

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA PARA RECURSOS
AMAZÔNICOS

JOSIELE VIANA GOMES

Análise do perfil químico e do potencial biológico de espécies de
boldo

ITACOATIARA-AM

2024

JOSIELE VIANA GOMES

Análise do perfil químico e do potencial biológico de espécies de
boldo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos, como requisito para obtenção de título de Mestre em ciência e tecnologia para Recursos Amazônicos na área de concentração Ciências Ambientais.

Orientadora: Profa. Dra. Dominique Fernandes de Moura do Carmo

Co-Orientador: Prof. Dr. Felipe Moura Araujo da Silva

ITACOATIARA-AM

2024

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

G633a Gomes, Josiele Viana
Análise do perfil químico e do potencial biológico de espécies de boldo / Josiele Viana Gomes . 2024
104 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Dominique Fernandes de Moura do Carmo
Coorientador: Felipe Moura Araújo da Silva
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Plantas medicinais. 2. boldo. 3. anticolinesterase. 4. compostos fenólicos. 5. . I. Carmo, Dominique Fernandes de Moura do. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Ao meu filho Anakin, que ficou longos dias sem sua mãe, para que eu pudesse realizar essa pesquisa.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A toda classe trabalhadora que financiou essa pesquisa por meio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas/ FAPEAM e CAPES.

A Universidade Federal do Amazonas e ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos, pela oportunidade de realizar este curso e aperfeiçoar meus conhecimentos.

A minha orientadora, Profa. Dra. Dominique Fernandes de Moura do Carmo, pela orientação, por confiar no meu potencial e compreender minhas subjetividades.

Ao meu Co- orientador, Prof. Dr. Felipe de Souza Araújo, da Central Analítica pela orientação.

Aos membros do grupo de pesquisa, Aniele Neves, Vitor Hugo, Douglas, Celine Menezes, Kácia Hellem, por todo auxílio nos experimentos.

A minha amiga Ívina Miranda, por ser minha luz orientadora nos momentos de escuridão durante a realização dessa pesquisa.

A minha amiga Rafaela, pelo acolhimento e compreensão e por compartilhar seus conhecimentos.

A todos os meus amigos que contribuiriam indireta ou diretamente como rede de apoio nesses dias de mãe solo, professora e mestranda, especialmente Fabiana, Fábio, Ednéia e Pedro.

RESUMO

O termo "boldo" é comumente usado para descrever várias espécies de plantas, como *P. barbatus*, *P. ornatus*, *G. amygdalinum* e *P. boldus*, todas utilizadas popularmente no tratamento de distúrbios digestivos. Essas espécies apresentam diversas atividades biológicas, como antioxidantes, anticolinesterásica, antimicrobianas e alelopáticas. Este estudo teve como objetivo identificar o perfil químico, potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), atividade antioxidante, alelopática e antifúngica dos extratos obtidos por infusão das folhas dessas espécies. A análise química foi realizada por espectrometria de massas (APCI-MS e ESI-MS), enquanto a atividade antioxidante foi avaliada frente aos radicais DPPH· e ABTS+, a atividade antifúngica foi testada contra *C. albicans* e a atividade alelopática foi avaliada sobre sementes de alface. A análise por ESI-MS identificou alcaloides característicos da espécie *P. boldus*, como a *N*-metil-coclaurina, Laurolitsina, Isoboldina e *N*-Metil-laurotetanina, por APCI-MS identificou flavonoides glicosilados em todas as espécies de boldo. Em relação às atividades antioxidantes, *P. boldus* apresentou a maior capacidade antioxidante frente aos radicais ABTS e DPPH, além de maior atividade alelopática. Os estudos de docagem molecular demonstraram que os compostos majoritários das amostras das espécies de boldo exibiram valores de energia de ligação entre -9,0 e -10,4 kcal/mol, mostrando-se próximos ou superiores à energia de ligação do inibidor galantamina. Os flavonoides glicosilados Luteolina-*O*-glicosídeo, identificado no extrato de *P. ornatus* e Apigenina-7-*O*-glicosídeo, identificado na amostra de *G. amygdalinum* demonstraram as melhores atividades de inibição da AChE no teste *in silico*. O alcaloide *N*-metillaurotetanina apresentou valor de energia de ligação de -10,2 kcal/mol, sendo o melhor inibidor da enzima acetilcolinesterase dentre os alcaloides testados. Por outro lado, todas as amostras apresentaram atividade antifúngica fraca contra *C. albicans*. Esses resultados sugerem que *P. boldus* possui constituintes químicos com potencial terapêutico não apenas para distúrbios digestivos, como são tradicionalmente utilizadas, mas também para condições neurológicas como a doença de Alzheimer. No entanto, seu uso medicinal deve ser moderado e cuidadoso, pois demonstrou alta capacidade fitotóxica contra sementes de alface.

Palavras-chaves: Plantas medicinais, boldo, anticolinesterase.

ABSTRACT

The term “boldo” is commonly used to describe various plant species, such as *P. barbatus*, *P. ornatus*, *G. amygdalinum* and *P. boldus*, all of which are popularly used to treat digestive disorders. These species have various biological activities, such as antioxidant, anticholinesterase, antimicrobial and allelopathic. The aim of this study was to identify the chemical profile, acetylcholinesterase (AChE) inhibition potential, antioxidant, allelopathic and antifungal activity of extracts obtained by infusion of the leaves of these species. The chemical analysis was carried out by mass spectrometry (APCI-MS and ESI-MS), while the antioxidant activity was assessed against DPPH- and ABTS+ radicals, the antifungal activity was tested against *C. albicans* and the allelopathic activity was assessed on lettuce seeds. ESI-MS analysis identified alkaloids characteristic of the *P. boldus* species, such as *N*-methyl-coclaurine, Laurolitsine, Isoboldine and *N*-Methyl-laurotetanine, and APCI-MS identified glycosylated flavonoids in all the boldo species. In terms of antioxidant activity, *P. boldus* showed the highest antioxidant capacity against ABTS and DPPH radicals, as well as the highest allelopathic activity. The molecular docking studies showed that the majority compounds in the boldo species samples had binding energy values between -9.0 and -10.4 kcal/mol, which was close to or higher than the binding energy of the inhibitor galantamine. The glycosylated flavonoids Luteolin-*O*-glucoside, identified in the *P. ornatus* extract, and Apigenin-7-*O*-glucoside, identified in the *G. amygdalinum* sample, showed the best AChE inhibition activities in the in silico test. The alkaloid *N*-methyllaurotetanine showed a binding energy value of -10.2 kcal/mol, making it the best inhibitor of the enzyme acetylcholinesterase among the alkaloids tested. On the other hand, all the samples showed weak antifungal activity against *C. albicans*. These results suggest that *P. boldus* has chemical constituents with therapeutic potential not only for digestive disorders, but also for neurological conditions such as Alzheimer's disease. However, its medicinal use should be moderate and careful, as it has shown a high phytotoxic capacity against lettuce seeds.

Keywords: Medicinal plants, boldo, anticholinesterase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Resumo das etapas de pesquisa e seleção de dados.	18
Figura 2. Comparação entre o número de publicações e citações anuais da pesquisa fitoquímica mundial.	19
Figura 3. Publicações científicas sobre “fitoquímica”, classificadas por países: 2010-2023. (A)Ranking dos 10 países com maior número de publicações sobre o tema. (B) Rede de colaboração entre países que publicaram sobre o tema fitoquímica.	20
Figura 4. A Rede com as categorias e suas conexões durante os anos 2010 -2023. B. Gráfico das 15 categorias com maior frequência e centralidade.	21
Figura 5. Top 10 tópicos de citação micro das publicações mundiais sobre fitoquímica.	22
Figura 6. Revistas que mais publicaram artigos de cientistas brasileiros sobre o tema fitoquímica.	23
Figura 7. Rede organizada com as revistas mais citadas sobre o tema fitoquímica.	24
Figura 8. Instituições brasileiras que mais publicam sobre a pesquisa fitoquímica.	24
Figura 9. Principais agências brasileiras de fomento à pesquisa com maior número de publicações sobre fitoquímica. índice H é uma métrica importante pois permite verificar a produtividade e relevância dos autores de determinada área de pesquisa. Um índice H elevado é sinal de que o pesquisador fez trabalhos de impacto na comunidade científica (Marques, 2013).	26
Figura 10. Espectro de massas do extrato aquoso de <i>P. barbatus</i> (A) e de sua fração metanólica proveniente do protocolo de SPE (B).	38
Figura 11. Espectro de massas da fração metanólica de <i>P. barbatus</i> (A), <i>P. ornatus</i> (B), <i>G. amygdalinum</i> (C), <i>P. boldus</i> (D), modo negativo	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Top 10 revistas que mais publicam sobre o tema fitoquímica, centralidade e Fator de impacto.	24
Tabela 2 - Autores brasileiros que mais publicam sobre o tema fitoquímica.	27
Tabela 3 - Metabólitos secundários presentes nas folhas de <i>P. barbatus</i>	35
Tabela 4 - Compostos identificados nas espécies de boldos.	40

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	9
2.1 Plantas medicinais	9
2.2 <i>P. boldus</i>	10
2.3 <i>P. barbatus</i>	11
2.4 <i>P. ornatus</i>	12
2.5 <i>G. amygdalinum</i>	12
3. OBJETIVOS	14
3.1 Objetivo geral	14
3.2 Objetivos específicos	14
Capítulo I- Análise cienciométrica da pesquisa fitoquímica de plantas medicinais	15
Capítulo II- Perfil químico, análise quimiométrica e atividade antioxidante de diferentes espécies de Boldo consumidos na Amazônia	32
Capítulo III- Composição química e potencial biológico de espécies de Boldo	36
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
REFERÊNCIAS	44

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais é fruto do acúmulo milenar de saberes empíricos por diversos grupos étnicos, resultando numa medicina tradicional reconhecida atualmente pela Organização Mundial da Saúde (OMS). No Brasil, os conhecimentos tradicionais indígenas, somados aos saberes trazidos pelos imigrantes e africanos, tiveram importância significativa no desenvolvimento de uma medicina popular rica, baseada na utilização da biodiversidade vegetal (Machado; Vargas, 2018).

Algumas plantas medicinais de uso tradicional são conhecidas pelo mesmo nome, apesar de serem de diferentes espécies, gênero, família. Muitas vezes isso acontece pelo fato dessas espécies serem utilizadas na medicina tradicional para a mesma finalidade terapêutica. Um desses exemplos é a denominação Boldo que é utilizada para se referir a diferentes espécies de plantas. A denominação “boldo” no início do século se referia ao boldo-do-chile, *Peumus Boldus*, citado na Primeira Farmacopeia Brasileira (Carvalho et al., 2014).

No Brasil, as espécies *Plectranthus barbatus* (boldo falso) e *Plectranthus ornatus* (boldo-miúdo), *Gymnanthemum amygdalinum* (boldo baiano) e *P. boldus* (boldo-do-chile) são popularmente conhecidas como Boldo, e são utilizadas na medicina tradicional para tratar distúrbios digestivos hepatobiliares (Schwanz, 2006). O consumo popular dessas plantas se dá através dos chás das folhas preparados a partir de infusões ou decocções.

Dessa forma, optou-se por investigar a composição química e as atividades biológicas dos extratos aquosos obtidos por infusão, pois essa é a forma tradicional mais comum de preparo dos chás das folhas das espécies de boldo. Essa abordagem permite compreender os constituintes químicos responsáveis pelas propriedades medicinais encontrados nos chás das folhas dessas espécies, o que pode ajudar a explicar suas propriedades terapêuticas conhecidas popularmente, pretendendo assim contribuir para o conhecimento da medicina tradicional e na busca de novos fármacos.

Estudos indicam que os efeitos terapêuticos dos chás das folhas das espécies de boldo no tratamento de problemas digestivos estão relacionados à atividade antioxidante e à inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) apresentadas por seus metabólitos secundários (Carvalho, 2014). A inibição da (AChE) pode explicar as respostas medicinais no sistema digestivo e hepatobiliar, devido ao papel dessa enzima no sistema nervoso autônomo, que regula diversas funções do trato gastrointestinal. A AChE é responsável pela quebra da acetilcolina, um neurotransmissor essencial para a contração muscular e a secreção de ácido gástrico, entre

outras funções. Ao inibir a AChE, os níveis de acetilcolina aumentam, o que pode melhorar a motilidade gastrointestinal, facilitando a digestão e reduzindo sintomas. Além disso, a acetilcolina pode regular a liberação de suco gástrico, o que é importante para distúrbios relacionados à produção excessiva ou insuficiente de ácido gástrico (Carvalho et al., 2014).

A inibição da AChE também é relevante no tratamento da doença de Alzheimer (DA), onde a redução dos níveis de acetilcolina contribui para os déficits cognitivos. Inibidores da AChE são usados nesse contexto para aumentar temporariamente os níveis de acetilcolina diminuindo os sintomas cognitivos. Portanto, os compostos presentes nos chás de boldo que inibem a AChE podem ter potencial terapêutico não apenas para distúrbios digestivos, mas também para condições neurológicas como a doença de Alzheimer (Carvalho, 2014). Dessa forma, a investigação da composição química e das atividades biológicas dos chás das folhas das espécies de Boldo podem contribuir para a busca de novos fármacos relacionadas a DA (Silva et al., 2022).

No que se refere aos principais constituintes químicos ativos, *P. boldus* apresenta como compostos majoritários alcaloides como a boldina, *N*-metil-coclaurina, Laurolitsina, Isoboldina e *N*-Metil-laurotetanina; compostos fenólicos, como taninos e catequina (Hosalkova et al., 2015); cumarinas (Fuentes-Barros et al., 2023) e óleos essenciais composto principalmente por monoterpenos (Lopes et al., 2020). As espécies do gênero *Plectranthus* tem como constituintes majoritários os terpenóides, principalmente os diterpenos, flavonoides (Ishii et al., 2022), óleos essenciais, composto em sua maioria por monoterpenos (Alasbahi; Melzig, 2010). A espécie *G. amygdalinum* é composta principalmente por flavonoides, taninos, alcaloides terpenóides, saponinas, e triterpenóides (Silva et al., 2013); óleos essenciais compostos basicamente por monoterpenos e sesquiterpenos (USunobun; Ngozi, 2016).

Estudos demonstram que essas plantas possuem diversas atividades biológicas em comum, como antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas, antifúngicas, anti-helmínticas e alelopáticas, inibição da AChE (Toleto et al., 2016; Carvalho et al., 2018; Costa, 2017; Silva et al., 2022). Dessa forma, torna-se importante investigar quais os metabólitos secundários são os responsáveis pelas atividades biológicas apresentadas por essas espécies de boldo.

Um estudo recente revelou que essas espécies de boldo têm em comum uma presença significativa de flavonoides (Santos, 2022). A presença desses compostos nas espécies de boldo pode ser um fator relevante para explicar a similaridade das atividades biológicas entre elas (Cassels; Fuentes-Barros; Castro-Saavedra, 2018; Fuentes-Barros et al., 2023; Lara-Fernández;

Rodríguez-Herrera; Aguilar, 2013; Quezada et al., 2004; Simirgiotis; Schmeda-Hirschmann, 2010).

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi investigar a composição química e atividade biológica presente nos extratos aquosos obtidos por infusão das folhas das espécies de boldo *P. boldus*, *P. barbatus*, *P. ornatus*, *G. amygdalinum*. Para atingir esse objetivo, avaliou-se as atividades anticolinesterásica, alelopática, antifúngica e antioxidante dos extratos aquosos das folhas das espécies de boldo. Esses resultados são importantes, pois podem elucidar alguns dos usos etnobotânicos relatados para essas plantas, bem como fornece informações para orientar o uso seguro das infusões pela população em geral, além de contribuir para a busca de novos fármacos.

Este trabalho está dividido em três capítulos, cada capítulo corresponde a um artigo.

O primeiro artigo trata-se de uma análise cienciométrica da produção científica entre os anos 2018 a 2022 na área da fitoquímica de plantas medicinais, com foco nas publicações de instituições e pesquisadores brasileiros, a fim de inferir sobre a contribuição do Brasil a esse campo de investigação.

O segundo artigo aborda os resultados das análises realizadas por espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-MS) e ferramentas quimiométricas (PCA e HCA). Além disso, foi apresentada a atividade antioxidante avaliada frente ao radical de DPPH, e o teor de fenólicos totais foi determinado pela metodologia de Folin-Ciocalteu.

O terceiro artigo apresenta os resultados da análise química realizada por espectrometria de massas (APCI-MS), da atividade antioxidante avaliada frente ao radical DPPH· e ABTS+, atividade anticolinesterásica *in silico*, da atividade antifúngica frente a *Candida albicans* e a alelopática sobre sementes de alface.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Plantas medicinais

Há milênios o homem utiliza plantas para fins medicinais. Tal prática talvez seja mais antiga que a existência do próprio homem (Santos *et al.*, 2008). As plantas medicinais são aquelas capazes de aliviar ou curar enfermidades e são tradicionalmente usadas como remédio em uma população ou comunidade. Sua eficácia vem sendo comprovada através de estudos químicos e farmacológicos. Quando a planta medicinal é industrializada para se obter um medicamento, tem-se como resultado o fitoterápico. O processo de industrialização padroniza

a quantidade e a qualidade através da purificação de microrganismos e substâncias estranhas, permitindo uma maior segurança no uso (Brasil, 2020).

As plantas produzem estrategicamente substâncias químicas complexas para se comunicarem com o meio ambiente, denominadas de metabólitos secundários. Podem ter origem em diversas rotas metabólicas, e podem atuar como hormônios, substâncias antioxidantes e mesmo ligadas à defesa contra fungos, bactérias, vírus, herbívoros ou outros predadores. As principais classes de substâncias químicas produzidas pelos vegetais e que apresentam alguma atividade medicinal nos seres humanos são mucilagens, substâncias fenólicas, taninos, flavonoides, cumarinas, iridoides, óleos essenciais, terpenoides, saponinas, alcaloides, proteínas e lectinas, ácidos graxos (ômega 3-6-9), vitaminas e carotenoides, minerais entre vários outros metabólitos (Machado; Vargas, 2018).

Para a planta medicinal apresentar a ação esperada, é necessário a identificação exata da espécie, além de saber qual a parte da mesma é tradicionalmente utilizada e qual contém a substância responsável pela ação medicinal (Machado; Vargas, 2018).

De acordo com a OMS, grande parte da população dos países em desenvolvimento depende da medicina tradicional, tendo em vista que 80% utiliza práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde e 85% destes utilizam plantas ou preparações destas, o que demonstra a relevância dos produtos naturais para promoção de saúde das populações de baixa renda. No Brasil, tendo em vista a ampla diversidade vegetal, bem como a riqueza étnico-cultural, o uso popular de plantas medicinais é bastante comum, principalmente pelas gerações mais antigas (Santos *et al.*, 2008). Seu uso também pode ser influenciado pela questão econômica, o alto custo dos medicamentos e o difícil acesso a consultas pelo Sistema Único de Saúde (SUS), também pela dificuldade de locomoção daqueles que residem em áreas rurais (Battisti *et al.*, 2013), além disso, com chegada no Brasil do movimento social urbano de contracultura, que busca contrapor-se a racionalidade médica dominante, a busca pelas plantas medicinais como recurso terapêutico vem atingindo um público cada vez maior (Mattos *et al.*, 2018).

Considerando essa realidade, a OMS estimula os governos a estabelecerem políticas para medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais, para que os países utilizem recursos naturais disponíveis em seus próprios territórios para promover a atenção primária à saúde (Brasil, 2010). Nesse contexto, em 2006, o Ministério da Saúde lançou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), oferecendo aos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS), principalmente no âmbito da Atenção Primária à Saúde (APS), a garantia de acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. Isso inclui métodos

adequados para produção de fitoterápicos e seu controle de qualidade, visando também a sustentabilidade e a redução dos impactos à biodiversidade (Brasil, 2006).

Uma planta amplamente utilizada para fins medicinais são as espécies popularmente conhecidas como boldo, que apresentam propriedades colagogas, ou seja, estimulam a contração da vesícula biliar e a motilidade gastrointestinal (Mauro et al., 2008). Diferentes espécies botânicas são chamadas de boldo, incluindo o *P. boldus* da família Monimiaceae (Peixoto et al., 2015), o *P. barbatus* e o *P. ornatus* da família Lamiaceae, e a *G. amygdalinum* da família Asteraceae (Harley et al., 2016; Silva et al., 2010).

2.2 *Peumus boldus*

P. boldus Molina, da família Monimiaceae é originário do Chile (Schwanz et al., 2008), é popularmente conhecido como boldo-do-chile e suas folhas são amplamente utilizadas na medicina tradicional para tratar problemas digestivos e hepáticos (Viegas et al., 2014). Reconhecido pelas farmacopeias fitoterápicas, o chá das folhas secas de *P. boldus* é considerado biologicamente ativo no tratamento de desconfortos intestinais, o que justifica seu uso tradicional (O'BRIEN, 2006).

Em sua composição química, destacam-se alcaloides como boldina, *N*-metil-coclaurina, Laurolitsina, Isoboldina e *N*-Metil-laurotetanina; compostos fenólicos, como taninos e catequina (Hosalkova et al., 2015); cumarinas (Fuentes-Barros et al., 2023), e óleos essenciais, principalmente monoterpenos (Lopes et al., 2020). Dentre suas atividades biológicas, destacam-se a capacidade antioxidante, e propriedades antiproliferativas contra células tumorais, sugerindo um potencial uso na luta contra o câncer. Além disso, *P. boldus* apresenta atividades antibacterianas, fungicidas, inseticidas e herbicidas, e é reconhecido por seu efeito anti-inflamatório.

Estudos identificaram que os alcaloides do *P. boldus* demonstram atividade anticolinesterásica e antioxidante, sugerindo sua potencial aplicação como protótipo para o desenvolvimento de futuros medicamentos destinados ao tratamento da doença de Alzheimer (DA). Esta condição neurodegenerativa é caracterizada por um comprometimento na neurotransmissão colinérgica, onde a enzima acetilcolinesterase (AChE) desempenha um papel crucial ao catalisar a hidrólise da acetilcolina, resultando na interrupção das sinapses e na redução da produção de estímulos. Os anticolinesterásicos atuam retardando a degradação da acetilcolina, prolongando sua permanência na fenda sináptica e, conseqüentemente, intensificando a transmissão colinérgica (Araujo et al., 2016; Schwanz et al., 2008; Silva et al.,

2022). Outros estudos revelaram que *P. boldus* possui ação larvicida (De Castro, 2016), inseticida (Lopes et al., 2020), e herbicida natural, conforme indicado pelo óleo essencial. Além disso, foi observada atividade alelopática do chá de *P. boldus* sobre as sementes de alface e pepino (Toledo et al., 2016).

2.3 *Plectranthus barbatus*

P. barbatus Andrews, popularmente conhecida como boldo-peludo, falso-boldo ou boldo brasileiro (Lorenzi et al., 2008), é uma das espécies mais importantes do gênero *Plectranthus* L'Herit. (Lamiaceae) (Alasbahi e Melzig, 2010). De acordo com Lukhoba et al. (2006), *P. barbatus* é amplamente utilizado na forma de infusão para tratar uma variedade de doenças, incluindo distúrbios intestinais, doenças cardíacas, doenças hepáticas e distúrbios respiratórios. Além disso, essa espécie vegetal é empregada no alívio de processos inflamatórios e no tratamento de algumas doenças do sistema nervoso. Os constituintes químicos da planta incluem diterpenoides, compostos fenólicos e óleos essenciais, sendo o ácido rosmarínico seu principal componente, responsável pela atividade antioxidante e pela inibição da enzima acetilcolinesterase (Amaral, 2011).

A similaridade de aroma, sabor e efeitos digestivos para com o *P. boldus* (Boldo-do-Chile), o fato de ser mais facilmente cultivável que a espécie chilena e de ambos serem comumente preparados como infusos pode ter contribuído para que *P. barbatus* se tornasse uma das plantas mais populares e citadas em pesquisas etnobotânicas recentes (Borges, 2007). Embora esta planta já esteja inclusa na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS (RENISUS), de acordo com Costa (2017), não há uma padronização quanto a seus constituintes para fins medicinais ou funcionais. Dessa forma, considerando que diferenças fitoquímicas são constatadas nos diferentes cultivares, existe uma necessidade de padronização de sua procedência (Brasil, 2008).

Em um estudo com extrato etanólico das folhas de *P. barbatus*, foi identificada atividade inibitória contra duas enzimas do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1): protease e transcriptase reversa, resultando na redução da carga viral e de outros sintomas em indivíduos infectados pelo vírus (Kapewangolo & Meyer, 2013). Além disso, foi demonstrado o efeito alelopático dos extratos brutos de infusão de *P. barbatus* em sementes de *Bidens pilosa* e *Lactuca sativa* (Azambuja et al., 2010). Outro estudo conduzido por Cordeiro et al. (2020) destacou que *P. barbatus* apresenta baixa toxicidade em células humanas saudáveis e exibe

atividades bacteriostática, fungistática e imunomoduladora, o que o torna um candidato promissor para uso terapêutico.

2.4 *Plectranthus ornatus*

A espécie *P. ornatus* Codd, endêmica da África e introduzida no Novo Mundo no século XVI, é geralmente conhecida como boldo miúdo, e é utilizada popularmente em algumas regiões do Brasil como uma planta etnomedicinal, para doenças digestivas, e suas folhas possuem ação antibiótica (Rijo et al., 2011). A espécie é constituída principalmente por diterpenóides, compostos fenólicos e óleos essenciais (Maioli et al., 2010). Estudos conduzidos com *P. ornatus* sugerem que as atividades biológicas exibidas por essa espécie estão relacionadas a presença de fitoquímicos, como ornantina, barbatusina, labdano e forskolina, alquifenois e flavonoides glicosilados (Oliveira et al., 2011).

2.5 *Gymnanthemum amygdalinum*

G. amygdalinum (Delile) Sch.Bip. ex Walp. (Asteraceae), espécie mais conhecida pelas sinônimas *Vernonia amygdalina* Delile, *Vernonia condensata* é uma espécie de boldo conhecida popularmente por boldo grande ou boldo baiano, é nativa possivelmente da África e trazida ao Brasil ainda nos tempos coloniais pelos povos escravizados (Risso, 2008). Empregado na medicina popular para problemas gastrointestinais, laxativo, remédio anti-inflamatório Silva et al., (2017), antimalárico e anti-helmíntico. Estudos demonstraram que diferentes extratos do vegetal possuem atividades antioxidante, potencial inibidor da enzima acetilcolinesterase, potencial redutor do colesterol Carvalho. (2014), atividade antimicrobiana Barbosa et al., (2018), atividade alelopática Simionatto et al. (2010), o principal uso da planta se dá pela infusão ou decocção das folhas, contra problemas gastrointestinais, tais como diarreia, constipação, dor de estômago, vermes intestinais e infecções bacterianas. Essas atividades biológicas estão relacionadas aos constituintes químicos de suas folhas, compostas principalmente por flavonoides, taninos, alcaloides terpenóides como as lactonas sesquiterpênicas, saponinas, glicosídeos esteroides e triterpenóides (Da Silva et al., 2013); óleos essenciais compostos basicamente por monoterpenos e sesquiterpenos (USunobun; Ngozi, 2016).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar o perfil químico e o potencial biológico das espécies de boldo *P. barbatus*, *P. ornatus*, *G. amygdalinum* e *P. boldus*.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar a composição química dos extratos obtidos por infusão das folhas das espécies de *P. barbatus*, *P. ornatus*, *G. amygdalinum* e *P. boldus*;
- Comparar o perfil químico dos extratos obtidos por infusão das folhas das espécies de *P. barbatus*, *P. ornatus* com as amostras comerciais de *P. boldus*;
- Avaliar as atividades anticolinesterásica das espécies de boldo através de ensaios *in vitro* e *in silico*, por simulação computacional de docking;
- Avaliar a atividade antioxidante, frente ao radical de DPPH e ABTS, das amostras de boldo;
- Avaliar alelopatia dos extratos obtidos por infusão das folhas das espécies de boldo sobre sementes de alface;
- Avaliar o potencial antifungico frente à *Candida albicans*.

CAPÍTULO I

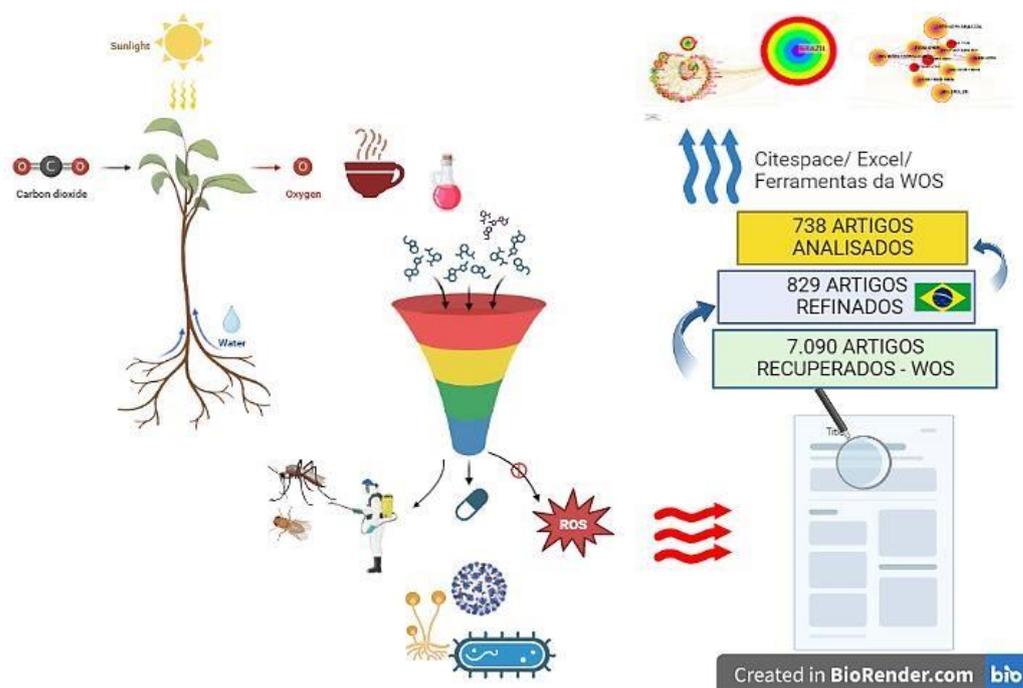
Análise cienciométrica da pesquisa fitoquímica de plantas medicinais

Josiele Viana Gomes^{1*}; Renata Micketen²; Dominique Fernandes de Moura do Carmo³

^{1,3} Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos – PPGCTRA/ Instituto de Ciências exatas e tecnologia- ICET, Universidade federal do Amazonas – UFAM

²Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná/ Campus Dois Vizinhos e Ponta Grossa (UTFPR-DV), Brasil

Graphical Abstract



Resumo

Nas últimas décadas, a tendência das investigações científicas tem sido plantas medicinais já conhecidas pelas sociedades tradicionais, sendo este caminho considerado um dos melhores para a descoberta de novas drogas, com diversos estudos comprovando atividades biológicas e identificando a composição química de várias espécies de plantas. Esses estudos fazem parte dos segmentos da denominada pesquisa fitoquímica. Dentro desse contexto, o presente estudo teve como objetivo revisar cientimetricamente a produção científica entre 2018 a 2022 na área da fitoquímica de plantas medicinais, com foco nas publicações de instituições e pesquisadores brasileiros, a fim de inferir sobre a contribuição do Brasil a esse campo de investigação. Para isso, foi realizada uma análise cientimétrica para identificar tendências e lacunas na pesquisa nesse campo. Entre os principais tópicos abordados na cientimetria estão a avaliação da qualidade e do impacto da pesquisa, a análise de citações, a identificação de áreas científicas ativas e a utilização de indicadores para orientar políticas e gestão de pesquisa. Os dados foram obtidos do banco de dados da Web of Science e analisados usando Microsoft Office Excel e CiteSpace. Após refinamento, foi analisado um conjunto de 7.090 publicações relacionadas a

pesquisa fitoquímica mundial e 738 registros relacionados a pesquisa realizada por cientistas do Brasil. Os resultados revelaram um crescimento na pesquisa fitoquímica desde 2018, com especial interesse em óleos essenciais, terpenóides e atividade antioxidante de plantas medicinais tradicionais. Globalmente, a China e a Índia lideram as publicações na área, enquanto o Brasil ocupa a sétima posição no ranking mundial, tendo caído uma posição em relação a 2009. Quanto aos estudos realizados por pesquisadores brasileiros, foi observado que as publicações mais citadas abordam as atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e antiproliferativas de óleos essenciais de plantas medicinais tradicionais. Esses estudos foram publicados em revistas científicas de alto impacto. Esses resultados mostram a importante contribuição dos cientistas brasileiros para o cenário científico internacional da pesquisa fitoquímica, demonstrando a qualidade e relevância dos estudos desenvolvidos no país, apesar dos desafios enfrentados devido à pandemia e aos cortes de orçamento da pesquisa científica nacional durante esse período, que fizeram o número de publicações cair a partir de 2021. Para reverter esse quadro, é essencial que os gestores públicos demonstrem disposição política e comprometimento com a ciência, por meio de maiores investimentos na pesquisa nacional nesse momento crucial de recuperação da pandemia de covid-19.

Palavras chaves: Plantas medicinais, produtos naturais, citespace.

INTRODUÇÃO

Uma planta é classificada como medicinal quando contém compostos que, ao serem utilizados pelo ser humano, têm a capacidade de prevenir, curar ou tratar doenças (Anvisa, 2022). A utilização dessas plantas remonta aos primórdios da civilização, quando o homem primitivo dependia inteiramente da natureza para tratar suas enfermidades. Ao longo da história, várias culturas desenvolveram sistemas sofisticados de medicina baseados em plantas (Almeida, 2011).

No contexto do Brasil, é geralmente estudado o conhecimento de plantas medicinais de comunidades tradicionais indígenas ou caiçaras (Nascimento, 2019). Além disso, as pesquisas etnomédicas revelam a marcante influência da herança cultural africana na medicina tradicional do Brasil, especialmente nas regiões norte, nordeste e sudeste (Almeida, 2011). Dessa forma, a riqueza de plantas medicinais na biodiversidade dos biomas brasileiros é grande (Pereira *et al.*, 2023) e seu uso faz parte da cultura popular brasileira.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) orienta os países a estabelecerem uma ligação entre a medicina tradicional empírica e a medicina científica, com o objetivo de garantir que os medicamentos à base de plantas não sejam rejeitados por preconceito, mas também não sejam aceitos como verdades absolutas sem questionamento, sendo recomendada uma abordagem racional e crítica. Nas últimas décadas, a tendência das investigações científicas tem sido plantas já conhecidas pelas sociedades tradicionais, sendo este caminho considerado um dos melhores para a descoberta de novas drogas. Isso orienta os estudos científicos no

direcionamento de uma determinada ação terapêutica, reduzindo significativamente os investimentos em tempo e dinheiro em pesquisas (Almeida, 2011).

Diante desse cenário, o Governo Brasileiro implementou o Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos (PNPMF) para garantir o acesso seguro e gratuito às plantas medicinais por meio do SUS (Marmitt *et al.*, 2018), buscando, dessa forma, a melhoria da assistência à saúde da população e a inclusão social. Para isso, é necessário o estudo características químicas e biológicas das plantas medicinais, o que implica na avaliação de sua segurança e eficácia por meio de testes farmacológicos e toxicológicos. Além da investigação das propriedades medicinais das plantas, há também estudos relacionados ao potencial pesticida, entre outros produtos de alto valor agregado, que fazem parte dos segmentos da denominada pesquisa fitoquímica (Braz Filho, 2010).

A química de produtos naturais (QPN) de vegetais - ou fitoquímica, como é conhecida atualmente - concentra-se principalmente na identificação estrutural, avaliação de propriedades e estudos biossintéticos de substâncias naturais produzidas pelo metabolismo secundário de organismos vivos (Braz Filho, 2010). As investigações realizadas sobre este tema contemplam principalmente as seguintes linhas de pesquisas: estudo sistemático da composição química de espécies vegetais; extração, isolamento e caracterização de substâncias naturais, com propriedades medicinais, funcionais, aromáticas, condimentares; elucidação estrutural de novas moléculas, com uso intenso de técnicas espectrométricas; síntese e transformações químicas de moléculas com ação biológica; desenvolvimento de novos produtos bioativos (Pimentel; Almeida, 2010).

O crescente interesse interdisciplinar nos metabólitos secundários de plantas medicinais também envolve a participação da fitoquímica, promovendo avanços em diversas áreas do conhecimento, tais como biologia molecular, botânica ecológica, sistemática e evolutiva, farmacologia, biotecnologia, química orgânica (por meio de novos modelos de síntese, reações e reagentes, bem como testes de reagentes), medicina (para a descoberta de novos medicamentos), agricultura (no desenvolvimento de defensivos agrícolas) e veterinária (para medicamentos voltados a outras espécies animais) (Braz Filho, 2010).

A relativa facilidade de coleta, a condição ambiental favorável para desenvolvimento sustentável, a biodiversidade estrutural de substâncias orgânicas naturais e a possibilidade de descoberta de princípios ativos permitem destacar as plantas brasileiras como a principal fonte renovável para o surgimento e desenvolvimento de novos fármacos, além de outros produtos que podem ser utilizados para finalidades sociais adicionais (Braz Filho, 2010). Assim,

possuímos uma vasta coleção de plantas em ambientes aquáticos e terrestres, com um potencial químico significativo, ainda pouco explorado em relação ao esforço de pesquisa dedicado a ele.

Deste modo, a pesquisa fitoquímica é de extrema importância para o desenvolvimento científico, tecnológico e sustentável de um país, sendo cada vez mais relevante investimentos nessa área de pesquisa. Então, é de especial interesse conhecer a distribuição da cena científica brasileira em relação à pesquisa fitoquímica. Dessa forma, torna-se importante investigar as lacunas e tendências na literatura, a fim de compreender o estado da arte atual dessa área de pesquisa, e assim apontar perspectivas futuras e orientar caminhos na elaboração de políticas para o desenvolvimento científico, tecnológico e sustentável.

Atualmente a análise cienciométrica é amplamente utilizada como método para avaliar e examinar a evolução da pesquisa e o desempenho de acadêmicos, instituições, países e até mesmo periódicos em áreas específicas de estudo (Konur, 2012).

Segundo John Mingers (2015), a ciencimetria foi inicialmente definida por Nalimov (1971) como métodos quantitativos de pesquisa sobre o desenvolvimento da ciência como um processo informacional. Pode ser considerada como o estudo dos aspectos quantitativos da ciência e da tecnologia, visualizados como um processo de comunicação. Alguns dos principais temas incluem formas de medir a qualidade e o impacto da pesquisa, entender os processos de citações, mapear áreas científicas e o uso de indicadores na elaboração de políticas e gestão da pesquisa.

Dessa forma, o principal objetivo deste trabalho foi analisar o estado da arte da pesquisa fitoquímica, com foco nas publicações de instituições e pesquisadores brasileiros, a fim de inferir sobre a contribuição atual do Brasil nesse campo de investigação. Para isso, foi realizada uma análise cienciométrica para identificar tendências e lacunas na pesquisa nesse campo.

MATERIAIS E MÉTODOS

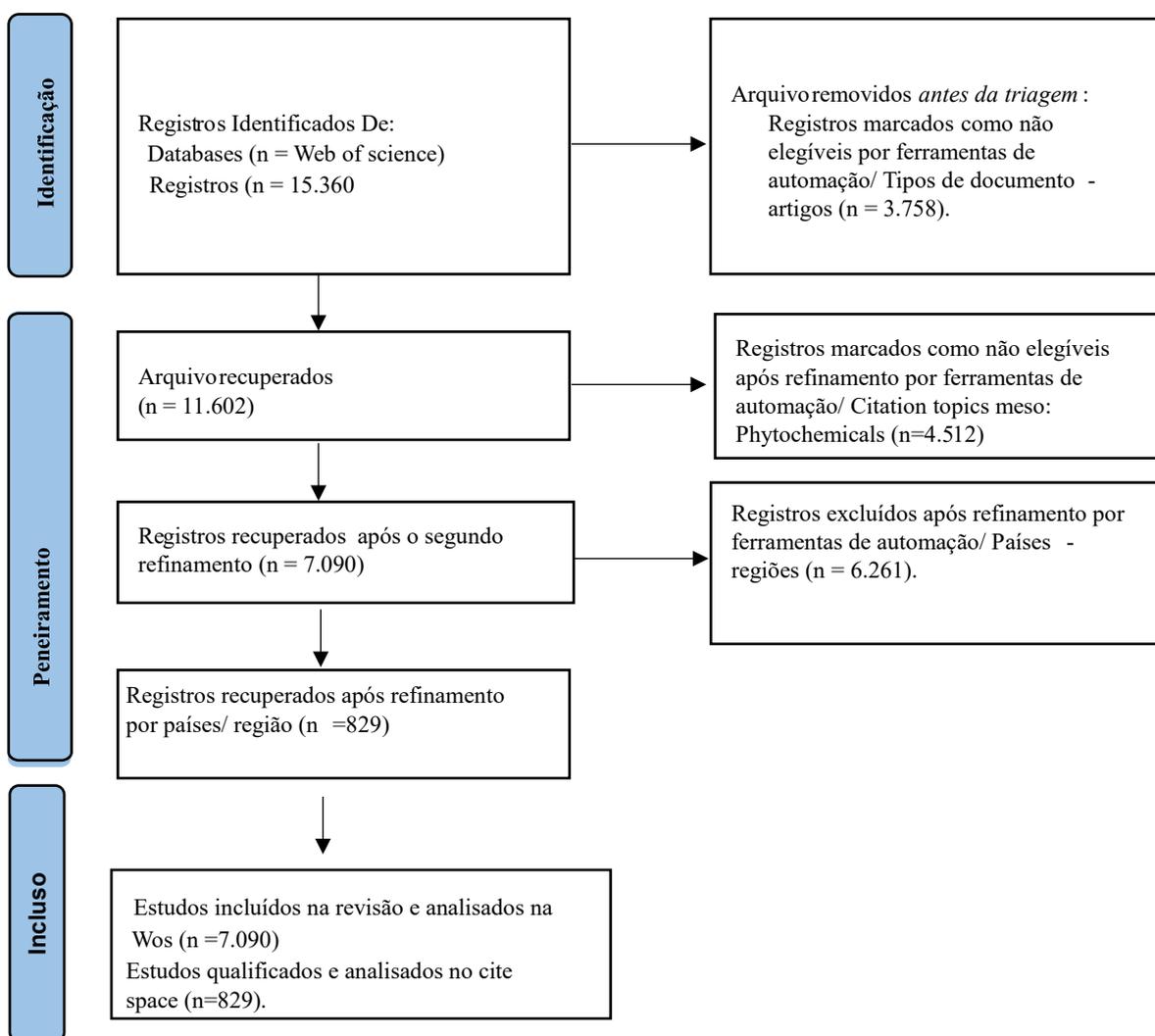
A base de dados da coleção principal da Web of Science (WOS) foi utilizada para desenvolver a revisão cienciométrica. A WOS é considerada a mais importante base de dados de publicações científicas sobre diversos temas de pesquisa e inclui um conjunto abrangente de metadados, como listas de autores, resumos, referências, número de citações, instituições, agências de fomento, fator de impacto de periódicos e países.

Realizou-se busca na Wos em duas etapas. Na primeira etapa, realizada em abril de 2023, buscou-se em pesquisa avançada, todos os campos, os seguintes termos e operadores booleanos: ALL (Phytochemical OR “chemical constituents” OR phytochemistry OR

“chemical-composition” OR “chemical profile” OR “main constituent”)) AND ALL=(medicinal plants OR “medicinal plant” OR “herbal medicines” OR “traditional plants”) and Artigo (Tipos de documento) entre 2018 e 2022, que resultou em 11.602 publicações.

Em seguida, utilizou-se refinamento por ferramentas automação, chamada Citation topics meso, e selecionado o ítem Phytochemicals, obtendo-se retorno de 7.090 artigos. Na segunda etapa, foi utilizado o filtro Países/ regiões, que faz a busca pelo país nos endereços dos autores, resultando em 829 resultados, conforme pode se visualizar no Flow Chart do Prisma Figura 1.

Figura 1: Resumo das etapas de pesquisa e seleção de dados



Na WoS, foram utilizadas as ferramentas “Analisar resultados” “Relatório de citações” para analisar o conjunto de dados da primeira busca, o qual, 11.602, e também o conjunto de

dados da segunda busca, 829 publicações. Informações sobre a Soma das Vezes Citadas, citações médias por item e “H-index” foram registradas.

Os registros, incluindo títulos, resumos e referências citadas, foram então enviados para Citespace (Chen, 2022), Microsoft Excel 2016 (Microsoft Office 2016). Foram qualificados 692 documentos pelo Citespace.

O Citespace, criado pelo Dr. Chaomei Chen, é um software de visualização científica em Java. Em seus mapas de visualização, cada nó representa um item que poder ser uma palavra-chave, assunto, periódico ou referência, e os links representam a cocitação ou coocorrência entre esses itens. Cada nó é representado por anéis de árvores em cores diferentes, indicando a ordem temporal dos links de coocorrência: azul para mais antigos e laranja para mais recentes. Além disso, um anel roxo externo indica uma boa centralidade para um item, quanto mais espessa mais forte Chen (2016).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Característica gerais das publicações mundiais relacionadas à pesquisa fitoquímica de plantas medicinais

Neste tópico será apresentado os resultados do levantamento da produção científica realizado diretamente na Web of Science entre 2018 e 2022, abordando-se inicialmente a pesquisa fitoquímica como um todo no âmbito mundial, para em seguida dar enfoque à pesquisa fitoquímica realizada pelas instituições e pesquisadores brasileiros.

Após o refinamento automático por tipo de documentos/artigos e Citation topics meso/ Phytochemicals, obteve-se um conjunto de 7.090 publicações, o qual foi analisado pelas ferramentas da WOS.

Dentre os estudos selecionados 99,323% foram escritos em inglês, 0,268% em português e 0,212% em espanhol. Todo o conjunto de dados recebeu 49.483 citações, em média 6,98 citações por item, índice H 52.

O índice H é um indicador da qualidade da produção científica que avalia a importância do estudo realizado pelos pesquisadores, sendo essas publicações classificadas de acordo com o número de citações. Ou seja, dentre as publicações avaliadas nesta revisão, 52 delas receberam pelo menos 52 citações, demonstrando assim a relevância dos trabalhos publicados, considerando o curto intervalo de tempo. Dessa forma, o índice H dos estudos evidencia um bom desempenho científico nessa área de pesquisa.

A Figura 2 mostra a evolução temporal das publicações mundiais e suas respectivas citações relacionadas à pesquisa fitoquímica.

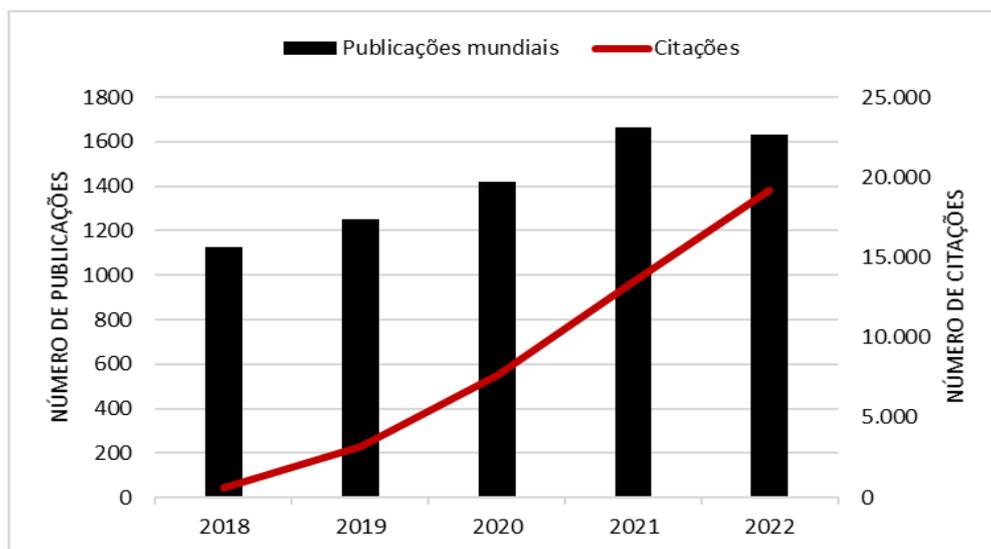


Figura 2. Comparação entre o número de publicações e citações anuais da pesquisa fitoquímica mundial.

As publicações mundiais relacionadas à fitoquímica cresceu desde 2018, com uma leve queda em 2022. As citações das publicações cresceram sem interrupção.

A distribuição geográfica de publicações sobre a pesquisa fitoquímica é um fator extremamente importante, pois permite visualizar os países que se destacam em pesquisa e desenvolvimento tecnológico sobre este tema (Furtado *et al.*, 2022).

A figura 3 apresenta as publicações científicas classificadas por país de origem dos autores, com destaque para os dez países que mais publicaram sobre o tema Fitoquímica. Observa-se que a china e a Índia apresentam a maior taxa de publicação sobre o tema ocupando o primeiro e segundo lugar no ranking mundial, respectivamente.

O Brasil ocupa sétima posição no ranking mundial, tendo caído uma posição em relação a 2009, onde ocupava a sexta posição (Pimentel; Almeida, 2010).

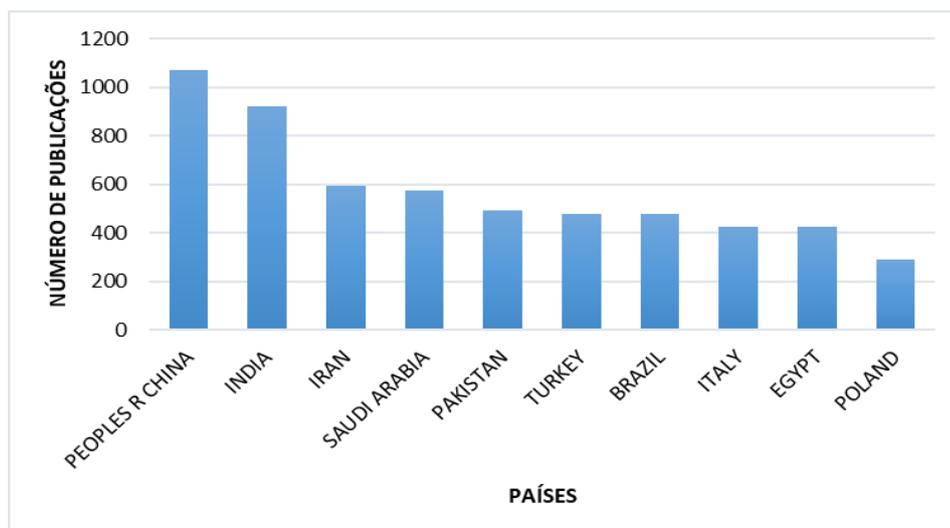


Figura 3. Publicações científicas sobre “fitoquímica”, classificadas por país: 2018-2022. (A) Distribuição geográfica de publicações. (B) Ranking dos 10 países com maior número de publicações sobre o tema.

De acordo com um relatório da Elsevier e da Agência Bori, em 2022 os autores brasileiros publicaram 74,5 mil documentos científicos, uma queda de 7,5% em relação ao ano anterior. Apenas a Ucrânia, afetada pela guerra, teve declínio dessa magnitude, enquanto que China, Índia e Paquistão, aumentaram o número de publicações Queiroz, (2023), fazendo com que esses países ocupem as primeiras posições, e o Brasil ter caído de posição no ranking.

As revistas que mais publicam sobre o tema fitoquímica de plantas medicinais estão listadas a seguir juntamente com seus respectivos fatores de impacto 2022: Journal Of Ethnopharmacology (5.195), Molecules (4.927), Industrial crops and products (6.449), Natural Product Research (2.488), Journal Of Essential Oil Bearing Plants (1.971). Pode haver um interesse científico mundial significativo neste tema, uma vez que os trabalhos estão sendo publicados em revistas com alto fator de impacto.

Além disso, observa-se que a revista que mais publica artigos sobre o tema é a Journal Of Ethnopharmacology, que cobre o uso medicinal tradicional de plantas, indicando o interesse da comunidade científica em pesquisas coletadas dentro de uma população culturalmente definida. De acordo com Almeida (2011), este é considerado um dos melhores caminhos para a descoberta de novas drogas, uma vez que orienta os estudos científicos no direcionamento de uma determinada ação terapêutica, reduzindo significativamente os investimentos em tempo e dinheiro em pesquisas.

As 10 áreas de pesquisa da WOS com maior número de publicações globais sobre fitoquímica de plantas medicinais estão mostrados na figura 4. As categorias “Plant sciences”, “Pharmacology Pharmacy”, “Chemistry medicinal”, “Biochemistry Molecular biology”,

“Chemistry multidisciplinary” aparecem com maior frequência destacando interesse dessas áreas no tema investigado.

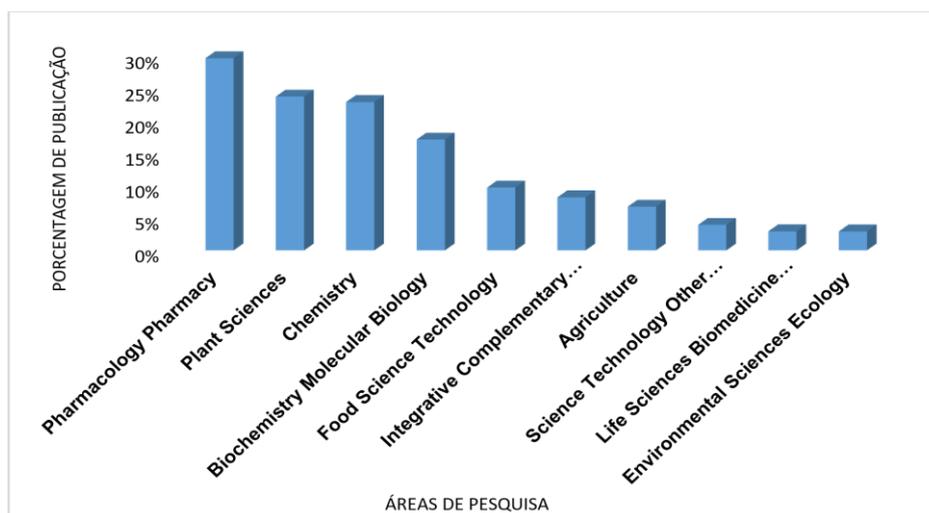


Figura 4. Principais áreas de pesquisa da WOS em que são publicados estudos globais sobre fitoquímica.

Dessa forma, observa-se o interesse interdisciplinar no estudo de plantas medicinais de uso tradicional. De acordo com (Braz filho, 2010), a fitoquímica contribui ativamente para avanços em outras áreas do conhecimento como farmacologia, biologia molecular, botânica ecológica, sistemática e evolutiva, biotecnologia, química orgânica (por meio de novos modelos de síntese, reações e reagentes, bem como testes de reagentes), medicina (para a descoberta de novos medicamentos), agricultura (no desenvolvimento de defensivos agrícolas) e veterinária (para medicamentos destinados a outras espécies animais).

A figura 5 mostra os principais tópicos de citação micro da WOS, indicando os principais temas que estão sendo estudados na pesquisa fitoquímica mundial. Observa-se que os temas que mais estão sendo investigados são o “óleo essencial”, “atividade antioxidante”, “triterpenóides” e “etnobotânica”, demonstrando interesse da comunidade científica mundial na atividade biológica dos metabólitos secundários de plantas medicinais usadas tradicionalmente. Observa-se que tanto as principais revistas que publicam sobre fitoquímica de plantas medicinais, quanto as principais áreas de pesquisa e micro tópicos, indicam que a comunidade científica internacional está interessada em investigar os óleos essenciais, terpenóides e atividade antioxidante de plantas medicinais de uso tradicional.

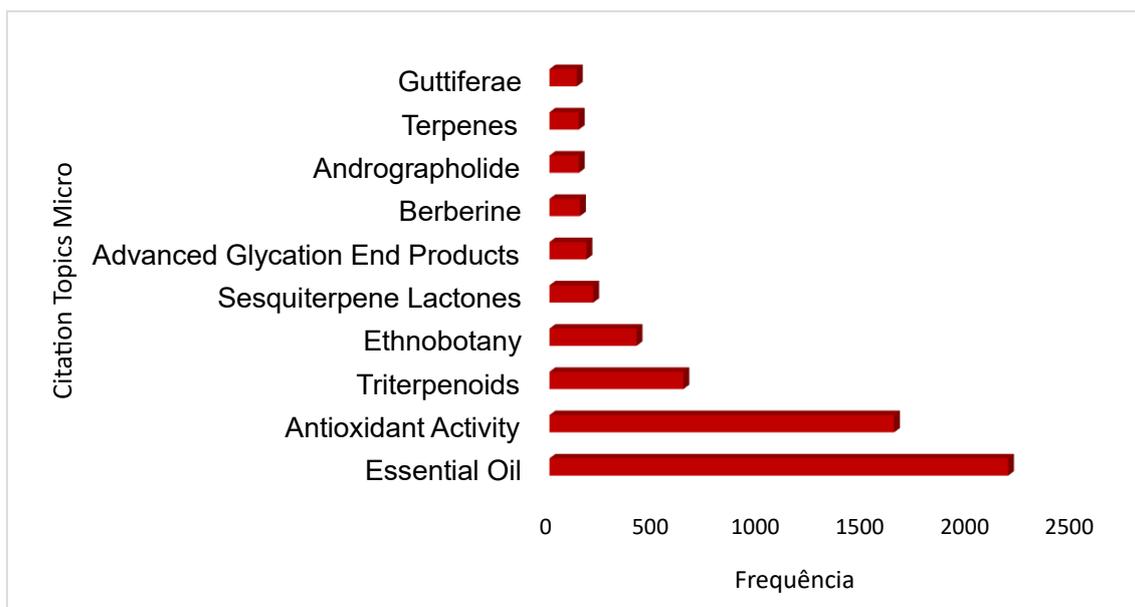


Figura 5. Top 10 tópicos de citação micro da WOS das publicações mundiais sobre fitoquímica.

Características gerais da produção científica realizada pelas instituições e pesquisadores do Brasil relacionadas a pesquisa fitoquímica de plantas medicinais

Após o refinamento utilizando o filtro País/ Região, obteve-se 829 publicações na WOS, entre 2018 e 2022. Dentre os estudos selecionados, 97,15% foram escritos em inglês, 2,6% em português e 0,26% em espanhol conforme ilustrado na Figura 2. Todo o conjunto de dados recebeu 4611 citações, em média 6.25 citações por item, índice H 25. O índice H é um indicador da qualidade da produção científica que avalia a importância do estudo realizado pelos pesquisadores, sendo essas publicações classificadas de acordo com o número de citações. Ou seja, dentre as publicações avaliadas nesta revisão, 25 delas receberam pelo menos 25 citações, demonstrando assim a relevância dos trabalhos publicados, considerando o curto intervalo de tempo. Dessa forma, o índice H dos estudos evidencia um bom desempenho científico das publicações com autoria de cientistas brasileiros.

A figura 6 mostra a relação entre as publicações feitas por pesquisadores do Brasil e suas respectivas citações entre 2018-2022. Observa-se aumento consecutivo no número de publicações até 2020, seguindo o padrão mundial Figura 2. No entanto, a partir de 2021, há uma queda na taxa de publicações até 2022, não seguindo mais a tendência mundial. Houve um

crescimento significativo no número de citações entre 2018 a 2022, o que pode indicar aumento do interesse pelo tema.

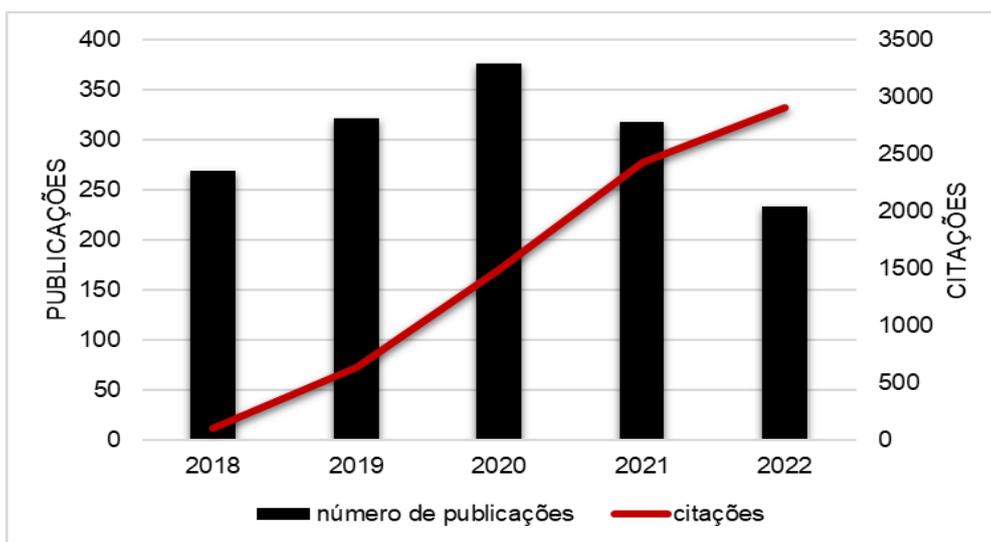


Figura 6. Comparação entre as publicações e citações relacionadas a pesquisa fitoquímica realizada por cientistas brasileiros

Essa diminuição no número de publicações pode explicar a queda do Brasil no Ranking mundial entre os países que mais publicam sobre o tema fitoquímica de plantas medicinais Figura 3. De acordo com relatório divulgado no fim de julho de 2023 pela Elsevier e pela Agência Bori, os autores brasileiros tiveram queda de 7,5% em 2022 no número de publicação em relação ao ano anterior. Segundo Queiroz, (2022), de 1996 a 2021, a produção científica brasileira aumentou de forma contínua, apesar de ter desacelerado no início da pandemia. Com essa redução, maior do que a do Reino Unido, dos Estados Unidos e da Rússia, a contribuição do Brasil para a ciência mundial caiu de 2,78% para 2,46%, retornando ao nível de 2014.

De acordo com o presidente das relações acadêmicas da Elsevier para a América Latina, como a redução afetou muitos países, a explicação principal para esse resultado está na pandemia, que, no entanto, atingiu a comunidade científica brasileira de forma mais intensa. A hipótese mais provável no momento é que a queda de 2021 para 2022 tenha sido causada pelos efeitos da pandemia, como também nos cortes de verbas, falta de recursos laboratoriais e insumos. Além disso, uma análise prévia conduzida pela Elsevier durante a pandemia revelou que as pesquisadoras eram mais impactadas do que seus colegas homens durante os períodos de confinamento, devido ao acúmulo de múltiplas responsabilidades, como o cuidado com os filhos Queiroz (2022), diminuindo assim o número de publicações de mulheres cientistas.

De acordo com o CNPq, as mulheres constituíam 43,7% do quadro de pesquisadores brasileiros em 2023. Dessa forma, a diminuição da produtividade das cientistas brasileiras afeta

diretamente a produção científica nacional. Nesse sentido, será necessário medidas compensatórias para reduzir o impacto da pandemia nas carreiras de pesquisa das mulheres. As universidades terão que considerar os impactos de gênero da pandemia ao tomar decisões relacionadas à contratação, admissão, progressão na carreira, remuneração baseada na produtividade, entre outros (Ribeiro, 2020).

Ainda de acordo com o relatório a maior perda no número de publicações ocorreu nas ciências da natureza, de 44.616 artigos em 2021 para 40.964 em 2022. Essas disciplinas foram as que sofreram mais com o fechamento dos laboratórios e a suspensão de pesquisas de campo durante mais de um ano na pandemia.

Observa-se no gráfico da Figura 6 que houve um aumento do número de publicações em 2020. Isso pode ser explicado pelo fato de que, de acordo com Queiroz, (2022), no início da pandemia houve um aumento no número de publicações de 5% em 2022, ano em que o distanciamento social foi mais rigoroso, muitos pesquisadores, impossibilitados de realizar trabalho de campo e com mais tempo disponível para redigir artigos, dedicaram-se à análise de dados previamente coletados, publicando suas análises. No entanto, a falta de novos dados de campo levou a uma queda nas submissões de artigos em 2021 e 2022.

Outros países, como China e Índia, apresentaram uma recuperação rápida no número de artigos publicados em 2022, em comparação com o Brasil. Segundo Helena Nader, presidente da Academia Brasileira de Ciências, isso ocorre devido às dificuldades enfrentadas pela comunidade científica brasileira com financiamento nos últimos anos, agravadas durante o último governo, e também devido à pandemia.

Dessa forma, para reverter esse quadro, é de suma importância investimentos em pesquisas em todos os campos do conhecimento, bem como políticas públicas para ampliar o espaço para mulheres na pesquisa, uma vez que a maternidade costuma atrasar a carreira das pesquisadoras, além de outros fatores relacionados a desigualdade de gênero.

Na figura 7 está representado a rede de colaboração entre pesquisadores do Brasil e de outros países.

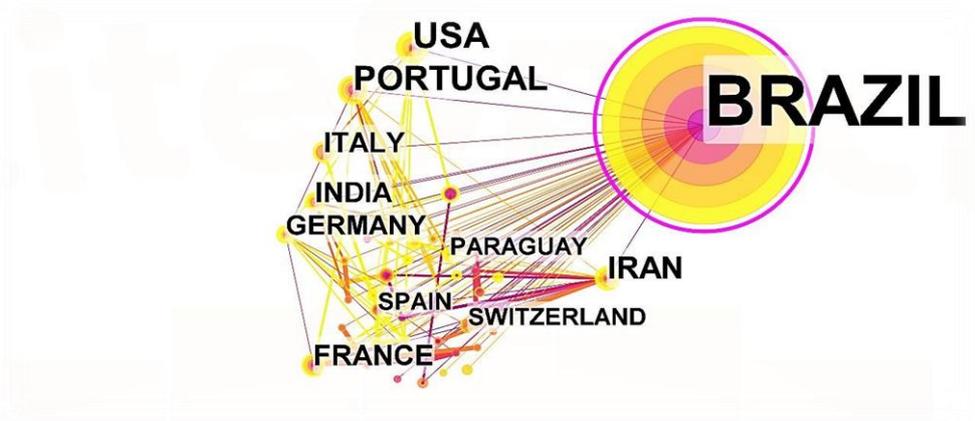


Figura 7 Rede de colaboração do Brasil com outros países.

Observa-se que o Brasil tem parcerias com a Índia e Irã, segundo e terceira posição no ranking mundial dos países que mais publicaram sobre o tema fitoquímica (figura 3), e também com a Itália, oitava posição no ranking. Esses resultados sugerem que é preciso realizar também parcerias com a China, que ocupa o primeiro lugar no ranking mundial atual sobre pesquisa fitoquímica de plantas medicinais. De acordo com Pimentel; Almeida, (2010), em 2009 a China ocupava o segundo lugar no ranking mundial de publicações sobre fitoquímica. Em 2021 e 2022, a quantidade de artigos científicos publicados em todas as áreas pela China aumentou mais de 20%, enquanto a dos Estados Unidos caiu cerca de 1,6% no mesmo período, de acordo com um relatório da editora Elsevier baseado na base de dados Scopus.

Esse desempenho chinês após a pandemia intensificou a rivalidade científica entre as duas principais potências mundiais e provavelmente irá solidificar a liderança do país asiático, que já vinha superando seu rival em termos quantitativos desde 2019 Queiroz, (2022). A atual posição indica o crescente interesse e investimento da China na pesquisa fitoquímica, sendo de grande importância parceria com este país.

As principais áreas de pesquisas da WOS em que estão sendo publicados os estudos sobre fitoquímica realizado por pesquisadores Brasil estão na figura 8.

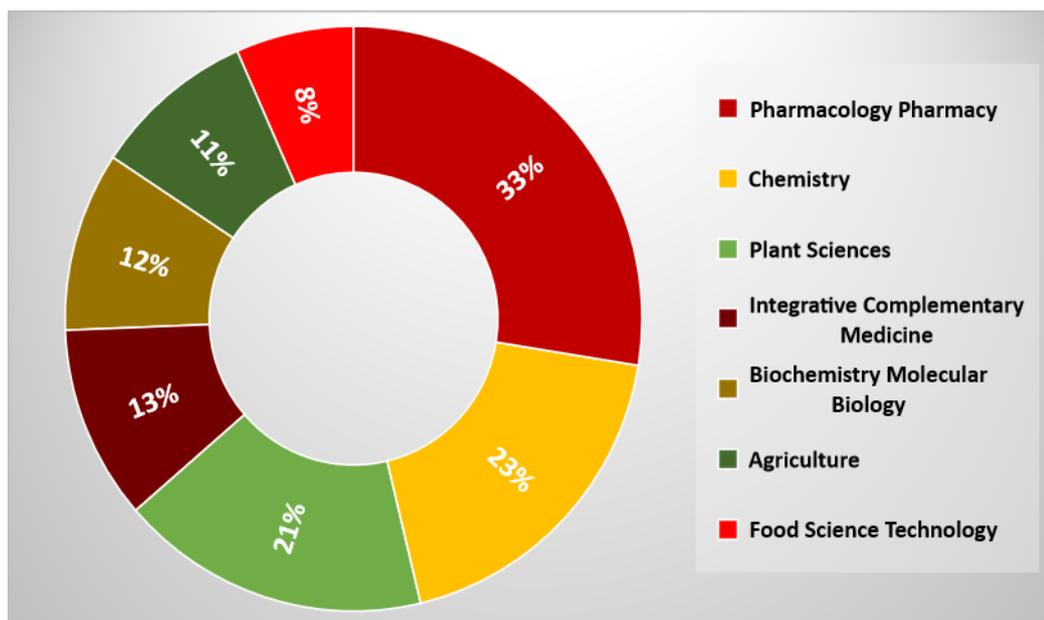


Figura 8. Principais áreas da WOS em que estão sendo publicadas as pesquisas brasileiras relacionadas ao tema fitoquímica

Verifica-se que a Pharmacology Pharmacy é área com maior número de publicações, correspondendo a 33%, seguida da Chemistry 23%, Plant Sciences 21%, Integrative Complementary Medicine 13%, Biochemistry Molecular Biology 12%, Agriculture 11% e Food Science Technology 8%. Pode-se constatar, ao comparar com as principais áreas de pesquisas mundiais sobre fitoquímica de plantas medicinais, que os pesquisadores brasileiros seguem as tendências mundiais de pesquisas. Isso mostra que essas são as áreas globais de pesquisa mais ativas quando se trata do tema fitoquímica. Observa-se que tanto a pesquisa mundial, quanto a nacional estão interessadas na busca por novos fármacos, uma vez que área de pesquisa com maior número de publicação é a Pharmacology Pharmacy, Figura 4 e 8.

Na figura 9 estão listados os 10 principais micros tópicos de citação de acordo com a WOS. Observa-se que o Brasil segue a tendência mundial de pesquisa no que se refere aos micros tópicos “óleo essencial”, “atividade antioxidante” e “Triterpenoides”.

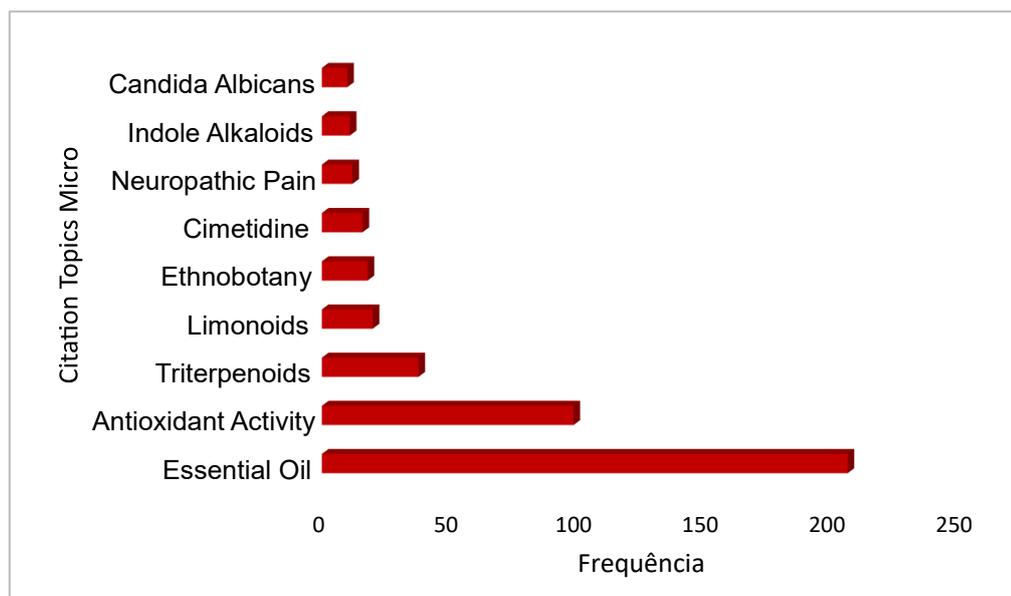


Figura 9. Top 10 tópicos de citação micro da WOS das publicações nacionais sobre fitoquímica

No entanto, é notável que o Brasil também investiga distintos micro tópicos, demonstrando interesse na investigação de “limonoids”, “Cimetidine”, “Neuropathic Pain”, “Indole Alkaloids” e “Candida Albicans”.

As 10 revistas científicas que abordam sobre o tema fitoquímica mais citadas pelo conjunto de publicações de cientistas brasileiros estão listadas na Tabela 1 com seus respectivos fatores de impacto, centralidade e ilustradas com links na Figura 11.

Tabela 1. Top 10 revistas que mais publicam sobre o tema fitoquímica, centralidade e Fator de impacto.

Ranking	Frequência	Revistas	Centralidade	Fator De Impacto_2022
1	6231	Journal Of Ethnopharmacology	0.41	5.4
2	3931	Food Chemistry	0.13	8.8
3	3777	Phytochemistry	0.08	3.8
4	3747	JournalOf Agricultural And Food Chemistry	0.13	6.1
5	3697	Molecules	0.16	4.6
6	3398	Phytotherapy Research	0.07	7.2

7	3245	Planta Medica	0.08	2.7
8	3029	Fitoterapia	0.12	3.4
9	2048	Industrial Crops And Products	0.00	5.9
10	1547	Natural Product Research	0.00	2.2

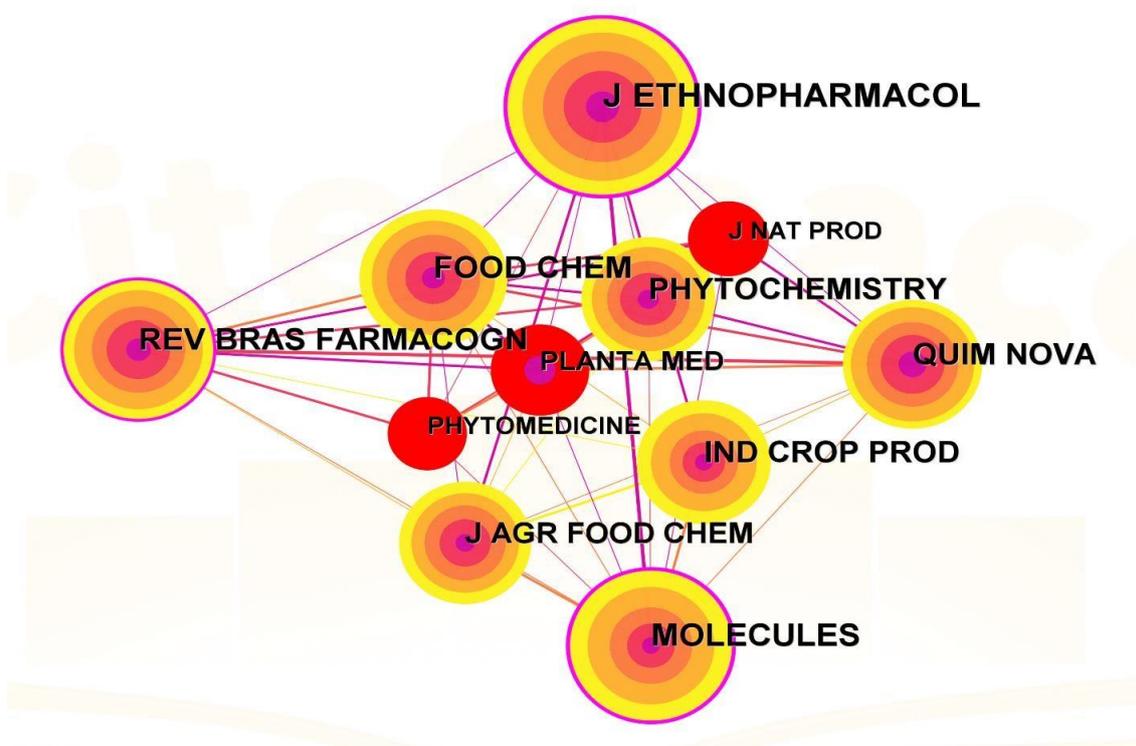


Figura 20. Revistas que mais publicaram artigos de cientistas brasileiros sobre o tema fitoquímica.

Dentro deste tema, para cada revista, destaca-se a frequência (número de publicações representado na figura pelo tamanho do nó), centralidade (influência representada na figura pelo halo roxo), Burst (explosão de citações representado na figura pelo centro vermelho), as linhas entre os nós significam a contribuição entre as revistas (Chen, 2016). As 4 revistas mais citadas foram Journal Of Ethnopharmacology, Molecules, Revista Brasileira Farmacognosia e Química Nova, respectivamente.

Observa-se que as duas primeiras revistas são também as que mais publicam estudos mundiais sobre a pesquisa fitoquímica de plantas medicinais, demonstrando visibilidade internacional nesse tema, e possuem alto fator de impacto. A centralidade indica a influência

das revistas sobre o tema estudado, quanto maior a centralidade maior a influência, dessa forma, constata-se que as revistas *Journal Of Ethnopharmacology* (0,31), *Molecules* (0,31), *Revista Brasileira Farmacognosia* (0,10) possuem a maiores centralidades, demonstrando a influência destas sobre o tema pesquisado. Uma explosão de citações fornece evidências de que um determinado item está associado a uma onda de citações, que pode durar por vários anos ou um ano (Chen, 2016).

Dois periódicos se destacam com suas explosões de citação, *Planta Medica*, com explosão de citação entre 2020 e 2022 e *Journal Of Natural Products*, entre 2018 e 2019. Isso indica um rápido aumento no número de publicações nesse intervalo de tempo, o que mostra que esses periódicos têm tido interesse significativo nas produções da comunidade científica brasileira nesse período. Dessa forma, a probabilidade dessas revistas aceitarem publicações sobre o tema fitoquímica de plantas medicinais é alta.

Além disso, a terceira e quarta revista, respectivamente, são revistas brasileiras com destaque em publicações nacionais sobre fitoquímica de plantas medicinais, sendo a *Revista Brasileira Farmacognosia* de grande influência e relevância nesse tema. A partir desses resultados, observa-se que os cientistas brasileiros têm sido reconhecidos e valorizados internacionalmente pela qualidade de seus estudos, como evidenciado por suas publicações em revistas de alto impacto. Isso reforça a importância e relevância do Brasil na pesquisa em fitoquímica global.

Na tabela 2 estão listados os dez principais artigos com número mais significativo de citações entre 2018 e 2022 disponível na WOS.

Tabela 2 . As dez publicações mais citadas relacionadas à pesquisa fitoquímica realizadas por pesquisadores brasileiros.

Classificação	Título	Periódicos	Autor e Ano	Total de Citações	Média por Ano
1	Antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimycobacterial activities of the essential oil of <i>Psidium guineense</i> Sw. and spathulenol	Journal Of Ethnopharmacology	Nascimento <i>et al.</i> (2018)	114	19
2	<i>Annona muricata</i> Linn. leaf as a source of antioxidant compounds with in vitro antidiabetic and inhibitory potential against alpha-amylase, alpha-glucosidase, lipase, non-enzymatic glycation and lipid peroxidation	Biomedicine & Pharmacotherapy	Justino <i>et al.</i> (2018)	84	14
3	Antibacterial and antifungal activities of phenolic compound-enriched ethyl acetate fraction from <i>Cochlospermum regium</i> (mart. Et. Schr.) Pilger roots: Mechanisms of action and synergism with tannin and gallic acid	South African Journal Of Botany	Carvalho <i>et al.</i> 2018	54	9
4	Alternative sources of oils and fats from Amazonian plants: Fatty acids, methyl tocols, total carotenoids and chemical composition	Food Research International	Serra <i>et al.</i> (2019)	51	10,2
5	Green coffee seed residue: A sustainable source of antioxidant compounds	Food Chemistry	Castro <i>et al.</i> (2018)	47	7,83
6	Inhibition of the essential oil from <i>Chenopodium ambrosioides</i> L. and alpha-terpinene on the NorA efflux-pump of <i>Staphylococcus aureus</i>	Food Chemistry	de Moraes <i>et al.</i> (2018)	42	7
7	Seasonal variation in the chemical composition of two chemotypes of <i>Lippia alba</i>	Food Chemistry	Gomes <i>et al.</i> (2019)	41	8,2
8	<i>Schinus molle</i> : anatomy of leaves and stems, chemical composition and insecticidal activities of volatile oil against bed bug (<i>Cimex lectularius</i>)	Revista Brasileira De Farmacognosia- Brazilian Journal Of Pharmacognosy	Machado <i>et al.</i> (2019)	39	7,8
9	Physicochemical Characterization, Antioxidant Activity, and Phenolic Compounds of Hawthorn (<i>Crataegus</i> spp.) Fruits Species for Potential Use in Food Applications	Foods	Alirezalu <i>et al.</i> (2020)	37	9,25
10	Crude extract and fractions from <i>Eugenia uniflora</i> Linn leaves showed anti-inflammatory, antioxidant, and antibacterial activities	Bmc Complementary And Alternative Medicine	Falcao <i>et al.</i> (2018)	33	5,5

O Estudo de Do Nascimento *et al.* (2018), intitulado “Antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimycobacterial activities of the essential oil of *Psidium guineense* Sw. and spathulenol”, apresentou o maior número de citações com 114 citações e 19 por ano, em média. Este estudo investiga atividade antioxidante, antiinflamatória, antiproliferativa e antimicobacteriana do óleo essencial de *P. guineense*, uma planta cujas folhas são usadas na medicina popular brasileira no tratamento de doenças inflamatórias, e do espatulenol constituinte majoritário desta planta. O estudo pretendeu em parte fornecer evidências que apoiem o uso etnobotânico das folhas desta espécie. Este estudo demonstrou de forma inédita as atividades biológicas investigadas do óleo essencial de *P. guineense* e espatulenol, colaborando com o conhecimento etnofarmacológico desta planta relacionado ao efeito antiinflamatório. Considerando o significativo número de citações desta publicação, bem como a revista de alto fator de impacto na qual foi publicada, pode-se inferir que este estudo é referência na pesquisa fitoquímica de plantas medicinais.

O estudo de Justino *et al.* (2018), intitulado “*Annona muricata* Linn. leaf as a source of antioxidant compounds with in vitro antidiabetic and inhibitory potential against alphaamylase, alpha-glucosidase, lipase, non-enzymatic glycation and lipid peroxidation”, publicado em *Biomedicine & Pharmacotherapy*, fator de impacto 7.419, teve 84 citações. O referido estudo centrou-se em avaliar o potencial antidiabético *in vitro* da *Annona muricata*, espécie usada na medicina tradicional para controlar o diabetes mellitus e suas complicações, bem como investiga a capacidade antioxidante. O estudo apresentou novas atividades biológicas ainda não descritas anteriormente para a referida espécie, o que contribui para a compreensão da potencial eficácia do uso da folha de *A. muricata*. Considerando o fator de impacto da revista em que o estudo foi publicado, o número de citações e as descobertas inéditas trazidas neste trabalho, pode-se inferir que este artigo é referência e contribui significativamente à pesquisa fitoquímica de plantas medicinais. Os demais estudos centram-se principalmente nas atividades antibacteriana, antifúngico, antioxidantes e inseticida. Investiga-se principalmente as atividades biológicas dos óleos essenciais, compostos fenólicos. O significativo número de citações desses artigos, corrobora com as principais áreas globais ativas de pesquisas já apontadas neste estudo, as quais, investigação dos óleos essenciais e atividade antioxidante de plantas etnobotânicas.

A Figura 11 mostra as 16 instituições brasileiras que mais publicam sobre a pesquisa fitoquímica de plantas medicinais.

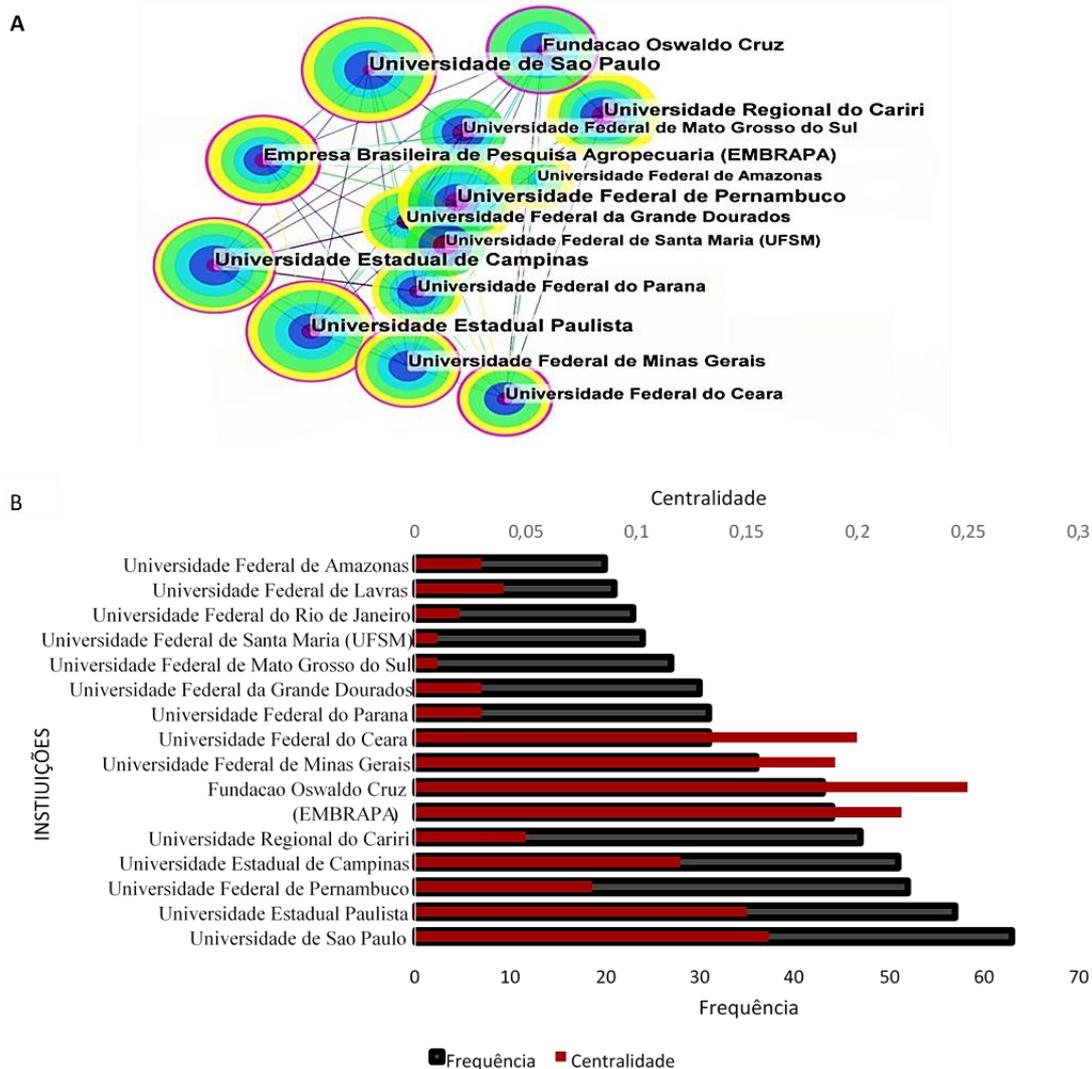


Figura 11. Rede de colaborações entre as principais instituições brasileiras (A). Relação entre frequência e centralidade das 16

Na Figura 11A mostra a rede de cooperação entre as principais instituições brasileiras que publicaram sobre o tema fitoquímica de plantas medicinais. O tamanho de cada nó indica sua frequência de publicação, ou seja, a visibilidade da instituição no tema abordado. Em contrapartida, o halo roxo do anel exterior do nó indica sua centralidade. Sendo assim, quanto mais espesso o halo roxo maior é a influência da instituição. A espessura das linhas indica a força de cooperação entre as instituições.

Entre as instituições, nota-se que há 10 Universidades federais localizadas em diferentes estados, 4 universidades estaduais e dois institutos federais de pesquisas. Observa-se pelo tamanho dos nós que a maior parte das publicações sobre a pesquisa fitoquímica de plantas medicinais concentram-se nos grupos de pesquisas pertencentes às universidades públicas, sendo a Universidade de São Paulo, Universidade Paulista, Universidade Federal de

Pernambuco e Universidade Estadual de Campinas com maior número de publicações, ou seja, maior visibilidade no tema abordado.

No entanto, os institutos que apresentaram maior centralidade foram a FIOCRUZ (0,25), a EMBRAPA (0,22), a Universidade Federal do Ceará (0,20) e seguida da Universidade Federal de Minas Gerais com (0,19). Dessa forma, observa-se que nem sempre a maior frequência de publicação reflete na influência e relevância das instituições no tema abordado.

A Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) possui unidades em 10 estados brasileiros, enquanto a EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) conta com 43 centros de pesquisa em todo o país, estabelecendo diversas parcerias com outras instituições. Esses resultados demonstram que essas instituições são referências em pesquisa fitoquímica de plantas medicinais.

Na figura 12, estão representadas as principais agências brasileiras de fomento à pesquisa com maior número de publicações sobre fitoquímica.

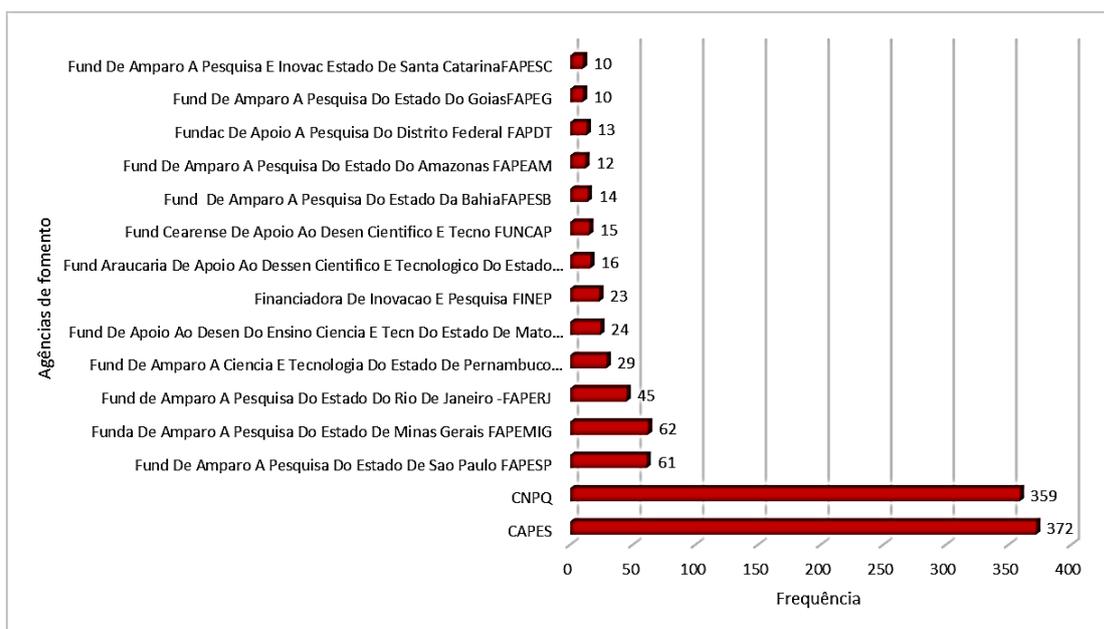


Figura 12. Principais agências brasileiras de fomento à pesquisa com maior número de publicações sobre fitoquímica.

Dentre as agências de fomento, destacam-se a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e o CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). A CAPES, com frequência de 372 publicações, é responsável pela promoção da formação de recursos humanos de alto nível para a pesquisa, além do desenvolvimento científico e tecnológico do país, sendo a agência que mais financia pesquisas científicas no Brasil. Em seguida, destaca-se o CNPQ, com frequência de 359, que

tem como objetivo fomentar a pesquisa científica e tecnológica no país, por meio da concessão de bolsas de estudos e projetos de pesquisa. Ambas as agências são vinculadas ao Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI).

Na sequência temos a FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) que uma agência estadual de fomento à pesquisa científica e tecnológica no Estado de São Paulo, e a FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) agência de fomento à pesquisa científica e tecnológica sediada em Belo Horizonte. Ambas agências financiam projetos de pesquisa e programas de pós-graduação em seus estados, além de promover parcerias com empresas e instituições de pesquisa.

Vale ressaltar que a CAPES e o CNPQ são instituições que financiam pesquisas em todo o país, enquanto as demais agências estaduais de fomento financiam pesquisas apenas de seus estados ou regiões, o que pode justificar a grande diferença em seus dados de frequência de publicação. Observa-se que as agências estaduais de fomento com maior número de publicações pertencem aos estados de São Paulo e Minas Gerais, o que pode estar relacionado ao maior número de publicações e à influência de suas universidades públicas, conforme Figura 11 B.

Importante destacar que o estado de São Paulo possui três Universidades estaduais entre as quatro principais instituições que mais publicam sobre o tema, USP, UNICAMP, UNESP, contribuindo também com sua visibilidade no tema fitoquímica. Dessa forma, percebe-se que investimentos na ciência, tecnologia e na ampliação de universidades impactam diretamente na produção científica das instituições e pesquisadores brasileiros, sendo de extrema importância para a contribuição e relevância científica do Brasil no cenário de pesquisa mundial relacionado ao tema fitoquímica.

Na tabela 3 encontra-se o ranking com os 10 pesquisadores brasileiros que mais publicaram sobre a fitoquímica de plantas medicinais de acordo com WOS

Tabela 3 - Autores brasileiros que mais publicam sobre o tema fitoquímica

Ranking	Autores	Artigos Publicados Sobre O Tema	H- Index	Publicações Entre 2018-2022	Soma Do Número De Citações 2018-2022	Instituição
1	Coutinho HDM	33	26	330	2.714	Universidade Regional do Cariri, CE
2	Almeida JRGD	24	13	32	501	Universidade Federal do Vale do são Francisco- UNIVASF
3	Bertolucci SKV	20	10	46	237	Universidade Federal de Lavras
4	Vilegas W	19	12	74	421	Universidade Estadual Paulista- UNESP
5	Cardoso CAL	17	13	102	708	Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul
6	Costa EV	14	11	57	322	Universidade Federal do Amazonas- UFAM
7	Da Silva FMA	14	11	68	326	Universidade Federal do Amazonas- UFAM
8	De Carvalho AA	14	4	12	41	Universidade Estadual Paulista- UNESP
9	De Menezes IRA	13	18	121	1.056	Universidade Regional do Cariri-CE
10	Blank AF	12	12	79	401	Universidade Federal de Sergipe

Dentre as vantagens do índice H, reside no fato de que essa métrica permite caracterizar a produtividade científica de um pesquisador com objetividade, principalmente em áreas em que há cultura consolidada de publicação em revistas indexadas, e pode ser útil na tomada de decisões sobre promoções, alocação de verbas e atribuição de prêmios (Marques, 2013). Dessa forma os autores listados na Tabela 3 são os mais produtivos na pesquisa fitoquímica no intervalo de 2018 a 2022, e possivelmente, os mais influentes, que pode ser observado pelos seus respectivos H – index.

CONCLUSÃO

A análise do número de publicações por ano revelou que o Brasil teve diminuição no número de publicações a partir de 2021, o que pode ter ocasionado a queda no ranking mundial da sexta posição para a sétima em relação a 2009. Esses resultados sugerem que essa diminuição na produtividade pode ter sido causada pelos efeitos da pandemia, como também nos cortes de verbas.

A análise das principais áreas de pesquisa revela que instituições e cientistas brasileiros estão alinhados com as tendências mundiais, concentrando seus estudos na descoberta de novos fármacos a partir de plantas medicinais tradicionais.

Os principais estudos realizados por cientistas brasileiros concentram-se principalmente nas atividades antibacteriana, antifúngica, antioxidante e inseticida, com foco nas atividades biológicas dos óleos essenciais e compostos fenólicos de plantas etnobotânicas. É notável que os pesquisadores brasileiros trazem informações fitoquímicas inéditas relacionadas às espécies de plantas medicinais, o que evidencia sua contribuição para o conhecimento científico na área. A análise das revistas que mais publicam sobre o tema abordado revela que os pesquisadores do Brasil têm publicado em revistas internacionais de alto impacto, demonstrando a qualidade dos estudos realizados pelos pesquisadores brasileiros, sendo amplamente reconhecidos e valorizados internacionalmente, reforçando sua importância e relevância na pesquisa fitoquímica. Observou-se também que duas revistas nacionais têm destaque em publicações nacionais sobre fitoquímica, sendo a Revista Brasileira Farmacognosia de grande influência e relevância nesse tema.

A análise da produtividade das instituições brasileiras no campo da pesquisa fitoquímica, possibilitou constatar que a FIOCRUZ e a EMBRAPA destacam-se como as mais importantes, com a maior centralidade, o que demonstra a sua relevância para o cenário científico nacional. Observa-se também que as publicações estão distribuídas entre as diferentes universidades públicas, com destaque para USP, UNICAMP, UNESP, todas universidades do

estado de São Paulo, com os maiores números de publicações sobre o tema, demonstrando assim grande visibilidade dessas universidades na pesquisa fitoquímica. Tal fato pode ser explicado quando se observa que a agência de fomento estadual mais citada nos artigos analisados foi a FAPESP, o que demonstra significativo investimento do estado à pesquisa, além disso, o estado possui três universidades estaduais, fato que aumenta sua produtividade na pesquisa.

Dessa forma, conclui-se que investimentos em ciência, tecnologia e na expansão do ensino superior têm um impacto significativo na produção científica das instituições e dos pesquisadores brasileiros.

Apesar do contexto da pandemia e dos seguidos cortes de verbas do governo federal entre 2018 e 2022, observa-se que o Brasil se configura como um importante e relevante ator no cenário científico internacional no que diz respeito à pesquisa em fitoquímica de plantas medicinais, com contribuições significativas para a literatura especializada.

Em relação às lacunas identificadas, nota-se uma escassez de estudos sobre os extratos aquosos obtidos por infusão de plantas medicinais de uso tradicional, assim como investigações relacionadas ao potencial inibitório da enzima acetilcolinesterase pelos constituintes químicos dessas plantas. Isso sugere a necessidade de futuras pesquisas para preencher essas lacunas.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, MZ. Plantas Mediciniais [online]. 3rd ed. Salvador: EDUFBA, 2011, 221 p. ISBN 97885-232-1216-2. Available from *SciELO Books* <<http://books.scielo.org>>.

ALIREZALU, A. et al. Physicochemical Characterization, Antioxidant Activity, and Phenolic Compounds of Hawthorn (*Crataegus* spp.) Fruits Species for Potential Use in Food Applications. **FOODS**, v. 9, n. 4, 2020.

PEREIRA, A. I. et al. **Traditional Plants Used in Southern Brazil as a Source to Wound Healing Therapies** *Chemistry and Biodiversity* John Wiley and Sons Inc, , 1 fev. 2023.

BATISTA, L. M.; VALENÇA, A. M. G. A fitoterapia no âmbito da atenção básica no SUS: realidades e perspectivas. **Pesqui. bras. odontopediatria clín. integr**, p. 293–296, 2012.

CARVALHO, R. S. et al. Antibacterial and antifungal activities of phenolic compound-enriched ethyl acetate fraction from *Cochlospermum regium* (mart. Et. Schr.) Pilger roots: Mechanisms of action and synergism with tannin and gallic acid. **SOUTH AFRICAN JOURNAL OF BOTANY**, v. 114, p. 181–187, jan. 2018.

CASTRO, A. C. C. M. et al. Green coffee seed residue: A sustainable source of antioxidant compounds. **FOOD CHEMISTRY**, v. 246, p. 48–57, 2018.

DE MORAIS OLIVEIRA-TINTINO, C. D. et al. Inhibition of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* L. and alpha-terpinene on the NorA efflux-pump of *Staphylococcus aureus*. **FOOD CHEMISTRY**, v. 262, p. 72–77, 2018.

DO NASCIMENTO, K. F. et al. Antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimycobacterial activities of the essential oil of *Psidium guineense* Sw. and spathulenol.

JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY, v. 210, p. 351–358, jan. 2018.

FALCAO, T. R. et al. Crude extract and fractions from *Eugenia uniflora* Linn leaves showed anti-inflammatory, antioxidant, and antibacterial activities. **BMC COMPLEMENTARY AND ALTERNATIVE MEDICINE**, v. 18, mar. 2018.

FAPESP. Retração da produção científica em 2022. Disponível em: <<https://revistapesquisa.fapesp.br/retracao-da-producao-cientifica-em-2022/>>. Acesso em: 7 maio 2024.

FINÊNCIO, B. M.; ; MININEL, F. J. Abordagem Fitoquímica E Análise Cromatográfica Das Folhas De *Bauhinia Variegata* L. **Intr@ciência Revista científica**, 2019.

FURTADO, I.F.S.P.; VASCONCELOS, M. W. ; STAHLSCHEMIDT, R; M.; SYDNEY, A. C.N.; GHISI, N. C.; SYDNEY, E. B. Scientometric analysis of microalgae wastewater treatment. **Valorization of Microalgal Biomass and Wastewater Treatment**, p. 1–20, 2022.

GOMES, A. F. et al. Seasonal variation in the chemical composition of two chemotypes of *Lippia alba*. **FOOD CHEMISTRY**, v. 273, n. SI, p. 186–193, 2019.

JUSTINO, A. B. et al. *Annona muricata* Linn. leaf as a source of antioxidant compounds with in vitro antidiabetic and inhibitory potential against alpha-amylase, alpha-glucosidase, lipase, nonenzymatic glycation and lipid peroxidation. **BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY**, v.

100, p. 83–92, 2018.

MACHADO, C. D. et al. *Schinus molle*: anatomy of leaves and stems, chemical composition and insecticidal activities of volatile oil against bed bug (*Cimex lectularius*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 1, p. 1–10, 2019.

MARMITT, D. J. et al. The healing properties of medicinal plants used in the Brazilian public health system: A systematic review. **Journal of Wound Care**, v. 27, p. S4–S13, 1 jun. 2018.

MARQUES, F. Os limites do índice-h. *Pesquisa FAPESP*, n. 207, p. 35–39, 2013.

PIMENTEL, F. A.; DE ALMEIDA, M. F. L. F. 2010. *Química verde no Brasil: 2010 - 2030*. p. 2010–2030, 2010.

SERRA, J. L. et al. Alternative sources of oils and fats from Amazonian plants: Fatty acids, methyl tocopherols, total carotenoids and chemical composition. **FOOD RESEARCH INTERNATIONAL**, v. 116, p. 12–19, 2019.

CAPÍTULO II

Perfil químico, análise quimiométrica e atividade antioxidante de diferentes espécies de Boldo consumidos na Amazônia

Josiele Viana Gomes¹; Ívina Thayná Miranda Trindade¹; Rafaela Rolim da Silva¹; Felipe Moura Araujo da Silva²; Dominique Fernandes de Moura do Carmo¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos – PPGCTRA/ Instituto de Ciências exatas e tecnologia- ICET, Universidade federal do Amazonas – UFAM

²Programa de Pós-graduação em Química-PPQ/ Universidade federal do Amazonas – UFAM

RESUMO

O termo boldo é popularmente utilizado para se referir a diferentes espécies de plantas, incluindo *P. barbatus*, *P. ornatus*, *G. amygdalinum* e *P. boldus*. Todas estas espécies são utilizadas para o tratamento de distúrbios digestivo e suas ações terapêuticas estão relacionadas aos metabólitos secundários presentes nas folhas. Nesse contexto, a presente pesquisa teve como objetivo identificar o perfil químico das infusões das folhas de *P. barbatus*, *P. ornatus*, *G. amygdalinum*, e amostras comerciais de *P. boldus*, encontradas em diferentes estabelecimentos dos municípios de Manaus e Itacoatiara, além de avaliar o potencial antioxidante das espécies. As análises ocorreram por espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-MS) e ferramentas quimiométricas (PCA e HCA), a atividade antioxidante foi avaliada frente ao radical de DPPH e a determinação do teor de fenólicos totais foi conduzida pela metodologia de Folin-Ciocalteu. A análise por ESI-MS das folhas secas comercializadas como boldo do Chile, demonstrou que as amostras codificadas como CPB2, CPB4, CPB5, CPB6 apresentaram marcadores químicos específicos da espécie *P. boldus*. A análise quimiométrica e o teor de fenólicos totais, sugerem presença significativa de compostos fenólicos em todas as amostras. Em relação aos valores de TEAC (Capacidade antioxidante **equivalente ao Trolox**), *P. boldus* apresentou a maior atividade antioxidante 1073,33 μM ET dentre as amostras. Em contrapartida, as amostras *in natura* apresentaram menor atividade antioxidante, *P. barbatus* 745,83 μM ET, *P. ornatus* e 187,22 μM ET, *G. amygdalinum* 457,22 μM ET. Estes resultados sugerem que *P. boldus* pode proporcionar maiores benefícios terapêuticos no tratamento de condições ligadas ao estresse oxidativo. Portanto, o presente estudo contribui para o conhecimento químico e biológico essencial para o uso seguro do chá das espécies de boldo.

Palavras-chave: plantas medicinais., compostos fenólicos., Boldo do Chile.

INTRODUÇÃO

No Brasil, a denominação "boldo" é popularmente utilizada para se referir a diferentes espécies de plantas. Entre essas espécies estão a *Plectranthus barbatus*, *Plectranthus ornatus*, ambas pertencentes à família Lamiaceae, *Gymnanthemum amygdalinum*, que pertence à família Asteraceae e *Peumus boldus*, da família Monimiaceae (Schwanz, 2006).

A denominação comum dessas plantas decorre do seu tradicional uso no tratamento de distúrbios digestivos e hepatobiliares. No entanto, apenas *P. boldus*, identificada popularmente como boldo do Chile, é reconhecida cientificamente como boldo verdadeiro, com diversos estudos evidenciando sua atividade farmacológica (Cassels; Fuentes-barros; castro-saavedra, 2018). As outras espécies são popularmente empregadas como substitutas a *P. boldus* (Costa, 2017), tendo em vista que são facilmente cultivadas nos quintais brasileiros, tornando-as mais acessíveis à população economicamente mais carente, uma vez que *P. boldus*, por ser importado do Chile, só pode ser acessada comercialmente.

Nota-se que essas espécies conhecidas por boldo pertencem a famílias distintas, resultando em diferenças no porte e na morfologia das partes vegetativas e reprodutivas. Apesar dessas diferenças, as folhas dessas espécies possuem semelhanças em suas propriedades medicinais de uso tradicional, sendo utilizadas principalmente para tratar enfermidades do sistema digestivo e hepatobiliar (Otero *et al.*, 2022). Essa característica pode ser considerada como a principal razão para a denominação genérica de "boldo" (Santos, 2022).

Além disso, diversos estudos comprovam que essas plantas compartilham outras atividades biológicas, como propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas, antifúngicas e anti-helmínticas (Carvalho *et al.*, 2018; Costa, 2017; Falé *et al.*, 2009).

No que se refere aos principais constituintes químicos ativos, *P. boldus* apresenta como compostos majoritários alcaloides aporfínicos como a boldina; compostos fenólicos, como taninos e catequina (Hosalkova *et al.*, 2015); cumarinas (Fuentes-Barros *et al.*, 2023) e óleos essenciais composto principalmente por monoterpenos (Lopes *et al.*, 2020).

As espécies do gênero *Plectranthus* tem como constituintes majoritários os terpenóides, principalmente os diterpenos, compostos fenólicos (Ishii *et al.*, 2022), óleos essenciais, composto em sua maioria por monoterpenos (Alasbahi; Melzig, 2010).

A espécie *G. amygdalinum* é composta principalmente por flavonoides, taninos, alcaloides terpenóides como as lactonas sesquiterpênicas, saponinas, glicosídeos esteroides e

triterpenóides (Da Silva *et al.*, 2013); óleos essenciais compostos basicamente por monoterpenos e sesquiterpenos (USunobun; Ngozi, 2016).

Um estudo recente revelou que essas espécies de boldo têm em comum uma presença significativa de flavonoides (Da Silva *et al.*, 2022), e tanto o *P. boldus* quanto o *G. amygdalinum* compartilham a presença de taninos e alcaloides em sua composição (Falé *et al.*, 2009; Santos, 2022). A presença desses compostos em comum nas espécies de boldo pode ser um fator relevante para explicar a similaridade das atividades biológicas entre elas, uma vez que são apontados pela literatura científica como eficientes eliminadores de radicais livres (Cassels; Fuentes-Barros; Castro-Saavedra, 2018; Fuentes-Barros *et al.*, 2023; Lara-Fernández; Rodríguez-Herrera; Aguilar, 2013; Quezada *et al.*, 2004; Simirgiotis; Schmeda-Hirschmann, 2010), desempenhando um papel importante no combate à doenças causadas pelo estresse oxidativo das células.

Nesse sentido, a investigação do potencial antioxidante e do teor de fenólicos totais podem indicar a presença desses compostos nas espécies estudadas.

A capacidade terapêutica das espécies de boldo para problemas estomacais e hepáticos está ligada à interação dos constituintes químicos de suas folhas na neurotransmissão colinérgica. A regulação da motilidade intestinal ocorre através da acetilcolina (ACh), cuja diminuição está associada a distúrbios gastrointestinais. A inibição da acetilcolinesterase (AChE) aumenta a disponibilidade de ACh, beneficiando o sistema gastrointestinal. A ACh também está relacionada a funções cognitivas, sendo sua deficiência característica da doença de Alzheimer. A inibição da AChE é uma abordagem investigada para tratar a DA, visando aumentar os níveis de ACh e melhorar a transmissão de sinais em pacientes afetados (Da Silva *et al.*, 2022).

Além disso, estudos revelam que o estresse oxidativo, resultante dos processos da DA, contribuem para a evolução da doença. Portanto, a descoberta de constituintes com propriedades antioxidantes pode ser benéfica para retardar a progressão da doença (Carvalho, 2014; Da Silva *et al.*, 2022).

As diferenças na composição química das espécies de boldo podem levar a outras diferentes respostas biológicas e efeitos colaterais. Dessa forma, é importante que haja a correta identificação de qual espécie está sendo utilizada, bem como se conheçam os compostos presentes nos chás para que seu uso seja feito de forma segura e não prejudicial à saúde humana (Cassels; Fuentes-Barros; Castro-Saavedra, 2018; Schwanz *et al.*, 2008).

Nesse sentido, é essencial conduzir análises químicas para monitorar a qualidade da matéria-prima vegetal, permitindo a detecção de marcadores químicos específicos e a identificação de eventuais substâncias estranha (Schwanz *et al.*, 2008).

Uma das abordagens químicas empregadas na identificação do perfil químico de espécies vegetais é o uso de ferramentas quimiométricas, como PCA e HCA. Essas ferramentas possibilitam o reconhecimento de padrões, agrupando amostras quimicamente semelhantes e destacando marcadores químicos específicos (Silva *et al.*, 2016).

Nesse contexto, a presente pesquisa teve como objetivo identificar o perfil químico de quatro espécies de boldo *P. barbatus*, *P. ornatus*, *G. amygdalinum* e amostras comerciais de *P. boldus* encontradas no município de Manaus e Itacoatiara, avaliando os marcadores químicos das amostras comercializadas como boldo verdadeiro, além de investigar a potencial atividade antioxidante frente ao DPPH e o teor de fenólicos totais nas amostras obtidas.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e Preparação da amostra

As folhas das espécies adultas de *P. barbatus*, *P. ornatus*, *G. amygdalinum* foram coletados em diferentes bairros do município de Itacoatiara, Amazonas, em agosto de 2022. Folhas secas de *P. boldus*, comercializadas como boldo do Chile, foram obtidas em diferentes pontos comerciais das cidades de Itacoatiara e Manaus (Tabela 1).

Tabela 3 - Código das amostras de boldo *in natura* e amostras comerciais de *P. boldus*

Código da espécie	Especificação	Local de origem	Dados geográficos	Nº de Registro Herbário
CPB - 1	<i>P. boldus</i> seco	Boldo do Chile – marca I Supermercado 1 - Itacoatiara	-3.1406098403185125, -58.4421831441846	-
CPB - 2	<i>P. boldus</i> seco	Boldo do Chile - marca II Supermercado 1 - Itacoatiara	-3.1406098403185125, -58.4421831441846	-
CPB - 3	<i>P. boldus</i> seco	Boldo do Chile – marca I Supermercado 1 - Itacoatiara	-3.1406098403185125, -58.4421831441846	-
CPB - 4	<i>P. boldus</i> seco	Boldo do Chile – Mercado municipal de Itacoatiara	-3.1362390404186637, -58.439458019833644	-
CPB - 5	<i>P. boldus</i> seco	Boldo do Chile – Mercadinho III - Manaus.	-3.1397676676999287, -60.02218561327861	-
CPB - 6	<i>P. boldus</i> seco	Boldo do Chile– Mercado municipal Adolpho Lisboa - Manaus	-3.1401533259354224, -60.020490457207046	-
CPBa	<i>P. barbatus in natura</i>	Bairro Tiradentes - Itacoatiara	-3.1427294165778417, -58.431567060542754	4467
CPO	<i>P. ornatus in natura</i>	Bairro São Jorge - Itacoatiara	-3.142857150311584, - 58.43725266654359	4395
CGA	<i>G. amygdalinum in natura</i>	Bairro Tiradentes - Itacoatiara	-3.1427294165778417, -58.431567060542754	4391

Extratos aquosos das espécies selecionadas foram preparadas metodologia descrita a seguir:

10 g das folhas secas de *P. boldus*, triturada manualmente, foram adicionadas a 250 mL de água fervida a 100°C, obtendo-se o chá. A solução foi fechada e deixada em repouso por 10 minutos. Após isso, os chás foram filtrados, guardados em frascos de vidro devidamente identificados, congelados, e posteriormente, liofilizados. Para as amostras *in natura* de *P.*

barbatus, *P. ornatos*, *G. amygdalinum* foram utilizadas 100,00 g das folhas frescas para 400 mL de água destilada fervida a 100°C, ficando em repouso por 10 minutos. Após filtração as soluções foram congeladas e liofilizadas. Todas as amostras foram codificadas como mostra a Tabela 1.

Análise por ESI-MS e tratamento quimiométrico dos dados

Os espectros foram obtidos em um espectrômetro de massa com ionização electrospray e analisador ion trap (modelo LCQ Fleet, Thermo Scientific) operando nos modos positivo e negativo. Foram preparadas soluções dos extratos liofilizados com metanol na concentração de 1mg/mL e analisados por infusão direta no espectrômetro de massa. As condições utilizadas do aparelho foram: sheath gas flow rate -9 psi; auxiliary gas flow rate -3 psi; sweep gas flow rate -0 psi; spray voltage -5 KV; capillary temp -260°C; capillary voltage -26 V; tube lens -120. Os espectros foram adquiridos e processados através do software Xcalibur® versão 2.7 (Thermo Scientific). - 1). Os espectros de EM/EM foram obtidos através de dissociação induzida por colisão (CID) utilizando-se argônio como gás de colisão e energias de colisão variando entre 30 a 35 eV.

Os dados gerados pelo ESI-MS dos extratos de todas as espécies foram tabulados no Excel® em uma matriz linhas x colunas. A matriz resultante foi analisada através do software Chemoface, versão 1.6.1. A análise de componentes principais (PCA) foi calculada através da variação dos íons registrados (variáveis) e a análise hierárquica de cluster (HCA), por sua vez, foi obtida através da distância euclidiana e média de ligação de três componentes principais (Da Silva et al., 2016).

Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi inferida através da capacidade dos compostos presentes nas amostras em sequestrar o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Foi preparada uma solução metanólica de DPPH a 0,039 mg/mL de modo que apresentasse a absorbância em 515nm, R2 = 0,99. As determinações foram realizadas por meio da adição de 3.900 µL da solução de DPPH em 100 µL de metanol para controle, ou o mesmo volume para as amostras dos extratos (1 mg/ml) seguida de sua incubação em ambiente escuro por 30 minutos. Posteriormente, foi realizada a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro a 515 nm (Bel photonics, uv-m51).

A concentração de DPPH• no meio de reação foi calculada conforme a curva de calibração obtida por regressão linear através de uma série de concentrações (100 a 1500 µM)

de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico (Trolox), o padrão, acrescida da solução de DPPH. A equação obtida foi $y = -0,0006x + 0,923$ $R^2 = 0,9999$ e os resultados foram expressos em μM de Equivalentes de Trolox.

Teor de fenólicos totais

A determinação do teor de fenóis totais (FT) foi realizada utilizando o método de Folin-Ciocalteu, onde a amostra (2mg/mL) foi adicionada a mistura reacional (1:1) do reagente de Folin-Ciocalteu e bicarbonato de sódio, a qual foi mantida no escuro por 90 min para posterior leitura de absorbância em espectrofotômetro a 725 nm. O padrão utilizado foi o ácido gálico e os resultados expressos em miliequivalentes de ácido gálico por grama de amostra.

RESULTADOS

Caracterização do perfil químico das amostras comerciais de *P. boldus* e *in natura* *P. barbatus*, *P. ornatus*, *G. amygdalinum*

A análise do perfil químico por infusão direta no espectrômetro de massas, permitiu comparar os perfis químicos das amostras comercializadas como *P. boldus* (Figura 3), e das amostras *in natura* das espécies *G. amygdalinum*, *P. barbatus* e *P. ornatus* Figura 2.

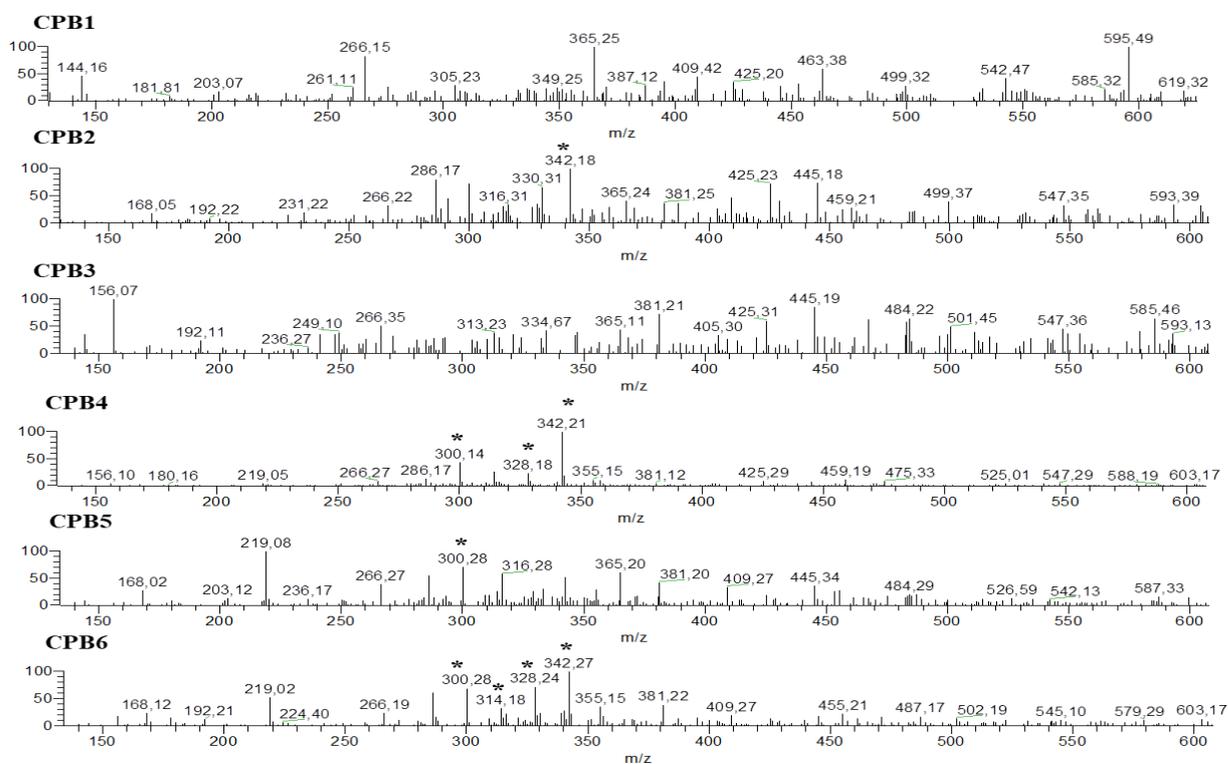


Figura 3. Espectro de massas no modo positivo em fonte ESI de amostras *P. boldus*.

Na análise do espectro de íons totais, modo positivo, foi observado nas amostras comerciais de *P. boldus* CPB2, CPB4 e CPB6 o íon molecular m/z 342 em maior intensidade. Na amostra CPB5 o íon m/z 300 foi detectado em alta intensidade. Esses íons são sugestivos de alcaloides, já reportados na literatura como um dos principais constituintes das folhas de *P. boldus*. Já as amostras CPB1 e CPB3 apresentaram um perfil químico diferente quando comparadas com as demais amostras, Figura 1, tendo os íons m/z 365 e 445 em maior intensidade.

Foi realizado a fragmentação sequencial (EM/EM) dos íons moleculares presentes nas amostras CPB2, CPB4, CPB5 e CPB6. Os dados da fragmentação foram analisados na tentativa de caracterizar essas moléculas Figura 2.

O espectro de EM/EM do íon m/z 342 apresentou íons fragmentos de m/z 311, 296, 279 e 248, evidenciando perdas sequenciais de 31, 15, 17 e 31 Da, sugerindo uma estrutura aporfínica contendo *N*-metil e metoxila adjacentes no anel A, sendo consistente com alcaloide *N*-Metil-laurotetanina, reportado na literatura como um dos constituintes de *P. boldus* (Falé et al., 2012; Torres-Vega et al., 2020).

O íon de m/z 300 produziu os íons fragmentos MS/MS a m/z 269, 237, 209, 192, 175, 145, 137, 107, com perdas sequenciais de 31, 32, correspondente às perdas de CH_3NH_2 e CH_3OH , compatíveis com o padrão de fragmentação do alcaloide *N*-metil-coclaurina Figura 2A (Da Silva et al., 2022; Falé et al., 2012; Torres-Vega et al., 2020).

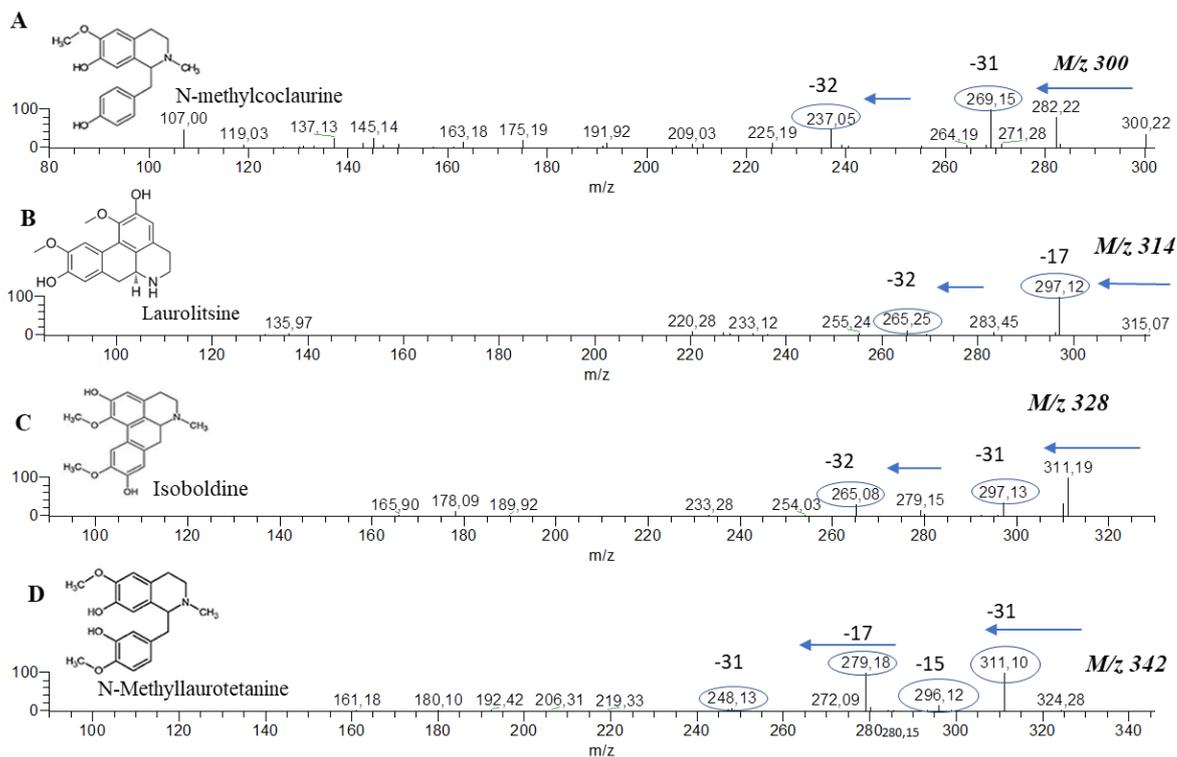


Figura 4 Espectro de EM/EM dos íons de m/z 300 (A), 314 (B), 328 (C) e 342 (D). Os íons circutados em azul indicam íons fragmentos previamente descritos na literatura para os alcaloides *N*-metil-coclaurina (A), Laurolitsina (B), Isoboldina (C) e *N*-Metil-laurotetanina (D).

Outros íons de menor intensidade também foram observados nessas quatro amostras, como o íon molecular em m/z 328 que obteve fragmentação em m/z 297, sugerindo perda de 31 Da, referente a massa de CH_3NH_2 e o íon fragmento em m/z 265 correspondente à perda de 32 Da, sugerindo perda sequencial de dois radicais metil. O alcaloide proposto na literatura para este espectro é a isoboldina (Fale *et al.*, 2012; Torres-Vega *et al.*, 2020).

Já o íon precursor em m/z 314, apresentou um íon fragmento em m/z 297, indicando a perda de 17 Da (NH_3), em m/z 265 sugerindo perda sequencial de dois radicais metila, 32 Da. Esse padrão de fragmentação é identificado na literatura como laurolitsina Figura 2, Tabela 2.

A amostra CPB6 de *P. boldus* foi escolhida para a realização da comparação do perfil químico de *P. boldus* com as demais espécies *in natura* Figura 3, uma vez que apresentou os íons m/z 300, 328, 342, Figura 3 A, considerados marcadores químicos dessa espécie Figura 2, Tabela 4, sendo possível a identificação na literatura como alcaloides constituintes da espécie *P. boldus*.

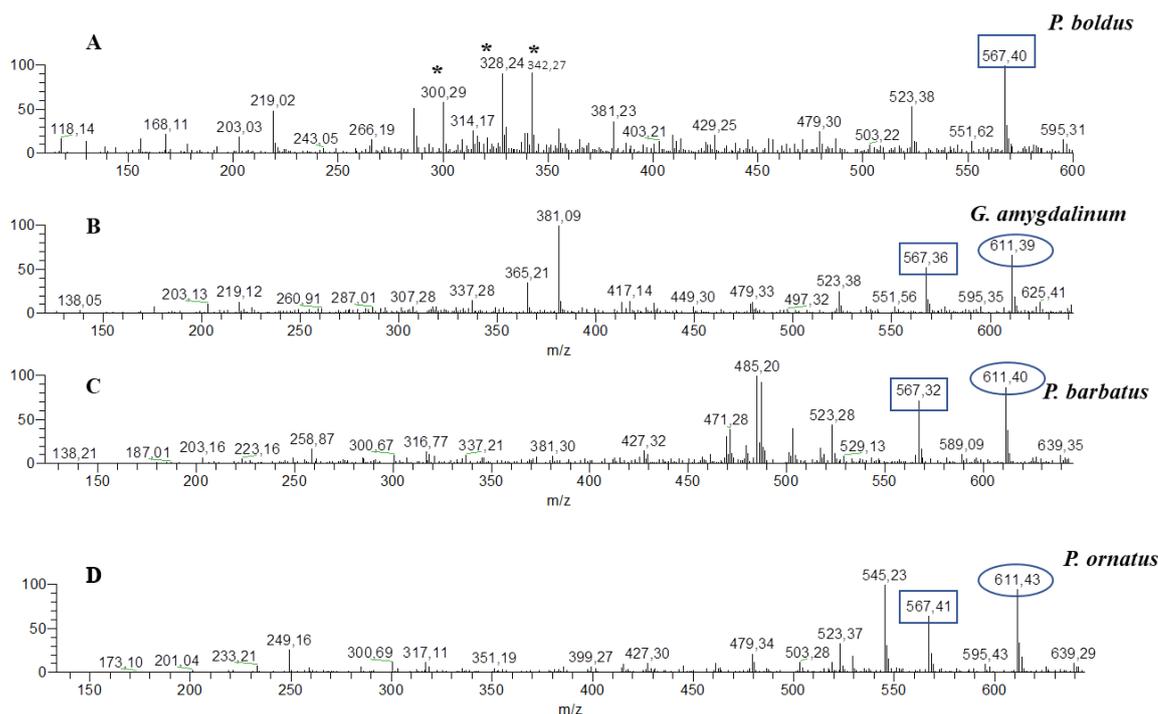


Figura 5 Espectro de massas no modo positivo em fonte ESI de *P. boldus* (A), *G. amygdalinum* (B), *P. barbatus* (C) e *P. ornatus* (D). O * denota os íons que foram fragmentados. Os íons em círculo azul indicam o íon m/z 611 presente nas amostras B, C e D. O quadrado azul indica o íon m/z 567 presentes em todas as amostras.

O espectro de massas no modo positivo em fonte ESI de *P. boldus*, *G. amygdalinum*, *P. barbatus* e *P. ornatus* evidencia diferentes perfis químicos para as quatro espécies de boldo Figura 3. Para amostra de *P. boldus* Figura 3A, foi observado o íon m/z 342 e 328 como íons de maior intensidade, enquanto que para *G. amygdalinum*, *P. barbatus* e *P. ornatus* foi observado os íons m/z 381, 485 e 545, respectivamente.

Por outro lado, observa-se a presença em comum de alguns íons de menor intensidade nas amostras de boldo, como o íon m/z 611 presente nas três amostras *in natura* de *G. amygdalinum*, *P. barbatus* e *P. ornatus*, e o íon m/z 567, presente nas quatro amostras Figura 3A, B, C e D, revelando uma pequena similaridade química entre essas espécies.

Tabela 4. Alcaloides identificados no extrato de *P. boldus*. * Denota o pico base.

Amostras	m/z precursor Íon	Íons fragmentados	Identificação	Formula molecular	Referência
CPB2, CPB4, CPB5 CPB6	300	269, 237, 209, 192,175,145,1 37, 107	<i>N</i> -metil- coclaurina	$C_{18}H_{21}NO_3$	Da Silva <i>et al.</i> , 2022; Falé <i>et al.</i> , 2012; Torres-Vega <i>et al.</i> , 2020.

CPB3, CPB5, CPB6, CPB2, CPB1	328	297, 265, 165	Isoboldina	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	Da Silva <i>et al.</i> , 2022; Falé <i>et al.</i> , 2012; Torres-Vega <i>et al.</i> , 2020.
CPB2* CPB4* CPB6* CPB5*	342	311, 296, 280, 279, 267	N-Metil- laurotetanina	C ₂₀ H ₂₃ NO ₄	Falé <i>et al.</i> , 2012; Torres-Vega <i>et al.</i> , 2020
CPB2, CPB5, CPB6	314	297, 265	Lauroitsina	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	Da Silva <i>et al.</i> , 2022; Torres-Vega <i>et al.</i> , 2020.

A análise dos dados do perfil químico através das ferramentas quimiométricas PCA e HCA, permitiu reunir as amostras quimicamente semelhantes entre si em grupos Figura 4 e 5.

No gráfico de escore de PCA (Figura 4A), foi observada a formação de três grupos principais, sendo o grupo I constituído pela amostra comercial CPB1 (*P. boldus*), o grupo II pela amostra CPB3 (*P. boldus*) e o grupo III formado pelas amostras CPB2, CPB4, CPB5, CPB6 (amostras comerciais de *P. boldus*) e amostras naturais CPBa, CPO, CGA, (*P. barbatus*, *P. ornatus*, *G. amygdalinum*, respectivamente).

De acordo com o gráfico biplot de PCA (Figura 4B), os íons *m/z* 708, 352 e 139 foram os principais responsáveis pela segregação do grupo I e o íon *m/z* 468 foi responsável pela discriminação do grupo II.

A segregação das amostras CPB1 e CPB3 nos grupos I e II, indicando grande variabilidade química quando comparadas com as outras amostras de *P. boldus*, está em concordância com os resultados obtidos no espectrômetro de massas (Figura 1), que detectou uma discrepância no perfil químico dessas amostras, sugerindo que elas não pertencem à espécie *P. boldus*.

Do outro lado, os íons *m/z* 611 e 567 podem ter sido os principais responsáveis pelo agrupamento das amostras CPB2, CPB4, CPB5, CPB6 (amostras comerciais de *P. boldus*) e amostras naturais CPBa, CPO, CGA (*P. barbatus*, *P. ornatus*, *G. amygdalinum*) no grupo III Figura 4B, uma vez que esses íons estão presentes em todas as amostras, conforme pode ser observado na Figura 1. No entanto, não foi possível a fragmentação e identificação desses íons.

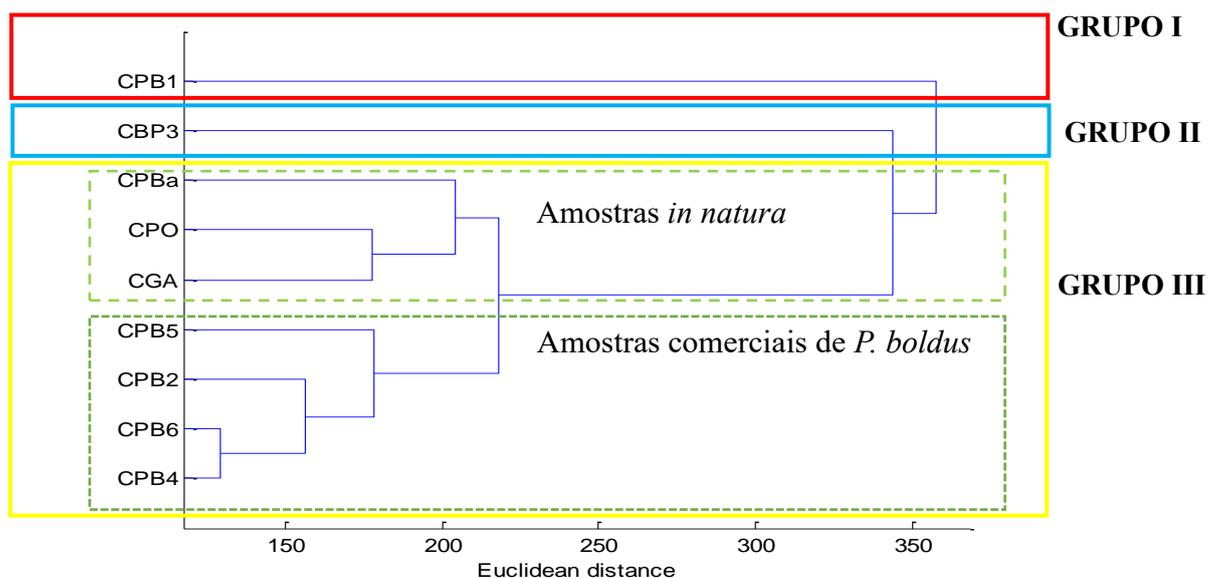


Figura 7 Dendrograma de HCA das amostras comerciais de *P. boldus* (CPB1,2,3,4,5 e 6) coletadas em diferentes estabelecimentos comerciais e *in natura* de *P. barbatus*, *P. ornatus*, *G. amygdalinum* (CPBa, CPO, CGA).

Conteúdos de fenólicos totais e atividade antioxidante

Os resultados do conteúdo de fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante dos extratos aquosos das amostras comerciais de *P. boldus* (CPB2, CPB4, CPB5 e CPB6) e *in natura* *P. barbatus*, *P. ornatus*, *G. amygdalinum* (CPBa, CPO, CGA) encontram-se apresentados na Tabela 3.

Por meio do método de Folin-Ciocalteu foi possível observar que dentre as amostras comerciais de *P. boldus*, a CPB6, apresentou maior teor de compostos fenólicos (305,32 mg EAG/g) quando comparado com as outras amostras comerciais Tabela 3.

Além disso, todas as demais amostras comerciais de *P. boldus*, apresentaram conteúdo fenólico total maiores que as amostras *in natura* *P. barbatus*, *P. ornatus*, *G. amygdalinum* ($167,71 \pm 1,1$ mg EAG/g, $88,05 \pm 1,2$ mg EAG/g, $161,67 \pm 4,8$ mg EAG/g) como pode ser visto na Tabela 3, e maiores que uma amostra de extrato aquoso de *P. boldus* investigado em um estudo de Da Silva et al., (2022), o qual obtiveram 82.4 mg EAG/g.

Tabela 5. Conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos aquosos de espécies de boldo.

Espécie	Amostras	CFT (mg EAG/g)*	DPPH (μ M ET)**
<i>P. boldus</i>	CPB6	305,32 \pm 2,4	1073,33 \pm 2,35
	CPB4	223,91 \pm 0,8	1039,11 \pm 88
	CBP2	219,09 \pm 0,5	1068,33 \pm 12,58
	CPB5	173,53 \pm 1,7	1024,16 \pm 1,17
<i>G. amygdalinum</i>	CGA	161,67 \pm 4,8	457,22 \pm 13,47
<i>P. ornatus</i>	CPO	88,05 \pm 1,2	187,22 \pm 34,25
<i>P. barbatus</i>	CPBA	167,71 \pm 1,1	745,83 \pm 24,74

* miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra.

**microlitro de Equivalentes de Trolox

Através do ensaio de DPPH foi possível observar maior potencial antioxidante nas amostras de *P. boldus* (1024,16 \pm 1,17 a 1073,33 \pm 2,35 μ M ET) Tabela 3. Dentre as amostra *in natura*, a *P. barbatus* apresentou maior atividade antioxidante (745,83 \pm 24,74 μ M ET) e a *P. ornatus* apresentou menor atividade antioxidante (187,22 \pm 34,25 μ M ET).

Em relação a espécie *G. amygdalinum*, observou-se que o teor de fenólicos totais (161,67 \pm 4,8 EAG g⁻¹) e atividade antioxidante (457,22 \pm 13,47 DPPH μ M ET) foram maiores que as observadas para *P. ornatus* Tabela 3.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na análise por EM, no modo positivo, sugerem que as amostras comercializadas como “boldo do Chile”, codificadas como CPB2, CPB4, CPB5, CPB6, são legítimas da espécie *P. boldus*, uma vez que foram identificados alcaloides como a *N*-Metil-laurotetanina e a laurotetanina apontados na literatura, como sendo marcadores químicos característicos dessa espécie (Cassels; Fuentes-Barros; Castro-Saavedra, 2018), e sua presença ou ausência possibilita inferir sobre sua autenticidade. No entanto, as amostras CPB1 e CPB3 não apresentaram a presença desses alcaloides, podendo ser resultado de problemas relacionados a qualidade da amostra, dificultando assim sua identificação.

Um estudo recente demonstrou, por meio de cromatografia líquida de ultra eficiência no espectrômetro de massas em tandem (UHPLC-MS/MS), que boldina não é o principal alcaloide na folha, como se achava que era, mas sim *N*-metil-laurotetanina e laurotetanina (Salehi *et al.*, 2021). De forma geral, as farmacopeias indicam os alcaloides como um dos

compostos principais que determinam a identidade e a qualidade das folhas do *P. boldus* (Costa, 2017).

No que se refere a identificação das amostras *in natura*, não foi possível obter a fragmentação dos íons obtidos no espectrômetro de massas, modo positivo. Isso pode estar relacionado ao fato de essas espécies terem como constituintes majoritários os compostos fenólicos, sendo necessário análise futura no modo negativo.

Na análise quimiométrica, observou-se que as quatro espécies de boldo analisadas nessa pesquisa, apresentaram relativa similaridade química entre si, o que pode explicar algumas das propriedades medicinais compartilhadas entre essas espécies, bem como a mesma denominação popular. Esses resultados estão de acordo com os dados obtidos no espectro de massas, que revelou pequena similaridade química entre as quatro espécies de boldo estudadas nesse trabalho Figura 3.

A similaridade química observada no HCA, entre as espécies *G. amygdalinum* e *P. ornatus*, já foi apontado em uma pesquisa fitoquímica, onde foi identificado que essas duas espécies de boldo têm em comum uma presença significativa de flavonoides em sua composição (Santos, 2022).

A presença de alto teor compostos fenólicos, como os flavonoides nas espécies de boldo, pode ser explicada a partir de uma perspectiva ecológica, uma vez que são plantas que habitam locais de alta incidência solar, e a presença de flavonoides está relacionada à proteção contra os danos causados pelos raios ultravioleta. *P. boldus* ao contrário das outras espécies, não é originária da África, mas sim do continente Sul Americano, onde habita em um ambiente caracterizado por significativas variações ambientais e alta exposição às irradiações UV (Santos, 2022).

Além disso, as espécies *in natura* investigadas nesse estudo, foram cultivadas no estado Amazonas, cuja localização por ser próxima à linha do equador, recebe o ano inteiro alta incidência solar, o que pode contribuir para nível da concentração de flavonóides.

Os compostos fenólicos têm sido extensivamente estudados em todo o mundo, principalmente devido às suas propriedades antioxidantes.

Em uma revisão sistemática realizada por (Cassels; Fuentes-Barros; Castro-Saavedra, 2018), observou-se que nos últimos anos, as pesquisas têm estudado *P. boldus* como uma valiosa fonte de compostos fenólicos com potencial atividade antioxidante, sendo identificado catequinas, epicatequinas e procianidinas.

Em uma investigação realizada por (Quezada et al., 2004) a atividade antioxidante dos extratos da folha de *P. boldus* foi atribuída principalmente à fração flavonoide (44,1%) seguida da fração alcaloide (15,6%), sendo a catequina e a boldina as principais responsáveis pela atividade antioxidante dessas 2 frações (60,9% e 35,6% de a atividade total, respectivamente), bem como nos estudos realizados por (Lara-Fernández; Rodríguez-Herrera; Aguilar, 2013).

Os resultados dessas pesquisas sugerem que as propriedades medicinais relatadas para o uso popular do chá de *P. boldus* devem ser atribuídas não apenas à presença dos alcaloides como a boldina, mas também a vários compostos fenólicos com conhecida atividade antioxidante (SimirgiotiS; Schmeda-Hirschmann, 2010).

Na presente pesquisa, ao analisar a relação entre a capacidade de sequestrar os radicais livres DPPH e o teor de fenólicos totais (Figura 8), observa-se que a alta atividade antioxidante apresentada pelas amostras *P. boldus* (Tabela 3), não se correlaciona diretamente com o teor de fenólicos totais. Isso é evidenciado pelo fato de que o valor da atividade inibitória permanece constante, mesmo com a variação no teor de fenólicos totais nas amostras CPB2, CPB4, CPB5 E CPB6.

Os resultados dessa pesquisa sugerem que o alto potencial antioxidante observado nas amostras de *P. boldus* é resultado tanto da presença de alcaloides quanto de compostos fenólicos, corroborando com a literatura.

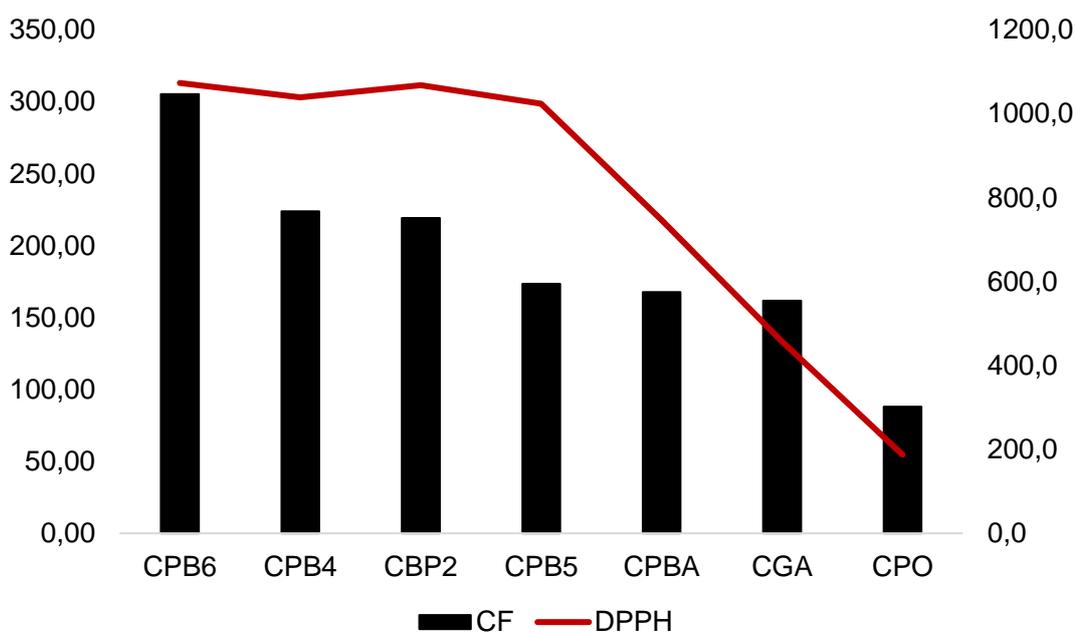


Figura 8 Relação entre Conteúdos fenólicos totais e capacidade de eliminação do DPPH

Em contrapartida, a atividade antioxidante dos extratos aquosos das espécies do gênero *Plectranthus*, *P. barbatus*, *P. ornatus* (CPBa, CPO) (Figura 6), (Tabela 3), apresentou correlação direta com o teor de fenólicos totais Figura 6, onde os valores do potencial de eliminação dos radicais livres variaram de acordo o teor dos compostos fenólicos.

Vários autores sugerem que a capacidade sequestradora de radicais livres do DPPH de *P. barbatus* está relacionada principalmente à presença de altos níveis de fenólicos. Muitos estudos apontam que constituintes fenólicos como flavonoides, ácidos, ésteres, fenilpropanóides e diterpenos podem contribuir para as atividades antioxidantes encontradas nas espécies do gênero *Plectranthus*. Dentre os constituintes fenólicos, à presença de ácido rosmarínico é atribuído a atividade antioxidante encontradas na família Lamiaceae (Falé *et al.*, 2009; Ganash; Qanash, 2018; Mendonça *et al.*, 2023).

Resultados similares ao da presente pesquisa, também foram observados para um extrato etanólico das folhas de *G. amygdalinum*, em um estudo realizado por (Da Silva *et al.*, 2013), onde constatou-se a presença de efeito antioxidante, sendo atribuído aos flavonoides, apigenina e luteolina.

Em outro estudo realizado por (Carvalho, 2014), a preparação por decocção do "chá" das folhas de *G. amygdalinum* apresentou alta atividade antioxidante, com um valor EC50 de $20,0 \pm 0,6$ $\mu\text{g/mL}$. Os principais compostos identificados e quantificados neste extrato, por meio de HPLC e espectrometria de massa, foram os ácidos monocateoilquínicos, como o ácido clorogênico, e os dicafeoilquínicos, como a cinarina. A esses fenólicos os autores atribuíram as atividades de todo o extrato.

Nesse contexto, a presente pesquisa atribui a atividade antioxidante observada na amostra, à presença de diversas espécies de compostos fenólicos presentes nas infusões das folhas de *G. amygdalinum*. No entanto, como apontaram alguns autores, é necessário investigações futuras a respeito da contribuição de outros compostos presentes nas folhas dessa espécie já identificadas em estudos fitoquímicos na literatura, como saponinas, alcalóides, taninos, terpenos, bem como vários tipos de lactonas sesquiterpênicas (Ruth *et al.*, 2020).

CONCLUSÃO

A análise do perfil químico das folhas secas comercializadas como *P. boldus*, sugerem que as amostras codificadas como CPB2, CPB4, CPB5 e CPB6 são autênticas, uma vez que contêm alcaloides característicos da espécie, como a *N*-Metil-laurotetanina e a laurotetanina.

Contudo, as amostras CPB1 e CPB3 apresentaram um perfil químico diferente, impossibilitando identifica-las como pertencentes à espécie *P. boldus*.

Os resultados deste estudo indicam que as espécies de boldo analisadas compartilham uma presença significativa de vários compostos fenólicos, possivelmente contribuindo para a atividade antioxidante observada, o que pode explicar algumas propriedades medicinais comuns entre essas espécies, bem como a mesma denominação popular. Além disso, as amostras da espécie *P. boldus*, apresentaram atividades antioxidantes superiores em relação as espécie *in natura*, e dessa forma, devem proporcionar maiores benefícios terapêuticos no tratamento de condições ligadas ao estresse oxidativo.

Portanto, este estudo contribui para o conhecimento químico e biológico dessas espécies, o que é fundamental para garantir a segurança e eficácia no uso do chá de boldo, bem como para o desenvolvimento de novos medicamentos.

Estudos futuros são necessários para identificar outras classes de metabólitos que provavelmente contribuem para a atividade antioxidante presente nas espécies de boldo *in natura*, bem como para outras atividades biológicas compartilhadas, como o potencial anticolinesterásico, e o papel da atividade antioxidante na proteção dos neurônios dos processos oxidativos gerados pela doença de Alzheimer.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALASBAHI, R. H.; MELZIG, M. F. *Plectranthus barbatus*: A review of phytochemistry, ethnobotanical uses and pharmacology part 2. *Planta Medica*, v. 76, n. 8, p. 753–765, 2010. Disponível em: DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0029-1240898>. Acesso em 15/07/2023
- CARVALHO, R. S. et al. Antibacterial and antifungal activities of phenolic compound-enriched ethyl acetate fraction from *Cochlospermum regium* (mart. Et. Schr.) Pilger roots: Mechanisms of action and synergism with tannin and gallic acid. *South African Journal Of Botany*, v. 114, p. 181–187, jan. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.11.010>. Acesso em 16/07/2023
- CASSELS, B. K.; FUENTES-BARROS, G.; CASTRO-SAAVEDRA, S. Boldo, Its Secondary Metabolites and their Derivatives. *Current Traditional Medicine*, v. 5, n. 1, p. 31–65, 3 jun. 2019. <http://dx.doi.org/10.2174/2215083804666181113112928>. Acesso em 15/07/2023
- COSTA, F. H. M. *Caracterização da composição química de extratos de boldos in natura e produtos comerciais derivados do boldo*. 2017. UFVJM, 2017. Disponível em: <http://acervo.ufvjm.edu.br/jspui/bitstream/1/1590/1/>. Acesso em 15/07/2023
- DA SILVA, B. Y. K. et al. Chemical and Biological Evaluation of the Aqueous Extract of *Peumus boldus* Molina (Monimiaceae) Leaves. *Pharmacognosy Research*, v. 14, n. 1, 2022. Disponível em <http://dx.doi.org/10.5530/pres.14.1.8>. Acesso em 15/010/2022
- DA SILVA, J. B. et al. *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae): A promising source of antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2013, 2013.
- FALÉ, P. L. et al. Rosmarinic acid, scutellarein 4'-methyl ether 7-O-glucuronide and (16S)-coleon E are the main compounds responsible for the antiacetylcholinesterase and antioxidant activity in herbal tea of *Plectranthus barbatus* (“falso boldo”). *Food Chemistry*, v. 114, n. 3, p. 798–805, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.015>. Acesso em 15/07/2023
- FALÉ, P. L. et al. Acetylcholinesterase inhibition, antioxidant activity and toxicity of *Peumus boldus* water extracts on HeLa and Caco-2 cell lines. *Food and Chemical Toxicology*, v. 50, n. 8, p. 2656–2662, ago. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22617353/>. Acesso em: 29 jun. 2023.
- FUENTES-BARROS, G. et al. Variation of the alkaloid content of *Peumus boldus* (boldo). *Fitoterapia*, v. 127, p. 179–185, jun. 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0367326X17318300>. Acesso em 11 jul. 2023.
- FUENTES-BARROS, G. et al. Phytochemical variation of wild and farmed populations of

boldo (*Peumus boldus* Molina). *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, v. 35, p. 100502, 3 maio 2023. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214786123000463>>. Acesso em: 11 jul. 2023.

GANASH, M.; QANASH, S. Phenolic Acids and Biological Activities of *Coleus forskohlii* and *Plectranthus barbatus* as Traditional Medicinal Plants. *International Journal of Pharmacology*, v. 14, n. 6, p. 856–865, 1 ago. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3923/ijp.2018.856.865>. Acesso em 15 ago. 2023.

HOSALKOVA, A. et al. Alkaloids from *peumus boldus* and their acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and prolyl oligopeptidase inhibition activity. *Natural Product Communications*, v. 10, n. 4, p. 577–580, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1934578X1501000410>. Acesso em: 11 jul. 2023.

ISHII, T. et al. Two New Abietane Diterpenoids from *Plectranthus barbatus*. *Chemistry of Natural Compounds*, v. 58, n. 3, p. 474–477, 2022. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s10600-022-03712-y>. Acesso em: 11 jul. 2023.

LARA-FERNÁNDEZ, L.; RODRÍGUEZ-HERRERA, R.; AGUILAR, C. N. Separation Conditions and Evaluation of Antioxidant Properties of Boldo (*Peumus Boldus*) Extracts. *Journal of Medicinal Plant Research*, v. 7, n. 15, p. 911–917, 2013. Disponível em: DOI 10.5897/JMPR13.2562. Acesso em: 11 jul. 2023.

LOPES, A. et al. Chemical Composition and Biological Activities of the Essential Oil of *Peumus boldus* Molina (Monimiaceae). *Revista Virtual de Química*, v. 12, n. 2, p. 433–446, 2020. Disponível em: <<http://static.sites.s bq.org.br/rvq.s bq.org.br/pdf/v12n2a14.pdf>>. Acesso em: 15 jul. 2022.

MENDONÇA, S. C. et al. Biological screening of herbal extracts and essential oil from *Plectranthus* species: α -amylase and 5-lipoxygenase inhibition and antioxidant and anti-*Candida* potentials. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 59, p. 1–16, 2023. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-82502023000100330&tlng=en>. Acesso em: 11 jul. 2023.

OTERO, C. et al. Biochemical characterization of *Peumus boldus* fruits: Insights of its antioxidant properties through a theoretical approach. *Food Chemistry*, v. 370, p. 131012, fev. 2022b. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814621020185>>. Acesso em: 11 jul. 2023.

QUEZADA, N. et al. Antioxidant activity of crude extract, alkaloid fraction, and flavonoid fraction from boldo (*Peumus boldus* Molina) leaves. *Journal of Food Science*, v. 69, n. 5, p.

371–376, 2004. Acesso em: 21 mai. 2023.

RUTH, O. et al. Phytochemical and Antibacterial Activities of Vernonia Amygdalina Leaves (Bitter Leaf) on two Drug Resistant Bacteria. *International Journal of Research Studies in Microbiology and Biotechnology*, v. 6, n. 1, p. 80–96, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.20431/2454-9428.0603004>. Acesso em: 21 mai. 2023.

SALEHI, B. et al. Ethnopharmacology, Phytochemistry and Biological Activities of Native Chilean Plants. *Current pharmaceutical design*, v. 27, n. 7, p. 953–970, 25 nov. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33234091/>>. Acesso em: 8 set. 2022.

SANTOS, L. P. dos. *Estudo Farmacognóstico Das Folhas De Cinco Plantas Mediciniais Denominadas Por Boldo*. 2022. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2022. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11422/16663>. Acesso em: 8 set. 2022.

SCHWANZ, M. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL FACULDADE DE FARMÁCIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS *Desenvolvimento e Validação de Método Analítico para Quantificação da Boldina*. Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e, 2006. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/7683>. Acesso em: 8 set. 2022.

SCHWANZ, M. et al. Caracterização Farmacobotânica de Peumus boldus (Monimiaceae) e Avaliação de Atividades Biológicas do Alcalóide Boldina. v. 27, n. 6, p. 871–879, 2008. Disponível em: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/7704>. Acesso em: 8 set. 2022.

SILVA, F. M. A. et al. Chemotaxonomy of the Amazonian Unonopsis species based on leaf alkaloid fingerprint direct infusion ESI-MS and chemometric analysis. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 27(3), p. 599-604, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150296>. Acesso em: 8 set. 2023.

SILVA, F. M. A. et al. Chemical constituents from Salacia impressifolia (Miers) A. C. Smith collected at the Amazon rainforest. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 68, p. 77–80, out. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030519781630165X>>. Acesso em: 8 out 2023.

SIMIRGIOTIS, M. J.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Direct identification of phenolic constituents in Boldo Folium (Peumus boldus Mol.) infusions by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, n. 4, p. 443–449, 22 jan. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.014>. Acesso em: 8 set. 2022.

SOTO, C. et al. Effect of extraction conditions on total phenolic content and antioxidant

capacity of pretreated wild *Peumus boldus* leaves from Chile. *Food and Bioproducts Processing*, v. 92, n. 3, p. 328–333, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.06.002>. Acesso em: 8 set. 2022.

SPEISKY, H.; CASSELS, B. K. Boldo and boldine: an emerging case of natural drug development. *Pharmacological Research*, v. 29, n. 1, p. 1–12, 1 jan. 1994. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/1043-6618\(94\)80093-6](https://doi.org/10.1016/1043-6618(94)80093-6). Acesso em: 8 set. 2022.

TORRES-VEGA, J. et al. Green extraction of alkaloids and polyphenols from *peumus boldus* leaves with natural deep eutectic solvents and profiling by HPLC-PDA-IT-MS/MS and HPLC-QTOF-MS/MS. *Plants*, v. 9, n. 2, p. 1–17, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/plants9020242>. Acesso em: 10 ago. 2022.

USUNOBUN, U.; NGOZI, O. Phytochemical analysis and proximate composition of *Vernonia amygdalina*. *International Journal of Scientific World*, v. 4, n. 1, p. 11, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.14419/ijsw.v4i1.5845>. Acesso em: 10 ago. 2023.

CAPÍTULO III

Composição química e potencial biológico de espécies de Boldo

Josiele Viana Gomes¹; Ívina Thayná Miranda Trindade¹; Rafaela Rolim da Silva¹; Maiara de Souza Nunes Ávila¹; Felipe Moura Araujo da Silva²; Dominique Fernandes de Moura do Carmo¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos – PPGCTRA/ Instituto de Ciências exatas e tecnologia- ICET, Universidade federal do Amazonas – UFAM

²Programa de Pós-graduação em Química-PPQ/ Universidade federal do Amazonas – UFAM

RESUMO

O termo "boldo" é comumente usado para se referir a várias espécies de plantas, como *P. barbatus*, *P. ornatus*, *G. amygdalinum* e *P. boldus*, todas empregadas popularmente no tratamento de distúrbios digestivos. Essas espécies possuem diversas atividades biológicas, como antioxidantes, antimicrobianas e alelopáticas. O presente estudo teve como objetivo identificar o perfil químico, potencial antioxidante, alelopático e antifúngico dos extratos obtidos por infusão das folhas das referidas espécies. A análise química foi realizada por espectrometria de massas (APCI-MS), a atividade antioxidante foi avaliada frente ao radical DPPH e ABTS⁺, a antifúngica frente a *Candida albicans* e a alelopática sobre sementes de alface. A análise por APCI-MS identificou compostos fenólicos em todas as amostras. Em relação as atividades biológicas, a espécie de *P. boldus* apresentou a maior capacidade antioxidante frente aos radicais ABTS e DPPH e maior atividade alelopática. Em contrapartida, todas as amostras apresentaram atividade antifúngica fraca sobre a *C. albicans*. Esses resultados sugerem que *P. boldus* pode oferecer maiores benefícios terapêuticos no tratamento de condições relacionadas ao estresse oxidativo, no entanto dever ser administrado com moderação e cuidado, uma vez que apresentou alta capacidade fitotóxica frente a sementes de alface.

Palavras-chave: plantas medicinais., Boldo do Chile., atividade biológica.

INTRODUÇÃO

Uma planta é considerada medicinal quando contém compostos que, ao serem utilizados pelo ser humano, têm a capacidade de prevenir, curar ou tratar doenças (Anvisa, 2022). O uso dessas plantas remonta aos primórdios da civilização, quando o homem primitivo dependia inteiramente da natureza para tratar suas enfermidades. Ao longo da história, várias culturas desenvolveram sistemas sofisticados de medicina baseados em plantas, que reconhecem e valorizam o potencial curativo das plantas (Almeida, 2011).

No contexto do Brasil, é geralmente estudado o conhecimento de plantas medicinais de comunidades tradicionais indígenas ou caiçaras (Nascimento, 2019). Além disso, as pesquisas etnomédicas revelam a marcante influência da herança cultural africana na medicina tradicional do Brasil, especialmente nas regiões norte, nordeste e sudeste (Nascimento, 2019). Algumas plantas medicinais são conhecidas pelo mesmo nome, apesar de serem de diferentes espécies, gênero, família. Muitas vezes isso acontece pelo fato dessas espécies serem utilizadas na medicina tradicional para a mesma finalidade terapêutica. Um desses exemplos é a denominação Boldo que é utilizada para se referir a diferentes espécies de plantas, como por exemplo, a *Plectranthus barbatus* e *Plectranthus ornatus*, *Gymnanthemum amygdalinum* e *Peumus boldus* (Schwanz, 2006), todas empregadas na medicina tradicional para tratar distúrbios digestivos.

P. boldus é uma árvore pequena da família Monimiaceae, originária do Chile, encontrada em regiões montanhosas do centro e sul do país. Suas folhas são conhecidas no Brasil como boldo-do-chile e são usadas na medicina tradicional para tratar distúrbios digestivos e hepáticos (Speisky & Cassels, 1994). A espécie *G. amygdalinum*, da família Asteraceae, é originária da África tropical e introduzida no Brasil pelos povos escravizados, sendo popularmente conhecida como boldo-da-bahia ou alumã. *P. barbatus*, conhecido como boldo falso, e *P. ornatus*, conhecido como boldinho, ambas pertencentes ao gênero *Plectranthus* da família Lamiaceae, também oriundas do continente Africano (Carvalho *et al.*, 2018; Costa, 2017; Falé *et al.*, 2009).

Estudos comprovam que essas plantas possuem diversas atividades biológicas, como antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas, antifúngicas, anti-helmínticas e alelopáticas (Toleto *et al.*, 2016; Carvalho *et al.*, 2018; Costa, 2017).

Um estudo recente revelou que essas espécies de boldo têm em comum uma presença significativa de flavonoides. A presença desses compostos em comum nas espécies de boldo pode ser um fator relevante para explicar a similaridade das atividades biológicas entre elas, uma vez que são apontados pela literatura científica como eficientes eliminadores de radicais livres (Cassels; Fuentes-Barros; Castro-Saavedra, 2018; Fuentes-Barros *et al.*, 2023; Lara-Fernández; Rodríguez-Herrera; Aguilar, 2013; Quezada *et al.*, 2004; Simirgiotis; Schmeda-Hirschmann, 2010).

Os compostos fenólicos, tais como ácidos fenólicos, taninos e flavonoides, são amplamente encontrados nas plantas e representam seus metabólitos secundários mais prevalentes. Essas substâncias possuem diversas atividades biológicas e podem servir como

marcadores quimiotaxonômicos em nível infrafamiliar. (Brant, 2003). Essa ferramenta juntamente com a morfologia, anatomia e citogenética, pode auxiliar no trabalho de organização sistemática (Borges *et al.*, 2020). Dessa forma, a caracterização dos compostos fenólicos das espécies de boldo pode contribuir para o conhecimento quimiotaxonômicos dessas espécies.

Os flavonoides são conhecidos por possuírem diversas atividades bioquímicas, incluindo a inibição da acetilcolinesterase (AChE). Por essa razão, há um interesse crescente na busca por novos inibidores dessa enzima em extratos de plantas, com o objetivo de reduzir os sintomas cognitivos, funcionais e comportamentais dos pacientes a longo prazo (Borges *et al.*, 2020).

A capacidade terapêutica das espécies de boldo para problemas estomacais e hepáticos está ligada à interação dos constituintes químicos de suas folhas na neurotransmissão colinérgica. A regulação da motilidade intestinal ocorre através da acetilcolina (ACh), cuja diminuição está associada a distúrbios gastrointestinais. A inibição da acetilcolinesterase (AChE) aumenta a disponibilidade de ACh, beneficiando o sistema gastrointestinal. A ACh também está relacionada a funções cognitivas, sendo sua deficiência característica da doença de Alzheimer. Dessa forma, a inibição da AChE é uma abordagem investigada para tratar a DA, visando aumentar os níveis de ACh e melhorar a transmissão de sinais em pacientes afetados (Silva *et al.*, 2022).

Considerando o amplo espectro de atividades farmacológicas das diferentes espécies de boldo, tanto pelos relatos da população através do uso popular quanto por meio de estudos científicos realizados, torna-se importante realizar análises químicas e biológicas dessas espécies. Isso possibilita o controle da matéria-prima vegetal, a identificação dos marcadores químicos, além de fornecer uma gama de informações indispensáveis para triagem de plantas com potencial interesse farmacêutico.

Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi realizar caracterização do perfil químico e avaliação biológica dos metabolitos bioativos de espécies de boldo. Dessa forma, foi avaliado as atividades anticolinesterásica, alelopáticas, antifúngicas e antioxidantes das amostras de boldo por meio de ensaios *in vitro* e *in silico*, usando simulação computacional de docking.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta e Preparação da amostra

As folhas das espécies adultas de *P. barbatus*, *P. ornatus*, *G. amygdalinum* foram coletados em diferentes bairros do município de Itacoatiara, Amazonas, em agosto de 2022.

Folhas secas de *P. boldus*, comercializadas como boldo do Chile, foram obtidas em diferentes pontos comerciais das cidades de Itacoatiara e Manaus (Tabela 1).

Tabela 6 - Código das amostras de boldo *in natura* e amostras comerciais de *P. boldus*

Código da espécie	Especificação	Local de origem	Dados geográficos	Nº de Registro Herbário
CPB - 6	<i>P. boldus</i> seco	Boldo do Chile– Mercado municipal Adolpho Lisboa - Manaus	-3.1401533259354224, -60.020490457207046	-
CPBa	<i>P. barbatus</i> <i>in natura</i>	Bairro Tiradentes - Itacoatiara	-3.1427294165778417, -58.431567060542754	4467
CPO	<i>P. ornatus</i> <i>in natura</i>	Bairro São Jorge - Itacoatiara	-3.142857150311584, -58.43725266654359	4395
CGA	<i>G.</i> <i>amygdalinum</i> <i>in natura</i>	Bairro Tiradentes - Itacoatiara	-3.1427294165778417, -58.431567060542754	4391

Extratos aquosos das espécies selecionadas foram preparadas metodologia descrita a seguir:

Um total de 10 g das folhas secas de *P. boldus*, triturada manualmente, foram adicionadas a 250 mL de água fervida a 100°C, obtendo-se o chá. A solução foi fechada e deixada em repouso por 10 minutos. Após isso, os chás foram filtrados, guardados em frascos de vidro devidamente identificados, congelados, e posteriormente, liofilizados. Para as amostras *in natura* de *P. barbatus*, *P. ornatus*, *G. amygdalinum* foram utilizadas 100,00 g das folhas frescas para 400 mL de água destilada, fervida a 100°C, a solução foi mantida em repouso por 10 minutos. Após filtração as soluções foram congeladas e liofilizadas. Todas as amostras foram codificadas conforme mostrado na Tabela 1.

Análises cromatográficas

Extração em fase sólida (SPE)

Os procedimentos de SPE foram realizados utilizando pipetas Pasteur como suporte e KP-C18-HS (35-70 µm) (Biotage, VA, EUA) como adsorvente.

A fim de remover interferentes prejudiciais às análises por EM, tais como sais e açúcares, um procedimento de *clean up* dos extratos foi realizado de acordo com Silva e colaboradores (2019), com adaptações. Inicialmente, 15 mg de cada extrato foram solubilizados em 1 ml de água destilada e passados através de uma pipeta Pasteur contendo 300 mg de adsorvente (KP-C18-HS) previamente ativado com MeOH (3 ml) e condicionado com água

destilada (5 ml). Em seguida, cada coluna foi lavada com água destilada (3 mL) (fração aquosa) e posteriormente eluída com MeOH (1 mL) para um vial de 2 ml (fração metanólica). Por fim, cada fração metanólica foi seca utilizando o dessecador de vidro.

Análises baseadas em espectrometria de massas (APCI-MS)

Os espectros de massas, no modo full scan e sequencial (EM/EM), foram registrados em espectrômetro do tipo triplo-quadrupolo (QqQ), modelo TSQ Quantum Access (Thermo Scientific, MA, EUA), equipado com fonte de ionização química à pressão atmosférica (APCI) e operando nos modos positivo ou negativo. Os espectros foram adquiridos e processados através do software Xcalibur® versão 2.7 (Thermo Scientific).

Soluções (1 mg/mL) das frações metanólicas das amostras comerciais de *P. boldus* (CPB2, CPB4, CPB5, CPB6) e *in natura* de *P. barbatus*, *P. ornatus* e *G. amygdalinum* foram preparadas em MeOH. Aliquotas (10 μ L) das soluções estoque foram posteriormente transferidas para vials contendo 1 mL de MeOH. Finalmente, 10 μ L das soluções diluídas (10 ppm) foram analisadas por inserção direta no espectrômetro de massas.

Avaliação da atividade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS

A atividade antioxidante foi inferida através da capacidade dos compostos presentes nas amostras em sequestrar o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Foi preparada uma solução metanólica de DPPH a 0,039 mg/mL de modo que apresentasse a absorvância em 515nm, $R^2 = 0,99$. As determinações foram realizadas por meio da adição de 3.900 μ L da solução de DPPH em 100 μ L de metanol para controle, ou o mesmo volume para as amostras dos extratos (1 mg/ml) seguida de sua incubação em ambiente escuro por 30 minutos. Posteriormente, foi realizada a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro a 515 nm (Bel photonics, uv-m51).

A concentração de DPPH• no meio de reação foi calculada conforme a curva de calibração obtida por regressão linear através de uma série de concentrações (100 a 1500 μ M) de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico (Trolox), o padrão, acrescida da solução de DPPH. A equação obtida foi $y = -0,0006x + 0,923$ $R^2 = 0,9999$ e os resultados foram expressos em μ M de Equivalentes de Trolox.

Para o ensaio com o radical ABTS•+, 30 μ L dos extratos (1mg/mL) foram adicionados à 3000 μ L da solução radicalar (Abs de 0,700), em triplicata, com posterior armazenamento na ausência de luz durante 6 min. A leitura da absorvância foi realizada a 734 nm (Re et al., 1999). A curva padrão de Trolox foi $y = -0,0003x + 0,9179$ ($R^2 = 0,9992$).

Atividade alelopática

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Botânica do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia/ ICET-UFAM, campus 1, em Itacoatiara- AM, no período de setembro a novembro de 2023. Para a elaboração dos extratos aquosos foram utilizadas folhas secas comercializadas de *Peumus boldus* (CPB) e folhas frescas das espécies *Gymnanthemum amygdalinum*, *P. barbatus* e *P. ornatus* (CGA, CPBa, CPO), coletadas na Horta Medicinal do campus. Os extratos aquosos por infusão (EAI) foram preparados numa proporção de 1/10 (p/v) (solução estoque 100%) de folhas em água destilada. A água a 100^o C foi adicionada às folhas, em um béquer coberto, por cinco minutos e posteriormente filtrado em papel filtro para remoção de resíduos de folhas. A partir dessa solução estoque, foram realizadas as diluições para os tratamentos.

O bioensaio de germinação foi conduzido utilizando uma câmara de germinação a 25 °C e 12 h de fotoperíodo para acondicionamento das caixas de acrílico gerbox. Em cada caixa gerbox foram colocadas duas folhas de papel germitest previamente autoclavadas e, em seguida as folhas foram umedecidas com o extrato na quantidade de 2,5 vezes o peso do papel. Posteriormente as sementes foram distribuídas uniformemente sobre o papel com o auxílio de uma pinça. As soluções testes foram adicionadas apenas uma vez, no início dos bioensaios (Ferreira e Aquila, 2000). O delineamento adotado neste experimento foi o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com cinco tratamentos: água destilada (controle), concentração de 25 %, 50 %, 75 % e 100% de *Peumus boldus* (CPB), *Gymnanthemum amygdalinum* (CGA), *P. barbatus* (CPBa) e *P. ornatus* (CPO) e quatro repetições de 25 sementes.

Foram realizadas avaliações diárias até não haver germinação por 3 dias. Os resultados foram obtidos e expressos conforme critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Foram consideradas sementes germinadas aquelas que apresentarem a protrusão da radícula de, no mínimo, 2 mm de comprimento (Miranda et al., 2015). As variáveis mensuradas foram: porcentagem de germinação (%G), tempo médio de germinação (TMG), velocidade média de germinação (VG), o vigor pelo índice de velocidade de germinação (IVG) e comprimento médio da raiz primária(CMR), por meio de suas respectivas fórmulas matemáticas, de acordo com a recomendação na literatura (Maguire, 1962; Labouriau; Valadares, 1976). O vigor de crescimento das plântulas foi estimado baseando-se no comprimento da radícula utilizando-se paquímetro digital. A leitura foi realizada em mm (Nakagawa, 1999).

Análise estatística

Os dados foram submetidos à normalidade e testes de erros de homogeneidade e, em seguida à análise de variância (ANOVA) e as médias resultantes foram comparadas entre si aplicando-se o teste de Tukey ao nível de 5 % de significância, utilizando o programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2011).

Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi determinada através da técnica de difusão em Ágar (Kirby e Bauer, 1966). Foram utilizados 30 μ L dos extratos, solubilizados em metanol a 100mg/mL, para embeber discos de papeis (6mm) e submeter a testes frente as cepas padrão provenientes da “American Type Culture Collection” (ATCC): *Candida albicans* ATCC 80193.

Docking molecular

Os estudos de *docking* molecular foram realizados de acordo com uma abordagem previamente relatada (LIMA et al., 2019). Inicialmente, as estruturas tridimensionais (3D) dos compostos fenólicos e dos alcaloides foram baixadas do PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) em formato de arquivo de dados espaciais (SDF). Em seguida a estrutura com menor energia foi otimizada pelo método semi-empírico PM7 (STEWART, 2013) utilizando o software MOPAC2016 (STEWART, 2016). A estrutura cristalina 3D do *Torpedo californica* (TcAChE) complexado com a galantamina foi recuperada do banco de dados de proteínas RCSB (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics) (<http://www.rcsb.org>) sob PDB ID 1QTI (BARTOLUCCI et al., 2001). Todos os experimentos de ancoragem foram realizados utilizando o software AutoDock Vina 1.1.2 (TROTT & OLSON, 2009) no qual o *grid box* foi centralizado no ligante (centro em x, y, z = 4.34, 64.37, 60.09); tamanho do espaço de busca (volume do *grid box*) foi definido como 18 x 28 x 26 Å. O Autodock Tools versão 1.5.6 foi usado para converter as moléculas do ligante e do receptor em formato de arquivo apropriado (pdbqt) para o AutoDock Vina (MORRIS et al., 2009) com o Discovery Studio (DISCOVERY STUDIOVISUALIZER, 2016) sendo usado para analisar as conformações de ligação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação do procedimento de *clean up* dos extratos aquosos

Através da análise do espectro de massas (*full scan*) das amostras foi possível observar a presença de íons característicos de açúcares, como frutose ou glicose (m/z 179) e sacarose

(m/z 341), comumente encontrados em matrizes vegetais, como é possível observar na amostra de *P. barbatus* (Figura 1A). Por outro lado, a fração metanólica (Figura B), resultantes do protocolo de *clean up* com SPE, tiveram uma redução significativa dos picos referente aos açúcares.

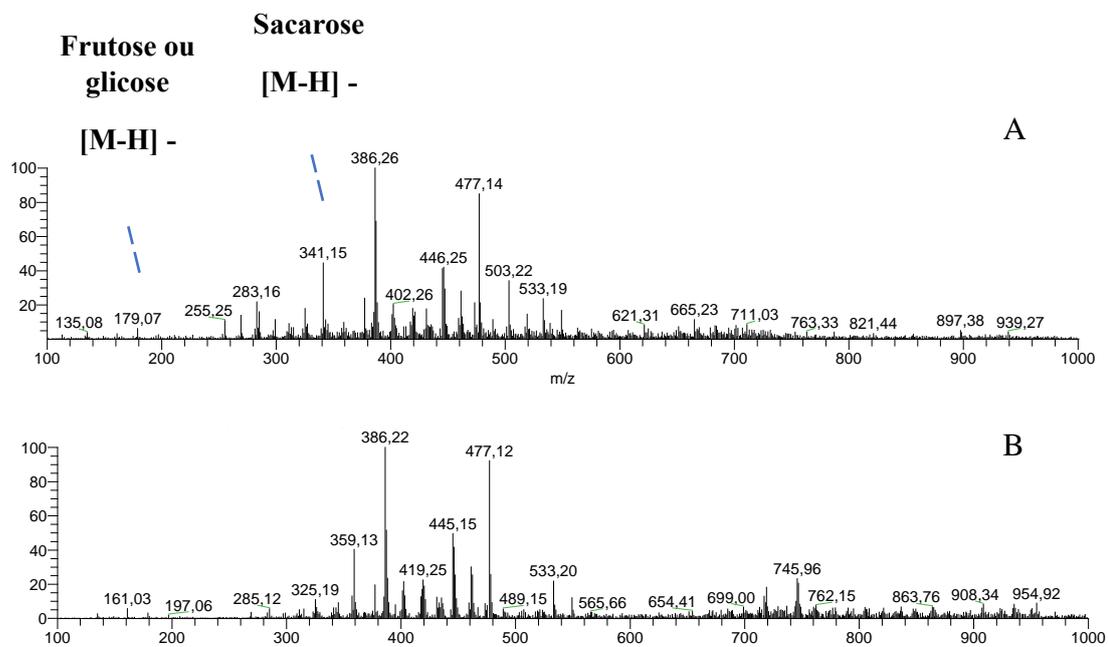


Figura 9. Espectro de massas do extrato aquoso de *P. barbatus* (A) e de sua fração metanólica proveniente do protocolo de SPE (B).

Caracterização da composição fenólica das frações metanólicas por APCI-EM

A espectrometria de massas foi utilizada com o intuito de identificar os metabólicos nos extratos aquosos, sem a necessidade de isolamentos destes compostos. A análise por inserção direta das frações metanólicas de *P. barbatus*, *P. ornatus* e *G. amygdalinum*, na faixa de m/z 100-1000. Como os polifenóis contêm um ou mais grupos hidroxila e/ou ácido carboxílico, os dados de MS foram adquiridos no modo de ionização negativa, revelando perfis distintos para quatro as espécies (Figura 2).

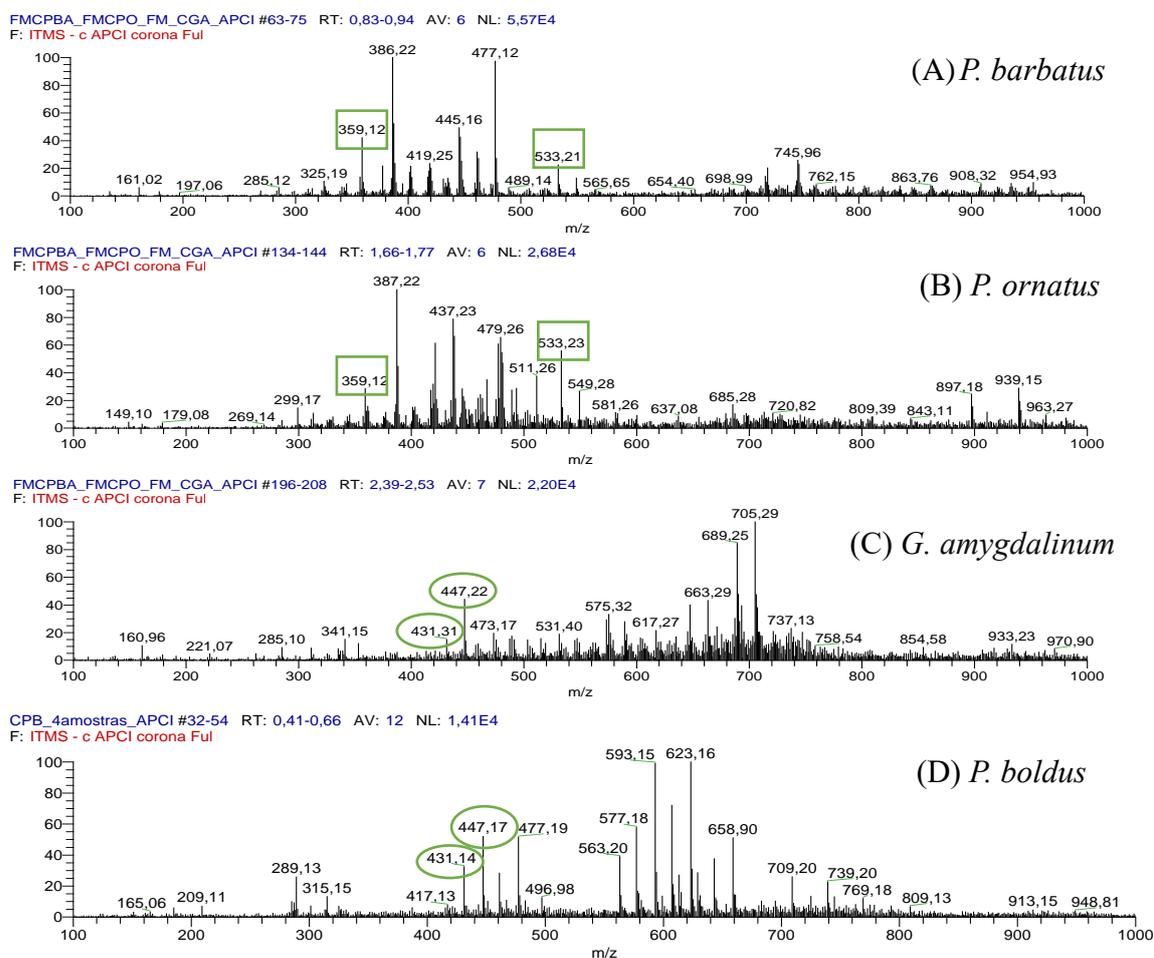


Figura 10 Espectro de massas da fração metanólica de *P. barbatus* (A), *P. ornatus* (B), *G. amygdalinum* (C), *P. boldus* (D), modo negativo.

Para a amostra de *P. barbatus* foi observado o íon de m/z 477 como pico base, enquanto que para *P. ornatus* foi observado o íon de m/z 387. Já na amostra de *G. amygdalinum* observou-se o íon de m/z 705 como pico base, e *P. boldus* apresentou o íon de m/z 593. No entanto, é possível observar outros íons de menor intensidade presentes tanto na amostra de *P. barbatus* quanto na amostra de *P. ornatus*, tais como o íon de m/z 359 e m/z 533, circulosados em verde (Figura 2 A e B).

Os dados espectrais MS/MS comparados com dados da literatura demonstraram que o íon de m/z 359 (Tabela 2) apresentou um pico base de m/z 161, íons de menor intensidade de m/z 179 e m/z 197. Os íons fragmentados em m/z 197 e 179 são relativos ao ácido salviânico A e ao ácido cafeico, respectivamente, produzidos a partir de perdas de 162 e 180 u, sendo consistentes com o padrão de fragmentação do ácido rosmarínico Hossain *et al.*, 2010.

Tabela 2. Substâncias identificadas através da APCI-MS

Amostras	Ionização negativa		Ionização positiva				Referências
	MS [M-H] ⁻	MS ²	MS [M+ H] ⁺	MS ²	FM	Compostos	
<i>P. barbatus</i>	477	314, 285	299, 479	317	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	<i>O</i> -hexosil <i>O</i> -metil quercetina	(Moser <i>et al.</i> , 2023)
<i>P. barbatus</i>	461	285	463	287	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	<i>O</i> -glucuronil kaempferol	(Moser <i>et al.</i> , 2023)
<i>P. barbatus</i>	359	197, 161,	179, -	-	C ₁₈ H ₁₅ O ₈ ⁻	Ácido rosmarínico	(Hossain <i>et al.</i> , 2010)
<i>P. barbatus</i> , <i>P. ornatus</i>	-	-	447	429, 327	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	Isoorientina	(Moser <i>et al.</i> , 2023); (Falé <i>et al.</i> , 2009)
<i>P. ornatus</i>	463	301	-	-	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	Quercetina-3- <i>O</i> - hexosídeo	(Hossain <i>et al.</i> , 2010)
<i>P. ornatus</i>	-	-	421	343, 325, 307, 279, 273	C ₂₂ H ₂₈ O ₈	Diterpenoide (coleon H)	(Moser <i>et al.</i> , 2023); (Falé <i>et al.</i> , 2009)
<i>P. ornatus</i>	447	285	-	-	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	Luteolina-7- <i>O</i> - glicosídeo	(Hossain <i>et al.</i> , 2010)
<i>G. amygdali num</i>	449	287	-	-	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	Eriodictiol 7- <i>O</i> -glicosídeo	(TSAGKARIS <i>et al.</i> , 2022)
<i>G. amygdali num</i>	477	357, 315	-	-		Quercetina 3'- <i>O</i> - metil-7- <i>O</i> -β- glucopiranosídeo	(Gimenes <i>et al.</i> , 2018)

<i>G. amygdali num</i>	431	268	-	-	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	Apigenina glicosídeo	7- <i>O</i> -	(Tsagkaris <i>et al.</i> , 2022)
<i>G. amygdali num</i>	353	191, 179, 173, 135	-	-		3- <i>O</i> -ácido cafeoilquínico		(Gimenes <i>et al.</i> , 2018)
<i>P. boldus</i>	477	314, 300, 285,	-	-		Glicosídeo isorhamnetina	de	(Simirgiotis & Schmeda-Hirschmann, 2010)
<i>P. boldus</i>	447	301, 271, 179	-	-		quercetina ramnosídeo	3- <i>O</i>	(Simirgiotis & Schmeda-Hirschmann, 2010)
<i>P. boldus</i>	289	123, 245	-	-		(+) Catequina		(Simirgiotis & Schmeda-Hirschmann, 2010)
<i>P. boldus</i>	431	285, 151	-	-		Ramnosídeo Kaempferol	de	(Simirgiotis & Schmeda-Hirschmann, 2010)
<i>P. boldus</i>	607	461, 315	-	-		Di-ramnosídeo isorhamnetina	de	(Simirgiotis & Schmeda-Hirschmann, 2010)
<i>P. boldus</i>	593	447, 285	-	-		Kaempferol rutinosídeo		(Simirgiotis & Schmeda-Hirschmann, 2010)
<i>P. boldus</i>	623	477, 315	-	-		Isorhamnetina glucosil-ramnosídeo		(Simirgiotis & Schmeda-Hirschmann, 2010)
<i>P. boldus</i>	595	433, 449	-	-		luteolina rutinosídeo	3- <i>O</i> -	(Torres-Veja <i>et al.</i> , 2020)
<i>P. boldus</i>	579	433, 287	-	-		diramnosídeo luteolina	de	(Torres-Veja <i>et al.</i> , 2020)

Um padrão semelhante de fragmentação do ácido rosmarínico foi relatado por vários autores (Moser *et al.*, 2023; Hossain *et al.*, 2010; Falé *et al.*, 2009). Este composto fenólico está especialmente presente na família Lamiaceae, encontrado em várias espécies do gênero *Plectranthus* (Veras; Alegre, 2017). Foram descritas na literatura várias atividades biológicas associadas ao ácido rosmarínico, dentre suas principais propriedades, destacam-se a ação adstringente, antioxidante, anti-inflamatória, antimutagênica, antibacteriana e antiviral (Petersen; Monique, 2003).

Os experimentos MS/MS da amostra de *P. barbatus* sugerem que o íon [M - H]⁻ em *m/z* 477 seja *O*-metil – hexosil- quercetina, uma vez que a perda de 163 u confirmou o substituinte *O*-hexosil, além da subsequente perda de 15 u (CH₃ •) sugeriu o substituinte *O*-metil na aglicona quercetina (Moser *et al.*, 2023). No íon de [M - H]⁻ em *m/z* 461 a perda de 176 u confirmou a presença do substituinte *O*-glucuronil, sendo identificado na literatura como *O*-glucuronil kaempferol (Moser *et al.*, 2023).

Na amostra de *P. ornatus* o padrão de fragmentação do íon de *m/z* 463, mostrou a perda de uma porção hexose (162u), identificado na literatura como composto quercetina-3-*O*-hexósido (Hossain *et al.*, 2010). O íon de *m/z* [M-H] 421, obteve padrão de fragmentação em *m/z* 343, 325, 307, 279, 273, compatíveis com diterpenóide (oleon H), comumente encontrado em espécies do gênero *Plectranthus* (Moser *et al.*, 2023). O íon de *m/z* 447, com perda de 162 u, identificado como Luteolin-*O*-glycoside. Em caracterização fenólica realizada por (Hossain *et al.*, 2010) em diversas espécies de Lamiaceae também foram identificados flavonoides como luteolina, luteolina-7-*O*-glicosídeo.

Na amostra de *G. amygdalinum* observou-se ocorrência do íon molecular de *m/z* 477 identificado como quercetin 3'-*O*-methyl-7-*O*-β-glucopyranoside (Gimenes *et al.*, 2018). O íon de *m/z* 431 teve o mesmo padrão de fragmentação encontrado na literatura e identificado como Apigenina 7-*O*-glicosídeo (Tsagkaris *et al.*, 2022). É interessante observar que em outra investigação realizada por (Hossain *et al.*, 2010) em espécies da família Lamiaceae por Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massa (LC-MS), também foi encontrado a Apigenina-7-*O*-glicosídeo, entre outros flavonoides como luteolina-7-*O*-glicosídeo, galocatequina, floridzina, quercetina e rutina. Estes resultados sugerem que os flavonoides estão abundantemente presentes nas espécies dessas duas famílias.

Muitos estudos sugerem que as espécies de Asteraceae contêm altas concentrações de compostos de ácidos cafeoilquínicos (Tsagkaris *et al.*, 2022). Neste estudo foi identificado a

substância 3-Ácido *O*-cafeoilquínico, identificado a partir da fragmentação do íon de m/z 353 (Gimenes *et al.*, 2018).

Em trabalho anterior realizado pelo nosso grupo de pesquisa, as amostras de chá das folhas de espécies de boldo foram analisadas no espectrômetro de massa com ionização electrospray modo positivo. Com esse método foi possível identificar apenas alcaloides característicos da espécie *P. boldus*, como a *N*-metil-coclaurina, Laurolitsina, Isoboldina e *N*-Metil-laurotetanina (Gomes *et al.*, 2024), não sendo possível identificar compostos fenólicos de nenhuma espécie.

Dessa forma, neste trabalho utilizou-se fonte de ionização química à pressão atmosférica (APCI) e operando nos modos positivo ou negativo, afim de identificar compostos fenólicos.

Neste estudo, a amostra do chá de *P. boldus* apresentou o íon de massa carga em m/z 477, com massa de fragmento em m/z 314, 300, 285, característica da Glicosídeo de isorhamnetina (Simirgiotis & Schmeda-Hirschmann, 2010). O íon de m/z 447 e íons fragmentos em m/z 301, 271, 179 característico da quercetina 3-*O* ramnosídeo. O íon m/z 289 com íons fragmentos em m/z 245, 123 característica de catequina (Simirgiotis & Schmeda-Hirschmann, 2010).

O íon de m/z 607 foi identificado como um di-ramnosídeo de isorhamnetina com íons fragmentos em m/z 461 e 315. Além disso, o íon de m/z 431 foi identificado como um ramnosídeo kaempferol, molécula desprotonada em m/z 151 e 285.

Também foram identificados derivados da luteolina, como o íon de m/z 595, identificado como luteolina 3-*O*-rutinosídeo. Os dados de MS/MS confirmam uma perda de 162 u (hexose) e 146 u (ramnose) (Torres-Veja *et al.*, 2020). O íon precursor em m/z 579 foi identificado como diramnosídeo de luteolina com os dados de MS/MS confirmaram uma perda sequencial de duas 146 u (ramnose) (Torres-Veja *et al.*, 2020).

Avaliação da atividade antioxidante e teor de fenólicos totais

Foram utilizadas as técnicas DPPH e ABTS para avaliar a capacidade sequestradora de radicais livres das infusões das folhas das espécies de boldo. Nos dois métodos, a atividade antioxidante foi medida por uma curva de calibração com soluções de Trolox, e os resultados dessas avaliações, assim como a quantificação do teor de fenólicos totais, estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Atividade antioxidante e teor de fenólicos totais de *P. boldus*, *P. barbatus*, *P. ornatus*, *G. amygdalinum*.

Espécies	Amostras	CFT (mg EAG/g) *	DPPH (μM ET) **	ABTS (μM ET) **
<i>P. boldus</i>	CPB6	305,32 ± 2,4	1073,33 ± 2,35	1859±66,1
	CPB2	219,09 ± 0,5	1068,33 ± 12,58	1701±93,8
	CPB4	223,91 ± 0,8	1039,11 ± 88	1531±75,8
	CPB5	173,53 ± 1,7	1024,16 ± 1,17	1694±26,4
<i>G. amygdalinum</i>	CGA	161,67 ± 4,8	457,22 ± 13,47	971±135,3
<i>P. barbatus</i>	CPBA	167,71 ± 1,1	745,83 ± 24,74	607±49,33
<i>P. ornatus</i>	CPO	88,05 ± 1,2	187,22 ± 34,25	226±38,19

* miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra.

**microlitro de Equivalentes de Trolox

Por meio do método de Folin-Ciocalteu foi possível observar que todas as amostras comerciais de *P. boldus* apresentaram conteúdo fenólico total maiores que as amostras *in natura* *P. barbatus*, *P. ornatus*, *G. amygdalinum*.

Através do ensaio de DPPH foi possível observar maior potencial antioxidante nas amostras de *P. boldus*, conforme observado na Tabela 3. Dentre as amostra *in natura*, a *P. barbatus* apresentou maior atividade antioxidante e a *P. ornatus* apresentou menor atividade antioxidante.

No método ABTS, as amostras de *P. boldus* também apresentaram alto potencial em sequestrar o radical, com valores entre 1531±75,88 a 1859±66,14 μM ET. Dentre as amostras *in natura*, a espécie *G. amygdalinum* apresentou o maior potencial antioxidante, com valor em 971±135,31 μM ET, seguido da espécie *P. barbatus*, com valor em 607±49,33. A espécie *P. ornatus*, apresentou baixa capacidade em sequestrar o radical, em ambos os métodos Tabela 3.

Em pesquisa anterior, nosso grupo avaliou a capacidade antioxidante do extrato aquoso das folhas de *P. boldus* usando os métodos DPPH, ABTS, FRAP e o sistema etacaroteno/ácido linoleico. Observou-se alta capacidade antioxidante, sendo atribuída à presença de alcaloides, uma vez que o extrato investigado apresentou baixa concentração de fenólicos (82,804 ± 0,9

mg EAG g⁻¹) (Silva et al., 2022). Na presente pesquisa, apesar de o teor de fenólicos totais ter apresentado valores maiores ($223,91 \pm 0,8$), a capacidade de sequestrar radicais livres permaneceu alta, com valores similares realizados por (Silva et al., 2022)

Pesquisas realizadas por outros autores como (Quezada et al., 2004; Lara-Fernández; Rodríguez-Herrera; Aguilar, 2013; SimirgiotiS; Schmeda-Hirschmann, 2010), sugerem que o alto potencial antioxidante observado nas amostras de *P. boldus* é resultado tanto da presença de alcaloides quanto de compostos fenólicos.

As espécies do genero *Plectranthus*, *P. ornatus* e *P. barbatus* apresentaram diferenças na capacidade de sequestrar o radical, tendo a *P. barbatus* apresentado maior potencial antioxidante nos dois métodos avaliados DPPH ($745,83 \pm 24,74$) e ABTS ($607 \pm 49,33$). De acordo com a literatura, a capacidade sequestradora de radicais livres de *P. barbatus* está relacionada principalmente à presença de altos níveis de fenólicos. Muitos estudos apontam que constituintes fenólicos como flavonoides, ácidos, ésteres, fenilpropanóides e diterpenos podem contribuir para as atividades antioxidantes encontradas nas espécies do gênero *Plectranthus*.

Dentre os constituintes fenólicos, à presença de ácido rosmarínico é atribuído a atividade antioxidante encontradas na família Lamiaceae (Falé et al., 2009; Ganash; Qanash, 2018; Mendonça et al., 2023). No presente estudo, foi identificado o ácido rosmarínico no chá das folhas de *P. barbatus* em maior abundancia relativa. Já nas infusões das folhas de *P. ornatus*, esse ácido estava presente mais em menor intensidade. Além disso, a avaliação de teor de fenólicos totais mostrou que *P. barbatus* apresentou maior valor de fenólicos ($167,71 \pm 1,1$) quando comparado com *P. ornatus* ($88,05 \pm 1,2$). Dessa forma, sugere-se que a capacidade de sequestrar os radicais livres de *P. barbatus* investigada nesse estudo, pode está diretamente relacionado a presença de compostos fenólicos, principalmente ao ácido rosmarínico.

As infusões das folhas da espécie *G. amygdalinum* apresentaram boa capacidade antioxidante nos dois métodos DPPH ($457,22 \pm 13,47$) e ABTS ($971 \pm 135,31$).

Resultados semelhantes foram observados em estudos anteriores. Silva et al. (2013) também constataram efeito antioxidante em um extrato etanólico das folhas de *G. amygdalinum*, atribuindo-o à presença de flavonoides, como apigenina e luteolina. Em outro estudo conduzido por Carvalho (2014), a preparação por decocção do "chá" das mesmas folhas demonstrou alta atividade antioxidante, evidenciada por um valor EC₅₀ de $20,0 \pm 0,6$ µg/mL. A análise por HPLC e espectrometria de massa identificou predominantemente ácidos monocateoilquínicos, como o ácido clorogênico, e dicafeoilquínicos, como a cinarina, nos quais os autores atribuíram as atividades antioxidantes do extrato. Nesta investigação também foram

identificadas no chá das folhas desta derivados da Apigenina 7-O-glicosídeo, bem como ácidos cafeoilquínicos, como o Ácido 3-O-cafeoilquínico, sugerindo a esses compostos a resposta antioxidante apresentada para esta espécie.

Verifica-se na literatura fitoquímica de cada espécie que flavonoides como apigenina, luteolina, bem como derivados da quercetina e rutina estão presentes nas folhas das espécies *P. boldus* (Hernandez et al., 2010, Simirgiotis & Schmeda-Hirschmann, 2010), *P. barbatus* e *P. ornatus* (Hossain et al., 2010), *G. amygdalinum* (Tsagkaris et al., 2022). Nesse sentido, sugere-se que a atividade antioxidante observado para essas espécies pode estar relacionado principalmente a presença desses compostos.

Atividade alelopática das espécies de boldo

Os resultados apresentados na Tabela 4 indicam que houve efeito alelopático na germinação de sementes de alface pelo extrato por infusão de folhas de *P. boldus* e *G. amygdalinum*, em comparação ao tratamento testemunha (água destilada).

Tabela 4. Porcentagem de germinação de sementes de alface submetidas a diferentes tratamentos dos chás das folhas de espécies de boldo.

TRATAMENTOS	GERMINAÇÃO (%)			
	<i>P. ornatus</i>	<i>P. barbatus</i>	<i>P. boldus</i>	<i>G. amygdalinum</i>
Água destilada	96 a	100 a	76 a	76 a
EAI 25%	99 a	100 a	14 b	73 a
EAI 50%	99 a	100 a	1,00 c	49 b
EAI 75%	100 a	100 a	0,00 c	39 b
EAI100%	100 a	100 a	1,00 c	45 b
Cv	0,98	0	23,89	18,94
Valor de p	0,0	1,0	0	0,06

Letras diferentes nas colunas diferem estatisticamente entre si.

A porcentagem de germinação de sementes de alface submetidas à infusão das folhas de *P. boldus* apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao tratamento controle (água destilada) no tratamento 25%, caindo de 76% para 14%, conforme mostrado na Figura 3A. No tratamento 50%, houve inibição total da germinação das sementes de alface, impossibilitando a avaliação dos demais parâmetros para este tratamento. Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos 75% e 100% quando comparados com o tratamento de 50%, o que indica uma atividade fitotóxica sobre as sementes de alface com o aumento das concentrações.

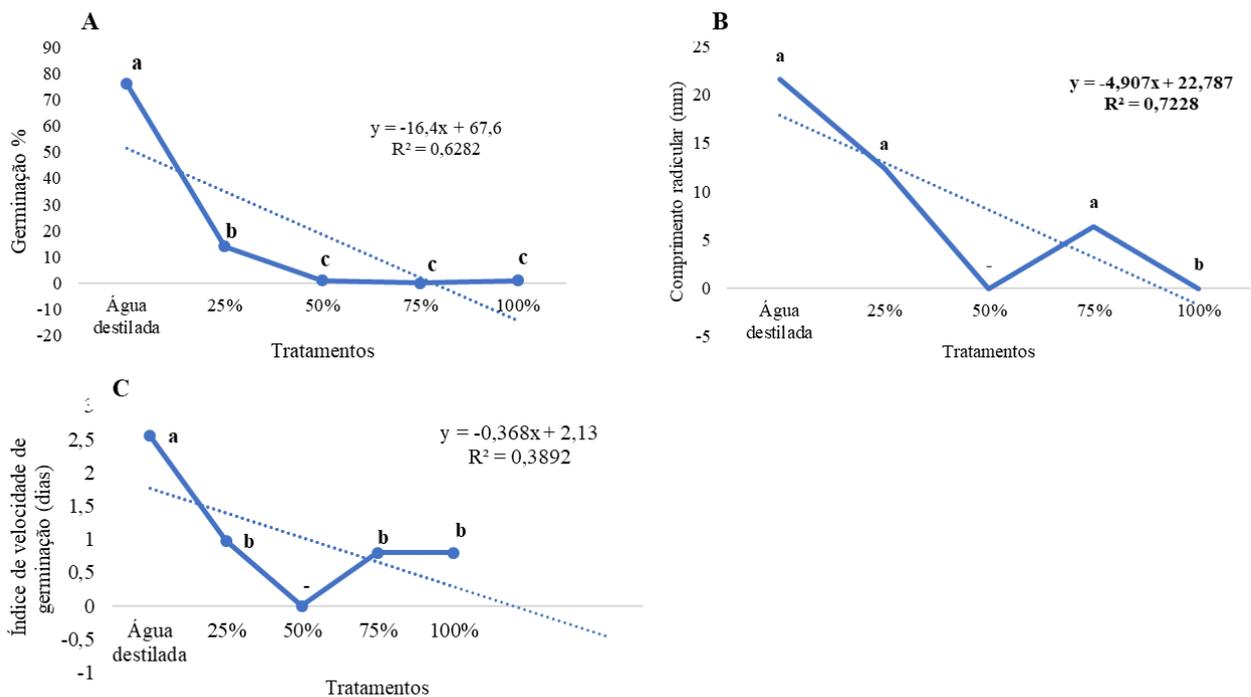


Figura 11- Porcentagem de germinação (A), Índice de velocidade de germinação (B) e Comprimento radicular (C) de sementes de alface submetidas a diferentes tratamentos do chá das folhas de *P. boldus*.

Resultados similares foram encontrados em uma investigação sobre a atividade alelopática do chá das folhas de *P. boldus* conduzida por Toletto et al. (2016), onde foi observada fitotoxicidade nas sementes de pepino e alface em todos os tratamentos (25%, 50%, 75% e 100%) avaliados pelos autores.

Na Figura 3C, observa-se que a infusão de *P. boldus* teve influência no índice de velocidade de germinação (IVG), indicando efeito inibitório sobre as sementes de alface. No tratamento 25% houve decréscimo estatisticamente significativo no índice de velocidade de germinação quando comparado com a água destilada. No tratamento com concentração de 50%, não foi possível obter valores do IVG devido à ausência de germinação.

Nas concentrações de 75% e 100%, não houve diferença significativa em relação à concentração de 25%. Esses resultados demonstram que a partir da concentração de 25% da infusão das folhas de *P. boldus*, já observa-se uma resposta inibitória eficaz sobre as sementes de alface, tornando-se mais eficiente conforme aumenta as concentrações, sugerindo que o decaimento da velocidade de germinação das sementes de alface pode estar relacionada com o aumento da concentração do chá. Em um estudo semelhante com sementes de alface, Toletto et al. (2016) também observaram uma redução no IVG com o aumento das concentrações do extrato de *P. boldus*.

Na Figura 3B, observa-se que não houve diferença significativa no tratamento 25% quando comparados ao controle no que se refere ao crescimento radicular. No entanto, a partir dos tratamentos 50% e 100%, não houve surgimento da radícula, diferindo-se significativamente dos demais tratamentos. Dessa forma, observa-se que a inibição do crescimento radicular ocorre quando submetidas à concentrações mais elevadas do chá.

Para verificação dos efeitos alelopáticos, os testes de germinação são geralmente menos sensíveis do que aqueles que avaliam o desenvolvimento das plântulas, como o comprimento da radícula, por exemplo (Ferreira e Aquila, 2000). No entanto, as infusões de *P. boldus* inibiram tanto a germinação quanto o crescimento das raízes das sementes de alface.

Resultados similares foram obtidos em investigação dos efeitos alelopáticos de *P. boldus* realizado por Toledo et al., (2016), onde foi observada uma diminuição no comprimento das raízes de pepino expostas ao chá em todos os tratamentos, sendo que a maior interferência no crescimento foi registrada no tratamento com 100% do chá.

De acordo com Lessa et al., (2016) quanto menor o crescimento das raízes maior a toxicidade. Dessa forma, sugere-se moderação e cuidado no consumo das infusões de *P. boldus*.

O chá de *P. boldus* apresentou atividade alelopática sobre as sementes de alface, demonstrando a presença de moléculas bioativas no chá. Dentre os componentes químicos identificados para *P. boldus* neste estudo estão os flavonóides e alcalóides, apontados na literatura como compostos potencialmente aleloquímicos (Siddiqui et al., 2018). Em altas concentrações, principalmente a catequina, pode ser tóxica ao organismo, especialmente para o fígado Lessa et al., (2016). O uso de plantas como cobertura vegetal pode ser uma estratégia para inibir o crescimento de plantas indesejáveis, reduzindo a necessidade de herbicidas e melhorando as condições do solo. Por isso, é importante estudos futuros sobre o efeito alelopático do chá de boldo-do-chile em plantas daninhas (Toledo et al., 2016).

Na figura 4, estão demonstrados os efeitos das diferentes concentrações das infusões das folhas in natura de boldo *P. barbatus*, *P. ornatus*, *G. amygdalinum* sobre a porcentagem de germinação, Índice de velocidade de germinação, comprimento radicular (mm) de sementes de alface.

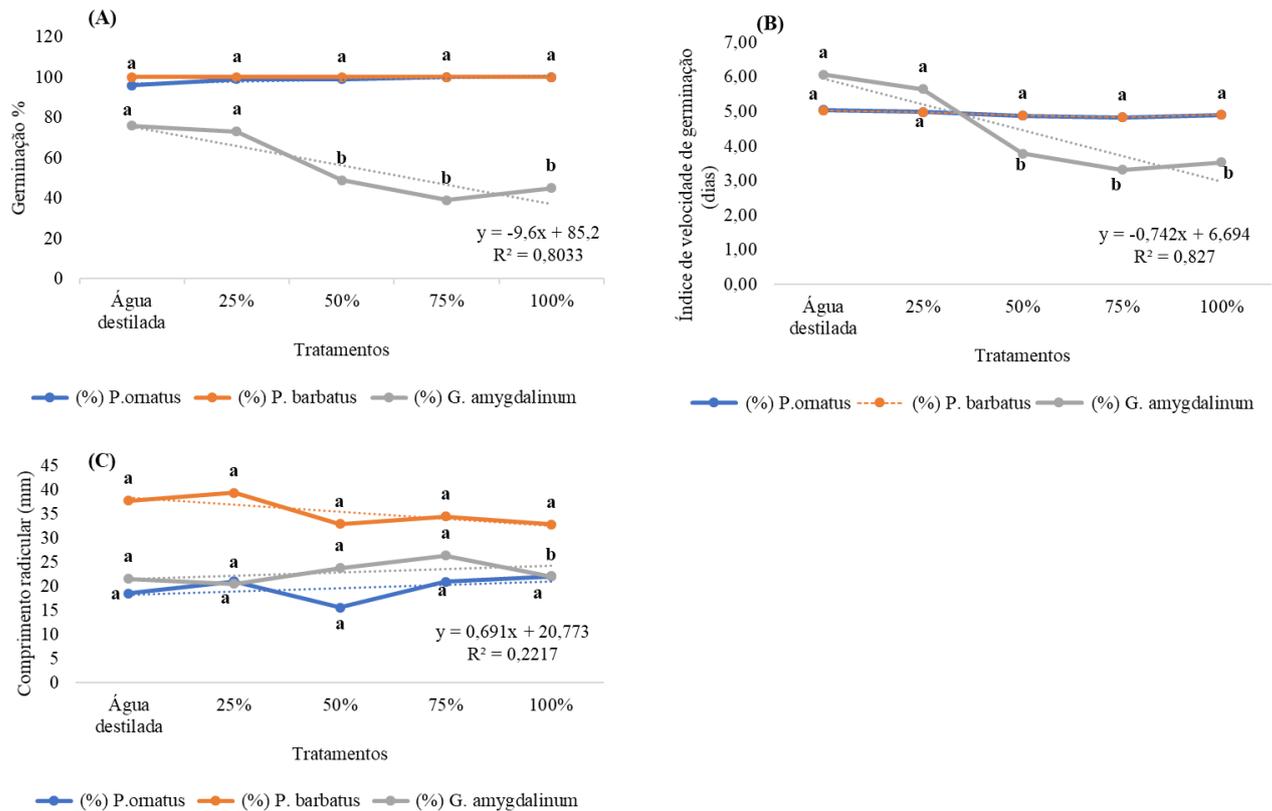


Figura 12. Porcentagem de germinação de sementes de alface (A), Índice de velocidade de germinação (B), comprimento radicular (mm) das espécies *in natura* de boldo *P. barbatus*, *P. ornatus*, *G. amygdalinum*.

A porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação e comprimento da radícula das sementes de alface submetidas aos tratamentos dos chás das espécies de mesmo gênero *P. barbatus*, *P. ornatus* não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao tratamento controle, não sendo observada atividade alelopática Figura 4A, B, C.

Esses resultados diferem dos obtidos por Azambuja et al., (2010), onde foi observado efeito alelopático inibitório nas infusões de *P. barbatus* já na concentração de 25% do chá. Os autores sugerem que o diterpeno denominado Barbatusina foi o responsável pela atividade inibitória observada. Nesse sentido, é interessante observar que este composto não foi identificado no presente estudo, o que pode explicar a ausência de atividade alelopática do chá das espécies *P. barbatus* e *P. ornatus* Figura 4.

As diferentes concentrações das infusões das folhas de *G. amygdalinum* apresentaram diferença significativa em relação ao controle a partir do tratamento de concentração 50%, tanto na porcentagem de germinação Figura 4A, quanto no índice de velocidade de germinação Figura 4B. O comprimento radicular sofreu influência do chá na concentração 100% Figura 4C. Observa-se que o efeito em todos os parâmetros avaliados está diretamente relacionado ao aumento da concentração.

Nos resultados obtidos por Simionatto et al. (2010) observou-se redução na germinação, IVG e inibição do crescimento de alface e cebola quando submetidos aos extratos aquosos de *G. amygdalinum*.

Em um estudo realizado por Sousa (2017), foi investigada a atividade alelopática de *Acritopappus confertus*, uma espécie da família Asteraceae. O Extrato Aquoso das folhas dessa espécie demonstrou uma significativa capacidade de inibir a germinação das sementes de *C. echinatus* em todas as concentrações testadas. Nas concentrações de 50, 75 e 100%, foi observada uma inibição total da germinação das sementes em comparação com o controle. Isso sugere que o Extrato Aquoso de *A. confertus* pode conter aleloquímicos que têm o potencial de impedir a germinação das sementes de *C. echinatus*.

Ferreira e Aquila (2000) apontam o ácido cafeico - um éster do ácido caféico com ácido quínico - como um potente inibidor do desenvolvimento de vegetais. Esse composto apresenta potencial alelopático, interferindo no crescimento e na germinação de uma grande variedade de espécies de plantas (MAGAÑA et al., 2021). No presente estudo, foi identificado nas folhas do chá de *G. amygdalinum* o Ácido 3-*O*-cafeoilquínico, bem como outros compostos fenólicos, permitindo sugerir que essas substâncias foram as responsáveis pelo efeito alelopático observado nos diferentes tratamentos do chá, as quais podem agir de forma isolada ou em conjunto.

De forma geral, os resultados mostram que o extrato obtido por infusão das folhas de *P. boldus* tiveram resultados de inibição alelopática mais expressivos quando comparados com as espécies *in natura*. Isso pode estar relacionado com a presença significativa de alcaloides e compostos fenólicos em sua composição química, como demonstrado na identificação por espectrometria de massas realizado neste trabalho.

Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos extratos das espécies de boldo foi classificada como baixa, moderada, alta e negativa, seguindo os critérios propostos por Silva (2016), conforme observado na Tabela 5.

Tabela 5. Concentração Inibitória Mínima (CIM) das amostras obtidas de espécies de boldo e da boldina.

Concentração das amostras em $\mu\text{g/mL}$	Amostras					Boldin
	<i>P. boldus</i>	<i>P. barbatus</i>	<i>G. amygdalinum</i>	<i>P. ornatus</i>	a	
800	-	-	+	-	-	-
1600	+	+	+	+	+	+

(+) Baixa: CIM entre 500 e 1600 $\mu\text{g/mL}$; (++) Moderada: CIM entre 100 a 500 $\mu\text{g/mL}$; Alta: CIM<100 $\mu\text{g/mL}$; (-) Negativa: (CIM >1600 $\mu\text{g/mL}$).

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos de espécies de boldo foi estimada como a menor concentração de extrato, expressa em $\mu\text{g/mL}$, necessária a inibição de 50% do crescimento fúngico comparado a um poço controle de crescimento livre de antifúngicos.

Os critérios adotados para avaliar a atividade antifúngica seguiram as diretrizes propostas por Holetz et al. (2002), com ajustes. Segundo esses critérios, a atividade foi classificada como alta quando a CIM era inferior a 100 $\mu\text{g/mL}$, moderada para CIM entre 100 e 500 $\mu\text{g/mL}$, baixa para CIM entre 500 e 1600 $\mu\text{g/mL}$, e inativa quando não havia inibição observada até a maior concentração testada (CIM >1600 $\mu\text{g/mL}$).

Os resultados revelaram que as cinco amostras exibiram atividade contra as espécies de *Candida* somente no CIM de 1600 $\mu\text{g/mL}$ atividade, sendo classificada como baixa atividade, exceto a espécie *G. amygdalinum* apresentou atividade de inibição no CIM 800 $\mu\text{g/mL}$, também considerada baixa Tabela 5.

Estudos investigando atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *P. boldus* são escassos na literatura. A investigação da atividade antimicrobiana gira em torno do óleo essencial das folhas de *P. boldus*, que foi avaliada em várias ocasiões, como por exemplo, em estudos realizados por Vila et al., (1999) e Bittner et al., (2009), que observaram que óleo extraído das folhas de *P. boldus* é ativo contra *Candida albicans*.

Embora o extrato de *P. barbatus* tenha demonstrado baixa atividade antifúngica contra *Candida albicans*, estudos na literatura indicam um amplo espectro antifúngico. Araújo et al. (2019) observaram atividade inibitória para várias espécies de *Candida* spp. (CIM 31,25-500 $\mu\text{g/mL}$) em seu estudo com o extrato etanólico de *P. barbatus*. Além disso, Cordeiro et al. (2021) constataram que o extrato foi fungistático contra *Trichophyton rubrum*, atribuindo a atividade inibitória a presença de compostos fenólicos. Outro estudo do extrato bruto de *P. barbatus* pareceu ser altamente eficaz contra todos os fungos e foi o mais forte entre as três espécies do gênero *Plectranthus* investigadas, sendo atribuídas ao diterpeno do tipo abietano,

isolados no estudo (Mothana et al., 2014). No presente estudos, não foi identificado diterpenos nas infusões de *P. barbatus*.

Araújo et al. (2019) pontua que o fato de vários compostos identificados em extratos etanólicos investigados na literatura apresentarem atividade antimicrobiana, então sugere-se que esta atividade dos extratos vegetais está relacionada com possíveis interações sinérgicas entre seus componentes.

Em relação à espécie *P. ornatus*, esta apresentou baixa atividade antifúngica frente à *C. albicans*. Ao comparar com os dados da literatura, um estudo realizado por Santos et al. (2014) constatou atividade antifúngica em diversas concentrações, com inibição do fungo *Saccharomyces cerevisiae* na presença do extrato de *P. ornatus*. No entanto, não foi observada inibição de *Candida albicans*. Assim, torna-se importante conduzir estudos futuros testando os extratos de *P. ornatus* em outros microorganismos.

G. amygdalinum apresentou baixa atividade contra *C. albicans*. A atividade antifúngica dos extratos hexânico de *G. amygdalinum* contra os fungos *C. albicans* e *M. canis* foi observada por Rocha et al. (2011), que atribuíram essa atividade a flavonoides, alcaloides, taninos, triterpenoides, saponinas, considerados compostos importantes na composição química das folhas dessa espécie. Em outra investigação realizada por Aneke et al. (2019), com extratos etanólicos de folhas de *G. amygdalinum*, observou-se que eles apresentam atividade antifúngica contra *Microsporum* spp. e *Trichophyton* spp.

Esses resultados sugerem que as propriedades antimicrobianas desses extratos variam de acordo com as concentrações dos fitoquímicos farmacologicamente ativos presentes nas folhas de *G. amygdalinum*.

Docagem molecular

Os estudos de *docking* molecular entre a estrutura tridimensional da AChE (1QTI) e os principais componentes das espécies de boldo foram realizados na região do sítio ativo, que foi previamente ocupada pela galantamina. O sítio ativo dessa enzima é conhecido por estar localizado na parte inferior de sua cavidade. Três resíduos de aminoácidos - Ser200, His440 e Glu327 - compõem a tríade catalítica, desempenhando um papel fundamental na hidrólise da acetilcolina (SUSSMAN et al., 1991). Adicionalmente, os resíduos de aminoácidos presentes nos subsítios aniônico (Trp84 e Phe330) e periférico (Trp279) são cruciais para o reconhecimento do ligante (MILLARD et al., 1999; DVIR et al., 2010).

Na tabela 6 são apresentados os resultados do *docking* molecular entre os compostos majoritários das espécies de boldo e a enzima ache. Os valores de energia de ligação variaram

entre -9,0 e -10,4 kcal/mol, mostrando-se próximos ou superiores à energia de ligação do inibidor galantamina durante o *redocking* (-10,3 kcal/mol, RMSD 0,3693 Å).

Tabela 6 Resultado do *docking* molecular para as substâncias presentes no extrato das espécies de boldo.

Espécie	Compostos	Energia de ligação (Kcal/mol)	Principais interações
Composto de referência	Galantamina	-10,3	HB (Ser200, His440), PAI (Phe330), PSI (Trp84) PP (Phe331).
<i>P. ornatus</i>	Luteolina- <i>O</i> -glicosídeo	-10,4	HB (Gly118, Gly199, Glu199, Ser286, Phe288, Phe331, His440) PP (Trp279, Phe330).
<i>G. amygdalinum</i>	Apigenina 7- <i>O</i> -glicosídeo	-10,3	HB (Gly118, Gly199, Ser286), PAI (Ile287), CH (Ser200, His440) PP (Phe330).
<i>P. boldus</i>	<i>N</i> -metillaurotetanina	-10,2	HB (Gln69), CH (Tyr70, Glu199, Phe330, His440), PSI (Trp84) PP (Phe331).
<i>P. ornatus</i>	quercetina-3- <i>O</i> -hexosídeo	-10,1	HB (Trp84, Tyr121), CH (Gly118, His440), PSI (Trp84).
<i>P. boldus</i>	Isoboldina	-10,0	HB (Ser122), PAI (Phe330), PSI (Trp84) CH (Tyr70, Gly123, His440) PP (Phe331).
<i>P. boldus</i>	Laurolitsina	-9,9	HB (Trp84, Tyr121, Phe288, Arg289), CH (Asn85, Glu199) PP (Phe330).
<i>P. barbatus</i>	<i>O</i> -Hexosil <i>O</i> -metil quercetina	-9,8	HB (Tyr70, Asp72, Gly123), CH (His440) PP (Tyr121, Trp279, Phe330).
<i>P. barbatus</i>	Ácido rosmarínico	-9,7	HB (Ser200), CH (Ser122) PP (Trp84), PC (His440).
<i>G. amygdalinum</i>	3- <i>O</i> -ácido cafeoilquínico	-9,0	HB (Tyr121, Ser122, Phe331), CH (Gly118) PP (Tyr334).

HB- hydrogen bond; **PAI**- π -alkyl; **PSi**- π -sigma; **CH**-carbon hydrogen bond; **AC**-attractive charge; **PP**- π - π ; **PC**- π -cation.

As interações observadas para a galantamina (Figura 5) estão de acordo com as descritas por Bartolucci e colaboradores (2001). Destaca-se a formação de uma ligação de hidrogênio com os resíduos de Ser200 e His440, onde o átomo de oxigênio do grupo *O*-metil está envolvido. Além disso, observaram-se interações π -alquil e π -sigma com os resíduos do subsítio aniônico Phe330 e Trp84, respectivamente.

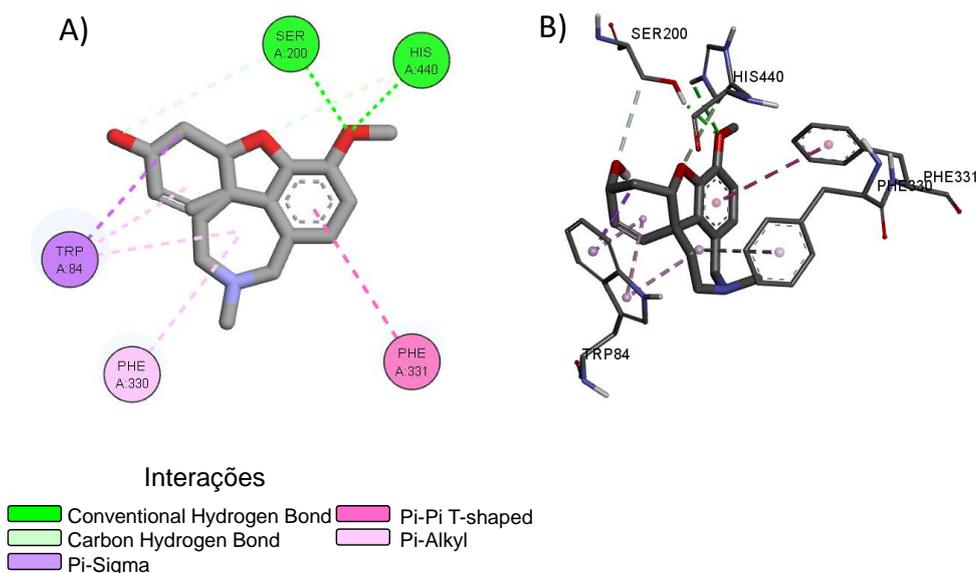


Figura 5. Principais interações identificadas para o complexo galantamina-AChE em 2D (A) e 3D (B).

Os flavonoides glicosilados Luteolina-*O*-glicosídeo, identificada no extrato de *P. ornatus* e Apigenina7-*O*-glicosídeo, identificada na amostra de *G. amygdalinum* demonstraram melhores atividades *in silico* em comparação com outros compostos Figura 6. Esses resultados podem ser atribuídos principalmente às interações de ligação de hidrogênio estabelecidas por esses compostos.

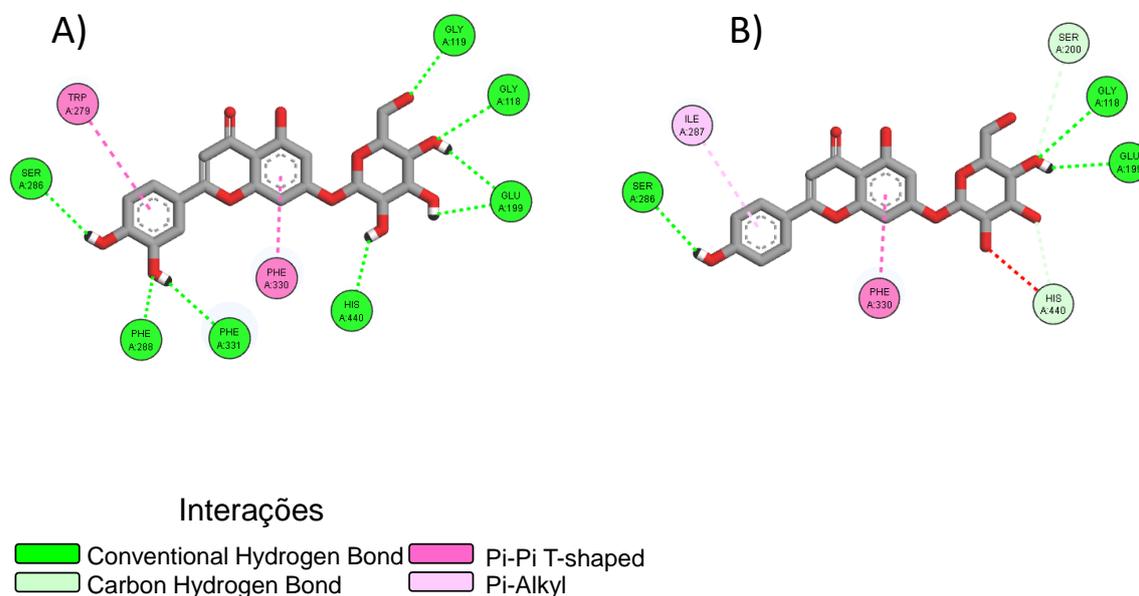


Figura 6. Principais interações observadas para os complexos Luteolina-*O*-glicosídeo-AChE (A) e Apigenina7-*O*-glicosídeo -AChE (B).

Os compostos Luteolina-*O*-glicosídeo e Quercetina-3-*O*-hexosídeo identificados em *P. ornatus* apresentaram alto potencial inibitório *in silico*. Esses flavonoides são comumente

encontrados em espécies do gênero *Plectranthus*. Ao analisar a atividade inibitória *in vitro* da AchE por flavonoides presentes no extrato de acetato de etila de espécies do gênero *Plectranthus*, Kubínová et al., (2019) verificaram que a quercetina apresentou o melhor potencial de inibição contra AchE, enquanto que os flavonoides glicosilados exerceram uma inibição moderada. Essa diferença pode estar relacionada ao tipo de extrato utilizado, bem como o teste *in vitro*.

Os flavonoides *O*-Hexosil *O*-metil quercetina e o Ácido rosmarínico identificados no extrato de *P. barbatus* apresentaram menor atividade *in silico* quando comparados com o padrão Galantamina e com os flavonoides encontrados em *P. ornatus*. No entanto, ao verificar na literatura, foi observado em teste *in vitro* por Falé et al., (2009) que os extratos aquosos de *P. barbatus* apresentaram alto potencial de inibição da AchE, sendo atribuído ao ácido rosmarínico, identificado como componente principal. Como o extrato aquoso estudado por Falé et al., (2009) foi obtido por decocção, sugere-se que o alto potencial inibitório da AchE observado pode estar relacionado com as concentrações de ácido rosmarínico, uma vez que o extrato preparado sob a forma de decocção apresenta um maior rendimento na extração de compostos.

O flavonoide glicosilado Apigenina 7-*O*-glicosídeo encontrado no extrato de *G. amygdalinum* apresentou potencial inibitório *in silico* frente a AchE igual ao do padrão galantamina. Por outro lado, o 3-*O*-ácido cafeoilquínico, outro composto encontrado no extrato, exibiu a menor atividade. Em uma investigação *in vitro* da atividade inibitória da AchE realizada por Carvalho (2014), observou-se um alto potencial inibitório, atribuído à presença de ácidos cafeoilquínicos, o que corrobora com os resultados encontrados nesse estudo.

Os alcaloides *N*-metil-coclaurina, Laurolitsina, Isoboldina e *N*-Metil-laurotetanina identificados nos extratos de *P. boldus* apresentaram alta atividade de inibição *in silico* com valores de energia de ligação entre -9,9 e -10,2 kcal/mol, mostrando-se próximos à energia de ligação do inibidor galantamina. Em ensaio *in silico* anterior realizado pelo nosso grupo de pesquisa, verificou-se que o alcaloide *N*-metillaurotetanina exibiu o melhor ligante de inibição da enzima acetilcolinesterase, com energia de -10,1 kcal/mol Silva et al., (2022). No teste *in silico* do presente estudo obtivemos o mesmo resultado para *N*-metillaurotetanina com valor de energia de ligação de -10,2 kcal/mol, sendo o melhor inibidor da enzima acetilcolinesterase dentre os alcaloides. De acordo com Fale et al., (2009), atividade de inibição da AchE pode ser também atribuída aos derivados de flavonóides glicosilados, sendo necessário fazer novos ensaios *in silico* com os flavonoides encontrados nas infusões do presente estudo.

CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que os compostos fenólicos Apigenina-7-*O*-glicosídeo, luteolina-7-*O*-glicosídeo, catequina, quercetina e rutina estão abundantemente presentes nas espécies de boldo. Nesse sentido, sugere-se que as atividades biológicas observado para essas espécies pode estar relacionado principalmente a presença dos derivados desses compostos.

As amostras da espécie *P. boldus*, apresentaram atividades antioxidantes superiores em relação as espécies *in natura*, e dessa forma, devem proporcionar maiores benefícios terapêuticos no tratamento de condições ligadas ao estresse oxidativo.

Os resultados da atividade alelopática indicam que houve efeito inibitório na germinação de sementes de alface pelo extrato por infusão de folhas de *P. boldus* e *G. amygdalinum*. *P. boldus* apresentou resultados mais expressivos quando comparados com a espécie *G. amygdalinum*. Isso pode estar relacionado com a presença tanto de alcaloides quanto de compostos fenólicos, na composição química de *P. boldus*. Dessa forma, sugere-se moderação e cuidado no consumo das infusões de *P. boldus*, uma vez que apresentou alta capacidade fitotóxica frente a sementes de alface.

As espécies *P. barbatus* e *P. ornatus* não apresentaram nenhuma atividade alelopática, o que pode ser explicado pela ausência de alguns compostos comumente encontrados nas folhas dessas espécies. Os testes antifúngicos apresentaram baixa inibição para *Candida albicans* para todas as espécies de boldo. Assim, torna-se importante conduzir estudos futuros testando diferentes extratos das espécies de boldo em outros microrganismos.

No teste *in silico* por docagem molecular, observou-se que os flavonoides identificados nas infusões das espécies *P. barbatus*, *P. ornatus* e *G. amygdalinum* apresentaram valores de energia de ligação próximos ou superiores à energia de ligação do inibidor galantamina, sugerindo atividade inibitória da AChE. Como a galantamina é reconhecida por sua eficácia na inibição da AChE, os resultados indicam que os flavonoides presentes nessas plantas têm potencial para inibir essa enzima, que pode explicar seu uso popular para tratar problemas digestivos, além de indicar que pode ser benéfico para o tratamento de condições neurológicas como a doença de Alzheimer, onde a inibição da AChE é um alvo terapêutico importante. Os alcaloides identificados nas folhas dos chás de *P. boldus* também apresentaram alto potencial para inibir a AChE, exibindo valores de energia de ligação próximos aos da galantamina. Além disso, *P. boldus* também contém derivados da luteolina na composição química das folhas, os quais exibiram alto potencial inibitório da AChE no teste *in silico*. Dessa forma, sugere-se que a interação entre alcaloides e flavonoides contribuem para o valor global das atividades

apresentadas para as amostras de *P. boldus*, o que pode justificar o alto potencial antioxidante e alelopático observados neste estudo, e provavelmente potencial atividade de inibição da AChE. Esses resultados podem contribuir para compreender melhor alguns dos usos tradicionais descritos para essa planta na etnofarmacologia e para orientar o uso seguro de suas infusões por parte da população em geral. No entanto, faz-se necessário estudos futuros de ensaios *in vitro* de inibição da AChE dos extratos aquosos das folhas de *P. boldus*, bem como ensaio *in silico* dos flavonoides identificados nos chás dessa espécie no presente estudo.

"REFERÊNCIAS

AQUILA, Maria Estefânia Alves, FERREIRA, Alfredo Gui. ALELOPATIA: UMA ÁREA EMERGENTE DA ECOFISIOLOGIA. **R. Bras.Fisiol.Veg.**, [S. l.], v. 12, n. especial, p. 175–204, 2000. Disponível em: <https://www.esalq.usp.br/LPV/sites/default/files/4%20-%20Referencia%2011%20-%20Alelopatia%20na%20agricultura.pdf>.

ARAÚJO, Sthéfane Guimarães; LIMA, William Gustavo; AMARAL PINTO, Maria Eduarda; MORAIS, Marcela Ísis; PEREIRA DE SÁ, Nívea; JOHANN, Susana; ROSA, Carlos Augusto; ALVES RODRIGUES DOS SANTOS LIMA, Luciana. Pharmacological prospection in-vitro of Lamiaceae species against human pathogenic fungi associated to invasive infections. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [S. l.], v. 21, p. 101345, 2019. DOI: [10.1016/j.bcab.2019.101345](https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101345). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878818119311478>. Acesso em: 27 abr. 2024.

AZAMBUJA, Natasha; EMILIO FLORES HOFFMANN, Clairomar; AUGUSTO SALLES DAS NEVES, Luiz. Potencial alelopático de *Plectranthus barbatus* Andrews na germinação de sementes de *Lactuca sativa* L. e de *Bidens pilosa* L. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 66–73, 2010. Disponível em: [https://www.bvs-vet.org.br/vetindex/periodicos/revista-de-ciencias-agroveterinarias/9-\(2010\)-1/potencial-alelopatico-de-plectranthus-barbatus-andrews-na-germinacao-d/](https://www.bvs-vet.org.br/vetindex/periodicos/revista-de-ciencias-agroveterinarias/9-(2010)-1/potencial-alelopatico-de-plectranthus-barbatus-andrews-na-germinacao-d/). Acesso em: 2 maio. 2024.

BITTNER, Magalis; AGUILERA, Milenko A.; HERNÁNDEZ, Víctor; ARBERT, Cecilia; BECERRA, José; CASANUEVA, María E. Fungistatic Activity Of Essential Oils Extracted from *Peumus boldus* Mol., *Laureliopsis philippiana* (Looser) Schodde and *Laurelia sempervirens* (Ruiz & Pav.) Tul. (Chilean Monimiaceae). **Chilean journal of agricultural research**, [S. l.], v. 69, n. 1, p. 30–37, 2009. DOI: [10.4067/S0718-58392009000100004](https://doi.org/10.4067/S0718-58392009000100004). Disponível em: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0718-58392009000100004&lng=en&nrm=iso&tlng=en. Acesso em: 27 abr. 2024.

CORDEIRO, M. F. et al. Phytochemical characterization and biological activities of *Plectranthus barbatus* Andrews. **Brazilian Journal of Biology**, [S. l.], v. 82, p. e236297, 2021. DOI: [10.1590/1519-](https://doi.org/10.1590/1519-)

6984.236297. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjb/a/knPZMTQCz9jL3hvsyQFVqw/?lang=en>.

Acesso em: 28 nov. 2023.

FALÉ, Pedro L. *et al.* Rosmarinic acid, scutellarein 4'-methyl ether 7-O-glucuronide and (16S)-coleon E are the main compounds responsible for the antiacetylcholinesterase and antioxidant activity in herbal tea of *Plectranthus barbatus* (“falso boldo”). **Food Chemistry**, [s. l.], v. 114, n. 3, p. 798–805, 2009.

Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814608012272>. Acesso em: 7 dez. 2023.

HOSSAIN, Mohammad B. *et al.* Characterization of Phenolic Composition in Lamiaceae Spices by LC-ESI-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 58, n. 19, p. 10576–10581, 2010.

Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf102042g>. Acesso em: 29 fev. 2024.

MAGAÑA, Armando Alcázar; KAMIMURA, Naofumi; SOUMYANATH, Amala; STEVENS, Jan F.; MAIER, Claudia S. Caffeoylquinic acids: chemistry, biosynthesis, occurrence, analytical challenges, and bioactivity. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, [S. l.], v. 107, n. 5, p. 1299–1319, 2021.

DOI: [10.1111/tpj.15390](https://doi.org/10.1111/tpj.15390).

Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9084498/>. Acesso em: 24 abr. 2024.

MOSER, Jeniffer Cristóvão *et al.* Role of K⁺ and Ca²⁺ Channels in the Vasodilator Effects of *Plectranthus barbatus* (Brazilian Boldo) in Hypertensive Rats. **Cardiovascular Therapeutics**, [s. l.], v. 2023, p. e9948707, 2023.

Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/cdtp/2023/9948707/>.

Acesso em: 7 fev. 2024.

MOTHANA, Ramzi A.; AL-SAID, Mansour S.; AL-MUSAYEIB, Nawal M.; GAMAL, Ali A. El; AL-MASSARANI, Shaza M.; AL-REHAILY, Adnan J.; ABDULKADER, Majed; MAES, Louis. In Vitro Antiprotozoal Activity of Abietane Diterpenoids Isolated from *Plectranthus barbatus* Andr.

International Journal of Molecular Sciences, [S. l.], v. 15, n. 5, p. 8360–8371, 2014. DOI:

[10.3390/ijms15058360](https://doi.org/10.3390/ijms15058360). Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/15/5/8360>. Acesso em: 1

dez. 2023.

PETERSEN, M.; SIMMONDS, M. S. J. Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, v. 62, n. 2, p. 121–125, jan.

2003. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942202005137>>.

PELEGRINI, L. L.; CRUZ-SILVA, C. T. A. Variação sazonal na alelopatia de extratos aquosos de *Coleus barbatus* (A.) Benth. sobre a germinação e o desenvolvimento de *Lactuca sativa* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [S. l.], v. 14, n. 2, p. 376–382, 2012. DOI:

[10.1590/S1516-](https://doi.org/10.1590/S1516-05722012000200019)

[05722012000200019](https://doi.org/10.1590/S1516-05722012000200019). Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722012000200019&lng=pt&tlng=pt)

[05722012000200019&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722012000200019&lng=pt&tlng=pt). Acesso em: 2 maio. 2024.

SIDDIQUI, Sazada *et al.* Allelopathic and Cytotoxic Effects of Medicinal Plants on Vegetable Crop Pea (*Pisum sativum*). **CYTOLOGIA**, [s. l.], v. 83, n. 3, p. 277–282, 2018. Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/cytologia/83/3/83_D18-00015/_article. Acesso em: 24 abr. 2024.

TOLEDO, oliveira toledo et al. Interferência alelopática do chá de boldo-do-chile (*Peumus boldus* Molina, Monimiaceae) sobre sementes de alface e pepino. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, v. 15, n. 3, p. 180–187, 18 nov. 2016. Disponível em: <<http://www.revistas.udesc.br/index.php/agroveterinaria/article/view/223811711532016180>>

TSAGKARIS, Aristeidis S.; LOUCKOVA, Anna; JAEGEROVA, Tereza; TOKAROVA, Viola; HAJLSLOVA, Jana. The In Vitro Inhibitory Effect of Selected Asteraceae Plants on Pancreatic Lipase Followed by Phenolic Content Identification through Liquid Chromatography High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS). **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 23, n. 19, p. 11204, 2022. DOI: [10.3390/ijms231911204](https://doi.org/10.3390/ijms231911204). Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/19/11204>. Acesso em: 14 mar. 2024.

VERAS, Kleyton Santos; ALEGRE, Porto. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL FACULDADE DE FARMÁCIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS. [S. l.], 2017.

Vila R, Valenzuela L, Bello H, Cañigüeral S, Montes M, Adzet T. Composição e atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Peumus Boldus*. *Planta Med* 1999; 65: 178-9.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na análise cienciométrica observou-se uma escassez de estudos sobre os extratos aquosos obtidos por infusão de plantas medicinais de uso tradicional, assim como investigações relacionadas ao potencial inibitório da enzima acetilcolinesterase pelos constituintes químicos dessas plantas.

Os resultados deste estudo indicam que as espécies de boldo analisadas compartilham uma presença significativa de vários compostos fenólicos, possivelmente contribuindo para a atividade antioxidante observada, o que pode explicar algumas propriedades medicinais comuns entre essas espécies, bem como a mesma denominação popular. Além disso, as amostras da espécie *P. boldus*, apresentaram atividades antioxidantes superiores em relação as espécie *in natura*, e dessa forma, devem proporcionar maiores benefícios terapêuticos no tratamento de condições ligadas ao estresse oxidativo.

Os testes *in silico* de inibição da AChE revelaram que os flavonoides das infusões de *P. barbatus*, *P. ornatus* e *G. amygdalinum* e os alcalóides identificados na amostra de *P. boldus* apresentaram alto potencial inibitório da AChE, o que pode explicar seu uso tradicional no tratamento de problemas digestivos e neurológicos.

Portanto, este estudo contribui para o conhecimento químico e biológico dessas espécies, o que é fundamental para garantir a segurança e eficácia no uso do chá de boldo, bem como para o desenvolvimento de novos medicamentos.

Estudos futuros são necessários para identificar outras classes de metabólitos que provavelmente contribuem para a atividades biológicas presente nas infusões das folhas das espécies de boldo *in natura*, bem como investigar outras atividades biológicas compartilhadas, como o potencial anticolinesterásico, e o papel da atividade antioxidante na proteção dos neurônios dos processos oxidativos gerados pela doença de Alzheimer.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. A.; MING, T. D.; CORRÊA, C. L.; & LAVINAS, T. Verificação da qualidade dos fitoterápicos sene e boldo-do-chile comercializados na região de Campinas. **Revista de Ciências Médicas**, v. 14, n. 3, 2012.
- AZEVEDO, S. G.; MAR, J.M.; DA SILVA, L. S.; FRANÇA, L. P.; MACHADO, M. B.;
- TADEI, W. P.; BEZERRA, J. de A.; DOS SANTOS, A. L.; SANCHES, E.A. Bioactivity of *Licaria puchury*-major Essential Oil Against *Aedes aegypti*, *Tetranychus urticae* and *Cerataphis lataniae*. **Rec. Nat. Prod.**, [s. l.], v. 12, ed. 3, p. 229-238, 2018.
- ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. A.; GONSALVES, A. A. Acetilcolinesterase - AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico. *Revista Virtual de Química* **2016**, 8, 1818. [CrossRef].
- BATTISTI, C.; GARLET, T. M. B.; ESSI, L.; HORBACH, R. K.; DE ANDRADE, A.; BADKE, M. R. Plantas medicinais utilizadas no município de Palmeira das Missões, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, ano 2013, v. 11, n. 3, p. 338-348, 3 nov. 2021. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/2457>. Acesso em: 19 out. 2021.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna SP: Embrapa Meio Ambiente, 2009. 341 p.
- BOLINA, R. C., GARCIA, E. E., DUARTE, M. G. R. Estudo comparativo da composição química das espécies vegetais *Mikaniaglomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker. **Rev. bras. farmacogn.** vol.19 no.1b, 2009.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Ministério da Saúde.
- Apresentações sobre “Traditional Medicine”**. Brasília, 20 de abril de 2014. Disponível em: <www.anvisa.gov.com.br>. Acesso em: 13.10.2021.
- COSTA, F. H. M. **Caracterização da composição química de extratos de boldos in natura e produtos comerciais derivados do boldo**. 2017. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2017. p. 62. Disponível em: <http://acervo.ufvjm.edu.br/jspui/handle/1/1590>. Acesso em: 28 out. 2021.
- CORDEIRO, M. F.; NUNES, T. R. S.; BEZERRA, F. G.; DAMASCO, P. K. M.; SILVA, W. A. V.; FERREIRA, M. R. A.; MAGALHÃES, O. M. C.; SOARES, L. A. L.; CAVALCANTI, I. M. F.; PITTA, M. G. R.; RÊGO, M. J. B. M. Phytochemical characterization and biological activities of *Plectranthus barbatus* Andrews. **Brazilian Journal of Biology**, [s. l.], ano 2022, v. 82, p. 1-12, 2020. DOI <https://doi.org/10.1590/1519-6984.236297>. Disponível em: <https://www.scielo.br>. Acesso em: 1 nov. 2021.

DE CASTRO, Débora Silva Borges et al. Larvicidal activity of essential oil of *Peumus boldus* Molina and its ascaridole-enriched fraction against *Culex quinquefasciatus*. *Experimental parasitology*, v. 171, p. 84-90, 2016.

DUTRA, J. C. V. **Caracterização fisiológica, fitoquímica e de atividades biológicas de plantas medicinais com potencial econômico para produção de fitoterápicos**. 2019. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, 2019. p. 194. Disponível em: <http://repositorio.ufes.br/handle/10/11382>. Acesso em: 19 out. 2021.

ESTEVES, C. O.; RODRIGUES, R. M.; MARTINS, A. L. D.; VIEIRA, R. DA.; BARBOSA, J. L.; VILELA, J. B. F. Medicamentos fitoterápicos: prevalência, vantagens e desvantagens de uso na prática clínica e perfil e avaliação dos usuários. **Revista de Medicina**, São Paulo, ano 2020, v. 99, ed. 5, p. 463-472, 2020. DOI <https://doi.org/10.11606/issn.16799836.v99i5p463472>. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/revistadc/article/view>. Acesso em: 27 out. 2021.

2021.

MACHADO, C. A.; VARGAS, J. F. DR. Plantas Medicinais do Jardim Botânico de Porto

Alegre. Porto Alegre: Escola de Saúde Pública, 2018. 110 p. v. único. ISBN 978-85-60517213. Disponível em: <https://saude.rs.gov.br/upload/arquivos/carga20190154/17115411-ebookplantas-medicinais.pdf>. Acesso em: 27 out. 2021.

O'BRIEN, P., C. CARRASCO-POZO & H. SPEISKY. **Chem. Biol. Interact.** 159: 1-17, 2006. PEIXOTO, A. L., LÍRIO, E. J. Monimiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015.

OLIVEIRA, F. B. M.; MOURA, M. E. B.; NUNES, B.; OLIVEIRA, B. M. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma reflexão no tratamento das infecções hospitalares. **Revista Interdisciplinar NOVAFAPI**, v. 4, n. 4, p. 72-77, 2011.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin J. Sci. Technol**, [s. l.], v. 26, ed. 2, p. 211-219., 2004.

RIBEIRO, F. F.; DA CONCEIÇÃO, L. D. O., OYAMA, E. M., & FURLAN, M. R. Boldo Verdadeiro X Boldo Falso: Caracterização Morfoanatómica Foliar. **Visão Acadêmica**, [S.l.], v. 18, n. 3, set. 2017.

RIJO, P., RODRÍGUEZ, B., DUARTE, A., SIMÕES, M. F. Antimicrobial properties of *Plectranthus ornatus* extracts, 11-acetoxyhalima-5, 13-dien-15-oic acid metabolite and its derivatives. **Journal of Natural Products**, n. 1, p. 57-64. 2011.

RISSE, W.E. Estudo da atividade antinociceptiva e análise exploratória da composição química dos extratos das folhas de *Vernonia condensata* Baker. Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2008.

SOARES, F. P.; FREIRE, N. M.; SOUZA, T. R. Avaliação farmacognóstica e da rotulagem das drogas vegetais boldo-do-chile (*Peumus boldus* Molina) e camomila (*Matricaria recutita* L.) comercializadas em Fortaleza, CE. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 3, p. 468-472, 2015.

SCHWANZ, M.; NUNES, E.; KONRATH, E. L.; VENDRUSCOLO, G. S.; VIGNOLISILVA, M.; HENRIQUES, A. T. & MENTZ, L. A. Caracterização farmacobotânica de *Peumus boldus* (Monimiaceae) e avaliação de atividades biológicas do alcaloide boldina. **Lat. Am. J. Pharm**, v. 27, n. 6, p. 871-9, 2008.

TOLEDO, A.M.O., ULGUIM, P.S., KAESER, S.S.; GOMES, F.T. Interferência alelopática do chá de boldo-do-chile (*Peumus boldus* Molina, Monimiaceae) sobre sementes de alface e pepino. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v.15, n.3, p.180-187, 2016.