

UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO

SILVÉRIA MARIA PEIXOTO LARÊDO

ESTRUTURA GENÉTICA E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA
DE *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl

RIBEIRÃO PRETO

2020

SILVÉRIA MARIA PEIXOTO LARÊDO

ESTRUTURA GENÉTICA E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA
DE *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP, como requisito para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Bianca Waleria Bertoni

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Soares Pereira

RIBEIRÃO PRETO

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento
Técnico da Biblioteca Central da UNAERP
- Universidade de Ribeirão Preto -

L321e Larêdo, Silvéria Maria Peixoto, 1962-
Estrutura genética e avaliação farmacológica de *Stachytarpheta
Cayennensis* (Rich.) Vahl / Silvéria Maria Peixoto Larêdo. - -
Ribeirão Preto, 2020.
87 f.: il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Bianca Waleria Bertoni

Tese (doutorado) - Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP,
Biotecnologia. Ribeirão Preto, 2020.

1. Plantas Medicinais. 2. Marcadores Moleculares.
3. Microsatélite. I. Título.

CDD 660.6

SILVÉRIA MARIA PEIXOTO LARÊDO

ESTRUTURA GENÉTICA E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE
STACHYTARPHETA CAYENNENSIS (RICH.) VAHL.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto, para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde

Data da defesa: 29 de setembro de 2020

Resultado: Aprovada

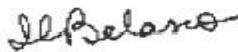
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Bianca Waléria Bertoni
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP



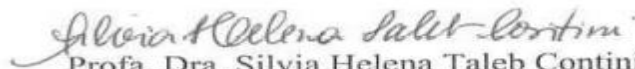
Prof. Dr. Rinaldo Eduardo Machado de Oliveira
Universidade de São Paulo - USP



Prof. Dra. Isabel Cristina Belasco
Universidade Federal do Sul da Bahia - UFSB



Prof. Dra. Edneidia Souza Pina
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP



Prof. Dra. Silvia Helena Taleb Contini
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP

RIBEIRÃO PRETO

DEDICATÓRIA

“Dedico esse trabalho à Alessandro Pierini (in memoriam), meu maior incentivador. Como gostaria que você estivesse aqui hoje ...”

AGRADECIMENTOS

Obrigada Senhor por me apresentar enfrentamentos cada vez mais difíceis em minha vida, pois, com eles vieram também pessoas boas e especiais em meu caminho.

Algumas me inspiraram (Juliana Coppede e Profa. Ana Maria), uns me ajudaram (Simone Torres, Camila Guimarães e Lucas Junqueira), outros me encorajaram (tia Léia, Lisa e Marcus), uma me desafiou (Profa. Bianca Bertoni), ao mesmo tempo mostrou meu potencial e confiou em mim.

Mas todos, fizeram de mim, um ser genuinamente melhor, a cada dia!

"Mas aqueles que esperam no Senhor renovam as suas forças.

Voam alto como águias; correm e não ficam exaustos, andam e não se cansam."

Isaías 40:31

RESUMO

Estrutura genética e avaliação farmacológica de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. 87p. Tese de Doutorado - Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2020.

Stachytarpheta cayennensis é originária do continente americano e ocorre espontaneamente em todos os biomas brasileiros. Esta espécie pertence a família Verbenaceae e é conhecida popularmente como gervão, apresenta diversas atividades farmacológicas como anti-oxidante e anti-inflamatória, sendo o verbascosídeo um dos principais compostos responsável por essas ações terapêuticas. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a espécie *S. cayennensis* do ponto de vista, genético, químico e farmacológico, visando disponibilizar acessos para as Farmácias Vivas. Foram utilizados marcadores moleculares para estudo da diversidade genética, CLAE para a avaliação da diversidade química e testes de inibição da enzima MAO-A e redução do radical DPPH, para avaliação da atividade ansiolítica e anti-oxidante. Não foi possível transferir os primers de microssatélite desenvolvidos com *Lippia alba* para *S. cayennensis*, apesar de pertencerem a mesma família (*Verbenaceae*) e o marcador molecular CAPS não identificou a existência de quimiotipos. Os ensaios com SCoT evidenciaram a presença de diversidade genética e a quantificação em CLAE mostrou que os acessos avaliados apresentaram diversidade quanto ao teor de verbascosídeo. O extrato de *S. cayennensis* apresentou atividade antioxidante, entretanto não inibiu a enzima MAO-A. Os dados obtidos no presente trabalho serão úteis para selecionar acessos mais adequados para a produção de fitoterápico em Farmácia Viva a partir de *S. cayennensis*

Palavras-chave: Plantas Medicinais, Marcadores Moleculares, Microssatélite, CAPS, SCoT, Coleção.

ABSTRACT

Genetic Structure and *Stachytarpheta-cayennensis* pharmacological evaluation (Rich.) Vahl. 87p. Doctoral Thesis - Ribeirão Preto University, Ribeirão Preto, 2020.

Stachytarpheta cayennensis is originally from the American continent and spontaneously occurs in all Brazilian biomes. This species belongs to the Verbenaceae family, which is popularly known as “gervão”, it presents many pharmacological activities such as anti-oxidant and anti-inflammatory, being the verboscoside one of the main compound responsible for those therapeutic actions. The objective of this work was to evaluate the species *S. Cayennensis* from genetic, chemical and pharmacological points of view in order to provide the elected accessions for Living Pharmacies. Molecular markers were used to study genetic diversity, CLAE was used for evaluation of chemical diversity, inhibition tests from MAO-A enzyme and reduction of the DPPH radical in order to evaluate anxiolytic and antioxidant activity. Although they belong to the same family (*Verbenaceae*), it was not possible to transfer microsatellite primers developed with *Lippia alba* to *S. Cayennensis*, that’s why the CAPS molecular marker could not identify the existence of chemotypes. The tests with SCoT markers pointed genetic diversity presence, while the CLAE quantification showed that the evaluated accessions presented diversity in terms of verboscoside content. The extract from *S. Cayennensis* pointed antioxidant activity, however it did not inhibit the MAO-A enzyme. The data obtained in this work will be useful to select the most appropriate accessions for the production of phytotherapy in Living Pharmacies from *S. cayennensis*.

Keywords: Medicinal Plants, Molecular Markers, Microsatellite, CAPS, SCoT, Collection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Visão geral da espécie <i>Stachytarpheta cayennensis</i> (Rich.)Vahl.	21
Figura 2 -	Estrutura da molécula de verbascosídeo	22
Figura 3 -	Análise eletroforética da extração de DNA	56
Figura 4 -	Perfil do gel de agarose via PCR com utilização de primers	57
Figura 5 -	Perfil do gel de agarose via PCR com utilização de primers em diferentes temperaturas. Grupo 10 (62,2 °C), Grupo 11 (64 °C) e Grupo 12 (65,10 °C)	57
Figura 6 -	Dendograma da distância genética de Jaccard pelo método de agrupamento UPGMA em indivíduos de <i>Stachytarpheta cayennensis</i> utilizando o marcador molecular CAPS	59
Figura 7 -	Resultado da amplificação da reação de PCR utilizando marcador molecular SCoT	60
Figura 8 -	Dendograma da distância genética de Jaccard pelo método de agrupamento UPGMA em indivíduos de <i>Stachytarpheta cayennensis</i> utilizando o marcador molecular SCoT	62
Figura 9 -	Análise das coordenadas principais (PCoA) em indivíduos de <i>Stachytarpheta cayennensis</i>	63
Figura 10 -	Grupos gênicos de indivíduos de <i>Stachytarpheta cayennensis</i> analisados através do programa STRUCTURE. A mesma cor para genótipos diferentes, indica que eles pertencem ao mesmo grupo. Cores diferentes no mesmo indivíduo indica a porcentagem do genoma compartilhado com cada grupo	65
Figura 11 -	Cromatograma obtido do extrato aquoso	66
Figura 12 -	Análise de agrupamento entre os constituintes químicos para cada indivíduo de <i>Stachytarpheta cayennensis</i>	68
Figura 13 -	Dendograma baseado na matriz genética obtido utilizando o marcador molecular SCoT em indivíduos de <i>Stachytarpheta cayennensis</i>	69
Figura 14 -	Comparação entre a capacidade antioxidante dos extratos aquoso e hidroalcolico de <i>Stachytarpheta cayennensis</i>	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Propriedades terapêuticas <i>Stachytarpheta cayennensis</i> (Rich.) Vahl, descritas em literatura científica realizada por vários autores em diversos países entre os anos de 1997 a 2020	25
Tabela 2 -	Primers das sequências de marcador molecular SCoT	31
Tabela 3 -	Identificação dos locais de coleta e procedência dos acessos de <i>Stachytarpheta cayennensis</i> utilizados na pesquisa	42
Tabela 4 -	Sequências dos locus microssatélites desenvolvidos por Rocha et al. (2015), para a espécie <i>Lippia alba</i>	45
Tabela 5 -	Número e porcentagem de bandas polimórficas obtidas por primers SCoT na análise molecular dos indivíduos de <i>Stachytarpheta cayennensis</i>	60
Tabela 6 -	Resultado do teste de média realizado entre os indivíduos conservados em ambas as coleções	67
Tabela 7 -	Capacidade antioxidante do extrato aquoso de <i>Stachytarpheta cayennensis</i> frente ao radical DPPH	71
Tabela 8 -	Capacidade antioxidante do extrato hidroalcolico de <i>Stachytarpheta cayennensis</i> frente ao radical DPPH	71
Tabela 9 -	IC50 dos extratos hidroalcolico e aquoso de <i>Stachytarpheta cayennensis</i> e do controle positivo rutina, frente ao radical DPPH	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequences
CLAE - UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector - Ultravioleta
COFEN	Conselho Federal de Enfermagem
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
DMSO	Solução de Sulfóxido de Dimetilo/Demethyl Sulphoxide
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetra Acético
EPS	Electrophoresis Power Supply
GPS	Sistema de Posicionamento Global
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IMAO	Inibidores da Enzima Monoamina Oxidase
MAO	Monoamina Oxidase
MgCl	Cloreto de Magnésio
MS	Ministério da Saúde
NaCl	Cloreto de Sódio
Pb	Pares de Base
PCoA	Principal Coordinates Analysis
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Potencial Hidrogeniônico
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
PVP	Polivinilpirrolidona
RAPD	Random Amplified Polymorphism DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
rpm	Rotação por minuto
RT	Tempo de Retenção/ Retention Time
SCoT	Start Codon Targeted

SISVAR	Sistema para Análise de Variância de Dados Balanceados
SSLP	Simple Sequence Length Polymorphis
SSR	Simple Sequence Repeats
STRs	Short Tandem Repeats
SUS	Sistema Único de Saúde
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris Base, Ácido Bórico
TNT	Tecido não tecido
UPGMA	Unweighted Pair Group Methol With Arithmetic Mean
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Aspectos Históricos e Legais	17
2.2 Conservação de Planta Medicinal	19
2.3 Espécie Alvo - <i>Stachytarpheta cayennensis</i> (Rich.) Vahl	20
2.3.1 Caracterização Morfológica e Química	20
2.3.2 Propriedades Terapêuticas	23
2.4 Caracterização Molecular	26
2.4.1 Microsatélite	26
2.4.2 CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences)	28
2.4.3 SCoT (Start Codon Targeted).....	30
2.5 Caracterização Química	32
2.6 Teste de Inibição Enzimática MAO-A	33
2.7 Redução do radical DPPH (2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl)	34
3. JUSTIFICATIVA	35
4. HIPÓTESE	37
5. OBJETIVOS	39
5.1 Objetivo geral	40
5.2 Objetivos específicos	40
6. MATERIAIS E MÉTODOS	41
6.1 Coleta das amostras	42
6.2 Caracterização Molecular	43
6.2.1 Extração do DNA Genômico	43
6.2.2 Teste de transferibilidade de Microsatélite	44
6.2.3 CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences)	46
6.2.4 SCoT (Start Codon Targeted)	47
6.3 Caracterização Química	48
6.3.1 Preparo do material vegetal	48
6.3.2 Preparo do extrato aquoso	48
6.3.3 Cromatografia Líquida de alta Eficiência com Detector de Ultravioleta	49
6.4 Análise dos Dados Moleculares e Fitoquímicos	49
6.5 Inibição Enzimática MAO A	50
6.5.1 Preparação das amostras e extratos	50

6.5.2 Reagentes e padrões	51
6.5.3 Atividade de Inibição da MAO-A	51
6.5.4 Análise dos Dados da Inibição da MAO-A	52
6.6 Ensaio de atividade antioxidante em <i>Stachytarpheta cayennensis</i> (Rich.) Vahl	52
6.6.1 Preparo da Solução DPPH (0,004 %)	52
6.6.2 Preparo dos extratos para ensaio de atividade antioxidante.....	52
6.6.3 Preparo das soluções e leitura em espectrofotômetro a 517nm	53
6.6.4 Análise dos Dados da atividade antioxidante dos extratos	53
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
7.1 Caracterização Molecular	56
7.1.1 Extração e Integridade do DNA Genômico.....	56
7.1.2 Amplificação por PCR e variabilidade Genética utilizando marcador molecular Microssatélites	56
7.1.3 Amplificação por PCR e variabilidade Genética utilizando marcador molecular CAPS	58
7.1.4 Amplificação por PCR e variabilidade Genética utilizando marcador molecular SC _{nt} T	59
7.2 Caracterização Química	66
7.3 Atividade de inibição da enzima MAO-A	70
7.4 Atividade antioxidante dos extratos hidroalcolico e aquoso de <i>Stachytarpheta cayennensis</i> frente ao radical DPPH	70
8. CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

1 INTRODUÇÃO

A possibilidade de curar doenças e aliviar dores a partir de recursos naturais, sempre foi um grande estímulo para a ciência. Assim, a utilização das plantas medicinais no combate às doenças são tão antigas quanto à própria existência do homem.

Acredita-se que o uso de plantas medicinais faz parte da evolução humana, sendo esses os primeiros recursos terapêuticos utilizados pelos povos, antecedendo inclusive o aparecimento da escrita, visto que o homem já utilizava as plantas como alimento e medicamento, com experiências de sucessos e fracassos, levando algumas vezes a cura, sem outros efeitos colaterais severos, e em alguns casos ao óbito.

As plantas medicinais e aromáticas vêm ganhando destaque nacional, seja por sua vasta biodiversidade, seja pela importância de sua utilização como produtos farmacêuticos, cosméticos e alimentícios.

Dentre elas, destacamos *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl, que embora seja uma espécie amplamente utilizada para fins fitoterapêuticos, apresenta uma escassez de estudos voltados para seus aspectos genético, farmacológico e fitoquímico.

Assim, para que a utilização da espécie seja ampliada, há necessidade de estudos sobre a diversidade genética, a variação dos constituintes químicos e seu potencial antioxidante.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Para o Ministério da Saúde, uma planta medicinal é uma espécie vegetal, utilizada para fins terapêuticos, podendo ser cultivada ou não, enquanto que fitoterápico é um produto que se origina de plantas medicinais ou de seus derivados, utilizados com finalidade profilática, curativa ou paliativa (BRASIL, 2006).

2.1 Aspectos Históricos e Legais

Acredita-se que as plantas medicinais estejam presentes desde 2.500 aC. Tudo leva a crer que muitos documentos antigos tenham se perdido com o incêndio da biblioteca de Alexandria em 391 dC. Pode-se afirmar que há 2.000 anos antes do aparecimento dos primeiros médicos gregos, já existia medicina egípcia, cujos os achados arqueológicos foi denominado papiro de Ebers apontaram para a utilização de mais de mil espécies de plantas medicinais por essa civilização (FUNDAÇÃO HERBARIUM DE SAÚDE E PESQUISA, 2008). Fica evidente que as plantas medicinais usadas na profilaxia e cura das doenças são tão antigas quanto à própria humanidade e grande parte dos conhecimentos postos em prática hoje, são frutos do conhecimento de ancestrais de civilizações remotas.

No Brasil, a história da utilização de plantas, no tratamento de doenças apresenta influências da cultura africana, indígena e européia, fato inerente à sua descoberta e a colonização. A contribuição dos escravos africanos se deu por meio das plantas que trouxeram consigo, muitas eram utilizadas em rituais religiosos e também por suas propriedades farmacológicas, empiricamente descobertas. Os índios que aqui viviam, utilizavam grande quantidade de plantas medicinais e, por intermédio dos pajés, este conhecimento das ervas locais e seus usos foram transmitidos e aprimorados de geração em geração (LORENZI; MATTOS, 2002). Esses autores também mencionam que os europeus que chegaram ao Brasil depararam-se com estes conhecimentos, que foram absorvidos por aqueles que passaram a viver no país e a sentir a necessidade de viver do que a natureza lhes tinha a oferecer, e também pelo contato com os índios que passaram a auxiliá-los como “guias”. Tais fatos fizeram com que os europeus ampliassem seu contato com a flora medicinal brasileira e a utilizassem para satisfazer suas necessidades alimentares e medicamentosas.

Sabe-se que no Brasil, desde o período colonial, o uso de plantas medicinais já era prática comum dos indígenas e esta foi enriquecida com a chegada dos

colonizadores portugueses e dos escravos, quando novos procedimentos terapêuticos foram utilizados. Os índios tinham um profundo conhecimento da flora nacional e das medidas curativas realizadas pelos pajés, sendo estes rituais carregados de elementos mágicos e místicos; além de ser a única alternativa de tratamento (SOSSAI, 2008).

No entanto, o uso destas plantas, só foi regulamentado e reconhecido como medicamento pela portaria nº 212 de 11 de setembro de 1981 do Ministério da Saúde (MS), onde apresenta a Proposta de Política Nacional de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos, que constitui um dos elementos fundamentais para a efetiva implementação de ações capazes de promover a melhoria das condições de assistência à saúde da população e preconiza a continuidade, a expansão e o apoio a pesquisas que visem o aproveitamento do potencial terapêutico da flora e fauna nacionais, enfatizando a certificação de suas propriedades medicamentosas (BRASIL, 2006).

Em 2006 o MS criou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), e posteriormente em 2008 a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), que visa “garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional”, desta forma constrói um marco regulatório em todas as etapas da cadeia produtiva de plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL, 2009).

Mas foi em 2010 que o MS estabelece a Farmácia Viva no âmbito do SUS, que tem por objetivo o cultivo, a coleta, o processamento, o armazenamento de plantas medicinais, a manipulação e, por fim, a dispensação (BRASIL, 2010).

Desde então, surgiu à necessidade emergente de profissionais de saúde se atualizarem nesta temática.

Contudo, entre os profissionais de saúde a falta de informação está presente, e de acordo com Trovó e Silva (2002), há carência de discussões e esclarecimentos sobre as Práticas Integrativas e Complementares, em especial as plantas medicinais, principalmente durante a graduação, gerando uma lacuna no conhecimento, trazendo prejuízo no seu desempenho profissional.

Neste sentido a enfermagem vem ampliando sua visão holística de saúde, valorizando a cultura e a tradição popular com o uso de plantas medicinais,

associadas às condições econômicas do país, como forma de programar uma terapêutica com resultado positivo, com baixo custo, atualmente comprovada pela ciência.

O enfermeiro é respaldado por lei por meio da Resolução 197/97 do Conselho Federal de Enfermagem (COFEN), para fazer uso de terapias alternativas, dentre elas, as plantas medicinais, sendo responsabilidade deste a sua atualização dos saberes técnicos, científicos e culturais, em benefício de seus pacientes, coletividade e desenvolvimento da profissão (CONSELHO FEDERAL DE ENFERMAGEM, 2004).

2.2 Conservação de Planta Medicinal

A diversidade genética, a diversidade de organismos vivos e a diversidade de ecossistemas constituem a biodiversidade, a qual é representada por todas as espécies de seres vivos. Uma forma de conservar e manejar os recursos genéticos é denominada germoplasma, onde *germ* significa “do qual algo nasce” e *plasma* significa “material que dele se forma”, e pode estar disponível para pesquisas em melhoramento genético e em biotecnologia (GOEDERT, 2007).

O objetivo principal dos bancos de germoplasma é o de preservar a variabilidade genética existente para determinada(s) espécie(s) em um ambiente controlado, sendo por este motivo considerado um método de conservação *ex situ* (NASS, 2001).

O desenvolvimento de bancos de germoplasma é resultado de uma preocupação constante entre os profissionais envolvidos na conservação e melhoramento de plantas, conhecida como erosão genética ou perda de alelos. A perda de alelos diminui a variabilidade genética disponível, tornando o processo de seleção menos eficaz. Além disso, uma baixa variabilidade implica em uma maior vulnerabilidade a pragas, doenças e condições abióticas adversas (YORINORI; KIIHL, 2001).

A instalação e caracterização de uma coleção de plantas medicinais é importante, pois, algumas espécies possuem elevada adaptação ecológica e estão associadas aos padrões culturais locais. Para Queiroz e Lopes (2007), há necessidade de se implantar coleções de plantas, desenvolver tecnologias para a domesticação e a identificação do potencial dessas espécies.

2.3 Espécie Alvo - *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl

Planta originária do continente Americano, com ocorrência principalmente nas savanas e no Brasil ocorre em todos os biomas, com destaque para os estados Amazonas, Pará, Bahia, alcançando também os estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (CAITANO et al., 1996; MOLDENKE, 1973; PIO CORRÊA, 1984).

Esta espécie é comum de ser encontrada em terrenos baldios, cresce com facilidade em bordas de matas, pastagens, beiras de estradas (LORENZI; MATTOS, 2002).

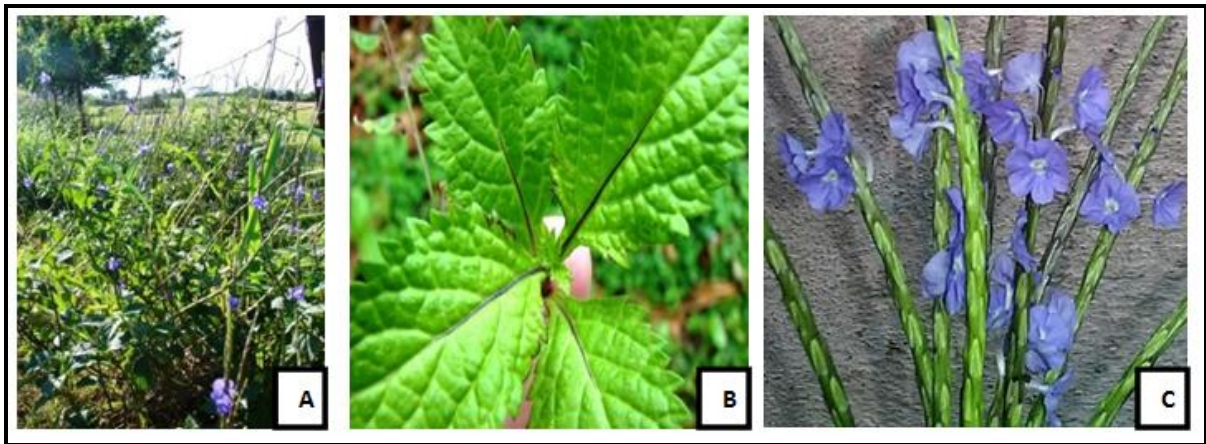
2.3.1 Caracterização Morfológica e Química

A *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl, pertencente a família das *Verbenaceae*; nome científico originário do grego: *Stachytarpheta*, de *Stachys* = espiga + *tarphos* = denso e *cayennensis* de Cayenne, capital da Guiana Francesa, local onde, presume-se, foi descrita pela primeira vez (MESIA-VELA, 1998).

Esta espécie é conhecida popularmente como gervão roxo, devido a cor de suas flores que variam do lilás ao roxo, no entanto é reconhecido por outros nomes como: gervão, gervão-folha-de-verônica, ogervão, orgibão, gerbão, rinchão, verbena, verbena falsa, verbena azul, verbena chimarrona, verbena selvagem chá brasileiro, vassourinha-de-botão e aguara-poda (PIO CORRÊA, 1984; THE RAINFOREST PLANT DATABASE, 2017).

Pio Corrêa (1984), descreve como arbusto dicótomo, pode chegar até 2,5 m de altura, os ramos são ligeiramente pilosos quando jovens, mas glabrescentes. As folhas são aromáticas, pecioladas, opostas, ovaladas até elípticas, obtusas ou arredondadas no ápice e estreitando-se para a base, podendo ter até 7 cm de comprimento, serradas ou cuneado-serradas, brilhante na página superior e opaca na página inferior. As flores azul-pálido ou roxas, de 5 mm, dispostas em espigas flexuosas de 25 cm ou menos; brácteas estreito-lineares, acuminados táceas e cálice curto.

Figura 1 – Visão geral da espécie *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl



A-Subarbusto ramificado B-Características das folhas C-Destaque para a inflorescência e espiga.

Fonte: Google Images modificada Disponível em: <https://loucadasplantas.blogspot.com/2019/02/flor-de-gervao.html>

Embora o gervão seja amplamente utilizado para fins fitoterapêuticos, poucos são os estudos voltados para seus aspectos estruturais, considerando a identificação anatômica associada à histoquímica e a prospecção Fitoquímica. Em sua pesquisa, Paes (2011), evidenciou que no gervão há presença de lipídeos, compostos fenólicos (lignina e taninos), alcalóides, polissacarídeos (amido e mucilagens, açúcares), proteínas e terpenóides (óleos essenciais e resinas); em concentrações semelhantes em raízes, caules e folhas

Já Lopata et al. (2011), quantificaram taninos principalmente nas folhas e caules, o resultado também apontou para a presença de outros metabólitos secundários: os flavonóides nas folhas e as saponinas no caule.

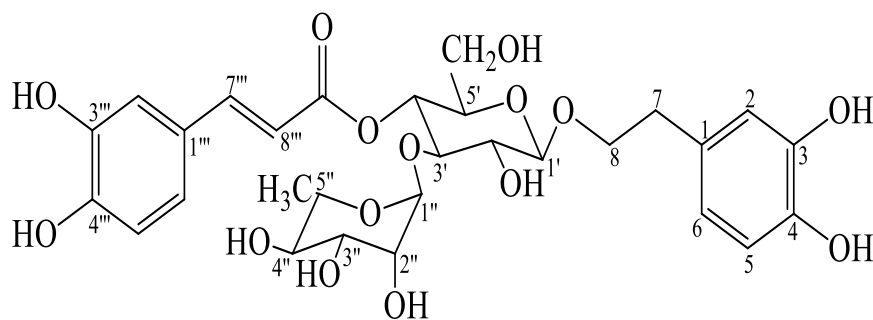
Dalamagro e Gasparetto, (2020), fizeram uma avaliação preliminar dos extratos aquoso e hidroalcolico, mostrando que o solvente hidroalcolico extraiu uma quantidade superior de metabólitos quando comparado ao aquoso. Quanto ao perfil fitoquímico os ensaios apontam a presença de heterosídeos cianogenéticos, taninos, alcaloides, flavonoides, esteroides e triterpenos.

Francisco (2019), avaliou os teores de ipolamida e verbascosídeo no extrato aquoso de gervão-roxo, por análise de CLAE, comprovando uma correlação positiva e moderada entre o teor do verbascosídeo e ipolamida, concluindo que à medida que o teor de ipolamida aumenta ocorre um incremento no teor de verbascosídeo.

Tem sido recorrente a busca por identificar e relacionar a atividade farmacológica dos compostos químicos presentes no gervão, em especial o verbascosídeo, que tem presença majoritária.

O verbascosídeo ou acteosídeo é um composto glicosídico fenólico hidrossolúvel, composto por quatro partes químicas: ácido caféico, aglicona, grupo de glicose (sacarídeo central) e grupo ramnose (Figura 2). Dada a importância desse composto, suas propriedades têm sido descritas na literatura, e possui diversas atividades, incluindo ação antioxidante, anti-inflamatória, fotoprotetora e quelante (OLIVEIRA et al., 2014).

Figura 2 – Estrutura da molécula de verbascosídeo



Fonte: próprio autor

O verbascosídeo pode ser encontrado em diversas espécies, é amplamente distribuído em plantas dicotiledôneas pertencentes a família das *Verbenaceae* entre outras, sendo por isso um dos compostos mais estudados. Este composto é conhecido por possuir várias atividades farmacológicas, como antioxidante, anti-inflamatória, antinociceptiva, antihepatotóxico, antiproliferativo e antiulcerogênico (SCHAPOVAL et al., 2010).

2.3.2 Propriedades Terapêuticas

Ainda que de forma empírica, o gervão é consagrado mundialmente por sua vasta utilização e por suas diferentes propriedades e os registros científicos comprovam suas relevantes propriedades farmacológicas, que estão relacionadas à sua diversidade química (Tabela 1).

Em 1984 Pio Correa descreveu algumas atividades terapêuticas atribuídas ao gervão-roxo, entre suas “*virtudes mediciais está o combate à dores no peito e estômago, bem como a de ser estimulante, sudorífica, febrífuga e diurética, útil para a lavagem de úlceras e como detergente*”.

A tabela 1 mostra uma revisão bibliográfica realizada em fevereiro de 2018, tendo como critérios de elegibilidade as palavras Gervão e *Stachytarpheta cayennensis* no título do artigo, de qualquer idioma e sem qualquer critério temporal. Obteve-se então 87 ocorrências; dessas foram subtraídas citações e artigos repetidos, após leitura dos resumos, foi considerando apenas os artigos que tratavam dos efeitos terapêuticos da planta, perfazendo um total de 32 artigos.

Em acréscimo, estudos comprovaram a atividade terapêutica da *Stachytarpheta cayennensis* em muitas doenças, ficando evidente sua capacidade antimicrobiana, em destaque, para doenças parasitárias e endêmicas como a Leishimaniose (MAQUIAVELI et al., 2016; MOREIRA et al., 2007; OLIVEIRA E SÁ 2016) e Malária (CHINWUDE; ACHUNIKE; OGBONNAYA, 2016; EZENYI; AKAH; OKOLI, 2016; FROELICH; GUPTA; SIEMS 2008; OKOKON; ETTEBONG; ANTIA 2008). Essas doenças são consideradas graves, com ocorrência em várias partes do mundo e com elevado índice de morbi-mortalidade.

Mesia-Vela et al. (1997), elucidaram os mecanismos das ações anti-secretora ácida e antiúlcera gástrica de princípios isolados do gervão-roxo. Outros importantes estudos também revelaram sua ação no sistema digestório, seja pela atividade antiulcerosa, quando inibe a produção da secreção ácido gástrico (gastroprotetor), seja pelo aumento da motilidade intestinal fazendo um efeito laxativo (MESIA-VELA et al., 1997; MESIA-VELA et al., 2004; PENIDO et al., 2006).

A ingestão de chá de folhas de *Stachytarpheta cayennensis* é usada no Peru, Nigéria e outros países tropicais para o tratamento do diabetes há muitos anos. Para explicar esse fenômeno, Adebajo et al. (2007), induziram ratos a hiperglicemia com injeção de altas cargas de glicose. Na sequência por administração oral de extratos

aquosos e metanólicos (das folhas), observou-se a reduções significativas de glicose no sangue, concluindo que os compostos hidroxipolamida, ipolamida e isoverbascosídeo, induziram o aumento da liberação de insulina evidenciando uma atividade hipoglicêmica.

Em 2020, Dalamagro e Gasparetto,, comprovaram a inibição do crescimento de bactérias (Gram-positivas e Gram-negativas), principalmente *Klebsiella pneumoniae* com extrato aquoso de *Stachytarpheta cayennensis*.

Os efeitos bactericidas ou bacteriostático foram elucidados por Youmbi et al., (2020), utilizando extrato bruto, frações e compostos da *Stachytarpheta cayennensis*, mostrando alto potencial inibitório para em *Escherichia coli* e atividades moderadas em outras bactérias, no entanto a *Pseudomonas aeruginosa* mostrou-se resistente nos ensaios.

Os extratos aquosos e hidroetanólicos de folhas de *Stachytarpheta cayennensis* indicaram a possível aplicação como fonte de compostos bioativos, potentes como antiproliferativos e citotóxicos para células de carcinoma pancreático humano (ADEBESIN, FAMA KINWA e OKPUZOR, 2016).

No sistema nervoso, de forma empírica, também há relatos do uso das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* para insônia e ansiedade, entre outros usos. A fim de buscar evidências científicas, conhecer os mecanismos neurais e também, estabelecer o limite de segurança/ toxicidade da droga vegetal, uma investigação em camundongos foi realizada, por Olayiwola, Ukponmwan e Olawode (2013), na qual, foi confirmada cientificamente, quando, os camundongos impossibilitados de locomoção espontânea, apresentaram aumento do tempo de sono induzido, o que confirma o seu efeito ansiolítico e através do percurso em labirinto elevado, constataram que os receptores do sistema neural gabaérgico estão envolvidos nas atividades sedativas e ansiolíticas.

Por fim, como a utilização de plantas medicinais simboliza muitas vezes, o único recurso terapêutico de muitas comunidades, há a necessidade improrrogável de exploração científica interdisciplinar sobre esta espécie tão popularmente usada.

Tabela 1 – Propriedades terapêuticas *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl, descritas em literatura científica realizada por vários autores em diversos países

EFEITO FARMACOLÓGICO	ANO	PAÍS	AUTOR	
Ação no Sistema nervoso	2001	Brasil	VIEIRA et al.	
	2008	Brasil	OKOYE et al.	
	2013	Nigéria	OLAYIWOLA; IBIKUNLE	
	2013	Nigéria	OLAYIWOLA; UKPONMWAN; OLAWODE	
Anti-Malária	2008	Alemanha/ Panamá	FROELICH et al.	
	2008	Nigéria	OKOKON; ETTEBONG; ANTIA	
	2016	Nigéria	EZENYI; AKAH; OKOLI	
	2016	Nigéria	EZENYI; AKAH; OKOLI	
Antimicrobiana/ Antioxidante	2007	Brasil	SILVEIRA et al.	
	2010	Brasil	SOUZA et al.	
	2010	Brasil/ EUA	SCHAPOVAL et al.	
	2010	Nigéria	OKOYE et al.	
	2011	Brasil	SOUZA et al.	
	2012	Nigéria	OKORONKWO; ECHEME; ONWUCHEKWA	
	2014	Brasil	ONOFRE; KAGIMURA; MATTIELLO	
	2015A	Brasil	ONOFRE et al.,	
	2020	Brasil	DALMAGRO e GASPARETTO	
	2020	Brasil	YOUMBI et al.	
Antinflamatória /	2004	Brasil	MESIA-VELA et al.	
	2005	Brasil	BLANCO et al.	
	2012	Índia	SIJU et al.	
Hipoglicemiante	2007	Nigéria	ADEBAJO et al.	
	2009	Nigéria	ELIAKIM-IKECHUKWU; OBRI; IGIR	
Hipotensor e hipertensora	2001	Brasil	BATTISTINI	
	2016	Nigéria	ADEBESIN, FAMA KINWA, OKPUZOR	
Ação Anti neoplásica	Ação gástrica	1997	Brasil	MESIA-VELA et al.
		1998	Brasil	MESIA-VELA
		2006	Brasil	PENIDO et al.
Leishimanicida	2007	Brasil	MOREIRA et al.	
	2016	Brasil	MAQUIAVELI et al.	
Outros	2014	Nigéria	OKOYE et al.	
	2014	Índia	RAUNIYAR et al.	

Fonte: ENDNOTE WEB. Disponível em: <<https://www.myendnoteweb.com>>. Acesso em: 13 set. 2020. Considerando as palavras: Gervão e ou *Stachytarpheta cayennensis*, no título, em qualquer ano e idioma de publicação.

2.4 Caracterização Molecular

O avanço da biologia molecular e a necessidade de detecção e análise de polimorfismo genético levou ao desenvolvimento dos marcadores moleculares.

Marcadores moleculares são definidos como qualquer sequência de DNA (ácido desoxirribonucleico) que revele polimorfismo entre indivíduos. De acordo com Turchetto-Zolet et al. (2017, p. 181), marcadores moleculares são: *“um segmento específico de DNA representativo das diferenças ao nível do genoma que permitem fazer inferências diretas sobre a diversidade genética e inter-relações entre os organismos ao nível do DNA”*.

Para Hoffmann e Barroso (2006), a principal aplicação dos marcadores moleculares, está diretamente ligada ao melhoramento genético, para eles, a seleção artificial de plantas, busca o aprimoramento de suas características agrônômicas ou de qualidade do produto agrícola e conseqüentemente apresentando grandes ganhos no rendimento.

Eles também são indicados para estudo de mapeamento genético, seleção assistida, diversidade genética, filogenia e taxonomia. Podem também, caracterizar os bancos de germoplasma, através da identidade genética dos indivíduos, identificação da riqueza alélica da coleção, representatividade da coleção, estrutura genética por meio da variação genética e também a similaridade ou distância genética entre acessos (SIGRIST, 2009).

Neste contexto, Cristians et al. (2018), mencionam que é crucial que análises moleculares e químicas sejam adotadas para garantir a segurança, eficácia e qualidade do material vegetal .

Existem diferentes tipos de marcadores moleculares. A escolha do tipo de marcador a ser empregado depende de fatores relacionados ao objetivo da pesquisa.

2.4.1 Microssatélite

Hoffmann e Barroso (2006), afirmam que nos últimos anos o uso de marcadores tem sido uma estratégia eficiente e de interesse em várias áreas do conhecimento. Dentre eles, merecem destaque os microssatélites, por serem considerados ideais para estudos genéticos e de melhoramento, uma vez que

combinam vários aspectos de interesse: a co-dominância; multialelismo, o alto polimorfismo, a dispersão abundante e uniforme em genomas de plantas e a eficiente detecção por Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR).

Microssatélites, são também conhecidos como *Short Tandem Repeats* (STRs), *Simple Sequence Repeats* (SSR) ou *Simple Sequence Length Polymorphisms* (SSLP), dada a sua natureza repetitiva, o tamanho do fragmento dos locus tende a aumentar ou diminuir. Os microssatélites apresentam muitas vantagens e aplicabilidades, mas, sua grande limitação reside na necessidade do isolamento e desenvolvimento de primers específicos para cada espécie, ou ter disponível primers de espécies relacionadas para testar transferibilidade (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017).

Para Aboulila e Mansour (2017), os marcadores microssatélites são técnicas poderosas, facilmente marcados e altamente polimórficos, no entanto, apresentam uma grande desvantagem que é o tempo e o custo necessários para caracterizá-los. Os autores reconhecem que com o desenvolvimento de novos protocolos aumenta a confiabilidade e reduz custos, tornando cada vez mais práticos para aplicações de rotina em muitas espécies.

A grande vantagem dos SSR, sobre outros marcadores moleculares, são a reprodutibilidade, simplicidade e rapidez, pequena quantidade de DNA requerida, baixo custo de utilização, grande poder de resolução e altos níveis de polimorfismo. Além disso, eles podem ser usados para análises de transferibilidade. Outra vantagem é o uso de primers específicos para ampliações de regiões genômicas bem definidas, cujo número de repetições do motivo SSR será responsável pela variabilidade observada. A desvantagem da técnica está no tempo que se gasta para identificar e caracterizar os locus e a dificuldade em determinar precisamente o tamanho dos fragmentos (HOFFMANN E BARROSO (2006).

A análise da transferibilidade pode ser confirmada através da avaliação de presença ou ausência de bandas, dependendo do objetivo do estudo. Os microssatélites apresentam alto grau de transferibilidade, portanto esses marcadores podem detectar variabilidade em um grande número de espécies relacionadas (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017).

Hoffmann e Barroso (2006), reiteram que uma vez disponibilizado os primers para a espécie em estudo, sua maior vantagem em relação a outros marcadores moleculares são a praticidade, o alto polimorfismo e a boa distribuição no genoma.

Buso et al. (2003), explicam que a análise de locus microssatélites é realizada por meio da técnica de PCR utilizando-se iniciadores (primers) complementares. Essas variações no número de repetições constituem-se em variações no comprimento do segmento amplificado, os quais são detectados pela separação destes fragmentos por meio da eletroforese.

Ressaltam ainda, que a grande desvantagem do uso do SSR em larga escala é o custo elevado e intensiva mão de obra, se considerar todas as etapas de seu desenvolvimento inclusive a obtenção dos primers. No entanto, uma vez obtidos os primers, os custos e a demanda de mão de obra são reduzidos drasticamente e os ensaios laboratoriais são rápidos, aumentando a acessibilidade da técnica, constituindo, portanto, uma ferramenta extremamente eficiente na identificação e diferenciação de indivíduos (BUSO et al., 2003).

Sigrist (2009), diz que os microssatélites apresentam características muito desejáveis, pois, entre outras, eles permitem avaliar rapidamente um grande número de indivíduos para um grande número de locus em pouco tempo, são facilmente visualizados em géis, são amplificados via PCR, o que facilita sua obtenção mesmo com poucas quantidades de DNA e os primers que amplificam podem ser compartilhados entre laboratórios.

Por fim, Turchetto-Zolet et al. (2017), reiteram que as técnicas para estudos com marcadores moleculares têm sido muito aprimoradas, bem como o surgimento de diferentes plataformas de sequenciamento de alto desempenho, tecnologias aliadas às análises de bioinformática e estatística, assim como, a necessidade de aumentar a sensibilidade e resolução na genotipagem que culminou com um rápido avanço nas técnicas e o surgimento de diferentes metodologias de sequenciamento de alto desempenho.

2.4.2 CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*)

Outro marcador que vem sendo amplamente usado com sucesso é a Sequência Polimórfica Amplificada e Clivada (CAPS), esse método tem sido testado em diferentes plantas.

CAPS são primers sintetizados pela comparação das sequências disponíveis em bancos de dados públicos ou cDNA ou por clonagem e sequenciamento de fragmentos de DNA amplificados por RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA). A análise de CAPS é versátil e pode ser combinada com outras técnicas para aumentar a possibilidade de encontrar polimorfismo de DNA (AMORIM, 2009).

O desenvolvimento dos marcadores CAPS, decorre das diferenças entre os genótipos na distribuição dos sítios de restrição. Como as enzimas reconhecem sequências de bases específicas no DNA, a alteração em uma base pode criar ou eliminar um sítio de restrição em determinado loco do genoma, gerando o polimorfismo (AMORIM, 2009).

Faleiro (2007), afirma que esses marcadores são fragmentos de DNA amplificados via PCR, utilizando-se de primers específicos (20 a 30 pb), seguido da digestão com endonucleases de restrição.

São marcadores aplicados com sucesso, seu princípio é muito simples e com base em três etapas consecutivas: a PCR com Iniciadores específicos; seguida da Digestão de fragmento de amplificação com enzimas de restrição (endonucleases); e a Separação de produtos de digestão em gel de agarose; portanto, CAPS é uma combinação de técnicas de PCR com métodos clássicos baseado na amplificação de pequenos fragmentos de DNA em vez do genoma inteiro (KANG-TSU et al., 2010; HEUBL, 2013; HU; TSAI; LIN, 2014).

Os marcadores CAPS também são chamados de marcadores PCR-RFLP, pois são derivados do RFLP- (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017).

Faleiro (2007), reforça que suas principais vantagens são a co-dominância e a alta reprodutividade e a principal desvantagem é a necessidade de conhecimento prévio de sequência de DNA para a construção dos primers.

De acordo com Shavrukov (2016), as bases de dados que proporcionam sequenciamento de genomas de plantas estão crescendo muito rapidamente, no entanto, uma grande parte das pesquisas utilizam o CAPS, com análises manuais e individuais não-automáticas, por se tratar de marcadores adequados para laboratórios simples para estudar fragmentos isolados do genoma ou gene de interesse individual.

Em 2006 Berteza et al. (2006), descreveram um método rápido baseado no uso da região 5S-rRNA-NTS utilizando os primers *forward* 5'-

GTGCTTGGGCGAGAGTAGTA-3' e *reverse* 5'-TTAGTGCTGGTATGATCGCA-3') como uma ferramenta para impressão digital de DNA de plantas, que combina análises de polimorfismo de PCR, sequenciamento e comprimento de fragmento de restrição.

A sequência do gene 5S-rRNA tem sido utilizada para estudo de diversidade genética porque ela é organizada em unidades repetidas de matriz em tandem que compreendem uma região de codificação de 120 pb conservada e um espaçador não transcrito (NTS) de comprimento variável nos nucleotídeos. Esta sequência, tem sido importante para avaliar algumas espécies de plantas medicinais e aromáticas identificando quimiotipos. A região 5S-rRNA-NTS é um componente de todos os ribossomos, exceto na mitocôndria de certas espécies. A função do gene está associada com um componente da grande subunidade ribossômica em todos os organismos eucarióticos. Portanto, a alta divergência nas regiões espaçadoras fornece um bom modelo para estudar a organização do genoma em diferentes espécies de plantas e recentemente, tem sido usada em várias espécies para estudar variações intraespecíficas, evolução do genoma e reconstrução filogenética (GNAVI, BERTEA, AFFEI, 2010).

2.4.3 SCoT (*Start Codon Targeted*)

Este Marcador molecular tem ganhado muita popularidade, devido sua superioridade comparada a outros marcadores de DNA dominantes. Ele foi descrito por Collard e Mackill em 2009 e é considerado de maior precisão e resolução, sendo uma boa opção para diferenciação genética em estudos de diversidade e análise da estrutura genética das populações (GORJI et al., 2011).

Este marcador é uma técnica simples e inovadora de marcação de DNA, de fácil exequibilidade realizada por PCR. Capaz de atender aos programas de melhoramento de plantas em prol das necessidades comerciais e acadêmicas (ABOULILA; MANSOUR, 2017).

O marcador molecular SCoT exibe alto polimorfismo e poder de resolução, isso se dá, por serem multilocus, desta forma são muito úteis para análise da estrutura da população, manejo efetivo de recursos genéticos e ainda, pode ser utilizado para enriquecer programas de melhoramento genético que visam maior

rendimento, melhor qualidade, adaptabilidade e resistência a pragas e doenças. (SATYA et al., 2015),

Para Marakli (2018), o marcador SCoT apresenta inúmeras vantagens mas as principais são: a confiabilidade e a eficiência da técnica, serem muito informativos e relativamente de baixo custo, podendo ser usado sozinho ou em combinação com outros marcadores.

Os pesquisadores Collard e Mackill (2009), descreveram um protocolo para utilização de 36 primers (Tabela 2), denominado *Start Codon Targeted*, (SCoT), a técnica foi validada por eles, a partir de seus experimentos com arroz (*Oryza sativa*). Este sistema é baseado em pequenas regiões conservadas de genes de plantas representados a partir do códon inicial de tradução ATG que serão flanqueadas. A técnica requer utilização de PCR, em padrão eletroforético com gel de agarose, tornando a técnica adequada para a grande maioria das plantas e de fácil uso em laboratórios de pesquisa.

Tabela 2 – Primers das sequências de marcador molecular SCoT

Primer \ Sequência	Primer \ Sequência	Primer \ Sequência
1 CAACAATGGCTACCACCA	13 ACGACATGGCGACCATCG	25 ACCATGGCTACCACCGGG
2 CAACAATGGCTACCACCC	14 ACGACATGGCGACCACGC	26 ACCATGGCTACCACCGTC
3 CAACAATGGCTACCACCG	15 ACGACATGGCGACC GCGA	27 ACCATGGCTACCACCGTG
4 CAACAATGGCTACCACCT	16 ACCATGGCTACCACCGAC	28 CCATGGCTACCACCGCCA
5 CAACAATGGCTACCACGA	17 ACCATGGCTACCACCGAG	29 CCATGGCTACCACCGGCC
6 CAACAATGGCTACCACGC	18 ACCATGGCTACCACCGCC	30 CCATGGCTACCACCGGCG
7 CAACAATGGCTACCACGG	19 ACCATGGCTACCACCGGC	31 CCATGGCTACCACCGCCT
8 CAACAATGGCTACCACGT	20 ACCATGGCTACCACCGCG	32 CCATGGCTACCACCGCAC
9 CAACAATGGCTACCAGCA	21 ACGACATGGCGACCCACA	33 CCATGGCTACCACCGCAG
10 CAACAATGGCTACCAGCC	22 AACCATGGCTACCACCAC	34 ACCATGGCTACCACCGCA
11 AAGCAATGGCTACCACCA	23- CACCATGGCTACCACCAG	35 CATGGCTACCACCGGCC
12 ACGACATGGCGACCAACG	24 CACCATGGCTACCACCAT	36 GCAACAATGGCTACCACC

Fonte: Collard e Mackill (2009)

Uma pesquisa recente, utilizando o marcador SCoT, objetivou investigar a diversidade genética entre várias populações de pistaches masculinos e femininos. O estudo revelou que o marcador SCoT é uma ferramenta molecular útil e valiosa

para separar populações masculinas e femininas de pistache e determinar a diversidade genética entre as populações (MALEKZADEH; MAHMOODNIA; AMIREBRAHIMI, 2019).

2.5 Caracterização Química

Para se validar a presença de classes químicas em uma determinada espécie vegetal e correlacionar à sua atividade biológica, deve-se realizar uma triagem química, mas para isso, é imprescindível, primeiramente, fazer uma extração de substâncias químicas usando um determinado solvente para a obtenção de um extrato bruto. Esse extrato deve ser submetido a um estudo fitoquímico, no qual é possível obter um perfil químico dos metabólitos secundários, presentes no extrato bruto, através das técnicas analíticas, tais como CLAE - UV Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um detector de ultravioleta, também conhecida com a sigla HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*).

Para tanto, um dos métodos mais usados atualmente é a cromatografia ou perfil cromatográfico. A palavra cromatografia em grego tem duas raízes: chroma (cor) e graphein (escrever).

A Cromatografia é um método físico-químico, que separa componentes de uma mesma mistura, a partir de duas fases, enquanto uma se mantém estacionária, a outra se move através dela, é basicamente utilizada a partir de pequenas colunas, preenchidas de materiais previamente preparados e uma fase móvel que é eluída sob altas pressões. Capaz de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes nas amostras (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A identificação da amostra, se dá através da comparação dos tempos de retenção de padrões com os tempos de retenção dos componentes da amostra analisados, nas mesmas condições cromatográficas. O resultado mostra cromatogramas que revelam a formação de um pico em um determinado tempo, que recebe o nome de tempo de retenção. Desta forma, os componentes são identificados, quando apresentam o tempo de retenção identificados ou extremamente semelhantes (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2014).

Para Collins, Braga e Nonato (2006), a CLAE utiliza instrumentos que podem ser totalmente automatizados, com eles torna-se possível a detecção de muitos e

diferentes compostos e ainda permite analisar aqueles compostos que aparecem em menor concentração. No entanto, essa técnica também apresenta algumas limitações, como o alto custo da instrumentalização, alto custo na operacionalização e necessidade de experiência em seu manuseio. Ainda assim, isto não impede sua utilização, e por isso a CLAE tem sido cada vez mais empregada.

Os cromatogramas, representam o tempo de retenção em minutos pela resposta do detector em relação ao padrão usado. Assim, se a amostra não produz um pico no mesmo tempo de retenção, pode-se considerar que o composto em questão está ausente ou sua presença ocorre em nível de concentração abaixo do limite de detecção do procedimento (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2014).

Devido aos grandes avanços tecnológicos, a CLAE se tornou uma das técnicas de maior emprego, devido sua capacidade de separar amostras cada vez mais complexas, contendo compostos de características variadas, em tempo reduzido de análise, alta resolução e boa análise qualitativa e quantitativa (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Da mesma forma, Skoog, Holler e Crouch (2014), consideram o método como sensível e de fácil adaptação para determinações quantitativas. Afirmam que a CLAE é a mais usada de todas as técnicas analíticas de separação e que sua popularização se deu por sua capacidade de separação de compostos não voláteis e por sua ampla aplicabilidade a substâncias de grande interesse para a indústria.

2.6 Teste de Inibição Enzimática

Depressão, ansiedade e doenças neurodegenerativas, estão diretamente associadas ao aumento da expectativa de vida, com isso há a necessidade de descoberta de drogas capazes de prevenir, postergar ou mesmo estabilizar tais enfermidades é urgente.

Dentre outras terapêuticas, o tratamento farmacológico das doenças neurodegenerativas e distúrbios psiquiátricos consistem no controle sintomático através do uso de inibidores da enzima monoamina oxidase (IMAO), uma redução dos seus níveis de atividade resulta no aumento das concentrações de certos neurotransmissores cerebrais, além de uma diminuição na produção de peróxido de hidrogênio, subproduto da reação catalisada pela MAO (FOLLMER; BEZERRA NETTO, 2013).

Os medicamentos sintéticos são muito eficazes, no entanto, evidenciam o aparecimento de efeitos indesejados, por esta razão, aumentam o número de estudos na identificação de produtos naturais, em especial de origem vegetal, que inibam a enzima Monoamina Oxidase (MAO).

A MAO-A tem sido importante alvo terapêutico por desempenhar um papel importante nos transtornos de depressão e ansiedade, enquanto a MAO-B está envolvida em doenças neurodegenerativas. Estas enzimas estão localizadas na membrana mitocondrial externa, que catalisa a desaminação oxidativa de monoaminas (FOLLMER; BEZERRA NETTO, 2013).

2.7 Redução do radical DPPH (2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl)

Este teste foi primeiramente sugerido em meados de 1950, e a partir daí o método foi utilizado para detectar doadores de hidrogênio em produtos naturais, e mais tarde, determinar a atividade antioxidante de fenóis, alimentos e amostras biológicas (BENZIE et al.,1999).

Para Xie e Schaich (2014), o ensaio do DPPH é simples e pode ser executado nos laboratórios mais rudimentares, por isso, têm se visto extensas aplicações do método, no entanto, desde o seu desenvolvimento, sofreu inúmeras variações nas concentrações, no tempo, bem como no cálculo da ação antioxidante.

É considerado um método indireto, pois, caracteriza-se por uma reação de oxiredução entre o oxidante e o antioxidante. O radical DPPH é estável de cor lilás, mas quando reduzido passa a ter coloração amarela, para Benzie et al. (1999), a intensidade da mudança de cor é proporcional à atividade deste antioxidante ou à concentração do mesmo.

O método é basicamente demonstrado pela capacidade do DPPH em reagir com doadores de hidrogênio, assim, na presença de substâncias antioxidantes o mesmo recebe H^+ e é reduzido, ou seja, evita a oxidação. Sua principal vantagem é a possibilidade de ser facilmente detectado por espectrometria e por sua precisão na avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais (SANCHEZ-MORENO, 2002).

3 JUSTIFICATIVA

É reconhecido que dados de eficácia e segurança de várias plantas medicinais ainda não são suficientes para dar suporte ao seu uso, por vezes, devido à falta de metodologias adequadas, para avaliar essas plantas.

Esta pesquisa se justifica por considerar que ainda existe resistência dos profissionais prescritores quanto ao uso de fitoterápicos; em função da origem extrativista da maioria das plantas medicinais comercializadas no Brasil, o que compromete a espécie e sustentabilidade; considerando que além disso, os quesitos fraude e contaminação do material, seja por falta de cuidados na coleta e ou falta de tratamento do material coletado; a troca de uma espécie por outra ou ainda presença de fungos e bactérias; bem como, a variabilidade química e genética podem interferir na qualidade e eficácia do medicamento, seja pela falta de padronização dos extratos, que podem conter ou não o princípio ativo ou pela presença de compostos tóxicos em quantidade desconhecida (MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2010).

Cristians et al. (2018), reforça que não existe uma prática padrão para identificar as espécies de plantas medicinais comercializadas e usadas em produtos fitoterápicos; assim, os consumidores e a indústria sofrem com fraudes e práticas antiéticas, nas quais as espécies vegetais podem ter substituição e adulteração. Essa situação pode levar a eventos de intoxicação ou ausência de eficácia terapêutica.

Considera-se a *Stachytarpheta cayennensis* uma espécie com grande potencial para utilização no SUS, entretanto há necessidade de estudos sobre a variabilidade genética, composição química, potencial antioxidante e sua capacidade de inibir a enzima MAO-A. Portanto estudos químicos, farmacológico e genético desta espécie possibilitará a produção de um material padronizado e por conseguinte seguro para uso da população.

4 HIPÓTESE

A espécie *Stachytarpheta cayennensis* apresenta uma variabilidade genética e química que se expressa em diferentes quimiotipos, capazes de reduzir a enzima MAO-A e apresentar atividade antioxidante.

5 OBJETIVOS

5.1. Objetivo geral

Avaliar a espécie *Stachytarpheta cayennensis* do ponto de vista, genético, químico e farmacológico visando a disponibilidade de material padronizado para as Farmácias Vivas.

5.2. Objetivos específicos

- Coletar folhas de indivíduos provenientes de diferentes coleções,
- Estudar a estrutura e a diversidade genética da coleção utilizando o marcador molecular microssatélite, CAPS e SCoT,
- Quantificar teor de verbascosideo,
- Verificar o potencial antioxidante
- Identificar sua capacidade de inibição da enzima MAO-A.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Coleta das amostras

O material vegetal utilizado foram folhas jovens de *Stachytarpheta cayennensis*, num total de vinte e oito amostras. As exsicatas encontram-se inseridas no acervo da Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP sob número de registro HPMU – 1891 e 1892. A atividade de acesso ao Patrimônio Genético foi cadastrada no SisGen (nº do cadastro A07D0A8).

Destas, vinte indivíduos foram coletados na Coleção de Plantas Medicinais da Farmácia da Natureza, distrito de Jurucê, município de Jardinópolis (SP), identificadas aqui pela letra T e oito plantas coletadas na coleção de plantas Medicinais da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), Ribeirão Preto (SP), identificadas com a letra U (Tabela 3).

Tabela 3 – Identificação dos locais de coleta e procedência dos acessos de *Stachytarpheta cayennensis* utilizados na pesquisa

Localidade		Amostra			
Coleção de Plantas Medicinais da Farmácia da Natureza, distrito de Jurucê, município de Jardinópolis – SP	T1	T6	T11	T16	
	T2	T7	T12	T17	
	T3	T8	T13	T18	
	T4	T9	T14	T19	
	T5	T10	T15	T20	
Coleção de plantas medicinais da Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP	U25	U34	U40	U45	
	U33	U39	U44	U46	
Ribeirão Preto - SP					

Procedência do material: (T1-20) = Jardinópolis - SP; (U25) = Ribeirão Preto - SP; (U33) = Piracicaba - SP; (U34; U39; U40; U44) = Araxá - MG; (U45) = Jaboticabal - SP; (U46) = Ituiutaba - MG.

Fonte: próprio autor

6.2 Caracterização Molecular

6.2.1 Extração do DNA Genômico

O método para obtenção de DNA foi baseado em DOYLE e DOYLE (1990) modificado e descrito a seguir. Folhas jovens e frescas foram pesadas na quantidade de 100 mg diretamente em microtubos de 2 mL, maceradas em nitrogênio líquido e sílica com a ajuda de um bastão de vidro até a obtenção de um fino pó, imediatamente foi adicionado 1.000 µL de tampão de extração CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio), Tris-HCl 100 mM pH 8,0; EDTA (ácido etileno diamino tetra acético) 100 mM; NaCl 1,4 M; solução de CTAB 2 % p/v; solução de β-mercaptoetanol 2 % v/v; PVP (polivinilpirrolidona) 2 %. Os microtubos foram mantidos em gelo até o processamento de todas as amostras, após foram incubadas em banho-maria a 65 °C por 30 minutos, em seguida foram acrescentados 200 µL de clorofil (clorofórmio-álcool isoamílico 24:1 v/v), os tubos foram cuidadosamente invertidos cinco vezes. A solução foi centrifugada a 12.000 rpm (rotação por minuto) à 4 °C, durante 5 minutos, o sobrenadante foi transferido para microtubos de 1,5 mL, adicionou-se à solução 600 µL de isopropanol (- 20 °C), os tubos foram homogeneizados por inversão e colocados no freezer durante 10 minutos para acelerar a precipitação. Após o tempo de precipitação os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm à 4 °C durante 10 minutos. O pellet de DNA aderido ao tubo foi visualizado e a fase líquida foi descartada, os tubos foram repousados sobre papel absorvente. No passo seguinte os pellets foram lavados em 1 mL de tampão de lavagem (etanol à 70 %, acetato de amônia 7,5 mM); os pellets foram deslocados e os tubos mantidos em repouso à temperatura ambiente durante 20 minutos e centrifugados novamente a 12.000 rpm à 4 °C por 10 minutos, descartado o sobrenadante, e lavados duas vezes em etanol 70 %, descartados o sobrenadante e repousados sobre papel absorvente e secos à temperatura ambiente. Os pellets foram ressuspensos em 50 µL de água ultra pura e armazenado a - 20 °C.

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose, a 1 % (m/v) acrescido de brometo de etídeo a 0,001 %, para verificação da qualidade do DNA obtido. A eletroforese foi conduzida em tampão TBE (Tris base, ácido bórico, EDTA, pH 8) a 90 V, 2,66 V/cm e 400 mA por aproximadamente 90 minutos.

A visualização foi feita em transluminador Gel Doc 2.000 da Bio Rad e documentada pelo programa *Carestream Molecular Imagine Software*.

O DNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop (IMPLEN P360), e a razão entre 260/280 nm foi calculada e utilizada para estimar a pureza das amostras de DNA.

6.2.2 Teste de transferibilidade de Microsatélite

O DNA extraído de cada indivíduo foi armazenado em freezer -20 °C, e a partir destes foram retiradas as alíquotas para diluição e obtenção de concentração final a 10 ng/μL, a fim de padronizar as reações de PCR.

A amplificação foi realizada em uma mistura contendo 7,8 μL àgua ultra pura, 1,5 μL de tampão de reação (10x), 1,2 μL BSA (2,5 mg/mL), 1,5 μL dNTPs (2,5 mM), 1,2 μL de primers (*forward* e *reverse* 50 μM), 0,3 μL de Taq DNA Polimerase (5 U/μL) e 1,5 μL de DNA (10 ng/μL). Totalizando 15 μL de reação por indivíduo.

Para o teste de transferibilidade foi utilizado um conjunto de seis iniciadores (LAB05, LAD03, LAE03, LAF04, LAH06 e LAH09), desenvolvidos por Rocha et al. (2015) para a espécie *Lippia alba* (*Verbenaceae*) e estão descritos na tabela 4.

As reações de PCR foram realizadas em um termociclador (marca JG modelo Gene Mate Series), as condições dos ciclos consistiram em 5 minutos iniciais a 94 °C, seguidos de 1 minuto de desnaturação a 94 °C, 1 minuto de anelamento a 55 °C e 1 minuto de alongamento a 72 °C repetidos por 35 ciclos e finalizando com 10 minutos de extensão a 72 °C.

Tabela 4 – Sequências dos locus microssatélites desenvolvidos por Rocha et al. (2015), para a espécie *Lippia alba*

LOCUS		PRIMERSEQUENCE (5'-3')
LAB05	F	TCCACCTCTTCTGCTTCACA
	R	CAGTTCGTGGCATCTGTGT
LAD03	F	CGACCTAAGACACACCTAAGCA
	R	TGGAAATATGGGTTACCTTG
LAE03	F	GCAGCTCCAAATCCAACAG
	R	GTTGATTGCCAAAGCGTCTA
LAE09	F	GCATGAAATAATAAAAATAAAAGACTCC
	R	CCCCTAAACCCCAAACACTCAT
LAFO4	F	GGCCTTGTGGTAAGATCCTG
	R	ACCATGCTGGGTTTATGTCC
LAG04	F	TGGAATTGGCTAGGCATGAT
	R	GGGTTGACCAAAAAGTCACAA
LAG05	F	CGATTCTGGAAAATCTGGGTA
	R	TGTTCTTGATGTTCATAAACCCCTA
LAH06	F	TACACCACCACAGCAGCAC
	R	ACAGGCTTTACGCACGAAGT
LAH09	F	CGTGTCTCGGGATATACGTG
	R	CCTCACAAGAAAGCATGTGG

Fonte: Rocha et al., (2015).

Para a otimização dos primers com o objetivo de alcançar melhores condições de amplificação, a temperatura de anelamento (55 °C) descrita na pesquisa de Rocha et al. (2015), foi modificada. Assim, as PCRs foram realizadas com temperatura variadas (1- 45 °C, 2- 46,3 °C, 3- 47 °C, 4- 49,5 °C, 5- 51,7 °C, 6- 53,8 °C, 7- 55,9 °C, 8- 58,1 °C, 9- 60,4 °C, 10- 62,2 °C, 11- 64 °C e 12- 65,1 °C).

Os fragmentos resultantes do processo de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose à 1 %, acrescido de 0,001 % de brometo de etídeo, em tampão TEB 1X. Após a polimerização da matriz foi realizada sob condições controladas em cuba horizontal Bio Rad (*Electrophoresis Power Supply – EPS 6000*), à 70 V. por um período aproximado de três horas, usando marcador de peso molecular de 100 pb. A visualização do gel foi feita em transluminador Gel Doc 2.000 da Bio Rad e documentada pelo programa *Carestream Molecular Imagine Software*.

6.2.3 CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*)

O DNA genômico foi armazenado em freezer -20 °C, foram retiradas as alíquotas para diluição e obtenção de uma concentração final a 20 ng/μl, a fim de padronizar as reações de PCR.

Foram utilizados 20 ng/μL de DNA para amplificação de sequências da região: 5S-rRNA-NTS, (*forward*: 5'- GTGCTTGGGCGAGAGTA GTA- 3' e *reverse*: 5'- TTAGTGCTGGTATGATCGCA-3'), primers utilizados por Berteza et al. (2006).

As reações de amplificação foram compostas por uma mistura contendo 31,8 μL à água ultra pura, 10 μL de tampão de reação (5X), 0,2 μL de dNTPs (2,5 mM), 2,0 μL de primers forward (10 μM) e 2,0 μL de primers reverse (10 μM), 0,5 μL de *Taq* DNAPolimerase (*Taq* – Promega 5 u/μL), 1,5 μL de MgCl₂ e 2,0 μL de DNA (10 ng/μL). Totalizando 50 μL de reação por indivíduo.

As reações de PCR foram realizadas em um termociclador (marca JG modelo Gene Mate Series) em diferentes temperaturas. As condições dos ciclos consistiram em desnaturação inicial de 4 minutos a 94 °C, seguidos de 30 segundos de desnaturação a 94 °C, 1 minuto de anelamento a 52 °C e 1 minutos de de extensão a 72 °C, repetidos por 30 ciclos e finalizando com 5 minutos de extensão a 72 °C .

O produto da PCR foi aplicado em gel de agarose a 1,5 % com tampão TBE, corado com brometo de etídeo 0,001 % e submetido a eletroforese em cuba horizontal Bio Rad (*Electrophoresis Power Supply* – EPS 6000), à 90 V por um período aproximado de duas horas e trinta minutos usando marcador 100 pb.

O gel foi colocado sobre o transluminador de bancada (marca Vilber Lourmat) para a visualização e extração das bandas de interesse.

As bandas com tamanhos aproximados de 500 pares de base (marcador Promega – 100 pb DNA Ladder - G2101) foram recortadas do gel e purificadas com kit de purificação (Promega – Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System – A9281).

Os parâmetros utilizados na digestão com enzimas de restrição foram realizadas a partir de uma mistura contendo 17,15 μL à água ultra pura, 1,85 μL Enzima Eco RI (37,5 U), 3,0 μL de tampão de reação (10X), 3,0 μL BSA (10 mM) e 5,0 μL amostra (15 ng/μL). Totalizando 30 μL de reação por indivíduo.

Todas as reações foram realizadas segundo o protocolo proposto por Gnavi, Berteza e Affei (2010), desta forma, o produto da purificação (amostra), foi quantificado e diluído a 15 ng/μL, em seguida foi submetido a incubações para a

digestão com as enzimas Cla I (AT/CGAT), EcoR I (G/AATTC), Hha I (GTT/AAC) e Mse I (T/TAA). As amostras foram colocadas à 37 °C por 60 minutos para a digestão em termociclador (marca JG modelo Gene Mate Series). Na sequência, respectivamente, todo o produto da digestão foi acrescido de 5 µL de tampão de carregamento e aplicado em gel de agarose à 1 %, submetidos à eletroforese em tampão TEB em cuba horizontal Bio Rad (*Electrophoresis Power Supply – EPS 6000*) durante duas horas e meia à 90 V. (GNAVI; BERTEA; AFFEI, 2010).

A visualização foi feita em transluminador Gel Doc 2.000 da Bio Rad e documentada pelo programa *Carestream Molecular Imagine Software*.

6.2.4 SCoT (Start Codon Targeted)

Para o presente estudo as amostras de DNA foram submetidas ao ensaio SCoT, a técnica da reação de PCR foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Collard e Mackill (2009).

Após testes de amplificação com os primers SCoT, optou-se em selecionar um total de 10 primers (01, 03, 08, 09, 13, 21, 24, 29, 34 e 35), dentre os listados na tabela 2.

O DNA extraído de cada indivíduo foi armazenado em freezer -20 °C, e a partir destes foram retiradas as alíquotas para diluição e obtenção de concentração final a 10 ng/µL, a fim de padronizar as reações de PCR.

A amplificação foi realizada em uma mistura contendo água ultra pura 4,4 µL, 1,0 µL de tampão de reação (10X), 1,0 µL de dNTPs (2,5 mM), 0,1 µL de *Taq* DNA Polimerase (5 U/µL), 1,0 µL de primers (8 µM) e 2,5 µL de DNA (10 ng/µL). Totalizando 10 µL de reação por indivíduo. Importante dizer que o Tampão da enzima é suplementado com MgCl₂.

As reações de PCR foram realizadas em um termociclador (marca JG modelo Gene Mate Series) em diferentes temperaturas. As condições dos ciclos consistiram em 3 minutos iniciais à 94 °C, seguidos de 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94 °C, 1 minuto de anelamento a 50 °C e 2 minutos de extensão a 72 °C, e finalizando com 5 minutos de extensão a 72 °C.

O produto das amplificações foi visualizado em gel de agarose 1,5 % corado com brometo de etídeo 0,001 % e submetido a eletroforese em cuba horizontal Bio

Rad (*Electrophoresis Power Supply* – EPS 6000), à 60 V. por um período aproximado de 180 minutos, usando marcador 100 pb.

O gel foi visualizado no transluminador (Gel Doc 2000 da Bio Rad) e documentado através do programa *Carestream Molecular Imagine Software*.

6.3 Caracterização Química

6.3.1 Preparo do material vegetal

Para o preparo dos extratos, as folhas de cada indivíduo foram acondicionadas em pequenos sacos pardos semi *kraft* (largura 9,5 cm x comprimento 24,5 cm x 5 cm lateral), abertos, devidamente identificados, colocados em estufa de secagem com circulação (Modelo MA035/5/10P Marca Marconi), a 45°C por 24 horas.

Os indivíduos coletados na Coleção de Plantas Medicinais da Farmácia da Natureza, por serem amostras com maior quantidade de folhas, foram triturados individualmente em moinho Macro de faca (modelo MA680, marca Marconi), até obter granulatura de 32 mesh. As amostras oriundas da Coleção de Plantas Medicinais da UNAERP, por terem uma quantidade pequena de folhas, foram individualmente trituradas em micro moinho de faca (modelo MA048, marca Marconi), até obter granulatura de 32 mesh, pesados (500 mg cada) e transferidos para tubos, previamente identificados.

6.3.2 Preparo do extrato Aquoso

Os extratos de cada amostra foram obtidos por infusão em 10 mL de água fervente para cada 500 mg de droga vegetal (5 %), por 5 minutos. Foram filtrados em algodão e transferido para um novo frasco. Foi realizada uma nova extração com o material vegetal utilizando mais 10 mL de água fervente, aguardou-se 5 minutos. Os extratos foram filtrados novamente e adicionados aos frascos contendo o extrato da primeira extração; posteriormente, os frascos foram tampados com fibra de TNT (Tecido não tecido).

Para o preparo de extratos das amostras U33, U39, e U44, devido a pequena quantidade de droga vegetal (< 500 mg), a extração foi realizada utilizando o volume de água proporcional a 5 %.

Após a extração, os extratos foram congelados em freezer (-20 °C) e liofilizados para remoção da água.

6.3.3 Cromatografia Líquida de alta Eficiência com Detector de Ultravioleta

A cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta (CLAE-UV), foi realizada em equipamento da marca Shimadzu® (Kyoto, Japão), sob as seguintes condições: o extrato seco (1 mg) foi solubilizado em 1 mL de metanol (de grau CLAE), filtrado usando filtro seringa 45 µ e a solução (20 µL) foi injetada em CLAE, em coluna analítica de fase reversa Luna C-18 250 mm x 10 mm, 5 µ (Phenomenex, California, USA) acoplada a detector de arranjo de diodo SPD-M10A.

Como sistema fase móvel, foi utilizado: água + CH₃COOH 0,1 % (A) e metanol (B), utilizando um gradiente de 10 a 70 % B (0 até 32 minutos); de 70 a 10 % B (32 até 35 minutos); 10 % B (35 até 40 minutos) com vazão de 1 mL/min. por 40 min. e a detecção foi realizada com UV a 330 nm para o verbascosídeo. O reagente padrão de verbascosídeo usado, foi da marca Sigma Aldrich. As análises foram realizadas em triplicata.

As curvas analíticas foram obtidas isoladamente dos compostos, sendo os padrões, solubilizados em metanol nas concentrações de 500; 250; 125; 62,5; 31,25 e 15,625 µg mL⁻¹.

6.4 Análise dos Dados Moleculares e Fitoquímicos

As quantificações dos compostos foram submetidas a Análise de Variância (ANOVA) utilizando o programa SISVAR V.4.3 (FERREIRA, 2003), sendo as médias dos genótipos comparados pelo teste de Scott-Knott a 5 % de significância (SCOTT; KNOTT 1974).

A partir das imagens de géis, geraram uma leitura para a configuração de uma matriz binária de 0 e 1 (presença ou ausência de bandas nos indivíduos). A partir da matriz de similaridade entre indivíduos foi obtida pelo programa *FreeTree* v.0.9.1.50 .

As relações genéticas foram mostradas com a elaboração de um dendograma, no programa *Tree VieW* e MEGAS6.

Na obtenção da medida da similaridade genética foi efetuada empregando-se o coeficiente de Jaccard ($a/a+b+c$), onde “a” representa o número de concordância positiva do tipo 1-1, “b” é o número de discordância 1-0 e “c” é o tipo de discordância 0-1. Em seguida o agrupamento foi realizado pelo método da média aritmética não ponderada *Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean* (UPGMA). A mesma matriz foi analisada por PCoA (Análise em Coordenadas Principais) visando determinar a formação dos grupos (PEAKALL; SMOUSE, 2006).

Para a discriminação dos grupos gênicos entre os indivíduos foi empregado o método bayesiano utilizando o programa STRUCTURE versão 2,1 (PRITCHARD et al., 2000). Neste estudo foram testadas as probabilidades de 01 a 20 agrupamentos (K=1 a K=20) seguindo os parâmetros: 300000 *burning* e 500000 MCMC. O modelo “*no admixture*” com frequências alélicas não correlacionadas foi utilizado, pois se trata de germoplasma. A escolha do valor de K para melhor agrupar os acessos foi feita com base no critério proposto por Evanno et al. (2005).

Na análise dos dados químicos, as áreas referentes aos picos dos cromatogramas das amostras e da curva analítica foram tabuladas e analisadas no *software Excel®* (Microsoft) para obtenção da regressão linear, quantificação e cálculos dos parâmetros de linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação e limite de detecção.

Foi gerada uma matriz das variáveis quantitativas baseada na distância euclidiana e a partir desta matriz foi realizado o agrupamento utilizando o método UPGMA.

6.5 Inibição Enzimática MAO A

6.5.1 Preparação das amostras e extratos

Para preparação das amostras foi utilizado 10 g de cada amostra seca e moída, feito uma mistura única, na sequência, foram preparados os extratos aquoso e hidroalcolico.

Extrato Aquoso: pesado 10 g da mistura das amostras, adicionado 100 ml de água fervente, com 5 minutos de espera, filtrado, congelado e posteriormente liofilizado.

Extrato hidroalcolóico: pesado 10 g da mistura das amostras, adicionado 100 ml solução hidroalcolóica 70 %, deixado por sete dias. Foi filtrado, congelado e posteriormente liofilizado.

Para o ensaio, em microtubos previamente identificados, foi pesado, 5 mg/mL de extrato seco hidroalcolóico e 5 mg/mL de extrato seco aquoso. Eles foram solubilizados em uma solução de sulfóxido de dimetilo (DMSO) a 2,5 %.

As demais concentrações de ambos os extratos foram realizadas a partir de diluições seriadas. No teste, a maior concentração dos extratos avaliados foi de 1 mg/mL e a concentração final de DMSO foi de 0,5 %.

6.5.2 Reagentes e padrões

Monoamina oxidase A recombinante humana, tiramina, clorgilina, ácido vanílico, 4-aminoantipirina, peroxidase de rábano e tiramina foram adquiridos da Sigma Aldrich.

6.5.3 Atividade de Inibição da MAO-A

A inibição da MAO-A foi realizada em placas de 96 poços seguindo o protocolo de Lopez et al. (2016), com modificações.

Foram adicionados em cada poço 50 μ L da solução cromogênica (0,8 mM de ácido vanílico, 2,5 mM de 4-aminoantipirina e 4 U/mL de peroxidase de rábano, preparados em tampão fosfato pH 7,6), 100 μ L à 3 mM de tiramina, 50 μ L do extrato de *Stachytarpheta cayennensis* em metanol, e 50 μ L de MAO-A 8 U/mL.

Em seguida a placa foi incubada a 37° C e absorvância foi lida a 490 nm a cada 5 minutos por meia hora. O controle positivo (clorgilina) e do solvente (metanol) foram considerados na placa.

6.5.4 Análise dos dados da Inibição da MAO -A

Três avaliações independentes das atividades inibitórias da MAO-A foram realizadas e os dados adquiridos foram analisados usando o *software GraphPad Prism*. Os valores de IC₅₀ do extrato hidroetanólico, feniletanóides purificados e o controle positivo foram calculados por regressão não-linear, simulando parcelas de log (concentração de inibidor) versus porcentagem de inibição normalizada.

6.6 Ensaio de atividade antioxidante em *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl

Uma das técnicas atualmente utilizada para detectar a capacidade antioxidantes de compostos, é o método baseado na eliminação do radical livre estável 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•)

6.6.1 Preparo da Solução DPPH 0,004 %

Inicialmente foi feito o preparo da solução de DPPH (0,004 %), para tanto foi pesado 0,004 g de DPPH e diluído 10 mL de metanol p.a; a solução foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e completado o volume, o frasco foi coberto com papel alumínio.

Foi verificado a absorbância da solução para garantir que a mesma estivesse menor que 1 (entre 0,8 a 0,99 em um comprimento de onda de 517 nm) depois armazenada temperatura de 4° C.

6.6.2 Preparo dos extratos para ensaio de atividade antioxidante

Foi pesado separadamente em microtubos, previamente identificados, 40 mg de extrato seco hidroalcolico e 40 mg de extrato seco aquoso que foram dissolvidos em 2 mL de metanol p.a, para se obter uma concentração de 20 mg/mL.

As demais concentrações de ambos os extratos (10 mg/mL; 5 mg/mL; 2,50 mg/mL; 1,2 mg/mL; 0,6 mg/mL; 0,3 mg/mL; 0,15 mg/mL; 0,07 mg/mL e 0,039 mg/mL), foram feitas a partir de diluição seriada.

6.6.3 Preparo das soluções para leitura em espectrofotômetro a 517 nm

Foi transferido 100 µL de cada um dos extratos preparados em diferentes concentrações para um microtubo devidamente identificado; em seguida foi acrescentado 1.900 µL da solução de DPPH.

Assim, as concentrações finais testadas dos extratos foram 1000 µg/mL; 500 µg/mL; 250 µg/mL; 125 µg/mL; 62,5 µg/mL; 31,25 µg/mL; 15,62 µg/mL; 7,81 µg/mL; 3,90 µg/mL e 1,95 µg/mL.

O branco foi preparado com 100 µL de metanol p.a acrescido de 1900 µL da solução de DPPH.

As soluções foram incubadas por 15 minutos com proteção da luz a 30 °C.

Na sequência foi adicionado 2mL de metanol p.a. na cubeta do espectrofotômetro para zerar descartando o na sequencia.

Foi adicionado 2 mL do branco para a leitura da absorbância, em seguida o descarte do branco.

Adicionou se 2 mL da solução contendo o extrato hidroalcolico na primeira concentração (20 mg/mL), e em seguida a leitura do valor da absorbância foi realizada. Este procedimento foi realizado para todas as soluções preparadas.

6.6.4 Análise dos Dados da atividade antioxidante dos extratos

Os valores de absorbância foram utilizados para calcular o percentual de atividade antioxidante dos extratos analisados em diferentes concentrações, seguindo a equação abaixo.

Cálculo da % de atividade antioxidante dos extratos

$$\% \text{ atividade antioxidante} = \frac{AB - AA}{AB} \times 100$$

Onde: AB = valor da absorbância do branco

AA = valor da absorbância da amostra

Os valores obtidos foram empregados na análise de regressão linear para determinar o EC₅₀ - concentração de antioxidante necessária para sequestrar 50 % dos radicais DPPH.

As análises foram efetuadas em triplicata e os resultados apresentados como média ± desvio padrão

A Rutina foi a solução controle (positivo), usada na concentração final de 4 mg/mL.

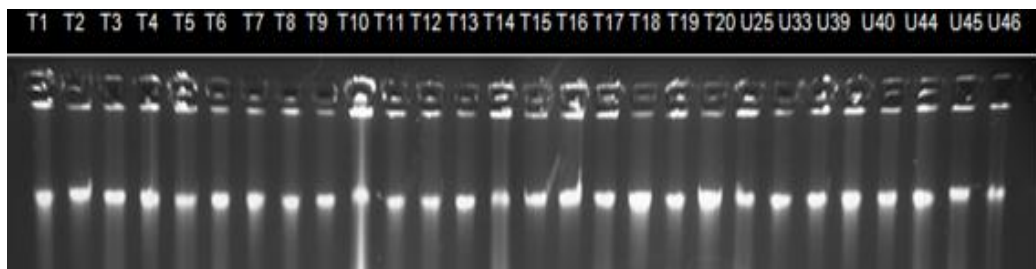
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Caracterização Molecular

7.1.1 Extração e Integridade do DNA Genômico

As modificações no protocolo de extração do DNA de *Stachytarpheta cayennensis*, foram eficientes, evidenciando a integridade e boa qualidade, apresentando uma razão 260/280 nm de 1,8 (Figura 3).

Figura 3 – Análise eletroforética da extração de DNA



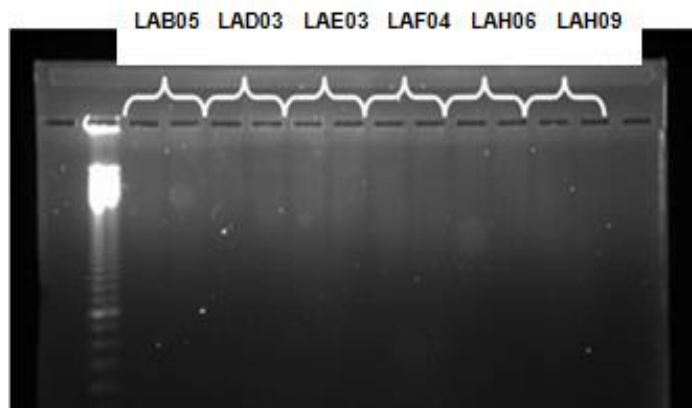
Fonte: própria

Para Macêdo (2018), o protocolo Doyle e Doyle (1990), é o método de extração de DNA mais utilizado, pois, apresenta boa resposta para diferentes espécies vegetais. Sua base em CTAB mostra muita eficiência, no entanto necessita de variações de acordo com a espécie e o tecido utilizado, essas modificações podem ser pela adição de antioxidantes, agentes desproteinizantes e outros, podem melhorar a eficiência na obtenção do DNA.

7.1.2 Amplificação por PCR e variabilidade Genética utilizando marcador molecular Microssatélites

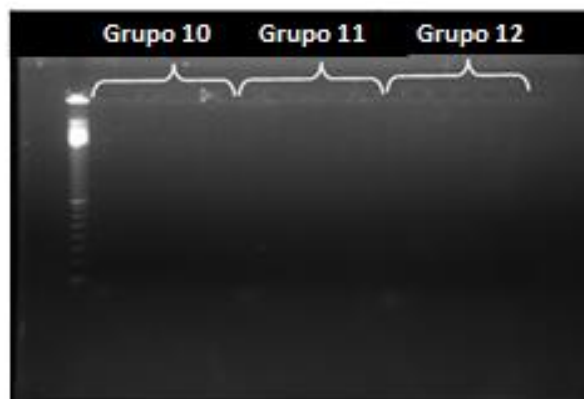
O produto da reação de PCR utilizando os primers de microssatélite (Figura 4) evidenciou que não houve amplificação com a temperatura de anelamento (55 °C), sugerida por Rocha et al., (2015). As diferentes temperaturas de anelamento utilizadas também não foram eficientes (Figura 5).

Figura 4 – Perfil do gel de agarose via PCR



(Fonte: própria)

Figura 5 – Perfil do gel de agarose via PCR com utilização de primers em diferentes temperaturas. Grupo 10 (62,2 °C), Grupo 11 (64 °C) e Grupo 12 (65,10 °C)



Fonte: própria

No caso da espécie *Stachytarpheta cayennensis*, apesar de ser da mesma família da *Lippia alba* (*Verbeceae*), a transferibilidade dos primers microssatélites desenvolvidos por Rocha (2015), para *Lippia alba*, não foram eficientes na amplificação de fragmentos, o que impossibilitou o estudo de diversidade genética utilizando este marcador molecular.

Silva (2019), também realizou estudo de transferibilidade de microssatélites entre *Campomanesia adamantium* (gabirobeira) e *Eucalyptus* spp, espécies diferentes, mas que pertencem a mesma família (*Mirtaceae*) e relatou a não eficiência da transferibilidade, concluindo que embora *Eucalyptus* spp. e *C. adamantium* sejam da mesma família, é possível que essas espécies tenham pouca homologia entre seus genomas, até mesmo pela grande distância do local originário

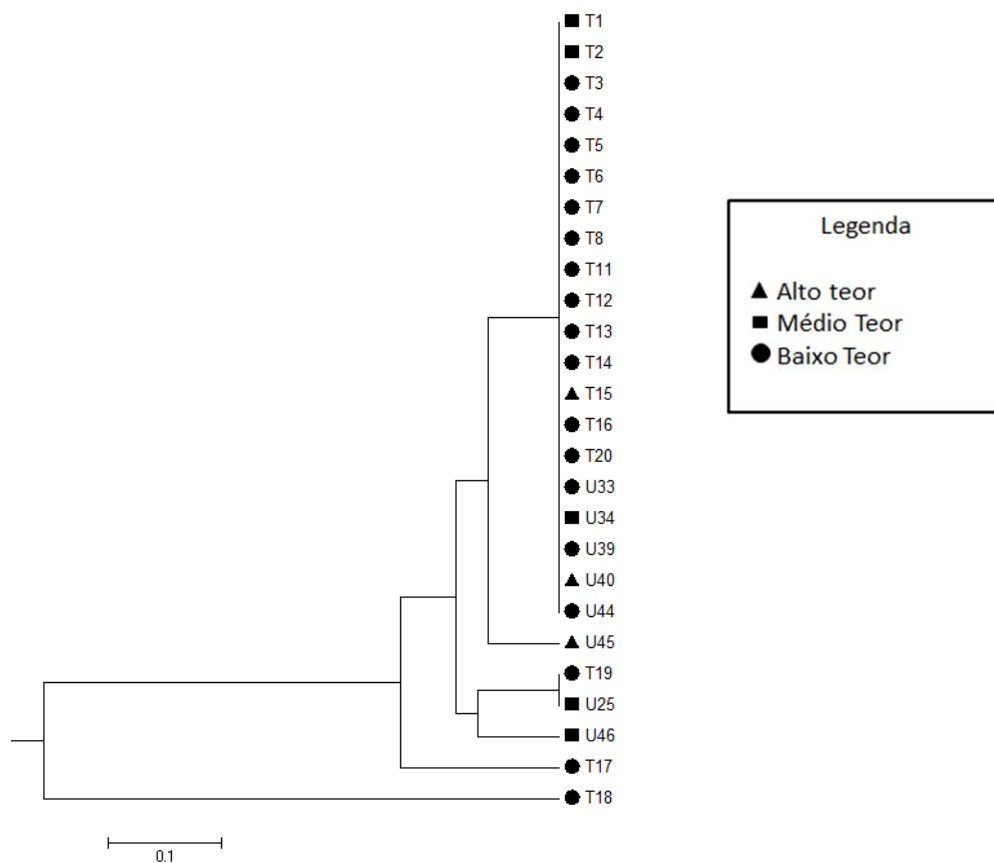
de cada uma, sugerindo que a não transferibilidade seja atribuída a distância genética entre os materiais avaliados.

7.1.3 Amplificação por PCR e variabilidade genética utilizando marcador molecular CAPS

Vários autores reconhecem a eficiência dos marcadores CAPS como uma ferramenta poderosa para distinguir genótipos. Reforçam que a combinação de técnicas biomoleculares e químicas permitem uma construção de mapa genético e uma caracterização molecular da região 5S-rRNA-NTS de seu genoma. Relatam que a metodologia é satisfatória e garantem a qualidade dos dados obtidos. Concluindo que os marcadores moleculares CAPS são valiosos recursos para programas de melhoramento e estudos genéticos (AMORIM, 2009; GNAVI et al., 2010; LIU et al., 2016; RUBIOLLO et al., 2009).

Entretanto, apesar da amplificação da região 5S-rRNA-NTS em *S. cayennensis* ter sido eficiente, separando alguns indivíduos (Figura 6), esta dissimilaridade não está correlacionada com o teor de verbascosídeo ($r=0,085$). Resultado diferente foi obtido no estudo realizado por Berteau et al. (2006), ao analisar a mesma região espaçadora do gene 5S-rRNA em *Salvia divinorum*, onde mostraram uma diferença marcante na composição do óleo e Impressão digital de DNA entre os diferentes quimiotipos identificando a existência de dois ecótipos, sugerindo portanto este método como sendo adequado para investigações fitoquímicas, forenses e toxicológicas.

Figura 6 – Dendograma da distância genética de Jaccard pelo método de agrupamento UPGMA em indivíduos de *Stachytarpheta cayennensis* utilizando o marcador molecular CAPS

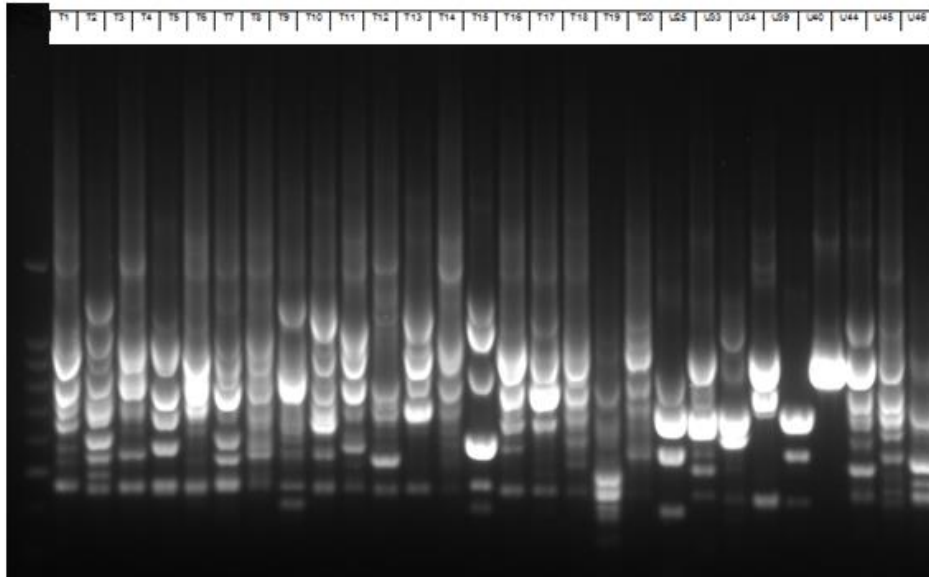


Fonte: própria

7.1.4 Amplificação por PCR e variabilidade genética utilizando marcador molecular SCoT

Os 36 primers descritos (Tabela 2), foram utilizados em duas amostras, para se evidenciar os melhores primers quanto a nitidez e o polimorfismo; assim, um total de 10 iniciadores SCoT (01, 03, 08, 09, 13, 21, 24, 29, 34 e 35), foram selecionados. Esta seleção levou em conta a quantidade de bandas amplificadas e a presença e ausência das mesmas nas diferentes amostras.

Figura 7 – Resultado da amplificação da reação de PCR utilizando marcador molecular SCoT



Fonte: própria

Os dez primers escolhidos amplificaram de 8 a 14 bandas, por primer, com um total de 107 bandas amplificadas apresentando 100 % de polimorfismo, Os iniciadores 1, 21 e 35 exibiram o maior número de bandas polimórficas (Tabela 5).

Tabela 5 – Número e porcentagem de bandas polimórficas obtidas por primers SCoT na análise molecular dos indivíduos de *Stachytarpheta cayennensis*

Primer	Sequência	Total de Bandas	%Bandas Polimórficas
1	CAACAATGGCTACCACCA	14	100
3	CAACAATGGCTACCACCG	12	100
8	CAACAATGGCTACCACGT	8	100
9	CAACAATGGCTACCAGCA	9	100
13	ACGACATGGCGACCATCG	11	100
21	ACGACATGGCGACCCACA	14	100
24	CACCATGGCTACCACCAT	8	100
29	CCATGGCTACCACCGGCC	8	100
34	ACCATGGCTACCACCGCA	9	100
35	CATGGCTACCACCGGCC	14	100
	Total	107	100

Fonte: próprio autor

Para Marakli (2018), o marcador SCoT apresenta inúmeras vantagens mas as principais são: o baixo custo, a confiabilidade, a eficiência da técnica, e a possibilidade de ser usado sozinho ou em combinação com outros marcadores.

O marcador molecular SCoT foi eficiente para analisar a variabilidade genética em indivíduos de *Stachytarpheta cayennensis*. A eficiência já foi evidenciada por Satya (2015), em estudos usando *Boehmeria nivea L. Gaudich*, eles concluíram que o polimorfismo genético gerado pelos marcadores SCoT também podem ser utilizados para rastreamento e reconstrução da história de reprodução dos genótipos domesticados.

Os indivíduos selecionados neste trabalho se dividiram em 3 grupos como pode ser visto no dendograma obtido pelo cálculo de similaridade genética utilizando o índice de Jaccard (Figura 8) e no gráfico de dispersão de Análise em Coordenadas Principais (Figura 9).

O primeiro grupo denominado A é composto por 17 indivíduos, sendo todos procedentes da Coleção de Plantas Medicinais da Farmácia da Natureza, distrito de Jurucê, município de Jardinópolis, SP, (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11, T12, T13, T15, T16, T17, T19); o segundo grupo denominado B é composto por 7 indivíduos, todos procedentes da Coleção de plantas Medicinais da UNAERP, Ribeirão Preto, SP, (U25, U33, U39, U40, U44, U45, U46); por fim o grupo denominado C é constituído por 4 indivíduos, sendo 3 provenientes da Coleção de Plantas Medicinais da Farmácia da Natureza, (T14, T18, T19) e um da Coleção de Plantas Medicinais da UNAERP (U34).

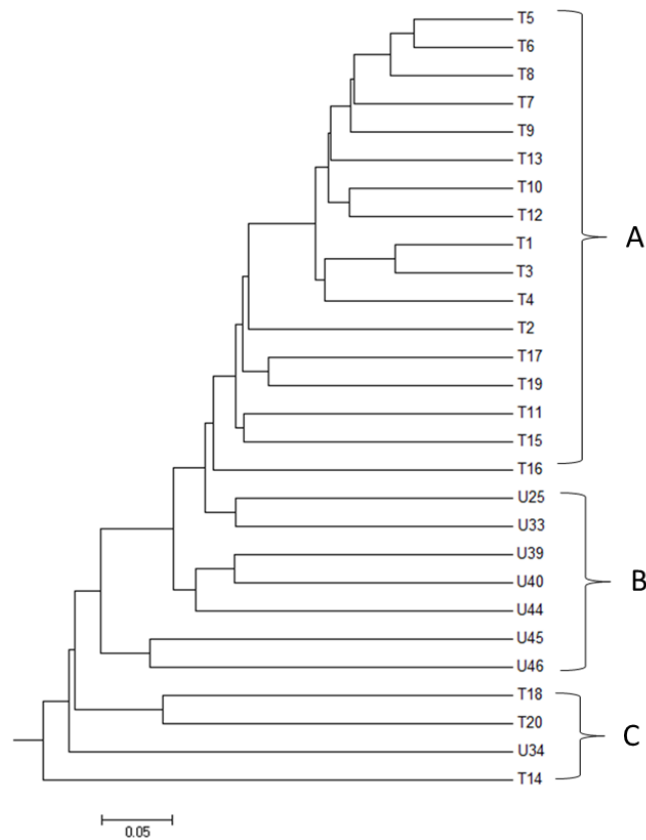
O grupo A, formado exclusivamente por indivíduos coletados na Coleção de Plantas Medicinais da Farmácia da Natureza, apresentaram grande nível de parentesco, mostrando alta similaridade genética. Muito provavelmente esta similaridade está relacionada ao tempo que esta coleção vem sendo mantida por multiplicação de progênies advindas de polinização cruzada entre os mesmos indivíduos da coleção.

Entretanto, o grupo B, composto por indivíduos exclusivamente da Coleção de Plantas Medicinais da UNAERP, apresentou uma maior diversidade genética entre os indivíduos, pois, esta coleção é composta por genótipos recentemente introduzidos procedentes de diferentes localidades (Ribeirão Preto; Piracicaba e Jaboticabal –SP, Araxá e Ituiutaba – MG).

O grupo C é composto pelos indivíduos com maior diversidade genética, sendo o indivíduo U34 procedente de Araxá o mais divergente (Figura 9).

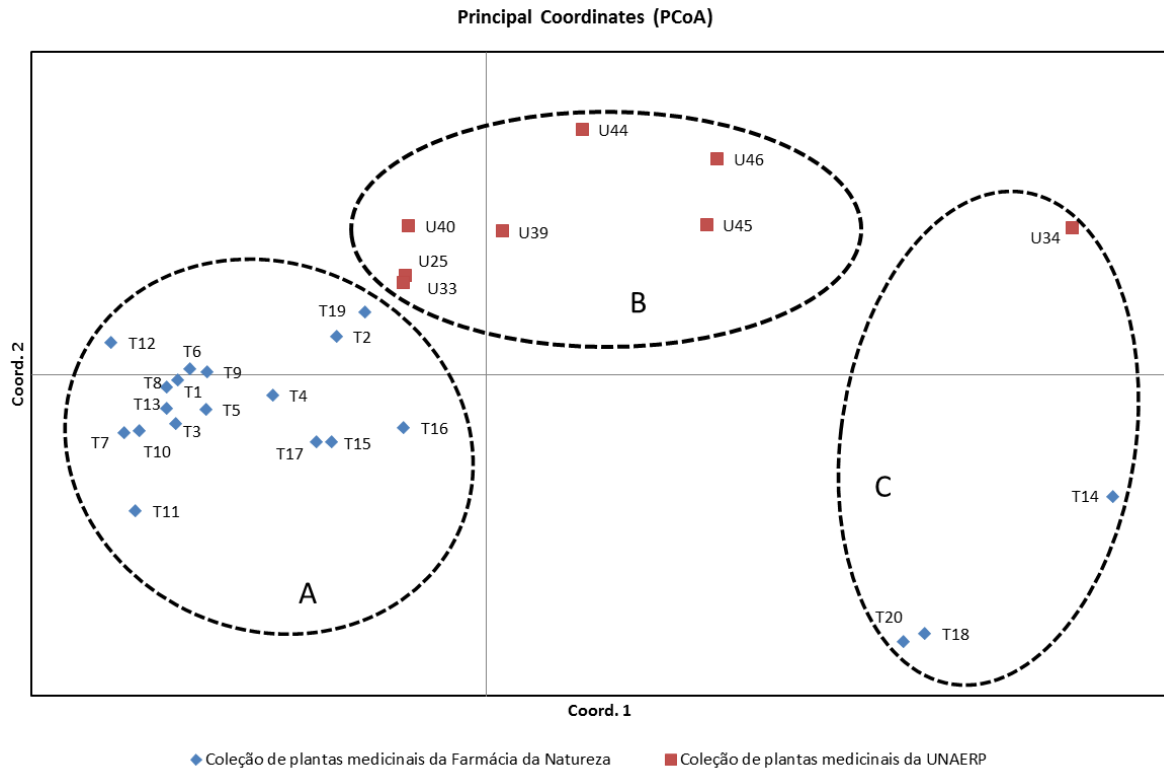
A similaridade genética média entre os indivíduos da coleção de Plantas Medicinais da Farmácia da Natureza foi de 55% e da Coleção de Plantas Medicinais da UNAERP de 47%, apresentando uma diferença entre elas de 18%.

Figura 8 – Dendograma da distância genética de Jaccard pelo método de agrupamento UPGMA em indivíduos de *Stachytarpheta cayennensis* utilizando marcadores moleculares SCoT



Fonte: próprio autor

Figura 9 – Análise das coordenadas principais (PCoA) em indivíduos de *Stachytarpheta cayennensis*



Fonte: próprio autor

O trabalho realizado por Aboulila e Mansour (2017), utilizando o marcador molecular SCoT demonstrou ser uma ferramenta poderosa para caracterizar a diversidade genética, revelando altos níveis de polimorfismo em genótipos de cevada egípcia. Concluindo que a identificação da variabilidade genética é um recurso importante para o melhoramento e manejo do germoplasma sem necessidade de muito tempo e custo.

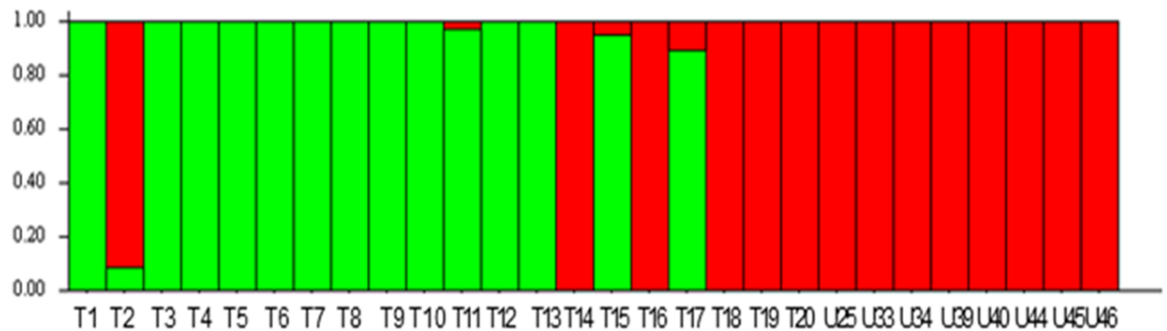
O custo da tecnologia de genotipagem e sequenciamento, tem reduzido, facilitando a identificação de genes e aceleração no desenvolvimento de novas cultivares (PÁDUA, 2018). A utilização dos marcadores moleculares facilita o direcionamento de ações associadas a caracterização, conservação e uso dos recursos genéticos. A identificação da variabilidade genética em plantas permite a obtenção via melhoramento genético, de variedades mais produtivas, resistente a

pragas, doenças e adaptadas aos diferentes ambientes (FALEIRO; AMABILE; SILVA, 2018).

O marcador molecular SCoT foi projetado utilizando-se regiões curtas que flanqueiam o códon de início da tradução do DNA (ATG), portando ele se destaca por ser confiável para correlacionar sequências funcionais, sendo portanto uma ferramenta valiosa no estudo da diversidade genética de plantas medicinais. Nos últimos anos o interesse pelo conhecimento da diversidade do germoplasma de espécies medicinais tem aumentado pois a produção de medicamentos fitoterápicos tem desempenhado um papel significativo como alternativa aos produtos farmacêuticos sintéticos (MARAKLI, 2018).

Outra análise muito utilizada para conhecimento do germoplasma das espécies é o método bayesiano utilizando o programa STRUCTURE. Em *Stachytarpheta cayennensis* esta análise evidenciou a presença de dois grupos gênicos (K=2), em que os indivíduos não apenas compartilham grupos gênicos diferentes, mas proporções dos diferentes grupos em alguns indivíduos. Os indivíduos da Coleção de Plantas Medicinais da Farmácia da Natureza (T) são constituídos em maioria pelo grupo gênico indicado pela cor verde (T1; T3; T4; T5; T6; T8; T9; T10; T12 e T13), outros quatro indivíduos compartilham proporções diferentes dos grupos verde e vermelho (T2; T11; T15 e T17), e outros cinco indivíduos apresentam apenas o grupo gênico vermelho (T14; T16; T18; T19 e T20). Os indivíduos da Coleção de Plantas Medicinais da UNAERP (U), apresentam apenas o grupo gênico vermelho (Figura 10).

Figura 10 – Grupos gênicos de indivíduos de *Stachytarpheta cayennensis* analisados através do programa STRUCTURE. A mesma cor para genótipos diferentes, indica que eles pertencem ao mesmo grupo. Cores diferentes no mesmo indivíduo indica a porcentagem do genoma compartilhado com cada grupo



Fonte: próprio autor

Esta análise não assume estrutura pré definida, ela visa delinear grupos de indivíduos com base em seus genótipos, permitindo assim a estimativa mais provável do número de clusters. É uma quantificação de quão provável cada indivíduo pertence a cada grupo e identifica a presença de mistura de populações ou seja hibridizações (EVANNO; REGNAUT; GOUDET, 2005). Portanto, fica evidente que a Coleção de Plantas Medicinais da Farmácia da Natureza contém quatro híbridos (T2, T11, T15 E T17) que contemplam proporções diferentes dos dois grupos gênicos.

Em um estudo realizado por Huded et al. (2020) com germoplasma de café utilizando marcadores moleculares SRAP e SCoT, eles relatam que a relação entre as coleções de germoplasma é essencial para o sucesso de programas de melhoramento e conservação de recursos genéticos, sugerindo que presença de misturas entre os indivíduos sugere a possibilidade de trocas genômicas entre os acessos ou linhagens parentais pertencentes a diferentes pool gênicos.

Apesar da similaridade genética ter sido maior na Coleção de Plantas Medicinais da Farmácia da Natureza, ela apresenta dois grupos gênicos distintos, que podem ser ampliados com a introdução de novos indivíduos.

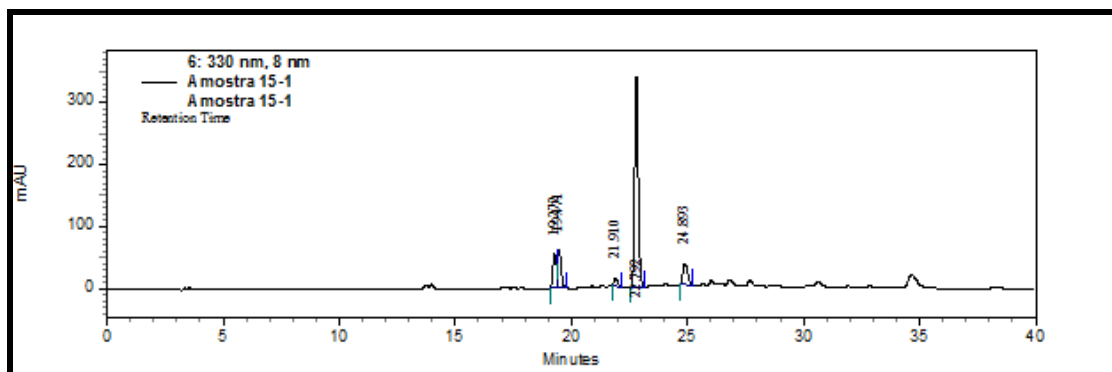
Portanto a introdução dos indivíduos da Coleção de Plantas Medicinais da Unaerp na Coleção de Plantas Medicinais da Farmácia da Natureza irá favorecer a diversidade genética, aumentando a plasticidade fenotípica da coleção, ou seja a

capacidade que os organismos apresentam de alterar a sua fisiologia ou morfologia de acordo com as condições ambientais, conferindo assim uma menor vulnerabilidade a coleção.

7.2 Caracterização Química

Na Figura 11, visualiza-se o perfil cromatográfico do extrato aquoso de *Stachytarpheta cayennensis*, podendo-se observar o tempo de retenção médio de 22.792 minutos para o verbascosídeo o qual foi equivalente ao tempo de retenção do padrão.

Figura 11 – Cromatograma obtido do extrato aquoso



Fonte: próprio autor

Da mesma forma, no trabalho de Oliveira e Sá (2016), que analisou a mesma espécie a partir de CLAE - UV e pela técnica Ressonância Magnética Nuclear (RMN), observou majoritariamente os compostos verbascosídeo e isoverbascosídeo (90%).

Portanto, os indivíduos de *Stachytarpheta cayennensis* analisados apresentaram como principal componente o verbascosídeo.

Os indivíduos procedentes da Coleção de Plantas Medicinais da UNAERP apresentaram maior média no teor de verbascosídeos (84,7 mg/g PS) do que os indivíduos da Coleção de Plantas Medicinais da Farmácia da Natureza (37,7 mg/g PS), portanto os indivíduos da Coleção de Plantas Medicinais da UNAERP

produzem 2,25 vezes mais verbascosídeo do que os indivíduos da Coleção de Plantas Medicinais da Farmácia da Natureza.

Os indivíduos apresentaram uma grande diversidade química, sendo o genótipo U40 o mais produtivo em relação ao teor de verbascosídeo (193,64 mg/g PS), com uma diferença significativa entre todos os outros genótipos. Sendo que os genótipos menos produtivos foram o U33 e T14 com 6,18 e 7,6 mg/g PS respectivamente.

Portanto o genótipo mais produtivo apresentou 31 x mais verbascosídeo do que o genótipo menos produtivo (Tabela 6). A distância entre a Coleção de Plantas Medicinais da UNAERP e a Coleção de Plantas Medicinais da Farmácia da Natureza é de apenas 22 km, as condições climáticas são muito semelhantes, e ambos os genótipos com maior e menor teor de verbascosídeo estão na Coleção de Plantas Medicinais da UNAERP (U40 e U33), sendo que o U40 é procedente da cidade de Araxá (MG) e o U33 da cidade de Piracicaba (SP).

Tabela 6 – Resultado do teste de média realizado entre os indivíduos conservados em ambas as coleções

Amostra	Teor de verbascosídeos mg/g PS	Amostra	Teor de verbascosídeos mg/g OS do extrato
T1	62,21 g	T15	173,41 b
T2	62,80 g	T16	21,22 l
T3	18,92 m	T17	19,28 m
T4	43,54 i	T18	32,92 k
T5	37,11 j	T19	31,71 k
T6	34,43 k	T20	19,57 m
T7	15,42 n	U25	71,01 f
T8	23,07 l	U33	6,18 o
T9	44,06 i	U34	100,57 d
T10	15,15 n	U39	45,91 i
T11	50,33 h	U40	193,64 a
T12	18,05 m	U44	40,95 i
T13	23,19 l	U45	143,49 c
T14	7,60 o	U46	76,03 e

As médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade.

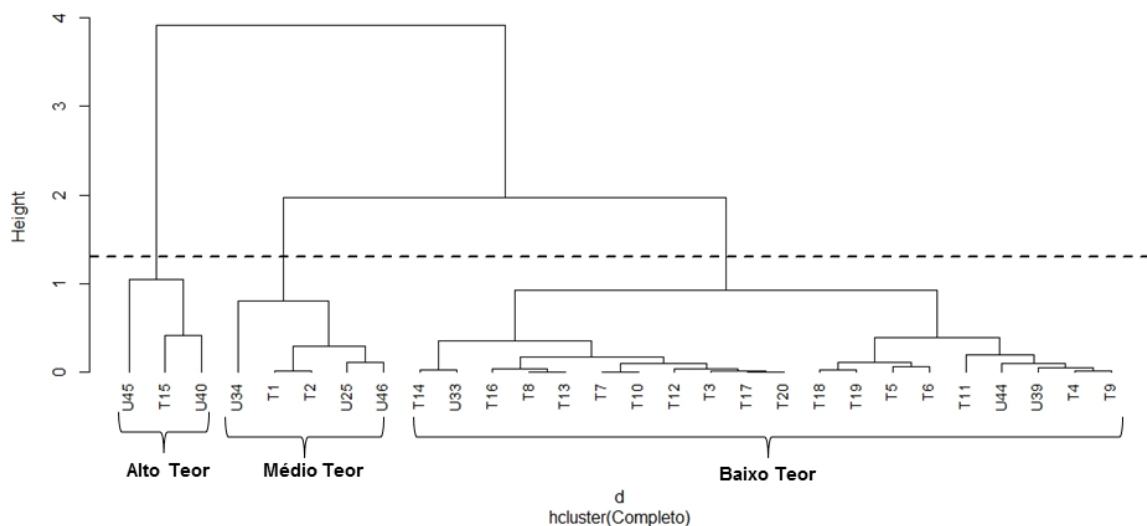
Fonte: próprio autor

A matriz gerada com as variáveis quantitativas, teor de verbascosídeo, baseada na distância euclidiana utilizando o método de agrupamento hierárquico de ligação média entre grupos (*Unweighted Pair-Group Average* – UPGMA), separou as

amostras em três grupos distintos, alto, médio e baixo teor de verbascosídeo (Figura 12).

Os maiores produtores foram os acessos denominados U40, T15 e U45 com média de produção de verbascosídeo de 170,18 mg/g PS, a maioria das amostras coletadas na Coleção de Plantas Medicinais da UNAERP. Os indivíduos com médio teor (74,52 mg/g PS) foram U34, T1, T2, U25 e os demais indivíduos ficaram todos no grupo com baixo teor de verbascosídeos, com média de 27,43 mg/g PS. Os indivíduos pertencentes ao grupo de alto e médio teor produzem 6x e 3x mais verbascosídeo do que os indivíduos do grupo de baixo teor.

Figura 12 – Análise de agrupamento entre os constituintes químicos para cada indivíduo de *Stachytarpheta cayennensis*



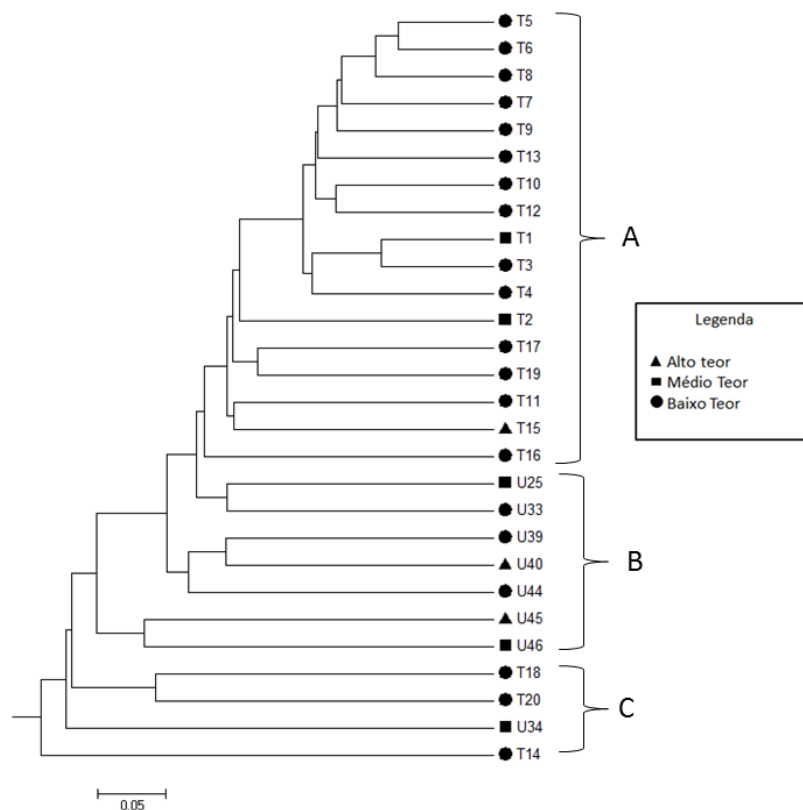
Fonte: próprio autor

A partir dos resultados obtidos com a análise dos grupos gênicos avaliados, foi constatado que não houve correlação genética com o teor de verbascosídeo produzido pelos indivíduos de *Stachytarpheta cayennensis* em ambas as coleções. A figura 13 evidencia que os indivíduos mais promissores estão inseridos em diferentes grupos genéticos.

Portanto, a introdução dos indivíduos da Coleção de Plantas Medicinais da UNAERP na Coleção de Plantas Medicinais da Farmácia da Natureza além de trazerem um ganho no aumento da diversidade genética, também contribuirá para

aumentar a média de produção do teor de verbascosídeo, principalmente com a introdução dos indivíduos U40 (193,64 mg/g PS) e U45 (143,49 mg/g PS).

Figura 13 – Dendograma baseado na matriz genética obtido utilizando o marcador molecular SCoT em indivíduos de *Stachytarpheta cayennensis*



Análises de controle de qualidade químico por si só podem não garantir a identidade da matéria prima, a base de plantas medicinais, principalmente se adulteradas por espécie que produz os mesmos compostos. Portanto, o uso concomitante de marcadores moleculares pode garantir o reconhecimento das espécies botânicas melhorando a qualidade do material utilizado como fitoterápico (CRISTIANS et al., 2018).

Portanto, estudos moleculares e químicos são fundamentais para a exploração sustentável de plantas medicinais. Sendo assim, são necessários esforços na manutenção e caracterização molecular e química do germoplasma o que contribui para a seleção de genótipos com maior rendimento, permitindo o manuseio correto do germoplasma (CELESTINO et al., 2015).

7.3 Atividade de inibição da enzima MAO-A

Embora a espécie *Stachytarpheta cayennensis* apresente ação sobre o sistema nervoso central com efeitos ansiolíticos e sedativos *in vivo* (AKANMU et al., 2006; OLAYIWOLA; IBIKUNLE, 2013) e seus principais metabólitos secundários, verbascosídeo e isoverbascosídeo, sejam potentes inibidores da MAO-A *in vitro* (PEREIRA et al., 2019) os extratos hidroalcoólico e aquoso de *Stachytarpheta cayennensis* não inibiram a atividade da enzima MAO-A em nenhuma das concentrações avaliadas.

Vieira (2001) confirmou que o extrato aquoso de *Stachytarpheta cayennensis* não apresentou qualquer atividade farmacológica no sistema nervoso central de camundongos, porém, ele constatou que este extrato atua diretamente no metabolismo de barbitúricos no sistema hepático, causando um atraso na degradação metabólica desses, razão pela qual observa uma potenciação do barbitúrico.

Os resultados dessa pesquisa sugerem que os extratos avaliados na concentração de 1 mg\dl não interferem na atividade da enzima MAO-A e que outros mecanismos podem estar associados aos efeitos ansiolíticos e sedativos exercidos pela espécie.

7.4 Atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólico e aquoso de *Stachytarpheta cayennensis* frente ao radical DPPH

A capacidade antioxidante do extrato aquoso de *Stachytarpheta cayennensis*, avaliada como percentual de inibição frente ao radical DPPH, está representado na tabela 7. Nota-se que houve variação de 3,3 % a 89,9 % de atividade antioxidante, em concentrações crescentes de 1,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do extrato.

Tabela 7 – Capacidade antioxidante do extrato aquoso de *Stachytarpheta cayennensis* frente ao radical DPPH

Concentração do extrato aquoso ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% de inibição
1,9	3,3 \pm 1,0
3,9	5,5 \pm 1,8
7,8	10 \pm 3,7
15,6	15,2 \pm 9,3
31,2	35,9 \pm 9,5
62,5	56,9 \pm 7,2
125,0	89,9 \pm 1,0

Fonte: próprio autor

A capacidade antioxidante do extrato hidroalcolico de *Stachytarpheta cayennensis* também foi avaliada frente ao radical DPPH e o percentual de inibição deste extrato está representado na tabela 8. Nota-se que houve variação de 4,8 % a 92,7 % de atividade antioxidante, em concentrações crescentes de 1,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do extrato.

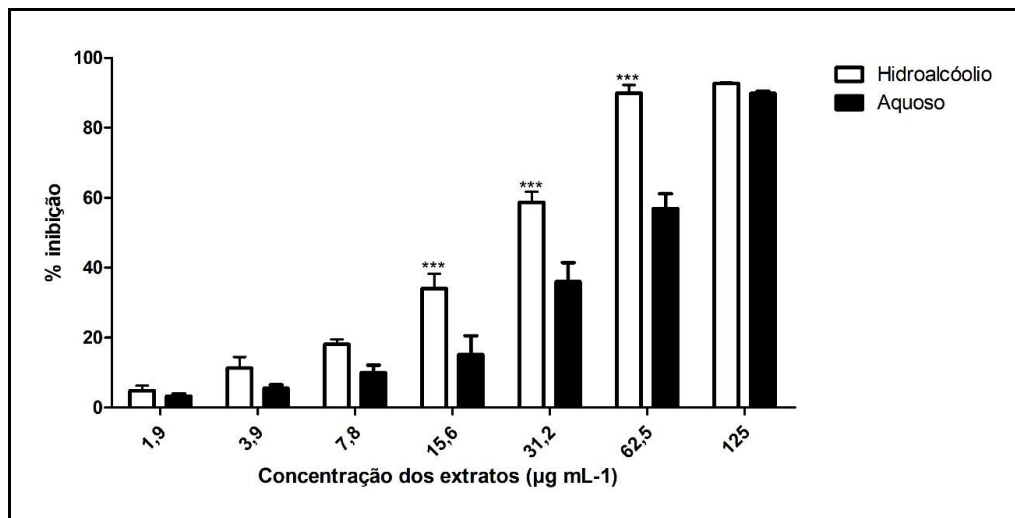
Tabela 8 – Capacidade antioxidante do extrato hidroalcolico de *Stachytarpheta cayennensis* frente ao radical DPPH

Concentração do extrato hidroalcolico ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% de inibição
1,9	4,8 \pm 1,4
3,9	11,3 \pm 3,1
7,8	18,1 \pm 1,4
15,6	34,0 \pm 4,2
31,2	58,7 \pm 2,9
62,5	89,9 \pm 2,4
125,0	92,7 \pm 0,3

Fonte: próprio autor

Os resultados obtidos mostram que ambos os extratos de *Stachytarpheta cayennensis* apresentam capacidade antioxidante significativa, embora o extrato hidroalcolico tenha se destacado com atividade mais expressiva quando avaliado nas concentrações de $15,6 \mu\text{g mL}^{-1}$, $31,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 14).

Figura 14 – Comparação entre a capacidade antioxidante dos extratos aquoso e hidroalcolico de *Stachytarpheta cayennensis*



Comparação entre a capacidade antioxidante dos extratos aquoso e hidroalcolico de *Stachytarpheta cayennensis*. A análise estatística foi pelo teste de ANOVA comparando as mesmas concentrações entre os diferentes tratamentos (hidroalcolico x aquoso). Os resultados são expressos como média e desvio padrão. Foi utilizado Bonferroni como pós-teste sendo a diferença estatística representada como * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.
Fonte: próprio autor

Os resultados obtidos nesta análise sugerem que, embora pertencentes à mesma espécie, os extratos estudados apresentam potencial antioxidante distintos. O extrato hidroalcolico apresentou IC_{50} de $26,0 \pm 0,06 \mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto que o extrato aquoso, o IC_{50} encontrado foi de $52,1 \pm 10,81 \mu\text{g mL}^{-1}$. A rutina, controle positivo utilizado neste ensaio, apresentou IC_{50} de $10,1 \pm 0,68 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 9).

Tabela 9 – IC₅₀ dos extratos hidroalcolico e aquoso de *Stachytarpheta cayennensis* e do controle positivo rutina, frente ao radical DPPH

Tratamento	IC ₅₀ (µg mL ⁻¹)
Extrato hidroalcolico	26,0 ±0,06
Extrato aquoso	52,1 ±10,81
Rutina	10,1 ±0,68

Fonte: próprio autor

Outros extratos de *Stachytarpheta cayennensis* (hexânico, clorofórmico, etanólico, butanólico) já foram avaliados em relação a atividade antioxidante (ONOFRE et al., 2015a; SOUZA et al., 2010), com resultados que corroboram com os encontrados no presente estudo ao comprovar o potencial da espécie frente a processos oxidativos.

Provavelmente a ação antioxidante exercida pelos extratos hidroalcolico e aquoso de *Stachytarpheta cayennensis* esteja associada principalmente à presença de compostos fenólicos previamente encontrados na espécie, como leucosceptosídeo A, martinósídeo e jionósídeo D, verbascosídeo e isoverbascosídeo (FROELICH et al., 2008). O verbascosídeo e isoverbascosídeo, por exemplo, quando isolados de *Stachytarpheta cayennensis* e testados separadamente mostraram ação antioxidante significativa (SOUZA et al., 2011), o que evidencia a participação destas substâncias na capacidade antioxidante da espécie.

Em relação aos valores de IC₅₀ frente ao radical DPPH, notou-se que o extrato hidroalcolico foi mais potente quando comparado ao aquoso, o que pode estar associado aos diferentes perfis químicos destes extratos, ocasionados pelo uso de solventes de diferentes polaridades e emprego de processos de extração distintos. Neste contexto, o estudo realizado por Onofre et al. (2015b) avaliou a capacidade antioxidante de extratos de polaridades crescentes de *Stachytarpheta cayennensis* (hexano, acetato de etila e etanol) em função das diferentes classes de metabólitos presentes em cada extrato, confirmando que o emprego de solventes distintos durante o processo de extração é uma estratégia importante na prospecção de metabólitos fenólicos na espécie e que a presença desta substâncias está associada a atividade antioxidante exercida pela espécie.

Compostos fenólicos são de fato moléculas amplamente reconhecidas como potencias antioxidantes devido a capacidade de doação de elétrons e pela habilidade de estabilização do elétron não pareado dentro da estrutura aromática (OLSZOWY, 2019). O interesse por espécies medicinais que contenham em sua composição estas moléculas têm crescido ao longo dos anos, dada a comprovada participação do estresse oxidativo em diversas patologias como Alzheimer (TÖNNIES; TRUSHINA, 2017), Parkinson (TRIST, HARE, DOUBLE, 2019), câncer (AGGARWAL et al., 2019), diabetes (AMIN et al., 2019) entre outras.

Assim, os resultados encontrados neste ensaio sugerem que a espécie *Stachytarpheta cayennensis*, em especial seu extrato hidroalcolico, é fonte promissora de compostos antioxidantes, podendo ser uma alternativa importante para estudos que buscam novos extratos medicinais com este potencial farmacológico.

8 CONCLUSÃO

Nessa pesquisa os dados demonstraram que não foi possível a transferibilidade dos primers de microssatélites apesar das espécies pertencerem a mesma família. Já o marcador molecular CAPS foi eficiente em separar os indivíduos, mas não identificou a existência de quimiotipos.

Os ensaios com marcadores SCoT evidenciaram polimorfismo entre todas as amostras. As análises cromatográficas identificaram uma grande variabilidade química, indicando que a coleção de Plantas Medicinais da UNAERP tem maior média de produção do verbascosídeo do que a Coleção de Plantas Medicinais da Farmácia da Natureza, concluindo portanto que a introdução dos indivíduos da Coleção de Plantas Medicinais da UNAERP na Coleção de Plantas Medicinais da Farmácia da Natureza além de trazer um ganho no aumento da diversidade genética, também contribuirá para aumentar a média de produção do teor de verbascosídeo. Foi possível confirmar pelo método de sequestro de radicais livres (DPPH) que a espécie apresenta atividade antioxidante, entretanto os indivíduos avaliados, nas condições ensaiadas não apresentaram capacidade de inibição da enzima MAO-A.

Contudo, fica claro que o gervão é um importante alvo terapêutico já discutido em outras pesquisas, podendo ser amplamente utilizada para fins fitoterapêuticos, possibilitando ainda o uso e o manejo sustentável desse importante recurso natural.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOULILA, A. A.; MANSOUR, M. Efficiency of Triple-SCoT Primer in Characterization of Genetic Diversity and Genotype-Specific Markers against SSR Fingerprint in Some Egyptian Barley Genotypes. **American Journal of Molecular Biology**, Irvine, v. 7, n. 3, 13 June 2017. DOI: 10.4236/ajmb.2017.73010.

ADEBAJO, A. C. et al. Hypoglycaemic constituents of *Stachytarpheta cayennensis* leaf. **Planta Medica**, Hippokrates Verlag, v. 73, n. 3, p. 241-250, Mar. 2007. DOI: 10.1055/s-2007-967125.

ADEBESIN, O. A., FAMA KINWA, O.O., OKPUZOR, J., In vitro cytotoxic effect of aqueous and hydroethanolic leaf extracts of *Stachytarpheta cayennensis* on the human pancreatic cell line (ASPC-1). **African Scientist** Vol. 17, No. 2 June 30, 2016. ISSN: 1595-6881

AGGARWAL, V. et al. Role of Reactive Oxygen Species in Cancer Progression: Molecular Mechanisms and Recent Advancements. **Biomolecules**, Basel, v. 9, n. 11, p. 735-766, 13 Nov. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/biom9110735>.

AKANMU, M. et al. Acute toxicity and sleep-wake eeg analysis of *Stachytarpheta cayennensis* (Verbenaceae) in rodents. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, Osun, v. 2, n. 3, p. 222-232, 2005.

AMIN, K. N. et al. The pivotal role of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 in diabetes-induced endothelial dysfunction. **Pharmacological Research**, [s. l.], v. 153, 104601, p. 104601-104637, Dec. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104601>.

AMORIM, L. L. B. **Construção de um mapa genético para feijão-caupi com marcadores moleculares ISSR, DARF E CAPS**. 2009. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

BATTISTINI, S. L. et al. **The hypotension induced by *Stachytarpheta cayennensis* Vahl is unrelated to inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) activity**. In: LATINAMERICAN CONGRESS OF PHARMACOLOGY, 16., 2001(a), Águas de Lindóia. Anais. Res. 10.173, p. 228.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Methods Enzymol**. New York, v. 299, p. 15-27, 1999. DOI: 10.1016/s0076-6879(99)99005-5

BERTEA, C. M. et al. PCR and PCR-RFLP of the 5S-rRNA-NTS region and salvinorin A analyses for the rapid and unequivocal determination of *Salvia divinorum*. Department of Plant Biology and Centre of Excellence CEBIOVEM, University of Turin, Italy. **Phytochemistry**, London, v. 67, n. 4, p. 371-378, Feb. 2006. DOI: 10.1016/j.phytochem.2005.12.006.

- BLANCO, L. C. et al. Avaliação da atividade antinociceptiva e antiinflamatória de extratos brutos de *Stachytarpheta cayennensis* e *Pleurothyrium bahiense*. **Revista Universidade Rural. Série Ciências da Vida**, Seropédica, Rio de Janeiro, v. 25, n. 1, p. 78-84, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política nacional de práticas integrativas e complementares no SUS**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciências, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009. 136 p. (Série C. Projetos, Programas e Relatórios).
- BRASIL, 2010 – Portaria nº 886 de 20 de abril de 2010. Institui a Farmácia Viva no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). Disponível em <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2010/prt0886_20_04_2010.html> Acesso em 19/10/2018.
- BUSO, G. S. C. et al. Desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites em espécies vegetais tropicais. **Revista de Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Anápolis, n. 30, p. 46-50, 2003.
- CAITANO, V. C. et al. Novos componentes de *Stachytarpheta cayennensis* Vahl - gervao roxo. In: REUNIAO ANUAL SOBRE EVOLUCAO, SISTEMATICA E ECOLOGIA MICROMOLECULARES, 18., 1996, São Paulo. Anais [...]. São Paulo, 1996.
- CELESTINO, R. S. et al. Molecular and chemical characterization of Vetiver, *Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty germoplasm. **Genetics and Molecular Research**, Orlando, v.14, n. 3, p. 9452-9468, 2015. DOI:<http://dx.doi.org/10.4238/2015.August.14.9>
- CHINWUDE, Z. I.; ACHUNIKE, A. P.; OGBONNAYA, O. C. Antiplasmodial Activity and Some Active Compounds from *Stachytarpheta cayennensis* Vahl. (Verbenaceae) Leaf Fractions. **Anti-Infective Agents**, Roma, v. 14, n. 2, 2016. DOI: 10.2174/2211352514666160725130125.
- CRISTIANS, S.; BYE, R.; NIETO-SOTELO, J. Molecular marker associated with chemical analysis: a powerful tool for qualitative control assessemtn of Calpalchi medicinal plant complex. **Frontiers in Pharmacology**, Lausanne, v. 9, aticle 666. Doi: 10.3389/fpha.2018.00666.
- COLLARD, B. C. Y.; MACKILL, D. J. Start Codon Targeted (Scot) Polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. **Plant Mol. Rep.**, Amsterdam, v. 27, p. 86-93, 2009. DOI: 10.1007/s11105-008-0060-5
- COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. 452p.

CONSELHO FEDERAL DE ENFERMAGEM. Resolução COFEN nº 290/04, de 14 de março de 2004. Dispõe sobre a fixação das especialidades de enfermagem. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 mar. 2004.

DALMAGRO, A.P.; GASPARETTO, A., *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl: preliminary phytochemical constitution and antibacterial effect. **Brazilian Journal of health Review**, Curitiba, v. 3, n. 1, p. 532-544 jan./feb. 2020.

DOI:10.34119/bjhrv3n1-041

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Boston, v. 12, n. 1, p.13-15, 1990.

ENDNOTE WEB. **Clarivate**. Disponível em: <<https://www.myendnoteweb.com>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

ELIAKIM-IKECHUKWU, C.; OBRI, A.; IGIR, A. The effect of aqueous ethanolic extract of *Stachytarpheta cayennensis* on the histology of the liver and fasting blood sugar of non-diabetic and diabetic wistar rats. **The Internet Journal of Nutrition and Wellness**, Houstoun, v. 10, n. 1, p. 1-6, 2009.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, p. 2611-2620, 2005. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x

EZENYI, I. C.; AKAH, P. A.; OKOLI, C. O. *Stachytarpheta cayennensis* methanol leaf extract and solvent fractions display antiplasmodial activity against plasmodium berghei berghei in vivo. **International Journal of Phytopharmacology**, Chennai, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2016.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-molecular aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina: EMBRAPA Cerrados, 2007. 102 p.

FALEIRO, F. G. AMABILE, R. F.; SILVA, C. B. C. Marcadores moleculares aplicados ao melhoramento genético de plantas. In: AMABILE, R. F.; VILELA, M. S.; PEIXOTO, J. R. **Melhoramento de Plantas**. Variabilidade genética, ferramentas e mercado. Brasília: Sociedade Brasileira de melhoramento de plantas. 2018. p. 53-76.

FERREIRA, D. F. **SISVAR (Sistema para análise de variância de dados balanceados) v.4.3**. Lavras: UFLA, 2003.

FOLLMER, C.; BEZERRA NETTO, H. J. C. Fármacos multifuncionais: monoamina oxidase e α -sinucleína como alvos terapêuticos na doença de Parkinson. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 2, p. 306-313, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000200017>

FRANCISCO, D. **Aspectos agronômicos, teor de ipolamida e verbascosídeo de clones de gervão-roxo [*Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl]**. 2019. 40 f. Dissertação (Mestrado em Horticultura) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2019.

FROELICH, S. et al. Phenylethanoid glycosides from *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl, Verbenaceae, a traditional antimalarial medicinal plant. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, n. 4, p. 517-520, Dec. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000400003>

FUNDAÇÃO HERBARIUM DE SAÚDE E PESQUISA. **Introdução a fitoterapia: utilizando adequadamente as plantas medicinais.** Colombo: Herbarium Laboratório Botânico, 2008.

GNAVI, G.; BERTEA, C. M.; AFFEI, M. PCR, sequencing and PCR–RFLP of the 5S-rRNA-NTS region as a tool for the DNA fingerprinting of medicinal and aromatic plants. **Flavour and Fragrance Journal**, Delft, v. 25, p. 132-137, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1002/ffj.1970>

GNAVI, G. et al. Comparative characterization of *Santolina insularis* chemotypes by essential oil composition, 5S-rRNA-NTS sequencing and EcoRV RFLP –PCR. **Phytochemistry**, London, v. 71, p. 930-936, 2010. DOI: [10.1016/j.phytochem.2010.03.012](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.03.012).

GOEDERT, C. O. Histórico e avanços em recursos genéticos no Brasil. In: NASS, L.L. (Ed). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: EMBRAPA, 2007. cap. 1, p. 23-59.

GORJI, A. M. et al. Efficiency of arbitrarily amplified dominant markers (SCoT, ISSR and RAPD) for diagnostic fingerprinting in tetraploid potato. **American Journal of Potato Research**, [s. l.], v. 88, p. 226-237, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12230-011-9187-2>

HUDED, A. K. C. et al. Genetic Diversity and Population Structure Analysis of Coffee (*Coffea canephora*) Germplasm Collections in Indian Gene Bank Employing SRAP and SCoT Markers. **International Journal of Fruit Science**, Lincoln, 2020. DOI: [10.1080/15538362.2020.1768618](https://doi.org/10.1080/15538362.2020.1768618)

HEUBL, G. DNA Based Authentication of TCM Plants: Current Progress and Future Perspectives. In: WAGNER, H.; ULRICH, G. M. (eds.). Vienna: Springer Vienna, 2013.

HOFFMANN, L. V.; BARROSO, P. A. V. **Marcadores moleculares como ferramentas para estudos de genética de plantas**. Campina Grande: EMBRAPA Algodão, 2006. (Documentos, 147).

HU, C. Y.; TSAI, Y. Z.; LIN, S. F. Development of STS and CAPS markers for variety identification and genetic diversity analysis of tea germplasm in Taiwan. **Botanical Studies**, Taipei, v. 55, p. 12, Dec. 2014. DOI: [10.1186/1999-3110-55-12](https://doi.org/10.1186/1999-3110-55-12).

KANG-TSU, L. et al. Identification of *Ginseng radix* in Chinese medicine preparations by nested PCR-DNA sequencing method and nested PCR restriction fragment length polymorphism, **Journal of Food and Drug Analysis**, Amsterdam, v. 18, n. 1, p. 58-63, 2010.

LIU, S. L. et al. Development of cleaved amplified polymorphic sequence markers and a CAPS based genetic linkage map in watermelon (*Citrullus lanatus* [Thunb.] Matsum. and Nakai) constructed using whole-genome re-sequencing data. **Breeding Science**, Ibaraki, v. 66, n. 2, p. 244-259, Mar. 2016. DOI: 10.1270/jsbbs.66.244

LOPATA, V. J. et al. Triagem fitoquímica e atividade antimicrobiana da *Stachytarpheta cayennensis* – Gervão (L.C. Rich) Vahl. **Revista Eletrônica de Biociências, Biotecnologia e Saúde**, Curitiba, n. 2, p. 44-53, maio/ago. 2011.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002.

MACÊDO, R. R. A. **Padronização de protocolos e de extração de DNA total para o gênero *Marsetia* DC. (Melastomataceae)**. 2018. 27 f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2018.

MALEKZADEH, K.; MAHMOODNIA, M.; AMIREBRAHIMI, F. F. Genetiese diversiteit analyse onder manlike en vroulike Pistachio genotypes met behulp van begin Codon geteiken (spot) merkers. **Journal of Plant Molecular Breeding**, Sari, 2019. DOI: 10.22058/jpmb.2019.108160.1183.

MAQUIAVELI, C. D. C. et al. *Stachytarpheta cayennensis* extract inhibits promastigote and amastigote growth in *Leishmania amazonensis* via parasite arginase inhibition. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 192, p. 108-113, Nov. 2016. DOI: 10.1016/j.jep.2016.07.044.

MARAKLI, S. A. Brief Review of Molecular Markers to Analyse Medicinally Important Plants. **International Journal of Life Sciences and Biotechnology**, Samsun, v. 1, n. 1, p. 29-36, 2018.

MESIA-VELA, S. **Mecanismos das ações anti-secretora ácida e antiúlcera gástrica de princípios ativos isolados do gervão-roxo (*Stachytarpheta cayennensis* Vahl)**. 1998. 194 f. Tese (Doutorado) - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1998.

MESIA-VELA, S. et al. Inhibition of gastric acid secretion by the aqueous extract and purified extracts of *Stachytarpheta cayennensis*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 63, n. 1, p. 36-39, 1997. DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-2006-957599>.

MESIA-VELA, S. et al. Pharmacological study of *Stachytarpheta cayennensis* Vahl in rodents. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 11, n. 7/8, p. 616-624, Nov. 2004. DOI: 10.1016/j.phymed.2003.05.001.

MOLDENKE, H. N. Flora of Panama Part IX. Family 168. Verbenaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, St. Louis, v. 60, n. 1, p. 41-148, 1973.

MOREIRA, R. C. R. et al. Efeito leishmanicida in vitro de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**,

Curitiba, v. 17, n. 1, p. 59-63, Mar. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2007000100013>.

MOREIRA, T. M. S.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 20, n. 3, p. 435-440, jun. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010000300023>.

NASS, L. L. Utilização de recursos genéticos vegetais no melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. (eds.). **Recursos genéticos e melhoramento** - plantas. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 29-56.

OKOKON, J. E.; ETTEBONG, E.; ANTIA, B. S. In vivo antimalarial activity of ethanolic leaf extract of *Stachytarpheta cayennensis*. **Indian Journal of Pharmacology**, India, v. 40, n. 3, p. 111-113, Jun. 2008. DOI: 10.4103/0253-7613.42303.

OKORONKWO, N. E.; ECHEME, J. O.; ONWUCHEKWA, E. C. Cholinesterase and bacterial inhibitory activities of *Stachytarpheta cayennensis*. **Academic Research International**, Lodhran City, v. 2, n. 3, May 2012.

OKOYE, T. C.; et al. Anticonvulsant and sedative effects of leaf extracts of *Stachytarpheta cayennensis*. **Journal of Tropical Medicinal Plants**, [s.l.], v. 9, n. 1, p. 17-22, 2008.

OKOYE, T. C. et al. Antimicrobial and antispasmodic activity of leaf extract and fractions of *Stachytarpheta cayennensis*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Haikou, v. 3, n. 3, p. 189-192, Mar. 2010. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(10\)60006-5](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(10)60006-5).

OKOYE, T. C. et al. Immunomodulatory effects of *Stachytarpheta cayennensis* leaf extract and its synergistic effect with artesunate. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 14, p. 376, Oct. 2014. DOI: 10.1186/1472-6882-14-376.

OLAYIWOLA, G.; IBIKUNLE, F. Antipsychotic Effect of the Leaves of *Stachytarpheta cayennensis* (L.C. Riche) Vahl. Verbenaceae in Mice. **Nigerian Journal of Natural Products and Medicine**, Ile-Ife, v. 17, 2013. DOI: 10.4314/njnpm.v17i1.2

OLAYIWOLA, G.; UKPONMWAN, O.; OLAWODE, D. Sedative and anxiolytic effects of the extracts of the leaves of *Stachytarpheta cayennensis* in mice. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, Ile-Ife, v. 10, n. 6, p. 568-579, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.4314/ajtcam.v10i6.32>.

OLIVEIRA, D. M. S. et al. Isolamento do verbacosídeo e validação de método analítico para padronização do extrato bruto das partes aéreas de *buddleja stachyoides* cham. & schltl. (scrophulariaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 37, n. 2, p. 344-348, 2014. DOI: <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140057>.

OLIVEIRA E SÁ, A. M. **Estudo da ação de compostos naturais da planta *Stachytarpheta cayennensis* (Gervão roxo) sobre a enzima arginase de *Leishmania (Leishmania) amazonensis***. 2016. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

OLSZOWY, M. What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants? **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 144, p.135-143, Nov. 2019.

ONOFRE, S. B.; KAGIMURA, F. Y.; MATTIELLO, S. P. Antimicrobial activity of essential oils obtained from *Stachytarpheta cayennensis*, (Rich.) Vahl. (Verbenaceae) collected in the South-west region of Paraná-Brazil. **Journal of Medicinal Plants of Research**, Nsukka, v. 8, n. 46, p. 1347-1353, Dec. 2014. DOI: 10.5897/JMPR2014.5548.

ONOFRE, S. B. et al. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoids contents in *Stachytarpheta cayennensis*, (Rich.) Vahl. (Verbenaceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, Nsukka, v. 9, n. 17, p. 569-575, May 2015a . DOI: <https://doi.org/10.5897/JMPR2014.5751>.

_____. Antifungal activity of the aqueous extract of *Stachytarpheta cayennensis*, (Rich.). **Journal of Medicinal Plants Research**, Nsukka, v. 9, n. 2, p. 42-47, Jan. 2015b. DOI: 105897/JMPR2014.5667.

PÁDUA, J. G. Recursos genéticos aplicados ao melhoramento de plantas. In: AMABILE, R. F.; VILELA, M. S.; PEIXOTO, J R. (eds.). **Melhoramento de Plantas**. Variabilidade genética, ferramentas e mercado. Brasília: Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas, 2018. p. 27-36.

PAES, L. S. **Aspectos estruturais de *Costus spicatus* (Jacq.)Sw.(pobrevelho), *Stachytarpheta cayennensis* (Rich)Vahl (gervão), *Ayapana triplinervis* (M.Vahl)R.M King &H.Rob.(japana) numa perspectiva micológica e fitoquímica**. 2011. 122 f. Tese (Doutorado em Agronomia Tropical) – Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2011.

PEAKALL, R., SMOUSE P.E., **GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research**. First published: 21 December 2005 <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>

PENIDO, C. et al. Anti-inflammatory and anti-ulcerogenic properties of *Stachytarpheta cayennensis* (LC Rich) Vahl. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne v. 104, n. 1-2, p. 225-233, 8 Mar. 2006. DOI: 10.1016/j.jep.2005.09.006.

PEREIRA, A. M. S. et al. Isolation and Identification of Phenylethanoid Glycosides from *Aloysia polystachya* and Its Activity as Inhibitors of Monoamine Oxidase-A. **Planta Medica International Open**, New York, v. 6, n. 1, p. 1-6, Jan. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/a-0787-1665>.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984. p. 393-395. v. 3.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, Baltimore, v. 155, n. 2, p. 945-959, Jun. 2000.

QUEIROZ, M. A.; LOPES, M. A. Importância dos recursos genéticos vegetais para o agronegócio. In: NASS, L. L. (ed.). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: EMBRAPA, 2007. cap. 2, p. 61-108.

RAUNIYAR, R. et al. Anti-Tyrosinase activity of *Stachytarpheta cayennensis* in vitro. **International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology**, Maharashtra, v. 3, n. 7, Jul. 2014.

ROCHA, D. S., C.P. Santos , M.M. Bajay , J.B. Campos , A.F. Blank , J.B. Pinheiro, M.I. Zucchi **Development of a novel set of microsatellite markers for Lippia alba (Verbenaceae)**, Genet. Mol. Res. 14 (1): 971-974 (2015) Published February 3, 2015 DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2015.February.3.4>

RUBIOLO, P. et al. Chemical and Biomolecular Characterization of *Artemisia umbelliformis* Lam., an Important Ingredient of the Alpine Liqueur “Genepi”. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, New York, 2009, v. 57, n. 9, p. 3436-3443, 2009. DOI:10.1021/jf803915v

SANCHEZ-MORENO, C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, Madris, v. 8, p. 121-137, 2002. DOI:<https://doi.org/10.1106/108201302026770>.

SATYA, P. Start codon targeted (SCoT) polymorphism reveals genetic diversity in wild and domesticated populations of ramie (*Boehmeria nivea* L. Gaudich.), a premium textile fiber producing species. **Meta Gene**, Amsterdam, v. 3, p. 62-70, Feb. 2015. DOI: 10.1016/j.mgene.2015.01.003.

SCHAPOVAL, E. E. et al. Antiinflammatory and antinociceptive activities of extracts and isolated compounds from *Stachytarpheta cayennensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 60, n. 1, p. 53-59, 2010. DOI: 10.1016/s0378-8741(97)00136-0.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A cluster analyses method for grouping means in the analyses of variance. **Biometrics**, Oxford, v. 30, n. 3, p. 507-512, Sep. 1974.

SHAVRUKOV, Y. N. CAPS Markers in Plant Biology. **Russian Journal of Genetics: Applied Research**, v. 6, n. 3, p. 279-287, 2016.

SIGRIST, M. S. **Divergência genética em *Curcuma longa* L. utilizando marcadores microssatélites e agromorfológicos**. 2009. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto Agronômico, Campinas, 2009.

SIJU, E. N. et al. Anti inflammatory activity of the whole plant of *Stachytarpheta cayennensis*. **International Journal of Pharmacy & Life Sciences**, Madhya Pradesh, v. 3, n. 6, p. 1777-1779, 2012.

SILVA, C. W. **Validação de Primers Microssatélites para *Campomanesia Adamantium* (Cambess.) O. Berg**. 2019. 25 f. Monografia (Graduação) – Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.

SILVEIRA, L. M. S. et al. Atividade antibacteriana de extrato de gervão frente cepas de *Staphylococcus aureus* oxacilina-sensíveis e oxacilina-resistentes isoladas de amostras biológicas. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 4, p. 299-301, 2007.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de química analítica**. 9ª. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2014.

SOSSAE, F. C. **Plantas medicinais**. 2008. Disponível em:

<<http://educar.sc.usp.br/biologia/prociencias/medicinais.html>>. Acesso em: 13 de jul 2018.

SOUZA, P.A. et al. Evaluation of antimicrobial, antioxidant and phototoxic activities of extracts and isolated compounds from *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl, Verbenaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 20, n. 6, p. 922-928, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010005000042>.

SOUZA, P. A. et al. Antioxidant activity of natural compounds of *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl, Verbenaceae, by scavenger of mitochondrial reactive oxygen species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 3, p.420-426, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000050>

THE RAINFOREST PLANT DATABASE. Disponível em: <<http://www.rain-tree.com>>. Acesso em: 3 jan. 2017.

TÖNNIES, E., TRUSHINA E. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, Amsterdam, v. 57, n. 4, p. 1105-1121, 2017. DOI: 10.3233/JAD-161088

TRIST, B. G.; HARE, D. J.; DOUBLE, K. L. Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. **Aging Cell**, Oxford, v. 18, n. 6, e13031, 20 ago. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/accel.13031>.

TROVÓ, M. M.; SILVA, M. E. P. Terapias alternativas / complementares a visão do graduando de enfermagem. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, São Paulo, v. 36, n. 1, mar. 2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0080-62342002000100012> Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0080-62342002000100012>. Acesso em: 16 jun. 2015.

TURCHETTO-ZOLET, A. C. et al. (org.). **Marcadores moleculares na era genômica: metodologias e aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. 181 p.

VIEIRA, R. A. **Avaliação dos efeitos centrais do extrato aquoso de *Stachytarpheta cayennensis*Vahl**. 2001.155 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

XIE, J.; SCHAICH, K. M. Re-evaluation of the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Free Radical (DPPH) Assay for Antioxidant Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 62, n. 19, p. 4251-4260, 2014.

YORINORI, J. T.; KIIHL, R. A. de S. Melhoramento de plantas visando resistência a doenças. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS (eds.). **Recursos genéticos e melhoramento**: plantas. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 715-736.

YOUMBI, L.M., ATONTSA, B.C.K., TANKEO, S.B., Wamba BEN, NAYIM, P., NGANOU, B.K., BITCHAGNO, G.T.M., SIMO, I.K., MPETGA, J.D.S., PENLAP, V.B. and KUETE, V. Antibacterial potential and mechanism of action of botanicals and phytochemicals from *Stachytarpheta cayennensis* (Verbenaceae) against Gram-negative multidrug-resistant phenotypes expressing efflux pumps. **Investigational Medicinal Chemistry and Pharmacology** (2020) 3(1):35; Doi: <https://dx.doi.org/10.31183/imcp.2020.00035>