

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 de 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 Natiéli 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 Natiéli 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, Natiéli. 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>Miriel 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 *VIOLA* 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
------------------------------------	------------

BAUHINIA SP. SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE SAZONALIDADE INDUZ ATIVIDADE ANTICÂNCER EM SARCOMA-180 *IN VITRO*

Judá Ben-Hur de Oliveira

Universidade Federal do Espírito Santo – UFES
Departamento de Ciências Biológicas, Vitória, ES-
Brasil

Jean Carlos Vencioneck Dutra

Universidade Federal do Espírito Santo – UFES
Departamento de Ciências Biológicas, Vitória, ES-
Brasil

Suiany Vitorino Gervásio

Universidade Federal do Espírito Santo – UFES
Departamento de Ciências Biológicas, Vitória, ES-
Brasil

Mirieli Bernardes Xavier

Universidade Federal do Espírito Santo – UFES
Departamento de Ciências Biológicas, Vitória, ES-
Brasil

Paula Roberta Costalonga Pereira

Universidade Federal do Espírito Santo – UFES
Departamento de Ciências Biológicas, Vitória, ES-
Brasil

Mainã Mantovanelli da Mota

Universidade Federal do Espírito Santo – UFES
Departamento de Ciências Biológicas, Vitória, ES-
Brasil

Maria do Carmo Pimentel Batitucci

Universidade Federal do Espírito Santo – UFES
Departamento de Ciências Biológicas, Vitória, ES-
Brasil

RESUMO: *Bauhinia* sp., pata-de-vaca, é utilizada como diurética, expectorante, anti-inflamatória

e para tratar diabetes *mellitus*. O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência da sazonalidade (estação seca e chuvosa), no conteúdo químico e nas atividades biológicas *in vitro* do extrato bruto etanólico das folhas de *Bauhinia* sp. O material vegetal foi coletado na estação seca (2015) e estação chuvosa (2016), o extrato bruto foi preparado e foram avaliados: teor total de flavonoides, ação antioxidante, citotoxicidade em linfócitos humanos e células do sarcoma-180 e a atividade anti-citotóxica contra cisplatina em linfócitos humanos. O conteúdo de flavonoides totais foi maior no extrato produzido com folhas coletadas na estação chuvosa (2016), $252,67 \pm 2,83 \mu\text{g.mL}^{-1}$, do que na estação seca (2015), $69,50 \pm 10,61 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A atividade antioxidante, ensaios ABTS e DPPH, mostrou que o extrato de *Bauhinia* sp. coletada em 2015, estação seca, foi mais efetivo em promover ações antioxidantes. Ambos extratos, nas doses testadas, reduziram a viabilidade celular de linfócitos humanos e sarcoma-180, após 24h e 48h de tratamento, assim como induziram maior citotoxicidade em células de sarcoma-180, após 48h de tratamento. Os extratos de *Bauhinia* sp. não foram capazes de prevenir os danos citotóxicos induzidos pela cisplatina nos ensaios de anti-citotoxicidade. Esses dados sugerem que a sazonalidade, estação seca e chuvosa, interfere na composição química de *Bauhinia* sp. e em

sua atividade antioxidante e reforçam sua aplicação medicinal e possível utilização no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de câncer.

PALAVRAS-CHAVE: sazonalidade, teor total de flavonoides, ABTS, DPPH, viabilidade celular.

ABSTRACT: *Bauhinia* sp., popularly known in Brazil as “pata-de-vaca”, is used as a diuretic, expectorant, anti-inflammatory and to treat diabetes mellitus. The objective of the present study was to evaluate the influence of dry season and rainy seasons on the chemical content and *in vitro* biological activities of the crude ethanolic extract of *Bauhinia* sp. The leaves were collected in the dry season (2015) and rainy season (2016), the crude extract was prepared and the total content of flavonoids, antioxidant action, cytotoxicity in human lymphocytes and sarcoma-180 and anti-cytotoxic activity against cisplatin in human lymphocytes. The content of total flavonoids was higher in the extract produced with leaves collected in the rainy season (2016), $252.67 \pm 2.83 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, than in the dry season (2015), $69.50 \pm 10.61 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. The antioxidant activity, ABTS and DPPH, showed that the extract of *Bauhinia* sp. collected in 2015, dry season, was more effective in promoting antioxidant actions. Both extracts, at the doses tested, reduced the cell viability of human lymphocytes and sarcoma-180 after 24h and 48h of treatment, as well as induced greater cytotoxicity in sarcoma-180 cells after 48h of treatment. The extracts of *Bauhinia* sp. were not able to prevent cytotoxic damage induced by cisplatin in anti-cytotoxicity assays. These data suggest that seasonality, dry and rainy season, interferes in the chemical composition of *Bauhinia* sp. and its antioxidant activity and reinforce its medicinal application and its possible use in the development of new drugs for the treatment of cancer.

KEYWORDS: seasonality, total content of flavonoids, ABTS, DPPH, cell viability.

1 | INTRODUÇÃO

O termo câncer é a tradução latina da palavra grega carcinoma (de karkinos = crustáceo, caranguejo). Este termo foi utilizado inicialmente por Galeno (138 a 201 dC) para indicar um tumor maligno da mama no qual as veias superficiais demonstravam formato que se assemelhava às patas de um caranguejo. Este termo generalizou-se e, ainda hoje, é usado para indicar qualquer neoplasia maligna (BOGLIOLO; BRASILEIRO FILHO, 2011).

A caracterização básica de uma célula tumoral se dá pela perda de função em consequência da ausência de diferenciação, proliferação descontrolada, invasão de tecidos e órgãos vizinhos e metástase. Sua origem é consequência de alterações no DNA (fatores genéticos) ou de mecanismos que controlam a expressão gênica (fenômenos epigenéticos) em um ou mais *locus* envolvidos no controle da divisão e da diferenciação celular (BOGLIOLO; BRASILEIRO FILHO, 2011).

Estima-se que 14,1 milhões de novos casos de câncer tenham ocorrido no

decorrer de um ano, na população mundial. As avaliações indicam que os aumentos destes índices são devidos ao envelhecimento da população assim como a crescente exposição a fatores de risco como tabagismo, excesso de peso e o sedentarismo (FERLAY, 2010).

Esses fatores de risco levam à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), que são determinadas pela perda ou ganho de um elétron. Quando em excesso, os ROS podem gerar o estresse oxidativo e causar danos genéticos pela modificação do DNA ou oxidação de lipídeos e proteínas, levando a possíveis mutações e alterações das vias metabólicas aumentando assim, o risco de desenvolvimento do câncer (LOBANOVA et al., 2017).

Atualmente, o câncer é a segunda principal causa de morte no mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2015, 14,1 milhões de novos casos de câncer foram identificados e 8,8 milhões de pessoas morreram, no mundo todo, o que justifica o aumento do número de estudos acerca de novos tratamentos e práticas terapêuticas mais eficientes.

A história das drogas utilizadas no combate ao câncer está intimamente ligada aos produtos naturais. As substâncias provenientes do metabolismo dos vegetais podem interagir com o corpo, atuando como agente capaz de trazer benefícios aos sistemas orgânicos dos indivíduos (DEL REY et al., 2018) "type" : "article-journal", "volume" : "12" }, "uris" : ["http://www.mendeley.com/documents/?uuid=be4d6570-77a1-44af-97db-474cb91db804"] }, "mendeley" : { "formattedCitation" : "(DEL REY et al., 2018. Segundo De Rezende et al. (2016), a síntese de compostos bioativos ocorre pela via do metabolismo secundário vegetal, onde a plasticidade genética somada a fatores bióticos e abióticos garantem a produção de determinados compostos para sua proteção e/ou sinalização, e que podem ser utilizados na dieta humana para fins medicinais, por exemplo, alguns estudos têm demonstrado que o conteúdo total e a atividade biológica dos metabólitos secundários podem ser afetados por fatores ambientais, assim como a disponibilidade de água, temperatura, composição do solo, altitude, entre outros (BORGES et al., 2013; LIU et al., 2015, 2016).

A atividade proporcionada por estes metabólitos ocorre pela sua capacidade de neutralizar ou eliminar os radicais livres, além do fato de apresentarem propriedade redox e uma estrutura com anéis conjugados e grupos carboxílicos capazes de inibir a peroxidação lipídica (GARG et al., 2012), assim como podem atuar sobre compostos químicos prevenindo ou reparando danos citotóxicos e mutagênicos (SANTOS, 2016).

Entre os compostos provenientes da síntese do metabolismo secundário estão os flavonoides, compostos amplamente encontrados nos vegetais, que conferem resistência a estresses bióticos ou abióticos e podem apresentar efeitos biológicos, como atividade antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral. (PEREIRA; DAS GRAÇAS CARDOSO, 2012; CONCEIÇÃO et al., 2017; PANDEY, 2017).

Muitas das plantas usadas para fins medicinais não são cultivadas sob condições controladas e estão sujeitas às variações ambientais, como variações sazonais, o

que inclui mudanças de temperatura e oscilações de precipitação. Neste contexto, os estresses bióticos e/ou abióticos podem interferir no metabolismo das plantas medicinais, modificando vias biossintéticas e, conseqüentemente, o conteúdo/disponibilidade destas substâncias (PACIFICO et al., 2015).

Plantas do gênero *Bauhinia* são encontradas nas áreas tropicais do planeta e utilizadas na medicina popular em várias regiões do mundo, incluindo África, Ásia, América Central e do Sul, sendo usadas, por exemplo, para o tratamento de inflamações e de diabetes *mellitus* (CORRÊA; SIQUEIRA-BATISTA; QUINTAS, 1998). Como descrito por Maia Neto *et al* (2008) o interesse pela avaliação do potencial antioxidante da *B. unguolata* L. foi reforçado pela confirmação da presença de flavonoides nas folhas, metabólitos secundários que apresentam reconhecida atividade antioxidante.

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da sazonalidade, estação seca e chuvosa, na produção total de flavonoides de *Bauhinia* sp., de modo a relacionar estes compostos com as atividades antioxidantes, citotoxicidade em células sadias e tumorais e efeito anti-citotóxico contra danos induzidos pela cisplatina.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção do extrato vegetal

O material avaliado é parte do banco de extratos do Laboratório de Genética de Plantas e toxicológica, localizado na Universidade Federal do Espírito Santo. As folhas de um mesmo espécime de *Bauhinia* sp. foram coletadas em estações de seca (2015) e chuvosa (2016) no Horto da Prefeitura Municipal de Vitória-ES, Brasil. As informações meteorológicas acerca das estações de coleta foram obtidas *on line* em acesso ao site do INCAPER (Instituto Capixaba de Pesquisa Assistência Técnica e Extensão Rural) - quesito de índice pluviométrico e umidade relativa do ar. O extrato bruto foi obtido por maceração exaustiva, em etanol absoluto P.A. (99,3%) à temperatura ambiente (25-30 °C), protegido da luminosidade durante 7 dias, sendo revolvido diariamente. Posteriormente, o material foi filtrado e concentrado em um evaporador rotatório a vácuo.

2.2. Análise Fitoquímica

2.2.1. Teor Total de Flavonoides

O conteúdo total de flavonoides foi mensurado pelo método colorimétrico descrito por Zhishen et al. (1999) com adaptações. Em tubos selados, 1,5mL de solução metanólica de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2% p/v) foi adicionado a 0,5mL do extrato e mantido ao abrigo de luz por 10 min. A absorbância a 430 nm foi detectada por leitor ELISA Epoch BioTek®. A solução metanólica de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ foi usada como branco e os experimentos feitos em duplicata. Uma série de diluições de solução metanólica de

rutina foi preparada e avaliada. A quantidade de flavonoides no extrato foi expressa em equivalente de rutina por grama de massa seca de extrato.

2.3. Atividade Antioxidante

2.3.1. ABTS

A atividade antioxidante do extrato bruto foi estimada pelo método colorimétrico a partir da captura do radical $ABTS^{\bullet+}$, derivado do ácido 2,2'-azinobis(-3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico, descrito por Re et al. (1999), com modificações. Neste teste, o radical $ABTS^{\bullet+}$ foi gerado a partir da reação de 5 ml da solução estoque de ABTS (7 mM), com 88 mL de solução

de persulfato de potássio (140 mM), e deixou-se reagir durante 16 horas à temperatura ambiente, no escuro. Após o período de incubação, a solução $ABTS^{\bullet+}$ foi diluída em etanol até alcançar uma absorbância de $0,70 \pm 0,05$ a 734 nm.

Em microplaca de 96 poços, 200 μ L da solução $ABTS^{\bullet+}$ foram adicionados a 40 μ L de solução etanólica do extrato bruto em diferentes concentrações (500,0, 250,0, 125,0, 62,50, 31,25 e 15,63 μ g. mL^{-1}). A leitura foi realizada após 6 minutos de incubação, à temperatura ambiente e ao abrigo de luz. A absorbância foi registrada no leitor ELISA Epoch BioTek® à 734 nm. O teste foi realizado em triplicata correlacionado ao padrão Trolox (Sigma-Aldrich) e um controle (sem extrato). O percentual de inibição por eliminação do $ABTS^{\bullet+}$ foi calculado a partir da seguinte equação:

$$\% \text{ Inibição} = [(Abs_{\text{Controle}} - Abs_{\text{Amostra}} / Abs_{\text{Controle}})] \times 100$$

2.3.2. DPPH

A atividade antioxidante do extrato bruto também foi mensurada pelo método colorimétrico de redução do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), descrito por Duarte e Almeida et al. (2006) e Rufino et al. (2007), com modificações. Neste teste, dissolveram-se 120 mg do reagente DPPH 0,3 mM em 100 ml de álcool metílico para originar o radical.

Em microplaca de 96 poços, 200 μ L da solução de DPPH• foram adicionados a 100 μ L de solução metanólica do extrato bruto em diferentes concentrações (500,0, 250,0, 125,0, 62,50, 31,25 e 15,63 μ g. mL^{-1}). Após 30 minutos de incubação e ao abrigo de luz, a absorbância foi registrada no leitor ELISA Epoch BioTek® à 517 nm. O teste foi realizado em triplicata correlacionado ao padrão ácido ascórbico (Sigma-Aldrich) e um controle (sem extrato). O percentual de inibição por eliminação do DPPH• foi calculado a partir da seguinte equação:

$$\% \text{ Inibição} = [(Abs_{\text{Controle}} - Abs_{\text{Amostra}} / Abs_{\text{Controle}})] \times 100$$

2.4. Citotoxicidade *in vitro*

2.4.1. Linfócitos Humanos

Os linfócitos humanos foram obtidos de sangue periférico de doador sadio entre 20 e 30 anos, isolados pelo método do Ficoll® Paque Plus, com pequenas modificações, e plaqueados em microplaca de 96 poços com 2×10^5 células em cada poço. Para avaliação da citotoxicidade, as células foram tratadas com os extratos de *Bauhinia* sp. diluído em água nas concentrações 10,0; 50,0 e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ por 24 ou 48h. Já para a avaliação da anti-citotoxicidade, as células receberam os extratos de *Bauhinia* sp. com adição cisplatina ($50,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$), agente citotóxico, seguindo protocolos de pré-tratamento e tratamento simultâneo. No pré-tratamento, as células recebem primeiro o extrato e 24h depois, a cisplatina. No tratamento simultâneo, recebem o extrato e a cisplatina simultaneamente. Ao final do tempo de exposição ao extrato, os linfócitos humanos foram submetidas ao teste de viabilidade celular pelo método do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT).

Os protocolos citados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Espírito Santo (Certificado 2.333.879).

2.4.2. Sarcoma-180

Células de Sarcoma 180 foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro e mantidas sob condições de cultura suplementada com antibióticos. As células foram cultivadas em microplaca de 96 poços, $100 \mu\text{L}$ de células (2×10^5 células/mL) em cada poço e mantidas a 37°C em atmosfera úmida, na presença de 5% de CO_2 . As células foram tratadas com os extratos de *Bauhinia* sp. nas concentrações de 10,0; 50,0 e $100,00 \mu\text{g.mL}^{-1}$ por 24h e 48h, e as células do controle negativo não foram tratadas. Após o fim do tratamento, a viabilidade celular foi avaliada pelo método de redução do MTT.

Os protocolos citados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFES (Parecer: 89/2015).

2.4.3. MTT

O princípio baseia-se na redução do MTT em um produto com a coloração violeta (MTT-formazan) pela enzima mitocondrial tetrazolium-succinato-desidrogenase. A conversão só ocorre em células viáveis. Após o tratamento, as microplacas foram centrifugadas a 860 rcf durante 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e $20 \mu\text{L}$ de MTT a 5 mg.mL^{-1} foram adicionados a cada poço. Passadas 3 horas, as placas foram centrifugadas a 860 rcf por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se $100 \mu\text{L}$ de DMSO. A absorbância a 595 nm foi detectada no leitor ELISA Epoch BioTek®. O experimento foi realizado em triplicata.

2.5. Análise estatística

Todos os resultados foram tabulados e os valores expressos como média \pm erro padrão. Os dados de atividade antioxidante (DPPH e ABTS) foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido do teste *t* de comparação múltipla ($p < 0,05$). Os dados de citotoxicidade e anti-citotoxicidade foram comparados em relação ao controle e submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido do teste *post hoc* de Dunnett ($p < 0,0001$). A comparação entre os tratamentos (linfócitos humanos e sarcoma-180) foi realizada com teste *t* para múltiplas comparações ($p < 0,05$).

3 | RESULTADOS

3.1 Teor de Flavonoides

O teor total de flavonoides no extrato produzido com material vegetal coletado na estação seca (2015) foi menor ($69,50 \pm 10,61 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) quando comparado ao da coleta realizada na estação chuvosa (2016) ($252,67 \pm 2,83 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) ($p = 0,0018$).

3.2 Avaliação da atividade antioxidante

3.2.1 Ensaio do ABTS

As figuras 1 e 2 apresentam, respectivamente, o percentual de inibição do radical ABTS e DPPH em função das concentrações do extrato de *Bauhinia* sp.

O percentual de inibição do radical ABTS exibido pelo extrato referente a coleta de 2015, estação seca, variou entre 8,62-92,87%, em 2016, estação chuvosa, variou entre 2,07-77,87% e o padrão trolox variou entre 14,49-93,63%. Ambos extratos apresentaram performance antioxidante estatisticamente inferior ao padrão trolox, exceto na concentração de $500,0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ com o extrato vegetal referente a estação seca (2015), cujo desempenho antioxidante foi similar ao do padrão. Em comparação aos resultados observados com o extrato vegetal referente a coleta na estação seca (2015), no ano de 2016, estação chuvosa, foi observado decréscimo acentuado na atividade antioxidante.

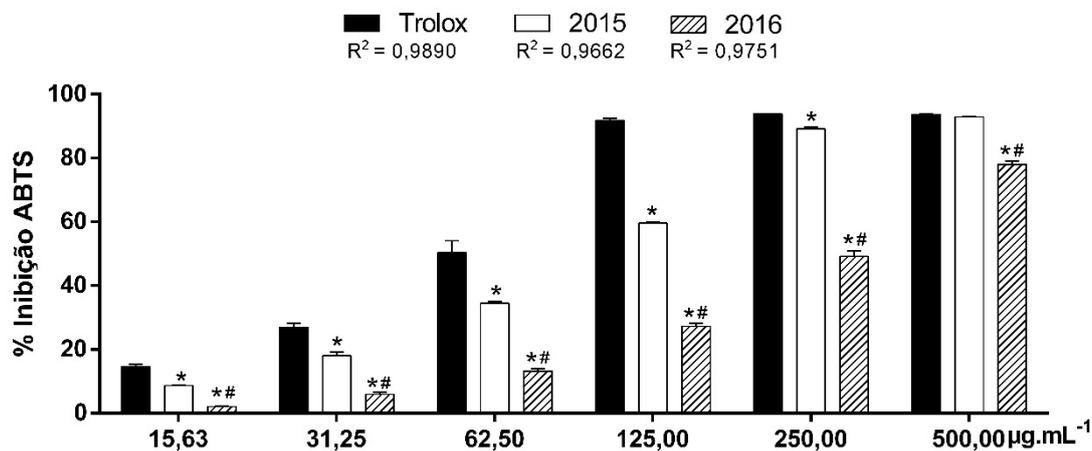


Figura 1. Inibição do radical ABTS por *Bauhinia* sp. a partir de extratos obtidos das folhas coletadas em estação seca e chuvosa.

Valores expressos em média \pm desvio padrão (n=3). Folhas de *Bauhinia* sp. coletadas em 2015 (estação seca) e 2016 (estação chuvosa). Teste *t* para múltiplas comparações - * Trolox vs. extratos de *Bauhinia* sp. coletada em 2015 ou 2016; #extrato de *Bauhinia* sp. coletada em 2015 vs. 2016 ($p < 0,05$). * ou # infere diferença estatística entre os grupos comparados.

3.2.2 Ensaio do DPPH

A inibição do radical DPPH exibida pelo extrato produzido com folhas coletadas na estação seca (2015) variou entre 12,24-89,79% e na estação chuvosa (2016) variou entre 2,03-46,02%, enquanto o padrão, ácido ascórbico, variou entre 46,61-93,93%. O extrato etanólico de *Bauhinia* sp. referente a coleta de 2015 apresentou ação antioxidante similar ao padrão ácido ascórbico nas concentrações de 500,0 e 250,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Quando comparados, o extrato produzido com folhas coletadas durante a estação seca apresenta melhor performance antioxidante do que aquele produzido com material coletado na estação chuvosa.

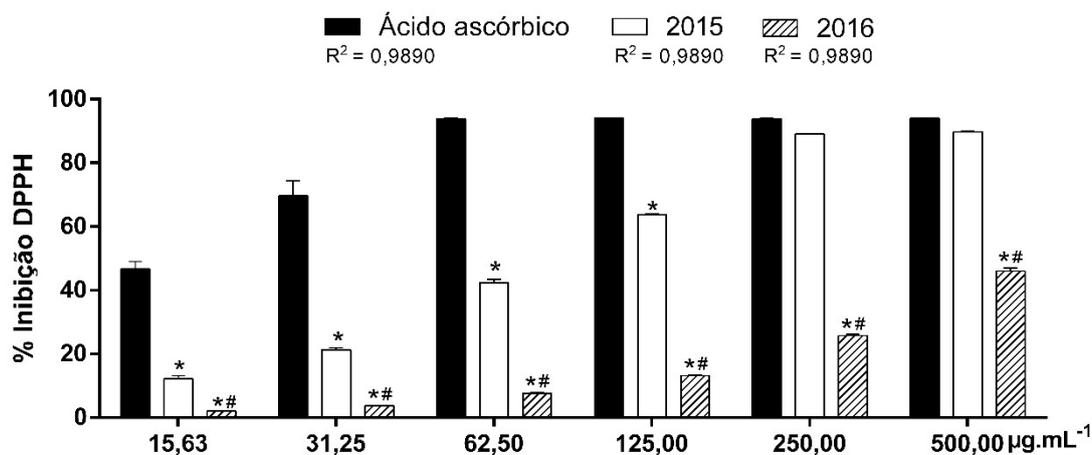


Figura 2. Inibição do radical DPPH por *Bauhinia* sp. a partir de extratos obtidos das folhas coletadas em estação seca e chuvosa.

Valores expressos em média \pm desvio padrão (n=3). Folhas de *Bauhinia* sp. coletadas em 2015 (estação seca) e 2016 (estação chuvosa). Teste *t* para múltiplas comparações - * Ácido ascórbico vs. extratos de *Bauhinia* sp. coletada em 2015 ou 2016; #extrato de *Bauhinia* sp. coletada em 2015 vs. 2016 ($p < 0,05$). * ou # infere diferença estatística entre os grupos comparados.

3.3 Atividade Citotóxica

Os efeitos citotóxicos dos extratos brutos etanólicos de *Bauhinia sp.* em linfócitos humanos e sarcoma-180 após 24h e 48h de exposição são apresentados na figura 3

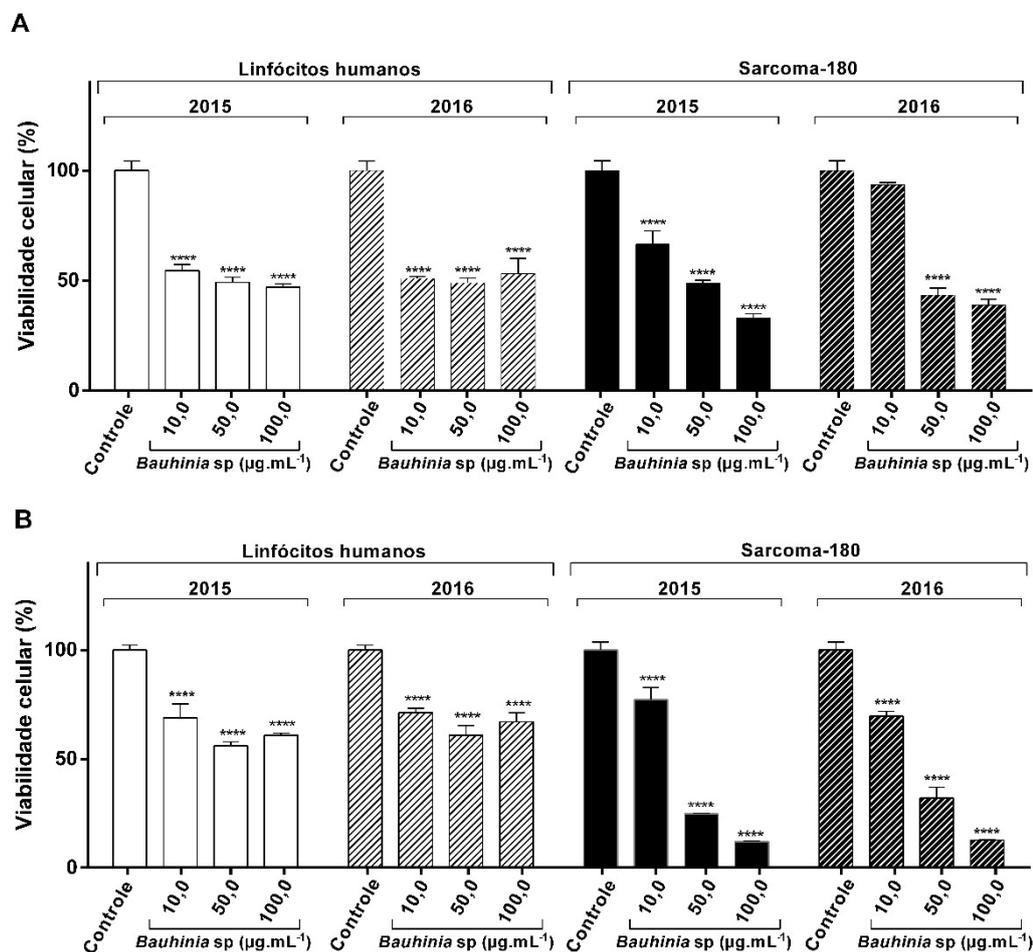


Figura 3. Percentual de viabilidade celular de linfócitos humanos e sarcoma-180 após tratamento com doses dos extratos etanólicos das folhas de *Bauhinia sp.*, coletada em estação seca e chuvosa, pelo método do MTT.

Valores expressos em média \pm desvio padrão ($n=3$). Percentual de viabilidade celular após 24h (A) e 48h (B) de tratamento. Controle - células não tratadas; doses de extrato de *Bauhinia sp.* - células tratadas com 10,0, 50,0 ou 100,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 2015 - estação seca; 2016 - estação chuvosa. A viabilidade celular foi comparada com seus respectivos controles pela ANOVA *post hoc* teste de Dunnett - **** $p < 0,0001$ - células tratadas com doses de *Bauhinia sp.* vs. grupo controle de linfócitos humanos ou sarcoma-180. A comparação entre linfócitos humanos e sarcoma-180 tratados foi realizado pelo teste *t* para múltiplas comparações ($p < 0,05$).

Após 24h de exposição (figura 3-A), ambos os extratos foram citotóxicos para os linfócitos e sarcoma-180, em todas as doses testadas, com exceção para a dose de 10,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em células de sarcoma-180 tratadas com o extrato referente a coleta da estação chuvosa (2016). A dose de 100,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do extrato produzido com material vegetal da coleta de 2015, estação seca, apresenta nível maior de citotoxicidade para as células de sarcoma-180 ($p=0,0124$).

Após 48h de exposição (figura 3-B), as doses testadas foram citotóxicas tanto

para os linfócitos quanto para o sarcoma-180. As doses de 50,0 e 100,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foram mais citotóxicas para as células de sarcoma-180 do que para os linfócitos humanos usando os extratos oriundos tanto da coleta na estação seca (2015) quanto da estação chuvosa (2016) ($p < 0,0001$).

3.4 Atividade anti-citotóxica

Os resultados obtidos nos ensaios de anti-citotoxicidade segundo os protocolos de pré-tratamento e tratamento simultâneo são apresentados na figura 4. Ambos extratos não foram capazes de prevenir o dano citotóxico induzido pela cisplatina com as doses testadas nos protocolos citados após 24h (Figura 4-A) e 48h de tratamento (Figura 4-B).

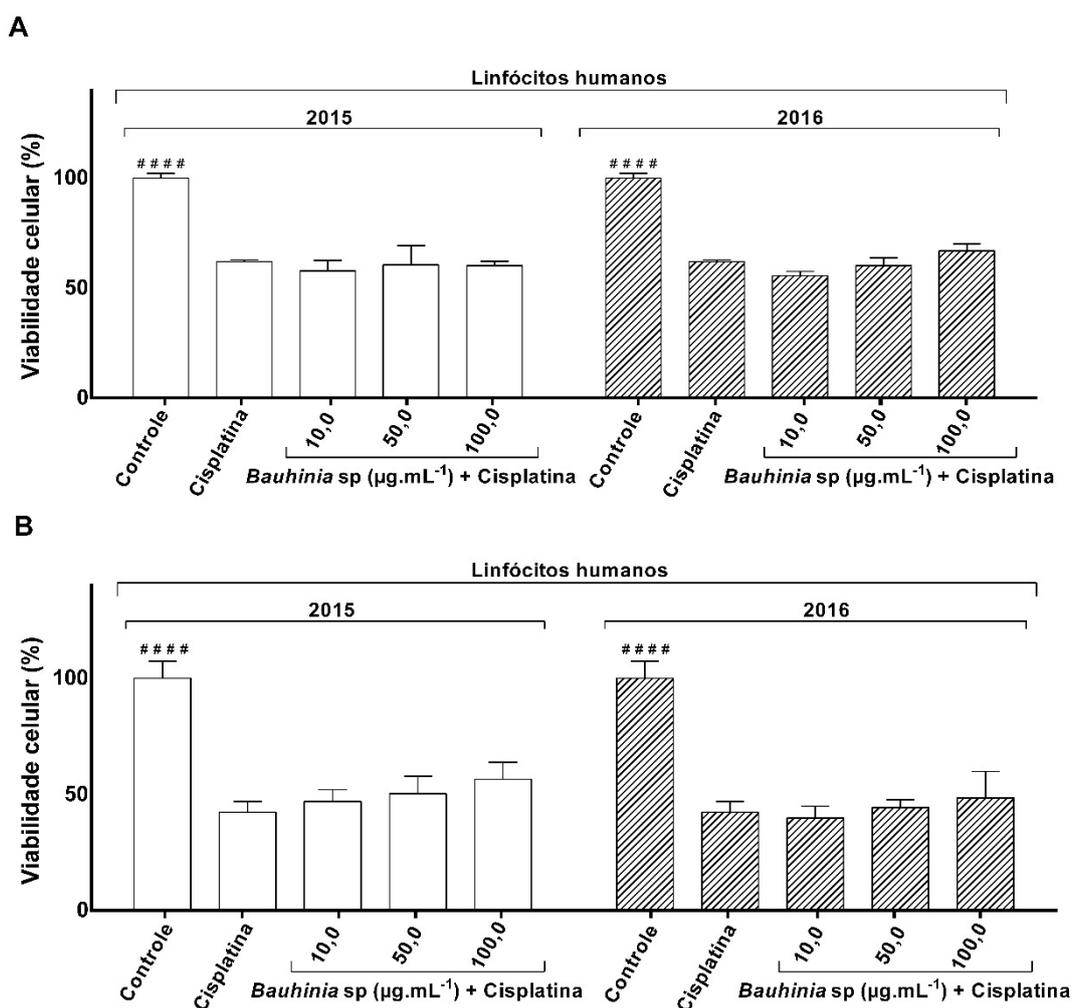


Figura 4 - Percentual de viabilidade celular de linfócitos humanos segundo seguindo os protocolos de anti-citotoxicidade após o tratamento com doses dos extratos etanólicos de *Bauhinia* sp., coletada em estação seca e chuvosa, pelo método do MTT.

Valores expressos em média \pm desvio padrão ($n=3$). Percentual de viabilidade celular no protocolo de pré-tratamento (A) e tratamento simultâneo (B). Controle - células não tratadas; Cisplatina - células tratadas com cisplatina (50,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); doses de extrato de *Bauhinia* sp. - células tratadas com 10,0, 50,0 ou 100,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 2015 - estação seca; 2016 - estação chuvosa. Os valores são médias \pm desvio padrão. A viabilidade celular nos protocolos de anti-citotoxicidade foi comparada com o grupo de células tratadas com cisplatina pela ANOVA *post hoc* teste de Dunnett - **** $p < 0,0001$ - grupo de células tratadas com cisplatina vs. grupo controle ou células tratadas com doses de *Bauhinia* sp.

4 | DISCUSSÃO

A efetividade das atividades biológicas de produtos naturais têm favorecido seu uso extensivo no campo culinário, industrial e farmacológico, assim como têm conduzido para um crescente o número de estudos científicos que avaliam tanto a eficácia e a importância das plantas medicinais quanto o papel dos metabólitos secundários no tratamento de doenças (PICCOLELLA et al., 2018).

Os produtos do metabolismo secundário conferem aos vegetais defesa contra herbivoria, ataque de patógenos e proteção a estresses abióticos associados à mudanças de temperatura, pluviosidade, exposição aos raios UV e disponibilidade de nutrientes minerais. Além disso, os produtos secundários do metabolismo vegetal podem atuar como moduladores da expressão gênica e transdução de sinais, influenciando no conteúdo/disponibilidade desses ativos (MISRA, 2009; MANIKANDASELVI; VADIVEL; BRINDHA, 2016).

Neste contexto, o estresse abiótico pode influenciar no desenvolvimento do vegetal e em sua capacidade de sintetizar metabólitos secundários, sendo, portanto, um fator relevante no que se refere a obtenção de produtos naturais à base de plantas medicinais (AKULA; RAVISHANKAR, 2011). Somado a isso, o acúmulo de metabólitos em plantas medicinais sujeitas às condições ambientais sofre grande variação devido às oscilações das condições ambientais, tais como a sazonalidade e eventos climáticos adversos, que incluem mudanças bruscas de temperatura, luz e quantidade de precipitação (PACIFICO et al., 2015).

Em resposta aos diferentes tipos de estresses, bióticos ou abióticos, as plantas podem exibir mecanismos moleculares como um sistema de defesa, divididos em três grupos principais. O primeiro mecanismo envolve a sinalização mediada por moléculas ativadas pelo estresse, que conduzem à alterações da homeostase iônica e osmótica e do mecanismo de desintoxicação vegetal. O segundo mecanismo está relacionado à regulação positiva de diferentes genes responsáveis pela síntese de proteínas específicas, como proteínas de choque térmico e proteínas LEA (do inglês *Late Embryogenesis Abundant*), e de moléculas protetoras, como açúcares, poliálcoois e aminoácidos. O terceiro mecanismo está associado a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e à ativação de sistemas antioxidantes pela síntese de metabólitos secundários especializados, como flavonoides e outros compostos fenólicos (BOSCAIU et al., 2008).

Em condições de estresse, é observada a síntese de metabólitos secundários especializados, como compostos fenólicos, os quais conferem defesa ao organismo vegetal e podem ser usados para promoção da saúde em humanos (DO NASCIMENTO; FETT-NETO, 2010; AKULA; RAVISHANKAR, 2011; AGATI et al., 2012, 2013). Em um estudo conduzido com folhas de salgueiro em regiões secas, foi observado que a

ausência de precipitação é muitas vezes acompanhada de altas temperaturas e alta incidência de radiação solar, o que conduz ao aumento da produção de flavonoides e ácidos fenólicos. Além disso, o estresse hídrico pode modular a razão clorofila/carotenóides nos tecidos vegetais, bem como promover o acúmulo de antocianinas (GIORDANO et al., 2016; FAHAD et al., 2017). A ativação das vias biossintéticas dessas moléculas, por sua vez, ocorre em decorrência da incidência luminosa e em resposta à superprodução de espécies reativas de oxigênio desencadeada por este tipo de estresse (AGATI et al., 2013).

Os fatores ambientais em que uma espécie cresce e se desenvolve parecem determinar diferenças significativas no teor de polifenóis produzido pelos vegetais, apresentando correlação positiva entre os teores de compostos polifenólicos e a capacidade antioxidante e remoção de radicais livres. Desta forma, espera-se que extratos vegetais ricos em polifenóis sejam capazes de promover maior poder redutor e atuarem sobre a regulação de enzimas antioxidantes endógenas (SCHAFFER et al., 2005).

A capacidade antioxidante de outras espécies do gênero *Bauhinia* sp. é relatada na literatura, como é o caso de *B. monandra*, em que os extratos clorofórmico e de acetato de etila são apontados como boas fontes de antioxidantes, atividade relacionada, segundo os autores, à presença de compostos de diferentes polaridades, possivelmente em função da presença de flavonóides e esteróides (ARGOLO et al., 2004).

Miceli *et al.* (2016), ao avaliarem o extrato hidroalcoólico de folhas de *Bauhinia fortificata*, inferem que os flavonoides sejam os principais responsáveis pela ação primária da atividade antioxidante. No presente estudo, os maiores teores de flavonoides foram encontrados no extrato de 2016 (estação chuvosa), assim como o observado por Gobbo-Neto et. al (GOBBO-NETO; LOPES, 2007) em extrato de *Lychnophora ericoides* onde os flavonóides foram produzidos principalmente na estação chuvosa. Apesar do maior teor de flavonoides no extrato da estação chuvosa, o extrato produzido a partir da coleta na estação seca (2015) foi mais efetivo no sequestro de radicais livres, possibilitando inferir que haja um grupo seletivo de flavonoides atuando na modulação desta resposta, o que favoreceu o extrato de 2015 (estação seca), nos dois testes avaliados. Rodrigues da Silva (2015) também relata que as diferenças individuais dentro de cada classe destes compostos resultam na variação e no número e posição dos grupamentos hidroxilas, por modificação nos anéis e no grau de metilação e glicosilação. Estas modificações dependem do estágio em que a planta se encontra, se jovem ou adulta, e de quais compostos químicos estão prevalecendo naquele momento. Esta questão deixa claro que o mecanismo de ação dos flavonoides estão relacionados às variações de suas estruturas.

Outros estudos como de Badgujar et al. (2017) observaram respostas positivas quanto à eliminação do radical superóxido (O_2^-), ao avaliar o extrato metanólico de *Bauhinia racemosa* por meio de teste *in vitro*. O estudo mostrou que esta espécie

vegetal pode atuar de forma positiva da prevenção de danos induzidos pelo radical, uma vez que superóxido pode provocar lesão biológica secundária à sistemas geradores de O₂⁻ quando em soluções aquosas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Quanto à atividade antioxidante, em estudos com o extrato etanólico e frações de *Bauhinia unguolata*, Paula (2014) relatou que as folhas são fontes potenciais de substâncias polifenólicas, como os flavonoides e que esses podem ser os responsáveis por atividades biológicas importantes, dentre elas as antioxidantes. Portanto, ao avaliar o potencial antioxidante dessa espécie, *in vitro*, obteve resultados que indicaram a *B. unguolata* como uma fonte promissora de antioxidantes naturais. Tal situação respalda os achados apresentados no presente estudo, os quais revelaram uma considerável capacidade antioxidante do extrato de *Bauhinia* sp., principalmente, do material coletado no ano de 2015.

Pesquisas voltadas para a atuação anti-câncer de plantas medicinais, tem como objetivo primário a não toxicidade de linhagem celular saudável, seguida de uma resposta citotóxica positiva em linhagens tumorais. Na avaliação da citotoxicidade dos extratos em linfócitos humanos e sarcoma-180, foi verificado que as 24h de exposição, para as doses testadas, ambos extratos reduzem significativamente a viabilidade celular tanto de células sadias quanto de células tumorais.

Resultados diferentes foram encontrados por Santos (2017), que ao realizar um tratamento com diferentes frações de *B. variegata* observou que no tratamento de 24h ele foi pouco citotóxico a linhagem 4T1 (Carcinoma Mamário Murino). Miceli et al. (2015) também não observou atividade citotóxica do extrato de folhas *B. fortificata* em células sadias de linfócitos humanos em todas as concentrações testadas no período de 24h. Entretanto, no mesmo período, foi observado ação citotóxica frente às células de melanoma humano (FO-1) que resultou na redução de 50,58% da viabilidade celular, na dose de 50mg/ml. Este estudo então, corrobora com os dados aqui relatados. Pandey (2017), avaliou a toxicidade *in vivo* de *B. variegata* (folhas, caule e flores), em sua análise de DL50, e inferiu que sua toxicidade poderia ser considerada superior a 2000 mg/kg, tornando-a então uma droga de uso seguro, até este limite.

Contudo, no tratamento de 48h de exposição ao extrato, a toxicidade passa a ser mais acentuada apenas para as células de sarcoma-180, sendo o extrato produzido com material vegetal coletado na estação seca (2015) o mais promissor para atividade anticâncer. Ferreira e Nardin (2017) avaliaram o extrato alcóolico à quente da casca de *Bauhinia glabra* em células saudáveis de linfócitos humanos no período de 48 horas e não foi observado efeito citotóxico ou proliferativo, a diferença observada nos dois estudos pode ser atribuída ao órgão vegetal, o modo de extração, sazonalidade, temperatura, latitude do local de retirada do material vegetal utilizado para os estudos. No trabalho de Miceli et al. (2016), também foi avaliada a viabilidade celular do extrato de folhas *B. fortificata* em células melanoma humano (FO-1) em exposição por 48h, que resultou em uma redução de 41,67% da viabilidade celular na dose de 50mg/ml. Vale ressaltar que neste mesmo estudo, foi verificada a viabilidade celular de

uma fração rica em flavonoide (FRF) (originada das folhas de *B. fortificada*), e não foi observada toxicidade para nenhuma das linhagens testadas, que permite inferir que os flavonoides não são os compostos envolvidos na toxicidade celular. Pandey (2017) também relatou atividade significativa na prevenção de melanoma B16F10 em camundongos C57BL quando expostos ao extrato de hidrometanólico de caule, flores e folhas de *Bauhinia variegata* em conjunto com a ciclofosfamida.

Para os testes anti-citotóxicos nos protocolos de pré-tratamento e tratamento simultâneo, ambos extratos foram incapazes de prevenir a indução de danos citotóxicos induzidos pela cisplatina. A cisplatina, uma molécula altamente reativa, é utilizada no tratamento de câncer devido a sua capacidade de se ligar ao RNA, DNA e proteínas, formando diferentes tipos de adutos e, assim, gerando efeitos citotóxicos, gerando diversos efeitos citotóxicos. A formação destes adutos, principalmente no DNA nuclear, tem sido reportada como uma das principais lesões celulares que conduzem a queda da viabilidade celular, a qual depende de mecanismos de reparo mediados pela excisão de nucleotídeos para ser revertida. Desta forma, após o estabelecimento dos danos ao DNA induzidos pela cisplatina pode ocorrer o bloqueio da replicação e/ou transcrição do DNA nuclear, comprometendo a divisão celular, conduzindo à apoptose. Além disso, os efeitos tóxicos da cisplatina estão relacionados com a sua ação no DNA e proteínas mitocondriais, assim o comprometimento da síntese proteica da cadeia de transporte de elétrons acarreta em um aumento na produção de ROS (PASCOE; ROBERTS, 1974; FICHTINGER-SCHEPMAN et al., 1985; YANG et al., 2006).

Os produtos naturais à base de plantas medicinais podem exibir efeitos citotóxicos e/ou a habilidade de reversão de danos induzidos por agentes químicos que comprometem a homeostase celular. As atividades biológicas observadas em diferentes modelos de estudo, como em testes antioxidantes e ensaios de citotoxicidade, são parte da triagem fitoquímica de produtos naturais e estão diretamente relacionadas com a composição química observada nos produtos naturais.

A grande diversidade de compostos fenólicos nos vegetais é resultado de derivações que ocorrem na via do ácido chiquímico, processo mediado pela enzima L-fenilalanina amônia-liase (PAL), que atua sobre ponto de ramificação entre o metabolismo primário (via do ácido chiquímico) e secundário (via de produção dos fenilpropanóides). A PAL atua sobre um conjunto limitado de estruturas moleculares dando origem à diversos compostos fenólicos, como os flavonóides, a classe mais abundante de polifenóis vegetais sintetizados por meio de uma combinação das vias do ácido chiquímico e acilpolilonato (FAOSTAT; FALCONE FERREYRA; RIUS; CASATI, 2012; PICCOLELLA et al., 2018). A ação enzimática da PAL viabiliza a síntese da L-fenilalanina, usada na produção do ácido transcinâmico, molécula da qual deriva a maior parte dos compostos fenólicos (DEWICK, 2009; VOGT, 2010).

A condição de seca e a ausência de precipitações têm sido relacionadas tanto ao aumento acentuado de compostos fenólicos, como aumento na produção de quercetina-3-O-hexosídeo e 6,8-dihexosilapigenina em *Calamintha nepeta*, quanto

ao forte decréscimo da quantidade de ácido rosmarínico em *Thymus longicaulis* (PICCOLELLA et al., 2018). Demonstrando que, assim como observado em nosso estudo, variações ambientais podem modular as vias metabólicas de produção dos compostos fenólicos, aumentando ou reduzindo o conteúdo total dessas substâncias nos vegetais.

5 | CONCLUSÃO

As plantas medicinais usadas pela população, na grande maioria das vezes, não são cultivadas e estão sujeitas às alterações do ambiente, fator que pode atuar sobre as vias de produção de metabólitos secundários, compostos relacionados às atividades biológicas desses vegetais. Nossos resultados sugerem que as variações sazonais, estação seca e chuvosa, atuam sobre as vias de produção total de flavonoides de *Bauhinia* sp. e que a estação chuvosa de coleta, quando comparada a estação seca, conduza ao aumento da concentração deste composto fenólico. As atividades biológicas avaliadas neste estudo estão diretamente relacionadas à composição química dos extratos vegetais, as substâncias que os compõem e os seus teores. Os ensaios antioxidantes demonstraram haver maior eficiência de atividade do extrato vegetal da coleta da estação seca, ou seja, que não há relação direta entre o teor total de flavonoides e as atividades antioxidantes testadas, sugerindo que a composição química destes extratos varie quantitativamente e qualitativamente. Contudo, mesmo com as diferenças na composição química, ambos extratos vegetais apresentaram efeito citotóxico e anti-citotóxico similares, sendo mais eficazes em reduzir a viabilidade de células tumorais. Nós hipotetizamos, com base nos resultados obtidos, que as condições de seca e precipitação às quais *Bauhinia* sp. estava sujeita no momento de coleta foi capaz atuar sobre as vias de produção dos compostos fenólicos desta planta, modulando qualitativa e qualitativamente a composição química dos extratos vegetais. Esses resultados reforçam os usos medicinais de *Bauhinia* sp., como também demonstram que os efeitos da sazonalidade devem ser considerados no processo de coleta de plantas para fins medicinais.

AGRADECIMENTOS

Guilherme Batitucci, por disponibilizar e coletar o material vegetal. À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES).

REFERÊNCIAS

AGATI, G.; AZZARELLO, E.; POLLASTRI, S.; TATTINI, M. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. **Plant Science**, v. 196, p. 67–76, 2012.

AGATI, G.; BRUNETTI, C.; DI FERDINANDO, M.; FERRINI, F.; POLLASTRI, S.; TATTINI, M. Functional roles of flavonoids in photoprotection: new evidence, lessons from the past. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 72, p. 35–45, 2013.

AKULA, R.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant signaling & behavior**, v. 6, n. 11, p. 1720–1731, 2011.

ARGOLO, A. C. C.; SANT'ANA, A. E. G.; PLETSCH, M.; COELHO, L. Antioxidant activity of leaf extracts from Bauhinia monandra. **Bioresource technology**, v. 95, n. 2, p. 229–233, 2004.

BADGUJAR, N. V.; MISTRY, K. N.; CHUDASAMA, P. N.; PATEL, J. S. In vitro Antioxidant and Cytotoxic Effects of Methanol Extracts of Vitex negundo, Lantana camara, Bauhinia variegata and Bauhinia racemosa on Human Cancer Cell lines. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 79, n. 3, p. 431–437, 2017.

BOGLIOLO, L.; BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo patologia**. [s.l.] Guanabara-Koogan, 2011.

BORGES, L. L.; ALVES, S. F.; SAMPAIO, B. L.; CONCEIÇÃO, E. C.; BARA, M. T. F.; PAULA, J. R. Environmental factors affecting the concentration of phenolic compounds in Myrcia tomentosa leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 2, p. 230–238, 2013.

BOSCAIU, M.; LULL, C.; LIDON, A.; BAUTISTA, I.; DONAT, P.; MAYORAL, O.; VICENTE, O. Plant responses to abiotic stress in their natural habitats. **Bulletin of university of agricultural sciences and veterinary medicine Cluj-Napoca. Horticulture**, v. 65, n. 1, p. 53–58, 2008.

CONCEIÇÃO, K. N.; SAMPAIO, F. A. S. A.; DA SILVA, V. F.; DA SILVA, A. O. PODER ANTIOXIDANTE DE CAROTENOIDES, FLAVONOIDES E VITAMINA E NA PREVENÇÃO DA ARTERIOSCLEROSE. **Revista Ciência & Saberes-Facema**, v. 2, n. 4, p. 320–324, 2017.

CORRÊA, A. D.; SIQUEIRA-BATISTA, R.; QUINTAS, L. E. M. **Plantas medicinais, do cultivo a terapeutica**. [s.l.] Editora Vozes, 1998.

DE REZENDE, F. M.; ROSADO, D.; MOREIRA, F. A.; DE CARVALHO, W. R. S. Vias de síntese de metabólitos secundários em plantas. **Laboratório de Ensino de Botânica**, p. 93, 2016.

DEL REY, B. G.; GUIMARAES, L. L.; DE TOLEDO, M. S.; TAKAHASHI, H. K.; STRAUS, A. H.; DE FREITAS, M. S.; HATTEBERGER, B.; SILVA, C. M. M.; DE CARVALHO, M. R.; TOMA, W. The antiulcer and antioxidant mechanisms of the butanolic fraction extract obtained from Bauhinia forficata leaves: A medicinal plant frequently used in Brazilian folk medicine. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 12, n. 6, p. 69–76, 2018.

DEWICK, P. M. The shikimate pathway: aromatic amino acids and phenylpropanoids. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, 3rd Edition**, p. 137–186, 2009.

DO NASCIMENTO, N. C.; FETT-NETO, A. G. Plant secondary metabolism and challenges in modifying its operation: an overview. In: **Plant Secondary Metabolism Engineering**. [s.l.] Springer, 2010. p. 1–13.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J. Dos; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446–452, 2006.

FAHAD, S.; BAJWA, A. A.; NAZIR, U.; ANJUM, S. A.; FAROOQ, A.; ZOHAIB, A.; SADIA, S.; NASIM, W.; ADKINS, S.; SAUD, S. Crop production under drought and heat stress: plant responses and management options. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 1147, 2017.

FALCONE FERREYRA, M. L.; RIUS, S.; CASATI, P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. **Frontiers in plant science**, v. 3, p. 222, 2012.

FAOSTAT, F. A. O. **Statistics Division 2012**, [s.d.].

FERLAY, J. GLOBOCAN 2008, cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase No. 10. <http://globocan.iarc.fr>, 2010.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da associação médica brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61–68, 1997.

FERREIRA, K. F. C.; NARDIN, J. M. Avaliação in vitro da citotoxicidade do extrato de bauhinia glabra em células linfocitárias normais. **Cadernos da Escola de Saúde**, v. 1, n. 13, 2017.

FICHTINGER-SCHEPMAN, A. M. J.; VAN DER VEER, J. L.; DEN HARTOG, J. H. J.; LOHMAN, P. H. M.; REEDIJK, J. Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum (II) with DNA: formation, identification, and quantitation. **Biochemistry**, v. 24, n. 3, p. 707–713, 1985.

GARG, D.; SHAIKH, A.; MULEY, A.; MARAR, T. In-vitro antioxidant activity and phytochemical analysis in extracts of Hibiscus rosa-sinensis stem and leaves. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 2, n. 3, p. 41–46, 2012.

GIORDANO, D.; PROVENZANO, S.; FERRANDINO, A.; VITALI, M.; PAGLIARANI, C.; ROMAN, F.; CARDINALE, F.; CASTELLARIN, S. D.; SCHUBERT, A. Characterization of a multifunctional caffeoyl-CoA O-methyltransferase activated in grape berries upon drought stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 101, p. 23–32, 2016.

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

INCAPER. Sistema de informações meteorológicas INCAPER. Disponível em: <<https://meteorologia.incaper.es.gov.br/SPI-2016>>. Acesso em 14/12/2016.

LIU, W.; LIU, J.; YIN, D.; ZHAO, X. Influence of ecological factors on the production of active substances in the anti-cancer plant *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) TS Ying. **PLoS one**, v. 10, n. 4, p. e0122981, 2015.

LIU, W.; YIN, D.; LI, N.; HOU, X.; WANG, D.; LI, D.; LIU, J. Influence of environmental factors on the active substance production and antioxidant activity in *Potentilla fruticosa* L. and its quality assessment. **Scientific reports**, v. 6, p. 28591, 2016.

LOBANOVA, A.; SHE, R.; PIERAUT, S.; CLAPP, C.; MAXIMOV, A.; DENCHI, E. L. Different requirements of functional telomeres in neural stem cells and terminally differentiated neurons. **Genes & development**, v. 31, n. 7, p. 639–647, 2017.

MANIKANDASELVI, S.; VADIVEL, V.; BRINDHA, P. Studies on physicochemical and nutritional properties of aerial parts of *Cassia occidentalis* L. **Journal of food and drug analysis**, v. 24, n. 3, p. 508–515, 2016.

MICELI, N.; BUONGIORNO, L. P.; CELI, M. G.; CACCIOLA, F.; DUGO, P.; DONATO, P.; MONDELLO, L.; BONACCORSI, I.; TAVIANO, M. F. Role of the flavonoid-rich fraction in the antioxidant and cytotoxic activities of *Bauhinia forficata* Link. (Fabaceae) leaves extract. **Natural product research**, v. 30, n. 11, p. 1229–1239, 2016.

MISRA, A. Studies on biochemical and physiological aspects in relation to phyto-medicinal qualities and efficacy of the active ingredients during the handling, cultivation and harvesting of the medicinal plants. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n. 13, p. 1140–1146, 2009.

NETO, M. M.; NETO, M. A.; BRAZ FILHO, R.; LIMA, M. A. S.; SILVEIRA, E. R. Flavonoids and alkaloids from leaves of *Bauhinia unguolata* L. **Biochemical systematics and ecology**, v. 36, n. 3, p. 227–229, 2008.

- PACIFICO, S.; GALASSO, S.; PICCOLELLA, S.; KRETSCHMER, N.; PAN, S.-P.; MARCIANO, S.; BAUER, R.; MONACO, P. Seasonal variation in phenolic composition and antioxidant and anti-inflammatory activities of *Calamintha nepeta* (L.) Savi. **Food Research International**, v. 69, p. 121–132, 2015.
- PANDEY, S. In vivo antitumor potential of extracts from different parts of *Bauhinia variegata* linn. Against b16f10 melanoma tumour model in c57bl/6 mice. **Applied Cancer Research**, v. 37, n. 1, p. 33, 2017.
- PASCOE, J. M.; ROBERTS, J. J. Interactions between mammalian cell DNA and inorganic platinum compounds—I: DNA interstrand cross-linking and cytotoxic properties of platinum (II) compounds. **Biochemical pharmacology**, v. 23, n. 9, p. 1345–1357, 1974.
- PAULA, C. da S. Estudo fitoquímico e propriedades biológicas das folhas de *Bauhinia unguolata* L., fabaceae. 2014.
- PEREIRA, R. J.; DAS GRAÇAS CARDOSO, M. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, 2012.
- PICCOLELLA, S.; CRESCENTE, G.; PACIFICO, F.; PACIFICO, S. Wild aromatic plants bioactivity: a function of their (poly) phenol seasonality? A case study from Mediterranean area. **Phytochemistry Reviews**, p. 1–15, 2018.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology and medicine**, v. 26, n. 9, p. 1231–1237, 1999.
- RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Comunicado técnico–metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Fortaleza: Embrapa**, p. 4, 2007.
- SANTOS, P. C. **Análise fitoquímica e avaliação das atividades antioxidante, antimutagênica e citotóxica de extratos hidroalcoólicos de *Coriandrum sativum* L.** Tese (Mestre em Biologia Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2016.
- SANTOS, K. M. **Estudos *in vitro* e *in vivo* da atividade de extratos de *Bauhinia* sobre o desenvolvimento tumoral.** Tese (Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular) - Universidade Federal de São João Del Rei. Divinópolis, p. 58. 2017.
- SCHAFFER, S.; SCHMITT-SCHILLIG, S.; MULLER, W. E.; ECKERT, G. P. Antioxidant properties of Mediterranean food plant extracts: geographical differences. **Journal of Physiology and Pharmacology. Supplement**, v. 56, n. 1, p. 115–124, 2005.
- VOGT, T. Phenylpropanoid biosynthesis. **Molecular plant**, v. 3, n. 1, p. 2–20, 2010.
- WHO. World Health Organization. WHO Cancer Factsheet. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>> Acesso em 15/06/2018.
- YANG, Z.; SCHUMAKER, L. M.; EGORIN, M. J.; ZUHOWSKI, E. G.; GUO, Z.; CULLEN, K. J. Cisplatin preferentially binds mitochondrial DNA and voltage-dependent anion channel protein in the mitochondrial membrane of head and neck squamous cell carcinoma: possible role in apoptosis. **Clinical cancer research**, v. 12, n. 19, p. 5817–5825, 2006.
- ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food chemistry**, v. 64, n. 4, p. 555–559, 1999.

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

