

Produção e Controle de Produtos Naturais

Natiéli Piovesan
Vanessa Bordin Viera
(Organizadoras)

some

 **Atena**
Editora

Ano 2018

NATIÉLI PIOVESAN
VANESSA BORDIN VIERA
(Organizadores)

Produção e Controle de Produtos Naturais

Atena Editora
2018

2018 by Atena Editora

Copyright © da Atena Editora

Editora Chefe: Prof^a Dr^a Antonella Carvalho de Oliveira
Diagramação e Edição de Arte: Geraldo Alves e Natália Sandrini
Revisão: Os autores

Conselho Editorial

Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
Prof^a Dr^a Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof^a Dr^a Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista
Prof^a Dr^a Deusilene Souza Vieira Dall’Acqua – Universidade Federal de Rondônia
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Prof^a Dr^a Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof^a Dr^a Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie di Maria Ausiliatrice
Prof^a Dr^a Juliane Sant’Ana Bento – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof^a Dr^a Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Prof^a Dr^a Natíeli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof^a Dr^a Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof^a Dr^a Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas
Prof^a Dr^a Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Prof^a Dr^a Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)	
P964	Produção e controle de produtos naturais [recurso eletrônico] / Organizadoras Natíeli Piovesan, Vanessa Bordin Viera. – Ponta Grossa (PR): Atena Editora, 2018. Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader Modo de acesso: World Wide Web Inclui bibliografia ISBN 978-85-85107-59-8 DOI 10.22533/at.ed.598181510 1. Biodiversidade. 2. Plantas – Cultivo e manejo. I. Piovesan, Natíeli. II. Viera, Vanessa Bordin. CDD 577.27
Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422	

O conteúdo do livro e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores.

2018

Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

www.atenaeditora.com.br

APRESENTAÇÃO

O Brasil possui uma das floras mais ricas e diversificadas do mundo – quase 19% da flora mundial. Nosso conhecimento sobre a diversidade, o cultivo e os benefícios que as plantas, frutos e sementes podem proporcionar ainda são incompletos. Dessa forma ressaltamos a importância de se continuar a explorar e conhecer o potencial que a flora brasileira possui.

Nesse intuito o e –book Produção e Controle de Produtos Naturais é composto por 13 artigos científicos que abordam assuntos de extrema importância relacionados à flora brasileira. O leitor irá encontrar assuntos que abordam temas como a atividade toxicológica de fungos, a composição química, biológica, atividade antioxidante, alelopática, citotóxica, anticitotóxica, teor de fenólicos totais e teor de flavonoides totais de plantas, além de fatores que podem ter influência sobre esses aspectos.

O e-book Produção e Controle de Produtos Naturais também apresenta artigos com intuito de orientação e incentivo ao uso, cultivo e manejo de plantas medicinais, além de temas relacionados à Gestão Ambiental e Sustentabilidade.

Diante da importância de discutir a biodiversidade, os artigos relacionados neste e-book, visam disseminar o conhecimento acerca da constituição da flora brasileira e promover reflexões sobre os temas. Por fim, desejamos a todos uma excelente leitura!

Natiéli Piovesan e Vanessa Bordin Viera

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
ANIDROCOCHLIOQUINONA A E ATIVIDADE ANTAGONISTA DO FUNGO ENDOFÍTICO <i>BIPOLARIS</i> SP. ASSOCIADO A <i>CYMBOPOGON NARDUS</i>	
<i>Vanessa Mara Chapla</i> <i>Sara Bruna Sousa Dantas</i> <i>Gabriel Leda de Arruda</i> <i>Aloísio Freitas Chagas Junior</i>	
CAPÍTULO 2	12
A PODA DO SISTEMA RADICULAR MELHORA A QUALIDADE DAS PLANTAS DE CACAU (<i>THEOBROMA CACAO</i> L.; MALVACEAE)	
<i>Luana Linhares Negreiro</i> <i>Dheyson Prates da Silva</i> <i>Iselino Nogueira Jardim</i>	
CAPÍTULO 3	15
ATIVIDADE ALELOPÁTICA E ANTIOXIDANTE DAS FOLHAS DE <i>METRODorea nigra</i> A. ST. HILL	
<i>Rodrigo de Souza Miranda</i> <i>Roberto Carlos Campos Martins</i> <i>Naomi Kato Simas</i> <i>Anne Caroline Candido Gomes</i>	
CAPÍTULO 4	29
AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO DE COPAÍBA (<i>COPAIFERA</i> SP.) COMERCIALIZADO NO MUNICÍPIO DE MARABÁ-PARÁ POR GC-MS	
<i>Danielle Rodrigues Monteiro da Costa</i> <i>Simone Yasue Simote Silva</i> <i>Sebastião da Cruz Silva</i> <i>João Marcos Dichtl Oliveira</i> <i>Ianara Viana Vieira</i> <i>Mayra Ellen dos Santos Neres</i>	
CAPÍTULO 5	42
<i>BAUHINIA</i> SP. SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE SAZONALIDADE INDUZ ATIVIDADE ANTICÂNCER EM SARCOMA-180 <i>IN VITRO</i>	
<i>Judá Ben-Hur de Oliveira</i> <i>Jean Carlos Vencioneck Dutra</i> <i>Suiany Vitorino Gervásio</i> <i>Mirieli Bernardes Xavier</i> <i>Paula Roberta Costalonga Pereira</i> <i>Mainã Mantovanelli da Mota</i> <i>Maria do Carmo Pimentel Batitucci</i>	
CAPÍTULO 6	60
CHEMICAL PROFILE OF CRUDE EXTRACTS OF <i>ARTHROSPIRA PLATENSIS</i> BIOMASSES CULTIVATED IN DIFFERENT CULTURE MEDIA	
<i>Laura Patrício de Almeida Nunes Cavalcanti</i> <i>Cláudia Maria Luz Lapa Teixeira</i> <i>Roberto Carlos Campos Martins</i>	
CAPÍTULO 7	69
<i>CORIANDRUM SATIVUM</i> EM ESTÁDIO VEGETATIVO E FLORAÇÃO INDUZ ATIVIDADE ANTICÂNCER <i>IN VITRO</i>	
<i>Vanessa Silva dos Santos</i> <i>Jean Carlos Vencioneck Dutra</i>	

Suiany Vitorino Gervásio
Paula Roberta Costalonga Pereira
Mainã Mantovanelli da Mota
Patrícia Carara dos Santos
Maria do Carmo Pimentel Batitucci

CAPÍTULO 8 83

CULTIVO E USO DAS PLANTAS MEDICINAIS TRADICIONAIS NA COMUNIDADE IPAMERINA, GOIÁS

Marcos Vinícios Faleiro
Wesley Costa Silva
Mateus de Sousa Mendes Alves do Nascimento
Alcione da Silva Arruda
Nivaldo Estrela Marques

CAPÍTULO 9 97

FUNGOS DE SEDIMENTOS MARINHOS DA ANTÁRTICA: PRODUÇÃO DE EXTRATOS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CONTRA *XANTHOMONAS AXONOPODIS* PV. *PASSIFLORAE*

Daiane Cristina Sass
Gabrielle Vieira
Jelena Puríc
Vítor Rodrigues Marin

CAPÍTULO 10 106

IRIDOIDES E CUMARINAS DO CAULE DE *TOCOYENA HISPIDULA*

Elcilene Alves de Sousa
Mariana Helena Chaves
Luanda Ferreira Floro da Silva
Gerardo Magela Vieira Júnior
Buana Carvalho de Almeida
Ruth Raquel Soares de Farias

CAPÍTULO 11 120

O GÊNERO *VIROLA* NO BRASIL: NEOLIGNANAS E ATIVIDADE BIOLÓGICA

Luana Carvalho Batista
Maria Raquel Garcia Vega

CAPÍTULO 12 137

PADRONIZAÇÃO DO EXTRATO EM N-HEXANO DE FOLHAS DE *PIPER SOLMSIANUM* C.DC. E AVALIAÇÃO CONTRA LARVAS DE *AEDES AEGYPTI*

Arthur Ladeira Macedo
Rodrigo Coutinho Duprat
Larissa Ramos Guimarães da Silva
Davyson de Lima Moreira
Maria Auxiliadora Coelho Kaplan
Thatyana Rocha Alves Vasconcelos
Laine Celestino Pinto
Raquel Carvalho Montenegro
Norman Arthur Ratcliffe
Cícero Brasileiro Mello
Alessandra Leda Valverde

CAPÍTULO 13 153

UMA INTER-RELAÇÃO POSSÍVEL: PLANTAS MEDICINAIS, GESTÃO AMBIENTAL, DESENVOLVIMENTO E SUSTENTABILIDADE

Viviane Mallmann
Lucas Wagner Ribeiro Aragão
Roberta Fernanda Ribeiro Aragão

Edineia Messias Martins Bartieres
Valdeci José Pestana
Shaline Séfara Lopes Fernandes
Rogério César de Lara da Silva

SOBRE AS ORGANIZADORAS.....	169
------------------------------------	------------

ATIVIDADE ALELOPÁTICA E ANTIOXIDANTE DAS FOLHAS DE *METRODOREA NIGRA* A. ST. HILL

Rodrigo de Souza Miranda

Instituto de Pesquisa de Produtos Naturais - CCS
- UFRJ

Rio de Janeiro - RJ

Roberto Carlos Campos Martins

Instituto de Pesquisa de Produtos Naturais - CCS
- UFRJ

Rio de Janeiro - RJ

Naomi Kato Simas

Faculdade de Farmácia - CCS - UFRJ

Rio de Janeiro - RJ

Anne Caroline Candido Gomes

Instituto Federal de Educação Ciência e
Tecnologia do Rio de Janeiro - IFRJ

Rio de Janeiro - RJ

RESUMO: *Metrodorea nigra* é uma pequena árvore tropical, endêmica do Brasil pertencente à família Rutaceae. É uma planta muito comum nos estados do Sudeste brasileiro. O único estudo fitoquímico desta espécie demonstrou o isolamento e caracterização de cumarinas, alcaloides, lignanas, diidrochalconas e esteroides, entretanto, até então não há registros de atividade biológica vinculada a esta espécie na literatura. O extrato metanólico das folhas e cascas de *M. nigra*, coletados na cidade do Rio de Janeiro, foram obtidos via maceração estática com metanol, e, posteriormente, particionados sucessivamente com diclorometano e acetato

de etila. O extrato bruto, suas frações de partição e resíduo hidroalcoólico resultante, foram submetidos a teste de ação antioxidante com DPPH, quantificação do teor de fenólicos e avaliação de sua atividade alelopática sobre o desenvolvimento de sementes de *Lactuca sativa* (alface). Os resultados mostraram que a partição em acetato de etila apresentou a maior ação antioxidante (68,76 µg/mL) e concentração de substâncias fenólicas (55,15 µgEAG/mL) dentre as amostras analisadas. Os ensaios de ação alelopática avaliaram a capacidade do extrato etanólico bruto, suas partições e resíduo hidroalcoólico, em inibir o desenvolvimento dos hipocótilos e radículas das sementes de *L. sativa* durante o período de germinação. Quando comparadas aos hipocótilos, as radículas mostraram-se muito mais sensíveis à ação citotóxica do extrato e suas subfrações, sendo novamente a fração acetato de etila a que mostrou maior inibição no desenvolvimento das sementes. Os resultados sugerem que, tanto a ação alelopática, quanto a ação antioxidante estão diretamente relacionadas à concentração de fenólicos presentes nesta fração.

PALAVRAS-CHAVE: *Metrodorea nigra*, Rutaceae, atividade antioxidante, alelopatia.

ABSTRACT: *Metrodorea nigra* is a small tree which belongs to Rutaceae family. It is a plant of tropical climate, endemic of Brazil, and very

common in the states of the Brazilian Southeast. Previous study of this plant reported the isolation and characterization of coumarins, alkaloids, lignans, dihydrochalcones and steroids from its leaves and stem bark¹ but, so far, there are no reports of biological activities for this species in literature. Methanolic extract from leaves of *M. nigra*, was obtained by static maceration and subsequently partitioned with dichloromethane and ethyl acetate. Both extract, the partitioning phases and the hydroalcoholic residue were tested for their antioxidant capacity, the total phenolic content and the allelopathic action over the growth of *Lactuca sativa* (lettuce) seeds. The results showed that the ethyl acetate phase was the one with the biggest antioxidant activity (68,76 µg/mL) and concentration of total phenolics (55,15 µgEAG/mL) among the tested samples. The allelopathic assays evaluated the crude extract, its partitions and the hydroalcoholic residue, in inhibit the development of the hypocotyls and rootlets of *L. sativa* seeds during their germination period. When compared with the hypocotyls, the rootlets proved to be much more sensitives to the cytotoxic action of the crude extract and its subfractions. Once again, the ethyl acetate fraction showed the best results on inhibiting the seeds development, suggesting that both the allelopathic and the antioxidant actions are directly related to the high concentration of phenolics present in this fraction.

KEYWORDS: *Metrodorea nigra*, Rutaceae, antioxidant activity, allelopathy.

INTRODUÇÃO

O gênero *Metrodorea* pertence à família Rutaceae, sendo um pequeno gênero de plantas tropicais que compreende apenas 6 espécies, *M. nigra*, *M. flavida*, *M. concinna*, *M. maracasana*, *M. mollis* e *M. stipularis*. Estas espécies estão distribuídas por todo território brasileiro, onde apenas a *Metrodorea flavida* não é endêmica do Brasil. A espécie *Metrodorea nigra* A. St. Hill, alvo deste estudo, é uma árvore de clima tropical, endêmica do Brasil, cujo tamanho pode variar entre 1,5 e 8 metros de altura. No Brasil, a espécie está distribuída desde o Sul do Piauí e Bahia, passando pelo Maranhão e por todos os estados do Sudeste brasileiro até o norte do Paraná (Figura 1). Pode ser encontrada nos biomas Caatinga, Planalto, Mata Atlântica e Cerrado, sendo mais comum na Mata Atlântica e em florestas semidecíduais do planalto (Pirani et al., 2002).

A espécie possui diversos nomes populares, de acordo com o estado brasileiro em que é encontrada, como por exemplo, carrapateiro (PR), vira-sarerê (BA), caputuna (MG), laranja selvagem, chupa-ferro e pitaguará (SP). A época de produção de flores varia de setembro a fevereiro e dos frutos de junho a janeiro (Pirani et al., 2002).

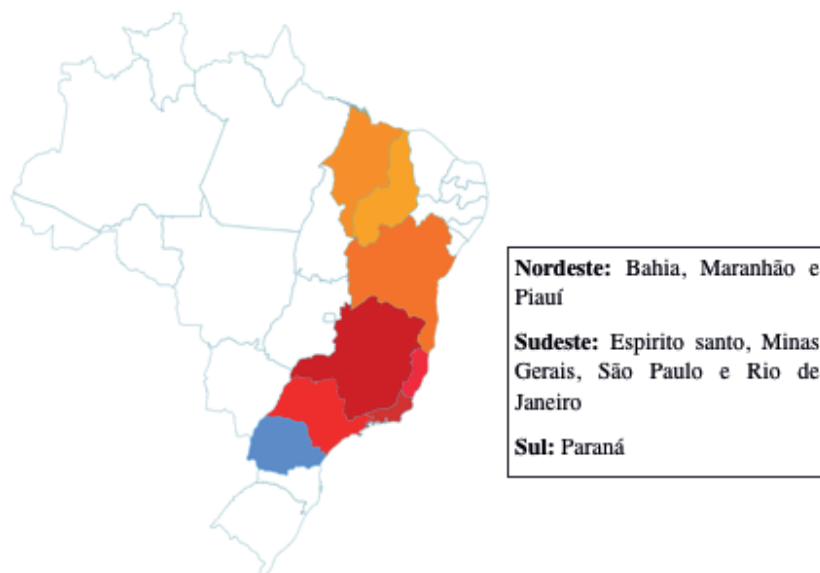


Figura 1: Distribuição geográfica da espécie *M. nigra* nos estados do território brasileiro.

Até então existe apenas um único trabalho sobre estudos químicos de *Metrodorea nigra* descrito na literatura, desenvolvido por Müller e seus colaboradores em 1995. Neste trabalho, Müller investigou a composição química dos frutos frescos, folhas e cascas de *M. nigra*. No total, 5 substâncias, até então inéditas na família foram isoladas: duas dihidrochalconas, duas cumarinas e um alcaloide furoquinolínico. Entretanto, até a presente data, não há qualquer relato na literatura de estudos que visem avaliar se a espécie possui ou não atividade biológica (Müller et al., 1995).

Neste contexto, o presente capítulo visa contribuir com o conhecimento químico e biológico da espécie, ainda pouco estudada, no que tange à descrição de sua atividade antioxidante, alelopática e também na avaliação de seu teor de fenólicos totais.

Segundo Almeida et al., 2006, atividade antioxidante é a capacidade que uma substância possui de retardar a velocidade da oxidação no meio reacional, podendo utilizar para este fim, mais de um mecanismo, como estabilização de radicais livres ou a complexação com metais.

Souza, et al., 2007, define substâncias antioxidantes como aquelas que, mesmo em baixa concentração, em relação ao substrato oxidável, retardam significativamente, ou inibem por completo a oxidação do substrato.

Tais substâncias podem ser sintéticas ou naturais. Entre os antioxidantes de origem natural mais comuns destacam-se o ácido ascórbico (vitamina C), tocoferóis (vitamina E), polifenóis e carotenoides, como o β -caroteno (Almeida et al., 2006; Souza, et al., 2007).

O termo “alelopatia” é derivado das palavras gregas *alleton* (mútuo) e *pathos* (prejuízo). Foi definida por Molish, em 1937, como qualquer processo envolvendo metabólitos secundários produzidos por plantas, micro-organismos ou fungos que, uma vez liberados no ambiente, estimulam ou inibem o desenvolvimento de outro ser vivo, pertencente ou não a mesma espécie (Tigre, 2009, Pires et al., 2011).

A atuação da alelopatia pode interferir direta ou indiretamente no processo de

crescimento, germinação, reprodução e, em casos mais extremos, na sobrevivência de outras plantas e microrganismos. Trata-se de um mecanismo de autopreservação que favorece o organismo produtor destas substâncias ao minimizar a competição com outros seres vivos por espaço, água, luz, sais minerais ou quaisquer outros recursos naturais essenciais para sua sobrevivência (Tigre, 2009).

Procedimento experimental:

Obtenção do extrato bruto e partições de *M. nigra*:

O material vegetal, aproximadamente 1.200g de folhas e galhos de *Metrodorea nigra*, foi coletado no Jardim Botânico do estado do Rio de Janeiro, em outubro de 2014, pelo professor Marcelo Trovó (IB-UFRJ), que realizou a identificação botânica. Uma exsicata encontra-se depositada no Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro sob o código Marquete O. 606 (RB). Folhas e cascas foram separados entre si, e submetidos a secagem em estufa sob circulação de ar a 40°C pelo período de 72 horas.

Após seco, o material botânico foi triturado por um moinho de facas, separadamente, obtendo-se 104,58g do pó das folhas e 208,74g do pó das cascas. O pó das folhas foi submetido a maceração estática a frio empregando-se 250ml de metanol a cada 24 horas de extração, até exaustão total do material. A completa eliminação do solvente de cada etapa de extração foi feita por evaporador rotativo a vácuo, obtendo-se ao fim do processo cerca de 19g de extrato metanólico bruto das folhas de *M. nigra*.

O extrato metanólico das folhas foi submetido a um processo de partição líquido-líquido. Inicialmente 5,776g do extrato metanólico das folhas foi solubilizado em 70 ml de solução água : metanol (7:3). Em seguida, a mistura foi filtrada e a parte solúvel (4g) submetida a sucessivas partições líquido-líquido utilizando-se respectivamente 200ml de diclorometano e 200ml de acetato de etila, como solventes extratores. Tanto as fases diclorometano e acetato de etila, quanto o resíduo hidroalcoólico, obtido ao fim do processo de partição líquido-líquido, foram concentrados, obtendo-se 977mg, 127mg e 2,2g de massa, respectivamente.

O extrato metanólico bruto das folhas de *M. nigra*, e suas frações obtidas da partição em diclorometano, acetato de etila, além da fração hidroalcoólica resultante, foram submetidos a testes de avaliação de sua atividade alelopática, antioxidante e de seu teor de fenólicos totais.

Teste de avaliação da ação alelopática

O objetivo do teste de verificação de atividade alelopática foi verificar a capacidade das substâncias produzidas pelas folhas de *Metrodorea nigra*, em interferir no desenvolvimento das sementes de outra planta, neste caso sementes de alface (*Lactuca sativa*).

O extrato bruto das folhas de *Metrodorea nigra*, bem como os extratos provenientes de sua partição em diclorometano, acetato de etila e o resíduo hidroalcoólico resultante, foram submetidos ao ensaio de atividade alelopática contra sementes de *L. sativa*, conforme metodologia descrita a seguir.

Os testes foram realizados em triplicata utilizando duas concentrações, 500ppm e 250ppm, para todas as amostras, com exceção do extrato bruto, que foi avaliado também na concentração de 1.000ppm. Cada extrato foi fixado em uma matriz, neste caso, rodela de papel de filtro de 2,5cm de raio, dispostos dentro de placas de petri destampadas, e deixadas para secar por 24 horas, para evitar degradação das sementes pelo contato com o solvente orgânico.

Após evaporação total do solvente e fixação da amostra no papel de filtro, cada placa de petri recebeu 10 sementes de alface (*Lactuca sativa*) e 2,5mL de uma solução contendo H₂O:DMSO 0,1% a fim de ressuspender a amostra. As placas foram tampadas e acomodadas em uma câmara de crescimento durante o período de 120 horas (5 dias) para germinação e desenvolvimento das sementes.

Após este período, as placas contendo as sementes germinadas, foram levadas ao congelador para interrupção do desenvolvimento das sementes, e lá permaneceram até o momento de sua leitura. A leitura das placas foi realizada retirando, uma por uma, cada semente germinada, colocando-as sobre uma folha de papel milimetrado, onde ocorreu a medição do hipocótilo (caule embrionário) e radícula (raiz embrionária) de cada unidade.

Os valores obtidos após a medição do hipocótilo e radícula de cada semente germinada, foram então analisados por um software de tratamento de dados estatísticos para avaliação dos resultados de inibição do crescimento.

Determinação da atividade antioxidante pelo método de DPPH:

O método utilizado neste ensaio foi adaptado dos métodos descritos por Scotti et al. (2007), e Nascimento et al. (2011). Este método baseia-se na avaliação da ação antioxidante (AAO) da amostra, através da reação de estabilização do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazila (Figura 2_(A)), de coloração violeta. A estabilização deste radical, ocorre apenas quando em contato com substâncias antioxidantes presentes na amostra, e dá origem ao 2,2-difenil-1-picrilidrazina (Figura 2_(B)), de coloração amarela.

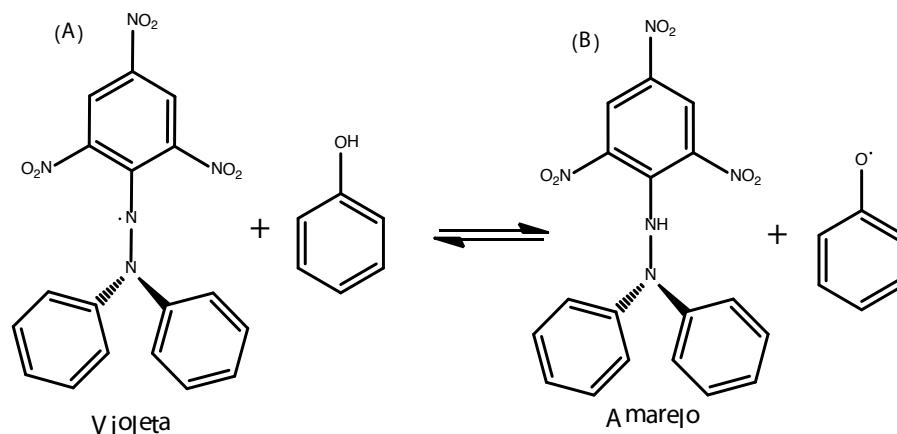


Figura 2: Reação radicalar de estabilização do DPPH (A).

O ensaio se iniciou através da preparação de soluções metanólicas das amostras nas concentrações 700, 350, 280, 140, 70, 28 e 14 $\mu\text{g/mL}$, que, ao fim das diluições realizadas durante o procedimento, corresponderiam as concentrações de 500, 250, 200, 100, 50, 25 e 5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

As amostras utilizadas neste procedimento foram o extrato bruto das folhas de *M. nigra*, e suas frações em diclorometano, acetato de etila e também a fração hidroalcolica resultante do fim da partição.

Foram preparadas 4 microplacas de 96 poços, para receber, cada uma, as amostras a serem testadas, já nas concentrações predeterminadas. Os controles, o branco e as amostras, foram dispostos na microplaca de 96 poços da seguinte maneira:

- De A1 até A8 foram pipetados o controle positivo, contendo 125 μL de metanol e 50 μL da solução de DPPH.
- De A9 até A12 foram pipetados o Branco, contendo apenas 175 μL de metanol.
- Nas colunas 1, 5 e 9 das linhas B até H, foram pipetados o branco da amostra, contendo 125 μL da amostra nas devidas concentrações, e 50 μL de metanol.
- Das colunas 2, 3 e 4 / 6, 7 e 8 / 10, 11 e 12, nas linhas B até H foram obtidas as triplicatas da amostra, nestes poços foram pipetados 125 μL das amostras nas devidas concentrações e 50 μL da solução de DPPH
- Nas linhas B, C, D, E, F, G e H foram pipetadas alíquotas da amostra respectivamente nas concentrações 500, 250, 200, 100, 50, 25 e 5 $\mu\text{g/mL}$.

Após a adição do DPPH em cada poço contendo amostra, esperou-se 30 minutos para o equilíbrio reacional em ausência de luminosidade. A Figura 3, ilustra a aparência final da microplaca contendo a amostra, o branco e o controle após atingir o equilíbrio da reação.

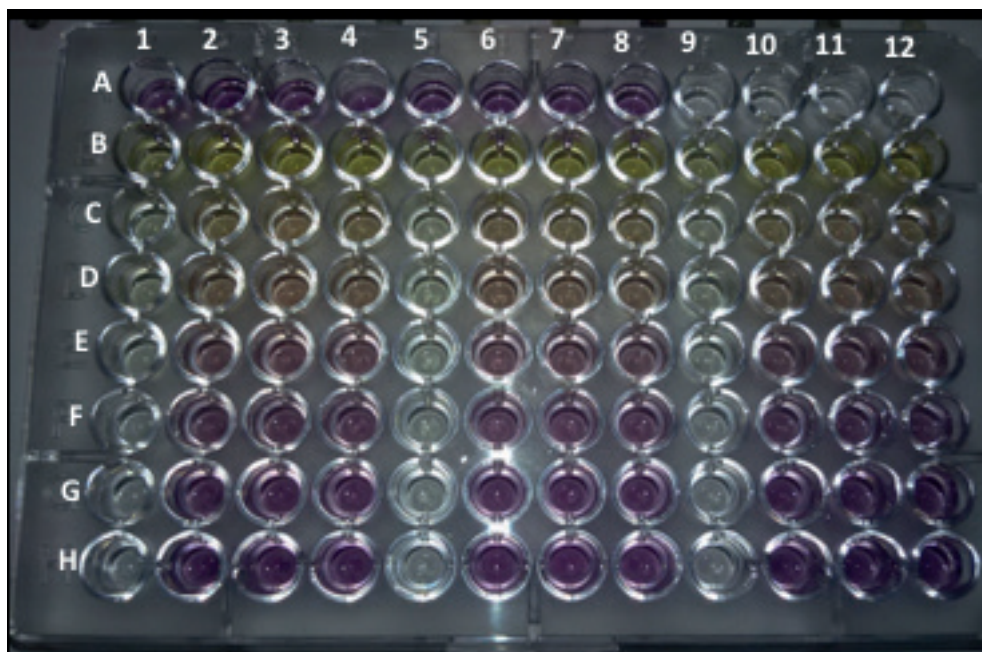


Figura 3: Placa de 96 poços contendo o teste de ação antioxidante após leitura em espectrofotômetro.

A leitura dos comprimentos de onda obtidos em cada poço foi realizada por um espectrofotômetro em 518 nm, os dados de absorvância foram tratados estatisticamente segundo a equação:

$$\% \text{ AAO} = \left[\frac{Aa \times 100}{Ab} \right] - 100$$

Onde: Ab = média de absorvância do controle positivo – média de absorvância do branco do solvente;

Aa = média da absorvância das triplicatas da amostra contendo DPPH após 30 minutos de reação – média de absorvância do branco da amostra.

Determinação do teor de fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu

Para realizar uma correlação entre o ensaio de atividade alelopática, atividade antioxidante e a concentração de fenóis na amostra, que pode ser um indicativo de possível atividade no material testado, foram dosados os fenóis totais no extrato metanólico bruto, nas frações diclorometano, acetato de etila e no resíduo hidroalcoólico do particionamento líquido-líquido.

O método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, também conhecido como método de equivalência do ácido gálico, é um procedimento que avalia o teor de substâncias fenólicas presentes em uma amostra, utilizando o ácido gálico como padrão de referência.

O reagente de Folin-Ciocalteu é uma solução de íons complexos poliméricos formados a partir de heteropoliácidos fosfomolibdicos e fosfotungsticos. Sua função é

oxidar os fenolatos da amostra, reduzindo os ácidos do reagente a um complexo de cor azul, cujo pico de absorvância ocorre em 760nm. Quanto maior a concentração de compostos fenólicos na amostra, maior será a quantidade de complexos formada, resultando assim em uma amostra de coloração azul mais intensa (Neves et al., 2009).

O procedimento experimental utilizado neste teste foi realizado em triplicata e está descrito a seguir.

Foram pesados 1mg de cada amostra (extrato bruto das folhas e suas partições em diclorometano, Acetato de etila e resíduo hidroalcolico) e solubilizados em 2mL de metanol, produzindo assim uma solução na concentração de 500µg/mL.

100µL da solução da amostra foi transferida para 3 microtubos de 2 mL e, em cada um deles, foi adicionado 100µL de metanol e 100µL da solução aquosa de Folin-Ciocalteu (1:10). Após 5 minutos de reação a temperatura ambiente, adicionou-se em cada tubo 700µL de solução aquosa de Na₂CO₃ a 20%, e deixou-se descansar a temperatura ambiente por 20 minutos. O branco seguiu exatamente a mesma metodologia, porém substituindo a amostra por mais 100µL de metanol puro.

Após 20 minutos, os microtubos foram centrifugados por cerca de 5 minutos em centrifuga apropriada, e o sobrenadante gerou 3 aliquotas (triplicatas) de 250µL, transferidas para 3 poços sucessivos de uma microplaca de 96 poços, ocupando assim 9 poços por amostra. A leitura da absorvância foi realizada por um espectrofotômetro (leitor de ELISA) à 760 nm.

Os dados de absorvância coletados para cada amostra foram tratados estatisticamente, inserindo os resultados obtidos, na equação da reta resultante da curva padrão de calibração do ácido gálico.

Resultados e Discussão:

A avaliação da atividade antioxidante (AAO), determinada através do teor de DPPH, deu-se através da leitura das soluções em espectrofotômetro em comprimento de onda de 518nm, escolhido pelo fato do DPPH possuir coloração violeta, cujo pico de absorção ocorre em torno de 515nm. Neste comprimento de onda a cor amarela (resultante da redução do radical DPPH, via ação antioxidante da amostra) não possui qualquer absorção, e, portanto, a ação antioxidante da amostra pôde ser estimada de acordo com a diferença dos valores de absorvância entre o controle (contendo 100% do radical DPPH) e a média de absorção das triplicatas da amostra, cuja coloração é variável entre violeta e amarelo, de acordo com sua concentração.

Os resultados obtidos para a os testes de atividade antioxidante de cada amostra podem ser observados nas tabelas 1, 2, 3 e 4, a seguir.

Extrato Metanólico Bruto	Atividade antioxidante						
Concentration $\mu\text{g/mL}$	500	250	200	100	50	25	5
AOA %	97,76	95,03	84,31	59,60	28,89	11,75	3,75
EC_{50}	86,25 $\mu\text{g/mL}$						

Tabela 1: AAO do extrato metanólico de *M. nigra*

Fração Diclorometano	Atividade antioxidante						
Concentração $\mu\text{g/mL}$	500	250	200	100	50	25	5
AAO %	97,45	74,73	67,25	45,43	31,38	20,16	18,99
EC_{50}	158,6 $\mu\text{g/mL}$						

Tabela 2: AAO da partição em diclorometano do extrato metanólico de *M. nigra*

Fração Acetato de Etila	Atividade antioxidante						
Concentração $\mu\text{g/mL}$	500	250	200	100	50	25	5
AAO %	94,64	93,83	92,23	70,56	41,52	21,40	13,75
EC_{50}	68,76 $\mu\text{g/mL}$						

Tabela 3: AAO da partição em acetato de etila do extrato metanólico de *M. nigra*

Fração Hidroalcoólica	Atividade antioxidante						
Concentração $\mu\text{g/mL}$	500	250	200	100	50	25	5
AAO %	95,75	58,81	48,68	16,11	-	-	-
EC_{50}	219,7 $\mu\text{g/mL}$						

Tabela 4: AAO da fração hidroalcoólica resultante da partição do extrato metanólico de *M. nigra*

Como pode ser observado nas tabelas acima, a maior atividade antioxidante calculada foi referente a fração acetato de etila ($EC_{50}=68,76 \mu\text{g/mL}$), seguido pelo extrato metanólico bruto, com $EC_{50} = 86,25 \mu\text{g/mL}$, fração em diclorometano, $EC_{50} = 158,6 \mu\text{g/mL}$, e a hidroalcoólica apresentou a menor atividade antioxidante observada, $EC_{50} = 219,7 \mu\text{g/mL}$.

O teor de fenólicos totais do extrato bruto das folhas de *M. nigra* e suas partições também foi avaliado, e seu resultado corrobora o observado anteriormente no teste de avaliação da atividade antioxidante.

Teor de Fenólicos Totais (μg EAG/mL)	
Extrato Metanólico Bruto	5,08
Fração Diclorometano	15,10
Fração Acetato de Etila	55,15
Resíduo Hidroalcoólico	4,00

Tabela 5: Teor de fenólicos totais do extrato metanólico de *M. nigra* e suas partições, equivalentes a curva padrão do Ácido Gálico (EAG).

Mais uma vez, a fração acetato de etila foi aquela que obteve melhor resultado, concentrando a maior quantidade de fenólicos, 55,15 μg EAG/mL (Tabela 5, acima). A alta concentração de fenólicos para a fração acetato de etila já era esperada, visto que substâncias fenólicas tendem a possuir alta ação antioxidante, atuando como redutores de oxigênio em reações de oxidação lipídica e também na quelatação de metais (Almeida et al., 2006).

De modo análogo, a fração hidroalcoólica apresentou a menor atividade antioxidante testada, o que pode estar associado ao baixo teor de fenólicos em sua composição.

Embora o teor de fenólicos totais do extrato metanólico bruto tenha sido menor que o observado para a fração diclorometano, sua ação oxidante mostrou-se praticamente duas vezes maior do que a referida partição. Tal fato pode ser justificado pela presença de outras classes de substâncias antioxidantes, como carotenoides, presentes no extrato bruto, que não podem ser dosados neste teste, e estão ausentes na partição em diclorometano.

A ação alelopática de uma espécie pode ser avaliada de acordo com a capacidade que a mesma possui de produzir e dispersar no solo, substâncias citotóxicas que promovam a inibição do desenvolvimento do hipocótilo e radícula da semente de uma planta concorrente, inviabilizando assim seu desenvolvimento.

A radícula e o hipocótilo são, respectivamente, a raiz e o caule embrionário das plantas. São as primeiras estruturas desenvolvidas por uma semente durante o período de germinação (Figura 4), que pode variar entre dias, semanas ou meses, de acordo com a espécie. Conforme se desenvolvem, a radícula e o hipocótilo dão origem as raízes e ao hepocótilo, respectivamente, estrutura a partir da qual as primeiras folhas são formadas.

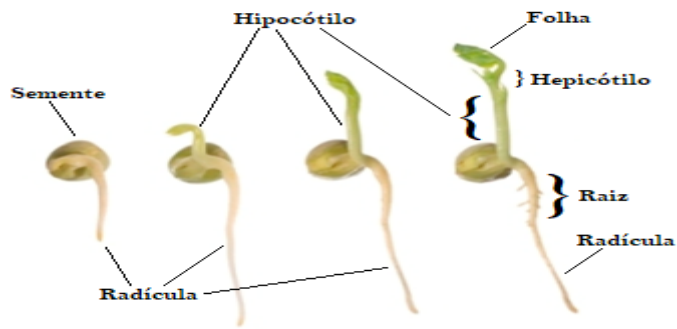
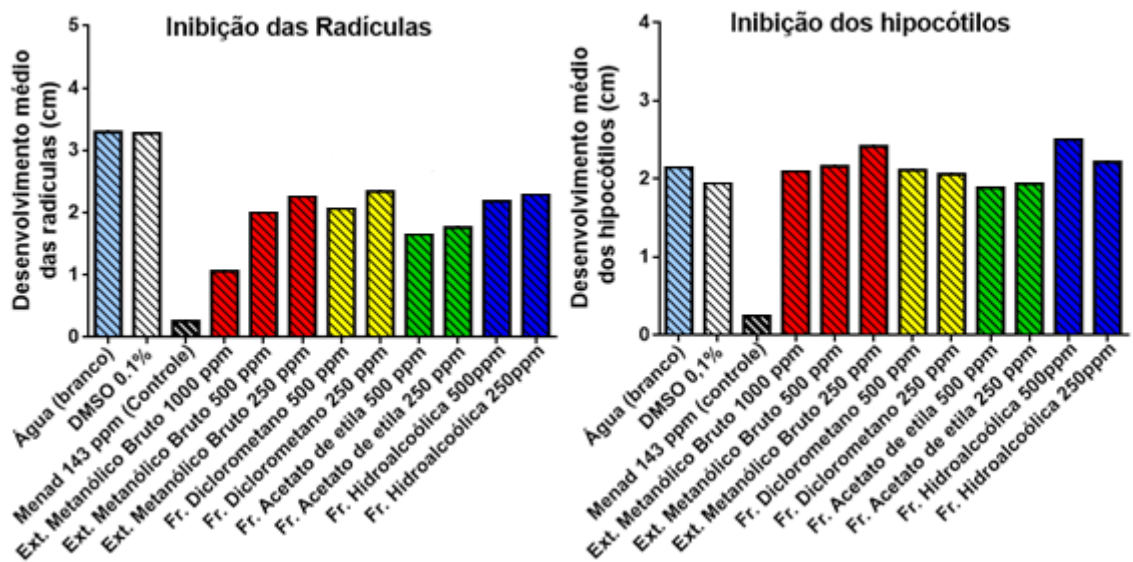


Figura 4: Estágios do desenvolvimento de uma semente

Fonte: <https://www.google.com.br/search?biw=1366&bih=651&tbm=isch&sa=1&q>

A escolha das sementes de *Lactuca sativa* (alface), utilizadas neste ensaio, deve-se a sua rápida germinação, que ocorre em média em 5 dias, e a sua alta sensibilidade a substâncias dispersas no meio onde a semente se desenvolve. Estes fatores permitem que a resposta, em relação ao estímulo ou inibição do desenvolvimento da semente, seja rápida e confiável, mesmo sob baixas concentrações das frações testadas (Santos, 2012).

Os resultados obtidos nos ensaios de fitotoxicidade para o extrato metanólico de *M. nigra* e suas partições sobre as sementes de *Lactuca sativa* podem ser observados nas Figuras 5 e 6, a seguir.



Figuras 5 e 6: Inibição do crescimento das radículas e hipocótilos de *L. sativa* pelo extrato das folhas de *M. nigra* e suas subfrações.

O resultado de inibição das radículas sugere que o aumento da concentração do extrato bruto influencia diretamente na inibição de seu crescimento, visto que, na maior concentração testada para o extrato (1.000 ppm) observou-se maior redução do

tamanho das radículas, 67,8%, quando comparado ao tamanho observado no controle negativo (teste em branco utilizando apenas o solvente DMSO).

Ao se diminuir a concentração do extrato bruto pela metade (500 ppm) o efeito inibitório observado diminuiu proporcionalmente (39%) e após nova redução da concentração (250ppm), a inibição se estabilizou em cerca de 30%.

O efeito alelopático do extrato metanólico bruto das folhas pode ser associado não somente à presença de substâncias fenólicas, mas também a outras classes de substâncias reconhecidamente alelopáticas como terpenos, esteroides, alcaloides e flavonoides, que já foram descritas na espécie.

Dentre as demais frações testadas nas concentrações de 500 ppm e 250 ppm, destaca-se a fração acetato de etila que foi capaz de inibir o crescimento das radículas em até 50%. Este resultado pode estar associado à capacidade antioxidante resultante da alta concentração de fenólicos nesta fração, visto que substâncias fenólicas podem ser derivadas do ácido cinâmico, que Pires et al., 2011, descreve como um potente agente alelopático.

A fração diclorometano não é rica em fenólicos e também concentra substâncias de menor polaridade como terpenos e esteroides, cuja ação alelopática também foi descrita por Pires e colaboradores (2011).

De maneira geral, o resultado do teste de inibição alelopática das radículas, seguiu o resultado do teste de ação antioxidante, indicando que substâncias com perfil antioxidante tendem a inibir ou atrasar consideravelmente o desenvolvimento das radículas.

Por outro lado, a ação citotóxica do extrato metanólico de *M. nigra*, bem como de suas partições, sobre os hipocótilos das sementes de *L. sativa*, foi muito menos efetiva do que o observado para as radículas. Praticamente não se observou inibição dos hipocótilos superior a 10% em relação ao branco. Além disso, quatro amostras apresentaram efeito oposto, estimulando o desenvolvimento dos hipocótilos quando comparados ao branco.

Os dados mostraram que o resíduo hidroalcoólico não foi capaz de inibir o crescimento dos hipocótilos, porém promove a aceleração do seu desenvolvimento. Esta fração foi a que apresentou menores concentrações de fenólicos e mais baixa atividade antioxidante dentre as frações testadas. Trata-se de uma fração onde costuma-se observar a predominância de substâncias de alta polaridade e peso molecular, como substâncias glicosiladas.

Segundo Pires et al., 2011, substâncias glicosiladas tendem a perder sua capacidade citotóxica para serem acumuladas em meio intracelular. O glicosídeo não apenas inibe a ação citotóxica destas moléculas, mas também servem como fonte de carbonos, necessária para a geração de energia, o que favorece o desenvolvimento da planta.

Considerando que, estatisticamente, os hipocótilos tendem a ser mais resistentes que as radículas frente à ação de substâncias citotóxicas, o resíduo hidroalcoólico foi

capaz de inibir as radículas, porém não foi eficaz na inibição dos hipocótilos, onde o acúmulo de glicosídeos favoreceu ainda mais seu desenvolvimento, possivelmente atuando como reserva energética (Tigre, 2009).

Em relação aos hipocótilos, a fração acetato de etila permaneceu promovendo a maior inibição alelopática entre as frações testadas (12%), entretanto, seu rendimento de inibição caiu consideravelmente quando comparado ao resultado obtido com as radículas.

Levando em consideração que a fração hidroalcoólica induz o crescimento do hipocótilo, enquanto a fração acetato de etila inibe levemente seu desenvolvimento, e que, proporcionalmente, a % em massa da fração hidroalcoólica foi muito superior a fração acetato de etila, a tendência “anfótera” do extrato bruto pode ser justificada.

Em maiores concentrações, o extrato metanólico bruto promove uma leve inibição do crescimento dos hipocótilos, que pode ser justificado pelo acúmulo de substâncias fenólicas, como as presentes na fração acetato de etila, e outras classes de substâncias como alcaloides e cumarinas. Entretanto, em frações mais diluídas, a concentração destes fenólicos e demais classes já não é grande o suficiente para inibir seu desenvolvimento e, conseqüentemente, as substâncias glicosiladas, proporcionalmente em maiores concentrações, voltam a servir como fonte de energia e a induzir o crescimento dos hipocótilos.

A fração diclorometano apresentou um baixo caráter inibitório da germinação dos hipocótilos (< 5%), quando comparado ao controle em meio aquoso. Isto pode estar diretamente relacionado à maior resistência por parte dos hipocótilos ao efeito citotóxico atribuído às substâncias que compõem a fração.

De maneira geral, os resultados do teste de inibição alelopática dos hipocótilos e radículas, seguiu o resultado do teste de ação antioxidante, indicando que substâncias com perfil antioxidante, como é o caso dos fenólicos, tendem a inibir ou atrasar consideravelmente o desenvolvimento das sementes de uma planta concorrente.

REFERÊNCIAS

Almeida, J.M.D.; Santos, R.J.; Genovese, M.I.; Lajolo, F.M.; **Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/Ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP, v. 26, n. 2, 446-452, Junho, 2006.

Müller, A.H.; Vieira, P.C.; Silva, M.F.G.F.; Fernandes, J.B.; **Dihidrochalcones, Coumarins and Alkaloids from *Metrodorea nigra***. Phytochemistry, Grã-Bretanha, v. 40, n. 6, p. 1797-1800, Agosto, 1995.

Nascimento, J.C.; Lage, L.F.O.; Camargos, C.R.D.; Amaral, J.C.; Costa, L.M.; Sousa, A.N.; Oliveira, F.Q.; **Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonoides totais em extratos de folhas da *Bauhinia variegata* L.**, Revista Brasileira de Farmácia, Belo Horizonte, MG, v. 92, n. 4, p. 327-332, novembro, 2011.

Neves, L.C.; Alencar, S.M.; Carpes, S.T.; **Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellífera***.

Brazilian Journal of food Technology, São Paulo, SP, p. 107-110, Junho, 2009.

Pirani, J.R.; Wanderley, M.G.L.; Shepherd, G.J.; Giulietti, A.M.; Melhem, T.S.; Bittrich, V.; Kameyama, C.; *in* **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**, Instituto de Botânica, São Paulo, SP, v. 2, p. 281-308, novembro, 2002.

Pires, N.M.; Oliveira, V.R.; Oliveira Jr, R.S.; Constantin, J.; Inoue, M.H.; Braccini, A.L.; Brighenti, A.M.; Tessman, D.J.; Bacarin, M.A.; Oliveira M.F.; **Biologia e manejo de plantas daninhas**. 1 ed., Curitiba, PR, Editora Omnipax, cap. 5, p. 95-124, 2011.

Scotti, L.; Scotti, M.T.; Cardoso, C.; Paulleti, P.; Gamboa, I.C.; Bolzani, V.S.; Valesco, M.V.R.; Menezes, C.M.S.; Ferreira, E.I.; **Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético**. Revista Brasileira de Ciências farmacêuticas, São Paulo, SP, v. 43, n. 2, p. 153-166, Junho, 2007.

Souza, C.M.M.; Silva, H.R.; Vieira-Jr, G.M.; Ayres, M.C.C.; Costa, C.L.S.; Araújo, D.S.; Cavalcante, L.C.D.; Barros, E.D.S.; Araújo, P.B.M.; Brandão, M.S.; Chaves, M.H.; **Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais**. Química Nova, Teresina, PI, v. 30, n. 2, p. 351-355, Janeiro, 2007.

Tigre, R.C.; **Atividade alelopática de *Cladonia verticillaris* (RADDI) Fr. sobre a germinação e o crescimento inicial de *Lactuca sativa* L.** 2009. 132f, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2009.

Agência Brasileira do ISBN
ISBN 978-85-85107-59-8

