



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

RENÊ LEMOS ALELUIA

**ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DAS ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DE *Schinus terebinthifolia* Raddi (aroeira)
SUBMETIDA A DIFERENTES TIPOS DE ADUBAÇÃO**

VITÓRIA - ES
2020

RENÊ LEMOS ALELUIA

**ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DAS ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DE *Schinus terebinthifolia* Raddi (aroeira)
SUBMETIDA A DIFERENTES TIPOS DE ADUBAÇÃO**

Dissertação de Mestrado 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 Mestre em Biologia Vegetal.

Área de concentração: Fisiologia Vegetal

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria do Carmo Pimentel Batitucci

VITÓRIA - ES
2020

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

A366a ALELUIA, Renê Lemos, 1986-
ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DAS
ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *Schinus terebinthifolia* Raddi
(aroeira) SUBMETIDA A DIFERENTES TIPOS DE
ADUBAÇÃO / Renê Lemos ALELUIA. - 2020.
120 f. : il.

Orientadora: Maria do Carmo Pimentel BATITUCCI.
Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e
Naturais.

1. *Schinus terebinthifolia* Raddi (aroeira). 2. Ácidos
anacárdicos. 3. Alelopatia. 4. Citotoxicidade. 5. Antioxidantes.
I. BATITUCCI, Maria do Carmo Pimentel. II. Universidade
Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Humanas e
Naturais. III. Título.

CDU: 57


Renê Lemos Aleluia


“ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE Schinus terebinthifolia Raddi (aroeira) SUBMETIDA A DIFERENTES TIPOS DE ADUBAÇÃO”.

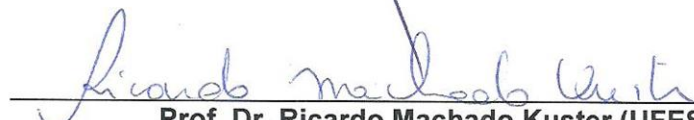
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Biologia Vegetal.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2020.

Comissão Examinadora:


Prof. Dra. Maria do Carmo Pimentel Batitucci (UFES)
Orientadora e Presidente da Comissão Examinadora


Prof. Dr. José Aires Ventura (UFES)
Examinador Titular Interno


Prof. Dr. Ricardo Machado Kuster (UFES)
Examinador Titular Externo

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal (PPGBV) por possibilitar o desenvolvimento desse trabalho de pesquisa e por me oportunizar a conhecer novas formas de se fazer Ciência.

Ao INCAPER (Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural), à equipe de profissionais que trabalham na Fazenda Experimental Engenheiro Agrônomo Reginaldo Conde (FERC) e no Projeto Biomas – Mata Atlântica, pelo fornecimento, ajuda na coleta e na secagem dos frutos e folhas de aroeiras utilizadas neste trabalho.

A todos os profissionais que atuam nos laboratórios onde foi possível a realização das análises aqui apresentadas. Ao Laboratório de Petroleômica e Forense, onde realizei as análises de Espectrometria de Massas (ESI (-) FT-ICR MS e MS/MS) e ao Laboratório de Taxonomia e Ecologia de Algas Continentais (LATEAC), pela cessão dos equipamentos utilizados nas análises químicas e biológicas aqui apresentadas.

Ao Prof. Dr. Ricardo Machado Kuster, por ter possibilitado a realização, dado auxílio na interpretação dos resultados das análises de Espectrometria de Massas e por ter aceitado fazer parte da banca que avaliou o trabalho aqui apresentado.

Ao Dr. José Aires Ventura, por ter autorizado o uso do material vegetal utilizado neste estudo e por ter aceitado compor a banca que realizou a avaliação do estudo aqui apresentado.

À Prof.^a Dr.^a Maria do Carmo Pimentel Batitucci, carinhosamente chamada de Do Carmo, por ter transformado um “se” em realidade e com isso, ter possibilitado a mim um reinício no mundo da pesquisa científica. Mas não só isso, agradeço também por todo o apoio dado por ela, dentro e fora do ambiente acadêmico, por ter a paciência de nos ouvir, orientar e, sempre que possível, tranquilizar nos em momentos de aflição. Muito obrigado por todo o conhecimento compartilhado, pela aprendizagem e por ser uma inspiração de ética e profissionalismo a ser seguida nessa longa jornada acadêmica.

A todos os componentes e amigos do Laboratório de Genética Vegetal e Toxicológica, em especial à Suiany Gervásio, Jean Vencioneck e Miriele Bernardes, pelo incentivo e apoio em embarcar no mundo das plantas medicinais e por, sempre

que possível, me ajudarem a esclarecer as eventuais dúvidas que apareciam no meio do caminho.

À minha amiga e colega de bancada Sula Feleti, por ter sido parceira em praticamente todas as etapas da experimentação e análise dos resultados, por ter me oportunizado praticar o companheirismo, a calma e o entendimento de que a confiança é à base de tudo.

Agradeço à minha família, especialmente à minha mãe, Raimunda Lemos, e à minha irmã Regina Lemos, as mulheres mais fortes, amorosas e guerreiras que já conheci. Muito obrigado por sempre me incentivar a buscar tudo aquilo que quero, por entender a minha ausência e por apoiar as escolhas feitas por mim, mesmo que por conta disso, nossos caminhos tenham sido distanciados. Sem o apoio e a compreensão de vocês, com certeza, eu não chegaria até aqui.

Por fim, mas não menos importante, quero agradecer ao Rafael Colombi por todo o companheirismo, apoio, paciência e afeto dado a mim ao longo dessa breve jornada. Muito obrigado por sempre me incentivar a buscar a concretização dos meus objetivos/sonhos, sem seu estímulo e alegria a realização desses seriam mais difíceis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aspectos morfológicos de <i>Schinus terebinthifolia</i> Raddi.....	20
Figura 2 - Ocorrência de <i>Schinus terebinthifolia</i> Raddi no território brasileiro.....	21
Figura 3 - Relato de ocorrência de aroeira (<i>Schinus terebinthifolia</i> Raddi) em diferentes países.....	22
Figura 4 - Metabolismo primário e metabolismo secundário em plantas e os compostos (metabólitos) gerados nos mesmos.....	28
Figura 5 - Estruturas químicas do ácido anacárdico, do cardanol, do cardol e do 2-metil-cardol.....	31
Figura 6 - Mecanismo de ação do reagente de <i>Folin-Ciocalteu</i>	33
Figura 7 - Complexação do flavonoide quercetina com cloreto de alumínio ($AlCl_3$) o qual forma o complexo estável flavonóide- Al^{3+}	34
Figura 8 - Princípio do ensaio de capacidade de eliminação do radical livre DPPH'.....	35
Figura 9 - Reação de estabilização do radical ABTS ^{•+} e sua formação pelo persulfato de potássio.....	35
Figura 10 - Reação de produção de Fe^{2+} a partir da redução do Fe^{3+} presente no complexo com TPTZ.....	36
Figura 11 - Formação do complexo estável Ferrozina- Fe^{2+}	36
Figura 12 - Esquema simplificado de um espectrômetro de massa.....	38
Figura 13 - Redução enzimática do MTT para Formazan.....	40
Figura 14 - Diagrama do mecanismo de liberação de aleloquímicos.....	42
Figura 15 - Projeto Biomas – Mata Atlântica, município de Linhares.....	48
Figura 16 - Etapas de produção dos extratos etanólicos.....	50
Figura 17 - Espectros de massas ESI (-) FT-ICR MS de extratos etanólicos de frutos (T1, T2, T3, T4, T5 e T6) e folhas (T1F e T6F) de <i>Schinus terebinthifolia</i>	70
Figura 18 - Proposta de fragmentação dos íons m/z 371, m/z 373, m/z 513 e m/z 567 por ESI (-) FT-ICR MS/MS.....	79
Figura 19 - Similaridade existente entre os extratos de folhas e de frutos de <i>S. teribinthifolia</i> verificada por meio da Análise de Componentes Principais (PCA)...	80
Figura 20 - Análise de Componentes Principais (PCA) dos teores de compostos fenólicos e testes antioxidantes de extratos de folhas e frutos de <i>S. teribinthifolia</i>	89

Figura 21 - Percentual de células viáveis, linfócitos humanos, submetidas a diferentes concentrações de extratos de <i>S. terebinthifolia</i> em 24 horas.....	90
Figura 22 - Percentual de células viáveis, linfócitos humanos, submetidas a diferentes concentrações de extratos de <i>S. terebinthifolia</i> em 48 horas.....	91
Figura 23 - Porcentagem de células de S-180 vivas após serem expostas a diferentes concentrações de extratos de <i>S. terebinthifolia</i> em 24 horas.....	93
Figura 24 - Porcentagem de células de S-180 vivas após serem expostas a diferentes concentrações de extratos de <i>S. terebinthifolia</i> em 48 horas.....	94
Figura 25 - Índice de germinação (IG) de <i>Allium cepa</i> L. tratado com diferentes concentrações de extratos de <i>S. terebinthifolia</i> (0,5; 1,0; 2,5 e 5,0 mg.mL ⁻¹) e do controle negativo (CN)	97
Figura 26 - Índice de alelopatia (IA) de <i>Allium cepa</i> L. tratado com diferentes concentrações de extratos etanólicos de <i>S. terebinthifolia</i> Raddi (aroeira) (0,5; 1,0; 2,5 e 5,0 mg.mL ⁻¹).....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ações biológicas relacionadas a <i>Schinus terebinthifolia</i> Raddi.....	25
Tabela 2 - Funções dos macro e micronutrientes no metabolismo, crescimento e desenvolvimento vegetal.....	45
Tabela 3 - Análise química (macro e micronutrientes) realizada em material vegetal (frutos e folhas) de <i>S. teribinthifolia</i> submetidas a diferentes tipos de adubação na área experimental do Projeto Biomas - Mata Atlântica, Linhares – ES.....	65
Tabela 4 - Substâncias identificadas por ESI (-) FT-ICR MS e ESI (-) FT-ICR MS/MS nos extratos de frutos (T1, T2, T3, T4, T5 e T6) e folhas (T1F e T6F) de aroeiras (<i>S. terebinthifolia</i>)	71
Tabela 5 - Concentração de compostos fenólicos nos extratos de frutos e folhas de aroeiras (<i>S. terebinthifolia</i>) submetidas a diferentes tipos de adubação.....	81
Tabela 6 - Matriz de Correlação de Pearson entre teores de compostos fenólicos e os teores de nutrientes contidos nas folhas e frutos de <i>S. terebinthifolia</i> Raddi submetidas a diferentes tipos de adubação.....	83
Tabela 7 - Atividade antioxidante de extratos de frutos e folhas de aroeiras (<i>S. terebinthifolia</i> Raddi) submetidas a diferentes tipos de adubação e mensuradas por diferentes métodos (ABTS, DPPH, FRAP e Quelação do Fe ⁺²).....	85
Tabela 8 - Viabilidade de linfócitos humanos (%) expostos a diferentes concentrações de extratos de <i>S. terebinthifolia</i> submetidas a diferentes tipos de adubação, por meio dos protocolos de pré, simultâneo e pós-tratamento.....	92
Tabela 9 - Valores de IC ₅₀ obtidos por meio do ensaio do MTT e Índice de Seletividade (IS) de diferentes extratos de <i>Schinus terebinthifolia</i> Raddi em relação às células de S-180, exposição em 24h e 48h.....	96
Tabela 10 - Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Tempo Médio de Germinação (TMG), Velocidade Média de Germinação (VMG), Crescimento Radicular Médio (CRM) e Índice de Velocidade de Crescimento Radicular (IVCR) de sementes de <i>Allium cepa</i> L. (cebola) tratadas com quatro concentrações (0,5; 1,0; 2,5 e 5,0 mg.mL ⁻¹) de diferentes de extratos de <i>Schinus terebinthifolia</i> Raddi e Controle Negativo (CN)	100

Tabela 11 - Matriz de Correlação de Pearson entre teores de compostos fenólicos e dados da avaliação do potencial alelopático.....	102
---	------------

RESUMO

Schinus terebinthifolia Raddi (Anacardiaceae) é uma planta nativa da América do Sul, conhecida popularmente como aroeira. É uma das espécies vegetais mais utilizadas na medicina tradicional e na gastronomia. O uso da aroeira e de seus produtos ainda é pautado no extrativismo, o que não garante uniformidade quanto à sua composição química e as ações biológicas advindas desses compostos, devido à interferência de fatores ambientais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de diferentes tipos de adubação na produção de metabólitos secundários de plantas de *S. terebinthifolia* quanto às atividades biológicas exibidas pelos extratos etanólicos produzidos a partir de folhas e frutos dessas plantas. O material vegetal foi coletado em um plantio experimental do INCAPER, município de Linhares – ES. Foram utilizadas diferentes condições de adubação, com as seguintes características: T1 = testemunha; T2 = 100g de adubo NPK; T3 = T2 + 2g de boro (H_3BO_3); T4 = T2 + 4g de zinco ($ZnSO_4$); T5 = T2 + 2g de boro (H_3BO_3) + 4g de zinco ($ZnSO_4$), e T6 = 500g de adubação orgânica (esterco bovino). Após a colheita, o material vegetal (folhas e frutos) foi seco, triturado e, em seguida, foram produzidos extratos etanólicos brutos com cada um deles. Amostras de folhas e frutos foram avaliadas quanto ao seu conteúdo químico de nutrientes. Todos os extratos produzidos foram avaliados quanto ao seu perfil químico por meio de Espectrometria de Massas (ESI (-) FT-ICR MS e MS/MS), composição fitoquímica (fenóis, flavonoides e taninos), atividade antioxidante (ABTS, DPPH, FRAP e Quelação do Fe^{2+}), citotoxicidade e anti-citotoxicidade em linfócitos humanos e efeito antiproliferativo em células de Sarcoma 180 *in vitro* (ensaio MTT) e potencial alelopático (sistema-teste *Allium cepa*). A análise do conteúdo químico do material vegetal de *S. teribinthifolia* revelou que as folhas foram os órgãos que apresentaram maior alteração no conteúdo de macro e micronutrientes, pois continham baixos teores de P, Fe, Cu, Zn e Mn. Os frutos das plantas adubadas com T1, T2, T3, T4 e T6 apresentaram carência de Zn e Mn, mas elevado conteúdo de cobre (Cu). As análises espectrométricas identificaram nos extratos de frutos e folhas de aroeira diferentes classes de substâncias, com destaque para os ácidos anacárdicos e seus derivados. Os extratos de frutos e folhas de *S. terebinthifolia* apresentaram respostas distintas nos testes de quantificação de fenólicos e nos ensaios antioxidantes, sendo que T1F e T6F apresentaram maior conteúdo de compostos fenólicos. A análise multivariada (PCA) demonstrou que a presença desses compostos bioativos influenciou em melhores respostas desses extratos na ação antioxidante, quando avaliados pelos testes do ABTS, DPPH e FRAP. Porém, no ensaio da quelação do Fe^{+2} , os extratos T3 e T5 foram mais eficientes. Na avaliação de viabilidade celular em linfócitos humanos, a maioria dos extratos testados demonstrou atividade citotóxica nas concentrações e tempos avaliados, sendo o extrato T2 aquele com maior seletividade de ação em relação às

células tumorais. Na avaliação anticitotóxica, nos tratamentos simultâneos e pós-tratamento, os extratos T1F e T6F demonstraram ter capacidade protetiva aos linfócitos humanos frente à cisplatina. Em relação ao potencial alelopático (IA), todos os extratos testados interferiram na germinação de sementes expostas a eles, assim como nos parâmetros de germinação (IVG) e de crescimento radicular (CRM e IVCR).

Palavras-chave: Alelopatia • ácidos anacárdicos • antioxidantes • citotoxicidade •

ABSTRACT

Schinus terebinthifolia Raddi (Anacardiaceae) is a plant native to South America, popularly known as Brazilian peppertree. It is one of the most used plant species in traditional medicine and gastronomy. The use of aroeira and its products is still based on extractivism, which does not guarantee uniformity regarding its chemical composition and the biological activity resulting from those compounds, due to the interference of environmental factors. The objective of this paper was to evaluate the influence of different types of fertilization on the production of secondary metabolites of *S. terebinthifolia* plants regarding the biological activities exhibited by the ethanol extracts produced from the leaves and fruits of those plants. The plant material used in the present study was collected in an experimental plantation at INCAPER, Linhares - ES. Different fertilization conditions were used, with the following characteristics: T1 = control; T2 = 100g of NPK fertilizer; T3 = T2 + 2g of boron (H_3BO_3); T4 = T2 + 4g zinc ($ZnSO_4$); T5 = T2 + 2g of boron (H_3BO_3) + 4g of zinc ($ZnSO_4$), and T6 = 500g of organic fertilization (bovine manure). After the collection, the plant material (leaves and fruits) of each treatment was dried, crushed and crude ethanolic extracts were produced with them. Leaf and fruit samples were evaluated for their chemical nutrient profile. All the extracts produced were evaluated for their chemical profile using Mass Spectrometry (ESI (-) FT-ICR MS and MS / MS), phytochemical composition (phenols, flavonoids and tannins), antioxidant activity (ABTS, DPPH, FRAP and Fe^{2+} chelation), cytotoxicity and anti-cytotoxicity in human lymphocytes and antiproliferative effect in *in vitro* Sarcoma 180 cells (MTT assay) and allelopathic potential (*Allium cepa* test system). The analysis of the chemical content of the plant material of *S. teribinthifolia* revealed that the leaves were the organs that showed the greatest alteration in the content of macro and micronutrients, as they contained low levels of P, Fe, Cu, Zn and Mn. The fruits of plants fertilized with T1, T2, T3, T4 and T6 showed a lack of Zn and Mn, but a high content of copper (Cu). Spectrometric analyses identified different classes of substances in the ethanol extracts of fruits and Brazilian peppertree leaves, with emphasis on anacardic acids and their derivatives. The extracts of fruits and leaves of *S. terebinthifolia* showed different responses in the phenolic quantification tests and in the antioxidant tests, with T1F and T6F having higher content of phenolic compounds. Multivariate analysis (PCA) demonstrated that the presence of those bioactive compounds influenced better responses of these extracts in antioxidant action, when evaluated by ABTS, DPPH and FRAP tests. However, in the Fe^{+2} chelation test, fruit extracts from treatments T3 and T5 were more efficient. In the evaluation of cell viability in human lymphocytes, most extracts tested showed cytotoxic activity at the concentrations and times evaluated, with the T2 treatment being the one with the greatest selectivity of action in relation to tumor cells. In the anticytotoxic evaluation, in the simultaneous treatments and in post-treatment, the

extracts of T1F and T6F demonstrated a protective capacity to human lymphocytes against cisplatin. Regarding the allelopathic potential (AI), all extracts tested interfered in the germination of seeds exposed to them, as well as in the parameters of germination (GSI) and root growth (RML and RGS).

Keywords: Allelopaty • anacardic acids • antioxidants • cytotoxicity •

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 <i>Schinus terebinthifolia</i> Raddi (aroeira).....	19
2.1.1 <i>Caracterização botânica e ecológica</i>	19
2.1.2 <i>Usos e aplicações biológicas</i>	22
2.1.3 <i>Composição química</i>	27
2.1.4 <i>Ácidos anacárdicos</i>	30
2.2 Ensaio utilizado na identificação de compostos químicos.....	32
2.2.1 <i>Teores totais de compostos fenólicos, flavonoides e taninos</i>	33
2.2.2 <i>Testes antioxidantes</i>	34
2.3 O uso da Espectrometria de Massas na identificação de compostos orgânicos.....	36
2.4 Ensaio utilizado na avaliação de ações biológicas.....	39
2.4.1 <i>Viabilidade celular</i>	40
2.4.2 <i>Atividade alelopática</i>	41
2.5 Influência da adubação no crescimento e no desenvolvimento vegetal e seus efeitos na produção de metabólitos secundários.....	43
3 OBJETIVOS	47
3.1 Objetivo Geral.....	47
3.2 Objetivos Específicos.....	47
4 MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1 Obtenção do material vegetal e caracterização do local de cultivo.....	48
4.2 Delineamento experimental do local de coleta e tipos de adubação.....	49
4.3 Análise de macro e micronutrientes em material vegetal.....	49
4.4 Produção dos extratos.....	50
4.5 Análise por ESI (-) FT-ICR MS e ESI (-) FT-ICR MS/MS.....	51
4.6 Análise química dos extratos.....	51
4.6.1 <i>Teor total de compostos fenólicos</i>	52
4.6.2 <i>Teor total de flavonoides</i>	52
4.6.3 <i>Teor total de taninos</i>	52
4.7 Avaliação das atividades antioxidantes.....	52

4.7.1 ABTS.....	53
4.7.2 DPPH.....	54
4.7.3 FRAP.....	54
4.7.4 Quelação do Fe ²⁺	55
4.8 Ensaio de viabilidade celular in vitro.....	56
4.8.1 Obtenção e isolamento de linfócitos humanos.....	56
4.8.1.1 Atividade citotóxica em linfócitos humanos.....	57
4.8.1.2 Atividade anticitotóxica em linfócitos humanos.....	58
4.8.2 Obtenção e isolamento de células de Sarcoma 180 (S-180).....	59
4.8.2.1 Atividade antiproliferativa em S-180.....	59
4.8.3 Índice de Seletividade (IS).....	60
4.9 Avaliação do potencial alelopático.....	60
4.10 Delineamento experimental e análise estatística.....	63
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
5.1 Análise de nutrientes em tecidos vegetais de <i>S. terebinthifolia</i> Raddi.....	64
5.2 Análise por ESI (-) FT-ICR MS e ESI (-) FT-ICR MS/MS de extratos etanólicos de <i>Schinus terebinthifolia</i> Raddi (aroeira).....	69
5.3 Teores de compostos fenólicos em extratos de <i>S. terebinthifolia</i> Raddi.....	81
5.4 Atividade antioxidante de extratos de <i>S. terebinthifolia</i> Raddi (aroeira).....	84
5.5 Ensaio de viabilidade celular in vitro.....	89
5.5.1 Atividade citotóxica em linfócitos humanos.....	90
5.5.2 Atividade anticitotóxica em linfócitos humanos.....	91
5.5.3 Atividade antiproliferativa em Sarcoma 180.....	93
5.5.4 Índice de Seletividade.....	96
5.6 Avaliação do potencial alelopático no sistema-teste <i>Allium cepa</i>	97
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	103
REFERÊNCIAS.....	105
ANEXO I.....	121
ANEXO II.....	122
ANEXO III.....	123

1 INTRODUÇÃO

A busca por espécies vegetais com potencial para diversos usos vem fazendo com que a humanidade invista em conhecer melhor a flora que a rodeia. As plantas ofertam matéria-prima para a maioria das atividades cotidianas que o homem realiza, ou seja, direta ou indiretamente, ele é dependente dos vegetais e não sobreviverá sem sua presença.

Dentre os diversos vegetais utilizados pela humanidade, as espécies medicinais – plantas que contêm substâncias, ou classes de substâncias, responsáveis por alguma ação terapêutica (ANVISA, 2010) - recebem destaque, pois têm uma importância cultural e farmacológica muito grande. As plantas medicinais são importantes para o desenvolvimento de novos medicamentos, não apenas quando os constituintes das plantas são usados diretamente como agentes terapêuticos, mas também como materiais de partida para a síntese de medicamentos ou como modelos para compostos farmacologicamente ativos (OMS, 1998).

No Brasil, existem diversas espécies de plantas medicinais que são empregadas popularmente no combate a várias patologias. Dentre elas, destaque-se a aroeira, *Schinus terebinthifolia* Raddi, espécie pertencente à família Anacardiaceae, distribuída naturalmente por parte do litoral brasileiro, do Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul, onde há a predominância do bioma Mata Atlântica. Seu uso é amplamente difundido em comunidades tradicionais (AMORIM; SANTOS, 2003; AZEVEDO et al., 2015).

A casca, as folhas e as raízes são constituintes tradicionais da medicina popular, devido às suas propriedades anti-inflamatórias, antitumoral, antioxidante, cicatrizante, antipiréticas e analgésicas (BERNARDES et al., 2014). Os frutos, conhecidos popularmente como pimenta-rosa, são consumidos como condimento alimentar e, quando processados, são extraídos deles o óleo essencial, muito utilizado pela indústria farmacêutica.

Apesar de *S. terebinthifolia* estar listada entre as espécies vegetais com potencial de gerar produtos de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS) e apresentar diversas ações biológicas e farmacológicas, comprovadas por meio de procedimentos experimentais e clínicos, essa espécie é ainda pouco utilizada para as finalidades indicadas acima.

Os frutos de aroeira, em maioria, são coletados em áreas de ocorrência natural da espécie, o que não garante a uniformidade na qualidade e na presença de compostos bioativos advindo do seu metabolismo secundário, pois o perfil químico dos vegetais pode sofrer alteração em função de fatores bióticos e abióticos presentes no ambiente (MIRANDA et al., 2016), o que resulta em respostas diferenciadas quando suas ações biológicas são avaliadas (PILATTI et al., 2019).

Em busca de uniformizar a presença dos compostos químicos ativos e de tornar o cultivo da aroeira agriculturalmente viável e comercialmente rentável, estão sendo desenvolvidos projetos que visam selecionar genótipos de aroeiras e/ou tratos culturais que melhorem a produção dos frutos e dos teores de substâncias ativas presentes nesta espécie, sobretudo os teores de compostos fenólicos.

Compostos fenólicos são produtos naturais bioativos que têm recebido crescente atenção nos últimos anos (GE; LI; LISAK, 2020). Neste grupo, as substâncias fenólicas, os flavonoides e os ácidos fenólicos são os que mais se destacam e são considerados os antioxidantes fenólicos mais comuns de fontes naturais (PIRES et al., 2017). Os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células.

No entanto, a maioria das pesquisas que objetivam verificar a influência dos tratos culturais, principalmente a dos nutrientes, no desenvolvimento de *Schinus terebinthifolia* Raddi analisam somente aspectos relacionados ao desenvolvimento do vegetal, a produção de frutos e/ou utiliza-se de análises visuais para inferir respostas acerca do funcionamento fisiológico dessa espécie, o que não garante um produto de qualidade para uso farmacológico.

Dessa forma, é necessário investigar a influência de diferentes tipos de adubação sob o metabolismo secundário de *Schinus terebinthifolia* Raddi (aroeira), saber a quantidade e quais os grupos de compostos químicos bioativos são produzidos quando as plantas de aroeira são nutridas suplementarmente com essas adubações, averiguar as ações desses compostos químicos por meio de atividades biológicas (*in vitro* e *in vivo*), indicar o órgão vegetal da aroeira onde esses compostos estão presentes em maior frequência e abundância e assim, saber qual o modo de nutrição é a mais recomendável quando o objetivo é produzir material vegetal a ser utilizado na produção de produtos farmacêuticos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Schinus terebinthifolia* Raddi (aroeira)

2.1.1 Caracterização botânica e ecológica

Schinus terebinthifolia Raddi (sinônimo *Schinus terebinthifolius* Raddi) é uma planta nativa do Brasil e popularmente conhecida como: aroeira, aroeira-vermelha, aroeira-da-praia, aroeirinha, aroeira-pimenteira, pimenta-rosa, entre outros nomes vulgares. É pertencente à família Anacardiaceae (CORADIN et al., 2011; SILVA-LUZ; PIRANI, 2015). Embora seja conhecida como pimenta-rosa, essa espécie não possui parentesco direto com as pimentas, mas é parente do caju (*Anacardium occidentale* L.), da manga (*Mangifera indica* L.) e do cajá-mirim (*Spondias mombin* L.) (SODRÉ, 2016; LUZ, 2017).

A aroeira é um arbusto ou árvore de médio porte, até 15 m de altura, tronco tortuoso e curto com Diâmetro a Altura do Peito (DAP) de até 60 cm, copa larga e pouco densa. Externamente o tronco é escuro, áspero, sulcado e escamoso, que se desprende em placas irregulares. Internamente é avermelhado, com textura fibrosa e odor característico com exsudação de terebintina. A disposição dos ramos se dá de forma radial e em diferentes inclinações (GILBERT; FAVORETO, 2011; NEVES et al., 2016).

Apresenta folhas aromáticas, perenes, compostas com 3 a 11 de folíolos imparipinados, alternas, vilosas, medindo de 3 a 5 cm de comprimento por 2 a 3 cm de largura, com formato oblongo ou elíptico, e cor verde-escuro. Os ramos das folhas, quando novas, são trifolioladas, característica utilizada na identificação da espécie (GILBERT; FAVORETO, 2011; NEVES et al., 2016).

S. terebinthifolia Raddi é uma espécie dioica, mas há relatos da existência de plantas hermafroditas (CESÁRIO; GAGLIANONE, 2008). Exibe flores pequenas (<5 mm), pentâmeras, numerosas e reunidas em cachos, sendo a inflorescência masculina sempre maior e com um número maior de flores (LENZI; ORTH, 2004), porém menos duradoura que a inflorescência feminina. As flores possuem coloração branca e são melíferas. O florescimento ocorre de setembro a janeiro (LORENZI, 2002; LENZI et al., 2003; ORWA et al., 2009; RUAS, 2016).

O fruto da aroeira é uma drupa levemente achatada que mede entre 4,0 mm e 5,5 mm de diâmetro. Quando imaturos são verde-claros, e quando maduros, adquirem cor avermelhada ou rosa-forte, característica utilizada para nomeá-la pimenta-rosa. Os frutos, assim como as folhas, são aromáticos. A frutificação ocorre entre os meses de maio a junho (GILBERT; FAVORETO, 2011; NEVES et al., 2016). A figura 1 ilustra alguns aspectos relacionados à morfologia da espécie.



Figura 1 - Aspectos morfológicos de *Schinus terebinthifolia* Raddi, onde: (a) ramo com folhas jovens; (b) ramo com flores; (c) ramo com frutos; e (d) indivíduo adulto no período da frutificação. Fonte: Acervo do autor (2018).

Está, de forma natural, presente em grande parte do litoral brasileiro, desde o Nordeste até a região Sul do país, área por onde se estende o bioma Mata Atlântica, mas pode ser encontrada no Centro-oeste e Norte do país, assim como em outros biomas (GILBERT; FAVORETO, 2011; CARVALHO et al., 2013). A modelagem ambiental realizada por Garrastazu e Mattos (2013) possibilitou observar a ampla distribuição de ocorrência potencial de *S. terebinthifolia* no território brasileiro, compatível com os diversos relatos de ocorrência natural acima descrito e ilustrado por Silva-Luz e Pirani (2015) (figura 2).



Figura 2 - Ocorrência de *Schinus terebinthifolia* Raddi no território brasileiro. Fonte: SILVA-LUZ; PIRANI (2015).

Sua distribuição se dá, principalmente, em ambientes tropicais e subtropicais costeiros, onde apresenta crescimento rápido, sobretudo em áreas que sofreram alterações antrópicas, e assim, fazendo com que ela receba o *status* de espécie pioneira. Cresce em diversos tipos de solos e em áreas que possuem até 2.000 m de altitude (ORWA et al., 2009).

De acordo com Rosas et al. (2019), aroeira é uma espécie que possui fácil adaptação as mudanças climáticas e apresenta grande plasticidade ecológica, sendo atualmente utilizada na restauração de áreas degradadas (SOUZA et al., 2001). Conforme Morais Junior et al. (2019) *S. terebinthifolia* é uma das espécies vegetais que possuem potencial para serem utilizadas em projetos que objetivam promover a compensação de carbono em áreas degradadas da Mata Atlântica.

A aroeira é nativa de países da América do Sul, tal como: Argentina, Brasil, Bolívia, Chile, Paraguai e Uruguai (ORWA et al., 2009; NEVES et al., 2016).

Nos Estados Unidos, principalmente no estado da Flórida, e em países da África, Ásia e Europa, foi introduzida como planta ornamental e atualmente é considerada uma planta invasora, sendo alvo de controle biológico devido ao seu rápido desenvolvimento e reprodução, e assim, tendo capacidade de alterar a estrutura e a função das espécies nativas presentes nesses territórios (ORWA et al., 2009; BENDAOU et al., 2010). O mapa apresentado (figura 3) indica os países onde a espécie foi relatada.



Figura 3 - Relato de ocorrência de aroeira (*Schinus terebinthifolia* Raddi) em diferentes países: natural (verde) e introduzida (hachurada). Fonte: ORWA et al. (2009).

Apesar de apresentar alguns aspectos negativos referentes à proliferação, pois em alguns países é considerada uma espécie invasora, a aroeira é uma planta bastante popular em outros países onde recebe os nomes de: “*brazilian peppertree*”, “*pink pepper*” e “*christmas berry*” (Estados Unidos); “*brasilianischer pfeffer*” (Alemanha); “*pimentero del Brasil*” e “*copal*” (Espanha); e “*poivre rose*” (França) (CARVALHO et al., 2013), onde é utilizada principalmente como condimento alimentar e na medicina tradicional.

2.1.2 Usos e aplicações biológicas

A aroeira é uma espécie vegetal bastante conhecida e utilizada na produção de lenha e carvão, na ornamentação, na nutrição e na medicina tradicional, tendo o último uso um maior destaque (AZEVEDO et al., 2015). Conforme Gomes et al. (2019) é uma planta muito empregada na medicina popular e possui vários potenciais biológicos. As aplicações biológicas desta planta são conhecidas há muitos anos e suas propriedades estão descritas desde a primeira edição da Farmacopeia Brasileira, publicada em 1926 (CARVALHO et al., 2013; FALCÃO et al., 2015).

Todas as partes das plantas têm sido empregadas na farmacologia tradicional para o tratamento de várias patologias. Os frutos, as cascas do caule e as folhas da aroeira são os órgãos mais utilizados no uso medicinal, havendo grande relato, principalmente em estudos experimentais, do uso do óleo vegetal proveniente dos

frutos e folhas (BENDAOUUD et al., 2010; GILBERT; FAVORETO, 2011; LIMA et al., 2017).

Na medicina tradicional, esta planta é usada para tratar feridas e úlceras na pele, tumores, diarreia, artrite, bem como infecções urinárias e do trato respiratório (BRANCO NETO et al., 2006). Carvalho et al. (2013), afirmam que os compostos advindos do metabolismo da aroeira atuam no tratamento de gastrites e dispepsias (desconforto abdominal), tem ação adstringente, tônico, estimulante e antineurválgico. Há relatos que indicam o uso de *S. terebinthifolius* Raddi no tratamento de muitas doenças, como bronquite e distúrbios urinários, e também é usado como febrífugo, analgésico e antimicrobiano (SCHIMITBERGER et al., 2018; TLILI et al., 2018).

Em pesquisa realizada por Beltreschi, Lima e Cruz (2019), em uma comunidade quilombola de Ipiranga – PB foi verificado que a aroeira é uma das espécies vegetais mais utilizadas pela comunidade, principalmente a casca e a entre casca da árvore. Tal comunidade indicou que a aroeira é utilizada no tratamento de inflamações, feridas e cortes, alergias e dor de garganta.

De acordo com Santana et al. (2012), na medicina popular, esta planta tem sido usada no tratamento de reumatismo, gota, doenças de pele e artrite. Além disso, a decocção de flores, caules, frutos e folhas são utilizadas para o tratamento de tumores e lepra (SCHMOURLO et al., 2005).

A pesquisa realizada por Silva (2015) relata o emprego de um extrato da casca do caule de *S. terebinthifolius*, em forma de decócto de uso tópico, para desinfecção vaginal – especificamente contra cervicite e cervico-vaginite crônica, tendo este uso apoio em ensaios clínicos e experimentais.

Como podemos verificar, diversos são os usos medicinais realizados por populações tradicionais atribuídos a aroeira, e que estes usos estão relacionados às suas propriedades anti-inflamatórias, antitumoral, antioxidante, cicatrizante, antipiréticas, analgésicas e como agente depurativo (BENDAOUUD et al., 2010; CARVALHO et al., 2013).

As ações farmacológicas e biológicas, acima relatadas, fazem com que *S. terebinthifolia* Raddi esteja listada entre as espécies vegetais com potencial de gerar produtos de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS) e esteja, conjuntamente com outras 71 espécies, elencada na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde – RENISUS (CORADIN et al., 2011), pois seu amplo uso,

como planta medicinal, tem apresentado grande potencial para o desenvolvimento de novos produtos à base da espécie (CARVALHO et al., 2013).

O conhecimento científico sobre as atividades biológicas das plantas medicinais pode estimular o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas (ROCHA et al., 2019). Dessa forma, os relatos de uso na farmacologia tradicional, os estudos experimentais e clínicos e a demanda por produtos obtidos a partir de determinada planta medicinal, podem instigar o desenvolvimento de novas cadeias produtivas ligadas à planta medicinal a ser explorada, bem como orientar estudos e pesquisas que possam contribuir na elaboração da Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (RENAFITO), dando suporte ao desenvolvimento e a inovação na área de plantas medicinais e fitoterápicas (PICH, 2019).

Na tabela 1 são apresentadas algumas ações biológicas, remetidas a *S. terebinthifolia* Raddi, divulgadas nos últimos cinco anos e apoiadas em evidências experimentais e clínicas.

Tabela 1 - Ações biológicas relacionadas a *Schinus terebinthifolia* Raddi (aroeira).

Ações biológicas	Organismos testes	Tipos de extração / solventes	Órgãos utilizados	Referências
Carrapaticida	Carrapatos da espécie <i>Rhipicephalus boophilus microplus</i>	Hidroalcoólico (70%)	Cascas e folhas	Dias et al. (2019)
Antibacteriano	Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (MRSA), <i>Enterococo</i> resistente à vancomicina (VRE), Bacilos Gram-negativos não fermentativos (NFGNB), entre outras.	Diclorometano, hexano, hidroetanólico (54%) e metanol	Resíduo de folhas, frutos e cascas dos frutos	Gomes et al. (2019)
Antitumoral, antiangiogênico e mutagênico	Sarcoma 180	Extrato salino (NaCl 0,15 M)	Folhas	Ramos et al. (2019)
Antibacteriano e ações antidiabéticas	<i>Clostridium</i> sp., <i>Salmonella</i> sp., <i>Escherichia coli</i> , <i>S. aureus</i> e <i>Bacillus cereus</i>	Metanol (99,8%)	Raízes, casca de caule e folhas	Rocha et al. (2019)
Antibacteriano	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Hidrodestilação	Frutos maduros e verdes (óleo essencial)	Santos et al. (2019)
Inseticida	Larvas de <i>Plutella xylostella</i>	Extrato salino (NaCl 0,15 M)	Folhas	Silva et al. (2019)
Antibacteriano	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> e <i>E. coli</i>	Hidrodestilação	Frutos maduros (óleo essencial)	Dannenberg et al. (2018)
Inseticida	Adultos da espécie <i>Rhyzopertha dominica</i>	Hidrodestilação	Frutos verdes e maduros (óleo essencial)	Nascimento et al. (2018)
Antitumoral e antifúngico	Osteoblastos, Caco-2 (células de adenocarcinoma epitelial colorretal humano) e fungo <i>Malassezia furfur</i>	Diclorometano e hexano	Frutos maduros secos	Oliveira et al. (2018)
Antioxidante e biofilme	Maças tipo “gala” (<i>Malus domestica</i> Borkh.)	Metanol	Frutos	Romani et al. (2018)
Antioxidante	Eritrócitos humanos	Metanol	Frutos	Brandão et al. (2017)
Antibacteriano	<i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	Hidrodestilação	Frutos (óleo essencial)	Carvalho et al. (2017)
Anti-inflamatório e cicatrizante	Ratos (<i>Rattus norvegicus albinus</i>)	Hidrodestilação	Folhas (óleo essencial)	Estevão et al. (2017)
Anti-hipertensivo	Ratos Wistar (<i>R. norvegicus</i>) e camundongos	Metanol	Frutos	Glória et al. (2017)

Tabela 1 – Ações biológicas relacionadas a *Schinus terebinthifolia* Raddi (aroeira) (continuação)

Ações biológicas	Organismos testes	Tipos de extração / solventes	Órgãos utilizados	Referências
Repelente e inseticida	Mosca-branca de batata-doce (<i>Bemisia tabaci</i> <i>Gennadius</i>) e Mosca-branca de mamona (<i>Trialeurodes ricini</i> Misra)	Hidrodestilação	Frutos (óleo essencial)	Hussein et al. (2017)
Atividade antimicrobiana	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus niger</i> e <i>Penicillium sp.</i>	Hidrodestilação e diclorometano	Frutos (óleo essencial)	Martinelli et al. (2017)
Atividade antioxidante, anti-inflamatória, antiproliferativa (<i>in vitro</i>)	Camundongo Swiss, (<i>Mus musculus</i>) e várias linhagens de células tumorais humanas	Metanol, frações com hexano, clorofórmio e acetato de etila	Folhas	Silva et al. (2017)
Antimicrobiano e atividade citotóxica	<i>S. aureus</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>E. coli</i> e várias linhagens de células causadoras da leucemia humana	Metanol	Flores	Carneiro et al. (2016)
Antisséptico e anti-inflamatório	Vacas das raças Jersey e Holstein, <i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Streptococcus spp.</i>	Extrato hidroalcoólico (álcool de cereais)	Folhas	Faccin et al. (2016)
Ação alelopática	Alface (<i>Lactuca sativa</i> L.)	Hidrodestilação	Folhas e flores	Fonseca et al. (2016)
Inseticida e controle biológico	Gorgulho (<i>Sitophilus spp.</i>),	Extrato aquoso e hidroalcoólico	Folhas	Goergen P. C. H. (2016)
Atividade antifúngica	Cepas de <i>Candida albicans</i> e de <i>C. tropicalis</i>	Destilação por arraste a vapor de água	Folhas (óleo essencial)	Pérez A. L. A. L. (2016)
Cicatrizante	Ratos Wistar (<i>R. norvegicus albinus</i>)	Hidroalcoólico	Entrecasca	Scheibe et al. (2016)
Atividade antifúngica	50 cepas do gênero <i>Candida sp.</i>	Extrato aquoso	Cascas	Torres et al. (2016)
Antimicrobiano	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>C. albicans</i>	Maceração e extração assistida por ultrassom, ambos utilizando etanol	Folhas	Uliana et al. (2016)
Analgésico	Camundongo Swiss, (<i>M. musculus</i>) e ratos Wistar (<i>R. norvegicus albinus</i>)	Metanol e frações com n-hexano, clorofórmio e acetato de etila	Partes aéreas	Balen (2015)
Ação alelopática	Alface (<i>L. sativa</i> L.)	Hidrodestilação	Folha	Bündchen et al. (2015)
Larvicida e inseticida	Larvas de <i>Aedes aegypti</i>	Extrato salino (NaCl 0,15 M)	Folhas	Procópio et al. (2015)

Apesar de todo o potencial farmacológico, apresentado anteriormente, a aroeira é uma espécie pouco cultivada no Brasil e seus frutos são, em maioria, coletados de áreas de ocorrência natural. No entanto, muitos dos processos relacionados ao extrativismo dessa espécie podem fazer com que a aroeira corra risco de extinção devido ao manejo inadequado empregado durante a colheita dos frutos produzidos por ela (ÁLVARES-CARVALHO et al., 2016; NEVES et al., 2016).

O Espírito Santo é um dos poucos estados brasileiros que possuem registros de plantios de aroeira voltados à produção de óleo essencial e condimento alimentar (ANDRADE, 2015; SILVA et al., 2017). Devido à sua valorização no exterior a pimenta-rosa já desponta como um dos principais produtos de exportação do Espírito Santo, sobretudo para os Estados Unidos, países da Ásia e Europa, principais consumidores da pimenta-rosa brasileira. Dados de 2016 apontam que o estado foi capaz de produzir até 300 toneladas de pimenta-rosa por ano, que era vendida por até 10,00 reais o quilo (FAES, 2009; SODRÉ, 2016).

As cascas da aroeira já são utilizadas para a produção dos fitoterápicos: Kronel[®], indicado no tratamento das cervicites, vaginites e cérvico-vaginites, e do Kios[®], medicamento destinado ao tratamento sintomático da gastrite leve a moderada.

A pimenta-rosa é utilizada, especialmente, como condimento alimentar, sendo muito usada na culinária nacional e internacional devido ao sabor suave e apimentado, bem como sua aparência, que permite o seu emprego em diversas preparações culinárias, podendo ser utilizada na forma de grãos inteiros ou moída (CASTRO et al., 2012; NEVES et al., 2016).

O óleo essencial, extraído principalmente dos frutos, é outro produto que tem ganhado mercado nacional e internacional. A indústria Natura[®] já produz alguns cosméticos (hidratante, óleo corporal, sabonete e creme antissinais) utilizando o óleo essencial e folhas de pimenta-rosa (NEVES et al., 2016; GOMES et al., 2013).

2.1.3 Composição química

As plantas produzem uma grande diversidade de compostos químicos que podem ser classificados como metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários são distribuídos por toda a planta e utilizados na manutenção das funções vitais ao vegetal. Já os metabólitos secundários não possuem uma ampla distribuição, pois não são necessários a todos os órgãos da planta, mas apresentam atividades

biológicas específicas, dentre elas a atividade antioxidante (SARTORELLI, 2015; TAIZ et al., 2017).

Os metabólitos secundários também atuam como compostos de sinalização, atraindo polinizadores ou animais para dispersão de sementes, além de protegerem as plantas dos agentes oxidantes e da radiação ultravioleta (VUOLO et al., 2019). No entanto, o conteúdo total de metabólitos secundários pode sofrer variações temporais e espaciais, sendo que sua síntese frequentemente pode ser afetada por condições ambientais (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). O esquema abaixo (figura 4) ilustra as ligações existentes entre o metabolismo primário e as rotas de biossíntese dos metabólitos secundários.

Os efeitos biológicos apresentados anteriormente e atribuídos à aroeira (*S. terebinthifolia* Raddi) decorrem de substâncias ativas advindas de seu metabolismo secundário, como é o caso dos compostos fenólicos, principalmente fenóis, flavonoides, taninos, alcaloides, saponinas e esteróis. Porém, os polifenóis, metabólitos secundários mais amplamente distribuídos nas plantas, estão distribuídos desigualmente em seus órgãos, como folhas, cascas, frutos, flores e sementes (BERNARDES et al., 2011; CARVALHO et al., 2013; VUOLO et al., 2019).

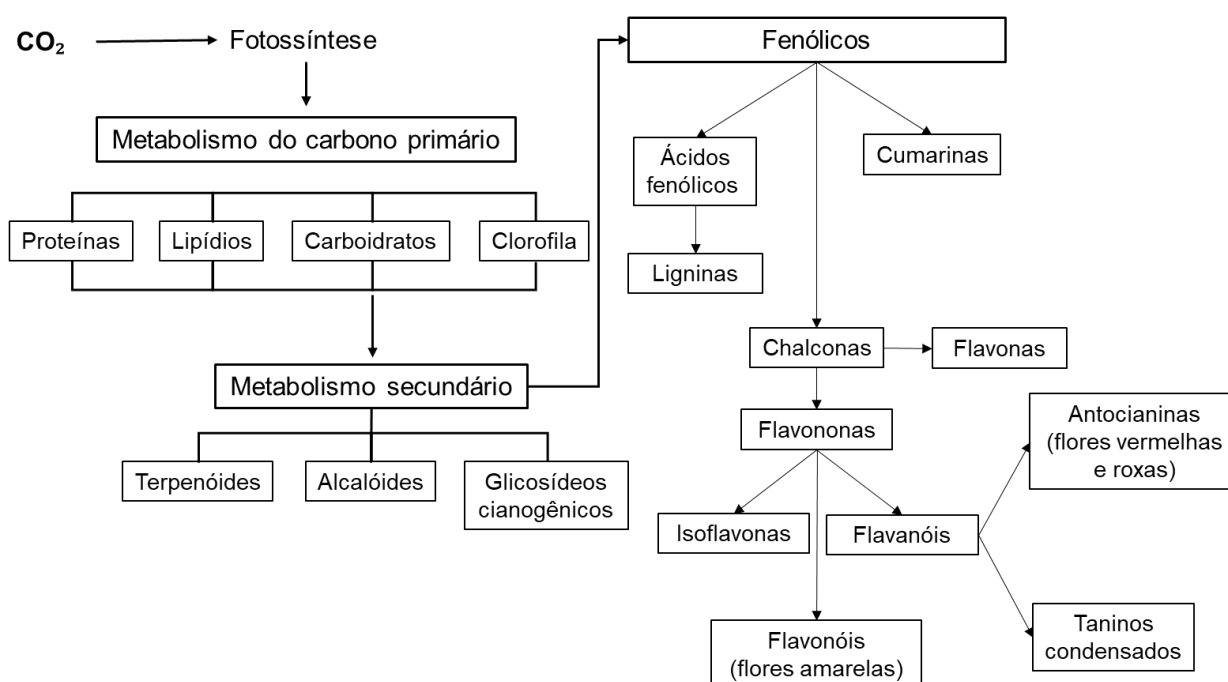


Figura 4 - Metabolismo primário e metabolismo secundário em plantas e os compostos (metabólitos) gerados nos mesmos. Fonte: Adaptado de Vuolo et al. (2019).

Em um levantamento bibliográfico, Heringer (2009) verificou que dentro do gênero *Schinus* a espécie mais estudada quimicamente é *S. terebinthifolia* Raddi, contribuindo com mais de 50% das substâncias isoladas do gênero. A espécie possui grande variedade química, apresentando cerca de sete classes de substâncias já isoladas, sendo a classe dos flavonoides a mais frequente.

Ao verificar o trabalho de Rocha et al. (2019) foi possível averiguar que os extratos metanólicos da casca do caule e das folhas de aroeira apresentaram as maiores concentrações de ácidos fenólicos e flavonoides. Os extratos metanólicos produzidos com folhas de *S. terebinthifolia* Raddi e analisados, após fracionamento com acetato de etila e solução hidrometanólica, com cromatografia de sílica gel indicaram a presença de compostos fenólicos, com destaque para taninos hidrolisados e flavonoides (SILVA et al., 2017). Pagani et al. (2014) verificaram que em frutos maduros de aroeira há um alto teor de capsaicina, a presença significativa de carotenoides e ácido ascórbico.

Em análise de extrato salino de folhas de aroeira, Ramos et al. (2019) verificaram que as folhas são ricas em proantocianidinas poliméricas, taninos hidrolisáveis, flavonoides heterosídeos e agliconas, derivados do ácido cinâmico, esteróides e lectina. No entanto, Pilatti et al. (2019), avaliando extratos metanólicos produzidos com folhas de aroeira (*S. terebinthifolia* Raddi) de duas populações florestais da Mata Atlântica, identificaram alcaloides, taninos hidrolisáveis, taninos condensados, saponinas, esteroides, triterpenóides e flavonoides como os principais compostos químicos presentes nestes órgãos vegetais.

Em busca de melhor conhecer e quantificar os metabólitos secundários presentes nos extratos vegetais várias técnicas químicas podem ser empregadas, tal como a prospecção fitoquímica, testes químicos de coloração ou precipitação, e/ou testes cromatográficos. As cromatografias permitem a separação dos compostos químicos presentes na amostra em função do seu tamanho molecular e outras características inerentes às classes a que se quer pesquisar/avaliar (SIMÕES et al., 2000; CUNHA, 2014; OLIVEIRA et al., 2014).

Gomes et al. (2019), por meio de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (GC/MS), identificaram 39 substâncias, sendo os triterpenos pentacíclicos lupeol (16,32%), lupenona (12,75%) e 28-norolean-17-em-3-ona (10,69%), bem como seu precursor esqualeno (9,69%), os principais compostos. Hussen et al. (2017) afirmam que os principais constituintes do óleo essencial dos

frutos de *S. terebinthifolius* são α -pineno (36,9%), α -felandreno (32,8%), limoneno (11,9%) e α -terpineol (6,0%).

Em análise com Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), Tlili et al. (2018) indicam que os principais compostos presentes nos extratos metanólicos de frutos de aroeira são a catequina (37-88%), a luteolina (17,95%) e o kampferol (27,13%). Glória et al. (2017), ao avaliar a fração aquosa do extrato metanólico de *S. terebinthifolia*, identificaram a presença de um flavonoide, a naringenina, e um ácido fenólico, o ácido gálico.

No trabalho realizado por Bernardes et al. (2014), por meio de análises em HPLC, foi possível verificar que no extrato metanólico bruto de frutas e folhas de aroeira e na fração A3 (rica em flavonoides), a apigenina, uma flavona, estava presente em maior quantidade e sendo ele responsável pelas boas atividades antioxidantes e antimicrobianas verificadas.

2.1.4 Ácidos anacárdicos

O levantamento bibliográfico realizado por Heringer (2009) aponta que os lipídios fenólicos, grupo em que estão presentes os ácidos anacárdicos, é uma das classes de substâncias químicas isoladas com maior frequência nas pesquisas fitoquímicas realizadas com *Schinus terebinthifolia*, sendo os lipídios fenólicos a classe mais importante, seguido dos grupos formados pelos monoterpenos, flavonoides e taninos.

Os ácidos anacárdicos são compostos formados por uma fração de ácido salicílico com uma longa cadeia lateral não ramificada ligada à posição 6 do anel fenólico. A cadeia lateral dos ácidos anacárdicos possui 15 carbonos que diferem no grau de insaturações, até 3 insaturações (CAILLLOL, 2018; GÓMEZ et al., 2019).

A biossíntese de lipídios fenólicos ainda não foi muito bem esclarecida, mas hipóteses indicam que eles se originam por meio da participação do acetato na biossíntese do ácido 6-metilsalicílico ou através da condensação de ácidos graxos de cadeia longa com três unidades de malonato, responsáveis pela formação do anel aromático (CORREA et al., 2006; MORAIS et al., 2017; KUMAR et al., 2018).

Correa et al. (2006) afirmam que, assim como os ácidos anacárdicos, o cardol ocorre naturalmente, em pequenas proporções, em espécies da família Anacardiaceae. Além da aroeira (*Schinus terebinthifolia* Raddi), a presença dos ácidos anacárdicos já foi evidenciada em pistache (*Pistacia vera* L.), em anacárdio oriental

(*Semecarpus anacardium* Linn.), e em caju (*Anacardium occidentale* L.), principalmente no Líquido da Castanha do Caju (LCC) (SCHULTZ et al., 2006; ERŞAN et al., 2018; SALEHI et al., 2019).

No LCC pode ser encontrada uma mistura de quatro compostos fenólicos potenciais, os ácidos anacárdicos (ácido 3-*n*-pentadecilsalicílico), o cardanol (3-*n*-pentadecilfenol), o cardol (5-*n*-pentadecilresorcinol) e o 2-metil-cardol (2-metil-5-*n*-pentadecilresorcinol) (figura 5), sendo os ácidos anacárdicos os compostos formadores de 80% desse líquido. Cada um desses constituintes fenólicos é heterogêneo e possui uma cadeia lateral saturada, monoeno, dieno e trieno de quinze carbonos (CAILLOL, 2018; SALEHI et al., 2019).

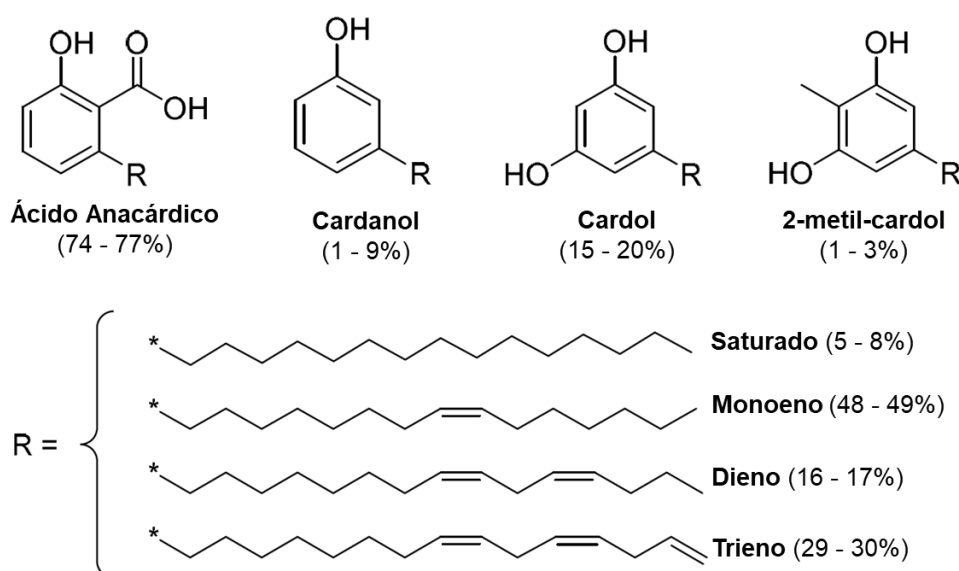


Figura 5 - Estruturas químicas do ácido anacárdico, do cardanol, do cardol e do 2-metil-cardol. Fonte: Adaptado de Caillol (2018).

As ações biológicas dos ácidos anacárdicos e dos seus derivados são bastante conhecidas. Eles possuem propriedades antimicrobianas contra várias bactérias patogênicas Gram-positivas (KUMAR et al., 2018; GOMEZ et al., 2019), sendo utilizados no combate a infecções, úlceras, amebíase, gengivites, malária e sífilis. Novas evidências sugerem que eles podem ser utilizados no tratamento de danos oxidativos, inflamações e de doenças mais graves, como câncer e a obesidade (CARVALHO et al., 2011; HEMSHEKHAR et al., 2011; SOUSA et al., 2019)

Há evidências da ação dos ácidos anacárdicos na supressão da expressão de reguladores gênicos, tais como as histonas acetiltransferases envolvidas na

sobrevivência, proliferação, invasão e inflamação das células, levando à potencialização da morte celular programada (apoptose) (SBARDELLA et al., 2008; SUNG et al., 2008). Tais evidências fazem com que, atualmente, a avaliação da citotoxicidade e do potencial terapêutico dos ácidos anacárdicos, no combate a células cancerígenas seja foco de várias pesquisas, pois são substâncias com a capacidade de modular respostas imunes (GOMEZ et al., 2019; ZHAO et al., 2019).

No estudo realizado por Zhao et al. (2019), foi verificado que os ácidos anacárdicos possuem potencial na aplicação terapêutica no tratamento de osteoporose mediada por osteoclastos. Araújo et al. (2018) afirmam que tais substâncias são potentes inibidores enzimáticos (anticolagenase e antielastase), ótimos antioxidantes e capazes de prevenir a deposição, aderência e proliferação de *Streptococcus mutans*, causador da cárie dentária.

Industrialmente, os lipídios fenólicos são empregados na produção de conservantes alimentares, tintas, cimentos, estabilizante de gasolina, inseticidas, potencialmente podem ser utilizados na produção de sabonete líquido com ação bactericida (CARVALHO et al., 2011; MAIA, 2017). O cardanol, devido às suas características químicas, pode ser um substituto de certos produtos de origem fóssil, monômeros epóxis, acrilato, plastificantes de policloreto de vinila (PVC) e surfactantes de emulsão (CAILLLOL, 2018).

Os ácidos anacárdicos possuem alto valor no mercado internacional, pois como podemos verificar, têm muitas aplicações biológicas e industriais. Dessa forma, podem se tornar um produto a ser explorado em países, como o Brasil, que possuem uma grande variedade de plantas capazes de sintetizar essa classe de substâncias em maior quantidade, tal como a aroeira e o caju (KUBO et al., 2011; SILVA, 2013).

2.2 Ensaio utilizados na identificação de compostos químicos

A análise química preliminar é necessária para verificar as possíveis ações biológicas que tais compostos possuem (SIMÕES et al., 2000) Além disso, serve para verificar a flutuação na composição química, pode ser empregada na escolha do material vegetal a ser empregados nos ensaios, na análise das condições ambientais mais favoráveis à produção desses compostos, auxiliando assim, na escolha de espécies a serem utilizadas em estudos químicos e farmacológicos (ALVES et al., 2010; BARBOSA et al., 2010).

Dentre as análises químicas mais utilizadas para verificar a ação da modulação ambiental sobre a quantidade e a qualidade de componentes ativos produzidos por uma espécie vegetal estão a medição dos teores de compostos fenólicos e os testes antioxidantes (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

2.2.1 Teores totais de compostos fenólicos, flavonoides e taninos

O ensaio para a quantificação de compostos fenólicos presentes em amostras vegetais que usa o reagente *Folin-Ciocalteu* é um método espectrofotométrico simples e amplamente utilizado. Baseia-se na interação das substâncias redutoras, como os compostos fenólicos, com o reagente *Folin-Ciocalteu*, o que leva à formação dos chamados molibdênio azul (Mo^{5+}) e tungstênio azul (W^{5+}) (figura 6). Por ter a capacidade de reagir com compostos não fenólicos, alguns autores sugerem que este método seja empregado para determinar capacidade antioxidante total (SOUSA, et al. 2007; ROCHA, et al. 2011; PIRES, et al. 2017).

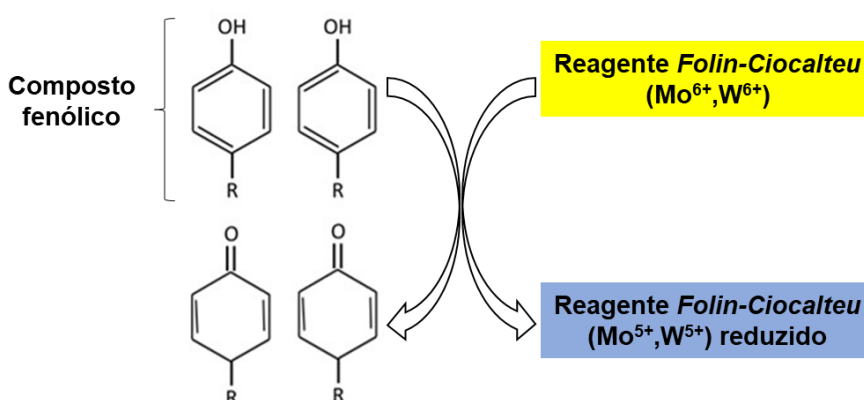


Figura 6 - Mecanismo de ação do reagente de *Folin-Ciocalteu*. Fonte: Adaptado de García Martínez et al. (2015).

O método espectrofotométrico, que utiliza o íon alumínio (Al^{3+}), é uma das técnicas mais empregadas na quantificação de flavonoides. Neste ensaio, o Al^{3+} reage com os grupos OH dos flavonoides, formando um complexo estável flavonoide- Al^{3+} de coloração amarela cuja intensidade é proporcional à concentração de flavonoides na amostra (figura 7). A formação do complexo torna a amostra quantificável e sem sofrer a influência de outros fenólicos presentes na amostra (AMORIM et al., 2008; SOBRINHO et al., 2012).

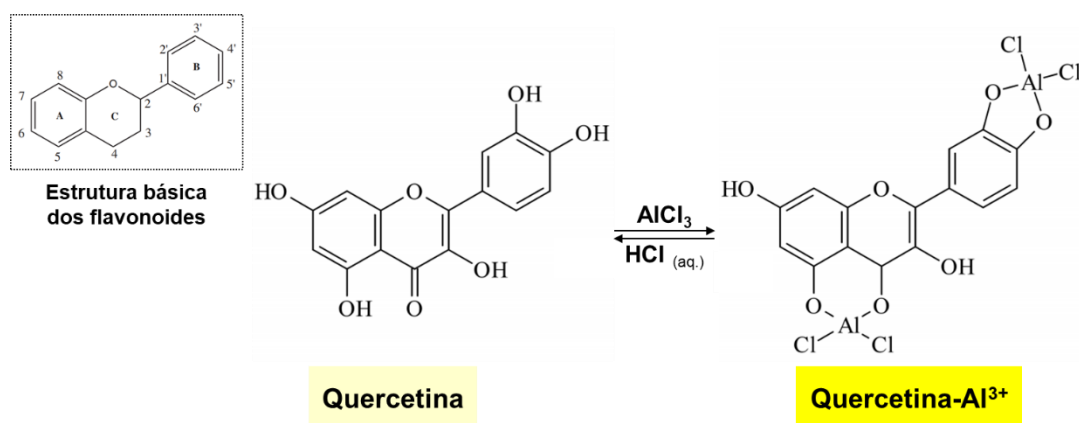


Figura 7 - Complexação do flavonoide quercetina com cloreto de alumínio (AlCl_3) o qual forma o complexo estável flavonóide- Al^{3+} . Fonte: Adaptado de Amorim et al., 2008 apud Mabry et al. (1970).

Os taninos vegetais têm sido quantificados por diversos tipos de ensaios, como precipitação de metais ou proteínas e por métodos colorimétricos, sendo esses últimos os mais comuns (MONTEIRO et al., 2005). O princípio do método colorimétrico baseia-se na redução de possíveis fenóis e taninos presentes na amostra pelo reagente de *Folin-Denis* utilizado. O método baseia-se na redução do ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico por hidroxilas fenólicas que quando são adicionadas a um álcali, em excesso, resulta em precipitados de coloração azul forte. O método de *Folin-Denis*, no entanto, não é um método específico, pois determina todos os fenólicos presentes, o que podem interferir nos resultados (ANGELO; JORGE, 2007).

2.2.2 Testes antioxidantes

O teste do DPPH, um dos ensaios antioxidantes mais comuns, é baseado na captura do radical livre DPPH[•] (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por oxidantes. Nesse processo, ocorre uma reação de oxirredução, onde o radical DPPH[•] é reduzido para DPPH-H, alterando a coloração da mistura de roxo para amarelo (figura 8). É um ensaio simples e barato que avalia o potencial antioxidante total de amostras vegetais (RUFINO et al., 2007; PIRES et al., 2017).

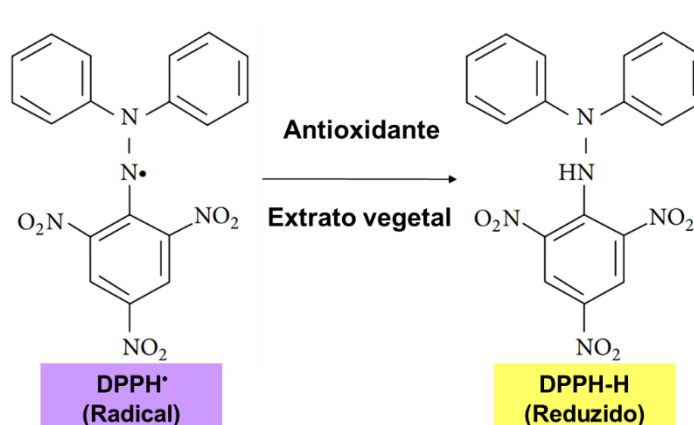


Figura 8 - Princípio do ensaio de capacidade de eliminação do radical livre DPPH[•]. Fonte: Adaptado de Rufino et al. (2007).

O ensaio do ABTS estima o potencial antioxidante de substâncias utilizando o radical sintético ABTS[•] [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)]. Neste teste o ABTS[•], de cor verde escuro, reage com o persulfato de potássio e forma o radical catiônico ABTS^{•+} de coloração verde claro (figura 9). Esse método é rápido, reprodutível e pode ser utilizado para medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (RUFINO et al., 2007; TORRES et al., 2017).

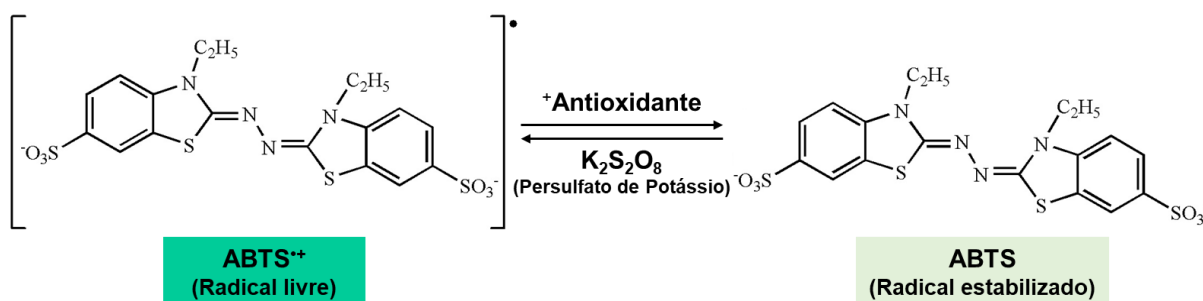


Figura 9 - Reação de estabilização do radical ABTS^{•+} e sua formação pelo persulfato de potássio. Fonte: Adaptado de Rufino et al. (2007).

O ensaio de determinação do Poder Antioxidante de Redução do Ferro (FRAP) está pautado na produção do íon Fe²⁺ (forma ferrosa) a partir da redução do íon Fe³⁺ (forma férrica) presentes no complexo 2,4,6- tripiridil-s-triazina (TPTZ). Quando a redução ocorre, há uma alteração na tonalidade da mistura de reação, passando de azul claro a um azul mais intenso (figura 10). É uma técnica facilmente reprodutível e que apresenta uma elevada correlação com os teores de ácido ascórbico e grupos fenólicos (RUFINO et al., 2006; URREA-VICTORIA et al., 2016).

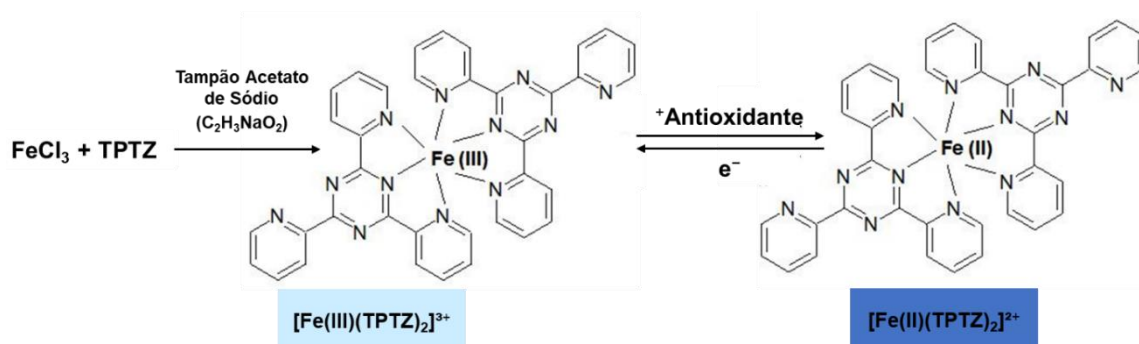


Figura 10 - Reação de produção de Fe^{2+} a partir da redução do Fe^{3+} presente no complexo com TPTZ. Fonte: Adaptado de Urrea-Victoria et al. (2016).

A atividade quelante de íons Fe^{2+} é utilizada para avaliar o potencial que uma substância tem em reduzir a peroxidação lipídica ou a formação de radicais livres, produtos das reações de *Fenton* e de *Haber-Weiss*. O reagente Ferrozina (3-(2-piridil)-5,6-bis-(4-ácido fenil sulfônico)-1,2,4-triazina) na presença de Fe^{2+} forma um complexo Ferrozina- Fe^{2+} , de cor rósea. Caso a substância apresente capacidade de quelar os íons ferro é verificada a diminuição da coloração para um tom mais claro (figura 11) (TANG et al., 2002; HARB et al., 2016).

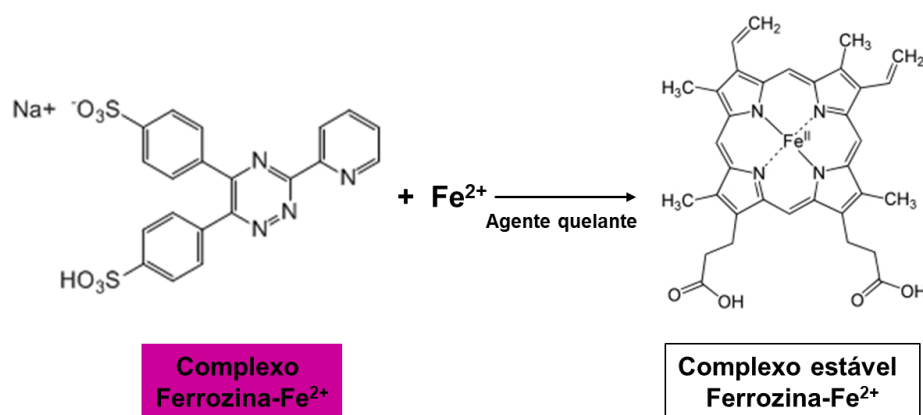


Figura 11 - Formação do complexo estável da Ferrozina- Fe^{2+} . Fonte: Adaptado de Delarmelina (2017).

2.3 O uso da Espectrometria de Massas na identificação de compostos orgânicos

Quando o objetivo é estudar uma classe de compostos químicos responsáveis por determinada ação biológica, a investigação deverá ser direcionada para o isolamento e elucidação das estruturas das mesmas (SIMÕES et al., 2000). Dentre as

técnicas utilizadas para tal finalidade tem destaque a espectrometria de massa (MS), a qual permite identificar compostos desconhecidos, quantificar materiais conhecidos e elucidar as propriedades químicas e estruturais dessas moléculas (AZEVEDO, 2004).

Por meio dessa técnica é possível obter importantes informações relacionadas à estrutura dos compostos, como a massa molecular (o peso molecular permite estabelecer a fórmula molecular) e os padrões de fragmentação (ajuda a caracterizar a presença e a localização de certos grupos funcionais e cadeias laterais) que um composto isolado pode apresentar. É uma técnica micro analítica que também pode ser utilizada para verificar os compostos presentes em misturas orgânicas complexas. Por tais características, é uma técnica amplamente utilizada em diversas áreas da ciência. Na indústria farmacêutica, por exemplo, é utilizada em todas as fases de desenvolvimento de um remédio (SIMÕES et al., 2000; AZEVEDO, 2004; ABDELNUR, 2011; PAVIA et al., 2015).

Resumidamente, a MS é uma técnica que detecta e mede a razão massa-carga (m/z) de íons, os quais são provenientes de uma fonte, método, de ionização. Esta fonte gera íons na fase gasosa, a partir de moléculas neutras ou de moléculas carregadas (ABDELNUR, 2011).

De modo geral, os espectrômetros de massa são constituídos de: um sistema de introdução de amostra, uma fonte de ionização, um analisador de massas (separa os íons formados de acordo com a razão m/z), um detector (dos íons formados) que está ligado a um sistema de aquisição dos dados, conforme ilustrado na figura 12 (COSTA, 2013; NASCIMENTO et al., 2018). O produto do sistema de dados é o espectro de massa – um gráfico do número de íons detectados como uma função de sua razão m/z (ROMÃO, 2010).

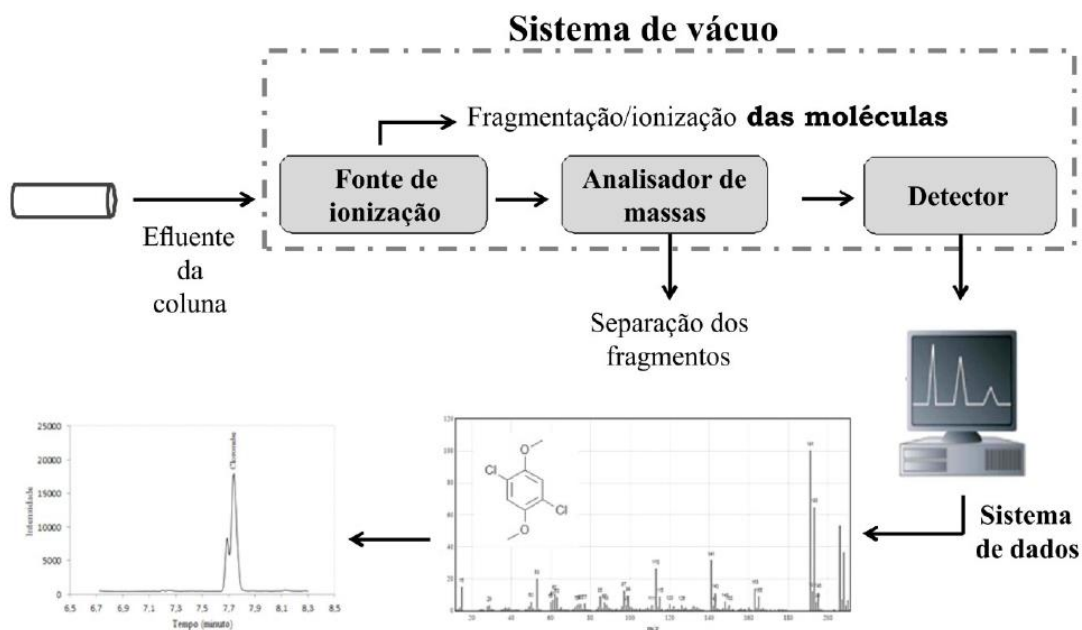


Figura 12 - Esquema simplificado de um espectrômetro de massa. Fonte: Nascimento et al. (2018)

O espectro de massa é dependente do método de ionização usado, sendo estes distribuídos em duas categorias: as que requerem a amostra em fase gasosa e a dos agentes que provocam dessorção em amostras sólidas ou líquidas. O método de ionização a ser usado dependerá do tipo de amostra em estudo e do espectrômetro de massa disponível. As fontes de ionização mais utilizadas são ESI (*Electrospray Ionization*) e MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*). Os analisadores são os quadrupolos, *íon-traps*, *time of flight (TOF)*, *Fourier-transform ion cyclotron resonance (FT-ICR)*, *orbitrap*, entre outros (COSTA, 2013; NASCIMENTO et al., 2018).

A ESI é uma técnica útil para o estudo de biomoléculas com alto peso molecular e outros compostos lábeis e não voláteis. Na ionização por ESI, podem-se formar íons negativos ou positivos por causa da perda de prótons da amostra para espécies básicas na solução, que pode ser ácida ou básica. A solução é submetida a uma nebulização ao passar pelo capilar metálico com alto potencial elétrico. Essas gotículas, que após secagem, liberam íons $[M+H]^+$ ou $[M-H]^-$ que são analisados pelo analisador de massas (ROMÃO, 2010). O uso da ESI não necessita de vácuo para gerar os íons, e, como depende de uma amostra em solução, é o método mais lógico de se empregar em MS (ABDELNUR, 2011; PAVIA et al., 2015).

A principal função do analisador de massa FT-ICR é separar os íons formados na fonte de ionização do espectrômetro de massa de acordo com a sua razão massa-carga (m/z). Com o uso deste analisador é possível avaliar uma ampla faixa de m/z que pode ser investigada com elevada precisão e a resolução (NASCIMENTO et al., 2018).

A identificação e a quantificação de metabólitos necessitam de uma instrumentação sofisticada, como a MS. A Espectrometria de Massas de Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier (FT – ICR MS) possui uma elevada resolução e exatidão, sendo estas características indispensáveis para a análise de misturas complexas, como os compostos orgânicos, permitindo a atribuição precisa de fórmulas moleculares aos íons detectados (SIMÕES et al., 2000; CUNHA et al., 2006; MARSHALL et al., 2007).

2.4 Ensaio utilizados na avaliação de ações biológicas

As plantas são ricas em substâncias que são, frequentemente, ativas contra um número limitado de espécies ou células. Algumas não específicas, muitas vezes são biodegradáveis e apresentam baixa ou nenhuma toxicidade a mamíferos (KIM, 2003). Inúmeros testes são utilizados para avaliar as concentrações e o tempo de exposição necessário para que os agentes tóxicos possam produzir efeitos adversos sobre os organismos testes (BRAGA; LOPES, 2015).

Testes *in vitro* realizados com células são frequentemente utilizados para verificar se moléculas ou grupos de compostos químicos interferem na proliferação celular ou apresentam efeitos citotóxicos que podem levar à morte celular (RISS et al., 2016). A avaliação da toxicidade vem ganhando força entre os pesquisadores, pois esses testes utilizam-se de células de mamíferos e avaliam os danos causados à célula, a formação ou não de colônias celulares e a viabilidade celular (BEDNARCZUK et al., 2010).

Moura et al. (2012) afirmam que testes de toxicidade *in vivo* são muito criticados devido ao uso de animais nesses experimentos e há uma crescente pressão para substituir ensaios *in vivo* por métodos alternativos que não utilizem animais. Uma alternativa ao uso de animais é a utilização do teste *Allium cepa*, técnica baseada na resposta biológica de um organismo vivo – plantas superiores – a uma determinada

substância ou, ainda, a metabólitos servindo como ferramenta para determinar o potencial alelopático/toxicidade de um organismo (PIRES; OLIVEIRA, 2001).

2.4.1 Viabilidade celular

Vários métodos são utilizados para estimar o número de células eucarióticas viáveis, dentre os quais tem destaque o ensaio do MTT. O teste do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) é um ensaio colorimétrico mundialmente conhecido e utilizado para medir a atividade metabólica celular por meio da avaliação da viabilidade e toxicidade celular. Também é possível medir a quantidade de apoptose ou necrose causada pelo material testado. O teste do MTT vem substituindo metodologias tradicionais, como contagem manual de células ou formação de colônias, em experimentos de larga escala, quando centenas ou até mesmo milhares de amostras são testadas (ALI-BOUCETTA et al., 2011; GASQUE et al., 2014; RISS et al., 2016; KUETE et al., 2017).

O ensaio do MTT se baseia na medida da atividade da enzima desidrogenase mitocondrial, dependente de NADH, que quando ativa é capaz de converter o sal de tetrazólio amarelo (MTT) em um composto roxo insolúvel em água, o Formazan ((E, Z) -5- (4,5 dimetiltiazol-2-il) – 1,3-difenilformazan) (figura 13). A intensidade da cor púrpura é diretamente proporcional ao número de células e, portanto, indica a quantidade de células vivas. Somente as células vivas são capazes de converter o MTT à Formazan (ARAÚJO et al., 2008; ALI-BOUCETTA et al., 2011; BAHUGUNA et al., 2017).

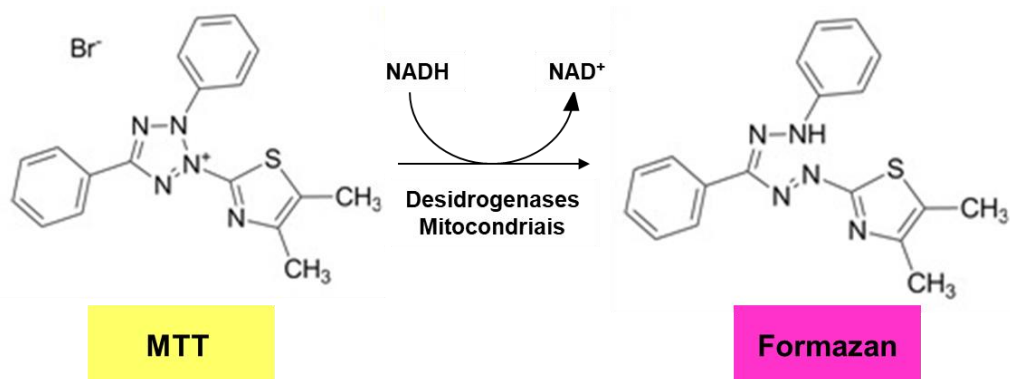


Figura 13 - Redução enzimática do MTT para Formazan. Fonte: Adaptado de Kuete et al. (2017)

2.4.2 Atividade alelopática

A alelopátia é uma forma de interferência natural que ocorre quando um vegetal, ou microrganismo, através de tecidos vivos ou em decomposição, interfere, de forma direta ou indireta, na germinação, no crescimento e no desenvolvimento de outros vegetais, que estão nas suas proximidades, por meio da liberação de inibidores químicos, os aleloquímicos (RICE, 1984; ZIMDAHL, 2018).

Segundo Gusman et al. (2012), aleloquímicos são metabólitos secundários bioativos produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos, capazes de influenciar, de forma benéfica ou não, no crescimento e no desenvolvimento de plantas. Eles interferem na divisão celular, na permeabilidade das membranas, na ativação de enzimas e na produção de hormônios pela planta (VERONKA et al., 2012). Também podem inibir processos importantes ligados à fotossíntese, ao balanço hídrico, à função estomática e a outras ações necessárias ao bom funcionamento do metabolismo vegetal (HAIG, 2008).

Muitos aleloquímicos são conhecidos, sendo os ácidos fenólicos e os compostos terpenóides as classes mais comuns (CHENGXU et al., 2011). Segundo HAIG (2008), os fenólicos atuam no sistema de defesa das plantas superiores, apresentam toxicidade variável e interferem em funções celulares importantes. Já os monoterpenos, os principais constituintes dos óleos essenciais das plantas, são amplamente conhecidos por seus fortes efeitos inibitórios no crescimento das plantas e na germinação de sementes.

Além da função alelopática, os aleloquímicos têm outros papéis ecológicos como defesa das plantas contra predadores, quelação de nutrientes, proteção contra a toxicidade de metais, absorção de nutrientes e regulação da biota do solo de maneiras que afetam a decomposição e a fertilidade do solo. Os aleloquímicos são substâncias que ao longo do processo evolutivo das plantas representaram alguma vantagem contra a ação de microrganismos e predadores (FERREIRA; AQUILA, 2000; LATIF et al., 2017; TAIZ et al., 2017).

Vários mecanismos são utilizados no processo de liberação de aleloquímicos pelas plantas no ambiente, incluindo a volatilização, a lixiviação de partes aéreas, a exsudação de raízes e a decomposição de resíduos de plantas no solo, uma vez que a maioria dos efeitos aleloquímicos ocorre através do solo (figura 14) (LATIF et al., 2017; ZIMDAHL, 2018).

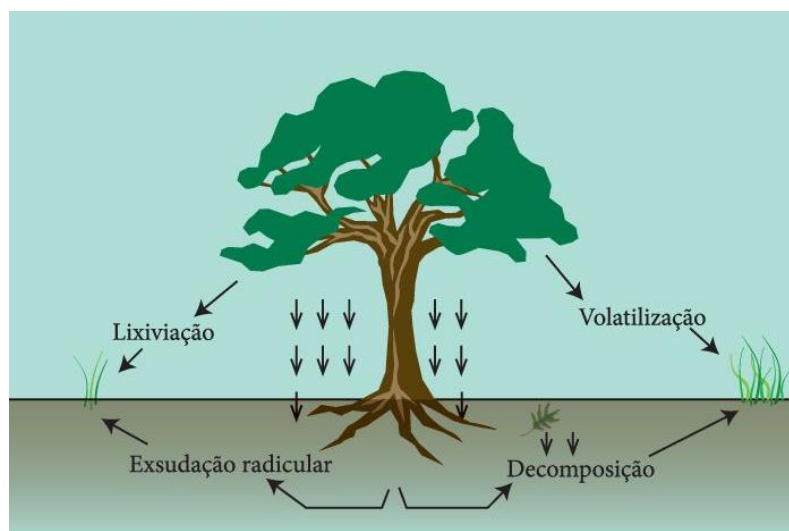


Figura 14 - Diagrama do mecanismo de liberação de aleloquímicos. Fonte: Rodrigues (2014).

Conforme Bonfim et al. (2018) espécies medicinais, aromáticas e condimentares são consideradas bioativas, pois dessas plantas podem ser extraídas substâncias químicas empregadas no controle de pragas em sistemas de produção agrícolas com viés ecológico. Nesses sistemas, os aleloquímicos podem ser empregados como alternativa ao uso de herbicidas, inseticidas e nematicidas (defensivos agrícolas) (FERREIRA; AQUILA, 2000).

Porém, Cremonez et al. (2013) advertem que é necessário realizar testes para verificar o potencial alelopático de certa planta, pois a alelopátia não é amplamente verificada em todos os vegetais. Esse potencial pode variar de uma espécie para outra, ou seja, a uma espécie pode inibir e a outra pode estimular o crescimento/desenvolvimento em condições semelhantes.

O uso do *Allium cepa* (cebola) como sistema de teste foi introduzido por Levan (1938), quando os efeitos da colchicina foram investigados. Desde então, o teste do *Allium cepa* tem sido usado com frequência (FISKESJO, 1985). A demonstração dos efeitos alelopáticos é feita experimentalmente por meio da aplicação de extratos de uma planta em sementes ou plântulas de outra espécie, verificando assim, se os aleloquímicos são capazes de inibir ou estimular a germinação das sementes testadas (PIRES; OLIVEIRA, 2001). Outros parâmetros também podem ser avaliados, tais como o tempo médio de germinação e a velocidade média de germinação, entre outros (COSTALONGA, 2017).

2.5 Influências da adubação no crescimento e no desenvolvimento vegetal e seus efeitos na produção de metabólitos secundários

A produção de biomassa e síntese de princípios ativos nas plantas medicinais, aromáticas e condimentares depende de vários fatores, dentre eles o fator genético, o clima, as condições edáficas e os manejos culturais (ROSAL et al., 2011). Para Gobbo-Neto e Lopes (2007), os fatores ambientais ou mesmo aqueles decorrentes dos tratamentos culturais, como o uso de adubações, são importantes moduladores da produção de metabólitos secundários das plantas.

De acordo com Faquin (2005) a adubação pode ser definida como a adição de elementos (nutrientes) de que a planta necessita para viver, com a finalidade de obter produtos com boa qualidade nutritiva ou industrial, com o mínimo de perturbação no ambiente. É um produto mineral ou orgânico, natural ou sintético, fornecedor de um ou mais nutrientes vegetais (ALCARDE; GUIDOLIN; LOPES, 1998).

Os benefícios da aplicação de adubações no solo, para a melhoria da produtividade das culturas, são conhecidos há muito tempo (MARENCO; LOPES, 2009). É parte essencial no crescimento de uma espécie e contribui para o aumento da produtividade, da qualidade e do estabelecimento dos plantios, sobretudo daqueles que objetivam tornar espécies nativas, tal como a *S. terebinthifolia* Raddi (aroeira), uma planta de larga escala e/ou seus produtos um novo nicho de mercado (SILVA et al., 2018).

Do ponto de vista químico, os adubos podem ser classificados em: minerais (fertilizantes sintéticos constituídos de compostos inorgânicos, desprovidos, ou não, de carbono) e orgânicos (adubos constituídos de compostos de origem natural, vegetal ou animal). A adubação orgânica fornece nutrientes para as plantas e proporciona benefícios na estrutura física, química e biológica do solo. Os produtos minerais exercem efetivamente as funções de fertilizante (ALCARDE; GUIDOLIN; LOPES, 1998; ROSAL et al., 2011).

Os elementos químicos ligados à nutrição das plantas são classificados em dois grupos, os elementos benéficos (aqueles que melhoram o desenvolvimento de algumas espécies vegetais) e os elementos essenciais (elementos necessários para a realização do seu ciclo de vida e/ou para a formação de moléculas ou componentes que sejam essenciais as plantas). (MARENCO; LOPES, 2009; SALISBURY; ROSS, 2012).

Os elementos essenciais, quando requeridos em altas concentrações, são classificados como macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S) e quando requeridos em baixas concentrações, são conhecidos como micronutrientes (Fe, Cu, Mn, Zn, Cl, Mo, B e Ni). Eles também podem ser classificados de acordo com sua função, os que têm um papel na estrutura de um componente importante e os elementos que possuem função de ativação de enzimas (MARENCO; LOPES, 2009; SALISBURY; ROSS, 2012).

Os nutrientes podem ser aplicados separadamente com o uso dos fertilizantes simples ou conjuntamente com o uso de misturas que constituem as fórmulas de fertilizantes (TRANI; TRANI, 2011). As principais funções desempenhadas pelos macro e micronutrientes no metabolismo, no crescimento e no desenvolvimento vegetal são apresentadas na tabela 2.

A qualidade agronômica de uma espécie terá reflexo direto na qualidade e segurança dos produtos dela originados, assim sendo a relação de alterações fisiológicas e metabólicas que uma espécie pode sofrer irão refletir nos produtos que poderão ser produzidos a partir delas (SIMÕES et al., 2017; YUNES; CALIXTO, 2001).

Dessa forma, é muito importante esclarecer como esse tipo manejo contribui, ou não, para um aumento da produção de compostos de interesse e, conseqüentemente, o quanto e como cada nutriente influencia na qualidade dos produtos obtidos de plantas (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; TAIZ et al., 2017).

Tabela 2 – Funções dos macro e micronutrientes no metabolismo, crescimento e desenvolvimento vegetal.

Nutrientes	Funções
Nitrogênio (N)	É o elemento mineral mais requerido e abundante nas plantas, pois é constituinte de aminoácidos, proteínas, enzimas, coenzimas e nucleotídeos. É facilmente translocável. ³ O nitrogênio é absorvido do solo na forma de nitrato (NO_3^+) e amônia (NH_4^+), esses íons são reguladores de várias reações metabólicas que ocorrem na célula vegetal. Leguminosas obtêm o N por meio de relações simbióticas com bactérias fixadoras deste elemento. ^{2,4} A adubação nitrogenada cumpre importante papel no aumento de volume da colheita em plantas das quais se aproveitam as flores, as inflorescências e o látex, pois está diretamente ligado ao crescimento vegetal. O rendimento de alcaloides é claramente favorecido por essa adubação. No grupo das aromáticas, os adubos nitrogenados podem elevar o teor de essência (óleo essencial). ^{5,6}
Fósforo (P)	O P é um elemento pouco disponível no solo. Ele é absorvido na forma do ânion fosfato monovalente (H_2PO_4^-) ou bivalente (HPO_4^{2-}). No metabolismo vegetal o fosfato pode ser encontrado na forma livre ou ligado às formas orgânicas como ésteres. ⁴ É essencial para desenvolvimento e componente de importantes compostos vegetais incluindo açúcares-fosfato (envolvidos na respiração e na fotossíntese), fosfolipídios de membranas celulares, nucleotídeos usados como fonte de energia (ATP), coenzimas (CoA, FAD) e em ácidos nucleicos (DNA, RNA). ³ A adubação fosfatada é importante para a produção de frutos secos, sementes e partes subterrâneas dos vegetais. ⁵
Potássio (K)	O potássio está presente nos vegetais na forma do cátion monovalente (K^+) e é responsável pela regulação do potencial osmótico em células vegetais. ⁴ Ele é requerido na ativação de várias enzimas envolvidas na fotossíntese, respiração celular, síntese de carboidratos, de proteínas e de ligninas. ³ O K, conjuntamente como o N e o P, está envolvido no desenvolvimento vegetal, principalmente na formação e no crescimento de gemas. Íons K^+ são utilizados na neutralização de ânions, manutenção do pH em níveis adequados ao funcionamento celular e desempenha papel protetor (resistência) contra doenças. ² Assim como o fósforo, o potássio pode estar relacionado a uma maior produção de frutos, sementes, raízes e óleo essencial. ⁵
Cálcio (Ca)	O cálcio é absorvido como íon Ca^{2+} bivalente. É constituinte da lamela média, parede que separa células recém-formadas. Ele também é utilizado no fuso mitótico durante a divisão celular. ⁶ Desempenha funções na membrana (ligação entre os fosfolipídios ou com proteínas da membrana). ^{3,5} É mensageiro secundário dos sinais primários reguladores de vários aspectos do desenvolvimento das plantas e é inibidor de várias enzimas. ²
Magnésio (Mg)	Nas células vegetais os íons magnésio (Mg^{2+}) têm o papel de ativar enzimas envolvidas na respiração, fotossíntese e síntese de DNA e RNA. Dentre as diversas enzimas estimuladas pelo Mg têm destaque as fosfatases, ATPases, carboxilases, cinases, enolases e polimerases. ^{4,6} Ele está presente na estrutura da clorofila e é um elemento essencial, pois se combina com a ATP (permitindo que a ATP seja utilizada em muitas reações). ³
Enxofre (S)	O enxofre é absorvido do solo como ânions sulfato bivalentes (SO_4^{2-}) e pode ser metabolizado nas raízes, conforme as necessidades desses órgãos, e translocado até a parte aérea. ^{2,4} O S é encontrado em alguns aminoácidos (cisteína e metionina) sendo constituinte de várias proteínas, vitaminas (tiamina e biotina) e coenzima A (composto utilizado na respiração e síntese de ácidos graxos) os quais são essenciais ao metabolismo. ⁶
Ferro (Fe)	O ferro é componente de enzimas envolvidas na transferência de elétrons (reações redox) e numerosas proteínas envolvidas na fotossíntese e na respiração, as hemo-proteínas (catalases, peroxidase, diversos tipos de citocromo oxidases) e as Fe-S-proteínas (Ferredoxina). ^{1,4,6} Ele possui a capacidade para formar quelatos e mudar seu estado de oxidação, de Fe^{3+} para Fe^{2+} , íon requerido no metabolismo vegetal. ³

Fontes: ¹Faquin, 2005; ²Kerbaudy, 2008; ³Marengo; Lopes, 2009; ⁴Salisbury; Ross, 2012; ⁵Mattos, 2016; ⁶Taiz et al., 2017.

Tabela 2 – Funções dos macro e micronutrientes no metabolismo, crescimento e desenvolvimento vegetal. (continuação)

Nutrientes	Funções
Cobre (Cu)	O cobre é absorvido como o íon cúprico bivalente (Cu^{2+}) e como íon monovalente de Cu^+ . ⁴ Ele participa de cofatores na cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria e está associado a enzimas e proteínas envolvidas em reações redox, onde é reversivelmente oxidado de Cu^+ a Cu^{2+} . ^{2,6} A plastocianina (proteína do cloroplasto que transporta elétrons na fotossíntese) contém 50% do Cu da folha. Ele está presente várias enzimas, como: citocromo oxidase (cadeia respiratória); superóxido dismutase (destoxificação de radicais superóxidos); poliamina oxidases (transforma espermidina em putrescina, H_2O_2 e NH_3); ascorbato oxidase (oxidação do ácido ascórbico em ácido desidroascórbico) e fenol oxidases (fomação de fenóis). ³
Manganês (Mn)	O Mn pode existir em três estados de oxidação (Mn^{2+} , Mn^{3+} e Mn^{4+}). Ele cumpre uma função estrutural no sistema de membranas do cloroplasto e promove a reação fotossintética pela qual o oxigênio (O_2) é produzido a partir da água. ⁴ Os íons manganês (Mn^{2+}) ativam várias enzimas nas células vegetais. ⁶ Poucas enzimas contêm Mn na sua estrutura, a superóxido dismutase (Mn-SOD) que atua na neutralização de superóxidos, é uma delas. ³
Zinco (Zn)	O zinco é absorvido como cátion divalente (Zn^{2+}) e forma complexos tetraédricos, pois não é oxidado ou reduzido. Esse cátion faz parte e/ou é requerido na ativação de várias enzimas importantes (desidrogenases, aldolases, enolases, isomerases, peptidases, transfosforilases e RNA e DNA polimerases) estando diretamente envolvido no metabolismo de carboidratos e na síntese de proteínas. ³ O Zn participa da formação da clorofila e impede a sua destruição. Ele está envolvido na via das auxinas, em particular no ácido indolacético (AIA). ⁴ É um mineral pouco móvel na planta, o que talvez explique a baixa constante de estabilidade dos quelantes orgânicos. Ele está envolvido no metabolismo nitrogenado da planta. ¹
Cloro (Cl)	O elemento cloro é encontrado nas plantas como o íon cloreto (Cl^-). Ele é necessário nas reações de quebra da molécula da H_2O na fotossíntese, pelas quais o O_2 é produzido. Além disto, ele pode ser necessário para a divisão celular, tanto em folhas quanto em raízes. ^{4,6} Tem função importante na osmorregulação e na manutenção de turgor. No citoplasma, o Cl aumenta a atividade de várias enzimas, como ATPases. ³
Molibdênio (Mo)	Os íons molibdênio (Mo^{4+} até Mo^{6+}) são componentes de várias enzimas, incluindo a nitrato redutase e a nitrogenase, envolvidas na redução de nitrato para nitrito (NO_3^- a NO_2^-) e de nitrogênio atmosférico para amônio (N_2 a NH_4^+). ^{3,6} Ele também pode ter função no metabolismo das purinas, como a adenina e guanina, e ser formador de uma oxidase que converte o aldeído do ácido abscísico no hormônio ABA. ⁴
Boro (B)	O boro solúvel, diferente de outros minerais, é absorvido na forma molecular como ácido bórico (H_3BO_3). Ele forma ésteres com grupos hidroxilas de carboidratos e glicoproteínas. Pode instigar a atividade da NADH oxidase, enzima que atua na produção do ascorbato, e a produção das auxinas. A deficiência de B pode estimular a produção de compostos fenólicos. ³ Ele participa da síntese de ácidos nucleicos, essenciais na divisão e no alongamento celular, no funcionamento, integridade da membrana e em respostas hormonais. ⁶ É importante para o alongamento do tubo polínico, e evidências indicam que esse mineral é essencial na divisão dos meristemas apicais. ⁴
Níquel (Ni)	Evidências indicam que o níquel (Ni^{2+}) seja um elemento essencial para as plantas e é parte da enzima urease (realiza a quebra da ureia em CO_2 e NH_4^+). ⁴ Aparentemente, o Ni é essencial para plantas em que os ureídeos apresentam um importante papel no metabolismo do N. Os ureídeos também são metabólitos importantes no metabolismo do N no processo de germinação das sementes. ¹

Fontes: ¹Faquin, 2005; ²Kerbaux, 2008; ³Marenco; Lopes, 2009; ⁴Salisbury; Ross, 2012; ⁵Mattos, 2016; ⁶Taiz et al., 2017.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência de diferentes tipos de adubação na produção de metabólitos secundários de plantas de *Schinus terebinthifolia* Raddi (aroeira) quanto às atividades biológicas exibidas pelos extratos etanólicos produzidos a partir de folhas e frutos dessas plantas.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar os teores de micro e macronutrientes nos tecidos vegetais (folhas e frutos) de plantas de *S. terebinthifolia* submetidas a diferentes tipos de adubação;
- Identificar por Espectrometria de Massas (ESI (-) FT-ICR MS e ESI (-) FT-ICR MS/MS) os principais compostos presentes nos extratos etanólicos produzidos a partir material vegetal de *Schinus terebinthifolia* submetidas a diferentes adubações;
- Analisar os teores totais de compostos fenólicos, de flavonoides e de taninos presentes em extratos etanólicos produzidos a partir de material vegetal de aroeira cultivada sob diferentes tipos de adubações;
- Determinar a atividade antioxidante de extratos etanólicos produzidos a partir de frutos e folhas de aroeira submetida a diferentes tipos de adubação, pelos métodos colorimétricos: DPPH, ABTS, FRAP e Atividade quelante do Fe²⁺;
- Avaliar as atividades citotóxicas e anticitotóxicas de extratos vegetais produzidos a partir de folhas e frutos secos de *S. terebinthifolia* em células de linfócitos humanos e de Sarcoma 180;
- Verificar o efeito alelopático sobre a germinação e o desenvolvimento inicial de *Allium cepa* L. dos extratos etanólicos de folhas e frutos de *Schinus terebinthifolia* Raddi;
- Relacionar as atividades biológicas com a adubação utilizada na nutrição suplementar de *S. terebinthifolia* (aroeira).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção do material vegetal e caracterização do local de cultivo

O material vegetal, folhas e frutos de *Schinus terebinthifolia* Raddi, foram cedidos pela equipe do Projeto Biomass – Mata Atlântica, realizado conjuntamente entre o Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER), a Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA) e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA).

A coleta foi realizada em maio de 2018, na Fazenda São Marcos, município de Linhares – ES. A área de cultivo experimental possuía um total de 8.460 m². A localização espacial da área onde foram colhidos os frutos e folhas de *S. terebinthifolia* (figura 15a) e o objetivo do experimento realizado nesta área são ilustrados na (figura 15b) são ilustrados abaixo.



Figura 15 - Projeto Biomass – Mata Atlântica, município de Linhares (19°12'59.92"S; 40°03'03.08"W), onde: (a) local de coleta do material vegetal (indicada em amarelo); e (b) identificação dos projetos desenvolvidos na área de coleta. Fonte: Google Earth (2019) e acervo do autor (2018).

Durante a coleta, os frutos foram acondicionados em sacos plásticos e identificados com o tipo adubação utilizada, o bloco coletado e a planta coletada. Após a coleta foram determinados o peso inicial dos frutos. As folhas foram acondicionadas em sacos de papel, seguindo a mesma identificação utilizada para os frutos.

As exsiccatas do material vegetal foram identificadas, registradas e depositadas no Herbário Central (VIES) da UFES, sob os números de tombo: 39056; 39057; 39058; 39059; 39060; 39061; 39062; 39063; 39064; 39065 e 39066. O material

também foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), sob o código A005043.

4.2 Delineamento experimental do local de coleta e tipos de adubação

O experimento foi realizado em Delineamento em Blocos Casualizados (DBC), com três repetições. De cada uma das adubações/parcelas foi coletado material vegetal de três plantas por bloco, totalizando nove amostras por adubação de cada órgão vegetal (folhas e frutos). Nesse experimento foram utilizadas 54 plantas.

Foram utilizados seis tipos de adubação na nutrição suplementar das plantas de aroeira. As adubações possuíam as seguintes características: T1 = testemunha (ausência de adubação); T2 = 100 g de adubo NPK (10:30:10); T3 = T2 + 2 g de boro, na forma de ácido bórico (H_3BO_3); T4 = T2 + 4 g zinco, na forma de sulfato de zinco ($ZnSO_4$); T5 = T2 + 2 g de H_3BO_3 + 4 g de $ZnSO_4$, e T6 = 500 g de adubação orgânica (esterco bovino). As aplicações das adubações, acima descritas, foram realizadas em covas e com frequência de três vezes ao ano.

Outros aspectos relacionados à escolha dos genótipos de *S. terebinthifolia* Raddi utilizados neste trabalho, a implantação dos experimentos, caracterização do local de plantio e forma de coleta dos frutos e folhas, estão descritos em RUAS (2016).

4.3 Análise de macro e micronutrientes em material vegetal

As análises químicas do material vegetal, folhas e de frutos de aroeira, de cada tratamento, foram realizadas pelo Laboratório de Análise Agronômica e Ambiental LTDA – FULLIN (Linhares - ES) e seguiram as metodologias indicadas por Malavolta, Vitti e Oliveira (1997).

Tais mensurações foram utilizadas para selecionar o material usado na produção dos extratos, para verificar a quantidade e a possível via de utilização de nutrientes (micro e macronutrientes) recebidos por meio das adubações, e também para obter informações sobre onde tais nutrientes foram mais alocados (folhas ou frutos). Dessa forma, tal teste nos auxiliou a inferir, conjuntamente com os demais testes abaixo descritos, se houve, ou não, influência dos modos de adubação na produção de metabólitos secundários pela planta e o órgão em que ocorreu maior produção destes.

4.4 Produção dos extratos

Após a coleta, o material vegetal foi levado para a Fazenda Experimental Engenheiro Agrônomo Reginaldo Conde (FERC), em Viana, onde os frutos foram desidratados, a 32°C com umidade regulada por desumidificador. As amostras de folhas foram secas em estufa de secagem a temperatura de 40 °C.

Em seguida, o material vegetal foi levado ao Laboratório de Genética Vegetal e Toxicológica da UFES, onde foram pesados, homogeneizados e triturados utilizando liquidificador industrial, marca Vitalex – Modelo LQI-04.

Com o material procedente da mesma adubação foi produzido um “pool” para originar um único extrato por modo de adubação e por órgão vegetal. Dessa forma, cada tratamento poderia originar dois tipos de extratos, um de frutos e outro de folhas.

Com as amostras trituradas foram produzidos 8 extratos etanólicos (99,8%), seis extratos de frutos (T1, T2, T3, T4, T5 e T6) e dois extratos de folhas (T1F e T6F), por meio de maceração à exaustão, em 3 ciclos de 72 horas. Ao fim do último ciclo de maceração, o material foi submetido à rotaevaporação, à 60 °C sob baixa pressão.

Os extratos produzidos foram conservados sob refrigeração e ao abrigo da luz até o uso. Foram estabelecidos os rendimentos e a massa seca dos extratos para uso nos ensaios. A figura 16 ilustra algumas etapas do processo de produção dos extratos.



Figura 16 – Etapas de produção dos extratos etanólicos, onde: (a e b) seleção do material vegetal e produção do “pool” por tratamento; (c) trituração e homogeneização do material; (d) exposição ao solvente (ciclos de maceração); (e) extrato após ciclos de rotaevaporação; e (f) extratos vegetais prontos e identificados. Fonte: Acervo do autor (2018).

4.5 Análise por ESI (-) FT-ICR MS e ESI (-) FT-ICR MS/MS

Com o objetivo de analisar o perfil químico dos extratos etanólicos produzidos a partir de *S. terebinthifolia* Raddi foi utilizada a Espectrometria de Massas de Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier (ESI (-) FT - ICR MS), na qual utilizou-se o espectrômetro de massa (modelo 9.4 T Solarix, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha).

As amostras diluídas em solução aquosa de metanol na proporção (1:1) foram analisadas na concentração de 1 mg.mL⁻¹. Cada amostra foi injetada na fonte *electrospray* (ESI), a uma taxa de 5 µL.min⁻¹, sob pressão do gás nebulizador de 1,0 Bar, a uma tensão capilar de 3,8 kV e a temperatura de transferência capilar de 200 °C. O tempo de acumulação dos íons foi de 0,015 segundos. Cada espectro produzido foi adquirido a partir da acumulação de 32 *scans* com alta resolução e assim, foi possível determinar a fórmula de íons moleculares de carga única. Os espectros foram obtidos no modo negativo a uma faixa de aquisição de íons (ICR) de *m/z* 150-1.500. Nos experimentos de ESI (-) FT-ICR MS/MS, a janela do quadrupolo foi fechada em um intervalo de 1 Da, proporcionando o isolamento dos íons de interesse, e sob as mesmas condições descritas anteriormente.

Os espectros de massa gerados por meio das análises foram adquiridos e processados utilizando o software Compass Data Analysis 4.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) e comparados quanto à presença e/ou ausência de determinados compostos nos extratos produzidos a partir do material vegetal (folhas e frutos) de aroeira.

4.6 Análise química dos extratos

A análise química foi realizada para quantificar e comparar os teores totais de compostos fenólicos, de flavonoides e de taninos contidos nos extratos de *Schinus terebinthifolia* Raddi (aroeira). A análise das absorvâncias foi realizada em espectrofotométrico UV-visível (Marca: BioTek, Modelo: Epoch). A quantificação dos teores abaixo descritos foi feita a partir da curva de calibração dos padrões utilizados em cada um dos testes colorimétricos realizados e os resultados foram expressos em mg.g⁻¹ de equivalência ao padrão.

4.6.1 Teor total de compostos fenólicos

O teor total de compostos fenólicos foi verificado utilizando o método *Folin-Ciocalteu* descrito por Zhang et al. (2006). Em um poço de microplaca para espectrofotômetro Elisa, uma alíquota do extrato vegetal diluído em etanol na concentração de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ reagiu com a solução de *Folin-Ciocalteu*, na concentração 1:10, e com a solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3), a 7,5%, por um período de 2 horas e ao abrigo da luz. A absorvância foi medida a 750 nm. O padrão utilizado foi o ácido gálico.

4.6.2 Teor total de flavonoides

Para quantificar o teor total de flavonoides presentes nos extratos foi utilizado o método descrito por Zhishen et al. (1999). No qual, em um microtubo de 2,0 mL, 500 μL do extrato vegetal diluído em metanol, na concentração de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, foi misturado a 1,5 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio hexahidratado ($\text{AlCl}_3.6\text{H}_2\text{O}$), a 2%. A mistura repousou no escuro por 10 minutos. Em seguida, 300 μL da mistura foram postas em um poço de microplaca para Elisa e a leitura foi realizada na faixa de absorvância de 420nm. A rutina foi utilizada como padrão.

4.6.3 Teor total de taninos

A análise do teor total de taninos foi realizada utilizando o método *Folin-Dennis* descrito por Pansera et al. (2003) com modificações. Nesse método, em um microtubo de 2,0 mL, ocorreu a reação do extrato vegetal diluído em etanol, na concentração de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, com o reagente *Folin-Dennis* e a solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3), a concentração de 8%. A reação foi deixada em repouso e ao abrigo da luz por 2 horas. Após esse período, a mistura foi centrifugada por 5 minutos a 2.000 rpm e então, 200 μL do sobrenadante da amostra foram adicionados em um poço de microplaca para Elisa e a leitura foi realizada na faixa de absorvância de 725 nm. O padrão utilizado foi o ácido tânico.

4.7 Avaliação das atividades antioxidantes

Após a análise química dos extratos de frutos e folhas de *S. terebinthifolia* Raddi, foi feita a avaliação preliminar da atividade antioxidante por meio dos testes colorimétricos ABTS, DPPH, FRAP e Quelação do Fe^{+2} . As análises das absorvâncias foram realizadas em leitor de microplacas espectrofotométrico UV-visível (Marca: BioTek, Modelo: Epoch).

4.7.1 ABTS

O método descrito por Rufino et al. (2007) com modificações, foi utilizado para verificar a atividade antioxidante dos extratos, por meio do sequestro de radicais orgânicos pelo ABTS (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico).

Inicialmente, foi necessária a produção das soluções de ABTS 7 mM e de persulfato de potássio. Para o preparo do radical ABTS^{*+} foi necessário produzir a reação entre a solução de ABTS 7 mM e a solução de persulfato de potássio 140 mM. A reação ocorreu durante 16 horas ao abrigo da luz e sob refrigeração. Após o período, 1 mL do preparo do radical ABTS^{*+} foi misturado a um determinado volume de etanol (99,8%) e, com auxílio de uma micropipeta, cerca de 240 μL da mistura do radical ABTS^{*+} foi depositado em microplaca para espectrofotômetro Elisa e lidos na faixa de absorvância de 734 nm até obter a absorvância de $0,70 \text{ nm} \pm 0,05 \text{ nm}$.

O equivalente, em peso seco, a $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de cada um dos extratos testados foi diluído em etanol (99,8%) na forma seriada de 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62 e $7,81 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Os padrões utilizados – ácido ascórbico, ácido gálico e Trolox (2 mM) – também foram diluídos e fracionados nas concentrações descritas.

O teste se deu por meio da reação de 40 μL de cada amostra, diluição seriada, com 200 μL do radical ABTS^{*+} em microplaca, 96 poços, para Elisa. A reação foi deixada em repouso e no escuro por 6 minutos e, após esse período, foi lida a 734 nm. O controle da reação foi produzido com 40 μL de etanol (99,8%) e 200 μL do radical ABTS^{*+} para indicar uma possível interferência da coloração, apresentada pelo radical, no resultado das análises. A Atividade Antioxidante Total (AAT%) dos extratos e dos padrões foi calculada utilizando a equação abaixo e expressas em IC_{50} ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). O IC_{50} representa a concentração inibitória à qual o extrato induz metade do efeito máximo de antioxidação.

$$AAT (\%) = \left(\frac{Abs_0 - Abs_1}{Abs_0} \right) \times 100$$

Onde: *Abs₀*: absorvância da solução controle do radical ABTS^{•+}

Abs₁: absorvância da amostra

4.7.2 DPPH

Outra metodologia usada para determinar a capacidade de captura de radicais orgânicos, pelos extratos, foi o ensaio do sequestro do radical livre DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) descrito por Rufino et al. (2007), com modificações.

Primeiramente, foi necessária a produção da solução etanólica de DPPH 0,3 mM. O equivalente, em peso seco, a 1 mg.mL⁻¹ de cada extrato foi diluído em etanol (99,8%) na forma seriada. Os padrões utilizados - ácido ascórbico, rutina e Trolox (2 mM) -, também foram diluídos e fracionados nas concentrações descritas anteriormente.

Para a realização do teste foi necessário misturar em um poço de microplaca para Elisa, 100 µL de cada concentração produzida na diluição seriada com 200 µL de solução de DPPH. Essa mistura permaneceu em repouso e no escuro por 30 minutos e, logo após, as placas foram lidas a 517 nm. O controle da reação foi produzido utilizando 100 µL de etanol P. A. e 200 µL de solução de DPPH. Atividade Antioxidante Total (AAT%) no teste do DPPH foi expressa em IC₅₀ (µg.mL⁻¹) e calculada utilizando equação abaixo.

$$AAT (\%) = \left(\frac{Abs_0 - Abs_1}{Abs_0} \right) \times 100$$

Onde: *Abs₀*: absorvância da solução controle de DPPH

Abs₁: absorvância da amostra

4.7.3 FRAP

Com o objetivo de verificar o potencial que os extratos etanólicos produzidos a partir de frutos e folhas de *S. terebinthifolia* Raddi (aroeira), sobretudo na redução de

íons ferro, foi utilizado o método FRAP (Poder Antioxidante de Redução do Ferro) descrito por Rufino et al. (2006), com modificações.

Para a realização do teste foi necessária a produção do reagente FRAP, composto formado a partir da mistura de alíquotas de tampão acetato de sódio 0,3 M, solução de TPTZ 10 mM e solução aquosa de cloreto férrico (FeCl_3) 20 mM. O mesmo modo de diluição seriada utilizada nos testes anteriores descritos foi empregado. O ácido gálico, o sulfato ferroso (2 mM) e o Trolox (2 mM) também foram diluídos seriadamente e utilizados como padrões nesse teste.

A reação do teste FRAP se deu em microtubo de 2 mL onde foram misturados 30 μL da amostra, 90 μL de água destilada e 900 μL de reagente FRAP. As reações foram homogeneizadas, submetidas à temperatura de 37 °C e mantidas ao abrigo da luz por 30 minutos. Após esse período, alíquotas de 250 μL foram lidas a 595 nm. O controle da reação foi composto por 30 μL de etanol P. A., 90 μL de água destilada e 900 μL de reagente FRAP. O cálculo da Atividade Antioxidante Total (ATT%) apresentado por meio do teste FRAP foi realizado utilizando a equação abaixo e os valores foram expressos em IC_{50} ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$).

$$AAT (\%) = \left(\frac{Abs_1 - Abs_0}{Abs_0} \right) \times 100$$

Onde: Abs_1 : absorvância da amostra

Abs_0 : absorvância da solução controle do reagente FRAP

4.7.4 Quelação do Fe^{2+}

Atividade de quelação de íons de Fe^{2+} foi avaliada de acordo com metodologia descrita por Tang et al. (2002) com modificações. Assim como o método FRAP, tal atividade foi utilizada para verificar o potencial que os extratos produzidos possuem em relação à redução/inibição da formação de complexos ferrosos.

Inicialmente, foram produzidas as soluções aquosas de cloreto de ferro II (FeCl_2) 2 mM e de Ferrozina (Ácido 3-(2-piridil)-5,6-bis(4-fenilsufônico)-1,2,4-triazina) 5 mM. Amostras e padrões - ácido ascórbico, ácido gálico e o ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) - foram diluídos e fracionados de forma seriada, conforme já descrito.

Em microtubo de 2 mL, foram adicionados 1 mL de cada amostra seriada e 50 µL de solução aquosa de FeCl₂ (2 mM). A mistura foi homogeneizada e repousou no escuro por 5 minutos. Em seguida, 200 µL de Ferrozina (5 mM) foram acrescentados à mistura inicial que foi novamente homogeneizada. Então, a mistura foi novamente mantida em repouso e ao abrigo da luz por mais 10 minutos. O controle da reação foi composto por 1 mL de metanol, 50 µL de solução aquosa de FeCl₂ (2 mM) e 200 µL de Ferrozina 5 mM, e foi preparada do mesmo modo que as reações das amostras. Alíquotas de 300 µL foram lidas a 562 nm. O cálculo da Atividade Quelante (AQ%) foi realizado utilizando a equação abaixo e os resultados expressos em IC₅₀ (µg.mL⁻¹).

$$AQ (\%) = \left(\frac{Abs_0 - Abs_1}{Abs_0} \right) \times 100$$

Onde: *Abs₀*: absorvância do controle da reação de Fe²⁺

Abs₁: absorvância da amostra

4.8 Ensaio de viabilidade celular *in vitro*

O protocolo utilizado foi o descrito por Mosmann (1983), com modificações (DUTRA et al., 2019). Os testes foram realizados com linfócitos humanos e células de Sarcoma 180 (S-180). Todas as leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-visível (Marca: BioTek, Modelo: Epoch) a uma faixa de absorvância de 630 nm. Os extratos que apresentaram melhores resultados foram selecionados para serem utilizados na avaliação da atividade alelopática no sistema-teste *Allium cepa*.

4.8.1 Obtenção e isolamento de linfócitos humanos

O procedimento foi realizado com autorização do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal do Espírito Santo (CEP/CCS/UFES) por meio do processo N° CAAE 71093016.6.0000.5542 de 2017.

A amostra de sangue periférico, da qual foram isolados os linfócitos humanos, foi doada por voluntário sadio com idade entre 18 e 30 anos, que não fez uso de qualquer espécie de droga (lícitas e/ou ilícitas), antibióticos ou tenha sofrido exposição

a raios-x no último semestre. O doador preencheu um termo de anuência, indicando ciência acerca dos processos relacionados à doação de sangue.

O isolamento dos linfócitos humanos se deu por meio do método tradicional, no qual amostras de 10 mL de sangue periférico foram coletadas, utilizando seringa descartável, e em seguida foram transferidas para tudo de ensaio contendo solução salina estéril (NaCl 0,9%) e heparina sódica, na proporção (1:1). Então, 4 mL do sangue diluído foram adicionados, cuidadosamente, a 3 mL de *Ficoll-Paque Plus*[®] em outro tubo de ensaio, que foi vedado e centrifugados a 200 rcf, por 30 minutos, a 25 °C. Após a centrifugação, o halo de linfócitos foi retirado utilizando pipeta Pasteur. Os linfócitos isolados, aproximadamente 5 mL, foram transferidos para um novo tudo de ensaio e a eles foi adicionado o mesmo volume de solução salina estéril. O material foi submetido à homogeneização e, então, centrifugado a 500 rcf por 30 minutos a 25 °C. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente com auxílio de pipeta Pasteur.

Para a análise da concentração de células viáveis foi realizada a contagem, pelo método de exclusão, em câmara de Neubauer, do número de células presentes em 10 µL da suspensão celular misturada ao corante Azul de Tripan. A suspensão celular foi produzida por meio da mistura de 30 µL da solução de células (linfócitos) a 20 µL de Azul de Tripan. Após a contagem, as células foram diluídas com meio RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10%, para alcançar a concentração final de 2×10^5 células mL⁻¹.

4.8.1.1 Atividade citotóxica em linfócitos humanos

Células viáveis de linfócitos humanos (100 µL) foram adicionadas à microplaca, 96 poços e, em seguida, foram incubadas em estufa para cultivo de células, por 24 horas a 37 °C e a 5% de CO₂. Após o tempo de incubação, as células foram tratadas com os extratos diluídos em água deionizada nas concentrações de 50, 25 e 5 µg.mL⁻¹. As células tratadas com as diferentes concentrações dos extratos foram incubadas e permaneceram por 24 e 48 horas, nas mesmas condições já descritas.

Ao término de cada tempo de exposição das células aos extratos, as placas foram centrifugadas e em seguida, adicionaram-se, a cada poço, 40 µL de MTT, na concentração de 0,25 mg.mL⁻¹, diluído em SFB estéril. As placas foram novamente incubadas por mais 4 horas. Após o fim do segundo período de incubação, foram adicionados, às amostras, 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e então, as placas

foram agitadas para solubilizar os cristais de formazan {E, Z-1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan} que foram formados. Células que não sofreram exposição a nenhum tipo de tratamento foram utilizadas como controle negativo (CN).

O cálculo da viabilidade celular (VC), que indica a citotoxicidade, em linfócitos humanos foi realizado utilizando a equação abaixo e os resultados foram expressos em % de células viáveis e IC_{50} ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). O IC_{50} representa a concentração efetiva à qual o extrato consegue inibir o crescimento e/ou morte de células cancerígenas.

$$VC (\%) = \left(\frac{Abs_1}{Abs_0} \right) \times 100$$

Onde: Abs_0 : absorvância das células não tratadas (controle);

Abs_1 : absorvância da amostra

4.8.1.2 Atividade anticitotóxica em linfócitos humanos

Na avaliação da atividade anticitotóxica, os linfócitos humanos foram expostos aos extratos de *S. terebinthifolia* Raddi de três modos diferentes, para verificar seu desempenho quanto à ação de proteção aos danos causados pelo agente alquilante cisplatina ($\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$).

As exposições tinham as seguintes características:

- a) Pré-tratamento: as células foram inicialmente tratadas com os extratos, após 24 horas de incubação foram acrescidos 10,5 μL de cisplatina e por fim, ocorreu nova incubação por 24 horas;
- b) Tratamento simultâneo: as células foram, simultaneamente, expostas aos extratos e ao agente alquilante pelo período de 24 horas;
- c) Pós-tratamento: os linfócitos foram expostos a 5,5 μL de cisplatina, sofreram incubação por 24 horas, foram tratados com os extratos e 5,0 μL de cisplatina, e logo após ocorreu submissão a outro ciclo de 24 horas de incubação.

Os procedimentos realizados após cada tipo de exposição foram os mesmos descritos para a verificação da atividade citotóxica em linfócitos humanos. Os ensaios foram realizados utilizando as concentrações de 50, 25 e 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada extrato. As células que não foram expostas a nenhum tipo de tratamento foram utilizadas como

controle negativo (CN) e aquelas submetidas apenas à exposição à cisplatina foram considerados controle positivo (CP).

O cálculo da viabilidade celular, que indica o nível de anticitotoxicidade, em células de linfócitos humanos foi realizado utilizando a mesma equação apresentada no item anterior, sendo os resultados expressos em % de células viáveis e IC_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$).

4.8.2 Obtenção e isolamento de células de Sarcoma 180 (S-180)

O procedimento foi realizado com autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA/UFES), por meio do processo N° 89/2015.

As células de S-180 utilizadas neste experimento foram adquiridas junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). A linhagem de células foi preservada em cultura suplementada com antibióticos em ultrafreezer, a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

As células de S-180 foram descongeladas em temperatura ambiente e, utilizando uma seringa, foram injetadas na cavidade intraperitoneal de camundongos da espécie *Mus musculus*, para multiplicação por 12 dias. Após o período de incubação os camundongos foram sacrificados e, as células de S-180, que proliferaram na cavidade intraperitoneal, foram coletadas utilizando seringas estéreis.

A viabilidade celular foi estimada utilizando o mesmo método descrito para os linfócitos humanos. As células foram diluídas em meio RPMI-1640 suplementado a 10% de SFB até alcançar a concentração final de 1×10^6 células.mL⁻¹.

4.8.2.1 Atividade antiproliferativa em S-180

Para avaliar a ação antiproliferativa dos extratos de *S. terebinthifolia* Raddi (aroeira), 100 μL da concentração final de células de S-180 foram tratadas com os extratos diluídos em água deionizada, nas concentrações de 50, 25 e 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ por 24 e 48 horas, nas mesmas condições descritas no experimento realizado com células humanas. Ao fim de cada tempo de exposição, as células passaram pelos mesmos procedimentos utilizados na avaliação de citotoxicidade em linfócitos. O cálculo da atividade antiproliferativa (AP) em células de S-180 foi feito utilizando a equação abaixo e os resultados foram expressos em % de células vivas e IC_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$).

$$AP (\%) = \left(\frac{Abs_1}{Abs_0} \right) \times 100$$

Onde: Abs_0 : absorvância das células não tratadas (controle)

Abs_1 : absorvância da amostra

4.8.3 Índice de Seletividade (IS)

Para avaliar se as concentrações de extratos utilizados nos ensaios de viabilidade celular *in vitro* (MTT) apresentam afinidade em combater as células de S-180, células neoplásicas, ou se afetam os linfócitos humanos (células não neoplásicas), da mesma forma, foi calculado o Índice de Seletividade (IS), utilizando metodologia descrita por Badisa et al. (2006). O IS foi mensurado por meio da equação abaixo e apresentado para cada um dos tempos de exposição ao qual as células interagiram com os extratos de *S. terebinthifolia* Raddi (aroeira).

$$IS = \frac{IC_{50} \text{ das células não neoplásicas}}{IC_{50} \text{ das células neoplásicas}}$$

4.9 Avaliação do potencial alelopático

O potencial alelopático dos extratos de *S. terebinthifolia* Raddi que apresentaram melhor desempenho nos outros testes biológicos foi avaliado no sistema-teste *Allium cepa* (cebola) seguindo metodologia descrita por Fiskesjo (1985), com modificações. As sementes de *Allium cepa* (da empresa Feltrin; cultivar Baia Periforme; lote nº. 3801810000040) foram obtidas de fonte comercial, eram do mesmo lote, mas não-clonais.

Na realização do teste foi utilizada água deionizada, como Controle Negativo (CN), e quatro concentrações (5,0; 2,5; 1,0; e 0,5 mg.mL⁻¹) dos extratos diluídos em água deionizada. O ensaio foi feito, em triplicata, de modo contínuo e em placas Petri, contendo 30 sementes cada (total de 90 sementes/tratamento). As placas foram forradas com papel filtro e embebidas com 5,0 mL do CN ou dos tratamentos. A cada 24 horas, e por um período de 7 dias, foram mensurados o número de sementes

germinadas e o comprimento das radículas. Assim, utilizando parâmetros compilados de Costalonga (2017) foi possível estabelecer:

- ❖ Índice de Germinação (IG): número de sementes germinadas em relação ao total de sementes submetidas ao teste. É calculado conforme a equação abaixo e expresso em %:

$$IG = \left(\frac{N}{90}\right) \times 100$$

Onde: N = número de sementes germinadas ao final do teste.

- ❖ Índice de Alelopatia (IA): capacidade que o extrato (tratamento) possui em interferir na germinação das sementes, em relação ao CN. É calculado da seguinte forma e apresentado em %:

$$IA = \left(\frac{GC - GT}{GC}\right) \times 100$$

Onde: GC = germinação do controle negativo (CN);

GT = germinação apresentada em cada tratamento.

- ❖ Índice de Velocidade de Germinação (IVG): velocidade de germinação das sementes (quando submetidas a cada tratamento) com relação ao tempo do teste. O IVG é calculado conforme a equação abaixo:

$$IVG = \sum \left(\frac{n_i}{t_i}\right)$$

Onde: n = número de sementes que germinaram

t = tempo após a instalação do teste

i = intervalo de tempo (1 – 7 dias)

- ❖ Tempo Médio de Germinação (TMG): média do tempo, em dias, necessários para as sementes germinarem quando expostas a cada tratamento. É calculado da seguinte forma:

$$TMG = \left(\frac{\sum n_i \times t_i}{\sum t_i} \right)$$

Onde: n_i = número de sementes germinadas por dia

t_i = tempo de exposição

i = intervalo de tempo (1 – 7 dias)

- ❖ Velocidade Média de Germinação (VMG): expressa em dias⁻¹ e obtida utilizando:

$$VMG = (1/t)$$

Onde: t = tempo médio de germinação

- ❖ Crescimento Radicular Médio (CRM): expresso em cm e calculado por meio da equação:

$$CRM = \left(\frac{\sum Cm_i}{t} \right)$$

Onde: Cm_i = comprimento médio no tempo i

t = tempo total do experimento

i = intervalo de tempo (1 – 7 dias)

- ❖ Índice de Velocidade do Crescimento Radicular (IVCR):

$$IVCR = \sum \left(\frac{c_i}{t_i} \right)$$

Onde: c_i = tamanho médio das radículas no tempo i

t_i = tempo médio de instalação do teste

i = intervalo de tempo (1 – 7 dias)

4.10 Delineamento experimental e análise estatística

Os experimentos laboratoriais foram realizados em triplicata, em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC). Os dados foram expressos em média \pm erro padrão (EP) e calculados utilizando programas estatísticos. Para calcular o IC₅₀ foi utilizado o programa *GraphPad Prism 6.0*. A análise de variância ANOVA, com pós-teste de comparação de médias Tukey em nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$) para verificar possível diferença entre os tratamentos, a Análise de Componentes Principais (PCA) e a correlação de Pearson foram realizadas utilizando o programa *Paleontological Statistics (PAST)*, versão 3.26, e Matrix Laboratory (MATLAB). Nas análises de correlação foram realizados os cruzamentos dos dados químicos e biológicos obtidos, por meio das análises, com o tipo de adubação utilizado em cada tratamento.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise de nutrientes em tecidos vegetais de *S. terebinthifolia* Raddi

Na tabela 3 são apresentados os resultados das análises de macro e micronutrientes realizadas com as amostras de material vegetal (frutos e folhas) de *S. terebinthifolia* submetidas a diferentes tipos de adubação. Os conteúdos foram analisados e comparados de acordo com as exigências nutricionais consideradas adequadas às plantas superiores, descritas por Marengo e Lopes (2009).

O conteúdo de nitrogênio (N) demonstrou ser adequado na maioria das amostras analisadas. Somente as folhas das plantas que foram nutridas com a adubação T5 (100 g de adubo NPK + 2 g de H_3BO_3 + 4 g de $ZnSO_4$) apresentaram deficiência (13,58 $g.Kg^{-1}$) de nitrogênio.

A falta de N afeta diretamente a produção de clorofila e, conseqüentemente, a síntese de substâncias ligadas a fotossíntese (MARENCO; LOPES, 2009). Isso acarretará a diminuição das concentrações de metabólitos secundários contendo N e a promoverá a produção de metabólitos derivados da via do ácido chiquímico, dentre eles os taninos condensados e hidrolisados (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

No entanto, Radušienė et al. (2019) indicam com seus estudos que tais informações não são totalmente conclusivas, pois os efeitos da adição e/ou da falta de N na produção de metabólitos secundários são variáveis e dependem do composto a ser sintetizado e da planta submetida a essa condição. Eles verificaram que quando indivíduos de *Hypericum pruinatum* L. são tratados com diferentes doses de N, as plantas submetidas às menores taxas produzem mais metabólitos secundários.

Em relação à concentração de fósforo (P) pode-se verificar que somente os frutos das plantas nutridas com a adubação T5, com 1,70 $g.Kg^{-1}$ de P, e as amostras foliares das plantas analisadas apresentaram pouco conteúdo de fósforo.

Conforme Grant et al. (2001), a carência de fósforo pode reduzir a respiração, a fotossíntese, a síntese de ácido nucléico e de proteínas, e induz o acúmulo de compostos nitrogenados. Porém, Kerbauy (2008) indica que a falta de P nas folhas pode ser o indício da realização da mobilidade desse nutriente. Fenômeno que é realizado quando há deficiência de fósforo no solo e a planta transloca o P que estavam nos tecidos fonte para os tecidos dreno, via floema.

Tabela 3 - Análise química (macro e micronutrientes) realizada em material vegetal (frutos e folhas) de *S. teribinthifolia* Raddi submetidas a diferentes tipos de adubação na área experimental do Projeto Biomass - Mata Atlântica, Linhares – ES.

Amostras	Macronutrientes						Micronutrientes					
	Nitrogênio ²	Fósforo ³	Potássio ³	Cálcio ³	Magnésio ³	Enxofre ³	Ferro ³	Zinco ³	Cobre ³	Manganês ³	Boro ⁴	
	(N)	(P)	(K)	(Ca)	(Mg)	(S)	(Fe)	(Zn)	(Cu)	(Mn)	(B)	
	(g.Kg ⁻¹)	(g.Kg ⁻¹)	(g.Kg ⁻¹)	(g.Kg ⁻¹)	(g.Kg ⁻¹)	(g.Kg ⁻¹)	(mg.Kg ⁻¹)	(mg.Kg ⁻¹)	(mg.Kg ⁻¹)	(mg.Kg ⁻¹)	(mg.Kg ⁻¹)	
Frutos	T1	15,75	2,36	11,25	3,00	1,94	1,49	208,0	25,0	14,0	24,0	14,0
	T2	17,57	2,17	13,13	2,95	1,89	1,58	197,0	16,0	15,0	25,0	13,0
	T3	16,73	2,49	12,50	3,00	2,10	1,68	190,0	17,0	16,0	27,0	14,0
	T4	17,08	2,06	11,88	3,34	2,15	1,58	135,0	14,0	13,0	15,0	13,0
	T5	17,01	1,70	11,25	3,04	2,25	1,58	80,0	15,0	12,0	14,0	12,0
	T6	15,61	2,49	12,50	3,18	1,95	1,68	158,0	15,0	13,0	29,0	15,0
Folhas	T1	19,25	1,09	10,00	8,79	3,38	1,49	67,0	9,0	5,0	24,0	17,0
	T2	16,03	1,06	10,63	9,13	3,38	1,58	61,0	10,0	5,0	23,0	14,0
	T3	15,68	1,13	12,50	8,14	3,00	1,49	66,0	9,0	5,0	21,0	30,0
	T4	15,96	1,13	11,25	9,08	3,19	1,68	63,0	8,0	5,0	22,0	19,0
	T5	13,58	0,99	10,00	9,88	3,25	1,88	64,0	10,0	5,0	24,0	20,0
	T6	15,26	0,99	9,38	9,68	3,19	1,98	60,0	115,0	5,0	59,0	21,0
*Referência	15 - 50	2 - 5	10 - 50	1 - 50	1,5 - 4	1 - 5	100 - 400	30 - 80	6 - 10	30 - 150	10 - 100	

T1 = testemunha (ausência de adubação); T2 = 100 g de adubo NPK (10:30:10); T3 = T2 + 2 g de boro, na forma de ácido bórico (H₃BO₃); T4 = T2 + 4 g zinco, na forma de sulfato de zinco (ZnSO₄); T5 = T2 + 2 g de H₃BO₃ + 4 g de ZnSO₄, e T6 = 500 g de adubação orgânica (esterco bovino). Fonte: FULLIN - Laboratório de Análise Agronômica e Ambiental LTDA; Metodologia utilizada: ²Digestão ácida a quente. ³Digestão nitro-perclórica. ⁴Digestão seca. *Referência: MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, (1997). *MARENCO; LOPES, (2009).

Em estudo realizado com *Glechoma longituba*, Jin, Liu e Guo (2019) constataram que o teor de P está relacionado à produção de compostos bioativos (ácidos fenólicos, flavonoides e triterpenos ácidos) principalmente na parte aérea da planta. Shan et al. (2018) verificaram que a longo prazo a adição de fósforo aumenta a concentração de fenóis totais, taninos condensados, celulose e lignina em folhas de *Glyceria spiculosa*.

Os conteúdos de potássio (K) demonstraram ser adequados na maioria do material vegetal analisado. Somente as folhas das plantas nutridas com a adubação orgânica (T6) o valor desse macronutriente ($9,38 \text{ g.Kg}^{-1}$) está abaixo do índice de referência ($10 - 50 \text{ g.Kg}^{-1}$) apresentado por Marengo e Lopes (2009).

De acordo com Taiz et al. (2017) isso pode ser o indicativo de que está ocorrendo a transferência de potássio das folhas mais velhas para as folhas mais jovens, estratégia realizada pelas plantas quando há sintomas de deficiência de potássio no solo. No entanto, vale ressaltar que o conteúdo de K nos frutos de aroeira expostos a mesma adubação (T6) está dentro dos padrões da referência, demonstrando que a hipótese exposta por Taiz et al. (2017) pode estar correta.

No trabalho realizado por Gaaliche et al. (2019) foi verificado que a aplicação da solução de sulfato de potássio (K_2SO_4) a 2%, nas folhas de *Ficus carica* L. (figueira), aumentou o conteúdo de compostos fenólicos (ácido clorogênico, quercetina e cianidina) nos figos produzidos por essas plantas. Em pesquisa semelhante, Oliveira (2017) verificou que a adubação com potássio elevou a taxa de compostos fenólicos em *Solanum melongena* L. (berinjela) quando foi aplicada a dose de $72 \text{ kg K}_2\text{O.ha}^{-1}$.

Os frutos das plantas nutridas com as adubações T1, T2, T3, T4 e T6 demonstraram ter conteúdo de ferro (Fe) adequados ao seu desenvolvimento. Porém, o material foliar das plantas anteriormente citadas e os frutos e folhas das plantas nutridas com a adubação T5 demonstraram ter deficiência em ferro.

De acordo com Moreira, Moraes e Aquino (2018), nas plantas, a ausência de ferro é prejudicial porque ele está envolvido em muitas vias metabólicas, ativando o sistema redox por algumas enzimas que têm participação direta na respiração mitocondrial, fotossíntese, biossíntese de hormônios, assimilação de N e enxofre (S) e fixação biológica de nitrogênio (N).

Wasli et al. (2018) analisaram o desenvolvimento de endro (*Anethum graveolens* L.) e confirmaram que a carência de ferro causa a redução na concentração de clorofila, de polifenóis e de flavonoides nas folhas e raízes dessa planta. Fato também confirmado por Jia et al. (2019) que em pesquisa realizada com *Malus halliana*

verificaram que a deficiência em ferro alterou a via da pentose fosfato, o metabolismo da galactose, da sacarose e dos aminoácidos, determinando com isso uma adaptação daquele vegetal à falta desse componente.

Em relação às propriedades de solo, Salisbury e Ross (2012) afirmam que em solos ácidos a absorção de ferro é limitada, sendo frequente a deficiência de Fe em plantas cultivadas neles.

Essa informação é bastante pertinente, pois o trabalho de Ruas (2016), realizado na mesma área e com as mesmas plantas aqui avaliadas, indicam, por meio de caracterização química e física, que o solo onde o experimento foi implantado possuía características ácidas, pois o pH do solo nas profundidades 0 - 20 e 20 - 40 cm apresentavam valores de 3,95 e 4,05, respectivamente. Dessa forma, podemos inferir que as características do solo podem estar interferindo na absorção do ferro e de outros nutrientes.

De acordo com Marengo e Lopes (2009), as plantas que exibem níveis de zinco, menor que 20 mg.Kg⁻¹, expõem níveis críticos de deficiência desse nutriente e os que apresentam níveis acima de 100 mg.Kg⁻¹ de zinco apresentam concentrações consideradas tóxicas.

Podemos verificar que dez das doze amostras avaliadas apresentam, de acordo com Marengo e Lopes (2009), níveis críticos de deficiência de zinco (Zn), ou seja, conteúdo de Zn menor que 20 mg.Kg⁻¹. Porém, as folhas das plantas submetidas à nutrição T6, que receberam adubo orgânico, apresentaram conteúdo de zinco maior (115,0 mg.Kg⁻¹) que o considerado adequado (30 - 80 mg.Kg⁻¹) ao desenvolvimento de plantas superiores, conteúdo esse considerado tóxico, de acordo com a referência.

O Zn é formador da enzima superóxido dismutase (Cu-Zn-SOD) logo, a presença de altas taxas desse nutriente nas folhas de aroeira pode ser um indício de que órgão está produzindo enzimas que combatem o estresse oxidativo. A enzima superóxido dismutase é utilizada no combate ao estresse produzido por radiação solar excessiva e altas temperaturas (MARENCO; LOPES, 2009).

Ao avaliar os efeitos de doses de potássio (K₂O) no desenvolvimento inicial e eficiência nutricional de mudas da aroeirinha (*S. teribinthifolia* Raddi) Carnevali et al. (2019) constataram que a menor taxa de potássio (K) (66,67 mg.Kg⁻¹ K₂O) proporcionou maior eficiência de translocação de fósforo (P), ferro (Fe) e zinco (Zn).

Ao verificar os dados das análises de micro e macronutrientes das plantas submetidas à nutrição orgânica (T6), percebe-se que algo similar ao que foi relatado

por Carnevali et al. (2019) pode estar ocorrendo, pois o conteúdo de potássio (K) é menor ($9,38 \text{ g.Kg}^{-1}$) nas folhas enquanto que os teores de fósforo ($2,49 \text{ g.Kg}^{-1}$) e ferro ($158,0 \text{ mg.Kg}^{-1}$) são maiores nos frutos.

Ullah et al. (2019) verificaram que a deficiência de zinco (Zn) acentuou o estresse hídrico e térmico e causou a redução da biomassa, da assimilação de carbono e da atividade antioxidante, aumentando o dano oxidativo em *Cicer arietinum* L. (grão de bico). O zinco é essencial ao metabolismo vegetal porque é ativador e componente de várias enzimas envolvidas na proteção dos tecidos vegetais contra o estresse oxidativo. A baixa concentração de Zn também interfere na produção de proteínas e no metabolismo do nitrogênio (FAQUIN, 2005).

Em relação às concentrações de cobre (Cu), analisadas no presente estudo, foi possível verificar que todas as adubações empregadas (T1, T2, T3, T4, T5 e T6) proporcionaram aos frutos teores de cobre maiores que os considerados adequados ($>10 \text{ mg.Kg}^{-1}$) à nutrição de plantas superiores, mas abaixo do valor que indique toxidez ($>20 \text{ mg.Kg}^{-1}$). No entanto, as folhas dessas plantas demonstraram apresentar carência desse micronutriente, pois todos os materiais foliares analisados apresentam concentrações menores que 6 mg.Kg^{-1} de cobre.

De acordo com Marengo e Lopes (2009), plantas cultivadas em solos ricos em matéria orgânica tendem a apresentar deficiência deste elemento e produzem mais compostos fenólicos. As análises químicas e físicas do solo realizadas por RUAS (2016) indicam que o local onde o presente experimento foi realizado é rico em matéria orgânica 5,16 %, na profundidade 0 - 20 cm, e 4,71% na profundidade 20 - 40 cm. Logo espera-se maior produção de compostos fenólicos nas folhas.

Alterações fisiológicas causadas pelo excesso de cobre nos tecidos vegetais são em parte atribuídas à sua capacidade de remover íons, em particular o Fe, tornando a toxidez de cobre semelhante à deficiência de Fe (MARENCO; LOPES, 2009; TAIZ et al., 2017). Esse evento pode estar ocorrendo nas plantas aqui analisadas, pois os teores de Fe estão abaixo do adequado, nas folhas, indicando carência de Fe, e os índices de Cu estão acima do ideal, nos frutos, sinalizando uma leve toxidez.

Em onze amostras analisadas, as concentrações de manganês (Mn) estão abaixo do considerado adequado ($30 - 150 \text{ mg.Kg}^{-1}$) mas estão acima do nível considerado crítico ($10 - 20 \text{ mg.Kg}^{-1}$). Somente o material foliar procedente de plantas submetidas à nutrição orgânica (T6) apresentaram valores de manganês adequado ($59,0 \text{ mg.Kg}^{-1}$) ao desenvolvimento de plantas superiores.

A deficiência de Mn é incomum em ambientes naturais, mas quando ocorre provoca a redução da fotossíntese e da produção de matéria seca. Íons de manganês ativam várias enzimas nas células vegetais, entre elas as descarboxilases e as desidrogenases, envolvidas no ciclo de Krebs. Outras enzimas contêm o Mn na sua estrutura, tal como a superóxido dismutase (Cu-Zn-SOD) e enzimas da rota do ácido chiquímico, responsáveis pela síntese de aminoácidos aromáticos e flavonoides (KERBAUY, 2008; MARENCO; LOPES, 2009; TAIZ et al., 2017).

A aplicação de sulfato de manganês nas folhas de *Vitis vinifera* L. (parreira) melhorou os teores de compostos fenólicos, antocianinas e flavonoides em uvas nutridas com esse composto (CHEN et al., 2020). O acúmulo excessivo de Mn tem um impacto negativo nas taxas de metabólitos fenólicos em plantas jovens de *Matricaria chamomilla* (camomila) (KOVÁČIK, et al., 2018).

Os conteúdos dos nutrientes cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S) e boro (B) demonstraram ser adequadas ao funcionamento do aparato fisiológico e ao crescimento/desenvolvimento das plantas de *S. terebinthifolia* (aroeira) analisadas, quando comparadas aos parâmetros apresentados por Marenco e Lopes (2009). Os nutrientes molibdênio (Mo), níquel (Ni) e cloro (Cl) não foram determinados pelas análises químicas aqui realizadas.

5.2 Análise por ESI (-) FT-ICR MS e ESI (-) FT-ICR MS/MS de extratos etanólicos de *Schinus terebinthifolia* (aroeira)

Após a realização das análises por ESI (-) FT-ICR MS foram obtidos os espectros de massas apresentados na figura 17. Os sinais que apresentaram maior intensidade em cada extrato foram: T1, m/z 371 (ácido anacárdico); T2, m/z 215 (glicose ou isômeros/Cl⁻); T3, m/z 371 (ácido anacárdico); T4, m/z 373 (ácido anacárdico); T5, m/z 371 (ácido anacárdico); T6, m/z 373 (ácido anacárdico); T1F, m/z 569 (ácido anacárdico galoiletilado) e T6F, m/z 569 (ácido anacárdico galoiletilado).

Na tabela 4 é apresentada a composição dos extratos analisados. As substâncias ou classes foram propostas com base nos íons gerados, fórmula molecular proposta, número de insaturações e anéis (DBE) e dados da literatura referente à identificação das substâncias na espécie, gênero ou família.

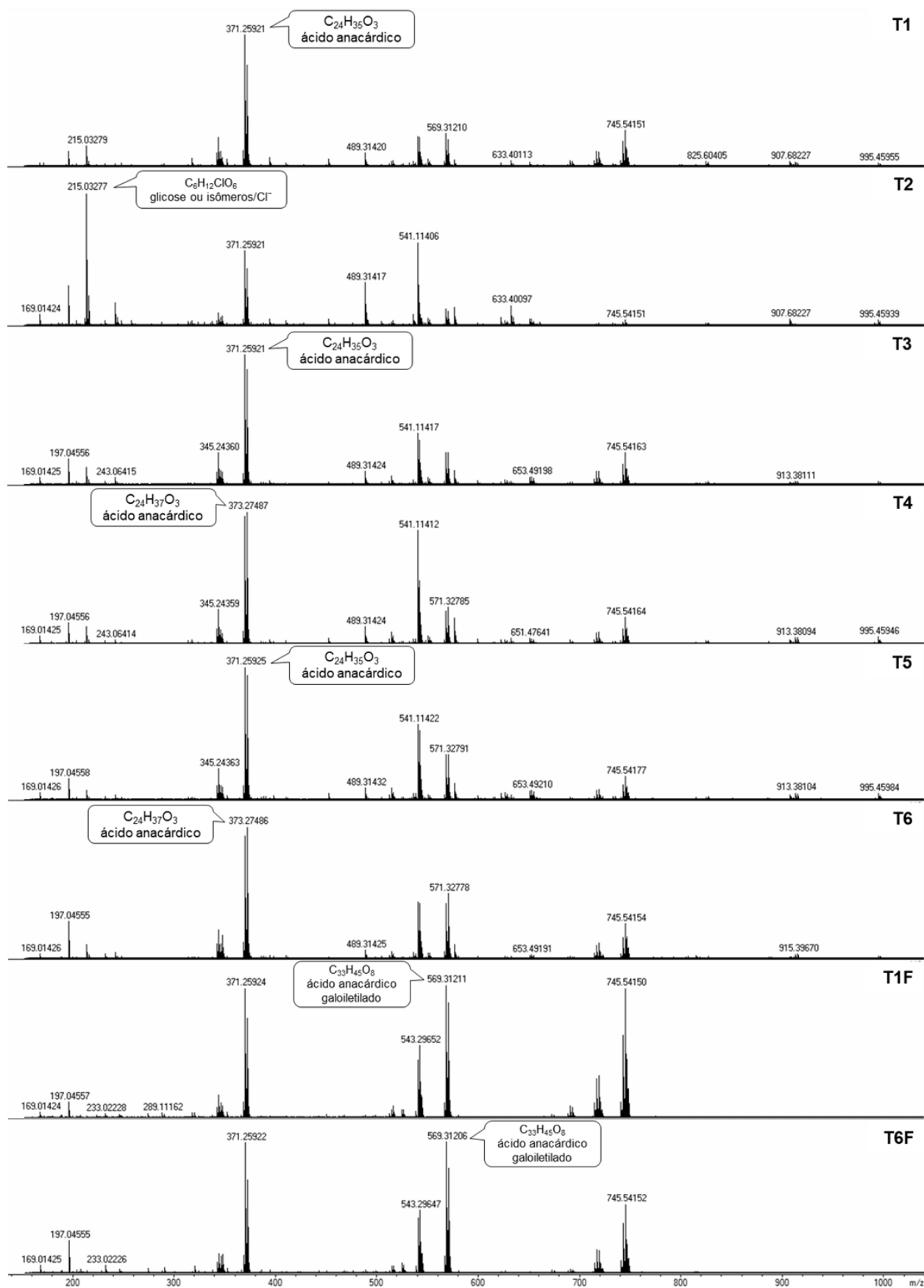


Figura 17 - Espectros de massas ESI (-) FT-ICR MS de extratos etanólicos de frutos (T1, T2, T3, T4, T5 e T6) e folhas (T1F e T6F) de *Schinus terebinthifolia*.

Tabela 4 - Substâncias identificadas por ESI (-) FT-ICR MS e ESI (-) FT-ICR MS/MS nos extratos de frutos (T1, T2, T3, T4, T5 e T6) e folhas (T1F e T6F) de aroeiras (*S. terebinthifolia*).

[M-H] ⁻ (m/z)	MS/MS	Fórmula Molecular [M-H] ⁻	Erro (ppm)	DBE ^a	Substância proposta	Extratos							
						T1	T2	T3	T4	T5	T6	T1F	T6F
169,01424		C ₇ H ₅ O ₅	0,03	5	ácido gálico	+	+	+	+	+	+	+	+
173,04554		C ₇ H ₉ O ₅	0,03	3	ácido chiquímico	-	-	-	-	-	-	+	+
179,05612		C ₆ H ₁₂ O ₆	-0,05	1	glicose	-	+	-	-	-	-	-	-
197,04557		C ₉ H ₉ O ₅	-0,12	5	galato de etila	+	+	+	+	+	+	+	+
204,99094		C ₇ H ₆ ClO ₅	-0,07	4	ácido gálico/Cl ⁻	+	+	+	+	+	+	+	+
209,02228		C ₇ H ₁₀ ClO ₅	-0,24	3	ácido chiquímico/Cl ⁻	-	+	-	-	-	-	+	+
215,03285		C ₆ H ₁₂ ClO ₆	-0,26	1	glicose ou isômeros/Cl ⁻	+	+	+	+	+	+	+	+
233,02228		C ₉ H ₁₀ ClO ₅	-0,24	5	galato de etila/Cl ⁻	+	+	+	+	+	+	+	+
279,23297		C ₁₈ H ₃₁ O ₂	-0,04	3	ácido linoleico	+	+	-	+	+	-	-	-
285,04059		C ₁₅ H ₉ O ₆	-0,47	11	luteolina	-	+	-	-	-	-	-	-
301,03540		C ₁₅ H ₉ O ₇	-0,09	11	quercetina	-	-	-	-	-	+	-	+
315,20970		C ₁₈ H ₃₂ ClO ₂	-0,23	3	ácido linoleico/Cl ⁻	+	+	+	+	+	+	-	-
317,03046		C ₁₅ H ₉ O ₈	-0,53	11	miricetina	-	-	-	-	-	-	+	+
317,22531		C ₁₈ H ₃₄ ClO ₂	-0,09	2	ácido oleico/Cl ⁻	+	+	+	+	+	+	-	-
319,22798		C ₂₀ H ₃₁ O ₃	-0,35	5	ácido anacárdico	+	+	+	+	+	+	+	+
321,02533		C ₁₄ H ₉ O ₉	-0,39	10	ácido digálico	+	+	+	+	+	+	+	+
325,05665		C ₁₄ H ₁₃ O ₉	0,93	14	ácido galoilchiquímico	+	+	+	+	+	+	+	+
327,26917		C ₂₃ H ₃₅ O	0,50	6	cardanol	+	-	-	+	-	-	-	-
331,06721		C ₁₃ H ₁₅ O ₁₀	-0,42	6	galoilglicose	+	+	+	+	+	+	+	+
337,23042		C ₂₁ H ₃₄ ClO	-0,17	5	cardanol/Cl ⁻	-	+	+	+	+	-	-	-
339,03588		C ₁₄ H ₁₁ O ₁₀	-0,31	9	cluster de ácido gálico	-	-	-	-	+	-	+	+
341,10912		C ₁₂ H ₂₁ O ₁₁	-0,54	2	dissacarídeo	-	+	-	-	-	-	-	-
343,22800		C ₂₂ H ₃₁ O ₃	-0,38	7	ácido anacárdico	+	+	+	+	+	+	+	+
345,24363	301,25415	C ₂₂ H ₃₃ O ₃	-0,33	6	ácido anacárdico	+	+	+	+	+	+	+	+
347,09845		C ₁₄ H ₁₉ O ₁₀	-0,23	5	cluster de ácido chiquímico	-	-	-	-	-	-	+	+
347,25928	303,26981	C ₂₂ H ₃₅ O ₃	-0,32	5	ácido anacárdico	+	+	+	+	+	+	+	+
349,05662		C ₁₆ H ₁₃ O ₉	-0,33	10	digalato de etila	+	+	+	+	+	+	+	+
353,10905		C ₁₃ H ₂₁ O ₁₁	-0,32	3	hexosídeo do ácido quínico	+	+	+	+	+	+	+	+
367,04379		C ₁₃ H ₁₆ ClO ₁₀	-0,13	6	galoilglicose/Cl ⁻	-	+	-	-	-	-	-	-
367,06716		C ₁₆ H ₁₅ O ₁₀	-0,24	9	cluster de galato de metila	-	-	-	-	-	-	+	+
369,24366		C ₂₄ H ₃₃ O ₃	-0,38	8	ácido anacárdico	+	+	+	+	+	+	+	+

^aNúmero de insaturações e anéis (*double bound equivalent*); (+) substâncias presentes; (-) substâncias ausentes.

Tabela 4 - Substâncias identificadas por ESI (-) FT-ICR MS e ESI (-) FT-ICR MS/MS nos extratos de frutos (T1, T2, T3, T4, T5 e T6) e folhas (T1F e T6F) de aroeiras (*S. terebinthifolia*). (continuação)

[M-H] ⁻ (m/z)	MS/MS	Fórmula Molecular [M-H] ⁻	Erro (ppm)	DBE ^a	Substância proposta	Extratos							
						T1	T2	T3	T4	T5	T6	T1F	T6F
371,25924	327,26984	C ₂₄ H ₃₅ O ₃	-0,20	7	ácido anacárdico	+	+	+	+	+	+	+	+
373,27491	329,28549	C ₂₄ H ₃₇ O ₃	-0,25	6	ácido anacárdico	+	+	+	+	+	+	+	+
375,29067	331,30118	C ₂₄ H ₃₉ O ₃	-0,53	5	ácido anacárdico	+	-	+	+	+	+	+	+
377,08571		C ₁₂ H ₂₂ ClO ₁₁	-0,26	1	dissacarídeo/Cl ⁻	+	+	+	+	+	+	-	-
395,09845		C ₁₈ H ₁₉ O ₁₀	-0,21	9	cluster de galato de etila	-	-	-	-	-	+	+	+
397,09328		C ₂₁ H ₁₇ O ₈	-0,98	13	lanneaf flavonol	+	+	+	+	-	+	-	-
399,34801		C ₂₄ H ₄₇ O ₄	-0,08	1	ácido laurico	+	+	+	+	+	+	-	-
453,33758		C ₃₀ H ₄₅ O ₃	-0,35	8	ácido morônico	+	+	+	+	+	+	+	+
455,35317		C ₃₀ H ₄₇ O ₃	-0,22	7	schinol	+	+	+	+	+	+	-	+
463,08841		C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	-0,46	12	miricitrina	-	-	-	-	-	-	+	+
477,06768		C ₂₁ H ₁₇ O ₁₃	-0,45	13	ácido digaloilchiquímico	-	+	+	+	+	-	-	+
489,31420		C ₃₀ H ₄₆ ClO ₃	-0,22	8	ácido morônico/Cl ⁻	+	+	+	+	+	+	-	+
495,07847		C ₂₁ H ₁₉ O ₁₄	0,88	12	ácido digaloilquinico	+	+	-	-	-	-	-	-
499,06514		C ₂₁ H ₂₀ ClO ₁₂	-0,53	12	miricitrina/Cl ⁻	+	-	-	-	-	-	+	-
499,27038		C ₂₉ H ₃₉ O ₇	-0,50	10	2-metil-cardol galoilado	-	-	-	-	-	-	+	+
513,25040	169,01431 343,22817	C ₂₉ H ₃₇ O ₈	-1,96	11	ácido anacárdico galoilado	+	+	+	+	+	+	+	+
515,26587	169,01431 345,24384	C ₂₉ H ₃₉ O ₈	-1,60	10	ácido anacárdico galoilado	+	+	+	+	+	+	+	+
517,28153	169,01431 347,25950	C ₂₉ H ₄₁ O ₈	-1,62	9	ácido anacárdico galoilado	+	+	+	+	+	+	+	+
525,28600		C ₃₁ H ₄₁ O ₇	-0,42	11	2-metil-cardol galoilmetilado	-	-	-	+	+	+	+	+
527,30159		C ₃₁ H ₄₃ O ₇	-0,31	10	2-metil-cardol galoiletilado	+	-	-	+	+	+	+	+
537,08283		C ₃₀ H ₁₇ O ₁₀	-0,20	22	robustaf flavona	+	+	+	+	+	+	-	-
538,25695	169,01431 369,24390	C ₃₁ H ₃₉ O ₈	0,50	13	ácido anacárdico galoilado	+	+	+	+	+	+	+	+
539,09858		C ₃₀ H ₁₉ O ₁₀	-0,39	21	rhusflavona	-	-	+	-	+	+	-	-
541,11415		C ₃₀ H ₂₁ O ₁₀	-0,23	20	rhusflavanona	+	+	+	+	+	+	-	-
541,28161	197,04555 343,22787	C ₃₁ H ₄₁ O ₈	-1,70	11	ácido anacárdico galoilado	+	+	+	+	+	+	+	+

^aNúmero de insaturações e anéis (*double bound equivalent*); (+) substâncias presentes; (-) substâncias ausentes.

Tabela 4 - Substâncias identificadas por ESI (-) FT-ICR MS e ESI (-) FT-ICR MS/MS nos extratos de frutos (T1, T2, T3, T4, T5 e T6) e folhas (T1F e T6F) de aroeiras (*S. terebinthifolia*). (continuação)

[M-H] ⁻ (m/z)	MS/MS	Fórmula Molecular [M-H] ⁻	Erro (ppm)	DBE ^a	Substância proposta	Extratos							
						T1	T2	T3	T4	T5	T6	T1F	T6F
543,29634	169,01432 373,27520	C ₃₁ H ₄₃ O ₈	-1,62	10	ácido anacárdico galoilado	+	+	+	+	+	+	+	+
545,31226		C ₃₁ H ₄₅ O ₈	-0,26	9	ácido anacárdico galoilado	+	+	+	+	+	+	+	+
549,30693		C ₃₀ H ₄₅ O ₉	-0,08	8	triterpeno glicosídeo	+	+	+	+	+	+	-	-
551,32283		C ₃₀ H ₄₇ O ₉	-0,50	7	triterpeno glicosídeo	+	+	+	+	+	+	-	+
553,33834		C ₃₀ H ₄₉ O ₉	-0,25	6	triterpeno glicosídeo	+	+	+	+	+	+	-	-
567,30012	197,04567 369,24390	C ₃₃ H ₄₃ O ₈	-0,63	13	ácido anacárdico galoiletilado	+	+	+	+	+	+	+	+
569,31297	197,04565 371,25949	C ₃₃ H ₄₅ O ₈	-1,72	11	ácido anacárdico galoiletilado	+	+	+	+	+	+	+	+
571,32782	197,04566 373,27514	C ₃₃ H ₄₇ O ₈	-0,31	10	ácido anacárdico galoiletilado	+	+	+	+	+	+	+	+
577,09089		C ₃₀ H ₂₂ ClO ₁₀	-0,34	20	rhusflavanona/Cl ⁻	+	+	+	+	+	+	-	-
623,35909		C ₃₇ H ₅₁ O ₈	-0,24	12	ácido anacárdico galoiletilado	+	+	+	+	+	+	-	+
633,40113	179,05628 453,33835	C ₃₆ H ₅₇ O ₉	-0,51	8	triterpeno glicosídeo	+	+	+	+	+	+	-	-
651,39052		C ₃₉ H ₅₅ O ₈	-0,43	12	ácido anacárdico galoiletilado	+	+	+	-	+	+	+	+
691,49458		C ₄₄ H ₆₇ O ₆	-0,38	11	cluster de ácido anacárdico	+	-	+	+	+	+	+	+
693,51017		C ₄₄ H ₆₉ O ₆	-0,30	10	cluster de ácido anacárdico	+	+	+	+	+	+	+	+
713,47916		C ₄₆ H ₆₅ O ₆	-0,69	14	cluster de ácido anacárdico	-	-	-	-	-	+	+	+
715,49478		C ₄₆ H ₆₇ O ₆	-0,52	13	cluster de ácido anacárdico	+	+	+	+	+	+	+	+
717,51038		C ₄₆ H ₆₉ O ₆	-0,39	12	cluster de ácido anacárdico	+	+	+	+	+	+	+	+
719,52598		C ₄₆ H ₇₁ O ₆	-0,40	11	cluster de ácido anacárdico	+	+	+	+	+	+	+	+
721,54169		C ₄₆ H ₇₃ O ₆	-0,42	10	cluster de ácido anacárdico	+	+	+	+	+	+	+	+
741,51039		C ₄₈ H ₆₉ O ₆	-0,48	14	cluster de ácido anacárdico	+	+	+	+	+	+	+	+
743,52594		C ₄₈ H ₇₁ O ₆	-0,37	13	cluster de ácido anacárdico	+	+	+	+	+	+	+	+
745,54150		C ₄₈ H ₇₃ O ₆	-0,34	12	cluster de ácido anacárdico	+	+	+	+	+	+	+	+
747,55731		C ₄₈ H ₇₅ O ₆	-0,43	11	cluster de ácido anacárdico	+	+	+	+	+	+	+	+
827,62046		C ₅₄ H ₈₃ O ₆	-1,14	13	cluster de ácido anacárdico	+	+	+	+	+	+	+	+
907,68227	453,33836	C ₆₀ H ₉₁ O ₆	-0,18	15	cluster de ácido morônico	+	+	+	+	+	+	-	-
909,69788		C ₆₀ H ₉₃ O ₆	-0,13	14	cluster de schinol	+	+	+	+	+	+	-	-

^aNúmero de insaturações e anéis (*double bound equivalent*); (+) substâncias presentes; (-) substâncias ausentes.

Diversos trabalhos evidenciam que *Schinus terebinthifolia* (aroeira) exibe uma variedade de compostos fenólicos. Estes compostos são os mais abundantes, sendo sintetizados principalmente pelas vias de ácido chiquímico, pentose fosfato e fenilpropanóide, que originam mais de 8.000 compostos (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ; BAQUERO; LARROATA, 2019).

As análises de ESI (-) FT-ICR MS revelaram que o ácido gálico e seus derivados foram identificados nos extratos de frutos e folhas de *S. terebinthifolia*. O íon da molécula desprotonada m/z 169, seu aduto clorado (m/z 204), seus dímeros de m/z 321, m/z 349 e $[2M-H]^-$ de m/z 339 confirmaram a presença desta substância. Em relação aos seus derivados, o íon m/z 197 sugere a presença de galato de etila, além de seu aduto com cloreto m/z 233. Os sinais em m/z 367 e m/z 395 estão relacionados aos dímeros $[2M-H]^-$ de galato de metila e galato de etila, respectivamente. Os dímeros $[2M-H]^-$ de m/z 339, m/z 367 e m/z 395, de derivados do ácido gálico, foram identificados principalmente nos extratos de folhas (T1F e T6F).

Os trabalhos realizados por Glória et al. (2017), Bernardes (2014) e Santana et al. (2012), utilizando HPLC e Ressonância Magnética Nuclear (RMN), e Gomes et al. (2019), usando ESI (-) FT-ICR MS, também identificaram o ácido gálico e seus derivados em órgãos de *S. terebinthifolia*. Os estudos de Rauf et al. (2017) e de Erşan et al. (2016), indicaram a presença do ácido gálico e de seus derivados em *Pistacia* sp., gênero pertencente à família Anacardiaceae.

Nos extratos foliares de aroeira (T1F e T6F) foram identificados o ácido chiquímico m/z 173, seu aduto com cloreto (m/z 209) e seu dímero $[2M-H]^-$ (m/z 347). A presença do íon m/z 325 foi verificado em todos os espectros analisados, indicando a possível formação do ácido galoilchiquímico. Em alguns extratos, a presença do dímero m/z 477 evidencia possivelmente a produção do ácido digaloilchiquímico.

Na pesquisa realizada por Alves (2016), a análise dos extratos hexânicos de folhas de *Anacardium occidentale* L. (caju), via Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (UPLC/MS), indicou a presença de ácido chiquímico e de seus derivados. Na investigação feita por Abu-Reidah et al. (2015), utilizando HPLC/MS, foi verificado que nos extratos metanólicos de frutos de *Rhus coriaria* L. (sumagre) estavam presentes alguns derivados do ácido chiquímico. As duas espécies utilizadas nos estudos acima pertencem à família Anacardiaceae.

Ésteres de ácidos graxos e seus derivados foram identificados nos extratos de frutos de *S. terebinthifolia* analisados: o ácido linoleico (m/z 279) e seu aduto com

cloro (m/z 315), o aduto de ácido oleico com cloro (m/z 317) e o íon de m/z 399, que denota a presença do ácido láurico.

No trabalho de Barbosa et al. (2007), foi constatado que teor de óleo nos frutos de aroeira é maior no estágio maduro que no verde, respectivamente, 4,65 e 3,98% de óleo, e que o teor de óleo nas folhas é baixo, entre 0,45 - 0,69%, dependendo do período do ano e do ciclo reprodutivo da planta. Essa informação é ratificada por Schimitberger et al. (2018), que destacam que “a diversidade química do óleo essencial de *S. terebinthifolia* é maior nos frutos maduros que nos frutos verdes”.

Comparando duas espécies do gênero *Schinus*, Tlili et al. (2018), verificaram que *S. terebinthifolius* continha mais ácidos graxos saturados enquanto que *S. molle* L. (aroeira salsa), mostrava ter mais ácidos graxos insaturados e especialmente ácidos graxos poliinsaturados.

Em seu experimento Ennigrou et al. (2016), verificaram que, independente do estágio de maturação, os frutos de *S. terebinthifolius* apresentam em sua composição os ácidos oleico e linoleico. Uma constatação semelhante foi feita por Boudieb, Ait Slimane-Ait Kaki e Amellal-Chibane (2019), que ao analisarem os extratos metanólicos de frutos de *Pistacia lentiscus* L. (lentisco), em diferentes estágios de maturação, verificaram que esses dois ácidos, oleico e linoleico, também estavam presentes em suas composições.

Alguns açúcares foram identificados nas amostras, como: a glicose (m/z 179) e seu aduto clorado (m/z 215), e um dissacarídeo (m/z 341) e seu aduto com cloro (m/z 377). O íon m/z 331, um aduto do íon m/z 179, foi verificado em todos os extratos analisados. A presença do íon m/z 367, indicou a possível formação do galoilglicose/Cl. Vale ressaltar que, o extrato T2 foi único que indicou conter todos os açúcares acima relatados.

A presença de açúcares, assim como a de outros compostos aqui identificados, é pouco descrita em análises espectrométricas realizadas com material oriundo de *S. terebinthifolia*. Somente Gomes et al. (2019), Bernardes (2014) e Silva et al. (2017) indicaram que em suas análises foram verificadas a presença de açúcares e/ou de seus derivados, em aroeira.

Avaliando os diferentes estágios de maturação dos frutos de *Mangifera indica* L. (manga Ubá), espécie pertencente à família Anacardiaceae, Oliveira et al. (2016) constataram que houve maior presença de íons de açúcares, identificados como

glicose, sacarose e seus derivados, nos estádios de maturação mais tardios do fruto, quando eles apresentam polpa amarelada.

Uma diversidade de flavonoides foi verificada nos extratos de aroeira analisados. Os íons m/z 285, 301, 317, 397, 463, 537, 539 e 541 indicaram a presença de luteolina, quercetina, miricetina, lanneaflavonol, miricitrina, robustaflavona, rhusflavona e rhusflavanona, em ordem. Os sinais do adutos clorado de miricitrina (m/z 499) e de rhusflavanona (m/z 577) também foram identificados em alguns dos extratos analisados.

Várias pesquisas realizadas com *Schinus terebinthifolia* confirmaram a presença de flavonoides na espécie. Silva et al. (2017), constataram que nas folhas de aroeira estavam presentes a robustaflavona, a quercetina e a luteolina. Fedel-Miyasato (2014), utilizando HPLC, atestaram a presença de quercetina, luteolina e apigenina em extratos metanólicos foliares de *Schinus terebinthifolia*.

Em extratos de raízes de *Lannea alata* (Engl.), produzidos com acetato de etila e n-hexano, foram identificadas as presenças de lanneaflavonol e miricitrina (OKOTH; CHENIA; KOORBANALLY, 2013). As análises realizadas por Rauf et al. (2017) indicaram a presença de luteolina e derivados de miricetina em espécies do gênero *Pistacia*. Nas análises cromatográficas (HPLC e RMN) feitas por Shrestha et al. (2012) com extratos metanólicos de frutos de *Rhus parviflora* (Roxb.) foram verificadas as presenças de rhusflavona e rhusflavanona. Fatos que demonstram a recorrente ocorrência desses metabólitos em plantas da família Anacardiaceae.

Apesar da molécula desprotonada de ácido quínico não ter sido identificada nas análises de ESI (-) FT-ICR MS, dois derivados desse composto, o hexosídeo do ácido quínico (m/z 353) e o ácido digaloilquínico (m/z 495), foram constatados nos extratos etanólicos de frutos e folhas de aroeira analisados nesse estudo.

Em *S. terebinthifolia* a presença do ácido quínico foi relatado por Queires et al. (2006), que ao analisar as frações (aquosa e acetato de etila) produzidas com folhas de aroeira, encontraram este, sendo ele, um dos principais componentes das frações. O hexosídeo do ácido quínico foi verificado por Gomes et al. (2019) nos extratos etanólicos e hidroalcóolicos de resíduos da indústria de beneficiamento da aroeira.

O ácido quínico e seus derivados também foram identificados em outras espécies da família Anacardiaceae. Remila et al. (2015), constataram a presença do ácido digaloilquínico no extrato hidroalcóolico (95%) de folhas e frutos de *P. lentiscus*.

Castro (2016) verificou a presença do ácido quínico e de seus derivados nos extratos hexânicos produzidos com a parte aérea de *M. urundeuva* (aroeira do sertão).

Nos extratos analisados nesse estudo, os terpenos estão representados pelo ácido morônico (m/z 453), pelo seu aduto clorado (m/z 489) e seu dímero [2M-H]⁻ de m/z 907, pelo schinol (m/z 455) e seu dímero [2M-H]⁻ de m/z 909, e por triterpenos glicosídeos (m/z 549, 551, 553 e 633).

A presença de triterpenóides em *S. terebinthifolia* foi confirmada por Gomes et al. (2019) e Silva et al. (2017), que em trabalhos utilizando extratos produzidos com resíduos dos frutos e folhas de aroeira, respectivamente, verificam a presença dos triterpenos ácido morônico, schinol e outros diferentes tipos de triterpenos.

Esses resultados estão de acordo com Gehrker (2012), que ao analisar, via ESI e RMN, o extrato n-hexânico de folhas de *S. lentiscifolius* March (aroeira do campo), espécie pertencente ao gênero *Schinus*, verificou a presença do triterpenóide ácido morônico. A autora também enfatiza que “a presença do ácido morônico em espécies do gênero *Schinus* é pouco verificada, mas é comum no gênero *Rhus*, também pertencente à família Anacardiaceae”. Ferraz (2015), utilizando as mesmas técnicas, verificou a presença de ácido morônico nos extratos hexânicos e no óleo essencial das cascas de *S. lentiscifolius*.

A ocorrência de schinol em *Pistacia* sp. foi confirmada por Sarkhail (2019), que ao analisar o extrato metanólico produzido com *P. vera*, utilizando espectrometria de massas (MS) e RMN, identificou nos frutos esse composto. Rauf et al. (2017), também evidencia a ocorrência de schinol em folhas de *Pistacia terebinthus* (terebinto).

As análises iniciais realizadas por ESI (-) FT-ICR MS sugeriram a presença dos ácidos anacárdicos por meio dos íons m/z 319, 343, 345, 347, 369, 371, 373 e 375 e de seus dímeros [2M-H]⁻ de m/z 691, 693, 713, 715, 717, 719, 721, 741, 743, 745, 747 e 827. Em alguns espectros de extratos de frutos foi verificada a presença do cardanol (m/z 327) e do seu aduto clorado (m/z 337). Também foram evidenciados os íons m/z 499, 525 e 527, indicando a possível formação de dímeros do 2-metil-cardol.

A literatura descreve os ácidos anacárdicos como um grupo de lipídios fenólicos muito relatados em estudos espectrométricos com membros da família Anacardiaceae, principalmente nos gêneros *Pistacia*, *Anacardium* e *Myracrodruon*. No entanto, nenhuma referência indicou a apresentação desses compostos em plantas do gênero *Schinus*.

Na pesquisa realizada por Erşan et al. (2016), os extratos metanólicos produzidos com cascas de *Pistacia vera* L. (pistache), submetidos à sonificação e analisados por HPLC-ESI-MS indicaram a presença de onze tipos de ácidos anacárdicos, com diferentes tamanhos de cadeias alquílicas e graus de saturação.

As pesquisas realizadas por Baptista (2018), Kumar et al. (2018), Mattison et al. (2018), Morais et al. (2017) com plantas de *Anacardium occidentale* L. (caju) evidenciam a presença dos ácidos anacárdicos e de seus derivados principalmente nas cascas das castanhas, local onde é produzido o Líquido da Castanha do Caju (LCC), um resíduo da indústria de beneficiamento da fruta. No entanto, Alves (2016) utilizando UPLC-MS/MS, também verificou a presença desses compostos em extratos hexânicos de folhas desta espécie.

Ao analisar a parte aérea de *M. urundeuva*, Castro (2016) constatou que nos extratos etanólicos de galhos e folhas desta espécie, estavam presentes três tipos de ácidos anacárdicos, com diferentes comprimentos de cadeias alquílicas e graus de saturação.

Os ácidos anacárdicos de m/z 371 foram os sinais que apresentaram maior intensidade nos extratos T1, T3 e T5. Enquanto que, nos extratos T4 e T6 as maiores amplitudes de sinal foram verificadas para os íons m/z 373, também ácidos anacárdicos.

Diante das análises iniciais, que apontaram a presença dos ácidos anacárdicos e de seus derivados, estruturas mais complexas, nos extratos etanólicos de frutos e folhas de *Schinus terebinthifolia* (aroeiras), foi realizada uma nova avaliação dos materiais, com o emprego de outra técnica, a ESI (-) FT-ICR MS/MS. O MS/MS é utilizado para elucidar a presença de estruturas por meio da fragmentação dos íons formadores desses compostos.

As análises por MS/MS atestaram que os íons de m/z 371 e m/z 373 são de fato ácidos anacárdicos, pois durante a fragmentação eles foram descarboxilados, ou seja, perderam o CO₂ (figura 18). As mesmas análises confirmaram que as moléculas desprotonadas em m/z 513, 515, 517, 539, 541 e 543 são de ácidos anacárdicos galoilados, pois essas estruturas perdem a fração referente ao ácido gálico (m/z 169) e formam os fragmentos m/z 343, 345, 347, 369, 371 e 373, referentes aos ácidos anacárdicos. Já os íons m/z 566, 569 e 571 são de ácidos anacárdicos galoiletilados, pois liberam a molécula de galato de etila (m/z 197) e originam os ácidos anacárdicos de m/z 369, 371 e 373, respectivamente. Na figura 18 pode-se verificar os espectros

que ilustram o processo de fragmentação dos íons m/z 371, m/z 373, m/z 513 e m/z 567.

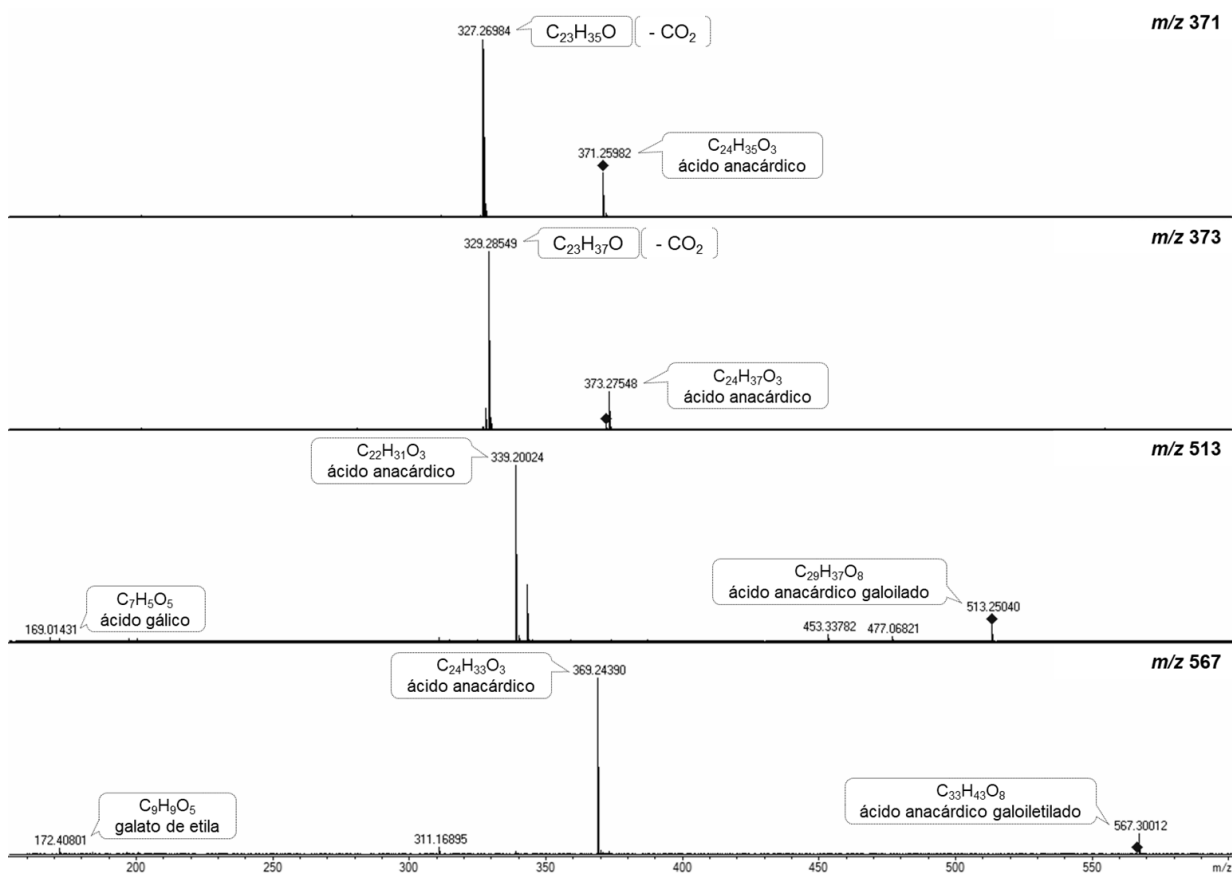


Figura 18 - Proposta de fragmentação dos íons m/z 371, m/z 373, m/z 513 e m/z 567 por ESI (-) FT-ICR MS/MS.

Apesar do emprego da técnica de MS/MS não ter conseguido realizar a fragmentação dos íons m/z 545 e 623, acredita-se que eles também sejam ácidos anacárdicos galoilados e galoiletilados, respectivamente. Nos extratos foliares, T1F e T6F, os íons m/z 569 foram os sinais que apresentaram maiores intensidades nas análises realizadas.

Em nosso estudo, a espectrometria de massas revelou que a composição fitoquímica dos extratos aqui avaliados é variável de acordo com o modo de adubação e o órgão vegetal analisado. Essas diferenças são percebidas tanto na análise dos espectros (figura 17), quanto no diagnóstico de presença ou de ausência dos compostos (tabela 4). Porém, é necessário verificar e confirmar essa variabilidade por meio de análises quimiométricas multivariadas, tal como a Análise de Componentes Principais (PCA).

Na figura 19 é apresentada a PCA realizada para confirmar a similaridade e/ou a diferença existente entre os extratos de frutos e folhas de *Schinus terebinthifolia* Raddi (aroeira) submetidas a diferentes tipos de adubação.

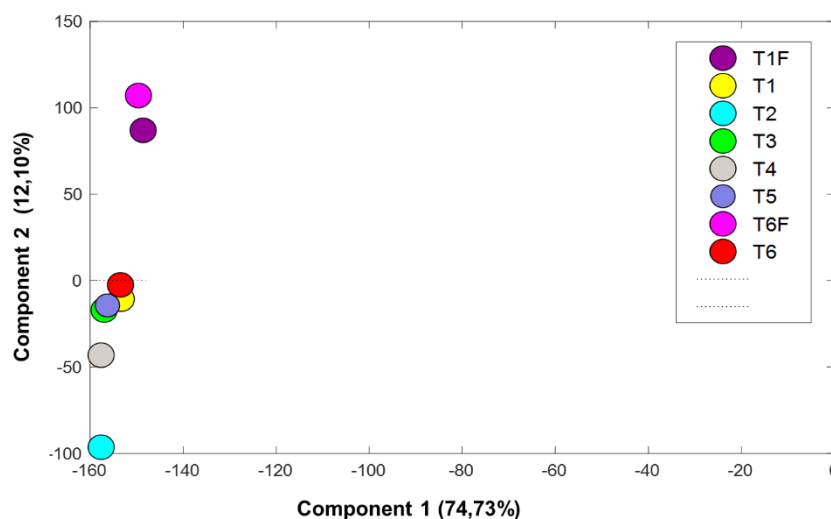


Figura 19 - Similaridade existente entre os extratos de folhas e de frutos de *S. teribinthifolia* Raddi verificada por meio da Análise de Componentes Principais (PCA).

Os dois componentes principais do gráfico explicam 86,83% da variância total existente entre as intensidades de sinais analisadas (presença da substância proposta). O componente 1 foi responsável por 74,73% da variação e o componente 2 por 12,10% da variância existente.

A análise indica que há similaridade muito grande entre os extratos T1F e T6F, podendo essa afinidade estar sendo exercida pela presença dos ácidos anarcárdicos galoiletilados (m/z 569).

Em relação aos extratos produzidos com frutos de aroeira, foi possível verificar que o agrupamento formado pelos extratos T1, T3, T5 e T6, é possivelmente influenciado pelos íons de ácidos anacárdicos (m/z 371 e m/z 373) e pelo seu dímero [2M-H]⁻ de m/z 745 (cluster de ácido anárdico). O extrato T4, apesar de estar próximo ao agrupamento formado pelos extratos T1, T3, T5 e T6, demonstra não apresentar forte semelhança a eles. Essa diferença pode estar sendo produzida pelo íon m/z 541 (ácido anacárdico galoilado). A dispersão exibida por T2 evidenciou que ele não é similar aos outros extratos analisados. Muito possivelmente, essa diferença se dá pela presença dos íons m/z 215 (glicose ou isômeros/Cl⁻) e m/z 489 (ácido morônico/Cl⁻).

Segundo Rosal et al. (2011), essas variações, qualitativas e quantitativas, ocorrem como uma resposta à aplicação de técnicas agrônomicas, como a adubação, as quais interferem na biossíntese dos metabólitos e na composição química das plantas cultivadas.

5.3 Teores de compostos fenólicos em extratos de *S. terebinthifolia* Raddi

Os compostos fenólicos têm sido intensamente estudados por apresentarem capacidade de combater o estresse oxidativo, uma vez que esse processo está ligado a vários distúrbios do metabolismo e a uma série de patologias (VUOLO et al., 2019).

Os resultados da análise química, dos teores totais de composto fenólicos (fenóis, flavonoides e taninos) contidos nos extratos de *S. terebinthifolia* são apresentados na tabela 5. A quantificação dos teores foi realizada a partir da curva de calibração dos padrões utilizados em cada um dos testes e expressos em mg.g^{-1} de equivalência ao padrão.

Tabela 5 - Concentração de compostos fenólicos nos extratos de frutos e folhas de aroeiras (*S. terebinthifolia* Raddi) submetidas a diferentes tipos de adubação.

Extratos	Fenóis (mg.g^{-1}) \pm EP	Flavonoides (mg.g^{-1}) \pm EP	Taninos (mg.g^{-1}) \pm EP
T1	81,98 ^c \pm 5,58	15,05 ^d \pm 2,57	44,88 ^{cd} \pm 5,51
T2	91,11 ^c \pm 8,33	11,43 ^d \pm 1,48	53,30 ^c \pm 4,53
T3	58,89 ^c \pm 10,02	21,05 ^d \pm 1,49	35,28 ^d \pm 3,92
T4	101,85 ^c \pm 21,29	15,90 ^d \pm 1,93	37,11 ^d \pm 2,02
T5	65,19 ^c \pm 6,79	59,71 ^{bc} \pm 3,08	31,11 ^d \pm 2,22
T6	59,14 ^c \pm 7,07	52,29 ^c \pm 8,01	42,17 ^{cd} \pm 1,64
T1F	249,63 ^a \pm 7,92	81,48 ^a \pm 2,09	415,54 ^a \pm 0,30
T6F	165,04 ^b \pm 3,41	69,63 ^{ab} \pm 1,71	352,03 ^b \pm 0,61

Os valores estão expressos em média \pm EP (n=3); EP: Erro Padrão; ^{a-d}Letras distintas indicam diferença estatística entre os tratamentos, ANOVA, Teste Tukey ($p < 0,05$). Padrões: Fenóis = ácido gálico; Flavonoides = rutina; Taninos = ácido tânico.

Os extratos T1F ($249,63 \pm 7,92 \text{ mg.g}^{-1}$) e T6F ($165,04 \pm 3,41 \text{ mg.g}^{-1}$) exibiram os maiores teores de fenóis totais quando comparados aos outros extratos avaliados. Eles também tiveram destaque na análise realizada para mensurar o conteúdo de

flavonoides, com concentração de $81,48 \pm 2,09 \text{ mg.g}^{-1}$, para T1F, e $69,63 \pm 2,09 \text{ mg.g}^{-1}$, para T6F. Na quantificação do teor de taninos totais, os extratos produzidos com material foliar, T1F e T6F, novamente foram os que exibiram maior concentração de taninos, com $415,54 \pm 0,30 \text{ mg.g}^{-1}$ e $352,03 \pm 0,61 \text{ mg.g}^{-1}$, respectivamente. Nenhum dos extratos produzidos com frutos de aroeira apresentou, estatisticamente, valores de teores similares aos dos frutos nos três testes realizados.

Ao avaliarem os teores de compostos fenólicos de aroeira Tlili et al. (2018) evidenciaram que os frutos dessa espécie são ricos em compostos bioativos e analisando o extrato metanólico dos frutos, verificaram que eles possuíam concentrações de fenóis ($35,23 \pm 1,25 \text{ mg GAE/g}$), de flavonoides ($39,05 \pm 1,23 \text{ mg QE/g}$) e de taninos ($7,32 \pm 0,10 \text{ mg CE/g}$).

Ennigrou et al. (2016) afirmam que os teores de compostos fenólicos podem variar nos diversos estágios de maturação do fruto de *S. terebinthifolia*. Maiores teores de fenóis foram verificados no estágio maduro (260 mg GAE/g) e os flavonoides apresentaram maiores índices no estágio intermediário ($7,0 \text{ mg QE/g}$).

Em estudo mais recente, Rocha et al. (2019) verificaram que as raízes, caules e folhas de aroeira possuíam teores de compostos bem distintos, tendo as folhas maior quantidade de fenóis ($446,48 \pm 28,93 \text{ mg GAE/g}$) e flavonoides ($57,78 \pm 3,79 \text{ mg QE/g}$). Apesar de o estudo citado apresentar valores de fenóis maiores que os encontrados em nossa pesquisa, eles evidenciam que as folhas são os órgãos de maior produção de compostos fenólicos em *Schinus terebinthifolia* (aroeira). Tais resultados de teores de compostos fenólicos corroboram com os resultados obtidos nessa pesquisa.

As plantas aqui analisadas foram submetidas a diferentes tipos de adubação, logo espera-se que as respostas fisiológicas a essas nutrições sejam também diferenciadas, pois de acordo com Radušienė et al. (2019) a síntese e o acúmulo de metabólitos secundários nas plantas são altamente influenciados por vários fatores ambientais bióticos e abióticos, como patógenos, herbívoros, luz, altitude, temperatura, irrigação, fertilidade e salinidade do solo.

Na matriz de correlação de Pearson (tabela 6), observa-se a presença de correlação entre diversos nutrientes e os teores de compostos fenólicos. Essas correlações, em linhas gerais, inferem que a presença desses nutrientes é essencial para a produção de substâncias bioativas capazes de combater o estresse oxidativo.

Tabela 6 – Matriz de Correlação de Pearson entre teores de compostos fenólicos e os teores de nutrientes contidos nas folhas e frutos de *S. terebinthifolia* Raddi submetidas a diferentes tipos de adubação.

	TPC	TFC	TTC	N	P	K	Ca	Mg	S	Fe	Zn	Cu	Mn	B
TPC	1													
TFC	0,602	1												
TTC	0,926	0,745	1											
N	0,515	0,171	0,301	1										
P	-0,784	-0,734	-0,857	-0,209	1									
K	-0,699	-0,699	-0,807	0,050	0,883	1								
Ca	0,835	0,718	0,942	0,214	-0,774	-0,754	1							
Mg	0,866	0,774	0,936	0,371	-0,807	-0,770	0,969	1						
S	0,032	0,293	0,298	-0,514	-0,262	-0,275	0,501	0,365	1					
Fe	-0,608	-0,832	-0,695	-0,145	0,905	0,803	-0,639	-0,719	-0,278	1				
Zn	0,258	0,327	0,490	-0,471	-0,471	-0,553	0,670	0,524	0,884	-0,352	1			
Cu	-0,819	-0,807	-0,912	-0,109	0,946	0,912	-0,817	-0,824	-0,280	0,876	-0,469	1		
Mn	0,305	0,359	0,556	-0,424	-0,381	-0,448	0,698	0,527	0,881	-0,235	0,926	-0,454	1	
B	0,588	0,561	0,763	-0,096	-0,505	-0,581	0,907	0,799	0,718	-0,383	0,819	-0,606	0,891	1

Correlação realizada a nível de significância $\alpha= 0,05$. TPC (Conteúdo total de fenóis); TFC (Conteúdo total de flavonoides); TTC (Conteúdo total de taninos); N (nitrogênio); P (fósforo); K (potássio); Ca (cálcio); Mg (magnésio); S (enxofre); Fe (ferro); Zn (zinco); Cu (cobre); Mn (manganês); B (boro).

É possível verificar que o nitrogênio (N) apresenta uma correlação fraca com os compostos fenólicos analisados (TPC, TFC e TTC). De acordo com Gobbo-Neto e Lopes (2007) isso pode ocorrer devido ao fornecimento abundante de nitrogênio, que afeta negativamente a produção de metabólitos fenólicos.

Na tabela 3 podemos verificar que os teores de fósforo (P) e potássio (K) dos órgãos avaliados (folhas e frutos) estão próximos do limite mínimo indicado como necessário ao ótimo metabolismo das plantas superiores. Na matriz de Correlação de Pearson (tabela 6) tais conteúdos apresentaram correlação forte negativa com a produção de compostos fenólicos (fenóis, flavonoides e taninos). Isso evidencia que quanto menos P e K maior a produção de compostos fenólicos em *S. terebinthifolia*.

A deficiência em potássio (K) pode desregular diversos processos metabólicos das plantas, pois ele é requerido por enzimas que participam de reações da fotossíntese, da respiração, da síntese de amidos, proteínas e ligninas (SALISBURY; ROSS, 2012). Segundo Dias et al. (2015) a maior produção de compostos fenólicos e antioxidantes ocorre como forma de defesa dos vegetais a condições que favoreçam o aumento de radicais livres oriundos do metabolismo celular.

Os nutrientes cálcio (Ca), magnésio (Mg) e boro (B) apresentaram correlação positiva com os teores de compostos fenólicos (TPC, TFC e TTC), demonstrando que quanto maior o teor desses nutrientes maior será a presença de fenólicos nas plantas de *Schinus terebinthifolia* (aroeira).

De acordo com Marengo e Lopes (2009), essa correlação positiva se deve ao fato desses nutrientes atuarem em processos essenciais ao metabolismo vegetal. O cálcio e o magnésio, por exemplo, atuam na ativação de enzimas importantes à produção de energia, as ATPases, enquanto que o B atua na atividade da NADH oxidase, enzima envolvida na produção de ascorbato.

5.4 Atividade antioxidante de extratos de *S. terebinthifolia* (aroeira)

A atividade antioxidante dos extratos vegetais se deve principalmente à presença de compostos fenólicos, flavonoides, taninos, ácidos fenólicos e cumarinas, que em sinergismo, aditividade ou antagonismo apresentam ação em baixas concentrações, que atrasam ou previnem de forma significativa a oxidação (DIAS et al., 2015; ROMANI et al., 2018).

Na tabela 7 são apresentados os resultados das análises de atividades antioxidantes dos extratos de frutos e folhas de aroeiras (*S. terebinthifolia* Raddi) mensuradas por meio de quatro diferentes ensaios *in vitro*: ABTS, DPPH, FRAP e Quelação do Fe⁺². Os valores das análises são representados em IC₅₀ e comparados às atividades dos padrões utilizados em cada teste.

Tabela 7 - Atividade antioxidante de extratos de frutos e folhas de aroeiras (*S. terebinthifolia* Raddi) submetidas a diferentes tipos de adubação e mensuradas por diferentes métodos (ABTS, DPPH, FRAP e Quelação do Fe⁺²).

Extratos	ABTS	DPPH	FRAP	Quelação do Fe ⁺²
	IC ₅₀ (µg.mL ⁻¹) ± EP	IC ₅₀ (µg.mL ⁻¹) ± EP	IC ₅₀ (µg.mL ⁻¹) ± EP	IC ₅₀ (µg.mL ⁻¹) ± EP
T1	109,30 ^{de} ± 2,07	196,97 ^b ± 21,52	411,90 ^a ± 19,55	209,97 ^{ab} ± 16,51
T2	98,99 ^e ± 5,70	154,03 ^b ± 2,15	358,13 ^a ± 4,42	259,23 ^a ± 9,52
T3	151,77 ^{ab} ± 3,18	253,87 ^a ± 15,58	362,80 ^a ± 22,14	34,13 ^{ef} ± 9,89
T4	139,83 ^{bc} ± 11,81	196,30 ^b ± 2,85	409,73 ^a ± 13,54	83,37 ^d ± 14,04
T5	169,27 ^a ± 3,71	256,13 ^a ± 4,86	401,57 ^a ± 30,30	8,41 ^f ± 3,86
T6	125,50 ^{cd} ± 6,20	181,43 ^b ± 8,42	406,93 ^a ± 15,67	156,30 ^c ± 6,84
T1F	25,68 ^{fg} ± 0,12	24,80 ^c ± 2,26	391,20 ^a ± 2,67	162,50 ^c ± 9,94
T6F	32,46 ^f ± 1,86	41,43 ^c ± 0,39	399,97 ^a ± 6,38	72,13 ^{de} ± 2,42
Padrões				
Ácido ascórbico	15,86 ^{fg} ± 1,08	11,44 ^c ± 0,46	- ± -	7,85 ^f ± 1,57
Ácido gálico	6,60 ^g ± 0,43	- ± -	101,97 ^b ± 0,55	8,06 ^f ± 0,99
EDTA	- ± -	- ± -	- ± -	7,31 ^f ± 0,07
Rutina	- ± -	28,32 ^c ± 0,62	- ± -	- ± -
Sulfato ferroso	- ± -	- ± -	434,17 ^a ± 16,96	- ± -
Trolox	23,97 ^{fg} ± 1,95	28,63 ^c ± 0,53	384,83 ^a ± 2,09	- ± -

Os valores estão expressos em média ± EP (n=3); EP: Erro Padrão; ^{a-g}Letras distintas indicam diferença estatística entre os tratamentos, ANOVA, Teste Tukey (p < 0,05).

No teste do ABTS podemos verificar que os extratos T1F (IC₅₀ = 25,68 ± 0,12 µg.mL⁻¹) e T6F (IC₅₀ = 32,46 ± 1,86 µg.mL⁻¹) produzidos com folhas de aroeira, apresentaram atividades antioxidantes estatisticamente semelhantes aos padrões utilizados no teste. Os valores de IC₅₀ dos extratos produzidos com frutos não foram similares às dos padrões, mas mostraram-se ser efetivos na atividade antioxidante.

No ensaio do radical livre DPPH foi verificado que os extratos foliares T1F (IC₅₀ = 24,80 ± 2,26 µg.mL⁻¹) e T6F (IC₅₀ = 41,43 ± 0,39 µg.mL⁻¹), assim como no ensaio do ABTS, demonstraram ter capacidade de capturar radicais livres igual à das substâncias utilizadas como padrão neste ensaio (ácido ascórbico, rutina e Trolox). O

T1F e T6F não apresentam diferença estatística em comparação aos padrões utilizados. Os demais extratos avaliados, extratos de frutos, não expuseram ação tão efetiva quanto os extratos de folhas, mas também possuem a capacidade de realizar o sequestro de radicais livres.

O teste do DPPH realizado por Tlili et al. (2018) com extratos metanólicos de frutos de *S. terebinthifolius* Raddi oriundos de duas regiões da Tunísia indicou que o material oriundo de Tunis ($IC_{50} = 182,48 \pm 2,48 \mu\text{g/mL}$) era efetivamente mais capaz de promover o sequestro dos radicais livres que o extrato originário da região de Gafsa (IC_{50} é de $202,74 \pm 3,78 \mu\text{g/mL}$).

No experimento de Brandão et al. (2017) foi verificado que as concentrações de extrato metanólico de frutos de aroeira necessárias para inibir em 50% os radicais livres DPPH e ABTS são de, $13,16 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$ e $8,66 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Em trabalho semelhante ao aqui apresentado, Uliana et al. (2016) verificaram que são necessários $15,43 \mu\text{g/mL}$ de extrato etanólico de folhas de aroeira para inibir a formação de 50% dos radicais livres DPPH. Índice similar ao encontrado por Silva et al. (2017) que ao avaliar o extrato metanólico de folhas de *S. terebinthifolius* Raddi pelo mesmo ensaio, verificou $IC_{50} = 12,32 \pm 1,50 \mu\text{g/mL}$ para a promoção dessa atividade. De acordo com Bendaoud et al. (2010) óleos essenciais de *S. terebinthifolius* Raddi exibiram forte atividade antioxidante ($IC_{50} = 24,1 \pm 0,8 \text{ mg/L}$) na eliminação de radicais livre no ensaio do ABTS.

Os valores de IC_{50} apresentados pelos autores acima referenciados são similares aos resultados verificados neste estudo e demonstram que os extratos de frutos e, principalmente, os extratos produzidos com folhas de aroeira possuem compostos químicos que podem estar ligados a atividade antioxidante aqui observada.

De acordo com Romani et al. (2018), no extrato da pimenta-rosa, frutos de *S. terebinthifolius*, foram identificados vários ácidos fenólicos que podem ser responsáveis pelas suas propriedades antioxidantes, sugerindo que eles têm um efeito importante nas propriedades ativas do extrato. Esses compostos, parte integrante do grupo dos compostos fenólicos, têm a capacidade de neutralizar radicais livres inibindo o risco de doenças cardiovasculares, diabetes, tumores e processos inflamatórios (SOARES et al., 2016).

Pelo que tudo indica, a presença dos compostos fenólicos nas amostras analisadas pode ter relação direta com a verificação da excelente atividade antioxidante verificada nos testes de captura dos radicais orgânicos, ABTS e DPPH, pois segundo Rufino et al. (2007 apud Halliwell, 1996) os efeitos defensivos de antioxidantes naturais em frutas e vegetais estão relacionados aos fenólicos como antioxidantes hidrofílicos e aos carotenoides como antioxidantes lipofílicos.

Os teores do último grupo de compostos citados acima, os carotenoides, não foram analisados neste trabalho, porém há vários relatos da sua presença em *S. terebinthifolius* Raddi (aroeira) e de sua ação na inibição da peroxidação lipídica. Silva et al. (2017) verificaram que o extrato metanólico de aroeira apresentou atividade antioxidante potente quando testada contra o sistema β -caroteno/ácido linoléico (AA% = $70,44 \pm 0,88$).

Por meio dos resultados do teste FRAP (tabela 7), podemos verificar que todos os extratos avaliados possuem potencial de reduzir íons férricos, pois não exibiram diferença do sulfato ferroso e do Trolox, dois dos três padrões utilizados. O ácido gálico não apresentou boa atividade, se comparado aos outros padrões, e demonstrou não ser uma referência segura, na concentração de 1 mg.mL^{-1} , a utilizar-se em testes que objetivam verificar a redução do íon Fe^{3+} . No teste FRAP, diferente dos outros testes, os valores mais elevados de IC_{50} indicam maior potencial da substância em reduzir íons férricos.

A atividade antioxidante medida por meio da quelação de íons de Fe^{+2} revelou que o extrato T5 ($\text{IC}_{50} = 8,41 \pm 3,86 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$), seguido pelo extrato T3 ($\text{IC}_{50} = 34,13 \pm 9,89 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$) e pelo extrato T6F ($\text{IC}_{50} = 72,13 \pm 2,42 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$) possui o maior poder de reduzir/inibir a formação de complexos ferrosos que os outros extratos avaliados. As atividades dos extratos T5 e T3 não diferiram estatisticamente dos padrões utilizados no teste.

Rocha et al. (2019) verificaram que os extratos metanólicos de folhas aroeira, apresentaram valores de $\text{IC}_{50} = 68,78 \pm 2,01 \text{ } \mu\text{g/mL}$, no teste FRAP, e de $\text{IC}_{50} = 95,30 \pm 3,64 \text{ } \mu\text{g/mL}$, na atividade de quelação de íons Fe^{+2} .

Ao avaliar a atividade antioxidante do extrato metanólico produzido com frutos maduros de *S. terebinthifolia* Raddi, Bernardes (2014) constatou que a concentração de extrato necessária para reduzir 50% de íons férricos é de $172,4 \pm 0,9 \text{ } \mu\text{M}$ de Trolox/mg.

Todos os extratos analisados no teste do FRAP são melhores que os evidenciados pelos autores acima citados. Os extratos T3, T4, T5 e T6F apresentam valor de IC₅₀ mais efetivos, no ensaio da quelação de íons Fe⁺², que os apresentados por Rocha et al. (2019).

A efetividade dos resultados apresentada nos testes que envolvem íons metálicos, principalmente o FRAP, provavelmente é devida aos teores de taninos presentes nos extratos aqui analisados, pois segundo Soares et al. (2016) os taninos possuem a propriedade de se complexar à íons metálicos, desempenhando assim, uma ótima função de antioxidante.

Utilizando testes fitoquímicos Pilatti et al. (2019) e Lima et al. (2017) verificaram que nas folhas e cascas de *Schinus terebinthifolia* Raddi (aroeira) estão presentes taninos, flavonoides, saponinas e esteroides. De acordo com Miranda et al. (2016) os taninos são um dos principais constituintes da casca de *S. terebinthifolius*, logo como estes estão em grande quantidade nesta droga vegetal são considerados como marcadores químicos.

Os antioxidantes presentes nos vegetais podem prevenir e/ou aliviar doenças relacionadas ao estresse oxidativo, retardando ou reduzindo esses danos, motivo pelo qual são considerados nutracêuticos (compostos presentes nos alimentos que são consumidos com o objetivo de prevenir ou tratar doenças) importantes à prevenção da peroxidação lipídica (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ; BAQUERO; LARROTA, 2019).

Bendaoud et al. (2010) afirma que o óleo essencial dos frutos de aroeira pode ser usado na indústria alimentícia como antioxidantes naturais ou como aromatizantes devido às suas propriedades químicas. No entanto, os resultados acima apresentados indicam que outros órgãos da aroeira, como por exemplo, as folhas, também podem ser utilizadas para esta finalidade, pois de acordo com Falcão et al. (2015) suas ações terapêuticas podem ser atribuídas aos variados polifenóis que estão distribuídos desigualmente em seus órgãos, como folhas, cascas, frutos, flores e sementes.

Na figura 20 é apresentada a Análise de Componentes Principais (PCA) realizada para determinar as diferenças existentes entre os tratamentos aqui analisados com base em seus perfis metabólicos (compostos fenólicos: fenóis, flavonoides e taninos) e atividades antioxidantes (ABTS, DPPH, FRAP e Quelação do Fe⁺²).

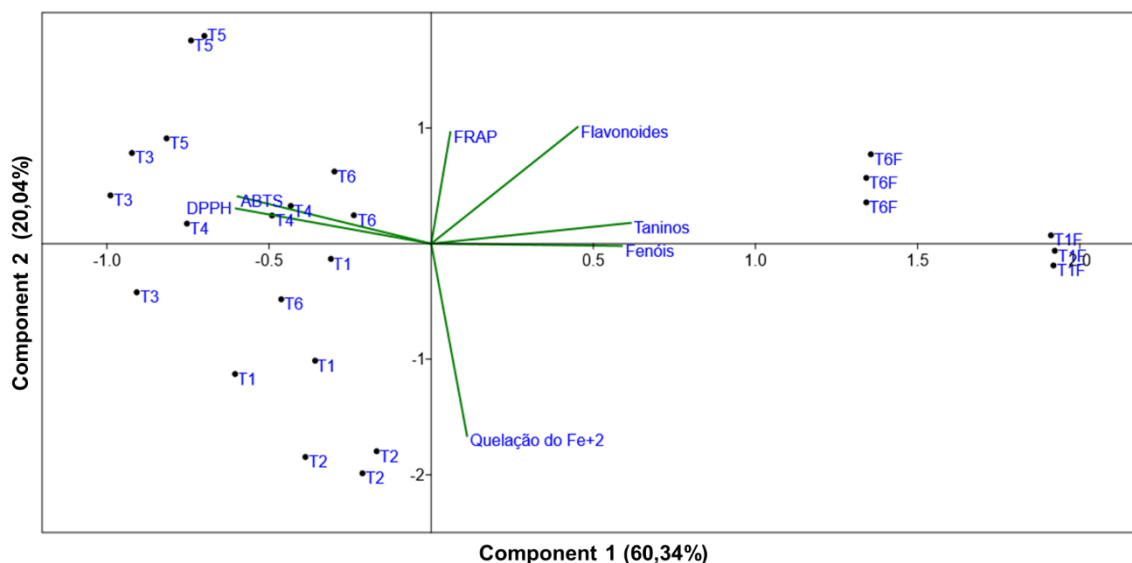


Figura 20 - Análise de Componentes Principais (PCA) dos teores de compostos fenólicos e testes antioxidantes de extratos de folhas e frutos de *S. teribinthifolia* Raddi.

Neste estudo dois componentes principais do gráfico explicam 80,38% da variância total existente entre os parâmetros analisados. O componente 1 foi responsável por 60,34% da variação e o componente 2 por 20,04% da variância existente. A análise dos dados indicou que os fenóis, flavonoides, taninos, FRAP e Quelação do Fe⁺² foram os parâmetros que contribuíram mais e positivamente para o componente 1, com grau de correlação satisfatório, enquanto que a correlação com o ABTS e o DPPH foi inversa. O componente 2 está relacionado principalmente entre o ABTS, DPPH e compostos fenólicos (fenóis, flavonoides e taninos).

A partir do gráfico observou-se que os extratos produzidos com folhas (T1F e T6F) apresentaram correlação positiva com a quantidade de fenóis, flavonoides e taninos e correlação negativa com o ABTS e DPPH o que indicou uma boa atividade antioxidante desses extratos.

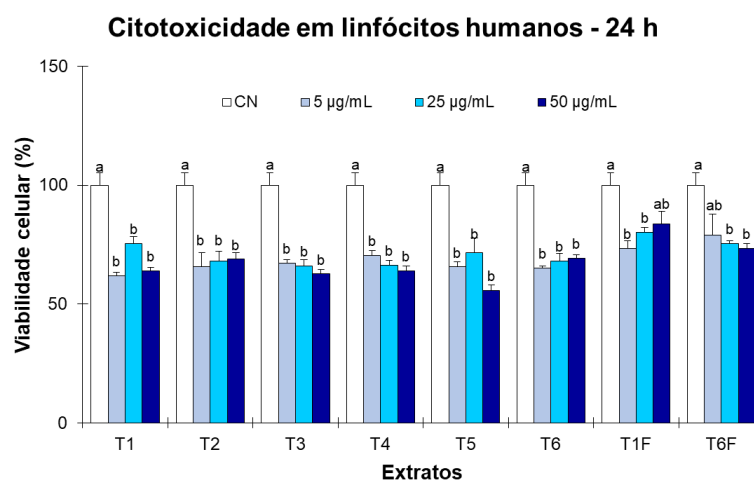
5.5 Ensaio de viabilidade celular *in vitro*

Os extratos produzidos com frutos e folhas de *Schinus terebinthifolia* Raddi (aroeiras) submetidas a diferentes tipos de adubação, foram testados *in vitro* quanto aos seus efeitos citotóxico e anticitotóxico, em linfócitos humanos, e antiproliferativo, em células de Sarcoma 180 (S-180), empregando o ensaio MTT.

5.5.1 Atividade citotóxica em linfócitos humanos

Os resultados de viabilidade celular analisados por meio do teste de citotoxicidade em linfócitos humanos estão representados na figura 21, para o tempo de 24 horas, e na figura 22, para o tempo de 48 horas.

Figura 21 - Percentual de células viáveis, linfócitos humanos, submetidas a diferentes concentrações de extratos de *S. terebinthifolia* em 24 horas.

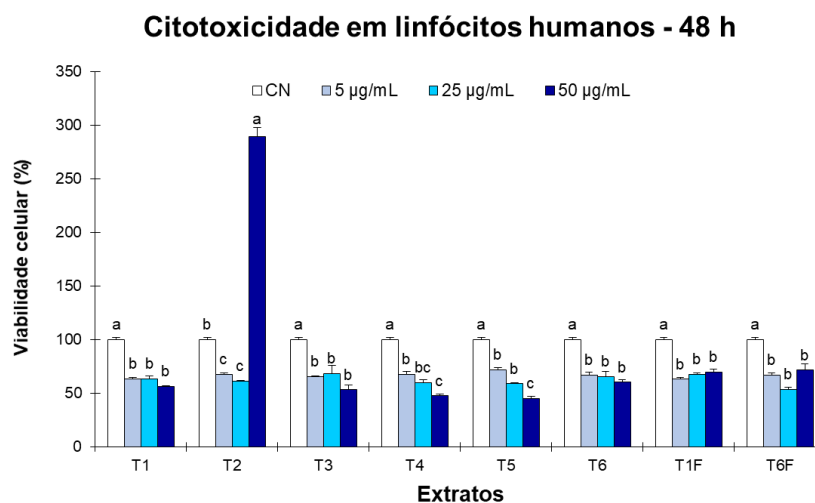


Os valores estão expressos em média \pm EP (n=3); EP: Erro Padrão; ^{a-b}Letras distintas indicam diferença estatística entre os tratamentos, ANOVA, Teste Tukey (p < 0,05).

As concentrações utilizadas (5; 25 e 50 µg/mL) demonstraram apresentar citotoxicidade já nas primeiras 24 horas de exposição das células aos extratos de *Schinus terebinthifolia* testados (figura 21). Nesse primeiro ciclo celular foi verificado que pelo menos 73% das células expostas aos extratos T1F e T6F permaneciam vivas, sendo as concentrações de 50 µg/mL, do extrato T1F, e 5 µg/mL, do extrato T6F, estatisticamente similares ao controle negativo (CN).

Após 48 horas de exposição, foi verificado que a tendência à citotoxicidade não se alterou na maioria dos extratos analisados, quando comparados ao tempo de 24 horas, ou seja, a porcentagem de células vivas se manteve próxima a 50% do total de células expostas (figura 22). Porém, a concentração de 50 µg/mL do extrato T2, diferente dos demais extratos, promoveu o crescimento celular com índice quase três vezes ao do exposto inicialmente (100%).

Figura 22 - Percentual de células viáveis, linfócitos humanos, submetidas a diferentes concentrações de extratos de *S. terebinthifolia* em 48 horas.



Os valores estão expressos em média \pm EP (n=3); EP: Erro Padrão; ^{a-c}Letras distintas indicam diferença estatística entre os tratamentos, ANOVA, Teste Tukey ($p < 0,05$).

Oliveira et al. (2018), ao testarem a citotoxicidade do óleo essencial, de extratos hexânico e de dicloro metano de frutos maduros de *Schinus terebinthifolia* em osteoblastos humanos, pelo mesmo método, verificaram que a viabilidade das células foi afetada pela presença dos extratos nas concentrações de 150, 250 e 450 µg/mL após 24 horas de exposição. Apesar de os extratos testados serem diferentes dos utilizados em nosso estudo, os resultados desses autores indicam que extratos de aroeira são capazes de promover a morte celular. Enquanto que o uso do óleo não determinou alterações nos níveis de viabilidade celular. Situação semelhante foi percebida por Duarte et al. (2018), que ao testarem o óleo essencial de *Schinus molle* (aroeira salsa), observaram maiores graus de citotoxicidade quando da utilização das concentrações de 30,07 e 42,07 µg/mL para linfócitos e macrófagos, respectivamente.

5.5.2 Atividade anticitotóxica em linfócitos humanos

Os dados referentes às avaliações anticitotóxicas realizadas com diferentes concentrações (5; 25 e 50 µg/mL) de extratos de *S. terebinthifolia* (aroeira) submetidas a diferentes tipos de adubação e verificadas por meio dos protocolos de pré, simultâneo e pós-tratamento são apresentados na tabela 8.

Tabela 8 - Viabilidade de linfócitos humanos (%) expostos a diferentes concentrações de extratos de *S. terebinthifolia* submetidas a diferentes tipos de adubação, por meio dos protocolos de pré, simultâneo e pós-tratamento.

Extratos	Concentrações	Pré-tratamento		Simultâneo		Pós-tratamento	
CN	-	100,0 ^b	± 5,61	100,0 ^a	± 3,32	100,0 ^a	± 7,25
CP	-	46,81 ^c	± 0,38	77,07 ^b	± 1,59	75,27 ^b	± 0,61
T1	5 µg/mL	47,25 ^c	± 1,16	79,94 ^{ab}	± 9,10	77,62 ^b	± 7,66
T2		47,03 ^c	± 1,44	72,61 ^b	± 2,21	70,32 ^b	± 2,55
T3		44,84 ^c	± 1,01	75,48 ^b	± 1,10	66,43 ^{bd}	± 1,87
T4		43,52 ^c	± 1,14	71,34 ^b	± 4,18	69,96 ^b	± 0,61
T5		47,47 ^c	± 0,66	74,04 ^b	± 3,03	69,96 ^b	± 1,06
T6		48,13 ^c	± 1,01	69,75 ^b	± 1,65	71,73 ^b	± 0,93
T1F		52,09 ^c	± 0,66	83,12 ^{ab}	± 2,21	75,97 ^{bc}	± 0,71
T6F		50,11 ^c	± 2,12	80,57 ^{ab}	± 2,49	80,92 ^a	± 8,31
T1	25 µg/mL	48,35 ^c	± 0,96	73,25 ^b	± 2,30	69,96 ^b	± 0,61
T2		45,93 ^c	± 0,88	74,52 ^b	± 2,53	72,44 ^b	± 3,59
T3		48,13 ^c	± 0,38	71,18 ^b	± 1,38	72,44 ^b	± 2,32
T4		47,69 ^c	± 4,51	76,11 ^b	± 3,87	71,38 ^b	± 3,02
T5		47,69 ^c	± 0,22	79,30 ^{ab}	± 2,21	67,84 ^b	± 1,22
T6		48,57 ^c	± 0,22	76,94 ^b	± 5,28	72,44 ^b	± 2,32
T1F		57,58 ^c	± 3,54	100,80 ^{ac}	± 5,79	82,33 ^{ad}	± 1,87
T6F		60,88 ^c	± 2,75	99,36 ^{ac}	± 7,23	86,93 ^a	± 3,18
T1	50 µg/mL	52,75 ^c	± 1,98	82,17 ^{ab}	± 2,21	76,68 ^{bc}	± 3,02
T2		191,2 ^a	± 18,47	77,39 ^b	± 2,21	71,38 ^b	± 4,08
T3		50,33 ^c	± 0,96	78,82 ^{ab}	± 0,28	71,73 ^b	± 2,47
T4		49,67 ^c	± 4,03	78,98 ^{ab}	± 5,74	74,91 ^{be}	± 1,54
T5		50,99 ^c	± 1,44	70,70 ^b	± 1,99	72,08 ^b	± 1,06
T6		56,04 ^c	± 2,38	87,90 ^{abc}	± 4,41	74,56 ^{be}	± 1,54
T1F		62,42 ^c	± 2,10	106,69 ^{ac}	± 4,18	94,70 ^{ac}	± 3,37
T6F		55,82 ^c	± 3,41	96,18 ^{abc}	± 4,59	92,93 ^{ae}	± 4,98

Os valores estão expressos em média ± EP (n=3); EP: Erro Padrão; ^{a-e}Letras distintas indicam diferença estatística entre os tratamentos, ANOVA, Teste Tukey (p < 0,05). CN (Controle Negativo); CP (Controle Positivo) utilização da cisplatina.

Após o protocolo de pré-tratamento foi observado que as células de linfócitos humanos submetidas à exposição do extrato T2 tiveram aumento da viabilidade celular, quando tratadas com a concentração de 50 µg/mL, e se comparadas aos CN e CP (cisplatina).

No tratamento simultâneo foi observada a redução dos danos induzidos pelo agente alquilante cisplatina em relação à viabilidade celular de linfócitos humanos, quando da exposição aos extratos de *S. terebinthifolia* Raddi, às concentrações de: 5

$\mu\text{g/mL}$, nos extratos T1, T1F e T6F; de 25 $\mu\text{g/mL}$, nos extratos T5, T1F e T6F e na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, para os extratos T6, T1F e T6F.

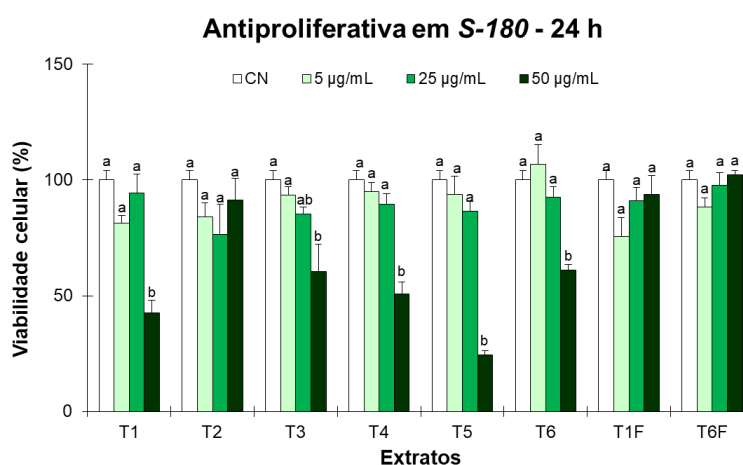
No pós-tratamento, os extratos T6F, nas doses de 5; 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$, e T1F, nas concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$, demonstraram ter capacidade de reduziu os danos induzidos pela cisplatina (CP).

Os resultados verificados nesse estudo são similares aos relatados por Fedel-Miyasato et al. (2014), que ao avaliarem as atividades quimiopreventivas do extrato metanólico produzido com folhas de *Schinus terebinthifolius* (aroeiras) verificaram que a maior taxa quimiopreventiva foi observada no protocolo de pós-tratamento, sendo este tratamento similar ao CN e eficaz na redução dos danos causados pelo agente alquilante ciclofosfamida.

5.5.3 Atividade antiproliferativa em Sarcoma 180

Os resultados da ação antiproliferativa exercidas pelos extratos de *Schinus terebinthifolia* e analisadas por meio do teste de toxicidade em células de Sarcoma 180 (S-180) estão representados na figura 23, para o tempo de 24 horas, e na figura 24, para o tempo de 48 horas.

Figura 23 - Porcentagem de células de S-180 vivas após serem expostas a diferentes concentrações de extratos de *S. terebinthifolia* em 24 horas

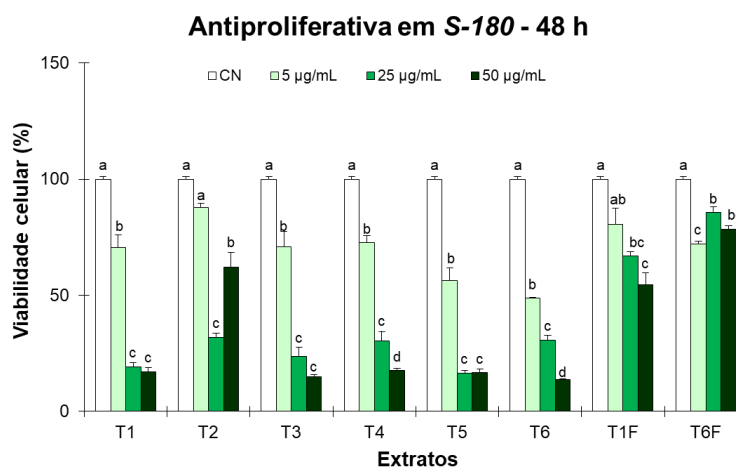


Os valores estão expressos em média \pm EP (n=3); EP: Erro Padrão; ^{a-b}Letras distintas indicam diferença estatística entre os tratamentos, ANOVA, Teste Tukey ($p < 0,05$).

A proliferação de células de *S-180* expostas aos extratos de *S. terebinthifolia* foi alta nas concentrações de 5 e 25 µg/mL, para todos os extratos testados, sendo o seu comportamento similar ao exposto pelo CN, e indicando que nessas concentrações os extratos utilizados não promovem a morte das células tumorais testadas, como pode ser verificado na figura 23. Entretanto, a concentração de 50 µg/mL dos extratos de T1, T3, T4, T5 e T6 afetou negativamente a multiplicação das células de *S-180*, sendo, em algumas concentrações, capazes de promover a morte de mais de 50% das células submetidas à exposição.

Após 48 horas de exposição das células de *S-180* aos extratos (figura 24), foi verificado que as concentrações de 25 e 50 µg/mL dos extratos T1, T3, T4, T5 e T6 promoveram uma ação antiproliferativa mais severa nas células testadas, se compararmos aos resultados das primeiras 24 horas de exposição (figura 23) todas com viabilidade celular abaixo de 50%. No extrato T2, a concentração de 25 µg/mL foi capaz de promover maior nível de inibição da multiplicação de células de Sarcoma 180, porém as concentrações de 5 e 50 µg/mL mantiveram a viabilidade celular (acima dos 60%). Os extratos produzidos com folhas (T1F e T6F), diferentemente do efeito exposto após 24 horas de exposição, foram eficazes em exibir uma ação antiproliferativa em células de *S-180*, uma vez todas as concentrações testadas diferiram do controle negativo (CN), com uma tendência dose-dependente, no caso do extrato T1F.

Figura 24 - Porcentagem de células de *S-180* vivas após serem expostas a diferentes concentrações de extratos de *S. terebinthifolia* em 48 horas.



Os valores estão expressos em média \pm EP (n=3); EP: Erro Padrão; ^{a-c}Letras distintas indicam diferença estatística entre os tratamentos, ANOVA, Teste Tukey (p < 0,05).

Os resultados obtidos nesta pesquisa corroboram os dados verificados por Ramos et al. (2019) que constataram que os extratos salinos produzidos com folhas de *S. terebinthifolia* foram capazes de inibir a viabilidade de células de S-180 em 24 horas, quando a concentração de 301,65 µg/mL foi testada.

Morais et al. (2017) testaram o extrato produzido com acetato de etila e frutos de *Schinus terebinthifolia* em diversas linhagens celulares e verificaram que no período de 24 horas são necessárias as concentrações de 78,3 mg/mL, > 200 mg/mL, 78,5 mg/mL, 71,3 mg/mL, 68,3 mg/mL, > 200 mg/mL e 98,3 mg/mL de extrato para inibir o crescimento de células causadoras do melanoma murino (B16F10-Nex 2), do melanoma humano (A2058), do glioblastoma (U87), do carcinoma do cólon (HCT), do câncer cervical (SiHa), de câncer de mama (SKBR-3) e do carcinoma cervical humano (*HeLa*), respectivamente.

No ensaio realizado por Bendaoud et al. (2010), com células de câncer de mama humano (MCF-7), o óleo essencial de *S. terebinthifolia* Raddi demonstrou ter ação citotóxica contra a linhagem testada após 48 horas de contato com as células e inibindo o crescimento celular na concentração de 47 ± 9 mg/L.

Em Caco-2, células de adenocarcinoma de cólon humano, o extrato diclorometânico produzido com frutos maduros de *S. terebinthifolia* Raddi promoveu redução da viabilidade celular quando foi submetida à presença do extrato na concentração de 150 µg/mL, o que o torna, segundo os autores, um candidato promissor ao tratamento do câncer (OLIVEIRA et al., 2018).

As atividades antiproliferativas, *in vitro*, apresentados por Silva et al. (2017) demonstram alta seletividade do extrato metanólico de folhas de *S. terebinthifolia* Raddi para linhagens de células tumorais causadoras dos cânceres de próstata (PC-3), ovário (OVCAR-3 e NCI-ADR / RES), mama (NCI / H460), glioma (U251) e mama (MCF-7) e para células não-tumorais *HaCat* (queratinócitos humanos), com concentrações que promovem inibição de 50% do crescimento celular de 6,3 g/mL, 6,5 g/mL, 7,6 g/mL, 9,1 g/mL, 9,4 g/mL e 8,1 g/mL, respectivamente.

A manutenção da taxa de células de Sarcoma 180 proporcionada pelas concentrações de 5 e 50 µg/mL do extrato T2 pode estar ligada a presença de uma maior quantidade de açúcares nesse extrato, constatada por meio da análise de espectrometria de massas. Essa possibilidade foi exposta inicialmente por Otto Warburg, em 1920, ao descobrir que mesmo na presença de oxigênio abundante,

células cancerosas preferem metabolizar a glicose pela glicólise, promovendo assim, o seu desenvolvimento (HSU; SABATINI, 2008).

Ao analisarem células cancerígenas de mamíferos (*HeLa*), Peeters et al. (2017) verificaram que em condições aeróbicas a alta proliferação das células cancerígenas estava ligada a maior taxa de atividade glicolítica, sendo esta regulada por genes ativadores. De acordo com Kowata et al. (2009), células tumorais tem como principal substrato energético a glicose, consumindo de 10 a 50 vezes mais em relação às células normais.

5.5.4 Índice de Seletividade

Em nosso estudo, os maiores níveis de citotoxicidade foram observados em células de Sarcoma 180. Essa afirmação pode ser reforçada a partir da análise dos valores de índice de seletividade (IS), tabela 9, que indicam a seletividade de determinada substância entre as células não neoplásicas e neoplásicas, obtido pela relação de valores de IC₅₀ destas linhagens celulares (BADISA et al., 2006). São considerados significativos os valores $\geq 2,0$, o que demonstra que as substâncias testadas são mais seletivas às células neoplásicas, no nosso caso, células de *S-180*.

Tabela 9 - Valores de IC₅₀ obtidos por meio do ensaio do MTT e Índice de Seletividade (IS) de diferentes extratos de *S. terebinthifolia* Raddi em relação às células de *S-180*, exposição em 24h e 48h.

Extratos	Linfócitos (24h) IC ₅₀ (µg/mL)	Linfócitos (48h) IC ₅₀ (µg/mL)	S-180 (24h) IC ₅₀ (µg/mL)	S-180 (48h) IC ₅₀ (µg/mL)	IS	
					24h	48h
T1	2,24	3,38	20,28	5,20	0,11	0,65
T2	2,24	35,61	3,79	7,64	0,59	4,66
T3	3,41	3,36	15,62	5,55	0,22	0,61
T4	3,57	4,00	25,71	5,83	0,14	0,69
T5	3,27	5,33	26,01	4,77	0,13	1,12
T6	2,24	3,41	25,64	3,81	0,09	0,90
T1F	2,25	2,23	10,81	4,52	0,21	0,49
T6F	3,57	3,90	84,75	2,25	0,04	1,74

No tempo de 24 horas, os valores do IS indicam a existência de uma baixa seletividade do efeito citotóxico mostrado pelos extratos. Porém, no período de 48 horas, o extrato de T2 não apresentou citotoxicidade às células de linfócitos humanos,

mas reduziu a viabilidade de células de S-180, o que o permitiu apresentar um IS de 4,66, indicando que possui maior afinidade em combater células neoplásicas, ou seja, é o extrato, entre os testados, que mais seletivamente combate células de S-180.

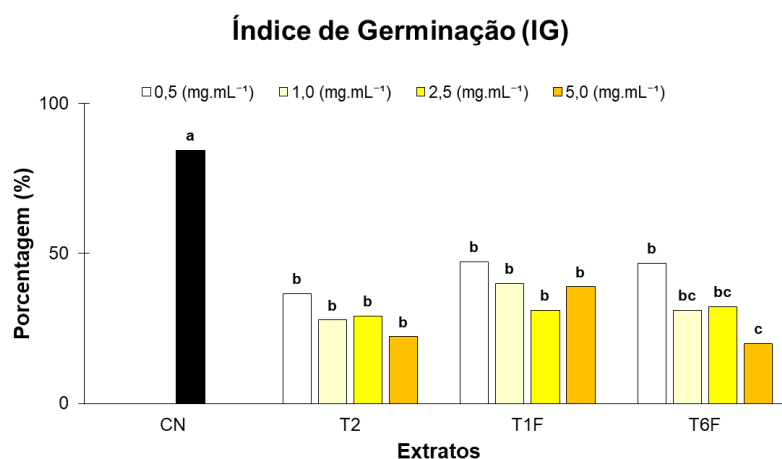
O estudo realizado por Rangel (2010) verificou que o extrato produzido com a madeira do caule de *Schinus terebinthifolia* tinha maior seletividade em combater macrófagos infectados com protozoários do gênero *Leishmania* que em combater fibroblastos NIH-3T3 sadios, com IS < 10, ação de combate similar ao verificado em nossa pesquisa.

5.6 Avaliação do potencial alelopático no sistema-teste *Allium cepa*

Os extratos T2, T1F e T6F de aroeira exibiram os melhores resultados nas análises químicas e atividades biológicas, e foram selecionados para avaliar o seu potencial alelopático por meio do sistema-teste *Allium cepa* (cebola).

Foi verificado que as concentrações utilizadas (0,5; 1,0; 2,5 e 5,0 mg.mL⁻¹), de todos os extratos aquosos avaliados neste ensaio, afetaram negativamente a germinação das sementes de *Allium cepa* (cv. Baia Periforme). O índice de germinação (IG) de todas as concentrações de extratos testados diferiram significativamente do controle negativo (CN), com taxas de germinação abaixo de 50% (figura 25).

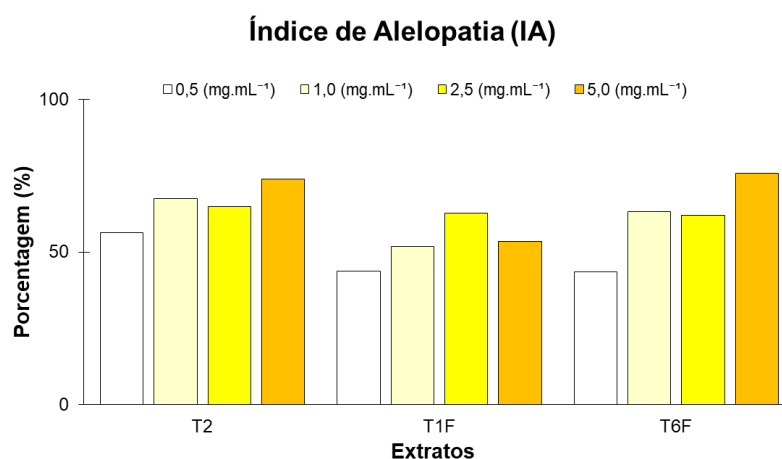
Figura 25 - Índice de germinação (IG) de *Allium cepa* L. tratado com diferentes concentrações de extratos de *S. terebinthifolia* (0,5; 1,0; 2,5 e 5,0 mg.mL⁻¹) e do controle negativo (CN).



Os valores estão expressos em média \pm EP (n=3); EP: Erro Padrão; ^{a-b}Letras distintas indicam diferença estatística entre os tratamentos, ANOVA, Teste Tukey (p < 0,05).

Quanto ao Índice de Alelopatia (IA), todas as concentrações testadas do extrato T2 e as concentrações de 1,0; 2,5 e 5,0 mg.mL⁻¹ dos extratos T1F e T6F demonstraram ter capacidade de interferir na germinação de sementes de cebola expostas a eles (figura 26). Os extratos utilizados podem ser considerados alelopáticos, pois inibiram a germinação de mais de 50% das sementes utilizadas no teste, e apresentaram uma relação dose-dependente, quanto maior a concentração, maior o efeito inibitório, em *Allium cepa* L. (cebola).

Figura 26 - Índice de alelopatia (IA) de *Allium cepa* L. tratado com diferentes concentrações de extratos etanólicos de *S. terebinthifolia* Raddi (aroeira) (0,5; 1,0; 2,5 e 5,0 mg.mL⁻¹).



Os valores estão expressos em média \pm EP (n=3); EP: Erro Padrão; ^{a-c}Letras distintas indicam diferença estatística entre os tratamentos, ANOVA, Teste Tukey (p < 0,05).

Os resultados encontrados nesse estudo corroboram os dados apresentados por Fonseca et al. (2016), que ao avaliarem a ação alelopática de extratos aquosos de folhas e flores de *S. terebinthifolius*, verificaram que eles possuem efeito alelopático, em altas concentrações, 50 e 100% (v/v), nas sementes de *Lactuca sativa* L., afetando tanto a germinação quanto o crescimento radicular.

Contudo, apesar de também confirmarem a ação inibitória de extratos aquosos de folhas e frutos de *Schinus terebinthifolius* frente à germinação de sementes de *L. sativa* L. (alface), Bündchen et al. (2015) afirmam que essa ação foi também verificada em tratamentos com menos concentração de extrato, à 20% (m/v). Dados também verificados no estudo aqui apresentado, pois até as menores concentrações (0,5 e 1,0

mg.mL⁻¹) também foram eficazes na inibição da germinação de sementes de *Allium cepa* L.

Ao testarem o potencial de extratos foliares de *Schinus terebinthifolia* Raddi na redução da germinação de plantas daninhas, Nunes et al. (2019) verificaram que os extratos aquosos e alcoólicos, nas concentrações de 1,0 e 1,5% (v/v), afetaram a germinação das sementes das diferentes plantas daninhas testadas: capim-massaral (*Sorghum halepense* (L.) Pers.), picão-preto (*Bidens pilosa* L.), amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla* L.), buva (*Conyza canadensis* (L.) Cronquist) e corda-de-viola (*Ipomoea nil* (L.) Roth). Em todas as espécies avaliadas, o extrato alcoólico a 1,5% (v/v), afetou mais acentuadamente o IG, confirmando ser um ótimo controlador de ervas-daninhas.

Embora o efeito inibitório do extrato aquoso de folhas de *Schinus terebinthifolius* seja comprovado frente às espécies mais sensíveis, o mesmo não foi verificado em relação a exótica *Leucaena leucocephala* (leucena), pois segundo Buturi et al. (2015), o extrato, a 10% (m/v), não foi capaz de inibir a germinação da espécie. Em contato com sementes de dedeieira (*Lafoesia pacari*) foi verificado que o extrato aquoso, a 10% (m/v), de folhas de aroeira estimulou a germinação e o crescimento inicial de plântulas (DIAS et al., 2010). Ou seja, as respostas fisiológicas exercidas pelos extratos de *S. terebinthifolius* dependem dos organismos testes a serem utilizados.

De acordo com Comiotto, Moraes e Lopes (2011), os efeitos alelopáticos são mediados por substâncias que pertencem a diferentes categorias de compostos secundários. Os produtos químicos mais comuns causadores de efeitos alelopáticos pertencem aos grupos dos ácidos fenólicos, cumarinas, terpenóides, flavonóides, alcalóides, glicosídeos, cianogênicos, derivados do ácido benzóico, taninos e quinonas complexas. Em *Schinus terebinthifolia* uma variedade de aleloquímicos são conhecidos, incluindo componentes de óleos essenciais, que tanto inibem a germinação de sementes, bem como o crescimento de plantas (BARBOSA et al., 2007).

Os dados de IVG, TMG, VMG, CRM e IVCR das sementes de *Allium cepa*, tratadas com quatro concentrações diferentes (0,5; 1,0; 2,5 e 5,0 mg.mL⁻¹) dos extratos T2, T1F e T6F de *S. terebinthifolia* Raddi (aroeira), são apresentados na tabela 10 e foram comparados, por meio de análises estatísticas, ao controle negativo (CN).

Tabela 10 - Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Tempo Médio de Germinação (TMG), Velocidade Média de Germinação (VMG), Crescimento Radicular Médio (CRM) e Índice de Velocidade de Crescimento Radicular (IVCR) de sementes de *Allium cepa* L. (cebola) tratadas com quatro concentrações de diferentes de extratos de *Schinus terebinthifolia* Raddi e Controle Negativo (CN).

Extratos	Concentrações (mg.mL ⁻¹)	IVG	TMG (dias)	VMG (dias ⁻¹)	CRM (cm)	IVCR
CN	-	6,48 ^a ± 0,50	4,34 ^{ab} ± 0,09	0,23 ^{ab} ± 0,00	0,99 ^a ± 0,10	1,29 ^a ± 0,12
T2		2,53 ^b ± 0,33	4,87 ^a ± 0,35	0,21 ^a ± 0,02	0,75 ^{ab} ± 0,10	1,02 ^a ± 0,16
T1F	0,5	3,13 ^b ± 0,26	5,01 ^a ± 0,30	0,20 ^a ± 0,01	0,68 ^{ab} ± 0,09	0,95 ^a ± 0,11
T6F		2,86 ^b ± 0,14	4,79 ^a ± 0,44	0,21 ^a ± 0,02	0,56 ^b ± 0,06	0,77 ^a ± 0,07
T2		2,03 ^b ± 0,35	4,61 ^a ± 0,13	0,22 ^b ± 0,01	0,66 ^{ab} ± 0,09	0,84 ^{ab} ± 0,11
T1F	1,0	3,17 ^b ± 0,63	3,99 ^b ± 0,15	0,25 ^a ± 0,01	0,61 ^{ab} ± 0,09	0,80 ^b ± 0,12
T6F		2,28 ^b ± 0,12	4,41 ^{ab} ± 0,14	0,23 ^{ab} ± 0,01	0,49 ^b ± 0,06	0,66 ^b ± 0,08
T2		1,95 ^b ± 0,16	4,76 ^a ± 0,19	0,21 ^a ± 0,01	0,43 ^b ± 0,06	0,57 ^b ± 0,07
T1F	2,5	2,24 ^b ± 0,20	4,49 ^a ± 0,15	0,22 ^a ± 0,01	0,37 ^b ± 0,02	0,51 ^b ± 0,03
T6F		2,27 ^b ± 0,33	4,58 ^a ± 0,21	0,22 ^a ± 0,01	0,37 ^b ± 0,01	0,51 ^b ± 0,02
T2		1,72 ^{bc} ± 0,30	4,26 ^a ± 0,46	0,24 ^a ± 0,02	0,32 ^b ± 0,05	0,44 ^b ± 0,07
T1F	5,0	3,18 ^b ± 0,34	3,96 ^a ± 0,14	0,25 ^a ± 0,01	0,43 ^b ± 0,03	0,59 ^b ± 0,04
T6F		1,24 ^c ± 0,26	4,97 ^a ± 0,99	0,22 ^a ± 0,06	0,29 ^b ± 0,11	0,42 ^b ± 0,15

Os valores estão expressos em média ± EP (n=3); EP: Erro Padrão; ^{a-c}Letras distintas indicam diferença estatística entre os tratamentos, ANOVA, Teste Tukey (p < 0,05).

Os dados de germinação comprovaram que houve diferença significativa entre o IVG dos tratamentos e do CN, isto significa que, os extratos afetaram a capacidade germinativa das sementes testadas, reafirmando seus efeitos alelopáticos. Porém, os extratos não foram capazes de interferir no TMG e na VMG das sementes de *Allium cepa* utilizadas, ou seja, as sementes que conseguiram germinar apresentaram parâmetros similares a do CN (tabela 10).

Resultado similar foi verificado por Nunes et al. (2019), pois quando as sementes de plantas daninhas foram submetidas a altas concentrações, 1,0 e 1,5% (v/v), de extratos de *Schinus terebinthifolia*, tiveram seus IVG diminuídos, ou seja, menos sementes germinaram por unidade de tempo. Segundo Bündchen et al. (2015) os extratos aquosos de aroeira, à 20% (m/v), foram fortemente inibitórios sobre IVG de sementes de alface, sugerindo que a espécie tem potencial para ser utilizada no controle de ervas daninhas na agricultura, em substituição aos herbicidas convencionais.

O índice de velocidade de germinação (IVG) é um parâmetro importante a ser analisado, pois sementes com maiores valores de IVG apresentam uma germinação rápida e uniforme, enquanto que o contrário denota a interferência de algum fator biótico e/ou abiótico, como os aleloquímicos, que podem estar diminuindo a capacidade germinativa das sementes analisadas e causando uma possível alelopatia (COSTALONGA, 2017; NUNES et al., 2019).

Em relação aos parâmetros relacionados ao crescimento radicular, o CRM e o IVCR: foram observadas diferenças significativas do CRM em todas as concentrações do extrato T6F e nas maiores concentrações (2,5 e 5,0 mg.mL⁻¹) dos extratos T2 e T1F; já as taxas do IVCR foi diminuída pelos extratos T1F e T6F nas concentrações de 1,0; 2,5 e 5,0 mg.mL⁻¹ e nas concentrações de 2,5 e 5,0 mg.mL⁻¹ pelo extrato T2, quando comparados ao controle negativo (CN). Verifica-se, então, que os extratos testados, principalmente em maiores concentrações 2,5 e 5,0 mg.mL⁻¹, afetam não só na germinação das sementes, mas também outros aspectos do desenvolvimento radicular de *Allium cepa* L., como pode ser observado na tabela 10.

No experimento realizado por Pawlowski et al. (2012) analisando a ação alelopática do óleo essencial de *S. terebinthifolius*, foi verificada redução do comprimento da raiz de alface e de cebola em mais de 80 e 83%, respectivamente, se comparadas ao controle. Os resultados apresentados por Fonseca et al. (2016), também evidenciam a inibição do crescimento radicular de plântulas de alface que foram expostas as concentrações mais altas, 50 e 100% (v/v), de extratos aquosos de aroeira (*S. terebinthifolia*).

De acordo com Sano (2015 apud Crawley, 1986) em plantas, a alelopatia geralmente afeta a germinação e o crescimento de plântulas, pois as espécies alelopáticas produzem e liberam metabólitos secundários que reduzem o desempenho e o estabelecimento das plântulas. Os compostos fenólicos presentes em *S. terebinthifolia* atuam como fitoquímicos protetores e contribuem para os efeitos alelopáticos apresentados pela espécie (FEUEREISEN et al., 2017). Dentre os compostos fenólicos, os taninos é um dos que apresentam potencial alelopático, uma vez que inibem a germinação de sementes, afetam a fixação de nitrogênio e limitam o crescimento das plantas (PILATTI et al., 2019).

Diante dos resultados analisados e das informações apresentadas a respeito do papel dos compostos fenólicos na ação alelopática exercida por *S. terebinthifolia* Raddi, foi produzida a matriz de correlação de Pearson (tabela 11). Essas correlações,

em linhas gerais, indicam se alguns dos parâmetros alelopáticos analisados (IG, IA, IVG, CRM e IVCR) são influenciados pelo conteúdo de compostos fenólicos presentes em cada um dos tratamentos analisados.

Tabela 11 – Matriz de Correlação de Pearson entre teores de compostos fenólicos e dados da avaliação do potencial alelopático.

	TPC	TFC	TTC	IG	IA	IVG	CRM	IVCR
TPC	1							
TFC	0,594	1						
TTC	0,489	0,935	1					
IG	0,450	0,650	0,493	1				
IA	-0,457	-0,647	-0,486	-0,933	1			
IVG	0,392	0,745	0,628	0,948	-0,889	1		
CRM	-0,632	-0,075	-0,142	0,159	-0,099	0,128	1	
IVCR	-0,552	0,029	-0,031	0,185	-0,114	0,144	0,986	1

TPC (Conteúdo total de fenóis); TFC (Conteúdo total de flavonoides); TTC (Conteúdo total de taninos); IG (Índice de germinação); IA (Índice de alelopatia); IVG (Índice de velocidade de germinação); CRM (Crescimento radicular médio); IVCR (Índice de velocidade de crescimento radicular). Correlação realizada a nível de significância $\alpha = 0,05$.

Podemos verificar que há uma correlação positiva, de fraca a moderada, entre os compostos fenólicos (TPC, TFC e TTC) e o Índice de germinação (IG). No entanto, há uma correlação negativa, de fraca a moderada, entre o índice de alelopatia (IA) e o conteúdo total de fenóis (TPC), de flavonoides (TFC) e de taninos (TTC), que indica que quanto menor a quantidade de compostos fenólicos menor será a alelopatia exercida pelas plantas. Informação reforçada pela análise de correlação existente entre o IA e IG, que constata a ideia de que quanto maior a quantidade de sementes germinadas, menor é o índice de alelopatia. Os compostos fenólicos, principalmente o conteúdo total de fenóis (TPC), influem negativamente no crescimento médio radicular (CRM) das plantas testadas (ver tabela 11).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise química do material vegetal de *S. teribinthifolia* Raddi revelou que a maioria das folhas analisadas apresentou pouco conteúdo de P, Fe, Cu, Zn e Mn. Somente o material foliar (T6F), das plantas nutridas com adubação orgânica, demonstrou ter quantidade de Zn maior que a considerada ideal ao seu desenvolvimento. As plantas nutridas com a adubação T5, que receberam doses suplementares de NPK, B e Zn, possuíam, em seus frutos, pouco conteúdo de P, Fe, Zn e Mn e elevado conteúdo de cobre, mas não em nível de toxidez. Além dos nutrientes já mencionados, as plantas que receberam essa nutrição (T5) também apresentaram pequenas taxas de N e Cu, nas amostras de suas folhas. As amostras de frutos das demais nutrições (T1, T2, T3, T4 e T6) apresentaram somente carência de Zn e Mn, mas com elevado conteúdo de cobre (Cu), assim como ocorrido com os frutos das plantas que receberam a adubação T5. Quando comparadas os frutos, as folhas (T1F, T2F, T3F, T4F, T5F e T6F) foram os órgãos nos quais ocorreram as maiores alterações nos conteúdos de macro e micronutrientes.

Os nutrientes analisados são necessários na produção de substâncias indispensáveis ao crescimento e desenvolvimento das aroeiras, pois a maioria deles estão envolvidos no processo da fotossíntese e/ou na ativação de enzimas atuantes na produção de metabólitos secundários. Logo, esses resultados nos permitem concluir que as plantas nutridas com NPK, B e Zn podem estar submetidas sob algum tipo de estresse provocado por essas adubações e/ou outros fatores ambientais.

As análises espectrométricas (ESI (-) FT-ICR MS e ESI (-) FT-ICR MS/MS) permitiram identificar nos extratos etanólicos de frutos e folhas de aroeira diferentes classes de substâncias, sobretudo compostos fenólicos, com destaque para os ácidos anacárdicos e seus derivados. A apresentação desses lipídios fenólicos é pouco relatada em *Schinus terebinthifolia*, mas bastante frequente em outras espécies da família Anacardiaceae. A fragmentação realizada pelo método de MS/MS possibilitou verificar a formação de duas substâncias complexas, que sugerem a formação dos ácidos anacárdicos galoilados e os ácidos anacárdicos galoiletalados. Porém, é necessária a utilização de outros métodos e técnicas para isolar, elucidar e confirmar a estrutura química e a formação desses compostos nos extratos de aroeira.

Os extratos de frutos e folhas de *Schinus terebinthifolia* (aroeira) apresentaram respostas distintas nos testes de quantificação de compostos fenólicos e nos ensaios

de ação antioxidante. Os extratos T1F e T6F apresentaram maior conteúdo de fenóis, flavonoides e taninos. A análise multivariada (PCA) demonstrou que a presença desses compostos bioativos influenciou em melhores respostas desses extratos na ação antioxidante, quando avaliados pelos testes do ABTS, DPPH e FRAP. Porém, no ensaio da quelação do Fe^{+2} , os extratos de frutos T3 e T5 demonstraram ser mais eficientes em efetuar a quelação de íons férricos.

Na avaliação de viabilidade celular em linfócitos humanos a maioria dos extratos de aroeira demonstrou ser citotóxica, nas concentrações e tempos avaliados. Apenas o extrato de frutos T2, na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, foi capaz de promover proliferação desse tipo celular, após 48h de exposição, e exibir atividade anticitotóxica no pré-tratamento. Além disso, este foi o extrato (T2) que apresentou maior seletividade de ação em relação às células do Sarcoma 180 (S-180). No tratamento simultâneo e no pós-tratamento, os extratos T1F e T6F demonstraram serem capazes de proteger os linfócitos humanos da ação do agente alquilante (cisplatina) na maioria das concentrações testadas. Os extratos de frutos T1, T3, T4, T5 e T6 apresentaram ação antiproliferativa em células de S-180 nas concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$, após 48 horas de exposição.

Na avaliação do potencial alelopático (sistema-teste *Allium cepa*), todos os extratos testados, nas concentrações de 1,0; 2,5 e 5,0 mg.mL^{-1} demonstraram ter capacidade de interferir na germinação de sementes de cebola expostas a eles (IG), sendo assim, considerados alelopáticos, pois inibiram a germinação de mais de 50% das sementes utilizadas no teste. A interferência dos extratos também foi verificada nos parâmetros de germinação (IVG) e de crescimento radicular (CRM e IVCR).

Todas as informações apresentadas reforçam a utilização da aroeira (*Schinus terebinthifolia* Raddi) na fabricação de produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos. Dessa forma, o aprofundamento nos estudos científicos relacionados à espécie, seus constituintes químicos e os fatores ambientais que podem influenciar na produção destes e nas ações biológicas que tais constituintes podem apresentar, é importantíssimo.

REFERÊNCIAS

1. ABDELNUR, P. V. Metabolômica e espectrometria de massas. Brasília: **Embrapa Agroenergia - Circular Técnica**, 10, 4p. 2011.
2. ABU-REIDAH, I. M., et al. HPLC–DAD–ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits. *Food Chemistry*, v. 166, p. 179 – 191. 2015.
3. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução - RDC Nº 10, de 9 de março de 2010**. Disponível em: <http://189.28.128.100/dab/docs/legislacao/resolucao10_09_03_10.pdf>. Acesso em: 07.02.2020.
4. ALCARDE, J. C.; GUIDOLIN, J. A.; LOPES, A. S. **Os adubos e a eficiência das adubações**. 3. ed. São Paulo, ANDA, 1998.
5. ALI-BOUCETTA, H.; AL-JAMAL, K. T.; KOSTARELOS, K. Cytotoxic assessment of carbon nanotube interaction with cell cultures. **Biomedical Nanotechnology**, v. 726, p. 299–312. 2011.
6. ÁLVARES-CARVALHO, S. V. et al. Structure and genetic diversity of natural Brazilian pepper populations (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Genetic and Molecular Research**. v. 15, n. 2. 2016.
7. ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210. 2010
8. ALVES, P. C. C. Estudos metabolômicos associados a resistência de folhas de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) à antracnose. **Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)**, Universidade Federal do Ceará – UFC, 2016. 68 p.
9. AMORIM, M. M. R.; SANTOS, L. C. Tratamento da vaginose bacteriana com gel vaginal de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi): ensaio clínico randomizado. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 25, n. 2, p. 95-102. 2003.
10. AMORIM, E. et al. A simple and accurate procedure for the determination of tannin and flavonoid levels and some applications in ethnobotany and ethnopharmacology. **Functional Ecosystems and Communities**. v. 2. p. 88-94. 2008.
11. ANDRADE, K. S. Extração e microencapsulamento de extratos de interesse biológico provenientes de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) e de pimenta-rosa (*Schinus terebinthifolius* R.). **Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos**, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, 2015. 164 p.
12. ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
13. ARAUJO, J. T. C. et al. Avaliação da atividade anticárie de nanopartículas poliméricas carregadas com ácido anacárdico. *In: Resumos da 70ª Reunião Anual da SBPC*, 2018. v. 70. p. 1-4.

14. ARAÚJO, S. A. C., et al. Avaliação *in vitro* da atividade citotóxica de drogas antivirais em fibroblastos caprinos. **Ciência Animal**. v. 18, p. 25-31, 2008.
15. AZEVEDO, C. F.; QUIRINO, Z. G. M.; BRUNO, R. L. A. Estudo farmacobotânico de partes aéreas vegetativas de aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae). **Revista brasileira de plantas medicinais**. v. 17, n. 1, p. 26-35, 2015.
16. AZEVEDO, D. A. **Espectrometria de Massas**. UFRJ. 2004. Disponível em: <<http://cebime.propesq.ufsc.br/files/2013/06/Apostila-Espectrometria-de-Massas-D%C3%A9bora-Azevedo.pdf>>. Acesso em: 26.10.2019.
17. BADISA, R. B. et al. Selective anticancer activity of pure licamichauxiioic-B acid in cultured cell lines. **Pharmaceutical Biology**, v. 44, n. 2, p. 141–145, 2006.
18. BALEN, E. Atividade analgésica de extrato de *Schinus terebinthifolius* e de derivados 1,2,3,4,6-Pentagaloil-O-B-Glucopiranosideo e robustaflavona em modelos experimentais de nocicepção em roedores. **Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde**. Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD, 2015. 60p.
19. BAPTISTA, A. B. Extrato de folhas de caju (*Anacardium occidentale* L.) e de cajuí (*Anacardium microcarpum* D.): prospecção fitoquímica, atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória, *in vitro* e *in vivo*. **Tese de Doutorado em Ciências da Nutrição**. Universidade Federal de Viçosa - UFV. Viçosa, 2018.
20. BARBOSA, L. C. A. et al. Seasonal variation in the composition of volatile oils from *Schinus terebinthifolius* raddi. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1959 - 1965. 2007.
21. BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643. 2010.
22. BAHUGUNA, A. et al. MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 12, n. 2, p. 115-118. 2017.
23. BELTRESCHI, L.; LIMA, R. B.; CRUZ, D. D. Traditional botanical knowledge of medicinal plants in a “quilombola” community in the Atlantic Forest of northeastern Brazil. **Environment, Development and Sustainability**. v. 21, n. 3, p. 1185–1203, 2018.
24. BENDAOU, H. et al. Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus molle* L. and *Schinus Terebinthifolius* Raddi berries essential oils. **Journal of food science**. v. 75, 2010.
25. BEDNARCZUK, V.O. et al. Testes *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**. v. 11. N. 2, 2010.
26. BERNARDES, N. R. et al. Quantificação dos teores de taninos e fenóis totais e avaliação da atividade antioxidante dos frutos de Aroeira. **Vértices**. v. 13, n. 3, p. 117-128. 2011.
27. BERNARDES, N. R. et al. Nitric oxide production, inhibitory, antioxidant and antimycobacterial activities of the fruits extract and flavonoid content of *Schinus*

- terebinthifolius*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 6, p. 644 - 650. 2014.
28. BONFIM, F. P. G.; Alelopatia: el potencial de las plantas medicinales en el control de espécies espontáneas. **Centro Agrícola**, v. 45, n. 1, p. 78-87. 2018.
29. BOUDIEB, K.; AIT SLIMANE-AIT KAKI, S.; AMELLAL-CHIBANE, H. Effect of maturation degree on the fixed oil chemical composition, phenolic compounds, mineral nutrients and antioxidant properties of *Pistacia lentiscus* L. fruits. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 47, n. 3, p. 836-847. 2019.
30. BRAGA, J. R. M.; LOPES, D. M. Citotoxicidade e genotoxicidade da água do rio Subaé (Humildes, Bahia, Brasil) usando *Allium cepa* L. como bioindicador. **Revista Ambiente e Água**. v.10, n.1, p.130-140. 2015.
31. BRANCO NETO, M. L. C. et al. Avaliação do extrato hidroalcoólico de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 21. 006.
32. BRANDÃO, S. C. et al. Composição química e avaliação da atividade antioxidante dos frutos de *Schinus Terebinthifolius* Raddi. **Encontro de Ensino, Pesquisa e Extensão (ENEPEX)**. 2017. Disponível em: <<http://eventos.ufgd.edu.br/enepex/anais/arquivos/2324.pdf>>. Acesso em: 02.04.2018.
33. BÜNDCHEN, M. et al. Extratos aquosos de *Schinus terebinthifolius* Raddi inibem a germinação e o desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa* L. **ScientiaTec**. v. 2, n.1, p. 102-109, 2015.
34. BUTURI, C. V. et al. Potencial da *Schinus terebinthifolius* Raddi na recuperação de áreas degradadas: interações aleloquímicas. **Cultivando o Saber**. v. 8, n. 1, p. 49 - 58, 2015.
35. CAILLOL, S. Cardanol: a promising building block for biobased polymers and additives. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 14, p. 26–32. 2018.
36. CARNEIRO, M. J. et al. Evaluation of the chemical composition and biological activity of extracts of *Tetragonisca angustula* propolis and *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Journal of Apicultural Research**, v. 55, n. 4, p. 315 - 323, 2016.
37. CARNEVALI, T. O. et al. Estudo nutricional de *Schinus terebinthifolius* (Raddi) em resposta à adubação potássica. **Ciência Florestal**, v. 29, n. 2, p. 824 - 833, 2019.
38. CARVALHO, A. L. N. et al. Acute, subacute toxicity and mutagenic effects of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale* Linn.) in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, n. 3, p. 730–736. 2011.
39. CARVALHO, J. A. M. et al. Composição química e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo de pimenta-rosa (*Schinus terebinthifolius*). V Semana da Engenharia Química da Universidade Federal do Espírito Santo (V SEQUFES). **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 4, p. 59-63, 2017.

40. CARVALHO, M.G. et al. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 1, p. 158-169. 2013.
41. CASTRO, A. A. et al. Quantificação das características nutricionais, físico-químicas e da atividade antioxidante da pimenta-rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Horticultura Brasileira**. v. 30, 2012.
42. CASTRO, C. B. Perfil químico e atividade citotóxica de extratos de folha, galho e casca de aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva*): abordagem metabolômica e quimiométrica. **Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)**. Universidade Federal do Ceará –UFC. 2016.
43. CESÁRIO, L. F.; GAGLIANONE, M. C. Biologia floral e fenologia reprodutiva de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) em Restinga do Norte Fluminense. *Acta Botanica Brasílica*, v. 22, n. 3, p. 828-833. 2008.
44. CHEN, H., et al. Foliar-sprayed manganese sulfate improves flavonoid content in grape berry skin of Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) growing on alkaline soil and wine chromatic characteristics. **Food Chemistry**, v. 314, 2020.
45. CHENGXU, W. et al. Review on allelopathy of exotic invasive plants. **Procedia Engineering**, v. 18, p. 240–246. 2011.
46. COMIOTTO, A.; MORAES, D. M.; LOPES, N. F. Potencial alelopático de extratos aquosos de aroeira sobre germinação e crescimento de plântulas de alface. **Scientia Agraria Paranaensis**. v. 10, n. 3, p 23-31. 2011.
47. CORADIN, L; SIMINSKI, A; REIS, A. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro - Região Sul**. Brasília: MMA, 2011. 934p. Disponível em:
<http://www.mma.gov.br/estruturas/sbf2008_dcbio/_ebooks/regiao_sul/Regiao_Sul.pdf>. Acesso em: 01.02.2019.
48. CORREIA, S. J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1287-1300. 2006.
49. COSTA, F. Q. Efeito da suplementação com diferentes óleos vegetais na dieta de doadoras de oócitos sobre a produção *in vitro* de embriões bovinos. **Tese de Doutorado em Ciência Animal** - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 2013. 78 p.
50. COSTALONGA, S. A. P. Avaliação alelopática, mutagênica e fitoquímica de extratos vegetais de três espécies exóticas invasoras. **Tese de doutorado em Biologia Vegetal**, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Espírito Santo, 2017.
51. CREMONEZ, F. E. et al. Principais plantas com potencial alelopático encontradas nos sistemas agrícolas brasileiros. **Acta Iguazu**, v. 2, p. 70-88, 2013.
52. CUNHA, A. (Org). **Farmacognosia e Fitoquímica**. 4. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 2014.

53. CUNHA, R. B.; CASTRO, M. S.; FONTES, W. Espectrometria de massa de proteínas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. n. 36. 2006
54. DANNENBERG, G. S. et al. Essential oil from pink pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi): chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action. **Food Control**, v. 95, p. 115–120. 2019.
55. DELARMELENA, J. M. *Bidens pilosa* L.: análises da composição química e atividades biológicas de diferentes populações e condições de cultivo. **Tese de doutorado em Biologia Vegetal**, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Espírito Santo, 2017.
56. DIAS, K. R. M. et al. Efeito alelopático de extratos aquosos de *Schinus terebinthifolia* Raddi sobre germinação e desenvolvimento inicial de *Lafoesia pacari*. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, Garça, v. 17, n. 2, p. 47 – 52. 2010.
57. DIAS, T. et al. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante em frutos de tomateiros mutantes fotomorfo genéticos. **Ciência Rural**, v. 45, n. 5, p. 782-787. 2015.
58. DIAS, A. S. et al. *In vitro* activity of the *Schinus terebinthifolius* (R.) extract on engorged female tick of *Rhipicephalus boophilus microplus* and on larvae hatchability. **Scientific Electronic Archives**. v. 12, n. 2, p. 64 – 69. 2019.
59. DUARTE, J. A., et al. Immunotoxicological evaluation of *Schinus molle* L. (Anacardiaceae) essential oil in lymphocytes and macrophages. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2018.
60. DUTRA, J. C. V. et al. *Cereus jamacaru* DC hydroalcoholic extract promotes anticytotoxic and antitumor activity. **Pharmaceuticals**. v. 11, n. 4, 2018.
61. ENNIGROU, A. et al. Maturation-related changes in phytochemicals and biological activities of the Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi) fruits. **South African Journal Of Botany**, v. 108, p. 407 - 415, 2016.
62. ERŞAN, S. et al. Identification of phenolic compounds in red and green pistachio (*Pistacia vera* L.) hulls (exo- and mesocarp) by HPLC-DAD-ESI-(HR)-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 64, n. 26, p. 5334–5344. 2016.
63. ERŞAN, S. et al. Subcritical water extraction of phenolic and antioxidant constituents from pistachio (*Pistacia vera* L.) hulls. **Food Chemistry**, v. 253, p. 46–54. 2018.
64. ESTEVÃO, L. R. M. et al. *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira) leaves oil attenuates inflammatory responses in cutaneous wound healing in mice. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 32, n. 9, p. 726 - 735. 2017.
65. FACCIN, A. et al. Use of hydroalcoholic extract of *Schinus terebinthifolius* Raddi in pre- and post-milking antisepsis of the teat in dairy cows. **Ciência Animal Brasileira**, v. 17, n. 1, p. 90-97. 2016.

66. FALCÃO, M. et al. *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira) e suas propriedades na medicina popular. **Revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável**. v. 10, n. 5, p. 23 - 27, 2015.
67. FAQUIN, V. **Nutrição Mineral de Plantas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2005.
68. FEDEL-MIYASATO, L. E. S., et al. Evaluation of anti-inflammatory, immunomodulatory, chemopreventive and wound healing potentials from *Schinus terebinthifolius* methanolic extract. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 5, p. 565 - 575. 2014.
69. Federação da Agricultura e Pecuária do Estado do Espírito Santo e Serviço Nacional de Aprendizagem Rural (FAES). Pimenta-rosa: uma nova opção agrícola para os capixabas. **Jornal Esta Terra**. Ano 13. n. 212. 2009
70. FERRAZ, A. Estudo do óleo essencial e extrato hexânico da casca do caule de *Schinus lentiscifolius*. **Dissertação de Mestrado em Química**. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.
71. FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E.A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **VII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal**. p. 175 – 204. 2000.
72. FEUEREISEN, M. M., et al. Differentiation of brazilian peppertree (*Schinus terebinthifolius* Raddi) and peruvian peppertree (*Schinus molle* L.) fruits by UHPLC–UV–MS analysis of their anthocyanin and biflavonoid profiles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 26, p. 5330–5338. 2017.
73. FISKESJÖ, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99–112. 1985.
74. FONSECA, V. B. et al. Allelopathic potential of leaves and flowers extracts of *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Científica**. v.44, n.1, p.35–39, 2016.
75. GAALICHE, B., et al. Impact of foliar potassium fertilization on biochemical composition and antioxidant activity of fig (*Ficus carica* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 253, p. 111–119. 2019.
76. GARRASTAZU, M.; MATTOS, P. (2013). Modelagem e distribuição geográfica. *In.*: GOMES, L. J.; SILVA-MANN, R.; MATTOS, P. P.; RABBANI, A. R. C. (Ed.). **Pensando a biodiversidade: aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi.)**, 1. ed. São Cristóvão: editora UFS, 2011. 372p.
77. GASQUE, K. C. S., et al. Cell density and solvent are critical parameters affecting formazan evaluation in MTT assay. **Brazilian archives of Biology and Technology**. v. 57, n. 3, p. 381-385. 2014.
78. GE, L.; LI, S; LISAK, G. Advanced sensing technologies of phenolic compounds for pharmaceutical and biomedical analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 179, n. 5. 2020.
79. GEHRKE, I. T. S. Estudo fitoquímico e biológico das espécies *Schinus lentiscifolius*, *Schinus terebinthifolius*, *Schinus molle* e *Schinus polygamus* (Anacardiaceae) do

- RS, **Tese de doutorado em Química**, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.
80. GILBERT, B.; FAVORETO, R. *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Revista Fitos**, [S.l.], v. 6, n. 1, p. 43-56, 2011.
81. GLÓRIA, L. L. et al. Phenolic compounds present *Schinus terebinthifolius* Raddi influence the lowering of blood pressure in rats. **Molecules**, v. 22, n. 10, 2017.
82. GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381. 2007.
83. GOERGEN, P. C. H. Extratos de *Schinus terebinthifolius* no controle de *Sitophilus* spp em grãos de trigo armazenado. **Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)**, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – UNIJUÍ, 2016. 40 p.
84. GOMES, L. J. et al. **Pensando a biodiversidade: aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi.)**. São Cristóvão: Editora UFS, 2013. 372 p.
85. GOMES, R.B. et al. Residues from the Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolia* Raddi) processing industry: chemical profile and antimicrobial activity of extracts against hospital bacteria. **Industrial Crops and Products**, v. 143, 2019.
86. GÓMEZ, S. et al. The antimicrobials anacardic acid and curcumin are not-competitive inhibitors of Gram-positive bacterial pathogenic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by a mechanism unrelated to human C5a anaphylatoxin binding. **Frontiers in Microbiology**, v. 10. 2019.
87. GRANT, C. A. et al. A importância do fósforo no desenvolvimento inicial da planta. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, n.95, 2001.
88. GUSMAN, G.; VIEIRA, L.; VESTENA, S. Alelopatia de espécies vegetais com importância farmacêutica para espécies cultivadas. **Biotemas**. v. 25, n. 4, p. 37-48. 2012
89. HAIG, T. Allelochemicals in Plants. *In*: ZENG R.S.; MALLIK A.U.; LUO S.M. (Ed.). **Allelopathy in Sustainable Agriculture and Forestry**. New York: Springer, p. 63-104. 2008.
90. HARB, T. B. et al. Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do sistema quelante de metais para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**, 2016.
91. HEMSHEKHAR, M. et al. Emerging roles of Anacardic acid and its derivatives: a pharmacological overview. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 110, n. 2, p. 122–132. 2011.
92. HERINGER, A. P. Aspectos químicos, ecológicos e farmacológicos de *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Dissertação de Mestrado em Química de Produtos Naturais**, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, 2009. 190p.

93. HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, P.; BAQUERO, L. P.; LARROTA, H. R. Flavonoids: potential therapeutic agents by their antioxidant capacity. **Bioactive Compounds**, p. 265–288. 2019.
94. HSU, P. P.; SABATINI, D. M. Cancer Cell Metabolism: Warburg and Beyond. **Cell**, v. 134, n. 5, p. 703–707. 2008.
95. HUSSEIN, H. S.; SALEM, M. Z. M.; SOLIMAN, A. M. Repellent, attractive, and insecticidal effects of essential oils from *Schinus terebinthifolius* fruits and *Corymbia citriodora* leaves on two whitefly species, *Bemisia tabaci*, and *Trialeurodes ricini*. **Scientia Horticulturae**, v. 216, p. 111–119. 2017.
96. JIA, X., et al. Metabolic analysis in *Malus halliana* leaves in response to iron deficiency. **Scientia Horticulturae**, v. 258, 2019.
97. JIN, L.; LIU, L.; GUO, Q. Phosphorus and iron in soil play dominating roles in regulating bioactive compounds of *Glechoma longituba* (Nakai) Kupr. **Scientia Horticulturae**, v. 256. 2019.
98. KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. 2.ed. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 453p.
99. KIM, S. I. Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*. **Journal of Stored Products**, v. 39, p 293–303, 2003.
100. KOVÁČIK, J., et al. Metabolic changes induced by manganese in chamomile. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 133, 2018.
101. KOWATA, C. H.; et al. Fisiopatologia da caquexia no câncer: uma revisão. **Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR**, v. 13, n. 3, p. 267-272, 2009.
102. KUBO, I. et al. Multifunctional cytotoxic agents from *Anacardium occidentale*. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 1, p. 38–45. 2011.
103. KUETE, V.; KARAOSMANOĞLU, O.; SIVAS, H. Anticancer activities of African medicinal spices and vegetables. **Medicinal Spices and Vegetables from Africa**, p. 271–297. 2017.
104. KUMAR, P. H.; CHANDREGOWD, V.; REDDY, G.C.; Synthesis and anti-mycobacterial activity of some novel anacardic acid derivatives from cashew nut shell liquid. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**. v. 9, n. 10, p. 4166-4176. 2018.
105. LATIF, S.; CHIAPUSIO, G.; WESTON, L. A. Allelopathy and the role of allelochemicals in plant defence. **How Plants Communicate with Their Biotic Environment**, p. 19–54. 2017
106. LENZI, M.; ORTH, A. I. Caracterização funcional do sistema reprodutivo da aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi), em Florianópolis-SC, Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura** [online], v. 26, n. 2, p.198 - 201. 2004

107. LENZI, M.; ORTH, A. I.; LAROCA, S. Associação das abelhas silvestres (Hym., Apoidea) visitantes das flores de *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae), na Ilha de Santa Catarina (sul do Brasil). **Acta Biológica Paranaense**, [S.l.], v. 32, dez. 2003.
108. LIMA, A. T. A. et al. Atividade antimicrobiana da espécie *Schinus Terebinthifolius Raddi* (aroeira-vermelha): breve revisão da literatura. **Anais do Seminário Científico do UNIFACIG**. p. 1 – 8. 2017. Disponível em: <<http://pensaracademico.facig.edu.br/index.php/semiariocientifico/article/view/491/416>>. Acesso em: 22.05.2019.
109. LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 2. ed. Nova Odessa: **Instituto Plantarum**, 2002. v. 2 368 p.
110. LUZ, C. L. S. Filogenia e sistemática de *Schinus* L. (Anacardiaceae), com revisão de um clado endêmico das matas nebulosas andinas. **Tese de Doutorado em Botânica**, Universidade de São Paulo – USP, 2017. 160p.
111. MAIA, D. S. Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas carregadas com ácido anacárdico. **Dissertação de Mestrado em Química**, Universidade Federal do Ceará – UFC, 2017. 62p.
112. MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas-princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1997. 319p.
113. MARENCO, R. A.; LOPES, N. F. **Fisiologia vegetal: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral**. 3. ed. Editora UFV, Viçosa. 486p. 2009.
114. MARTINELLI, L. et al. Antimicrobial activity and chemical constituents of essential oils and oleoresins extracted from eight pepper species. **Ciência Rural**, v. 47, n. 5, 2017.
115. MARTÍNEZ, E. M. G.; SEGOVIA, I. F.; LÓPEZ, A. F. **Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu**. 2015. Disponível em: <<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/52056/Garcia%20Mart%c3%adnez%20et%20al.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 22/10/2019.
116. MATTISON, C. P. et al. Effects of industrial cashew nut processing on anacardic acid content and allergen recognition by IgE. **Food Chemistry**, v. 240, p. 370–376. 2018.
117. MARSHALL, A. G. et al. Fourier Transform ion cyclotron resonance: dtate of the art. **European Journal of Mass Spectrometry**, v. 13, n. 1, p. 57–59. 2007.
118. MATTOS, J. K. A. Plantas medicinais: aspectos agronômicos. In. SANTOS, J. S.; ALMEIDA, C. C. O. F. (Orgs.). **Das plantas medicinais à fitoterapia: uma ciência em expansão**. Brasília: Editora IFB, 2016.
119. MIRANDA, M. V. et al. Controle de qualidade de amostras comerciais de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira) adquiridas em mercados públicos da cidade de São Luís – MA. **Biota Amazônia**. Macapá, v. 6, n. 1, p. 83-90, 2016.

120. MONTEIRO, J. M. et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896. 2005.
121. MORAIS JUNIOR, V. T. M. et al. Early assessment of tree species with potential for carbon offset plantations in degraded area from the southeastern Brazil. **Ecological Indicators**, v. 98, p. 854–860. 2019.
122. MORAIS, S. M. et al. Anacardic acid constituents from cashew nut shell liquid: NMR characterization and the effect of unsaturation on its biological activities. **Pharmaceuticals**. v. 10, n. 31. 2017.
123. MOREIRA, A.; MORAES, L. A. C.; AQUINO, G. S. Iron and manganese effect on soil chemical properties, yield components, and nutritional status of soybean. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, 49(15), 1844–1854. 2018.
124. MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**. v. 65, p. 55-63, 1983.
125. MOURA, N. S. et al. Ensaios toxicológicos: um estudo sobre a utilização de testes *in vivo* e *in vitro*. **Enciclopédia Biosfera**, v.8, n.15, p. 1945 – 1959, 2012
126. NASCIMENTO, A. F.; CAMARA, C. A.G.; MORAES, M. M. DE. Fumigant activity of *Schinus terebinthifolius* essential oil and its selected constituents *against Rhyzopertha dominica*. **Revista Faculd Nacional Agronomía Medellín**. vol.71, n. 1, pp.8359-8366, 2018
127. NASCIMENTO, R. F. et al. **Cromatografia gasosa: aspectos teóricos e práticos**. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2018.
128. NEVES, E. J. M. et al. **Cultivo da aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi) para produção de pimenta-rosa**. Colombo: Embrapa Florestas, 2016. 24 p.
129. NUNES, G. L. et al. Potencial de extratos foliares de *Schinus terebinthifolia* raddi para redução da germinação de plantas daninhas. **Journal of Agronomic Sciences**. v.8, n.1, p.136-144, 2019.
130. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Programme on Traditional Medicine. **Regulatory Situation of Herbal Medicines** A worldwide Review. 1998. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/63801>>. Acesso em: 07.02.2020.
131. OKOTH, D.; CHENIA, H.; KOORBANALLY, N. Antibacterial and antioxidant of flavonoids from *Lannea alata* (Engl.) Engl. (Anacardiaceae). **Phytochemistry Letters**. v. 6. p. 476- 481. 2013. 10.1016/j.phytol.2013.06.003.
132. OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. Farmacognosia: identificação de drogas vegetais. 2. ed. São Paulo: **Atheneu**. 2014.
133. OLIVEIRA, B. G. et al. Chemical profile of mango (*Mangifera indica* L.) using electrospray ionisation mass spectrometry (ESI-MS). **Food Chemistry**, v. 204, p. 37 – 45. 2016.

134. OLIVEIRA, M. S. et al. Chemical composition and antifungal and anticancer activities of extracts and essential oils of *Schinus terebinthifolius* Raddi fruit. **Revista Fitos**, v. 12, n. 2, p. 135-146, 2018.
135. OLIVEIRA, R. R. Crescimento da berinjela (*Solanum melongena* L.) em função do uso de águas salinas e fertilizantes orgânicos. **Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)**. Universidade Estadual da Paraíba UEPB, Catolé do Rocha, 2017. 36f.
136. ORWA, C. et al. *Schinus terebinthifolius*. **Agroforestry Database: tree reference and selection guide version 4.0**. World Agroforestry Centre, Kenya, 2009. Disponível em: <<http://www.worldagroforestry.org/sites/treedbs/treedatabases.asp>>. Acesso em: 02. Fev. 2019.
137. PAGANI, A. A. C. et al. Quantification of bioactive compounds of pink pepper (*Schinus Terebinthifolius*, Raddi). **International Journal of Engineering and Innovative Technology**. v. 4, n. 5, p. 37-41. 2014.
138. PANSERA, M. R. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no Nordeste do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 13, n. 1, p. 17 – 22, 2003.
139. PAVIA, D. L. et al. **Introdução à espectroscopia**. 4. ed., São Paulo, SP. Cengage Learning: 2010.
140. PAWLOWSKI, Â., et al. Essential oils of *Schinus terebinthifolius* and *S. molle* (Anacardiaceae): mitodepressive and aneugenic inducers in onion and lettuce root meristems. **South African Journal of Botany**, v. 80, p. 96–103. 2012.
141. PÉREZ, A. L. A. L. Estudo da atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi contra espécies de cândidas isoladas da cavidade bucal de usuários de próteses. **Dissertação de Mestrado em Odontologia**, Universidade Federal da Paraíba – UFPB, 2016. 80p.
142. PEETERS, K. et al. Fructose-1,6-bisphosphate couples glycolytic flux to activation of Ras. **Nature Communications**, v. 8, n. 1. 2017.
143. PICH, R. C. Obtenção e caracterização do produto seco da pimenta-rosa (*Schinus terebinthifolius* R.) por cast tape drying. **Dissertação de mestrado em Engenharia de Alimentos**, Universidade Federal de Uberlândia – UFU, 2019. 115p.
144. PILATTI, D. M. et al. Comparison of the phytochemical profiles of five native plant species in two different forest formations. **Brazilian Journal of Biology**. v. 79, n. 2, p. 233-242. 2019.
145. PIRES, J. S. et al. Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do *Folin-Ciocalteu* para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**, 2017.
146. PIRES, N.M.; OLIVEIRA, V.R. Alelopatia. *In*. OLIVEIRA, R.S.; CONSTANTIN, J. (Ed.). **Plantas daninhas e seu manejo**. Guaíba: Agropecuária, 2001. p. 145-185

147. PROCÓPIO, T. F. et al. *Schinus terebinthifolius* leaf extract causes midgut damage, interfering with survival and development of *Aedes aegypti* larvae. **PLoS ONE**. v. 10, n. 5, 2015.
148. QUEIRES, L. C. Polyphenols purified from the Brazilian aroeira plant (*Schinus terebinthifolius*, Raddi) induce apoptotic and autophagic cell death of DU145 cells. **Anticancer Research**. v. 26, p. 379 – 387. 2006.
149. RADUŠIENĖ, J., et al. Effect of nitrogen on herb production, secondary metabolites and antioxidant activities of *Hypericum pruinatum* under nitrogen application. **Industrial Crops and Products**, v. 139. 2019.
150. RANGEL, E. T. Atividade antiprotozoária, antifúngica e citóxica de extratos de plantas do bioma Cerrado, com ênfase em *Leshimania (Leishimania) chagasi*. **Tese de doutorado em Ciências da Saúde**, Universidade de Brasília – UNB, 2010. 131p.
151. RAMOS, D. B. M. et al. Evaluation of antitumor activity and toxicity of *Schinus terebinthifolia* leaf extract and lectin (StELL) in sarcoma 180-bearing mice. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 233. p. 148-157. 2019.
152. RAUF, A., et al. Phytochemical, ethnomedicinal uses and pharmacological profile of genus *Pistacia*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 86, p. 393 – 404. 2017.
153. REMILA, S., et al. Antioxidant, cytoprotective, anti-inflammatory and anticancer activities of *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae) leaf and fruit extracts. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 7, n. 3, p. 274 – 286. 2015.
154. RICE, E.L. **Allelopathy**. 2. ed. New York: Academic, 1984. 422p.
155. RISS, T. L. et al. Cell viability assays. **Assay Guidance Manual**. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>>. Acesso em: 28.10.2019.
156. ROCHA, P. S. et al. Microbiological quality, chemical profile as well as antioxidant and antidiabetic activities of *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**. p. 39 – 46. 2019.
157. ROCHA, W. S. et al. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 4, p. 1215-1221. 2011.
158. RODRIGUES, P. **Alelopatia**. 2014. Disponível em: <<http://www.agronegocios.eu/noticias/alelopatia/>>. Acesso em: 28.10.2019.
159. ROMANI, V. P.; HERNÁNDEZ, C. P.; MARTINS, V. G. Pink pepper phenolic compounds incorporation in starch/protein blends and its potential to inhibit apple browning. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 15, p. 151–158. 2018.
160. ROMÃO, W. Novas aplicações da espectrometria de massas em química forense. **Tese de Doutorado em Ciências**. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. 2010. 200p.

161. ROSAL, L. F. et al. Produção vegetal e de óleo essencial de boldo pequeno em função de fontes de adubos orgânicos. **Revista Ceres**, v. 58, n. 5, p. 670-678. 2011.
162. ROSAS, E. C.; CORREA, L. B.; HENRIQUES, M. G. Antiinflammatory Properties of *Schinus terebinthifolius* and its use in arthritic conditions. In: WATSON, R. R.; PREED, V. R. (Ed.). **Bioactive food as dietary interventions for arthritis and related inflammatory diseases**. p. 489–505. 2019.
163. RUAS, F. G. Seleção de genótipos, manejo e perfil químico de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi.) no Estado do Espírito Santo. **Dissertação de Mestrado em Biologia Vegetal**, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, 2016. 142 p.
164. RUFINO, M. D. S. M. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). Fortaleza: **Embrapa Agroindústria Tropical - Comunicado Técnico**, 125, 4p. 2006.
165. RUFINO, M. D. S. M.; et al. Metodologia Científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Fortaleza: **Embrapa Agroindústria Tropical - Comunicado Técnico**, 127, 4p., 2007.
166. RUFINO, M. D. S. M.; et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. Fortaleza: **Embrapa Agroindústria Tropical - Comunicado Técnico**, 128, 4p., 2007.
167. SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Fisiologia das plantas**. 4. ed. Editora Cengage Learning. São Paulo, 2012. 774p.
168. SALEHI, B. et al. Anacardium plants: chemical, nutritional composition and biotechnological applications. **Biomolecules**. v. 9, n. 465. 2019.
169. SANO, B. Efeito alelopático da aroeira *Schinus terebinthifolius* (Anacardeaceae) no estabelecimento de espécies arbóreas. **Prática de Pesquisa em Ecologia da Mata Atlântica**. Curso de Pós-Graduação em Ecologia - Universidade de São Paulo - USP. p. 1 - 4. 2015.
170. SANTANA, J. S. et al. Isolamento e avaliação do potencial citotóxico de derivados fenólicos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Química Nova**. v. 35, n.11, p. 2245-2248, 2012.
171. SANTOS, C. T. C. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de frutos verdes e maduros de *Schinus terebinthifolius* Raddi sobre isolados de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes. **Diversitas Journal**. v. 4, n. 1, p. 285-291, 2019.
172. SARKHAIL, P. et al. Bioassay-guided fractionation and identification of wound healing active compound from *Pistacia vera* L. hull extract. **Journal of Ethnopharmacology**. 2019
173. SARTORELLI, P. **A química das plantas medicinais**. 2015. Disponível em: <https://www.crq4.org.br/quimica_viva_plantas_medicinais>. Acesso em: 01.10.2019.

174. SBARDELLA, G. et al. Identification of long chain alkylidenemalonates as novel small molecule modulators of histone acetyltransferases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 9, p. 2788 – 2792. 2008.
175. SCHEIBE, C. L. et al. *Schinus terebinthifolius raddi* (aroeira) and *Orbignya phalerata* mart. (babassu) effect in cecorrahphy healing in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 31, n. 6, p. 402-410. 2016
176. SCHIMITBERGER, V. M. B. et al. Volatile compounds profile changes from unripe to ripe fruits of Brazilian pepper (*Schinus terebinthifolia* Raddi). **Industrial Crops and Products**. v. 119, p. 125–131. 2018.
177. SCHMOURLO, G. et al. Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 3, p. 563 - 568, 2005.
178. SCHULTZ, D.; WICKRAMASINGHE, N.; KLINGE, C. Chapter six Anacardic acid biosynthesis and bioactivity. **Recent Advances in Phytochemistry**. v. 40. p. 131-156. 2006.
179. SHAN, L., et al. Effects of long-term nitrogen and phosphorus addition on plant defence compounds in a freshwater wetland. **Ecological Indicators**, v. p. 94, 1–6. 2018.
180. SHRESTHA, S. et al. Cytotoxic and neuroprotective biflavonoids from the fruit of *Rhus parviflora*. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**. v. 55, p. 557 - 562. 2012.
181. SILVA, A. A. S. Atividade leishmanicida de triterpenos isolados de *Musa paradisiaca* e do ácido anacárdico e derivados contra *Leishmania infantum chagasi*. **Dissertação de Mestrado em Engenharia Química**, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 2013. 145p. 2013.
182. SILVA, F. A. M. et al. Granulated and biosolid fertilizers on the quality of *Schinus terebinthifolius* Raddi seedlings. **Floresta Ambiente**, v. 26, n. 3, 2019.
183. SILVA, J. H. S. et al. Anti-escherichia coli activity of extracts from *Schinus terebinthifolius* fruits and leaves. **Natural Product**. p. 1365-1368. 2017.
184. SILVA, M. A. B. Controle da qualidade de fitoterápicos: proposta de bula e metodologia para o controle de qualidade físico-químico de *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)**, Universidade de Brasília – UNB, 2015. 54 p.
185. SILVA, M. M. et al. *Schinus terebinthifolius*: phenolic constituents and *in vitro* antioxidant, antiproliferative and *in vivo* anti-inflammatory activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 4, p. 445-452. 2017.
186. SILVA, O. M. C.; SANTANA, L. S.; MACEDO, R. L. G. Influência da adubação mineral no desenvolvimento inicial de *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Agrarian Academy**. v. 5. p. 112-120. 2018.

187. SILVA-LUZ, C.L.; PIRANI, J. R. **Anacardiaceae in lista de espécies da flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB4394>>. Acesso em: 01. Fev. 2019.
188. SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora UFRS. 2010.
189. SIMÕES, C.M.O.; et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: 148 Artmed, 2017.
190. SOARES, N. P. et al. Técnicas de prospecção fitoquímica e sua importância para o estudo de biomoléculas derivadas de plantas. **Enciclopédia Biosfera - Goiânia**, v.13 n. 24. p. 991 – 1010. 2016.
191. SOBRINHO, T. J. S. P. et al. Teor de flavonóides totais em produtos contendo pata-de-vaca (*Bauhinia* L.) comercializados em farmácias de Recife/PE. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 4, p. 586-591. 2012.
192. SODRÉ, E. São Mateus, maior produtor de pimenta-rosa do mundo. **Jornal A tribuna**. 2016.
193. 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.
194. SOUSA, M. V. S. et al. Estudo da incorporação de LCC à membrana de quitosana. **Brazilian Journal of health Review**. v. 2, n. 4, p. 2762-2777, 2019.
195. SOUZA, P. et al. Estabelecimento de espécies arbóreas em recuperação de área degradada pela extração de areia. **Cerne**, v.7, n.2, p. 43 - 52, 2001.
196. SUNG, B. et al. Anacardic acid (6-nonadecyl salicylic acid), an inhibitor of histone acetyltransferase, suppresses expression of nuclear factor- B-regulated gene products involved in cell survival, proliferation, invasion, and inflammation through inhibition of the inhibitory subunit of nuclear factor- B kinase, leading to potentiation of apoptosis. **Blood**, v. 111, n. 10, p. 4880 - 4891. 2008.
197. TANG, S.Z. et al. Antioxidative mechanisms of tea catechins in chicken meat systems. **Food Chemistry**, v.76, p.45-51, 2002.
198. TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888 p.
199. TLILI, N. et al. *Schinus terebinthifolius* vs *Schinus molle*: a comparative study of the effect of species and location on the phytochemical content of fruits. **Industrial Crops and Products**. v. 122, p. 559–565. 2018.
200. TORRES, P. B. et al. Ensaio do potencial antioxidante de extratos de algas através do sequestro do ABTS⁺⁺ em microplaca. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**. 2017.

201. TORRES, K. A. M.; LIMA, S. M. R. R.; UEDA, S. M. Activity of the aqueous extract of *Schinus terebinthifolius* Raddi on strains of the *Candida* genus. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 38, n. 12, p. 593-599. 2016.
202. TRANI, P. E.; TRANI, A. L. **Fertilizantes: cálculo de fórmulas comerciais**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2011. 29p.
203. ULIANA, M. P. et al. Composition and biological activity of Brazilian rose pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 235–240. 2016.
204. ULLAH, A., et al. Adequate zinc nutrition improves the tolerance against drought and heat stresses in chickpea. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 143, p. 11 – 18. 2019.
205. URREA-VICTORIA, V. et al. Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro (FRAP) para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**. 2006.
206. VERONKA, D. A. et al. Efeito alelopático do extrato bruto de *Brachiaria decumbens* na germinação e no vigor de sementes e de plântulas de *Brachiaria brizantha*. **Embrapa Gado de Corte**. Documentos 188. 2012.
207. VUOLO, M. M.; LIMA, V. S.; JUNIOR, M. R. M. Phenolic compounds: structure, classification, and antioxidant power. *In*. **Bioactive Compounds**. Campos, M. R. S. (Ed.): Amsterdam: Elsevier. p. 33–50. 2019.
208. WASLI, H., et al. Variation of polyphenolic composition, antioxidants and physiological characteristics of dill (*Anethum graveolens* L.) as affected by bicarbonate-induced iron deficiency conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 126, p. 466–476. 2018
209. YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. (Ed.). **Plantas medicinais sob a óptica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001.
210. ZHANG, Q. et al. A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds. **J. of Applied Phycology**. v. 18, p. 445 - 450. 2006.
211. ZHAO, K. et al. Anacardic acid inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis in vitro and prevents ovariectomy-induced bone loss *in vivo*. **The FASEB Journal**, v. 33, n. 8, p. 9100-9115, 2019.
212. ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chem.** v. 64, p. 555–559, 1999.
213. ZIMDAHL, R. L. Allelopathy. **Fundamentals of Weed Science**, p. 253–270. 2018.

ANEXO I - Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA/UFES)




UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização Fisiológica, Fitoquímica e de Atividades Biológicas de Plantas Medicinais com Potencial Econômico para Produção de Fitoterápicos", Protocolo nº.89/2015, sob a responsabilidade de Maria do Carmo Pimentel Batitucci que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata(exceto o homem), para fins de pesquisa científica(ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal(CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS(CEUA) DO(A) Centro de Ciências da Saúde-Maruípe-Vitória-ES em 04-03-2016

Vigência do Projeto	Início: Abril/2016 Término:Fevereiro/2019
Espécie/Linhagem	Camundongos Swiss(Mus musculus)
Nº de Animais	Experimento Piloto:20 Protocolo Experimental:256 Total:276
Peso/Idade	Peso: 30-40g Idade:6-8 semanas
Sexo	Macho
Origem	Mamíferos

Vitória (ES), 04 de março de 2016.




ANEXO II – Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal do Espírito Santo (CEP/CCS/UFES)


DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

- DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise do potencial mutagênico, antimutagênico e citotóxico de plantas medicinais utilizadas pela população capixaba em linfócitos humanos in vitro.
Pesquisador Responsável: Maria do Carmo Pimentel Battuoci
Área Temática: Genética Humana
 (Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.)

Versão: 2
CAAE: 71093016.6.0000.5542
Submetido em: 05/09/2017
Instituição Proponente: Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo
Situação da Versão do Projeto: Aprovado
Localização atual da versão do Projeto: Pesquisador Responsável
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio



Comprovante de Recepção:  PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_553693

- DOCUMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA

- ↳ Versão em Tramitação (E1) - Versão 3
 - ↳ Emenda (E1) - Versão 3
 - ↳ Documentos do Projeto
 - ↳ Comprovante de Recepção - Submissão
 - ↳ Folha de Rosto - Submissão 1
 - ↳ Outros - Submissão 1
 - ↳ Projeto Detalhado / Brochura Investigad
 - ↳ TCLE / Termos de Assentimento / Justifi
- ↳ Versão Atual Aprovada (PO) - Versão 2
- ↳ Projeto Completo

Tipo de Documento	Situação	Arquivo	Postagem	Ações

- LISTA DE APRECIACÕES DO PROJETO

ANEXO III – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFES (CEP/CCS/UFES)



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS

É garantido ao participante da pesquisa direito à indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

ESCLARECIMENTO DE DÚVIDAS

Em caso de dúvidas sobre a pesquisa ou para relatar algum problema, o(a) Sr.(a) pode contatar a pesquisadora MARIA DO CARMO PIMENTEL BATITUCCI no telefone (27) 4009-7251/(27) 99969-3288 ou endereço Laboratório de Genética de Plantas e Toxicológica, Departamento de Ciências Biológicas, UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO. Endereço: Av. Fernando Ferrari, 514 - Goiabeiras, Vitória - ES, 29075-910. O(A) Sr.(a) também pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo (CEP/CCHN/UFES). Para denúncias e/ou intercorrências na pesquisa entrar em contato com o Comitê de Ética e Pesquisa pelo telefone (27) 3145-9820, pelo e-mail cep.goiabeiras@gmail.com, pessoalmente ou pelo correio, no seguinte endereço: Av. Fernando Ferrari, nº 514, Campus Universitário, sala 07 do Prédio Administrativo do CCHN, Goiabeiras, Vitória - ES, CEP 29.075-910.. O CEP/CCS/UFES tem a função de analisar projetos de pesquisa visando à proteção dos participantes dentro de padrões éticos nacionais e internacionais.

Declaro que fui verbalmente informado e esclarecido sobre o presente documento, entendendo todos os termos acima expostos, e que voluntariamente aceito participar deste estudo. Também declaro ter recebido uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de igual teor, assinada POR MIM (ou responsável legal),

RG _____, e pelo(a) pesquisador(a) principal ou seu representante, rubricada em todas as páginas.

VITÓRIA, 21 / 01 / 2019

Participante da pesquisa/Responsável legal