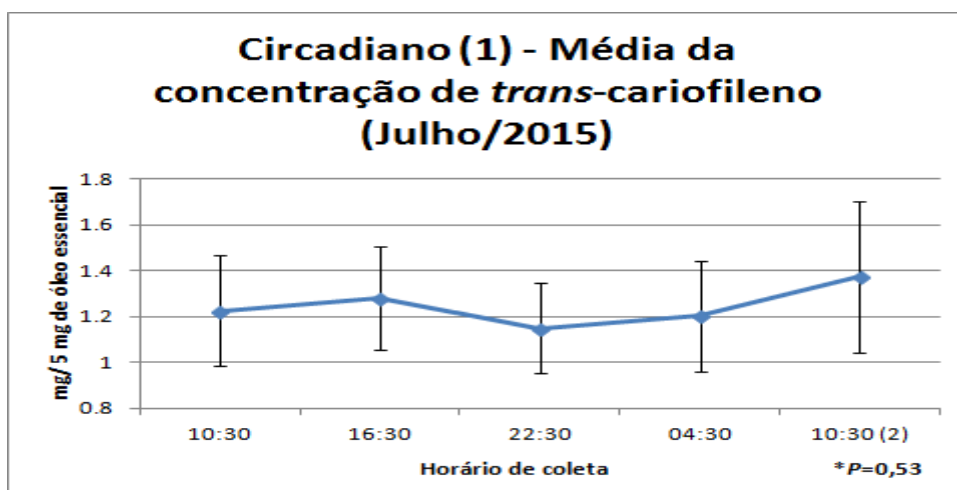


Figura 118 - Média do rendimento de *trans*-cariofileno dos espécimens do estudo circadiano (1)

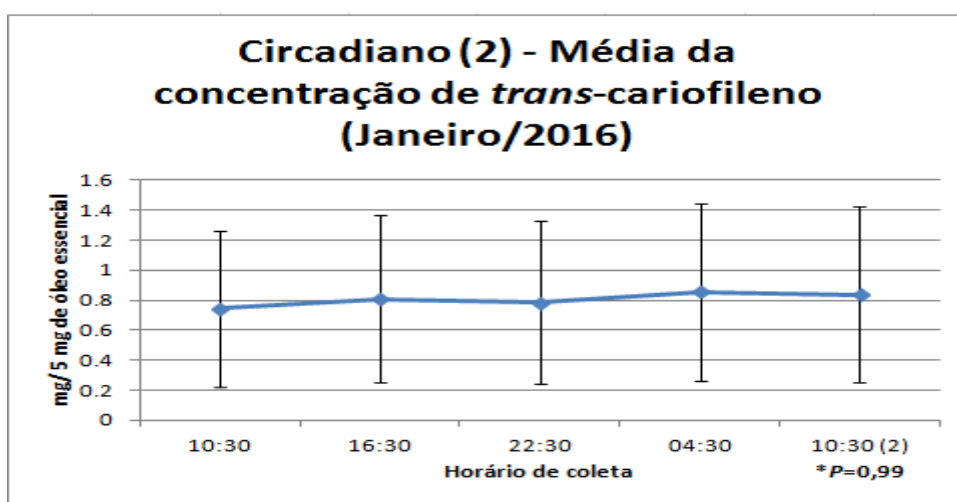


Figura 119 - Média do rendimento de *trans*-cariofileno dos espécimens do estudo circadiano (2)

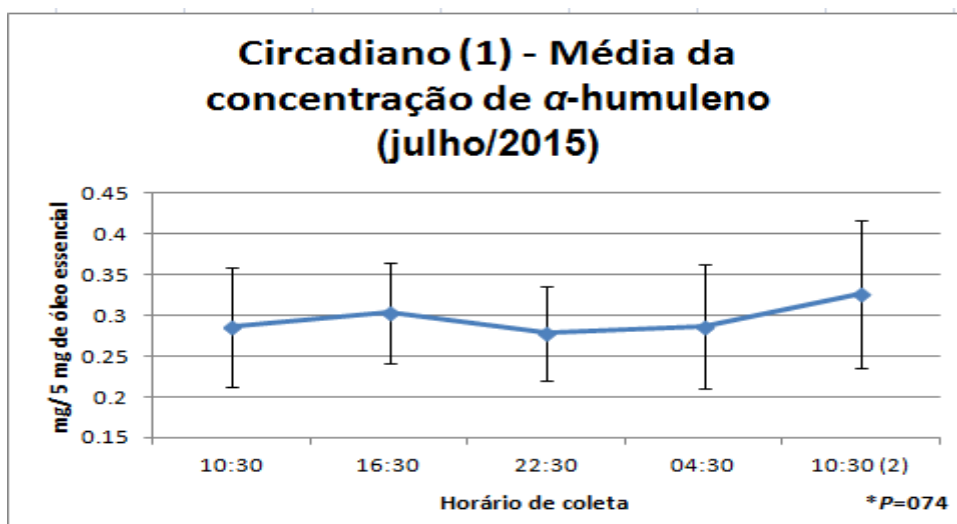


Figura 120 - Média do rendimento de α -humuleno dos espécimens do estudo circadiano (1)

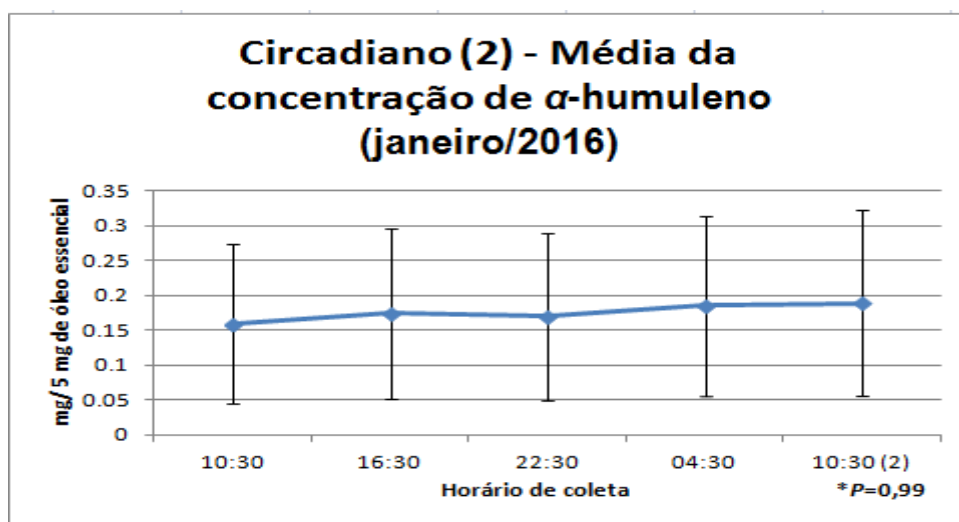


Figura 121 - Média do rendimento de α -humuleno dos espécimens do estudo circadiano (2)

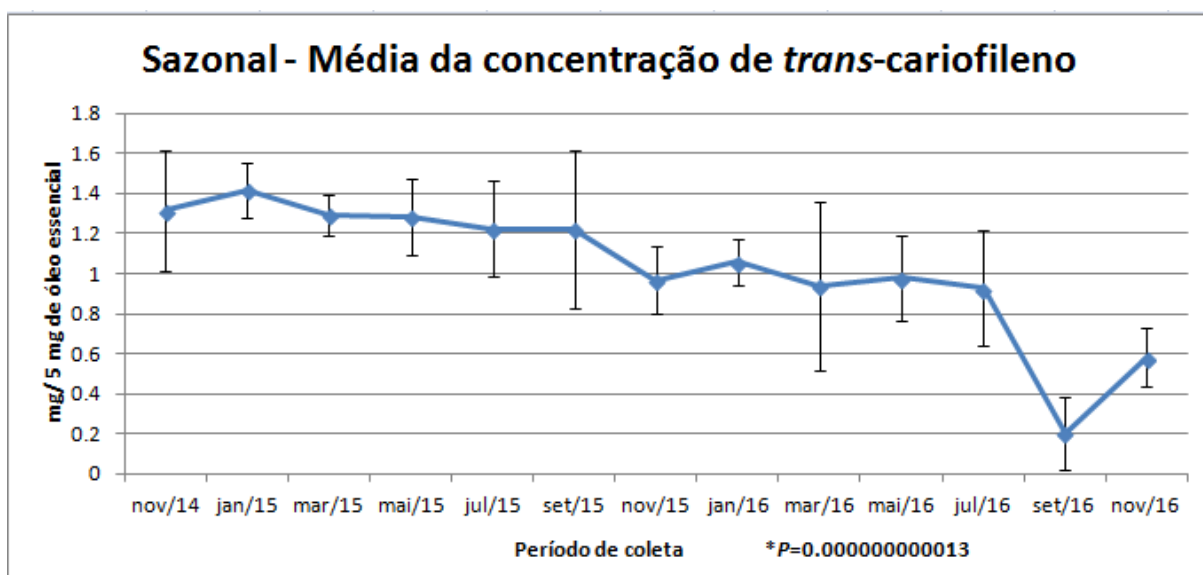


Figura 122 - Média do rendimento de *trans*-cariofileno dos espécimens do estudo sazonal

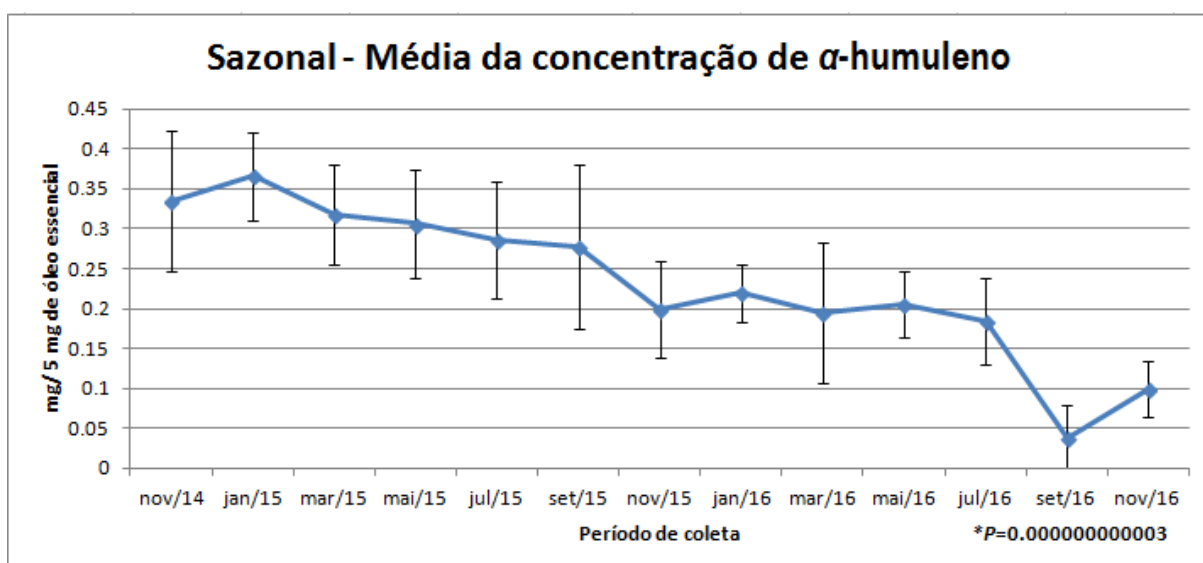


Figura 123 - Média do rendimento de α -humuleno dos espécimens do estudo sazonal

6 CONCLUSÃO

Foram isoladas quatro substâncias em apenas três etapas (extração em fase sólida, cromatografia em coluna e CLAE preparativa) para servirem como padrões cromatográficos, sendo as três substâncias identificadas por completo: cordialina A, artemetina e *cis*-cordialina A, sendo esta última inédita na literatura.

O método cromatográfico desenvolvido para análise em CLAE-DAD dos extratos etanólicos demonstrou boa resolução dos picos no cromatograma.

C. verbenacea possui variabilidade quantitativa em relação às substâncias não-voláteis, tem uma variação ao longo do ano, quando se analisa as substâncias isoladas. Apresentando uma maior produção de flavonoides em períodos de temperaturas mais elevadas e de triterpenos em períodos de temperaturas mais amenas.

Os rendimentos dos extratos e os teores de óleos essenciais estão diretamente ligados. No estudo circadiano 1 (junho/2015) apresentaram os maiores picos de produção no mesmo horário de coleta (04:30 h); no entanto, ao realizar a repetição do estudo circadiano (circadiano 2) em outro período do ano (janeiro/2016), observou-se um maior rendimento no horário das 22:30 h. Já em relação ao estudo sazonal, o maior teor de óleo essencial é observado em período de maior temperatura e pluviosidade (janeiro/2015 e janeiro/2016); quanto ao extrato, seu rendimento é variável ao longo do ano.

A análise estatística multivariada utilizando ferramentas quimiométricas demonstrou que os espécimens estudados do ponto de vista populacional, circadiana e sazonal, apresentam diferenças quantitativas em relação aos componentes do extrato etanólico. Alguns espécimens possuem tendência de maior produção de determinadas substâncias (triterpenos ou flavonoides) em relação às outras. A análise estatística demonstrou que o período do ano afeta a produção de extrato e das substâncias componentes do mesmo, apesar de não ser possível reconhecer um padrão de variabilidade química, enquanto que o período do dia no estudo circadiano não possui valor significativo.

Os óleos essenciais apresentaram diferenças em seu perfil cromatográfico, sendo separados em óleo de cor azul/esverdeado e óleos de coloração amarela, sendo que os óleos de cor azul apresentam 3 substâncias distintas dos demais óleos que são o elemeno, camazuleno e espatulenol, porém em relação aos óleos essenciais, os fatores ambientais também não demonstraram interferência em relação aos perfis químicos apresentados. Alguns espécimens possuem tendência de maior produção de *trans*-cariofileno e α -humuleno. Novamente a análise estatística demonstrou que o período do ano afeta o rendimento do óleo essencial e o teor de seus componentes.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. Identification os Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 4th. ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2007.
- AKROUT, A.A.; CHEMIL, R.; SIMMONDS, M.; KITE, G.; HAMMANI, M.&CHREIF, I. Seasonal variation of the essential oil of *Artemisia campestris* L. **Journal of Essential Oil Research**, v.15, p. 333-336, 2003.
- AMAZALLAG, G.N.; LARKOV, O.; BEN HUR, M.; DUDAI, N. Soil microvariations as a source of variability in the wild: The case of secondarymetabolism in *Origanun dayi* Post. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, n. 6, p.1235-1254, 2005.
- AMEIRA, O.A.1; PINTO, J.E.B.P.; CARDOSO, M.G.; ARRIGONI-BLANK, M.F. Estabelecimento de cultura de células em suspensão e identificação de flavonóides em *Cordia verbenacea* DC. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.11, n.1, p.7-11, 2009.
- BARROSO, I.C.E.; OLIVEIRA, F.; BRANCO, L.H.Z.; KATO, E.T.M.; DIAS, T.G. O gênero *Cordia* L.: Botânica, química e farmacologia. **Revista Lecta**. v. 20, n. 1, p. 07-14, 2002.
- BAYEUX, M.C.; FERNANDES, A.T.; FOGLIO, M.A.; CARVALHO, J.E. Evaluation of the antiedematogenic activity of artemetin isolated from *Cordia curassavica* DC. Brazilian **Journal of Medical and Biological Research**, v.35, n. 10, p. 1229-1232, 2002
- BORELLA, J.C.; DUARTE, D.P.; NOVARETTI, A.A.G.; MENEZES JR., A.; FRANÇA, S.C.; RUFATO, C.B.; SANTOS, P.A.S.; VENEZIANI, R.C.S.; LOPES, N.P.; Variabilidade sazonal do teor de saponinas de *Baccharis trimera* (Less.) DC (Carqueja) e isolamento de flavona. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4., p. 557-561, 2006.
- BORHIDI. A.; GONDAR, E.; OROSZ-KOVÁCS, Z. The re-consideration of the genus *Cordia* L. **Acta Botanica Hungarica**, Budapest. v. 34, n. 3-4, p. 375-423, 1988.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução ANVISA RDC n. 10, de 9 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 mar. 2010a. Seção 1, p. 52.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira**. Brasília: Anvisa, 2011. 126p.
- BOIRA, H.; BLANQUER, A. Environmental factors affecting chemical variability of essential oils in *Thymus piperella* L. **Biochemycal Systems Ecology**, v.26, n.8, p.811-822, 1998.
- BOTREL, P.P.; PINTO, J.E.B.P.; FERRAZ, V.; BERTOLUCCI, S.K.V.; FIGUEIREDO, F.C. Teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marrubioides* Epl., Lamiaceae em função da sazonalidade. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, n. 3, p. 533-538, 2010
- COUTINHO, M.A.S.; MUZITANO, M.F.; COSTA, S.S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.
- CRAVEIRO, A. A.; QUEIROZ, D. C. Óleos essenciais e química fina. **Revista Química Nova**, v. 16, n. 3, p. 224- 228, 1993.
- DE BARROS, F. M. C.; ZAMBARDA, E. O.; HEINZMANN, B.M.; MALLMANN, C.A. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenoides presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 861-867, mar. 2009.
- DE CARVALHO JR, P.M.; RODRIGUES, R.F., SAWAYA, A.C.; MARQUES, M.O.; SHIMIZU, M.T. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* D.C. **Journal of Ethnopharmacology**, v.95, p. 297–301, 2004.

FERNANDES, E.S.; PASSOS, G.F.; MEDEIROS, R. DA CUNHA, F.M.; FERREIRA, J. CAMPOS, M.M.; PIANOWISK, L.F. CALIXTO, J.B.. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 27, n. 569, p. 228-236, 2007.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GODINHO, W.M. Estudo da variação sazonal e circadiana da composição química do óleo essencial de *Blepharocalyx salicifolius* (KUNTH) O. Berg. Dissertação (Mestrado). Diamantina, 2011. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina.

GOTTSCHLING, M.; MILLER, J.S.; WEIGEND M.; HILGER, H.H. Congruence of *Cordiaceae* (Boraginales) inferred from ITS1 sequence data with morphology, ecology, and biogeography. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Saint Louis, v. 92, n. 3, p. 425-437, 2005.

GROTEWOLD, E. Plant metabolic diversity: a regulatory perspective. **Trends in Plant Science**, v.10, n.2, 2005.

HARBORNE, J. B. **Introduction to ecological biochemistry**. London: Academic Press, 1977. 243 p.

HERNÁNDEZ, T. CANALES, M.; AVILA J.G.; DURAN, A.; CABALLERO, J.; VIVAR, A.R.; LIRA, R. Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlan de las Salinas, Puebla (Mexico). **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 88, p. 181-188, 2003.

INUMA, M.; MATOBA, Y.; TANAKA, T.; MIZUNO, M. Flavonoids Synthesis. I. Synthesis and Spectroscopic properties of flavones with two hydroxy and Five methoxy groups at C-2', 3', 4', 5, 6, 6', 7 and C-2', 3, 4', 5, 5', 6, 7. **Chem. Pharm. Bull.** V.34, n. 4, p. 1656-1662, 1986.

LADEIRA, R.S. **Preparação do extrato seco de *Cordia verbenacea***. Monografia (Especialização). Porto Alegre, 2002. Instituto Brasileiro de Estudos Homeopáticos, Faculdade de Ciências da Saúde de São Paulo, Porto Alegre.

LARCHER, W. **Ecologia vegetal**, São Carlos: RiMa Artes e Textos, 2000. p.33-40.

LINS, A.P.; ALVARENGA, M.A.; GOTTLIEB, O.R.; OLIVEIRA, F. Two flavonoids from *Cordia verbenacea*. **Revista Latino-Americana de Química**, v. 21, n. 82, 1990.

LIMA, H.R.P.; KAPLAN, M. A.C.; CRUZ, A.V.M. Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas. **Floresta e Ambiente**, v. 10, n. 2, p. 71-77, 2003.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas**. Nova Odessa – SP: Instituto Plantarum, 2002. 100p.

KUROYANAGI, M.; KAWAHARA, N.; SEKITA, S.; SATAKE, M. HAYASHI, T. TAKASE, Y.; MASUDA, K. Dammarane-Type triterpenes from the Brazilian medicinal plant *Cordia multispicata*. **Journal of Natural Products**, v.66, p. 1307-1312, 2003.

KVIECINSKI, M. R. Study of the antitumor potential of brazilian *Bidens pilosa* L., *Casearea sylvestris* S., *Cordia verbenacea* DC and *Croton celtidifolius* B. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PLANTAS MEDICINAIS, 21., 2010, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais, 2010. 1 CD-ROM.

MABRY, T. J.; MARKHAN, K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. Springer-Verlag, New York, p-41, 1970.

MATIAS, E.F.F.; SANTOS, K.K.A.; ALMEIDA, T.S.; COSTA, J.G.M.; COUTINHO, H.D.M. Atividade antibacteriana *in vitro* de *Croton campestris* A., *Ocimum gratissimum* L. e *Cordia verbenacea* DC. **Revista Brasileira de Biociências**. V. 8, n.3, p. 294-298, 2010.

MATIAS, E.F.F.; ALVES, E.F. SILVA, M.K.N.; CARVALHO, V.R.A.; COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M. The genus *Cordia*: botanists, ethno, chemical and pharmacological aspects. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2015.

MELO, J.I.M.; LEMOS, L.P.L. Sinopse taxonômica de Boraginaceae *sensu lato* A. Juss. no Estado de Alagoas, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v.22, n.3, p. 701-710, 2008.

MILLER, J. S.; GOTTSCHLING, M. Generic classification in the Cordiaceae (Boraginales): resurrection of the genus *Varronia* P. Br. **Táxon**, Utrecht, v. 56, n. 1, p. 163-169, 2007.

MING, L.C. CHAVES, F.C.M. MARQUES, M.O.M.; MEIRELES, M.A.A. Produção sazonal de óleo essencial em uma população natural de *Piper aduncum* L. em Adrianópolis – PR. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 2, 2002

MONTANARI JR., I. **Variabilidade genética em uma população de *Cordia verbenacea* DC. para características agrônômicas e fitoquímicas**. Tese (Doutorado), Botucatu, 2011. Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, Botucatu.

MORVILLO, C.; GILL, A. Relationships between plant density, biomass and essential oil production in seven *Aloysia citrodora* accessions from Argentina and Chile. In **International symposium breeding research on medicinal and aromatic plants**. 2004, Campinas, Anais, p.A03-42

OLIVEIRA, L. G. S. Avaliação da atividade antifúngica e toxicidade do extrato etanólico de *Cordia verbenacea*. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PLANTAS MEDICINAIS, 21., 2010, João Pessoa. **Anais**. João Pessoa: Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais, 2010. 1 CD-ROM.

PASSREITER, C. M.; ALDANA, B. E. M. Variability of Sesquiterpene Lactones in *Neurolaena lobata* of Different Origin. **Planta Medica**, v.64, n.5, p. 427-430, 1998.

PEIXOTO SOBRINHO, T.J.S.; GOMES, T.L.B.; CARDOSO, K.C.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; AMORIM, E.L.C. Teor de flavonóides totais em produtos contendo pata-de-vaca (*Bauhinia* L.) comercializados em farmácias de Recife/PE. **Revista Brasileira Plantas Medicinais**, v.14, n.4, p.586-591, 2012.

PIANOWSKI, L. Primeiro fitomedicamento baseado em planta Brasileira é um antiinflamatório. **Jornal Fyotomédica**, São Paulo, v. 1, p. 2-3, 2005.

PINTO, J.E.B.P.; CARDOSO, M.G.; ARRIGONI-BLANK, M.F. Estabelecimento de cultura de células em suspensão e identificação de flavonoides em *Cordia verbenacea* DC. **Revista Brasileira Plantas Medicinais**. V.11, n. 11, p. 7-11, 2009.

ROBERTS, M. F.; TIMMERMAN, B. N.; MABRY, T.J.; BROWN, R.; MATLIN S.A. Brickellin. A novel flavones from *Brickellia veronicaefolia* and *B. chlorolepis*. **Phytochemistry**, v.23, n.1 163-165, 1984.

ROCA-PÉREZ, L.; BOLUDA, R.; GAVIDIA, I.; PÉREZ-BERMÚDEZ, P. Seasonal cardenolide production and Dop5br gene expression in natural populations of *Digitalis obscura*. **Phytochemistry**, v.65, p. 1869–1878, 2004.

ROLDÃO, E. F.; WITAICENIS, A.; LIMA, C.A.H.; DI STASI, L.C.. Evaluation of the antiulcerogenic and analgesic activities of *Cordia verbenacea* DC (Boraginaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, n. 119, p. 94-98, 2008.

SANDES, A.R.R.; DI BLASI, G. Biodiversidade e diversidade química e genética. **Biotechnology Ciência & Desenvolvimento**, p. 28-32, 2000.

SANTOS, I.F. **Determinação e avaliação quimiométrica da composição mineral do *Abelmoschus esculentus* L. comercializados na cidade de Salvador**. Dissertação (mestrado). Salvador, 2013. Universidade Federal da Bahia, Salvador.

SANTOS, M.C.B.G.; PINHO, M.S. Estratégias tecnológicas em transformação: Um estudo da indústria Farmacêutica Brasileira. **ENESEP**, p.1-15, 2010.

SCARDELATO, J. A. **Cordia verbenacea DC.: Perfil morfo-anatômico, hitoquímico, farmacognóstico e avaliação da atividade anti-Candida do extrato hidroetanólico e suas frações.** Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, SP - UNESP, 2013.

SCHRUBERT, A.; ZANIN, F.F.; PEREIRA, D.F.; ATHAYDE, M.L. Variação anual de metilxantinas totais em amostras de *Ilex paraguariensis* A. ST. – Hil. (erva-mate) em Ijuí e Santa Maria, estado do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, V. 29, N. 6, p.1233-1236, 2006.

SERTIÉ, J. A.; BASILE, A.C.; PANIZZA, S.; MATIDA, A.K.; ZELNIK, R. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea*. Part 1. Anti-inflammatory activity and toxicity of the crude extract of the leaves. **Planta Medica**, Stuttgart, n. 54, v. 1, p. 7-10, 1988.

SERTIÉ, J. A.; BASILE, A.C.; PANIZZA, S.; MATIDA, A.K.; ZELNIK, R. Antiinflammatory activity and sub-acute toxicity of artemetin. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 56, n. 1, p. 36-40, 1990.

SIANI, A. C. Óleos essenciais: potencial anti-inflamatório. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 6, p. 38-43, 2000

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.** Editora LTC, sétima edição, 2010

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R.; **Farmacognosia : da planta ao medicamento.** 6. ed. Santa Catarina: Editora da UFSC, 2010.

SOUZA, M. F.; NERY, P. S.; MANGANOTTI, S. A.; MATOS, C.C.; MARTINS, E. R. Conteúdo de Óleo Essencial de *Cordia verbenacea* em Diferentes Horários de Coleta. **Revista Brasileira De Agroecologia**, v. 4, n. 2, p.2672-2675, 2009.

SOUSA, M.P. DE; MATOS, M.E.O.; MATOS, F.J.A.; MACHADO, M.I.L.; CRAVEIRO, A.A. In: MATOS, F.J.A. (org.). **Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras.** Fortaleza: Ed. UFC, 2004. 448p.

STILL, W.C.; KAHN, M.; MITRA, A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. **Journal of Organic Chemistry**. v. 43, n. 14, p. 2923-2925, 1978

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Secondary metabolism. Terpenes. Phenolic compounds. Nitrogen-Containing. Plant Physiology.** 2nd. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1998. p. 349-371.

YARIWAKE, J.H.; LANÇAS F.M.; CAPPELARO, E.A.; VASCONCELOS, E.C. TIBERTI, L.A.; PEREIRA, A.M.S.; FRANCA, S.C. Variabilidade sazonal de constituintes químicos (triterpenos, flavonóides e polifenóis) das folhas de *Maytenus aquifolium* Mart. (Celastraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 162-168, 2005.

VAN DEN DOLL, H., KRATZ, P. D., A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, p. 463-471, 1963.

VEIGA-JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528. 2005.

VELDE, V.V.; LAVIE, D.; ZELNIK, R.; MATIDA, A.K. Cordialin A and B, two new triterpenes from *Cordia verbenacea* DC. **Journal of the Chemical Society Erkin Trans**, v. 1, p. 2697-2700, 1982.

WAGNER, H.; BLADT, S.; RICKLÇ, V. **Plant Drug Analysis:** Athin Layer Chromatography Atlas. 2nd. ed. Berlin: Springer Verlag, 1996. 384p.

8 ANEXOS

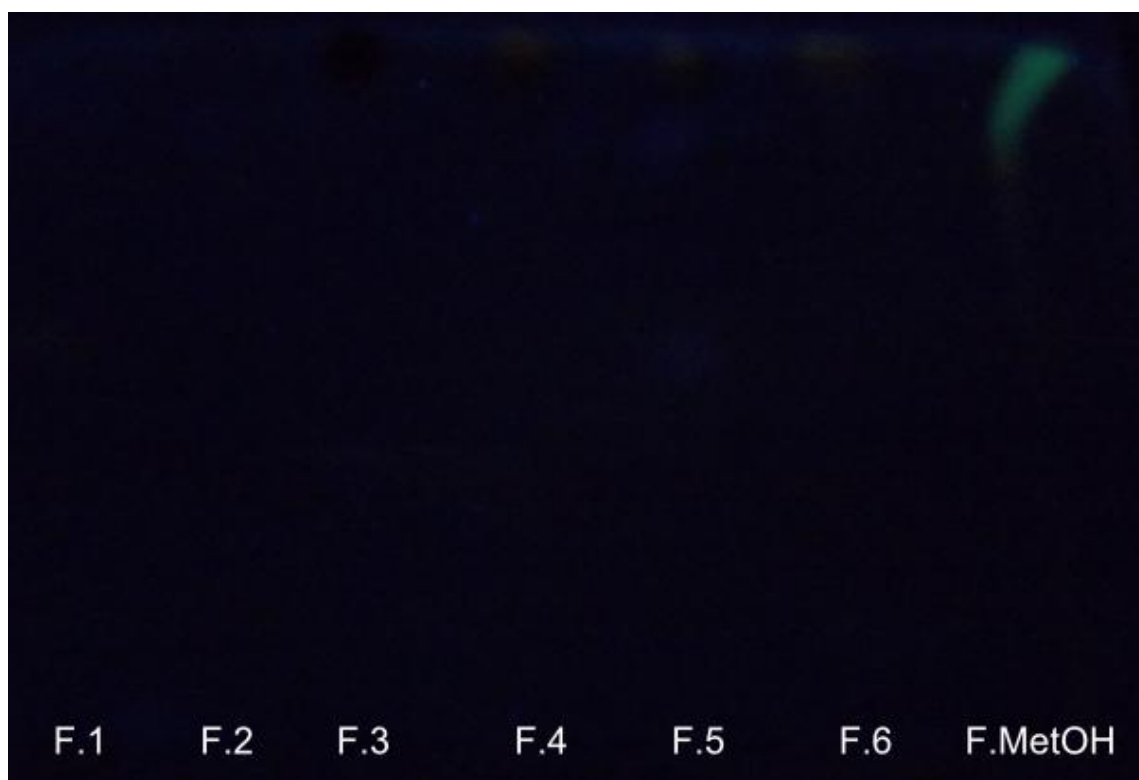


Ministério da
Ciência, Tecnologia
e Inovação

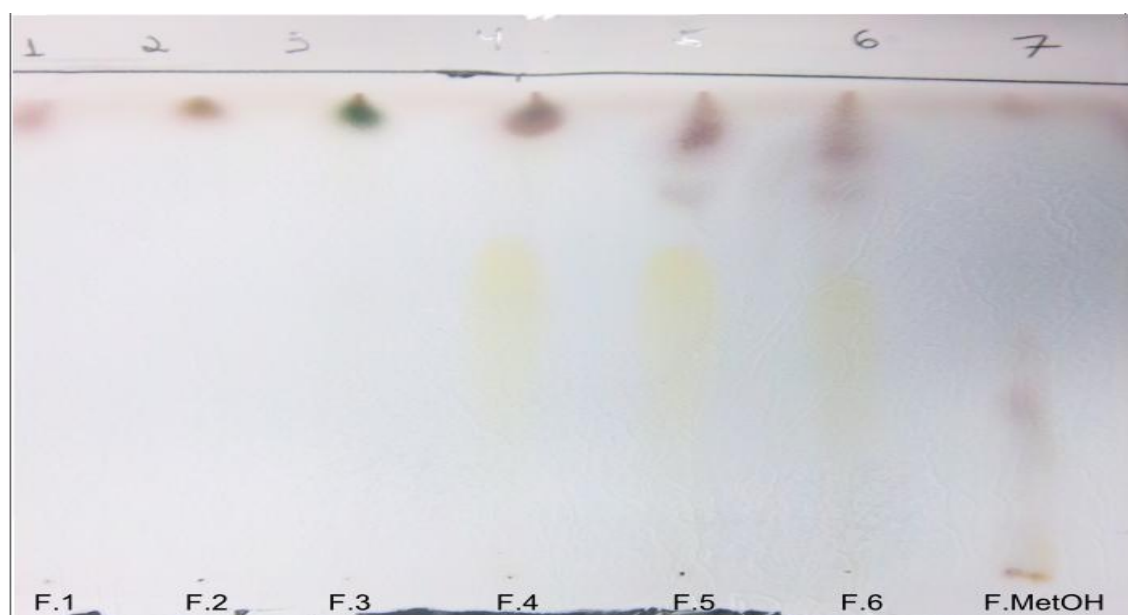


Processo	013.000878/9213-30
Autorização	010282/2015-7
Data da Autuação pelo CNPq	20/04/2015
Data da Autorização	23/04/2015
Validade da Autorização	24 meses
Instituição	Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
CNPJ	480.319.180/0001-24
Finalidade	Pesquisa Científica
Projeto	Avaliação da variabilidade química dos metabólitos secundários de <i>Cordia verbenacea</i> DC
Coordenador (a)	André Gonzaga dos Santos
Material Biológico envolvido	<i>Cordia verbenacea</i> DC
Origem do material	In situ
Localização da área de coleta	Paulínia (SP)
Remessa e/ou Transporte	Não
Sigilo	Não

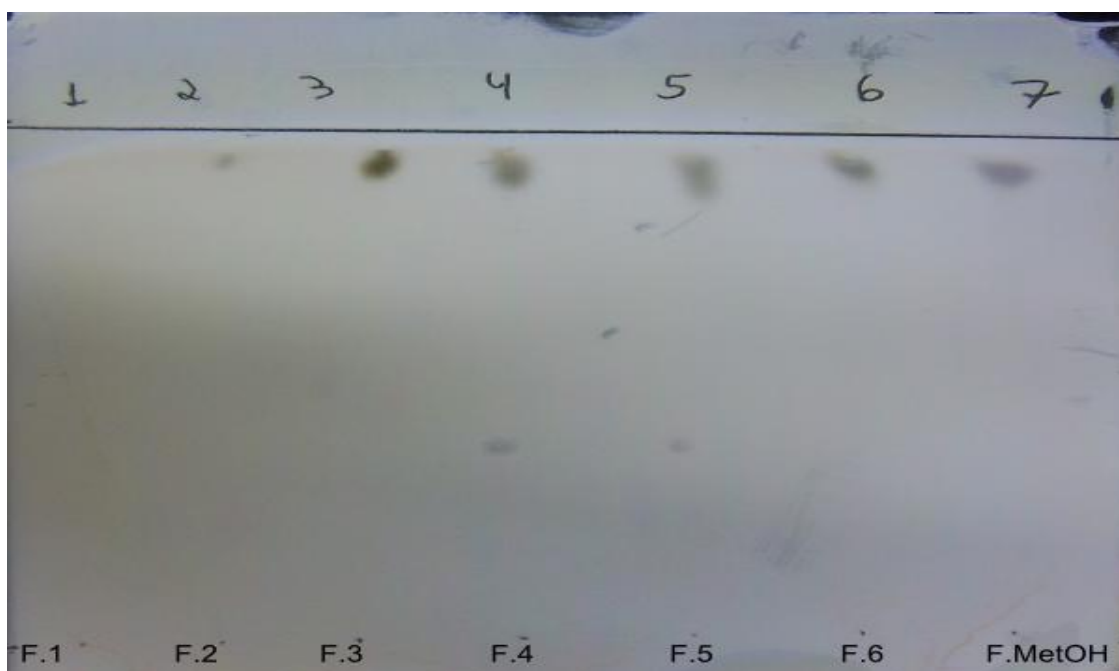
Anexo 1: Autorização de acesso ao Patrimônio Genético (CNPq)



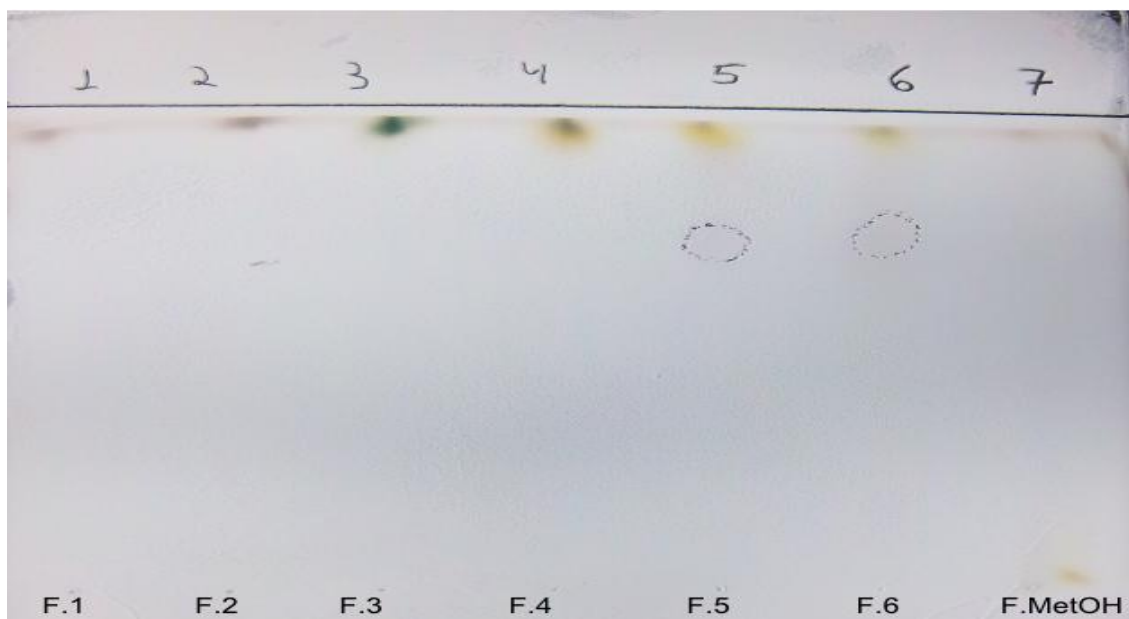
Anexo 2: Cromatoplasmas das frações EFSteste. Amostras, da esquerda para direita: F.1, F.2, F.3, F.4, F.5, F.6, F.MetOH. Fase móvel: n-butano/ácido acético/água 60:37:3. Revelador: NP-PEG.



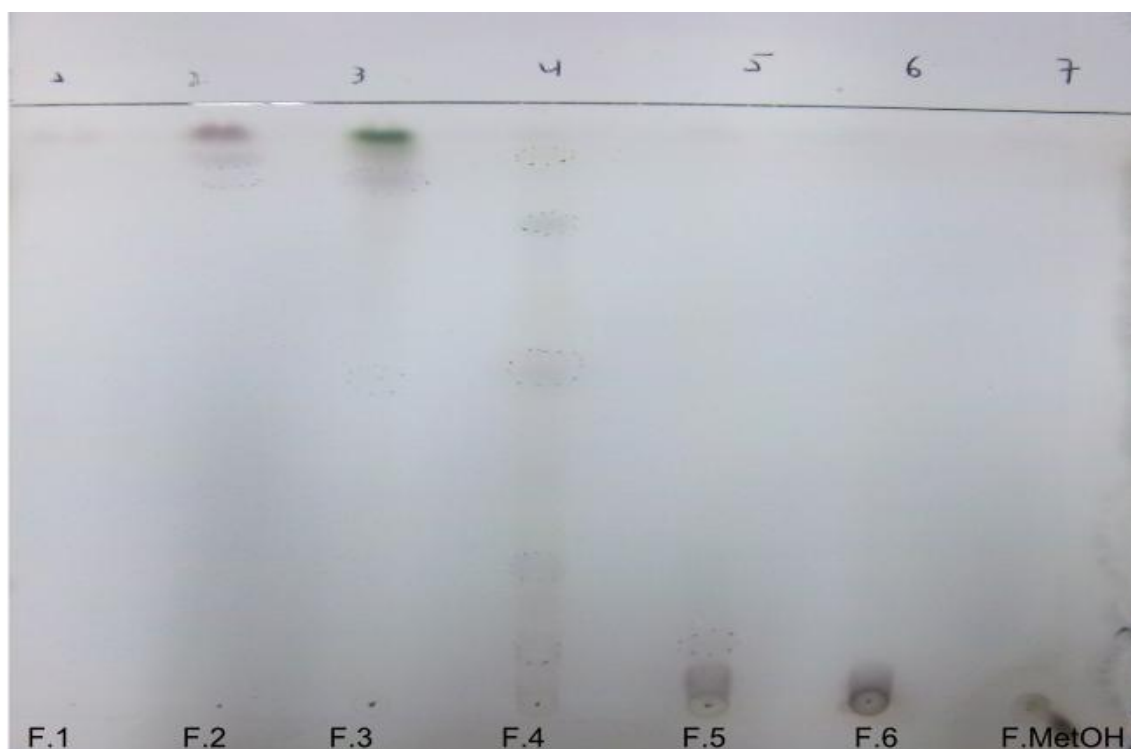
Anexo 3: Cromatoplasmas das frações EFSteste. Amostras, da esquerda para direita: F.1, F.2, F.3, F.4, F.5, F.6, F.MetOH. Fase móvel: n-butano/ácido acético/água 60:37:3. Revelador: ácido sulfúrico 10%.



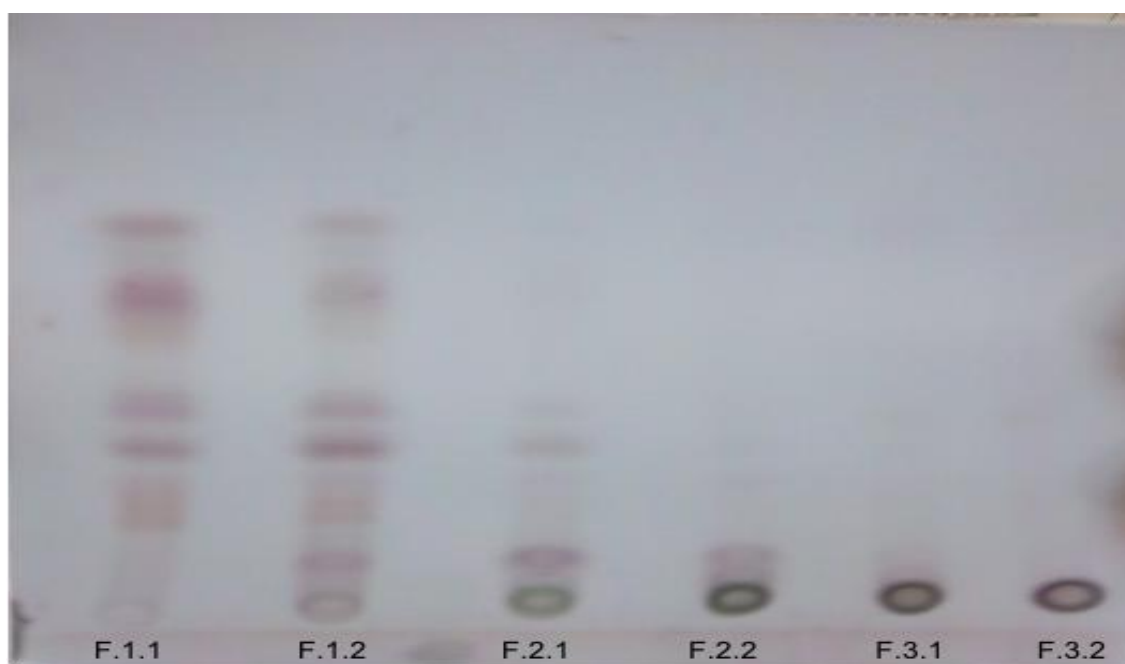
Anexo 4: Cromatoplasas das frações EFSteste. Amostras, da esquerda para direita: F.1, F.2, F.3, F.4, F.5, F.6, F.MetOH. Fase móvel: acetato de etila/ácido fórmico/água 90:5:5. Revelador: Solução etanólica de FeCl_3 1%.



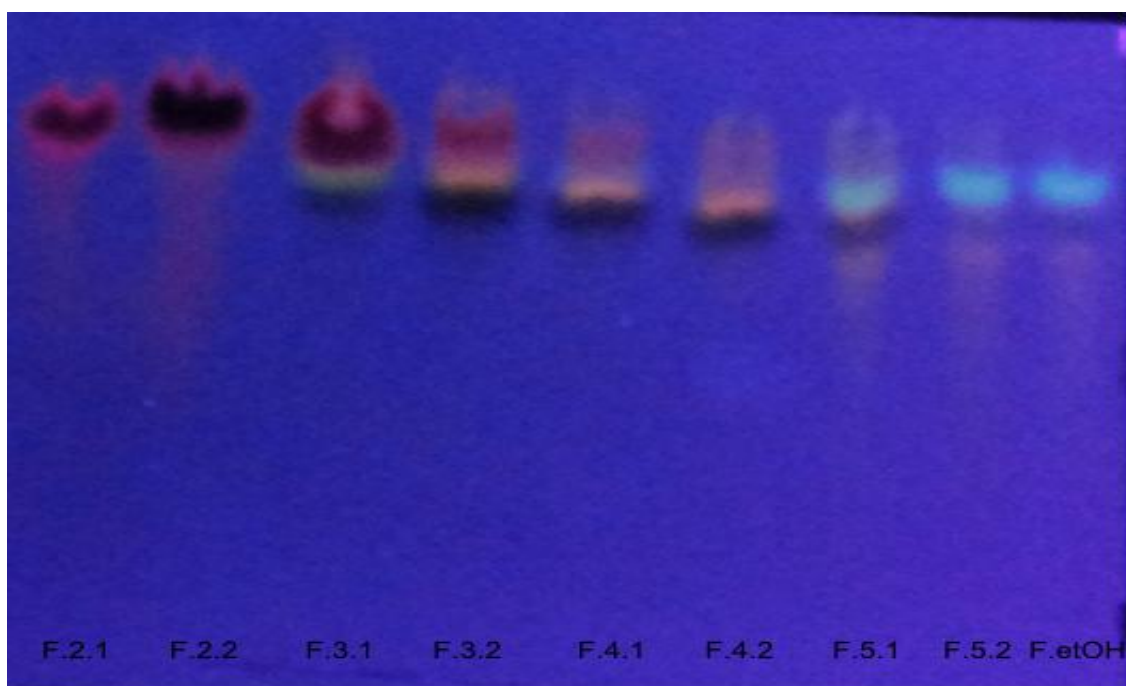
Anexo 5: Cromatoplasas das frações EFSteste. Amostras, da esquerda para direita: F.1, F.2, F.3, F.4, F.5, F.6, F.MetOH. Fase móvel: acetato de etila/ácido fórmico/água 90:5:5. Revelador: ácido sulfúrico 10%.



Anexo 6: Cromatoplasas das frações EFSteste. Amostras, da esquerda para direita: F.1, F.2, F.3, F.4, F.5, F.6, F.MetOH. Fase móvel: clorofórmio/acetato de etila 60:40 Revelador: ácido sulfúrico 10%.



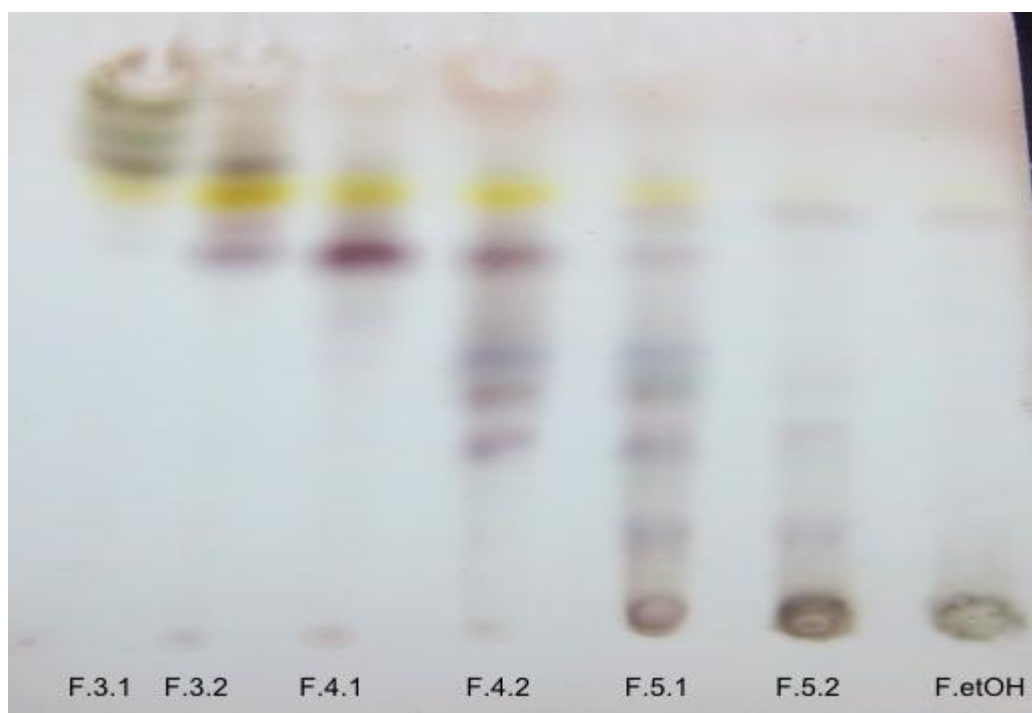
Anexo 7: Cromatoplasas das frações EFS. Amostras, da esquerda para direita: F.1.1, F.1.2, F.2.1, F.2.2, F.3.1, F.3.2. Fase móvel: hexano/acetato de etila 95:5 Revelador: ácido sulfúrico 10%.



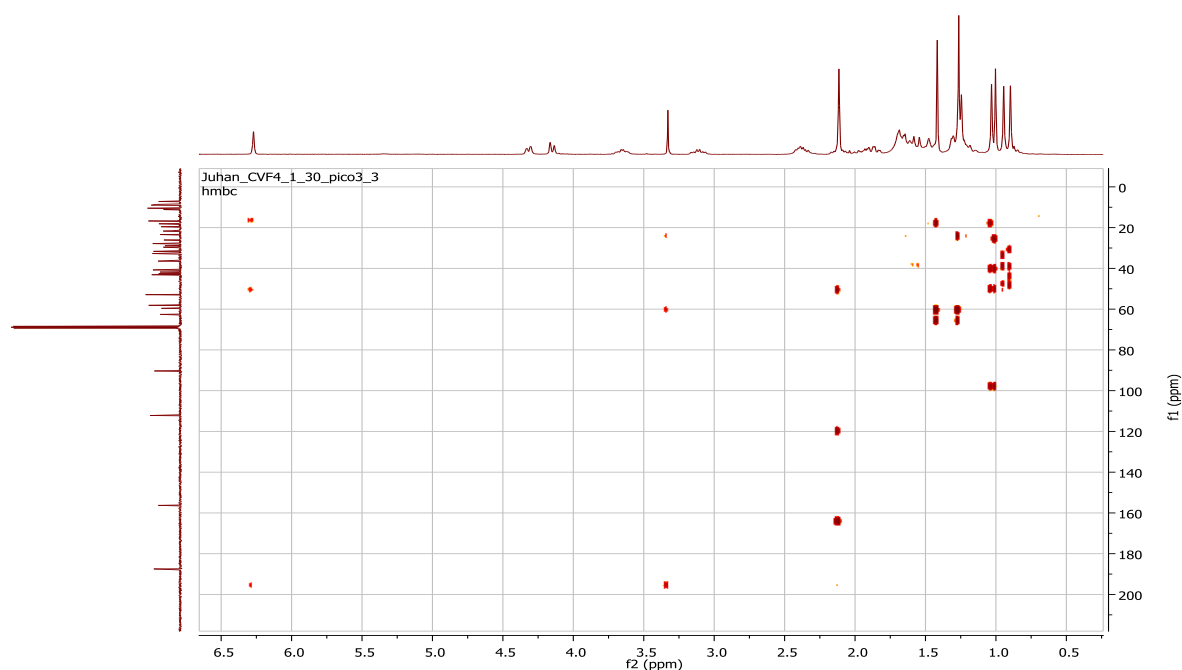
Anexo 8: Cromatoplasas das frações EFS. Amostras, da esquerda para direita: F.2.1, F.2.2, F.3.1, F.3.2, F.4.1, F.4.2, F.5.1, F.5.2, F.etOH. Fase móvel: n-butanol/ácido acético/água 60:37:3. Revelador: NP-PEG.



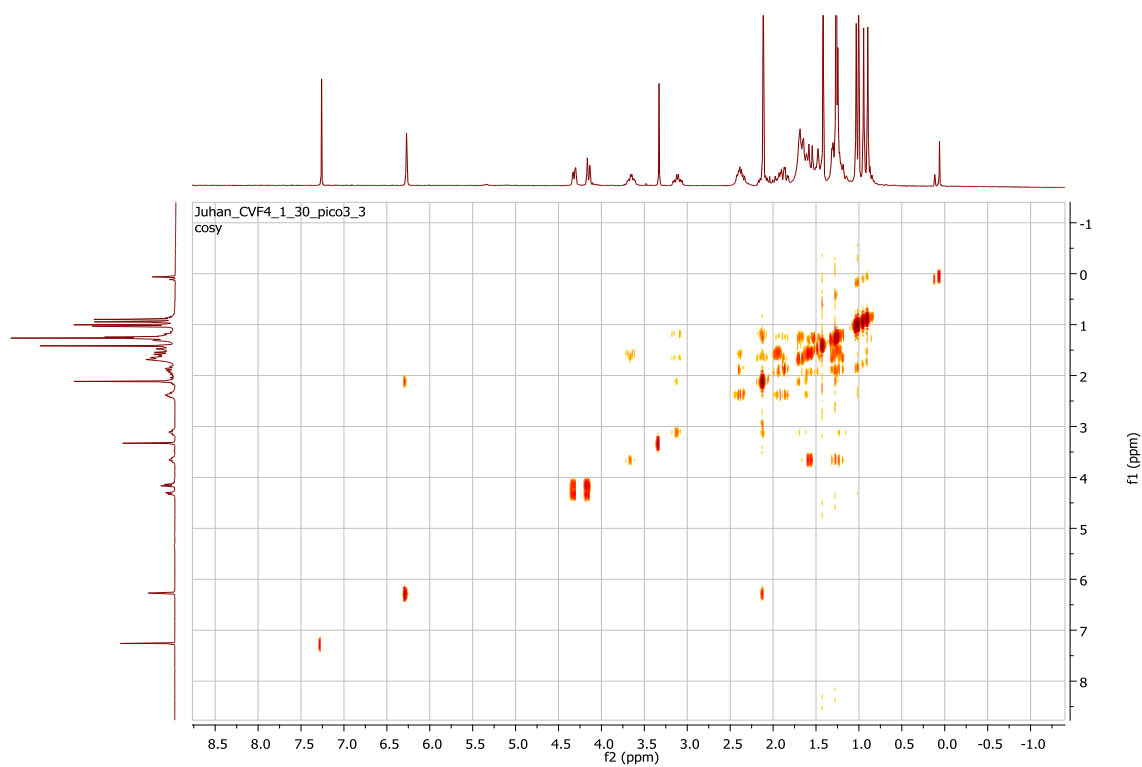
Anexo 9: Cromatoplasas das frações EFS. Amostras, da esquerda para direita: F.2.1, F.2.2, F.3.1. Fase móvel: hexano/acetato de etila/isopropanol 70:28:2. Revelador: ácido sulfúrico 10%.



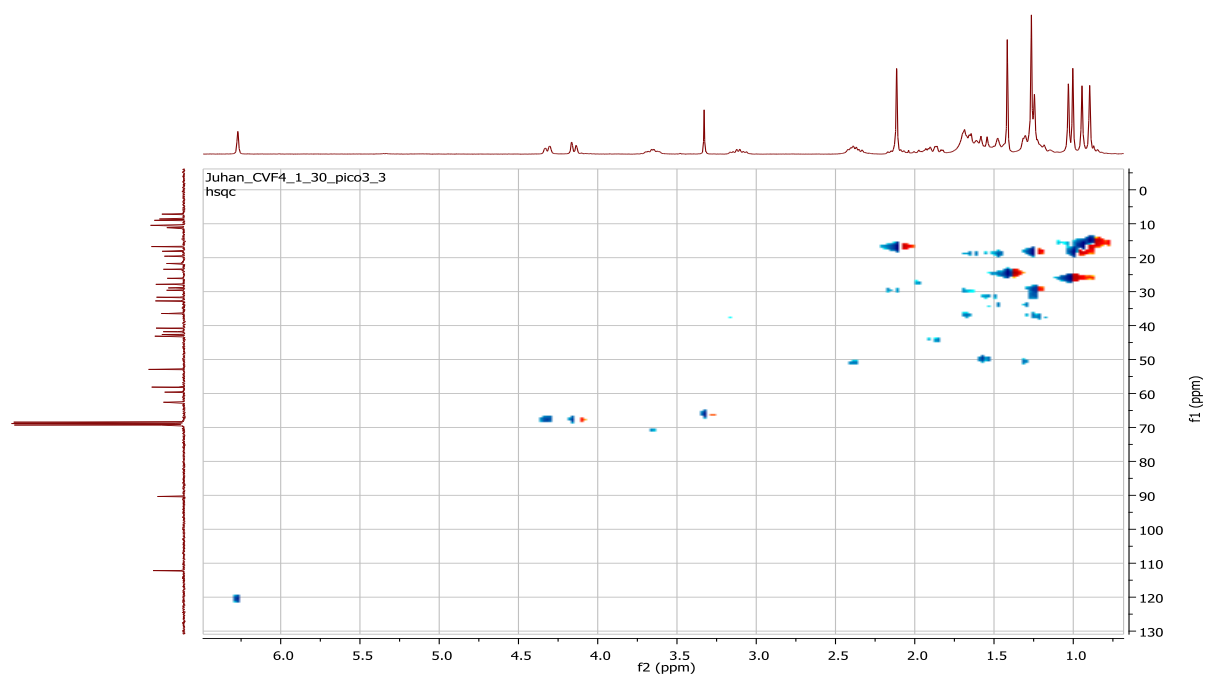
Anexo 10: Cromatoplas das frações EFS. Amostras, da esquerda para direita: F.3.1, F.3.2, F.4.1, F.4.2, F.5.1, F.5.2, F.etOH. Fase móvel: acetato de etila/ácido fórmico/água 95:5:5. Revelador: ácido sulfúrico 10%.



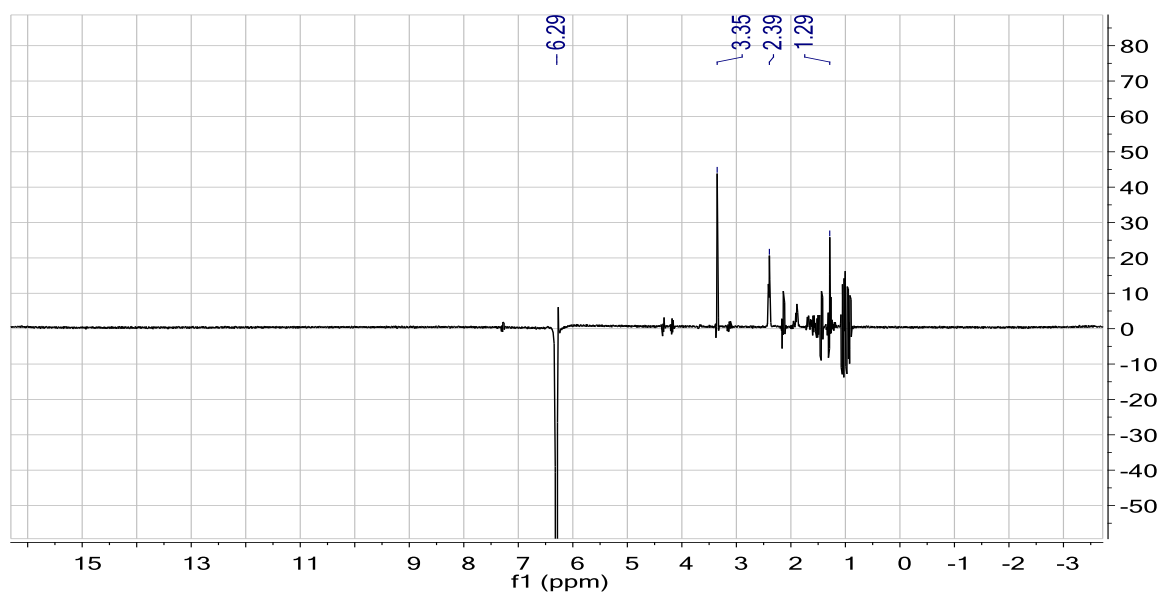
Anexo 11 - Mapa de contornos HMBC da cordialina A em CDCl_3 (10 mg/mL)



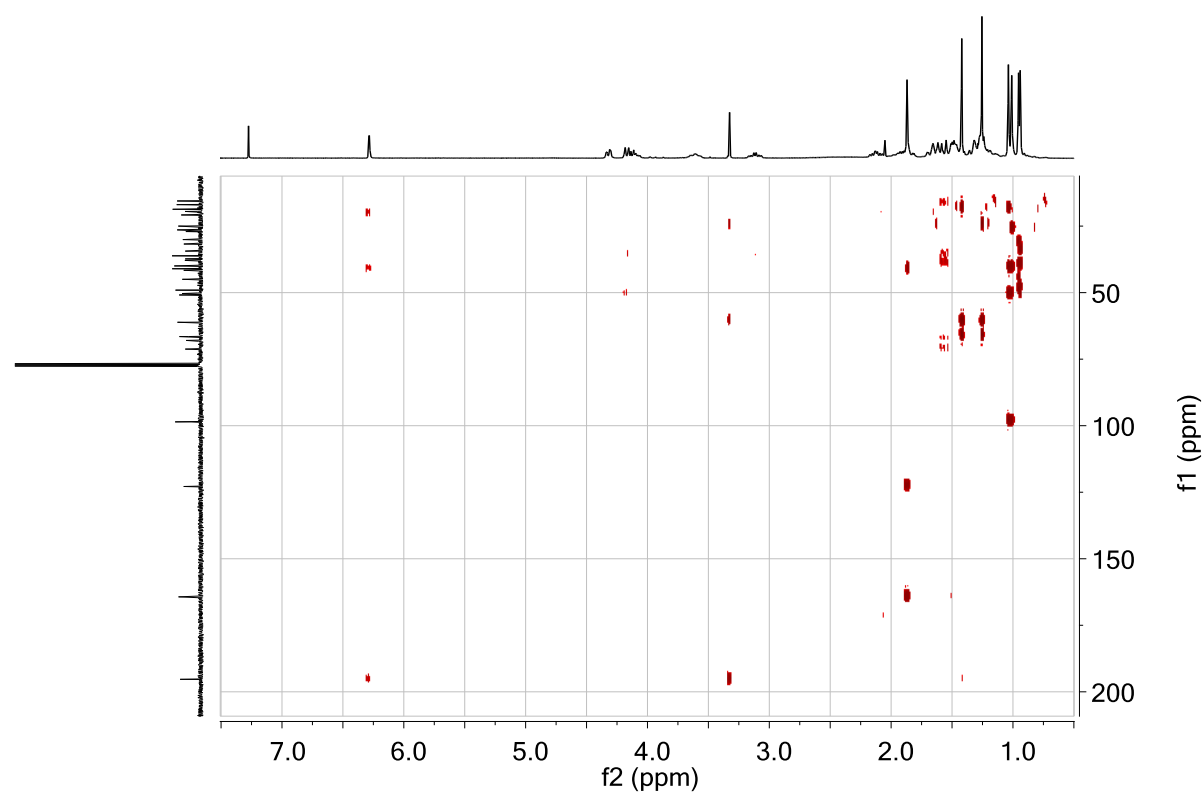
Anexo 12 - Mapa de contornos COSY da cordialina A em CDCl₃ (10 mg/mL)



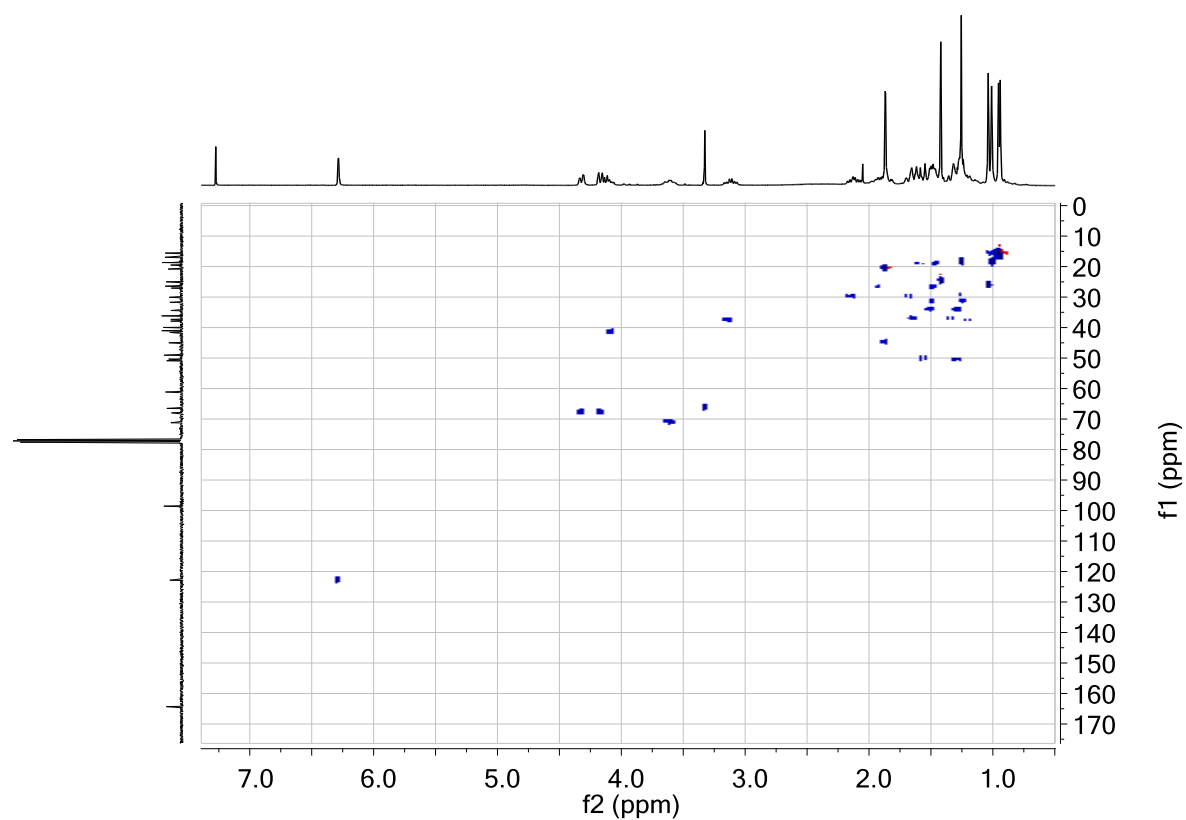
Anexo 13 - Mapa de contornos HSCQ da cordialina A em CDCl₃ (10 mg/mL)



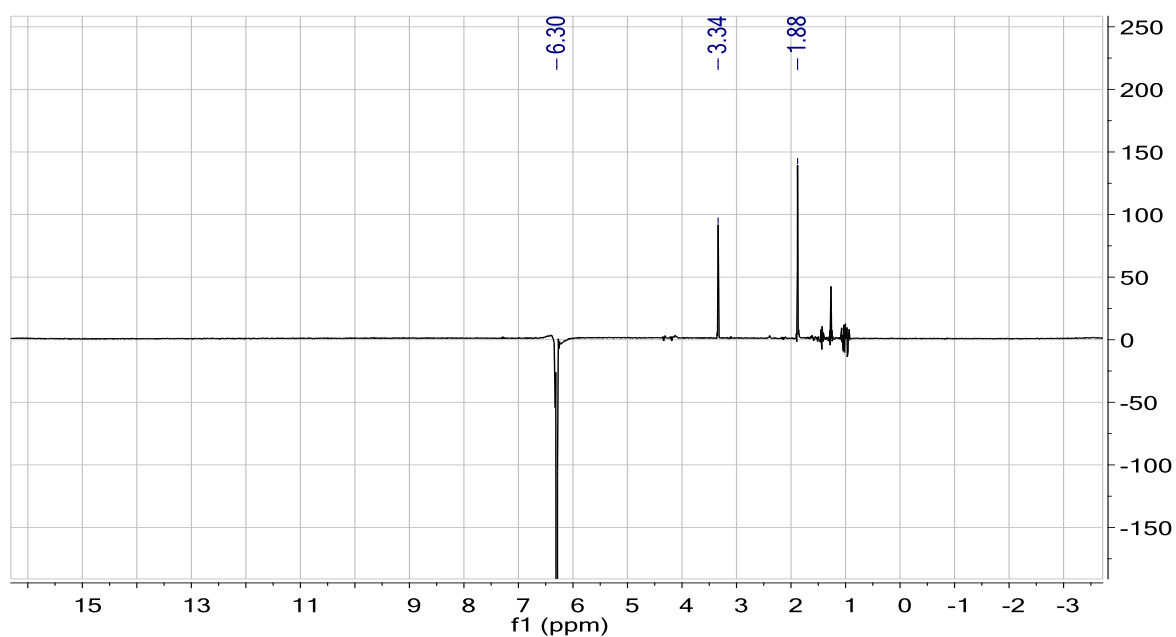
Anexo 14 – NOE-1D da cordialina A em CDCl_3 (10 mg/mL)



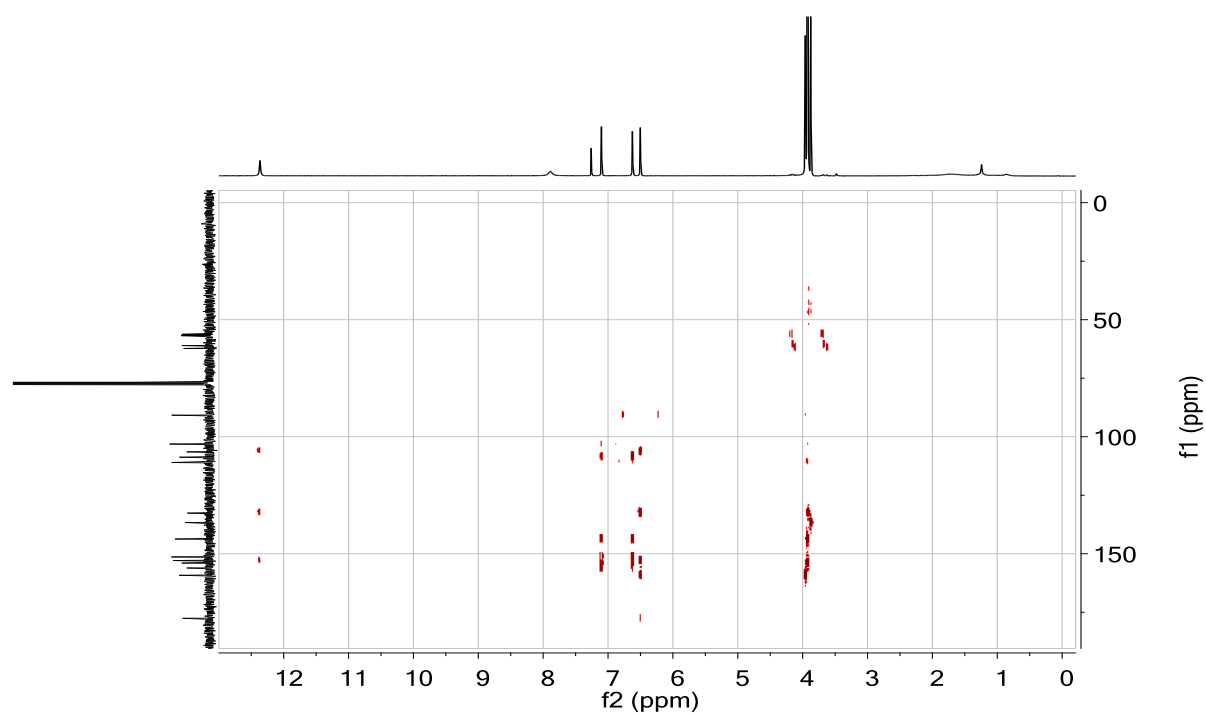
Anexo 15 - Mapa de contornos HMBC da *cis*-cordialina A (10 mg/mL)



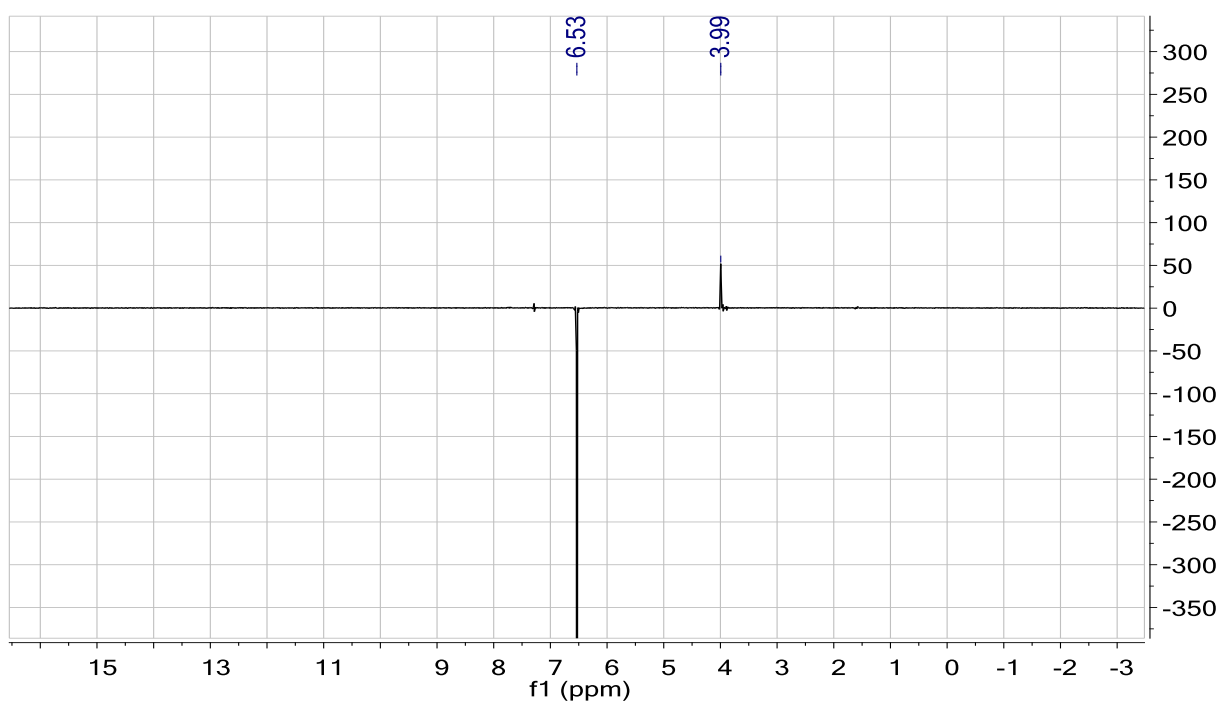
Anexo 16 - Mapa de contornos HSCQ da *cis*-cordialina A (10 mg/mL)



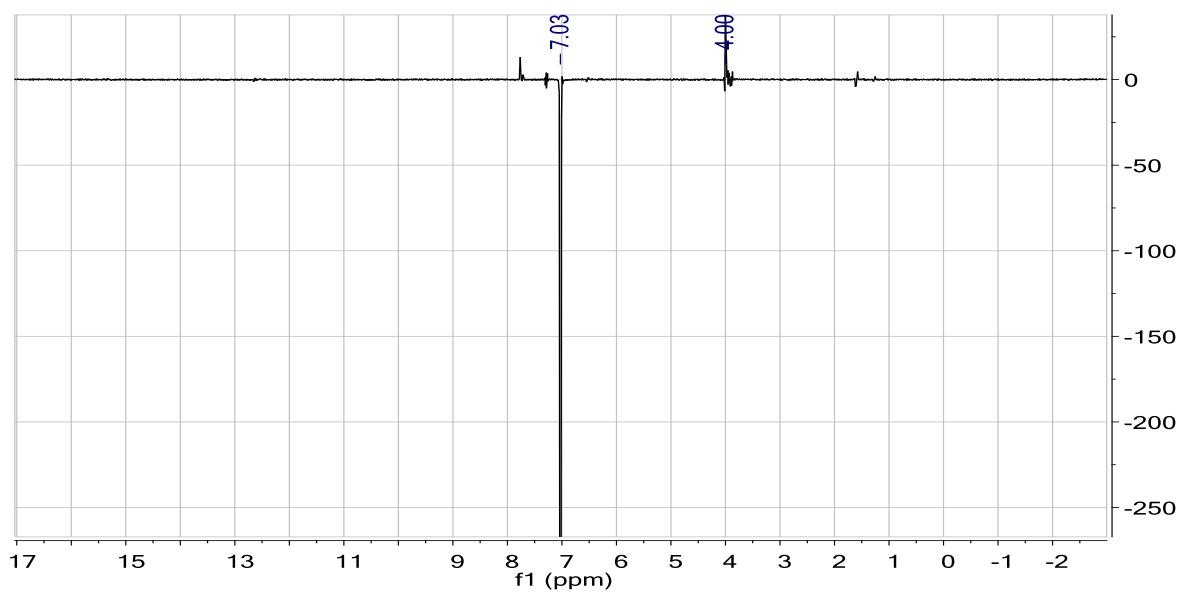
Anexo 17 – NOE-1D da *cis*-cordialina A (10 mg/mL)



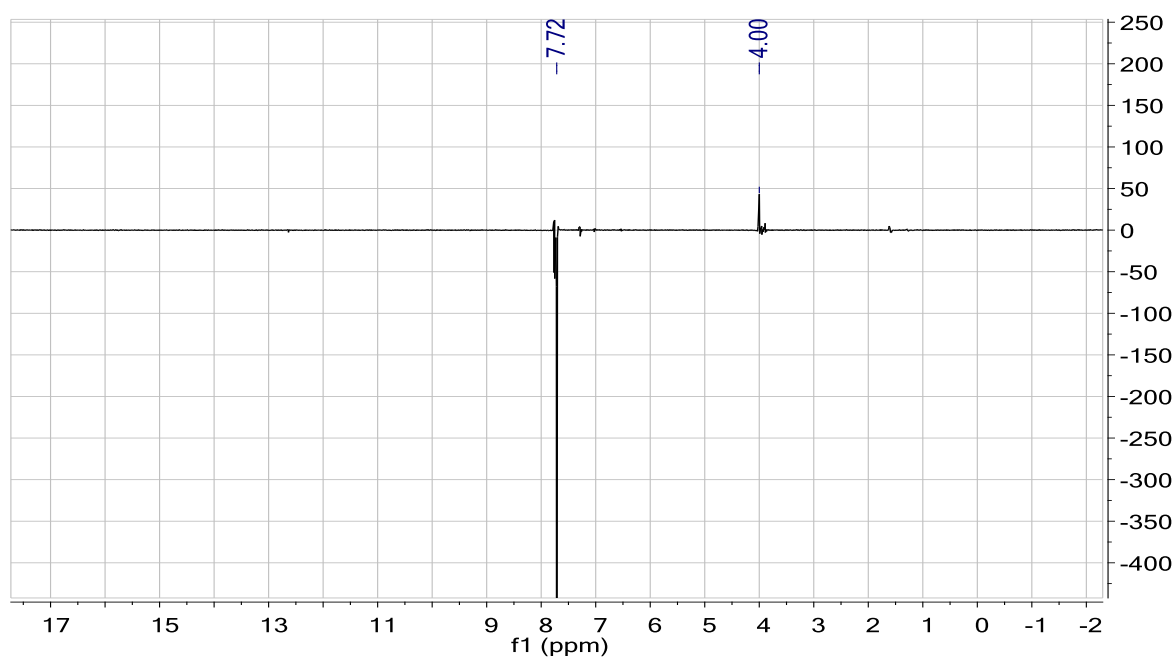
Anexo 18 - Mapa de contornos HMBC da 4',5-diidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona ou 2',5-diidroxi-4',3,5',6,7-pentametoxiflavona em CDCl₃ (17 mg/mL)



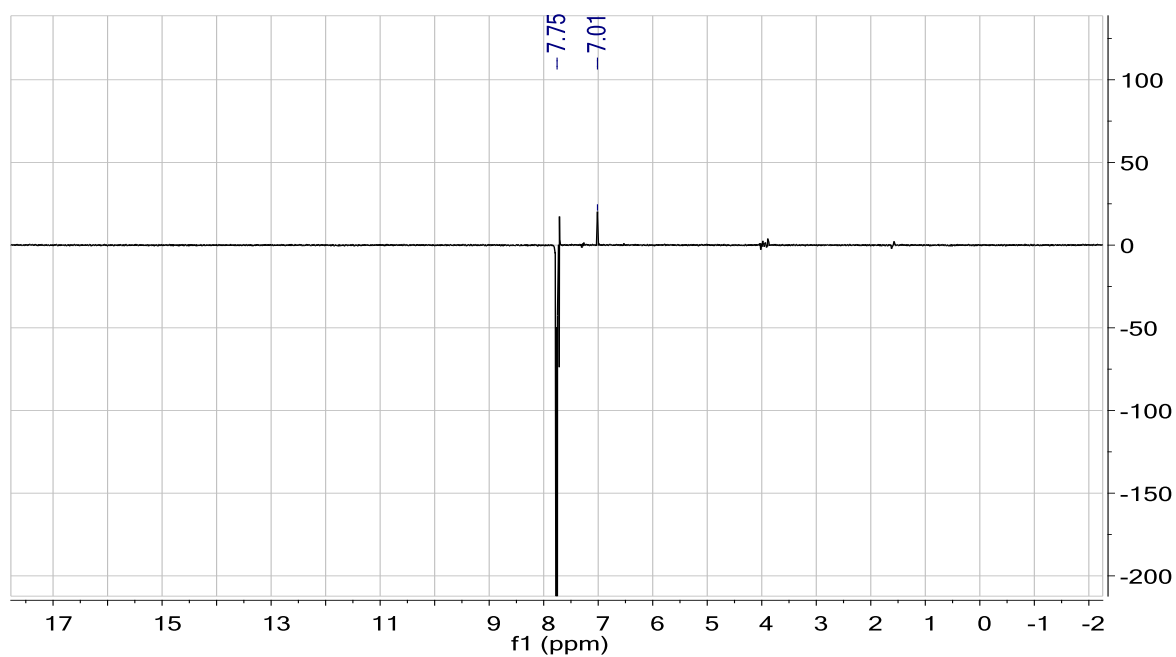
Anexo 19 – NOE-1D da artemetina (1,7 mg/mL)



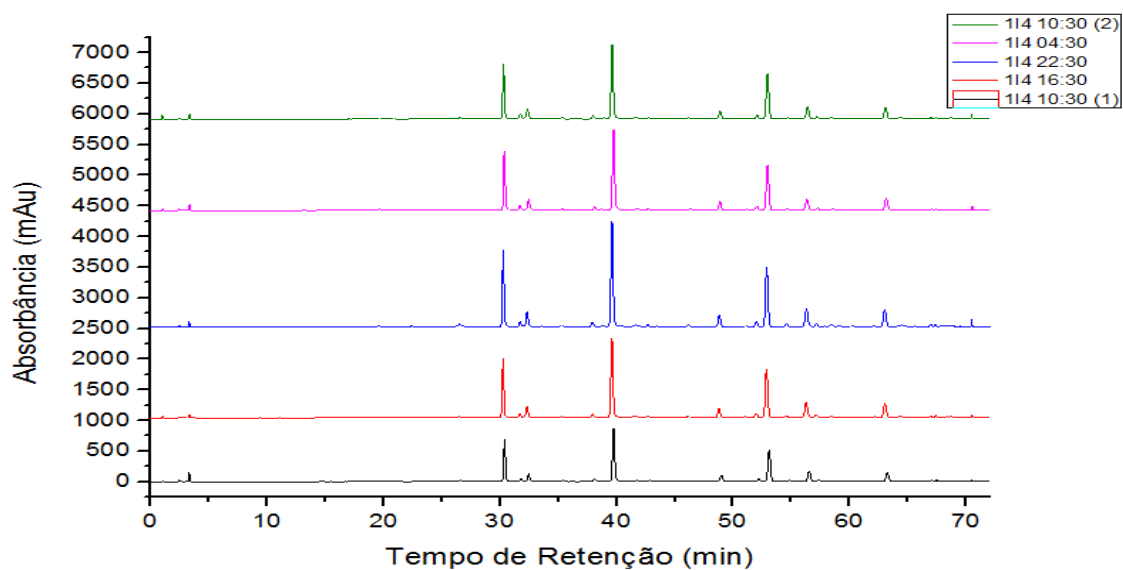
Anexo 20 – NOE-1D da artemetina (1,7 mg/mL)



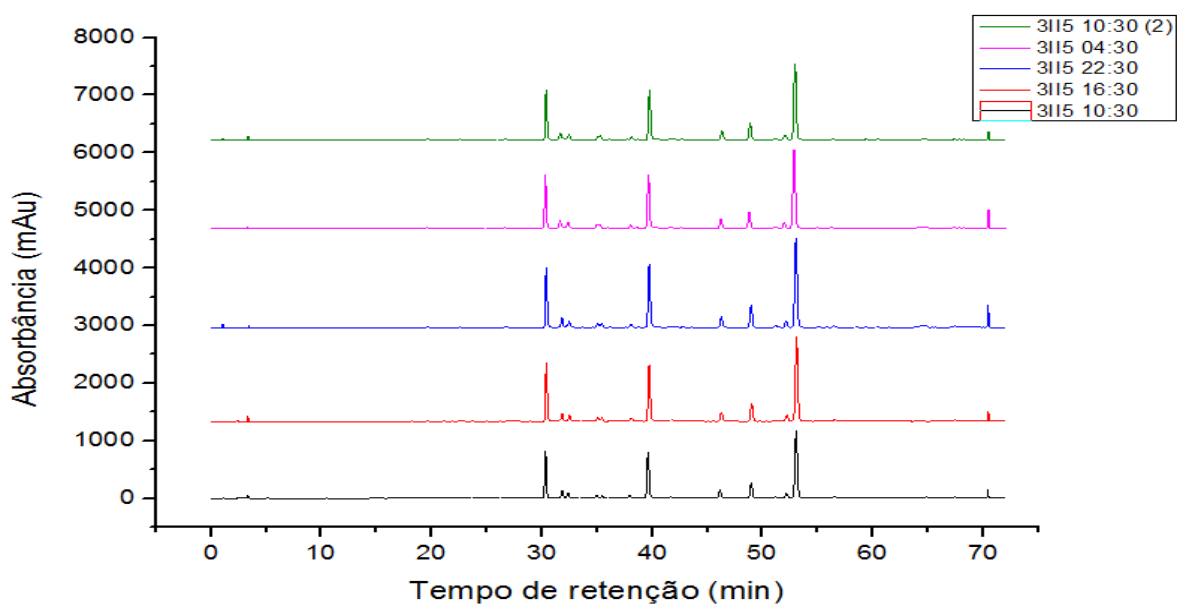
Anexo 21 – NOE-1D da artemetina (1,7 mg/mL)



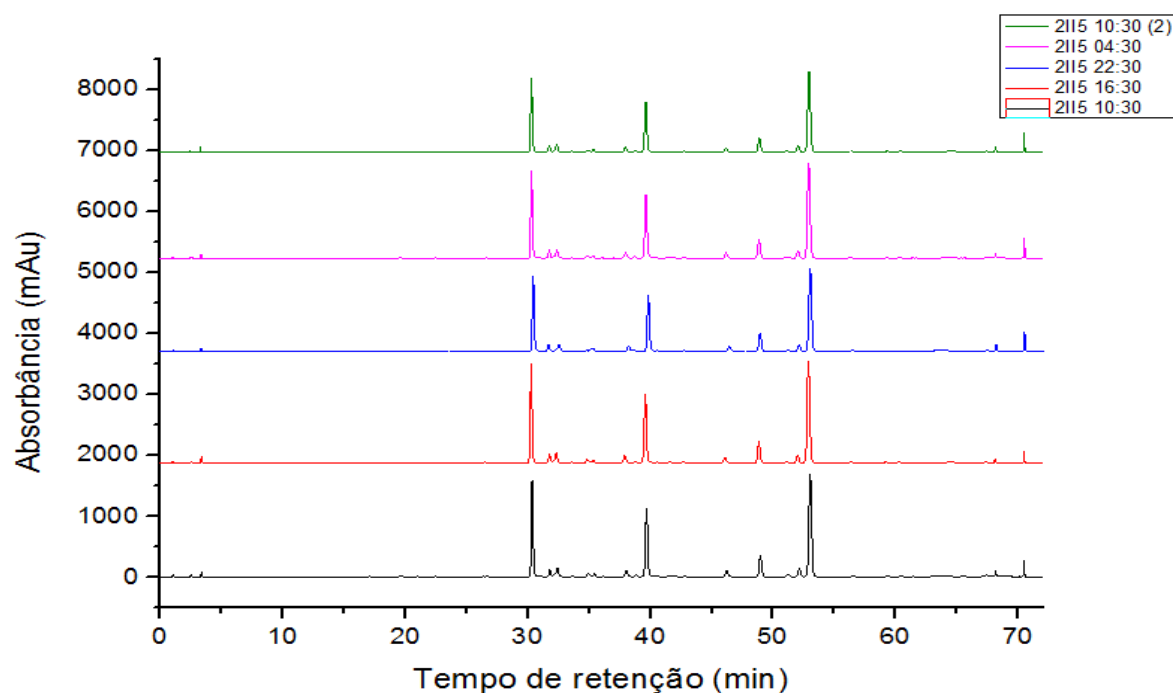
Anexo 22 – NOE-1D da artemetina (1,7 mg/mL)



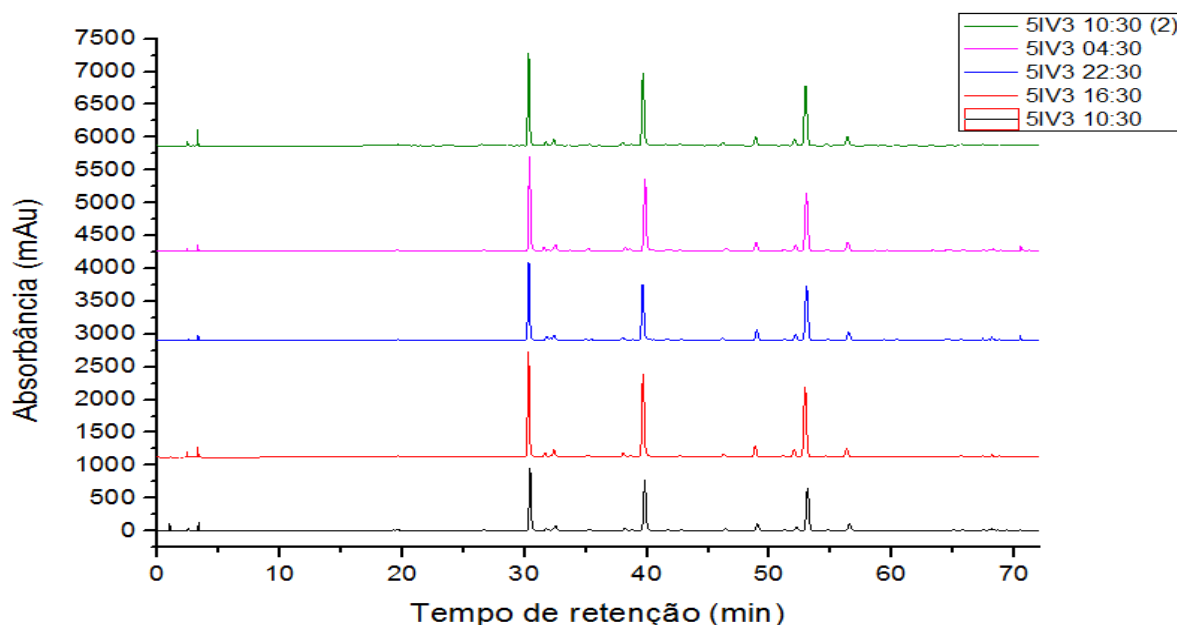
Anexo 23 - Comparação dos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD de extratos de *C. verbenacea* do espécimen 114 do estudo circadiano. Condições de análise: 0-10': 8 a 20%; 10-13': 20 a 35%; 13-60': 35 a 68%; 60-62': 68 a 100%; 62-70': 100% acetonitrila; coluna: Ace® C18 (250x4,6 mm; 5 µm); Injeção de 20 µL; λ-254 nm; vazão de 1,0 mL/min.



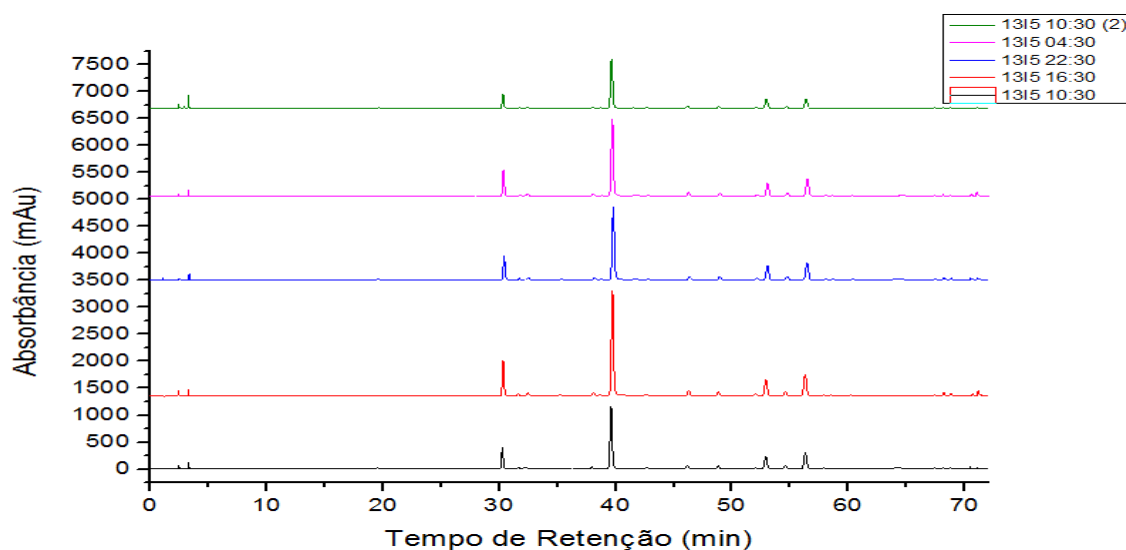
Anexo 24 - Comparação dos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD de extratos de *C. verbenacea* do espécimen 3II5 do estudo circadiano. Condições de análise: 0-10': 8 a 20%; 10-13': 20 a 35%; 13-60': 35 a 68%; 60-62': 68 a 100%; 62-70': 100% acetonitrila; coluna: Ace[®] C18 (250x4,6 mm; 5 μ m); Injeção de 20 μ L; λ -254 nm; vazão de 1,0 mL/min.



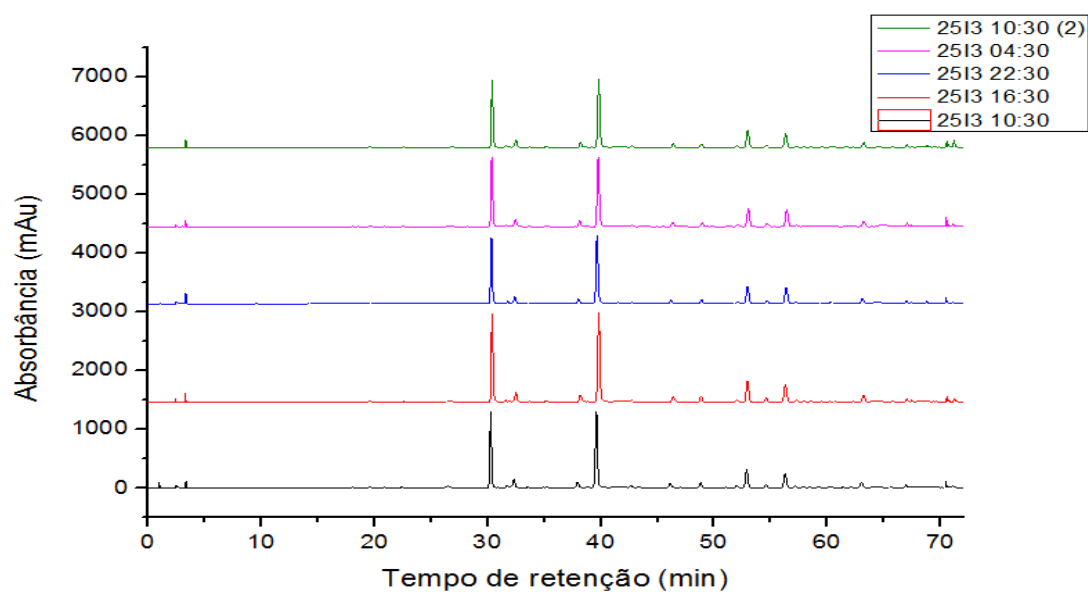
Anexo 25 - Comparação dos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD de extratos de *C. verbenacea* do espécimen 2II5 do estudo circadiano. Condições de análise: 0-10': 8 a 20%; 10-13': 20 a 35%; 13-60': 35 a 68%; 60-62': 68 a 100%; 62-70': 100% acetonitrila; coluna: Ace[®] C18 (250x4,6 mm; 5 μ m); Injeção de 20 μ L; λ -254 nm; vazão de 1,0 mL/min.



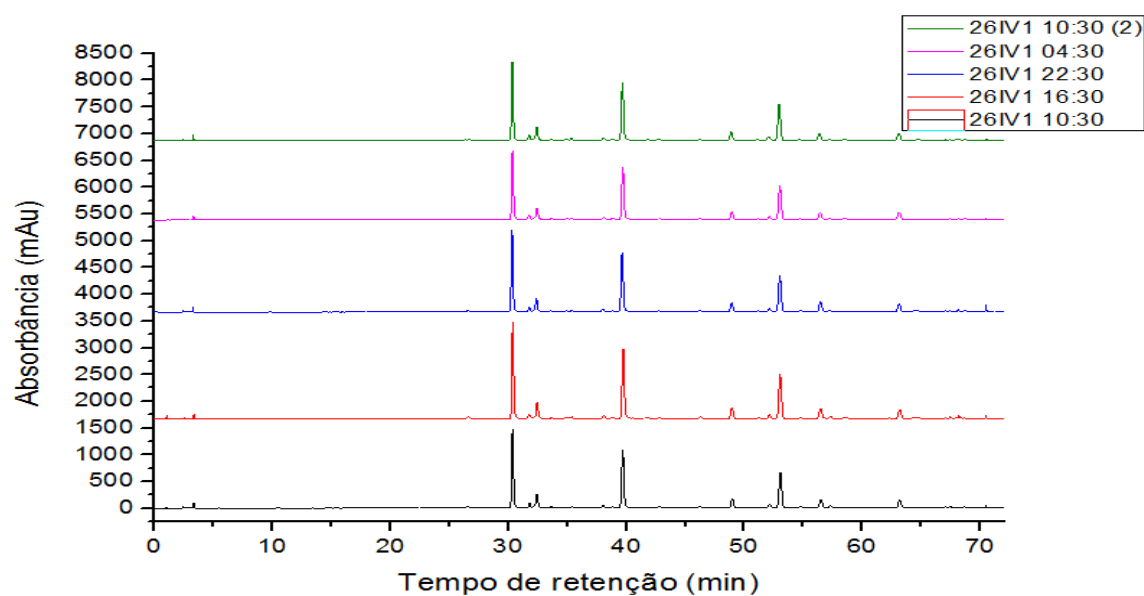
Anexo 26 - Comparação dos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD de extratos de *C. verbenacea* do espécimen 5IV3 do estudo circadiano. Condições de análise: 0-10': 8 a 20%; 10-13': 20 a 35%; 13-60': 35 a 68%; 60-62': 68 a 100%; 62-70': 100% acetonitrila; coluna: Ace[®] C18 (250x4,6 mm; 5 μ m); Injeção de 20 μ L; λ -254 nm; vazão de 1,0 mL/min.



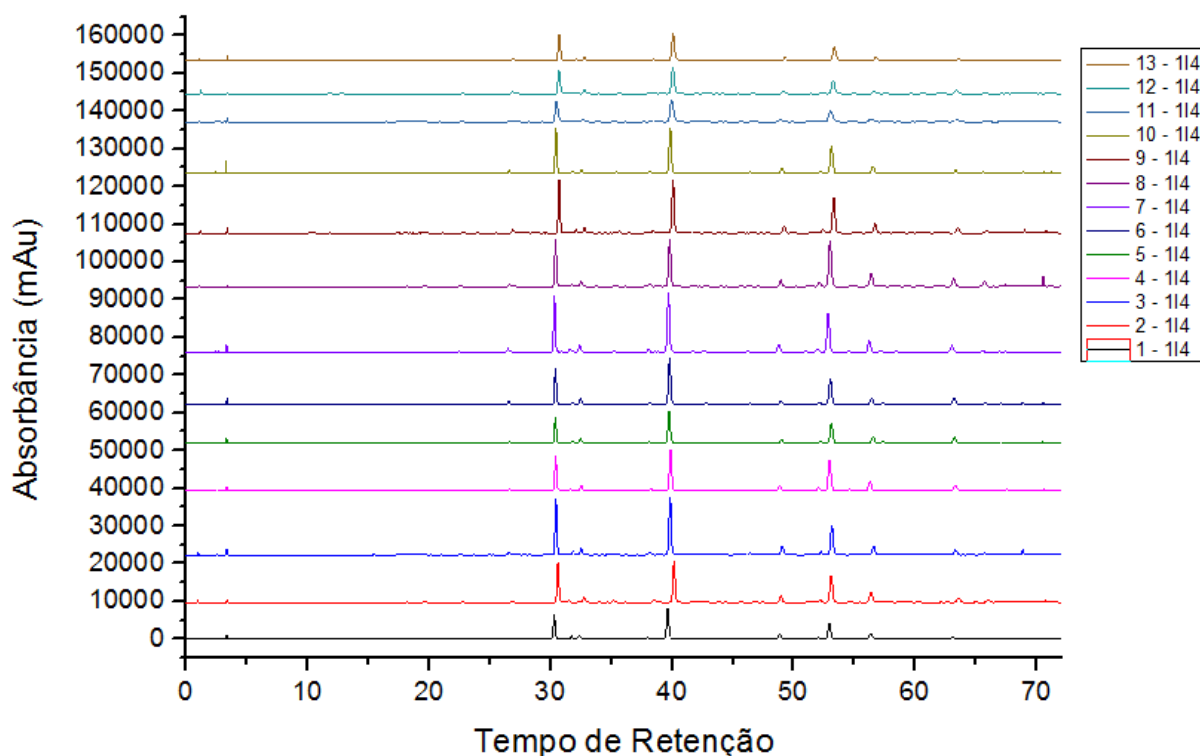
Anexo 27 - Comparação dos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD de extratos de *C. verbenacea* do espécimen 13I5 do estudo circadiano. Condições de análise: 0-10': 8 a 20%; 10-13': 20 a 35%; 13-60': 35 a 68%; 60-62': 68 a 100%; 62-70': 100% acetonitrila; coluna: Ace[®] C18 (250x4,6 mm; 5 μ m); Injeção de 20 μ L; λ -254 nm; vazão de 1,0 mL/min.



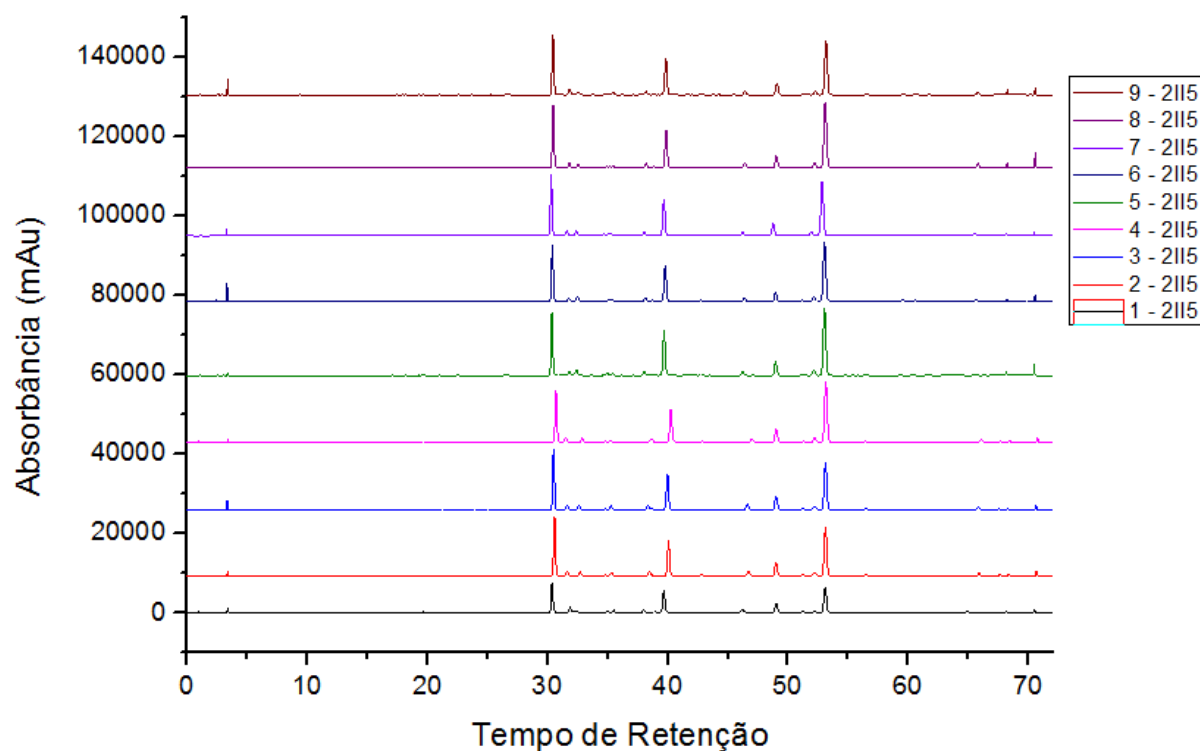
Anexo 28 - Comparação dos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD de extratos de *C. verbenacea* do espécimen 25I3 do estudo circadiano. Condições de análise: 0-10': 8 a 20%; 10-13': 20 a 35%; 13-60': 35 a 68%; 60-62': 68 a 100%; 62-70': 100% acetonitrila; coluna: Ace® C18 (250x4,6 mm; 5 µm); Injeção de 20 µL; λ-254 nm; vazão de 1,0 mL/min.



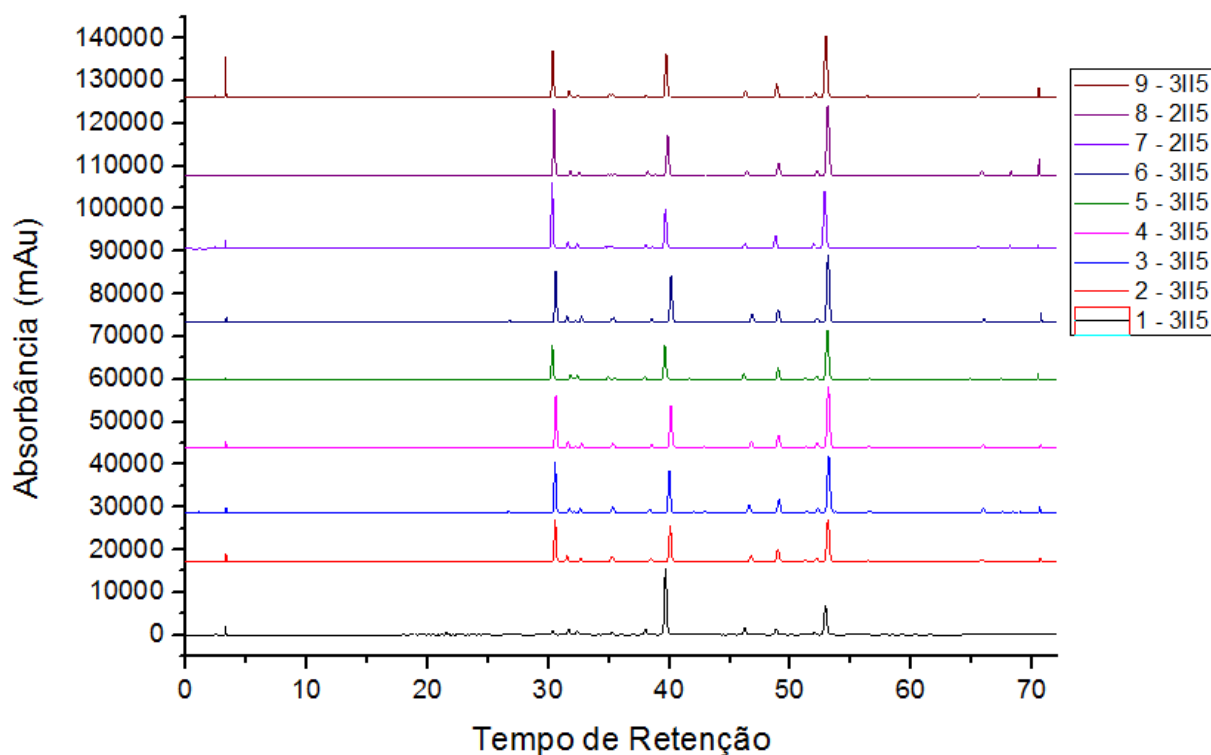
Anexo 29 - Comparação dos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD de extratos de *C. verbenacea* do espécimen 26IV1 do estudo circadiano. Condições de análise: 0-10': 8 a 20%; 10-13': 20 a 35%; 13-60': 35 a 68%; 60-62': 68 a 100%; 62-70': 100% acetonitrila; coluna: Ace® C18 (250x4,6 mm; 5 µm); Injeção de 20 µL; λ-254 nm; vazão de 1,0 mL/min.



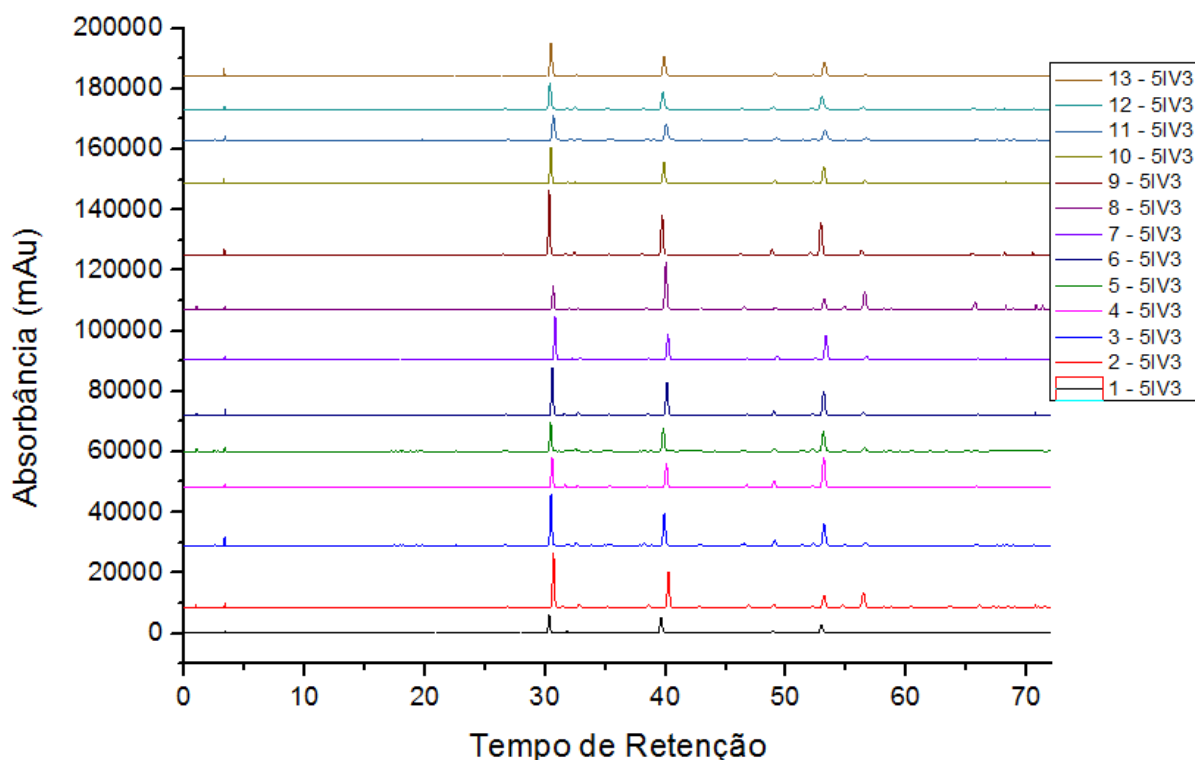
Anexo 30 - Comparação dos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD de extratos de *C. verbenacea* do espécimen 114 do estudo sazonal. Condições de análise: 0-10': 8 a 20%; 10-13': 20 a 35%; 13-60': 35 a 68%; 60-62': 68 a 100%; 62-70': 100% acetonitrila; coluna: Ace[®] C18 (250x4,6 mm; 5 μ m); Injeção de 20 μ L; λ -254 nm; vazão de 1,0 mL/min.



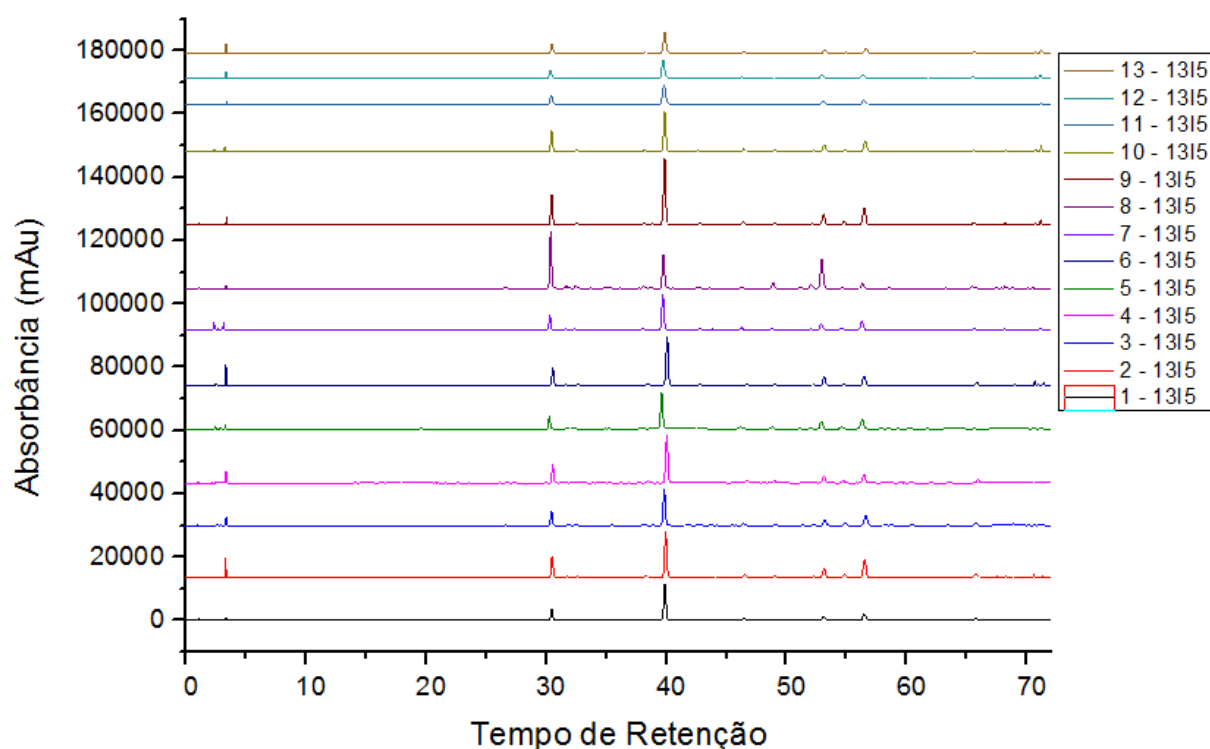
Anexo 31 - Comparação dos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD de extratos de *C. verbenacea* do espécimen 2115 do estudo sazonal. Condições de análise: 0-10': 8 a 20%; 10-13': 20 a 35%; 13-60': 35 a 68%; 60-62': 68 a 100%; 62-70': 100% acetonitrila; coluna: Ace[®] C18 (250x4,6 mm; 5 μ m); Injeção de 20 μ L; λ -254 nm; vazão de 1,0 mL/min.



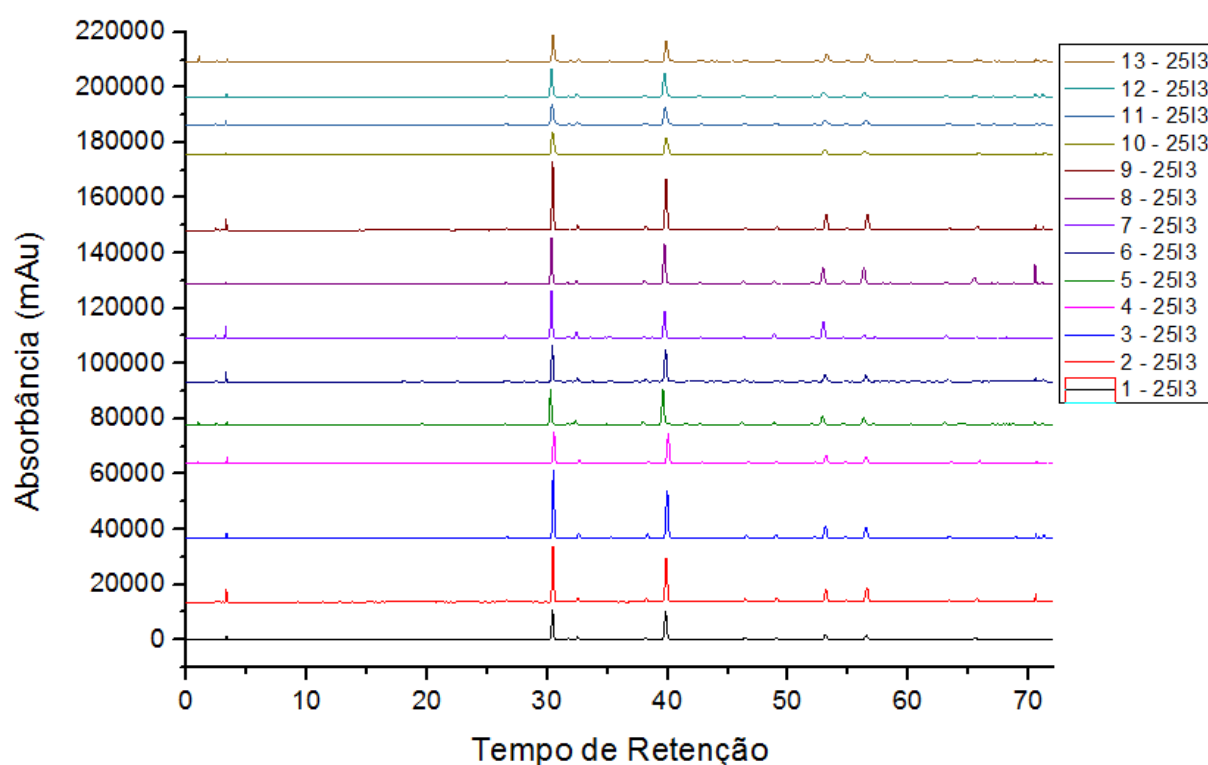
Anexo 32 - Comparação dos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD de extratos de *C. verbenacea* do espécimen 3II5 do estudo sazonal. Condições de análise: 0-10': 8 a 20%; 10-13': 20 a 35%; 13-60': 35 a 68%; 60-62': 68 a 100%; 62-70': 100% acetonitrila; coluna: Ace® C18 (250x4,6 mm; 5 µm); Injeção de 20 µL; λ-254 nm; vazão de 1,0 mL/min.



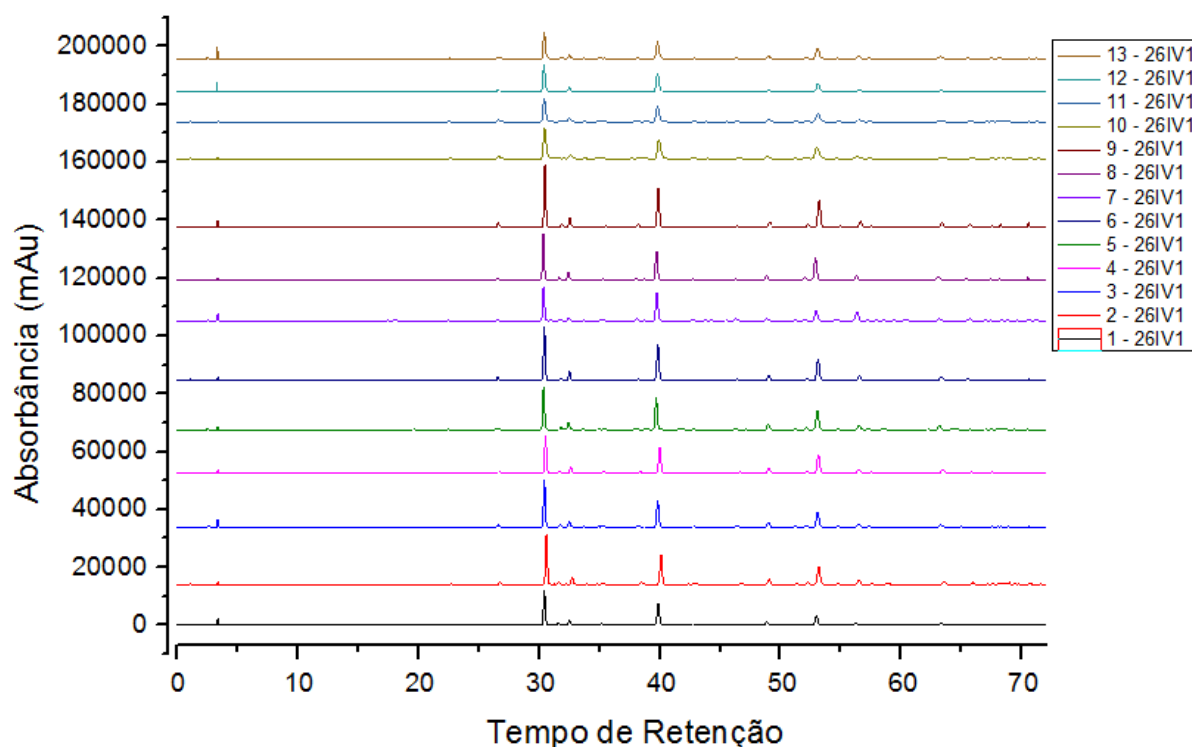
Anexo 33 - Comparação dos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD de extratos de *C. verbenacea* do espécimen 5IV3 do estudo sazonal. Condições de análise: 0-10': 8 a 20%; 10-13': 20 a 35%; 13-60': 35 a 68%; 60-62': 68 a 100%; 62-70': 100% acetonitrila; coluna: Ace® C18 (250x4,6 mm; 5 µm); Injeção de 20 µL; λ-254 nm; vazão de 1,0 mL/min.



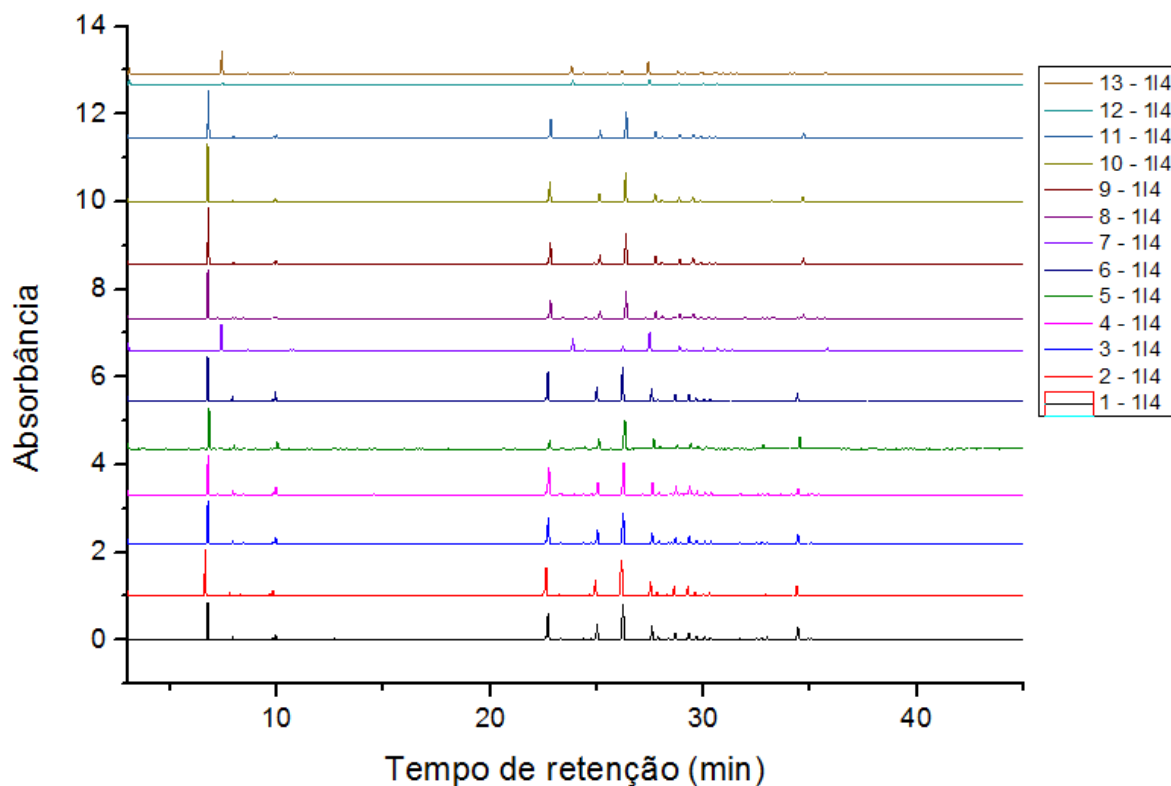
Anexo 34 - Comparação dos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD de extratos de *C. verbenacea* do espécimen 13I5 do estudo sazonal. Condições de análise: 0-10': 8 a 20%; 10-13': 20 a 35%; 13-60': 35 a 68%; 60-62': 68 a 100%; 62-70': 100% acetonitrila; coluna: Ace[®] C18 (250x4,6 mm; 5 μ m); Injeção de 20 μ L; λ -254 nm; vazão de 1,0 mL/min.



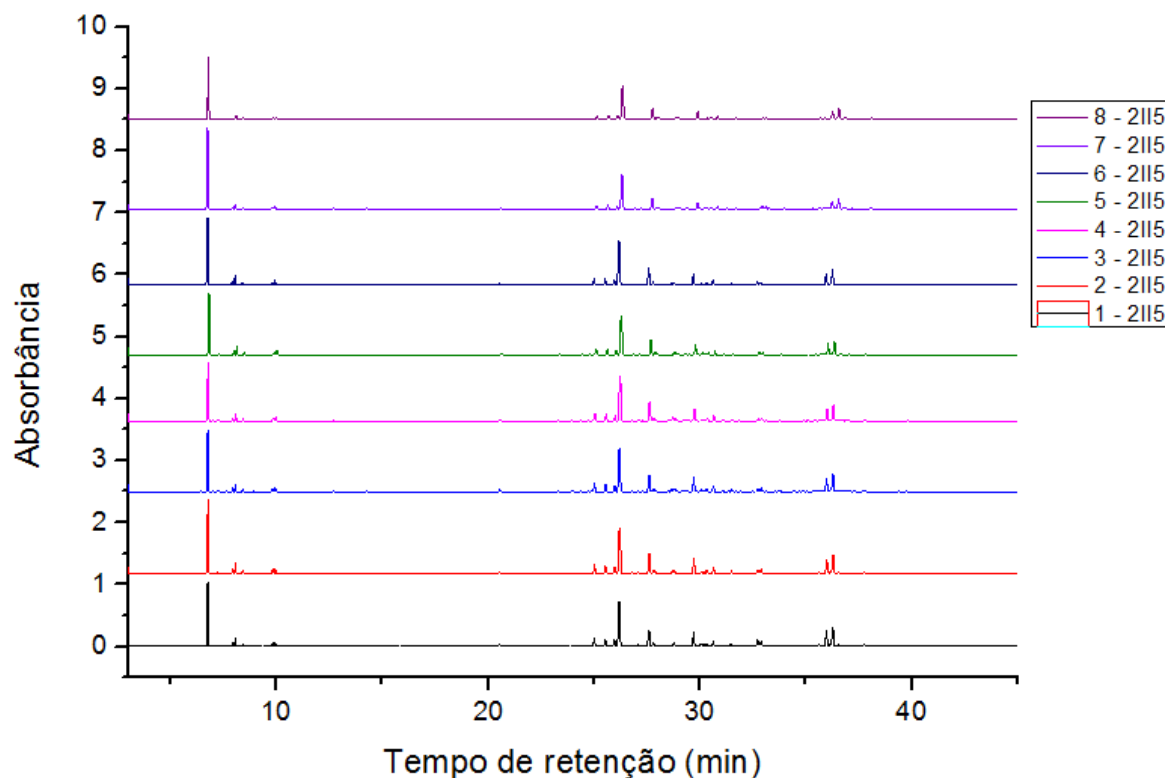
Anexo 35 - Comparação dos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD de extratos de *C. verbenacea* do espécimen 25I3 do estudo sazonal. Condições de análise: 0-10': 8 a 20%; 10-13': 20 a 35%; 13-60': 35 a 68%; 60-62': 68 a 100%; 62-70': 100% acetonitrila; coluna: Ace[®] C18 (250x4,6 mm; 5 μ m); Injeção de 20 μ L; λ -254 nm; vazão de 1,0 mL/min.



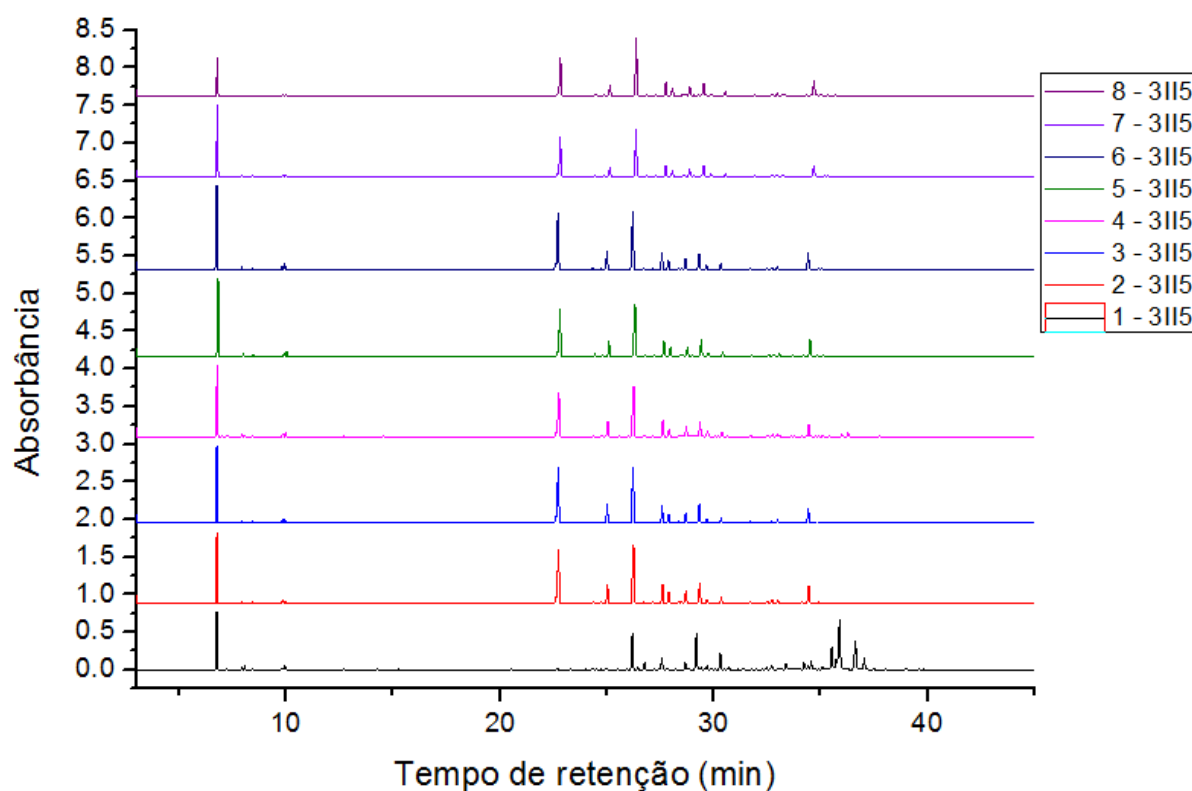
Anexo 36 - Comparação dos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD de extratos de *C. verbenacea* do espécimen 26IV1 do estudo sazonal. Condições de análise: 0-10': 8 a 20%; 10-13': 20 a 35%; 13-60': 35 a 68%; 60-62': 68 a 100%; 62-70': 100% acetonitrila; coluna: Ace® C18 (250x4,6 mm; 5 µm); Injeção de 20 µL; λ-254 nm; vazão de 1,0 mL/min.



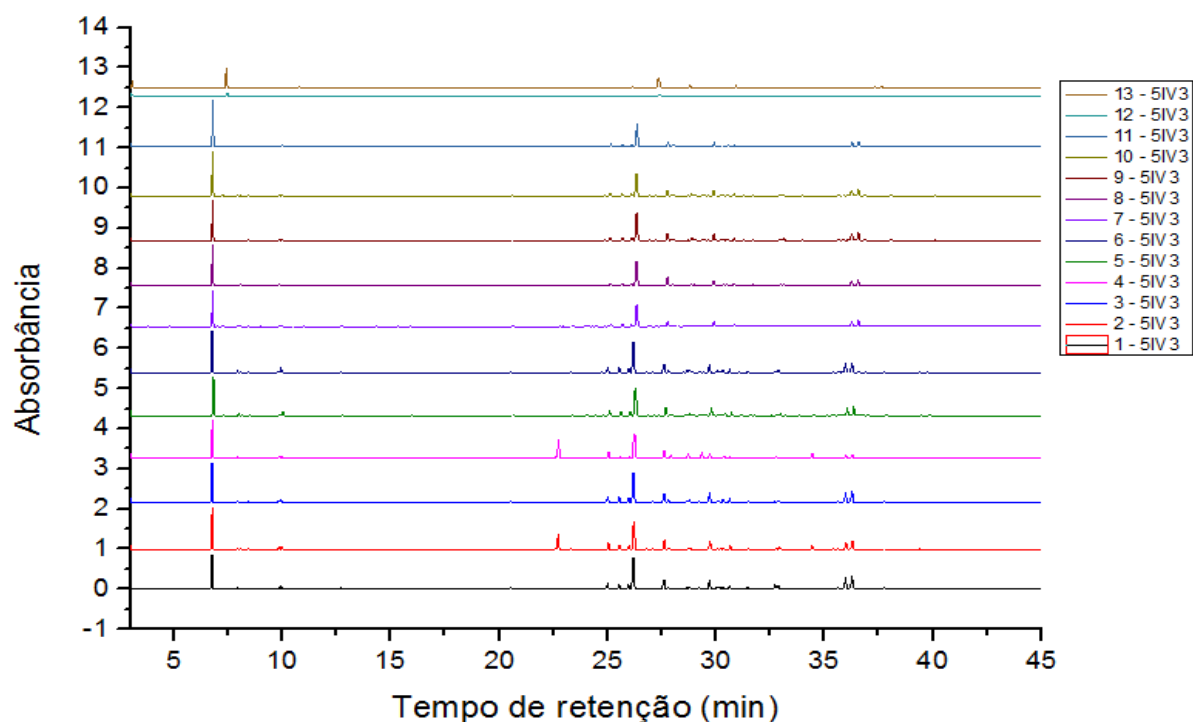
Anexo 37: Comparação dos cromatogramas obtidos por CG-EM de óleos essenciais de *C. verbenacea* do espécimen 114 do estudo sazonal. Condições de análise: 60 a 246° C - 3° C/ min; temperatura do injetor: 240° C; split: 1/20; coluna Rtx-5MS (30m x 0,25 mm d.i.; 0,25 µm filme interno).



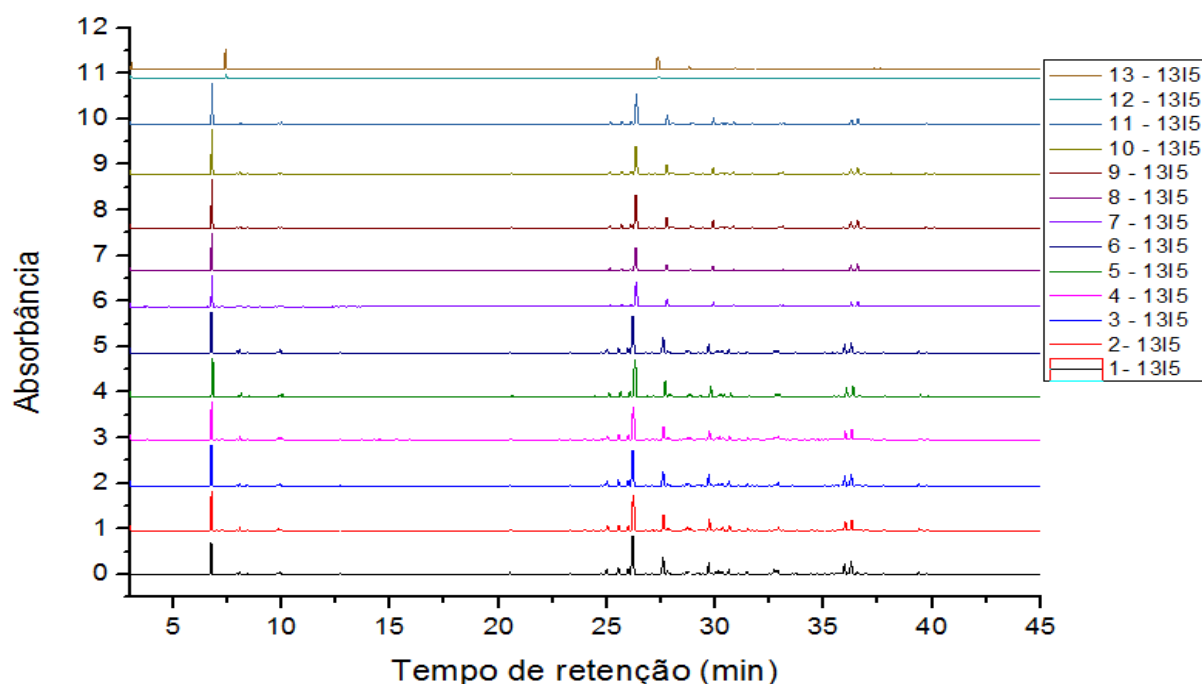
Anexo 38: Comparação dos cromatogramas obtidos por CG-EM de óleos essenciais de *C. verbenacea* do espécimen 2II5 do estudo sazonal. Condições de análise: 60 a 246° C - 3° C/ min; temperatura do injetor: 240° C; split: 1/20; coluna Rtx-5MS (30m x 0,25 mm d.i.; 0,25 µm filme interno).



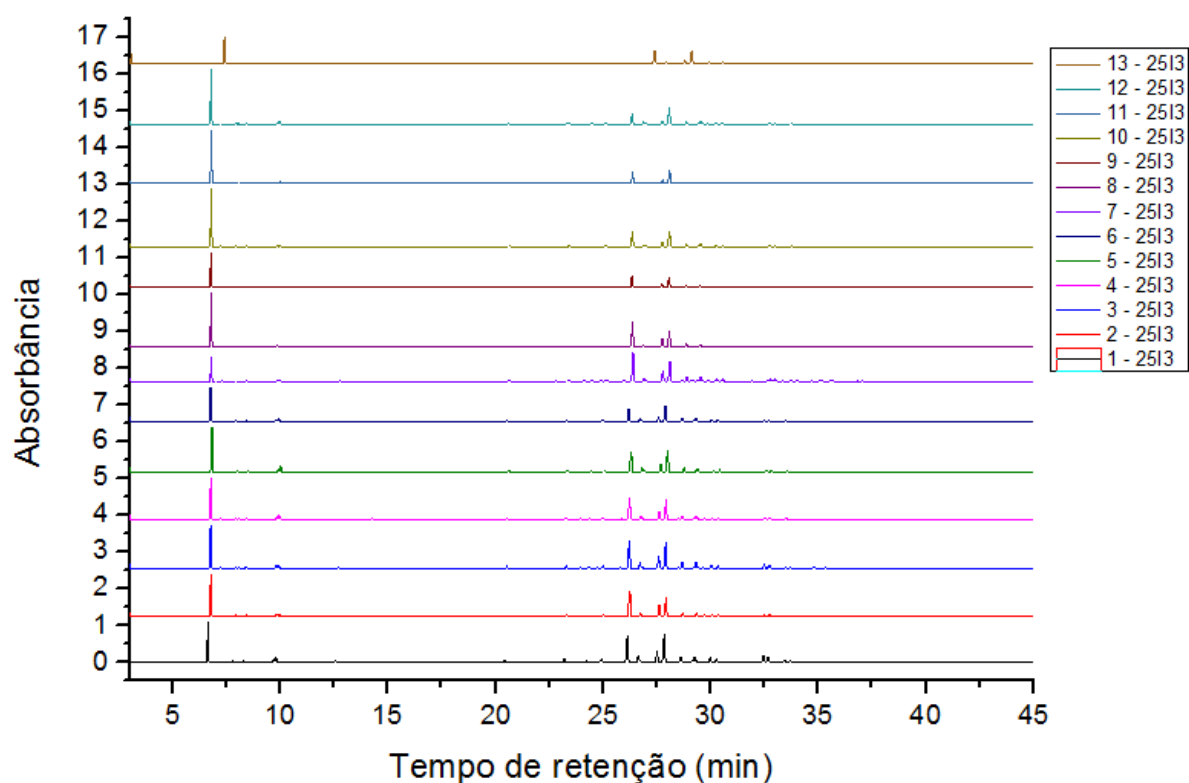
Anexo 39: Comparação dos cromatogramas obtidos por CG-EM de óleos essenciais de *C. verbenacea* do espécimen 3II5 do estudo sazonal. Condições de análise: 60 a 246° C - 3° C/ min; temperatura do injetor: 240° C; split: 1/20; coluna Rtx-5MS (30m x 0,25 mm d.i.; 0,25 µm filme interno).



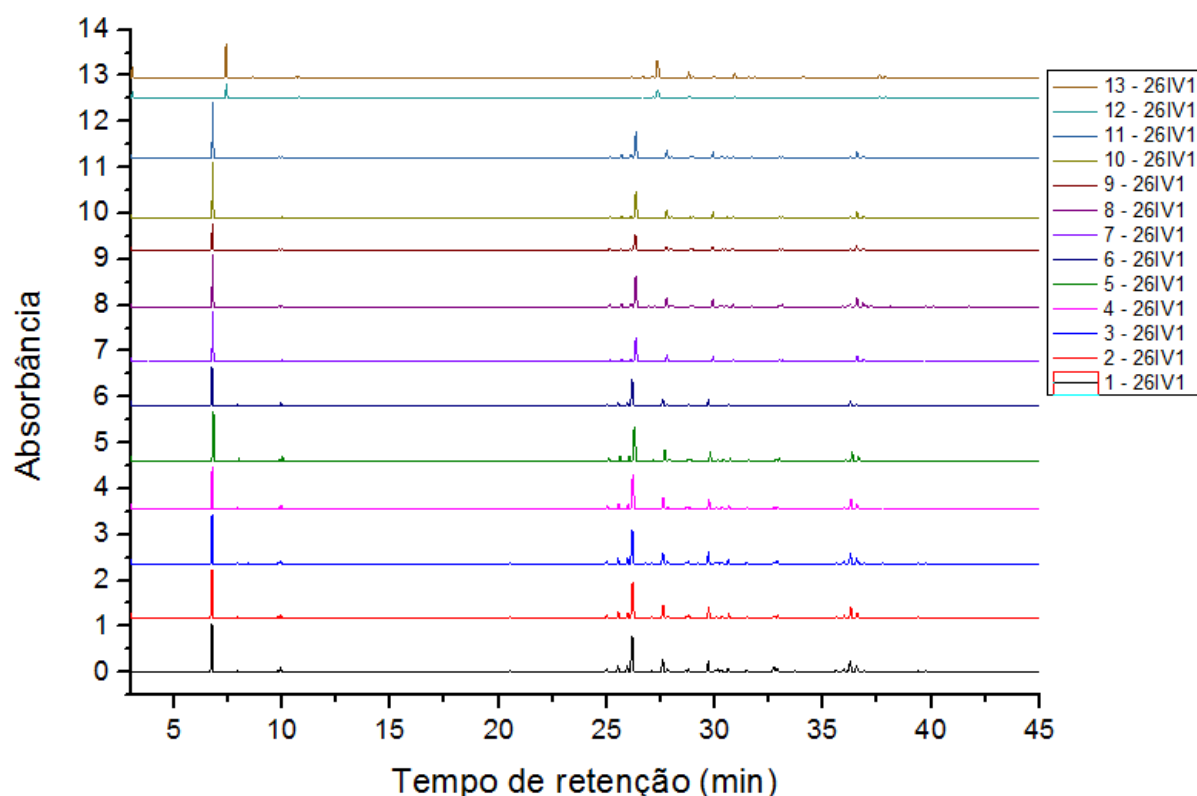
Anexo 40: Comparação dos cromatogramas obtidos por CG-EM de óleos essenciais de *C. verbenacea* do espécimen 5IV3 do estudo sazonal. Condições de análise: 60 a 246° C - 3° C/ min; temperatura do injetor: 240° C; split: 1/20; coluna Rtx-5MS (30m x 0,25 mm d.i.; 0,25 µm filme interno).



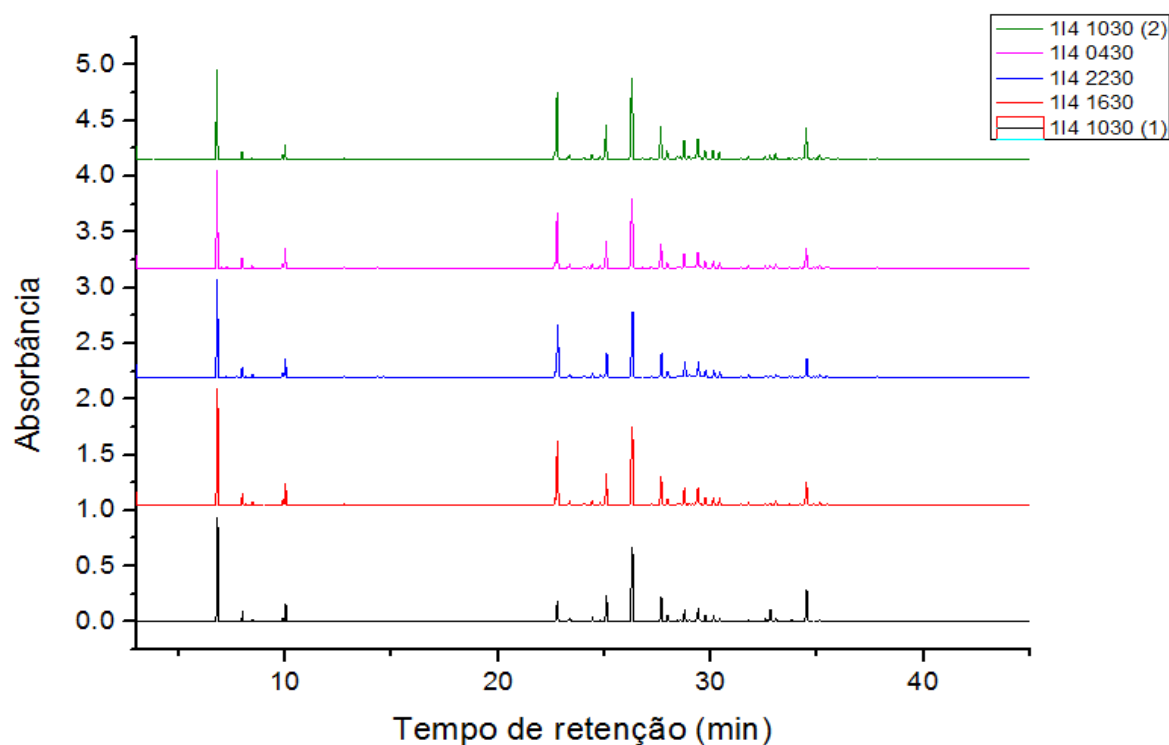
Anexo 41: Comparação dos cromatogramas obtidos por CG-EM de óleos essenciais de *C. verbenacea* do espécimen 13I5 do estudo sazonal. Condições de análise: 60 a 246° C - 3° C/ min; temperatura do injetor: 240° C; split: 1/20; coluna Rtx-5MS (30m x 0,25 mm d.i.; 0,25 µm filme interno).



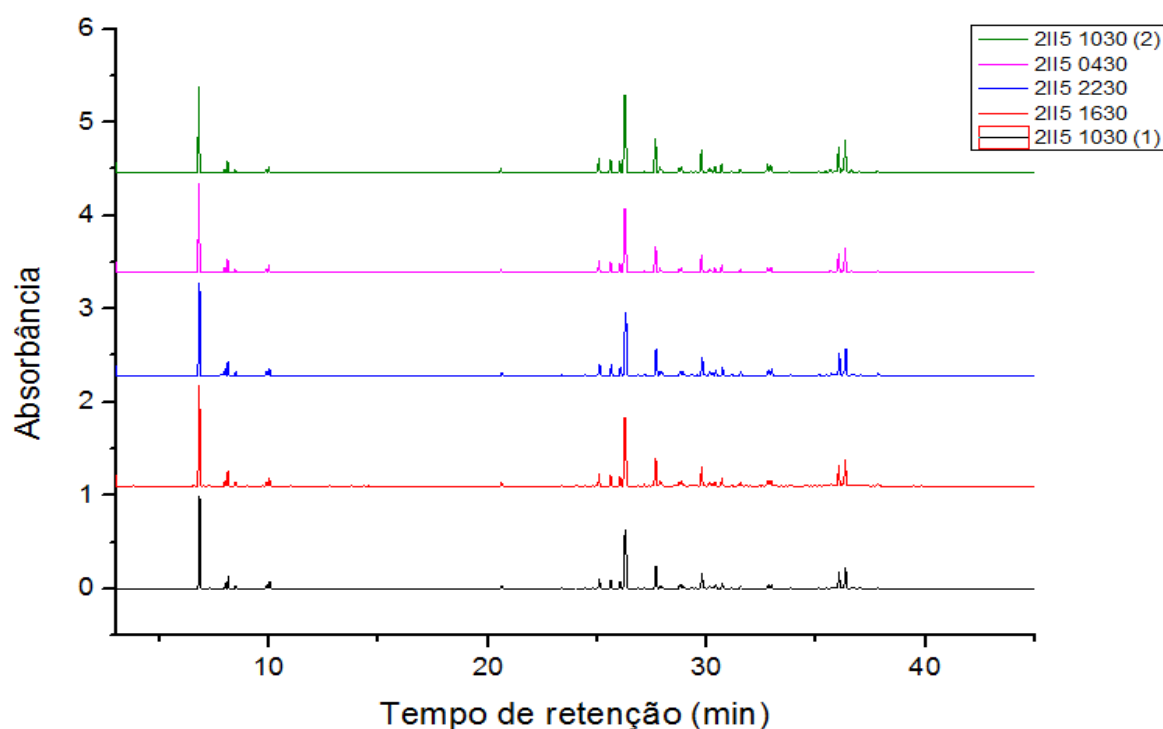
Anexo 42: Comparação dos cromatogramas obtidos por CG-EM de óleos essenciais de *C. verbenacea* do espécimen 25I3 do estudo sazonal. Condições de análise: 60 a 246° C - 3° C/ min; temperatura do injetor: 240° C; split: 1/20; coluna Rtx-5MS (30m x 0,25 mm d.i.; 0,25 µm filme interno).



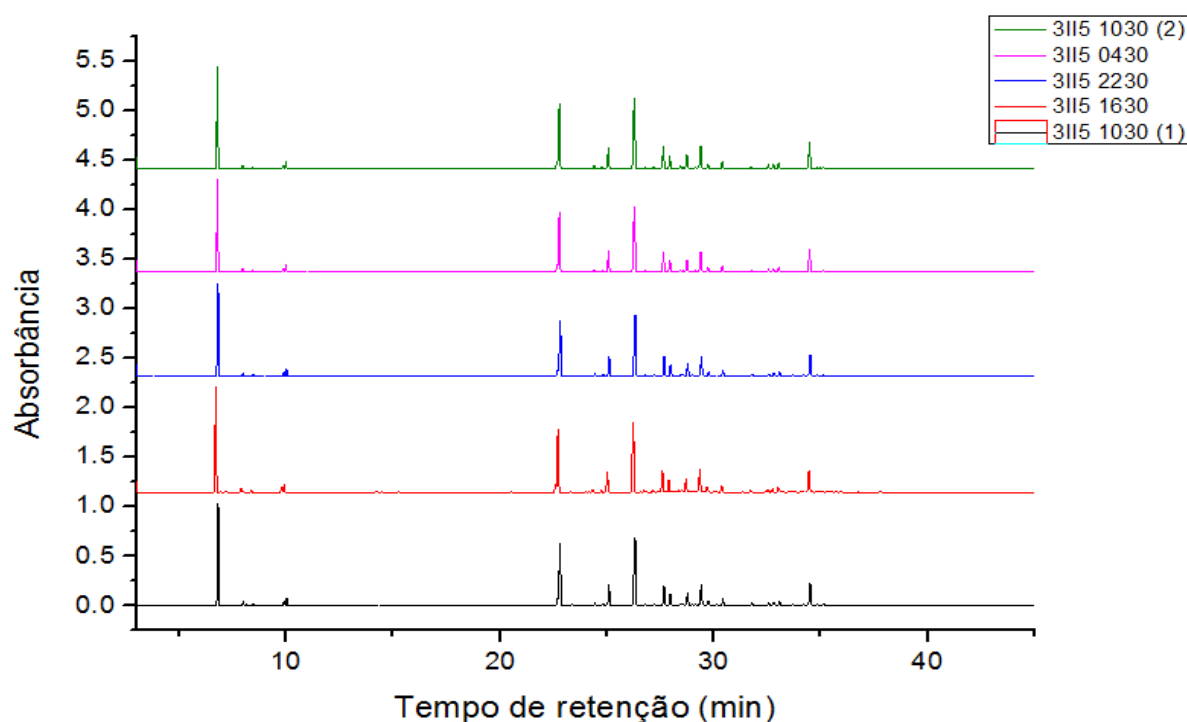
Anexo 43: Comparação dos cromatogramas obtidos por CG-EM de óleos essenciais de *C. verbenacea* do espécimen 26IV1 do estudo sazonal. Condições de análise: 60 a 246° C - 3° C/ min; temperatura do injetor: 240° C; split: 1/20; coluna Rtx-5MS (30m x 0,25 mm d.i.; 0,25 µm filme interno).



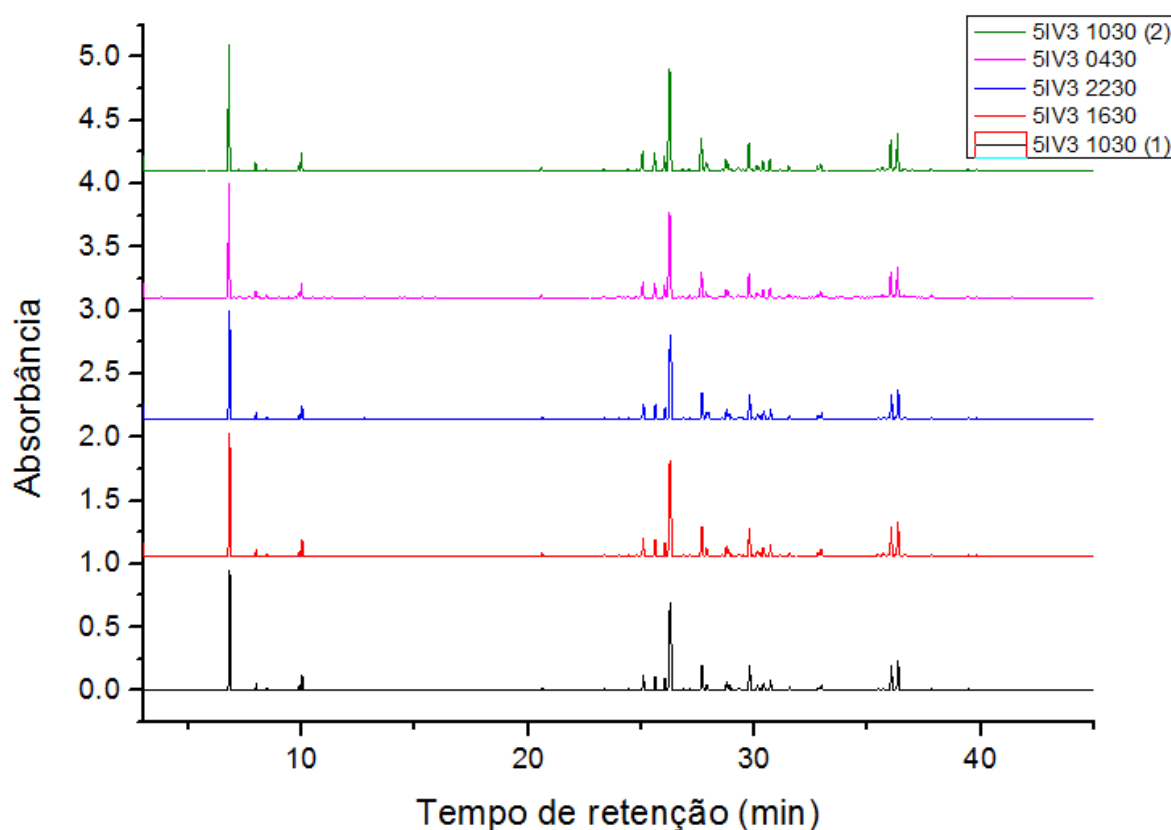
Anexo 44: Comparação dos cromatogramas obtidos por CG-EM de óleos essenciais de *C. verbenacea* do espécimen 114 do estudo circadiano. Condições de análise: 60 a 246° C - 3° C/ min; temperatura do injetor: 240° C; split: 1/20; coluna Rtx-5MS (30m x 0,25 mm d.i.; 0,25 µm filme interno).



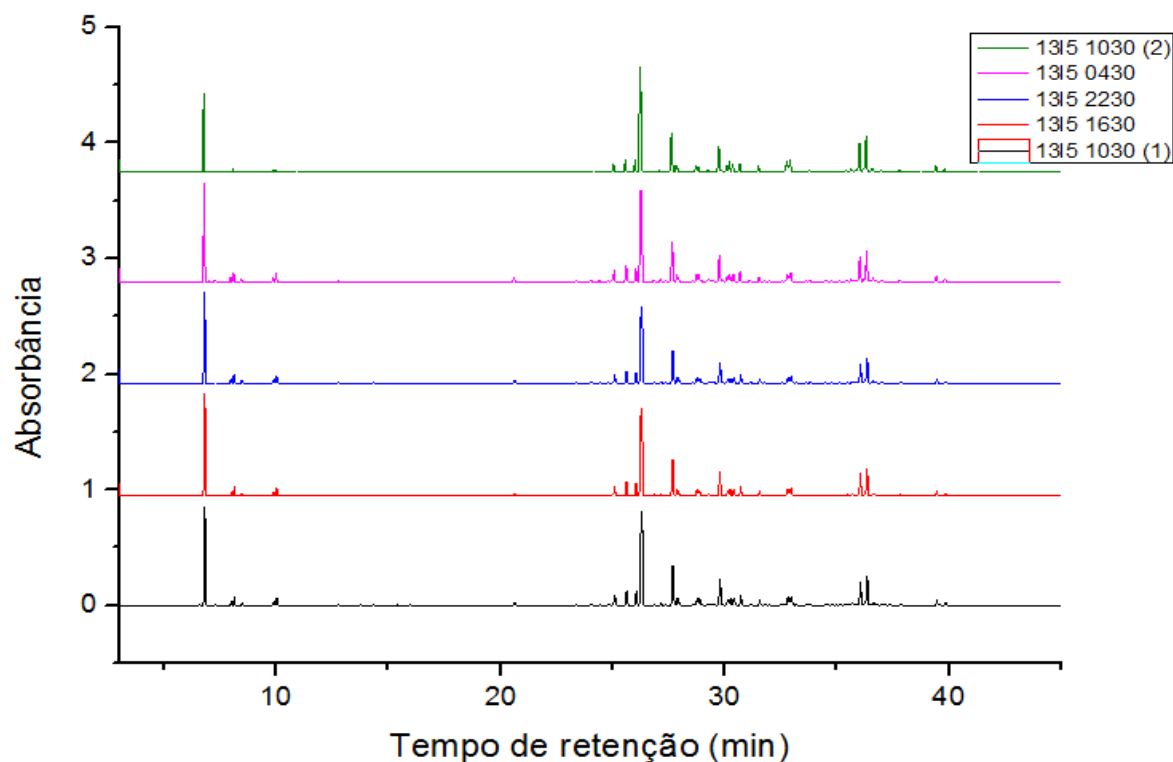
Anexo 45: Comparação dos cromatogramas obtidos por CG-EM de óleos essenciais de *C. verbenacea* do espécimen 2115 do estudo circadiano. Condições de análise: 60 a 246° C - 3° C/ min; temperatura do injetor: 240° C; split: 1/20; coluna Rtx-5MS (30m x 0,25 mm d.i.; 0,25 µm filme interno).



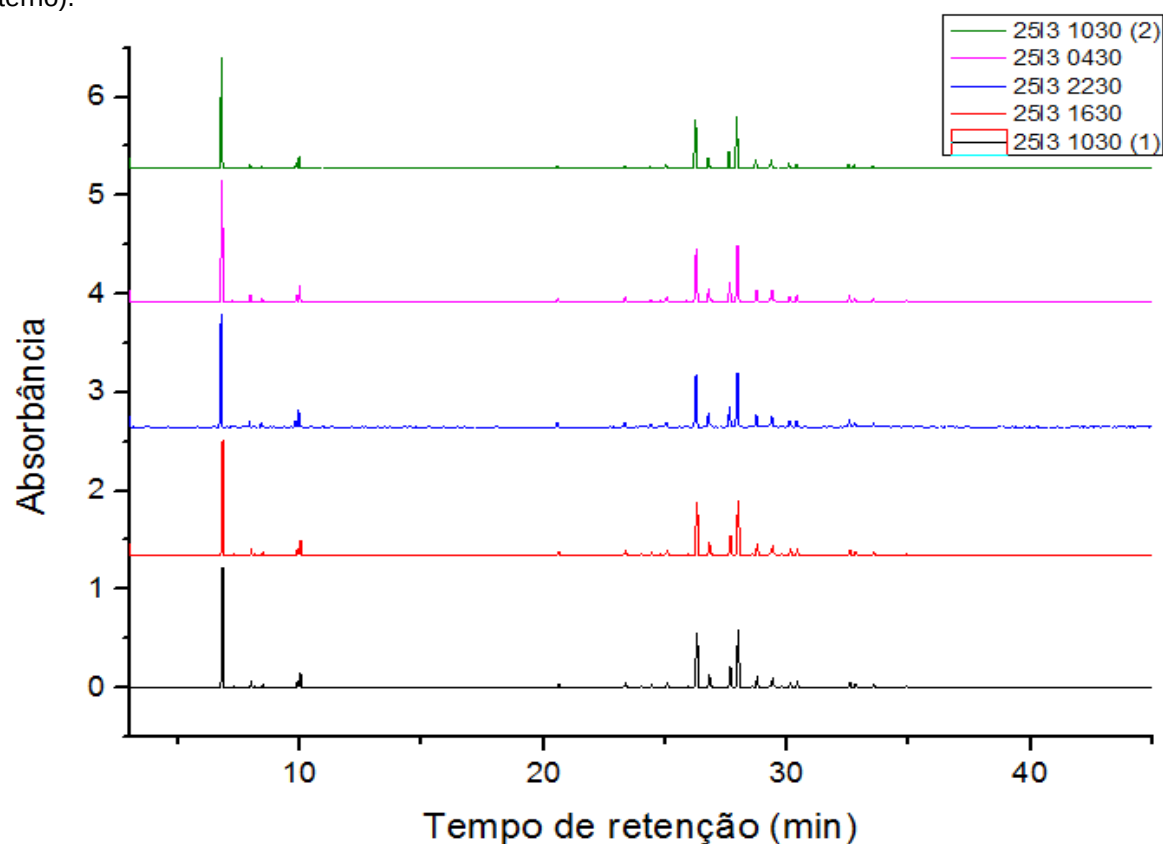
Anexo 46: Comparação dos cromatogramas obtidos por CG-EM de óleos essenciais de *C. verbenacea* do espécimen 3II5 do estudo circadiano. Condições de análise: 60 a 246° C - 3° C/ min; temperatura do injetor: 240° C; split: 1/20; coluna Rtx-5MS (30m x 0,25 mm d.i.; 0,25 µm filme interno).



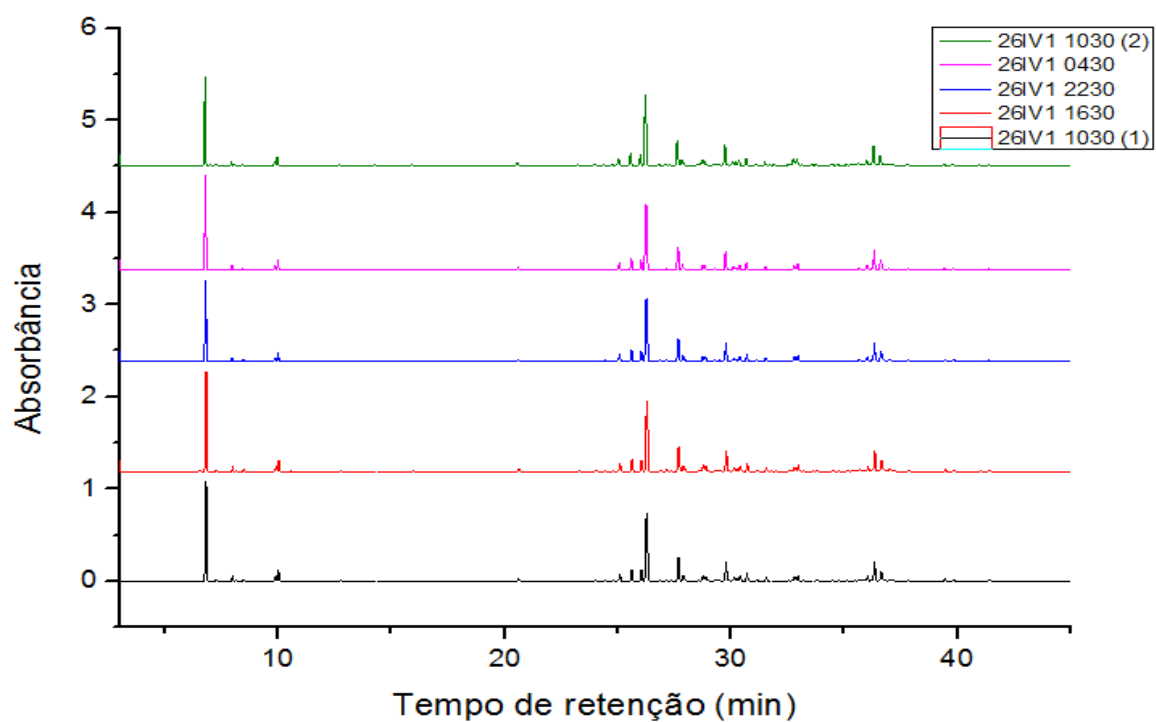
Anexo 47: Comparação dos cromatogramas obtidos por CG-EM de óleos essenciais de *C. verbenacea* do espécimen 5IV3 do estudo circadiano. Condições de análise: 60 a 246° C - 3° C/ min; temperatura do injetor: 240° C; split: 1/20; coluna Rtx-5MS (30m x 0,25 mm d.i.; 0,25 µm filme interno).



Anexo 48: Comparação dos cromatogramas obtidos por CG-EM de óleos essenciais de *C. verbenacea* do espécimen 1315 do estudo circadianol. Condições de análise: 60 a 246° C - 3° C/ min; temperatura do injetor: 240° C; split: 1/20; coluna Rtx-5MS (30m x 0,25 mm d.i.; 0,25 µm filme interno).



Anexo 49: Comparação dos cromatogramas obtidos por CG-EM de óleos essenciais de *C. verbenacea* do espécimen 2513 do estudo circadianol. Condições de análise: 60 a 246° C - 3° C/ min; temperatura do injetor: 240° C; split: 1/20; coluna Rtx-5MS (30m x 0,25 mm d.i.; 0,25 µm filme interno).



Anexo 50: Comparação dos cromatogramas obtidos por CG-EM de óleos essenciais de *C. verbenacea* do espécimen 26IV1 do estudo circadianol. Condições de análise: 60 a 246° C - 3° C/min; temperatura do injetor: 240° C; split: 1/20; coluna Rtx-5MS (30m x 0,25 mm d.i.; 0,25 µm filme interno).