

# 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<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> 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<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cristina Gaio – Universidade de Lisboa  
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná  
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> 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<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> 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<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> 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<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

<b>Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)</b>	
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
<b>Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422</b>	

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](http://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

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>1</b>
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>	
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>12</b>
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>	
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>15</b>
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>	
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	<b>29</b>
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>	
<b>CAPÍTULO 5</b> .....	<b>42</b>
<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>	
<b>CAPÍTULO 6</b> .....	<b>60</b>
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>	
<b>CAPÍTULO 7</b> .....	<b>69</b>
<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>	

*Suíany 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**

## ANIDROCOCHLIOQUINONA A E ATIVIDADE ANTAGONISTA DO FUNGO ENDOFÍTICO *BIPOLARIS* SP. ASSOCIADO A *CYMBOPOGON NARDUS*

**Vanessa Mara Chapla**

Universidade Federal do Tocantins (UFT), Gurupi-Tocantins

**Sara Bruna Sousa Dantas**

Universidade Federal do Tocantins (UFT), Gurupi-Tocantins

**Gabriel Leda de Arruda**

Universidade Federal do Tocantins (UFT), Gurupi-Tocantins

**Aloísio Freitas Chagas Junior**

Universidade Federal do Tocantins (UFT), Gurupi-Tocantins

**RESUMO:** O gênero *Bipolaris* tem fornecido um grande número de micotoxinas, como as pertencentes a classe das cochlioquinonas. O fungo endofítico *Bipolaris* sp. isolado da planta medicinal *Cymbopogon nardus* foi submetido a ensaio de antagonismo *in vitro* contra três fungos fitopatogênicos, o fungo *Bipolaris* sp. apresentou potencial antagonista contra o fungo *Fusarium oxysporum*. Anidrocochlioquinona A foi isolada do extrato bruto AcOEt obtido do cultivo do endófito *Bipolaris* sp. em PDB (potato dextrose broth). A estrutura do composto foi elucidada baseada em técnicas de RMN 1D e 2D. Anidrocochlioquinona A é descrita como antitumoral por apresentar atividade citotóxica contra células HeLa.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Bipolaris* sp.;

Anidrocochlioquinona A; fungos endofíticos; antagonismo.

**ABSTRACT:** *Bipolaris* genus has afforded many types of mycotoxin as cochlioquinone class. The endophytic fungus *Bipolaris* sp. isolated from medicinal plant *Cymbopogon nardus* was submitted to *in vitro* antagonism assay against three phytopatogenic fungi, the fungus *Bipolaris* sp. showed antagonism activity against *Fusarium oxysporum*. Anhydrocochlioquinone A was isolated from the crude EtAcO extract obtained from *Bipolaris* sp. cultured in PDB (potato dextrose broth) medium. The structure was established conclusively by 1D and 2D NMR spectra analysis. Anhydrocochlioquinone A was described as antitumor by showed cytotoxicity activity against HeLa cells.

**KEYWORDS:** *Bipolaris* sp.; Anhydrocochlioquinone A; endophytic fungi; antagonism.

### 1 | INTRODUÇÃO

O gênero *Bipolaris* contém mais de 100 espécies fúngicas associadas a diversas plantas com uma distribuição mundial. Segundo Manamgoda et al. (2014) este gênero é composto por fungos filamentosos Ascomicetos, da classe Dothideomycetes, ordem Pleosporales e família

Pleosporaceae. As espécies do gênero *Bipolaris* estão muitas vezes associadas ao desenvolvimento de doenças em espécies vegetais, principalmente em culturas de alto valor na família Poaceae, e ainda à agentes etiológicos de doenças em seres humanos (BERBEE; PIRSEYEDI; HUBBARD, 1999; CAMPOS, 2009). Entretanto, apesar de estar associado ao desenvolvimento de patologias, esse gênero fúngico têm alcançado crescente interesse biotecnológico por sua relação com a produção de diferentes metabólitos biologicamente ativos, como as cochlioquinonas (JUNG et al., 2003), paecilin B (GUO et al., 2007), curvulina (VARMA et al., 2006), emodina (GUO et al., 2011), 6-epi-3anhydrophiobolina B (SHEN et al., 1999), crisofanol (GUO et al., 2011) e bipolarinona (ARUNPANICHLERT et al., 2012).

As cochlioquinonas são importantes fitotoxinas fúngicas associadas a doenças graves em cereais, são produzidas principalmente por *Bipolaris* spp. e outros gêneros relacionados (PHUWAPRAISIRISAN et al., 2007). Segundo Koyama et al. (2005), apresentam esqueleto terpenóidico, contendo uma benzoquinona em sua estrutura. Grande parte de seus análogos são caracterizadas por um par de derivados do 1-álquil-3,5-di-hidroxifenila com uma unidade farnesil (WANG et al., 2016).

As cochlioquinonas apresentam muitas propriedades biológicas, tais como inibição da atividade sobre a enzima Acil-CoA e da atividade contra colesterol aciltransferase (FUJIOKA et al., 1996), inibição da atividade contra diacilglicerol kinase (MACHIDA; HIGASHI; OGAWARA et al., 1995), atividade fitotóxica (LIM et al., 1996), nematicida (SCHAEFFER et al., 1990), citotóxica (WANG et al., 2016) e antiangiogênica (JUNG et al., 2003). Campos et al. (2017) também demonstrou a ação larvicida dessas substâncias contra Leishmaniose, além de sua atividade antibacteriana e antitumoral. Estes estudos corroboram para a grande aplicabilidade biotecnológica dessas substâncias, considerando os usos biológicos e farmacêuticos.

Os fungos do gênero *Bipolares*, compreendem uma série de espécies que são classificadas como endofíticas em diversas plantas (WANG et al., 2016). O termo endófito ou endofítico está associado a microrganismos que vivem no interior de tecidos e órgãos vegetais sem aparentemente causar danos aos seus hospedeiros (RUDGERS E CLAY, 2007).

As interações entre o endófito e a planta hospedeira, ainda não estão completamente compreendidas, mas acredita-se que possam ser simbióticas, neutras ou antagônicas, podendo variar de um hospedeiro para o outro (CHAPLA; BIASETTO; ARAUJO, 2013). Segundo Lacava, Sebastianes e Azevedo (2004) nas interações simbióticas o crescimento do endófito no interior da planta envolve contínua interação metabólica entre o endófito e o hospedeiro, onde ambos se beneficiam desta associação. Em decorrência dessas interações, os endófitos são capazes de produzir um grande número de substâncias de interesse biotecnológico, com propriedades biológicas ou farmacêuticas, o que os tornaram alvos de muitos estudos nos últimos anos, considerando-os como fontes prolíficas de produtos naturais novos e bioativos (BORGES et al., 2009; PAMPHILE et al., 2018).

Com o objetivo de investigar a biodiversidade endofítica do Cerrado presente no estado do Tocantins, a planta medicinal *Cymbopogon nardus* foi submetida a isolamento de fungos endofíticos, sendo possível o isolamento e identificação de doze endófitos. O extrato bruto AcOEt obtido do fungo endofítico *Bipolaris* sp. apresentou alta atividade toxicológica, este resultado nos levou a investigação química do extrato na busca por metabólitos fúngicos bioativos, onde foi possível o isolamento da Anidrocochlioquinona A.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Isolamento e Identificação Morfológica dos Fungos endofíticos

Os fungos endofíticos foram isolados de folhas saudáveis de *Cymbopogon nardus* L. Rendle (capim citronela) disponível no herbário da UFT Campus de Gurupi, Tocantins. O material vegetal coletado foi submetido a assepsia, com imersão em álcool 70% por 1 minuto, em hipoclorito de sódio 3% por 4 minutos e novamente em álcool 70% por 30 segundos, por fim lavado em água destilada estéril, a fim de eliminar resíduos da solução de hipoclorito de sódio e utilizada como parâmetro de controle da assepsia (LOPES *et al.*, 2017).

Após assepsia, as folhas foram trituradas em 5 mL de solução tampão fosfato de sódio monobásico (pH 7,4) com auxílio de gral e pistilo. O material triturado foi plaqueado em meio sólido batata-dextrose-ágar (PDA), tratado com ampicilina (500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e incubado em incubadora BOD a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 8 dias, seguido de sucessivos repiques até o isolamento das colônias fúngicas.

Para a identificação dos fungos a nível de gênero, foram analisadas culturas puras dos fungos em placa de Petri em meio PDA, foram observadas características morfológicas macroscópicas e microscópicas das colônias, como forma reprodutiva e características celulares das hifas, tomado como referências literaturas da área (HANLIN E MENEZES, 1996; BARNETT E HUNTER, 1998).

### 2.2 Teste de Antagonismo

A avaliação do antagonismo *in vitro* foi realizado em placas de Petri com confronto direto entre o fungo endofítico isolado *Bipolaris* sp. (UFT/MB.J11) contra três fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Curvularia lunata* e *Bipolares oryzae* obtidos do banco de cepas microbianas do Laboratório de Fitopatologia da UFT Campus de Gurupi, Tocantins.

Em placas com meio PDA, foram inoculados em pontos equidistantes da placa 2 discos de micélio-ágar de 6 mm de diâmetro cada, sendo um referente ao fungo endofítico e o outro ao fitopatógeno confrontado, além de testemunhas (controle), onde somente o fitopatógeno foi inoculado. Após inoculação, as placas foram incubadas

em incubadora BOD a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  por 14 dias e avaliadas após as colônias controle ocupassem a placa por completo (LOPES *et al.*, 2017).

### 2.3 Cultivo e Obtenção do Extrato Bruto

O inóculo do fungo *Bipolaris* sp. foi incubado em placa de Petri com meio PDA a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  por 7 dias. Em seguida, o fungo endofítico foi cultivado em Meio líquido PDB (potato dextrose broth) em frascos de Erlenmeyer (500 mL) com 300 mL de meio de cultura. Após inoculação, o cultivo foi mantido em incubadora BOD  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  por 28 dias, sobre suave agitação a cada 72 horas.

Após o período de cultivo, o caldo foi submetido a filtração a vácuo, separando-se o micélio do caldo fermentado. Em seguida o filtrado foi submetido a partição líquido/líquido com acetado de etila (AcOEt por 3 x 250 mL), a fase AcOEt foi concentrada em evaporador rotativo fornecendo o extrato bruto AcOEt.

### 2.4 Isolamento do Composto

O extrato bruto AcOEt (160,7 mg) foi submetido a cromatografia em coluna. O procedimento foi realizado em coluna de vidro (30 x 2,2 cm), utilizando sílica gel e fase móvel com gradiente de 100:0 (hexano:AcOEt) com o aumento da polaridade até a proporção 0:100 (hexano:AcOEt), e por fim uma solução AcOEt:MeOH (1:1 v/v).

As 52 frações obtidas, de aproximadamente 10 mL cada, foram analisadas em cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) em placas de sílica gel 60 F254 (Filter-Bio®), as frações que apresentaram similaridade foram reunidas. A fração 17 (4,8 mg) forneceu a substância **1**, esta foi submetida a análise de ressonância magnética nuclear (RMN, 1D e 2D) em espectrômetro Bruker Avance III HD 600.

### 2.5 Atividade Toxicológica

A atividade toxicológica do extrato bruto AcOEt foi realizada em organismo teste *Artemia salina*, sendo suas condições de eclosão e criação: solução salina de sal marinho a uma concentração de  $38 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , oxigenação contínua pelo período de 24 horas. A solução salina preparada foi utilizada para eclosão dos ovos, criação, condição controle, preparo das soluções e diluições dos extratos brutos avaliados (MEYER *et al.*, 1982).

Foram avaliadas 5 diferentes concentrações do extrato bruto, sendo elas 200, 100, 20, 10 e 5  $\text{mg.L}^{-1}$ , solubilizadas em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) e solução salina (1:1 v/v) e a concentração controle, somente a solução salina. Os ensaios foram conduzidos em triplicada, com 10 organismos por teste e avaliado quanto a letalidade dos microcrustáceos frente as concentrações preparadas no período de 24 horas de exposição.

Foi determinado a dose mínima necessária para a morte de 50% dos organismos

testados ( $DL_{50}$ ) pelo log da concentração dos extratos em função do percentual de organismos mortos, ajustando-se uma equação linear simples em comparação com a concentração controle.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Atividade Antagonista

Foram isolados doze fungos endofíticos originados de partes saudáveis da folha de *Cymbopogon nardus* (capim citronela) e classificados até o nível de gênero após observação dos aspectos macro e micro morfológicos. O fungo codificado como UFT/MB.J11 foi identificado morfológicamente como pertencente ao gênero *Bipolaris* sp. (LOPES et al., 2017).

Os testes realizados através do método *in vitro* revelaram o potencial antagonista do fungo endofítico *Bipolaris* sp., por pareamento direto, contra o fitopatógeno *Fusarium oxysporum*, constatado através da sobreposição das colônias do endófito ou pela formação de um halo de inibição, que reduziram o crescimento micelial do patógeno. O fungo endofítico inibiu 43,3% o crescimento do fitopatógeno após 14 dias de incubação. Para os demais fungos fitopatógenos *Curvularia lunata* e *Bipolaris oryzae* não houve inibição do crescimento significativo pelo endófito (tabela 1).

	Confronto direto			
	7 dias		14 dias	
	Diâmetro da colônia (mm) <sup>1</sup>	PI (%) <sup>2</sup>	Diâmetro da colônia (mm) <sup>1</sup>	PI (%) <sup>2</sup>
Controle <i>Bipolaris oryzae</i>	28,0 a	-	70,0 a	-
<i>Bipolaris</i> sp. (UFT/MB.J11)	25,0 b	10,7	70,0 a	0,0
Controle <i>Curvularia lunata</i>	26,3 a	-	67,3 a	-
<i>Bipolaris</i> sp. (UFT/MB.J11)	26,0 a	1,3	70,0 a	0,0
Controle <i>Fusarium oxysporum</i>	44,0 a	-	50,0 a	-
<i>Bipolaris</i> sp. (UFT/MB.J11)	24,7 b	43,9	28,3 b	43,3

Tabela 1. Média do confronto direto do fungo endofítico *Bipolaris* sp. com os fitopatógenos

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra minúscula, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. <sup>2</sup>PI = Porcentagem de inibição do crescimento micelial.

O potencial antagonista do endófito *Bipolaris* sp. encontrado pode estar relacionado à maior eficiência na competição por espaço e nutrientes ou pela liberação de metabólitos em comparação com o fitopatógeno. Alguns metabólitos secundários produzidos pelo gênero *Bipolaris* demonstraram nas avaliações *in vitro* possuírem atividades antimicrobianas, como substâncias da classe das cochlioquinonas (CAMPOS et al., 2017), crisofanol e emodina (ARUNPANICHLERT et al., 2012), isto sugere que

em muitos casos o endófito é capaz de produzir compostos contra microrganismos fitopatogênicos ajudando o seu hospedeiro a se proteger (GUNATILAKA, 2006; LACAVA; SEBASTIANES; AZEVEDO, 2010).

Os demais endófitos isolados de *C. nardus* foram também submetidos ao ensaio antagonista e várias linhagens demonstraram atividade antagonista como citato por Lopes et al. (2017). A atividade antagonista pode servir de base em futuros ensaios *in vivo* para a utilização destes endófitos no controle biológico de pragas em lavouras.

### 3.2 Identificação de Anidrocochlioquinona A

O fungo endofítico *Bipolaris* sp. foi cultivado em meio PDB durante 28 dias, após este período foi submetido a partição líquido/líquido com acetato de etila para obtenção do extrato bruto AcOEt. O extrato bruto AcOEt foi submetido a cromatografia em coluna e resultou no isolamento de um composto identificado por ressonância magnética nuclear como anidrocochlioquinona A (1) (Figura 1).

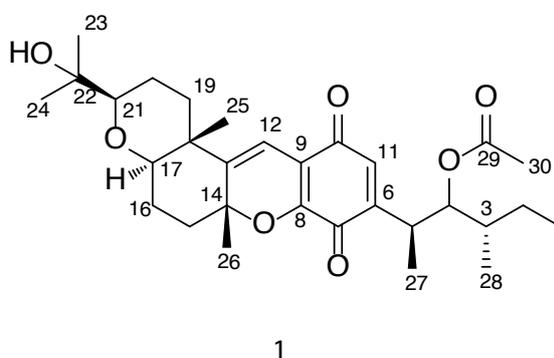


Figura 1: Estrutura da anidrocochlioquinona A

Anidrocochlioquinona A foi isolada como um sólido amorfo de coloração avermelhada. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Tabela 2) apresentou sinais de dois hidrogênios olefínicos ( $\delta_{\text{H}}$  6,53, s, H-11 e 6,31, s, H-12), três hidrogênios oximetínicos ( $\delta_{\text{H}}$  5,01, t, J = 6, H-4; 3,18, m, H-17 e 3,16, m, H-21) e oito grupos metílicos ( $\delta_{\text{H}}$  0,86, H-1; 1,19, s, H-23; 1,18, s, H-24; 1,11, s, H-25; 1,54, s, H-26; 1,13, d, J = 7,2, H-27; 0,86, m, H-28 e 1,96, s, H-30). O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Tabela 2) apresentou dois sinais em  $\delta_{\text{C}}$  185,1 e 181,3 atribuídos a carbonos carbonílicos de quinona. As correlações observadas no espectro de HMBC (Figura 2) do H-11 com C-7 e C-9 juntamente com a do H-12 com C-8 e C-10 confirmaram o esqueleto quinona. O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresentou ainda cinco carbonos oxigenados ( $\delta_{\text{C}}$  72,0; 78,7, 81,2; 81,6; 84,7). Estas informações juntamente com as análises dos espectros de RMN 2D sugeriram se tratar de um composto derivado do esqueleto cochlioquinona.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresentou descolamento químico característico de uma carbonila de éster em  $\delta_{\text{C}}$  170,0 e de uma metila em  $\delta_{\text{C}}$  20,9 que foi atribuída a um resíduo acetato. O resíduo acetato foi conectado ao C-4 devido as correlações em HMBC do H-4 com o C-29, estabelecendo dessa forma a cadeia lateral C-1/C-5.

As correlações observadas em HMBC do H-5 com C-4, C-6, C-7 e C-11 e do H-11 com C-5 estabeleceram a conectividade da cadeia lateral alifática C-1/C-5 ao C-6 da quinona. Com os deslocamentos químicos em  $\delta_c$  110,7 e 149,6 referentes aos carbonos olefínicos em C-12 e C-13 foi possível constatar que se trata da anidrocochlioquinona A. A configuração absoluta do composto **1** foi atribuída comparando os deslocamentos químicos e constantes de acoplamento com os valores encontrados literatura (PHUWAPRAISIRISAN et al., 2007).

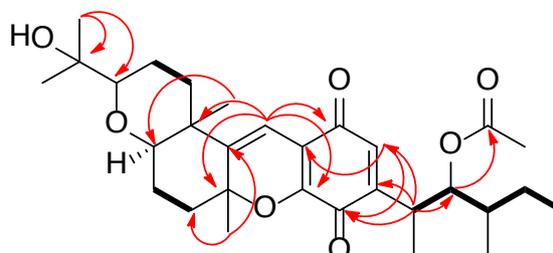


Figura 2: Correlações observadas em HMBC e COSY para a anidrocochlioquinona A

O composto **1** foi a primeira cochlioquinona que possui um resíduo de desidropiranobenzoquinona isolada. A literatura fornece apenas alguns compostos contendo o esqueleto desidropiranobenzoquinonas, que incluem metacromina J e galopiperone (PHUWAPRAISIRISAN et al., 2007). Do ponto de vista biossintético, as cochlioquinonas são formadas pela introdução de uma unidade farnesil em um precursor aromático cujo grupos metil (C-27 e C-28) derivam da metionina. A desidratação de 12-OH em cochlioquinona A resulta na formação da anidrocochlioquinona A (PHUWAPRAISIRISAN et al., 2007).

Posição	Anidrocochlioquinona A ( <b>1</b> )		
	$\delta_c$	$\delta_H$	HMBC
1	11,6	0,86 (m)	C-2, C-3
2	26,5	1,18 (s)	-
3	36,4	1,57 (m)	-
4	78,7	5,01 (t, 6)	C-6, C-29
5	34,2	3,26 (quint, 7,2)	C-4, C-7, C-11, C-27
6	148,7	-	-
7	181,3	-	-
8	149,2	-	-
9	117,2	-	-
10	185,1	-	-
11	132,5	6,53 (s)	C-7, C-9
12	110,7	6,31 (s)	C-8, C-10, C-14, C-18
13	147,6	-	-
14	81,6	-	-

15	37,9	2,30 (dl, 13,8) 2,03 (m)	C-13, C-14
16	24,6	1,70 (dt, 12,6 e 3,0) 1,80 (dd, 13,2 e 3,6)	C-14
17	81,2	3,18 (m)	C-19
18	38,7	-	-
19	34,9	2,10 (m) 1,57 (m)	C-20
20	21,8	1,70 (dt, 12,6 e 3,0) 1,57 (m)	-
21	84,7	3,16 (m)	C-20, C-22
22	72,0	-	-
23	26,2	1,19 (s)	C-21, C-22
24	23,9	1,18 (s)	C-23
25	20,3	1,11 (s)	C-13, C-17, C-19
26	27,1	1,54 (s)	C-13, C-14, C-15
27	17,6	1,13 (d, 7,2)	C-4, C-6
28	13,4	0,86 (m)	C-2, C-3, C-4
29	170,0	-	-
30	20,9	1,96 (s)	C-29

Tabela 2: Dados de RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz para  $^1\text{H}$ , 150 MHz para  $^{13}\text{C}$ ) obtidos para 1

Anidrocochlioquinona A foi descrita por PHUWAPRAISRISAN et al. (2007) como sendo um composto antitumoral por apresentar atividade citotóxica contra células de carcinoma cervical humana (HeLa) ( $\text{CI}_{50}$  de  $5,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Este composto também apresentou alta atividade citotóxica contra células cancerígenas humanas SK-OA-3, com inibição de 85% a uma concentração de  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , e células A549, com inibição de 41% a uma concentração de  $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (ZHOU et al., 2015). Além de apresentar forte atividade na indução de apoptose em células HCT 116 na faixa de 10 a  $30 \mu\text{M}$ , em concentração maiores como  $50 \mu\text{M}$  a atividade foi ainda maior, foi também detectado a ativação da caspase em células cancerígenas HCT 116 (QI et al., 2014).

Nascimento et al. (2015) descreve que a anidrocochlioquinona A apresenta atividade leishmanicida ( $\text{CI}_{50}$  de  $50,53 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Quando o autor compara a atividade deste composto com a atividade obtida para os compostos cochlioquinona A e isocochlioquinona A ( $\text{CI}_{50}$  de  $10,16 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), sugere que a ausência de um átomo de oxigênio (em C-12) em anidrocochlioquinona A possivelmente diminui a atividade leishmanicida, devido ao menor valor de  $\text{CI}_{50}$  encontrado.

### 3.3 Atividade toxicológica do extrato bruto AcOEt

O teste realizado permite a avaliação da toxicidade geral, portanto, é considerado como preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica. Neste estudo determinou-se a toxicidade do extrato bruto AcOEt utilizando o microcrustáceo

*Artemia salina*. A utilização de *A. salina* ocorre pois é uma espécie de fácil manipulação em laboratório e baixo custo econômico. Estudos comprovam a ação tóxica de várias substâncias naturais ao microcrustáceo *A. salina* (LOPES, SILVA, ECHEVARRIA 2016).

Com valores de porcentagem de larvas de *A. salina* mortas, em relação ao aumento da concentração do extrato, foi possível ajustar uma equação linear. A partir da equação foi possível calcular o valor de  $DL_{50}$  para o extrato. O resultado obtido apresentou atividade tóxica significativa, sendo o valor de  $DL_{50}$  de  $3,16 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

A alta atividade toxicológica encontrada para o extrato bruto AcOEt frente ao microcrustáceo *A. salina* pode estar relacionada a presença da anidrocochlioquinona A, uma vez que já foram descritas diversas atividades citotóxicas para esse composto.

#### 4 | CONCLUSÃO

O fungo endofítico *Bipolaris* sp. apresentou atividade antagonista contra o fungo *F. oxysporum*, o que pode estar relacionado à maior eficiência na competição de nutrientes ou à liberação de produtos antimicrobianos.

Foi possível identificar a anidrocochlioquinona A produzido pelo endófito, o qual é descrita como um composto antitumoral, por apresentar diversas atividades contra diferentes linhagens cancerígenas, além de apresentar atividade leishmanicida. A alta atividade toxicológica encontrada para o extrato bruto AcOEt pode estar relacionada a presença da anidrocochlioquinona A, uma vez que já foram descritas atividades citotóxicas para esse composto.

#### 5 | AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento desta pesquisa contou com benefícios do Programa Novos Pesquisadores da UFT (Propesq/UFT). A Anathian G. S. D. Santos, André R. Pinheiro e Jeane C. Lopes pela contribuição no desenvolvimento do trabalho e Juliana C. Holzbach pelos espectros de RMN.

#### REFERENCIAS

ARUNPANICHLERT, J., et al. A dimeric chromanone and a phthalide: Metabolites from the seagrass-derived fungus *Bipolaris* sp. PSU-ES64. **Phytochemistry Letters**, v. 5, n. 3, p. 604-608, 2012.

BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. 1998. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 4. ed. St. Paul, MN. Am. Phytopatol. Soc. Press, 218p.

BERBEE M. L.; PIRSEYEDI M.; HUBBARD S. Cochliobolus phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. **Mycologia**. V.91, p.964–977, 1999.

- BORGES, W. D., et al. Endophytic fungi: natural products, enzymes and biotransformation reactions. **Current Organic Chemistry**, v. 13, p.1137-1163, 2009.
- CAMPOS, F. F. et al. In vitro leishmanicidal, antibacterial and antitumour potential of anhydrocochlioquinone A obtained from the fungus *Cochliobolus* sp. **Journal of Biosciences**, v. 42, n. 4, p. 657–664, 2017.
- CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de Química**, p. 421-437, 2013.
- FUJIOKA, T., et al. Epi-cochlioquinone A, a novel acyl-CoA:cholesterol acyltransferase inhibitor produced by *Stachybotrys bisbyi*. **Journal of Antibiotics** v.49, p. 409-413, 1996.
- GUO, S., et al. Preparative isolation of three anthraquinones from *Rumex japonicus* by high-speed counter-current chromatography. **Molecules**, v. 16, n. 2, p. 1201-1210, 2011.
- GUO, Z., et al. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR signal assignments of Paecilin A and B, two new chromone derivatives from mangrove endophytic fungus *Paecilomyces* sp.(tree 1–7). **Magnetic resonance in chemistry**, v. 45, n. 9, p. 777-780, 2007.
- GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 509-526, 2006.
- HANLIN, R.T.; MENEZES, M. 1996. **Gêneros ilustrados de ascomicetos**. UFRPE, Recife 274p.
- JUNG, H. J. et al. Cochlioquinone A1, a new anti-angiogenic agent from *Bipolaris zeicola*. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 11, n. 22, p. 4743-4747, 2003.
- KOYAMA, N., et al. Stemphones, novel potentiators of imipenem activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, produced by *Aspergillus* sp FKI-2136. **Journal of Antibiotics**, v.58, p. 695-703, 2005.
- LACAVAL, P.T.; SEBASTIANES, F. L.S.; AZEVEDO, J.L. Fungos endofíticos: biodiversidade e aplicações biotecnológicas. 535-569. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2 ed. Caxias do Sul: EDUCS, 2010, p. 533-569.
- LACAVAL, P. T.; SEBASTIANES, F. L. S.; AZEVEDO, J. L. Fungos endofíticos: biodiversidade e aplicações biotecnológicas. In: **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, Cap. 8, 2004.
- LIM, C. H. et al. Cochlioquinol: a new cochlioquinone derivative produced by the plant pathogenic fungus *Bipolaris cynodontis*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.60, p.724-725, 1996.
- LOPES, J. C. et al. Fungos endofíticos isolados do capim citronela e seleção de antagonistas a fitopatogênicos. **Biota Amazônia**, v. 7, n. 3, p. 84-88, 2017.
- LOPES, G.; SILVA, T. M. S.; ECHEVARRIA, A. Atividade Tóxica Frente à *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de Extratos Brutos e Frações Glicoalcaloidais de *Solanum* spp. **Revista Virtual Química**, v. 8, n. 1, p. 141-156, 2016.
- MACHIDA, T.; HIGASHI, K.; OGAWARA, H. Cochlioquinone A, an inhibitor of diacylglycerol kinase. **The Journal of antibiotics**, v. 48, n. 10, p. 1076-1080, 1995.
- MANAMGODA, D. S., et al. The genus bipolaris. **Studies in Mycology**, v. 79, p. 221-288, 2014.

MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medical Plant Research**, v. 45, n.1, p. 31-34, 1982.

NASCIMENTO, A. M. do et al. Antileishmanial activity of compounds produced by endophytic fungi derived from medicinal plant *Vernonia polyanthes* and their potential as source of bioactive substances. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 31, p. 1793–1800, 2015.

PAMPFILE, J. A., et al. Aplicações biotecnológicas de metabólitos secundários Extraídos de fungos endofíticos: o caso do *Colletotrichum* sp. **REVISTA UNINGÁ**, v. 53, 2018.

PHUWAPRAISIRISAN, P. et al. Anhydrocochlioquinone A, a new antitumor compound from *Bipolaris oryzae*. **Tetrahedron letters**, v. 48, n. 30, p. 5193-5195, 2007.

QI, Q. et al. Cochlioquinone Derivatives with Apoptosis-Inducing Effects on HCT116 Colon Cancer Cells from the Phytopathogenic Fungus *Bipolaris luttrellii* L439. **Chemistry & Biodiversity**, v. 11, p. 1892-1899, 2014.

RUDGERS, J. A.; CLAY, K. Endophytic symbiosis with tall fescue: how strong are the impacts on communities and ecosystems?. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, p.107-124. 2007.

SCHAEFFER, J. M., et al. Cochlioquinone-A, a nematocidal agent which competes for specific [h-3] ivermectin binding-sites. **Journal of Antibiotics** v.43, p. 1179-1182, 1990.

SHEN, X. Y., et al. Characterization of 6-epi-3- anhydrophiobolin B from *Cochliobolus heterostrophus*. **Journal of Natural Products** v.62, p.895-897, 1990.

VARMA, G. B., et al. Production of phenylacetic acid derivatives and 4-epiradicinol in culture by *Curvularia lunata*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 17, p. 1925-1930, 2006.

WANG, M. et al. Cytotoxic cochlioquinone derivatives from the endophytic fungus *Bipolaris sorokiniana* derived from *Pogostemon cablin*. **Fitoterapia**, v. 110, p. 77-82, 2016.

ZHOU, L. et al. Chemical constituents of the fungus *Veronaea* sp. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 51, n. 2, p. 270-272, 2015.

## A PODA DO SISTEMA RADICULAR MELHORA A QUALIDADE DAS PLANTAS DE CACAU (*THEOBROMA CACAO* L.; *MALVACEAE*)

**Luana Linhares Negreiro**

Universidade Federal do Pará  
Altamira - PA

**Dheyson Prates da Silva**

Universidade Federal do Pará  
Altamira – PA

**Iselino Nogueira Jardim**

Universidade Federal do Pará  
Altamira – PA

**RESUMO:** O cacau é uma cultura de grande importância socioeconômica mundial. Logo, o sucesso do processo produtivo do cacau depende da produção de mudas de qualidade. As práticas culturais como a poda das raízes também podem contribuir para a produção de mudas com melhores características morfológicas e fisiológicas. Assim, nosso trabalho teve objetivo de avaliar o crescimento e a qualidade das mudas de cacau submetidas à poda do sistema radicular. Mudas de cacau foram produzidas a partir de sementeira em tubetes de 290 cm<sup>2</sup>. Estes foram preenchidos com fibra de coco + palha de arroz carbonizada + terra de subsolo (80:10:10, v:v) acrescidos de 6 g de Osmocote<sup>®</sup> por 1 L de substrato. Aos 120 dias selecionou-se 20 mudas, sendo 10 com raízes podadas (50% do torrão) e mais 10 sem poda. Foram feitas quatro avaliações, com intervalo de 15 dias, obtendo-se os valores para

altura (H, cm) diâmetro do colo (DC, mm), a razão H/DC e número de folhas (NF). Não houve diferença entre a altura média das mudas dos tratamentos. Entretanto, as mudas que tiveram seu sistema radicular podado apresentaram 13.52% de crescimento em relação às mudas sem poda. A média DC das mudas sem poda foram superiores estatisticamente a das mudas com poda. Enquanto, H/DC das mudas podadas foram superiores na terceira e quarta avaliações. Assim, a poda do sistema radicular estimulou o desenvolvimento de *Theobroma cacao*, demonstrando que essa técnica pode ser útil para a manutenção em viveiro das mudas quanto para o transplanto a campo.

**PALAVRAS-CHAVE:** cacau; silvicultura; viveiro; espécie nativa da Amazônia

**ABSTRACT:** Cocoa is a culture of great socioeconomic importance in the world. Therefore, the success of the coffee production process depends on the production of quality seedlings. Cultural practices as one of the roots may also be useful for the production of seedlings with more morphological and physiological characteristics. The production of cocoa seedlings under pruning of the root system. Cocoa seedlings were produced from sowing in 290 cm<sup>2</sup> tubes. These were filled with coconut fiber + charcoal + rice straw + dressing ground (80:10:10, v: v) added with 6 g of Osmocote<sup>®</sup>

per 1 L of substrate. At 120 days, 20 seedlings were selected, 10 with roots pruned (50% of the clod) and 10 without pruning. From 15 days, the values for height (d, cm), the diameter of the neck (DC, mm), an H / DC ratio and number of leaves (NF) were obtained. The average separation of the seedlings from the treatments was not made. However, the seedlings that have their root system are 13.52% growth in relation to the seedlings without pruning. The average DC of pruning seedlings was statistically higher in pruned seedlings. As, H / DC of pruned seedlings were superior in the third and fourth evaluations. Thus, a group of root plants stimulated the development of *Theobroma cacao*, demonstrating that this type of technology may be useful for the maintenance of a system of seedling cultivation in relation to field transplantation.

**KEYWORDS:** cocoa; forestry; nursery; native species of the Amazon

O cacau é uma cultura de grande importância socioeconômica mundial. A semente é a parte do fruto com maior interesse pelas indústrias de alimento e de cosmético. Logo, o sucesso do processo produtivo do cacau depende da produção de mudas de qualidade. Fatores como semente, substrato, recipiente, adubação e manejo em geral, contribuem para essa “qualidade”. As práticas culturais como a poda das raízes também podem contribuir para a produção de mudas com melhores características morfológicas e fisiológicas. Assim, nosso trabalho teve objetivo de avaliar o crescimento e a qualidade das mudas de cacau submetidas à poda do sistema radicular. Mudas de cacau foram produzidas a partir de semente em tubetes de 290 cm<sup>2</sup>. Estes foram preenchidos com fibra de coco + palha de arroz carbonizada + terra de subsolo (80:10:10, v:v) acrescidos de 6 g de Osmocote® por 1 L de substrato. Aos 120 dias selecionou-se 20 mudas, sendo 10 com raízes podadas (50% do torrão) e mais 10 sem poda. E, imediatamente transplantadas para sacos plásticos (16 x 23 cm), contendo a mesma composição do substrato e da adubação usado para a semente. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, constituído por dois tratamentos, muda sem poda e com poda das raízes. Foram feitas quatro avaliações, com intervalo de 15 dias, obtendo-se os valores para altura (H, cm) diâmetro do colo (DC, mm), a razão H/DC e número de folhas (NF). Não houve diferença entre a altura média das mudas dos tratamentos. Entretanto, as mudas que tiveram seu sistema radicular podado apresentaram 13.52% de crescimento em relação às mudas sem poda. A média DC das mudas sem poda foram superiores estatisticamente a das mudas com poda. Enquanto, H/DC das mudas podadas foram superiores na terceira e quarta avaliações. Além disso, o H/DC das mudas podadas apresentou 17% de crescimento em relação às mudas sem poda. Portanto, com base no índice H/DC, as mudas com sistema radicular podado apresentaram melhor qualidade e, portanto, mais indicado para ser levado ao campo. Em relação ao NF, as mudas que sofreram a poda apresentaram maior média na última avaliação, indicando que as mudas apresentaram uma maior plasticidade durante o processo regenerativo do sistema radicular. Assim, a poda do sistema radicular estimulou o desenvolvimento

de *Theobroma cacao*, demonstrando que essa técnica pode ser útil para a manutenção em viveiro das mudas quanto para o transplântio a campo.

## REFERÊNCIAS

FREITAS, S. A. T. et al. **EFEITO DA PODA DE RAIZES SOBRE O CRESCIMENTO DAS MUDAS DE EUCALIPTO**. Ciência Florestal, Santa Maria, v. 19, n. 1, p. 1-6, jan.-mar., 2009.

## 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

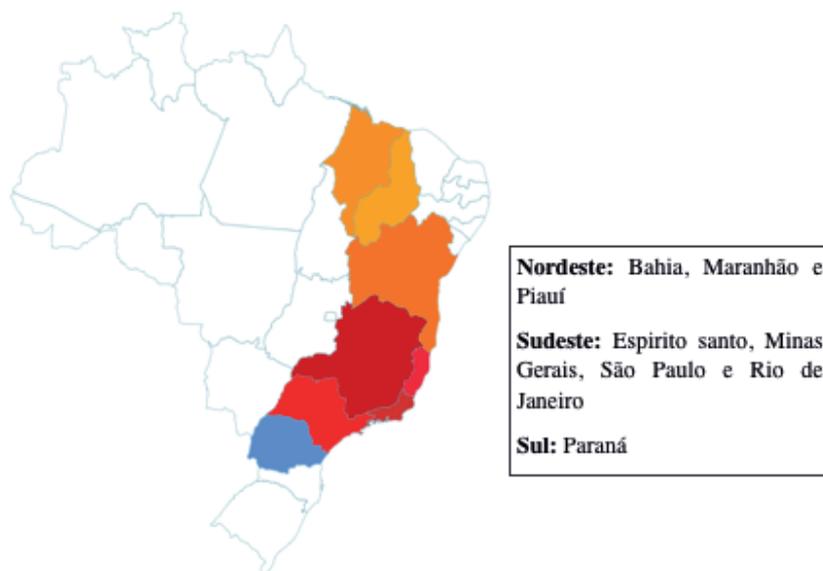
common in the states of the Brazilian Southeast. Previous study of this plant reported the isolation and characterization of coumarins, alkaloids, lignans, dihydrochalcones and steroids from its leaves and stem bark<sup>1</sup> but, so far, there are no reports of biological activities for this species 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  $\beta$ -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.

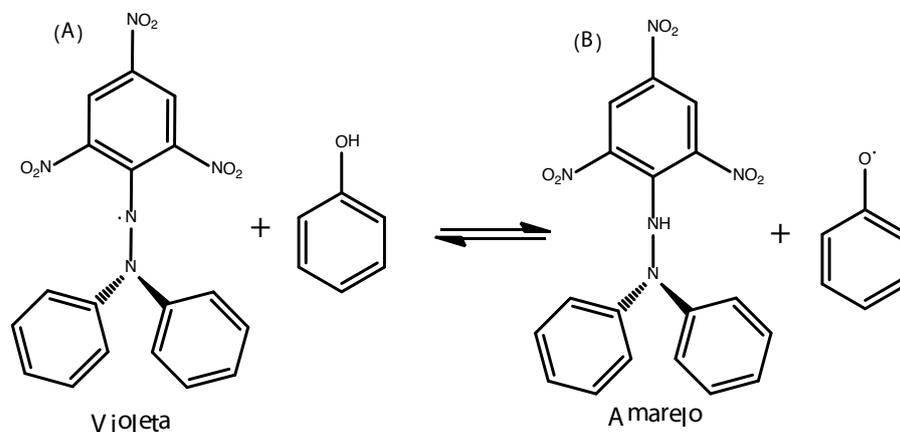
Após evaporação total do solvente e fixação da amostra no papel de filtro, cada placa de petri recebeu 10 sementes de alface (*Lactuca sativa*) e 2,5mL de uma solução contendo H<sub>2</sub>O:DMSO 0,1% a fim de ressuspender a amostra. As placas foram tampadas e acomodadas em uma câmara de crescimento 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<sub>(A)</sub>), 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<sub>(B)</sub>), de coloração amarela.



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

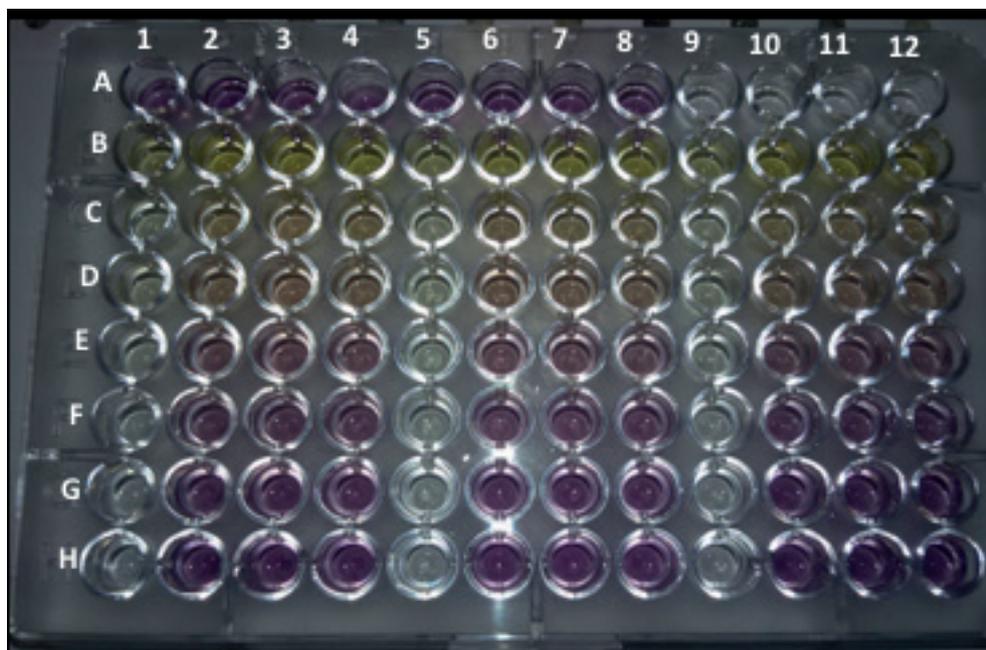
O ensaio se iniciou através da preparação de soluções metanólicas das amostras nas concentrações 700, 350, 280, 140, 70, 28 e 14  $\mu\text{g/mL}$ , que, ao fim das diluições realizadas durante o procedimento, corresponderiam as concentrações de 500, 250, 200, 100, 50, 25 e 5  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

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  $\mu\text{L}$  de metanol e 50  $\mu\text{L}$  da solução de DPPH.
- De A9 até A12 foram pipetados o Branco, contendo apenas 175  $\mu\text{L}$  de metanol.
- Nas colunas 1, 5 e 9 das linhas B até H, foram pipetados o branco da amostra, contendo 125  $\mu\text{L}$  da amostra nas devidas concentrações, e 50  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  das amostras nas devidas concentrações e 50  $\mu\text{L}$  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 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 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 ( $\mu\text{g}$ 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).

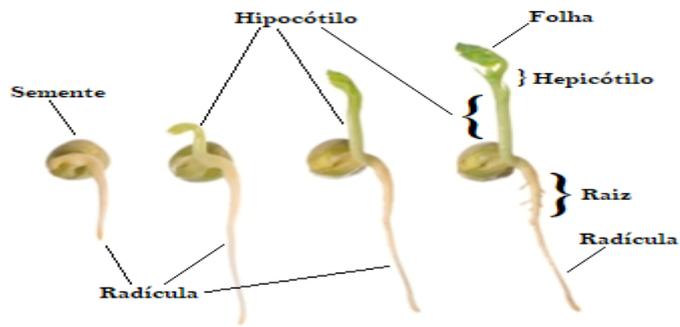
Mais uma vez, a fração acetato de etila foi aquela que obteve melhor resultado, concentrando a maior quantidade de fenólicos, 55,15  $\mu\text{g}$  EAG/mL (Tabela 5, acima). A alta concentração de fenólicos para a fração acetato de etila já era esperada, visto que substâncias fenólicas tendem a possuir 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.

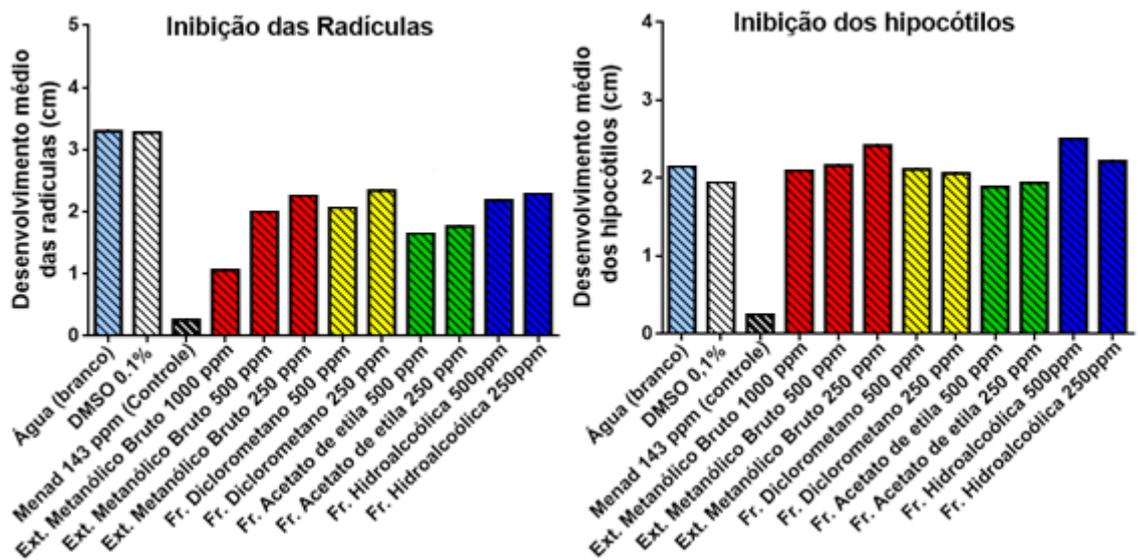


**Figura 4:** Estágios do desenvolvimento de uma semente

Fonte: <https://www.google.com.br/search?biw=1366&bih=651&tbn=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  $\beta$ -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.

## AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO DE COPAÍBA (*COPAIFERA SP.*) COMERCIALIZADO NO MUNICÍPIO DE MARABÁ-PARÁ POR GC-MS

### **Danielle Rodrigues Monteiro da Costa**

Departamento de Ciências Naturais - DCNA  
Universidade do Estado do Pará – Campus  
Marabá

### **Simone Yasue Simote Silva**

Instituto de Ciências Exatas - ICE  
Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará –  
Campus Marabá

### **Sebastião da Cruz Silva**

Instituto de Ciências Exatas - ICE  
Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará –  
Campus Marabá

### **João Marcos Dichtl Oliveira**

Curso de Licenciatura em Ciências Naturais  
Universidade do Estado do Pará – Campus  
Marabá

### **Ianara Viana Vieira**

Curso de Licenciatura em Ciências Naturais  
Universidade do Estado do Pará – Campus  
Marabá

### **Mayra Ellen dos Santos Neres**

Curso de Licenciatura em Ciências Naturais  
Universidade do Estado do Pará – Campus  
Marabá

**RESUMO:** O presente trabalho envolve o estudo referente a composição química dos óleos de copaíba comercializados em feiras livres e farmácias obtidas nos quatros núcleos da cidade de Marabá-PA. As amostras foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada

a espectrometria de massas via Headspace. A partir das análises cromatográficas, observou-se que os óleos de copaíba mostraram uma diferença na composição química. O que leva a sugerir uma possível adulteração nos óleos vendidos nas feiras livres e nas farmácias.

**PALAVRAS-CHAVE:** Copaíba; Cromatografia Gasosa; Marabá.

**ABSTRACT:** This study analyses the chemical composition of Copaiba Oils, commercialized at marketplaces and drugstores in four different locations in Marabá - Pará/Brazil. Gas chromatography attached to mass spectrometry has been used to analyze the samples. It has been observed, from the Chromatographic Analysis, that Copaiba Oils presented a difference in chemical composition; therefore, leading to suggestions of possible adulterations in the oil sold at these places.

**KEYWORDS:** Copaiba; Gas Chromatography; Marabá.

### 1 | INTRODUÇÃO

O Brasil adquiriu um vasto conhecimento na utilização de plantas medicinais e de óleos vegetais para o tratamento de enfermidades, tendo como principal influência para a obtenção deste saber o conhecimento indígena (HECK et

al., 2012). Os produtos naturais a partir de seus efeitos farmacológicos passaram a ser comercializados e terem destaque na economia brasileira, o óleo de copaíba, por exemplo, vem sendo utilizado desde a chegada dos portugueses ao Brasil na medicina tradicional. Sua comercialização é atualmente nacional e internacional, representando um dos produtos naturais da Amazônia empregado em diversas áreas industriais.

O óleo resina conhecido popularmente por óleo de copaíba é constituído de dois grupos de substâncias distintas e solúveis entre si, sendo estas: voláteis e não voláteis (DEUS et al., 2011). As principais substâncias majoritárias dos compostos voláteis (sesquiterpenos) do óleo resina são o  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno e  $\alpha$ -copaeno (SANTIAGO et al., 2014). E na região diterpênica que corresponde à fração não volátil apresentam em sua composição o ácido copálico, ácido agalático, ácido 11-hidroxicopálico, 11-acetoxi-copálico, ácido hardwickiico e o ácido carenóico, entre outros (GIESBRECHT, 2011; SANTIAGO et al., 2014).

O marcador comum no gênero *Copaifera* é o  $\beta$ -cariofileno, que segundo Lucca et al., (2014), Agra (2007; 2008) e Santiago et al., (2014) desencadeia efeitos terapêuticos como: anti-inflamatório, antibacteriano, antifúngico e antiedêmica. Tornando-o um medicamento fitoterápico eficaz no tratamento de doenças para populações de baixa renda, por apresentar custo-benefício oportuno comparado à medicamentos alopáticos vendidos em farmácias (MONTEIRO et al., 2012).

O óleo de copaíba comercializado principalmente em feiras livres e lojas de produtos naturais, podem apresentar diferenças na composição, devido não possuir na maioria das vezes o certificado do controle de qualidade, tendo como consequência, possíveis misturas de outros óleos que alteram sua pureza e influenciam na toxicidade e reações diversas do uso indiscriminado do produto (YAMAGUCHI; GARCIA, 2012). Logo, não se garante que esse produto comercializado para o consumidor, contenha a concentração necessária para que ocorra o efeito terapêutico atribuído por determinado vegetal (MONTEIRO et al., 2012).

Dentre as técnicas utilizadas para avaliar o controle de qualidade de determinado produto, destaca-se o uso da cromatografia gasosa e líquida. A cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massa (CG/EM) permitiu a identificação das substâncias voláteis presentes nas amostras obtidas nas feiras livres e nas farmácias, sendo esse recurso essencial para analisar a composição química do óleo de copaíba.

## 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Família Leguminosae

A família Leguminosae é vista como a terceira maior família de angiospermas, responsável pela grande diversidade em florestas tropicais, ela é composta por 727 gêneros e 19.325 espécies, (FERNANDES e GARCIA, 2008; BORTOLUZZI et al.,

2006), que estão distribuídas em quatro subfamílias: a *Faboideae* (ou *Papilionoideae*), *Caesalpinoideae* (ou *Caesalpinaceae*), *Mimosoideae* (ou *Mimosaceae*) e *Cercideae* (BARBOSA, 2012). No Brasil, esta corresponde ao número de 188 gêneros e 2.100 espécies, passando a pertencer ao grupo das principais famílias que compõe a flora dos diversos ecossistemas (FERNANDES e GARCIA, 2008).

As leguminosas dispõem de uma vasta expansão geográfica, podendo ser encontradas em quase todas as regiões do mundo, desde os picos das serras montanhosas até o litoral arenoso, da floresta tropical úmida, desertos, ambientes aquáticos, dando exceção apenas em regiões árticas, antárticas e algumas ilhas que se apresentam mais distantes da linha do Equador (FERNANDES e GARCIA, 2008; BARBOSA, 2012).

Reconhecidas pelo grande valor econômico e taxonômico, as subfamílias *Caesalpinoideae*, *Mimosoideae* e as *Papilionoideae*, são utilizadas na indústria de móveis, construção civil, medicina popular (BORTOLUZZI et al., 2006). Além de fornecer resinas e óleos de boa qualidade, matéria-prima para fabricação de perfumes, tinturas e fármacos (FERNANDES e GARCIA, 2008).

## 2.2 Gênero *Copaifera*

Pertencente à família *Leguminosae*, subfamília *Caesalpinoideae*, gênero *Copaifera* (YAMAGUCHI, 2012), as ‘copaibeiras’ ou ‘copaíba’ (nome de origem indígena atribuído ao tupi “cupa-yba”), são árvores de grande porte que podem chegar a uma idade de 400 anos, alcançando a uma altura entre 25 e 40 metros (SOUSA, 2011; BIAVATTI et al., 2006). O tronco é áspero e escuro, medindo entre 0,4 e 4 metros de diâmetro (VEIGA-JUNIOR; PINTO, 2002), o mesmo é revestido por uma casca aromática que é considerada como um fator predominante no reconhecimento da planta. “A folhagem é densa de flores pequenas e frutos secos, do tipo vagem, que possuem sementes pretas e ovoides, com um arilo amarelo abundante em lipídeos” (PIERI et al., 2009).

Comuns na América Latina e África Ocidental (PIERI et al., 2009; GELMINI et al., 2012), entre as espécies existentes de copaíba, este gênero reúne 28 espécies válidas, sendo 16 nativas do Brasil, das quais 11 sucedem na Amazônia brasileira: *C. duckei* Dwyer, *C. glycyarpa* Ducke, *C. guianensis* Desf., *C. langsdorffii* Desf., *C. martii* Hayne, *C. multijuga* Hayne, *C. officinalis* (Jacq.) L., *C. paupera* (Herzog) Dwyer, *C. piresii* Ducke, *C. publiflora* Benth. e *C. reticulata* Ducke (BARBOSA, 2012; YAMAGUCHI, 2012).

Segundo Barbosa (2009), as copaibeiras podem se adaptar a variados ambientes, ocorrendo em florestas de terra firme, matas de transição, capoeiras, campos, campinaranas, em áreas alagadas, e/ou nas margens de lagos e igarapés, e até mesmo em dunas. A partir dos 5 anos de idade, em plantios, as mesmas passam a florescer e frutificar de forma adaptada as variações entre os períodos de junho e outubro, dependendo da região e clima ao qual está submetida (VEIGA-JUNIOR;

PINTO, 2002).

A importância destas plantas está ligada diretamente a boa qualidade de sua madeira e à produção de seu óleo-resina, que têm sido utilizados de forma significativa pelas populações tradicionais e indústrias farmacêuticas, por apresentarem uma variedade de propriedades terapêuticas e econômica (VEIGA-JUNIOR; PINTO, 2002).

### 2.3 Óleo-Resina

O óleo de copaíba, como é conhecido popularmente, segundo Gonçalves (2014), provém de canais esquizolízigeos, que são secretores, presentes em todas as partes da árvore, estes canais são formados pela dilatação de espaços intercelulares. O óleo é o produto da deterioração dessas paredes celulares do tronco das árvores de copaíba, “onde os canais longitudinais, distribuídos em faixas concêntricas, nas camadas de crescimento demarcadas pelo parênquima terminal, reúnem-se com um traçado irregular, em camadas lenhosas, muitas vezes sem se comunicarem” (VEIGA-JUNIOR; PINTO, 2002).

Biologicamente o óleo-resina é liberado como produto da excreção e/ou desintoxicação do organismo vegetal, que funciona como um escudo de proteção contra animais, fungos e bactérias (GONÇALVES, 2014).

Sendo classificado quanto a sua coloração, turbidez e viscosidade, o óleo possui características físicas que variam de transparente a opaco, mais ou menos viscoso, de coloração que vai do amarelo ao vermelho, chegando a ser encontrado também incolor, possui sabor amargo e odor aromático característico (SIGNORI; CORREA, 2015).

Signori e Correa (2015) afirma que, o mesmo é parcialmente solúvel em álcool e insolúvel em água. Quando é exposto ao ar, o óleo-resina passa a possuir uma coloração mais escura e se torna mais viscoso, mas estes requisitos não influenciam na ampla busca pelas indústrias farmacêuticas e de cosméticos.

A produção do óleo das copaibeiras varia de uma árvore para outra, segundo Alencar (1982) ainda não há conhecimento dos fatores que determinam, exceto as considerações relevantes as fontes de variações, como: condições ambientais do local de crescimento e desenvolvimento das árvores, características genéticas e sazonalidade, sugerindo assim que o potencial econômico deste recurso é limitado, mesmo quando o modo de exploração siga um plano de manejo.

O processo de extração é realizado através de uma pequena abertura feita no tronco da árvore, onde é inserido um cano que conduz o óleo para o exterior (YAMAGUCHI, 2012). Este método é o mais utilizado na atualidade, pois o mesmo é considerado sustentável, por permitir a veda após a retirada do óleo-resina, visando futuras extrações (MEDEIROS, 2006).

### 2.4 Composição Química do Óleo-Resina

O óleo-resina do gênero *Copaifera*, quimicamente, é composto pela fração

de ácidos diterpênicos e sesquiterpênicos (CASCON; GILBERT, 2000). Os ácidos diterpênicos ou resinosos, segundo Faria (2014), são a parte que compõe a fração resinosa, sólida, não volátil, insolúvel em água, a qual se encontra diluída em compostos voláteis (sesquiterpenos oxigenados e hidrocarbonetos), que podem ser extraídos por hidrodestilação e dispõem de aromas marcantes, sendo principalmente utilizados pelas indústrias de perfumarias.

Encontrados com frequência no óleo-resina de copaíba, estão os sesquiterpenos que são: o  $\beta$ -cariofileno;  $\alpha$ -copaeno;  $\alpha$ -cubebeno;  $\alpha$ -humuleno;  $\beta$ - bisaboleno;  $\alpha$  e  $\beta$  selineno;  $\alpha$ -bisabolol;  $\beta$ -elemeno;  $\delta$ -cadineno,  $\sigma$ -cadineno, cadinol, entre outros compostos não identificados (SOUSA, 2011; FARIA, 2014). Os diterpenos mais representativos são: o ácido copálico, ácido hardwíckiico, ácido caurenóico e ácido colavênico (VEIGA; PINTO, 2002).

O ácido copálico, segundo Faria (2014); Veiga-Junior, Pinto (2002), é o componente químico que em todos os óleo-resinas estudados até hoje, o mesmo se encontra presente, tal razão sugere que seja utilizado como marcador químico dessa matéria prima vegetal. Porém, não pode ser considerado confiável, pois em alguns estudos algumas espécies analisadas apresentaram apenas traços deste componente, afirma Faria (2014).

## 2.5 Controle de Qualidade

Segundo Alencar (1982), a copaíba possui grande importância, em virtude de ser produtora de óleo-resina, que é retirado do seu tronco. O mesmo pode ser encontrado frequentemente em mercados livres e comercializado para os mercados nacional e internacional (ALENCAR, 1982).

Biavatti et al., (2006) afirma que, a deficiência de estudos químicos que visam à caracterização do óleo de copaíba, aliada à versatilidade natural inseparável a esta matéria-prima e à progressiva demanda do mercado por medicamentos fitoterápicos, podendo comprometer a efetividade e a autenticidade dos produtos que contém óleo de copaíba. Inclusivamente, Biavatti et al., (2006) diz que, “não há como garantir de maneira direta a identidade botânica da copaibeira, já que o óleo vem sendo obtido na maioria das vezes via extrativismo sustentável e, simultaneamente, de várias espécies de *Copaifera*”.

Gonçalves (2014) em suas pesquisas afirma que, “apesar de vários estudos demonstrarem a atividade farmacológica do óleo de copaíba e sua indicação para o tratamento de várias afecções, são poucos os estudos avaliando a segurança do seu uso pela população”. Pois, a ausência de parâmetros definitivos para a caracterização e realização do controle de qualidade do óleo resina é um dos principais obstáculos para a ocorrência de registro e exportação de produtos fitoterápicos contendo este insumo (BIAVATTI et al., 2006).

Porém, diversos trabalhos analíticos recentes têm sido realizados buscando a

padronização do perfil químico desta matéria-prima, mesmo em meio à variabilidade natural da espécie *Copaifera*, sendo que a cromatografia gasosa a técnica mais empregada (BIAVATTI et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2006).

### **3 | PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS**

#### **3.1 Coleta da Amostra**

A amostra do óleo-resina de *Copaifera* foi coletada na proximidade do município de Marabá-PA, em julho de 2017, na fazenda Cedro (5°40'35.0"S 49°16'34.2"W), utilizando com critérios de seleção árvores intactas, ou seja, sem ocorrência de perfurações anteriores para extração do óleo-resina, se havia a existência de deformações na casca da árvore, o tipo de solo em que a árvore se encontrava como também, se tinha infestação por cupins.

#### **3.2 Extração do Óleo-Resina**

Para obtenção do mesmo, foi usado trado manual de 7/8 polegadas de diâmetro e 1,0 metro de comprimento. A árvore foi perfurada a altura de 1 metro do chão (20 a 50 cm de profundidade no tronco, de acordo com seu diâmetro), com pequeno declive para o escoamento do óleo. Um tubo de PVC 3/4 polegadas foi colocado bem ajustado no orifício, e no outro extremo do tubo foi colocado frasco de vidro âmbar de 1L. Após a colheita o furo foi tampado com uma espécie de rolha de madeira, pois este método preserva a árvore para futuras colheitas e é ecologicamente correto (DEUS et al., 2011).

#### **3.3 Obtenção de Amostras Comercializadas**

Foram selecionadas 4 feiras livres e farmácias dos quatro núcleos do município de Marabá-PA (Nova Marabá, Cidade Nova, Velha Marabá e Morada Nova) que comercializam o óleo, onde foi adquirido 2 mostras de lotes distintos de cada comerciante (duas amostras comerciais de feiras livres e duas amostras de farmácias), totalizando 16 amostras.

#### **3.4 Levantamentos Quanto a Origem do Óleo de Copaíba**

Os vendedores foram entrevistados por meio de questionário contendo 5 perguntas discursivas para obtenção de dados do produto comercializado, como também, foram convidados a assinar o termo de consentimento livre e esclarecido, permitindo as divulgações das informações.

#### **3.5 Análise Química da Fração Volátil do Óleo-Resina de *Copaifera* Sp.**

As amostras foram analisadas no Laboratório de Análises Química da Universidade

Federal do Sul e Sudeste do Pará, através do Cromatógrafo gasoso Shimadzu, modelo QP2010 equipado com um mostrador automático AOC-5000, que consiste em uma porta de injetor dividido: splitless/split e um detector de espectrometria de massas.

A injeção foi no modo splitless. A coluna utilizada foi Rtx-5MS e tendo o Hélio como gás de arraste. A temperatura do forno foi programada a partir de 60°C durante 3 minutos, com um aumento de 40°C/minuto, até atingir a temperatura de 300°C, finalizando a corrida cromatográfica em 9 minutos.

Neste processo, utilizou-se o Injetor linha de transferência (Interface), e as temperaturas de origem foram fixadas em 220°C, 300°C e 150°C, respectivamente. O detector de massa foi operado com o sistema de impacto de elétron a 70 Ev e o sinal gravado e processado com software de Análise de Dados (GC-MS) (LUCCA et al., 2015).

#### 4 | RESULTADOS E DISCUSSÕES

A partir da análise dos questionários direcionados aos feirantes, foi possível concluir que o óleo comercializado nos estabelecimentos possui uma origem desconhecida. Isso, por não apresentarem certeza e/ou simplesmente não se ter conhecimento de qual localidade é extraído o óleo de copaíba e, além disso, há falta de conhecimento dos vendedores em relação ao período de abundância do óleo e suas funções terapêuticas. Em relação à garantia de qualidade do produto, segundo os feirantes, não há fiscalização que garanta um controle de qualidade e, desse modo, a única garantia é a credibilidade na palavra dos comerciantes.

Dessa forma, o óleo de copaíba comercializado, principalmente em feiras livres e lojas de produtos naturais, podem apresentar diferenças na composição, devido não possuir na maioria das vezes o certificado do controle de qualidade, tendo como consequência, às vezes misturas de outros óleos que alteram sua pureza e influenciam na toxicidade e reações diversas do uso indiscriminado do produto (YAMAGUCHI; GARCIA, 2012). Devido isto, não se garante que esse produto comercializado para o consumidor, contenha a concentração necessária para que ocorra o efeito terapêutico atribuído por determinado vegetal (MONTEIRO et al, 2012).

Constatou-se também que o conhecimento dos comerciantes de feira livre e lojas de produtos naturais em relação a forma de armazenamento do óleo de copaíba é superficial, o que leva a possíveis modificações na composição química do óleo, pois de acordo com Veiga J.; Pinto, (2002) o óleo de copaíba deve ser armazenado em frasco escuro para que se evite a oxidação das substâncias.

A partir do perfil cromatográfico por CG/MS das amostras de óleo-resina de copaíba, foi possível analisar a composição química das amostras comercializadas. Na injeção das amostras adquiridas nas feiras, através do método de Lucca et al, (2015), obteve-se uma padronização na composição química do perfil cromatográfico frente

aos compostos: Cyclohexane; Bergamotene <math>\alpha</math>- , cis->; 14-Benzocycloheptene;  $\beta$  – humulene; Bisabolene <math>(Z)</math>- ,  $\alpha</math>->; Caryophyllene alcohol; Cyclosativene; Caryolan – 8 – ol; Cubelene <math>\alpha</math>->;  $\alpha$  – copaene;  $\alpha$  – Muurolene; Amorphene <math>\delta</math>->; Amorpha -4,11- diene; Benzocycloheptene. Como mostra o cromatograma abaixo:$

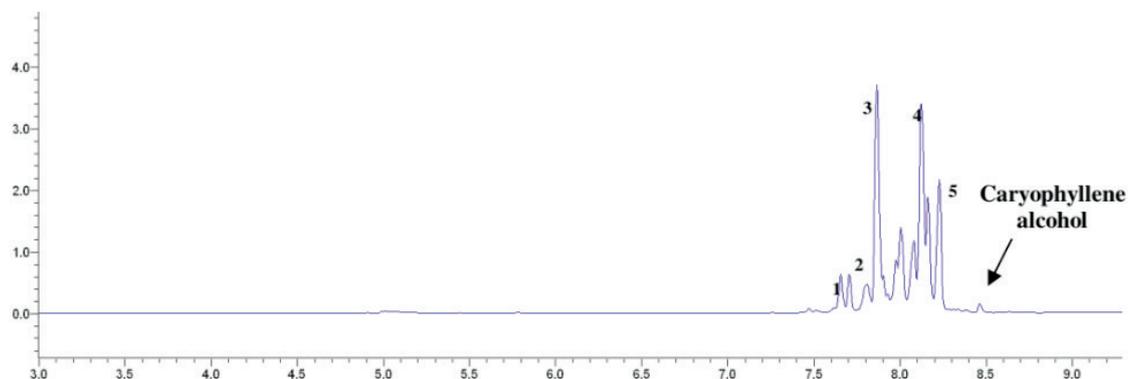


Figura 1. Perfil cromatográfico da amostra A2 (feira) do óleo de copaíba obtida por GC-MS indicando a presença de: Cyclosativene(1), Cyclohexane(2), Bergamotene <math>\alpha</math>- , cis->(3), Bisabolene <math>(Z)</math>- ,  $\alpha</math>->(4), Caryolan – 8 – ol(5) e a seta indicando o Caryophyllene <math>\beta</math>- em baixa concentração.$

Nos espectros de massas dos compostos, foram identificadas em maior proporção as seguintes substâncias: Bisabolene <math>(Z)</math>- ,  $\alpha</math>->; Bergamotene <math>\alpha</math>- , cis->; Amorpha – 4,11- diene e  $\alpha$  – copanene, tendo como majoritárias o Bisabolene<math>(Z)</math>- ,  $\alpha</math>-> e o Bergamotene<math>\alpha</math>- , cis->.$$

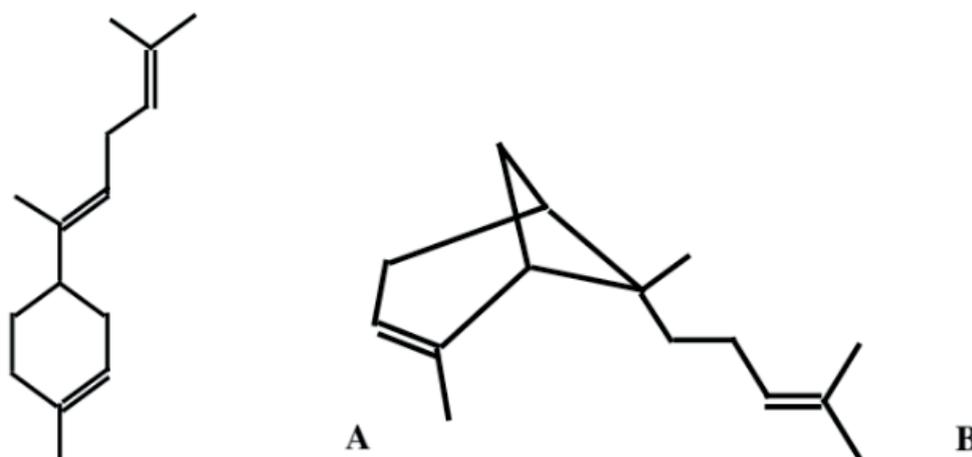


Figura 2. Estrutura das substâncias majoritárias do perfil cromatográfico da amostra A2 do óleo de copaíba. Substância (A): Bisabolene<math>(Z)</math>- ,  $\alpha</math>->; (B): Bergamotene<math>\alpha</math>- , cis->.$

Ao analisar os perfis cromatográficos dos óleos de copaíba, foi possível observar uma baixa concentração do  $\beta$ -cariofileno em todas as amostras comercializadas em feiras, em algumas o mesmo nem se apresentou na composição química do óleo, Veiga J.; Pinto, (2002) em seus estudos relaciona este fato a:

Variação na composição dos óleos em função de fatores bióticos externos, tais como a injúria provocada por insetos ou fungos. Um exemplo seria a produção de  $\beta$ -cariofileno, que é particularmente efetivo contra lepidópteros, e de seu óxido, que atua diretamente na inibição de fungos. As variações na composição sesquiterpênica dos óleos, porém, são muito grandes, descritas durante a maturação, ocorrendo sazonalmente em uma árvore, numa mesma espécie e entre espécies (VEIGA J.; PINTO, 2002)

Nas amostras adquiridas em farmácias, foi possível observar um padrão na composição química, através das análises dos perfis cromatográficos, mesmo apresentando lotes distintos, conforme a tabela 1. Ao contrário das amostras obtidas na feira, as amostras da farmácia possuem uma maior proporção de Caryophyllene . Como mostra o cromatograma da Amostra A4, figura 3.

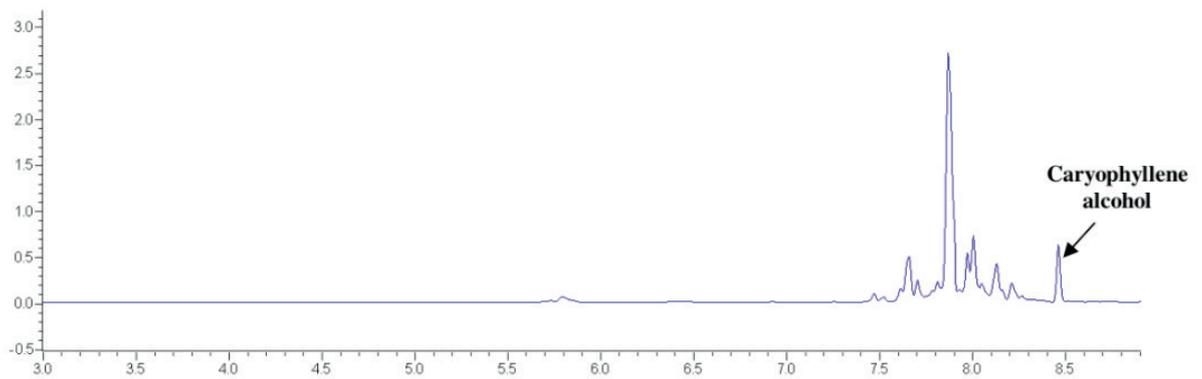


Figura 3. Perfil cromatográfico da Amostra A4, apresentando maior concentração de Caryophyllene.

Substância	Tempo de Retenção (RT)
Elemene <delta->	7.470
Alpha – Copaene	7.655
Copaene	7.660
Cyclohexane,1-ethenyl-1-methyl-2,4-bis(1-methylethenyl)-, [1S-(1.alpha.,2.beta.,4.beta.)]	7.700
Bicyclo [5.2.0]nonane, 2-methylene-4,8,8-trimethyl-4-vinyl	7.875
Amorphene <delta->	8.125
Alpha – Muurolene	8.130
Caryophyllene alcohol	8.460

Tabela 1. Substâncias presentes nas amostras de farmácias com os seus tempos de retenção.

Vale ressaltar, que mesmo apresentando uma concentração significativa nas amostras, o Caryophyllene não era a substância majoritária, mas sim o composto Bicyclo[5.2.0]nonane, 2-methylene-4,8,8-trimethyl-4-vinyl, que possui fórmula estrutural:

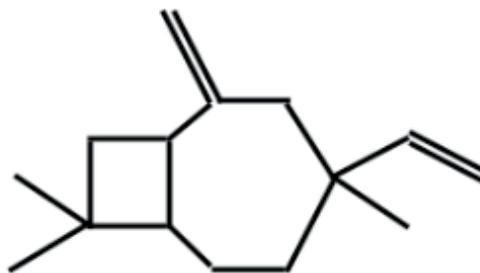


Figura 4. Fórmula estrutural do Bicyclo [5.2.0]nonane, 2-methylene-4,8,8-trimethyl-4-vinyl.

Mediante isso, frente os dados apresentados, é possível visualizar uma possível diferenciação quanto aos perfis cromatográficos dos óleos de copaíba vendidos em feiras livres em relação os comercializados em farmácias, apesar de apresentarem os mesmos constituintes químicos. Contudo, observou-se que os perfis cromatográficos das amostras de farmácias, quando comparadas entre si, possuem o mesmo perfil.

Entretanto, os óleos de copaíba comercializados em feiras livres, ao serem analisados, verificou-se uma variação das concentrações e de substâncias que compõe a fração volátil de algumas amostras, este fato pode estar relacionado a diversificação de espécies do gênero *copaifera* e a sazonalidade que é um dos fatores importantes para a determinação da composição química do óleo-resina de copaíba (BIAVATTI et al., 2006).

Ressalta-se que foi constatada nas amostras de farmácias a presença da substância Caryophyllene.

## 5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

A comercialização de produtos naturais apresenta **déficit em** relação aos cuidados exigidos. Dessa maneira, a forma como os produtos são vendidos, com a ausência de dados que comprovem sua veracidade, pode acarretar problemas patológicos para os consumidores.

Contudo, tanto os consumidores quanto os feirantes de plantas medicinais acreditam que estes remédios, por serem de origem natural não oferecem riscos. Entretanto, o óleo de copaíba vendido é coletado de várias árvores que podem ser de espécies distintas que conseqüentemente altera a eficiência deste fitoterápico. Ao analisar as amostras no cromatógrafo gasoso, verificou-se uma diferença de composição entre os óleos comercializados em feiras e as de farmácias, percebendo que os picos dos constituintes das amostras da farmácia permanecem inalterados que, por meio disto, é possível estabelecer um padrão cromatográfico.

Quanto as amostras das feiras a dificuldade de analisar os picos das substâncias pode está relacionada as impurezas contidas nestes, que pode ser atribuída a maneira incorreta de armazenamento, extração do óleo, entre outros fatores que podem

comprometer sua qualidade.

## REFERÊNCIAS

AGRA, M. F. et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosi*, João Pessoa, v. 18, n. 3, p. 472 - 508, jul./set. 2008. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-695X2008000300023](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2008000300023)>. Acesso em: 29 de nov. 2017.

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; FILHO, J. M. B. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosi*, João Pessoa, v. 17, n. 1, p. 114-140, jan./mar. 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v17n1/a21v17n1.pdf>>. Acesso em: 29 de nov. 2017.

ALENCAR, J. C. Estudos silviculturais de uma população natural de *Copaifera multijuga* Hayne – Leguminosae, na Amazônia Central. 2- Produção de óleo-resina. *Acta Amazônica*, Manaus, vol. 12, n. 1, p. 255-279, 1982. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/aa/v12n1/18094392-aa-12-1-0075.pdf>>. Acesso em: 29 de nov. 2017.

BARBOSA, P. C. S. Padronização de óleos de *Copaifera multijuga* hayne por meio de técnicas cromatográficas. 2012. 135 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2012. Disponível em: <<http://tede.ufam.edu.br/handle/tede/3340?mode=full>>. Acesso em: 15 de jun. 2017.

BARBOSA, K.S.; SCUDELLER, V.V.; ROSA, A.L. Potencial de produção de óleo resina de *Copaifera multijuga* Hayne nos dois períodos climáticos amazônicos na Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Tupé, Manaus-AM. *Diversidade Biológica*. Manaus, V.2, 2009. Disponível em: <<http://biotupe.org/livro/vol2/pdf/Capitulo%2012%20%20Copaiba1.pdf>>. Acesso em: 30/ de nov. 2017>. Acesso em: 12 de out. 2017.

BIAVATTI, M. W. et al. Análise de óleos-resinas de copaíba: contribuição para o seu controle de qualidade. *Revista Brasileira de Farmacognosi*, v. 16, n. 2, p. 230-235, abr./jun. 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v16n2/v16n2a17>>. Acesso em: 29 de nov. 2017.

BORTOLUZZI, R. L. C.; MIOTTTO, S. T. S.; REIS, A. LEGUMINOSAS-CESALPINIOÍDEAS. v. 2. Santa Catarina: ADEMIR REIS, 2006. Disponível em: <[http://www.hbr.org.br/fic/HBR\\_0601.pdf](http://www.hbr.org.br/fic/HBR_0601.pdf)>. Acesso em: 04 de fev. 2017.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC no 26 de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Brasília: Diário oficial da União, n. 90, p. 5261, 2014.

CASCON, V.; GILBERT, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. *Phytochemistry*, Rio de Janeiro, v. 55, n. 7, p. 773 – 778, 2000. Doi: <[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00284-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00284-3)>. Acesso em: 25 de mar. de 2017.

DEUS, R.J.A.; ALVES, C.N.; ARRUDA, M.S.P. Avaliação do efeito antifúngico do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, v. 13, n. 1, p. 1-7, 2011. Doi: <<http://dx.doi.org/10.1590/S151605722011000100001>>. Acesso em: 12 de jan. 2017.

FARIA, M. J. M. de. J. M. Oleorresina de *Copaifera* spp.: caracterização, verificação da atividade antimicrobiana in vitro e avaliação preliminar de uma formulação em vacas leiteiras com mastite. 2014. 150 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014. Disponível em: <<https://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/3939>>. Acesso em: 26 de mar. 2017.

FERNANDES, J. M.; GARCIA, F. C. P. LEGUMINOSAE EM DOIS FRAGMENTOS DE FLORESTA ESTACIONAL SEMIDECIDUAL EM ARAPONGA, MINAS GERAIS, BRASIL: ARBUSTOS, SUBARBUSTOS E TREPADERAS. *Rodriguesia*, v. 59, n. 3, p. 525-546, 2008. Disponível em: <[https://rodriguesia.jbrj.gov.br/FASCICULOS/rodrig59\\_3/009.pdf](https://rodriguesia.jbrj.gov.br/FASCICULOS/rodrig59_3/009.pdf)>. Acesso em: 12 fev. de 2017.

GELMINI, F. et al. GC-MS profiling of the phytochemical constituents of the oleoresin from *Copaifera langsdorffii* Desf. and a preliminary in vivo evaluation of its antipsoriatic effect. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 440, n. 2, p. 170-178, jan. 2013. Doi: <doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.08.021.>. Acesso em: 22 de jan. 2017.

GIESBRECHT, P. C. P. Efeitos da Pomada de Óleo de Copaíba em Queimadura Cutânea em Rato. 2011. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Centro Universitário Vila Velha, Vila Velha, 2011. Disponível em: <[https://www.uvv.br/edital\\_doc/DISSERTA%C3%87%C3%83O%20FINAL%20DE%20PATR%C3%8DIA%20CALDEIRA%20PENNA%20GIESBRESHT\\_fe4dc2f1-d122-4610-b306-23882cbbf055.pdf](https://www.uvv.br/edital_doc/DISSERTA%C3%87%C3%83O%20FINAL%20DE%20PATR%C3%8DIA%20CALDEIRA%20PENNA%20GIESBRESHT_fe4dc2f1-d122-4610-b306-23882cbbf055.pdf)>. Acesso em: 13 de jan. de 2017.

GONÇALVES, E. da S. Avaliação da segurança de uso do óleo de *Copaifera multijuga* Hayne (Fabaceae). 2014. 140 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014. Disponível em: <<http://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/11946>>. Acesso em: 20 de jun. de 2017.

HECK, M. C.; VIANA, L. Á.; VICENTINI, V. E. P. Importância do Óleo de *Copaifera* sp. (COPAÍBA). *SaBios: Revista Saúde e Biologia*, Maringá, v. 7, n. 1, p. 82-90, jan./abr. 2012. Disponível em: <<http://revista.grupointegrado.br/revista/index.php/sabios2/article/view/992/413>>. Acesso em: 24 de ago. 2017.

JUNIOR, V. F. V.; PINTO, A. C. O GÊNERO *Copaifera* L. *Quim. Nova*, v. 25, n. 2, p. 273-286, 2002. Doi: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422002000200016>>. Acesso em: 11 de mar. de 2017.

LUCCA, Letícia G. et al. Determination of  $\beta$ -caryophyllene skin permeation/retention from crude copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne) and respective oil-based nanoemulsion using a novel HS-GC/MS method. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, v. 104, p. 144-148, 2015.

MEDEIROS, R. da S. Sustentabilidade de Extração, Produção e Características Químicas do óleo-resina de Copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) em Manaus. 2006. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Florestas Tropicais) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2006. Disponível em: <[http://btd.inpa.gov.br/bitstream/tede/1127/1/Dissertacao\\_Raquel\\_Medeiros.pdf](http://btd.inpa.gov.br/bitstream/tede/1127/1/Dissertacao_Raquel_Medeiros.pdf)>. Acesso em: 04 de abr. de 2017.

MONTEIRO, M. M.; MONTEIRO, M. J. S.; BARBOSA, W. L. R. Saber e uso de Plantas Medicinais em Marudá e na APA Algodual - Maiandeuá. In: ENCONTRO NACIONAL DA ANPPAS, 6., 2012, Belém. Anais... Belém: ANPPAS, 2012. p. 1-16. Disponível em: <<http://www.anppas.org.br/encontro6/anais/ARQUIVOS/GT5-853-597-20120714172948.pdf>>. Acesso em: 05 de out. de 2017.

OLIVEIRA, E.C.P.; LAMEIRA, O.A.; ZOGHBI, M.G.B. Identificação da época de coleta do óleo-resina de copaíba (*Copaifera* spp.) no município de Moju, PA. *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu*, v. 8, n. 3, p. 14-23, 2006. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes//publicacao/578061/identificacao-da-epoca-de-coleta-do-oleo-resina-de-copaiba-copaiferasp-no-municipio-de-moju-pa>>. Acesso em: 20 de ago. de 2017.

PIERI, F.A.; MUSSI, M.C.; MOREIRA, M.A.S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. *Revista Brasileira Plantas Mediciniais*, Botucatu, v. 11, n. 4, p. 465-472, 2009. Doi: <<http://dx.doi.org/10.1590/S151605722009000400016>>. Acesso em: 28 de jun. de 2017.

SANTIAGO, K. B. Immunomodulatory action of *Copaifera* spp oleoresins on cytokine production by human monocytes. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 70, p. 12-18, 2015. Doi: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2014.12.035>>. Acesso em: 15 de jan. de 2017.

SIGNORI, J. V. F. Atividade antimicrobiana e identificação de compostos de plantas medicinais de uso popular. Revista de Trabalhos Acadêmicos da FAM: TCC 2015, Americana, v. 1, n. 1, nov. 2015. Disponível em: <<http://faculdadedeamericana.com.br/revista/index.php/TCC/article/view/115/115>>. Acesso em: 30 mar. 2017.

SOUSA, J. P. B. de. *Copaifera langsdorffii*: estudo fitoquímico, validação de métodos cromatográficos e análise sazonal. 2011. 167 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2011. Doi: 10.11606/T.60.2011.tde02052011-102744.

YAMAGUCHI, M. H.; GARCIA, R. F. Óleo de Copaíba e suas Propriedades Mediciniais: Revisão Bibliográfica. Revista Saúde e Pesquisa, Maringá, v. 5, n. 1, p. 137-146, jan./abr. 2012. Disponível em: <<http://periodicos.unicesumar.edu.br/index.php/saudpesq/article/view/2082/1563>>. Acesso em: 16 de jun. de 2017.

## 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

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

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

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)<sup>type</sup> : “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 saudáveis 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  $\mu$ L da solução  $ABTS^{\bullet+}$  foram adicionados a 40  $\mu$ L de solução etanólica do extrato bruto em diferentes concentrações (500,0, 250,0, 125,0, 62,50, 31,25 e 15,63  $\mu$ 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  $\mu$ L da solução de DPPH• foram adicionados a 100  $\mu$ L de solução metanólica do extrato bruto em diferentes concentrações (500,0, 250,0, 125,0, 62,50, 31,25 e 15,63  $\mu$ 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  $2 \times 10^5$  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 ( $2 \times 10^5$  células/mL) em cada poço e mantidas a  $37^\circ\text{C}$  em atmosfera úmida, na presença de 5% de  $\text{CO}_2$ . 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  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$  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.

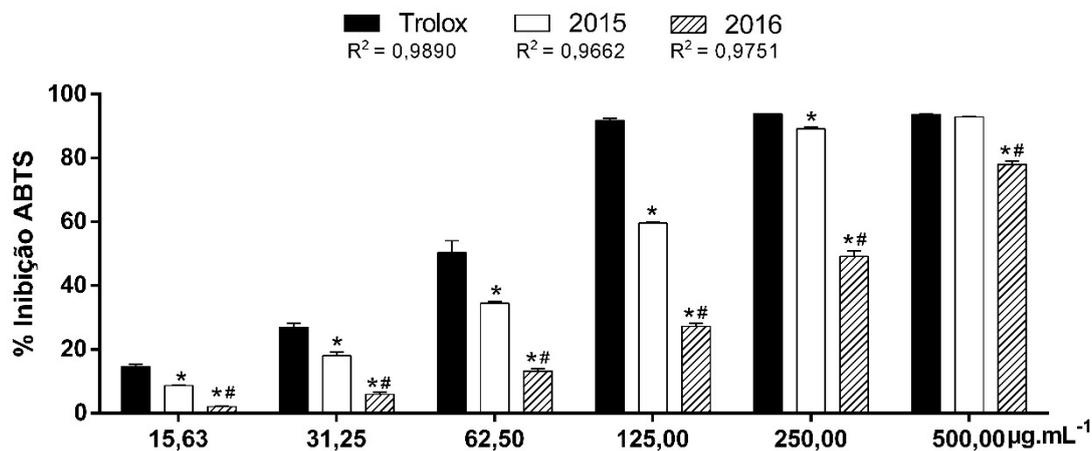


Figura 1. Inibição do radical ABTS por *Bauhinia* sp. a partir de extratos obtidos das folhas coletadas em estação seca e chuvosa.

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.

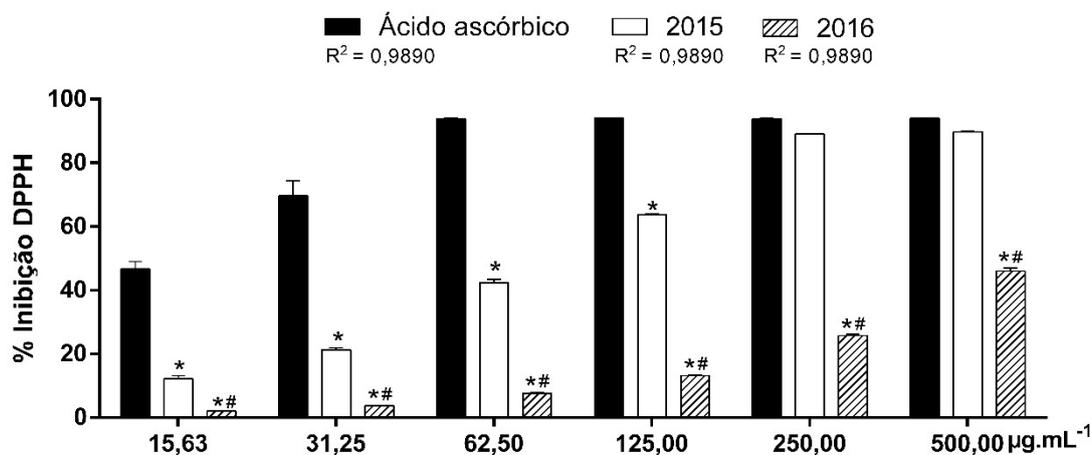


Figura 2. Inibição do radical DPPH por *Bauhinia* sp. a partir de extratos obtidos das folhas coletadas em estação seca e chuvosa.

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

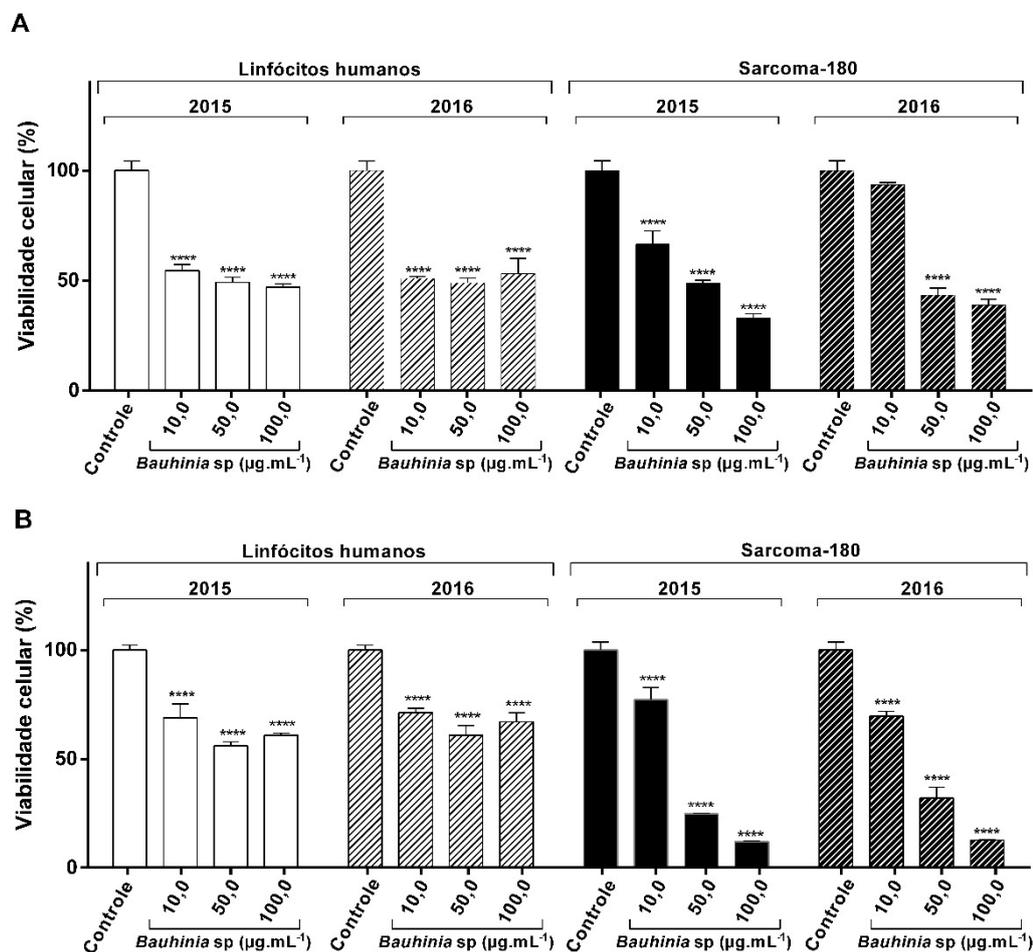


Figura 3. Percentual de viabilidade celular de linfócitos humanos e sarcoma-180 após tratamento com doses dos extratos etanólicos das folhas de *Bauhinia sp.*, coletada em estação seca e chuvosa, pelo método do MTT.

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).

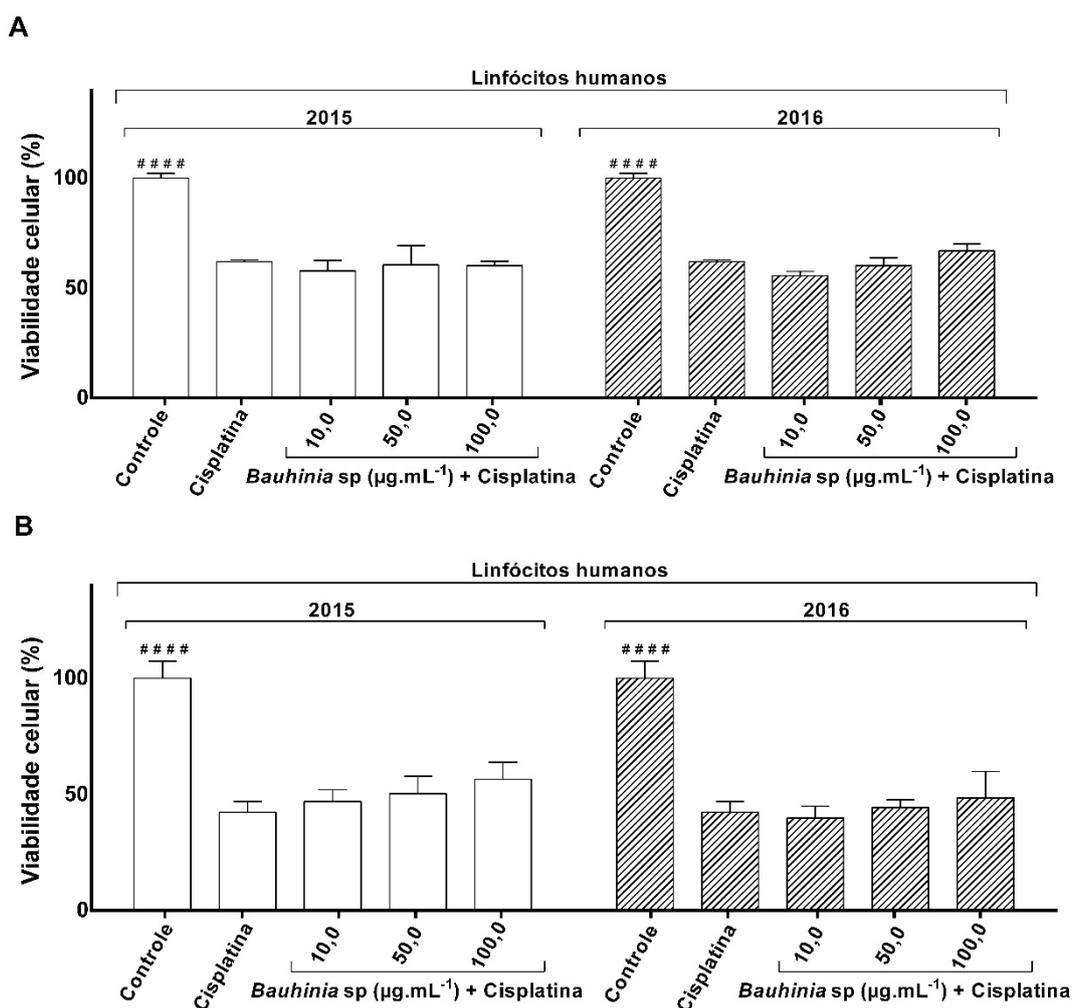


Figura 4 - Percentual de viabilidade celular de linfócitos humanos segundo seguindo os protocolos de anti-citotoxicidade após o tratamento com doses dos extratos etanólicos de *Bauhinia* sp., coletada em estação seca e chuvosa, pelo método do MTT.

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 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 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  $\beta$ -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.

## CHEMICAL PROFILE OF CRUDE EXTRACTS OF *ARTHROSPIRA PLATENSIS* BIOMASSES CULTIVATED IN DIFFERENT CULTURE MEDIA

### Laura Patrício de Almeida Nunes Cavalcanti

LAPEMESP, Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais, UFRJ, Av. Carlos Chagas Filho, 373, Prédio do CCS, Bloco H, Subsolo, Lab 18 SS, Ilha do Fundão, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ

### Cláudia Maria Luz Lapa Teixeira

Laboratório de Biotecnologia de Microalgas, Instituto Nacional de Tecnologia, Av. Venezuela, 82 - Saúde, Rio de Janeiro, RJ

### Roberto Carlos Campos Martins

LAPEMESP, Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais, UFRJ, Av. Carlos Chagas Filho, 373, Prédio do CCS, Bloco H, Subsolo, Lab 18 SS, Ilha do Fundão, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ

**ABSTRACT:** *Arthrospira platensis* is a microalga which belongs to the group Cyanophyta; it has metabolites such as proteins, vitamins, carotenoids and the phycocyanin pigment, all of them showing a broad spectrum of biological activities. The Zarrouk medium, a chemically defined medium, is used for the growth and generation of compounds of interest in the algal biomass. However, a significative production cost is assigned to Zarrouk medium. This work aimed to conduct a comparative study between the Zarrouk culture medium and the modified F2 culture medium concerning to the production of

products of industrial interest. TLC and HPLC-DAD techniques were used in order to verify the chemical profile of the biomass extracts (MeOH and EtOH) originated from the two different media and the production of their main bioactive compounds. TLC and HPLC results suggest that the extractions with EtOH led to a higher extraction of carotenoids and chlorophyll, as well as of other minor substances. In addition, biomass produced in Zarrouk medium seems to contain a greater amount of carotenoids than biomass produced in F2 medium.

**KEYWORDS:** *Arthrospira platensis*, HPLC-DAD, microalgae, chemical composition, culture media

### 1 | INTRODUCTION:

*Arthrospira platensis* is a blue green alga which is found in tropical and subtropical regions whose surface waters contain high levels of carbonates and bicarbonates in a pH range of 8 – 11. *A. platensis* belongs to the group Cyanophyta and is more specifically known as a cyanobacterium, which has a great pharmacological and alimentary value due to its rapid growth and a high production of metabolites, such as proteins, vitamins, carotenoids and the phycocyanin pigment, all of them showing a broad spectrum of biological activities (COLLA

*et al.*, 1998; MACL *et al.*, 1999, MENDIOLA *et al.*, 2006; BOROWITZKA, 2013).

There have been a great number of relates of antifungal, antiviral, antialgal, enzymatic, or antibiotic properties of compounds extracted from *A. platensis*. Since their production changes according to the environment on which the microalga grows, manipulating the culture conditions can stimulate the biosynthesis of specific compounds (MORAIS *et al.*, 2015).

The indoor cultivation of this microalga has been a promising alternative, due to continuous production of microalga which does not follow harvest regimes. Besides, *in vitro* cultivation protect the growing cells of severe alterations due to the light and temperature outdoors. Additionally, standard culture medium might generate compounds of interest; medium can be reused, reducing water consumption and costs; the residual biomass derived from the extraction of the target compounds which can still be used as food supplements in feed or as fertilizer, among other advantages (LIMA *et al.*, 2018).

So far, microalgae *A. platensis* is cultivated in Zarrouk medium, a chemically defined medium containing minerals salts and nutrients necessary for the growth and generation of target compounds in the algal biomass. However, these chemicals are quite expensive, increasing the biomass production costs (RAJASEKARAN *et al.* 2015).

Modified media have been reported, using sea water and reuse water to optimize a specific target compound production, biomass yield or as an alternative as a low cost culture medium.

Leema *et al.* in 2010 reported the use of seawater as culture medium for *A. platensis* and Zarrouk medium was used as control. The seawater was pretreated with  $\text{NaHCO}_3$  in order to precipitate the excess divalent cations  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ . Three different media were tested: SW1 (undiluted seawater), SW2 (2:1 seawater/freshwater, v/v) and SW3 (1:2 seawater/freshwater, v/v). The three seawater media supported the growth of *A. platensis*. In addition, SW2 showed significantly higher lutein content in the biomass than control medium.

Matos *et al.* in 2017 reported a desalination concentrate (wastewater) as an alternative method for microalgae cultivation. They showed that *A. platensis* is able to grow in desalination concentrate, which is rich in nutrients like N and P as well as other minerals ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ), but had the production of protein lowered and lipids, amino acids and saturated fatty acids increased. This fact is correlated to osmotic stress influenced by salt concentration.

Ho *et al.* in 2018 reported the optimization of the phycobiliprotein C-phycocyanin (C-PC), a protein with great commercial interest due to its wide spectrum of bioactivity activities, produced from *A. platensis*. In this paper, authors report light sources (white LED, monochromatic LED and fluorescent lamps) being manipulated to enhance C-PC productivity in *A. platensis* cultivated in Zarrouk recycled medium. The white LED resulted in higher C-PC production efficiency and the recycled medium proved to be an interesting alternative from an economic and environmental point of view for C-PC production.

Thus, the optimization and preparation of a low cost culture medium and the production of an extract largely enriched of commercially interesting biomolecules has been pursued by scientists over the years.

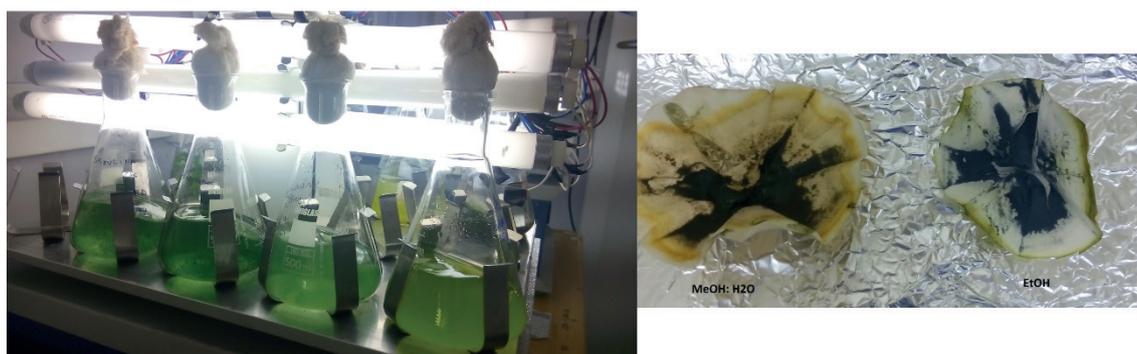
## 2 | OBJECTIVES:

Evaluate the chemical profile of ethanolic and methanolic extracts of *A. platensis* biomass cultivated in different media (Zarrouk and modified F2), showing qualitative differences in the production of carotenoids, chlorophyll, phenolic compounds and proteins.

## 3 | METHODOLOGY:

Microalgae *A. platensis*, initially provided by Professor Sergio Lourenço (Fluminense Federal University, Niteroi, RJ) from the Elizabeth Aidar Microalgae Collection, was cultivated in erlenmeyers containing liquid Zarrouk medium modified by George and F2 medium with the following modifications: superior concentration of nitrate and phosphate (equivalent to Zarrouk medium), and treatment with EDTA (for the removal of turbidity from precipitate of calcium salts) (GUILLARD, 1975; GEORGE, 1976). Both cultures were grown under fluorescent light 24h, T=22°C, under constant stirring. At the final of the cultivation, biomass was recovered by filtration and lyophilized. Dried biomasses were extracted for 24h with MeOH:H<sub>2</sub>O 8:2 (Z-MeOH and F2-MeOH) or 100% EtOH (Z-EtOH and F2-EtOH), separately.

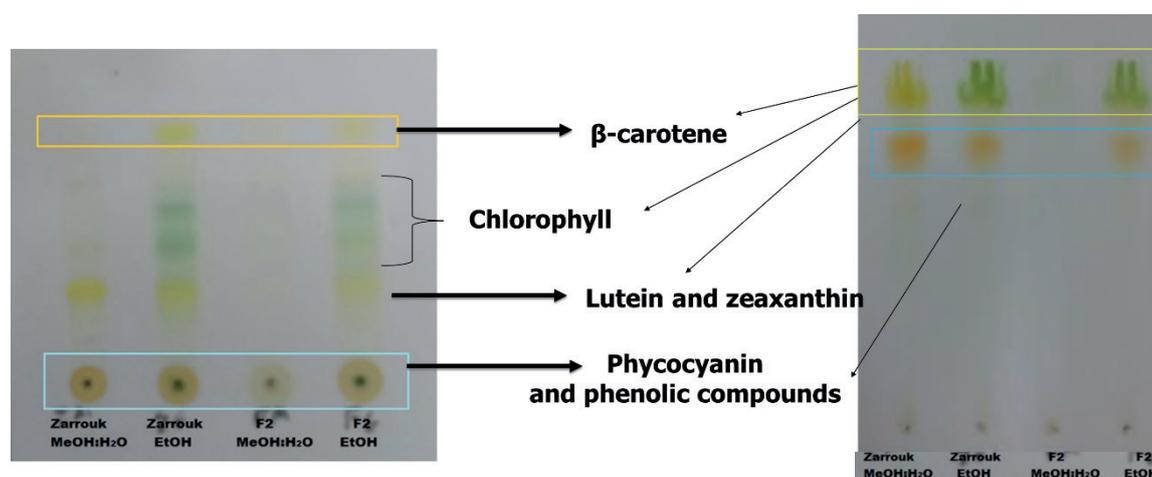
The crude extracts obtained were analyzed by TLC (elution in ethyl acetate: Hexane 6: 4 and BAW 8:1:1) and HPLC-DAD (performed at the Analytical Center - IPPN, UFRJ. The analysis was performed using the following parameters: Phenomenex Column RP18 250 x 4,6 mm, 5mm; the mobile phase was a mixture of solvent A (water/ formic acid 0,1%) and solvent B (MeOH), at a flow rate of 0,9 mL min<sup>-1</sup>; gradient: 0 min (30% B), 30 min (100% B), 45 min (10% B), 46 min (30% B); Total acquisition time: 55 min).



**Figure 1:** Cultivation of microalgae in erlenmeyer and biomasses of *Arthrospira platensis* (Zarrouk medium) after maceration.

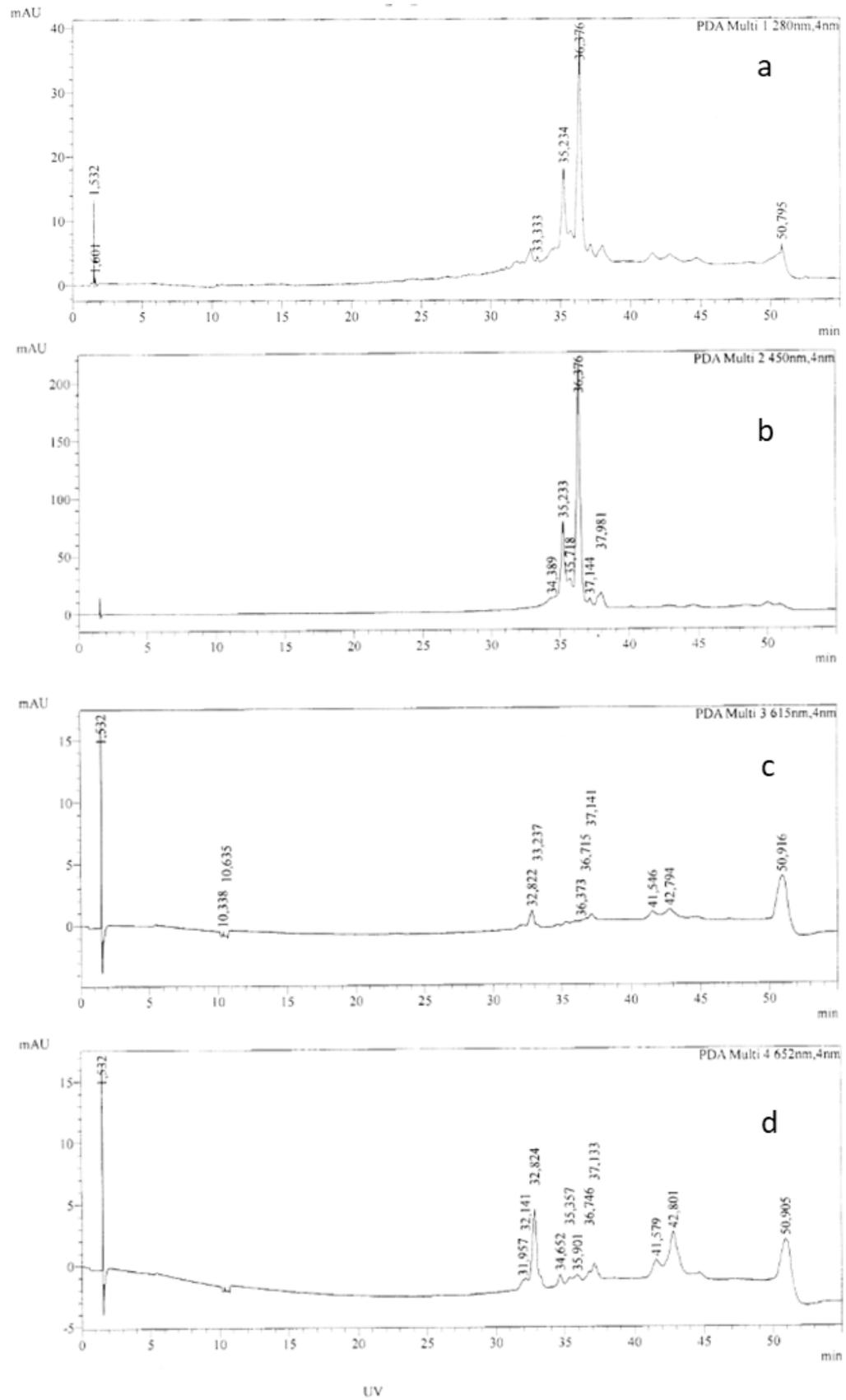
## 4 | RESULTS:

Preliminary analysis by TLC, eluted in an apolar mobile phase confirmed the presence of  $\beta$ -carotene as the substance of higher R<sub>f</sub>, confirmed by comparison with a standard sample of this carotenoid (LAGUNA *et al.* 2015). Phycocyanin and phenolic compounds were retained at the beginning of elution starter point due to their high polarity. In UV light, 360 nm range, it was possible to observe a very strong blue color only in the spot where the sample F2-MeOH was applied, which may suggest that this culture medium may have optimized the production of a more polar compound in the microalgae. In the case of the polar eluent, phenolics elute through the plate. As previously reported, at 360 nm, it was also possible to observe a very strong blue color in the spot where the sample F2-MeOH was applied (**Figure 2**).

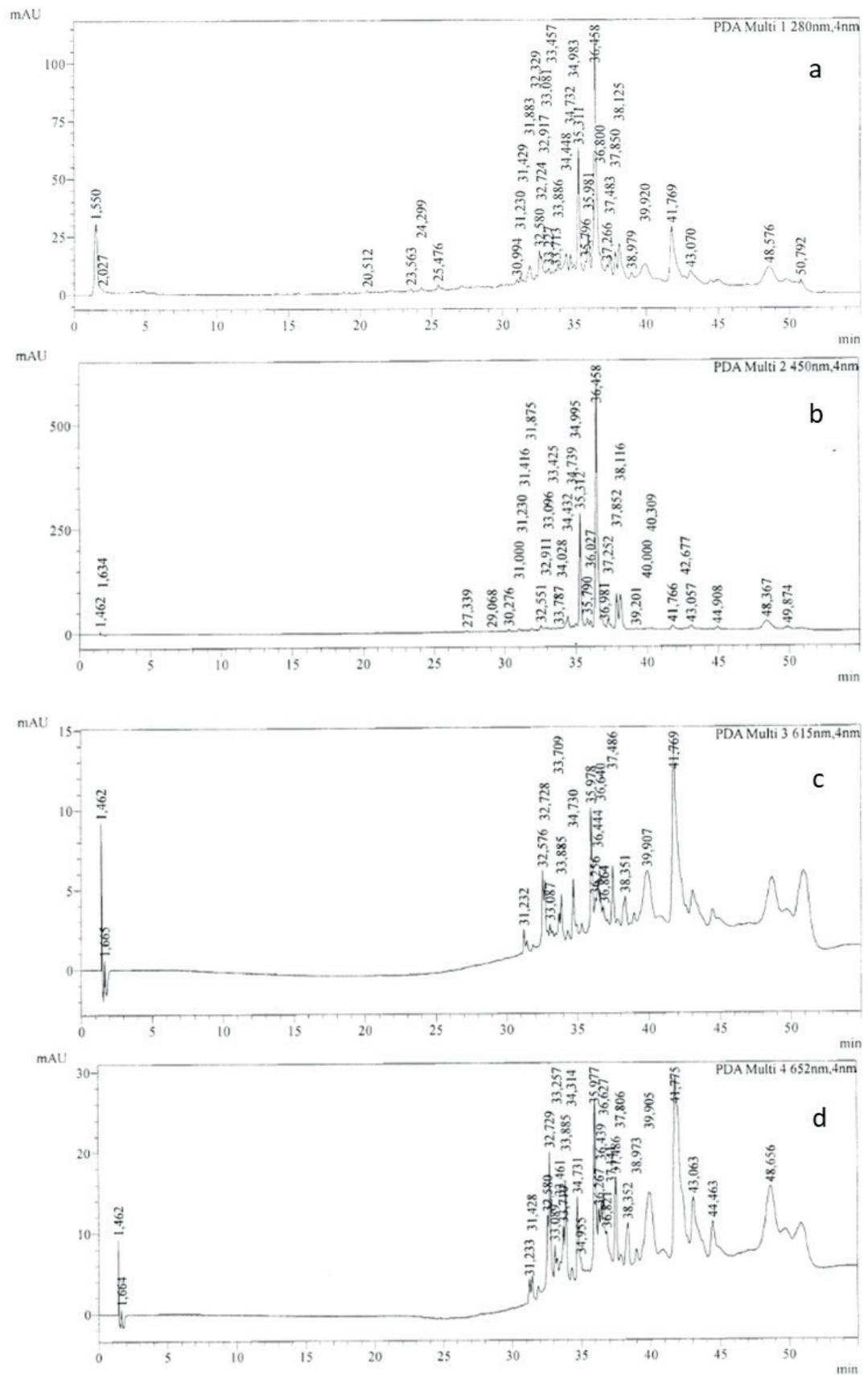


**Figure 2:** TLC of the crude extracts of *A. platensis* grown in Zarrouk and F2 medium (elution in ethyl acetate: Hexane 6: 4 and BAW 8:1:1).

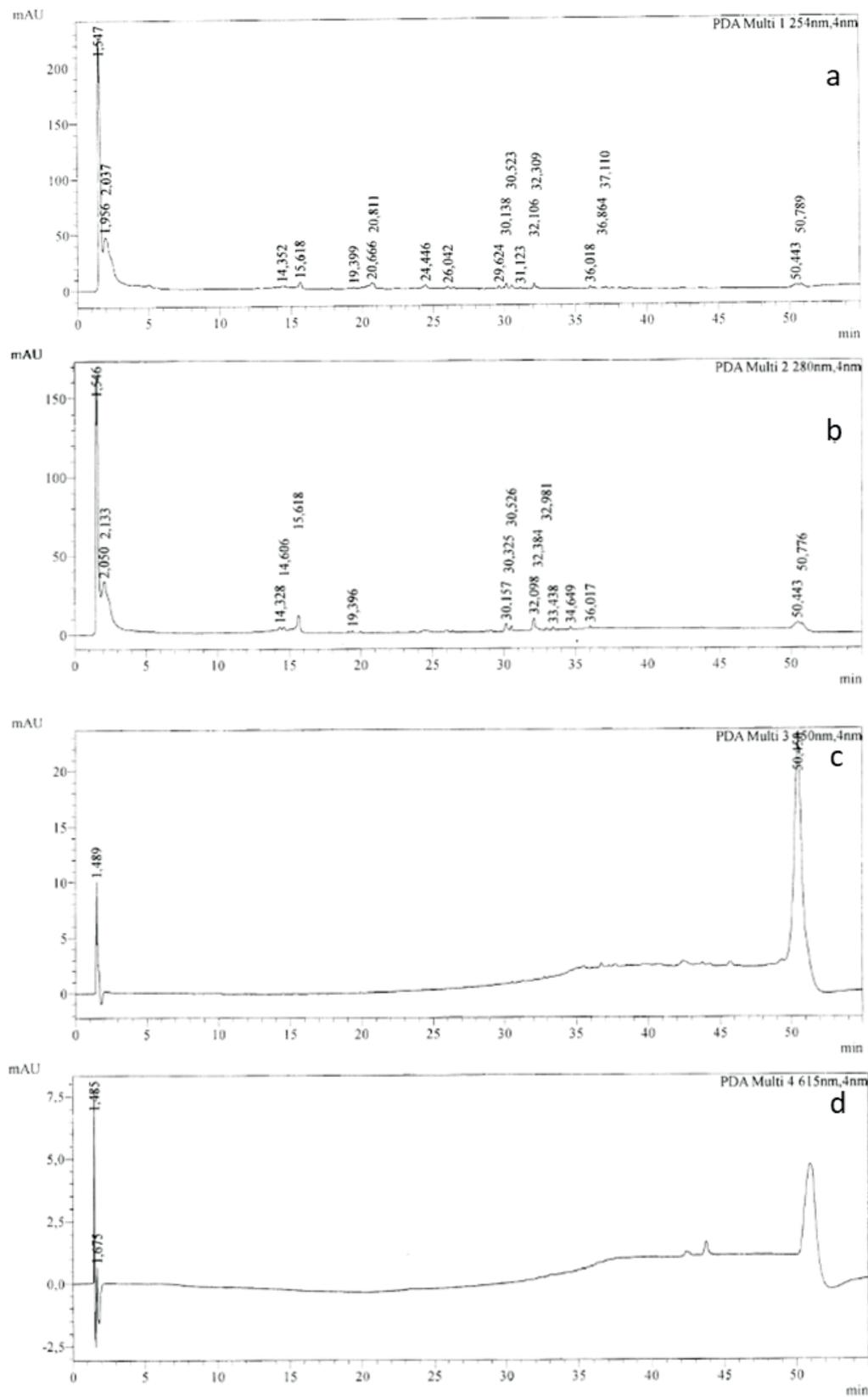
Analysis by HPLC-DAD showed a massive concentration of substances in the ethanolic crude extracts. The crude extracts originated by Zarrouk medium showed a higher production of carotenoids, as confirmed by their UV spectra in 465 nm. TLC and HPLC experiments data suggest that the extractions with ethanol led to a higher extraction of carotenoids and chlorophyll, as well as of other minor substances.



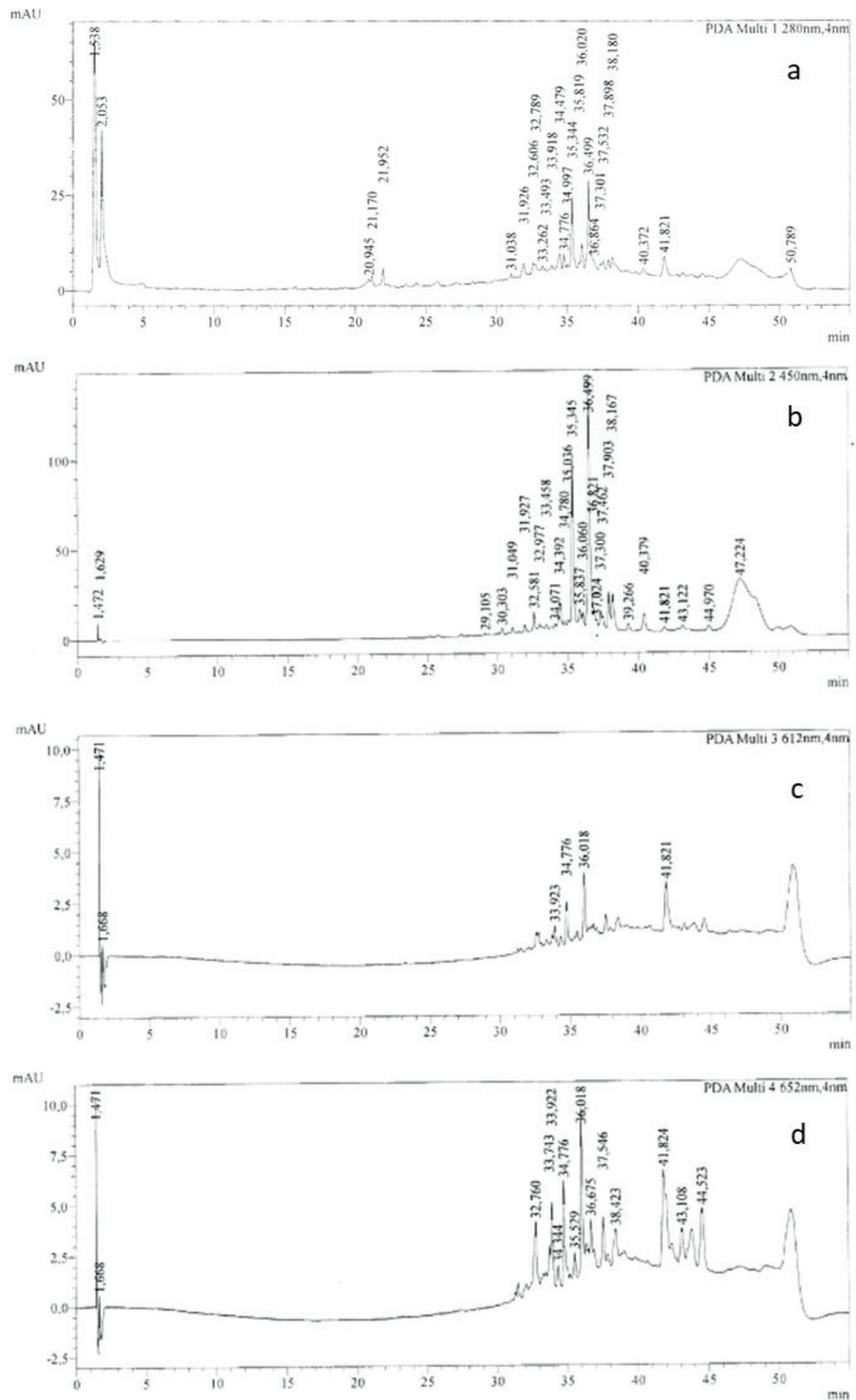
**Figure 3:** Chromatogram of the MeOH extract of *A. platensis* in ZK medium by HPLC-DAD, a) 280 nm; b) 450 nm; c) 615 nm; d) 652 nm.



**Figure 4:** Chromatogram of the EtOH extract of *A. platensis* in ZK medium by HPLC-DAD, a) 280 nm; b) 450 nm; c) 615 nm; d) 652 nm.



**Figure 5:** Chromatogram of the MeOH extract of *A. platensis* in F2 medium by HPLC- DAD, a) 252 nm; b) 280 nm; c) 450 nm; d) 615 nm.



**Figure 6:** Chromatogram of the EtOH extract of *A. platensis* in F2 medium by HPLC- DAD, a) 280 nm; b) 450 nm; c) 612 nm; d) 652 nm.

## 5 | CONCLUSION:

Previous methodologies describe only the use of MeOH to obtain crude extracts of *A. platensis* biomass. Based upon our results, it is possible to suggest that extraction

with EtOH, a slightly less polar solvent seems to be an interesting alternative, since it can extract more molecules present in the biomass, mainly carotenoids. Zarrouk medium seems to produce a greater amount of carotenoids than F2 medium.

## BIBLIOGRAPHY

Borowitzka, M. A. **High-value products from microalgae—their development and commercialization.** *Journal of Applied Phycology*, v. xx, p. 1-14, 2013.

Colla, L. M.; Reinehr, C.O.; Reichert, C.; Costa, J.A.V. **Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under divergent temperature and nitrogen regimes.** *Bioresource Technol.*, v. 98, p. 1489-1493, 2007.

George, E.A. **Culture centre of Algae and Protozoa: List of Strains 1976**, 3rd ed., Institute of Terrestrial Ecology, Natural Environment Research Council, Cambridge, 1976.

Guillard, R.R.L. **Culture of Phytoplankton For Feeding Marine Invertebrates.** in: Smith, W.L. and M. H. Chanley (Eds.), *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, New York, NY, 1975.

Ho, S.; Liao, J.; Chen, C.; Chang, J. **Combining light strategies with recycled medium to enhance the economic feasibility of phycocyanin production with *Spirulina platensis*.** *Bioresource Technology*, v. 247, p. 669-675, 2018.

Laguna, I. H. B.; Marante, F. J. T.; Freire, K. R. L.; Mioso, R. **Extraction of Nutraceuticals from *Spirulina* (Blue-Green Alga): A Bioorganic Chemistry Practice Using Thin-Layer Chromatography.** *Biochemistry and Molecular Biology Education*, v. xx, p. 366-369, 2015.

Leema, J.T. M.; Kirubakaran, R.; Vinithkumar, N.V.; Dheenan, P.S.; Karthikayulu, S. **High value pigment production from *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* cultured in seawater.** *Bioresource Technology*, v. 101, p. 9221-9227, 2010.

Lima, G. M.; Teixeira, P.C.N.; Teixeira, C.M.L.L.; Filócomo, D.; Lage, C.L.S. **Influence of spectral light quality on the pigment concentrations and biomass productivity of *Arthrospira platensis*.** *Algal Research*, v.31, p.157–166, 2018.

Macl, D.E.O.; Monteiro, M.P.C.; Robbs, P.G.; Leite, S. G. F. **Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures.** *Aquaculture Int.* v.7, p. 261-75, 1999.

Matos, A. P.; Moecke, E. H. S.; Sant'Anna, E. S. **The use of desalination concentrate as a potential substrate for microalgae cultivation in Brazil.** *Algal Research*, v.24, p. 505–508, 2017.

Mendiola, J. A.; Jaime, L.; Santoyo, S.; Reglero, G.; Cifuentes, A.; Ibañez, E.; Señoráns, F. J. **Screening of functional compounds in supercritical fluid extracts from *Spirulina platensis*.** *Food Chemistry*, v. 102, p. 1357-1367, 2006.

Morais, M. G.; Vaz, B. S.; Morais, E. G.; Cost, J. A. V. **Biologically Active Metabolites Synthesized by Microalgae.** *BioMed Research International*, v. xx, p. 1-16, 2015.

Rajasekaran, C.; Ajeesh, C. P. M. A.; Balaji, S.; Shalini, M.; Siva, M.; Das, R.; Fulzele, D. P.; Kalaivan, T. **Effect of Modified Zarrouk's Medium on Growth of Different *Spirulina* Strains.** *Walailak Journal*, v.13, n.1; p.67-75, 2016.

## CORIANDRUM SATIVUM EM ESTÁDIO VEGETATIVO E FLORAÇÃO INDUZ ATIVIDADE ANTICÂNCER *IN VITRO*

### **Vanessa Silva dos Santos**

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

### **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

### **Patrícia Carara dos Santos**

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

apresenta grande variedade de atividades biológicas. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência do estágio vegetativo e floração sobre o teor total de flavonoides e as atividades antioxidante, citotóxica, anti-citotóxica e antiploriferativa *in vitro* de extratos brutos de *Coriandrum sativum* cultivado sob adubação orgânica. As plantas foram cultivadas com adubação orgânica e as folhas foram coletadas no estágio vegetativo e floração para produção do extrato bruto hidroalcoólico usado para os testes químicos e biológicos. O teor total de flavonoides observado foi similar entre o estágio vegetativo e floração. Nos ensaios antioxidantes, ABTS e DPPH, foi verificado semelhante poder redutor para os extratos de *C. sativum*, estágio vegetativo e floração. Ambos extratos induziram efeitos citotóxicos em linfócitos humanos e sarcoma-180 após 24h e 48h de tratamento. Para os dois extratos, às 48h de tratamento, verificou-se maior citotoxicidade para as células de sarcoma-180. No ensaio de anti-citotoxicidade, pré-tratamento, os extratos testados não promoveram ação preventiva contra danos citotóxicos induzidos pela cisplatina. Esses resultados sugerem que para *C. sativum* cultivado sob adubação orgânica o estágio de desenvolvimento, vegetativo e floração, não interfere no conteúdo total de flavonoides e nas atividades biológicas avaliadas. Estes achados reforçam o uso dessa

**RESUMO:** *Coriandrum sativum* L. (Apiaceae), coentro, é uma planta condimentar que

planta condimentar na culinária e na medicina tradicional, promovendo a prevenção de doenças e com potencial uso para o desenvolvimento de fármacos de combate ao câncer.

**PALAVRAS-CHAVE:** coentro, ABTS, DPPH, ensaio do MTT, antiproliferativo.

**ABSTRACT:** *Coriandrum sativum* L. (Apiaceae), coriander, is a seasoning plant that presents a great variety of biological activities. The objective of this study was to evaluate the influence of the vegetative stage and flowering on the total flavonoid content and the antioxidant, cytotoxic, anti-cytotoxic and antiproliferative activities *in vitro* of extracts of *Coriandrum sativum* grown under organic fertilization. The plants were cultivated with organic fertilization and the leaves were collected at the vegetative stage and flowering to produce the crude hydroalcoholic extract used for chemical and biological tests. The total flavonoid content observed was similar between vegetative stage and flowering. In the antioxidant tests, ABTS and DPPH, similar reductive power was verified for extracts of *C. sativum*, vegetative stage and flowering. Both extracts induced cytotoxic effects in human lymphocytes and sarcoma-180 cells after 24h and 48h of treatment. Both extracts, at 48 hours of treatment, increased the cytotoxic effect in sarcoma-180 cells. In the anti-cytotoxicity assay, pretreatment, the extracts tested did not promote preventive action against cytotoxic damages induced by cisplatin. These results suggest that for *C. sativum* cultivated under organic fertilization the stage of development, vegetative and flowering, does not interfere in the total content of flavonoids and in the biological activities evaluated. These findings reinforce the use of this spice plant in cooking and traditional medicine, promoting disease prevention and potential use for the development of cancer fighting drugs.

**KEYWORDS:** coriander, ABTS, DPPH, MTT assay, antiproliferativo.

## 1 | INTRODUÇÃO

A introdução de plantas na alimentação humana data de milhares de anos atrás, sendo consumidas há séculos por uma variedade de propósitos: temperos, corantes e conservantes. Somado a isso, estudos têm demonstrado que determinadas espécies usualmente consumidas no dia a dia possuem propriedades medicinais (JANA et al., 2014).

As plantas utilizadas para fins medicinais vêm sendo empregadas como forma alternativa aos medicamentos sintéticos no tratamento de diversas doenças e sua aplicabilidade tornou-se comum em muitos países e culturas diferentes por meio do conhecimento popular. No início da década de 1990, a Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgou que a maioria da população dos países em desenvolvimento, cerca de 65-80% dependiam de plantas medicinais como elemento primário do seu sistema de saúde (JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

*Coriandrum sativum* L., trata-se de uma dessas espécies que apresenta

propriedades medicinais, além de seu amplo uso na alimentação humana. Popularmente, conhecido como coentro, esta espécie é um importante membro da família Apiaceae. Nativa da bacia do Mar Mediterrâneo, *Coriandrum sativum* tem registros de suas propriedades medicinais naquela região, desde a antiguidade (ISHIKAWA; KONDO; KITAJIMA, 2003; SILVA; COELHO JÚNIOR; SANTOS, 2012). Em consequência de seu cultivo intenso no leste europeu, o coentro é comumente utilizado na culinária de pratos típicos da China, México, América do Sul, Índia e Sudeste da Ásia (WONG; KITTS, 2006).

Os compostos químicos presentes em extratos de plantas medicinais usadas na culinária, como *C. sativum*, possuem atividades farmacológicas e são considerados fontes potenciais de antioxidantes naturais, uma vez que são capazes de retardar ou inibir a oxidação de lipídeos e outras biomoléculas, prevenindo ou reparando danos celulares causados por radicais livres. Estes fitoquímicos bioativos são responsáveis por uma ampla variedade de atividades biológicas que incluem, além de propriedades antioxidantes, propriedades anticancerígenas, neuroprotetivas, ansiolíticas, anticonvulsivas, analgésicas, hipolipemiantes, hipoglicêmicas, hipotensivas, antimicrobiais, anti-inflamatórias e no alívio de enxaquecas. Por esse motivo muitos estudos têm voltado o seu foco para as ações dos antioxidantes de produtos naturais de origem vegetal e sua aplicabilidade na alimentação (MSAADA et al., 2017; PRACHAYASITTIKUL et al., 2017).

A crescente procura por antioxidantes oriundos de produtos naturais de origem vegetal tem ocorrido, em parte, devido à instabilidade química apresentada pelos antioxidantes sintéticos e a sua possível contribuição para o desenvolvimento de eventos carcinogênicos. Essas descobertas levaram a um maior interesse pelo estudo de alternativas naturais de aditivos alimentares (não tóxicos) como potenciais antioxidantes (TOMAINO et al., 2005; MSAADA et al., 2017). Desta forma antioxidantes sintéticos, tais como hidroxitolueno butilado (BHT) e o hidroxianisol butilado (BHA), antes considerados eficazes, vem sendo cada vez menos utilizados na alimentação (NAMIKI, 1990; SAMOJLIK et al., 2010; MSAADA et al., 2017).

O desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade antioxidante da célula, pode levar ao estresse oxidativo (TANG et al., 2013). Essas EROs incluem o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) e o oxigênio singlete ( $1O_2$ ), são constantemente geradas como subprodutos em eventos metabólicos que ocorrem, principalmente, nas mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos (GUPTA, 2010; BARBOSA et al., 2014; TAIZ et al., 2017). Tais moléculas são extremamente instáveis e reativas, capazes de transformar outras moléculas com as quais interagem.

O desequilíbrio entre os antioxidantes disponíveis nas células e as EROs podem desencadear a oxidação de lipídeos e proteínas e induzir danos genéticos por meio da modificação do DNA, tais como mutações e, por conseguinte, o desenvolvimento de cânceres (HUANG; OU; PRIOR, 2005; SILVA; GONÇALVES, 2010; TANG et al., 2013;

PEREIRA, 2017).

A neutralização da citotoxicidade das EROs envolve mecanismos de defesa enzimáticos e não enzimáticos. Estes são, em sua maioria, exógenos – absorvidos por meio da ingestão de alimentos. Dentre eles destacam-se a ubiquinona, o ácido úrico, a taurina, os flavonoides e outros compostos fenólicos de origem vegetal (HALLIWELL, 1990; SIES, 1991). Sendo assim a inclusão de plantas que contém compostos químicos com propriedades antioxidantes na dieta humana pode auxiliar na manutenção do equilíbrio entre a produção e a neutralização de espécies reativas de oxigênio, trazendo benefícios a saúde (TANG et al., 2013; BARBOSA et al., 2014).

Compreender o mecanismo de ação de metabólitos secundários, como compostos fenólicos, terpenos e alcaloides é de vital importância para garantir o uso seguro de plantas medicinais. Estes, são sugeridos como responsáveis por diferentes ações biológicas e, portanto, estudos que auxiliem na comprovação dessas atividades ou mesmo na avaliação de suas correlações com fatores bióticos e abióticos são essenciais. Além disso, é relevante considerar que o estágio de desenvolvimento das plantas medicinais, estágio vegetativo e floração, podem interferir nas vias do metabolismo secundário, alterando a composição química de produtos naturais à base de plantas medicinais (SANTOS, 2016).

Estudos prévios conduzidos em nosso laboratório (SANTOS, 2016), sugerem que o estágio de desenvolvimento interfira na produção de compostos fenólicos, como flavonoides. Nessa perspectiva o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência do estágio vegetativo e floração sobre o teor total de flavonoides e as atividades antioxidante, citotóxica e antiploriferativa *in vitro* de extratos brutos de *Coriandrum sativum* cultivado sob adubação orgânica.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção do extrato vegetal

As plantas foram cultivadas sob o regime de adubação orgânica (esterco bovino, sem herbicidas), em campo, na região de Venda Nova do Imigrante /ES, em parceria com agricultores da região. A cidade apresenta clima tropical de altitude, com temperatura média de 18,5 °C e predominância de Latossolos, Argissolos e Cambissolos (INCAPER), informações disponibilizadas *on line*. A parte aérea das plantas foi coletada em estágio vegetativo e floração, foram secas e submetidas à maceração em etanol 70%, à temperatura ambiente. As amostras foram filtradas e passaram por rotaevaporação à vácuo para obtenção do extrato bruto. Posteriormente foi estabelecida a massa seca dos extratos para o uso nos ensaios químicos e biológicos.

## 2.2 Teor total de Flavonoides

Para mensurar o conteúdo total de flavonoides foi utilizado o método colorimétrico descrito por Zhishen et al. (1999) com adaptações. Foram preparadas amostras a partir da adição de 1,5mL de solução metanólica de  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (2% p/v) a 0,5mL do extrato, em tubos selados. Após manter a amostra por 10 minutos ao abrigo de luz, a absorbância foi detectada a 430 nm por leitor ELISA Epoch BioTek®. Utilizou-se como branco a solução metanólica de  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  sem extrato, sendo todos os testes realizados em duplicata. A partir de diluições metanólicas de rutina foi preparada a curva padrão de calibração e a quantidade de flavonoides no extrato foi expressa em equivalente de rutina por grama de massa seca de extrato.

## 2.3 Atividade antioxidante pelo método ABTS

A atividade antioxidante foi medida pelo método 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazoli-Ácido 6-sulfônico) (ABTS) descrito por Re et al. (1999), com modificações. Em uma microplaca de 96 poços, cada poço recebeu 200µL da solução ABTS<sup>+</sup> e 40 µL de solução alcóolica do extrato bruto de *C. sativum*, nas concentrações de 1000,0; 500,00; 250,00 e 125,00 µg.mL<sup>-1</sup>. A capacidade antioxidante total das amostras foi calculada em relação à atividade do padrão ácido ascórbico e do controle da reação, sem extrato. O teste foi realizado em triplicata e a atividade antioxidante foi calculada de acordo com a fórmula:

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

A absorbância foi medida em leitor ELISA Epoch BioTek à 734 nm e os valores expressos em porcentagem de inibição do radical livre ABTS<sup>+</sup>.

## 2.4 Citotoxicidade *in vitro*

### 2.4.1 Linfócitos humanos

A citotoxicidade e anti-citotoxicidade foi avaliada em linfócitos humanos obtidos de sangue periférico de um doador sadio com idade entre 20 e 30 anos. Os linfócitos foram isolados com o reagente Ficoll® Paque Plus, como recomendado pelo fabricante, com pequenas modificações. 100 µL da solução de células foi adicionada a cada poço da microplaca, concentração de  $2 \times 10^5$  células / mL.

Para a avaliação da citotoxicidade, as células foram incubadas por 24 ou 48 h na presença do extrato de *C. sativum*, diluído em água nas concentrações de 10,0; 50,0 e 100 µg.mL<sup>-1</sup> assim como na ausência do extrato (grupo controle). Para a avaliação da anti-citotoxicidade foi usado o protocolo de pré-tratamento, em que, após 24h de prévia exposição à doses dos extratos, utilizou-se a cisplatina (50,0 µg.mL<sup>-1</sup>) como agente

citotóxico. Ao final do experimento, a viabilidade celular dos linfócitos foi avaliada pelo método do brometo de 3- (4,5-dimetil-2- tiazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT)

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Espírito Santo (Certificado 2.333.879).

#### 2.4.2 Sarcoma 180

A atividade anticâncer foi avaliada em células de sarcoma 180 (*Mus musculus*), obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro e mantidas sob condições de cultura suplementada com antibióticos. Para o teste de citotoxicidade as células foram tratadas com extrato nas concentrações de 10,0; 50,0 e 100,00  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  por 24h e 48h. Células não tratadas com o extrato constituíram o grupo controle. As células foram mantidas em incubadora de células em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e atmosfera úmida. Após o tempo de exposição ao extrato, as células de sarcoma 180 foram submetidas ao teste de viabilidade celular pelo método do brometo de 3- (4,5-dimetil-2- tiazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT).

O protocolo utilizando células de roedores possui aprovação do Comitê de Ética, certificado 89/2015.

#### 2.4.3 Ensaio do MTT

A técnica baseia-se no princípio da redução do MTT pela enzima mitocondrial tetrazolium-succinato-desidrogenase em um produto com a coloração violeta (MTT-formazan). Esta conversão é possível apenas em células viáveis. Após os testes de citotoxicidade e anti-citotoxicidade, as microplacas (96 poços) foram centrifugadas a 860 rcf durante 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e 20  $\mu\text{L}$  de MTT à 5  $\text{mg.mL}^{-1}$  foram adicionados a cada poço. Após 3h de incubação, as placas passaram por centrifugação a 860 rcf por 5 minutos, o sobrenadante foi novamente descartado e adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de DMSO. A leitura da absorbância foi determinada no espectrofotômetro ELISA Epoch BioTek® a 595 nm. A viabilidade celular foi calculada em porcentagem, considerando-se o controle negativo como 100%, e todos os testes foram realizados em triplicata.

#### 2.5 Análises Estatísticas

Os resultados obtidos estão representados como média  $\pm$  desvio padrão. A comparação entre os terrores totais de flavonoides foi realizada por meio do teste *t* ( $p < 0,05$ ). Os dados de atividade antioxidante pelo ensaio ABTS foi submetido à análise de variância (ANOVA), seguido do teste *t* de comparação múltipla ( $p < 0,05$ ). A citotoxicidade e anti-citotoxicidade das doses de extrato testadas foram comparadas em relação ao grupo de células controle, ensaio de citotoxicidade, ou ao grupo de células que receberam cisplatina, ensaio de anti-citotoxicidade, sendo submetidos à

análise de variância (ANOVA), seguido do teste post hoc de Dunnett ( $p < 0,05$ ).

### 3 | RESULTADOS

#### 3.1 Teor Total de Flavonoides

O teor total de flavonoides apresentado nos dois estádios de desenvolvimento foi similar, sendo observado no estágio vegetativo  $26,85 \pm 3,30 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e no estágio de floração  $26,19 \pm 1,89 \mu\text{g.mL}^{-1}$  ( $p = 0,8275$ ).

#### 3.2 Atividade Antioxidante

Quanto à atividade antioxidante, no ensaio ABTS, a inibição do radical observada para o estágio vegetativo foi 12,99–78,85%, para o estágio de floração 7,47–80,43% e para o padrão ácido ascórbico 93,41–93,55% (Figura 1). Ambos extratos apresentaram atividades antioxidantes inferiores ao padrão (ácido ascórbico). Quando comparados entre si, os extratos apresentaram atividade antioxidante semelhante.

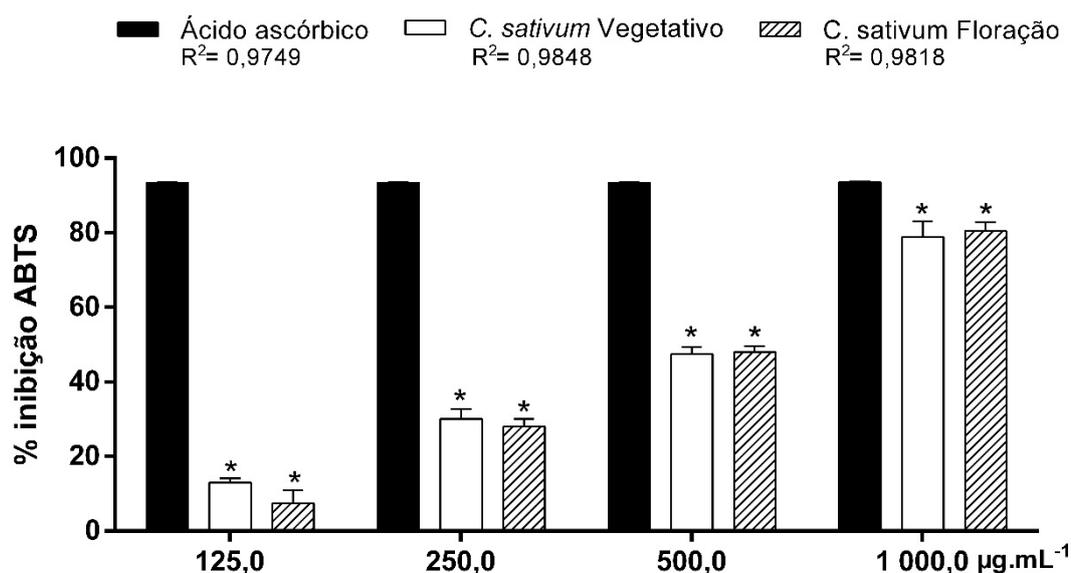


Figura 1. Inibição do radical ABTS por extratos de *C. sativum* coletado em estágio vegetativo e floração.

Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ). Folhas de *C. sativum* coletadas em estágio vegetativo e floração. Teste *t* para múltiplas comparações - \* ácido ascórbico vs. extratos de *C. sativum* coletado em estágio vegetativo ou floração ( $p < 0,05$ ). \* infere diferença estatística entre os grupos comparados.

#### 3.3 Viabilidade celular

A citotoxicidade dos extratos de *C. sativum*, coletado em estágio vegetativo e floração, em linfócitos humanos e sarcoma-180 está sumarizada na figura 1. Após 24h de tratamento, nas doses testadas, ambos extratos reduziram a viabilidade celular de linfócitos humanos e de sarcoma 180, sendo mais tóxica para as células de sarcoma 180 (Figura 2A). Em comparação aos efeitos citotóxicos observados em 24h

de exposição, às 48h de exposição ao extrato houve a redução da citotoxicidade em linfócitos humanos e o aumento da toxicidade em células de sarcoma 180 (Figura 2B).

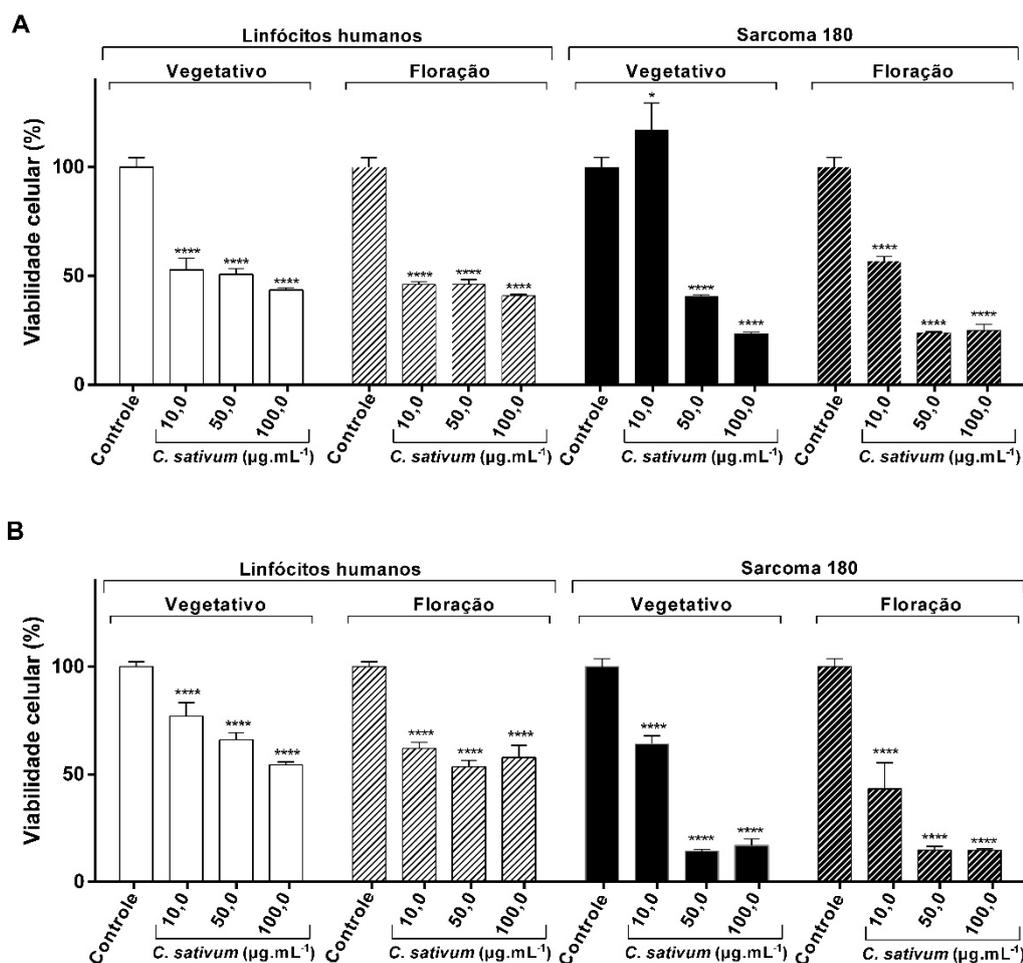


Figura 2. Percentual de viabilidade celular de linfócitos humanos e sarcoma-180 tratadas com doses de extrato de *C. sativum*, coletado em estágio vegetativo e floração, pelo método do MTT.

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 *C. sativum* - células tratadas com 10,0, 50,0 ou 100,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; Vegetativo - estágio vegetativo; Floração - estágio de floração. A viabilidade celular foi comparada com seus respectivos controles pela ANOVA *post hoc* teste de Dunnett - \*\*\*\* $p < 0,0001$  - células tratadas com doses de *C. sativum*. 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 ( $p < 0,05$ ).

No ensaio de anti-citotoxicidade, seguindo o protocolo de pré-tratamento, as doses dos extratos de *C. sativum* de ambos estádios de coleta não foram capazes de promover a prevenção do dano citotóxico induzido pela cisplatina (Figura 3).

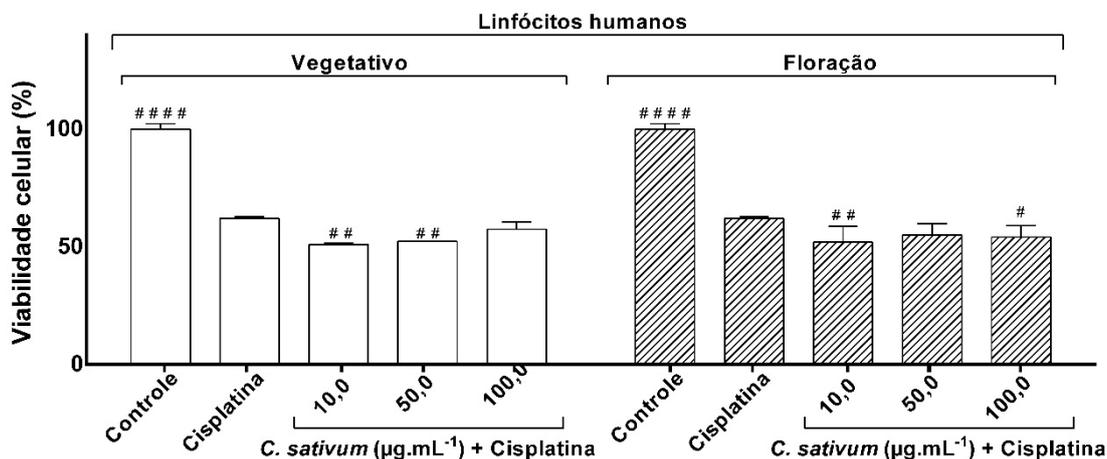


Figura 3. Percentual de viabilidade celular de linfócitos humanos no ensaio de anti-citotoxicidade utilizando doses dos extratos de *C. sativum* coletado em estágio vegetativo e floração, segundo o protocolo de pré-tratamento, pelo método do MTT

Controle células não tratadas; Cisplatina - células tratadas com cisplatina (50,0 µg.mL<sup>-1</sup>); Doses do extrato de *C. sativum* - células tratadas com 10,0; 50,0 ou 100,0 µg.mL<sup>-1</sup> de extrato de *C. sativum* e posteriormente cisplatina. Os valores são as médias ± desvio padrão. A viabilidade celular foi comparada com as células tratadas com cisplatina pela ANOVA post hoc Dunnett - #p <0,05, ##p <0,01 ou #### p <0,0001 vs. controle.

#### 4 | DISCUSSÃO

O uso popular e medicinal de plantas condimentares tem crescido nos últimos, reforçando a ideia do alimento-medicinal, e as atividades biológicas exibidas por estas plantas está relacionada a sua composição química, que pode variar em função de fatores ambientais ou inerentes aos estádios de desenvolvimento do próprio organismo.

Dentre as substâncias encontradas em muitas ervas e especiarias destacam-se os compostos fenólicos, caracterizados por um anel aromático ligado a uma ou mais hidroxilas em sua estrutura (MENDES; RODRIGUES-DAS-DORES; CAMPIDELI, 2015). A classe química dos compostos fenólicos é formada por diversas substâncias, e dentre elas destacam-se os ácidos fenólicos, o tocoferol e os flavonoides como os antioxidantes mais comuns de fonte natural (BRAGAGNOLO; DANIELSEN; SKIBSTED, 2007; PERRONE et al., 2015) and anticancer properties of curcumin”, “type”: “article-journal”, “volume”: “10” }, “uris”: [ “http://www.mendeley.com/documents/?uuid=a8814f99-55c4-4bdf-a380-d5250b4fdf7e” ] }, “mendeley”: { “formattedCitation”: “(BRAGAGNOLO; DANIELSEN; SKIBSTED, 2007; PERRONE et al., 2015. Análises da composição química de extratos hidroalcoólicos de sementes de *C. sativum* indicam a presença de flavonoides em sua constituição (RAJESHWARI; ANDALLU, 2011), compostos também detectados no presente estudo com parte aérea de *C. sativum*, em ambos estádios de desenvolvimento. Os princípios ativos de plantas medicinais, oriundos do metabolismo secundário vegetal, variam de acordo com fatores intrínsecos e extrínsecos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Nas condições testadas, o fator estágio de desenvolvimento não acarretou em grande variação

no teor de flavonoides do coentro, uma vez que o conteúdo total de flavonoides foi semelhante.

A presença de flavonoides, muitas vezes, está relacionada a uma ação antioxidante, que pode ser desenvolvida pela capacidade de neutralização e/ou inativação de radicais livres (GUANG-MING et al., 2013; YAN et al., 2014). As espécies reativas de oxigênio são os principais radicais livres gerados nos organismos animais, produzidos durante o processo de respiração. Por serem substâncias muito reativas, esses radicais podem degradar moléculas com funções vitais às células levando ao envelhecimento, câncer, doenças coronarianas, doença de Alzheimer, desordens neurodegenerativas, aterosclerose e inflamações (GASPARRI, 2005; ROLIM et al., 2013). Desta forma, a ingestão de plantas condimentares, como o coentro, que é usado para usado para conferir aroma e sabor aos alimentos pode, ao mesmo tempo, minimizar os danos causados pelos radicais livres, e assim auxiliar na ação preventiva de diversas doenças.

Ambos extratos apresentaram inibição do radical ABTS próxima à 80% nas maiores concentrações avaliadas, em concordância com estudos prévios de atividade antioxidante (PANJWANI; MISHRA; BANJI, 2010; RAMADAN et al., 2013). A atividade antioxidante de seu extrato é atribuída à presença de constituintes fenólicos, carotenóides, taninos, flavonoides, cumarinas, saponinas e terpenos, mostrando grande eficácia em experimentos com animais avaliando, por exemplo, os efeitos de agentes tóxicos (DE ALMEIDA MELO; MANCINI FILHO; GUERRA, 2005).

A medida indireta da viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial, por meio do teste MTT, mostrou um efeito citotóxico do extrato hidroalcoólico de *C. sativum* em linfócitos humanos e em células de sarcoma 180 após 24h de exposição, contudo, após 48h de exposição ao extrato o efeito citotóxico foi reduzido nos linfócitos humanos e aumentado nas células de sarcoma 180. Efeitos citotóxicos também foram encontrados em estudos com óleo essencial de outra planta condimentar, o orégano (*Origanum vulgare*), em que foi observada redução da viabilidade celular de duas linhagens de câncer humano (MCF-7 e LNCaP) e uma linhagem de fibroblasto (NIH 3T3) (HUSSAIN et al., 2011). Semelhantes testes de viabilidade celular, realizados com células PC12 cultivadas sob condições hipoglicemiantes, também apontam ação citotóxica dos constituintes de *C. sativum*, reduzindo a viabilidade de células sobretudo em condições estressantes (GHORBANI et al., 2011).

No presente estudo, os maiores níveis de citotoxicidade foram observados em células do sarcoma-180. Células cancerosas podem ser originadas pelo desequilíbrio na produção e eliminação de ERO's (SOSA et al., 2013), como as células tumorais são metabolicamente alteradas, frente a agentes estressores, como o extrato, se a maquinaria antioxidante for danificada a célula pode não responder, apresentar acúmulo de danos citotóxicos e morrer. Contudo, se a maquinaria antioxidante é de alguma forma ativada ou se encontra funcional ela pode reduzir o estresse oxidativo e restabelecer total ou parcialmente a homeostase, o que possivelmente aconteceu

com as células de linfócitos humanos, favorecendo o aumento da viabilidade celular.

Santos (2016), em seus estudos em medula óssea de camundongos *in vivo*, tratados com extratos hidroalcoólicos da parte aérea de *C. sativum*, aponta para uma redução da atividade citotóxica exibida pelo mutágeno ciclofosfamida. No presente estudo, *in vitro*, tal ação não foi observada, o que pode estar relacionado ao mecanismo diferenciado da indução de toxicidade da cisplatina, utilizada como controle para promoção de danos citotóxicos. A cisplatina liga-se ao DNA formando adutos, que induzem distorções na dupla hélice de DNA. A sua ação citotóxica é relacionada à sua inibição da transcrição e replicação, o que acarreta na morte celular programada da célula (WANG; LIPPARD, 2005; GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). Nas condições experimentais testadas, os compostos presentes nos extratos hidroalcoólicos de *C. sativum*, tanto no estágio vegetativo quanto floração, não foram capazes de atuar sobre a via de toxicidade induzida pela cisplatina.

Os metabólitos secundários ocorrem nos vegetais com alta diversidade estrutural e podem ser armazenados em concentrações relativamente elevadas. As características bioquímicas e fisiológicas do metabolismo secundário estão fortemente correlacionadas com a função. Alguns metabólitos secundários funcionam como moléculas de sinalização, que atraem artrópodes polinizadores ou animais dispersores, como também podem atuar no combate a herbivoria, bactérias, fungos e vírus (WINK, 2018).

O florescimento, diferente do observado em nosso estudo, pode ser caracterizado pelo aumento da produção de metabólitos secundários, como observado em *Phlomis anisodonta* durante a floração, em que ocorrer a intensa biossíntese de óleo essencial (AMIRI; GHIASVAND, 2017). Esta intensa biossíntese, segundo os autores, pode ocorrer devido ao aumento do número de estruturas secretoras após a expansão das flores e/ou como resposta à pressão implícita nos herbívoros, polinizadores e fitófagos.

## 5 | CONCLUSÃO

O estágio de desenvolvimento, vegetativo ou floração, de *C. sativum* cultivado sob regime de adubação orgânica não induziu alterações no conteúdo total de flavonoides para condições testadas. De modo similar, a atividade antioxidante, citotoxicidade em linfócitos humanos e sarcoma-180 exercida pelos extratos de *C. sativum* foram similares. Após 48h de tratamento, ambos extratos foram mais citotóxicos para células tumorais, sarcoma-180, do que para células saudáveis, linfócitos humanos. Nós sugerimos, com base nestas observações, que o estágio de desenvolvimento desta planta, vegetativo e floração, não interfere no conteúdo total de flavonoides desta planta e nas atividades biológicas avaliadas. Estes achados reforçam o uso dessa planta na culinária e prevenção de doenças, como também demonstram o possível uso desta planta para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos para combater o

câncer.

## 6 | AGRADECIMENTOS

À Eduardo Batitucci, por disponibilizarem a infraestrutura e o material vegetal, e à Guilherme Batitucci, pela assistência técnica para o cultivo das plantas. Este trabalho teve apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES).

## REFERÊNCIAS

- AMIRI, H.; GHASVAND, A. R. Changes in composition and antioxidant activities of essential oils in *Phlomis anisodonta* (Lamiaceae) at different stages of maturity. **Progress in Biological Sciences**, v. 6, n. 2, p. 205–212, 2017.
- BARBOSA, M. R.; MEDEIROS DE ARAÚJO SILVA, M.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; RANGEL CAMARA, T. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, 2014.
- BRAGAGNOLO, N.; DANIELSEN, B.; SKIBSTED, L. H. Rosemary as antioxidant in pressure processed chicken during subsequent cooking as evaluated by electron spin resonance spectroscopy. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 8, n. 1, p. 24–29, 2007.
- DE ALMEIDA MELO, E.; MANCINI FILHO, J.; GUERRA, N. B. Characterization of antioxidant compounds in aqueous coriander extract (*Coriandrum sativum* L.). **LWT-Food Science and Technology**, v. 38, n. 1, p. 15–19, 2005.
- GASPARRI, S. Estudo das atividades antioxidante e mutagênica/antimutagênica induzidas pelo extrato vegetal da *Costus spicatus*. **Estudo das atividades antioxidantes e mutagênicas/antimutagênicas induzidas pelo extrato vegetal da Costus spicatus**, 2005.
- GHORBANI, A.; RAKHSHANDEH, H.; ASADPOUR, E.; SADEGHNIA, H. R. Effects of *Coriandrum sativum* extracts on glucose/serum deprivation-induced neuronal cell death. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 2, n. 1, p. 4–9, 2011.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. **Quimica Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.
- GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. da. Morte celular por apoptose. **Revista brasileira de cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335–343, 2007.
- GUANG-MING, Y.; RU, Y. A. N.; ZHAO-XIAN, W.; ZHANG, F.-F.; YANG, P. A. N.; BAO-CHANG, C. A. I. Antitumor effects of two extracts from *Oxytropis falcata* on hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. **Chinese journal of natural medicines**, v. 11, n. 5, p. 519–524, 2013.
- GUPTA, S. D. Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. In: **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. [s.l.] CRC Press, 2010. p. 14–43.
- HALLIWELL, B. How to characterize a biological antioxidant. **Free radical research communications**, v. 9, n. 1, p. 1–32, 1990.
- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841–1856, 2005.
- HUSSAIN, A. I.; ANWAR, F.; RASHEED, S.; NIGAM, P. S.; JANNEH, O.; SARKER, S. D. Composition,

antioxidant and chemotherapeutic properties of the essential oils from two *Origanum* species growing in Pakistan. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 6, p. 943–952, 2011.

ISHIKAWA, T.; KONDO, K.; KITAJIMA, J. Water-soluble constituents of coriander. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 51, n. 1, p. 32–39, 2003.

JANA, S.; PATRA, K.; SARKAR, S.; JANA, J.; MUKHERJEE, G.; BHATTACHARJEE, S.; MANDAL, D. P. Antitumorigenic potential of linalool is accompanied by modulation of oxidative stress: an in vivo study in sarcoma-180 solid tumor model. **Nutrition and cancer**, v. 66, n. 5, p. 835–848, 2014.

JUNIOR, V. F. V.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura. **Química nova**, v. 28, n. 3, p. 519–528, 2005.

MENDES, G. M.; RODRIGUES-DAS-DORES, R. G.; CAMPIDELI, L. C. Avaliação do teor de antioxidantes, flavonoides e compostos fenólicos em preparações condimentares. **Rev. bras. plantas med**, v. 17, n. 2, p. 297–304, 2015.

MSAADA, K.; JEMIA, M. Ben; SALEM, N.; BACHROUCH, O.; SRITI, J.; TAMMAR, S.; BETTAIEB, I.; JABRI, I.; KEFI, S.; LIMAM, F. Antioxidant activity of methanolic extracts from three coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruit varieties. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S3176–S3183, 2017.

NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 29, n. 4, p. 273–300, 1990.

PANJWANI, D.; MISHRA, B.; BANJI, D. Time dependent antioxidant activity of fresh juice of leaves of *Coriandrum sativum*. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, v. 2, n. 1, p. 63–66, 2010.

PEREIRA, Paula Roberta Costalonga. **Análise fitoquímica, atividade antioxidante e atividade antiproliferativa do extrato etanólico das folhas de *Acacia mangium* Willd.** Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) - Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2017.

PERRONE, D.; ARDITO, F.; GIANNATEMPO, G.; DIOGUARDI, M.; TROIANO, G.; LO RUSSO, L.; DE LILLO, A.; LAINO, L.; LO MUZIO, L. Biological and therapeutic activities, and anticancer properties of curcumin. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 10, n. 5, p. 1615–1623, 2015.

PRACHAYASITTIKUL, V.; PRACHAYASITTIKUL, S.; RUCHIRAWAT, S.; PRACHAYASITTIKUL, V. Coriander (*Coriandrum sativum*): A promising functional food toward the well-being. **Food Research International**, 2017.

RAJESHWARI, C. U.; ANDALLU, B. Reverse phase HPLC for the detection of flavonoids in the ethanolic extract of *Coriandrum sativum* L. seeds. **Pak J Food Sci**, v. 2011, p. 13–21, 2011.

RAMADAN, M. M.; ABD ALGADER, N. N.; EL-KAMALI, H. H.; GHANEM, K. Z.; FARRAG, A. H. Chemo preventive effect of *Coriandrum sativum* fruits on hepatic toxicity in male rats. **World J. Med. Sci**, v. 8, p. 322–333, 2013.

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.

ROLIM, T. L.; WANDERLEY, F. T. S.; CUNHA, E. V. L.; TAVARES, J. F.; OLIVEIRA, A. M. F.; ASSIS, T. S. Constituintes químicos e atividade antioxidante de *Byrsonima gardneriana* (Malpighiaceae). **Quim Nova**, v. 36, p. 524–527, 2013.

SAMOJLIK, I.; LAKIC, N.; MIMICA-DUKIC, N.; ĐAKOVIĆ-ŠVAJČER, K.; BOŽIN, B. Antioxidant and hepatoprotective potential of essential oils of coriander (*Coriandrum sativum* L.) and caraway (*Carum carvi* L.) (Apiaceae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 15, p. 8848–8853, 2010.

SANTOS, Patricia Carara. **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.

SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **The American journal of medicine**, v. 91, n. 3, p. S31–S38, 1991.

SILVA, A. A. da; GONÇALVES, R. C. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. **Ciência Rural**, p. 994–1002, 2010.

SILVA, M. A. D.; COELHO JÚNIOR, L. F.; SANTOS, A. P. Vigor de sementes de coentro (*Coriandrum sativum* L.) provenientes de sistemas orgânico e convencional. **Revista Brasileira de plantas medicinais, Botucatu**, v. 14, p. 192–196, 2012.

SOSA, V.; MOLINÉ, T.; SOMOZA, R.; PACIUCCI, R.; KONDOH, H.; LLEONART, M. E. Oxidative stress and cancer: an overview. **Ageing research reviews**, v. 12, n. 1, p. 376–390, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. [s.l.] Artmed Editora, 2017.

TANG, E. L. H.; RAJARAJESWARAN, J.; FUNG, S. Y.; KANTHIMATHI, M. S. Antioxidant activity of *Coriandrum sativum* and protection against DNA damage and cancer cell migration. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 13, n. 1, p. 347, 2013.

TOMAINO, A.; CIMINO, F.; ZIMBALATTI, V.; VENUTI, V.; SULFARO, V.; DE PASQUALE, A.; SAIJA, A. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. **Food chemistry**, v. 89, n. 4, p. 549–554, 2005.

WANG, D.; LIPPARD, S. J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. **Nature reviews Drug discovery**, v. 4, n. 4, p. 307, 2005.

WINK, M. Introduction. **Annual plant reviews**, p. 1–20, 2018.

WONG, P. Y. Y.; KITTS, D. D. Studies on the dual antioxidant and antibacterial properties of parsley (*Petroselinum crispum*) and cilantro (*Coriandrum sativum*) extracts. **Food chemistry**, v. 97, n. 3, p. 505–515, 2006.

YAN, X.-T.; LI, W.; SUN, Y.-N.; YANG, S.-Y.; LEE, S.-H.; CHEN, J.-B.; JANG, H.-D.; KIM, Y.-H. Identification and biological evaluation of flavonoids from the fruits of *Prunus mume*. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 24, n. 5, p. 1397–1402, 2014.

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.

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

### **Marcos Vinícios Faleiro**

Universidade Estadual de Goiás – Campus  
Ipameri  
Ipameri – Goiás

### **Wesley Costa Silva**

Universidade Federal de Uberlândia – Campus  
Umuarama  
Uberlândia

### **Mateus de Sousa Mendes Alves do Nascimento**

Universidade Estadual de Goiás – Campus  
Ipameri  
Ipameri – Goiás

### **Alcione da Silva Arruda**

Universidade Estadual de Goiás – Campus  
Ipameri  
Ipameri – Goiás

### **Nivaldo Estrela Marques**

Universidade Estadual de Goiás – Campus  
Ipameri  
Ipameri – Goiás

**RESUMO:** A demanda por plantas medicinais vem aumentando cada vez mais nos últimos anos. No Brasil, a maior parte das plantas medicinais comercializadas ainda são provenientes do extrativismo, ou seja, da coleta das plantas que nascem espontaneamente nas matas e pastagens. No entanto, geralmente, essas plantas desidratadas têm qualidades

insatisfatórias como baixos teores de princípios ativos e apresentam sinais de deterioração. O consumidor está se tornando exigente, sendo importante, para quem deseja ingressar nesse mercado, seguir o caminho da qualidade da produção de modo a atender as exigências desse consumidor. Tais produtores devem ter em mente que produzir plantas medicinais em larga escala requer um planejamento cuidadoso desde o início da produção até a qualidade final do produto.

**PALAVRAS-CHAVE:** Horto, manejo, medicamento, tratamento.

**ABSTRACT:** The demand for medicinal plants is increasing more and more in recent years. In Brazil, most of the medicinal plants sold are still arising from the extraction, i.e., the collection of plants that grow spontaneously in the Woods and pastures. However, often, these plants have unsatisfactory qualities as dehydrated low levels of active principles and show signs of deterioration. The consumer is becoming demanding, being important, for those who want to enter this market, follow the path of production quality in order to meet the requirements of that consumer. Such producers should keep in mind that produce medicinal plants on a large scale requires careful planning from the start of production until the final quality of the product.

**PALAVRAS-CHAVE:** Garden, management,

medicine, treatment.

## 1 | INTRODUÇÃO

Atualmente o consumo de fitoterápicos cresce em todo o mundo. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) revela que aproximadamente 80% da população mundial faz uso de algum tipo de planta na busca de alívio de alguma sintomatologia dolorosa ou desagradável. Deste modo, a utilização de plantas medicinais, tem inclusive gerado incentivos da própria OMS (RODRIGUES, 2004).

Denomina-se planta medicinal aquela que acarreta em um ou em vários de seus órgãos (folhas, caule, flores e raízes) substâncias utilizadas com finalidade terapêutica, as quais são conhecidas como 'princípio ativo'. Estes incluem alcaloides, mucilagens, flavonoides, taninos, cumarinas, óleos essenciais, entre outros (CARVALHO, 2015).

Plantas medicinais, com suas eficiências terapêuticas avaliadas, estão cientificamente permitidas a serem utilizadas pela população nas suas necessidades básicas de saúde, em função da facilidade de acesso, do baixo custo e da compatibilidade cultural com as tradições populares. As plantas medicinais são classificadas como produtos naturais, deste modo a lei permite que sejam comercializadas livremente, além de poderem ser cultivadas por aqueles que disponham de condições mínimas necessárias (RODRIGUES, 2004).

Entretanto, as plantas medicinais comercializadas no Brasil ainda é baixa, devido problemas como: teor de princípio ativo menor do que o recomendado ou esperado; presença de elementos estranhos; falsificações; e presença de resíduos de agroquímicos. O cultivo dessas plantas com critérios e cuidado, surge como importante alternativa para evitar tais problemas e contribuir com o aumento da qualidade do material produzido, comercializado e utilizado no cuidado da saúde (CARVALHO, 2015).

Assim, visto que o bioma do Cerrado é considerado a segunda maior biodiversidade do planeta e detentor de espécies muito difundidas na medicina popular, graças as suas propriedades medicinais, é essencial a preservação destas espécies. Por este motivo, é que trabalhos de difusão e resgate do conhecimento de plantas medicinais tem sido realizados cada vez mais, principalmente nas áreas mais carentes (SILVA et al., 2011).

Segundo SILVA et al. (2016) em trabalho de extensão, sobre a utilização de plantas medicinais pela comunidade periférica do município de Ipameri-Goiás, observaram-se que as pessoas, têm o hábito de utilizarem plantas medicinais, e que a obtenção dessas plantas e seu conhecimento, são bastantes variáveis. O trabalho ainda reforça, apresentando as espécies mais utilizadas e relatam a oportunidade de produção e comercialização de plantas medicinais.

Deste modo, o presente trabalho teve como intuito a orientação e incentivo

ao uso, cultivo e manejo correto de plantas medicinais, aperfeiçoando aspectos de segurança, eficácia e qualidade destes produtos, além disso, a disponibilização de banco de dados com as informações sistematizadas oriundas do projeto. Associado a esses objetivos, realização de atividades e eventos abertos a toda a comunidade acadêmica e comunidade regional orientando sobre a prática da fitoterapia tradicional associado a adoção de procedimentos sustentáveis.

O Horto Medicinal mantido no Câmpus Ipameri tem permitido estudos que servirão como orientação para a população do uso correto de plantas medicinais. Além disso, o material biológico vai atender a demanda das pesquisas do Grupo BioGen Cerrado, visando aprimorar os conhecimentos sobre as plantas medicinais sua utilização pela população, bem como a descoberta de novos potenciais fitoterápicos.

## **2 | CULTIVO DO HORTO MEDICINAL**

### **2.1 Local**

A área escolhida para implantação do horto medicinal deve ser próxima a locais com água de qualidade e em abundância, sendo distante de esgotos, fossas e chiqueiros. É importante que o terreno tenha exposição ao sol, principalmente no período da manhã, além disso, é fundamental que o local seja próximo a moradia do proprietário ou pessoa física responsável do horto.

### **2.2 Solo**

É importante conhecimentos preliminares das características do solo que irá ser utilizado para implantação do Horto Medicinal. Deste modo, é interessante a realização da análise de solo em laboratório especializado, para que possa ter, posteriormente, uma recomendação de correção do solo e adubação. Uma das alternativas para correção do solo é o uso de calcário que vem se demonstrando eficiente sobretudo em solos com características dessa região do Cerrado.

De modo geral, o solo preferencial deve ser leve e fértil, o qual permita um bom enraizamento das espécies escolhidas. Ademais, sabe-se que as características físicas, químicas e biológicas também podem apresentar resultados mais satisfatórios quando é aplicado um manejo adequado.

A adubação orgânica pode ser outra alternativa viável, uma vez que se caracteriza por trazer como benefício ao solo, o aumento dos nutrientes disponíveis, e contribuição eficiente na retenção da umidade.

### **2.3 Preparo do solo**

Inicialmente faz-se uma limpeza geral da área, removendo vegetações nativas, pedras e obstáculos que possa comprometer a condução do Horto Medicinal. Após

revolve-se o solo utilizando como ferramentas enxadão, pá ou arado (mecanizado ou tração animal).

A declividade do terreno é um fator de grande importância que deve ser levado em consideração quanto ao planejamento e distribuição das espécies, uma vez que pode haver influência na implantação do Horto Medicinal. Canteiros devem ser levantados de forma horizontal à declividade do terreno.

Recomenda-se que os canteiros apresentem as seguintes dimensões: 1 a 1,2 m de largura e 0,2 m de altura e que haja um espaçamento em torno de 0,60 m entre canteiros, para que possa facilitar a circulação de pessoas responsáveis pela manutenção do Horto. Para plantio das espécies, as covas precisam ter dimensões de 30x30x30 cm (comprimento, largura e profundidade).

É importante pontuar ainda, que torna-se necessário no ambiente de cultivo, existir um espaço apropriado para condução da sementeira. Nesta a terra deve ser fofa, onde as sementes possam ser cobertas com areia ou terra fina bem peneirada.

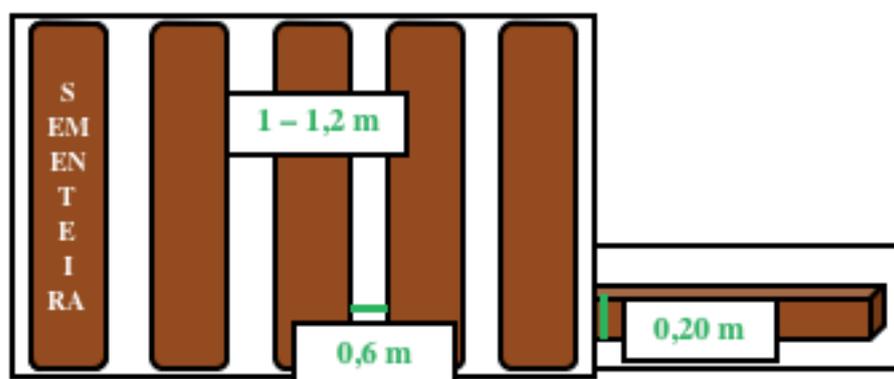


Figura 1. Modelo de canteiros para utilização em Horto Medicinal.

## 2.4 Adubação

Dentre os fatores que podem interferir na composição química de uma planta, a nutrição é um dos pontos que merece mais destaque. Uma vez que nas plantas medicinais o objetivo principal é atingir o seu potencial máximo de principio ativo, a adubação tem importância indispensável na implantação de um Horto Medicinal.

Os adubos tem ação diferente na planta. Sabe-se que a adubação nitrogenada tem papel importante no aumento da produção no momento da colheita em plantas das quais se aproveitam as folhas e as inflorescências, e as adubações fosfatadas e potássicas são particularmente importantes para as partes subterrâneas (rizomas, raízes, bulbos e etc).

As adubações devem ser direcionadas afim de disponibilizar o adubo no momento ideal de absorção para planta. A aplicação de N, é fundamental no período do crescimento vegetativo da espécie cultivada, sendo relevante o parcelamento da adubação, visto que contribui para redução na perda no nutriente por volatilização, lixiviação e desnitrificação.

A adubação bem equilibrada é a chave para a obtenção de plantas mais resistentes a pragas e doenças e também com maiores teores de fármacos, sem comprometer a produção de massa verde.

Tem como exemplo de adubação em canteiros e sementeiras de Horto Medicinal: 150 g de calcário/m<sup>2</sup>; 3 a 5 kg de esterco bovino curtido por m<sup>2</sup>; 2 a 3 litros de cama de frango por m<sup>2</sup>; e 2 litros de húmus.

## 2.5 Covas

São utilizadas para espécies arbustivas, trepadeiras e arbóreas. Normalmente nas dimensões de 30 cm x 30 cm x 30 cm, nos espaçamentos de 3 m entre plantas e 4 m entre linhas, sendo este espaçamento variável dependendo do crescimento da planta.

## 2.6 Cobertura morta

É recomendada a utilização de cobertura morta visto que tal prática melhora a retenção de água; retarda ou impede o surgimento de plantas invasoras; evita a exposição direta do solo à radiação solar e ao impacto das gotas de chuvas. Além de reduzir o contato direto das folhas com o solo. Assim se recomenda coberturas mortas com casca de arroz, capim seco (sem sementes), casca de café, entre outras.

## 2.7 Plantio

Uma vez corrigido, adubado e feito o preparo do solo, passa-se ao preparo das covas, canteiros e sulcos. É importante a observação da planta para melhor adequação do local de plantio, já que há regras fixas para a grande parte das espécies.

## 2.8 Pragas e doenças

O uso de produtos sintéticos (agrotóxicos) é dispensável para o cultivo de espécies medicinais, visto que não possui produto registrado para estas espécies, e por seus resíduos tóxicos poderem alterar os princípios ativos, porém, as plantas medicinais normalmente apresentam alta resistência ao ataque de doenças e pragas, mas, por algum desequilíbrio, este pode ocorrer em níveis prejudiciais. Deste modo, é fundamental a busca de alternativas para evitar o uso de produtos tóxicos.

As principais pragas encontradas são: ácaros, besouros, cochonilhas, formigas, lagartas, percevejos, pulgões, lesma e nematoides. E tem como principais doenças, fungos, bactérias e vírus. Deste modo, para evitar o aparecimento destes, tem como estratégia de controle as práticas de: seleção de área de cultivo; manejo do solo; rotação de culturas; consórcio de espécies; plantio na época correta; usar sementes, mudas e estacas de plantas saudáveis; plantio no espaçamento adequado; adubação equilibrada; destruição de restos culturais; aração do solo; poda ou desbaste; irrigação; cultura armadilha; destruição natural; uso de armadilhas; feromônios; liberação, proteção e

fomento dos inimigos naturais; entre outros.

Algumas plantas em consórcio podem ser benéficas ou prejudiciais, deste modo segue abaixo alguma destas associações.

- Alfavaca: seu cheiro repele mosca e mosquitos. Não deve ser plantadas perto de arruda.
- Funcho: em geral não se dá bem com nenhuma outra planta.
- Alecrim: mantém afastados a borboleta-da-couve e a mosca-da-cenoura.
- Arnica brasileira: inibe a germinação de sementes de plantas daninhas.
- Tomilho: seu aroma mantém afastada a borboleta-da-couve.

Outra estratégia é a utilização de extratos naturais, utilizando como macerado de samambaia; macerado curtido de urtiga; mistura de álcool e fumo; mistura querosene, sabão e macerado de fumo; entre outros.

## 2.9 Irrigação

Folhas de plantas mais sensíveis quando murchas ou caídas indicam necessidade de água. Não irrigar por aspersão espécies sensíveis ao ataque de doenças, pois a umidade estimulara a proliferação de fungos e bactérias. A prática de cobertura morta contribui para redução da evaporação da água.

## 2.10 Colheita

Atingindo o ponto de colheita, que deve preferencialmente, coincidir com o maior teor de princípio ativo da espécie medicinal, recomenda-se esta prática seja realizada com o tempo seco, de preferência no período da manhã. Não se recomenda, executá-la com água sobre as partes, por exemplo, com o orvalho da manhã.

Definir o momento ideal da colheita também o órgão da planta a ser colhido, o estágio de desenvolvimento, a época do ano e a hora do dia, acaba por se tornar um grande desafio. Algumas sugestões de recomendação de colheita podem ser encontradas na Tabela 1.

Parte colhida	Ponto de colheita
Casca e entrecasca	Quando um estiver florida
Flores	No início da floração
Frutos e sementes	Quando maduros
Raízes	Quando a planta estiver adulta
Talos e folhas	Antes do florescimento

**Tabela 1.** Recomendações de colheita

(Atualizado Rodrigues, 2004)

O consumo de plantas medicinais frescas garante uma ação mais eficaz dos poderes curativos nelas presentes, embora isso nem sempre seja possível, o que torna a secagem um método de conservação eficaz quando bem conduzido.

O aproveitamento adequado dos princípios ativos de uma planta exige o preparo correto, ou seja, para cada parte a ser usada, grupo de princípio ativo a ser extraído ou doença a ser tratada, existe forma de preparo e uso mais adequado.

A secagem, em virtude da evaporação de água contida nas células e nos tecidos das plantas, reduz o peso do material. Por essa razão, promove aumento percentual de princípios ativos em relação ao peso do material.

### 3 | PLANTAS MEDICINAIS COM IMPORTÂNCIA FARMACOLÓGICA CULTIVADAS EM IPAMERI, GOIÁS

#### 3.1 Alecrim

**Nome popular:** Alecrim, alecrim verdadeiro, alecrim do sul, rosmaninho, flor-de-olimpio, alecrim-de-cheiro, alecrim-de-jardim.

**Nome científico:** *Rosmarinus officinalis* L.

**Família:** Lamiaceae.

**Partes utilizadas:** Folhas e flores.

**Descrição:** Planta de origem européia, na qual possui porte subarborescente lenhoso, ereto, pouco ramificado, de até 1 m de altura. Apresenta folhas finas e aromáticas, medindo 1,5 a 4 cm de comprimento por 1 a 3 mm de espessura. Suas flores são azuladas, pequenas e cheirosas. Planta amplamente distribuída por todo o mundo.

**Indicações e ação farmacológica:** Sua atividade está relacionada a seu óleo essencial e seus compostos fenólicos antioxidantes. Utilizado como estimulante digestivo, para a falta de apetite; contra azia; problemas respiratórios e debilidade cardíaca. Por suas virtudes tônicas e estimulantes, atua sobre o sistema nervoso (cansaço mental) e cansaço físico. É anti-séptico\*, colagogo\*, diurético\*, anti-espasmódico\* (uso interno: vesícula e duodeno), cicatrizante (uso externo), colerético\*, protetor hepático\*, anti-tumoral\*, anti-depressivo\* natural, carminativo\* e vasodilatador\*. Externamente atua como estimulante do couro cabeludo e tem ainda ação anticapa e previne a queda de cabelo.

**Contra indicação:** Utilizado em altas dosagens pode ser tóxico. Pode causar aborto, sonolência, espasmo, gastroenterite, irritação nervosa e em grandes doses até a morte.

**Preparo e uso:**

Uso interno: Infuso = 20 g de planta em 2 litros de água, tomar 2 a 3 xícaras ao dia. Uso externo: Infuso a 5%.



**Figura 2.** Planta Medicinal: Alecrim

### 3.2 Arruda

**Nome popular:** Arruda, arruda de jardins, arruda doméstica, arruda fedorenta.

**Nome científico:** *Ruta graveolens* L.

**Família:** Rutaceae.

**Partes utilizadas:** Folhas e raízes.

**Descrição:** Planta aromática, pequena, com altura de até 90 cm, e muito ramificada. Suas folhas são compostas, pinadas, de folíolos lisos e de cor verde-azulada. As flores são pequenas, amareladas, dispostas em corimbos terminais. Produz óleo essencial amarelo-esverdeado, de sabor amargo e odor desagradável.

**Indicações e ação farmacológica:** Empregada na medicina popular principalmente em crianças contra o mal olhado, como também em desordens menstruais, inflamações na pele, câimbras, dor de ouvido e dente. Ação febrífuga\*, emenagoga\*, abortiva, antirreumática\*, antiparasitária\*, espasmolítica\*, fotossensibilizante\*, cicatrizante, anti-inflamatória\*, antiulcerogênica\*, anti-helmíntica\* e sudorífera\*.

Além destes, a arruda pode ser utilizada no tratamento de piolhos e outros parasitas.

**Contra indicações:** Não há causas de toxicidade dentro das dosagens recomendadas.

**Preparo e uso:**

- O sumo é obtido espremendo-se as folhas, no qual serve para aliviar a dor de ouvido.

- Prepare o chá, por infusão, a partir de uma colher de folhas picadas em uma xícara de água fervendo. Deixe mornar e use a dose de duas xícaras por dia, até obter resultados positivos no tratamento. Serve para regular a menstruação.

- As folhas trituradas servem para lavar feridas. Em maceração, deixe de 4 a 6 g de folhas frescas ou de 2 a 3 g de folhas secar numa xícara com água fria, durante um período de 6 a 12 horas. Beber duas vezes ao dia.



**Figura 3.** Planta Medicinal: Arruda

### 3.3 Bálsamo

**Nome popular:** Bálsamo, pau-de-bálsamo, balso, cabraiba, óleo-vermelho, cabureiba, pau-vermelho, bálsamo-de-cotiledon.

**Nome científico:** *Cotyledon orbiculata* L.

**Família:** Crassulaceae.

**Partes utilizadas:** Folhas.

**Descrição:** Em termos práticos, “bálsamo” é uma palavra que designa de forma genética as plantas que possuem composição carnuda.

**Indicações e ação farmacológica:** É indicada para bronquite crônica, diabetes, frieira, inflamação (gastrointestinal, pele), proteger contra úlcera, erisipela\*, afecção, aparelho respiratório e urinário, queimadura. Tendo propriedades medicinais analgésica, antiinflamatória, cicatrizante, digestivo, emoliente\* e vermífuga.

**Contra indicações:** Quando consumida por mulheres gestantes e crianças.

**Preparo e uso:**

- ao natural, sob a forma de saladas, sem tempero: inflamações gástricas, protetora contra úlcera, erisipela, afecções do aparelho respiratório e urinário.
- óleo: diabetes, bronquite crônica, queimaduras, frieiras.
- sumo: pele inflamada.
- suco: 10 folhas batidas no liquidificador com 1,5 copos de água. Tomar meio copo antes do café da manhã.
- folhas maceradas: eliminar verrugas;
- infusão das folhas: gota, dores de cabeça e de dente, vermes intestinais.
- cataplasma das folhas: dores de ouvido, inflamações e outros problemas de pele como eczema e acne.



### 3.4 Boldo Nacional

**Nome popular:** Falso-boldo, boldo nacional, boldo da terra, hortelã homem, boldo africano, boldo sete-dores, boldo do Brasil, boldo silvestre, plectranthus, cóleo, alumã, boldo do Chile.

**Nome científico:** *Plectranthus barbatus* Andrews.

**Família:** Lamiaceae.

**Partes utilizadas:** Folhas.

**Descrição:** Trata-se de um arbusto aromático perene, de ramos eretos e sub-lenhosos, que atinge de 1,0 a 1,5 m de altura. As folhas são ovado-oblongas, pilosas e grossas com bordos denteados. As flores de coloração azulada crescem em racemos (espigas) que surgem na estação chuvosa.

**Indicações e ação farmacológica:** É utilizada como planta medicinal, com propriedades analgésica e antidiarréica\*.

**Contra indicações:** Gestantes, lactantes, crianças, pessoas com hipertensão, hepatites, obstrução das vias biliares e uso de medicamentos para o sistema nervoso central.

Doses do chá deste vegetal acima das recomendadas e utilizadas por um período maior que o recomendado podem causar irritação gástrica.

**Preparo e uso:**

Boldo nacional é utilizado na medicina popular brasileira e também extrato fresco e alcoólico.

Para uso interno do chá é preparado com 2 folhas frescas de boldo e água fervente. Este chá deve ser consumido duas vezes ao dia.

Para uso externo 20 g de planta fresca em 100 mL de etanol a ser dissolvido. 20-40 gotas de tintura 3 vezes ao dia, administrado externamente.



Figura 5. Planta Medicinal: Boldo nacional

### 3.5 Capim Cidreira

**Nome popular:** Capim-catinga, capim-cheiroso, capim-cidrão, capim-cidrillo, capim-cidreira, capim-cidró, capim-ciri, capim-de-cheiro, capim-marinho, capim-

membeca, capim-santo, erva-cidreira, falsa-erva-cidreira, grama-cidreira, patchuli, palha camelo, capim da lapa, citronela, belgata, belgate, capim-membeca, esquenanto e chá de caxinde.

**Nome científico:** *Cymbopogon citratus* L.

**Família:** Poaceae.

**Partes utilizadas:** Folhas, rizoma e raízes frescas ou secas.

**Descrição:** Como seu nome diz, é uma capim que cresce em touceiras vigorosas, até cerca de um metro de altura, possuindo rizomas curtos e nós bem demarcados. Folhas alongadas com limbo foliar linear e áspero nas duas faces e nervuras principais paralelas, sendo a central mais grossa e recoberta por fina camada de cera. A touceira é formada por numerosas brotações, que fazem que ela se alargue rapidamente. Não se observa floração e por isso também não há sementes. A reprodução é feita facilmente dividindo-se as touceiras, formando cada brotação uma nova muda.

**Indicações e ação farmacológica:** ansiedade, aumentar o sono, catarro, cefaleia, cólicas menstruais e intestinais, conjuntivite, contusões, diarreia, diminui atividade motora, distúrbio renal, dor de cabeça, dor estomacal, dor muscular, eczemas\*, entorse\*, espasmo\*, espasmo intestinal, estômago, febre, feridas, gases, indigestão, nervosismo, celulite, resfriado, stress, tensão, úlceras, poros dilatados, acne, manchas e sardas.

**Contra indicações:** Não possui efeitos colaterais referidos na literatura, desde que respeitadas as doses recomendadas.

**Preparo e uso:**

Chás preparados como infusão a 2% (5 g/250 mL de água). 250 mL à noite para insônia. Chegando 1.000 mL ao dia para ansiedade, nervosismo ou outras indicações.



**Figura 6.** Planta Medicinal: Capim cidreira

### 3.6 Erva Cidreira

**Nome popular:** Erva cidreira, sálvia-da-gripe, erva-cidreira-de-campo, alecrim-do-campo, salsa-brava, salva, salva limão, lípia.

**Nome científico:** *Lippia Alba* (Mill.) NE Br.

**Família:** Verbenaceae

**Partes utilizadas:** Folhas frescas ou secas e rizomas.

**Descrição:** Geralmente forma touceiras baixas e ramos finos e longos que

dobram para o chão, no qual tem a propriedade de produzir raízes nos ramos, quando estes tocam o solo. As folhas são bem verdes, simples e ásperas, crescem aos pares, opostas, onde na base delas aparecem os tufos de flores lilases.

**Indicações e ação farmacológica:** o chá ou xarope das folhas com mel é utilizado contra gripes e tosse. O chá das folhas é útil para acalmar crianças e dar sono. Dizem que o chá fortalece o cérebro e os nervos, a memória e contra o histerismo\*. Planta antiespasmódica\* e estomáquica\*. Ação em cólicas menstruais.

**Contra indicações:** Pessoas com pressão baixa devem evitar o consumo desse chá. Além disso, é importante resaltar que o consumo deve seguir as posologias indicadas, caso contrário, pode causar irritação gástrica.

**Preparo e uso:** Coloque a água em um recipiente e leve ao fogo para ferver. Enquanto isso, coloque as folhas em uma xícara. Quando começar a ferver, desligue o fogo e jogue a água por cima das folhas. Deixe a xícara tampada, deixando o chá descansar por aproximadamente 10 minutos em infusão. Depois desse período, basta coar e consumir.

A dose indicada varia de acordo com a idade, sendo ideal 35 mL 3x ao dia para crianças entre 3 e 7 anos, até os 12 anos, 75 mL também 3x ao dia, acima dos 12 anos, 150 mL, e para maiores de 70 ano, 75 mL.



**Figura 7.** Planta Medicinal: Erva cidreira

#### 4 | GLOSSÁRIO

**Antidispéptica:** Medicamento que combate a dispepsia.

**Anti-depressivo:** Que atenua ou evita a depressão ou estimula o ânimo de alguém em depressão.

**Antiespasmódico:** Inibe a motilidade da musculatura visceral.

**Anti-helmíntico:** Também conhecidos como parasiticida, vermícidias ou vermífugos, constituem uma medicação utilizadas no tratamento de diferentes parasitoses.

**Anti-inflamatório:** É uma substância ou medicamento que combate a inflamação de tecidos.

**Antiparasitária:** Medicamento utilizado contra parasitas.

**Antirreumática:** Que previne ou trata o reumatismo.

**Antiséptico:** Se refere a tudo o que for utilizado no sentido de degradar ou inibir a proliferação de micro-organismos presentes na superfície da pele e mucosas.

**Antitumoral:** Que impede o desenvolvimento de tumores.

**Antiulcerogênica:** Substância ou medicamento utilizado no tratamento de úlceras gástricas e pépticas.

**Carminativo:** Substâncias que agem impedindo gases intestinais.

**Colagogo:** Medicamento utilizado para contrair a vesícula biliar, estimulando a evacuação da biliar do canal colédoco para o intestino, facilitando assim a digestão de alimentos gordurosos.

**Colerético:** São grupos de plantas que aumentam a quantidade de biliar segregada pelo fígado que fica armazenada na vesícula biliar, até que a passagem dos alimentos provoque o seu esvaziamento para o intestino.

**Diurético:** São fármacos que atuam no rim, aumentando o volume e o grau do fluxo urinário.

**Eczema:** Doença inflamatória da pele. É uma doença que pode surgir tanto em indivíduos normais como atópicos.

**Emenagoga:** Toda substância que facilita ou aumenta o fluxo menstrual.

**Entorse:** Lesão observada nos tendões e/ou ligamentos presentes numa articulação, normalmente, ocasionada por uma distensão.

**Erisipela:** Medicamentos que trata infecções cutâneas que atinge a camada superficial da pele.

**Emoliente:** Hidrata a pele e restaura a oleosidade perdida devido ao ressecamento da pele.

**Espasmo:** Contração involuntária, não ritmada, de um ou vários músculos, podendo ocorrer isolada ou continuamente, sendo dolorosa ou não.

**Espasmolítica:** Medicamento utilizado para tratar os espasmos.

**Estomáquica:** Promove a atividade funcional do estômago.

**Febrífuga:** Medicamento que combate a febre.

**Fotossensibilizante:** Grupo de substâncias que tornam a pele e mucosas mais sensíveis à luz ou às radiações ultravioletas.

**Histerismo:** Forte manifestação de descontrole emocional.

**Protetor hepático:** Protetor do fígado.

**Sudorífera:** Que pode provocar suor.

**Vasodilatador:** Aumenta o calibre dos vasos, alongando suas fibras musculares.

## REFERÊNCIAS

AZEVEDO, C. D.; MOURA, M. A. Cultivo de plantas medicinais. Niterói: (Programa Rio Rural. Manual técnico; 27) 2010. 19 p.

CARVALHO, L. M. Orientações técnicas para o cultivo de plantas medicinais, aromáticas e condimentares. Circular Técnica 70, Aracaju, 2015.

COSTA, M. C. C. D. Uso popular e ações farmacológicas de *Plectranthus barbatus* Andr. (Lamiaceae): revisão dos trabalhos publicados de 1970 a 2003. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Borucatu, v. 8, n. 2, p. 81-88, 2006.

COSTA, L. L.; FERNANDES, F. H.; SILVA, R. P.; ZUCCHI, M. R. Estudos etnobotânicos de plantas medicinais em campos cerrados de Ipameri (GO). In: III Seminário de Iniciação Científica e da I Jornada de Pesquisa e Pós-Graduação da UEG, 2005, Anápolis, GO, 2005.

PENTEADO, J. G.; CECY, A. T. Alecrim *Rosmarinus officinalis* L. Labiatae (Lamiaceae) uma revisão bibliográfica. Brasília, 2005. Disponível em: <[http://www.unieuro.edu.br/sitenovo/revistas/downloads/farmacia/cenarium\\_02\\_02.pdf](http://www.unieuro.edu.br/sitenovo/revistas/downloads/farmacia/cenarium_02_02.pdf)> Acesso em: 9 jan. 2018. Trabalho de conclusão de curso. Fundação Educacional do Município de Assis – FEMA – Assis, 2014.

RIBEIRO, C. S. P. Determinação espectrofotométrica de flavonoides totais presente nas folhas de arruda (*Ruta graveolens* L.). Fundação Educacional do Município de Assis, 2014.

RODRIGUES, V. G. S. Cultivo, uso e manipulação de plantas medicinais. Embrapa, documentos 91, Porto velho, 2004. 30 p.

SILVA, G. A.; ISHIKAWA, T. SILVA, M. A. Projeto de implantação do horto de plantas medicinais da faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2011.

SILVA, L. Conheça os benefícios do alecrim: erva marcante também conhecida como rosmarinos. Produtos Naturais, 2016. Disponível em: <<http://produtosnaturais.info/alecrim-rosmarinos/>> Acesso em: 16 jan. 2018.

SILVA, W. C.; FERREIRA, A. A. S.; MARTINS, A. S.; COSTA, M. B. T.; ARRUDA, A. S. Utilização de plantas medicinais pela comunidade periférica do município de Ipameri, Goiás. In: II Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão da UEG, Inovação: Inclusão social e direitos. Pirenópolis, 2016.

SILVA, M. C. F.; JUNIOR, R. S. S. Projeto plantas medicinais – cartilha informativa. Itaipu Binacional, 2012. Disponível em: <[http://www.cultivandoaguaboa.com.br/sites/default/files/iniciativa/BX\\_cartilha\\_15x21cm.pdf](http://www.cultivandoaguaboa.com.br/sites/default/files/iniciativa/BX_cartilha_15x21cm.pdf)> Acesso em: 9 jan. 2018.

STEFFEN, P. C. J. Plantas medicinais – usos populares tradicionais. Instituto Anchietano de Pesquisas/UNISINOS, 2010. Disponível em <<http://www.anchietano.unisinis.br/publicacoes/botanica/avulsas/clemente.pdf>> Acesso em: 10 jan. 2018.

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

### **Daiane Cristina Sass**

Professora do Instituto de Biociências de Rio Claro – UNESP.

e-mail: daiane\_sass@rc.unesp.br

### **Gabrielle Vieira**

Mestre em Microbiologia Aplicada, Instituto de Biociências de Rio Claro - UNESP.

### **Jelena Purić**

Mestre em Microbiologia Aplicada, Instituto de Biociências de Rio Claro - UNESP

### **Vítor Rodrigues Marin**

Graduado em Ciências Biológicas, Instituto de Biociências de Rio Claro - UNESP

**RESUMO:** O Brasil desempenha um importante papel no agronegócio mundial, liderando a produção em várias culturas, como o maracujá-amarelo. No entanto devido a dispersão da espécie *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, causadora da bacteriose do maracujá, a produção é reduzida. A doença costuma ser controlada pelo uso de produtos químicos cúpricos e antibióticos, entretanto eles têm causado desenvolvimento de bactérias mais resistentes e um acúmulo de substâncias no ambiente que são nocivas a natureza e a saúde humana, fato que torna necessário o desenvolvimento de alternativas sustentáveis. Metabólitos secundários são apontados como possíveis alternativas já que são produtos naturais

de alta especificidade, com potencial atividade microbicida e que possuem meia-vida curta no ambiente. Neste contexto, este trabalho avaliou a potencial atividade de extratos produzidos por 47 fungos isolados de sedimentos marinhos da Antártica contra a bactéria *X. axonopodis* pv. *passiflorae*. Os resultados mostraram que 22 fungos produziram extratos que inibiram, em mais de 90%, o crescimento bacteriano. Os fungos bioativos, em sua maioria, são dos gêneros *Pseudogymnoascus* e *Penicillium*. O estudo indica que fungos de sedimentos marinhos antárticos apresentam potencial para produção de compostos bioativos no combate a bacteriose do maracujá.

**PALAVRAS-CHAVE:** Maracujá, bacteriose, metabólitos secundários, fungos.

**ABSTRACT:** Brazil plays an important role in world agribusiness, leading production in various crops, such as yellow passion fruit. However, due to the dispersion of the species *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, which causes passion fruit bacteriosis, production is reduced. The disease is usually controlled by the use of cupric chemicals and antibiotics, but they have caused the development of more resistant bacteria and an accumulation of substances in the environment that are harmful to nature and human health, which makes it necessary to develop sustainable alternatives.

Secondary metabolites are indicated as possible alternatives since they are natural products of high specificity, with potential microbicidal activity and have short half-life in the environment. In this context, this work evaluated the potential activity of extracts produced by 47 fungi isolated from marine Antarctic sediments against the bacterium *X. axonopodis* pv. *passiflorae*. The results showed that 22 fungi produced extracts that inhibited, by more than 90%, bacterial growth. Bioactive fungi, for the most part, are of the genus *Pseudogymnoascus* and *Penicillium*. The study indicates that fungi of Antarctic marine sediments present potential for the production of bioactive compounds in the fight against passion fruit bacteriosis.

**KEYWORDS:** Passion fruit, bacteriosis, secondary metabolites, fungi.

## 1 | INTRODUÇÃO

O maracujá pertence ao gênero *Passiflora*, o mais importante economicamente e que apresenta o maior número de espécies da família Passifloraceae (BERNACCI et al., 2003; NUNES e QUEIROZ, 2006). No Brasil já foram encontradas cerca de 130 espécies (CERVI et al., 2010), sendo o maracujá-amarelo ou azedo (*P. edulis*) a espécie mais cultivada no país (FREITAS, 2011; MELETTI, 2011).

Atualmente o Brasil é um dos maiores produtores de maracujá do mundo, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2013) a produção brasileira foi superior a 800.000 toneladas em 2013, cultivada em uma área de aproximadamente 60.000 hectares, destacando-se as regiões Nordeste, Norte e Sudeste como maiores produtoras do maracujá-amarelo.

O maracujá-amarelo é o mais conhecido, cultivado e comercializado devido à qualidade de seus frutos e ao seu maior rendimento industrial (FALEIRO et al., 2005). A importância econômica se dá majoritariamente pelo consumo da fruta fresca e da produção de sucos, mas há grande interesse de indústrias farmacêuticas na extração de compostos que são utilizados como calmantes, vitaminas, entre outros (ISHIDA e HALFED-VIEIRA, 2009).

Ospomares de maracujá têm sido afetados por doenças causadas por fungos, vírus e bactérias. Destacam-se: virose do endurecimento dos frutos (woodness), bacteriose (*X. axonopodis* pv. *passiflorae*) e fusariose (*Fusarium oxysporum*) (MELETTI, 2011).

A bacteriose ou mancha oleosa, causada pela bactéria *X. axonopodis* pv. *passiflorae* é uma das doenças mais severas (MUNHOZ et al., 2015) a bactéria é transmitida pela semente e a doença é caracterizada pelo aparecimento de pequenas lesões nas folhas e deixa os frutos impróprios para o consumo (Figura 1) (TORDIN, 2016).



Figura 1. Sintomas da bacteriose em folha e fruto de maracujazeiro-amarelo  
(Fonte: ISHIDA e HALFELD-VIEIRA, 2009).

No Brasil a doença foi confirmada inicialmente no final da década de 1960 na cidade de Araraquara – SP e atualmente está disseminada em todas as regiões do país onde se produz a fruta. No estado de São Paulo, devido ao clima quente e úmido, a disseminação da doença se tornou um empecilho grave no cultivo ou até mesmo na obtenção de indivíduos sadios (FALEIRO et al, 2011; ISHIDA e HALFELD-VIEIRA, 2009; NAKATANI et al, 2008).

A bacteriose, causada pela *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, costuma ser controlada pelo uso de produtos químicos (cúpricos) e de antibióticos, porém, com aplicações recorrentes, o microrganismo causador adquire resistência rapidamente e a prática muitas vezes é ineficaz, prejudicial ao meio ambiente e de alto custo (TORDIN, 2016; ECONOMOU e GOUSIA, 2015). Diante do exposto torna-se necessária a busca por novas alternativas de controle desta praga, principalmente aquelas menos nocivas ao meio ambiente e ao ser humano.

O interesse pelo emprego na agricultura de metabólitos bioativos produzidos por micro-organismos e plantas, como alternativa aos produtos químicos sintéticos e com nenhum ou mínimo impacto ambiental tem se tornado crescente nos últimos anos (DAYAN et al., 2009; FURBINO 2014; NEWMAN e CRAGG, 2016).

A obtenção de substâncias de fontes naturais é importante visto a variabilidade de tais produtos. De maneira geral, moléculas naturais apresentam estruturas mais complexas quando comparadas a compostos químicos sintéticos, além de apresentarem maior diversidade estrutural e como são frutos de um metabolismo secundário é comum que possuam diversas funções bioativas (DAYAN et al., 2009; FEHER e SCHMIDT, 2002).

Na literatura vem sendo relatados diversos estudos de atividade antibacteriana de metabólitos secundários, produzidos por micro-organismos, contra bactérias fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas* (MURATE, et al., 2015; SPAGO et al., 2014; DE OLIVEIRA et al., 2011).

Dentre os micro-organismos que tem demonstrado capacidade de combate a *Xanthomonas*, estão os isolados de ambientes extremos, como a Antártica

(DANILOVICH et al, 2018; ENCHEVA et al., 2014; SILBER et al., 2013). Estes micro-organismos podem ser fontes ricas de novos produtos naturais baseados em estruturas químicas únicas (TIAN et al., 2017; FURBINO, 2014).

Assim, considerando a necessidade atual de novas alternativas no controle da *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, que visam substituir os produtos químicos sintéticos e ao mesmo tempo minimizar danos ao meio ambiente, o presente trabalho contribui para a descoberta de novos compostos produzidos por fungos isolados de sedimentos marinhos da Antártica que apresentem potencial ação contra a bacteriose do maracujá. Para isto foi avaliada a atividade antibacteriana de extratos produzidos por fungos isolados de sedimentos marinhos da Antártica contra *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, causadora da bacteriose no maracujá.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Fungos

Os micro-organismos utilizados neste trabalho (47 fungos filamentosos) foram disponibilizados pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lara Durães Sette (UNESP, Rio Claro) e foram isolados de sedimentos marinhos coletados em diversos locais na Antártica durante a fase IV da OPERANTAR XXXIII (Janeiro de 2015) no âmbito do projeto PROANTAR/CNPq intitulado “A vida microbiana na criosfera antártica: mudanças climáticas e bioprospecção - MICROSFERA” sob a coordenação da Profa. Vivian Pellizari (IO/USP). Os micro-organismos fazem parte do acervo de fungos da coleção de pesquisa da Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM- UNESP).

### 2.2. Linhagem da *X. axonopodis* pv. *passiflorae*

A linhagem da bactéria *X. axonopodis* pv. *passiflorae* (isolado LM4a) foi isolada de maracujá azedo em Limeira/SP, este isolado foi gentilmente cedido pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Lúcia Carneiro Vieira da Esalq/USP.

### 2.3. Obtenção dos extratos brutos

Os 47 fungos foram reativados em placas de Petri contendo meio malte ágar 2% e incubados em B.O.D. a 15°C por um período de aproximadamente 10 dias para crescimento. Discos de 5 mm de ágar com micélio foram transferidos para erlenmeyers contendo 150 mL do meio líquido malte 2% e foram mantidos pelo período de 20 dias em agitação constante (150 rpm) a 15°C. Em seguida o sobrenadante foi separado da biomassa por filtração a vácuo e submetido à extração líquido-líquido com acetato de etila. A fração orgânica foi concentrada em um evaporador rotativo.

## 2.4. Avaliação da atividade antibacteriana contra *X. axonopodis* pv. *passiflorae*

A análise de atividade antibacteriana contra *X. axonopodis* pv. *passiflorae* foi realizada pelo método REMA (*resazurin microtiter assay*), que consiste em um ensaio de microtitulação com resazurina ( $C_{12}H_7NO_4$ ) (SILVA et al., 2013).

Os extratos brutos foram dissolvidos em solução 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), em seguida foram diluídos em meio NYG (0,3% extrato de levedura, 0,5% peptona bacteriológica, 2% glicerol). A concentração máxima testada foi de 3,00 mg/ml e a partir dela foi realizada microdiluição seriada até a concentração de 0,02 mg/mL. Em todas os testes a concentração de DMSO não ultrapassasse 1% (concentração do controle de veículo).

Em seguida foi adicionado o inóculo bacteriano ( $10^5$  UFC/mL). Observação: as células bacterianas foram cultivadas em meio NYG líquido a 29°C sob rotação de 200 rpm por 12 horas, até atingir a densidade ótica (DO) de 0,8 (lido no espectrofotômetro a 600 nm) que corresponde a  $10^8$  UFC/mL e fase log do crescimento da bactéria.

As placas foram incubadas a 29°C por aproximadamente 16 horas e em seguida foi adicionada uma solução de resazurina (0.1 mg/mL) para uma nova incubação a 29°C por aproximadamente 1 hora. Após este período foi realizada a medida da fluorescência através do aparelho Biotek Synergy H1MFD leitor de microplacas (comprimento de onda de excitação: 530 nm; comprimento de onda de emissão: 590 nm). O ensaio foi realizado em triplicata.

## 2.5. Avaliação da atividade bactericida

O bioensaio de atividade bactericida foi realizado por imersão de um replicador de colônia nos poços da microplaca de 96 poços do teste REMA (após a incubação a 29°C por 18h, e antes da adição de resazurina) seguido da aplicação deste em placa de Petri (150 x 15 mm) contendo meio NYG sólido. As placas foram incubadas por 48 horas a 29°C em estufa bacteriológica. O crescimento bacteriano foi analisado visualmente, e para os extratos, em que não houve o crescimento bacteriano, foi determinada a concentração mínima bactericida. O ensaio foi realizado em triplicata.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme descrito em materiais e métodos foram produzidos extratos extracelulares de 47 fungos. Estes extratos foram submetidos ao bioensaio, a fim de verificar qual dos extratos apresentava atividade antibacteriana contra a *X. axonopodis* pv. *passiflorae*. Os resultados obtidos mostraram que dos 47 extratos testados 22 apresentaram uma porcentagem média de inibição do crescimento bacteriano maior que 90% na concentração máxima testada, sendo que o isolado 5A-1C315III do

gênero *Pseudogymnoascus* apresentou a maior inibição atingindo uma média de 99% (Tabela 1).

Isolado	Gênero	Inibição do crescimento bacteriano (%)
2B-1C115IIII	<i>Pseudogymnoascus</i>	98,23
5A-1C315IIII	<i>Pseudogymnoascus</i>	99,04
4A-1C115IIII	<i>Penicillium</i>	96,24
5A-1C115II	<i>Paraconiothyrium</i>	98,35
5B-1C315IIIIA	<i>Penicillium</i>	97,50
5A-1C715IIII	<i>Pseudogymnoascus</i>	96,53
3A-1C315IIII	<i>Cadophora</i>	98,62
2A-1C115II	<i>Penicillium</i>	97,40
2A-1C1III	<i>Pseudogymnoascus</i>	98,05
6DC415I	<i>Pseudogymnoascus</i>	97,65
3A-1C215IIIIIC	<i>Cadophora</i>	98,62
2DC615IA	<i>Pseudogymnoascus</i>	95,66
5DC115I	<i>Paraconiothyrium</i>	92,88
2D-3C115IIII	<i>Pseudogymnoascus</i>	98,09
5D-3C115II	<i>Toxicocladosporium</i>	98,39
6DC215IIII	<i>Pseudogymnoascus</i>	97,58
6DC4III	<i>Pseudogymnoascus</i>	91,26
5DC1IIII	<i>Pseudogymnoascus</i>	96,87
2DC715III	<i>Penicillium</i>	94,55
5B-1C315IIIIIB	<i>Penicillium</i>	93,33
3DC615I	<i>Penicillium</i>	94,12
2D-3C115III	<i>Pseudogymnoascus</i>	95,87

**TABELA 1** - Porcentagem média de inibição do crescimento bacteriano dos 22 extratos bioativos na concentração de 3,00 mg/mL

De acordo com os dados apresentados na tabela 1 é possível verificar que a maioria dos fungos que apresentaram atividade antibacteriana contra *X. axonopodis* pv. *passiflorae* são dos gêneros *Pseudogymnoascus* (11 isolados) e *Penicillium* (6), ou outros são do gênero *Cadophora* (2), *Paraconiothyrium* (2) e *Toxicocladosporium* (1).

Estudos anteriores realizados com fungos antárticos mostraram que o gênero *Pseudogymnoascus* é comum na região (SANTIAGO et al., 2015; GODINHO et al., 2015; DING et al., 2016; GONÇALVES et al., 2015). Outras pesquisas demonstraram a capacidade destes fungos em apresentar atividade antimicrobiana contra *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Cladosporium sphaerosperum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Clavibacter michiganensis* e *Xanthomonas campestris* (FURBINO et al., 2014; HENRÍQUEZ et al., 2014; GONÇALVES et al., 2015).

Os 22 extratos bioativos foram submetidos ao bioensaio de atividade bactericida, a partir dos dados obtidos neste experimento foi possível verificar que todos os extratos apresentaram atividade bactericida, sendo que a maioria (15 isolados) mostrando atividade bactericida apenas na concentração de 3,0 mg/mL, mas 7 mostraram

atividade bactericida também na concentração de 1,5 mg/mL de extrato bruto.

Os resultados apresentados neste trabalho teve continuidade e estes extratos foram testados em outras *Xanthomonas* de interesse econômico, todos os resultados foram recentemente publicados (VIEIRA, *et al.*, 2018; PURIC, *et al.*, 2018).

#### 4 | CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que os fungos filamentosos de sedimentos marinhos da Antártica são micro-organismos com potencial para produzir compostos capazes de inibir o crescimento de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, causadora da bacteriose do maracujá. Dos 47 extratos produzidos pelos fungos isolados de sedimentos marinhos antárticos 22 produziram compostos químicos ativos contra *X. axonopodis* pv. *passiflorae*.

Os extratos bioativos foram produzidos, em sua maioria, por fungos do gênero *Pseudogymnoascus*, que é um gênero muito comum na região da Antártica, mas que ainda há pouco conhecimento sobre seus produtos naturais e suas atividades biológicas.

#### 5 | AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Proc. 2015/20629-6), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Proc. 401230/2016-3) e Pró-Reitoria de Pesquisa da UNESP pelos suportes financeiros que possibilitaram a execução deste estudo.

#### REFERÊNCIAS

BERNACCI, L. C. et al. **Passifloraceae**. In: WANDERLEY, M. G. L. et al. Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. São Paulo: FAPESP: RiMa. v.3, p.247-274, 2003.

CERVI, A. C. et al. **Passifloraceae**. In: Lista de espécies da flora do Brasil. Rio de Janeiro: Jardim Botânico, 2010. Disponível em: <floradobrasil.jbrj.gov.br>. Acesso em: 22 jan. 2011.

DANILOVICH, M. E. et al. Antarctic bioprospecting: in pursuit of microorganisms producing new antimicrobials and enzymes. *Polar Biol*, 2018.

DAYAN, F. E.; CANTRELL, C. L.; DUKE, S. O. **Natural products in crop protection**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. v. 17, p. 4022-4034, 2009.

DE OLIVEIRA, A. G. et al. **Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain**. *Biological Control*. v. 56, p.125–131, 2011.

DING, Z. et al. **Richness and bioactivity of culturable soil fungi from the Fildes Peninsula,**

- Antarctica.** *Extremophiles*, v. 20, n. 4, p. 425–435, 2016.
- ENCHEVA-MALINOVA, M. et al. **Antibacterial potential of streptomycete strains from Antarctic soils.** *Biotechnol. Biotec. Eq.* v. 28, p. 721-727, 2014.
- ECONOMOU, V.; GOUSA, P. **Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria.** *Infection and drug Resistance*, v. 8, p. 59-61, 2015.
- FALEIRO, F. G. et al. **Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro: desafios da pesquisa.** In: FALEIRO, F. G. et al. *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético.* Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p. 187- 202.
- FALEIRO, F. G. et al. **Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro – histórico e perspectivas.** Planaltina: Embrapa cerrados, Documentos 307, 2011.
- FEHER, M.; SCHMIDT, J. M. **Property Distributions: Differences between Drugs, Natural Products, and molecules from Combinatorial Chemistry.** *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, v.43, p. 218-227, 2003.
- FREITAS, J. P. X. et al. **Avaliação de recursos genéticos de maracujazeiro amarelo.** *Pesq. agropec. bras.*, v.46, p.1013-1020, 2011.
- FURBINO, L. E. et al. **Diversity Patterns, Ecology and Biological Activities of Fungal Communities Associated with the Endemic Macroalgae Across the Antarctic Peninsula.** *Microbial Ecology.* v. 67, p. 775-787, 2014.
- GODINHO, V. M. et al. **Diversity and bioprospection of fungal community present in oligotrophic soil of continental Antarctica.** *Extremophiles*, v. 19, n. 3, p. 585–596, 2015.
- GONÇALVES, V. N. et al. **Antibacterial, antifungal and antiprotozoal activities of fungal communities present in different substrates from Antarctica.** *Polar Biol.* v. 38, p. 1143-1152, 2015.
- HENRÍQUEZ, M. et al. **Diversity of cultivable fungi associated with Antarctic marine sponges and screening for their antimicrobial, antitumoral and antioxidant potential.** *World J Microbiol Biotechnol*, v. 30, p. 65-76, 2014.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Municipal, Culturas Temporárias e Permanentes.** 2013. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2013/>. Consultado em junho de 2018.
- ISHIDA; A. K. N.; HALFELD-VIEIRA, B. A. **Mancha-Bacteriana do Maracujazeiro (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*): Etiologia e Estratégias de Controle.** Belém: Embrapa Amazônia Oriental, Documentos 357, 2009.
- MELETTI, L. M. M. **Avanços na cultura do maracujá no Brasil.** *Rev. Bras. Frutic.* v. especial, p. 83-91, 2011.
- MUNHOZ, C. F. et al. **Analysis of plant gene expression during passion fruit–*Xanthomonas axonopodis* interaction implicates lipoxygenase 2 in host defence.** *Ann Appl Biol.* v. 167, p. 135-155, 2015.
- MURATE, L. S. et al. **Activity of secondary bacterial metabolites in the control of Citrus Canker.** *Agricultural Sciences*, v. 6, p. 295-303, 2015.
- NAKATANI, A. K.; LOPES, R.; CAMARGO, L. E. A. **Variabilidade genética de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*.** *Summa Phytopathol*, v. 35, n. 2, p. 116-120, 2009.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. **Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014.** J. Nat. Prod., v.79, p.629-661, 2016.

NUNES, T. S.; QUEIROZ, L. P. **Flora da Bahia: Passifloraceae. *Sitientibus*:** Série Ciências Biológicas, v.6, p.194226, 2006.

PURIC, J.; VIEIRA, G.; CAVALCA, L.B. et al. **Activity of antarctic fungi extracts against phytopathogenic bacteria.** Lett. Appl. Microbiol., v.66, p.530-536, 2018.

SANTIAGO, I. F. et al. **Lichensphere: a protected natural microhabitat of the non-lichenised fungal communities living in extreme environments of Antarctica.** Extremophiles, v. 19, n. 6, p. 1087–1097, 2015.

SILBER, J. et al. **Calcarides A–E, Antibacterial Macrocyclic and Linear Polyesters from a *Calcarisporium* Strain.** Mar. Drugs, v. 11, p. 3309-3323, 2013.

SILVA, I. C. et al. **Antibacterial activity of alkyl gallates against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.** Journal of Bacteriology, v. 195, n. 1, p. 85-94, 2013. Disponível em: <<http://jb.asm.org/content/195/1/85.long>>. Consultado em agosto de 2016.

SPAGO, F. R. et al. ***Pseudomonas aeruginosa* produces secondary metabolites that have biological activity against plant pathogenic *Xanthomonas* species.** Crop Protection, v. 62, p. 46-54, 2014.

TIAN, Y. et al. **Secondary Metabolites from Polar Organisms,** Mar. Drugs v. 15, p. 28, 2017.

TORDIN, C. **Bacteriose do maracujá é combatida com microrganismos da própria planta. Agroecologia e produção orgânica.** EMBRAPA, 2016. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/13777025/bacteriose-do-maracuja-e-combatida-com-microrganismos-da-propria-planta>.

VIEIRA, G.; PURIC, J.; MORÃO, L.G et al. **Terrestrial and marine Antarctic fungi extracts active against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.** Lett. Appl. Microbiol., v. 67, p. 64-71, 2018.

## IRIDOIDES E CUMARINAS DO CAULE DE *TOCOYENA HISPIDULA*

### **Elcilene Alves de Sousa**

Universidade Federal do Piauí – UFPI  
Teresina – Piauí

### **Mariana Helena Chaves**

Universidade Federal do Piauí – UFPI  
Teresina – Piauí

### **Luanda Ferreira Floro da Silva**

Universidade Federal do Piauí – UFPI  
Teresina – Piauí

### **Gerardo Magela Vieira Júnior**

Universidade Federal do Piauí – UFPI  
Teresina – Piauí

### **Buana Carvalho de Almeida**

Instituto Federal do Piauí – IFPI  
Parnaíba - Piauí

### **Ruth Raquel Soares de Farias**

Programa de Biodiversidade do Trópico Ecotonal  
do Nordeste – UFPI  
Teresina - Piauí

**RESUMO:** O estudo fitoquímico das frações  $\text{CHCl}_3$  e  $\text{AcOEt}$  do caule de *Tocoyena hispidula*, resultou no isolamento e identificação das cumarinas escopoletina (**1**) e isofraxidina (**2**), do noriridoide morindolídeo (**3**) e de três misturas estereoisoméricas de iridoides:  $\alpha$ - e  $\beta$ -gardiol (**4a+4b**), 10-hidroxi-1-oxo-7-irideno-11 $\alpha$ -ato de metila e 10-hidroxi-1-oxo-7-irideno-11 $\beta$ -ato de metila (**5a+5b**),  $\alpha$ -genipina e genipina (**6a+6b**). As estruturas dos compostos foram identificadas

pela análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  uni e bidimensionais e comparação com a literatura. Todos os compostos estão sendo relatados pela primeira vez na espécie.

**PALAVRAS-CHAVE:** Iridoides, cumarinas, *T. hispidula*, Rubiaceae

**ABSTRACT:** The phytochemical study of the  $\text{CHCl}_3$  and  $\text{EtOAc}$  fractions from stem of *Tocoyena hispidula* resulted in the isolation and identification of the coumarins scopoletin (**1**) and isofraxidin (**2**), noriridoid morindolide (**3**) and three stereoisomeric mixtures of iridoids:  $\alpha$ - and  $\beta$ -gardiol (**4a+4b**), 10-hydroxy-1-oxo-7-iriden-11 $\alpha$ -oic methyl ester and 10-hydroxy-1-oxo-7-iriden-11 $\beta$ -oic methyl ester (**5a+5b**),  $\alpha$ -genipin and genipin (**6a+6b**). The structures of the compounds were assigned by the basis of spectroscopic data, including two-dimensional NMR methods and comparison with the literature. All compounds are being reported for the first time in the species.

**KEYWORDS:** Iridoids, coumarins, *T. hispidula*, Rubiaceae

## 1 | INTRODUÇÃO

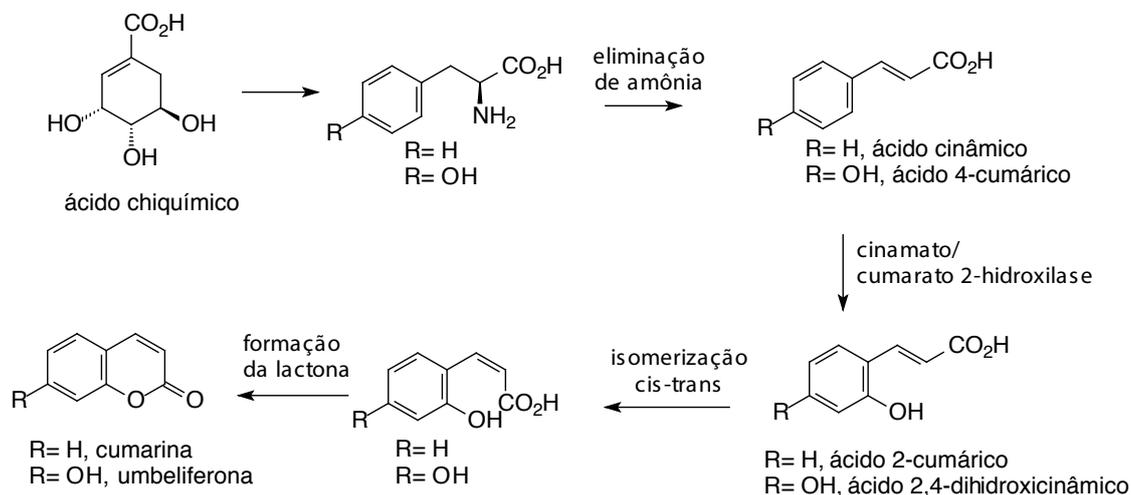
A família Rubiaceae é caracterizada como uma das mais importantes da flora brasileira, com cerca de 126 gêneros e 1411 espécies

(BARBOSA et al., 2015; BOLZANI et al., 2001). Mundialmente é considerada a quarta maior família em número de espécies entre as Angiospermas, com cerca de 650 gêneros e 13000 espécies (DELPRETE e JARDIM, 2012). É constituída pelas subfamílias Rubioideae, Ixoroideae e Cinchonoideae, as quais possuem como marcadores quimiotaxonômicos antraquinonas, iridoides e alcaloides indólicos, respectivamente (MARTINS e NUNEZ, 2015). Plantas da família são também conhecidas por metabolizar cumarinas, flavonoides, derivados fenólicos, esteroides, triterpenos, diterpenos, lignanas, saponinas e taninos (MARTINS e NUNEZ, 2015; BOLZANI et al, 2001).

O gênero *Tocoyena* (Rubiaceae) é típico do Cerrado, ocorre nas regiões pan e neotropical, sendo constituído por 30 espécies de hábito arbustivo ou árvores de pequeno porte. No Brasil há registro de 12 espécies, sendo cinco endêmicas, distribuídas nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul (OLIVEIRA, 2015). Este gênero pertence à subfamília Ixoroideae e tribo Gardenieae-Gardenineae (DELPRETE E JARDIM, 2012; POSER e SEIBT, 1998). Somente quatro espécies do gênero *Tocoyena* possuem estudo químico (*T. formosa*, *T. bullata*, *T. brasiliensis* e *T. sellowiana*, sinonímia *T. selloana*), para as quais são relatadas a presença de iridoides, flavonoides, esteroides, cumarinas, derivados fenólicos, triterpenos e saponinas triterpênicas (SANTOS et al., 2011; ROCHA, 2009; HAMERSKI et al., 2005; POSER e SEIBT, 1998; BOLZANI, et al., 1997; BOLZANI, et al., 1996).

*Tocoyena hispidula* Standl é conhecida popularmente por flor-do-cerrado/angelca e jenipapinho. É encontrada no Brasil nas regiões Norte (Pará) e Nordeste (Maranhão e Piauí) na forma de arbustos ou subarbustos. Popularmente suas raízes são utilizadas no combate a dor de barriga e inflamação do útero (SILVA, 2010; OLIVEIRA et al., 2007).

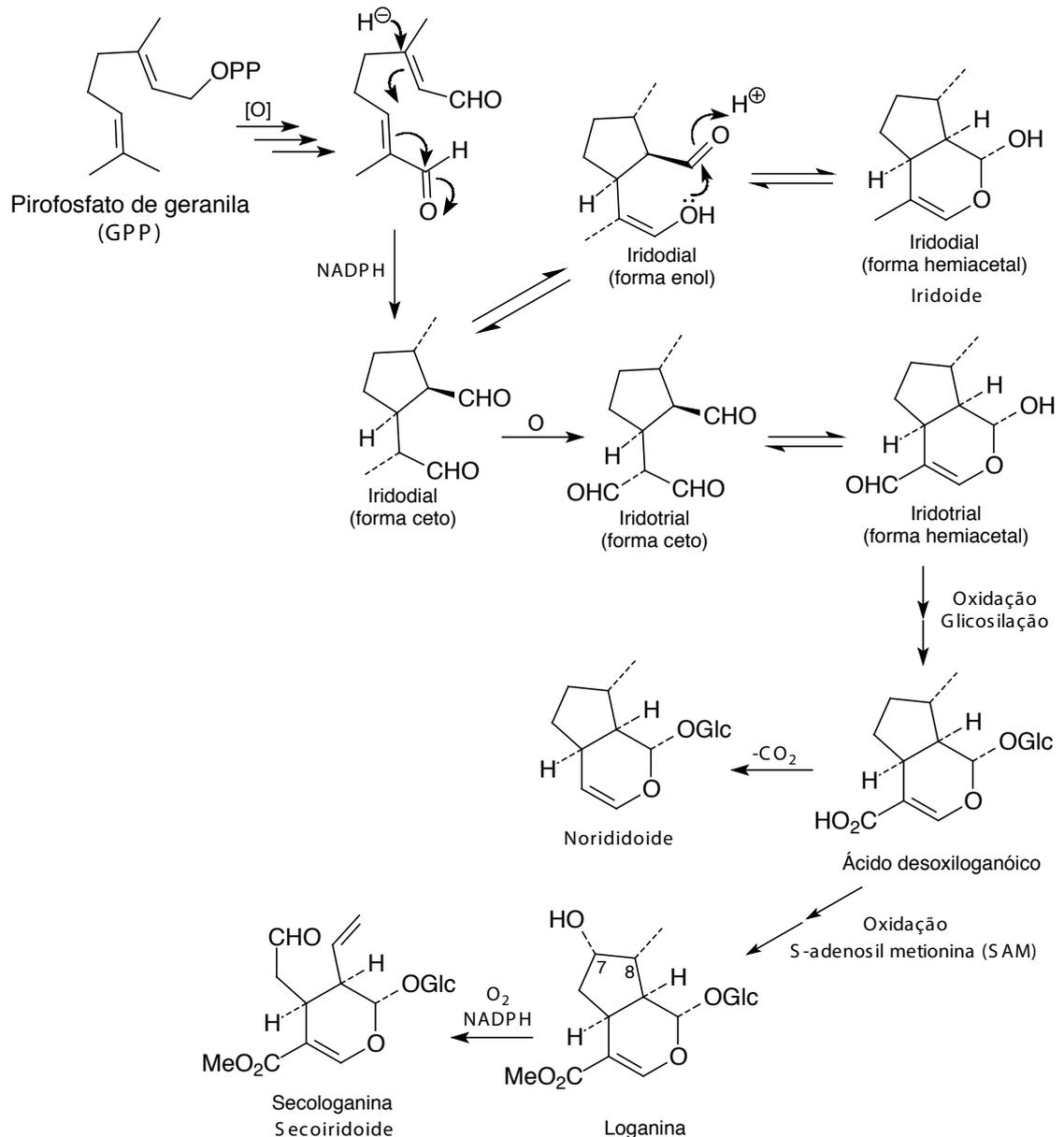
As cumarinas são amplamente distribuídas em plantas, na forma livre ou glicosilada, e comumente encontradas nas famílias Umbellifereae e Rutaceae (LI, YAO e LI, 2017; DEWICK, 2009). Estruturalmente, são benzo- $\alpha$ -pironas, biossintetizadas pela rota do chiquimato, tendo como precursor ácidos cinâmicos (Figura 1). Apresentam uma ampla variedade de atividades biológicas, tais como, anti-inflamatória, citotóxica, antibacteriana, antioxidante, anticâncer, anti-HIV e anti-Alzheimer (DETSI et al., 2017).



**Figura 1.** Biossíntese de cumarinas (Adaptado de Dewick, 2009)

Os iridoides são metabólitos secundários encontrados em uma grande variedade de plantas, especialmente na ordem das Gentianales, produzidos principalmente como defesa contra herbívoros ou infecções por microorganismos (TUNDIS et al., 2008; DINDA, DEBNATH e HARIGAYA, 2007). Exibem um amplo espectro de atividades, tais como, neuroprotetora, anti-inflamatória, imunomoduladora, hepatoprotetora, antitrombótica, hipolipidêmica, colerética, antiespasmolítica, purgativa, antitumoral e antioxidante (CARRILLO-OCAMPO, 2013; DINDA, DEBNATH e BANIK, 2011).

Os iridoides são monoterpênicos com esqueleto iridano contendo o sistema de anéis ciclopenta[C]pirano formados por uma ciclização alternativa do pirofosfato de geranila (GPP) (DEWICK, 2009). Os iridoides podem ser encontrados também como secoiridoides, caracterizados pela clivagem oxidativa da ligação C7-C8 do anel ciclopentano e como noriridoides, originados da descarboxilação oxidativa de C-10 ou C-11 (AMARAL et al., 2013). Estes compostos apresentam uma grande variedade estrutural, decorrentes dos processos de glicosilação, epoxidação, hidroxilação e esterificação com introdução de grupos metila ou derivados do ácido chiquímico (AMARAL et al., 2013; SAMPAIO-SANTOS e KAPLAN, 2001). A Figura 2 mostra a rota biossintética de iridoides.



**Figura 2.** Biossíntese de iridoídeos (Adaptado de Dewick, 2009)

O presente trabalho relata o isolamento e identificação estrutural dos iridoídeos e cumarinas obtidos das frações  $CHCl_3$  e AcOEt do extrato etanólico do caule de *T. hispidula*.

## 2 | METODOLOGIA

O caule de *Tocoyena hispidula* Standl foi coletado na fazenda Lourdes (S 04° 51' 32,4" e W 42° 03' 42,9", altitude: 154 m), no município de Jatobá do Piauí-PI, em 31 de maio de 2015. O material vegetal foi identificado pela botânica Dra. Ruth Raquel Soares de Farias e uma exsicata encontra-se depositada no Herbário Graziela Barroso da UFPI com o número TEPB 30.572.

O caule seco e moído (1,36 kg) foi submetido à maceração exaustiva com etanol (95%). O material obtido foi concentrado em evaporador rotativo e liofilizado, rendendo

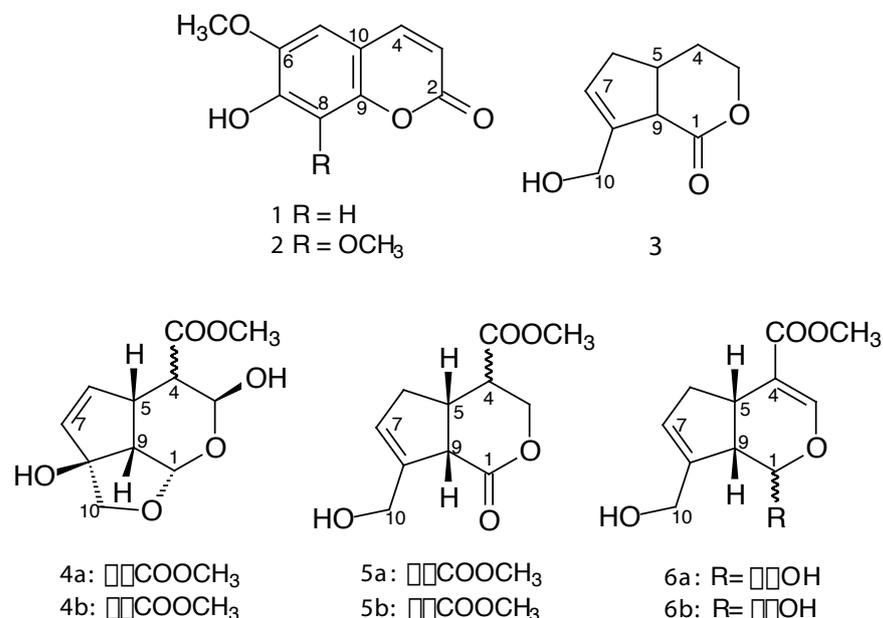
48 g (3,5%) de extrato EtOH do caule. Uma alíquota de 41 g do extrato foi solubilizada em MeOH, e a parte solúvel (36,5 g) foi submetida à cromatografia em coluna filtrante de gel de sílica, utilizando hexano, CHCl<sub>3</sub>, AcOEt e MeOH como eluentes. A fração CHCl<sub>3</sub> (2,8 g) foi submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica, eluída com hexano/AcOEt em ordem crescente de polaridade, rendendo 82 frações, que foram analisadas por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) e reunidas em 16 grupos. Os grupos CC65 (125,5 mg), CC82 (202,4 mg) e CC72 (100,7 mg) foram submetidos à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20, utilizando Hex/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:4) e CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Acetona (3:2) como eluentes, levando ao isolamento dos compostos **1** (17,8 mg), **2** (2,0 mg) e **3** (46,0 mg) respectivamente.

A fração AcOEt (2,5 g) foi aplicada em cartucho Stracta (C18, 10 g), rendendo as frações MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1, MeOH e CHCl<sub>3</sub>. A fração MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1 (1,35 g) foi submetida a cromatografia em coluna de Sephadex LH-20, utilizando MeOH como eluente, fornecendo 4 subfrações. A subfração A7 (683 mg) foi purificada em HPLC semipreparativo, utilizando coluna Phenomenex Luna (C-18, 5 μ, 250x10 mm), no modo isocrático (20% de MeOH/ACN 1:1 e 80% de H<sub>2</sub>O, λ=240 nm), fornecendo a mistura dos compostos **4a+4b** (9,2 mg), **5a+5b** (19,7 mg) e **6a+6b** (3,6 mg). A subfração A10 (285 mg) foi submetida a cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 e de gel de sílica, resultando também no isolamento de **4a+4b** (47,6 mg) e **6b** (21,0 mg).

As análises por ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono-13 (RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C) dos compostos foram realizadas em espectrômetros Bruker-modelo Avance III, operando a 400 MHz (<sup>1</sup>H) e 100 MHz (<sup>13</sup>C) e Bruker Ascend-modelo 600, operando a 600 MHz (<sup>1</sup>H) e 150 MHz (<sup>13</sup>C). Foram utilizados CDCl<sub>3</sub> ou CD<sub>3</sub>OD como solventes e TMS como referência interna.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

A filtração em coluna de gel de sílica do extrato EtOH do caule de *T. hispidula*, forneceu as frações hexânica (50 mg; 0,15%), CHCl<sub>3</sub> (2,8 g; 7,7%), AcOEt (3,6 g; 9,9%) e MeOH (26,6 g; 72,9%). A fração CHCl<sub>3</sub> depois de submetida a procedimentos cromatográficos clássicos, resultou no isolamento e identificação das cumarinas **1** e **2** e do noriridoide **3**. A fração AcOEt após ser submetida a fracionamento em cartucho C-18, coluna de Sephadex LH-20 e HPLC possibilitou isolar três misturas estereoisoméricas de iridoides: **4a+4b**, **5a+5b** e **6a+6b**. A identificação estrutural dos compostos isolados foi realizada pela análise dos espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C uni e bidimensionais (*g*HSQC, *g*COSY e *g*HMBC) e comparação com dados da literatura. A Figura 3 mostra as estruturas dos compostos identificados.



**Figura 3.** Compostos isolados do caule de *T. hispidula*.

Os espectros de RMN <sup>1</sup>H dos compostos **1** e **2** (Tabela 1) apresentaram o mesmo padrão de sinais na região de hidrogênios em carbonos sp<sup>2</sup>, sendo dois dupletos entre  $\delta$  6,22-6,28 ( $J=9,4/9,5$  Hz, H-3) e 7,87-7,59 ( $J=9,4/9,5$  Hz, H-4). Adicionalmente, mostraram simpletos entre  $\delta$  6,65-7,12 e 3,92-4,08, com integração para um e três hidrogênios, respectivamente, indicativos de hidrogênios em anel aromático e de metoxilas nas posições C-6 e C-8 do esqueleto cumarínico. Os espectros de RMN <sup>13</sup>C (Tabela 2) apresentaram todos os sinais na região de  $\delta$  103-164, característicos do esqueleto cumarínico, e adicionalmente sinais de metoxilas entre  $\delta$  56-61. A comparação dos dados obtidos com os relatados na literatura, permitiram identificar as cumarinas escopoletina (**1**) e isofraxidina (**2**) (LIN, YANG e CHOU, 2002; PANICHAYUPAKARANANT et al., 1995).

O espectro de RMN <sup>1</sup>H dos iridoides (Tabelas 1 e 3) apresentaram sinais entre  $\delta$  2,63-3,90, geralmente multipletos, característicos dos hidrogênios H-5 $\beta$ /H-9 $\beta$  do sistema de anéis ciclopentanopirano com fusão  $\beta$ -*cis*. Os compostos **3**, **5a+5b** e **6a+6b** apresentaram simpletos entre  $\delta$  5,77-5,89 (H-7) e dupletos em  $\delta$  4,26-4,41 (H-10), com integração para um e dois hidrogênios respectivamente, característicos de iridoides com ligação dupla em C-7 e hidroxilação em C-10, enquanto **4a+4b** apresentaram duplos dupletos entre  $\delta$  5,57-5,95 ( $J\sim 5,5$  e 2,0 Hz; H-6 e H-7) indicativo de ligação dupla em C-6, bem como dupletos entre  $\delta$  3,57-3,95 ( $J\sim 9,5$  Hz) com integração para dois hidrogênios, atribuídos a H-10 para os dois epímeros.

Foi possível verificar uma variação nos deslocamentos químicos dos sinais de H-3 do anel pirano, tais como: multipletos entre  $\delta$  4,26-4,52 com integração para dois hidrogênios, indicando a ausência de substituição na posição C-3 nos compostos **3** e **5a+5b**; simpletos entre  $\delta$  7,48-7,52 característicos de hidrogênios olefínicos em C-3 na estrutura de **6a+6b** e dupletos entre  $\delta$  5,22-5,41 indicativos de hidroxilação em C-3 nos

compostos **4a+4b**. As misturas **4a+4b** e **6a+6b** apresentaram sinais adicionais entre  $\delta$  4,80-5,58 (d;  $J=8,6/5,8$  Hz) e 5,30 (sl) respectivamente, referentes aos hidrogênios oximetínicos H-1 do núcleo iridoídico, enquanto **3** e **5a+5b** não apresentaram sinais característicos de H-1, sugerindo que houve uma substituição nessa posição. Foram observados ainda, simpletos com integração para três hidrogênios entre  $\delta$  3,71-3,78, característicos da presença de grupos metoxila.

A análise dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ , DEPT  $90^\circ$  e  $135^\circ$  dos iridoídes (Tabela 2), mostraram sinais em comum na região de  $\delta$  34,8-40,6 e 48,3-52,5 característicos dos carbonos metínicos C-5 e C-9 do esqueleto iridano. Na região de carbonos olefínicos observou-se os pares de sinais de olefinas trissubstituídas entre  $\delta$  129,3-132,9 (CH) e 140,0-142,1 (C) atribuídos a C-7 e C-8 respectivamente, dos compostos **3**, **5a+5b** e **6a+6b**. Os compostos **6a+6b** apresentaram um par de sinais adicional na região olefínica, entre  $\delta$  152,6-153,4 (CH) e 110,9 (C), confirmando a ligação dupla em C-3 e C-4. Para a mistura **4a+4b**, o par de sinais encontra-se entre  $\delta$  136,6-138,0 (CH) e 135,2-135,6 (CH), atribuídos à ligação dupla em C-6 e C-7. Pela análise do DEPT  $135^\circ$ , foi possível observar a presença de sinais entre  $\delta$  60,2-76,8 de carbonos oximetilênicos, atribuídos a C-10. Todos os compostos apresentaram pelo menos um sinal na região de  $\delta$  168,1-173,3, referentes à carbonila de lactona ou de éster, nas posições C-1 ou C-11, ou ambos. Com exceção do composto **3**, todos os outros apresentaram sinais entre  $\delta$  51,4-52,7, confirmando a presença de metoxila em C-12.

O composto **3**, diferentemente dos demais iridoídes, apresentou somente 9 sinais no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , caracterizando-se como um noriridoíde, pela perda de C-11. Os derivados de 11-noriridoíde-1,3-olídeo são raramente encontrados de fontes naturais (BAN et al., 2013). Após análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e comparação com dados da literatura, o composto **3** foi identificado como o noriridoíde morindolídeo (YOSHIKAWA, 1995).

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  dos compostos **4a-6b** apresentaram réplicas de menor intensidade de praticamente todos os sinais do espectro, caracterizando a presença de isômeros configuracionais. A análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  em comparação aos dados da literatura permitiu identificar as misturas estereoisoméricas dos iridoídes:  $\alpha$ - e  $\beta$ -gardiol (**4a+4b**), uma mistura epimérica de difícil separação, sendo o  $\beta$ -gardiol o constituinte majoritário (DREWES et al., 1996 e 1999); 10-hidroxi-1-oxo-7-irideno-11 $\alpha$ -ato de metila e 10-hidroxi-1-oxo-7-irideno-11 $\beta$ -ato de metila (**5a+5b**), tendo **5a** como constituinte majoritário (DREWES et al., 1996);  $\alpha$ -genipina e genipina (**6a+6b**), com o isômero **6a** como constituinte minoritário na mistura (RAGASA, PIMENTA, e RIDEOUT 2007). Velásquez et al. (2014) e Tommaso et al. (2013) sugeriram que o composto **6a** pode ser formado por uma reação de mutarrotação parcial, durante o processo de dissolução em  $\text{CDCl}_3$ , catalisada por traços de HCl neste solvente.

Deslocamento químico d (ppm)			
H	1 <sup>§</sup>	2 <sup>†</sup>	3 <sup>†</sup>
3	6,22 (d; 9,4)	6,28 (d; 9,5)	4,26 e 4,37 (m)
4	7,87 (d; 9,4)	7,59 (d; 9,5)	1,68 e 2,08 (m)
5	7,12 (s)	6,65 (s)	2,89 (m)
6	-	-	2,15 (dl; 17,0 6 $\alpha$ -H)
7	-	-	2,75 (dd; 17,0 e 8,8 6 $\beta$ -H)
8	6,78 (s)	-	5,77 (sl)
9	-	-	-
10	-	-	3,74 (m)
11	-	-	4,26 (m)
11	3,92 (s)	4,08 (s)	-
12	-	3,93 (s)	-

**Tabela 1.** Dados de RMN <sup>1</sup>H dos compostos **1-3** (*J* em Hz)

<sup>†</sup>CDCl<sub>3</sub> (600 e 150 MHz); <sup>§</sup>CD<sub>3</sub>OD (400 e 100 MHz)

C	1 <sup>§</sup>	2 <sup>†</sup>	3 <sup>†</sup>	4a <sup>§</sup>	4b <sup>§</sup>	5a <sup>†</sup>	5b <sup>†</sup>	6a <sup>†</sup>	6b <sup>†</sup>
1	-	-	173,3	102,5	101,3	172,4	171,0	95,3	96,5
2	164,1	160,8	-	-	-	-	-	-	-
3	112,5	113,7	67,8	91,0	90,5	67,6	65,0	153,4	152,6
4	146,1	144,0	29,3	48,9	48,9	45,4	42,3	110,9	110,9
5	109,9	103,3	34,8	40,6	40,6	37,7	35,7	35,7	36,8
6	147,1	144,7	38,9	136,6	138,0	38,4	34,5	38,5	39,1
7	153,0	143,2	129,3	135,2	135,6	129,3	129,2	132,9	131,1
8	104,0	134,6	140,0	93,5	94,0	140,2	140,2	142,1	142,1
9	151,5	142,6	50,6	52,5	49,5	49,4	50,7	49,9	48,3
10	112,6	111,4	60,7	76,8	74,8	60,7	60,2	61,6	61,5
11	56,8	61,9	-	173,0	173,0	171,5	170,6	168,1	168,1
12	-	56,4	-	52,2	52,5	52,7	52,3	51,4	51,5

**Tabela 2.** Dados de RMN <sup>13</sup>C dos compostos **1-6b** ( $\delta$  em ppm)

<sup>†</sup>CDCl<sub>3</sub> (600 e 150 MHz); <sup>‡</sup>CDCl<sub>3</sub> (400 e 100 MHz); <sup>§</sup>CD<sub>3</sub>OD (400 e 100 MHz)

H	Deslocamento químico d (ppm)					
	4a <sup>§</sup>	4b <sup>§</sup>	5a <sup>‡</sup>	5b <sup>‡</sup>	6a <sup>†</sup>	6b <sup>†</sup>
1	5,58 (d; 5,6)	5,53 (d; 5,8)	-	-	5,30 (sl)	4,80 (d; 8,65)
3	5,22 (d; 8,7)	5,41 (d; 2,5)	4,49 m (H3a) 4,52 m (H3b)	4,52 (m; H3b) 4,49 (m; H3a)	7,48 (s)	7,52 (s)
4	2,73 (sobreposto)	2,73 (dd; 6,8 e 2,5)	2,73 (dt; 8,5 e 3,4)	3,16 (m)	-	-
5	3,54 (m)	3,57 (m)	3,16 (m)	3,30 (m)	3,34 (td; 8,2 e 3,6)	3,20 (q; 8,6 e 17,3) 2,88 (ddd; 16,5; 8,6 e 1,3)
6	5,81 (dd; 6,4 e 2,0)	5,95 (dd; 5,5 e 2,1)	2,80 (m; H6a) 2,26 (m; H6b)	2,66 (m; H6a) 2,30 (m; H6b)	2,73 (m) 2,29 (m)	2,06 (dd; 16,7 e 9,5)
7	5,83 (sl)	5,77 (dd; 5,5 e 1,9)	5,79 (s)	5,79 (s)	5,80 (s)	5,87 (s)
9	2,63 (dd; 9,3 e 8,0)	2,69 (sobreposto)	3,81	3,90 (m)	3,24 (m)	2,53 (t; 8,1)
10	3,69 (d; 9,5) 3,93 (d; 9,5)	3,57 (d; 9,4) 3,82 (d; 9,4)	4,30	4,26 (sl)	4,41 (d; 13) 4,20 (d; 12,7)	4,34 (d; 13) 4,28 (d; 13)
12	3,78 (s)	3,76 (s)	3,76 sl	3,73 (sl)	3,71 (s)	3,72 (s)

**Tabela 3.** Dados de RMN <sup>1</sup>H dos compostos **4-6** (J em Hz)

<sup>†</sup>CDCl<sub>3</sub> (600 e 150 MHz); <sup>‡</sup>CDCl<sub>3</sub> (400 e 100 MHz); <sup>§</sup>CD<sub>3</sub>OD (400 e 100 MHz)

Todos os compostos isolados estão sendo relatados pela primeira vez na espécie *T. hispidula*. Com exceção da escopoletina (**1**) e da mistura de  $\alpha$ - e  $\beta$ -gardiol (**4a+4b**), todos os outros compostos estão sendo descritos pela primeira vez no gênero *Tocoyena*.

Todos os compostos já foram descritos em espécies da família Rubiaceae, como mostra o Quadro 1, que apresenta os resultados de um revisão bibliográfica da ocorrência destas substâncias em espécies de Rubiaceae, bem como descreve as atividades biológicas desses compostos, relatadas nos últimos 10 anos, incluindo artigos de revisão.

A escopoletina apresentou o maior número de ocorrências em espécies de Rubiaceae e também o maior número de atividades biológicas. Para a mistura estereoisomérica **5a+5b**, só foi encontrado um registro de isolamento e identificação a partir da espécie *Gardenia jasminoides*. Entretanto, Kinuthia et al. (2012) relata a ocorrência somente de **5b** no extrato diclorometano das sementes secas de *Gardenia volkensii*. Não foram encontrados na literatura relatos de testes de atividades biológicas para a mistura **5a+5b**. Destaca-se também que o iridoide genipina, além de possuir várias atividades biológicas, é conhecido por produzir uma série de pigmentos azuis utilizados na indústria alimentícia, bem como aplicações em biomateriais (NERI-NUMA et al., 2017).

Substâncias	Atividades	Ocorrência	Referência
Isofraxidina (1)	antibacteriana <sup>1</sup> , anti-oxidante <sup>1</sup> , anti-inflamatória <sup>1</sup> , antitumoral <sup>1</sup> , antialérgica <sup>1</sup> , anticancerígena <sup>2</sup> , anties-tresse <sup>2</sup> , colagógica <sup>2</sup> , antifadiga <sup>2</sup>	<i>Morinda citrifolia</i> <sup>3</sup> <i>Simira grazielae</i> <sup>4</sup>	<sup>1</sup> NIU et al., 2012 <sup>2</sup> XIAO et al., 2009 <sup>3</sup> WANG et al., 2016 <sup>4</sup> SANCHES et al., 2017
Escopoletina (2)	Citotóxica <sup>1</sup> , anti-hipertensiva <sup>2</sup> , analgésica <sup>2</sup> , antileishmania <sup>3</sup> , antibacteriana, antifúngica <sup>4</sup> , anticancerígena <sup>5</sup> , anti-hiperglicêmica, anti-hiperlipidêmica <sup>6</sup> ; espasmolítica, anti-inflamatória, antioxidante, antiproliferativa, anticolinesterásica, anti-hipouricêmico, antitumoral <sup>7</sup> , antiangiogênica <sup>8</sup> ; antiviral <sup>9</sup> ; inseticida, alelopática, hepatoprotetora <sup>10</sup>	<i>Rennellia elliptica</i> <sup>11</sup> <i>Anthospermum emirnense</i> <sup>12</sup> <i>Anthospermum hispidulum</i> <sup>12</sup> <i>Psychotria vellosiana</i> <sup>13</sup> <i>Morinda citrifolia</i> <sup>14</sup> <i>Galianthe thalictroides</i> <sup>15</sup> <i>Fadogia homblei</i> <sup>16</sup> <i>Sabicea brasiliensis</i> <sup>17</sup> <i>Hymenodictyon floribundum</i> , <i>Alibertia myrciifolia</i> , <i>Sabicea brasiliensis</i> , <i>Sabicea grisea</i> var. <i>grisea</i> , <i>Fadogia homblei</i> , <i>Augusta longifolia</i> , <i>Ophiorrhiza liukuensis</i> , <i>Psychotria vellosiana</i> , <i>Plocama pendula</i> , <i>Galianthe thalictroides</i> , <i>Saprosma ternatum</i> <sup>18</sup> <i>Tocoyena selloana</i> <sup>19</sup>	<sup>1</sup> HE et al, 2017 <sup>2</sup> TSUKAMOTO, HISADA E NISHIBE, 1985 <sup>3</sup> IVERSON et al., 2010 <sup>4</sup> GNONLONFIN, SANNI E BRIMER 2012 <sup>5</sup> TANG et al., 2012 <sup>6</sup> VERMA et al., 2013 <sup>7</sup> SIATKA E KASPAROVÁ, 2008 <sup>8</sup> SHI et al., 2017 <sup>9</sup> KHUNNAWUTMANOTHAM et al., 2016 <sup>10</sup> LUO et al., 2018 <sup>11</sup> OSMAN et al., 2016 <sup>12</sup> RASOARIVELO et al., 2017 <sup>13</sup> MORENO et al., 2014 <sup>14</sup> MAHATTANADUL et al., 2011 <sup>15</sup> FIGUEIREDO et al., 2014 <sup>16</sup> MOHAMMED et al., 2013 <sup>17</sup> BATISTA et al., 2014 <sup>18</sup> MARTINS e NUNEZ, 2015 <sup>19</sup> ROCHA, 2009
Morindolídeo (3)	anti-inflamatória, antimicrobiana <sup>1</sup> , antimalárica, citotóxica <sup>2</sup>	<i>Morinda officinalis</i> <sup>3</sup> <i>Villaria odorata</i> <sup>4</sup>	<sup>1</sup> TAN et al., 2014 <sup>2</sup> BAPELA, 2016 <sup>3</sup> ZHANG et al., 2018 <sup>4</sup> MARTINS e NUNEZ, 2015
$\alpha$ -gardiol (4a) + $\beta$ -gardiol (4b)	citotóxica <sup>1</sup> , antifúngica <sup>4</sup>	<i>Rothmannia wittii</i> <sup>1</sup> <i>Gardenia jasminoides</i> <sup>2</sup> <i>Xeromphis nilotica</i> <sup>3</sup> <i>Tocoyena formosa</i> <sup>4</sup> <i>Burchellia bubalina</i> <sup>4</sup> <i>Alibertia sessilis</i> <sup>5</sup> <i>Burchellia bubalina</i> <sup>5</sup> <i>Tocoyena selloana</i> <sup>6</sup>	<sup>1</sup> CHAIPIKDEE et al., 2016 <sup>2</sup> SONG et al., 2014 <sup>3</sup> FARID et al., 2002 <sup>4</sup> DREWES et al., 1999 <sup>5</sup> MARTINS e NUNEZ, 2015 <sup>6</sup> ROCHA, 2009
10-hidroxi-1-oxo-7-irideno-11 $\alpha$ -ato de metila (5a) 10-hidroxi-1-oxo-7-irideno-11 $\beta$ -ato de metila (5b)	-	<i>Gardenia jasminoides</i>	RAGASA, PIMENTA e RIDEOUT 2007
Genipina (6b)	anti-inflamatória, anticancerígena, antiproliferativa, hepatoprotetora <sup>1</sup> , antioxidativa, antidiabética <sup>3</sup> , antiviral <sup>4</sup> , antibacteriana, antitrombótica, neuroprotetiva, antidepressiva <sup>5</sup>	<i>Gardenia jasminoides</i> <sup>1</sup> <i>Gardenia fructus</i> <sup>2</sup> <i>Genipa americana</i> <sup>2</sup> <i>Rothmannia urcelliformis</i> <sup>2</sup> <i>Rothmannia wittii</i> <sup>6</sup>	<sup>1</sup> KIM, JEONG e MOON, 2012 <sup>2</sup> MARTINS e NUNEZ, 2015 <sup>3</sup> SHANMUGAM et al., 2018 <sup>4</sup> SON et al., 2015 <sup>5</sup> RAMOS et al., 2016 <sup>6</sup> CHAIPIKDEE et al., 2016

**Quadro 1.** Atividades biológicas e ocorrência dos compostos 1-6 na família Rubiaceae

## 4 | CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico do extrato EtOH do caule de *T. hispidula* conduziu ao isolamento e identificação das cumarinas escopoletina (1) e isofraxidina (2), do noriridoide morindolídeo (3) e de três misturas estereoisoméricas de iridoides:  $\alpha$ - e  $\beta$ -gardiol (4a+4b), 10-hidroxi-1-oxo-7-irideno-11 $\alpha$ -ato de metila e 10-hidroxi-1-oxo-7-irideno-11 $\beta$ -ato de metila (5a+5b),  $\alpha$ -genipina e genipina (6a+6b). Com exceção da escopoletina e do  $\alpha$ - e  $\beta$ -gardiol, os demais compostos estão sendo relatados pela primeira vez no gênero. As substâncias isoladas estão em concordância com os dados quimiotaxonômicos, uma vez que os iridoides são marcadores da subfamília Ixoroideae. Dentre os compostos obtidos, a escopoletina apresentou o maior número de ocorrências em espécies de Rubiaceae, bem como mostrou o maior número de atividades biológicas descritas.

## 5 | AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES e CNPq pelo apoio financeiro e pelas bolsas de E. A. Sousa, L. F. F. Silva e M. H. Chaves (302639/2015-2) e ao INCTBioNat.

## REFERÊNCIAS

- AMARAL, A. C. F. et al. **A general description of Apocynaceae iridoids chromatography**. In: Martin, D. F.; Martin, B. B. (Eds.), *Column Chromatography*, InTech, Rijeka, 2013.
- BAN, N. K. et al. Two new 11-noriridoids from the aerial parts of *Morinda umbellata*. **Phytochemistry Letters**, v. 6, p. 267-269, 2013.
- BARBOSA, M. R. et al. 2015. **Rubiaceae in lista de espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB210>. Acesso em: 20 de junho de 2018.
- BAPELA, M. J. **NMR-based metabolomic study of medicinal plants used malária and the isolation of bioactive alkaloids**. Faculty of Natural & Agricultural Sciences, University of Pretoria, Tese-2016.
- BOLZANI, V. S. et al. Antifungal iridoids from the stems of *Tocoyena formosa*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 7, p. 157-160, 1996.
- BOLZANI, V. S. et al. Iridoids from *Tocoyena formosa*. **Phytochemistry**, v. 46, p. 305-308, 1997.
- BOLZANI, V. S. et al. Secondary metabolites from brazilian Rubiaceae plant species: chemotaxonomical and biological significance. **Recent Research Developments in Phytochemistry**, v. 5, p. 19-31, 2001.
- CHAIPUKDEE, N. et al. Two new bioactive iridoid s from *Rothmannia wittii*. **Fitoterapia**, v. 113, p. 97-101, 2016
- BATISTA, J. C. et al. Constituintes químicos e avaliação das atividades antioxidante e anti-inflamatória das raízes de *Sabicea brasiliensis* Wernh (Rubiaceae). **Química Nova**, v. 37, p. 638-642, 2014.
- CARRILLO-OCAMPO, D. et al. Anti-inflammatory activity of iridoids and Verbascoside Isolated from

*Castilleja tenuiflora*. **Molecules**, v. 18, p. 12109-12118, 2013.

DELPRETE, P. G.; JARDIM, J. G. Systematics, taxonomy and floristics of Brazilian Rubiaceae: an overview about the current status and future challenges. **Rodriguésia**, v. 63, p. 101-128, 2012.

DETSI, A.; KONTOGIORGIS, C.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. Coumarin derivatives: an updated patent review (2015-2016). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 27, p. 1201-1226, 2017.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach**. 3 ed., New York: John Wiley & Sons, 2009.

DINDA, B.; DEBNATH, S.; BANIK, R. Naturally occurring iridoids and secoiridoids. An Updated Review, Part 4. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 59, p. 803-833, 2011.

DINDA, B.; DEBNATH, S.; HARIGAYA, Y. Naturally occurring iridoids. A Review, Part 1. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, p. 159-222, 2007.

DREWES, S. E. et al. Stereostructure, conformation and reactivity of  $\beta$ - and  $\alpha$ -gardiol from *Burchellia bubalina*. **Phytochemistry**, v. 50, p. 387-394, 1999.

DREWES, S. E.; KAYONGA, L. Iridoid molluscicidal compounds from *Apodytes dimidiata*. **Journal Natural Products**, v. 59, p. 1169-1170, 1996.

FARID, H. A. R. et al. Isolation and structure elucidation of iridoide and coumarin derivatives from *Xeromphis nilotica* (Rubiaceae). **Monatshefte für Chemie**, v. 133, p. 1453-1458, 2002.

FIGUEIREDO, P. O. et al. Further constituents of *Galianthe thalictroides* (Rubiaceae) and inhibition of DNA topoisomerases I and II $\alpha$  by its cytotoxic  $\beta$ -carboline alkaloids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, p. 1358-1361, 2014.

GNONLONFIN, G. J. B.; SANNI, A.; BRIMER, L. Review scopoletin-A Coumarin Phytoalexin with Medicinal Properties. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 31, p. 47-56, 2012.

HE, R. et al. Benzofuran glycosides and coumarins from the bark of *Streblus indicus* (Bur.) Corner. **Phytochemistry**, v. 138, p. 170-177, 2017.

HAMERSKI, L. et al. Saponinas triterpênicas de *Tocoyena brasiliensis* Mart. (Rubiaceae), **Química Nova**, v. 28, p. 601-604, 2005.

IVERSON, C. D. et al. Glutathione S-transferase inhibitory, free radical scavenging, and anti-leishmanial activities of chemical constituents of *Artocarpus nobilis* and *Matricaria chamomilla*. **Phytochemistry Letters**, v. 3, p. 207-211, 2010.

KIM, E.; JEONG, C.; MOON, A. Genipin, a constituent of *Gardenia jasminoides* Ellis, induces apoptosis and inhibits invasion in MDA-MB-231 breast cancer cells. **Oncology Reports**, v. 27, p. 567-572, 2012.

KINUTHIA, E. W. et al. Constituents of Kenyan *Gardenia volkensii*. **Natural Product Reserch**, v. 7, p. 4-13, 2012.

KHUNNAWUTMANOTHAM, N. et al. Synthesis and anti-acetylcholinesterase activity of scopoletin derivatives. **Bioorganic Chemistry**, v. 65, p. 137-145, 2016.

LI, H.; YAO, Y.; LI, L. Coumarins as potential antidiabetic agentes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 69, p. 1253-1264, 2017.

LIN, L. C.; YANG, L. L.; CHOU, C. J. Constituents from the stems of *Ecdysanthera rosea*. **The Journal of Chinese Medicine**, v. 13, p. 191-195, 2002.

LUO, J. et al. Photodegradation of scopoletin in organic solvents and aqueous solutions: kinetics and degradation pathways. **Water Air Soil Pollution**, v. 229, p. 50, 2018.

MAHATTANADUL, S. et al. Effects of *Morinda citrifolia* aqueous fruit extract and its biomarker scopoletin on reflux esophagitis and gastric ulcer in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, p.

243–250, 2011.

MARTINS, D.; NUNEZ, C. V. Secondary metabolites from Rubiaceae species. **Molecules**, v. 20, p. 13422-13495, 2015.

MOHAMMED, A. M. A. et al. Chemical constituents from *Fadogia homblei* de Wild (Rubiaceae). **International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy**, v. 9, p. 116-124, 2013.

MORENO, B. P. et al. Terpenoids and a coumarin from aerial parts of *Psychotria vellosiana* Benth. (Rubiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 56, p. 80-82, 2014.

NERI-NUMA, I. A. et al. Genipin: a natural blue pigment for food and health purposes. **Trends in Food Science & Technology**, v. 67, p. 271-279, 2017.

NIU, X. et al. Isofraxidin exhibited anti-inflammatory effects *in vivo* and inhibited TNF- $\alpha$  production in LPS-induced mouse peritoneal macrophages *in vitro* via the MAPK pathway. **International Immunopharmacology**, v. 14, p. 164-171, 2012.

OLIVEIRA, J. A. 2015. *Tocoyena* in **Lista de espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB14335>>. Acesso em: 20 de junho de 2018.

OLIVEIRA, L. S. D. et al. Levantamento florístico do Parque Ambiental Paquetá, Batalha, Piauí. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 2., p. 372-374, 2007.

OSMAN, C. P. et al. Two new pyranoanthraquinones from the root of *Rennellia elliptica* Korth. (Rubiaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 16, p. 225-229, 2016.

Panichayupakaranant, P. et al. Naphthoquinones and coumarins from *Impatiens balsamina* root cultures. **Phytochemistry**, v. 40, p. 1141-1143, 1995.

POSER, G. L. V.; SEIBT, L. T. Gardenoside from *Tocoyena bullata*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 26, p. 669-670, 1998.

RAGASA, C. Y.; PIMENTA, L. E.; RIDEOUT, J. A. Iridoids from *Gardenia jasminoides*. **Natural Product Research**, v. 21, p. 1078–1084, 2007.

RASOARIVELO, T. S. R. et al. Chemical study of *Anthospermum emirnense* (Rubiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 70, p. 186-191, 2017.

RAMOS-DE-LA-PENÑA, A. M. et al. A review through recovery, purification and identification of genipin. **Phytochemistry Reviews**, v. 15, p. 37-49, 2016.

ROCHA, M. O. **Estudo fitoquímico e avaliação das atividades moluscicida e larvicida de *Tocoyena selloana* k. schum. (Rubiaceae)**. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas, 2009.

SAMPAIO-SANTOS, M. I.; KAPLAN, A. C. Biosynthesis significance of iridoids in chemosystematics. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 12, p. 144-153, 2001.

SANCHES, M. N. G. et al. Chemical compounds isolated from *Simira grazielae*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 53, p. 543-544, 2017.

SANTOS, W. P. et al. Constituintes químicos de *Tocoyena sellowiana* Schum (Rubiaceae), 2011. **34º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Florianópolis-SC.

SIATKA T. KASPAROVÁ, M. Effects of auxins on growth and scopoletin accumulation in cell suspension cultures of *Angelica archangelica* L. **Ceska a Slovenska Farmacie**, v. 57, p. 17-20, 2008.

SHANMUGAM, M. K. et al. Potential role of genipin in cancer therapy. **Pharmacological Research**, v. 133, p. 195-200, 2018.

SHIN, W. et al. Design, synthesis and cytotoxic activities of scopoletin-isoxazole and scopoletin-pyrazole hybrids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, p. 147-151, 2017.

- SILVA, M. P. **Etnobotânica de comunidades rurais da serra de Campo Maior – Piauí, Brasil**. 2010. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2010.
- SONG, J. et al. Iridoids from the flowers of *Gardenia jasminoides* Ellis and their chemotaxonomic significance. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 56, p. 267-270, 2014.
- SON, M. et al. Genipin as a novel chemical activator of EBV lytic cycle, **Journal of Microbiology**, v. 53, p. 155–165, 2015.
- TAN, M. A. et al. Anti-inflammatory and antimicrobial constituents from the leaves of *Villaria odorata*. **Acta Manilana**, v. 64, p. 47-52, 2014.
- TANG, W.-M. et al. A review of the anticancer and immunomodulatory effects of *Lycium barbarum* fruit. **Inflammopharmacology**, v. 20, p. 307–314, 2012.
- TOMMASO, S. D. et al. Structure of genipin in solution: a combined experimental and theoretical study. **RSC Advances**, v. 3, p. 13764–13771, 2013.
- TSUKAMOTO, H.; HISADA, S.; NISHIBE, S.; Coumarins from bark of *Fraxinus japonica* and *F. mandshurica* var. *japonica*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, p. 4069-4073, 1985.
- TUNDIS, R. et al. Biological pharmacological activities of iridoids: recent developments. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 8, 399-420, 2008.
- VELÁSQUEZ, C. L. et al. Obtención de Genipina a partir de frutos de caruto (*Genipa americana* L.) del llano venezolano. **Avances en Química**, v. 9, p. 75-86, 2014.
- VERMA, A. et al. Hypoglycemic and hypolipidemic activity of scopoletin (coumarin derivative) in streptozotocin induced diabetic rats. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 22, p. 79-83, 2013.
- WANG, J. et al. Two new anthraquinones with antiviral activities from the barks of *Morinda citrifolia* (Noni). **Phytochemistry Letters**, v. 15, p. 13-15, 2016.
- XIAO, X.; GUO, J.; LI, G. Separation and purification of isofraxidin from *Sarcandra glabra* by microwave-assisted extraction coupled with high-speed counter-current chromatography. **Separation and Purification Technology**, v. 68, p. 250–254, 2009.
- YOSHIKAWA, M. et al. Chemical constituents of chinese natural medicine, *Morindae Radix*, the dried roots of *Morinda officinalis* How.: structures of morindolide and morofficaloside. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 43, p. 1462-1465, 1995.
- ZHANG, J. et al. *Morinda officinalis* How - A comprehensive review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 213, p. 230–255, 2018.

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

### Luana Carvalho Batista

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, Centro de Ciência e Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais – PPGCN, Laboratório de Ciências Químicas - LCQUI  
Campos dos Goytacazes – RJ

### Maria Raquel Garcia Vega

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, Centro de Ciência e Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais – PPGCN, Laboratório de Ciências Químicas - LCQUI  
Campos dos Goytacazes – RJ

**RESUMO:** Uma estreita relação entre o homem e as plantas existiu desde os primórdios da humanidade, pela provável tendência de utilizar as espécies vegetais para o tratamento de diversos males e na alimentação. A família Myristicaceae se destaca etnofarmacologicamente na literatura devido ao uso de suas espécies como alucinógenos descritos na literatura. No Brasil, esta família é representada por 5 gêneros, dentre estes o gênero *Virola* é o mais bem representado possuindo 35 espécies relatadas. Destas, 10 espécies possuem algum estudo químico e 6 registros de estudos sobre atividade biológica foram encontrados (para neolignanas isoladas das espécies) na revisão para o presente

trabalho. Sendo as espécies *V. carinata*, *V. elongata* e *V. sebifera* as mais estudadas quimicamente e, *V. sebifera* e *V. surinamenses* as mais estudadas biologicamente. As classes de substâncias que ocorrem em maior quantidade no gênero são lignanas e neolignanas, que juntas representam 66% das 188 substâncias isoladas das espécies de *Virola* de ocorrência no Brasil. O presente trabalho descreve as neolignanas identificadas no gênero *Virola* no Brasil e as atividades biológicas avaliadas para as mesmas. 89 diferentes estruturas de neolignanas foram descritas, destas 11 tiveram algum estudo sobre atividade biológica (12%). Esses dados ressaltam a importância de se continuar a explorar o potencial biológico do gênero a fim de contribuir com o conhecimento etnofarmacológico de espécies brasileiras de *Virola*, bem como estabelecer um perfil químico para as mesmas, que poderá direcionar estudos químicos futuros.

**PALAVRAS-CHAVE:** Myristicaceae, *Virola*, Neolignanas, Atividade biológica

### 1 | INTRODUÇÃO

Uma estreita relação entre o homem e as plantas existiu desde os primórdios da humanidade, pela provável tendência de utilizar as espécies vegetais para o tratamento de

diversos males e na alimentação (Yunes e Calixto, 2001; Gottlieb e Kaplan, 1993).

A busca por alívio e cura de doenças pode ter sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais, e o conhecimento adquirido foi repassado de geração em geração (Viegas Jr e Bolzani, 2006). Além da busca por alívio e cura de doenças outras formas de uso também são registradas para os produtos naturais, como por exemplo, para fins da própria defesa vegetal como veneno, para fins estéticos, como pinturas, como repelentes, etc. (Viegas Jr e Bolzani, 2006; Dewick, 2002).

Um dos motivos que levou ao interesse em estudar a família Myristicaceae deve-se principalmente a descrição de espécies desta família na etnofarmacologia, destacando espécies descritas pelo pesquisador Otto R. Gottlieb em 1979, como alucinógenos e veneno de flecha por tribos indígenas da Colômbia, Brasil e Venezuela (Valderrama, 2000; Gottlieb, 1979).

Myristicaceae constitui uma das maiores famílias de angiospermas possuindo 20 gêneros e cerca de 500 espécies de plantas descritas. Representada, principalmente, por árvores e arbustos com casca interna com exsudado avermelhado ou que em contato com o ar oxida para o vermelho, folhas simples, alternas e sem estípulas. E, fruto baciforme com semente envolta por arilo carnoso, inteiro ou fendido (Quintanilha e Lobão, 2017).

A família Myristicaceae é constituída pelos gêneros: *Brochoneura*, *Cephalosphaera*, *Coelocaryon*, *Compsonera*, *Doyleanthus*, *Endocomia*, *Gymnacranthera*, *Haematodendron*, *Horsfieldia*, *Iryanthera*, *Knema*, *Mauloutchia*, *Myristica*, *Osteophloeum*, *Otoba*, *Paramyristica*, *Pycnanthus*, *Scyphocephalum*, *Staudtia* e *Virola* (The Plant List, 2013).

No Brasil, esta família é representada por cinco gêneros: *Compsonera*, *Iryanthera*, *Osteophloeum*, *Otoba* e *Virola*, com 64 espécies reconhecidas e distribuídas geograficamente em quase todos os estados brasileiros, com exceção dos estados de Rio Grande do Norte, Paraíba e Alagoas (Flora do Brasil 2020; The Plant List, 2013).

Myristicaceae possui diversos metabólitos descritos isolados ou identificados para suas espécies, tais como: ésteres, esteroides, flavonoides, lignanas, neolignanas, alcaloides e terpenos (Gottlieb, 1979; Kawanishi e Hashimoto, 1987; Lopes et al., 1998; Denny et al., 2008)

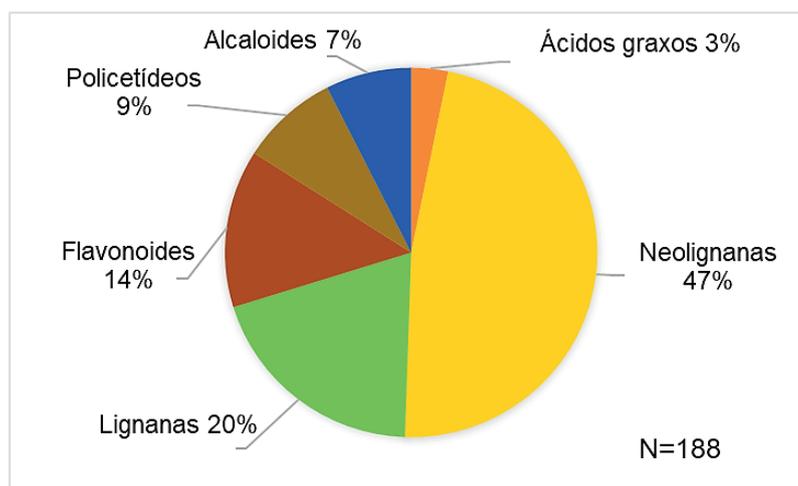
O presente trabalho visa a descrição e quantificação de neolignanas de *Virola* (Myristicaceae) no Brasil, gênero este que é o mais amplamente distribuído e com maior número de espécies de ocorrência. É abordado também o amplo espectro de atividades biológicas relatadas para as neolignanas dentro do gênero *Virola* (Kawanishi e Hashimoto, 1987).

## 2 | GÊNERO VIROLA

O gênero *Virola* compreende 48 espécies distribuídas na Ásia, África, Madagascar

e na América. Na América é gênero mais disperso, indo desde a Guatemala ao Rio Grande do Sul, incluindo a costa ocidental da Colômbia e Equador ao Atlântico (Valderrama, 2000).

As principais classes de metabólicos secundários relatados para o gênero são: flavonoides, policetídeos, lignanas, neolignanas, ácidos graxos, taninos, terpenos e alcaloides (Barata et al., 2000; Blumenthal et al., 1997; Lopes et al., 1983; Martinez et al., 1999; Rezende; Kato, 2002; Denny et al., 2007). Dados compilados para este trabalho sumarizam 188 substâncias diferentes presentes em espécies de *Virola* do Brasil que estão representadas na Figura 1.



**Figura 1.** Gráfico do percentual de metabólitos secundários presentes no gênero *Virola* (Myristicaceae).

A análise do gráfico acima evidencia que dentre as classes de metabólitos isolados, as lignanas e neolignanas, correspondem à maior porcentagem de constituintes identificados no gênero somando 67%. Esses dados corroboram também com o relato de Moraes (2008) de que neolignanas e lignanas se destacam como constituintes majoritários na família Myristicaceae na qual este gênero está inserido (Moraes, 2008).

No Brasil são descritas 35 espécies deste gênero, sendo geralmente encontradas nas florestas tropicais. Na bacia amazônica, por exemplo, 26 espécies já foram relatadas (Quintanilha e Lobão, 2017; Rodrigues, 1980). As espécies existentes no Brasil estão listadas na Tabela 1.

Espécie	Domínio Fitogeográfico	Distribuição Geográfica	Endemismo
<i>Virola albidiflora</i> Ducke	Amazônia	AM, AC, MT	NE
<i>Virola bicuhyba</i> (Schott ex Spreng.) Warb. sin. <i>Virola oleífera</i> (Schott) A.C.Sm	Mata Atlântica	BA, MG, ES, SP, RJ, PR, SC, RS	E
<i>Virola caducifolia</i> W.A.Rodrigues	Amazônia	PA, AM	NE
<i>Virola calophylla</i> Warb.	Amazônia	RR, AP, PA, AM, AC, RO, MT	NE
<i>Virola calophylloidea</i> Markgr.	Amazônia	PA, AM, AC	NE
<i>Virola carinata</i> (Benth.) Warb.	Amazônia	AC, AM, AP, RO, RR, MT	NE

<i>Virola coelhoi</i> W.A.Rodrigues	Amazônia	AM	NE
<i>Virola crebrinervia</i> Ducke	Amazônia	AP, PA, AM, RO	E
<i>Virola decorticans</i> Ducke	Amazônia	AM, AC	NE
<i>Virola duckei</i> A.C.Sm.	Amazônia	AM, AC	NE
<i>Virola elongata</i> (Benth.) Warb. sin. <i>Virola cuspidata</i> (Benth.) Warb.	Amazônia	RR, AP, PA, AM, AC, RO, MT	NE
<i>Virola flexuosa</i> A.C.Sm.	Amazônia	AM, AC, PA, RO	NE
<i>Virola gardneri</i> (A.DC.) Warb.	Mata Atlântica	PE, BA, AL, MG, ES, SP, RJ	E
<i>Virola guggenheimii</i> W.A.Rodrigues	Amazônia	AP, PA, AM	E
<i>Virola loretensis</i> A.C.Sm.	Amazônia	AM, AC	NE
<i>Virola malmei</i> A.C.Sm.	Amazônia, Cerrado	PA, AC, MT	E
<i>Virola marleneae</i> W.A.Rodrigues	Amazônia	AM	NE
<i>Virola michelii</i> Heckel sin. <i>Virola melinonii</i> Benist	Amazônia	AP, PA, AM, RO, RR, MA, MT	NE
<i>Virola minutiflora</i> Ducke	Amazônia	AC, AM, RO, MT	E
<i>Virola mollissima</i> (A.DC.) Warb. sin. <i>Virola divergens</i> Ducke	Amazônia	PA, AM, AC, RO, RR, MT	NE
<i>Virola multicostata</i> Ducke	Amazônia	PA, AM, RO, MT	E
<i>Virola multinervia</i> Ducke	Amazônia	PA, AM, AC, RO	NE
<i>Virola obovata</i> Ducke	Amazônia	AM	NE
<i>Virola officinalis</i> Warb.	Mata Atlântica	BA, MG, ES	E
<i>Virola parvifolia</i> Ducke	Amazônia	AM	NE
<i>Virola pavonis</i> (A.DC.) A.C.Sm.	Amazônia	AC, AM, RO, MT	NE
<i>Virola peruviana</i> (A.DC.) Warb.	Amazônia	AM, AC	NE
<i>Virola polyneura</i> W.A.Rodrigues	Amazônia	AM	NE
<i>Virola rugulosa</i> Warb.	Amazônia	AM	NE
<i>Virola sebifera</i> Aubl. Sin. Heterotípico <i>Virola theiodora</i> (Spruce ex Benth.) Warb.	Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica	RR, AP, PA, AM, TO, AC, RO, MA, BA, MT, GO, DF, MG, SP, RJ	NE
<i>Virola sessilis</i> (A.DC.) Warb.	Amazônia, Cerrado	RO, MT	E
<i>Virola subsessilis</i> (Benth.) Warb.	Cerrado	TO, MA, PE, BA, PI, GO	E
<i>Virola surinamensis</i> (Rol. Ex Rottb.) Warb.	Amazônia, Caatinga	RR, AP, PA, AM, TO, AC, RO, MA, PI, CE, MT	NE
<i>Virola urbaniana</i> Warb.	Cerrado	TO, MA, BA, MT, GO, DF	E
<i>Virola venosa</i> (Benth.) Warb.	Amazônia	AP, PA, AM, RO, MT	NE

**Tabela 1.** Lista das espécies do gênero *Virola* presentes no Brasil e distribuição geográfica.

\*NE= Não Endêmica no Brasil; E= Endêmica no Brasil.

Das espécies descritas para o Brasil, apenas 10 apresentam algum tipo de estudo químico e/ou biológico. O que retrata a necessidade de estudos mais aprofundado para o gênero.

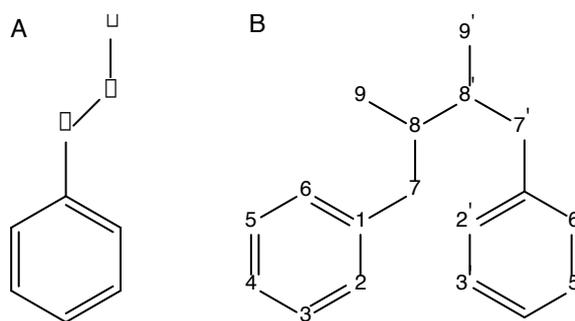
Das espécies mencionadas na Tabela 1 as mais estudadas do ponto de vista químico são *V. carinata*, *V. elongata* e *V. sebifera*. E em termos de atividade biológica, se destacam como as mais analisadas *V. sebifera* e *V. surinamenses*.

### 3 | NEOLIGNANAS

De acordo com Barbosa Filho (1999), o termo genérico lignóides é utilizado para descrever as micromoléculas que possuem seu esqueleto básico formado pelo grupo fenilpropanoico ( $C_6-C_3$ )<sub>n</sub> (Figura 2), sendo *n* reservado a poucas unidades. Os lignóides se dividem em seis grupos (lignanas, neolignanas, alolignanas, norlignanas, oligolignóides e heterolignóides) de acordo ao tipo de acoplamento observado entre as unidades  $C_6-C_3$  criando uma variabilidade estrutural responsável pelas subclasses apresentadas (Barbosa Filho, 1999; Gottlieb, 1979).

Neste trabalho abordamos os diferentes tipos estruturais de lignóides do tipo neolignanas presentes no gênero *Virola* (Myristicaceae) pesquisado no período de 1975 – 2017 (ScienceDirect, Scifinder, PubMed, Scielo).

Neolignanas, do grego *néos* = novo, são uma classificação dos lignóides proposta em 1978 por Otto Richard Gottlieb onde dímeros oxidativos de alil fenóis e de propenil fenóis ligados no carbono β e que não apresentam o carbono gama ( $C-\gamma$ ) oxigenado (Figura 2-A). A numeração dos átomos de carbono segue a numeração proposta por Gottlieb onde os átomos de carbono são enumerados de 1-9 e os átomos de carbono da segunda unidade de  $C_6-C_3$  são enumerados de 1'-9' como mostrado na Figura 2-B (Gottlieb, 1978).



**Figura 2. A)** Unidade básica de neolignanas ( $C_6-C_3$ ). **B)** Numeração dos átomos de carbono da estrutura básica de neolignanas.

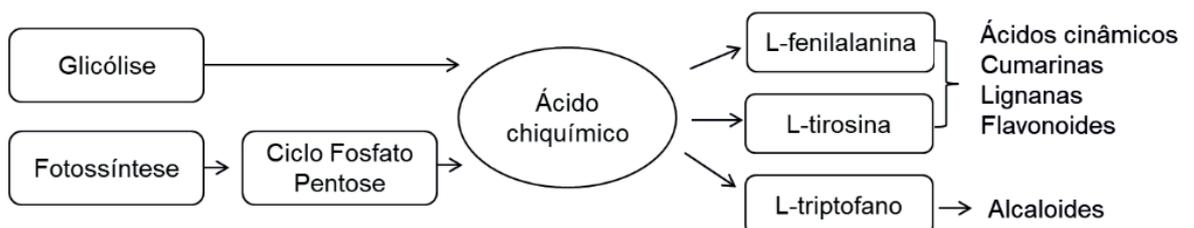
As diferentes formas de junção destas unidades  $C_6-C_3$  possibilitam 15 diferentes subtipos de esqueletos básicos de neolignanas. O esqueleto básico de neolignanas podem ser representados de acordo com as posições das ligações entre as unidades  $C_6-C_3$ . Os tipos estruturais encontrados dentro do gênero *Virola* são de 9 subtipos: diarilbutano, ariltetralina, tetraidrofurano, benzofurano, di-hidrodieugenol, ariloxiarilpropano, benzodioxano, arilbenzilmetiltetraidrofurano e β-ariloxiarilpropano. Que são mostrados na Tabela 2 (Barbosa Filho, 1999).

<p>Diarilbutano</p> <p>8.8'</p>	<p>Aritetralina</p> <p>8.8',6.7'</p>	<p>Tetraidrofurano</p> <p>7.O.7',8.8'</p>
<p>Benzofurano</p> <p>7.O.4',8.3'</p>	<p>Di-hidrodieugenol</p> <p>3.3'</p>	<p>Ariloxiarilpropano</p> <p>8.O.4'</p>
<p>Benzodioxano</p> <p>7.O.3',8.O.4'</p>	<p>Arilbenzilmetiltetraidrofurano</p> <p>8.8',7.O.9'</p>	<p><math>\beta</math>-ariloxiarilpropano</p> <p>8.3'</p>

**Tabela 2.** Esqueletos carbônicos e designação numérica de neolignanas relacionadas na literatura.

Neolignanas são oriundas biossinteticamente da rota do chiquimato. O ácido chiquímico, obtido como produto intermediário da glicólise ou da fotossíntese via ciclo de fosfato pentose é o precursor dos aminoácidos aromáticos L-tirosina, L-fenilalanina e L-triptofano.

Os aminoácidos aromáticos são as unidades básicas formadoras de fenilpropano ( $C_6-C_3$ ) presente nas mais diversas classes de metabólitos primários. L-tirosina e L-fenilalanina formam as unidades básicas encontradas em ácidos cinâmicos, cumarinas, lignanas e flavonoides. E o aminoácido L-triptofano forma a unidade observada em várias estruturas de alcaloides (Dewick, 2002) – Figura 3.

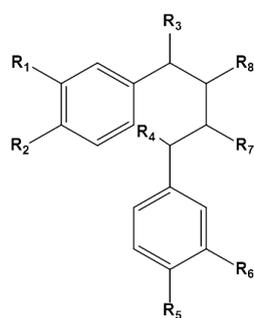


**Figura 3.** Esquema simplificado da rota biossintética de metabólitos secundários via chiquimato.

## 4 | NEOLIGNANAS DO GÊNERO VIROLA

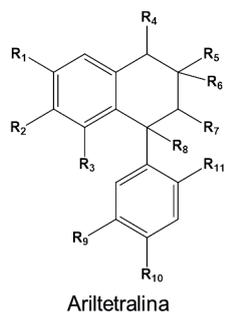
O gênero *Virola* no Brasil apresenta 89 neolignanas descritas e isoladas das folhas, cascas, galhos, frutos e madeira das espécies listadas na Tabela 3. Destas 20 são do tipo diarilbutano, 31 ariltetralina, 6 tetraidrofurano, 6 benzofurano, 2 dihidrodieugenol, 10 ariloxiarilpropano, 6 benzodioxano, 2 arilbenzilmetiltetraidrofurano, 4  $\beta$ -ariloxiarilpropano e 2 outras neolignanas com esqueletos semelhantes a dihidrodieugenol (Figura 4 e 5).

As neolignanas do subtipo ariltetralinas são os constituintes secundários encontrados em maior quantidade nas espécies de *Virola* (Rezende et al., 2005).

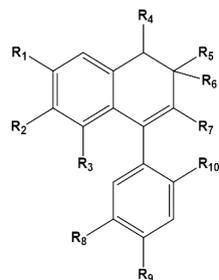


Diarilbutano

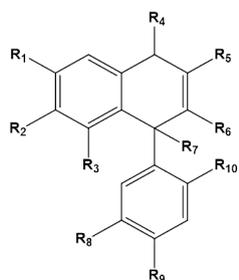
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
1	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	H	OH	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
26		-OCH <sub>2</sub> O-	OH	H	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
27	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	OH	H		-OCH <sub>2</sub> O-	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
28		-OCH <sub>2</sub> O-	OH	H		-OCH <sub>2</sub> O-	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
29	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	O	H		-OCH <sub>2</sub> O-	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
40	H <sub>3</sub> CO	OH	H	CH <sub>2</sub>		-OCH <sub>2</sub> O-	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
41	H <sub>3</sub> CO	OH	H	H	OH	H <sub>3</sub> CO	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
42	H <sub>3</sub> CO	OH	H	H		-OCH <sub>2</sub> O-	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
52		-OCH <sub>2</sub> O-	O	O		-OCH <sub>2</sub> O-	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
60	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	O	H		-OCH <sub>2</sub> O-	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
68	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	OH	H	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
69		-OCH <sub>2</sub> O-	OH	H	OH	H <sub>3</sub> CO	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
70	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	OH	H	OH	H <sub>3</sub> CO	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
71		-OCH <sub>2</sub> O-	H	OH	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
72		-OCH <sub>2</sub> O-	H	H	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
73	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	H	H		-OCH <sub>2</sub> O-	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub>
74	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	O	O		-OCH <sub>2</sub> O-	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
75		-OCH <sub>2</sub> O-	H	O	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
76	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	H	O	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
87		-OCH <sub>2</sub> O-	H	H		-OCH <sub>2</sub> O-	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>2</sub> OH



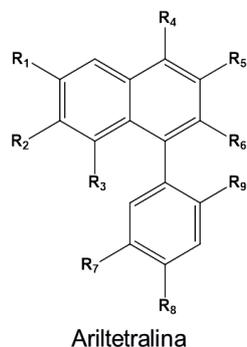
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11
2	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	H	
5	H	-OCH <sub>2</sub> O-	H	O	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH	-OCH <sub>2</sub> O-	H		
6	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	H	O	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH	-OCH <sub>2</sub> O-	H		
7	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	H	O	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	-OCH <sub>2</sub> O-	H		
8	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	H	O	CH <sub>3</sub>	OH	CH <sub>3</sub>	OH	-OCH <sub>2</sub> O-	H	
9	-OCH <sub>2</sub> O-	H	H	O	CH <sub>3</sub>	OH	CH <sub>3</sub>	OH	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	H
22	H <sub>3</sub> CO	OH	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H <sub>3</sub> CO	OH	H	
23	-OCH <sub>2</sub> O-	H	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H <sub>3</sub> CO	OH	H	
24	-OCH <sub>2</sub> O-	H	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	H	
25	H	-OCH <sub>2</sub> O-	OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	-OCH <sub>2</sub> O-	H			
44	H <sub>3</sub> CO	-OCH <sub>2</sub> O-	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH	-OCH <sub>2</sub> O-	H			
45	H	-OCH <sub>2</sub> O-	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH	-OCH <sub>2</sub> O-	H			
67	H <sub>3</sub> CO	OH	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	H	
77	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	-OCH <sub>2</sub> O-	H		
78	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	H	O	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	-OCH <sub>2</sub> O-	OH		
79	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	H	O	CH <sub>3</sub>	OH	CH <sub>3</sub>	H	-OCH <sub>2</sub> O-	OH	
80	H	-OCH <sub>2</sub> O-	O	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	-OCH <sub>2</sub> O-	H			
81	H	-OCH <sub>2</sub> O-	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	-OCH <sub>2</sub> O-	H			
82	H	-OCH <sub>2</sub> O-	O	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	-OCH <sub>2</sub> O-	OH			
83	H	-OCH <sub>2</sub> O-	O	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	-OCH <sub>2</sub> O-	OAc			
88	H <sub>3</sub> CO	OH	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	-OCH <sub>2</sub> O-	H		



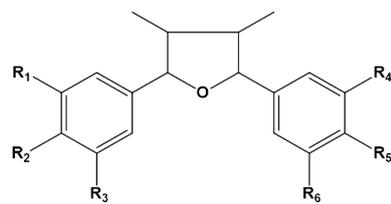
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
10	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	H	O	CH <sub>3</sub>	OH	CH <sub>3</sub>	-OCH <sub>2</sub> O-	H	
37	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	-OCH <sub>2</sub> O-	H		
46	H <sub>3</sub> CO	-OCH <sub>2</sub> O-	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	-OCH <sub>2</sub> O-	H			
84	-OCH <sub>2</sub> O-	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	H		
85	-OCH <sub>2</sub> O-	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	-OCH <sub>2</sub> O-	H			



	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
11	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	H	O	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH	-OCH <sub>2</sub> O-	H	

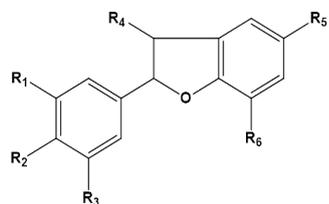


	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
3	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	H	H	CH <sub>3</sub>	COH	-OCH <sub>2</sub> O-	H	
4	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	H	H	CH <sub>3</sub>	COOH	-OCH <sub>2</sub> O-	H	
38	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	-OCH <sub>2</sub> O-	H	
39	H <sub>3</sub> CO	OH	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	-OCH <sub>2</sub> O-	H	



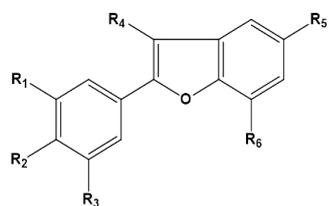
Tetraidrofurano

	R1	R2	R3	R4	R5	R6
<b>30</b>	-OCH <sub>2</sub> O-		H	H		-OCH <sub>2</sub> O-
<b>31</b>	H <sub>3</sub> CO	OH	H	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	H
<b>32</b>	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	H	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	H
<b>35</b>	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO
<b>36</b>	-OCH <sub>2</sub> O-		H	H <sub>3</sub> CO	OH	H
<b>43</b>	H <sub>3</sub> CO	OH	H	H <sub>3</sub> CO	OH	H



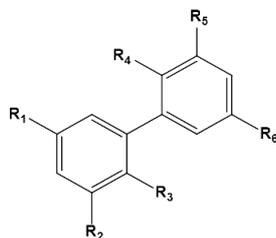
Benzofurano

	R1	R2	R3	R4	R5	R6
<b>13</b>	H	OH	H <sub>3</sub> CO	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH=CH <sub>2</sub>	H <sub>3</sub> CO
<b>17</b>	H	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>2</sub> CH=CH <sub>2</sub>	H <sub>3</sub> CO
<b>32</b>	-OCH <sub>2</sub> O-		H	CH <sub>3</sub>	CH=CHCH <sub>3</sub>	H <sub>3</sub> CO
<b>66</b>	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH=CH <sub>2</sub>	H <sub>3</sub> CO



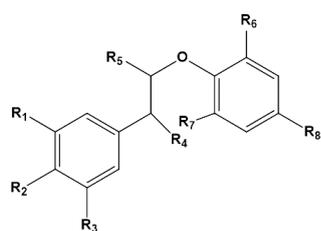
Benzofurano

	R1	R2	R3	R4	R5	R6
<b>12</b>	H	OH	H <sub>3</sub> CO	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH=CH <sub>2</sub>	H <sub>3</sub> CO
<b>20</b>	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH=CH <sub>2</sub>	H <sub>3</sub> CO



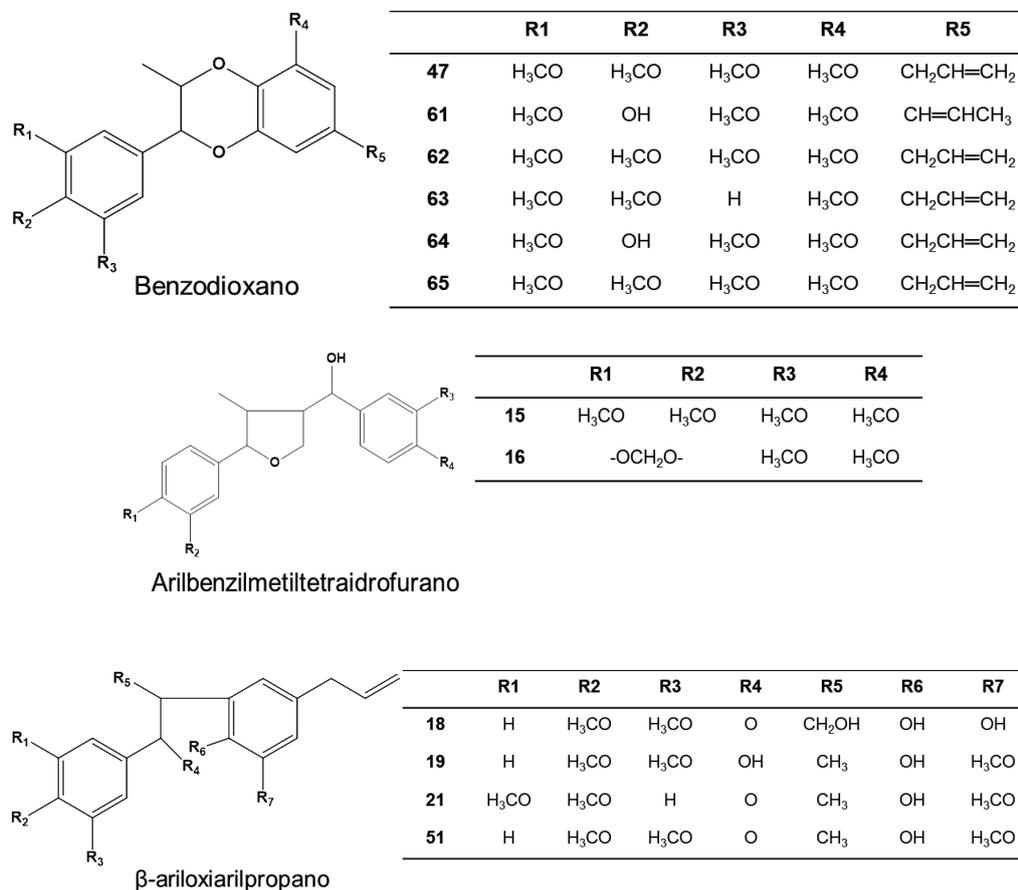
Di-hidrodieugenol

	R1	R2	R3	R4	R5	R6
<b>49</b>	CH <sub>2</sub> CH=CH <sub>2</sub>	H <sub>3</sub> CO	OH	OH	H <sub>3</sub> CO	CH <sub>2</sub> CH=CH <sub>2</sub>
<b>50</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H <sub>3</sub> CO	OH	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	CH <sub>2</sub> CH=CH <sub>2</sub>

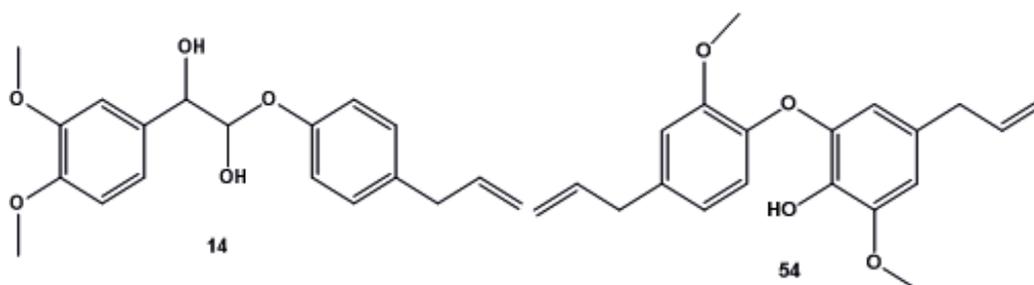


Ariloxiarilpropano

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
<b>33</b>	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	OH	CH <sub>3</sub>	H <sub>3</sub> CO	H	CH=CHCH <sub>3</sub>
<b>34</b>	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	H	OH	CH <sub>3</sub>	H <sub>3</sub> CO	H	CH=CHCH <sub>3</sub>
<b>48</b>	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	H	CH <sub>3</sub>	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	CH=CHCH <sub>3</sub>
<b>53</b>	H	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	OH	CH <sub>2</sub> OH	H <sub>3</sub> CO	H	CH <sub>2</sub> CH=CH <sub>2</sub>
<b>55</b>	-OCH <sub>2</sub> O-	H <sub>3</sub> CO	H	CH <sub>3</sub>	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	CH <sub>2</sub> CH=CH <sub>2</sub>
<b>56</b>	H <sub>3</sub> CO	OH	H <sub>3</sub> CO	H	CH <sub>3</sub>	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	CH=CHCH <sub>3</sub>
<b>57</b>	H <sub>3</sub> CO	OH	H <sub>3</sub> CO	OH	CH <sub>3</sub>	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	CH=CHCH <sub>3</sub>
<b>58</b>	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	OH	CH <sub>3</sub>	H <sub>3</sub> CO	H	CH=CHCH <sub>3</sub>
<b>59</b>	H <sub>3</sub> CO	OH	H <sub>3</sub> CO	O	CH <sub>3</sub>	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	CH=CHCH <sub>3</sub>
<b>86</b>	H <sub>3</sub> CO	H <sub>3</sub> CO	H	OH	CH <sub>3</sub>	H <sub>3</sub> CO	H	CH <sub>2</sub> CH=CH <sub>2</sub>



**Figura 4.** Estruturas de neolignan presentes no gênero *Virola*.



**Figura 5.** Estruturas de neolignanas com esqueleto semelhante a di-hidroieugenol encontradas no gênero *Virola*.

As neolignanas estão distribuídas nas espécies segundo a Tabela 3.

Espécie	Composto	Referência
<i>Virola albidiflora</i> Ducke	-----	
<i>Virola bicuhyba</i> (Schott ex Spreng.) Warb.	<b>2, 25-29, 30-32, 43, 67-70</b>	[13], [24], [39]
<i>Virola caducifolia</i> W.A.Rodrigues	-----	-----
<i>Virola calophylla</i> Warb.	<b>37-40</b>	[33],
<i>Virola calophylloidea</i> Markgr.	<b>44, 46</b>	[32]
<i>Virola carinata</i> (Benth.) Warb.	<b>12-13, 17-20, 22-24, 49-51, 53-59, 66</b>	[8], [15], [21], [22], [23]
<i>Virola coelhoi</i> W.A.Rodrigues	-----	-----

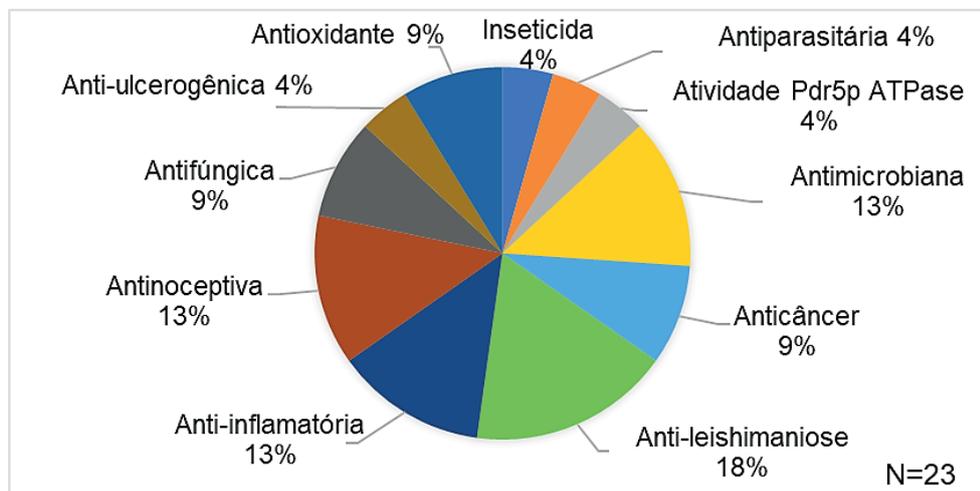
<i>Viola crebrinervia</i> Ducke	-----	-----
<i>Viola decorticans</i> Ducke	-----	-----
<i>Viola duckei</i> A.C.Sm.	-----	-----
<i>Viola elongata</i> (Benth.) Warb.	<b>1-2, 5-8, 15-16, 24, 37, 47-48, 60, 71-80, 84-85</b>	[18], [19], [29], [31]
<i>Viola flexuosa</i> A.C.Sm.	<b>87</b>	[1]
<i>Viola gardneri</i> (A.DC.) Warb.	-----	-----
<i>Viola guggenheimii</i> W.A.Rodrigues	-----	-----
<i>Viola lorentensis</i> A.C.Sm.	-----	-----
<i>Viola malmei</i> A.C.Sm.	-----	-----
<i>Viola michelii</i> Heckel	-----	-----
<i>Viola minutiflora</i> Ducke	-----	-----
<i>Viola mollissima</i> (A.DC.) Warb.	<b>5, 35</b>	[35]
<i>Viola multicostata</i> Ducke	-----	-----
<i>Viola multinervia</i> Ducke	-----	-----
<i>Viola obovata</i> Ducke	-----	-----
<i>Viola officinalis</i> Warb.	-----	-----
<i>Viola parvifolia</i> Ducke	-----	-----
<i>Viola pavonis</i> (A.DC.) A.C.Sm.	<b>12-13, 19-20, 31-32, 43, 48-49, 51, 56, 61, 66, 86</b>	[3], [14], [30], [35]
<i>Viola peruviana</i> (A.DC.) Warb.	-----	-----
<i>Viola polyneura</i> W.A.Rodrigues	-----	-----
<i>Viola rugulosa</i> Warb.	-----	-----
<i>Viola sebifera</i> Aubl.	<b>1-11, 52, 74, 80, 82-83</b>	[25], [26], [27], [38]
<i>Viola sessilis</i> (A.DC.) Warb.	-----	-----
<i>Viola subsessilis</i> (Benth.) Warb.	-----	-----
<i>Viola surinamensis</i> (Rol. Ex Rottb.) Warb.	<b>2, 30, 32-36,</b>	[2], [3], [5], [6], [41], [44]

**Tabela 3.** Neolignanas presentes nas espécies do gênero *Viola* no Brasil.

## 5 | ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS NEOLIGNANAS DO GÊNERO VIOLA

Neolignanas (naturais e sintéticas) já foram estudadas quanto aos efeitos antifúngicos, anti-inflamatório, neurológico, anti-hepático, anticâncer, entre outros (Barata et al., 2000). Aqui serão abordadas apenas aquelas isoladas das espécies do gênero supracitado.

Na revisão realizada pode-se constatar que apenas 23 estudos envolvendo alguma atividade biológica foram analisados a partir de extratos, frações e/ou substâncias isoladas do gênero *Viola* (Figura 6) (Hiruma-Lima et al., 2009; Barata et al., 2000; Veiga et al., 2017; Zacchino et al., 1998; Kuroshima et al., 2001; Rezende et al., 2005; Sartorelli, Young e Kato, 1998; Lopes et al., 1998; Denny et al., 2008; Costa et al., 2008; Miles et al., 1987; Pereira et al., 2017; Baquero et al., 2015; Carvalho et al., 2010; Morais et al., 2009).



**Figura 6.** Gráfico do percentual de cada atividade biológica avaliada para as substâncias e/ou extratos das espécies do gênero *Virola*.

Dos 23 estudos de atividade biológica avaliados e relatados na literatura entre 1978-2017 para extratos, frações e/ou substâncias isoladas de espécies de *Virola*, 6 relatam algum estudo realizado para neolignana presente no gênero. Observa-se que em termos farmacológicos pouco se sabe sobre o potencial das neolignanas aqui citadas (Figura 4 e 5).

Dentre essa quantidade reduzida de atividade relatada, destacam-se as atividades anti-leishmaniose, antifúngica, anti-ulcerogênica, antinoceptiva, anti-inflamatória, antioxidante; que foram realizadas para neolignanas isoladas de alguma das espécies de *Virola*.

Em 2017, Veiga e colaboradores avaliaram extratos (Hexano, Acetato de etila e Metanol), frações e as neolignanas **33**, **34**, e **35** isoladas de *V. surinamensis* frente as cepas *L. amazonenses* e *L. chagasi*. A atividade foi realizada apenas para os extratos, frações e a neolignana **33**, pois as neolignanas **34** e **35** não foram isoladas em quantidade suficiente. Dos compostos testados apenas o extrato em Hexano foi ativo, com um  $IC_{50}$  de  $86,40 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $79,7 \mu\text{g mL}^{-1}$  para *L. amazonenses* e *L. chagasi*, respectivamente, comparado com o controle (anfotericina:  $IC_{50} = 0,062$  e  $0,169 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). A neolignanas **33** não apresentou atividade anti-leishmaniose nas concentrações testadas (entre 25 e  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Veiga et al., 2017).

A atividade antifúngica foi realizada mediante a inibição da enzima sintase (1,3)- $\beta$ -glucan pelas neolignanas **33** e **34** (isoladas das folhas de *V. surinamensis*). A atividade biológica avaliada demonstrou que **33** não possui nenhuma ação frente à enzima. No entanto, a neolignana **34** resultou em 43% de inibição ( $IC_{50} = 175 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) da enzima comparado com o controle positivo (Zacchino et al., 1998).

Atividade antioxidante das neolignanas **5**, **6**, **7**, **80** e **82** foi realizada mediante a inibição do processo de peroxidação lipídica espontânea utilizando lipídio cerebral de ratos Wistar através da medida de TBARS (reação com ácido tiobarbitúrico). Como controle positivo foi utilizado  $\alpha$ -tocoferol (CTL+). Das neolignanas avaliadas, apenas a

**82** foi ativa com concentração letal inferior a obtida para o controle ( $CL_{82} = 0,10 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $CL_{CTL+} = 4,64 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Rezende et al., 2005).

Grandisin (**35**) isolada de *Virola surinamensis* foi avaliada quanto a atividade antinoceptiva e anti-inflamatória. A atividade antinoceptiva foi realizada mediante à contração abdominal provocada por ácido acético em camundongos albinos suíços e, o tempo de reação de dor nas patas ocasionadas por ingestão de formalina. Já a atividade anti-inflamatória foi avaliada mediante a medição de edemas provocados por inflamação cutânea e, pelo teste de Carrageenan, que quantifica os leucócitos que migraram para a cavidade peritoneal sob ação de agentes quimiotáticos. Grandisin reduz a contração abdominal numa dose dependente da concentração assim como reduz em 65,7% o tempo de reação de dor no teste de ingestão de formalina. A ação anti-inflamatória também foi verificada na redução de 64% de edemas comparado com o grupo controle. Quanto à contagem dos leucócitos, grandisin não apresentou alteração na migração (Carvalho et al., 2010).

O potencial alelopático (inibição de germinação de semente, radículas e hipocótilo) das neolignanas **33** e **34** isoladas de *V. surinamensis* frente as espécies de ervas daninhas *Mimosa pudica*, *Senna obtusifolia* e *Senna occidentalis* resultou na inibição do crescimento de sementes em maior intensidade apenas de *M. pudica* (31%), seguida pela espécie *S. occidentalis* (26%) na maior concentração utilizada ( $8,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Já a neolignana **34** não produziu efeitos inibitórios em nenhuma das espécies de planta daninha (Borges et al., 2007).

O extrato metanólico das folhas, as frações em hexano e acetato de etila e a neolignanas **28** de *V. oleífera* foram avaliados quanto a atividade antinoceptiva. O teste consistiu na redução da constrição do músculo abdominal junto com um alongamento dos membros posteriores induzido por ingestão de ácido acético em camundongos suíços masculinos. Os animais pré-tratados com  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  de solução do extrato, frações e substância apresentou redução no número de constrição muscular de ordem de 39,8%, 51,3% e 50,5% para o extrato metanólico, fração em hexano e fração em acetato de etila, respectivamente. A neolignanas **28**, apresentou a melhor redução (75,9%) quando comparado ao controle (Kuroshima et al., 2001).

## 6 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

No período pesquisado 29 trabalhos foram encontrados e analisados envolvendo estudos químicos e atividades biológicas de espécies vegetais do gênero *Virola* de ocorrência no Brasil sendo referentes a 10 das 35 espécies distribuídas em território nacional.

Do ponto de vista de variabilidade estrutural, este gênero mostrou-se muito rico em diversidade onde, das 188 substâncias relatadas isoladas a partir de 10 espécies estudadas, 89 são neolignanas representando 46% dos compostos presentes nessas

plantas.

Quanto à atividade biológica de espécies de *Virola*, a maior parte dos estudos (20) foram realizados com extrato de partes da planta. Apenas 9 estudos foram realizados em termo de substâncias presente na espécie, e destes, 5 espécies (*V. michelli*, *V. oleífera*, *V. pavonis*, *V. sebífera*, *V. surinamensis*) foram as mais avaliadas. As 4 espécies: *V. oleífera*, *V. pavonis*, *V. sebífera* e *V. surinamensis* destacam-se como as que obtiveram alguma atividade avaliada a partir de neolignanas isoladas das mesmas.

Esse baixo número de estudo biológico evidencia a importância de se continuar a pesquisar o potencial biológico do gênero, bem como contribuir com o estudo fitoquímico das espécies listadas na Tabela 3 que não apresentaram nenhum estudo referente à identificação de neolignanas.

Dados compilados no presente trabalho evidenciam que as neolignanas e lignanas são os compostos majoritários de *Virola* no Brasil e, as neolignanas com maior grupo metoxila como substituintes são as que apresentaram uma atividade biológica mais expressiva embora estudos de correlação entre atividade biológica e estruturas químicas são escassos ou inexistentes.

## REFERÊNCIAS

<sup>[1]</sup>BAQUERO, E.; QUIÑONES, W.; FRANZBLAU, S.; TORRES, F.; ARCHBOLD, R.; ECHEVERRI, F. Furan type lignans with antimycobacterial activity. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 14, n. 3, p. 171-178, 2015.

<sup>[2]</sup>BARATA, L. E. S.; BAKER, P. M.; GOTTLIEB, O. R.; RÚVEDA, E. A. Neolignans of *Virola surinamensis*. **Phytochemistry**, v. 17, p. 783-786, 1978.

<sup>[3]</sup>BARATA, L. E. S.; SANTOS, L. S.; FERRI, P. H.; PHILLIPSON, J. D.; PAINE, A.; CROFT, S. L. Anti-leishmanial activity of neolignanas from *Virola* species and synthetic analogues. **Phytochemistry**, v. 55, p. 589-595, 2000.

<sup>[4]</sup>BARBOSA FILHO, J. M. Lignan, neo-lignan e seus análogos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora da UFSC, 1999. p. 471-488.

<sup>[5]</sup>BLUMENTHAL, E. E. A.; SILVA, M. S.; YOSHIDA, M. Lignoids, flavonoids and polyketides of *Virola surinamensis*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 4, p. 745-749, 1997.

<sup>[6]</sup>BORGES, F. C.; SANTOS, L. S.; CORRÊA, M. J. C.; OLIVEIRA, M. N.; SOUZA FILHO, A. P. S. Potencial alelopático de duas neolignanas isoladas de folhas de *Virola surinamensis* (Myristicaceae). **Planta Daninha**, v. 25, n. 1, p. 51-59, 2007.

<sup>[7]</sup>CARVALHO, A. A. V.; GALDINO, P. M.; NASCIMENTO, M. V. M.; KATO, M. J.; VALADARES, M. C.; CUNHA, L. C.; COSTA, E. A. Antinociceptive and antiinflammatory activities of grandisin extracted from *Virola surinamensis*. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 1, p. 113-118, 2010.

<sup>[8]</sup>CAVALCANTE, S. H.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Neolignans from *Virola carinata* fruit. **Phytochemistry**, v. 24, n. 5, p. 1051-1055, 1985.

- [9] COSTA, E. S.; HIRUMA-LIMA, C. A.; LIMA, E. O.; SUCUPIRA, G. C.; BERTOLIN, A. O.; LOLIS, S. F.; ANDRADE, F. D. P.; VILEGAS, W.; SOUZA-BRITO, A. R. M. Antimicrobial activity of some medicinal plants of Cerrado, Brazil. **Phytotherapy Research**, v. 22, n. 5, p. 705-707, 2008.
- [10] DENNY, C.; ZACHARIAS, M. E.; KOHN, L. K.; FOGGIO, M. A.; CARVALHO, J. E. Atividade antiproliferativa dos extratos e da fração orgânica obtidos das folhas de *Virola sebifera* Aubl. (Myristicaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 598-603, 2007.
- [11] DENNY, C.; ZACHARIAS, M. E.; RUIZ, A. L. T. G.; AMARAL, M. C. E.; BITTRICH, V.; KOHN, L. K.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F.; CARVALHO, J. E.; FOGGIO, M. A. Antiproliferative properties of polyketides isolated from *Virola sebifera* leaves. **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 127-130, 2008.
- [12] DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach**. 2ª Edição. Inglaterra: John Wiley & Sons Ltd. 2002. 507 p.
- [13] FERNANDES, A. M. A. P.; BARATA, L. E. S.; FERRI, P. H. Lignans and a neolignan from *Virola oleifera* leaves. **Phytochemistry**, v. 32, n. 6, p. 1567-1572, 1993.
- [14] FERRI, P. H.; BARATA, L. E. S. Neolignans and a phenylpropanoid from *Virola pavonis* leaves. **Phytochemistry**, v. 31, n. 4, p. 1375-1377, 1992.
- [15] GOTTLIEB, O. R.; MAIA, J. G. S.; RIBEIRO, M. N. S. Neolignans from *Virola carinata*. **Phytochemistry**, v. 15, p. 773-774, 1976.
- [16] HIRUMA-LIMA, C. A.; BATISTA, L. M.; ALMEIDA, A. B. A.; MAGRI, L. P.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W.; BRITO, A. R. M. S. Antiulcerogenic action of ethanolic extract of the resin from *Virola surinamensis* Warb. (Myristicaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, p. 406-409, 2009.
- [17] KATO, M. J.; LOPES, L. M. X.; PAULINO FO, H. F.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Acylresorcinols from *Virola sebifera* and *Virola elongata*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 3, p. 533-536, 1985.
- [18] KATO, M. J.; PAULINO FO, H. F.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Neolignans from fruits of *Virola elongata*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 1, p. 279-280, 1986.
- [19] KATO, M. J.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Lignoids and arylalkanones from fruits of *Virola elongata*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 6, p. 1799-1810, 1990.
- [20] KAWANISHI, K.; HASHIMOTO, Y. Long chain esters of *Virola* species. **Phytochemistry**, v. 26, n. 3, p. 749-752, 1987.
- [21] KAWANISHI, K.; UHARA, Y.; HASHIMOTO, Y. Neolignans of *Virola carinata* bark. **Phytochemistry**, v. 21, n. 11, p. 2725-2728, 1982.
- [22] KAWANISHI, K.; UHARA, Y.; HASHIMOTO, Y. The neolignans (-)-carinatone and carinatin from *Virola carinata*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 4, p. 929-931, 1982.
- [23] KAWANISHI, K.; UHARA, Y.; HASHIMOTO, Y. The neolignans, carinatidin, dihydrocarinatidin, carinatidiol and dehydrodieugenol B from *Virola carinata*. **Phytochemistry**, v. 22, n. 10, p. 2277-2280, 1983.
- [24] KUROSHIMA, K. N.; CAMPOS, F.; SOUZA, M. M.; YUNES, R. A.; MONACHE, F. D.; CECHINEL FILHO, V. Phytochemical and pharmacological investigations of *Virola oleifera* leaves. **Journal of Biosciences**, v. 56, n. 9-10, p. 703-706, 2001.
- [25] LOPES, L. M. X.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. 1,11-Diarylundecan-1-one and 4-aryltetralone

neolignans from *Virola sebifera*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 3, p. 751-755, 1982.

[26] LOPES, L. M. X.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Aryltetralone and arylindanone neolignans from *Virola sebifera*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 9, p. 2021-2024, 1984.

[27] LOPES, L. M. X.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Further lignoids from *Virola sebifera*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 11, p. 2647-2652, 1984.

[28] LOPES, N. P.; CHICARO, P.; KATO, M. J.; ALBURQUEQUE, S.; YOSHIDA, M. Flavonoids and lignans from *Virola surinamensis* twigs and their *in vitro* activity against *Trypanosoma cruzi*. **Planta Medica**, v. 64, n. 7, p. 667-668, 1998.

[29] MACRAE, W. D.; TOWERS, G. H. N. Non-alkaloidal constituents of *Virola elongata* bark. **Phytochemistry**, v. 24, n. 3, p. 561-566, 1985.

[30] MARQUES, M. O. M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Neolignans from fruits of *Virola pavonis*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 12, p. 4380-4381, 1992.

[31] MARTINEZ V., J. C.; CUCA S., L. E.; SANTANA M., A. J.; POMBO-VILLAR, E.; GOLDING, B. T. Neolignans from *Virola elongata*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 7, p. 1612-1614, 1985.

[32] MARTINEZ V., J. C.; CUCA S., L. E.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Neolignans from *Virola calophylloidea*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 8, p. 1867-1868, 1985.

[33] MARTINEZ V., J. C.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Arylnaphthalene neolignans from *Virola calophylla*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 9, p. 2655-2657, 1990.

[34] MILES, D. H.; LY, A. M.; RANDLE, S. A.; HEDIN, P. A.; BURKS, M. L. Alkaloidal insect antifeedants from *Virola calophylla* Ward. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 35, p. 794-797, 1987.

[35] MORAIS, S. K. R.; TEIXEIRA, A. F.; TORRES, Z. E. S.; NUNOMURA, S. M.; YAMASHIRO-KANASHIRO, E. H.; LINDOSO, J. A. L.; YOSHIDA, M. Biological activities of lignoids from amazona Myristicaceae species: *Virola michelli*, *V. molíssima*, *V. pavonis* and *Iryanthera juruensis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 6, p. 1110-1118, 2009.

[36] QUINTANILHA, L. G.; LOBÃO, A. Q. Flora do Rio de Janeiro: Myristicaceae. **Rodriguésia**, v. 68, n. 1, p. 85-89, 2017.

[37] REZENDE, K. R.; DAVINO, S. C.; BARROS, S. B. M.; KATO, M. J. Antioxidant activity of aryltetralone lignans and derivatives from *Virola sebifera* (Aubl.). **Natural Product Research**, v. 19, n. 7, p. 661-666, 2005.

[38] REZENDE, K. R.; KATO, M. J. Dibenzylbutane and aryltetralone lignans from seeds of *Virola sebifera*. **Phytochemistry**, v. 61, n. , p. 427-432, 2002.

[39] SARTORELLI, P.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Antifungal lignans from the arils of *Virola oleífera*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 6, p. 1003-1006, 1998.

[40] **THE PLANT LIST (2013). Version 1.1. Publicado na internet: <http://www.theplantlist.org/> (Acessado: 19/06/2018).**

[41] VEIGA, A.; ALBURQUEQUE, K.; CORRÊA, M. E.; BRIGIDO, H.; SILVA, J. S.; CAMPOS, M.; SILVEIRA, F.; SANTOS, L.; DOLABELA, M.; Leishmania amazonenses and Leishmania chagasi: in vitro leishmanicide activity of *Virola surinamensis* (rol.) Warb. **Experimental Parasitology**, v. 175, p. 68-73, 2017.

<sup>[42]</sup>VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

<sup>[43]</sup>YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. 2001, **Plantas Medicinais Sob A Óptica Da Moderna Química Medicinal**, Argos, Chapecó, Santa Catarina, 523p.

<sup>[44]</sup>ZACCHINO, S.; RODRÍGUEZ, G.; SANTECCHIA, C.; PEZZENATI, G.; GIANNINI, F.; ENRIZ, R. In vitro studies on mode of action of antifungal 8.O.4'-neolignans occurring in certain species of *Virola* and related genera of Myristicaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, p. 35-41, 1998.

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

### **Arthur Ladeira Macedo**

UFF, Instituto de Química  
Niterói - RJ

### **Rodrigo Coutinho Duprat**

UFF, Instituto de Biologia  
Niterói - RJ

### **Larissa Ramos Guimarães da Silva**

UFF, Instituto de Química  
Niterói - RJ

### **Davyson de Lima Moreira**

Fiocruz, Instituto de Tecnologia em Fármacos -  
Farmanguinhos  
Rio de Janeiro - RJ

### **Maria Auxiliadora Coelho Kaplan**

UFRJ, Instituto de Pesquisa de Produtos Naturais  
Rio de Janeiro - RJ

### **Thatyana Rocha Alves Vasconcelos**

UFF, Instituto de Química  
Niterói - RJ

### **Laine Celestino Pinto**

UFPA, Instituto de Biociências  
Belém - PA

### **Raquel Carvalho Montenegro**

UFC, Faculdade de Medicina  
Fortaleza - CE

### **Norman Arthur Ratcliffe**

Swansea University, Department of Biosciences  
Swansea – Glamorgan, Reino Unido

### **Cícero Brasileiro Mello**

UFF, Instituto de Biologia  
Niterói - RJ

### **Alessandra Leda Valverde**

UFF, Instituto de Química  
Niterói - RJ

**RESUMO:** O mosquito *Aedes aegypti* é um dos principais vetores de arboviroses e os inseticidas utilizados no seu controle são tóxicos e não são totalmente efetivos. O gênero *Piper* apresenta diversas substâncias ativas contra artrópodes, incluindo as neolignananas. O presente trabalho avaliou o potencial larvicida do extrato bruto *n*-hexânico de folhas de *Piper solmsianum* (PS) e do eupomatenóide-6 contra *Ae. aegypti*. O extrato PS apresentou boa atividade contra larvas de terceiro estágio e eupomatenóide-6 exibiu DL<sub>50</sub> de 19,33 µM, sendo a substância mais ativa contra *Ae. aegypti* já isolada de uma espécie de *Piper*. Eupomatenóide-6 foi também analisado quanto à sua toxicidade e apresentou boa seletividade. Foi desenvolvido e validado um método por Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência acoplado a detector de ultravioleta-visível em rede de diodos (CLAE-DAD) para a determinação de eupomatenóide-6 em PS, sendo o extrato padronizado em 23,45 ± 0,58 mg da substância/g. Dessa forma, a DL<sub>50</sub> de PS corresponde a uma dose cerca de quatro vezes menor que a DL<sub>50</sub> de eupomatenóide-6, indicando a presença de outras substâncias ativas. Foi demonstrado que PS apresenta

grande potencial para uso como inseticida contra *Ae. aegypti*, uma vez que sua substância majoritária apresenta ótima atividade e seletividade. O método analítico desenvolvido apresenta diversas vantagens sobre o descrito anteriormente na literatura.

**PALAVRAS-CHAVE:** Larvicida, Neolignanas, Padronização, Piperaceae, Toxidez.

**ABSTRACT:** The *Aedes aegypti* mosquito is one of the major vectors of arboviruses and the insecticides used are toxic and have not been effective. The genus *Piper* has many active compounds against arthropods, including neolignans. The present study evaluated the larvicidal potential of the *n*-hexanic crude extract of leaves of *Piper solmsianum* (PS) and of eupomatenoid-6 against *Ae. aegypti*. PS showed good activity against 3<sup>rd</sup> instar larvae and eupomatenoid-6 exhibited LD<sub>50</sub> of 19.33 µM, being the most active compound against *Ae. aegypti* isolated from *Piper* sp. Eupomatenoid-6 was also assayed to its toxicity and exhibited great selectivity. A High-Performance Liquid Chromatography (HPLC-DAD) method for the determination of eupomatenoid-6 in PS was validated and the extract was standardized in 23.45 ± 0.58 mg of eupomatenoid-6 per gram of extract. Therefore, the LD<sub>50</sub> of PS corresponds to a dose of eupomatenoid-6 about 4 times smaller than the isolated compound, indicating the presence of other active substances. In conclusion, we found that PS has a great potential for use as insecticide against *Ae. aegypti* once its major compound is very active and selective. The analytical method developed has many advantages over the previously reported in scientific literature.

**KEYWORDS:** Larvicidal, Neolignans, Piperaceae, Standardization, Toxicity.

## 1 | INTRODUÇÃO

O artrópode *Aedes aegypti* (Culicidae) é um inseto adaptado ao ambiente urbano, local onde encontra-se a principal fonte de alimentação das fêmeas, o sangue humano. Esse mosquito é considerado o principal vetor de diversas arboviroses nas regiões tropicais e subtropicais. Dentre as arboviroses transmitidas estão a dengue (DENV) e as febres chikungunya (CHIV) e zika (ZIKV) (MUSSO; GUBLER, 2016).

Nos últimos 40 anos vêm ocorrendo o ressurgimento de várias dessas arboviroses, afetando em grande escala os seres humanos. Além dos transtornos causados por esses vírus, diversas complicações podem ocorrer: a dengue pode evoluir para quadro hemorrágico, podendo levar o paciente a choque hipovolêmico e morte, as infecções por CHIV podem levar a quadros de artralgia incapacitante crônica e, quanto ao ZIKV, existem fortes indícios de que esteja ligado ao surgimento da Síndrome de Guillain-Barré (SGB) e microcefalia em neonatos (MUSSO; GUBLER, 2016).

Não existe tratamento específico para essas arboviroses, sendo este feito sobre os sintomas. Recentemente foi lançada uma vacina contra DENV (Dengvaxia®), mas ainda não existem vacinas para ZIKV e CHIV. De maneira geral, a melhor forma de

prevenção contra essas arboviroses é o combate ao *Ae. aegypti*. A recente expansão de DENV, CHIV e ZIKV destaca a ineficiência dos métodos atuais de controle deste vetor (HIGGS; VANLANDINGHAM, 2015).

Um dos motivos complicadores no controle do vetor *Ae. aegypti* é a sua domesticação. O fato de ele estar associado à presença de seres humanos restringe o leque de inseticidas que podem ser utilizados, uma vez que muitos deles apresentam grande toxidez contra mamíferos (NESHEIM; FISHEL; MOSSLER, 2014). Outro problema é o surgimento de cepas resistentes, como relatado por Chediak et al. (2016). Esses autores reportaram o aumento da resistência com o passar dos anos, onde, desde 2010, o temefós vem apresentando mortalidade de menos de 80% dos mosquitos na maioria das regiões brasileiras, caracterizando sua ineficiência. Assim, evidencia-se a necessidade do desenvolvimento de novos métodos efetivos de controle do vetor *Ae. aegypti*.

Para suprir essa necessidade, pesquisas por novas alternativas naturais de controle que tenham menor impacto na saúde humana e de outros animais têm sido realizadas (BENELLI, 2015). Nesse contexto, as plantas do gênero *Piper* produzem um arsenal de substâncias ativas contra artrópodes. As neolignan se destacam nesse cenário, especialmente contra mosquitos (MACEDO; DOS SANTOS; et al., 2017).

As neolignanas isoladas de espécies de *Piper* apresentam diversas atividades biológicas, sendo as benzofurânicas as mais exploradas (MACEDO; DOS SANTOS; et al., 2017). No que concerne a atividade larvicida, eupomatenoide-5 (**1**), eupomatenoide-6 (**2**), conocarpano (**3**) e decurrenal (**4**) foram testados contra larvas de *Aedes atropalpus* e apenas **4** não apresentou toxidez significativa (CHAURET et al., 1996). Burchelina (**5**) foi tóxica para larvas de *Ae. aegypti*, causando desorganização e destruição celular, ruptura do tecido muscular e vacuolização de células epiteliais do intestino (Figura 1) (NARCISO et al., 2014).

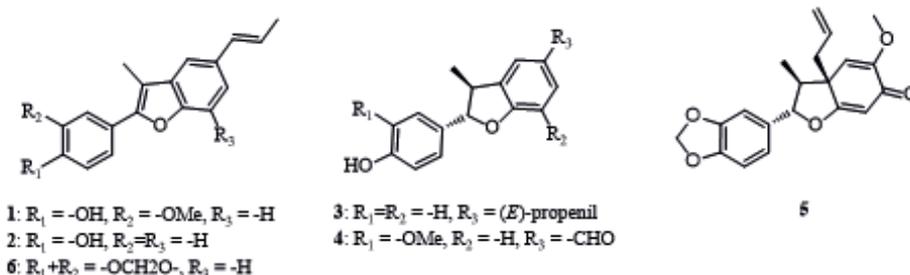


Figura 1 – Algumas neolignanas com núcleo benzofurânico isoladas de espécies de *Piper*.

*Piper solmsianum* C.DC. é um arbusto nativo e endêmico do Brasil, conhecido popularmente como caapeba ou jaguarandi (Figura 2). A partir de extratos dessa espécie já foram obtidas as neolignanas benzofurânicas **1**, **2**, **3**, eupomatenoides-3 (**6**), além de outras substâncias como neolignanas tetraidrofurânicas, flavonoides e o arilpropenoide apiol (MARTINS et al., 2000; MOREIRA; KAPLAN; GUIMARAES, 1995; SILVA et al., 2010).

O objetivo deste trabalho consistiu no isolamento bioguiado para avaliação do potencial citotóxico e larvicida do extrato em *n*-hexano de folhas de *P. solmsianum* e do eupomatenóide-6, bem como no desenvolvimento e validação de um método para quantificação desta neolignana.

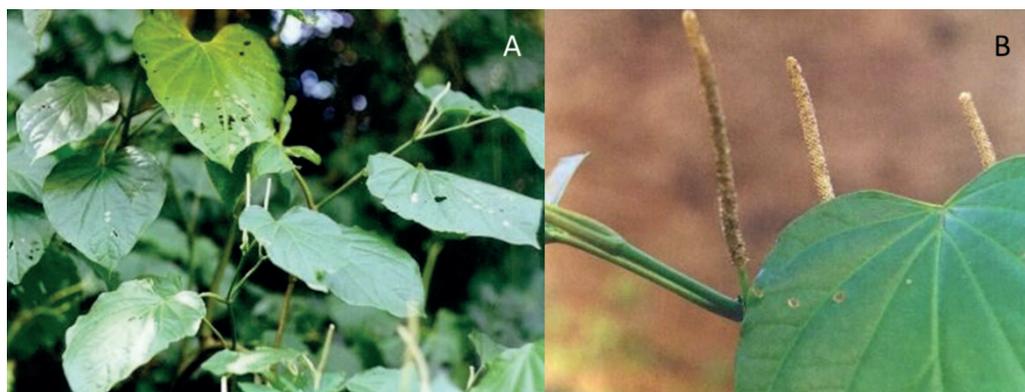


Figura 2 – *Piper solmsianum* C.DC.: (A) arbusto, (B) detalhe das inflorescências.

Fonte: Davyson de Lima Moreira

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção do extrato

Folhas de *Piper solmsianum* C.DC. foram coletadas em propriedade privada, próxima ao Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Guapimirim/RJ (GPS 22.480502 °S 42.996839 °O), em agosto de 2009. A espécie foi identificada pela especialista em Piperaceae Dra. Elsie Franklin Guimarães do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro (JBRJ) e uma exsicata foi depositada no Herbário do JBRJ sob o número RB306112.

As folhas foram secas a 40 °C em estufa ventilada até atingirem peso constante (600 g). O material vegetal seco foi triturado, extraído por maceração estática com *n*-hexano e o solvente foi removido em evaporador rotatório sob pressão reduzida, rendendo 20,1 g de extrato seco (PS).

### 2.2 Isolamento de substâncias do extrato de *Piper solmsianum*

Uma alíquota de 20 g do extrato de PS foi submetida à cromatografia líquida a vácuo (CLV - partícula 5-25 µm) em funil sinterizado, onde foram obtidas 18 frações. As frações PS-2 a 5 foram reunidas (5,07 g) e submetidas à cromatografia em coluna de gel de sílica, com auxílio de uma bomba Waters 510 (partícula 5-25 µm), eluída com gradiente de polaridade, rendendo 27 frações. Dessas frações, reuniu-se de 8-11 (711 mg) que foram novamente cromatografadas em cromatografia *Flash* (partícula 40-63 µm), sendo obtidas 10 frações. Dessas frações juntou-se de 5-7 (131 mg) que foram posteriormente separadas em CLAE-DAD (equipamento Waters® constituído de duas bombas modelo 510; detector de arranjo de fotodiodos (DAD) modelo 996 e injetor

manual) preparativo utilizando coluna Supelcosil C-8 (250 x 21,2 mm, 12 µm) com fase móvel composta por 80% de metanol e 20% de água ultra pura acidificada com 0,05% de ácido trifluoroacético (TFA), vazão de 3 mL/min. Foram recolhidas duas frações **A** (13 mg) e **B** (51 mg).

### 2.3 Elucidação estrutural

As análises por cromatografia com fase gasosa (CG) foram realizadas em equipamento Hewlett-Packard 6890 acoplado ao espectrômetro de massas (EM) Hewlett-Packard 5972, utilizando-se coluna DP-5MS (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano) capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm i.d., 0,25 µm de espessura da camada), tendo Hélio como gás de arraste, com vazão de 0,5 mL/min, por 60 min. A temperatura inicial foi de 70 °C com taxa de aquecimento de 5 °C/min até atingir 315 °C, mantendo essa temperatura até o final da análise. A temperatura do injetor foi 270 °C e a do forno 300 °C. Os parâmetros de operação do EM foram: 70 eV, fonte de íons a 250 °C, com o quadrupolo configurado para selecionar íons com  $m/z$  de 40 a 700.

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos em um espectrômetro Varian VNMRS 500 MHz, operando a 500 MHz para frequência de  $^1\text{H}$  e 125 MHz para  $^{13}\text{C}$ , tendo como padrão interno o tetrametilsilano (TMS), para  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (0 ppm).

### 2.4 Teste larvicida

Os ovos de *Ae. aegypti*, cepa Rockefeller, foram fornecidos pelo Dr. José Bento Pereira Lima, do Instituto de Biologia do Exército Brasileiro e Fundação Oswaldo Cruz. A eclosão foi feita em água de criação por aproximadamente 60 min. Em seguida, as larvas foram colocadas em recipientes plásticos (25 x 15 x 7 cm) contendo 1 mL de água desclorada e 1 mg de ração em pó para peixe por larva. As larvas foram mantidas em estufas BOD a  $26 \pm 1$  °C por 72 a 78 h.

As unidades experimentais foram formadas por grupos de 10 larvas de terceiro estágio acondicionadas em copos plásticos de 50 mL contendo 10 mL de água desclorada cada. Os copos foram então organizados em grupos de maneira aleatória, com auxílio do programa PASS 11.0.10 para Windows, pela implementação do algoritmo “random sorting” (HINTZE, 2011).

Para avaliar o extrato de *P. solmsianum*, dois grupos formados por seis replicatas foram submetidos a doses de 50 e 100 µg/mL. Subsequentemente foi realizado um experimento de dose x resposta utilizando **B** para o cálculo da dose letal de 50 ( $DL_{50}$ ), 90 ( $DL_{90}$ ) e 99 ( $DL_{99}$ ), variando-se a concentração entre 11,35 e 30,27 µM (3 e 8 µg/mL). Grupos com diferentes concentrações de **B** foram formados com quatro replicatas cada. Este estudo foi realizado em duplicata para o cálculo dos valores de DL (MACEDO; DUPRAT; et al., 2017).

## 2.5 Análise dos dados

Os resultados são mostrados como média aritmética da porcentagem de cada replicata de acordo com os grupos experimentais ao longo dos dias. As barras de erro representam o erro padrão da média.

A comparação das curvas de desenvolvimento das larvas a adultos foi feita pelo teste estatístico de Gehan-Breslow-Wilcoxon ( $p \leq 0,05$ ) no *software* GraphPad Prism 6,05 para Windows. Os valores de  $p$  gerados foram validados no *software* PAST, versão 3,14 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001). Os valores de DL foram calculados por análise de probit (RAYMOND, 1985).

## 2.6 Ensaio de citotoxicidez

A atividade metabólica (viabilidade) das células MRS5 foi analisada utilizando o método de MTT (MOSMANN, 1983). As células foram semeadas em placas de 96 poços em concentração de  $5 \times 10^4$  células/poço e deixadas em estufa por 24 h. O meio de cultura foi então aspirado e substituído por um fresco. As células retornaram para a estufa incubadora na presença dos diferentes extratos e partições e foram incubadas por 48 h. Após esse período, o reagente de MTT foi adicionado e as placas foram incubadas por mais 3,5 h. O sobrenadante foi novamente retirado, os cristais de formazan foram dissolvidos em solução a base de isopropanol (4 mM de HCl e 0,1% de Nondet P-40) e a absorbância medida a 560 nm em espectrofotômetro de microplaca EPOCH. A substância **B** foi testada entre 7,8 e 500  $\mu\text{g/mL}$  e em triplicata.

## 2.7 Validação do método de CLAE-DAD e padronização do extrato em *n*-hexano

A padronização foi feita por CLAE-DAD utilizando sistema Flexar SQ 300 equipado com coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (50 mm x 4,6 mm i.d., 3,5  $\mu\text{m}$ , tamanho de partícula), fase móvel composta por 65% de acetonitrila e 35% de água acidificada com 0,05% de TFA, com vazão de 0,8 mL/min e temperatura de forno de 30 °C. O volume de injeção foi de 10  $\mu\text{L}$  e a análise foi acompanhada em 254 nm por 4,5 min.

A substância **B** foi utilizada para a construção da curva analítica de oito pontos (10 a 140 ng/mL). O método foi validado de acordo com o manual do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, sendo avaliados o intervalo de trabalho e linearidade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), efeito de matriz, precisão e robustez (INMETRO, 2016).

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir do extrato obtido com *n*-hexano de *P. solmsianum* (PS), foi feita uma série de cromatografias para o isolamento das substâncias **A** e **B**.

Em análise por CG-EM da fração **A**, foi encontrado um sinal único com tempo de retenção (tR) de 37,28 min e íon molecular de  $m/z$  266, sugerindo fórmula molecular

de  $C_{18}H_{18}O_2$ . Já na análise da fração **B** foi encontrado um sinal único com tR de 40,05 min e íon molecular de  $m/z$  264, sugerindo fórmula molecular de  $C_{18}H_{16}O_2$ .

Os dados de RMN  $^1H$  e  $^{13}C$  permitiram identificar as substâncias **A** e **B** como as neolignan conocarpano (**3**) e eupomatenoide-6 (**2**) (Tabela 1) respectivamente, quando comparados com dados da literatura (PESSINI et al., 2005). Os espectros de correlação homonuclear  $^1H$ - $^1H$  COSY e heteronucleares  $^1H$ - $^{13}C$  HSQC e HMBC confirmaram as estruturas propostas.

#C/H	$^1H$ (m, J em Hz, nH) (B)	$^1H$ (nH, m, J em Hz) (A)	$^{13}C$ (m)* (B)	$^{13}C$ (m) (A)
1	-	-	124,2 (C)	133,16 (C)
2/6	7,68 (d, J = 8,7, 2H)	7,29 (d, J = 8,5, 2H)	128,3 (CH)	128,06 (CH)
3/5	6,94 (d, J = 8,6, 2H)	6,83 (d, J = 8,6, 2H)	115,4 (CH)	115,65 (CH)
4	-	-	155,4 (C)	155,79 (C)
7	-	5,08 (d, J = 8,7, 1H)	151,1 (C)	92,80 (CH)
8	-	3,39 (m, 1H)	109,9 (C)	45,44 (CH)
9	2,42 (s, 3H)	1,39 (d, J = 6,6, 3H)	9,3 (CH <sub>3</sub> )	18,06 (CH <sub>3</sub> )
1'	-	-	132,6 (C)	131,48 (C)
2'	7,43 (d, J = 1,4, 1H)	7,13 (s, 1H)	116,1 (CH)	120,93 (CH)
3'	-	-	131,7 (C)	132,55 (C)
4'	-	-	153,0 (C)	158,49 (C)
5'	7,36 (d, J = 8,7, 1H)	6,76 (d, J = 8,1, 1H)	110,6 (CH)	109,48 (CH)
6'	7,28 (dd, J = 8,7 e 1,5, 1H)	7,12 (d, J = 8,2, 1H)	122,1 (CH)	126,51 (CH)
7'	6,52 (dd, J = 15,6 e 1,5, 1H)	6,36 (dd, J = 15,6, 1,5, 1H)	131,2 (CH)	130,96 (CH)
8'	6,23 (dq, J = 15,6 e 6,6, 1H)	6,09 (dq, J = 15,6, 6,5, 1H)	124,2 (CH)	123,24 (CH)
9'	1,91 (dd, J = 6,6 e 1,5, 3H)	1,86 (dd, J = 6,6, 1,5, 3H)	18,4 (CH <sub>3</sub> )	18,60 (CH <sub>3</sub> )
OH	4,99 (sl, 1H)	4,90 (sl, 1H)	-	-

Tabela 1 – Dados de deslocamentos químicos (em ppm) das substâncias **A** e **B**.

$^1H$  500 MHz,  $CDCl_3$ ;  $^{13}C$  125 MHz  $CDCl_3$ . \* valores obtidos a partir dos espectros de HMBC e HSQC.

Uma vez que as neolignanas têm demonstrado boa atividade contra insetos, decidiu-se testar o extrato de *P. solmsianum* contra larvas de *Ae. aegypti* (MACEDO; DOS SANTOS; et al., 2017).

A Figura 3 apresenta o efeito do tratamento das larvas de *Ae. aegypti* com o extrato em *n*-hexano de PS nas concentrações de 100  $\mu g/mL$  e 50  $\mu g/mL$ . A dose mais alta causou a morte de 80% das larvas no primeiro dia e 98,3% no terceiro, restando apenas uma larva viva. Essa larva passou para o estágio de pupa com 5 dias de atraso, morrendo após essa evolução. A concentração de 50  $\mu g/mL$ , por outro lado, não causou nenhuma morte após o primeiro dia e 50% dos insetos morreram ao final do experimento, sendo a maioria na forma de pupa. Não houve uma quantidade

significativa de mortes em nenhum dos grupos controle (Figura 3A). Dessa forma, não foi feita curva de dose x resposta e assumiu-se 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  como  $\text{DL}_{50}$  para o extrato de PS. Foi possível observar também o atraso de 1 dia no desenvolvimento das larvas sobreviventes a pupa e 1 dia de pupa para adultos (Figura 3B-D).

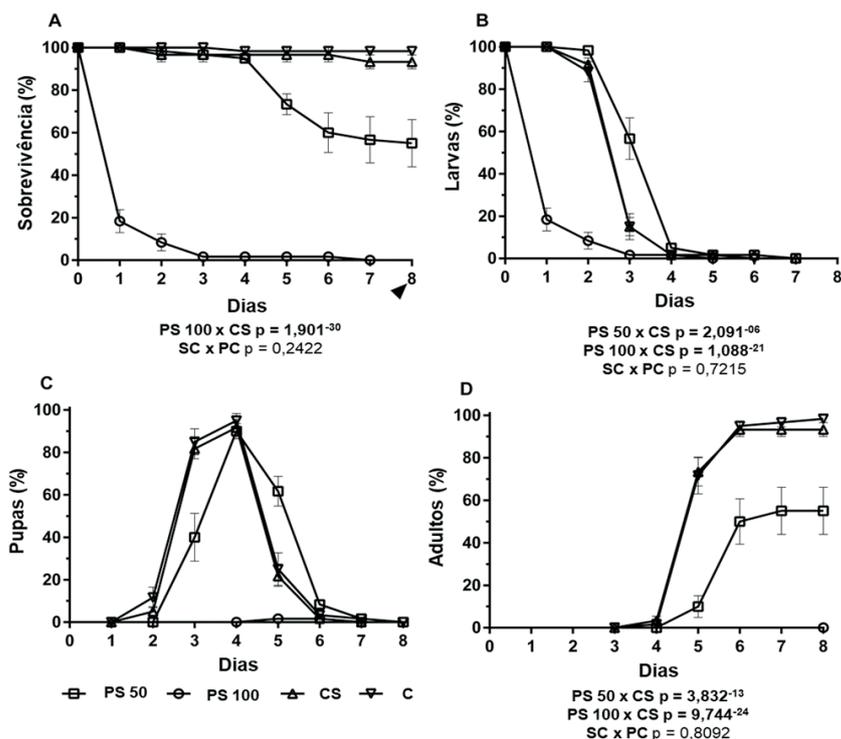


Figura 3 – Efeito do extrato bruto em *n*-hexano de folhas de *P. solmsianum* na sobrevivência (A) e desenvolvimento de larvas (B), pupa (C) e adultos (D) de *Ae. aegypti* a partir de larvas de terceiro estágio em diferentes dias após tratamento experimental com 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (PS 100) ou 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (PS 50) comparados com o controle de solvente (CS) e controle físico (CF). Adaptado de Macedo et al. (2017)

O extrato foi então fracionado, as frações testadas e, da mais ativa, foi obtido **2**, substância que Chauret et al. (1996) demonstraram apresentar boa atividade contra larvas de segundo estágio de *Ae. atropalpus*. Essa substância foi testada em diferentes concentrações contra as larvas de *Ae. aegypti* para a obtenção dos valores de  $\text{DL}_{50}$  (19,33  $\mu\text{M} = 5,11 \mu\text{g}/\text{mL}$ ),  $\text{DL}_{90}$  (28,68  $\mu\text{M} = 7,58 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) e  $\text{DL}_{99}$  (36,28  $\mu\text{M} = 9,59 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) como mostrado na Figura 4 e na Tabela 2. A atividade contra *Ae. aegypti* exibida por **2** é maior do que as já descritas para outras substâncias isoladas de espécies de *Piper* (CABRAL et al., 2009; LEITE et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2013).

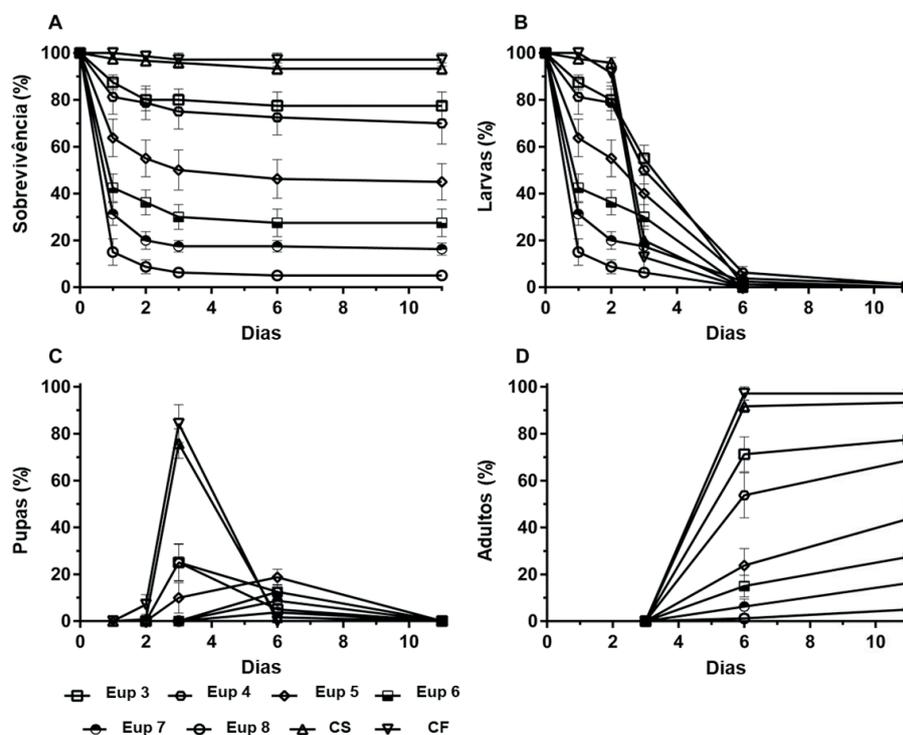


Figura 4 – Efeito do eupomatenoide-6 (**2**) obtido do extrato bruto em *n*-hexano de folhas de *P. solmsianum* na sobrevivência (A) e desenvolvimento de larvas (B), pupa (C) e adultos (D) de *Ae. aegypti* a partir de larvas de terceiro estágio em diferentes dias após tratamento experimental com 3,0 a 8,0  $\mu\text{g/mL}$  (EUP 3 a 8) comparados com o controle de solvente (CS) e controle físico (CF). Adaptado de Macedo et al. (2017)

DL	$[\mu\text{M}]$ (IC 95%)	$[\mu\text{g/mL}]$ (IC 95%)
2	4,39 (0,61-7,04)	1,16 (0,16-1,86)
50	19,33 (18,24-20,35)	5,11 (4,82-5,38)
90	28,68 (27,09-30,76)	7,58 (7,16-8,13)
99	36,28 (33,67-39,91)	9,59 (8,90-10,55)

Tabela 2 – Valores de Dose Letal (DL) do eupomatenoide-6 (**2**), obtido do extrato bruto em *n*-hexano de folhas de *P. solmsianum*, contra larvas de terceiro estágio de *Ae. aegypti* da cepa Rockefeller.

Outras substâncias ativas isoladas de espécies de *Piper* e testadas contra *Ae. aegypti* são os alcaloides piplartina, isolado de *Piper tuberculatum* e piperlonguminina, purificado de *P. scutifolium*. A piplartina foi efetiva em concentrações acima de 378,33  $\mu\text{M}$  (100  $\mu\text{g/mL}$ ), enquanto piperlonguminina apresentou  $\text{DL}_{50}$  de 37,81  $\mu\text{M}$  (12  $\mu\text{g/mL}$ ), matando 100% das larvas a 94,54  $\mu\text{M}$  (30  $\mu\text{g/mL}$ ) (MALECK et al., 2014). A neolignana (-)-grandisina, isolada das inflorescências de *P. solmsianum* apresentou  $\text{DL}_{50}$  igual a 5,48  $\mu\text{M}$  (2,37  $\mu\text{g/mL}$ ), porém esse estudo foi realizado com larvas de primeiro estágio, sendo mais susceptíveis a tratamentos químicos (CABRAL et al., 2009). Quando testada em larvas de terceiro estágio, como no presente trabalho, o valor de  $\text{DL}_{50}$  da (-)-grandisina foi 346,81  $\mu\text{M}$  (150  $\mu\text{g/mL}$ ). A avaliação histológica das larvas mostrou alterações no intestino médio, com intensa destruição tecidual e desorganização celular (LEITE et al., 2012). Outra neolignana ativa é a burchelina

(5), que apresentou  $DL_{50}$  de  $45,54 \mu\text{M}$  ( $15,5 \mu\text{g/mL}$ ) e  $DL_{90}$  de  $79,33 \mu\text{M}$  ( $27 \mu\text{g/mL}$ ) (NARCISO et al., 2014).

A boa atividade encontrada para **2** sugeriu que esta pode ser a principal substância ativa do extrato obtido em *n*-hexano de PS, dessa forma foi desenvolvido um método para a quantificação de **2** neste extrato (seção 3.1). Assim, o extrato foi padronizado em  $23,45 \pm 0,58$  mg de eupomatenóide-6 (**2**) por grama de PS. Em vista disso, a  $DL_{50}$  de PS sobre as larvas ( $50 \mu\text{g/mL}$ ) corresponde a uma dose de  $4,44 \pm 0,11 \mu\text{M}$  ( $1,17 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$ ), uma quantidade cerca de 4 vezes menor que a substância isolada, o que sugere a presença de outras substâncias ativas. Como também foi isolado **3** no presente trabalho e esta neolignana já apresentou atividade contra larvas de *Ae. atropalpus* é esperado que essa substância contribua em possível efeito de interação, como sinérgico ou aditivo (CHAURET et al., 1996). Embora não seja ideal, utilizando a abordagem de Felipe et al. (2006) para doseamento de neolignanas totais, estima-se uma concentração de  $1,15 \pm 0,52$  mg de **3** para cada grama de PS, tendo assim a dose correspondente de  $2,14 \pm 0,11 \mu\text{M}$  ( $0,57 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$ ) na  $DL_{50}$  de PS.

Existem três tipos de interação entre substâncias em alvos biológicos: efeitos aditivo, sinérgico e antagônico. O efeito aditivo ocorre quando a ação de duas substâncias utilizadas em conjunto é igual à soma das atividades isoladas, enquanto o efeito sinérgico é o fenômeno onde duas ou mais substâncias agem em conjunto para produzir um efeito maior do que o esperado para essas substâncias isoladamente. Já o antagonismo é definido pelo efeito de interação ser menor que o esperado para a soma dos efeitos individuais (LEE, 2010).

O sinérgismo geralmente assume papel importante nas atividades descritas para produtos naturais. Devido a presença de sinérgismo e de outros fatores como menor custo de produção e, geralmente, menor toxicidade associada a extratos brutos, grande parte do mercado de produtos naturais visa o desenvolvimento de produtos a partir desses extratos ao invés de substâncias isoladas (CALIXTO, 2000; DUTRA et al., 2016; WAGNER, 2011). Alguns exemplos de inseticidas comercializados no Brasil na forma de extratos são *Derris* sp. e *Lonchocarpus* sp. (devido à presença de rotenona), neem (*Azadirachta indica* A.Juss.) e alho (*Allium sativum* L.) (ISMÁN, 2006).

Outro fator importante na busca de extratos ou substâncias ativas é a verificação de sua toxicidade. Dessa forma, além do teste larvicida de **2**, foi realizado um ensaio de citotoxicidade em uma linhagem de fibroblastos humanos saudáveis (MRC5), onde foi encontrada uma concentração inibitória de 50% ( $CI_{50}$ ) de  $39,30 \mu\text{M}$  ( $10,39 \mu\text{g/mL}$ ). Essa concentração foi 2,03 vezes maior que o valor de  $DL_{50}$  encontrado para a atividade larvicida. Embora a realização de ensaios de citotoxicidade não sejam comuns nos trabalhos que buscam novas substâncias com atividade larvicida, essa é uma etapa crucial para que possa ser predita a toxicidade aguda em mamíferos, uma vez que a maioria dos inseticidas utilizados hoje apresentam alta toxicidade (COS et al., 2006). Nesse sentido, utilizando o método proposto por Vieira et al. (2011), foi calculado o valor predito de  $DL_{50}$  para toxicidade aguda em roedores de **2**, obtendo uma dose de 42,26

mmol/kg (11.147,01 mg/kg), sendo um valor considerado seguro (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS, 2009). Segundo o manual da ONU, substâncias que possuem  $DL_{50}$  predita entre 2.000 e 5.000 mg/kg (maior  $DL_{50}$  abordada neste documento) apresentam toxidez aguda relativamente baixa e o teste em animais é desnecessário. A partir desse valor pode-se calcular ainda o índice de seletividade ( $IS = DL_{50}$  predita para camundongo/ $DL_{50}$  do alvo) que mostra que **2** é aproximadamente 283.893 vezes mais seletivo para mosquitos do que para camundongo.

### 3.1 Desenvolvimento e validação do método analítico

Na validação deste método foram construídas três curvas pelo método dos mínimos quadrados utilizando as áreas dos sinais cromatográficos obtidos a partir de soluções de **2** em acetonitrila. As medições de cada curva foram realizadas em triplicatas para cada nível de concentração. Comportamento linear na faixa de concentração de 10,0 a 140,0 ng/L de **2** foi observado em todas as curvas analíticas. A equação representativa da curva está descrita na Figura 5A.

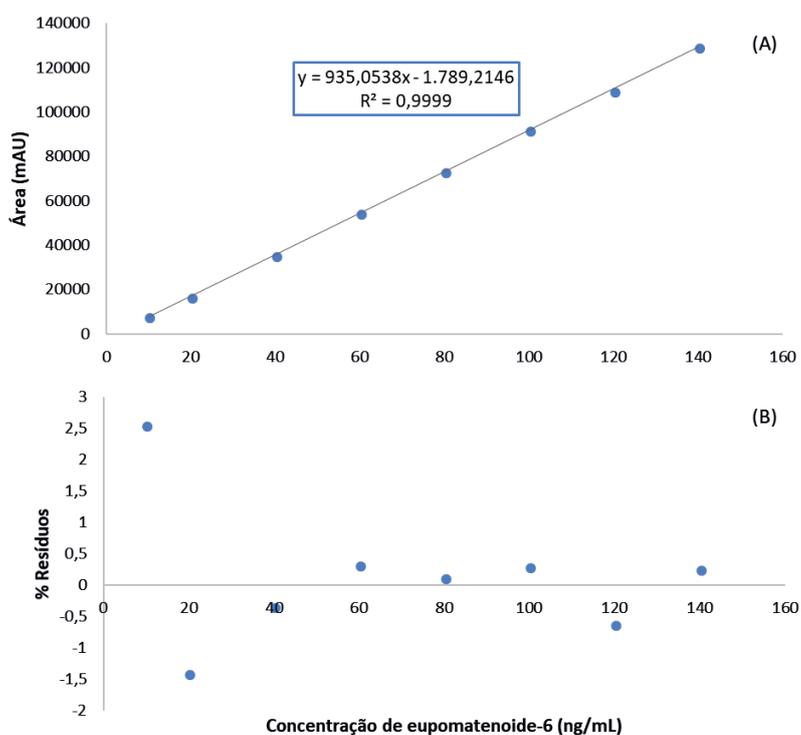


Figura 5 – (A) Curva analítica representativa para determinação de eupomatenoide-6 (**2**) em extrato em *n*-hexano de *P. solmsianum* por CLAE-DAD; (B) gráfico de resíduos.

O teste de Grubbs apontou a ausência de valores discrepantes (*outliers*) e o teste de Shapiro-Wilk confirmou a distribuição normal dos resíduos [ $W_{\text{calculado}} = 0,875 > W_{\text{tabelado}} (n = 8) = 0,818$ ] (Figura 5B). A adequação do modelo linear foi avaliada pelo teste F de *Snedecor-Fisher* [ $F_{\text{calculado}} = 372.647,7 > F_{\text{tabelado}} (1; 23) = 5,8$ ] e pelo teste de falta de ajuste e erro puro [ $F_{\text{calculado}} = 0,10 < F_{\text{tabelado}} (6; 16) = 3,34$ ]. Todos os testes consideraram  $p = 0,05$ . A partir dos resultados destes testes estatísticos, pode-

se concluir que o modelo linear é adequado para a determinação de eupomatenoide-6 (2) no extrato em *n*-hexano de folhas de *P. solmsianum*.

Para a medição do efeito de matriz foram feitas três curvas de adição padrão independentes (Figura 6). A adição padrão se deu nas mesmas concentrações e condições da curva analítica proposta. O valor de *t* calculado (0,009) foi menor que o valor tabelado (2,692) utilizando *p* = 0,01, mostrando que as inclinações das curvas são estatisticamente iguais e, dessa forma, a matriz não interfere na análise.

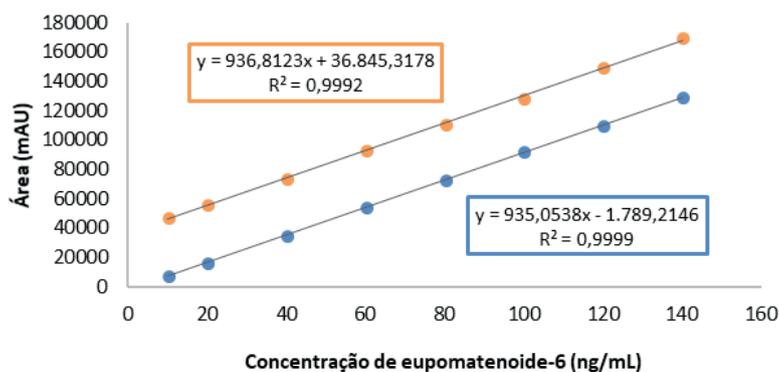


Figura 6 – Curva analítica (azul) e curva de adição padrão (laranja) para avaliação do efeito da matriz sobre a determinação de eupomatenoide-6 (2) em extrato em *n*-hexano de *P. solmsianum* por CLAE-DAD.

O limite de quantificação (LQ) e o limite de detecção (LD) foram calculados utilizando sete injeções do primeiro nível de concentração da curva analítica (10,0 ng/L), sendo LD = 0,97 ng/L e LQ = 3,35 ng/L.

Para o método desenvolvido, a repetibilidade foi estimada utilizando o coeficiente de variação (CV) com base em três medidas consecutivas de três níveis de concentração (10,0, 80,0 e 140,0 ng/L), no mesmo dia (precisão intra-dia). Valores de CV foram inferiores a 15% para cada nível estudado, 3,07, 0,26 e 1,51 respectivamente, evidenciaram a boa repetibilidade do método (INMETRO, 2016).

Neste trabalho a precisão intermediária foi avaliada variando o dia das medidas e foi calculada por meio do coeficiente de variação, em triplicatas autênticas, de soluções de eupomatenoide-6 (2) em acetonitrila, para os níveis mais baixos, intermediário e mais alto (10,0, 80,0 e 140,0 ng/L, respectivamente), em três dias diferentes (precisão inter-dia). Valores de CV menores que 15%, 1,77, 2,66 e 1,36 respectivamente, demonstram a boa precisão intermediária do método (INMETRO, 2016).

A robustez do método foi avaliada considerando a influência da temperatura e variação da fase móvel. A avaliação consistiu nos dados de CV (Tabela 3), cujo valor médio foi inferior a 1 %. Além disso, foi realizada a análise de variância (ANOVA) de um fator por vez, sendo que os valores de F calculados, tanto para temperatura (0,681) quanto para fase móvel (0,400), foram inferiores ao valor crítico tabelado (5,143), para *p* = 0,05. Tais fatos evidenciaram que o método é robusto nas condições investigadas.

Condição	Área média do sinal (mAU)	Desvio Padrão	CV (%)
MeCN:H <sub>2</sub> O (65:35), 30 °C	64.319,61	1.758,96	2,73
MeCN:H <sub>2</sub> O (63:37), 30 °C	65.132,90	768,72	1,18
MeCN:H <sub>2</sub> O (67:33), 30 °C	64.811,49	293,55	0,45
MeCN:H <sub>2</sub> O (65:35), 25 °C	64.777,44	172,23	0,27
MeCN:H <sub>2</sub> O (65:35), 35 °C	65.366,32	726,80	1,11
<b>Geral</b>	64.881,55	396,77	0,61

Tabela 3 – Robustez do método desenvolvido para determinação de **2** em extrato em *n*-hexano de *P. solmsianum* por CLAE-DAD. Este procedimento foi realizado com uma solução de extrato bruto em *n*-hexano de folhas de *P. solmsianum*.

MeCN = acetoneitrila; H<sub>2</sub>O = água ultrapura + 0,05% de ácido trifluoroacético; CV: Coeficiente de variação

O presente trabalho é o primeiro a propor a quantificação de eupomatenoide-6 (**2**) em extrato de *P. solmsianum*. O único trabalho descrito na literatura que também visava a quantificação de **2** foi o de Felipe et al. (2006), porém em extratos de *P. regnellii* var. *pallenscens* e apresentava algumas peculiaridades. Os autores propuseram um método para a quantificação de neolignanas [eupomatenoide-5 (**1**), **2** e conocarpano (**3**)] por CLAE-DAD utilizando apenas **3** como padrão. As condições utilizadas para quantificação de **2** e por Felipe et al. (2006) são apresentadas na Tabela 4.

Os autores utilizaram **3** como padrão para quantificar três substâncias diferentes e comprimento de onda máximo no ultravioleta ( $\lambda$ ) igual a 280 nm, por considerarem como ponto comum de máximo das três neolignanas (FELIPE et al., 2006). No presente trabalho foi encontrado como máximo de absorção de **2** em  $\lambda$  254 nm. O ajuste de  $\lambda$  possibilitou trabalhar em concentrações na ordem de ng/mL ao invés de  $\mu$ g/mL, levando a um LD e LQ mais de mil vezes menor. A utilização de uma coluna de 50 mm com tamanho de partícula menor (3,5 x 5,0 mm), permitiu analisar **2** com um tempo total relativamente curto (4,5 min), reduzindo muito o gasto de solvente.

Parâmetro	Proposto	Felipe et al. (2006)
Coluna	Zorbax Eclipse Plus C18 (50 mm x 4,6 mm, 3,5 $\mu$ m)	Metadesil ODS (150 mm x 4,6 mm, 5,0 $\mu$ m)
Fase móvel	65% de MeCN e 35% de H <sub>2</sub> O + 0,05% de TFA	60% de MeCN e 40% de H <sub>2</sub> O + 2% de ácido acético
Vazão	0,8 mL/min	1,0 mL/min
Temperatura de forno	30 °C	30 °C
Comprimento de onda	254 nm	280 nm
Tempo de análise	4,5 min	25 min
Padrão	Eupomatenoide-6 ( <b>2</b> )	Conocarpano ( <b>3</b> )
Intervalo da curva	10 a 140 ng/mL	32,25 a 125 $\mu$ g/mL
Limite de detecção	0,97 ng/mL	1,68 $\mu$ g/mL
Limite de quantificação	3,35 ng/L	5,6 $\mu$ g/mL

Tabela 4 – Comparação do método proposto com método da literatura para doseamento de **2**.

## 4 | CONCLUSÃO

O extrato bruto em *n*-hexano de folhas de *P. solmsianum* apresentou boa atividade contra larvas de terceiro estágio de *Ae. aegypti*. Foi isolada a neolignana eupomatenoide-6, substância com maior atividade larvicida isolada de *Piper* spp. até o momento. Foi possível também o isolamento e identificação de conocarpano que não foi testado por não haver quantidade suficiente. O eupomatenoide-6 apresentou alta seletividade de ação, tendo a toxidez estimada em roedores em mais de 200 mil vezes menor que para as larvas.

Um método analítico foi validado para a quantificação do eupomatenoide-6 no extrato. Esse método apresentou vantagens quando comparado ao da literatura, como menores LD e LQ, correção do comprimento de onda utilizado, menor tempo total de análise e menor gasto de solvente. O extrato foi, então, padronizado quanto a quantidade de eupomatenoide-6 e a proporção dessa neolignana nesse extrato em relação à atividade larvicida sugere a presença de outras substâncias ativas.

## 5 | ASPECTOS LEGAIS

A coleta do material vegetal foi autorizada pelo ICMBio no processo de número 45566-1. O acesso ao patrimônio genético foi autorizado pelo CGEN no processo de número 010771/2014-0.

## 6 | AGRADECIMENTOS

Ao CNPq (processos 310474/2015-9 e 159779/2013-8) e à FAPERJ (processo E-26/102.258/2013).

## REFERÊNCIAS

BENELLI, G. Plant-borne ovicides in the fight against mosquito vectors of medical and veterinary importance: a systematic review. **Parasitology Research**, v. 114, n. 9, p. 3201-3212, 2015.

CABRAL, M.M.O.; ALENCAR, J.A.; GUIMARÃES, A.E. et al. Larvicidal activity of grandisin against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 25, n. 1, p. 103-105, 2009.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

CHAURET, D.C.; BERNARD, C.B.; ARNASON, J.T. et al. Insecticidal neolignans from *Piper decurrens*. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 2, p. 152-155, 1996.

CHEDIAK, M.; PIMENTA, F.G., JR.; COELHO, G.E. et al. Spatial and temporal country-wide survey

of temephos resistance in Brazilian populations of *Aedes aegypti*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 5, p. 311-321, 2016.

COS, P.; VLIETINCK, A.J.; BERGHE, D.V. et al. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* 'proof-of-concept'. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 3, p. 290-302, 2006.

DUTRA, R.C.; CAMPOS, M.M.; SANTOS, A.R.S. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4-29, 2016.

FELIPE, D.F.; FILHO, B.P.D.; NAKAMURA, C.V. et al. Analysis of neolignans compounds of *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck by HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 4, p. 1371-1375, 2006.

HAMMER, O.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. Past: paleontological statistics software package for Education and data analysis. **Palaeontol Electron**, v. 4, n. 2, p. 4-9, 2001.

HIGGS, S.; VANLANDINGHAM, D. Chikungunya Virus and Its Mosquito Vectors. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 15, n. 4, p. 231-240, 2015.

HINTZE, J. **PASS 11**. Kaysville, Utah, USA: NCSS, LLC 2011.

INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. DOQ-CGCRE-008: 1-31 p. 2016.

ISMAN, M.B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. In: (Ed.). **Annual Review of Entomology**, v.51, 2006. p.45-66. (Annual Review of Entomology). ISBN 978-0-8243-0151-4.

LEE, S.I. Drug interaction: focusing on response surface models. **Korean Journal of Anesthesiology**, v. 58, n. 5, p. 421-34, 2010.

LEITE, A.C.C.F.; KATO, M.J.; SOARES, R.O.A. et al. Grandisin caused morphological changes larval and toxicity on *Aedes aegypti*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 3, p. 517-521, 2012.

MACEDO, A.L.; DOS SANTOS, T.C.C.; VALVERDE, A.L. et al. An overview of neolignans of the genus *Piper* L.: Isolation methods and biological activities. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 8, p. 693-720, 2017.

MACEDO, A.L.; DUPRAT, R.C.; MOREIRA, D.D.L. et al. Isolation of a larvicidal compound from *Piper solmsianum* C.DC. (Piperaceae). **Natural Product Research**, 2017.

MALECK, M.; FERREIRA, B.; MALLETT, J. et al. Cytotoxicity of piperamides towards *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 51, n. 2, p. 458-463, 2014.

MARTINS, R.C.C.; LATORRE, L.R.; SARTORELLI, P. et al. Phenylpropanoids and tetrahydrofuran lignans from *Piper solmsianum*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 843-846, 2000.

MOREIRA, L.D.; KAPLAN, M.A.C.; GUIMARAES, E.F. Chemical constituents from *Piper solmsianum* C.DC. (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacia**, v. 76, n. 4, p. 106-109, 1995.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1, p. 55-63, 1983.

MUSSO, D.; GUBLER, D.J. Zika virus. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 3, p. 487-524, 2016.

NARCISO, J.O.; SOARES, R.O.; REIS DOS SANTOS MALLETT, J. et al. Burchellin: study of bioactivity against *Aedes aegypti*. **Parasit Vectors**, v. 7, p. 172, 2014.

NASCIMENTO, J.C.D.; DAVID, J.M.; BARBOSA, L.C.A. et al. Larvicidal activities and chemical composition of essential oils from *Piper klotzschianum* (Kunth) C. DC. (Piperaceae). **Pest Management Science**, v. 69, n. 11, p. 1267-1271, 2013.

NESHEIM, O.N.; FISHEL, F.M.; MOSSLER, M. **Toxicity of Pesticides**. AGRICULTURE, U. S. D. O.: UF/IFAS Extension Service. PI-13: 6 p. 2014.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. Part 3 - Health Hazards. **Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)**, Nova York e Genebra, 2009. Disponível em: < [http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev03/English/03e\\_part3.pdf](http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/English/03e_part3.pdf) >. Acesso em: 23 de junho de 2017.

PESSINI, G.L.; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V. et al. Neolignan e análise do óleo essencial das folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallidum* (C. DC.) Yunck. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 199-204, 2005.

RAYMOND, M. Presentation d'une programme d'analyse logprobit pour microordinateur cahiers Orstrom. **Sér Ent Med Parasitol**, v. 22, p. 117-121, 1985.

SILVA, R.Z.; YUNES, R.A.; DE SOUZA, M.M. et al. Antinociceptive properties of conocarpan and orientin obtained from *Piper solmsianum* C. DC. var. *solmsianum* (Piperaceae). **Journal of Natural Medicines**, v. 64, n. 4, p. 402-408, 2010.

VIEIRA, M.D.S.; DE OLIVEIRA, V.; LIMA, E.M. et al. *In vitro* basal cytotoxicity assay applied to estimate acute oral systemic toxicity of grandisin and its major metabolite. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 63, n. 5, p. 505-510, 2011.

WAGNER, H. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Fitoterapia**, v. 82, n. 1, p. 34-37, 2011.

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

### **Viviane Mallmann**

Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul,  
Doutoranda no Programa de Pós-Graduação em  
Recursos Naturais  
Naviraí-MS

### **Lucas Wagner Ribeiro Aragão**

Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul,  
Mestre no Programa de Pós-Graduação em  
Recursos Naturais  
Naviraí-MS

### **Roberta Fernanda Ribeiro Aragão**

Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul,  
Graduanda em Tecnologia em Gestão Ambiental  
Mundo Novo-MS

### **Edineia Messias Martins Bartieres**

Universidade Federal da Grande Dourados,  
Mestranda no Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Geral/ Bioprospecção  
Dourados-MS

### **Valdeci José Pestana**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná,  
Mestrando no Programa de Pós-graduação em  
geografia.  
Marechal Cândido Rôndón-Pr

### **Shaline Séfara Lopes Fernandes**

Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul,  
Bolsista no Programa de Pós-doutorado em  
Recursos Naturais  
Dourados-MS

### **Rogério César de Lara da Silva**

Universidade Estadual do Mato Grosso  
do Sul, Pesquisador do CDTEQ Centro de

desenvolvimento de tecnologias Químicas.  
Naviraí-MS

**RESUMO:** Este artigo veio mostrar o desenvolvimento de um projeto executado por um grupo de camponeses assentados no Projeto de Assentamento Nazareth, situado em Sidrolândia-MS. Estas pessoas estudaram métodos agroecológicos para desenvolver suas parcelas de terra, recebidas pelo INCRA (instituto nacional de Reforma Agrária), na tentativa de recuperar o ecossistema local e de produzir alimentos saudáveis. O plano de trabalho teve início nos quintais de cada família, onde construíram um quintal-medicinal-produtivo. Com os resultados conquistados nestes quintais, o projeto foi expandido para uma área maior em cada propriedade. Nestas novas áreas estão sendo implantados Sistemas Agroflorestais, composto com plantas nativas do cerrado e outros frutos de interesse comercial. Durante a execução das atividades, este grupo de pessoas tomou conhecimento sobre o uso medicinal de algumas plantas que compunham o cenário das plantas que foram surgindo com o manejo agroecológico do solo. Partindo destas informações, realizaram uma parceria com Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS), e hoje já existe uma tese de doutorado sendo desenvolvida embasada no uso medicinal

destas plantas nativas, aprofundando o conhecimento químico e biológico presente nos óleos essenciais destas espécies. O projeto possui já etapas concluídas e ainda se encontra em expansão, servindo de modelo e reflexão para outros agricultores que se encontram na mesma situação.

**PALAVRAS-CHAVE:** Alimentos saudáveis- Sistemas Agroflorestais-Plantas nativas-Óleos essenciais-Produtivo.

**ABSTRACT:** This article showed the development of a project executed by a group of peasants settled in the Nazareth Settlement Project, located in Sidrolândia-MS. These people studied agroecological methods to develop their parcels of land, received by INCRA (National Institute of Agrarian Reform), in an attempt to recover the local ecosystem and produce healthy food. The work plan began in the backyards of each family, where they built a backyard-medicinal-productive. With the results achieved in these backyards, the project was expanded to a larger area on each property. In these new areas Agroforestry Systems are being implemented, composed of native cerrado plants and other fruits of commercial interest. During the execution of the activities, this group of people became aware of the medicinal use of some plants that composed the scenario of the plants that came up with the agroecological management of the soil. Based on this information, they have established a partnership with the State University of Mato Grosso do Sul (UEMS), and today there is a doctoral thesis being developed based on the medicinal use of these native plants, deepening the chemical and biological knowledge present in the essential oils of these species. The project has already completed stages and is still expanding, serving as a model and reflection for other farmers who find themselves in the same situation.

**KEYWORDS:** Healthy food- Agroforestry systems-Native plants-Essential oils-Productive.

## 1 | INTRODUÇÃO

### 1.1 O cerrado e as ações antrópicas

O cerrado é um bioma detentor de grande biodiversidade, mas vem sendo utilizado abusivamente, resultando na perda de inúmeras espécies vegetais de grande importância para a sociedade, e ainda segundo Klink e Moreira (2002) o fogo nessas áreas, em decorrência da matéria seca e poucas chuvas só agrava a situação. Grande parte dessas áreas de terra que ficam impróprias para uso, em parte, são destinadas ao Programa Nacional de Reforma Agrária (PNRA), que fica a cargo do INCRA, o Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária.

No Cerrado de Mato Grosso do Sul, várias áreas de Reforma Agrária enfrentam problemas de solos exauridos e contaminados, exigindo dos camponeses estudo e manejo (VEIGA, 2017). O Programa de Reforma agrária vem sendo, ao longo de sua

trajetória, utilizado por muitas famílias como uma forma de voltar às suas raízes e praticarem a agricultura.

O INCRA foi criado em 1970, pelo Decreto-lei nº 1.110, é uma autarquia que surgiu em substituição a outras duas instituições, o IBRA (Instituto Brasileiro de Reforma Agrária) e o INDA (Instituto Nacional de Desenvolvimento Agrário), sua unificação pelo governo militar veio para promover a reforma agrária e desenvolver o setor rural, que tinha por objetivo inicial, avançar no projeto de colonização da região amazônica, e mais adiante tomaria ainda outros aportes práticos. De 2011 a 2013 nenhuma família foi assentada no Estado de Mato Grosso do Sul, (DATA LUTA, 2014). Mas em 2014, as atividades foram retomadas, e dentre os Projetos de Assentamentos (P.A.) lançados, estava o Nazareth, situado em Sidrolândia-MS, contemplando 171 famílias.

No P.A. Nazareth, os assentados têm buscado uma forma para recobrar as áreas que foram degradadas e vêm utilizando um grupo de métodos e alternativas pautados na agroecologia para tal fim. A partir de algumas estratégias, buscaram resgatar as espécies que ainda se desenvolvem na região, proporcionando aos poucos, a introdução de outros cultivares com fins comerciais e que contribuam no processo de restabelecimento do ecossistema.

Uma das metodologias adotadas foram os cultivos em Sistemas Agroflorestais (SAFs), que de acordo com Ribaski et al. (2001) se mostram como uma ótima alternativa para recuperação dos solos contaminados, produção e subsistência.

A utilização de SAFs tem sido, nas últimas décadas, bastante difundida, pois contempla em sua essência rica biodiversidade e a melhora dos aspectos físico-químicos de solos degradados (REINERT, 1998 e MENDONÇA et al. 2001 citado por ARATO et al. 2003). Outro método que contribui para o reequilíbrio do ecossistema é o uso de adubações verdes (AGUIAR et al. 2000; RIBASKI et al. 2001), que podem ser introduzidas concomitantemente nos espaços de SAFs, por apresentarem grandes vantagens como rápido desenvolvimento, cobertura de solo, além de depositarem fontes de nitrogênio para outros cultivares.

## **1.2 Avaliação e alternativas possíveis.**

Da natureza pode-se obter alimento e abrigo, mas já é sabido, desde culturas passadas, que também é grande fonte de remédios. Descobrir os vários fins medicinais das plantas que se encontram em nosso entorno, também deve fazer parte do processo de troca e equilíbrio. Pois, muitas das vezes, encontram-se plantas que podem ser utilizadas também na agricultura, fomentando a produção agrícola sem uso de defensivos químicos industrializados, por exemplo.

Para se obter o conhecimento do uso das plantas e outros recursos naturais, podem-se lançar mão de muitos meios, mas vale destacar a “observação das relações que ocorrem na natureza” e o resgate da cultura, que exige “a conversa”, o “ouvir histórias” de quem já viveu muito mais tempo nestes lugares, podendo direcionar ações e pesquisas na área. Rodas de conversa para debate e estudo das situações

que se mostrarem emergentes em cada período, também fazem parte do trabalho. Atividades como esta, colaboram para a construção do conhecimento, que aliado ao meio científico tem trazido inúmeros avanços para sociedade.

Este artigo tem foco no relato da experiência de construção de quintais medicinais produtivos e da implantação de SAFs como alternativa para restabelecer o ambiente degradado e para sustento da família no campo. Apresenta alguns recortes ampliados de uma tese de doutoramento em Recursos Naturais, que se encontra em desenvolvimento. O manuscrito está estruturado em dois blocos principais, o primeiro apresenta um relato sobre o etnoconhecimento e a construção dos quintais medicinais, que poderá servir de base para nortear o estudo químico e biológico destas plantas nativas do cerrado em MS, o segundo tece considerações sobre alternativas para produção sustentável e recuperação de áreas degradadas, pautadas na construção de SAFs no modelo agroecológico.

## **2 | QUINTAIS MEDICINAIS, IDENTIFICAÇÃO DAS PLANTAS E O ETNOCONHECIMENTO**

O trabalho descrito pelo artigo foi desenvolvido em três propriedades rurais do P.A. Nazareth, lotes 98, 99 e 111, localizados à uma distância de 70 km da Capital, Campo Grande. As análises apresentadas neste texto são respectivas às atividades desenvolvidas logo após a data da implantação do assentamento, ocorrida em setembro de 2014. Mostra o método de pesquisa que os agricultores utilizaram para avaliar a capacidade de recuperação do ecossistema e sua resposta às práticas realizadas, um processo construído em grupo. Parte deste artigo contém trechos de entrevistas de alguns agricultores, bem como, algumas reflexões que partiram de suas rodas de conversa.

Durante muitos dias, sentados nas rodas de conversa, cerca de dez pessoas, discutiram um método para iniciar o trabalho produtivo em suas parcelas de terra, os chamados lotes. Para isso, era necessário um projeto, um plano a ser realizado, uma vez que era visível o nível de degradação do meio ambiente e a ideia era buscar a produção, trabalhando em prol da recuperação daqueles espaços. Por meio desse grupo de conversa, decidiu-se que seria construído um quintal, um espaço de jardins com diversas espécies de flores. Nesse lugar, os agricultores realizariam suas experiências, partindo da ideia e do desejo de ter um lugar lindo em torno de suas casas.

O primeiro passo foi retirar o capim que estava presente em toda a extensão dos lotes, a braquiária (*Urochloa* sp.). Para este fim, optaram por utilizar a roçadeira com o objetivo de cortar o capim e usá-lo como adubação, servindo também de cobertura para garantir um período mais longo de umidade nos solos. Para tornar mais eficiente a eliminação do capim, foi utilizada lona, cobrindo o espaço que havia sido roçado por

um período de dez dias. Após este prazo, a lona era trocada de lugar. Seguidamente foi realizado uma capina, cortando as raízes que estavam presentes. Todas as outras espécies foram preservadas, não sendo capinadas. Após esta etapa, esperava-se que primeiro germinassem algumas plantas parceiras de ciclos anuais e depois outros espécimes que caracterizam o ecossistema do cerrado.

Aos poucos, nesse espaço, foram sendo introduzidas flores e plantas medicinais exóticas. Plantou-se também cultivares de mandioca, milho e feijão, para descompactar, melhorar o solo e dar sombras para as plantas menores que estavam em ascensão. Durante todo o processo, o solo era mantido coberto com palhas de outras áreas que eram roçadas.

Para a surpresa dos camponeses, em menos de três meses novas plantas foram emergindo, naturalmente. Em cada estação do ano, um grupo diferente de plantas anuais e não anuais foram surgindo. Seis meses depois dessa etapa, inseriu-se também mudas de diversas frutas não nativas do cerrado.

Sobre a palhada dos quintais foram pulverizadas solução de micro-organismos eficientes (EM) coletadas na reserva que ficara próxima dos sítios, seguindo a metodologia de Andrade (2011). Algumas homeopantias empregaram-se para melhorar a condição físico química do solo, de acordo com Vithoukias (1980), cada homeopatia possui um papel individual e pode ser utilizada de diferentes formas perante diferentes contextos. De acordo com Casali et al., (2006) escreve que as homeopantias podem contribuir na harmonia das inter-relações dos sistemas vivos e por isso, são amplamente utilizadas em sistemas agroecológicos.

Durante as pulverizações das homeopantias nos solos que apresentavam altos níveis de alumínio tóxico, foi possível observar alterações na coloração deste, por exemplo, de vermelho, para acinzentado, de acordo com o relato de alguns camponeses. O tratamento foi realizado numa bateria de quinze dias. Nos primeiros sete dias, foram pulverizados pela manhã a Solo CH6, e à tarde, Calcário CH6. Na semana seguinte, pela manhã foi utilizado *Alumina* CH6 e na parte da tarde, *Calcarea carbonica* CH6, indicadas no processo de recuperação de solo, metodologia adaptada da cartilha REZENDE (2009).

A condição que foi sendo criada nesse espaço, permitiu que as sementes que estavam guardadas no solo, abaixo das raízes de braquiária, germinassem. **A Figura 1** mostra algumas imagens das flores presentes nos quintais-medicinais-produtivos, após seis meses da data inicial da implantação do projeto:



**Figura 1.** Flores nativas que surgiram no “jardim medicinal-productivo”.

a) Cipó branco (*Fridericia florida* (DC.) L.G.Lohmann) b) Jalapa-do-campo *Mandevilla illustris* (Vell.) R. E. Woodson c) Flor de anjo/Caliandra (*Calliandra dysantha*) d) Amarelinha (*Calea phyllolepis* Baker) e) Produção de arroz bico preto e batatas f) Não identificada g) Saudades do Campo (*Vernonia grandiflora* Less ) h) Asteraceae sp. i) Ainda não identificado j) Tiririca-de-flor-amarela (*Hypoxis decumbens*) k) Dorme-dorme (*Mimosa* sp.) l) Paratudo (*Gonphema macrocephala* A. St. Hill).

Após observar estes resultados uma das camponesas deu seu depoimento: “*Não podemos arrancar nenhuma plantinha, por que logo depois que elas nascem, dali mais uns dias já vem soltando cachos de flores, flores tão lindas que nunca vi igual e ainda tem que esperar a flor cair, por que tem muitas que dão frutinhas muito gostosas...*”.

Nesta fala, percebe-se o orgulho da camponesa de estar envolvida neste projeto, de ver que o meio ambiente estava dando respostas além do que era esperado. As frutas nativas que passaram a se desenvolver nesses espaços serviram de alimento para a família e os animais ali presentes. De acordo com Brasil (2002) intervir, cuidar e restaurar ambientes degradados é compromisso de honra, que representa nossa identidade e ressalta que, as futuras gerações precisaram deste ambiente.

As famílias continuaram se reunindo para discutir os próximos passos a serem tomados, como por exemplo, escolher os cultivares que seriam introduzidos nos sistemas. Nos relatos dos camponeses, eles contam que passaram a se reunir dentro desse quintal, e que ali era possível perceber alguns resultados importantes do processo, como a presença de pássaros de diversas espécies cantando e buscando refúgio nesse lugar, o aroma das flores, podia-se ouvir o zumbido de inúmeras abelhas, polinizando, colhendo néctar e fazendo com que as lavouras de gergelim, feijão e vinagreira trouxessem, mais tarde, recorde na produção. Sobre o processo de participação humana no cuidar e transformar a natureza, Brasil coloca que:

É preciso que as pessoas saibam como atuar, como adequar práticas e valores, uma vez que o ambiente é também uma construção humana, sujeito a determinações de ordem não apenas naturais, mas também sociais. (BRASIL, 1997. p.201)

O próximo passo do processo, foi tornar esse espaço um lugar também para produzir alguns frutos exóticos, em parceria com as plantas nativas que já estavam se desenvolvendo. Dentre as escolhidas temos as mudas de pêssigo, figo, limão, laranja, abacate, abacaxi, manga, morango e caju. Com pouco mais de 24 meses, neste espaço de jardim, puderam ser colhidos os primeiros frutos, como o caju e o morango, que ganham destaque na **Figura 2**, juntamente com outros frutos que puderam ser observados no espaço do jardim.



**Figura 2.** Frutos: nativos (a-f) e exóticos (g-j) presentes no “jardim medicinal-produtivo”.

a) Ainda não identificado b) Fruta do tatú (*Pradosia brevipes*) c) Maracujá-de-cabra (*Passiflora foetida*) d) Myrtaceae sp. e) Eucalipto do cerrado (*Eugenia langsdorffii* O. Berg.) f) Araticum-de-raposa (*Anona cornifolia*) g) Morango (*Fragaria* sp.) h) pêssigo (*Prunus* sp.) i) Caju (*Anacardium* sp.) j) Rosela/vinagreira (*Hibiscus* sp.)

Fonte: Viviane Mallmann

O trabalho destes homens e mulheres serve para inspirar outras ações concretas. Ele pôde mostrar o quão grande é a biodiversidade desse lugar e a resiliência que essas plantas possuem para conseguirem, após a agressão de seu habitat, se restabelecerem em tão pouco tempo, uma vez tendo encontrado condições para ressurgirem.

Dados apontam o Brasil como portador de imensa biodiversidade, como traz Bizerril:

“O Brasil detém a maior diversidade biológica no mundo e o cerrado é um dos seus principais biomas, tanto em área quanto em biodiversidade. Recentemente, o cerrado foi incluído na lista dos 25 hotspots – as áreas críticas para a conservação no mundo, definidas com base na existência de espécies endêmicas (de distribuição geográfica restrita) e no grau de ameaça ambiental. Esse bioma, de fato, vem sendo transformado em ritmo bastante acelerado, e a ação governamental precária para impedir o processo de degradação parece refletir o reduzido interesse de boa parte dos brasileiros quanto à sua conservação”. (BIZERRIL, 2003 p.56)

Contam os agricultores que, durante uma das reuniões das famílias, houve a visita de um raizeiro que morava pela redondeza já há muitos anos. Ele se animou

em vir conversar com o grupo devido as diferentes cores que observou no quintal ao passar em frente a uma das propriedades. E relatou que nunca havia visto tantas flores nativas juntas e tão bonitas. Logo perguntou ao grupo se estavam produzindo para comercialização, devido a suas potencialidades de cura, e também direcionou a fala para mulher assentada nesse lote: “*Minha senhora, que milagre você fez aqui, de onde vieram todas essas flores, você sabia que tem gente que chega bater o mato dia e noite atrás destas flores aqui, pra fazer garrafadas e pomadas...*”.

Nessa tarde, o curandeiro, passou a fazer parte da roda de discussão e o grupo foi tomando nota sobre as propriedades medicinais das plantas que estavam ali no quintal. O grupo não mais chamou esse lugar de jardim, e passaram a chamá-lo de “quintal-medicinal-produtivo”.

Agora sabendo da grande potencialidade biológica das plantas, os camponeses tiveram a ideia de fazer uma parceria com algum instituto de pesquisa para avaliar as plantas citadas como remédio. Logo esta parceria foi feita com a UEMS (Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul). A parceria se concretizou com o projeto de doutorado de uma aluna do programa de pós-graduação em recursos naturais, da UEMS de Dourados-MS. Hoje, oito plantas com indicações de uso popular estão sendo estudadas frente linhagens de câncer, atividade antibacteriana, antifúngica e capacidade anti-inflamatória. Segue a relação das plantas que estão sendo objeto de estudo na tese de doutorado: *Ortopappus angustifolius* (SW) Gleason (Língua de vaca), *Vernonia grandiflora* Less. (Saudades do campo), *Gonphema macrocephala* A. St. Hill (Para-tudo), *Gymneia interrupta* (Pohlex Benth.) Harley e J. P. B. (Rabo de gato), *Calea phyllolepis* Baker (Amarelinha), *Lippia lupulina* Chan. (Cidreira do cerrado), *Eugenia langsdorffii* O. Berg. (Eucalipto do cerrado), *Eriosema crinitum* (Kunth) G. Ron (Peludinha).

Com a parceria realizada com a universidade os agricultores esperam publicar e divulgar o conhecimento sobre uso de algumas das plantas medicinais do cerrado e sua comprovada eficácia por meio dos ensaios químicos e biológicos, apontando a segurança de seu uso. Este contato abre espaço para uma nova discussão, ainda pouco em pauta no Brasil, a parceria com a agricultura familiar para produção de plantas medicinais dotadas de princípios ativo de interesse e para indicar sua forma de uso.

Dos quintais já foi possível comercializar alguns produtos, com venda direta ao consumidor, através de feiras. Dentre estes, pode-se destacar a geleia e o vinagre de duas espécies de *Hibiscus sp.*, e produtos defumados valendo-se de temperos cultivados no mesmo espaço, como pode ser visto na **Figura 3**.



**Figura 3.** Pimentas e outros temperos produzidos no “jardim medicinal-produtivo”, utilizados no tempero de defumados.

A partir do jardim-medicinal-produtivo, o grupo de agricultores percebeu a possibilidade de introduzir o ensaio de seus jardins em todo seu terreno, que é de aproximadamente dez hectares cada. Novamente eles buscaram estudar uma forma para executar a ideia. Logo em suas primeiras pesquisas na internet, encontraram os Sistemas Agroflorestais (SAFs) e iniciaram uma busca destas experiências no Brasil. A partir delas, encontraram ações em alguns estados que serviram de modelo para tal fim.

Correlacionando os dados das experiências em seus quintais aos novos conhecimentos, eles formularam um cronograma de recuperação de áreas degradadas para as três propriedades, envolvidas no projeto. Esta nova área seria para cultivar frutos do cerrado e frutas exóticas em linhas, e em seu intermédio, grãos, outros cultivares de interesse comercial e para subsistência, além de plantas medicinais.

No item 3 deste artigo, pode-se acompanhar um pouco sobre a implantação dos SAFs nos sítios supracitados e o modo pelo qual a agroecologia trouxe fundamentos teóricos para ações concretas, sendo esta redescoberta em cada nova área, uma vez que cada ambiente pode responder diferentemente perante os mesmos estímulos, dada às características ímpares de cada lugar.

### **3 | ALTERNATIVAS PARA PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL E RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS,**

Recuperar áreas degradadas no bioma do cerrado a partir da técnica de introdução de Sistemas Agroflorestais tem sido um grande desafio, mas se destaca como opção, pois fortalece a produção orgânica, agroecológica e a subsistência das pessoas que vivem no campo.

Para dar início as atividades nas condições já descritas logo acima, o primeiro passo foi realizar análise dos solos, a partir do qual se percebeu uma alta acidez, pH 4,5, indicando a necessidade de correção. De acordo com CFS RS/SC (1994), a elevação do pH, pode ser alcançada, tradicionalmente, com a introdução de calcário, sendo uma prática recomendada uma vez que restabelece as condições adequadas ao desenvolvimento das plantas sensíveis à acidez, embora outras técnicas alternativas

também podem ser utilizadas. Muitas plantas são sensíveis a altos níveis de acidez de solo e não se desenvolvem, sendo necessário então trabalhar em função de atingir um índice de pH mais próximo ao 7,0.

Sobre a análise de solo, na granulometria observou-se que na categoria do tipo de solo ele foi classificado como tipo 1, que de acordo com a Instrução Normativa N° 2, de 9 de outubro de 2008, se caracteriza por apresentar textura arenosa, com teor mínimo de 10% de argila e menor do que 15% ou com teor de argila igual ou maior do que 15%, nos quais a diferença entre o percentual de areia e o percentual de argila seja maior ou igual a 50. Assim, adotando-se o percentual de argila = a, e a diferença entre os percentuais de areia e argila =  $\Delta$ , tem-se para os solos tipo 1:  $10\% \leq a < 15\%$  ou  $a \geq 15\%$  com  $\Delta \geq 50$ . Com teor de areia de 81,25%, silte 7,50% e de argila de apenas 11,25%.

Devida a baixa quantidade de argila nos solos em estudo, entendeu-se que o método amparado nos agroecossistemas seria o mais viável, pois viabilizaria “o equilíbrio entre plantas, solos, nutrientes, luz solar, umidade e outros organismo coexistentes”, em relação ao sistema convencional que tem os insumos facilmente lixiviadas e absorvidas pelas culturas introduzidas no sistema de produção, obrigando reposições consecutivas (ALTIERI, 1989). Essa maneira de devolver vida ao solo, lentamente, a partir de reações químicas e biotransformações, vêm a dar suporte para introdução de culturas de interesse bem como multiplicação da capacidade do solo, tendendo a movimentos e produções sintrópicas, conseqüentemente ao equilíbrio. **Sintropia:** na agricultura agroecológica, aplica-se a entender que ao contrário da entropia, é um processo que vai do simples para o complexo, gerando interdependências e organização. Desenvolvido por Ernst Gotsch funciona e ensina a viver de floresta produzindo alimentos na floresta, nas palavras dele. A agroecologia de Ernst segue essa lógica, todas as interações ali ocorrem para promover um balanço energético positivo no sistema.

Para iniciar o trabalho com solos, buscou-se uma forma de eliminar o capim pré-existente sem o uso de agrotóxicos, que pudesse ser aplicado em grande escala em curto espaço de tempo. Aqui, a lona não seria viável, pois a área era muito grande. Como alternativa os agricultores optaram por lavrar a terra e fazer plantio de adubação verde para impedir que o banco de sementes de braquiária germinasse, dentre elas estavam crotalária da espécie *Crotalária ochroleuca*, feijão de porco (*Canavalia ensiformis*), mucuna preta (*Stizolobium aterrimum*), mucuna anã (*Mucuna deeringiana*) e a mucuna cinza (*Mucuna pruriens*).

Estas, em seu auge de desenvolvimento, a floração, foram roçadas, permitindo assim fixar água no meio bem como material vegetal para decomposição, estabelecendo uma barreira contra a evaporação da água do solo. As leguminosas também possibilitaram a fixação de nitrogênio, essencial para o desenvolvimento de outras plantas, reação que se deu pela associação simbiótica com bactérias do solo conhecidas como rizóbios, que aproveitam o nitrogênio fixando-o a partir do ar

(SARTORI et al., 2011). Na **Figura 4** podem ser vistas algumas áreas dos SAFs do projeto desenvolvido pelos agricultores:



**Figura 4.** Sistemas Agroflorestais em desenvolvimento.

**Fonte:** Viviane Mallmann

Sobre o novo cenário do solo, foram pulverizadas diferentes homeopantias, preparadas a partir das próprias fontes naturais como terra e calcário. As homeopantias foram preparadas de acordo com a metodologia proposta por Hahnemann (1984): Solo CH6: uma alíquota de dez gramas de terra coletada em cada uma das propriedades, foi adicionada a um litro de solução de álcool de cereais e água destilada (70%-30%). Após 15 dias de repouso, retirou-se 5 gotas desta solução mãe e foram adicionadas a uma solução de álcool de cereais e água (30%-70%) e dinamizadas até o CH6, da mesma forma procedeu-se para realização de Calcário CH6 e Adubo CH6. Modolon et al. (2016), traz o indicativo da *Nux vômica* como homeopatia importante no processo de recuperação e desintoxicação de solos contaminados e degradados. Embora ainda pouco difundida, a homeopatia possui grandes vantagens, ela se insere em qualquer modelo agrícola, alternativo ou convencional viabilizando o equilíbrio natural (CASALI et al., 2006).

Após essa etapa foi pulverizado solução de micro-organismos eficientes (EM), PII e colaboradores (2015), frisam que, dentre os resultados oriundos da diversa complexidade de microrganismos no ambiente, o retorno do carbono da atmosfera na forma mineral disponível às plantas superiores, mais a liberação no solo, em formas passíveis de serem também utilizadas pelas plantas, garante um contínuo ciclo ininterrupto de liberação dos diversos elementos na natureza.

No próximo passo misturou-se sementes de 46 espécies vegetais para serem introduzidas na área que foi gradeada. Estas seriam semeadas em sulcos de 25 cm de profundidade em linha reta, tendo estas linhas uma distância de 6 metros uma das outras. Havia sementes de árvores de diferentes extratos, que iriam nascer conforme

às condições e evolução do solo. Nos mesmos sulcos, ainda foram colocadas ramas de mandioca (*Manihot esculenta*) (a cada 2 metros), entre elas sementes de cará-moela (*Dioscorea bulbifera*) (a cada 6 metros), inhame (*Dioscorea sp.*) (a cada 3 metros) e cúrcuma (*Curcuma longa*) (a cada 1 metro) e sementes de flores nativas, de ciclos anuais assim como adubação verde novamente.

Ao lado de cada linha, foram introduzidas mudas de embaúba (*Cecropia sp.*), por sua capacidade plástica de adaptação e por seu rápido desenvolvimento em áreas degradadas (FRAGOSO et al., 2017). Popularmente conhecida como “embaúba” ou “imbaúba”, é comumente registrada em vegetação secundária, sendo uma das primeiras espécies vegetais a se estabelecer em áreas degradadas ou clareiras naturais, servindo também de alimento para inúmeras espécies animais (CHONG et al., 2017). Foram inseridas mudas no espaçamento de 3 em 3 metros em linha reta, com à distância de 60 cm da linha base onde haviam sido inseridas as sementes. As linhas foram irrigadas por micro aspersores, colocados à cada 4 metros de distância.

A ordem de sucessão das plantas precisa ser mantida no SAF para que as plantas se desenvolvam plenamente. De acordo com Gotsch (1996), o fator crítico para o desenvolvimento de uma planta em um dado sistema não se prende tanto a luminosidade e sim a ordem e do momento que estas são inseridas no sistema.

Entre as linhas do SAF, foi iniciada seguidamente o cultivo da cultivar híbrida de melancia (Conquista 165), para fins comerciais. Foram plantadas entre cada linha, trinta e cinco covas, com 35 cm de profundidade, onde foram adicionados 1 kg de composto (compostagem realizada com palha de braquiária), 12 gramas de cascas de ovos em pó e garrafas pet-recicladas com preparados homeopáticos para o solo, calcário e adubo NPK ambas no CH6. As garrafas foram fixadas em uma estaca de madeira a 30 cm do solo. As homeopatias foram administradas em uma dose única de 2 litros de solução por cova (gotejamento).

Desta área de produção obteve-se um peso médio de quinze quilos por fruto. Cada melancia foi vendida no próprio assentamento, num preço aproximado de quinze reais por unidade, gerando um ganho aproximado de R\$ 3.150,00 em cada espaço entre as linhas. Configurando uma fonte de renda dentro desses agroecossistemas. Na **Figura 5** pode ser visto o processo de captura dos microorganismos e a produção de melancias entre linhas do SAFs.



**Figura 5.** Sistemas Agroflorestais em desenvolvimento.

Fonte: Viviane Mallmann

No decorrer dos meses, o esperado é que as outras sementes das linhas se desenvolvam e que possibilitem passo a passo a introdução de outras espécies, à medida que as condições do solo estejam melhor, como bananeiras e cacau.

Cabe ressaltar sobre este projeto sua reprodutibilidade, podendo ser aplicado em outras áreas de cultivo no Brasil e no mundo, sejam estas áreas da agricultura familiar ou produção em grande escala. É um sistema passível de estudo, de reflexão e de adequação dada às condições de cada ambiente. As técnicas propostas pelos camponeses e camponesas, como mostra neste artigo, evidencia a agroecologia como alternativa para produzir e aponta a dispensa de insumos químicos industrializados e agrotóxicos.

Após 12 meses de implantação do sistema, um resultado chamou a atenção. Houve uma grande mudança no pH dos solos, diminuindo a acidez. Esse resultado mostra a tendência de melhora do meio ambiente quanto mais biodiversidade nele houver.

Acredita-se que a melhora da qualidade do solo pode ser atribuída ao conjunto de fatores inseridos que interagiram no espaço de recuperação, dando destaque aos microrganismos, que possuem papéis importantes no processo de reciclagem dos elementos orgânicos, degradando-os e disponibilizando para o ambiente micro- e macronutrientes, que serviram de nutrição para o rápido crescimento vegetativo das espécies vegetais; as homeopatas também tiveram grande influência nos resultados, Casali et al. (2006) ressaltam a importância dos preparados homeopáticos serem

inseridos junto aos sistemas de recuperação de solo, uma vez que vem estimular a defesa e a adaptação dos microrganismos de forma natural, quase como se fosse intrínseca.

Estudar, trabalhar e implantar sistemas pautados na gestão ambiental, no desenvolvimento, na sustentabilidade e nas plantas medicinais em áreas de assentamento foram decisões assertivas. A discussão e implantação deste projeto tem viabilizado a subsistência destas famílias, garantindo a produtividade com excedentes para comercialização e a recuperação do meio ambiente, vindo de encontro a Lei que visa regulamentar o uso dessas terras na Reforma Agrária, a Lei Nº 8.629, de 25 de fevereiro de 1993, que dispõe sobre a regulamentação dos dispositivos constitucionais relativos à reforma agrária, previstos no Capítulo III, Título VII, da Constituição Federal. Esta lei traz, em seu Art. 2º a seguinte proposição:

“a propriedade rural que não cumprir a função social prevista no art. 9º é passível de desapropriação, nos termos desta Lei”, e no Art. 9º tem-se que, “a função social é cumprida quando a propriedade rural atende, simultaneamente, segundo graus e critérios estabelecidos nesta lei, os seguintes requisitos: I- aproveitamento racional e adequado; II- utilização adequada dos recursos naturais disponíveis e preservação do meio ambiente; III- observância das disposições que regulam as relações de trabalho; IV - exploração que favoreça o bem-estar dos proprietários e dos trabalhadores (Câmara dos deputados, 1993).

Entende-se que este grupo de trabalhadores e trabalhadoras compreenderam bem a função social de que trata a lei, servindo de exemplo para inúmeras pessoas que se encontram em condições parecidas. Como resultados, vale destacar a troca de conhecimentos entre todas as pessoas envolvidas, a existência de frutas sadias, saborosas e com folhas bem pigmentadas, bem como uma diversidade de animais e insetos, servindo de indicativo para avaliar o aumento da qualidade do solo e a recuperação do espaço degradado.

#### **4 | ALGUMAS CONSIDERAÇÕES**

Dentre os resultados destaca-se a interação de troca de saberes, e frisa-se que novas relações entre universidades e agricultura familiar precisam ocorrer, trazendo o conhecimento científico para viabilizar a dura realidade que vive o povo do campo, e que também sirva para nortear a pesquisa para novos produtos oriundos dos recursos naturais partindo do pressuposto da produção sustentável, uma realidade possível.

Este artigo apresentou algumas respostas de uma proposta de recuperação de áreas degradadas em solos de cerrado no Mato Grosso do Sul, evidenciando resultados como a evolução na qualidade de solo como o equilíbrio de pH e a produtividade sustentável nas áreas de estudo. Também foi possível visualizar com o manuscrito

as possibilidades de estudos e parcerias que podem ser realizadas no que tange ao estudo dos recursos naturais pelo viés da sustentabilidade, sendo seus resultados importantes não só para os agricultores, mas toda a sociedade acaba ganhando, inclusive o meio ambiente.

A perspectiva destes trabalhadores, ainda para o ano de 2018, é tornar estas três unidades de produção em bancos de sementes crioulas comunitárias, com parceria com o Ministério do Desenvolvimento Agrário, bem como ampliar o SAFs para 2 hectares por lote. Para este fim foram solicitadas juntamente ao Banco do Brasil do município de Sidrolândia-MS, o acesso ao PRONAF (Programa Nacional de Fortalecimento da Agricultura Familiar), que viabilizará recursos financeiros para esta nova etapa.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, A. V.; SILVA, A. M.; MORAES, M. L. T.; FREITAS, M. L. M.; BORTOLOZO, F. R. **Implantação de espécies nativas para recuperação de áreas degradadas em região de Cerrado**. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS, 4., 2000, Blumenau. Anais. Blumenau, Sociedade Brasileira de Recuperação de Áreas Degradadas, Fundação Universidade Regional de Blumenau, 2000. CD-ROM.
- ALTIERI, M.A. **Agroecologia: as bases científicas da agricultura alternativa**. Rio de Janeiro: PTA/FASE, 1989.
- ANDRADE, F.M.C.; CASALI, V.W.D. Homeopatia, agroecologia e sustentabilidade. **Revista Brasileira de Agroecologia**. V.6, n.1, p.49-56, 2011.
- ARATO, H. D.; MARTINS, S. V.; FERRARI, S. H. **Produção e decomposição de serapilheira em um sistema agroflorestal implantado para recuperação de área degradada em Viçosa-MG**. Revista *Árvore*, v. 27, n. 5, p. 715-721, 2003.
- BIZERRIL, M.X.A. O cerrado nos livros didáticos de geografia e ciências. **Jornal da Ciência**, v.32, p. 56. 2003.
- BRASIL. Secretaria de Educação. Parâmetros curriculares nacionais vl 08 – temas transversais e Ética Mec. SEF. e introdução aos parâmetros curriculares nacionais VII. Meio ambiente e saúde. vol.09, 1997.
- CÂMARA dos Deputados. Diário Oficial da União - Seção 1 - 26/2/1993, Página 2349 (Publicação Original). Coleção de Leis do Brasil - 1993, Página 352 Vol.
- CASALI, V. W. D.; CASTRO, D. M.; ANDRADE, F. M. C.; LISBOA, S. P. **Homeopatia: bases e princípios**. Viçosa: Editora UFV, 2006. 140 p.
- CHONG, K. Y.; RAPHAEL, M. B.; CARRASCO, L. R.; YEE, A. T. K.; GIAM, X.; YAP, V. B.; TAN, T. W. **Reconstructing the invasion history of a spreading, non-native, tropical tree through a snapshot of current distribution, sizes, and growth rates**. *Plant Ecology*, v. 218, n. 6, p. 673-685, 2017.
- FRAGOSO, R. O.; CARPANEZZI, A. A.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. **Barreiras ao estabelecimento da regeneração natural em áreas de pastagens abandonadas**. *Ciência Florestal*, v. 27, n. 4, p. 1451-1464, 2017.
- GÖTSCH E. **O Renascer da Agricultura**. Tradução: Patrícia Vaz. Rio de Janeiro: AS-PTA, 2ª edição

1996.

HAHNEMANN, S. **Exposição da Doutrina Homeopática ou Organon da Arte de Curar**. Traduzido da 6ª d. alemã. São Paulo: Grupo de Estudos Homeopáticos “Benoit Mure”, 1984.

KLINK, C.A.; A.G. MOREIRA Past and current human occupation and land-use. In: P.S. Oliveira & R.J. Marquis (eds.). **The Cerrado of Brazil. Ecology and natural history of a neotropical savanna**. Columbia University Press, New York. p. 69-882002

MODOLON, T. A.; PIETROWSKI, V.; ALVES, L. F. A.; GUIMARÃES, A. T. B. **Desenvolvimento inicial do milho tratado com o preparado homeopático Nux vomica e submetido ao percevejo barriga-verde *Dichelops melacanthus* Dallas (Heteroptera: Pentatomidae)**. *Revista Brasileira de Agroecologia*, v. 11, n. 2, P. 85-96, 2016.

MONTIBELLER F. G. **O mito do desenvolvimento sustentável: Meio ambiente e custos sociais no moderno sistema produtor de mercadorias**. Florianópolis: Ed. Da UFSC, 2001.

NARDOQUE S.; ALMEIDA R. A. DATALUTA **Bancos de Dados da Luta pelo Terra**. Laboratório de Estudos territoriais, Três Lagoas, 2014.

PII, Y.; PENN, A.; TERZANO, R.; CRECCHIO, C.; MIMMO, T.; CESCO, S. **Plant-microorganism-soil interactions influence the Fe availability in the rhizosphere of cucumber plants**. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 87, p. 45-52, 2015.

REZENDE J. M. CADERNO DE HOMEOPATIA. **Instruções práticas geradas por agricultores sobre o uso da homeopatia no meio rural**. 3ª Edição, 2009.

RIBASKI, J.; MONTOYA, L. J.; RODIGHERI, H. R. **Sistemas Agroflorestais: aspectos ambientais e socioeconômicos**. *Informe Agropecuário*, v. 22, n. 212, p. 61-67, 2001.

SARTORI, V.C.; DA SILVA-RIBEIRO R.T.; SCUR L.; PANSERM. R.; RUPP L.C.D.; VENTURIN L. **Cartilha para agricultores: adubação verde e compostagem: Estratégia de manejo para a conservação das águas**, Caxias do Sul, RS: Educus, 2011.

VEIGA, D. P. B. **O impacto do uso do solo na contaminação por agrotóxicos das águas superficiais de abastecimento público**. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2017.

VITHOULKAS G. **Homeopatia: Ciência e Cura**. Editora Cultrix, São Paulo-SP, 1980.

## **SOBRE AS ORGANIZADORAS**

**NATIÉLI PIOVESAN** Docente no Instituto Federal do Rio Grande do Norte (IFRN), graduada em Química Industrial e Tecnologia em Alimentos, pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Possui graduação no Programa Especial de Formação de Professores para a Educação Profissional. Mestre e Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Atua principalmente com o desenvolvimento de pesquisas na área de antioxidantes naturais, desenvolvimento de novos produtos e análise sensorial.

**VANESSA BORDIN VIERA** docente adjunta na Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), bacharel e licenciada em Nutrição pelo Centro Universitário Franciscano (UNIFRA). Mestre e Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Docente no Instituto Federal do Amapá (IFAP). Editora da subárea de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Journal of bioenergy and food science. Possui experiência com o desenvolvimento de pesquisas na área de antioxidantes, desenvolvimento de novos produtos, análise sensorial e utilização de tecnologia limpas.

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

