



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

FLÁVIO MAURÍCIO PERINI

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO E ANÁLISE FITOQUÍMICA DE
EXTRATO ETANÓLICO E FRAÇÕES, OBTIDOS DE FOLHAS DE *Clusia
fluminensis* Planck & Triana.**

VITÓRIA - ES
2020

FLÁVIO MAURÍCIO PERINI

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO E ANÁLISE FITOQUÍMICA DE
EXTRATO ETANÓLICO E FRAÇÕES, OBTIDOS DE FOLHAS DE *Clusia
fluminensis* Planck & Triana.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Vegetal.

Área de concentração: Fisiologia Vegetal.

Orientador(a): Prof.^a Dr.^a Viviana Borges Corte

Coorientador(a): Prof. Dr. Hildegardo Seibert França

VITÓRIA - ES

2020

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

P445a Perini, Flávio Maurício, 1976-
Avaliação do potencial biológico e análise fitoquímica de extrato etanólico e frações, obtidos de folhas de *Clusia fluminensis* Planck & Triana. / Flávio Maurício Perini. - 2020.
116 f. : il.

Orientadora: Viviana Borges Corte.
Coorientador: Hildegardo Seibert França.
Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais.

1. Clusiaceae. I. Corte, Viviana Borges. II. França, Hildegardo Seibert. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Humanas e Naturais. IV. Título.

CDU: 57

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO E ANÁLISE FITOQUÍMICA
DE EXTRATO ETANÓLICO E FRAÇÕES, OBTIDO DE FOLHAS DE
Clusia fluminensis Planck & Triana.**

FLÁVIO MAURÍCIO PERINI

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Vegetal na área de concentração Fisiologia Vegetal.

Aprovada em 30 de outubro de 2020

Comissão Examinadora:



Prof. Dra. Viviana Borges Corte (UFES)
Orientadora e Presidente da Comissão



Prof. Dr. Pedro Corrêa Damasceno Junior (UFRRJ)
Examinador Interno

Prof. Dr. Antelmo Ralph Falqueto (UFES)
Examinador Interno



Prof. Dra. Carine Coneglian de Farias (IFES/ES)
Examinadora Externa



Prof. Dra. Janaina Brandão Seibert (UFSCar)
Examinadora Externa

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por ANTELMO RALPH FALQUETO - SIAPE 1648734 Departamento de Ciências Agrárias e Biológicas - DCAB/CEUNES

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/90404?tipoArquivo=0>

AGRADECIMENTOS

Aos meus filhos, Matheus Balestrero Perini e Vivian Altoé Assu Perini, que são os meus maiores bens e principal motivo de querer sempre melhorar pessoalmente e profissionalmente.

À minha mãe, Izabel Miossi, que sempre incentivou meus estudos e me proporcionou a oportunidade de poder chegar a esse momento. Te amo e muito obrigado!

Ao meu pai, Arliss Félix Perini, por todos incentivos que são inatos aos pais! Te amo!

Aos meus irmãos, Fábio Miossi Perini, Fhelipe Félix Perini e Fernanda Miossi Perini, muito obrigado por tudo a longo desse anos de vida. À cunhada Elisa Senna Ribeiro, sobrinhas Gabriela e Giovana; sobrinhos Bruno e Bernardo; sobrinhos Lorenzo e Isabeli. Todos moram em meu coração!

A todos familiares, avó, tios e tias, primos e primas e todos que fazem parte de minha vida e que de alguma forma, presente ou não, contribuíram para tudo que foi construído!

A participação daqueles que mesmo sem ser família de sangue, representaram uma família de laços, meus agradecimentos a Lorena, Milton, Lílian, Lucian e Manu!

À minha orientadora, Dra. Viviana Borges Corte, pela confiança e orientação e principalmente por oportunizar mais um ganho em minha formação.

Ao Dr. Hildegardo Seibert França, pela co-orientação, que, juntamente com o Dra. Carine Coneglian de Farias Colman, Dr. Elias Terra Werner e Dra. Janaina Brandão Seibert contribuíram para a execução do projeto.

Aos amigos Dr. Anderson Mariquito e Dr. Alessandro Bermudes Gomes, parceiros nessa jornada.

Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal (PPGBV – UFES) que me proporcionou ganhos intelectuais e acadêmicos que permitiram alcançar o título de Doutor.

Ao Instituto Federal do Espírito Santo, instituição à qual estou vinculado e que me proporcionou todo incentivo para que pudesse me qualificar cada vez mais visando um retorno de qualidade à sociedade brasileira. Em especial: ao Ifes – Campus Cariacica, “minha casa” nessa instituição de ensino e ao Ifes - Campus Vila Velha e à equipe do seu laboratório pelo incentivo, pelo apoio e pela colaboração durante toda à pesquisa.

À Professora Dra. Idalina Tereza de Almeida Leite, pela atenção e por disponibilizar o laboratório LASEF para que os experimentos pudessem ser realizados, a ela minha gratidão.

Ao amigo José Mauro Ferreira pela disponibilidade em vir de Viçosa/MG para colaborar em alguns experimentos, meu muito obrigado pelo carinho e atenção.

Aos amigos que me ajudaram no campo e no laboratório, e que, assim, fizeram parte: Dra. Camila Reis dos Santos, Msc. Juliana Trindade, Dra. Tarsila Gomes, Msc. Josinei Rodrigues Filho e Dr. Enes Follador Nogueira.

Aos demais amigos que fizeram parte da minha vida durante este período e que de alguma forma tornaram tudo isso possível.

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

Pesquisas buscam nos metabólitos secundários dos vegetais potenciais alelopáticos como alternativa ao controle biológico, bem como a busca de substâncias terapêuticas alternativas que leva ao aumento da exploração da biodiversidade visando reconhecer alternativas que possam minimizar impactos e abrir novas perspectivas de exploração biológica. Espécies vegetais de uso paisagístico e ornamental se mostram como alternativa de exploração, visando o aproveitamento de resíduos que naturalmente seriam descartados, como ocorre com a espécie *Clusia fluminensis* Planch. & Triana, que se enquadra em um grupo de plantas portadoras de metabólitos especiais com potencial a ser explorado com finalidade biológica, como a alelopatia, a atividade antioxidante e a atividade fotoprotetora. Extrato etanólico e frações hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol e aquoso, obtidos de folhas de *C. fluminensis*, foram testados em sementes de alface e capim colônia, analisando influência na germinação e crescimento inicial. Foi realizada prospecção fitoquímica por cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa (CG/EM), testes biológicos de germinação e emergência, comprimentos de radícula e parte aérea, massa fresca, atividade enzimática das enzimas catalase (CAT), peroxidase (POX) e superóxido dismutase (SOD) e teor de pigmentos (clorofila a, clorofila b e carotenoides). Foram ainda realizadas análise de teores de fenóis totais, taninos e flavonoides associando-os aos efeitos antioxidante, com testes de capacidade do extrato em sequestrar o cátion radical livre ABTS^{•+} (ABTS), capacidade do extrato em doar átomos de hidrogênio e estabilizar o radical livre DPPH[•] (DPPH), poder antioxidante redutor do ferro (FRAP), capacidade antioxidante total pelo método do fosfomolibdênio (TAC-fosfomolibdenio), e teste de efeito fotoprotetor. A análise de CLAE demonstrou a presença de hyperosídeo na fração acetato de etila, de modo a permitir uma correlação à atividade antioxidante. As concentrações testadas nos experimentos de germinação e emergência, bem como nos experimentos de atividade antioxidante e fotoproteção foram 0.25, 0.50, 0.75 e 1.0mg/mL. A fração acetato de etila apresentou melhores resultados alelopáticos, houve aumento significativo da atividade das três enzimas em sementes de alface, diminuição na atividade sobre as enzimas CAT e SOD e não influência sobre a POX em sementes de capim colônia. No tratamento de sementes com o extrato acetato de etila foi observado elevação nos teores de clorofila a, b e carotenoides, no teor de clorofilas totais e na relação clorofila total/carotenoides, além de não haver alteração na relação clorofila a/b. Os resultados demonstraram presença significativa de fenóis totais, taninos e flavonoides no extrato etanólico e nas frações, com destaque para a fração acetato de etila. A atividade fotoprotetora se mostrou mais efetiva para a fração diclorometano, com FPS 7.01, compatível ao uso como fotoprotetor, além de identificar a fração acetato de etila como um possível efetivador de atividade fotoprotetora devido ao seu efeito antioxidante. Os resultados sugerem que o extrato acetato de etila obtido de folhas de *C. fluminensis* apresenta potencial alelopático promissor, com possibilidade de exploração como alternativa para uso no controle biológico e convencional em substituição aos agroquímicos convencionais. Permitem concluir também que a fração acetato de etila obtida de folhas de *C. fluminensis* seria a melhor a ser explorada visando a obtenção de formas naturais de antioxidantes e promotores de fotoproteção, bem como a fração diclorometano se apresentam como alternativa ao uso como FPS.

Palavras-chave: alelopatia • antioxidante • *Clusia fluminensis* • fotoproteção •

ABSTRACT

Research looks from the secondary metabolites of potential allelopathic plants as an alternative to biological control, as well as the search for alternative therapeutic substances that leads to increased exploration of biodiversity in order to recognize alternatives that can minimize impacts and open new perspectives of biological exploration. Vegetable species for landscape and ornamental use are shown as an exploration alternative, aiming at the use of residues that would naturally be discarded, as occurs with the species *Clusia fluminensis* Planch. & Triana, which fits into a group of plants with special metabolites with potential to be explored for biological purposes, such as allelopathy, antioxidant activity and photoprotective activity. Ethanol extract and hexane, dichloromethane, ethyl acetate, butanol and aqueous fractions, obtained from *C. fluminensis* leaves, were tested on lettuce seeds and colonization grass, analyzing influence on germination and initial growth. Phytochemical prospecting was performed by thin layer chromatography, high performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS), germination and emergence biological tests, radicle and shoot lengths, fresh mass, activity enzymatic enzymes catalase (CAT), peroxidase (POX) and superoxide dismutase (SOD) and pigment content (chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoids). Analysis of the contents of total phenols, tannins and flavonoids was also carried out, associating them to the antioxidant effects, with tests of the extract's ability to sequester the free radical cation $ABTS^{\cdot+}$ (ABTS), the extract's ability to donate hydrogen atoms and stabilize the free radical DPPH \cdot (DPPH), iron-reducing antioxidant power (FRAP), total antioxidant capacity by the phosphomolybdenum method (TAC-fosfomolibdenio), and photoprotective effect test. The HPLC analysis demonstrated the presence of hyperoside in the ethyl acetate fraction, in order to allow a correlation to the antioxidant activity. The concentrations tested in the germination and emergence experiments, as well as in the antioxidant and photoprotection experiments were 0.25, 0.50, 0.75 and 1.0mg / mL. The ethyl acetate fraction showed better allelopathic results, there was a significant increase in the activity of the three enzymes in lettuce seeds, a decrease in activity on CAT and SOD enzymes and no influence on POX in seeds of colonization grass. In the treatment of seeds with the ethyl acetate extract, there was an increase in the levels of chlorophyll a, b and carotenoids, in the total chlorophyll content and in the total chlorophyll / carotenoid ratio, in addition to no change in the chlorophyll a / b ratio. The results showed a significant presence of total phenols, tannins and flavonoids in the ethanol extract and in the fractions, with emphasis on the ethyl acetate fraction. The photoprotective activity was shown to be more effective for the dichloromethane fraction, with SPF 7.01, compatible with use as a photoprotector, in addition to identifying the ethyl acetate fraction as a possible enabler of photoprotective activity due to its antioxidant effect. The results suggest that the ethyl acetate extract obtained from *C. fluminensis* leaves. presents promising allelopathic potential, with the possibility of exploitation as an alternative for use in biological and conventional control to replace conventional agrochemicals. They also allow us to conclude that the ethyl acetate fraction obtained from *C. fluminensis* leaves would be the best one to be explored in order to obtain natural forms of antioxidants and photoprotection promoters, as well as the dichloromethane fraction are presented as an alternative to use as SPF.

Keywords: allelopathy • antioxidant • *Clusia fluminensis*• photoprotection •

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1: (A) Imagem de planta adulta de *Clusia fluminensis*; (B) flor aberta de *Clusia flumineisis*; (C) paisagismo de cerca viva de plantas adultas de *Clusia fluminensis*..28
- Figura 2: Realização de podas e grande volume de resíduos.....29
- Figura 3: Esquema geral simplificado da interação entre o metabolismo primário e as vias de síntese do metabolismo secundário.31
- Figura 4: Principais fatores que influenciam a produção e acúmulo dos metabólitos secundários.....34
- Figura 5: Representação do espectro eletromagnético, com destaque para a região do espectro visível.....41

CAPÍTULO I - Efeito alelopático de extratos obtidos de folhas de *Clusia fluminensis* Planck & Triana sobre a germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. e *Panicum maximum* Jacq.

- Figura 1: Gráficos representativos da regressão linear das variáveis em estudo em função da concentração da fração acetato de etila sobre *Lactuca sativa*. Concentrações analisadas: 0,25, 0,50, 0,75 e 1,0 mg/mL. Variáveis representadas: A - porcentagem de germinação (%G) em porcentagem relativa; B - índice de velocidade de germinação (IVG); C - tempo médio de germinação (TMG) em horas; D - velocidade de germinação (VG) em porcentagem; E - índice de alelopatia (IA); F - comprimento da raiz (CR) em centímetros; G - comprimento da parte aérea (CPA) em centímetros; H - massa fresca da raiz (MFR) em grama; I - massa fresca da parte aérea (MFPA) em gramas.66
- Figura 2: Gráficos representativos da regressão linear das variáveis em estudo em função da concentração da fração acetato de etila sobre *Panicum maximum*. Concentrações analisadas: 0,25, 0,50, 0,75 e 1,0 mg/mL. Variáveis representadas: A - porcentagem de germinação (%G) em porcentagem relativa; B - índice de velocidade de germinação (IVG); C - tempo médio de germinação (TMG) em horas; D - velocidade de germinação (VG) em porcentagem; E - índice de alelopatia (IA); F - comprimento da raiz (CR) em centímetros; G - comprimento da parte aérea (CPA) em centímetros; H - massa fresca da raiz (MFR) em grama; I - massa fresca da parte aérea (MFPA) em gramas.67

Figura 3: Atividade enzimática de CAT, POX e SOD, em sementes de *Lactuca sativa*, submetidas ao tratamento controle e ao extrato acetato de etila, na concentração 0,75mg/mL.68

Figura 4: Atividade enzimática de CAT, POX e SOD, em sementes de *Panicum maximum*, submetidas ao tratamento controle e ao extrato acetato de etila, na concentração 0,75mg/mL.68

CAPÍTULO II - Folhas de *Clusia fluminensis* Planck & Triana: uma alternativa ao uso como antioxidante e fotoprotetor

Figura 1: Análise espectrofotométrica do extrato etanólico e suas frações hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol e aquoso.....97

Figura 2: Gráficos representativos do Fator de Proteção Solar (FPS) identificado no extrato etanólico e em suas frações hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol e aquoso, seguindo o cálculo proposto por Mansur et. al, 1986.....98

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I - EFEITO ALELOPÁTICO DE EXTRATOS OBTIDOS DE FOLHAS DE *Clusia fluminensis* Planck & Triana SOBRE A GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DE *Lactuca sativa* L. e *Panicum maximum* Jacq.

Tabela 1: Cromatografia em camada delgada (CCD), sistemas de eluição e reagentes reveladores dos respectivos fitoquímicos.	62
Tabela 2: Valores de pH, potencial hídrico (PW) dos extratos de folhas de <i>Clusia fluminensis</i> Planck & Triana nas concentrações 0,0, 0,25, 0,50, 0,75 e 1,0 mg/mL, na temperatura de 25,2°C.	63
Tabela 3: Análise de germinação e crescimento inicial de alface e capim colônia, submetidos a tratamento com extrato etanólico e frações hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol e aquoso.	64
Tabela 4: Análise de germinação e crescimento inicial de alface e capim colônia, submetidos a tratamento com fração acetato de etila nas concentrações 0.0, 0.25, 0.50, 0.75 e 1.00 mg/mL.	65
Tabela 5: Teor de pigmentos medidos em plântulas de capim colônia germinadas com tratamento controle e com extrato acetato de etila (0,75mg/mL).	68
Tabela 6: Prospecção fitoquímica inicial por meio de cromatografia de camada delgada (CCD) dos extratos obtidos de folhas de <i>Clusia fluminensis</i> e suas frações.	69

CAPÍTULO II: FOLHAS DE *Clusia fluminensis* Planck & Triana: ALTERNATIVA AO USO COMO ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETOR

Tabela 1: Atividade antioxidante do extrato etanólico de folhas de <i>Clusia fluminensis</i> e suas frações hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol e aquoso.	96
Tabela 2: Teores de fenóis totais, taninos e flavonoides.	98
Tabela 3: Resultados obtidos de CLAE.	99
Tabela 4: Principais compostos identificados por Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massas (CG/EM) nas frações apolares de folhas de <i>Clusia fluminensis</i> Planck & Triana.	100

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	14
2. OBJETIVO GERAL.....	18
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19
5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
5.1 A problemática do uso de herbicidas e alternativas.....	23
5.2 Caracterização de família gênero e espécie de <i>Clusia fluminensis</i> Planch. & Triana.....	27
5.3 Metabolismo secundário e alelopatia.....	30
5.4 Aleloquímicos	33
5.5 Atividade antioxidante	35
5.6 Atividade fotoprotetora	40
5.7 Referências bibliográficas	43
CAPITULO 1 – EFEITO ALELOPÁTICO DE EXTRATOS OBTIDOS DE FOLHAS DE <i>Clusia fluminensis</i> PLANCK & TRIANA SOBRE A GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DE <i>Lactuca sativa</i> L. E <i>Panicum maximum</i> JACQ.	55
RESUMO	56
ABSTRACT.....	57
1. INTRODUÇÃO.....	58
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	59
2.1. Preparação do extrato vegetal	59
2.2. Análise do potencial alelopático.....	60
2.3. Prospecção química por Cromatografia em camada delgada	61
2.4. Delineamento experimental e análise estatística.....	62
3. RESULTADOS	62
3.1 Análise de potencial alelopático.....	62
3.1 Perfil fitoquímico	69
4. DISCUSSÃO.....	69
5. CONCLUSÕES.....	80
6. REFERÊNCIAS	81
CAPITULO 2 – FOLHAS DE <i>Clusia fluminensis</i> PLANCK & TRIANA: UMA ALTERNATIVA AO USO COMO ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETOR	85
RESUMO	86
ABSTRACT.....	87
1. INTRODUÇÃO.....	88
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	89
2.1 Material biológico de pesquisa	89

2.2	<i>Maceração e partição dos extratos</i>	89
2.3	<i>Análises</i>	90
2.3.1	<i>Análise de Atividade Antioxidante</i>	90
2.3.1.1	<i>DPPH</i>	90
2.3.1.2	<i>ABTS</i>	91
2.3.1.3	<i>FRAP-Poder de redução férrico</i>	92
2.3.1.4	<i>Capacidade antioxidante total pelo método do fosfomolibdênio</i>	92
2.3.2	<i>Atividade Fotoprotetora</i>	92
2.3.3	<i>Determinação de Fenóis Totais</i>	93
2.3.4	<i>Determinação de Taninos</i>	93
2.3.5	<i>Determinação de Flavonóides totais</i>	94
2.3.6	<i>HPLC</i>	94
2.3.7	<i>Cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa</i>	95
2.4	<i>Delineamento experimental</i>	95
3.	RESULTADOS	95
3.1	<i>Atividade antioxidante: ABTS, DPPH, FRAP, TAC-fosfomolibdênio</i>	95
3.2	<i>Atividade fotoprotetora</i>	97
3.3	<i>Teores de fenóis totais, taninos e flavonóides</i>	98
3.4	<i>CLAE e CG/EM</i>	99
4.	DISCUSSÃO	100
5.	CONCLUSÕES	109
6.	REFERÊNCIAS	110

1. INTRODUÇÃO GERAL

O uso contínuo e diverso de agroquímicos no Brasil tem se tornado um crescente problema de ordem ambiental e de saúde pública. A exposição aos agrotóxicos e os impactos causados por eles tem sido registrado pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) e um grande aumento de notificações foi constatado ao longo dos anos monitorados, entre 2007 e 2015. Só em 2014 foram relatados 6,26 casos para cada 100 mil habitantes, a maior incidência em notificações de intoxicação por agrotóxicos no Brasil, e o Espírito Santo se encontra entre os principais estados com valores acima do dobro da média nacional (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Como exemplo de gravidade e abuso do uso de agrotóxicos, segundo o engenheiro agrônomo Edegar Formentini, com base em dados do Fórum Espírito-Santense de Combate aos Impactos dos Agrotóxicos e Transgênicos (FESCIAT), a partir da ficha semestral de agrotóxicos do Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal (Idaf), formada a partir das receitas de agrotóxicos vendidos nas lojas especializadas, somente durante o primeiro semestre de 2018, foram comercializados quatro milhões de quilos de agrotóxicos no Espírito Santo. Se for levado em consideração a manutenção dessa média de consumo também no segundo semestre, estima-se, aproximadamente, um total de oito mil toneladas de agrotóxicos, o que poderia matar, por intoxicação aguda, 44.163.348 pessoas ou, 11,46 vezes a população capixaba (SÉCULO DIÁRIO, 2020).

Mesmo assim, a pauta atual do Ministério da Agricultura do Governo Federal para o setor agrícola caminha no sentido da facilitação na liberação e registro de novos agrotóxicos, como por exemplo o Projeto de Lei (PL) n.º 6.299/2002, conhecido como “Pacote do Veneno”, que facilita a liberação de novos agrotóxicos que está em discussão na Câmara dos deputados (AGÊNCIA CÂMARA DE NOTÍCIAS, 2019).

Diante do exposto, identifica-se o sistema agroalimentar como um dos maiores fatores de desequilíbrio ambiental, impactando na saúde da população, além de repercutir nas dimensões econômica, social e cultural (AZEVEDO e PELICIONI, 2011) gerando a necessidade da busca de alternativas sustentáveis ao uso de agroquímicos convencionais bem como os desafios dos órgãos de vigilância em saúde e ambiental para efetivação de medidas que mitiguem os danos causados pelo uso dos defensivos agrícolas. Dessa forma, é crescente a busca pela utilização de métodos alternativos para o controle de pragas e doenças, assim como a utilização de estimulantes e fontes nutritivas naturais no Brasil e no mundo. Nesse contexto, a alelopatia pode ajudar fornecendo novos conceitos de controle

integrado de plantas daninhas, variedades de culturas e novas gerações de fitotoxinas (ZIMDHAL, 1999; VYVYAN, 2002).

Desde meados do século XIX são identificados relatos do emprego de produtos naturais no controle de pragas agrícolas (BRAIBANTE e ZAPPE 2012). Tais produtos são, no geral, obtidos de extratos vegetais, oriundos do metabolismo secundário destes, a priori, sintetizados para proteção do vegetal ou favorecimento de suas interações com o meio. A interferência direta ou indireta que diversos compostos químicos produzidos pelo metabolismo secundário das plantas no crescimento, no desenvolvimento ou em mais atividades biológicas de outras plantas indica seu efeito alelopático (GATTI, PEREZ e LIMA, 2004).

O uso da alelopatia visando controlar a infestação de plantas daninhas ou invasoras traz as vantagens de ser um controle de baixo custo, não precisar de equipamentos sofisticados para aplicação, além de não ser poluente ao meio, e os estudos dos mecanismos das interferências bióticas entre os componentes cultivados e não cultivados, especialmente por meio de interações alelopáticas, tornam-se mais importantes à medida que as limitações econômicas e ecológicas das práticas de controle de infestantes passam a ser mais restritivas (CARVALHO et al, 2012).

Todas as plantas produzem metabólitos secundários e a variação na sua quantidade e qualidade varia de acordo com a espécie e com o local de cultivo, pois muitos deles têm sua síntese desencadeada por eventuais inconstâncias a que as plantas estão expostas (FERREIRA e ÁQUILA, 2000). Pensando no aspecto de interferência sobre outras plantas, destaca-se o uso dos extratos vegetais como causadores da redução da porcentagem e velocidade de germinação (LUSTOSA, OLIVEIRA e ROMEIRO, 2007; BELINELO et al., 2008; BORELLA et al., 2012), redução ou estímulo do crescimento inicial das plantas (ZHANG et al., 2010; SILVEIRA, MAIA e COELHO, 2012) alteração do teor de pigmentos (BORELLA et al., 2009; BORELLA et al., 2012), dentre outros efeitos.

As substâncias produzidas pelas plantas são agrupadas de acordo com suas singularidades biogênicas. Esses grupos compreendem os fenóis simples, ácidos orgânicos, aldeídos, lactonas simples insaturadas, terpenos, esteróides, quinonas, flavonóides, taninos, alcalóides, cumarinas, aminoácidos, ácidos graxos, álcoois, polipeptídios, nucleosídeos e muitos outros ainda não identificados (BLUM, 1998 ; MACÍAS et al ., 1992 , 2000 ; WEIDENHAMER et al., 2004; NISHIDA et al., 2005). Entre os mais diversos compostos com efeito alelopático, podem ser destacados os alcaloides, os flavonoides, os taninos e os compostos fenólicos (KING e AMBIKA, 2002).

Grande parte das pesquisas envolvendo alelopatia procura descrever apenas os efeitos sobre a germinação e o crescimento das espécies testadas, não elucidando seus efeitos anatômicos, celulares e moleculares. Entretanto é importante levar em consideração que as alterações na germinação e crescimento promovidos pelos fitoquímicos refletem o resultado secundário de modificações anteriores (FERREIRA e AQUILA, 2000) que podem ter ocorrido em nível molecular, celular e anatômico. Pesquisas têm demonstrado que a interferência dos aleloquímicos ocorre com frequência na assimilação de nutrientes, na inibição da fotossíntese (TAWAHA et al., 2003; ANAYA et al., 2005), divisão celular, síntese orgânica, interações hormonais, absorção de nutrientes, inibição da síntese de proteínas, mudanças no metabolismo lipídico, abertura estomática, assimilação de CO₂ e na fotossíntese, inibindo o transporte de elétrons e reduzindo o conteúdo de clorofila na planta, tendo como consequência, inibição no desenvolvimento da planta (REZENDE et al., 2003; REIGOSA et al., 2006).

A busca por espécies que possam ser utilizadas como fornecedoras de substâncias que exerçam efeitos alelopáticos ou fitotóxicos é crescente. Muitas famílias, gêneros e espécies nativas, exóticas e cultivadas têm sido alvo de estudos para tais fins (OLIVEIRA et al., 2020; RIBEIRO et al., 2019). Nesse sentido, a família Clusiaceae, também conhecida como Guttiferae (KERRIGAN et al., 2011) apresenta potencial promissor. Além de sua aplicação em ornamentação e paisagismo, várias espécies desta família são utilizadas com fins medicinais em todo o mundo, como para o tratamento do câncer, processos inflamatórios, infecções, como purgativos e controle da obesidade (HEMSHEKHAR et al., 2011). As informações quanto ao aspecto alelopático e fitotóxico ainda pouco exploradas trazem mais uma perspectiva de descobertas para espécies da família, além disso, a presença comprovada de metabólitos secundários com efeito alelopático em espécies do gênero *Clusia* indicam um caminho promissor para que pesquisas ecofisiológicas sejam implementadas, uma vez que poucas informações são encontradas sobre potencial alelopático dessas plantas sobre outras.

Dentre as diversas espécies do gênero *Clusia*, destacamos a espécie *Clusia fluminensis* Planck & Triana - espécie endêmica da Mata Atlântica brasileira com ocorrência significativa no Espírito Santo, entre outros estados como Bahia e Rio de Janeiro (BITTRICH 2010). Pode ser encontrada em regiões de alta luminosidade e restrição hídrica, sendo amplamente utilizada como planta ornamental. Se destaca por seu uso na medicina popular e por grande abrangência no Brasil (FENNER et al. 2006, BITTRICH 2010, REVEAL e CHASE 2011). Curiosamente, suas folhas raramente mostram sinais de herbivoria, apresentando-se sempre intactas e brilhantes (BITTRICH 2010).

Em 2000, Porto et al. identificaram e quantificaram, por cromatografia líquida de alta eficiência, benzofenonas poliisopreniladas, incluindo clusianona e espiroona, em resinas obtidas de flores masculinas de *C. fluminensis*. Recentemente, clusianona de flores masculinas de *C. fluminensis* também foi isolada e caracterizada estruturalmente (SILVA et al. 2012) e investigada sua atividade larvicida (BITTRICH 2010).

Com base nas pesquisas prévias relatadas, por ser de fácil manejo, amplamente usada para ornamentação e paisagismo no Espírito Santo e por suas podas gerarem grande quantidade de resíduos subaproveitados, a espécie *Clusia fluminensis* apresenta-se como espécie promissora para bioprospecção vegetal.

Na bioprospecção de plantas tida como atividade exploratória que visa identificar componentes vegetais do patrimônio genético e informação sobre conhecimento tradicional associado, com potencial de uso comercial (BASRA, et al., 2011; CANTANHEDE et al., 2014), podemos destacar as pesquisas referentes aos seus efeitos biológicos, com perspectivas alelopáticas, farmacêuticas, terapêuticas, alimentícias cosméticas e preventivas. Desta forma, o comportamento dos extratos frente às respostas obtidas de experimentos *in vitro* podem indicar novos caminhos a serem explorados visando melhoria da qualidade de vida, com a obtenção de produtos naturais mais sustentáveis e menos prejudiciais à saúde.

Diante do exposto, o presente trabalho visa identificar possíveis efeitos biológicos de extratos de folhas de *Clusia fluminensis* Planch. & Triana.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar potenciais atividades biológicas promovidas pelo extrato etanólico de folhas da espécie *Clusia fluminensis* e das frações hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol e aquoso, bem como realizar uma análise fitoquímica procurando associá-la a atividades biológicas analisadas.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Associar sobre possíveis efeitos alelopáticos e fitotóxicos exercidos pelo extrato etanólico e frações obtidas a partir dos solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol, sobre a germinação e o crescimento inicial de *Lactuca sativum* e *Panicum maximum*, identificando aquele que tem maior potencial para uso como defensivo agrícola.
 - ✓ Correlacionar os efeitos alelopáticos e fitotóxicos observados com as possíveis mudanças anatômicas, celulares e moleculares.
 - ✓ Identificar alterações enzimáticas que possam justificar possíveis mudanças biológicas nas espécies testadas.
 - ✓ Identificar alterações em pigmentos clorofila e carotenóides que possam justificar possíveis mudanças biológicas nas espécies testadas.
 - ✓ Identificar as classes de metabólitos secundários presentes no extrato etanólico obtidos de folhas da espécie *Clusia fluminensis* e suas frações hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol e aquoso, obtidas a partir dos solventes extratores hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol.
 - ✓ Avaliar testes antioxidantes que possam justificar possíveis atividades biológicas promovidas pelos extratos.
 - ✓ Avaliar potencial atividade fotoprotetora que possam justificar possíveis atividades biológicas promovidas pelos extratos.
-

4. REFERÊNCIAS

- Agrotóxicos aplicados no ES em um ano matariam a população capixaba onze vezes. Século Diário, 09 de fev de 2020. Disponível em: <<https://www.seculodiario.com.br/meio-ambiente/agrotoxicos-aplicados-no-es-em-um-ano-matariam-a-populacao-capixaba-onze-vezes>>. Acesso em: 01 de ago. de 2020.
- ALVES, C.Q.; DAVID J.M.; DAVID J.P.; BAHIA M.V.; AGUIAR R.A. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. Quim. Nova, Vol. 33, No. 10, p. 2202-2210, 2010.
- ANAYA, A. L. et al. Allelochemicals from *Stauranthus perforatus*, a Rutaceous tree of the Yucatan Peninsula. Phytochemistry, v. 66, p. 487-494, 2005.
- AZEVEDO E.; PELICIONI M.C.F. Health Promotion, Sustainability and Agroecology: an intersectoral discussion. Saude soc. vol.20 no.3 São Paulo July/Sept. 2011.
- BARREIROS A.L.B.S., DAVID J.M., DAVID J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. Quim Nova 29: 113-123. 2006
- BARREIROS. A.L.B.S; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. Quim. Nova, V.29, p.113-123, 2006.
- BASRA, S. M. A.; IFTIKHAR, M. N.; AFZAL, I. Potential of moringa (*Moringa oleifera*) leaf extract as priming agent for hybrid maize seeds. International Journal of Agriculture and Biology, v. 13, p. 1006–1010, 2011.
- BASTOS, V.P.D.; et al. Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo? Revista UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde, 2014; vol. 16, nº 3, p. 213-219, 2014.
- BELINELO, V. J., CZEPAK, M. P., VIEIRA FILHO, S. A., MENEZES, L. F. T., JAMAL, C. M. Alelopatia de *Arctium minus* Bernh (*Asteraceae*) na germinação e crescimento radicular de sorgo e pepino. Caatinga, v.21, n.4, p.12-16, 2008.
- BIANCHI, N. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. Revista Nutrição, v.12, n.2, p.123-130, 1999.
- BITTRICH V. 2010. Clusiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000089>>. Acesso em 05/08/2020.
- BLUM, U. Effects of microbial utilization of phenolic acids and their phenolic acid breakdown products on allelopathic interactions. J. Chem. Ecol., v. 24, n. 2, p. 685-708, 1998.
- BORELLA, J., MARTINAZZO, E. G., AUMONDE, T. Z., AMARANTE, L., MORAES, D. M., VILLELA, F. A. Respostas na germinação e no crescimento inicial de rabanete sob ação de extrato aquoso de *Piper mikanianum* (Kunth) Steudel. Acta Botanica Brasilica, v.26, n.2, p.415-420, 2012.
- BORELLA, J., WANDSCHEER, A. C. D., BONATTI, L. C., PASTORINI, L. Efeito alelopático de extratos aquosos de *Persea americana* Mill. sobre *Lactuca sativa* L. Revista Brasileira de Biociências, v.7, n.3, p.260-265, 2009.
- BRAIBANTE, M. E. F.; ZAPPE, J. A. A química dos agrotóxicos. Química Nova na Escola, v. 34, n. 1, p. 10–15, 2012.
-

-
- CALDIZ, D. O.; FERNÁNDEZ, L. Allelopathy as possible strategy for weed control in agriculture and forestry systems. In: MACIAS, F. A. et al. Recent advances in allelopathy. Cádiz: Universidad de Cádiz, 1999. p. 451-462.
- CANTANHEDE, D.J.; SILVA, M. R. M.; VASCONCELOS, F.F.A; SANTANA, D.F.; CÂMARA, P.B.M. Potencial Alelopático de Extrato Aquoso de Folhas de Babaçu Sobre Germinação e Desenvolvimento de Sementes de Feijão-caupi e Senna obtusifolia. Cadernos de Agroecologia, Bento Gonçalves, RS, v. 9, n. 4, p.1-8, 2014.
- CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. Free Radical Biology & Medicine, v.22, n.5, p.749- 760, 1997.
- CARVALHO, W.P. et al. Alelopatia de adubos verdes sobre feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.). Revista brasileira de Biociências, v. 10, n.1, p.93-86, 2012.
- DEGASPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. Antioxidants properties of phenolic compounds. Visão Acadêmica, v.5, p.33-40, 2004. DEL-RE, P. V; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v.14, n.2, p.389-399, 2012.
- DORNAS, W. C.; OLIVEIRA, T. T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R.G.; SANTOS, A. F.; NAGEM, T. J. Flavonoides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v.28, n.3, p.241-249, 2007.
- EINHELLIG, F. A. et al. Effects of root exudate sorgoleone on photosynthesis. J. Chem. Ecol., v. 19, p. 369-375, 1993.
- EINHELLIG, F.A. Mode of Allelochemical Action of Phenolic Compounds. In: Allelopathy. Chemistry and Mode of Action of Allelochemicals. CRC Press, p.217-233, 2004.
- FENNER R, BETTI AH, MENTZ LA AND RATES SMK. 2006. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. Rev Bras Cienc Farm 42: 369-394.
- FERREIRA, A.G.; AQUILA, M.E.A. Alelopatia: uma área emergente na ecofisiologia. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, v. 12, Edição Especial, p.204-175, 2000.
- FLOR, J.; DAVOLOS, M.R.; CORREA, M. A. Protetores solares. Quimica Nova, v.30, n.1, p.153-158, 2007.
- GATTI, A.B., PEREZ, S.C.J.G.A., LIMA, M.I.S. Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. Acta bot. bras. 18(3): 459-472. 2004.
- HAMINIUK, C. W. I.; MACIEL, G. M.; PLATA-OVIEDO, M. S. V.; PERALTA, R. M. Phenolic compounds in fruits – no overview. International Journal of Food Science & Technology, 2012.
- HEMSHEKHAR, M.; SUNITHA, K.; SANTHOSH, M. S.; DEVARAJA, S.; KERNPARRAJU, K.; VISHWANATH, B. S.; NIRANJANA, S. R.; GIRISH, K. S.; *Phytochem. Rev.* 2011, 10,325.
- KERRIGAN, R. A.; COWIE, I. D.; DIXON, D. J. Em *Clusiaceae*; Short, P. S.; Cowie, I. D., eds.; Northern Territory Herbarium: Australia, 2011.
-

- KING, S. R., AMBIKA, R. Allelopathic plants. 5. *Chromolaena odorata* (L.). *Allelopathy Journal*, v.9, p.35-41, 2002.
- LUSTOSA, F. L., OLIVEIRA, S. C. C., ROMEIRO, L. A. Efeito alelopático de extrato aquoso de *Piper aduncum* L. e *Piper tectoniifolium* Kunth na germinação e crescimento de *Lactuca sativa* L. *Revista Brasileira de Biociências*, v.5, supl.2, p.849-851, 2007.
- MACIAS, F. A. et al. Dehydrozalanin C: A potent plant growth regulator with potential use as a natural herbicide template. *Phytochemistry*, v. 54, p. 65-171, 2000.
- MACIAS, F. A. et al. Natural products as allelochemicals. I. Potential allelopathic activity of several sesquiterpene lactone models. *Phytochemistry*, v. 31, p. 1969-1977, 1992.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos. Tiragem: 1ª edição – 2018 – versão eletrônica. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/images/pdf/2016/dezembro/05/Relatorio-Nacional-de-VSPEA-vol-1.pdf>>. Acesso em: 05/05/2020.
- NASCIMENTO, C. S.; NUNES, L. C. C.; LIMA, Á. A. N. de; GRANGEIRO JÚNIOR, S.; ROLIM NETO, P. J. Incremento do FPS em formulação de protetor solar utilizando extratos de própolis verde e vermelha. *Revista Brasileira de Farmácia*, Rio de Janeiro, v. 30, n. 1, p.334-339, 2009.
- NEAVE, I. A.; DAWSON, J. O. Juglone reduces growth nitrogenase activity, and root respiration of actinorhizal black alder seedlings. *J. Chem. Ecol.*, v. 15, n. 6, p. 1823-1826, 1989.
- NISHIDA, N. et al. Allelopathic effects of volatile monoterpenoids produced by *Salvia leucophylla*: Inhibition of cell proliferation and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* seedlings. *J. Chem. Ecol.*, v. 31, n. 5, 2005.
- OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes Vegetais Naturais de Antioxidantes. *Química Nova*, v.32, n.3, p.689-702, 2009. Oliveira, Y.R.; Silva, P.H.; Abreu, M.C.; Leal, C.B.; Oliveira, L.P. Potencial Alelopático de Espécies da Família Fabaceae Lindl. *Ensaios e Ciênc.*, v. 24, n. 1, p. 65-74, 2020. DOI: <<https://doi.org/10.17921/1415-6938.2020v24n1p59-64>>. Acesso em 28/08/2020.
- PICHERSKY, E; LEWINSOHN, E. Convergent Evolution in Plant Specialized Metabolism. *Annual Reviews Plant Biology*, v.62, p.549-566, 2011.
- POMPEU, G.F.; BORTOLANÇA, P.C.; GRIGNOLI, C.R.E.; SIMIONATO, M.I.V.; GRIGNOLI, L.C.E. Estudo comparativo sobre a conscientização dos hábitos de fotoproteção e dos fatores de risco da carcinogênese de pele em trabalhadores de rua. *Revista Científica da UNIARARAS*, v.1, n.2, p.54-64, 2013.
- REIGOSA, M. J.; PEDROL, N.; GONZÁLEZ, L. Allelopathy: a physiological process with ecological implications. Holanda: Springer, 2006, p. 127-139.
- REVEAL JL AND CHASE MW. 2011. APG III: Bibliographical information and synonymy of Magnoliidae. *Phytotaxa* 19:71-134.
-

REZENDE, C de P.; PINTO, J. C.; EVANGELISTA, A. R.; SANTOS, I. P. A. Alelopatia e suas interações na formação e manejo de pastagens plantas forrageiras. Lavras: UFLA, 2003. 18 p. (Boletim Agropecuário).

RIBEIRO, R.P. Desenvolvimento e validação da metodologia de análise do teor de filtros solares e determinação do FPS in vitro em formulações fotoprotetoras comerciais. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

RIBEIRO, V.M.; VALMORBIDA, R.; HARTMANN, K.C.D.; PORTO, E.C.; ALMEIDA, J.; CORSATO, J.M.; FORTES, A.M.T. Efeito alelopático de *Leucaena leucocephala* e *Hovenia dulcis* sobre germinação de *Mimosa bimucronata* e *Peltophorum dubium*. Museu de Ciências Naturais. Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul. Iheringia, Série Botânica, Porto Alegre, 74: e2019006, 2019. DOI: <<https://doi.org/10.21826/2446-82312019v74e2019006>>. Acesso em: 28/08/2020.

ROCHA, E.C; SARTORI, R.C; NAVARRO, F.F. A aplicação de alimentos antioxidantes na prevenção do envelhecimento cutâneo. Revista Científica da FHO –UNIARARAS, vol. 4, nº 1, p. 19-26, 2016.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; Food Sci. Tech. Int. 2002, 8, 121.

SILVA, C.M; SANTOS, R.A; CAVALCANTE, C.F.C. Os benefícios da nutrição na prevenção do envelhecimento cutâneo. Revista Conexão Eletrônica, vol. 13, nº 1, p. 1-10, 2016.

SILVA, M. C. A.; PAIVA, S. R. Antioxidant activity and flavonoid content of *Clusia fluminensis* Planch. & Triana. Anais da Academia Brasileira de Ciências 2012, 84, 609.

SILVEIRA, P. F., MAIA, S. S. S., COELHO, M. F. B. Potencial alelopático do extrato aquoso de folhas de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. na germinação de *Lactuca sativa* L. Bioscience Journal, v.28, n.3, p.472-477, 2012.

SIQUEIRA, C. Regras sobre liberação de agrotóxicos geram polêmica em debate na Câmara. Fonte: Agência Câmara de Notícias. Brasília, 19 de set. de 2019. Disponível em: <<https://www.camara.leg.br/noticias/585715-regras-sobre-liberacao-de-agrotoxicos-geram-polemica-em-debate-na-camara/>>. Acesso em 27/08/2020.

SOUZA, T.M.; SANTOS, L.E.; MOREIRA, R.R.D.; RANGEL, V.L.B.I. Avaliação da atividade fotoprotetora de *Achillea millefolium* L. (Asteraceae). Revista Brasileira de Farmacognosia, Curitiba, v. 15, n. 1, p. 36-38, 2005.

TAWAHA, A. M.; TURK, M. A. Allelopathic effects of black mustard (*Brassica nigra*) on germination and growth of wild barley (*Hordeum spontaneum*). J. Agron. Crop Sci., v. 189, n. 5, p. 298-303, 2003.

VYVYAN, J. R. Allelochemicals os leads for news herbicides and grochemicals. Tetrahedron, v. 58, p. 1631-1646, 2002.

WEIDENHAMER, J. D.; ROMEO, J. T. Allelochemicals of *Polygonella myriophylla*: Chemistry and soil degradation. J. Chem. Ecol., v. 30, n.5, p.1067-1082, 2004.

ZHANG, D., ZHANG, J., YANG, W., WU, F. Potential allelopathic effect of *Eucalyptus grandis* across a range of plantation ages. Ecological Research, v.25, p.13- 23, 2010.

ZIMDHAL, R. L. Fundamentals of weed science. New York: Academic Press, 1999. 556 p.

5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

5.1 *A problemática do uso de herbicidas e alternativas*

A descoberta dos herbicidas auxínicos, na década de 40, promoveu o início de um novo período de exploração agrícola. Representados pelos compostos ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), e o ácido 4- cloro-2-metilfenoxiacético (MCPA), dois herbicidas seletivos pioneiros que inovaram o comércio dos agroquímicos e, desde então, uma grande diversidade de substâncias químicas passaram a serem utilizadas para o controle de espécies daninhas em campo, promovendo aumento de produtividade e redução de custos (YANG; ZHU, 2013).

Nos últimos anos, o elevado crescimento demográfico forçou o aumento da produção de alimentos e por consequência uma utilização intensa de defensivos agrícolas, buscando altas produtividades que pudessem suprir as crescentes demandas alimentares (MONQUEIRO et al., 2008), e um dos principais fatores que dificultam a produção de alimentos é a prevenção e o controle de pragas, patógenos e plantas daninhas, que são considerados os grandes responsáveis por perdas significativas no campo (Godoy & Oliveira, 2004), porém, a utilização global de agrotóxicos, procurando minimizar perdas e aumentar produtividade, passou a representar diferentes graus de ameaças à qualidade do ambiente e a saúde humana, uma vez que vem aumentando em uma escala preocupante (ABRASCO, 2015).

Embora o objetivo seja proporcionar aumento na produtividade, os principais herbicidas aplicados no campo são compostos sintéticos com alta atividade biológica, em sua grande maioria são tóxicos, podendo ocasionar câncer e mutações, além de serem utilizados em quantidades excessivas e em extensas áreas, com destino final de seus contaminantes o meio ambiente (CABRERA et al., 2008). Uma vez utilizados na agricultura, as suas moléculas podem seguir diferentes rotas no ambiente gerando em longo prazo prejuízos à saúde humana e alterações significativas nos ecossistemas que podem ser irreversíveis (BOHNER et al., 2013).

Os últimos anos foram marcados pelo aumento significativo do consumo de agrotóxicos em todo o mundo. No Brasil, a utilização dos agroquímicos expandiu-se na década de 70, e a partir de então o uso desses produtos químicos foi difundido em todo o país (ARAÚJO et al., 2007), sendo que o Brasil, ocupa desde 2008, o ranking do país onde mais se consome agrotóxicos no mundo (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SAÚDE COLETIVA, 2015). O fato de ser um país que se evidencia por apresentar uma economia baseada na agricultura, buscando aumentar produção e reduzir perdas na safra, o uso

desenfreado e abusivo de agrotóxicos levanta a problemática de se colocar em risco a saúde das pessoas expostas a essas substâncias, bem como o aumento de impactos ambientais (BURNS et al., 2001).

Além da contaminação das águas superficiais e subterrâneas dos solos, a aplicação excessiva dos agrotóxicos desencadeia tanto desequilíbrios ecológicos como biológicos, promovendo pressão agrícola e reduzindo a biodiversidade local da flora e da fauna e levando a instabilidade dos ecossistemas (SILVA et al., 2012; BELCHIOR et al., 2014). Portanto, muitos agrotóxicos podem influenciar de forma direta ou indireta na população da macro e microfauna (ZILLI et al., 2008).

Os agrotóxicos também são considerados um premente problema de saúde pública, uma vez que a população quase na sua totalidade se encontra exposta aos seus efeitos negativos de diferentes formas e níveis, incluindo os produtores e consumidores finais dos alimentos contaminados (GERAGE, 2016).

Além dos problemas citados, a intensa utilização dos agrotóxicos nas áreas agrícolas favorece ainda o aumento da pressão de seleção, contribuindo para a seleção de biótipos resistentes de algumas espécies espontâneas aos herbicidas convencionais, trazendo enormes prejuízos econômicos com seu manejo.

Desde a descoberta dos herbicidas, seu uso rotineiro e indevido no campo para o manejo de plantas espontâneas, vem acarretando o surgimento de resistência de biótipos por pressão de seleção a tais substâncias em algumas espécies. Essas plantas daninhas resistentes aos herbicidas são determinadas a partir de indivíduos que apresentam modificações genéticas dentro da mesma população. Essa resistência é notada quando as plantas apresentam capacidade de sobrevivência e propagação após a exposição a doses letais dos herbicidas convencionais (LEAL et al., 2012). Conseqüentemente, o emprego habitual de um mesmo herbicida ou de um conjunto de herbicidas com o mesmo mecanismo de ação tem aumentado a manifestação de populações daninhas resistentes.

Recentemente, no mundo foram reveladas 480 ocorrências de biótipos de plantas daninhas resistentes a herbicidas, sendo 251 espécies resistentes a 163 ingredientes ativos distintos, abrangendo 91 culturas distribuídas em 69 países (HEAP, 2017). Os primeiros casos de resistência a herbicidas no Brasil foram relatados com as espécies *Bidens pilosa* (picão-preto) e *Euphorbia heterophylla* (leiteiro), que apresentaram mecanismos de ação da enzima acetolactatosintase - ALS inibidos (AGOSTINETTO; VARGAS, 2014).

Em atenção a essa crescente problemática, uma mobilização para redução do uso de agrotóxicos vem se estabelecendo ao longo dos últimos anos e algumas ações em escala mundial tem repercutido a necessidade de mudanças.

-
- ✓ Em 2007 a agricultura orgânica foi recomendada como alternativa para o desenvolvimento sustentável na Conferência Internacional sobre Agricultura Orgânica e Segurança Alimentar, realizada pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (SCIALABBA, 2007).
 - ✓ Em 2009 e 2013 os documentos intitulados Trade and Environment Review foram lançados pela Conferência das Nações Unidas sobre Comércio e Desenvolvimento e promovem a minimização do uso de agrotóxicos a partir de diferentes formas de agricultura sustentável, baixo uso de insumos externos e manejo integrado de pragas, além de destacar a capacidade desse tipo de agricultura em promover uma melhor produção alimentar como capacidade de mitigar problemas alimentares em escala mundial (UNITED NATIONS CONFERENCE ON TRADE AND DEVELOPMENT, 2009; 2013).
 - ✓ Segundo a Agenda 2030, proposta pelo PROGRAMA DAS NAÇÕES UNIDAS PARA O DESENVOLVIMENTO, 2015, p. 192, espera-se, até 2020, alcançar o manejo ambientalmente adequado dos produtos químicos e de todos os resíduos, ao longo de todo o ciclo de vida destes, de acordo com os marcos internacionalmente acordados, e redução significativa da liberação destes para o ar, a água e o solo, para minimizar seus impactos negativos sobre a saúde humana e o meio ambiente.
 - ✓ No Brasil destaca-se a institucionalização da Política Nacional de Agroecologia e Produção Orgânica (PNAPO) em 2012, que tem o objetivo de integrar, articular e adequar políticas, programas e ações indutoras da transição agroecológica e da produção orgânica e de base agroecológica, contribuindo para o desenvolvimento sustentável e a qualidade de vida da população, por meio do uso sustentável dos recursos naturais e da oferta e consumo de alimentos saudáveis (BRASIL, 2012a, art. 1).

Essas iniciativas demonstram a necessidade da busca de alternativas ao uso de agroquímicos convencionais bem como os desafios dos órgãos de vigilância em saúde e ambiental para efetivação de medidas que mitiguem os danos causados pelo uso dos defensivos agrícolas (DIETRICH et al. 2011).

Várias publicações sobre o impacto dos agrotóxicos no meio ambiente e sobre a saúde humana estão disponíveis e buscam mostrar que a preocupação em substituir os defensivos agrícolas usuais por outros menos danosos é evidente (LOPES e ALBUQUERQUE, 2018). E dentre os agrotóxicos, os herbicidas foram os mais encontrados em águas doces brasileiras (ALBUQUERQUE et al., 2016). Agrotóxicos podem contaminar

diversos tipos de reservatórios de água (SOUZA et al., 2016) intervindo diretamente nos organismos aquáticos (VIEIRA et al., 2016).

É relatado que o uso de agrotóxicos pode promover redução na produção de alimentos, como a redução na produtividade de cenouras em região de aplicação de tembotriona, 8 meses antes do plantio (BONTEMPO et al., 2013). Resíduos de agrotóxicos podem permanecer em alimentos, como frutas, mesmo após colheita e disponibilizado para consumo em supermercados (JARDIM et al., 2014; NAKANO et al., 2016).

Trabalhadores de áreas de cultivo de tabaco podem apresentar danos nos mecanismos de defesa celular e atividade de telômeros (KARL et al., 2016), transtornos mentais (FARIA et al., 2014), sibilância (FIORI et al., 2015), doença do tabaco (FASSA et al., 2014), dores de cabeça, náuseas e dor de estômago (CARGNIN et al., 2017), depressão, ansiedade e mialgia (SANTOS et al., 2017). Além de relatos de maior chance de suicídio em trabalhadores expostos a agrotóxicos (KRAWCZYK et al., 2014). Inúmeros outros relatos podem ser encontrados na literatura descrevendo os efeitos danosos da ação de agrotóxicos na saúde.

A adoção de novas formas de manejo das plantas daninhas e da integração de métodos culturais, biológicos, mecânicos e físicos de controle são importantes para substituir ou até mesmo reduzir o uso de controle químico na agricultura convencional, uma vez que o uso indevido de herbicidas causa muitos problemas ao meio ambiente e ao homem (GALON et al., 2016).

Diante do exposto, a busca por herbicidas alternativos para o controle dos biótipos resistentes de plantas daninhas aos herbicidas comerciais é de suma importância, visto que essa resistência dificulta onerosamente o manejo delas. O uso de compostos naturais na elaboração de novos herbicidas, os chamados bio-herbicidas, que apresentem novos mecanismos de ação é uma das alternativas para diminuir o número de plantas resistentes (DAYAN; DUKE, 2014).

A aplicação de compostos semissintéticos, oriundos de compostos naturais com elevada atividade biológica é uma excelente alternativa para obtenção de bio-herbicidas com diferentes mecanismos de ação no manejo de plantas daninhas. Para obtenção desses bio-herbicidas, é necessário que seus derivados sejam eficazes no controle de plantas e que sejam facilmente obtidos a um baixo custo (SOUZA FILHO et al., 2006). Essas substâncias naturais têm que ser eficientes na sustentabilidade e na produtividade agrícola, sem ocasionar impactos à saúde e ao meio ambiente, diferentemente dos herbicidas sintéticos convencionais (VILA-AIUB et al., 2005).

5.2 Caracterização da espécie *Clusia fluminensis* Planch. & Triana

A família Clusiaceae Lindley (Guttiferae Juss.) possui ampla distribuição em regiões tropicais. De acordo com a classificação de Dahlgren (1980), esta família é constituída por 50 gêneros e cerca de 1.200 espécies. No Brasil, está representada por 19 gêneros com ampla distribuição, especialmente na região Amazônica (ANDRADE et al., 2002; GASPAROTTO JUNIOR, et al., 2005). No entanto de acordo com Stevens (2008), a família Clusiaceae compreende apenas 14 gêneros.

A família Clusiaceae possui várias espécies de valor econômico, com gêneros explorados pela indústria madeireira, gêneros portadores de propriedades medicinais comprovadas e de ampla aplicação ornamental (HUTCHINSON, 1969; ANDRADE, 1987).

A identificação das espécies do gênero *Clusia* é feita, normalmente, com base nas características dos órgãos reprodutivos, porém, as flores não mantêm suas características quando são armazenadas em coleções de herbários, além de perdurarem por um período curto de aproximadamente 15 dias apenas (PIPOLY et al., 1998).

O gênero *Clusia* representa o primeiro registro de uma árvore dicotiledônea com adaptação ao metabolismo ácido das crassuláceas (CAM) (TING et al., 1987), realizando tanto mecanismo C3 quanto CAM (FRANCO et al., 1994; ROBERTS et al., 1998; HERZOG et al. 1999), uma flexibilidade metabólica no processo fotossintético que possibilitou a dispersão geográfica característica do gênero (FRANCO et al., 1990).

Do ponto de vista químico a família apresenta-se caracterizada pela presença de xantonas, benzofenonas, terpenóides, flavonóides, dentre outras classes de metabólitos especiais, responsáveis por efeitos anti-hipertensivos, antibacterianos, inibitório do vírus HIV e antiofídico (CASTRO et al., 1999; GASPAROTTO JUNIOR, et al., 2005; NOLDIN et al., 2006). Estudos com este gênero têm demonstrado a produção de terpenóides e esteróides (lupenona, friedelina, sitosterol, entre outros) e algumas benzofenonas (weddelianona A, clusianona e spiritona) (NAGEN et al., 1993; PORTO et al., 2000).

Conhecida popularmente como abaneiro ou mangue-da-praia, a espécie *Clusia fluminensis* Planch. & Triana, pertencente à família Clusiaceae e gênero *Clusia*, tem como sinônimo heterotípico a nomenclatura *Clusia ildefonsiana* A. Rich. ex Planch. & Triana. Representa uma espécie nativa e endêmica do Brasil, sendo encontrada de forma mais ampla nos estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo e Bahia, é característica do bioma Mata Atlântica, apresentando-se em forma de arbustos ou árvores e geralmente pode alcançar de 2 a 3 metros de altura, é muito utilizada para fins de ornamentação (Figura 1) (BRASIL, 1999; PEREIRA e PUTZKE, 2010; SILVA e PAIVA, 2012; BITTRICH et al., 2015).

É uma planta dioica com características morfológicas que podem ser descritas como portadora de folhas opostas de pecíolo muito curto, lâmina obovada com ápice retuso e base cuneada decorrente, coriácea, discolor, glabra de margem inteira e um pouco revoluta e com uma nervura marginal, de 10 -14cm de comprimento por 5 – 7cm de largura, com nervação secundária muito discreta. Possui Inflorescências cimosas, geralmente terminais, com 2 – 6 flores unissexuais de pétalas brancas e estames ou carpelos alaranjados (Figura 1B) (MUSEU NACIONAL/UFRJ, c2020). Os frutos apresentam coloração esverdeada, com cápsulas contendo arilos, ricos em carotenóides, em seu interior, membranas de cor alaranjada onde as sementes encontram-se dispersas (CORREIA et al., 2013).



Figura 1: (A) Imagem de planta adulta de *Clusia fluminensis*; (B) flor de aberta de *Clusia flumineis*; (C) paisagismo de cerca viva de plantas adultas de *Clusia fluminensis*. Imagens retiradas da internet: (A) retirada de <<https://br.pinterest.com/>>. (B) retirada de <<https://www.flickr.com/>>. (C) retirada de <<https://www.mundoecologia.com.br/>>

Como qualquer planta ornamental, requerem poda regular. Os resíduos de poda, apesar de serem considerados de classe II, não são perigosos, segundo a norma técnica NBR 10.004/2004. Sendo assim, tais resíduos possuem menor potencial ofensivo ao meio

ambiente, porém, devido ao grande volume gerado e sua destinação final em aterros sanitários, gera-se a problemática dos riscos de incêndio, gerando poluição do ar e até mesmo da água além de degradação da paisagem (MEIRA, 2010). De posse do exposto, uma nova alternativa para tais resíduos seria muito eficiente e proveitosa, como a sugestão do uso de tais resíduos como matéria prima para estudos alelopáticos, como os que ocorrem com o intuito de obtenção de alternativa aos herbicidas convencionais, ou outros estudos como a obtenção de compostos antioxidantes e fotoprotetores (Figura 2).



Figura 2: Realização de podas e grande volume de resíduos, que, normalmente, tendem a ser destinados a aterros sanitários gerando impactos Fonte: < <https://m.vitoria.es.gov.br/noticia/cidade-mais-verde-acoes-de-paisagismo-jardinagem-e-poda-em-mais-de-40-bairros-32722>>. Acesso em 13/08/2020).

Quatro principais classes de metabólitos secundários são encontradas nesta família: biflavonóides, cumarinas, xantonas e, principalmente, benzofenonas que são biossintetizados como mecanismos de defesa da planta (ACUÑA; JANCOVSKI; KENNELLY, 2009). Os gêneros *Garcinia* e *Clusia* têm sido reportados como sendo as principais fontes de benzofenonas polipreniladas (KUMAR; SHARMA; CHATTOPADHYAY, 2013). Em Clusiaceae foram encontradas cerca de 40 estruturas de biflavonóides em diferentes gêneros e várias espécies desta família e têm sido investigados sua ação analgésica, antibacteriana, antiinflamatória, antinoceptiva, antioxidante, antiparasitária, antitumoral, citotóxica, imunomoduladora e hipolipidêmica, com resultados promissores na maioria dos casos (FERREIRA; DE CARVALHO; DA SILVA, 2012).

Quanto a composição química presentes em órgãos de *C. fluminensis*, Mazza et al. Identificaram em extratos dos arilos do fruto com sementes a presença de compostos fenólicos como os ácidos protocatecuico, 4-hidroxibenzoico e 4-hidroxicinâmico (*p*-cumárico), o flavonoide rhamnetina (7-metóxi-quercetina) e os carotenoides luteína, zeaxantina e-criptoxantina e um baixo teor de vitamina C (MAZZA et al., 2019). Em seu estudo com *C. fluminensis*, Silva isolou os terpenos 3-oxo-friedelina e epifriedelinol dos

extratos hexânicos de folhas e caules e ainda a benzofenona clusianona e o terpenoide lanosterol nos extratos hexânicos das flores. (SILVA,2011).

O gênero *Clusia* é considerado uma das principais fontes de benzofenonas em Angiospermas (KUMAR; SHARMA; CHATTOPADHYAY, 2013) e estes metabólitos secundários são considerados os marcadores químicos do gênero. Até o ano de 2014 (ANHOLETI et al., 2015), foram catalogadas 55 benzofenonas em *Clusia*, distribuídas em flores, frutos, caule, galhos e folhas. A maior parte destas estruturas foi isolada dos frutos (35 estruturas), flores e caule e podem ser encontradas em mais de um órgão vegetal. Outras classes de compostos como terpenos, benzoquinonas, flavonóides, derivados dihidrofenantrênicos e ácidos tocotrienólicos também são encontrados em espécies deste gênero (DE ANDRADE; ALMEIDA; CONSERVA, 1998).

5.3 Metabolismo secundário e alelopatia

Caracterizado como o conjunto de reações que possibilitam o processamento das moléculas orgânicas, por meio de atividade enzimática, o metabolismo, que se processa no interior de células vivas, representa o meio pelo qual promove-se o abastecimento energético e renovação de moléculas, levando a manutenção de um estado biológico equilibrado (MARZZOCO e TORRES, 2007).

Em vegetais as reações que caracterizam o metabolismo se estabelecem em rotas metabólicas específicas, direcionadas por enzimas específicas, sempre com o intuito de promover as necessidades gerais celulares, abastecendo as células com compostos como celulose, lignina, lipídios, proteínas, glicídios, entre outros, relacionados a funções vitais , sendo designado, neste caso, como metabolismo primário (CHAMPE et al., 2008). Quando relacionado a produção de substâncias que se apresentam em baixas concentrações, restritos a determinados grupos de plantas, geralmente de estrutura complexa, baixo peso molecular, possuem atividades biológicas marcantes, porém, não ligadas as funções vitais básicas do vegetal, passa a ser designado metabolismo secundário (BERG e LUBERT, 2008).

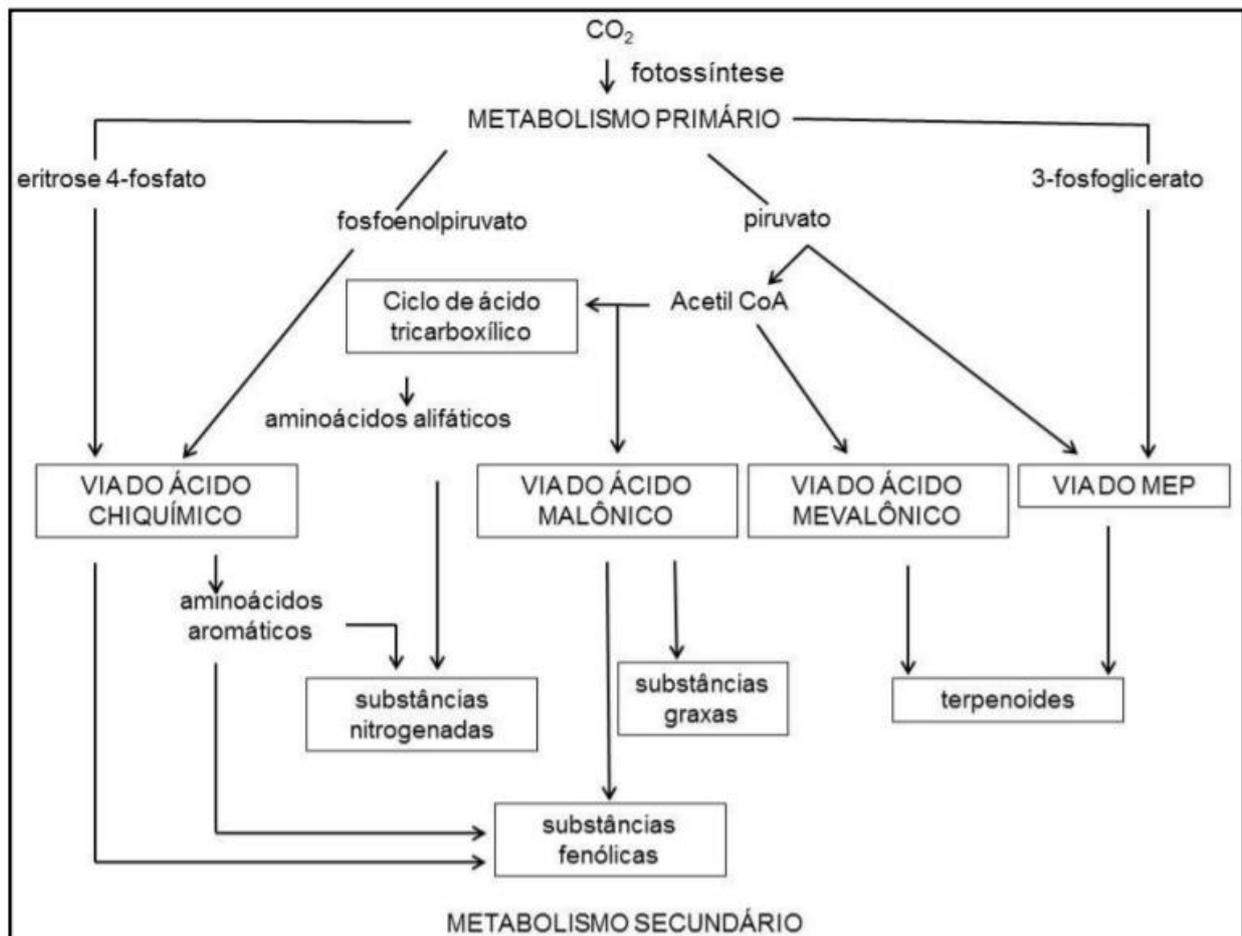


Figura 3: Esquema geral simplificado da interação entre o metabolismo primário e as vias de síntese do metabolismo secundário (Fonte: Taiz & Zeiger, 2009).

Os compostos produzidos pelo metabolismo secundário são designados metabólitos secundários ou metabólitos especializados e já foram considerados como produtos de excreção vegetal, porém, é atualmente reconhecido que se tratam de compostos diretamente envolvidos nos mecanismos que permitem a adequação do vegetal ao seu meio, despertando grande interesse, não só pelas atividades biológicas exercidas pelas plantas em resposta ao meio, mas também pela imensa importância comercial na área farmacêutica, nas áreas alimentar, agrônômica, perfumaria e outras (SIMÕES et al., 2007). Tais compostos, também designados aleloquímicos, podem ser liberados pelos vegetais que os produziram no meio ambiente, interferindo no desenvolvimento de outras espécies (OLIVEIRA et al., 2015). A liberação ocorre por meio da volatilização, lixiviação, exsudação radicular e pela decomposição de resíduos vegetais, podendo exercer influência positiva ou negativa sobre outro organismo (BORELLA & PASTORINI, 2009).

A influência exercida pelos aleloquímicos introduz o conceito de alelopatia, que pode ser definida como um processo pelo qual as plantas produzem substâncias que, liberadas no meio ambiente, influenciam de forma favorável ou desfavorável o desenvolvimento das

plantas (SANTOS, 2012). O termo alelopatia foi cunhado por Molisch (1937) e significa do grego *allelon* = de um para outro, *pathós* = sofrer. Descreve a influência de um indivíduo sobre o outro, seja prejudicando ou favorecendo o segundo, e sugere que o efeito é realizado por biomoléculas (aleloquímicos) produzidas por uma planta e lançadas no ambiente, seja na fase aquosa do solo ou substrato, seja por substâncias gasosas volatilizadas no ar que cerca as plantas terrestres (RIZVI et al., 1992). Em 1984, Rice definiu a alelopatia como: “qualquer efeito direto ou indireto danoso ou benéfico que uma planta (incluindo microrganismos) exerce sobre outra pela produção de compostos químicos liberados no ambiente”.

Estudos alelopáticos se diferenciam de estudos de fitotoxicidade nos procedimentos empregados na extração de compostos ativos. Um estudo de alelopatia é conduzido com substâncias químicas extraídas de tecido vegetal usando métodos naturais, como lixiviação, exsudação e liberação através da deterioração da matéria vegetal, ou mesmo a vaporização; ou com aleloquímicos extraídos em condições de laboratório que replicam um processo natural, como extração aquosa de tecido vegetal que foi esmagado ou decomposto, simulando até certo ponto a ação da chuva e orvalho em partes das plantas na natureza. Em contrapartida, um estudo de fitotoxicidade é aquele que é realizado com substâncias extraídas do tecido vegetal através de qualquer procedimento químico ou físico-químico não natural, por exemplo, através do uso de solventes orgânicos, como hexano, diclorometano e metanol, ou utilizando tecnologias para extrair compostos bioativos de plantas, como métodos de extração ultrassônica, Soxhlet e de alta pressão, com o objetivo de maximizar a solubilidade de substâncias química (REIGOSA et al., 2013).

A atividade dos aleloquímicos tem sido usada como alternativa ao uso de defensivos agrícolas diversos (WALLER, 1999). Como grande parte da produção agrícola desenvolve-se utilizando herbicidas que trazem grandes prejuízos ao meio ambiente e ao homem, entende-se que o desenvolvimento de novas tecnologias para o controle de ervas daninhas baseadas em compostos naturais de origem vegetal passa a apresentar uma importância significativa (GAALICHE et al., 2017).

Para os estudos com alelopatia, os bioensaios costumam utilizar sementes de organismos-teste como alface (*Lactuca sativa*), por serem altamente sensíveis às diferentes concentrações de aleloquímicos, mesmo que estas sejam baixas, por terem germinação rápida, em aproximadamente 24h, possibilitando obtenção de respostas em curto período experimental, além de crescimento linear e ampla tolerância às variações de pH (MAIRESSE et al., 2007, STEIN et al., 2008).

Para que seja indicada como planta teste, a espécie deve apresentar germinação

rápida e uniforme, e um grau de sensibilidade que permita expressar os resultados sob baixas concentrações das substâncias alelopáticas (GABOR e VEATCH, 1981; Ferreira & Áquila, 2000), sendo a alface e o capim colonião duas espécies abrangentes quanto ao uso em pesquisas como plantas teste.

É fato que a resistência ou tolerância aos metabólitos secundários é uma característica espécie-específica, estando a alface (*Lactuca sativa* L.) entre as mais sensíveis e, por isso, boa indicadora de atividade alelopática. Já o capim colonião (*Panicum maximum*) é considerada uma daninha invasora agressiva que, além de causar danos às reservas naturais, prejudica culturas como a da cana de açúcar (KISSMANN, 1997), o que torna necessário estudos de combate às gramíneas africanas, como o capim colonião, no País utilizando diferentes técnicas de controle tais como a aplicação de herbicidas e o controle biológico (PIVELLO, 2008).

Pesquisas aplicadas à alelopatia têm sido motivadas pelo desejo crescente de substituir os insumos químicos sintéticos nos agroecossistemas por materiais produzidos naturalmente, visto que os resultados destas pesquisas podem ser utilizados para melhorar a sustentabilidade de sistemas de produção e a conservação da vegetação natural, pois representam uma alternativa biológica com ação específica e menos prejudicial ao meio ambiente (TUR et al., 2010). Vários estudos têm relatado espécies vegetais com potencial alelopático que podem servir de instrumento em manejos ecológicos, sendo uma alternativa ao uso intensivo de herbicidas sintéticos (KREMER et al., 2016; ROCHA et al., 2016).

5.4 Aleloquímicos

Os compostos químicos liberados pelas plantas ou microrganismos no ambiente e que causam efeitos benéficos ou deletérios sobre outras plantas ou microrganismos são denominados de substâncias alelopáticas, agentes aleloquímicos ou simplesmente aleloquímicos, ou produtos secundários (CARVALHO, 1993). Quando o composto liberado causa somente efeitos prejudiciais, recebe também o nome de fitotoxina. Esses compostos podem ser produzidos em qualquer parte das plantas e a sua concentração varia de espécie para espécie e, numa mesma espécie, de acordo com a parte da planta e o seu estágio de desenvolvimento. (RODRIGUES et al., 1993).

Entre os agentes alelopáticos, existem mais de 300 compostos secundários vegetais e microbiológicos pertencentes a muitas classes de produtos químicos (RICE, 1984) e esse número continua aumentando com a realização de novas pesquisas. Todas as plantas produzem metabólitos secundários e a variação na sua quantidade e qualidade varia de acordo com a espécie e com o local de cultivo, pois muitos deles têm sua síntese

desencadeada por eventuais inconstâncias a que as plantas estão expostas (FERREIRA e ÁQUILA, 2000).

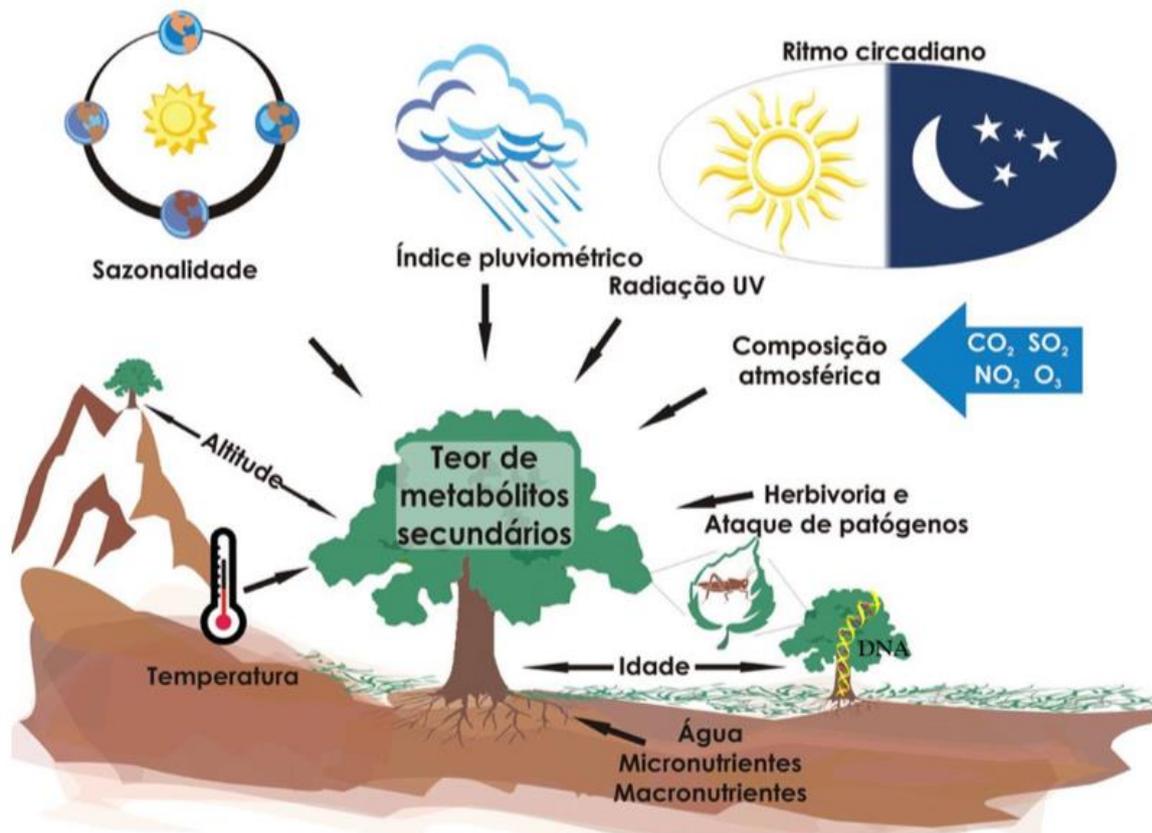


Figura 4: Principais fatores que influenciam a produção e acúmulo dos metabólitos secundários (Fonte: Adaptado de Gobbo-Neto e Lopes, 2007).

De acordo com a estrutura química que apresentam, os metabólitos secundários que funcionarão como aleloquímicos podem ser classificados em diferentes categorias químicas, sendo os Terpenos (óleos essenciais, triterpenos, saponinas e glicosídeos), os compostos fenólicos (ligninas, flavonoides e taninos) e os alcaloides (compostos nitrogenados) os três grupos principais, cuja base para sua síntese são o ácido chiquímico e o acetato, sendo provenientes da glicólise, ciclo de Krebs e ciclo das pentoses-fosfato, que são rotas biossintéticas do metabolismo vegetal (SIMÕES et al., 2017). Como observado na figura 3, estas vias sempre terão ligação com o metabolismo primário.

Segundo Rice, (1984) a diversidade de compostos orgânicos identificados como aleloquímicos é grande, sendo eles produzidos por plantas e micro-organismos diversos, sendo os principais exemplos: ácidos orgânicos solúveis em água, álcoois de cadeia reta, aldeídos alifáticos e cetonas; ácidos cítrico, málico, acético e butírico; metanol, etanol e acetaldeído; Lactonas insaturadas simples (patulina e ácido parasórbico); Ácidos graxos de cadeia longa e poliactilenos (oléico, esteárico, mirístico e agropireno); Naftoquinonas,

antraquinonas e quinonas complexas (julglona, tetraciclina e aureomicina); Fenóis simples, ácido benzóico e derivados (ácido gálico, vanílico e hidroquinona); Ácido cinâmico e derivados (ácido clorogênico e ferúlico); Cumarinas (escopoletina e umbeliforona); Flavonóides (quercitina, florizina e catequina); Taninos condensados e hidrolisáveis (ácidos elágico e digálico); Terpenóides e esteróides (cineole, cânfora e limoneno); Aminoácidos e polipeptídeos (marasmina e victorina); Alcalóides e cianoidrinas (estriquinina, atropina, codeína, cocaína e amidalina); Sulfetos e glicosídeos (sirigrina e alilisotiocianato); Purinas e nucleosídeos (cordicepina, teofilina e paraxantina).

As substâncias alelopáticas liberadas por uma planta poderão afetar o crescimento, prejudicar o desenvolvimento normal e até mesmo inibir a germinação das sementes de outras espécies vegetais (SILVA, 1978). Para que os efeitos alelopáticos sejam aceitos, há a necessidade de que um inibidor químico de atividade efetiva seja produzido em uma concentração que exerça efetividade no solo, além de se comprovar que a inibição exercida não seja promovida por atividade competitiva da planta por alguns fatores abióticos (ex.: luz, água e nutrientes) ou bióticos (ex.: atividade animal) (WHITTAKER e FEENY, 1971).

5.5 Atividade Antioxidante

A ocorrência contínua de atividade metabólicas nas células leva, naturalmente, à geração radicais livres, que atuam como mediadores de transferência de elétrons nas mais variadas reações do metabolismo, e sua produção, em proporções adequadas, possibilita a realização de atividades biológicas fundamentais para o metabolismo celular, porém, a produção excessiva pode conduzir a danos oxidativos (SHAMI e MOREIRA, 2004).

Dentre os metabólitos especializados dos vegetais destaca-se a classe dos compostos fenólicos (PICHESKY & LEWINSOHN, 2011), em especial os flavonoides, ainda pouco reconhecido com potencial alelopáticos uma vez que seus mecanismos de ação são pouco evidenciados (EINHELLIG, 2004), porém, portadores de atividade antioxidante comprovada, isso pois possuem propriedades de óxido-redução, incluindo o sequestro e neutralização dos radicais livres, assim como, atividade quelante de oxigênio tripleto e singleto, ou decompositora de peróxidos (CAO et al., 1997; DORNAS et al., 2007; HAMINIUK et al., 2012; DEGASPARI & WASZCZYNSKYJ, 2004). Outros compostos como vitaminas (C, E, A), carotenoides e alguns polifenóis, também são importantes antioxidantes (OLIVEIRA et al., 2009).

Quando plantas se encontram em condições adversas para o desenvolvimento, pode ocorrer produção excessiva de moléculas que contém oxigênio reativo, conhecidas como espécies reativas de oxigênio (EROS), que tendem a se acumular promovendo o estresse

oxidativo gerador do dano oxidativo, tendo como consequência a ocorrência de lesões de estruturas celular, gerando disfunções metabólicas (DEMIDCHIK, 2015).

Reconhecidas como moléculas que danificam estruturas celulares e macromoléculas, podendo levar a morte celular (GILL e TUTEJA, 2010; MURSHED, LOPEZ-LAURI e SALLANON, 2013), as EROS são compostos conhecidos por apresentarem um ou mais átomos de oxigênio reativo, entre os quais podem ser citados o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxila (OH^\bullet), o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o oxigênio singlete (1O_2) (AHMAD et al., 2010). Podem ser formadas, quando a planta está sob condições de estresse, em diferentes compartimentos celulares como os peroxissomos, mitocôndrias e cloroplastos, sendo estes dois últimos os responsáveis pela maior produção destes compostos, principalmente devido à fuga de elétrons que ocorre na cadeia transportadora de elétrons (ASADA, 2006; MURPHY, 2009). Porém, é importante atentar que as EROs exercem importante papel como moléculas sinalizadoras e reguladoras de genes em plantas submetidas a estresses abióticos (DRIEDONKS et al., 2015; MOLASSIOTIS e FOTOPOULOS, 2011).

Em resposta a produção contínua de EROs e com o objetivo de manter os níveis intracelulares desses agentes de modo prevenir a ocorrência de eventuais danos decorrentes da presença de tais radicais, houve a evolução de mecanismos de proteção antioxidante (Shami e Moreira, 2004; Bianchi e Antunes, 1999), com a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres ou das espécies reativas não-radicaais, o que pode ocorrer por impedimento da ação desses, por meio do impedimento da formação dos radicais livres ou espécies não-radicaais ou favorecendo o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas (KOURY e DONANGELO, 2003; CLARKSON e THOMPSON, 2000).

Os agentes antioxidantes podem ser definidos como compostos bioativos que eliminam efetivamente radicais livres, retardam ou previnem significativamente o início ou a propagação da cadeia de reações de oxidação, inibindo reações de lipoperoxidação, de oxidação de outras moléculas, como proteínas, DNA, além de manter a estrutura e funções celulares evitando ainda outros danos oxidativos, mesmo estando em pequenas concentrações quando comparado ao substrato oxidável (ZOU et al., 2016; HALLIWELL, 1995).

Os antioxidantes são compostos que atuam como protetores celulares da ação danosa dos radicais livres, que podem ser produzidos de forma natural nos sistemas biológicos, como produto do metabolismo no organismo, ou ainda por fatores externos físicos ou químicos, por exemplo a radiação, o contato com substâncias tóxicas, entre

outros (BIANCHI e ANTUNES, 1999) e se a produção de radicais livres supera a capacidade antioxidante em um sistema vivo, danos estruturais e/ou funcionais nas células, enzimas e material genético podem ser estabelecidos, pois as espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio podem reagir com lipídios, proteínas e com o DNA (BARREIROS, et al., 2006).

De acordo com o mecanismo de ação que apresentam, os sistemas de defesa antioxidante podem ser não enzimático ou enzimático, possuindo, três critérios de classificação: o mecanismo de ação, diferenciando os antioxidantes em preventivos, de interceptação e de reparo; a localização orgânica do antioxidante, diferenciando-os em intracelulares e extracelulares; e sua procedência, podendo ser endógenos ou exógenos. (BASTOS et al., 2014).

O sistema de defesa enzimático envolve algumas enzimas, como a Superóxido Dismutase (SOD), a Catalase (CAT) e a Peroxidase (POX), que atuam criando mecanismos de prevenção que impedem ou controlam a formação dos radicais livre de espécies reativas não-radicaís que estejam relacionados com as reações que levam a iniciação e amplificação do processo que gera o dano oxidativo (SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004; FERREIRA e MATSUBARA, 1998). O sistema não enzimático lança mão da utilização de compostos do metabolismo primário e secundário portadores de estrutura compatível com atividade antioxidante, dentre os quais pode-se citar o ácido ascórbico, os tocoferóis, os carotenóides e os compostos fenólicos, que em conjunto ao sistema enzimático promovem a proteção antioxidante em situações de estresse (DEMIDCHIK, 2015; GILL e TUTEJA, 2010).

São diversas as pesquisas que identificaram e comprovaram a existência de antioxidantes naturais de origem vegetal, com compostos bioativos provenientes do metabolismo secundário das plantas (ROCHA, SARTORI, NAVARRO, 2016; SILVA, SANTOS, CAVALCANTE, 2016) que possam atuar sozinhas ou sinergicamente com outros aditivos; que funcionem como alternativa para prevenir a deterioração oxidativa em substituição aos convencionais sintéticos (MELLO E GUERRA, 2002).

Dentre os compostos antioxidantes mais ativos nos vegetais e encontrados com maior frequência, estão os compostos fenólicos (BIANCHI e ANTUNES, 1999), que podem ser classificados em dois grupos, flavonóides e não flavonoides (KARAKAYA, 2004).

Os compostos fenólicos são caracterizados como antioxidantes naturais e têm recebido muita atenção devido ao seu papel na neutralização ou eliminação de radicais livres (SPENCER et al. 2008), uma vez que sua estrutura permite a doação de um próton a um radical livre, interrompendo o mecanismo de oxidação. Por esse motivo, os derivados

fenólicos são transformados em radicais livres, no entanto, esses radicais podem ser estabilizados sem promover ou propagar reações (RAMALHO e JORGE 2006). Os flavonoides e os ácidos fenólicos são classificados como antioxidantes mistos (RAMALHO e JORGE 2006) porque são capazes de doar prótons aos radicais livres e ainda são capazes de impedir a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), seja pela inibição de enzimas envolvidas no processo ou quelando vestígios de metal envolvidos em sua produção (PIETTA 2000). Os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células, sendo assim, quando há limitação na disponibilidade de antioxidantes podem ocorrer lesões oxidativas de caráter cumulativo (ANHOLETI et al., 2015).

Existem diversos métodos para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de substâncias biologicamente ativas, envolvendo desde ensaios químicos com substratos lipídicos a ensaios mais complexos utilizando as mais diversas técnicas instrumentais (SANCHES, 2002). Estes testes têm se tornado ferramentas usuais e extremamente necessárias na seleção inicial de substâncias antioxidantes em folhas, frutas, legumes e bebidas, ente outros materiais biológicos de origem vegetal (ALVES et al., 2010).

Devido aos diferentes tipos de radicais livres e as suas diferentes formas de atuação nos organismos vivos, dificilmente existirá um método simples e universal pelo qual a atividade antioxidante possa ser medida precisa e quantitativamente. Assim, a busca por testes mais rápidos e eficientes tem gerado muitos métodos para avaliar a atividade de antioxidantes naturais pelo uso de uma grande variedade de sistemas geradores de radicais livres (ALVES et al., 2010).

Uma grande gama de testes que visam avaliar a atividade antioxidante *in vitro* foram desenvolvidos e têm se tornado ferramentas essenciais para que pesquisadores possam avaliar substâncias biologicamente ativas isoladas de produtos naturais ou até mesmo sintéticas. Os métodos de análise de antioxidantes também se tornam úteis em pesquisas que permitam selecionar espécies vegetais promissoras para análise química e farmacológica, bem como identificar compostos antioxidantes em alimentos e bebidas (ALVES et al., 2010).

O teste de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) é um dos métodos indiretos para se determinar a atividade antioxidante mais antigo sendo sugerido originalmente em 1950 para se descobrir os doadores de hidrogênio em matérias naturais. Mais tarde foi quantificado para determinar o potencial antioxidante de compostos fenólicos isolados e alimentos tão bem como amostras biologicamente relevantes (ROGINSKY; LISSI, 2005). Uma característica desse método é que ele não envolve condições drásticas de temperatura e

oxigenação (SILVA et al, 1999). O DPPH pode reagir com compostos fenólicos, bem como com ácidos aromáticos contendo apenas um grupamento (SANTOS et al, 2007).

O método de DPPH. é muito utilizado para se determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas como: compostos fenólicos (SOUSA et al, 2007), fenilpropanóides, fenólicos totais, flavonóis (LEJA et al, 2007), cumarinas (VOGEL et al, 2005), quitosana com diferentes pesos moleculares (Kim; Thomas, 2006), antocianinas, antocianidinas (LEJA et al, 2007; DE LIMA et al, 2007), carotenóides (AJILA et al, 2007), rutina, kaempferol (SILVA et al, 2005).

Esse método consiste em avaliar a capacidade antioxidante via atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila – DPPH. O radical DPPH. possui coloração púrpura absorvendo a um comprimento de onda máximo de aproximadamente 516 nm. Por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R.), o DPPH. é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional. O DPPH apresenta-se como um método simples podendo também ser usado para avaliar a atividade antioxidante de formas sintéticas (ex: nimesulida, dapsona e ácido acetilsalicílico), algas, quitosanas, etc., mas por ser um método colorimétrico não é muito aplicado para substâncias coloridas devido a interferências por pigmentos (CHANDRASEKAR et al, 2006; KIM; THOMAS, 2006; RAYMUNDO et al, 2004).

Um dos métodos mais utilizados para medir a atividade antioxidante é através da captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6- ácido sulfônico) (ABTS^{•+}), que pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática. Com essa metodologia, pode-se medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (KUSKOSKI et al, 2005). A ideia do método é monitorar o decaimento do cátion-radical ABTS^{•+}, produzido pela oxidação do ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiaziline-6-sulfonate), gerado pela adição de uma amostra contendo antioxidantes. Na ausência de fenóis, ABTS^{•+} é estável, mas reage energeticamente com um doador de átomo de hidrogênio, como fenóis, sendo convertido em uma forma não colorimétrica do ABTS. Os autores determinam a quantidade de ABTS^{•+} consumida devido à reação deste com a amostra contendo fenóis, sendo expressa em Trolox equivalente. A vantagem do método está na sua relativa simplicidade o que permite sua aplicação em rotinas de laboratório (STRATIL, et al., 2006; SURVESWARAN, et al., 2007; PICCINELLI, et al., 2004).

O ensaio FRAP (ferric reducing antioxidant power) (BENZIE, et. al, 1996) está baseado na capacidade dos fenóis em reduzir o Fe^{3+} em Fe^{2+} . Quando isto ocorre, na presença de 2,4,6-tripiridils-triazina (TPTZ), a redução é acompanhada pela formação de um complexo corado com o Fe^{2+} . O ensaio é expresso em ácido ascórbico equivalente. Apesar de ser um método relativamente simples, também é muito utilizado (STRATIL, et al., 2006; SURVESWARAN, et al., 2007; AABY, et. al, 2004).

O método baseado na redução do complexo de fosfomolibdênio, por Prieto e colaboradores (1999), fundamenta-se na redução do molibdênio (VI) a molibdênio (V) na presença de substâncias antioxidantes e resulta na formação do complexo de fosfomolibdênio (verde/azul) (BALESTRIN, 2006; BORA et al., 2005).

Devido aos diversos tipos de radicais e aos diferentes alvos de oxidação, dificilmente haverá um único método capaz de representar de forma segura e precisa a real atividade antioxidante de um composto. Para uma avaliação correta desta atividade em alimentos e sistemas biológicos, modelos individuais devem ser desenvolvidos desde que representem as mesmas condições químicas, físicas e ambientais esperadas para o sistema em análise (ALVES et al., 2010).

Como os tipos de radicais livres são diferentes nos organismos vivos e o modo de ação é diferente, é improvável que exista um método simples e versátil para medir com precisão e quantitativamente a atividade antioxidante. Portanto, a busca por testes mais rápidos e eficientes levou a uma variedade de métodos para avaliar a atividade de antioxidantes naturais usando uma variedade de sistemas geradores de radicais livres (ALVES et al., 2010).

5.6 Atividade Fotoprotetora

A luz solar é composta por espectro contínuo de radiação eletromagnética, que, de acordo com o intervalo de comprimento de onda (λ) que se apresenta, pode ser radiação ultravioleta (UV), com comprimento de onda variando entre 100 e 400nm e representado cerca de 5% da radiação, luz visível, com comprimento de onda entre 400 e 780nm e representando cerca de 39% da radiação, e infravermelho, com comprimento de onda maior que 780nm e representando cerca de 56% da radiação. Além disso, a radiação UV é subdividida, tradicionalmente em UVC (100-290 nm), UVB (290-320 nm) e UVA (320-400 nm). Por sua vez, a radiação UVA é classificada em UVA1 (340-400 nm) e UVA2 (320-340 nm). (GONZÁLEZ et al., 2008; PALM e O`DONOGHUE, 2007; SVOBODOVA et al., 2006).

Os raios UVA apresentam espectro de ação mais longos, sendo pouco absorvidos pelo O_3 (ozônio) estratosférico podendo causar queimaduras em exposição solar em

excesso (KHURY, 2010). A radiação UVB é absorvida de forma eficiente pelo ozônio estratosférico, apresenta uma importância biológica na síntese de vitamina D no organismo, entretanto, devido a sua elevada energia causam danos agudos e crônicos à pele, tais como manchas, queimaduras, descamação e câncer de pele (ARAÚJO, 2008). Os raios UVC são os mais energéticos e conseqüentemente os mais lesivos aos seres vivos, porém são retidos, devido à absorção pelo oxigênio e pelo ozônio, na estratosfera, não chegando a superfície terrestre (MELO, 2015).

A radiação ultravioleta pode causar danos na vegetação, direta ou indiretamente, por meio da formação de radicais livres, pode provocar danos ao DNA e aos fotossistemas, prejudicando assim a fotossíntese (LI et al. 2013). Em alguns estudos obtiveram-se indícios que o UVB pode aumentar os níveis de clorofila, mas também se observaram que afeta negativamente a fotossíntese nas espécies em todo o reino vegetal, (ZISKA et al., 1996; MARK e TEVINI 1997; HAO et al, 2000).

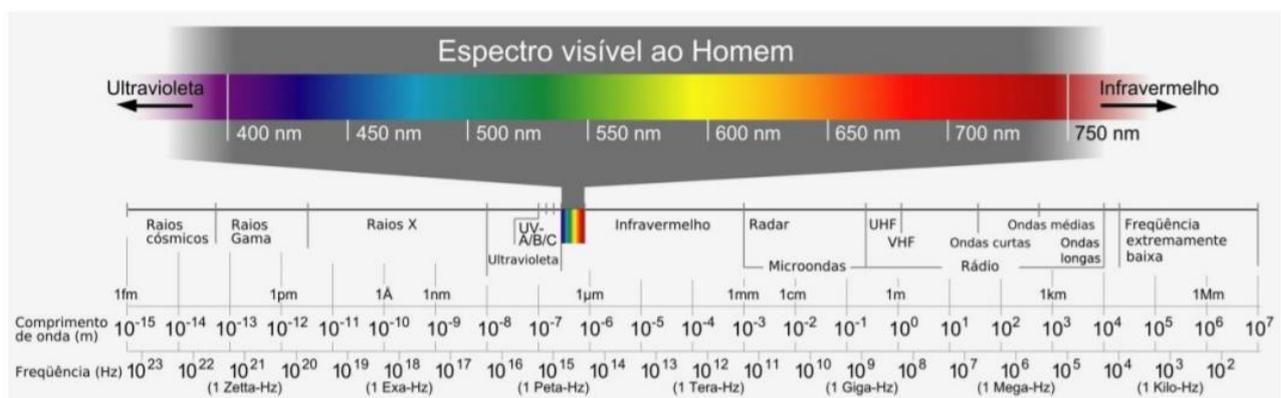


Figura 5: Representação do espectro eletromagnético, com destaque para a região do espectro visível (figura obtida do site <http://www.sbfisica.org.br/>, acesso em 07/08/2020).

Apesar da radiação solar ser um pré-requisito para vida, a luz solar pode causar efeitos extremamente nocivos à saúde humana. Mesmo não possuindo a capacidade de penetrar profundamente no organismo a exposição inadequada e sem proteção aos raios solares atinge a pele, olhos e mucosas, contribuindo para o aumento do risco de câncer de pele, foto envelhecimento e doenças oftalmológicas, além de afetar o sistema imune (POMPEU et al., 2013), pode causar inflamações, queimaduras, até mutações gênicas e disfunções celulares (FLOR et al., 2007).

Entre os mecanismos naturais para evitar ou neutralizar os efeitos nocivos da radiação ultravioleta podemos citar a produção de tricomas, folhas mais espessas, aumento do teor de alguns compostos, principalmente fenóis que absorvem a radiação UV, impedindo a penetração de radiação UV. Também pode ocorrer maior produção de

flavonóides para proteção das plantas contra esta radiação, isso foi relatado para muitas espécies (DEMKURA et al., 2010, 2012).

Devido aos problemas causados pela radiação solar, tem havido um interesse crescente no desenvolvimento de fotoprotetores baseados em produtos naturais. O uso de materiais vegetais com atividade fotoprotetora ou fator protetor solar aprimorado é um objetivo interessante da pesquisa e, uma vez demonstrada a atividade de absorção, a eficácia do produto pode ser melhorada. (NASCIMENTO et al., 2009). Nesse caso, acredita-se que os níveis de flavonóides e outros metabólitos fenólicos sejam importantes para as plantas resistirem aos raios UV (SOUZA et al., 2005).

É reconhecido que o teor de flavonóides produzidos por uma planta é considerado fator importante de proteção para as plantas contra a radiação ultravioleta já que atuam dissipando a energia UV absorvida de uma maneira inofensiva (Markhan et al., 1998), sendo que o espectro de absorção ultravioleta de um flavonóide mostra, em geral, um pico máximo de absorção entre 240-280 nm e outro a 300-550 nm, o que mostra a possibilidade de uso de extratos ricos em flavonóides como filtros solares em preparações fotoprotetoras (Bobin et al., 1995). A presença de taninos também identifica um potencial na absorção da radiação UV (SANTANA et al., 2001).

Os alcalóides são compostos nitrogenados farmacologicamente ativos e uma possível função dessas substâncias seria a proteção contra a radiação ultravioleta, devido ao fato de, em sua maior parte, serem compostos com núcleos aromáticos altamente absorventes dessa radiação (HENRIQUES et al., 2000).

Diversos trabalhos demonstraram que as plantas que absorvem na região ultravioleta apresentam em sua composição complexa, diferentes moléculas, destacando-se metabólitos especiais como os flavonóides, taninos, antraquinonas, alcalóides e os polifenóis (BOBIN et al., 1994; HENRIQUES et al., 2000; FALKENBERG et al., 2000; ZUANAZI, 2000; GOOSSENS & LEPOITTEVIN, 2003; SOUZA et al., 2005; DI MAMBRO e FONSECA 2006).

Diversas moléculas na pele podem absorver a radiação UV e sofrer alterações químicas devido a essa absorção, sendo DNA uma das principais moléculas que absorve a radiação UV, podendo sofrer mutações que, posteriormente, podem resultar em transformações malignas da célula (MAVERAKIS et al., 2010), e a fotoproteção se mostra como um elemento profilático e terapêutico frente aos efeitos danosos da radiação UV (GONZALES et al., 2008).

A linha de defesa contra estes efeitos nocivos envolve a utilização dos fotoprotetores, que podem ser compostos de vários filtros UV, incluindo filtros inorgânicos (bloqueadores

físicos) e orgânicos (absorvedores químicos), com eficácia prevista por meio de metodologias *in vitro* e *in vivo* que predizem o valor de fator de proteção solar (FPS), relacionado basicamente à radiação UV-B (MAIER E KORTING, 2005; SHEU et al., 2003).

De acordo com sua estrutura química os filtros químicos sintéticos, apresentam a absorção máxima em regiões diferentes. Sendo assim os que absorvem no comprimento de ondas compreendido entre 290 a 320nm são considerados filtros solares UVB e os que tendem em absorver entre 320 a 400nm, são denominados filtros solares UVA (AIKENS, 2006). Esta mesma relação é feita para os filtros solares vegetais (GOOSSENS & LEPOITTEVIN, 2003). Portanto, as plantas que absorvem na região UV, apresentam em sua composição, moléculas ativas semelhantes aos filtros químicos sintéticos (RANCAN et al. 2002).

Uma alternativa para combater os danos causados pela radiação UV é a busca por moléculas com potencial antioxidante e fotoprotetor (OLIVEIRA-JUNIOR E ALMEIDA, 2013), sendo assim, as plantas surgem como grandes candidatos para obtenção de produtos que possam exercer as requisitadas atividades, até mesmo pelo fato de serem portadoras de grande diversidade de compostos fenólicos, especialmente flavonóides, que são comumente utilizados para incorporação de fórmulas cosméticas (OLIVEIRA-JUNIOR et al., 2013), que utilizam fotoprotetores como principal abordagem contra os efeitos danosos da radiação UV, exatamente devido a presença de moléculas ou complexos moleculares que podem absorver, refletir ou dispersar a radiação UV (PALM e O`DONOGHUE, 2007).

5.7 Referências Bibliográficas

ABRASCO - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SAÚDE COLETIVA. Dossiê ABRASCO: Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. RJ/SP: Editora e Papéis Nova Aliança, 2015. 624 p.

ACUÑA, U.M.; JANCOVSKI, N.; KENNELLY, E.J. Polyisoprenylated benzophenones from Clusiaceae: potential drugs and lead compounds. *Current topics in medicinal chemistry*, v. 9, n. 16, p. 1560–1580, 2009.

AGOSTINETTO, D.; VARGAS, L. (Ed.). Resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil. Pelotas: Editora UFPel. 2014. p. 9-32.

AGROTÓXICOS aplicados no ES em um ano matariam a população capixaba onze vezes. *Século Diário*, Espírito Santo, 09 de fev. de 2020. Disponível em: <<https://www.seculodiario.com.br/meio-ambiente/agrotoxicos-aplicados-no-es-em-um-ano-matariam-a-populacao-capixaba-onze-vezes>>. Acesso em: 27/08/2020.

AHMAD, P.; JALEEL, C.A.; SALEM, M.A.; NABI, G.; SHARMA, S. Roles of enzymatic and non-enzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 30, n. 3, p. 161-175, 2010.

AIKENS P. Nanomateriais proporcionam proteção solar de amplo espectro. *Cosmet Toiletries* 18: 60-64. 2006

ALBUQUERQUE A.F., RIBEIRO J.S., KUMMROW F., et al. Pesticides in brazilian freshwaters: a critical review. *Environ. Sc. Processes Impacts*. [internet]. 2016 [acesso em 2020 ago 12]; 7:1-9. Disponível em: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/em/c6em00268d#!div>.

ANDRADE, VC; DE MARIZ, G; CAVALCANTI, LH E ANDRADE, LHC. (2002) Distribuição das espécies do gênero *Clusia* L. (Clusiaceae). In: TABARELLI, M; SILVA, JMC. (Org.). *Diagnóstico da Biodiversidade de Pernambuco, Recife*. Pernambuco: Sectma – Fundaj.

ANHOLETI, M. C. et al. Chemosystematic aspects of polyisoprenylated benzophenones from the genus *Clusia*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 87, n. 1, p. 289–301, mar. 2015.

ARAÚJO, A.J.; LIMA, J.S.; MOREIRA, J.C.; JACOB, S.C.; SOARES, M. O.; MONTEIRO, M.C.M.; AMARAL A.M.; KUBOTA, A.; MEYER, A.; COSENZA, C.A.N.; NEVES C.; MARKOWITZ, S. Exposição múltipla a agrotóxicos e efeitos à saúde: estudo transversal em amostra de 102 trabalhadores rurais, Nova Friburgo, RJ. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 12, n.1, p. 115-130, 2007.

ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*, v. 141, p. 391-396, 2006.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SAÚDE COLETIVA. Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Organização de Fernando Ferreira Carneiro, Lia Giraldo da Silva Augusto, Raquel Maria Rigotto, Karen Friedrich e André Campos Búrigo. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015.

ATOUI, A.K. et al. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chem.*, v. 89, p. 27-36, 2005.

BARREIROS. A.L.B.S; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim. Nova*, V.29, p.113-123, 2006.

BASTOS, V.P.D.; et al. Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo? *Revista UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde*, 2014; vol. 16, nº 3, p. 213-219, 2014.

BELCHIOR, D.C.V.; SARAIVA A.S.; LÓPEZ A.M.C.; SCHEIDT G.N. Impactos de agrotóxicos sobre o meio ambiente e a saúde humana. *Cadernos de Ciência & Tecnologia, Brasília*. v. 34, n. 1, p. 135- 151, jan./abr. 2014.

BERG, J.M.T. e LUBERT, J. *Bioquímica*. 6.Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 545p. 2008

BIANCHI, M.L.P., ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev Nutr*. 1999; 12(12):123-30. doi: 10.1590/S1415-52731999000 200001.

BIANCHI, N.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista Nutrição*, v.12, n.2, p.123-130, 1999.

- BITTRICH, V.; TRAD, R.J.; CABRAL, F.N.; NASCIMENTO-Jr, J. E.; SOUZA, V.C. 2015. Clusiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB6834>>. Acesso em 05 de agosto de 2020.
- BOBIN, M.F.; RAYMOND, M.; MARTINI, M.C. 1995. Propriedades de absorção UVA/UVB de produtos naturais. Cosmet Toil (edição em português) 7: 44-50.
- BOEGER, M.R.T.; ALVES DE BRITO, C.J.F. & NEGRELLE, R.R.B. Relação entre características morfo-anatômicas foliares e esclerofilia em oito espécies arbóreas de um trecho de floresta pluvial Atlântica. Arq. Biol. Tecnol., v. 40 (2), p.493-503. 1997.
- BOHNER, T.O.L.; ARAÚJO, L.E.B. & NISHIJIMA T. O impacto ambiental do uso de agrotóxicos no meio ambiente e na saúde dos trabalhadores rurais. Revista Eletrônica do Curso de Direito da UFSM. v. 8, p. 329-341. 2013.
- BONTEMPO A.F, CARNEIRO, G.D.P, GUIMARÃES F.A, et al. Residual tembotrione and atrazine in carrot. J. Environ. Sci. Health B. [internet]. 2013 [acesso em 2020 set 09]; 51(7):465-468. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27052932>.
- BOOTS THE CHEMISTS Ltd. (England). The Revised guidelines to the ractical measurement of UVA: UVB ratios according to the boots star rating system. Nottingham: The Boots CO PLC, 2004.
- BORELLA, J.; PASTORINI, L.H. Influência alelopática de *Phytolacca dioica* L. na germinação e crescimento inicial de tomate e picão-preto. Revista Biotemas, v. 22, n.3, p.67-75, 2009.
- BRASIL, Governo do Pará, Secretária do Estado do Meio Ambiente. Lei Estadual Nº 6194 de 12 de janeiro de 1999.
- BURNS C.J, BEARD K.K, CARTMILL J.B. Mortality in chemical workers potentially exposed to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 1954-94: an update. Occup. Environ. Med. 2001; 58(1):24-30. <https://doi.org/10.1136/oem.58.1.24>
- CABRERA, L.; COSTA, F.P.; PRIMEL, E.G. Estimativa de risco de contaminação das águas por pesticidas na região sul do estado do RS. Química Nova, v. 31, n. 8, p. 1982-1986, 2008.
- CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R.L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. Free Radical Biology & Medicine, v.22, n.5, p.749- 760, 1997.
- CARGNIN, M.C.S., ECHER, I.C., SILVA, D.R. Fumicultura: uso de equipamento de proteção individual e intoxicação por agrotóxico. Rev. Pesq.: Cuidado Fund. Online. [internet]. 2017 [acesso em 2020 set 09]; 9(2):466-472. Disponível em: <http://www.seer.unirio.br/index.php/cuidadofundamental/article/view/5444>.
- CARVALHO, S.I.C. Caracterização dos efeitos alelopáticos de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu no estabelecimento das plantas de *Stylosanthes guianensis* var. vulgaris cv. Bandeirante. 1993. 72 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1993
-

- CASTRO, O; GUTIÉRREZ, J.M; BARRIOS, M; CASTRO, I; ROMERO, M; UMAÑA, E. (1999) Neutralization of the hemorrhagic effect induced by *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) venom with tropical plant extracts. *Ver. Biol. Trop.* 47(3): 605-616.
- CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A.; FERRIER, D.R. (2008), *Bioquímica Ilustrada*. 4. Ed. Porto Alegre: Artmed, 533p
- CLARKSON PM, THOMPSON HS. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am J Clin Nutr.* 2000; 72(2):637-46.
- CLAYTON, Q.; ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Quim. Nova*, Vol. 33, No. 10, 2202-2210, 2010.
- CORREIA, M.C.R.; LIMA, H.A.; SILVA, R.C.P. Caracterização dos frutos, sementes e plântulas de espécies de Clusiaceae das restingas do Rio de Janeiro. *Rodriguésia – Revista do Jardim Botânico do Rio de Janeiro* 2013, 64, 61.
- DAHLGREN, R.M.T. (1980) A revised system of classification of the angiosperms. *Botanical Journal of the Linnean Society* 80(2): 91-124.
- DAYAN, F.E.; DUKE, S.O. Natural compounds as next-generation herbicides. *Plant physiology*, 166.3: p. 1090-1105, 2014.
- DE ANDRADE, M.R.; ALMEIDA, E.X.; CONSERVA, L.M. Alkyl chromone and other compounds from *Clusia nemerosa*. *Phytochemistry*, v. 47, n. 7, p. 1431–1433, 1998.
- DEGASPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. Antioxidants properties of phenolic compounds. *Visão Acadêmica*, v.5, p.33-40, 2004. DEL-RE, P. V; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.14, n.2, p.389-399, 2012.
- DEMIDCHIK, V. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*, n. 109, p. 212-228, 2015.
- DEMKURA, P.V. et al. 2010. Jasmonate-dependent and-independent pathways mediate specific effects of solar ultraviolet B radiation on leaf phenolics and antiherbivore defense. *Plant Physiology*, v. 152, p. 1084-1095.
- DI MAMBRO V.M, FONSECA M.J.V. Avaliação da eficácia fotoprotetora in vivo de formulações contendo extratos de *Ginkgo biloba* e *Glycyrrhiza glabra*. XX Congresso Brasileiro de Cosmetologia. São Paulo, Brasil. 2006.
- DORNAS, W.C.; OLIVEIRA, T.T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R.G.; SANTOS, A.F.; NAGEM, T.J. Flavonoides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v.28, n.3, p.241-249, 2007.
- DRIEDONKS, N.; XU, J.; PETERS, J. L.; PARK, S.; RIEU, I. Multi-Level Interactions Between Heat Shock Factors, Heat Shock Proteins, and the Redox System Regulate Acclimation to Heat. *Frontiers in Plant Science*, v. 6, n. 999, p. 1-9, 2015.
- EINHELLIG, F.A. Mode of Allelochemical Action of Phenolic Compounds. In: *Allelopathy. Chemistry and Mode of Action of Allelochemicals*. CRC Press, p.217-233, 2004.
-

- FAIRHURST D. 1997. Surface coating and the optimization of microfine oxides in sunscreen formulations. *Cosmet Toiletries* 112: 81-88.
- FALKENBERG M.B., SANTOS R.I., SIMÕES C.M.O. 2000. Introdução à análise fitoquímica. In: *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 2. ed. UFRGS/UFSC: Porto Alegre/ Florianópolis, p. 171.
- FARIA, N.M.X., FASSA, A.G., MEUCCI, R.D., et al. Occupational exposure to pesticides, nicotine and minor psychiatric disorders among tobacco farmers in southern Brazil. *Neurotoxicology*. [internet]. 2014 [acesso em 2020 set 09]; 45:347-354. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24875484>.
- FARIAS, A.V., FERNANDES, R.A., dos SANTOS, R.A., de SOUZA, E.S., de SOUZA, J.V.B. Estudo fitoquímico e análise de fotoproteção dos extratos e óleos essenciais de Aniba canelilla (H.B.K) MEZ. *The Journal of Engineering and Exact Sciences – JCEC*. Vol. 03. N.04. 2017.
- FASSA, A.C.G, FARIA, N.M.X., MEUCCI, R.D., et al. Green tobacco sickness among tobacco farmers in southern Brazil. *Am. J. Ind. Med.* [internet]. 2014 [acesso em 2020 set 09]; 57(6):726-735. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24526387>.
- FERREIRA A.L.A, MATSUBARA L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *RAMB*. 1997; 43(1):61-8.
- FERREIRA, R.O.; DE CARVALHO, M.G.; DA SILVA, T.M.S. Ocorrência de biflavonoides em clusiaceae: aspectos químicos e farmacológicos. *Quimica Nova*, v. 35, n. 11, p. 2271–2277, 2012.
- FIORI, N.S, FASSA, A.C.G, FARIA, N.M.X, et al. Wheezing in tobacco farm workers in Southern Brazil. *Am. J. Ind. Med.* [internet]. 2015 [acesso em 2020 set 09]; 58(11):1217-1228. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26471879>.
- FLOR, J.; DAVOLOS, M.R.; CORREA, M.A. Protetores solares. *Quimica Nova*, v.30, n.1, p.153-158, 2007.
- FRANCO, A.C. BALL, E.; LÜTTGE, U. Patterns of gas Exchange and organic ascillations in tropical trees of the genus *Clusia*. *Oecologia*, v.85, p.108-114. 1990.
- FRANCO, A.C.; OLIVARES, E.; LÜTTGE, U.; HAAG-KERWER, A. In situ studies of crassulacean acid metabolism in several sympatric species of tropical trees of the genus *Clusia*. *New Phytol*, v. 126, p. 203-211. 1994.
- GAALICHE, B.; LADHARI, A; MEDEIROS, A.G.; BENMIMOUN, M.; HAILAOUI, M.R. Relationship between phytochemical profiles and phytotoxic proprieties of Tunisian fig leaf cultivars. *South African Journal of Botany*, v. 122, n. 2, p. 322-328, 2017.
- GALON, L.; MOSSI, A.; REICHERT JUNIOR, F.; REIK, G.; TREICHEL, H.; FORTE, C. Manejo biológico de plantas daninhas – breve revisão. *Revista Brasileira de Herbicidas*, v.15, n.1, p.116-125, 2016.
- GASPAROTTO JUNIOR, A; FERREIRA, I.C.P; NAKAMURA, C.V; DIAS FILHO, B.P; JACOMASSI, E; YOUNG, M.C.M; GARCIA CORTEZ, D.A. (2005) Estudo morfoanatômico das folhas e caule da *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae), uma contribuição ao estudo farmacognóstico da droga vegetal. *Acta Farmaceutica Bonaerense* 24(3): 371-376.

- GERAGE, M. J. Exposição aos resíduos de agrotóxicos por meio do consumo alimentar da população brasileira. 2016.102f. Dissertação, (Mestrado) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz Piracicaba, 2016.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 48, p. 909-930, 2010.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.
- GODOY, R.C.B, OLIVEIRA, M.I. Agrotóxicos no Brasil: processo de registro, riscos à saúde e programas de monitoramento. *Crus das Almas - BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical*, 2004.
- GONZÁLEZ, S., FERNÁNDEZ-LORENTE, M., GILABERTE-CALZADA, Y. The latest on skin photoprotection. *Clin Dermatol*. 2008; 26:614-26.
- GOOSSENS, A., LEPOITTEVIN, J.P. Allergie de contact aux cosmétiques et aux composants de parfums: aspects cliniques, chimiques et diagnostiques nouveaux. *Revue Française D'allergologie et D'immunologie Clinique* 43: 294-300. 2003.
- HALLIWELL, B., WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*. 2004; 142(2): 231-55.
- HALLIWELL, B. et al. The characterization of antioxidants. *Food Chem. Toxicol.*, v. 33, n. 7, p. 601-617, 1995.
- HAMINIUK, C.W.I.; MACIEL, G.M.; PLATA-OVIEDO, M.S.V.; PERALTA, R.M. Phenolic compounds in fruits – na overview. *International Journal of Food Science & Technology*, 2012.
- HAO, X. et al. 2000. Effects of pre-exposure to ultraviolet-B radiation on responses of tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. New Yorker) to ozone in ambient and elevated carbon dioxide. *Environmental Pollution*, v. 110, p. 217-224.
- HEAP, I. International survey of herbicide resistant weeds; 2017. Disponível em: Acesso em: 14 maio 2019.
- HENRIQUES, A.T; KERBER, V.A; MORENO, P.R.H. Alcalóides: generalidades e aspetos básicos. In: *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 2. ed. UFRGS/UFSC: Porto Alegre/Florianópolis, p. 641-642. 2000.
- HERZOG, B.; GRAMS, T.E.E.; HAAG-KERVER, A.; BALL, E.; FRANCO, A.C. & LÜTTGE, U. Expression of modes photossynthesis (C-3, CAM) in *Clusia criuva* Camb. In a Cerrado gallery forest transect. *Plant Biology*, v.1, p. 357-364. 1999.
- HORTO BOTÂNICO. *Clusia fluminensis* Museu Nacional / UFRJ, c2020. Disponível em < <http://museunacional.ufrj.br/hortobotanico/restinga/clusiafluminensis.html>>. Acesso em 05/08/2020.
- JARDIM, A.N.O; MELLO, D.C; GOES, F.C; et al. Pesticide residues in cashew apple, guava, kaki and peach: GC- mu ECD, GC-FPD and LC-MS/MS multiresidue method validation, analysis and cumulative acute risk assessment. *Food Chem.* [internet]. 2014 [acesso em
-

-
- 2020 set 09]; 164:195-204. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24996324>.
- KAHKONEN, M.P. et al. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.*, v. 37, n.10, p. 3954-3962, 1999.
- KAHL, V.F.S; SILVA, J.; SILVA, F.R. Influence of exposure to pesticides on telomere length in tobacco farmers: A biology system approach. *Mut. Res.* [internet]. 2016 [acesso em 2020 set 09]; 791:19-26. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27566293>.
- KAHL, V.F.S; SIMON, D.; SALVADOR, M.; et al. Telomere measurement in individuals occupationally exposed to pesticide mixtures in tobacco fields. *Environ. Mol. Mutagen.* [internet]. 2016 [acesso em 2020 set 09]; 57(1):74-84. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26426910>.
- KOURY, J.C.; DONANGELO, C.M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. *Rev Nutr.* 2003; 16(4):433-41. doi: 10.1590/S1415-52732003000400007.
- KRAWCZYK, N.; MEYER, A.; FONSECA, M.; et al. Suicide mortality among agricultural workers in a region with intensive tobacco farming and use of pesticides in Brazil. *J. Occup. Environ. Med.* [internet]. 2014 [acesso em 2020 set 09]; 56(9):993-1000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25046321>.
- KREMER, T. C.B.; YAMASHITA, O.M.; FELITO, R.A.; FERREIRA, A.C.T.; ARAÚJO, C.F. Atividade alelopática de extrato aquoso de *Croton glandulosus* L. na germinação e no desenvolvimento inicial de alface. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*, v.14, n.1, p.890-898, 2016.
- KUMAR, S.Y.; SHARMA, S.; CHATTOPADHYAY, S. K. The potential health benefit of polyisoprenylated benzophenones from *Garcinia* and related genera: Ethnobotanical and therapeutic importance. *Fitoterapia*, v. 89, n. 1, p. 86–125, 2013.
- LEAL, U.A.S.; SILVA, G.N.; KARAM, D. Otimização Dinâmica Multiobjetivo da Aplicação de Herbicida Considerando a Resistência de Plantas Daninhas. *Biomatemática*, v.22, p.1-16, 2012.
- LI, H. et al. 2013. The effects of different light qualities on rapeseed (*Brassica napus* L.) plantlet growth and morphogenesis in vitro. *Scientia Horticulturae*, v. 150, p. 117- 124
- LOPES, C.V.A.; ALBUQUERQUE, G.S.C. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. *REVISÃO • Saúde debate* 42 (117) Abr-Jun 2018. Disponível em <<https://doi.org/10.1590/0103-1104201811714>>. Acesso em 09/09/2020.
- MAIER, T.; KORTING, H.C. Sunscreens - which and what for? *Skin Pharmacol Physiol.* 2005; 18:253-62.
- MARK, U. et al. 1997. Effects of solar ultraviolet-B radiation, temperature and CO₂ on growth and physiology of sunflower and maize seedlings. In: *UV-B and biosphere*. Springer Netherlands, p. 224-234.
- MARKHAN, K.R.; RYAN, K.G.; BLOOR, S.J; MITCHELL, K.A. 1998. An increase in the luteolin:apigenin ratio in *Marchantia polymorpha* on UV-B enhancement. *Phytochemistry* 48: 791-794.
-

MARZZOCO, A. e TORRES, B. B. (2007), Bioquímica), Bioquímica Básica. 3. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 736p.

MAVERAKIS E, MIYAMURA Y, BOWEN M.P, CORREA G, ONO Y, GOODARZI H. Light, including ultraviolet. J. Autoimmu. 2010;34:J247-57.

MAZZA, K.E.L.; SANTIAGO, M.C.P.A.; PACHECO, S.; NASCIMENTO, L.S.M.; BRAGA, E.C.O.; MARTINS, V.C.; CUNHA, C.P.; GODOY, R.L.O.; BORGUINI, R.G. Determinação de substâncias bioativas em arilos dos frutos de *Clusia fluminensis* Planch. & Triana. Revista Virtual de Química, v.11, n.1, 2019. Disponível em: <<http://rvq-sub.sbq.org.br/index.php/rvq/article/view/1962>>. Acesso em 06/08/2020.

MEIRA, A.M. Gestão de resíduos da arborização urbana. p. 179. Tese Recursos Florestais com opção em tecnologia de produtos florestais. Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba. 2010.

MELO, E.A.; GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. Bol. SBCTA, v. 36, n.1, p. 1-11, jan./jun. 2002

MOLASSIOTIS, A.; FOTOPOULOS, V. Oxidative and nitrosative signaling in plants. Plant Signal Behavior, v. 6, p. 210-214, 2011.

MONQUEIRO PA, AMARAL LR, BINHA DP, SILVA AC, SILVA PV. Potencial de lixiviação de herbicidas no solo submetidos a diferentes simulações de precipitação. Planta Daninha. 2008; 26(2): 403- 409. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582008000200017>

MURPHY, M.P. How mitochondria produce reactive oxygen species. Biochemistry Journal, v. 417, p. 1-17, 2009.

MURSHED, R.; LOPEZ-LAURI, F.; SALLANON, H. Effect of water stress on antioxidant systems and oxidative parameters in fruits of tomato (*Solanum lycopersicon* L, cv. Microtom). Physiology and Molecular Biology in Plants, v. 19, n. 3, p. 363-378, 2013.

NAGEM, T.J; MESQUITA, A.A.L; SILVA, R. (1993) Constituents of *Clusia fluminensis*. Fitoterapia, 64(4): 380.

NAKANO, V.E; KUSSUMI, T.A; LEMES, V.R.R.; et al. Evaluation of pesticide residues in oranges from Sao Paulo, Brazil. Food Sci. Technol. [internet]. 2016 [acesso em 2020 set 09]; 36(1):40-48. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612016000100040.

NASCIMENTO, C.S.; NUNES, L.C.C.; LIMA, Á.A.N.; GRANGEIRO JÚNIOR, S.; ROLIM NETO, P.J. Incremento do FPS em formulação de protetor solar utilizando extratos de própolis verde e vermelha. Revista Brasileira de Farmácia, Rio de Janeiro, v. 30, n. 1, p.334-339, 2009.

NOLDIN, V.F; ISAIAS, D.B; CECHINEL FILHO, V. (2006) Gênero *Calophyllum*: importância química e farmacológica. Química Nova 29(3): 549-554.

OLIVEIRA, A.C.; VALENTIM, I.B.; GOULART, M.O.F.; SILVA, C.A.; BECHARA, E.J.H.; TREVISAN, M.T.S. Fontes Vegetais Naturais de Antioxidantes. Química Nova, v.32, n.3, p.689-702, 2009.

OLIVEIRA, J.S.; PEIXOTO, C.P.; POELKING, V.G.C.; ALMEIDA, A.T. Avaliação de extratos das espécies *Helianthus annuus*, *Brachiaria brizantha* e *Sorghum bicolor* com potencial

-
- alelopático para uso como herbicida natural. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.17, n.3, p.379-384, 2015.
- OLIVEIRA-JUNIOR, R.G.; ALMEIDA, J.R.G.S. Prospecção tecnológica de fotoprotetores derivados de produtos naturais. *Geintec*. 2013; 3:32–40.
- OLIVEIRA-JUNIOR, R.G.; ARAUJO, C.S.; SOUZA, G.R.; et al. In vitro anti-oxidant and photoprotective activities of dried extracts from *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae). *J Appl Pharm Sci*. 2013; 3:1222013; 3:122–127
- OROIAN, M.; ESCRICHE, I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, v.74, p. 10-36, 2015.
- PALM, M.D.; O`DONOGHUE, M.N. Update on photoprotection. *Dermatol Ther*. 2007; 20:360-76.
- PEREIRA, A.P.; PUTZKE, J.; *Dicionário Brasileiro de Botânica*, CRV: Curitiba-PR, 2010.
- PICHERSKY, E; LEWINSOHN, E. Convergent Evolution in Plant Specialized Metabolism. *Annual Reviews Plant Biology*, v.62, p.549-566, 2011.
- PIPOLY, J.J.; KEARNS, D.M.; BERRY, P.E. *Clusia*. In *Flora of the Venezuelan Guayana*, v4, *Caesalpiniaaceae-Ericaceae* (Berry, P.E.; Holst, B.K.; Yattskievych, K., eds.), St. Louis, Missouri: Missouri Botanical Garden Press, p.260-294. 1998.
- POMPEU, G.F.; BORTOLANÇA, P.C.; GRIGNOLI, C.R.E.; SIMIONATO, M.I.V.; GRIGNOLI, L.C.E. Estudo comparativo sobre a conscientização dos hábitos de fotoproteção e dos fatores de risco da carcinogênese de pele em trabalhadores de rua. *Revista Científica da UNIARARAS*, v.1, n.2, p.54-64, 2013.
- PORTO, A.L.M; MACHADO, S.M.F.; DE OLIVEIRA, C.M.A.; BITTRICH, V.; AMARAL, M.D.C.E.; MARSAIOLI, A.J. (2000) Polyisoprenylated benzophenones from *Clusia* floral resins. *Phytochemistry* 55(7): 755-768.
- RAMOS, M.F.S.; SANTOS, E.P.; BIZARRI, C.H.B.; MATTOS, H.A.; PADILHA, M.R.S.; DUARTE, H.M. Preliminary studies towards utilization of various plant extracts as antisolar agents. *Int J Cosmet Sci* 18: 87-101. 1996
- RANCAN, F.; ROSAN, S.; BOEHM, K.; FERNANDEZ, E.; HIDALGO, M.E.; QUIHOT, W.; RUBIO, C.; BOEHM, F.; PIAZENA, H.; OLTMANN, U. Protection against UVB irradiation by natural filters extracted from lichens. *J Photochem Photobiol B* 68: 133-139. 2002.
- RIBEIRO, C. *Cosmetologia aplicada a dermoestética*. São Paulo: Pharmabooks. 2006.
- RICE, E.L. *Allelopathy*. 2. ed. New York: Academic, 1984. 422 p.
- RIZVI, S.J.H.; HAQUE, H.; SINGH, U.K. & RIZVI, V. A discipline called allelopathy. In: RIZVI, S.J.H. & RIZVI, H. (Eds.) *Allelopathy: Basic and applied aspects*. London, Chapman & Hall, 1992. p.1-10.
- ROBERTS, A.; BORLAND, A.M.; MAXWELL, K. & GRIFFITHS, H. Ecophysiology of the C-3-CAM intermediate *Clusia minor* L. in Trinidad: seasonal and short-term photosynthetic characteristics of sun and shade leaves. *Journal of Experimental Botany*, v.49 (326), p.1563-1573. 1998.
-

- ROCHA, A.M.; FELITO, R.A.; YAMASHITA, O.M.; GERVAZIO, W.; KREMER, T.C. B. Estudos Preliminares Para o Potencial Uso do Repolho Como Herbicida Natural: Práticas Para o Manejo Agroecológico. *Cadernos de Agroecologia*, v.11, n.2, 2016.
- ROCHA, E.C; SARTORI, R.C; NAVARRO, F.F. A aplicação de alimentos antioxidantes na prevenção do envelhecimento cutâneo. *Revista Científica da FHO –UNIARARAS*, vol. 4, nº 1, p. 19-26, 2016.
- RODRIGUES, L.R.A.; ALMEIDA, A.R.P.; RODRIGUES, T.J.D. Alelopatia em forrageiras e pastagens. In: *Simpósio sobre ecossistema de pastagens*, 2., 1993, Jaboticabal. *Anais... Jaboticabal: FUNEP*, 1993. p. 100-129.
- SÁNCHEZ-MORENO, C.; *Food Sci. Tech. Int.* 2002, 8, 121
- SANTANA, J.L.; PEÑA, M.; MARTINEZ, F.; GÓMEZ, A.; CORDONÍO, E.; GARCIA, O.; GARCIA, G.; VARGAS, L.M.; GARCIA, C. Evaluación de la actividad antimicrobiana, fotoprotectora, antielastasa y antioxidante de polifenóis de origen natural, empleados en formulaciones cosméticas. *XV Congreso Latinoamericano e Ibérico de Químicos Cosméticos*. 2001.
- SANTOS, A.C.M.; SOARES, I.P.; MOREIRA, J.C.; et al. Perfil dos registros clínicos em prontuários de fumicultores em Alagoas. *Rev. Bras. Med. Trab.* 2017; 15(4):310-316.
- SANTOS, Q.D. Potencial Herbicida e Caracterização Química do Extrato Metanólico da Raiz e Caule do *Cenchrus echinatus* (Timbete). *Dissertação de Mestrado em Química, Universidade Federal de Uberlândia - MG*, 2012.
- SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *RBME*. 2004; 10(10):308-13.
- SCHUELLER, R; ROMANOWSKI, P. The ABCs of SPFs: an introduction to sun protection products. *Cosmet Toiletries*. 1999. 114: 49-57.
- SHAMI, N.J.I.E.; MOREIRA, E.A.M. Licopeno como agente antioxidante. *Rev Nutr.* 2004; 17(2):227-36. doi: 10.1590/S1415-52732004000200009.
- SHEU, M.T; LIN, C.W.; HUANG, M.C; SHEN, C.H.; Correlation of in vivo and in vitro measurements of sun protection factor. *J Food Drug Anal.* 2003; 11:128-32.
- SILVA, C.M; SANTOS, R.A; CAVALCANTE, C.F.C. Os benefícios da nutrição na prevenção do envelhecimento cutâneo. *Revista Conexão Eletrônica*, vol. 13, nº 1, p. 1-10, 2016.
- SILVA, L.O.C.; et al. Action of *Eleusine coracana* in the remediation of soils contaminated with picloram. *Planta Daninha*, v. 30, n. 3, p. 627-632, 2012.
- SILVA, M.C.A.; PAIVA, S.R. Antioxidant activity and flavonoid content of *Clusia fluminensis* Planch. & Triana. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 2012, 84, 609. [CrossRef]
- SILVA, Z. L. Alelopatia e defesa em plantas. *Boletim Geográfico, Rio de Janeiro*, v. 36, n. 258-259, p. 90-96, 1978.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (2007), *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Florianópolis: Editora da UFSC, 1102p.
-

- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- SOUZA, A.S; CAVALCANTE, R.M., MILHOME, M.A.; et al. Estimated levels of environmental contamination and health risk assessment for herbicides and insecticides in surface water of Ceará, Brazil. Bull. Environ. Contam. Toxicol. [internet]. 2016 [acesso em 2020 ago 12]; 96(1):90-95. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26537372>.
- SOUZA FILHO, A.P.S.; et al. Allelopathic potential of *Myrciaguianensis*. Planta daninha, v. 24, n. 4, p. 649-656, 2006.
- SOUZA, T.M.; MOREIRA, R.R.D.; RANGEL, V.L.B.I.; PIETRO, R.C.L.R. Avaliação da atividade fotoprotetora de *Achillea millefolium* L. Rev Bras Farmacogn. 2005. 15: 36-38.
- SOUZA, T.M.; SANTOS, L.E.; MOREIRA, R.R.D.; RANGEL, V.L.B.I. Avaliação da atividade fotoprotetora de *Achillea millefolium* L. (Asteraceae). Revista Brasileira de Farmacognosia, Curitiba, v. 15, n. 1, p. 36-38, 2005.
- STEVENS, P.F.F. Angiosperm Phylogeny Website. Versão 9, Junhojunho 2008. Disponível em: < <http://www.mobot.org/mobot/research/apweb/>>. Acessado em 06/08/2020.
- SVOBODOVA, A.; WALTEROVA, D.; VOSTALOVA, J. Ultraviolet light induced alteration to the skin. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.2006;150:25-38.
- TAIZ, LINCON; ZEIGER, E. Plant Physiology. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.
- TEVINI, M.; et al 1989. UV-B effects on terrestrial plants. Photochemistry and Photobiology, v. 50, p. 479-487.
- TING, I.P.; LORD, E.M.; STERNBERG, L. DA S.L. & DENIRO, M.J. Crassulacean acid metabolismo in the strangler *Clusia rósea* Jacq. Science, v. 229, p. 969-971.
- TUR, C.M.; BORELLA, J.; PASTORINI, L.H. Alelopatia de extratos aquosos de *Duranta repens* sobre a germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* e *Lycopersicum esculentum*. Revista Biotemas, Florianópolis, n. 23, v. 2, p. 13-22, 2010. Vv
- VELIOGLU, Y.S. Antioxidant activity and total phenolic in selected fruits, vegetables, and grain products. J. Agric. Food Chem., v. 46, p. 4113-4117, 1998.
- VIEIRA, D.C.; NOLDIN, J.A.; DESCHAMPS, F.C.; et al. Ecological risk analysis of pesticides used on irrigated rice crops in southern Brazil. Chemosphere. [internet]. 2016 [acesso em 2020 SET 09]; 162:48-54. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27479455>.
- VILA-AIUB, M.M.; GHERSA, C.M. Building up resistance by recurrently exposing target plants to sublethal doses of herbicide. European Journal of Agronomy, v. 22, p. 195-207, 2005.
- WALLER, G.R. Introduction. In: MACIAS, F.A.; GALINDO, J.C.G.; MOLINILLO, J.M.G. & CUTLER, H.G. (Eds.) Recent advances in allelopathy. Cadiz, Serv. Pub. Univ. Cadiz, 1999. v.1, sem paginação.
- WHITTAKER, R.H.; FEENY, P.P. Allelochemicals: chemical interaction between species. Science, [S.I.], v. 171, n. 3973, p. 757-770, 1971.
-

-
- YÁÑES-ESPINOZA, L.; TERRAZAS, T.; LÓPEZ-MATA L.; VALDEZ-HERNÁNDEZ, J.I. Leaf trait variation in tree species through canopy strata in a semi-evergreen. Neotropical forest. *Canadian Journal of Botany*, v. 81(4), p. 398-404. 2003.
- YANG, D.T.; ZHU, X. Modernization of agriculture and long-term growth. *Journal of Monetary Economics*, v. 60, n. 3, p. 367-382, 2013.
- ZILLI, J.E.; BOTELHO, G.R.; NEVES, M.P.; RUMJANEK, N.G. Efeito de glyphosate e imazaquin na comunidade bacteriana do rizoplano de soja (*Glycinemax* (L.) Merrill) e em características microbiológicas do solo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. v. 32, n. 2, p. 633-642, mar./abr. 2008.
- ZISKA, L.H. 1996. The potential sensitivity of tropical plants to increased ultraviolet-B radiation. *Journal of plant physiology*, v. 148, p. 35-41.
- ZOU, Z.; XI, W.; HUA, Y.; NIE, C.; ZHOU, Z. Antioxidant activity of Citrus fruits. *Food Chemistry*, v.196, p. 885–896, 2016.
- ZUANAZZI, J.A.S. Flavonóides. In: *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 2. ed. UFRGS/ UFSC: Porto Alegre/Florianópolis, 2000. p.489-492.
-

CAPÍTULO 1

EFEITO ALELOPÁTICO DE EXTRATOS FOLIARES DE *Clusia fluminensis* Planck & Triana SOBRE A GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DA *Lactuca sativa* L. e *Panicum maximum* Jacq.

Autores: Flávio Mauricio Perini ⁽¹⁾; • Viviana Borges Corte² • Hildegardo Seibert França¹

(1) Instituto Federal do Espírito Santo, Av. Rio Branco, 50 - Santa Lucia, CEP 29056-255, Vitória, ES, Brasil.

(2) Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Departamento de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, CEP 29075-910, Vitória, ES, Brasil.

*Autor para correspondência: flavio.mauricio.perini@gmail.com

Periódico a ser submetido ou submetido: Rodriguésia – Revista do Jardim Botânico do Rio de Janeiro em novembro de 2020.

RESUMO

Produzir de forma sustentável requer que plantas daninhas sejam controladas, e para isso o uso de produtos naturais, em substituição aos defensivos agrícolas químicos, chamam cada vez mais a atenção dos pesquisadores, que buscam nos metabólitos secundários dos vegetais potenciais alelopáticos como alternativa para substituir os defensivos químicos convencionais. O objetivo dessa pesquisa foi avaliar o potencial alelopático dos extratos etanólico, hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol e aquoso, de folhas de *Clusia fluminensis* Planch. & Triana, sobre a germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* e *Panicum maximum*. Foram realizadas prospecção fitoquímica por cromatografia em camada delgada, testes biológicos de germinação e emergência, comprimentos de radícula e parte aérea, massa fresca, atividade enzimática das enzimas catalase (CAT), peroxidase (POX) e superóxido dismutase (SOD) e teor de pigmentos (clorofila a, clorofila b e carotenoides). A fração acetato de etila apresentou melhor resultado com menor influência sobre a alface e maior influência sobre o capim, quando comparados os resultados dos testes de germinação e emergência dos seis extratos testados em comparação ao controle. Em tratamentos feito com o extrato acetato de etila, houve aumento significativo da atividade das três enzimas em sementes de alface, diminuição na atividade das enzimas CAT e SOD em sementes de capim colômbio. Houve elevação nos teores de clorofila a, b, carotenoides, clorofilas totais e na relação clorofila total/carotenoides, além de não haver alteração na relação clorofila a/b em plântulas de capim colômbio. Os resultados sugerem que o extrato acetato de etila obtido de folhas de *C. fluminensis* apresenta potencial alelopático promissor, com possibilidade de exploração como alternativa para uso no controle biológico em substituição aos agroquímicos convencionais.

Palavras-chave: alelopatia • *Clusia fluminensis* • metabólitos secundários • fitoquímica • fitotoxicidade •

ABSTRACT

ALELOPATIC EFFECT OF EXTRACTS OBTAINED FROM LEAVES OF *Clusia fluminensis* ON THE GERMINATION AND INITIAL GROWTH OF *Lactuca sativa* L. and *Panicum maximum* Jacq.

ABSTRACT: Producing in a sustainable way requires that weeds are controlled, and for this the use of natural products, in substitution to chemical pesticides, increasingly calls the attention of researchers, who look for the secondary metabolites of potential allelopathic vegetables as an alternative to replace the conventional chemical pesticides. The objective of this research was to evaluate the allelopathic potential of ethanolic, hexane, dichloromethane, ethyl acetate, butanol and aqueous extracts, from leaves of *Clusia fluminensis* Planch. & Triana, on the germination and initial growth of *Lactuca sativa* and *Panicum maximum*. Phytochemical prospecting was carried out by thin layer chromatography, biological germination and emergence tests, radicle and shoot lengths, fresh mass, enzyme activity of catalase (CAT), peroxidase (POX) and superoxide dismutase (SOD) and pigment content (chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoids). The ethyl acetate fraction showed a better result with less influence on lettuce and greater influence on grass, when comparing the results of the germination and emergence tests of the six extracts tested in comparison to the control. In treatments made with ethyl acetate extract, there was a significant increase in the activity of the three enzymes in lettuce seeds, a decrease in the activity of CAT and SOD enzymes in seeds of coloniãõ grass. There was an increase in the levels of chlorophyll a, b, carotenoids, total chlorophylls and in the total chlorophyll / carotenoid ratio, in addition to no change in the chlorophyll a / b ratio in seedlings of colonization grass. The results suggest that the ethyl acetate extract obtained from leaves of *C. fluminensis* has a promising allelopathic potential, with the possibility of exploration as an alternative for use in biological control instead of conventional agrochemicals.

Keywords: *allelopathy* • *Clusia fluminensis* • *secondary metabolites* • *phytochemistry*, *phytotoxicity*.

1. INTRODUÇÃO

Produzir de forma economicamente sustentável requer que as plantas daninhas sejam controladas efetivamente. Estima-se que estas plantas causem grandes prejuízos, em escala global, comprometendo a produção de culturas diversas prejudicando seu estabelecimento e desenvolvimento, atuando como competidoras agressivas, hospedeiras de pragas e patógenos e como produtoras de compostos secundários prejudiciais as plantas (Christoffoleti, 2015).

No que diz respeito à aplicação prática e comercial do uso de extratos vegetais, um dos principais objetivos dos estudos sobre atividades alelopáticas é a descoberta de herbicidas naturais que possam servir como alternativa ao uso dos herbicidas sintéticos convencionais atualmente utilizados na agricultura. O uso de herbicidas de forma racional e consciente que controlam as plantas daninhas e não afetam significativamente o desenvolvimento das culturas é a prática mais usual e viável no controle de infestações (Christoffoleti, 2015). O grande interesse em fitoquímicos para o controle de plantas daninhas, usando produtos naturais modificados e/ou derivados sintéticos com atividade herbicida, é dado na medida em que se espera que eles não causem contaminação do solo e plantas além de baixa toxicidade às diferentes formas de vida, diferentes dos herbicidas tradicionalmente usados (Caser et al., 2020).

Visando identificar espécies produtoras de metabólitos secundários com papel alelopático, a família Clusiaceae, também conhecida como Guttiferae (Kerrigan et al, 2011) apresenta potencial promissor. Nesta família destaca-se o gênero *Clusia* de grande interesse paisagístico, no manejo ambiental e reflorestamento de áreas de restinga (Correia et al., 1993), com alguns representantes do gênero de grande importância na medicina popular contra hipertensão (García-González & Matamoros, 1998), como para o tratamento do câncer, processos inflamatórios, infecções, como purgativos e controle da obesidade (Hemshekhar te al, 2011). Porém, as pesquisas que envolvam a atividade alelopática se mostram carentes, com poucas descrições de efeito alelopático de extratos obtidos de plantas do gênero *Clusia* e, principalmente, da espécie *Clusia fluminensis*. A presença comprovada de metabólitos secundários em espécies do gênero *Clusia* servem como incentivo para que pesquisas com a finalidade ecofisiológica sejam implementadas.

O presente trabalho visa verificar o potencial alelopáticos e fitotóxico do extrato etanólico e suas frações, obtidos de folhas de *Clusia fluminensis* sobre a germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.) e capim colônia (*Panicum maximum* Jacq.), identificando possíveis extratos que possam ser utilizados como

herbicidas naturais, em substituição aos químicos usuais. Desta forma, foi testado o potencial alelopático do extrato etanólico e frações identificando o extrato considerado mais promissor como alternativa para substituição de defensivos agrícolas tradicionais, bem como uma identificação fitoquímica inicial, associando os compostos identificados aos efeitos obtidos e às respostas enzimáticas (enzimas CAT, POX, SOD) e de pigmentos (clorofila e carotenóides). Os critérios utilizados para a seleção do extrato mais promissor foram os resultados obtidos a partir de experimentos de germinação e para o crescimento inicial.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Preparação do extrato vegetal

Folhas maduras e completamente expandidas, escolhidas aleatoriamente de plantas de *Clusia fluminensis* Planck & Triana presentes nos jardins do Instituto Federal do Espírito Santo (IFES) campus Cariacica, foram coletadas de plantas adultas e acondicionadas em sacos de papel, sendo conduzidas para o Laboratório de Sementes e Ecofisiologia de Espécies Florestais (LASEF) do Departamento de Ciências Biológicas na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Após a coleta, foram lavadas visando a retirada de poeira ou outros resíduos. Foram desidratadas em estufa a 40°C, por 120 horas, e trituradas, em liquidificador industrial.

Foi obtido o extrato pelo método de maceração exaustiva das folhas sendo utilizado etanol como solvente. Após 72 horas, o material foi filtrado, separando o resíduo vegetal do extrato. O extrato etanólico obtido foi concentrado em evaporador rotatório até a completa eliminação do etanol, que após recuperado foi novamente adicionado ao resíduo vegetal, para continuar o processo de extração por mais 72 horas, que se repetiu até o esgotamento do material vegetal. O extrato bruto obtido foi armazenado em um frasco de vidro sob refrigeração a 8°C. Parte do extrato etanólico concentrado (bruto), obtido após o processo de extração, foi ressuspenso em uma mistura de água:etanol (2:8 v/v) e realizadas extrações sucessivas com solventes de polaridade crescente, obtendo as frações hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol. O resíduo final, após a separação realizadas com os respectivos solventes, foi designado fração aquosa. Após o fracionamento, o solvente foi completamente eliminado por evaporação em capela, para as frações de hexano, diclorometano e acetato de etila, enquanto na fração butanol a eliminação ocorreu por meio de rotoevaporação.

2.2. Análise do potencial alelopático

Para avaliação do potencial alelopático foi realizada o *bioensaio de germinação* utilizando sementes de uma dicotiledônea, alface (*Lactuca sativa* L.), e uma monocotiledônea, capim colômbio (*Panicum maximum* Jacq.). Inicialmente foi verificado o *pH* e o *potencial hídrico* do extrato etanólico (bruto) e suas frações na concentração de 1mg/mL. O *pH* foi aferido no pHmetro portátil KASVI–modelo K39-0014P. O *potencial hídrico* foi medido por meio do potenciômetro WP4 e os valores expressos em MPa (Delgado; Barbedo, 2012). As sementes foram distribuídas em quatro placas de Petri com 12 cm de diâmetro forradas com duas folhas de papel filtro umedecidas com 5,0 mL do extrato etanólico e suas frações: hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol e aquoso, nas concentrações de 1.0mg/mL, 0.75 mg/mL, 0.50 mg/mL e 0.25 mg/mL. Foram distribuídas 20 sementes por placa, com cinco repetições, as quais foram mantidas em câmara de germinação (tipo BOD) a 20°C para a alface e 25°C para o capim colômbio e luz constante (Brasil, 2009). A contagem de germinação foi realizada a cada 24 horas durante sete dias e as medidas dos comprimentos das radículas e das partes aéreas foram realizadas após sete dias do início do experimento. Foram consideradas germinadas as sementes que apresentaram radícula com no mínimo 50% do tamanho da semente (Ferreira; Áquila, 2000). Para análise do potencial alelopático, foram avaliadas variáveis em duas etapas de desenvolvimento, germinação e crescimento inicial. Variáveis de germinação foram *porcentagem de variação de germinação (%G)* (Casimiro et al., 2017) (Labouriau et al., 1976), *índice de velocidade de germinação (IVG)* (Maguire, 1962; Krzyzanowski et al, 1999), *tempo médio de germinação (TMG)* (Ferreira; Borghetti, 2004), *velocidade de germinação (VG)* (Gao et al., 2006), *índice de alelopatia (IA)* (Gao et al., 2006). Variáveis de crescimento inicial (Gatti et al., 2004) foram *comprimento da raiz (CR)*, *comprimento da parte aérea (CPA)*, *massa fresca raiz (MFR)* e *massa fresca da parte aérea (MFPA)*. A *massa fresca* foi obtida a partir da massa de 10 amostras selecionadas aleatoriamente dentre as plântulas que tiveram o comprimento da raiz e do epicótilo avaliados. Foi separada a parte aérea da raiz e pesadas em separado. A pesagem foi realizada em balança analítica de precisão. Os resultados foram expressos em gramas por raiz e gramas por parte aérea.

A atividade enzimática da *catalase (CAT)*, da *peroxidase (POX)* e da *superóxido dismutase (SOD)* foram obtidas pela maceração em N₂ líquido de 0,3g de sementes e raízes de capim colômbio submetidas a tratamentos pré-germinativos por 18 horas e a tratamentos germinativos por 07 dias, na fração acetato de etila na concentração de 0,75mg/mL, seguido da adição de 2,0 mL do seguinte meio de homogeneização: tampão fosfato de

potássio 0,1 M, pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1% (p/v) (Peixoto et al., 1999). Seguiu-se centrifugação a 12.000 xg por 15 minutos, a 4°C, obtendo-se um extrato enzimático bruto. A reação mede produto consumido (H_2O_2).

Para a determinação da atividade da catalase (CAT) (Havir; Mchale, 1987), a atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $36 M\text{ cm}^{-1}$ (Anderson et al., 1995) e o resultado expresso em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína. Na determinação da atividade da peroxidase (POX) (Kar; Mishra, 1976) a atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $2,47 \text{ mM cm}^{-1}$ (Chance; Maehley, 1955) e o resultado expresso em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína. A determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD) (Del Longo et al., 1993), uma unidade de SOD foi definida como a quantidade da enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (Beauchamp; Fridovich, 1971). Foram utilizadas quatro repetições com duplicatas.

Foi feita a quantificação do teor dos pigmentos cloroplastídicos (clorofila a, clorofila b e carotenóides) em plântulas de *Panicum maximum*, após 7 dias de germinação com a fração acetato de etila 0,75 mg/mL. Foi utilizado 4 mg de tecido foliar liofilizado que foi triturado em grau e pistilo com 2 mL de acetona a 20% (nuclear). Após este processo, o homogeneizado triturado foi centrifugado por 15.000 g. por 10 min a uma temperatura de 4 °C, em que o sobrenadante foi removido e realizada a quantificação das clorofilas a, b e carotenóides utilizando espectrofotômetro Agilent, modelo UV-Vis Care Win, de acordo com metodologia proposta por Lichtenthaler & Buschmann (2001) nos comprimentos de onda 470, 646 e 663 nm. As concentrações dos pigmentos foram determinadas segundo as equações de Lichtenthaler e Buschmann (2001): Clorofila a = $12,25.A_{663} - 2,79.A_{646}$; Clorofila b = $21,50.A_{646} - 5,10.A_{663}$; Clorofila Total = Clorofila a + Clorofila b; Carotenoides = $(1000.A_{470} - 1,82.\text{clorofila a} - 85,02.\text{clorofila b})/198$. Onde: A_{470} = absorvância a 470 nm; A_{663} = absorvância a 663 nm; A_{646} = absorvância a 646 nm. Os resultados foram apresentados em mg por grama de massa seca (mg g^{-1} MS).

2.3. Prospecção química por Cromatografia em camada delgada (CCD)

A cromatografia é um método físico-químico de separação baseado na migração diferencial dos componentes de uma mistura devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária (Tabela 1). As múltiplas combinações de fases móveis e estacionárias fazem dela uma técnica muito versátil e altamente aplicável (Collins et al., 1993).

A análise por cromatografia em camada delgada (CCD) foi utilizada para caracterizar a presença dos principais grupos de metabólitos secundários. Para a fase estacionária utilizou-se cromatoplaças de gel de sílica 60 (ALUGRAM® Xtra SIL G/UV254, 10 x 10 cm), com bandas de aplicação de 0,5 cm para as amostras e eluição da fase móvel de 8,0cm. Com auxílio de uma micropipeta (Hamilton 705SN), foram aplicados 10µL das amostras. Os grupos químicos, as condições cromatográficas e os reveladores para cada grupo estão apresentados na Tabela 1 (Wagner; Bladt, 1996).

Tabela 1: Cromatografia em camada delgada (CCD), sistemas de eluição e reagentes reveladores dos respectivos fitoquímicos.

Grupos químicos	Sistemas de eluição	Reveladores
Alcaloide	Tolueno: acetato de etila: dietilamina (7:2:1)	Reagente Dragendorff
Derivados antrocênicos	Acetato de etila:metanol:água (10:1,35:1)	Reagente KOH etanólico 10%
Antroquinonas	Éter etílico:acetato de etila:ácido fórmico (7,5:2,5:0,1)	Reagente Ácido fosfomolibdico
Cumarinas	Tolueno: éter etílico (1:1 saturado com 10% De Ácido acético)	Reagente KOH etanólico 10%
Flavonoides e taninos	Acetato de etila: ácido fórmico:ácido acético glacial: água (100:11:11:26)	Reagente de NEU
Ligninas	Clorofórmio: metanol: água (7:3:0,4)	Reagente vanila fosfórica
Mono e diterpenos	Tolueno: acetato de etila (9,3:0,7)	Reagente vanila sulfúrica
Naftoquinonas	Tolueno: ácido formico (9,9:0,1)	Reagente KOH etanólico 10%
Triterpenos e esteroides	Tolueno: clorofórmio: etanol (4:4:1)	Reagente Liebermann-Burchard

2.4. Delineamento experimental e análise estatística

Os experimentos foram conduzidos num delineamento inteiramente casualizado (DIC). Na análise estatística dos resultados dos experimentos, para a variável extratos, foi realizada a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de comparação de médias de Tukey ($p \leq 1$ e 5%). Também foi utilizado para as análises enzimáticas e de pigmentos o teste T a 5% de significância.

3. RESULTADOS

3.1 Análise do potencial alelopático

Os valores de pH dos diferentes extratos apresentaram-se em uma faixa que varia de 3,94 a 6,05, tendendo a diminuição do pH à medida que a concentração dos extratos aumenta. O pH da água destilada (controle) ficou em 6,16. O valor do potencial hídrico (PW) dos extratos e suas frações variou de -0,35 a 0,30 Mpa (Tabela 2).

Tabela 2: Valores de pH, potencial hídrico (PW) dos extratos de folhas de *Clusia fluminensis* Planck & Triana nas concentrações 0.0, 0.25, 0.50, 0.75 e 1.0 mg/mL, na temperatura de 25,2°C.

extrato e frações	mg/mL	pH	PW
controle negativo	0.0	6.16	0.0
etanol	0.25	5.18	-0.09
	0.50	5.02	-0.32
	0.75	4.66	-0.30
	1.00	4.58	-0.29
hexano	0.25	4.93	0.0
	0.50	4.54	-0.04
	0.75	4.13	-0.29
	1.00	3.94	-0.33
diclorometano	0.25	4.78	-0.18
	0.50	4.64	-0.27
	0.75	4.31	-0.27
	1.00	4.09	-0.35
acetato de etila	0.25	5.65	-0,18
	0.50	5.02	-0,12
	0.75	4.75	-0,24
	1.00	4.33	-0,20
butanol	0.25	6.05	-0.35
	0.50	5.88	-0.23
	0.75	5.23	-0.19
	1.00	4.71	-0.05
aquoso	0.25	4.77	-0.20
	0.50	4.44	-0.26
	0.75	4.70	-0.35
	1.00	4.32	-0.31

Para o potencial alelopático foram realizadas comparações dos extratos e das frações sendo feitas as análises dos dados obtidos a partir dos tratamentos com sementes de alface e de capim colônia.

Observa-se que o percentual de germinação (%G) das sementes da alface diminuiu significativamente em relação ao controle negativo nos tratamentos com o extrato etanólico e as frações hexano, diclorometano e butanol. As frações acetato de etila e aquoso não diferem em relação ao controle. Houve redução no índice de velocidade de germinação (IVG) em todos tratamentos. O tempo médio de germinação (TMG) das sementes da alface aumentou significativamente nos tratamentos submetidos ao extrato etanólico e às frações hexano e butanol. A velocidade de germinação (VG) apresentou diminuição significativa em todos os tratamentos. O índice de alelopatia (IA) indica efeito alelopático inibitório significativo em todos os tratamentos. Para as variáveis de crescimento inicial analisadas (CR, CPA, MFR e MFPA) foi observado: diminuição significativa do CR em todos os tratamentos, exceto no tratamento com a fração aquoso; diminuição significativa do CPA

nas frações etanol, diclorometano, butanol e aquoso; diminuição da MFR e MFPA em todos tratamentos (Tabela 3).

Para o capim colônião a fração acetato de etila foi a única a promover interferência significativa em todas as variáveis de germinação (%G, IVG, TMG, VG e IA), além de promover diminuição significativa em todas as variáveis de crescimento inicial (CR, CPA, MFR e MFPA) (Tabela 3).

Tabela 3: Análise de germinação e crescimento inicial de alface e capim colônião, submetidos a tratamento com extrato etanólico e frações hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol e aquoso. Água destilada foi utilizada com controle.

Alface									
	%G	IVG	TMG (H)	VG (%)	IA	CR	CPA	MFR	MFPA
controle	100.00 a	18.60 a	25.51 d	100.00 a	0.00 a	4.68 a	0.84 a	0.40 a	0.096 a
etanol	92.03 bc	15.46 b	31.10 bc	83.29 b	-0.17 b	3.43 c	0.56 d	0.024 c	0.041 d
hexano	83.00 d	13.00 c	36.15 b	69.94 c	-0.32 c	4.20 b	0.80 ab	0.013 f	0.030 f
diclorometano	86.39 cd	15.67 b	27.42 cd	84.52 b	-0.15 b	3.85 b	0.74 bc	0.014 e	0.033 ef
acetato	95.72 ab	16.74 b	29.06 cd	90.10 b	-0.10 b	4.21 b	0.87 a	0.024 c	0.058 c
butanol	85.73 cd	11.80 c	47.17 a	63.64 c	-0.36 c	3.26 c	0.71 c	0.020 d	0.036 e
aquoso	98.66 a	16.65 b	29.93 cd	89.62 b	-0.10 b	4.76 a	0.72 bc	0.030 b	0.062 b
Capim colônião									
	%G	IVG	TMG (H)	VG (%)	IA	CR	CPA	MFR	MFPA
controle	100.00 a	5.16 a	91.00 ab	100.00 a	0.00 a	2.88 d	2.18 b	0.0123 a	0.0246 b
etanol	90.52 b	4.86 b	87.79 bc	90.88 bc	-0.09 c	3.33 bc	1.54 d	0.0042 cd	0.0152 e
hexano	95.82 ab	4.89 a	94.82 a	91.56 b	-0.08 b	3.42 bc	1.91 c	0.0044 bc	0.0158 de
diclorometano	91.60 bc	4.87 a	88.55 bc	91.17 b	-0.09 b	3.20 cd	1.87 c	0.0039 d	0.0178 d
acetato	80.55 d	4.48 b	85.52 cd	83.78 c	-0.16 c	2.40 e	1.92 c	0.0041 cd	0.0203 c
butanol	90.48 c	4.96 a	85.83 cd	92.73 b	-0.07 b	3.66 ab	2.08 b	0.0041 bc	0.0178 d
aquoso	89.06 c	5.09 a	83.19 d	95.36 ab	-0.05 ab	3.82 a	2.38 a	0.0048 b	0.0282 a

Nota: Os parâmetros analisados foram porcentagem de germinação (%G), determinado em %; índice de velocidade de germinação (IVG); tempo médio de germinação (TMG), em horas; velocidade de germinação, em porcentagem; índice de alelopatia (IA), em %; comprimento da raiz (CR), em centímetros (cm), comprimento da parte aérea (CPA), em centímetros (cm); massa fresca da raiz (MFR), em grama e massa fresca da parte aérea (MFPA), em grama. As médias seguidas pela mesma letra, em uma coluna e em um mesmo tratamento ou comparado com o controle, não diferem estatisticamente entre si. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias analisadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados da análise conjunta do extrato e frações, permite identificar a fração acetato de etila como a que menos influenciou na alface, preservando o %G, TMG e CPA, bem como a única a apresentar inibição em todas as variáveis de germinação e crescimento inicial do capim colônião, sendo portanto considerada a fração mais promissora entre as testadas para o aprofundamentos das pesquisas.

Visando reconhecer na fração mais promissora a concentração mais efetiva, dentre as testadas, foi feita uma análise apenas dos resultados obtidos na fração acetato de etila. Foram testadas as concentrações 0.25, 0.50, 0.75 e 1.0 mg/mL. Água destilada foi utilizada como controle.

Os resultados para os testes de germinação da alface mostram que a fração acetato de etila afetou apenas o TMG, independente da concentração testada. Para as análises de crescimento inicial foi constatada maior influência, com preservação do CR e CPA nas concentrações 0,50 e 1,00 mg/mL (Tabela 4). A análise de regressão mostra não haver influência da dose nos parâmetros %G, CR e CPA (Figura 1-A, F e G). Para as outras variáveis analisadas foi observado que a concentração de maior interferência são 0,71mg/mL para o IVG, 0,73mg/mL para o TMG, 0,71mg/mL para a VG, 0,70mg/mL para o IA, 0,91mg/mL par MFR e 0,99mg/mL para MFPA (Figura 1). Tais valores permitem reconhecer que concentrações mais próximas da menor concentração dentre as constatadas na regressão polinomial preservariam a alface quanto ao crescimento inicial. Dentre as concentrações testadas a que mais se aproxima dos resultados obtidos é a de 0,75mg/mL, desta forma o ideal para tratamentos com alface seriam concentrações abaixo desta.

As sementes do capim colônia tiveram maior inibição de %G, o IVG, o VG e o IA a partir de 0,75mg/mL. Quanto ao crescimento inicial apenas o CR não mostrou alterações significativas na concentração 0,75mg/mL (Tabela 4). A análise de regressão mostra relação dose dependente, com exceções do TMG, que não sofreu alteração e MFR que apresentou concentração inibitória ideal 0,73mg/mL (Figura 2). Comparando tais resultados com os obtidos na Tabela 4, observa-se que, a partir da concentração 0,75mg/mL os resultados diminuem significativamente para todos os parâmetros. Desta forma, visando reconhecer uma menor concentração capaz de promover resultados alelopáticos satisfatórios, opta-se por selecionar a concentração 0,75mg/mL, dentre as testadas.

Tabela 4: Análise de germinação e crescimento inicial de alface e capim colônia, submetidos a tratamento com fração acetato de etila nas concentrações 0.0, 0.25, 0.50, 0.75 e 1.00 mg/mL. Água destilada foi usada como controle.

alface									
mg/mL	%G	IVG	TMG	VG	IA	CR	CPA	MFR	MFPA
0.0	100.00 a	18.60 a	25.50 c	100.00 a	0.0 a	4.68 a	0.84 a	0.0395 a	0.0958 a
0.25	94.95 a	16.57 a	28.99 a	89.21 a	-0.11 a	2.46 c	0.74 c	0.0216 c	0.0742 b
0.50	93.78 a	16.08 a	30.40 a	86.59 a	-0.13 a	5.12 a	1.00 ab	0.0279 cb	0.0512 c
0.75	94.95 a	16.30 a	30.05 a	87.78 a	-0.12 a	3.38 b	0.76 c	0.0160 d	0.0303 d
1.0	94.95 a	16.13 a	30.37 a	86.93 a	-0.13 a	5.40 a	1.02 a	0.0167 d	0.0365 d
capim									
mg/mL	%G	IVG	TMG	VG	IA	CR	CPA	MFR	MFPA
0.0	100.00 a	5.04 a	90.39 a	100.00 a	0.00 a	2.88 a	2.18 a	0.124 a	0.0246 a
0.25	85.13 b	4.88 a	81.81 b	91.07 a	-0.09 a	2.64 a	2.14 ab	0.0026 b	0.0244 a
0.50	82.97 b	4.77 a	82.57 ab	88.99 a	-0.11 a	2.32 ab	2.02 ab	0.0024 b	0.0215 ab
0.75	70.48 c	3.88 b	87.06 ab	72.95 b	-0.27 b	2.28 ab	1.86 b	0.0022 b	0.0181 bc
1.0	64.15 c	3.5 b	85.75 ab	65.91 b	-0.34 b	1.86 b	1.40 c	0.0011 c	0.0131 c

Nota: Os parâmetros analisados foram porcentagem de germinação (%G), determinado em %; índice de velocidade de germinação (IVG); tempo médio de germinação (TMG), em horas; velocidade de germinação, em porcentagem; índice de alelopatia (IA), em %; comprimento da raiz (CR), em centímetros (cm), comprimento da parte aérea (CPA), em centímetros (cm); massa fresca da raiz (MFR), em grama e massa fresca da parte aérea (MFPA), em grama. As médias seguidas pela mesma letra, em uma coluna e em um mesmo tratamento ou comparado com o controle, não diferem estatisticamente entre si. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias analisadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

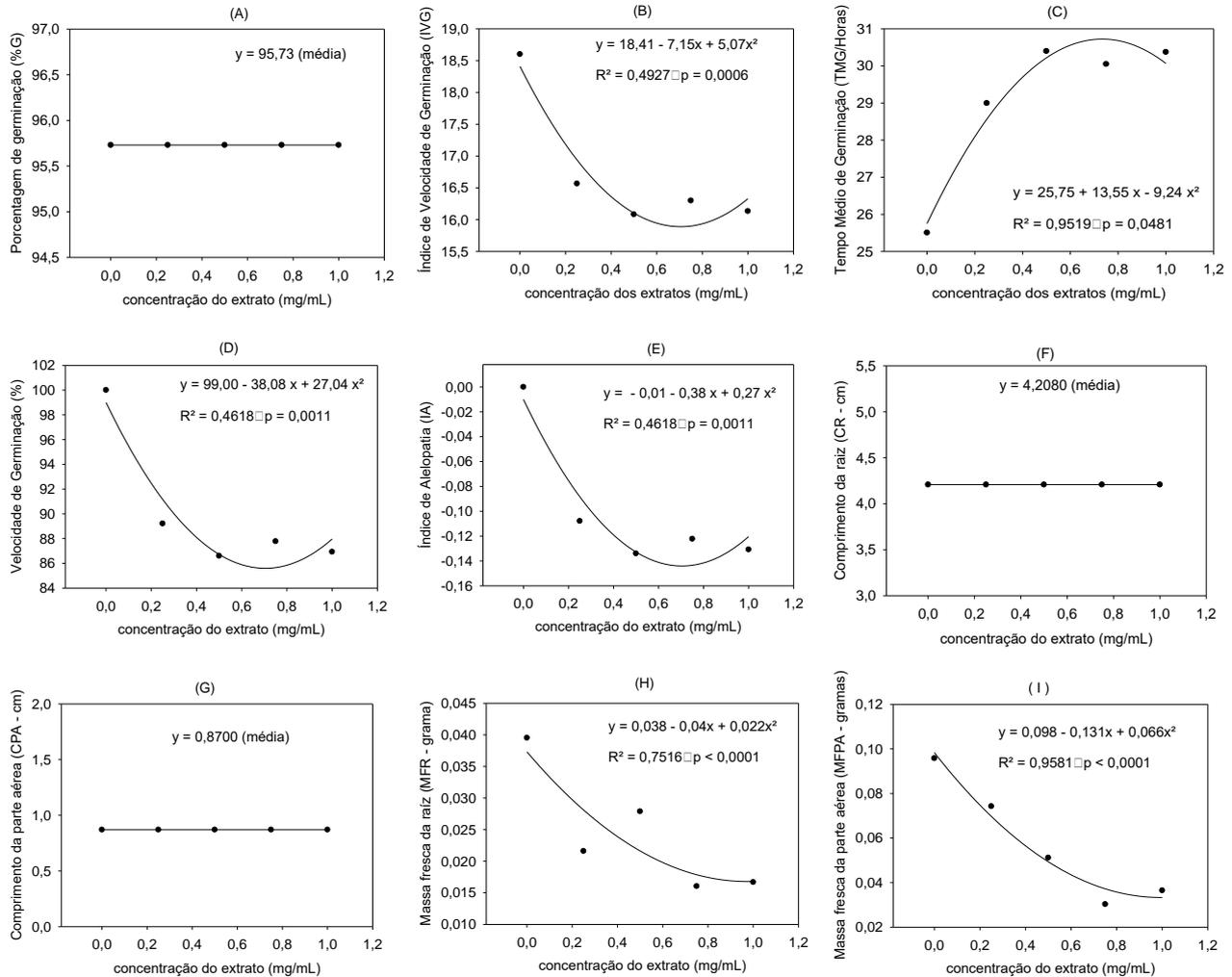


Figura 1: Gráficos representativos da regressão linear das variáveis em estudo em função da concentração da fração acetato de etila. Concentrações analisadas: 0,25, 0,50, 0,75 e 1,0 mg/mL. Variáveis representadas: A - porcentagem de germinação (%G) em porcentagem relativa; B - índice de velocidade de germinação (IVG); C - tempo médio de germinação (TMG) em horas; D - velocidade de germinação (VG) em porcentagem; E - índice de alelopatia (IA); F - comprimento da raiz (CR) em centímetros; G - comprimento da parte aérea (CPA) em centímetros; H - massa fresca da raiz (MFR) em grama; I - massa fresca da parte aérea (MFPA) em gramas. A análise de regressão foi realizada usando o programa SigmaPlot.

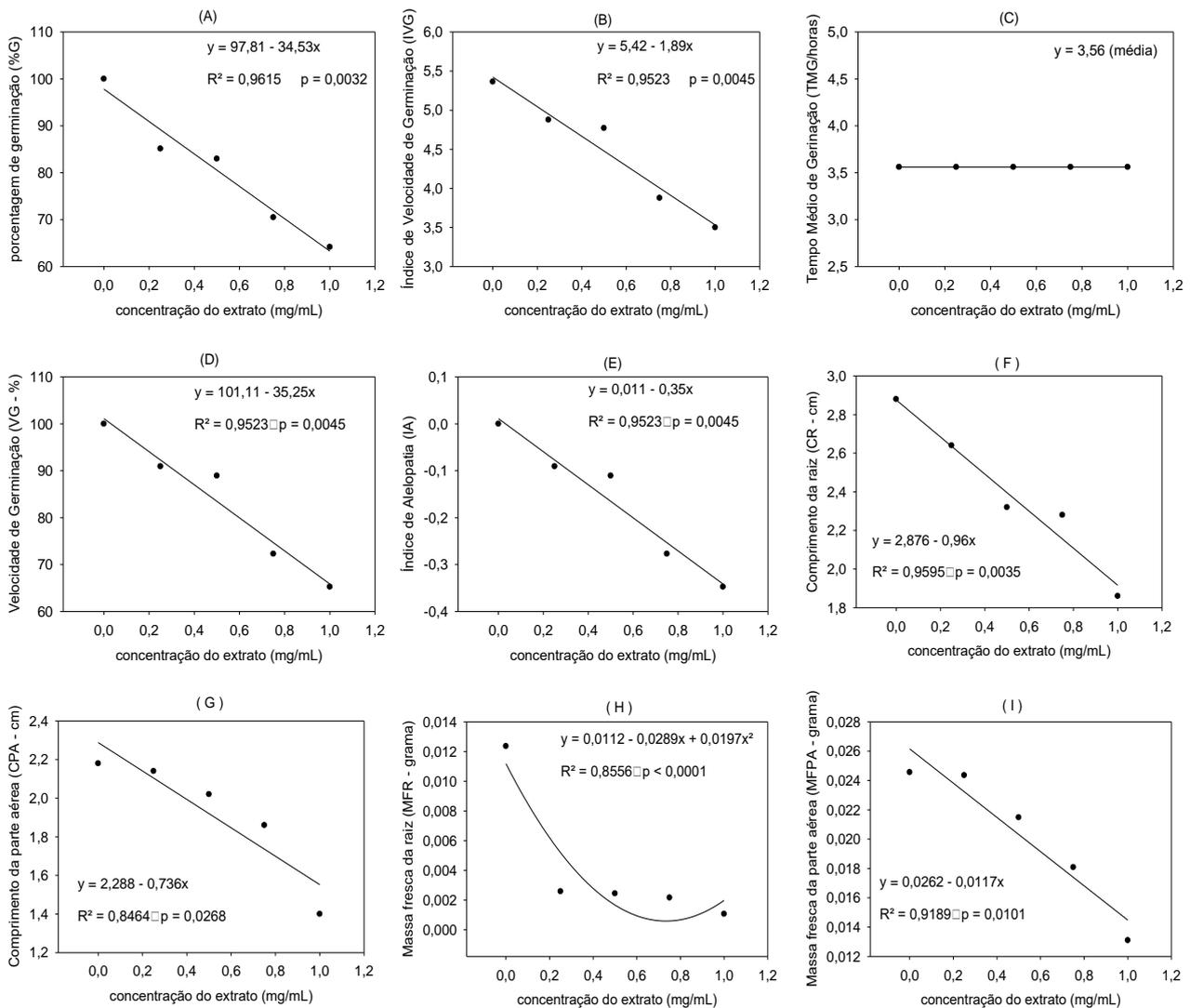


Figura 2: Gráficos representativos da regressão linear das variáveis em estudo em função da concentração da fração acetato de etila. Concentrações analisadas: 0,25, 0,50, 0,75 e 1,0 mg/mL. Variáveis representadas: A - porcentagem de germinação (%G) em porcentagem relativa; B - índice de velocidade de germinação (IVG); C - tempo médio de germinação (TMG) em horas; D - velocidade de germinação (VG) em porcentagem; E - índice de alelopatia (IA); F - comprimento da raiz (CR) em centímetros; G - comprimento da parte aérea (CPA) em centímetros; H - massa fresca da raiz (MFR) em grama; I - massa fresca da parte aérea (MFPA) em gramas. A análise de regressão foi realizada usando o programa SigmaPlot.

A análise de atividade enzimática foi realizada apenas com o extrato acetato de etila, selecionado como mais promissor, para sementes de alface e capim colômbio. Foram analisadas as atividades enzimáticas mensuradas em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína. As enzimas analisadas foram a catalase (CAT), a peroxidase (POX) e a superóxido dismutase (SOD). Houve aumento significativo nas atividades da CAT, POX e SOD nas sementes da alface submetidas ao extrato de acetato de etila (Figura 3). Observou-se diminuição significativa, da atividade da CAT e SOD em sementes de capim colômbio. Não houve diferença significativa na atividade da POX em relação ao controle (Figura 4).

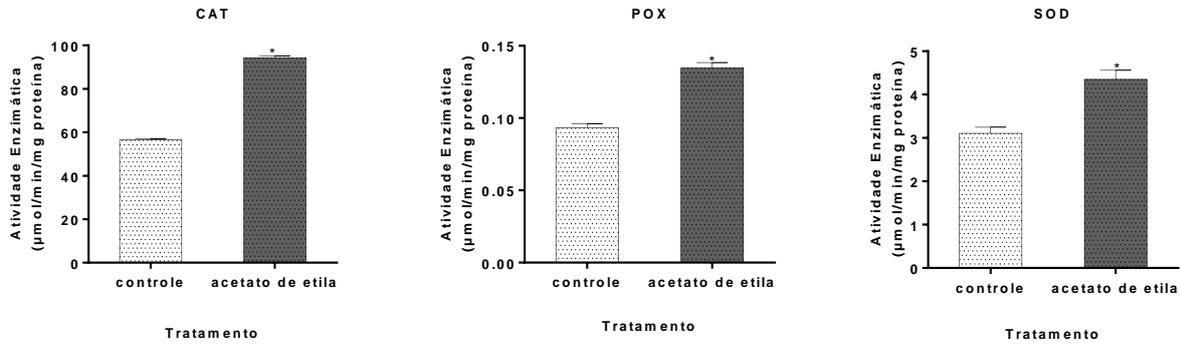


Figura 3: Atividade enzimática de CAT, POX e SOD, em sementes de *Lactuca sativa*, submetidas ao tratamento controle e ao extrato acetato de etila, na concentração 0,75mg/mL. O asterisco (*) indica resultados significativos do extrato em relação ao controle. Foi utilizado teste T.

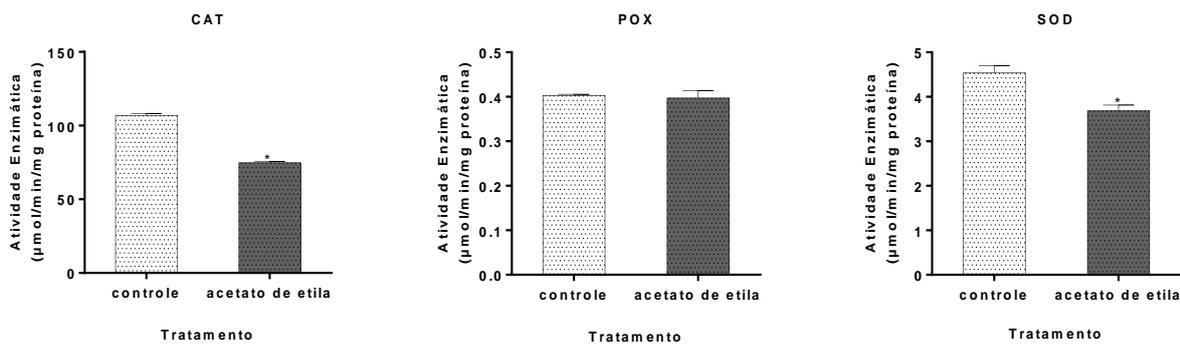


Figura 4: Atividade enzimática de CAT, POX e SOD, em sementes de *Panicum maximum*, submetidas ao tratamento controle e ao extrato acetato de etila, na concentração 0,75mg/mL. O asterisco (*) indica resultados significativos do extrato em relação ao controle. Foi utilizado teste T.

Para melhor compreensão dos mecanismos danosos da fração acetato de etila sobre a planta invasora, verificou-se o teor dos pigmentos clorofila a, clorofila b e carotenoides, clorofilas totais, a relação clorofila a/b e a relação clorofila total/carotenoides. Houve aumento significativo de todos os pigmentos e relações analisadas, exceto na relação clorofila a/b, que mostrou manutenção da relação, indicando aumento proporcional dos dois tipos de clorofila. Pode ser verificada também uma diminuição significativa da relação clorofila total/carotenoides, indicando um maior aumento do teor de clorofilas do que de carotenoides (Tabela 5).

Tabela 5: Teor de pigmentos medidos em plântulas de capim colônia germinadas com tratamento controle e com extrato acetato de etila (0,75mg/mL). Os resultados foram submetidos ao teste T com 5% de probabilidade. As letras em uma mesma linha indicam resultados estatisticamente significativos.

VARIÁVEIS	CONTROLE	FRAÇÃO ACETATO
Clorofila a (mg g ⁻¹ MS)	4,94 ± 0,00 a	5,73 ± 0,02 b
Clorofila b (mg g ⁻¹ MS)	2,58 ± 0,00 a	3,00 ± 0,07 b
Clorofila Total (mg g ⁻¹ MS)	7,52 ± 0,00 a	8,73 ± 0,00 b
Carotenoides (mg g ⁻¹ MS)	1,50 ± 0,00 a	1,66 ± 0,03 b
Clorofila a/b	1,91 ± 0,00 a	1,91 ± 0,00 a
Clorofila total/carotenoides	5,02 ± 0,00 a	5,26 ± 0,00 b

3.2 Perfil fitoquímico

Por meio da prospecção fitoquímica feita por CCD identifica-se que o extrato etanólico de folhas de *Clusia fluminensis* apresenta alcaloides, antrocenos, cumarinas, esteroides e triterpenos, lignanas, monoterpenos e diterpenos, além de demonstrar a ausência de antraquinonas e naftoquinonas. As frações obtidas apresentaram uma diversidade menor de metabólitos secundários, quando comparadas ao extrato etanólico (bruto). As fração hexano apresentou flavonóides, esteroides e triterpenos, lignana, monoterpeno e diterpeno e a fração diclorometano apresentou alcaloides, esteroides e triterpenos, lignana, monoterpeno e diterpeno. A fração acetato de etila apresentou antraceno, cumarina, flavonoides e lignanas. A fração butanol apresentou antraceno e flavonoides apenas, bem como a fração aquoso apresentou cumarinas e flavonoides apenas (Tabela 6).

Tabela 6: Prospecção fitoquímica inicial por meio de cromatografia de camada delgada (CCD) dos extratos obtidos de folhas de *Clusia fluminensis* e suas frações.

Compostos	Extratos					
	Bruto	Hexano	Diclorometano	Acetato de etila	Butanol	Aquoso
Alcaloide	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
Antraceno	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
Antraquinona	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Cumarina	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
Flavonóide	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)
Esteróides e triterpeno	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
Lignana	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
Mono e diterpeno	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
Naftoquinona	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

4. DISCUSSÃO

Visando uma análise fisiológica que permita resultados conclusivos quanto ao possível efeito alelopático, há a necessidade da isenção de fatores que possam mascarar os verdadeiros resultados alelopáticos, desta forma, a análise de pH e potencial hídrico (PW) se faz necessário.

A verificação do pH é importante, pois os extratos podem conter solutos como açúcares, ácidos orgânicos e aminoácidos que podem proporcionar valores extremos de pH e mascarar o efeito alelopático dos extratos (Ferreira & Aquila 2000).

Os valores de pH dos diferentes extratos apresentaram-se em uma faixa que varia de 3,94 a 6,05 (Tabela 2), havendo diminuição do pH à medida que a concentração dos extratos aumentava. O pH da água destilada (controle) ficou em 6,16. É descrito que valores de pH igual ou inferior a 3,0 ou igual e superior a 9,0, exercem efeitos depressivos sobre a germinação e o crescimento da radícula (Rao & Reddy, 1981; Eberlein, 1987; Pattnaik & Misra, 1987). Os valores de pH dos extratos testados permitem concluir isenção deste fator nos experimentos, e qualquer resultado inibitório ou estimulante pode ser atribuído aos efeitos dos extratos.

Sabe-se que potenciais hídricos acima de -0,4Mpa e -0,8Mpa não afetam a germinação de sementes de *Lactuca sativa* (Bertagnolli et al., 2003) e *Panicum maximum* (Belido et al., 2016), respectivamente. A variação do potencial hídrico do extrato e suas frações foi de -0,35Mpa a 0,30Mpa, portanto, todos os valores de potencial hídrico dos extratos utilizados estão fora da faixa de possível estresse de natureza osmótica para as sementes da alface e do capim colônio, sendo então, possível afirmar que tal variável não teve influência sobre a germinação e/ou desenvolvimento das plântulas teste.

O presente trabalho tem como objetivo principal a busca de eventuais extratos ou compostos com atividade alelopática que sejam uma alternativa natural ao uso de herbicidas sintéticos. Desta forma, foi feita uma seleção que pudesse filtrar a diversidade de extratos pesquisados até a obtenção do considerado mais promissor para a finalidade desejada. Nesse sentido, o extrato mais promissor para controle biológico por meio da ação alelopática é o extrato que menos influencie na cultivar (alface), e ao mesmo tempo, iniba o crescimento da daninha ou invasora, neste caso o capim colônio. Os critérios utilizados para a seleção do extrato mais promissor foram os resultados obtidos para a germinação e o crescimento inicial. Após o reconhecimento desse extrato passou-se a discutir os resultados dele apenas.

A preparação do extrato inicial (extrato etanólico) foi realizada visando a coleta de uma maior variedade de compostos que pudessem trazer um efeito alelopático ou fitotóxico nos experimentos que se seguem. Quando se pretende identificar e isolar um composto químico vegetal com potencial herbicida, os extratos alcoólicos como o metanólico e etílico, por serem polares, se tornam mais eficientes, por extraírem mais substâncias dos tecidos das plantas (Inderjit & Dakshini, 1995), desta forma foi feita a extração inicial dos metabólitos presentes nas folhas de *C. fluminensis* com etanol, seguindo posterior

fracionamento do extrato com os solventes que pudessem selecionar diferentes grupos de metabólitos para análise de efeitos alelopáticos. A separação das frações foi estabelecida em ordem crescente de polaridade com o intuito de selecionar metabólitos com características compatíveis com os solventes utilizados.

Ao submeter as sementes de alface e capim aos tratamentos com o extrato etanólico e as frações foi constatado que além de ter sido a fração com menor influência na alface, apresentou os resultados mais deletérios para o capim. A fração acetato de etila não influenciou a %G, no TMG e CPA da alface, diferente do capim que teve todas essas variáveis de germinação prejudicadas, além do IVG, VG e IA.

Em relação ao %G é reconhecido que quanto maior for o percentual, maior será a uniformidade e distribuição das plantas o que sugere melhor produtividade (Krzyzanowski et al., 2018). A não interferência no %G da alface e maior interferência no capim sugerem que a fração acetato de etila pode atuar como um modulador que promova menor população de capim sem interferir na alface. A diminuição do TMG pode representar uma estratégia para estabelecimento mais acelerado da planta no meio de germinação, o que neste caso pode ser prejudicial por expor a planta a um ambiente desfavorável ao seu desenvolvimento (Ferreira & Borghetti, 2004). O aumento do TMG indica um atraso de geminação, o que sugere ajuste para que as plantas encontrem melhores condições em um ambiente alterado (Laboriau & Agudo, 1987). A alface não teve alteração significativa de TMG, sugerindo que a presença da fração acetato de etila não gerou resposta adaptativa para o desenvolvimento inicial. Em contrapartida, houve uma resposta de diminuição do TMG do capim, fazendo com que a planta seja exposta a um ambiente hostil precocemente, reforçando a ação danosa da fração acetato de etila.

Segundo Ferreira & Borghetti, 2004, o enfraquecimento da semente causa perda progressiva na capacidade produtiva, com a redução na uniformidade da germinação, daí a necessidade de se avaliar o vigor das sementes, o que é feito pelo IVG e VG (Maguire, 1962; Nakagawa, 1999). Menores IVG e VG permitem que se possa reconhecer a diminuição do vigor das sementes de capim colônio devido ao efeito tóxico do extrato (Tabela 4). De acordo com Fenner (2000), o tempo de germinação é um fator determinante para a sobrevivência das plântulas, trazendo consequências no crescimento e nos estágios subsequentes do desenvolvimento, assim, alterações na velocidade de germinação podem gerar consequências ecológicas significativas. Além disso, sementes de germinação mais lenta podem gerar plântulas menores, o que influencia no processo de competição por recursos tornando essas plantas mais suscetíveis a estresses e predação, e,

consequentemente, apresentando menor chance de sobrevivência (Jefferson & Pennachio, 2003).

Outro fator levado em consideração para a seleção do extrato foi o índice de efeito alelopáticos (IA), que indica estímulo quando apresenta valores positivos em relação ao controle e valores negativos indicam inibição demonstrando a ação alelopática (Khong et al., 2002; Abdelgaleil e Hashinaga, 2007), podendo ser verificado a partir de algumas variáveis de germinação, como %G, IVG, VG ou outro parâmetro do processo (Ferreira e Aquila, 2000). O IA demonstra que a fração acetato e etila apresenta efeito alelopático significativo sobre o capim colônia (Tabela 4).

A diminuição do %G e aumento do TMG, somado a diminuição do IVG e da VG, indicando uma perda de vigor nas sementes, e índice de alelopátia compatível com efeito alelopáticos, podem ser um indicativo de que a presença da fração acetato de etila exerça influência sobre mecanismos fisiológicos, os quais manifestam-se nos resultados observados dessas variáveis. O efeito sobre a atividade enzimática pode ser um mecanismo influenciado levando a diminuição da qualidade fisiológica das sementes de capim colônia. A investigação das possíveis rotas de ação aleloquímica pode levar ao entendimento de como o desenvolvimento do capim colônia está sendo severamente afetado pelo tratamento, levando a diminuição de uma ação competitiva que essa invasora/daninha poderia exercer sobre uma eventual cultivar.

Os resultados de influência desse extrato sobre a germinação estão adequados ao desejado para um eventual herbicida que traga menor influência para a espécie cultivar de interesse econômico e ao mesmo tempo promova resistência ou danos ao desenvolvimento da daninha/invasora.

Ferreira & Borghetti (2004), relatam que o efeito alelopático não se dá apenas sobre a porcentagem de germinação final, e que pode estar relacionada a outro parâmetro, como por exemplo, o comprimento médio da raiz primária, e, segundo Ferreira e Áquila (2000), a germinação pode ser menos sensível aos aleloquímicos que o crescimento da plântula. Desta forma, a análise do crescimento inicial também se torna um critério importante a ser avaliado para confirmação do extrato acetato de etila como o mais eficaz para o objetivo deste trabalho.

A fração acetato de etila reduziu significativamente o comprimento de raiz (CR) e da parte aérea (CPA) do capim colônia (Tabela 4), com perda de 16,67% e 11,93%, respectivamente. Em ambos casos houve diminuição progressiva dos comprimentos a partir de 1mg/mL para CR e de 0.75mg/mL para CPA (Tabela 5). A análise de regressão realizada segue o um modelo polinomial linear, com R^2 acima de 95% para CR e acima de

84% para CPA e descreve uma relação dose dependente em ambas variáveis analisadas (Figura 2 – F e G). Esses resultados corroboram a escolha do extrato acetato de etila como o mais promissor entre os estudados. Para a alface, a análise de regressão demonstrou não haver distinção entre a concentração utilizada, indicando não haver significância do tratamento sobre a alface, seguindo o desejado para o propósito deste trabalho.

Os resultados mais marcantes para a raiz do que para a parte aérea é perfeitamente justificável pelo fato de haver um maior contato do extrato com a raiz. Correia et al. (2005), destacam que os aleloquímicos são concentrados e absorvidos pelo tecido radicular, devido ao maior contato com o substrato, desta forma, espera-se que a resposta da radícula por substâncias alelopáticas seja mais significativa. Além disso é reconhecido que o alongamento radicular depende das divisões celulares, que podem ser comprometidas e inibidas por ação de aleloquímicos, comprometendo o desenvolvimento radicular normal (Hoffmann et al., 2007).

Foram observadas alterações anatômicas nas raízes, com regiões de escurecimento e necrose, o que leva a percepção de que aleloquímicos presentes no extrato possam estar trazendo modificações radiculares. Pires e Oliveira (2001) descrevem que o escurecimento e endurecimento da raiz, durante o desenvolvimento da plântula, representam algumas das alterações secundárias da alelopatia, sendo elas reflexo de alterações que se estabelecem em nível celular. Reigosa et al. (2006) relatam que os aleloquímicos podem exercer efeitos na rizosfera, desencadeando mudanças na relação água-planta, promovendo distúrbios nas membranas celulares das raízes, causando diminuição significativa da biomassa vegetal e área foliar.

De acordo com Gatti et al. (2004) a ação de vários aleloquímicos se faz pela inibição e modificação nos padrões de desenvolvimento das plantas, ou em ambos. Segundo Rodrigues et al. (1999), os compostos alelopáticos são inibidores de germinação e crescimento, pois interferem na divisão celular, permeabilidade de membranas e na ativação de enzimas.

Os resultados obtidos de diminuição de massa fresca tanto em alface quanto em capim (tabelas 3 e 4) podem ser reflexo da resposta fisiológica desencadeada por aleloquímicos presentes nos extratos vegetais. Em relação a alface foi constatada uma relação polinomial quadrática tanto para MFR quanto para MFPA, com R^2 acima de 75% para MFR e acima de 95% para MFPA e concentrações mais danosas 0,91mg/mL e 0,99mg/mL, respectivamente. Em relação ao capim colônio a regressão linear mostrou um comportamento polinomial quadrático para a MFR, com concentração mais danosa 0,73mg/mL e comportamento polinomial linear para MFPA e relação dose dependente. Os

resultados demonstraram que há influência significativa sobre o desenvolvimento das plantas teste, de modo a promover perdas de massa. As médias de perdas para MFR foram de 40% na alface e 66,94% no capim colônia, enquanto as médias de perdas de MFPA foram de 39,58% na alface e 17,48% no capim colônia.

Em diversos estudos realizados, o que se tem observado é um efeito alelopático mais drástico sobre o desenvolvimento inicial de uma plântula alvo quando comparado à germinação, já que na germinação se utiliza reservas da própria semente (Áquila, 2000). É evidente a perda na massa fresca das plântulas, tanto de alface como de capim colônia, com uma perda de massa bem mais marcante nas raízes do capim. Apesar dos resultados sobre a germinação e sobre o crescimento inicial terem sido favoráveis, ao se comparar os efeitos sobre a cultivar e sobre a daninha/invasora, fica evidente que a interferência dos extratos na massa fresca pode comprometer a viabilidade futura de ambas espécies testadas.

O isolamento, caracterização e quantificação de substâncias com potencial alelopático representa uma etapa fundamental para a determinação da atividade biológica individual ou em conjunto com outras substâncias (Trezzi et al, 2005), desta forma se faz necessário a utilização de técnicas que permitam a identificação de classes de compostos químicos presentes nos extratos.

O uso da técnica de cromatografia de camada delgada (CCD) permitiu uma identificação inicial dos metabólitos presentes em cada um dos extratos produzidos (Tabela 6), possibilitando associar os resultados dos testes a presença de diferentes aleloquímicos. Vale ressaltar a ausência de antroquinonas e naftoquinonas em todos os extratos, porém esse resultado não é conclusivo de que tais metabólitos não estão presentes na espécie estudada, até porque a presença de antraceno, que pode ser oxidado a antraquinona, corrobora a possibilidade da presença desses compostos na espécie.

Gobbo-Neto e Lopes (2007) relatam a influência de variações temporais e espaciais no conteúdo e proporções relativas de metabólitos secundários em plantas, com possíveis alterações em consequência da interação de fatores bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos, sem muitos conhecimentos relativos a essas interações, mesmo havendo um controle genético voltado a produção inicial dos metabólitos.

É descrito que a família Clusiacea apresenta biflavonóides, cumarinas, xantonas e, principalmente, benzofenonas como os principais compostos oriundos do metabolismo secundário, sendo eles biossintetizados como mecanismos de defesa da planta (Acuña; Jancovski; Kennelly, 2009). Espécies do gênero *Clusia* possuem benzofenonas verdadeiras, benzofenonas poliiisopreniladas, terpenos, benzoquinonas, flavonoides,

dihidrofenantrenos e ácidos tocotrienolóicos (Oliveira, et al. 1991), além de fontes de benzofenonas polipreniladas (Kumar; Sharma; Chattopadhyay, 2013). Os resultados aqui obtidos estão condizentes com o proposto na literatura que referência a fitoquímica de Clusiaceas.

Tomando por base a presença de antraceno, cumarina, flavonoides e lignana na fração acetato de etila, a presença de compostos com ação alelopática se faz evidente.

No tocante a lignanas, poucos trabalhos identificam o efeito alelopático em plantas, e no geral inconclusivos. Porém, já foram identificadas atividades antitumoral, antiviral, fungicida, inibidora enzimática, antimetabólica etc. (MacRae, 1984). Já os outros metabólitos descritos para o extrato acetato de etila são bem descritos como alelopáticos.

Compostos fenólicos como as cumarinas e os flavonóides são desde outrora associados com o efeito alelopático (Einhellig, 1986). Os flavonóides participam dos processos relacionados à absorção iônica que pode comprometer o gradiente eletroquímico das membranas celulares das raízes (Glass; Dunlop, 1974), e dependendo da concentração poderão promover ou inibir o crescimento de raízes (Macias et al., 1997). Segundo Baratto et al. (2008) as cumarinas podem ser mediadoras de efeitos alelopáticos, sendo apontadas como inibidoras potentes do crescimento de plantas e da germinação de sementes (Rice, 1984; Willis, 2010). A identificação de antraceno, cumarinas, flavonóides e lignana na fração acetato de etila (Tabela 6) permite sugerir que os efeitos obtidos sobre a germinação e sobre o crescimento inicial poderia estar associada a ação alelopática dessa fração, com promoção de efeitos danosos em diferentes alvos nas sementes e nas plântulas de capim colômbio, porém, é evidente que as ações dos diversos aleloquímicos passa por alterações a serem desvendadas de forma mais conclusiva.

Variados processos fisiológicos vegetais podem ser afetados pelos aleloquímicos: germinação das sementes, assimilação de nutrientes, crescimento das plântulas, fotossíntese, síntese proteica, respiração, atividade de enzimas, além da perda de nutrientes pelos efeitos na permeabilidade da membrana celular (Rodrigues et al., 1993; Einhellig, 1995), o que gera a necessidade de buscas de respostas que possam justificar resultados promissores de extratos alelopáticos ou fitotóxicos. Ainda na busca de respostas alelopáticas, Fujii & Hiradate (2007) sugerem que os efeitos alelopáticos causados nas plantas são mediados por substâncias como alcalóides, cumarinas e fenóis, compostos secundários que podem ser liberados por volatilização, lixiviação da parte aérea ou da matéria em decomposição no solo e também por exsudação das raízes (Macias et al., 2003; Fujii & Hiradate, 2007).

Dependendo da concentração dos metabólitos no meio, estes podem afetar negativamente a germinação ou desenvolvimento das plântulas. Entre as responsáveis pela ação alelopática estão os alcaloides, antraquinonas, cumarinas, fenóis, flavonoides, heterosídeos antraquinônicos e cardioativos, taninos e terpenos, devido a toxicidade sobre as células vegetais, alterando a permeabilidade da membrana das células meristemáticas ou atuando em seu citoesqueleto, por exemplo, levando-as à morte (Weir et al. 2004; Fujii & Hiradate 2007; Adams et al. 2011; Mulac & Humpf 2011).

Shilling & Yoshikawa (1987), verificaram, em bioensaio para determinação da atividade alelopática de compostos fenólicos, que a biomassa fresca da parte aérea e das raízes foram as melhores características para se avaliar a fitotoxicidade dos compostos fenólicos. Já, os aleloquímicos podem desencadear mudanças na rizosfera interferindo na relação água-planta, promovendo distúrbios nas membranas das células das raízes, causando diminuição significativa da biomassa vegetal e área foliar (Reigosa et al., 2006).

Visando compreender possíveis mecanismos fisiológicos de ação dos metabólitos presentes no extrato acetato de etila, foram realizadas análises enzimáticas de vias metabólicas de proteção. As enzimas catalase (CAT), peroxidase de fenóis (POX) e superóxido dismutase (SOD) foram analisadas em sementes tratadas com o extrato acetato de etila (Figuras 3 e 4).

Com o surgimento da fotossíntese e o conseqüente acúmulo posterior de oxigênio na atmosfera, ele passou a ser utilizado no metabolismo energético aeróbio proporcionando vantagens adaptativas aos seres aeróbios (Foyer & Noctor, 2000). Porém, junto ao benefício energético, apareceram problemas resultantes do metabolismo aeróbio, como o aparecimento das espécies reativas de oxigênio (EROs). No metabolismo aeróbico a produção de EROs ocorrerá como o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil ($\cdot OH$), e o oxigênio "singlet" (1O_2). Todos eles podem promover danos celulares (Scandalios, 2000).

Todos os tipos celulares estão sujeitos a danos oxidativos, e, ao analisar o mecanismo de proteção de plantas contra tais danos alguns mecanismo enzimáticos e não enzimáticos atuam na detoxificação, estando as enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e peroxidases de fenóis (POX) entre as principais enzimas detoxificantes (Billy et al., 2008). Em plantas as EROs podem ser produzidas em reações ocorridas nas mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos (Foyer & Noctor, 2000), locais onde também agem SOD, POX e CAT (Mittler, 2002; Kim & Kwak, 2010; Dinakar et al., 2012). A ação desses agentes antioxidantes pode evitar que sejam formados, promover a degradação ou o sequestro dos radicais livres, prevenindo as plantas da ocorrência de danos celulares

(Serkedjieva, 2011). Porém, quando sob estresse ambiental e o equilíbrio entre a produção de EROs e a atividade antioxidante é rompido a favor dos compostos oxidantes, ocorrem danos oxidativos nas estruturas celulares (Kim & Kwak, 2010). Logo, a capacidade de acionar mecanismos de defesa antioxidantes pode prevenir o acúmulo de EROs e o estresse oxidativo extremo (Bhattacharjee, 2010).

O aumento significativo da atividade das três enzimas em sementes da alface quando submetidas a fração acetato de etila (0,75mg/mL) mostra resposta enzimática ao estresse ocasionado pelo tratamento. Houve aumento de 66,76% na atividade da CAT, 44,29% na atividade da POX e 40,09% na atividade da SOD.

As SODs são enzimas que catalisam a dismutação de dois radicais superóxido (O_2^-), gerando H_2O_2 e O_2 , sendo consideradas a primeira linha de defesa contra as EROs. Elas participam da modulação do nível de H_2O_2 em cloroplastos, mitocôndrias, citosol e peroxissomos (Mittler, 2002; Bhattacharjee, 2010). O aumento da atividade da SOD é indicativo de que houve aumento na produção de ânion superóxido (O_2^-), produzido pela oxidação parcial do oxigênio molecular (O_2), uma ERO de vida curta, que é transformada, por ação da SOD, em H_2O_2 , um substrato das enzimas POX e CAT. Espera-se que, com o aumento da atividade da SOD, haja uma resposta fisiológica para a eliminação do H_2O_2 produzido, o que se dará pelo aumento da atividade da CAT e da POX, como pode ser constatado nos gráficos apresentados na Figura 3.

Segundo Seigel (1993), a POX tem como uma de suas principais funções a proteção celular contra reações oxidativas, tendo sua atividade, comumente, aumentada em resposta às condições de estresse. Já segundo Dubey (2011), em concentrações relativamente altas de H_2O_2 a atividade da CAT é efetiva, sendo por isso consideradas enzimas fundamentais e indispensáveis para a eliminação de EROs, em especial quando em condições de estresse severo, quando os níveis de H_2O_2 estão mais elevados.

Sementes de capim colonião respondem diferente da alface quando expostas a fração acetato de etila (0,75mg/mL). Ao contrário do ocorrido com a alface, houve diminuição da atividade das três enzimas. Quando comparadas ao controle, a CAT apresentou atividade 30% menor; a SOD atividade 18,79% menor e a POX uma atividade 1,41% menor, neste último caso sem significância estatística (Figura 4).

Em várias situações, os aleloquímicos têm inibido proteinases e enzimas pectolíticas, catalases, peroxidases, fosforilases, celulasas e outras (Rice, 1984), tal como observado nas sementes de capim colonião tratadas com a fração acetato de etila. Assim como o estímulo da SOD leva a formação de H_2O_2 , e, por consequência, uma elevação da

atividade de CAT e POX, uma inibição da SOD levaria a menor formação de H_2O_2 , o que não seria suficiente para sensibilizar aumento de atividade de CAT e POX.

Alguns compostos antioxidantes podem capturar os radicais livres, dentre eles flavonóides e compostos fenólicos (Malencinc et al., 2000). Os flavonoides modulam os níveis de EROs e apresentam efeitos alelopáticos, sendo capazes de inibir a germinação e o crescimento de plantas (Peer & Mutphy, 2007). No extrato acetato de etila foi identificado presença de flavonoides e outros compostos fenólicos. Segundo Buer e Djordjevic (2009) há uma ligação entre os flavonóides e a arquitetura vegetal, de modo que alterações no crescimento e na parte aéreas das plantas podem ser causadas por flavonoides mutantes. Relatam ainda haver três possibilidades para sua ação: efeito direto dos flavonóides em moléculas não identificadas; efeito indireto mediado pela sua habilidade em modular os níveis de auxina ou através da regulação das espécies reativas de oxigênio (EROs) (Buer et al., 2010).

A homeostase das células vegetais pode ser alterada durante as sinalizações de resposta celular ao estresse, e como mecanismos de defesa as plantas tendem a aumentar a concentração e atividade de sistemas antioxidantes (Shi et al., 2014) ou desencadear o mecanismo de morte celular programada, o que se faz importante para a eliminação de células severamente danificadas, sendo que o aumento da concentração das enzimas antioxidantes e a maior atividades das mesmas, nesses casos, podem estar relacionados a uma maior produção de EROs nas células vegetais (Yun et al., 2011). O que irá definir entre potencializar a maquinaria antioxidante ou desencadear a morte celular programada será o equilíbrio entre produção e eliminação de EROs (Yun et al., 2011). Desta forma, podemos propor que a menor atividade da SOD em sementes de capim colômbio no tratamento com a fração acetato de etila pode ser devido a esse balanço entre produção e eliminação das EROs, onde a exposição das sementes ao extrato pode ter promovido uma elevação muito significativa das EROs intracelulares ocasionando o estresse oxidativo que levasse a não promoção de aumento de SOD e sim ao caminho de morte celular ou bloqueio de alguma outra via metabólica que possa levar a tal caminho. O reflexo poderia ser justificado pelas diminuições significativas da emissão de raiz e perda de massa fresca.

Outra possibilidade é reconhecer que uma diferença de sensibilidade do capim colômbio, quando comparado a alface, pode levar a formação de menos EROs, o que promoveria menor atividade de SOD e, por consequência, de CAT e POX. Segundo Bernat et al., (2004), a forma com uma espécie ou cultivar responde à presença dos aleloquímicos no meio varia, podendo algumas espécies expressar maior resistência à ação alelopática.

O nível de dano que determinado estresse pode estar causando à planta também pode ser evidenciado pelo teor de clorofila e conteúdo de carotenoides, uma vez que esses pigmentos estão relacionados com a defesa da planta, de modo que, em situações de estresse desencadeado por herbicidas, as clorofilas totais são destruídas com maior intensidade que os carotenoides (Hendry et al., 1987). A capacidade fotossintética da planta diminui de acordo com o tamanho do estresse a que ela está submetida (Chagas, 2007).

A fotossíntese pode ser prejudicada devido a ação de aleloquímicos que atuam induzindo alterações no conteúdo de clorofila das plantas receptoras (Carmo *et al.*, 2007). Em contrapartida, como consequência à tentativa de aclimação da espécie, pode haver um aumento do teor de clorofila (Marengo & Lopes, 2005). Nos dois casos os efeitos são similares ao que promovem alguns herbicidas em plantas, como por exemplo, as piridazinonas e imidazolinonas (Carmo *et al.*, 2007).

Foi observado elevação dos teores de todos os pigmentos (clorofila a, clorofila b e carotenoides) (Tabela 6), podendo a elevação da clorofila ser uma resposta a aclimação da espécie ao estresse promovido pela fração acetato de etila, estresse esse que pode ser o responsável pela elevação dos teores de carotenoides, uma vez que tais pigmentos exercem atividade protetora antioxidante, promovendo a eliminação de EROs.

É reconhecido que carotenoides possuem capacidade de prevenirem a foto-oxidação das clorofilas (Hendry e Price, 1993), além de possuírem um papel importante na extinção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Krieger-Liszkay, 2004), sendo assim, esse efeito protetivo dos carotenoides, poderia representar um argumento para o não aumento significativo da SOD nas sementes de capim colômbio tratadas com o extrato acetato de etila, levando a crer que a ação antioxidante dos carotenoides pode ter atuado de forma mais rápida do que a resposta fisiológica de ativação ao aumento da atividade da SOD.

Vale o destaque que situações normais de estresse tendem a promover a destruição de clorofilas, o que leva a diminuição do teor de clorofila total, bem como tende a levar à diminuição da relação clorofila/carotenoides, porém os resultados mostram comportamento diferente. Houve um incremento de 16,09% na clorofila total e de 4,78% na razão clorofila/carotenoide, tendo a relação entre as clorofilas a e b permanecido inalterada (Tabela 6). Tais informações mostram que o aumento dos dois tipos de clorofila ocorreu de forma proporcional. O fato de os carotenoides apresentarem a capacidade de prevenir a foto-oxidação das clorofilas e capacidade de extinguir as EROs pode ter influenciado no aumento das clorofilas a e b e, conseqüentemente, na relação clorofila/carotenoide e manutenção da proporção clorofila a / clorofila b.

O incremento dos teores de pigmentos pode ter sido preponderante para a manutenção no comprimento das folhas na concentração 0,75mg/mL (Tabela 4). A diminuição do comprimento foliar na concentração mais elevada, em comparação ao controle, pode ser um indicativo de que concentrações mais elevadas do extrato possam exercer perdas no aparato fotossintético quanto aos pigmentos, porém, essa é apenas uma suposição, pois os testes de pigmentos foram realizados apenas na concentração 0,75mg/mL, já que buscamos avaliar a menor concentração com efeitos significativos para a alelopatia.

5. CONCLUSÕES

A fração acetato de etila de folhas de *Clusia fluminensis* é apontada como a mais promissora como alternativa ao controle de invasoras agrícolas por promover menor influência na cultivar testada (alface) e maior influência na invasora/daninha (capim colonião). Com foco no uso da fração acetato de etila como um herbicida natural, os danos sobre o capim colonião se colocam como os mais importantes em nossos resultados. Os resultados negativos para o capim colonião se mostram significativos a partir da concentração 0,75mg/mL. Apesar dos resultados promissores na germinação e crescimento inicial, os resultados de massa fresca mostraram efeito danoso dos extratos da fração sobre o desenvolvimento das plântulas de alface e capim, o que requer novas avaliações. A análise fitoquímica da fração acetato de etila comprova a presença de aleloquímicos potentes para efeito alelopático, que podem ter afetado a atividade das enzimas CAT, SOD e POX com efeito promotor na alface, e inibidor no capim, o que pode explicar a possível resposta alelopática mais efetiva sobre o capim colonião do que sobre a alface. A elevação das taxas de pigmentos se mostra como uma possível resposta do capim colonião ao efeito danoso do extrato, bem como uma interferência na atividade fotossintética pode ser a responsável por vários danos no crescimento inicial. Ao final concluímos que *C. fluminensis* se mostra como uma espécie promissora para o aprofundamento das pesquisas com finalidade alelopática.

6. REFERÊNCIAS

- Acuña UM, Jancovski N & Kennelly EJ. Polyisoprenylated benzophenones from Clusiaceae: potential drugs and lead compounds. *Current topics in medicinal chemistry*, v. 9, n. 16, p. 1560–1580, 2009.
- Anderson MD, Prasad TK & Stewart CR. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiology*. v.109, p.1247-1257, 1995.
- Apel K & Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, v.55, p.373-399, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15377225>>. Acesso em: 26 fev. 2019. doi: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701.
- Aquila MEA. Efeito alelopático de *Ilex paraguariensis* A. St. -Hil. na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. *Iheringia Série Botânica*, Porto Alegre, v. 53, n. 23, p. 51-66, 2000.
- Balsalobre LC, Gutierrez RC, Comarin MT, Gouveia MC, Pereira BM, Pinto DG & Piliackas JM. Ação alelopática do arilo das sementes de *Passiflora edulis* Sims e *Passiflora alata* Dryand. In: 19ª RAIB, v.68, suplemento 2, 2006. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/biologico/v68_supl_raib/283.PDF>. Acesso em: 30 jan. 2019.
- Baratto L, Lang KL, Vanz DC, Reginatto FH, Oliveira JB & Falkenberg M. 2008. Investigação das atividades alelopática e antimicrobiana de *Mikania laevigata* (Asteraceae) obtida de cultivos hidropônico e tradicional. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18: 577-582
- Beauchamp, C. & Fridovich, I. Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels. *Analytical Biochemistry*, 44, 276-287, 1971.
- Berrie AM, Parker BA, Knights W & Hemdrimn MR. (1968). Studies on lettuce seed germination. I. Coumarin induced dormancy. *Phytochemistry*, 7: 567-573.
- Carmo FMS, Borges EEL & Takaki M. Alelopatia de extratos aquosos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer). *Acta Bot Bras.* 2007;21(3):697-705.
- Caser, M .; Demasi, S .; Caldera, F .; Dhakar, NK; Trotta, F .; Scariot, V. Activity of *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle Extract como um Potencial Bioherbicida para o Manejo Sustentável de Ervas Daninhas em Horticultura. *Agronomy* 2020 , 10 , 965.
- Casimiro GS, Mansur E, Pacheco G, Garcia R, Leal ICR & Simas NK. Allelopathic Activity of Extracts from Different Brazilian Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Cultivars on Lettuce (*Lactuca sativa*) and Weed Plants. *The Scientific World Journal*. 2017. Article ID 2796983. <http://dx.doi.org/10.1155/2017/2796983>.
- Chagas RM. (2007). Alterações fotossintéticas e respostas oxidativas em plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) tratadas com paraquat. Tese (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Piracicaba – SP, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - ESALQ, 82p.
- Chance B & Maehley AC. Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*, v.2, p.764-775, 1955.
- Chou CH & Kuo YL. Allelopathic exclusion of understory by *Leucena leucocephala* (Lam.). *Journal of Chemical Ecology*, v.12, n.1, p.1434-1448, 1986.
-

- Costa DA, Chaves MH, Silva WCS & Cost CLS. Constituintes químicos, fenóis totais e atividade antioxidante de *Sterculia striata* St. Hil. et Naudin. *Acta Amazica*, v.40, n.1, p.207-212, 2010.
- Einhellig FA. Mechanisms and modes of action of allelochemicals. *The science of allelopathy*. New York: John Wiley & Sons, 1986. p. 171-187.
- Foyer CH & Noctor G. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phytologist*, 146:359-388, 2000.
- Gatti AB, Perez SCJGA & Lima MIS. Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. *Acta Botânica Brasilica*, Belo Horizonte, v. 18, n. 3, p. 459-472, 2004. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062004000300006>
- Giannopolitis CN & Ries SK. Superoxide dismutases: Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* 59:309-314, 1997.
- Gobbo-Neto L & Lopes NP. Plantas Medicinais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários. *Química. Nova*, v.30, n.2, p.374-381, 2007.
- Govidarajan R, Madhavan V & Annie S. Studies on the antioxidant activities of *Desmodium gangeticum*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v.26, p.1424-7, 2003.
- Havir EA & Mchale NA. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco-leaves. *Plant Physiology*, v.84, p.450-455, 1987.
- Hemshekhar M, Sunitha K, Santhosh MS, Devaraja S, Kemparaju K, Vishwanath BS, Niranjana SR, Girish KS. Uma visão geral do gênero *Garcinia*: aspectos fitoquímicos e terapêuticos. *Phytochem Rev.* 2011; 10: 325-351.
- Inderjit, Dakshini KMM. On laboratorial bioassays in allelopathy. *Robô. Rev* 61, 28-44 (1995). <https://doi.org/10.1007/BF02897150>
- Krzyzanowski FC, França-Neto JB & Henning AA. A alta qualidade da semente de soja: fator importante para a produção da cultura. *Embrapa. Circular Técnica* 136; Londrina, PR, Mai, 2018. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/177391/1/CT136-online.pdf>>. Acesso em: 31/08/2020.
- Kumar S, Sharma S & Chattopadhyay SK. The potential health benefit of polyisoprenylated benzophenones from *Garcinia* and related genera: Ethnobotanical and therapeutic importance. *Fitoterapia*, v. 89, n. 1, p. 86-125, 2013.
- Lima LARS, Santos LP & Boaventura, MAD. Acetogenins from *Annona cornifolia* and their antioxidant capacity. *Food Chemistry*, v.122, n.4, p.1.129- 1.138, 2010.
- Macías FA, Castelhana D & Molinillo JMG. Search for a standard phytotoxic bioassay for allelochemicals selection of standard target species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.48, p.2512-2521, 2000.
- MacRae WD & Towers GHN. Biological activities of lignans. *Phytochemistry*. Volume 23. Edição 6.: 1207-1220p. 1984.
- Marenco RA & Lopes NF. *Fisiologia vegetal: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral*. Viçosa (MG): Editora UFV; 2005. 451p.
-

- Mariutti LRB & Bragagnolo N. Revisão: Antioxidantes Naturais da Família Lamiaceae - Aplicação em Produtos Alimentícios. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.10, n.2, p.96-103, 2007.
- Mayer AM & Poljakoff-Mayber A. The germination of seeds. New York: Pergamon press, 263p. 1975.
- Morais LAS. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. *Horticultura Brasileira*, v.27, p.4050-4063, 2009.
- Nakagawa, J. Testes de vigor baseados no desempenho de plântulas. In: Krzyzanowski, F.C.; Vieira, R.D.; França Neto, J.B. (Ed.). *Vigor de sementes: conceitos e testes*. Londrina: ABRATES, 1999. cap.2, p.1-24.
- Peixoto PHP, Cambraia J, Sant'anna R, Mosquim PR, Moreira MA. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 11:137-143, 1999.
- Pires MN & Oliveira VR. Alelopatia. Pg. 145- 185. (cap. 5) In: R.S. Oliveira Jr. & J. Constantim. 2011.
- Pivello VR. Invasões biológicas no cerrado brasileiro: efeitos da introdução de espécies exóticas sobre a biodiversidade. *Ecologia Info*, Suécia, n. 33, 2008.
- Rice EL. Allelopathy. 2. ed. New York: Academic Press. 422p. 1984.
- Rodrigues FCMP & Lopes BM. Potencial alelopático de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth sobre sementes de *Tabebuia alba* (Cham.) Sandw. *Série Técnica Floresta e Ambiente*, Rio de Janeiro, v. 8, n.1, p.130 - 136, 1999.
- Rodrigues LRA, Rodrigues TJD & Reis RA. Alelopatia em plantas forrageiras. Guaíba. FCAVJUNESP/ FUNEP, Jaboticabal. 1999
- Rosa DM, Fortes AMT, Mauli MM, Marques DS & Palma D. Potencial Alelopático de *panicum maximum* Jacq. sobre a Germinação de Sementes de Espécies Nativas. *Floresta e Ambiente*, 2011.
- Scandalios JG, Acevedo A & Ruzsa S. Catalase gene expression in response to chronic high temperature stress in maize. *Plant Science*, 156:103-110, 2000.
- Serkedjieva J. Antioxidant effects of plant polyphenols: case study of a polyphenol-rich extract from *Geranium sanguineum* L. In: GUPTA, S.D. *Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants*. Enfield: Science Publishers, 2011. Chap.13, p.275-293.
- Sousa, CMdeM, Silva HR, Vieira-Jr. GM, Ayres MCC, Costa CLSda, Araújo DS, Cavalcante LCD, Barros EDS, Araújo PBdeM, Brandão MS & Chaves MH. (2007). Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova* [online]. 2007, vol.30, n.2, pp.351-355. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200021>. Acesso em 26 Set. 2020.
- Sousa ET, Lopes WA & Andrade JB. Sources, formation, reactivity and determination of quinones in the atmosphere. *Química Nova* 39(4), 2016. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/295689067_Sources_formation_reactivity_and_determination_of_quinones_in_the_atmosphere>. Acesso em 22/02/2019.
- Trevisan RR, Lima CP, Miyazaki CMS, Pesci FA, Silva CB, Hirota BCK, Lordello ALL, Miguel OG, Miguel, MD & Zanin SMW. Avaliação da atividade fitotóxica com enfoque alelopático do

extrato das cascas de *Celtis iguanaea* (Jacq) Sargent Ulmaceae e purificação de dois triterpenos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.14, p.494-499, 2012.

Willis, R.J. *The history of allelopathy*. New York: Springer Verlag, 330p. 2010.

CAPÍTULO 2

FOLHAS DE *Clusia fluminensis* Planck & Triana: UMA ALTERNATIVA AO USO COMO ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETOR

Autores: Flávio Mauricio Perini ⁽¹⁾; • Viviana Borges Corte ⁽²⁾ • Hildegardo Seibert França ⁽¹⁾

(1) Instituto Federal do Espírito Santo, Av. Rio Branco, 50 - Santa Lucia, CEP 29056-255, Vitória, ES, Brasil.

(2) Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Departamento de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, CEP 29075-910, Vitória, ES, Brasil.

*Autor para correspondência: flavio.mauricio.perini@gmail.com

Periódico a ser submetido ou submetido: Rodriguésia – Revista do Jardim Botânico do Rio de Janeiro em novembro de 2020.

RESUMO

A busca de substâncias terapêuticas alternativas leva ao aumento da exploração da biodiversidade visando reconhecer alternativas que possam minimizar impactos e abrir novas perspectivas de exploração biológica. Espécies vegetais de uso paisagístico e ornamental se mostram como alternativa de exploração, visando o aproveitamento de resíduos que naturalmente seriam descartados, como ocorre com a espécie *Clusia fluminensis*. O gênero *Clusia* se enquadra em um grupo de plantas portadoras de metabólitos especiais com potencial a serem explorados com finalidade biológica, como a atividade antioxidante e fotoprotetora. Visando reconhecer potencial antioxidante e fotoprotetor de extratos etanólico e frações hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol e aquoso, obtidos de folhas de *C. fluminensis*, foram realizadas análise de teores de fenóis totais, taninos e flavonoides associando-os aos efeitos pesquisados. Também foi realizada uma pesquisa mais específica de alguns compostos potencialmente bioativos por meio de CLAE e CG/EM, além de ensaios antioxidantes ABTS, DPPH, FRAP e Fosfomolibdênio para reconhecimento de potencial antioxidante do extrato e frações analisados. Os resultados demonstraram presença significativa de fenóis totais, taninos e flavonoides no extrato e nas frações, com destaque para a fração acetato de etila. Análise de CLAE demonstrou a presença de hyperosídeo na fração acetato de etila, de modo a permitir uma correlação à atividade antioxidante mais significativa encontrada nessa fração frente aos ensaios ABTS, DPPH e FRAP. A atividade fotoprotetora se mostrou mais significativa para a fração diclorometano, com FPS 7,01, compatível ao uso como fotoprotetor, além de identificar a fração acetato de etila como um possível efetivador de atividade fotoprotetora devido ao seu efeito antioxidante constatado. Os resultados permitem concluir que a fração acetato de etila obtida de folhas de *C. fluminensis* seria a melhor a ser explorada visando a obtenção e formas naturais de antioxidantes e promotores de fotoproteção, bem como a fração diclorometano se apresentam como alternativa ao uso como FPS.

Palavras chave: antioxidante, fotoproteção, metabólitos especiais, extratos vegetais.

ABSTRACT**WASTE OF *Clusia fluminensis* Planck & Triana: AN ALTERNATIVE TO USE AS AN ANTIOXIDANT AND PHOTOPROTECTOR**

ABSTRACT: The search for alternative therapeutic substances leads to an increase in the exploitation of biodiversity in order to recognize alternatives that can minimize impacts and open new perspectives for biological exploration. Vegetable species for landscape and ornamental use are shown as an exploration alternative, aiming at the use of residues that would naturally be discarded, as occurs with the species *Clusia fluminensis*. The *Clusia* genus fits into a group of plants with special metabolites with potential to be explored for biological purposes, such as antioxidant and photoprotective activity. In order to recognize the antioxidant and photoprotective potential of ethanolic extracts and hexane, dichloromethane, ethyl acetate, butanol and aqueous fractions, obtained from *C. fluminensis* leaves, analysis of the contents of total phenols, tannins and flavonoids was carried out, associating them to the researched effects. More specific research was also carried out for some potentially bioactive compounds by means of HPLC and GC/MS, in addition to ABTS, DPPH, FRAP and Phosphomolybdenum antioxidant tests to recognize the antioxidant potential of the extract and analyzed fractions. The results showed a significant presence of total phenols, tannins and flavonoids in the extract and in the fractions, with emphasis on the ethyl acetate fraction. HPLC analysis demonstrated the presence of hyperoside in the ethyl acetate fraction, in order to allow a correlation to the most significant antioxidant activity found in this fraction compared to the ABTS, DPPH and FRAP assays. The photoprotective activity was more significant for the dichloromethane fraction, with SPF 7.01, compatible with use as a photoprotector, in addition to identifying the ethyl acetate fraction as a possible effector of photoprotective activity due to its antioxidant effect. The results allow us to conclude that the ethyl acetate fraction obtained from *C. fluminensis* leaves would be the best to be explored aiming at obtaining and natural forms of antioxidants and photoprotection promoters, as well as the dichloromethane fraction are presented as an alternative to use as SPF.

Keywords: antioxidant, photoprotection, special metabolites, plant extracts.

1. INTRODUÇÃO

Visando a melhoria da qualidade de vida da população, a rica biodiversidade brasileira vem sendo explorada pela química de produtos naturais em busca de compostos bioativos que possam ser isolados e identificados como substâncias terapêuticas alternativas (Bolzani; Montanari, 2001).

Nesse sentido, o desenvolvimento de estudos com plantas e seus extratos são de grande relevância, considerando a possibilidade da utilização das substâncias ativas naturais (Stein, 2011). Fontes naturais estão disponíveis em abundância e oferecem as melhores possibilidades de encontrar substâncias ativas de interesse terapêutico (COSTA-LOTUFO et al, 2010).

Plantas da família Clusiaceae têm sido motivo de estudos fitoquímicos por apresentarem metabólitos especiais com estruturas diversificadas e com atividades biológicas. Estudos realizados com este grupo de plantas levaram a caracterização de metabólitos especiais pertencentes a várias classes, tais como: benzofenonas, floroglucínóis, biflavonoides, bifenilas e xantonas.1,4-7. Entre as atividades relatadas para substâncias e/ou extratos obtidos de plantas deste gênero, destacam-se as propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas e antioxidantes (Ferreira et al., 2012; Ribeiro et al, 2011; Farias et al., 2012).

Uma fonte natural não atentada é representada pelo que se costuma designar como “lixo”. Neste caso, será designado “lixo” os resíduos obtidos de poda de plantas ornamentais. Resíduos esses que, normalmente, são descartados e que aqui, serão enxergados como matéria prima para pesquisas. Folhas de *Clusia fluminensis*, uma planta tradicionalmente utilizada como ornamental, e cujos resíduos de poda são descartados como lixo, serão utilizadas para produção de extratos vegetais que serão avaliados como alternativa ao uso como antioxidantes naturais e fotoprotetores naturais.

Produtos naturais de origem vegetal têm a capacidade de reduzir o estresse oxidativo, atuando como antioxidantes (Silva et al., 2013), retardando ou prevenindo a oxidação do substrato envolvido nos processos oxidativos impedindo a formação de radicais livres (ROCHA, SARTORI, NAVARRO, 2016; SILVA, SANTOS, CAVALCANTE, 2016). Além da atividade antioxidante o estudo do potencial fotoprotetor tem sido cada vez mais explorado, pois estudos recentes têm demonstrado que compostos de origem vegetal possuem ações fotoprotetoras

(EINSPAHR et al., 2003; ROSA et al., 2008 e ZAID et al., 2009). Desta forma, o desenvolvimento de antioxidantes, de fotoprotetores ou até mesmo de potenciadores de efeito fotoprotetivo naturais se mostram como uma alternativa ao uso dos convencionais já existentes.

Pensando assim, reconhece-se que os métodos de análises de atividade antioxidante *in vitro* têm se tornado relevantes, uma vez que auxiliam na busca por substâncias bioativas, bem como na seleção de matéria-prima para estudo, bem como os testes de fotoproteção *in vitro*, por meio da análise espectrofotométrica, que visam verificar a presença de compostos capazes de bloquear e/ou filtrar radiações (UVA e UVB), vem sendo amplamente utilizados para verificação do potencial fotoprotetor de extratos vegetais (BOBIN et al., 1994; MORLEY et al., 2005; VELASCO et al., 2008; VIOLANTE et al., 2009).

O presente artigo visa reconhecer se os metabólitos especiais presentes em folhas de *Clusia fluminensis* possuem potencial atividade biológica para uso como antioxidantes e fotoprotetores naturais.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material biológico de pesquisa

Folhas maduras e completamente expandidas, escolhidas aleatoriamente de plantas de *Clusia fluminensis* Planck & Triana presentes nos jardins do Instituto Federal do Espírito Santo (IFES) campus Cariacica, foram coletadas de plantas adultas e acondicionadas em sacos de papel, sendo conduzidas para o Laboratório de Sementes e Ecofisiologia de Espécies Florestais (LASEF) do Departamento de Ciências Biológicas na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Após a coleta, foram lavadas visando a retirada de poeira ou outros resíduos. Foram desidratadas em estufa a 40°C, por 120 horas, e trituradas, em liquidificador industrial.

2.2 Maceração e partição dos extratos

Para maceração das partes aéreas trituradas foi utilizado etanol como solvente. Foram utilizadas 500 g das folhas trituradas em um balão volumétrico contendo 1000 mL de álcool etílico absoluto 99,8% P.A. lote 34526 da marca NEON. Após 96 horas o extrato foi rotaevaporado, sendo obtido o extrato etanólico

bruto. O álcool recuperado pelo rotaevaporador foi reutilizado para uma extração à exaustão. O extrato bruto obtido das folhas de *C. fluminensis* foi submetido a um processo de separação fracionada, utilizando para tal, quatro solventes: hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol. Para o procedimento de separação dos extratos foi feita a preparação do material com adição de 100mL de etanol ao extrato bruto visando a dissolução dele. Para melhor dissolução o material foi colocado para dissolver em lavadora ultrassônica digital SoniClean2. Após o material estar totalmente dissolvido, foi transferido para um funil de separação iniciando assim o procedimento de fracionamento, sendo o extrato bruto submetido a fracionamento com extração sequencial com hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol. As frações obtidas foram designadas como fração hexano, fração diclorometano, fração acetato de etila, fração butanoico, e o residual, fração aquoso. De cada fração adquirida, o solvente foi evaporado até à secura. Com os extratos secos obtidos foram realizados os ensaios.

2.3 Análises

2.3.1. Avaliação *in vitro* de Atividade Antioxidante

2.3.1.1. DPPH: capacidade do extrato em doar átomos de hidrogênio e estabilizar o radical livre DPPH•

A análise da atividade antioxidante dos extratos foi realizada por meio do método de captura do radical livre DPPH (RUFFINO et al., 2007), com adaptações. O teste de DPPH• é um método direto para se determinar a atividade antioxidante de um composto, por meio da doação de hidrogênio. Esse método consiste em avaliar a capacidade antioxidante via atividade sequestradora do radical livre DPPH•. O radical DPPH• possui coloração púrpura, absorvendo em um comprimento de onda máximo de aproximadamente 517 nm. As amostras analisadas foram preparadas utilizando 1mL de solução de DPPH 0,1mM e 3mL do extrato etanólico e suas frações, na concentração de 1,0mg/mL. As amostras permaneceram reagindo por 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo de luz até a realização das leituras das absorbâncias das amostras. Para determinação da curva padrão foi utilizado 4mL de solução DPPH nas concentrações de 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 40 μ M, 50 μ M e 60 μ M, com as diluições feitas em metanol. Foi utilizado metanol como branco para calibrar o espectrofotômetro. O estudo foi realizado em triplicatas e as leituras

em cubetas de vidro. A leitura das absorvâncias foi realizada em espectrofotômetro (Biospectro SP-220) no comprimento de onda de 517nm. Utilizou-se o Trolox como padrão antioxidante e os resultados foram expressos em termos da capacidade antioxidante do composto equivalente ao trolox, expresso em valor de TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant).

2.3.1.2. ABTS: Capacidade do extrato em sequestrar o cátion radical livre ABTS^{•+}

Para a atividade antioxidante do extrato etanólico e suas frações por meio da captura do cátion radical ABTS (RUFFINO et al., 2007). Neste ensaio, o ABTS é oxidado, por meio da retirada de um elétron, pelo persulfato de potássio, formando o radical catiônico ABTS^{•+}. Este último possui coloração verde intensa com absorção máxima em 734 nm. Por ação de um antioxidante ocorre a doação de um elétron que reage com o ABTS^{•+} reduzindo a coloração pela formação do ABTS de cor verde clara ou incolor. A solução do radical ABTS foi preparada pela reação do ABTS 7 mM com persulfato de potássio 140 mM. Para completa reação e estabilização do radical, a solução radical ABTS permaneceu ao abrigo de luz, à temperatura ambiente, por um período de 16 horas. Diluiu-se a solução de ABTS em etanol até obter uma absorvância de $0,7 \pm 0,05$ a 734 nm. A curva de calibração do padrão Trolox foi feita nas concentrações de 100, 500, 1000, 1500 e 2000 μM . As concentrações utilizadas para construção da curva de calibração para capacidade antioxidante do extrato etanólico e suas frações foram de 1 mg/mL. Em ambiente escuro foi transferida uma alíquota de 30 μL de cada solução padrão, para tubos de ensaio e adicionados 3,0 mL da solução de radical ABTS. As absorvâncias foram medidas a 734 nm após 6 min de reação, utilizando-se o etanol como branco. Realizou-se o mesmo procedimento para as soluções do extrato etanólico e suas frações. A atividade em capturar o cátion radical ABTS foi expressa em μM trolox/g de extrato, obtida a partir das equações das retas das curvas concentração de Trolox versus absorvância e concentração da amostra versus absorvância (RUFFINO et al., 2007). Utilizou-se o Trolox como padrão antioxidante e os resultados foram expressos em termos da capacidade antioxidante do composto equivalente ao trolox, expresso em valor de TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)

2.3.1.3. Poder antioxidante redutor do ferro (FRAP) dos extratos

No teste FRAP (SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2005), o poder de redução do extrato etanólico e suas frações estudadas foi estimado, resumidamente, processando 900 μL de reagente FRAP, recém preparados e aquecidos a 37°C , foram misturados com 90 μL de água destilada e 30 μL de amostra (1,0 mg/mL) de teste ou branco de reagente padrão ou apropriado. O reagente FRAP continha 2,5 ml de uma solução TPTZ 10 mM em HCl 40 mM, mais 2,5 ml de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM, mais 25 ml de tampão acetato 0,3 mM, pH 3,6. Realizou-se as leituras a 595 nm, sendo realizadas a cada 15s, utilizando um espectrofotômetro Beckman DU-640 (Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, EUA) equipado com um suporte de célula auto termostato. A temperatura foi mantida a 37°C . As leituras aos 30 min foram selecionadas para o cálculo dos valores de FRAP. A curva padrão foi feita substituindo a alíquota da amostra por uma alíquota de 10 μL de Trolox em concentrações de 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5, 1,75 e 2,0 μMol de Trolox. Soluções metanólicas de concentrações conhecidas de trolox foram usadas para calibração. Os resultados antioxidantes foram expressos em equivalentes μmol de trolox / g de extrato.

2.3.1.4. Capacidade antioxidante total pelo método do fosfomolibdênio (TAC-fosfomolibdenio)

A capacidade antioxidante total (TAC) do extrato etanólico e suas frações hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol foi avaliada pelo método do fosfomolibdênio (PRIETO et al., 1999). Uma alíquota de 300 μL (1 mg / mL) do extrato e de cada fração foi adicionada em 3 mL de solução reagente contendo (ácido sulfúrico 0,6 M, fosfato de sódio 28 mM e molibdato de amônio 4 mM). A solução da mistura foi sujeita a incubação em banho-maria a 95°C por 90 min. A absorbância foi medida a 695 nm com espectrofotômetro UV/VIS. A capacidade antioxidante total foi expressa em equivalentes ao ácido ascórbico (μg EAA / mg).

2.3.2. Atividade Fotoprotetora

A atividade fotoprotetora foi avaliada *in vitro* através da determinação do comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máximo}}$) e da absorbância máxima ($A_{\text{máxima}}$). Os

extratos secos foram diluídos em Metanol ($0,1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ p/v) e realizada varredura entre os comprimentos de onda de 260 a 400 nm (Espectrofotômetro FEMTO, modelo 800XI, em cubeta de quartzo de 1,0 cm caminho óptico), para verificar a absorção nas regiões ultravioleta A e B (UVA e UVB). O Metanol absoluto PA foi utilizado como branco e o experimento realizado em triplicata.

Cálculo do Fator de Proteção Solar (FPS)

O cálculo do fator de proteção solar (FPS) foi obtido de acordo com a equação desenvolvida por Mansur et al, 1986.:

$$\text{SPF}_{\text{spectrophotometric}} = \text{CF} \times \sum_{290}^{320} \text{EE}(\lambda) \times I(\lambda) \times \text{Abs}(\lambda)$$

Onde: CF = fator de correção (10), referente a um FPS = 4; EE (λ) = efeito eritemogênico da radiação; I (λ) = intensidade do sol; Abs (λ) = leitura espectrofotométrica da absorbância do extrato. Os valores do efeito eritemogênico da radiação - EE (λ) e intensidade do sol - I (λ) utilizados para o cálculo do FPS foram os mesmos usados na literatura.

2.3.3. Determinação de Fenóis Totais

Utilizou-se metodologia de Waterhouse (2002). Para a quantificação de fenóis nas amostras, foi retirado 0,2 mL de cada extrato (1mg/mL), acrescido de 0,5 mL da solução de Folin-Ciocalteu a 10% (v/v), 1,0 mL da solução de carbonato de sódio a 7,5% (P/V) e 8,4 mL de água, tendo sido protegidos da luz; após 30 minutos, foi medida a absorbância em espectrofotômetro, a 760 nm. Como branco foi feita a substituição da alíquota da amostra por metanol. O mesmo procedimento foi adotado para as soluções-padrão de ácido gálico, nas seguintes concentrações: 100–50–25–12,5–6,25–3,125–1,56–0,78 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. As determinações foram realizadas em triplicata e o resultado expresso em equivalente de ácido gálico por miligrama de matéria seca (μg EAG/mg).

2.3.4. Determinação de Taninos

As análises dos extratos foram realizadas para determinação de fenóis totais pelo método Folin-Ciocalteu e os taninos totais, pelo método da precipitação da caseína (FOLIN e CIOCALTEAU, 1927; MUELLER-HARVEY, 2001; QUEIROZ et al., 2002; SEIGLER et al., 1986; READEL et al., 2001). Alterações no método foram

inseridas visando à adequação aos teores de compostos fenólicos e taninos encontrados em cada espécie. Os taninos foram determinados pelo método da precipitação pela caseína, que consistiu em adicionar a um erlenmeyer de 50 mL 1 g de caseína em pó e alíquotas de 6 mL do extrato diluído em 12 mL de água, que foram mantidos sob agitação constante por três horas na temperatura ambiente (25 °C). Depois, as amostras foram filtradas em papel-filtro Whataman de 9 cm e o volume do filtrado resultante, completado para 25 mL. Alíquotas variando de 8 a 12 mL foram removidas dessa solução e os fenóis residuais determinados pelo método Folin-Ciocalteu. A quantidade de taninos correspondeu à diferença entre o valor encontrado nessa leitura e o obtido na determinação de fenóis totais. As determinações foram realizadas em triplicata e o resultado expresso em equivalente de ácido gálico por miligrama de matéria seca ($\mu\text{g EAG/mg}$).

2.3.5. Determinação de Flavonoides Totais

O conteúdo total de flavonoides do extrato etanólico de folhas de *Clusia fluminensis* e suas frações foi realizado pelo método colorimétrico de cloreto de alumínio adotado por Djeridane et al. [15]. Um volume de 1,5 mL de solução de AlCl_3 2% em etanol foi misturado com 1,5 mL de solução de amostra (1mg/mL). Após incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, a absorbância foi medida a 415 nm com espectrofotômetro UV / VIS (Thermo, Waltham, MA, EUA). Para o branco foi utilizado o etanol em substituição a amostra. A quercetina foi utilizada como padrão para a curva de calibração e os resultados foram expressos como equivalentes de quercetina ($\mu\text{g EQ/mg}$).

2.3.6. CLAE

As análises realizadas por CLAE foram realizadas em método único no laboratório LABPETRO da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). A metodologia conta com um volume de injeção de 10 μL e uma vazão de 1 mL min^{-1} . As amostras e os padrões foram solubilizados em metanol (em concentração para análise CLAE). O método se inicia com uma concentração de água de 100%, sendo esta variada de 100 % para 50 % em 45 minutos, sendo tal concentração mantida por 10 minutos, posteriormente a concentração retorna para 100 % em 10 minutos, sendo tal concentração mantida por mais 10 minutos. Para estas análises

foi utilizado como fase móvel, além da água, a acetonitrila (em concentração para análise CLAE). Trata-se de uma metodologia que envolve análise apenas dos extratos obtidos de solventes polares, desta forma, foram feitas análise com o extrato etanólico e as frações acetato de etila, butanol e aquoso.

2.3.7. Cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa (CG/EM)

A Cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG/EM) foi realizada em um equipamento Agielant no laboratório de cromatografia do LABPETRO da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). A coluna utilizada no processo cromatográfico foi uma HP-5 de 30m x 250µm x 0,25µm. O injetor foi ajustado para uma temperatura de 290°C e o detector para 310°C. A eluição foi em uma rampa de aquecimento iniciando a 40°C com taxa de aquecimento de 5°C/min até 280°C, seguido com taxa de aquecimento de 15°C/min até 310°C. Para caracterização foi utilizado padrão de alcano de C10 a C40. A identificação das substâncias foram realizadas através da comparação dos espectros de massas da biblioteca NIST com os índices de retenção e semelhança dos espectros de massas com dados da literatura (ADAMS, 2009; THE PHEROBASE-DATABASE, 2020; CHEMISTRY WEBBOOK, 2020).

2.4 *Delineamento experimental e análise estatística*

Os experimentos foram conduzidos por um delineamento inteiramente casualizado (DIC). A análise estatística dos resultados dos experimentos foi realizada a partir da análise de variância (ANOVA) seguida do teste de comparação de médias de Tukey ($p \leq 1$ e 5%).

3. RESULTADOS

3.1 *Atividade antioxidante: ABTS, DPPH, FRAP, TAC-fosfomolibdênio*

Os testes antioxidantes, *ABTS*, *DPPH*, *FRAP* e *TAC-fosfomolibdênio*, mostraram atividade antioxidante significativa com todos os extratos e na concentração testada, quando comparado aos padrões utilizados nos experimentos, sendo que nos ensaios *ABTS*, *DPPH* e *FRAP* os resultados foram

obtidos a partir de uma curva padrão Trolox e para o ensaio fosfomolibdênio os resultados foram obtidos a partir de uma curva padrão com ácido ascórbico.

Para todos os ensaios realizados foi observado aumento da atividade antioxidante a medida que aumentava a concentração dos extratos (uma relação dose dependente), sendo que no ensaio DPPH com extrato etanólico, frações hexano e aquoso, nas concentrações 0,25 e 0,50 mg/mL, assim como no ensaio FRAP, com o extrato etanólico, concentrações 0,50 e 0,75mg/mL e fração hexano, concentrações 0,25 e 0,5 mg/mL, não observa-se diferença significativa. Comparando o extrato e as frações entre si, nota-se que os melhores resultados foram os alcançados nos testes realizados com a fração acetato de etila, exceto para o ensaio fosfomolibdênio, no qual os melhores resultados foram observados nos tratamentos com a fração hexano. Entende-se por melhores resultados a maior atividade antioxidante obtida em referência a curva padrão (Tabela 1).

Tabela 1: Atividade antioxidante do extrato etanólico de folhas de *Clusia fluminensis* e suas frações hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol e aquoso.

Ensaio antioxidante	Concentração dos extratos (mg/mL)	Extratos e Atividade Antioxidante					
		Etanol	Hexano	DCM	Acetato	Butanol	Aquoso
ABTS	0,25	71.31dC	62.09 dC	159.11dB	381.91dA	180.23dB	171.51dB
	0,50	142.62cD	124.17cD	318.22cC	763.82cA	360.45cB	343.02cB
	0,75	213.93bD	186.26bD	477.33bC	1145.74bA	540.68bB	514.53bB
	1,00	285.24aE	248.34aF	636.45aD	1527.65aA	720.68aB	686.04aC
DPPH	0,25	218.89cC	160.28dD	289.50cB	375.16dA	258.44dB	270.17cB
	0,50	235.22cD	199.94cE	283.61cC	441.06cA	325.44cB	291.28cC
	0,75	290.67bE	230.61bF	359.56bD	554.50bA	421.33bC	475.50bB
	1,00	332.00aD	291.67aE	470.11aC	645.22aA	487.67aBC	511.06aB
FRAP	0,25	1.59cD	1.15cD	5.18dC	17.63dA	9.16dB	7.61dBC
	0,50	4.31bD	3.02bcD	10.40cC	26.82cA	13.18cB	11.50cBC
	0,75	5.86bD	3.88bD	15.43bC	35.68bA	22.26bB	16.37bC
	1,00	13.31aD	10.23aE	29.25aC	60.04aA	38.26aB	31.61aC
MOLI	0,25	47.37dB	61.04dA	39.04dC	44.55dB	44.75bB	42.72dB
	0,50	84.21cA	88.95cA	45.91cC	73.47cB	51.55cC	50.98cCD
	0,75	107.21bB	126.77bA	75.96bE	87.63bD	83.65bD	101.75bC
	1,00	118.22aB	135.98aA	100.99aD	94.89aE	92.81aE	105.39aC

Nota: Os ensaios antioxidantes realizados foram ABTS, DPPH, FRAP e FOSFOMOLIBDÊNIO. O extrato e suas frações foram testados nas concentrações 0,25, 0,50, 0,75 e 1,0 mg/mL. Os resultados para os ensaios ABTS, DPPH e FRAP foram expressos em equivalente Trolox ($\mu\text{M trolox g}^{-1}$). Os resultados para o ensaio fosfomolibdênio foram expressos em equivalente ácido ascórbico ($\mu\text{M ácido ascórbico g}^{-1}$). A análise estatística foi feita em experimento fatorial com análise de variância Anova. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, com letras maiúsculas comparando mesma linha e minúsculas em mesma coluna. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.2 Atividade fotoprotetora

A atividade fotoprotetora do extrato etanólico e suas frações foi avaliada mediante as análises espectrofotométricas na faixa do ultravioleta (260 a 400 nm), (Figura 1).

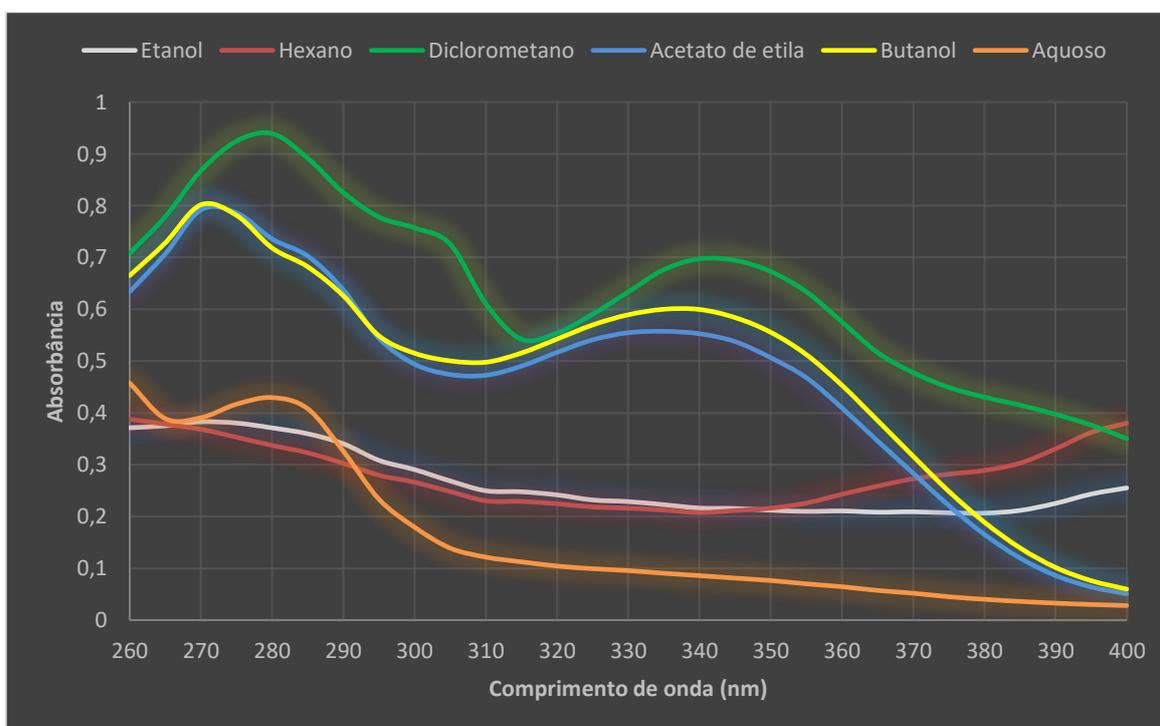


Figura 1: Análise espectrofotométrica do extrato etanólico e suas frações hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol e aquoso.

Os resultados para o fator de proteção solar (FPS), de acordo com a equação desenvolvida por Mansur et al., mostram que os melhores valores foram observados para a fração diclorometano (7,01), seguido das frações butanol (5,12) e acetato (4,90), sendo ambos com a mesma significância estatística; bruto (2,74) e hexano (2,51) ambos com a mesma significância estatística, e a fração aquosa (1,56) a menos efetiva e estatisticamente distinta de todos os outros (Figura 2).

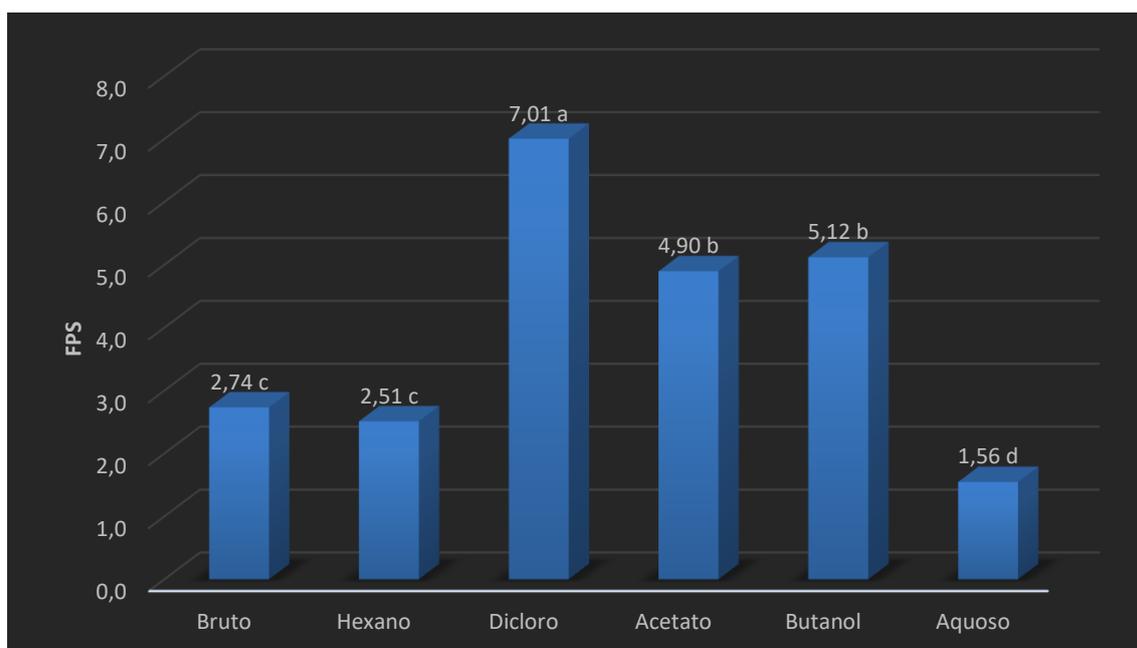


Figura 2: Gráficos representativos do Fator de Proteção Solar (FPS) identificado no extrato etanólico e em suas frações hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol e aquoso, seguindo o cálculo proposto por Mansur et. al, 1986. Acima das barras estão os valores de FPS obtidos. A análise estatística foi feita em experimento fatorial com análise de variância Anova. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.3 Teores de fenóis totais, taninos e flavonóides

Os resultados para os teores de fenóis totais, taninos e flavonoides do extrato etanólico de folhas de *Clusia fluminensis* e suas frações hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol e aquoso encontram-se apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Teores de fenóis totais, taninos e flavonoides.

Extrato	Teor de fenóis ($\mu\text{g GAE/mg}$)	Teor de taninos ($\mu\text{g GAE/mg}$)	Teor de flavonoides ($\mu\text{g CE/mg}$)
Etanólico	173.51b	92.82e	4.07b
Hexano	193.56b	173.86d	5.12a
DCM	499.83a	413.90c	3.83bc
Acetato	576.16a	478.59b	3.38bc
Butanol	498.76a	498.76ab	3.00c
Aquoso	530.91a	510.72a	0.55d

Em relação ao teor de fenóis totais as frações com os maiores teores foram a fração acetato de etila com 576,16 $\mu\text{gEAG/mg}$, aquoso com 530,91 $\mu\text{gEAG/mg}$,

diclorometano com 499,83 $\mu\text{gEAG/mg}$ e a fração butanol com 498,76 $\mu\text{gEAG/mg}$, sem diferenças estatísticas significativas, seguidas das frações hexano com 193,56 $\mu\text{gEAG/mg}$ e o extrato etanólico com 173,51 $\mu\text{gEAG/mg}$, sem diferenças significativas entre estes dois últimos, porém com diferenças significativas em relação às outras quatro frações descritas.

Houve aumento significativo no teor de taninos com o aumento da polaridade das frações (Tabela 1). Os maiores teores de flavonoides foram observados na fração hexano com 5,12 $\mu\text{gCE/mg}$, seguido do extrato etanólico com 4,07 $\mu\text{gCE/mg}$ e os menores teores identificados na fração aquoso, com 0,55 $\mu\text{gCE/mg}$.

3.4 CLAE e CG/EM

Os resultados obtidos para os testes CLAE e CG/EM estão expressos na Tabelas 3 e 4, respectivamente.

Tabela 3: Resultados obtidos de CLAE.

Padrão utilizado	Extrato e frações			
	EtOH	AE	But	Aq
Hyperosídeo	+	+	+	+
Isoquercitrina	+	-	-	-
Rutina	+	-	-	-

Nota: Foram usados os padrões hiperosídeo, isoquercitrina e rutina. Foram analisados o extrato etanólico (EtOH) e as frações acetato de etila (AE), butanol (But) e aquoso (Aq). O sinal (+) indica a presença do componente e o sinal (-) indica a não presença dele.

Observa-se a presença de hiperosídeos no extrato etanólico ($\cong 375$ mAU) e nas frações acetato de etila ($\cong 950$ mAU), butanol ($\cong 825$ mAU) e aquoso ($\cong 20$ mAU), sendo que no extrato etanólico, além dos hiperosídeos isoquercitrina ($\cong 400$ mAU) e rutina ($\cong 375$ mAU) que também foram detectados de forma significativa. A unidade mAU representa a área total de absorvância (mAU) obtida no experimento CLAE no cromatograma. Os valores de mAU de referências obtidos no cromatograma para os padrões foram: hiperosídeo ($\cong 4250$), isoquercitrina ($\cong 4000$) e rutina ($\cong 4200$ mAU).

Na Cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG/EM) das frações apolares, a fração hexano apresentou como destaque o composto 4 α ,14-Dimethyl-5 α -ergosta-8,24(28)-dien-3 β -ol, um intermediário na biossíntese do colesterol também conhecido como obtusifoliol. Além dele, se destacaram os compostos β -Sitosterol, β -Amyrin e α -Amyrin (Tabela 4). Na fração diclorometano

foi observada uma maior variedade de compostos e quantitativamente mais próximos, com destaques para o composto Benzaldehyde, 2,5-dimethyl, o composto Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl), o composto n-Hexadecanoic acid, o composto Squalene, o composto 3-Cyclohexene-1-ethanol, α -ethenyl- α ,3-dimethyl-6-(1-methylethylidene), e o composto prebucol (Tabela 4).

Tabela 4: Principais compostos identificados por Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massas (CG/EM) nas frações apolares de folhas de *Geonoma schottiana* Mart.

RT (min)	Área %	Compostos - Hexano
45,523	34,24	4 α ,14-Dimethyl-5 α -ergosta-8,24(28)-dien-3 β -ol
45,813	12,93	β -Sitosterol
46,094	10,74	β -Amyrin
46,415	17,52	α -Amyrin

RT (min)	Área %	Compostos - Diclorometano
13,545	7,04	Benzaldehyde, 2,5-dimethyl
21,463	14,67	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)
31,295	10,91	ácido n-hexadecanóico
43,255	6,9	Squalene
45,979	15,12	3-Cyclohexene-1-ethanol α -ethenyl- α ,3-dimethyl-6-(1-methylethylidene)
50,499	5,21	prebucol

4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitem algumas correlações significativas quanto aos teores de fenóis totais, taninos e flavonoides X atividade antioxidante X fotoproteção. Três fatores correlacionados que podem promover explicações convincentes quanto a alguns aproveitamentos biológicos de extratos vegetais para uso humano, para redução de impactos ambientais, para melhoria da saúde, para sustentabilidade entre outras possibilidades de uso biológico. Além disso, os resultados obtidos permitem acrescentar e referendar algumas informações que envolvam a aplicabilidade do gênero *Clusia* e da espécie *Clusia fluminensis*, já indicados com alguns fins biológicos.

A análise de teores de fenóis totais, taninos e flavonoides reafirma a presença desses compostos no extrato de folhas de *Clusia fluminensis* e frações

(Tabela 2). A identificação e quantificação de tais compostos permitem a exploração dos extratos para fins biológicos, como a ação antioxidante (Tabela 1) e a atividade fotoprotetora (Figuras 1 e 2).

Atividade antioxidante

A atividade antioxidante é relacionada à capacidade de um composto bioativo eliminar efetivamente radicais livres, inibindo reações de lipoperoxidação, mantendo a estrutura e funções celulares e evitando outros danos oxidativos (ZOU et al., 2016). Entre os compostos com ação antioxidante destacam-se os polifenóis, representados, por exemplo, pelos flavonoides e pelos taninos, dois dos compostos fenólicos analisados neste trabalho. O grande destaque se dá aos flavonoides, visto que, juntamente com os compostos fenólicos, os flavonoides são indicativos de atividade antioxidante (CHEN, XIE, NIE, LI, & WANG, 2008; QIAO et al., 2009). Taninos são compostos fenólicos, que normalmente estão vinculados a macromoléculas, com uma conhecida atividade antioxidante (SOARES, 2002).

Como não existe um método padronizado oficialmente para determinação da atividade antioxidante em espécies de origem vegetal e seus subprodutos, tendo em vista os vários mecanismos antioxidantes que podem ocorrer, bem como a diversidade de compostos bioativos (Sousa et al (2011), é necessário que a avaliação seja realizada por diferentes técnicas para melhor indicar a capacidade antioxidante desse tipo de matriz.

A variação da atividade obtida pelo método ABTS, de 381,91 a 1527,65 μM trolox g^{-1} , mostrou a fração acetato de etila com uma atividade antioxidante significativamente maior quando comparada ao extrato etanólico e as outras frações analisadas, levando a crer que o material obtido das folhas de *C. fluminensis* exercem efeito marcante na neutralização de radicais livres.

Assim como ocorreu com os testes no ensaio ABTS, a variação da atividade obtida no ensaio DPPH, de 375,16 a 645,22 μM trolox g^{-1} , mostrou que a fração acetato de etila exerce efeito marcante na neutralização de radicais livres, ajudando a referendar o potencial efetivo como agente antioxidante.

O ensaio antioxidante FRAP se apresenta como um processo de redução baseado na transferência de elétrons. Estima o potencial antioxidante a partir da capacidade da matriz promover a redução do estado férrico (Fe^{3+}) para o estado ferroso (Fe^{2+}) (IQBAL et al., 2012). Tanto o extrato etanólico como suas frações

foram ativos frente a redução de íons férricos em todas as concentrações testadas, com destaque de eficiência para a fração acetato de etila, que apresentou os melhores resultados quando comparados a todos os outros e com um comportamento dose dependente, mostrando-se o mais ativo entre todos os extratos testados, apresentando a concentração 1,0 mg/mL como mais eficaz, com valores de atividade antioxidante 60,04 $\mu\text{M trolox g}^{-1}$.

O ensaio de FRAP mede somente os mecanismos de transferência de elétrons que em combinação com outros métodos, pode ser útil na distinção de mecanismos dominantes com diferentes antioxidantes (PRIOR; XIANLI; SCHAICH, 2005). Segundo Thaipong et al. (2006), FRAP foi a técnica que apresentou elevada correlação com os teores de ácido ascórbico e grupos fenólicos.

Nogueira, Cardoso & Vilhena (2019), identificaram atividade antioxidante em casca e sementes da espécie *Garcinia macrophylla* (família Clusiaceae), mostrando que diferentes órgãos vegetais na família em estudo geram extratos com comprovado poder antioxidante. Demonstraram a atividade antioxidante de extrato hidroalcoólico (0,75 mg/mL e 0,1875 mg/mL) obtido a frio e a quente de cascas e sementes da espécie citada, com resultados significativos para os ensaios ABTS, DPPH e FRAP. Para o ensaio ABTS e DPPH foram encontrados valores em equivalente trolox (mg TE/g), e para o FRAP valores em $\mu\text{mol Fe (II)/g}$ de extrato. Dos extratos hidroalcoólicos obtidos a quente de *G. macrophylla*, aquele das cascas foi mais ativo do que o das sementes, sendo que, na concentração de 0,75 mg.mL⁻¹, as atividades foram de 180,02 ($\pm 3,30 \times 10^{-3}$) e 94,89 ($\pm 1,02 \times 10^{-3}$) $\mu\text{mol Fe (II)/g}$ de extrato, respectivamente. Observou-se que os extratos de *G. macrophylla* foram ativos na captura do radical ABTS^{•+} e demonstraram atividades similares variando em torno de 64,00 mg de TE/g de extrato, para a concentração de 3 mg/mL. Os resultados do ensaio DPPH foram expressos em função do equivalente em trolox (TE) por grama de extrato e se mostraram muito próximos variando de 275,49 a 281,74 mg de TE/g. Apesar da distância taxonômica em relação a *C. fluminesis*, e dos testes terem sido utilizados com órgãos e extratos distintos, os resultados obtidos pelos autores fortalecem a exploração de atividade antioxidante em espécies da família Clusiaceae e do gênero *Clusia*.

Extrato e frações obtidas das partes aéreas de *C. paralicola* foram capazes de sequestrar os radicais livres DPPH[•] e ABTS^{•+} e a fração acetato de etila foi também a mais ativa (Lins et al, 2016). Os testes para o DPPH e ABTS aqui foram

realizados em diferentes concentrações e com resultados em equivalente Trolox ($\mu\text{M trolox g}^{-1}$), e, assim como no observado para *C. paralicola*, os melhores resultados foram obtidos com a fração acetato de etila, com valores variando de 375,16 a 645,22 μM de Trolox no ensaio DPPH e 381,91 a 1527,65 $\mu\text{M trolox g}^{-1}$ no ensaio ABTS.

O fato de os melhores resultados para atividade antioxidante nos testes ABTS, DPPH e FRAP, terem sido obtidos com a fração acetato de etila (Tabela 1), levanta a sugestão de que as substâncias com melhor atividade antioxidante em folhas de espécies de *Clusia* têm provavelmente um caráter de polaridade intermediária e caráter positivamente carregada. Além disso pode-se notar o comportamento dose dependente, fato em praticamente todos os ensaios, com poucas exceções em alguns resultados que não apresentaram significância estatística.

O aumento do potencial antioxidante observado para os ensaios está seguindo o obtido em vários estudos que indicam uma relação direta ente a presença de compostos fenólicos à atividade antioxidante (LEFAHAL et al., 2018), conforme observado nos estudos realizados com folhas de *Cordia verbenácea*, que demonstrou que as frações acetato de etila, butanol e diclorometano, respectivamente apresentaram considerável quantidade de compostos fenólicos (SANTI, 2014) e com estudos de folhas de *Dicksonia sellowiana*, em que a maior atividade antioxidante foi observada em compostos com maiores conteúdos de compostos fenólicos (BORA, 2005).

Há uma diversidade muito grande de fenóis, podendo serem destacados os flavonóides, ácidos fenólicos, taninos, fenóis simples, ligninas, cumarinas e tocoferóis (Shahidi & Naczk, 1995). Constituem um dos grupos mais interessantes de compostos no reino vegetal, principalmente devido à sua forte capacidade antioxidante, sua alta eficácia como preservantes e sua ampla aceitação pelo público em geral, sendo muitas vezes aplicados nos alimentos através de extratos de plantas, se valendo dos efeitos sinérgicos entre compostos, ou também são adicionados individualmente, no caso de moléculas com elevada atividade (CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2016; ZOU et al., 2016).

Para que os compostos fenólicos sejam considerados antioxidantes e possam exercer seu papel biológico é necessário que, mesmo em baixas concentrações, sejam capazes de impedir, retardar ou prevenir a auto oxidação ou

oxidação mediada por radicais livres e que o produto formado após a reação seja estável (RICE-EVANS, 1996). Os teores mais elevados de fenóis totais na fração acetato de etila corroboram os resultados dos testes antioxidantes DPPH, ABTS e FRAP, que mostraram os melhores resultados de atividade antioxidante para a fração acetato de etila, e, apesar dos resultados do ensaio fosfomolibdênio da fração acetato não terem sido os melhores, é fato que a discrepância em relação aos mais significativos não é muito grande, o que torna essa fração importante para o ensaio fosfomolibdênio.

A análise dos teores de fenóis totais mostrou dois níveis de significância, com teores mais elevados nos extratos de polaridade intermediária e maior polaridade, com destaque quantitativo para a fração acetato de etila (tabela 2). Apesar de não haver diferença estatística significativa dos teores de fenóis obtidos pela extração das frações diclorometano, butanol e aquoso, o maior teor em número absoluto foi o obtido pela extração feita com a fração acetato de etila. Esses resultados podem ser comparados com fontes da literatura, visando referendar os dados de teores de fenóis.

Lins et al. (2016) mostraram que as frações obtidas por meio da extração com acetato de etila de folhas de *Clusia paralicola*, apresentaram as maiores quantidades de compostos fenólicos (92,4mgEAG g⁻¹). Da mesma forma, os resultados aqui obtidos, mostram os maiores teores de fenóis totais em folhas de *C. fluminensis* a partir da fração acetato de etila, porém, os teores encontrados foram maiores para *C. fluminensis* (576.16 µgEAGmg⁻¹).

Como o observado na tabela 2, e de acordo com o descrito na literatura, a presença de flavonoides no extrato etanólico e frações analisadas pode ser um indicativo de efetivação da atividade antioxidante descrita na tabela 1, uma vez que os flavonoides estão relacionados a diversas atividades biológicas, entre elas a ação antioxidante. A ação antioxidante dos flavonoides se dá pela sua capacidade de sequestrar radicais livres e quelar íons metálicos (Vinayagam, 2015).

De acordo com Pietta (2000), os flavonoides, devido ao seu baixo potencial de redução, são termodinamicamente aptos para reduzirem radicais livres altamente oxidantes como o superóxido, peroxila, alcoxila e hidroxila através da doação de um átomo de hidrogênio.

A análise da tabela 2 permite reconhecer que os teores de flavonoides foram significativamente maiores no extrato etanólico e na fração hexano, com as frações

de maiores polaridades apresentando teores quantitativamente menores, porém, de quantificação relevante. Assim, a correlação destes compostos com a atividade antioxidante passa a ser feita de forma destacada e com algumas correlações na literatura.

Macedo et al. (2013) correlacionou os teores de flavonoides e taninos em cipó-caboclo (*Davilla rugosa*) associando tais compostos à atividade antioxidante quantificada pelo método DPPH, relatando uma relação direta entre o teor de flavonoides e taninos e a atividade antioxidante. Eles utilizaram extrações com solventes hexano e acetato de etila enfatizando a maior capacidade seletiva de compostos antioxidantes na extração realizada com acetato de etila, assim como os resultados obtidos neste trabalho.

Silva & Paiva, 2012, quantificaram flavonoides expressos como equivalentes de rutina em $\mu\text{g mL}^{-1}$, e o ensaio DPPH, expresso em EC50, medido em g extrato /g DPPH, com extrato metanólico obtido de folhas de *C. fluminensis*. Para a quantificação de flavonoides, os resultados obtidos foram 8,07% de flavonoides e para o ensaio DPPH os valores obtidos foram 3,48 g extrato/g DPPH. Esses resultados mostram a presença significativa de flavonoides e o efeito antioxidante do extrato metanólico obtido de folhas e *C. fluminensis*. No presente trabalho, obtivemos valores de flavonoides em equivalente de quercetina ($\mu\text{g EQ/mg}$) variando de 0,55 a 5,12 $\mu\text{g EQ/mg}$ e valores de DPPH em equivalente Trolox ($\mu\text{M trolox g}^{-1}$) variando de 375,16 a 645,22 $\mu\text{M trolox g}^{-1}$, sendo os melhores resultados de DPPH obtidos com a fração acetato de etila, e os melhores resultados dos teores de flavonóides obtidos para a fração hexano.

Ao se comparar os resultados de atividade antioxidante com os teores de flavonoides, nota-se que os melhores resultados antioxidantes não foram das frações que possuem os maiores teores de flavonoides encontrados, e sim os de teores médios (Tabela 2). Isso sugere que os flavonoides presentes no extrato e frações podem ser de diferentes tipos, e que não é a quantidade de flavonoides que tende a influenciar na atividade antioxidante e sim a presença de diferentes tipos de flavonoides, ou até mesmo outros compostos presentes no extrato e suas frações, que podem exercer efeito sinérgico para efetivação da atividade antioxidante.

Pelo exposto no ensaio CLAE, dentre os flavonoides presentes nos extratos, houve um grande destaque para a presença de hiperosídeos na fração acetato de

etila (a que se mostrou mais eficaz frente a atividade antioxidante para ABTS, DPPH e FRAP). Sabe-se que o hiperosídeo (hiperina, quercetina-3-O-galactosídeo; HYP) é um metabólito secundário pertencente ao grupo dos flavonóides glicosilados, encontrado em diferentes espécies vegetais (Zheng et al., 2012). Os hiperosídeos são moléculas relativamente hidrofílica (Jia et al., 2012), com capacidade de citoproteção (Zhang et al., 2010; Zhang et al., 2011), atividade antioxidante (Luo et al., 2004; Gioti et al., 2009; Rainha et al., 2013) e anti-inflamatória (Hammer et al., 2007; Sosa et al., 2007; Süntar et al., 2010). A presença de tal flavonoide, sugerida pelo CLAE, corrobora o comportamento do extrato etanólico e das frações analisadas quanto ao perfil antioxidante, verificado nos ensaios antioxidantes (Tabela 1). Corrobora ainda a hipótese de que o tipo e não necessariamente a maior quantidade de flavonoides tende ser mais marcante para efetivação da atividade biológica.

Fotoproteção

Os resultados apresentados na figura 1 representam um indicativo de que o extrato etanólico e, principalmente três de suas frações (diclorometano, acetato de etila e butanol), possam ser utilizados como produtos fotoprotetores. A faixa espectral, com máximo em 305nm, é a de maior relevância em termos de fotoatividade, pois é a faixa onde ocorre a maior indução a quebra de dímeros de ciclobutanopiridina encontrado no DNA epidermal, conforme descrito no relatório da Organização Mundial da Saúde (Rosa et al., 2008). Foram observadas faixas elevadas de absorbâncias em diferentes comprimentos de onda, com destaque para a faixa entre 290 e 360 nm (espectro específico da região UVB), que, apesar de não ter sido o maior pico de comprimento de onda (os mais elevados foram entre 270 e 280 nm), apresentaram-se com valores relativamente altos, merecendo destaque para avaliação de efetividade biológica de Fatores de Proteção Solar (FPS) (Figura 1).

Os parâmetros de FPS foram determinados pelo método espectrofotométrico desenvolvido por Mansur et al. (1986), utilizando a RUV-B como representativa, isso pois tal radiação é considerada a de maior incidência durante o dia promovendo maior tempo de exposição às pessoas. Para se determinar a eficácia do extrato como protetor solar adotou-se a referência de classificação dos FPS em fatores de mínima proteção quando apresentarem FPS

de 2-12, fatores de moderada proteção quando apresentarem FPS de 12-30 e fatores de alta proteção quando o FPS for ≥ 30 (Ratnasooriya et al., 2016). Porém, seguindo recomendação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2012) o fator mínimo de proteção, segundo essa resolução, é de FPS 06.

Segundo as orientações de classificação, apenas a fração aquoso (1,56) não seria recomendado como possível protetor solar natural, e, a fração diclorometano se apresentaria como um potencial extrato a ser utilizado como FPS, apresentando-se com valores de FPS 7,01, acima do sugerido pela ANVISA, inclusive.

Vale o destaque do relato de que os raios UV-B absorvidos pela pele levam à produção de radicais livres agressivos como O_2 , 1O_2 , HO_2 , OH , ROO (RATNASOORIYA et al., 2014). Desta forma, a incorporação de antioxidantes tende a ser amplamente recomendada em filtros solares. Assim, para a avaliação dos extratos mais eficientes, a atividade antioxidante seria importante para o desenvolvimento de filtros solares mais eficazes (NAPAGODA, 2016). Isso leva a reconhecer que a possível eficácia das frações diclorometano, acetato de etila e butanol podem ser levadas em consideração também pelo fato de estarem sendo associados com efeitos antioxidantes (Tabela 1).

Os resultados de atividade antioxidante ABTS, DPPH e FRAP, mostraram que as frações acetato de etila e butanol demonstraram os melhores resultados (com destaque para a fração acetato de etila), e, apesar de não demonstrarem valores de FPS compatíveis com o requisitado pela ANVISA, demonstraram valores que se enquadram acima no mínimo (FPS mínimo = 2) para atividade fotoprotetiva, o que sugere a possibilidade de avaliação de tais frações, principalmente a fração diclorometano com efeito protetor e a fração acetato de etila como efetivo fotoprotetor, ou, ao menos, como promotores de eficácia, lembrando que, visando aumentar a eficiência dos protetores solares, a combinação do uso de compostos antioxidantes e/ou anti-inflamatórios com os protetores solares podem promover maior eficácia dos fotoprotetores, e, mais uma vez, a avaliação dos teores de fenóis, taninos e principalmente flavonoides corroboram tanto com o potencial fotoprotetor quanto com o potencial antioxidante.

A relação entre a composição química descrita no extrato etanólico e suas frações permite que se possa levantar a possibilidade de exploração deles como componentes de proteção solar ou acentuadores de efeito protetivo, e a presença de polifenóis, taninos e flavonoides favorece tal atividade.

No caso de atividade fotoprotetora, foi descrito que os flavonóides têm efeitos fotoprotetores significativos por causa de sua capacidade de absorção de UV e seus efeitos antioxidantes (Saewan & Jimtaisong, 2013). Recentemente, foi bem relatado que extratos de plantas ricos em flavonóides são capazes de absorver luz ultravioleta nas regiões UV-B e UV-A (COSTA et al., 2015). Nesse contexto, vários autores associaram a atividade fotoprotetora de extratos vegetais ao seu conteúdo de flavonóides (SOUZA et al., 2015; SILVA et al., 2014; De-Oliveira-Junior et al., 2013).

Os flavonóides são ácidos fracos e, como são polares, ou moderadamente polares, são solúveis em etanol, metanol, butanol e combinações de solventes com água (MARKHAM, 1982). Absorvem radiação eletromagnética na faixa do ultravioleta (UV) e do visível, e dessa maneira apresentam papel de defesa nas plantas frente a radiação UV da luz solar (ROBARDS et al., 1999). Além disso, representam a classe de polifenóis com maior atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres, além de apresentarem significativa atividade anti-inflamatória (KOH; MITCHELL, 2008; MANACH ET AL et al., 2004).

A presença de flavonoides e taninos nos extratos conferem um destaque quanto a absorção espectral pela radiação solar na faixa do UV-B com finalidade de antienvhecimento e fotoproteção (Ramos et al., 2010; Dal'Belo, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2007), além de ser, um indicativo de absorção da radiação UV, proporcionando altas absorvidades molares ($\epsilon/M^{-1}cm^{-1}$) para comprimentos de onda (λ) que culminem com um FPS biologicamente efetivo (Simões et al., 2010).

O perfil de CG/EM da fração diclorometano revelou alguns componentes que podem corroborar o melhor efeito de FPS obtido. Destaca-se o composto escaleno (Tabela 4), um triterpeno relatado como um protetor de várias doenças na literatura (Ryan et al., 2007).

Segundo o descrito por Fernando et al., 2018, em experimento envolvendo a análise de extrato de etanol, e das frações acetato de etila e hexano de *Caulerpa racemosa*, para identificar princípios bioativos, o composto esqualeno aumentou os efeitos protetores nos queratinócitos HaCaT contra danos celulares induzidos por UV, reduzindo os níveis de EROs. Além disso, o esqualeno pode reduzir os níveis de óxido nítrico (NO), óxido nítrico sintase indutível (iNOS), prostaglandina E2 (PGE₂), ciclo-oxigenase (COX-2) e algumas citocinas pró-inflamatórias nos macrófagos brutos induzidos por lipopolissacarídeo, exercendo assim efeito

antioxidante e anti-inflamatório. Apesar do estudo ter sido realizado com uma espécie de macroalga, os resultados podem ajudar a associar uma possível ação benéfica do composto esqualeno, presente na fração diclorometano, como promotor de atividade fotoprotetora.

Outro fator que corrobora com os resultados obtidos para promoção de efeito fotoprotetor da fração diclorometano é a presença de ácido *n*-hexadecanóico, (Tabela 4). Sugere-se que o ácido *n*-hexadecanóico possa funcionar como um agente anti-inflamatório, pois demonstrou atividade inibidora significativa no estudo da cinética enzimática do fosfolipase A₂(PLA₂) (Aparma et al., 2012), enzima que controla o passo inicial na formação de potentes mediadores inflamatórios (Ueno & Rosemberg, 1990), além de apresentarem potencial citotóxico e anticâncer (Ravi & Krishman, 2017).

Tanto a presença de esqualeno, quanto de ácido *n*-hexadecanóico poderiam ajudar a explicar o maior valor obtido de FPS para a referida fração diclorometano.

5. CONCLUSÕES

Extratos de folhas de *C. fluminesis* apresentam potencial para ser explorados com fins biológicos. O extrato etanólico e suas as frações analisadas apresentam potencial ação antioxidante, com destaque para a fração acetato de etila. Apresenta potencial atividade fotoprotetora, exatamente pelo poder antioxidante demonstrado. A fração diclorometano destaca-se pela potencial atividade fotoprotetora, demonstrando FPS compatível com o aceitável para uso como protetor solar. As análises bioquímicas realizadas referendaram a busca de uma exploração sustentável a partir de rejeitos biológicos que naturalmente seriam descartados como lixo.

6. REFERÊNCIAS

- Acuña, U. M.; Jancovski, N.; Kennelly, E. J.; Curr. Top. Med. Chem. 2009, 9, 1560.
- Anholeti, M. C.; Paiva, S. R.; Figueiredo, M. R.; Kaplan, M. A. C.; An. Acad. Bras. Ciênc. 2015, 87, 289.
- Aparna, V.; Dileep, K. V.; Mandal, P.K.; Karthe, P.; Sadasivan, C.; Haridas, M. Anti-Inflammatory Property of *n*-Hexadecanoic Acid: Structural Evidence and Kinetic Assessment. Chem Biol Drug Des 2012; 80:434–439. Research Article. 2012.
- Atoui, A. K.; Mansouri, A.; Boskou, G.; Kefalas, P.; Food Chem. 2005, 89, 27; Barreiros, A. L. B. S.; David, J. M.; David, J. P.; Quim. Nova 2006, 29, 113.
- Baker, H. G. Characteristics and mode of origin of weeds. In BAKER, H. G.; STEBBINS, G. L. (Ed.). The genetics of colonizing species. New York: Academic Press, 1965. p. 147–172.
- Belinelo, V. J., Czepak, M. P., Vieira Filho, S. A., Menezes, L. F. T., Jamal, C. M. Alelopatia de *Arctium minus* Bernh (Asteraceae) na germinação e crescimento radicular de sorgo e pepino. Caatinga, v.21, n.4, p.12-16, 2008.
- Bora, K.; Miguel, O.G.; Andrade, C.A.; Oliveira, A.O.T. Determinação da concentração e do potencial antioxidante das diferentes frações do extrato de folhas de *Dicksonia sellowiana*, (Presl.) Hook, Dicksoniaceae. Revista Visão Acadêmica, v.6, n.2, p.6-15, 2005.
- Borella, J., Martinazzo, E. G., Aumonde, T. Z., Amarante, L., Moraes, D. M., Villela, F. A. Respostas na germinação e no crescimento inicial de rabanete sob ação de extrato aquoso de *Piper mikanianum* (Kunth) Steudel. Acta Botanica Brasilica, v.26, n.2, p.415-420, 2012.
- Borella, J., Wandscheer, A. C. D., Bonatti, L. C., Pastorini, L. Efeito alelopático de extratos aquosos de *Persea americana* Mill. sobre *Lactuca sativa* L. Revista Brasileira de Biociências, v.7, n.3, p.260-265, 2009.
- Brighenti, Alexandre Magno, and M. F. de Oliveira. "Biologia de plantas daninhas." *Embrapa Milho e Sorgo-Capítulo em livro técnico-científico (ALICE)* (2011). Acesso online em 21/07/2018

<<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/904874/1/Biologiaplantasdaninhas.pdf>>

Carvalho, W. P.; Carvalho, G. J.; Andrade, M. J. B.; Fonseca, G.; Andrade, L.; Valaci, F.; Oliveira, D. P.; Alelopatia de adubos verdes sobre feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Brasileira de Biociências*. v. 10, n.1, 2012.

Chen, Y., Xie, M.-Y., Nie, S.-P., Li, C., & Wang, Y.-X. Purification, composition analysis and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Ganoderma atrum*. *Food Chemistry*, v. 107(1), p.231–241, (2008).

Christoffoleti, P. USP ESALQ – ASSESSORIA DE COMUNICAÇÃO. Grupo Cultivar
Data: 04/03/2015 Caderno/Link:
<http://www.grupocultivar.com.br/site/content/noticias/?q=42659> Assunto: De olho nas plantas daninhas. Acesso em 20 de julho de 2018.

Costa, D.A. et al. Constituintes químicos, fenóis totais e atividade antioxidante de *Sterculia striata* St. Hil. et Naudin. *Acta Amazica*, v.40, n.1, p.207-212, 2010.

Costa-Lotufo, L. V.; Montenegro, R. C.; Alves, A. P. N. N.; Madeira, S. V. F.; Pessoa, C.; Moraes, M. E. A.; Moraes, M. O. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. *Revista Virtual Química*, vol. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

Decker, E.A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nutrition Reviews*, New York, v.55, n.11, p.396-407, 1997.

El-Agamey, A.; Lowe, G. M.; McGarvey, D. J.; Mortesen, A.; Phillip, D. M.; Truscott, T. M.; Young, A. J.; *Arch. Biochem. Biophys.* 2004, 430, 37;

Fabiani, M. C. Germinação de sementes e crescimento de plântulas de milho e soja afetados por palha e extrato aquoso de culturas de inverno. 86 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Universidade do Estado de Santa Catarina, 2016.

Farias, J. A.; Ferro, J. N.; Silva, J. P.; Agra, I. K.; Oliveira, F. M.; Candea, A. L.; Conte, F. P.; Ferraris, F. K.; Henriques, M. ; Conserva, L. M.; Barreto, E.; *Inflammation*. 2012, 35, 764.

Fernando IPS, Sanjeewa KKA, Samarakoon KW, Lee WW, Kim H-S, Jeon Y-J. Squalene isolated from marine macroalgae *Caulerpa racemosa* and its potent antioxidant and anti-inflammatory activities. *J Food Biochem.* 2018; e12628. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12628>.

Ferreira, A. G.; Aquila, M. E. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 12 (Edição Especial), p. 175-204, 2000.

Ferreira, R. O.; Camara, C. A.; Agra, M. F.; Silva, T. M. S.; *Nat. Prod. Commun.* 2012, 7, 1597.

Ferreira, R. O.; Carvalho, M. G.; Silva, T. M. S.; *Quim. Nova* 2012, 35, 2271.

Ferreira, R. O.; Silva, T. M. S.; Carvalho, M. G.; *Molecules* 2015, 20, 14326.

Firmo, W. C. A.; Menezes, V. J. M.; Passos, C. E. C.; Dias, C. N.; Alves, L. P. L.; Dias, I. C. L.; Neto, M. S. Olea, R. S. G. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. *Cadernos de Pesquisa, São Luís*, vol. 18, n. especial, p. 90-95, dez. 2011.

Foglio, M. A.; Queiroga, C. L.; Sousa, I. M. O.; Rodrigues, R. A. F. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. Disponível em: Acesso em 16 de março de 2017.

Gasparatto Junior, A.; Ferreira, I. C. P.; Nakamura, C. V.; Filho, B. P. D.; Jacomassi, E.; Young, M. C. M.; Cortez, D. A. G.; *Acta Farm. Bonaerense* 2005, 24, 371.

Gatti, A. B., Perez, S. C. J. G. A., Lima, M. I. S. Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. *Acta Botanica Brasilica*, v.18, n.3, p.459-472, 2004.

Genovesi, P. 2005. Eradications of invasive alien species in Europe: a review. *Biological Invasions*, 7: 127-133.

Ghribia, L.; Ghouilaa, H.; Omrib, A.; Besbesb, M.; Ben Janneta, H. Antioxidant and anti-acetylcholinesterase activities of extracts and secondary metabolites from *Acacia cyanophylla*. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2014, 4 (Suppl. 1), S417–S423.

Gomes, A. B. Potencial alelopático de extratos de folhas de *Geonoma schottiana* (Arecaceae). 84 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal). Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2016.

Govidarajan, R. et al. Studies on the antioxidant activities of *Desmodium gangeticum*. Biological & Pharmaceutical Bulletin, v.26, p.1424-7, 2003.

Grime, J. P. Plant strategies, vegetation processes, and ecosystem properties. New York: John Wiley & Sons, 2006. 456p.

Gurgel, E. S. C. Morfoanatomia, perfil químico e atividade alelopática de três espécies de *Copaifera* L. (Leguminosae Caesalpinioideae) nativas da Amazônia. 126 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2009.

Haslam, E.; J. Nat. Prod. 1996, 59, 205.

Hemshakar, M.; Sunitha, K.; Santhosh, M. S.; Devaraja, S.; Kernparaju, K.; Vishwanath, B. S.; Niranjana, S. R.; Girish, K. S.; Phytochem. Rev. 2011, 10, 325.

Kerrigan, R. A.; Cowie, I. D.; Dixon, D. J. Em Clusiaceae; Short, P. S.; Cowie, I. D., eds.; Northern Territory Herbarium: Australia, 2011.

King, S. R., Ambika, R. Allelopathic plants. 5. *Chromolaena odorata* (L.). Allelopathy Journal, v.9, p.35-41, 2002.

Lefahal, M.; Zaabat, N.; Ayad, R.; Makhloufi, E.H.; , Djarri, L.; Benahmed, M.; , Laouer, H.; , Nieto, G.; Akkal, S. In Vitro Assessment of Total Phenolic and Flavonoid Contents, Antioxidant and Photoprotective Activities of Crude Methanolic Extract of Aerial Parts of *Capnophyllum peregrinum* (L.) Lange (Apiaceae) Growing in Algeria. Medicines, v. 5, n. 2, 2018.

Lima, L.A.R.S. et al. Acetogenins from *Annona cornifolia* and their antioxidant capacity. Food Chemistry, v.122, n.4, p.1.129- 1.138, 2010.

Lokesh Ravi e Kannabiran Krishnan, 2017. Potencial citotóxico de ácido N-hexadecanóico extraído de *Kigelia pinnata* Leaves. Asian Journal of Cell Biology, 12: 20-27.

Lorenzi, H., Plantas Daninhas do Brasil: Terrestres, Aquáticas, Parasitas, Tóxicas e Medicinais. 2ª edição. Noca Odessa, SP: Plantarum, 1991. 440p.

Lustosa, F. L., Oliveira, S. C. C., Romeiro, L. A. Efeito alelopático de extrato aquoso de *Piper aduncum* L. e *Piper tectoniifolium* Kunth na germinação e crescimento de *Lactuca sativa* L. Revista Brasileira de Biociências, v.5, supl.2, p.849-851, 2007.

Macedo J.M, Souza L.G.P., Valenzuela V.C.T, Oliveira A.B., Castilho R.O., Jácome R.L.R.P.; Variação sazonal nos teores de flavonoides, taninos e atividade antioxidante de *Davilla rugosa* Poir. Revista de Ciência Farmaceutica Básica Aplicada. 34(4):585-590, 2013.

Maguire, J.D. 1962. Speed of germination and in selection and evaluation for seedlings emergence and vigor. Crop Science, Madison, v.2, n.2, p.176-177.

Mariutti, L.R.B.; Bragagnolo, N. Revisão: Antioxidantes Naturais da Família Lamiaceae - Aplicação em Produtos Alimentícios. Brazilian Journal of Food Technology, v.10, n.2, p.96-103, 2007.

Nair, S. C., Panikkar, K. R., Cancer Lett. 1990, 49, 121. AMB, M. K.; Ahluwalia, A. S.; Allelopathy: Potential Role to Achieve New Milestones in Rice Cultivation; ScienceDirect; Rice Science, 2016, 23(4): 165-183, acesso online <www.sciencedirect.com>

Oliveira, C. M. A.; Porto, A. M.; Bittrich, I. V.; Marsaioli, A. J.; Phytochemistry 1999, 50, 1073.

Oliveira, S. C. C. et al. Efeito alelopático de folhas de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil. (Solanaceae) na germinação e crescimento de *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae) sob diferentes temperaturas. Acta Botânica Brasílica, v. 18, n. 3, p. 401-406, 2004.

Omoni, A. O.; Aluko, R. E.; Trends Food Sci. Technol. 2005, 16, 344.

Parker, I. M.; Simberloff, D.; Lonsdale, W. M.; Goodell, K.; Wonham, M.; Kareiva, P. M.; Williamson, M. H.; Holle, B. V.; Moyle, P. B.; Byers, J. E.; Goldwasser, L. 1999. Impact: toward a framework for understanding the ecological effects of invaders. Biological Invasions, 1: 3-19.

Pietta PG. Flavonoids as Antioxidants. J Nat Prod. 2000; 63:1035-42.

Prieto, P.; Pineda, M.; Aguilar, M. Quantificação espectrofotométrica da capacidade antioxidante através da formação de um complexo de fosfomolibdênio: aplicação específica à determinação da vitamina E1. *Anal. Biochem.* 1999, 269, 337-341.

Qiao, D. L., et al. Antioxidant activities of polysaccharides from *Hyriopsis cumingii*. *Carbohydrate Polymers*, v. 78(2), p. 199–204, 2009.

Reginatto, F. H. Introdução à análise fitoquímica. In: Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; et al, *Farmacognosia: da Planta ao medicamento*, Porto Alegre/Florianópolis Ed. Universiadde/UFRGS/Ed. Da UFSC, p. 69-81, 2016.

Ribeiro, P. R.; Ferraz, C. G.; Guedes, M. L. S.; Martins, D.; Cruz, F. G.; *Fitoterapia* 2011, 82, 1237.

Sampaio, A. B.; Schmidt, I. B. Espécies exóticas invasoras em Unidades de Conservação Federais do Brasil. *Revista Biodiversidade Brasileira*, n. 2, p. 32-49, 2013.

Santi, M.M.; Sanches, F.S.; Silva, J.F.M.; Santos, P.M.L. Determinação do perfil fitoquímico de extrato com atividade antioxidante da espécie medicinal *Cordia verbenacea* DC. por HPLC-DAD. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.16, n.2, p.256-261, 2014

Senthilkumar, R.; Parimelazhagan, T.; Chaurasia, O.P.; Srivastava, R.B. Free radical scavenging property and antiproliferative activity of *Rhodiola imbricata* Edgew extracts in HT-29 human colon cancer cells. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 2013, 6, 11–19.

Shahidi F, Naczk M. *Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications*. Lancaster: Technomic; 1995.

Silva, E. M.; Araújo, R. M.; Freire-Lima, L. G.; Silveira, E. R.; Lopes, N. P.; Paula, J. E.; Braz-Filho, R.; Espindola, L. S.; *J. Braz. Chem. Soc.* 2013, 24, 1314.

Silva, K. F. A. S. et al. Resistência de genótipos de tomateiro à *Bemisia tabaci* mediada por tricomas glandulares e acilaçúcares. *Horticultura Brasileira* 30: S1493-S1500.

Silveira, P. F., Maia, S. S. S., Coelho, M. F. B. Potencial alelopático do extrato aquoso de folhas de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. na germinação de *Lactuca sativa* L. Bioscience Journal, v.28, n.3, p.472-477, 2012.

Soares, S. E., 2002. Ácidos fenólicos como antioxidants. Revista de Nutrição, Campinas, 15, 71-81.

Sousa, C.M.M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. Química Nova, v.30, n.2, p.351-355, 2007.

Svendsen, A.B.; Verpoorte, R. Chromatography of Alkaloids. New York: Elsevier Scientific Publishing Company. 1983. 517 p.

Thaipong, K.; Boonprakob, U.; Crosby, K; Cisneroszevallos, L.; Byrne, D.H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. Journal of Food Composition and Analysis, v.19, p.669-675, 2006.

Ueno E., Rosenberg P. (1990) Inhibition of phosphorylation of ratsynaptosomal proteins by snake venom phospholipase A₂neuro-toxins (b-bungarotoxin, notexin) and enzymes (*Naja atra*, *Naja nigricollis*). Toxicon; 28:1423–1437.

Valko, M.; Izakovic, M.; Mazur, M.; Rhodes, C. J.; Telser, J.; Mol. Cell. Biochem. 2004, 266, 37;

Vinayagam R, Xu B. Antidiabetic properties of dietary flavonoids: a cellular mechanism review. Nutr Metab. 2015; 12(60): 1-20.

Zou, Z.; Xi, W.; Hua, Y.; Nie, C.; Zhou, Z. Antioxidant activity of Citrus fruits. Food Chemistry, v.196, p. 885–896, 2016.