



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Leonardo de Carvalho Garcia

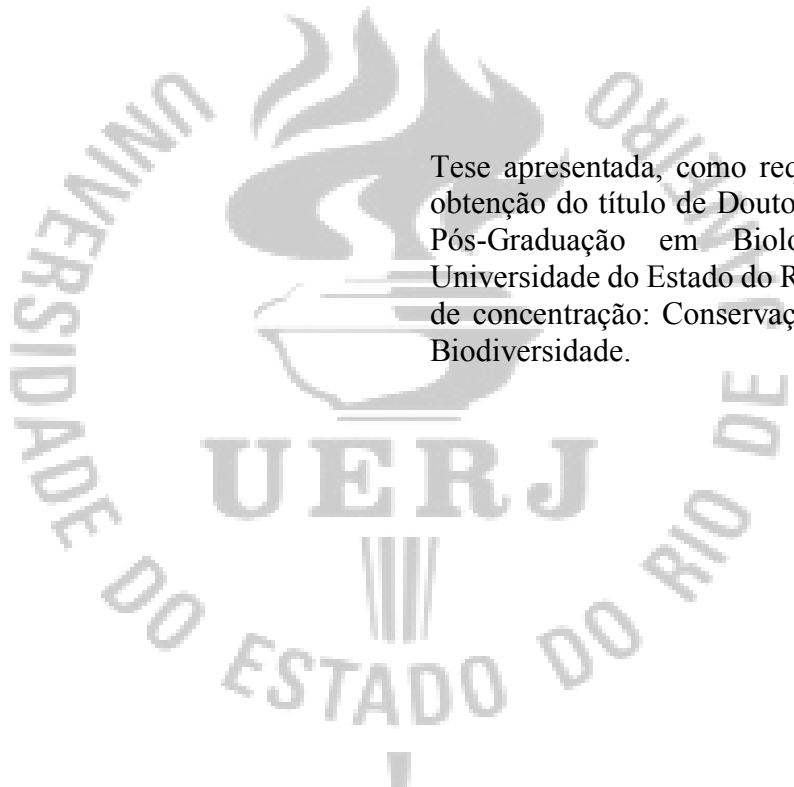
**Otimização de métodos extrativos, investigação fitoquímica e biológica  
de *Arachis repens* HANDRO (Fabaceae)**

Rio de Janeiro

2016

Leonardo de Carvalho Garcia

**Otimização de métodos extrativos, investigação fitoquímica e biológica de *Arachis repens*  
HANDRO (Fabaceae).**



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Conservação e Utilização da Biodiversidade.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Ivana Correa Ramos Leal

Coorientadoras: Prof.<sup>a</sup> Dra. Elisabeth Atalla Mansur de Oliveira

Prof.<sup>a</sup> Dra. Naomi Kato Simas

Rio de Janeiro

2016

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/ REDE SIRIUS/ BIBLIOTECA CTC/A

G216	<p>Garcia, Leonardo Carvalho Otimização de métodos extrativos, investigação fitoquímica e biológica de <i>Arachis repens</i> Handro (Fabaceae) /Leonardo Carvalho Garcia.- 2016. 241f.</p> <p>Orientadora: Ivana Correa Ramos Leal Coorientadoras: Elisabeth Atalla Mansur de Oliveira, Naomi KatoSimas.</p> <p>Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes.</p> <p>1. Legumionosa - Teses. 2. Extração (Química) - Teses. 3. Alelopatia - Teses. I. Leal, Ivana Correa Ramos. II. Oliveira, Elisabeth Atalla Mansur de. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes. IV. Título.</p> <p>CDU 582.736</p>
------	--

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução parcial desta dissertação desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Leonardo de Carvalho Garcia

**Otimização de métodos extrativos, investigação fitoquímica e biológica de *Arachis repens***

**HANDRO (Fabaceae)**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Conservação e Utilização da Biodiversidade

Aprovado em 10 de outubro de 2016.

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Ivana Correa Ramos Leal (Orientadora)  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Naomi Kato Simas (Coorientadora)  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Elisabeth Atalla Mansurde Oliveira (Coorientadora)  
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes - UERJ

---

Prof. Dr. Davyson de Lima Moreira  
FIOCRUZ – Manguinhos

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Marsen Garcia Pinto Coelho  
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Juliana Villela Paulino  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Alice Sato  
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Carla da Silva Carneiro  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2016

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Nilson e Sonia, pelo exemplo de honestidade, dedicação, amor e fé.

Ao meu filho Artur, pelo amor e pelo companheirismo.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela força em todos os momentos difíceis da minha vida. Por não permitir que minhas forças e fé esgotarem-se.

Aos meus pais, Nilson † e Sonia †, que sempre me incentivaram a estudar e auxiliaram nas conquistas dos meus sonhos. Com certeza estes dois continuam olhando por mim e me auxiliando sempre que solicito seus conselhos.

Ao meu filho Artur M. R. Garcia, que inúmeras vezes precisou ser compreensivo por não poder ofertar a atenção desejada e pela amizade e companheirismo nos momentos de lazer.

Ao meu irmão Antonio Marcos e minha sobrinha Sofia, pelo apoio e compreensão nos momentos de ausência.

Às Prof<sup>as</sup> Dr<sup>as</sup> Ivana Correa Ramos Leal e Naomi Kato Simas, por terem aceitado orientar este trabalho, pela confiança, dedicação, paciência e por terem me ensinado boa parte dos conhecimentos adquiridos ao longo destes anos. Nunca irei esquecer o que fizeram por mim e deste sempre OBRIGADO.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rachel Gagliardi, pela amizade, carinho e pelos inúmeros conselhos durante a realização e desenvolvimento deste trabalho.

A todos os professores da Pós-Graduação que auxiliaram na construção do meu conhecimento durante a realização do curso.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Claudia Amaral (FIOCRUZ), pela realização dos cromatogramas e pelas orientações.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Michelle Frazão Muzitano (LPBIO-UFRJ-Macaé), por auxiliar na realização dos testes de atividade- anti-inflamatória.

Ao aluno Marlon Heggdorne, pelas análises de atividade anti-inflamatória.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal (PPGBV) da UERJ pela possibilidade de realização deste trabalho e evoluir meus conhecimentos acadêmicos.

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado nos 2 primeiros anos.

Aos amigos e colegas do LABMIT (UERJ).

Em especial à minha amiga Bianka Soares (com K), pelas conversas e conselhos, além dos momentos de descontração durante os dias de trabalho e também fora dele.

Ao amigo e companheiro de mestrado e doutorado Gabriel Casimiro, pelos momentos de discussão sobre os experimentos, estudos e também de diversão. Por partilhar novos conhecimentos e no auxílio do desenvolvimento das técnicas realizadas durante o decorrer do trabalho dentro e fora do laboratório.

Aos amigos e companheiros Paulo Araújo (Crioulo), Raphael Carpes (Cabelo) e Guilherme Gowman (Botada), pelos momentos de diversão e pelas contribuições para o desenvolvimento deste trabalho, sempre que necessário estavam prontos para ajudar.

A todos os funcionários, doutorandos, mestrandos e IC's do Núcleo de Biotecnologia Vegetal, pelos momentos de convivência "harmônica", pelas alegrias partilhadas e principalmente ao auxílio no desenvolvimento do trabalho, afinal sem os funcionários e os IC's não existiriam os laboratórios.

Em especial vou agradecer a duas IC's que contribuíram inigualavelmente para o desenvolvimento deste trabalho, que foram as alunas Raphaela Reis e Carina Morgado, sempre prontas a realizarem as tarefas designadas e as cumprindo com muita destreza e dedicação. Obrigado!

À UFRJ, por disponibilizar suas dependências para que fosse realizado o trabalho.

Finalmente chego a este agradecimento especial. Aos meus amigos e colegas no LaProNEB (UFRJ), pelos diversos momentos felizes e apreensivos que passamos ao longo destes 2 anos

de trabalho. Agradeço a todos vocês, do fundo do meu coração. Desde o momento que cheguei ao laboratório, até o último segundo, me deram total apoio e forças para prosseguir nesta caminhada. Este laboratório é abençoado, clima sempre harmonioso e feliz. Todos os alunos possuem um local especial no meu coração, sem distinção.



Nesta parte volto a repetir as palavras proferidas pela minha amada e querida mãe, que mesmo não obtendo grandes estudos acadêmicos, possuía uma grande vivência e sempre pôde nos dar bons exemplos e conselhos de vida. Hoje posso afirmar que sua missão, e a do meu pai, foram cumpridas com êxito. Chego ao final de mais um ciclo de estudos e sempre que as situações se complicavam lembrava dos seus conselhos e este me marcou bastante.

As pessoas podem tirar tudo de você. Mas os seus estudos elas nunca conseguirão arrancar. Estudar nunca é demais, não ocupa espaço e sempre vale a pena.

*Sonia de Carvalho Garcia*

## RESUMO

GARCIA, Leonardo de Carvalho. **Otimização de métodos extrativos, investigação fitoquímica e biológica de *Arachis repens* HANDRO (Fabaceae)**. 2016. 251f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

*Arachis repens*, vulgarmente conhecido como grama-amendoim, e pela primeira vez detectamos a presença do composto bioativo *trans*-resveratrol (t-RSV). Comparamos a eficiência de três metodologias de extração diferentes: Maceração (MC), ultra-som (EAU) e micro-ondas em relação ao teor de fenóis totais (FT) e resveratrol, posteriormente avaliou-se a atividade antioxidante. A MC pelo período de 1 h possibilitou a maior recuperação de RSV ( $1,024 \pm 0,036$  mg / L) e, correspondentemente, a maior captura de DPPH ( $23,90 \pm 0,04\%$ ) e o conteúdo de FT com ( $27,26 \pm 0,26$  mg / g de EAG). Na EAU, o rendimento máximo de FT (357,18 mg / g de GAE) e RSV (2,14 mg / L), bem como o AA mais efetiva (70,95%), foram obtidos com 5 min de exposição após um período de 5 min. de pré-tratamento por maceração, na proporção sólido-solvente 1:40 p / v. Para o EAM, aplicou-se um delineamento do composto central rotacional (DCCR) para avaliar os efeitos estatísticos de quatro variáveis independentes na extração de RSV. As condições ideais estabelecidas para obter a maior recuperação de RSV (2,516 mg / g) foram: 20 min; 90% MeOH aq.; 120 rpm; 60 ° C e relação sólido-solvente: 1:35 p / v. Correlações relevantes foram estabelecidas considerando os teores de FT, RSV e AA, evidenciando as vantagens destas técnicas em termos de eficiência de extração. A identificação dos constituintes por GC / MS revelou a presença de novas substâncias aleloquímicas na espécie. Substâncias isoladas na mistura ou não no extrato hexânico de caules de *A. repens* indicam a presença de esteróides como o sitosterol, estigmasterol e lupeol. A estas substâncias atribui-se a atividade alelopática conhecida na literatura. A partição de diclorometano do extrato metanólico de caules e folhas mostrou um efeito alelopático inibitório tanto para hipocótilo como em radículas *L. sativa* e nas ervas daninhas *Commelina benghalenses* e *Panicum máximo*.

Palavras-chave: *Arachis repens*. Atividade alelopática. Extração Assistida por Micro-ondas. *trans*-resveratrol.

## ABSTRACT

GARCIA, Leonardo de Carvalho. **Optimization of extractive methods, phytochemical and biological research of *Arachis repens* HANDRO (Fabaceae)**. 2016. 251f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

The vegetal species *Arachis repens*, commonly known as peanut grass, was studied and, for the first time, we detected the presence of the bioactive compound *trans*-resveratrol (t-RSV). We compared the efficiency of three different methodologies (conventional Maceration [CM], ultrasound [UAE] and microwave [MAE] assisted extractions) concerning total phenolics (TP) and resveratrol (t-RSV) content, followed by antioxidant activity (AA) evaluation. By CM, at 1 h, it was found the highest RSV content ( $1.024 \pm 0.036$  mg / L) and, correspondingly, the highest DPPH capture ( $23.90 \pm 0.04\%$ ). The TP contents, at 1h, presented the highest value ( $27.26 \pm 0.26$  mg/g GAE). By the UAE, the maximum yield of TP (357.18 mg/g GAE) and RSV (2.14 mg/L), as well as, the highest AA (70.95%), were obtained by 5 min after a maceration pre-treatment, on the solid-solvent ratio 1:40 w/v. For MAE, a central composite rotatable design (CCRD) was applied followed by the FFD design in order to evaluate the statistical effects of four independent variables on the extraction of RSV. The optimal conditions established for obtaining the highest recovery (2.516 mg/g) were: 20 min; 90% MeOH aq.; 120 rpm; 60°C and, solid-solvent ratio: 1:35 w/v. Relevant correlations were established considering the TP and RSV contents, as well as, the AA, corroborating obvious advantages of such techniques in terms of high extraction efficiency in shorter times. The identification of the constituents by GC / MS revealed the presence of novel allelochemical substances in the species. Substances isolated in mixture or do not indicate the presence of steroids such as sitosterol, stigmasterol and lupeol in the hexanic extract of *A. repens* stems. These substances are attributed to the allelopathic activity known in the literature. The dichloromethane partition of the methanolic extract of stems and leaves showed an inhibitory allelopathic effect for both hypocotyls as in *L. sativa* radicles and in the weeds *Commelina benghalenses* and *Panicum maximum*.

Keywords : *Arachis repens*; allelopathic activity; microwave-assisted extraction, phenols, *trans*-resveratrol.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Estrutura química do Brassinolídeo.....	40
Figura 2-	Estrutura química dos derivados do ácido benzóico que apresentam atividade alelopática.....	41
Figura 3-	Estrutura química dos derivados do ácido cinâmico que apresentam atividade alelopática.....	41
Figura 4-	Fenóis com atividade alelopática em <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	42
Figura 5-	Flavonóides com atividade alelopática.....	43
Figura 6-	Estrutura química da Sorgoleona.....	44
Figura 7-	Estrutura química da Hipericina.....	44
Figura 8-	Terpenos com atividade aleloquímica.....	45
Figura 9-	Ácidos hidroxinâmicos com atividade alelopática.....	46
Figura 10-	Acalóide Juliprosina isolado de <i>Prosopis juliflora</i> .....	47
Figura 11-	Alcalóide isolado de <i>Chenopodium album</i> .....	47
Figura 12-	Estrutura química da Castaligenina B <sub>2</sub> .....	47
Figura 13-	Área de ocorrência natural das espécies do gênero <i>Arachis</i> na América do Sul, com destaque para as seções taxonômicas.....	54
Figura 14-	<i>Arachis repens</i> .....	55
Figura 15-	Principais ácidos já identificados em <i>Arachis</i> .....	56
Figura 16-	Principais flavonóides e derivados já identificados em <i>Arachis</i> .....	59
Figura 17-	Antioxidantes sintéticos disponíveis comercialmente.....	60
Figura 18-	Principais estilbenos encontrados em <i>A. hypogaea</i> .....	62
Figura 19-	Metabólitos secundários já identificados em espécies do gênero <i>Arachis</i> .....	64
Figura 20-	Mecanismos de migração dos leucócitos para o sítio inflamatório. (A) detalhe e (B) visão geral das etapas da migração: 1. Rolamento, 2. Ativação das integrinas, 3. Adesão estável e 4. Migração/diapedese.....	71
Figura 21-	Representação esquemática dos possíveis eventos de evolução do processo inflamatório agudo.....	72
Figura 22-	Sinalização de citocinas.....	74
Figura 23-	Estrutura química do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila).....	85
Figura 24-	Curva padrão do ácido gálico.....	86
Figura 25-	Curva padrão de resveratrol em cinco diferentes concentrações (mg.L <sup>-1</sup> ).....	87

Figura 26-	Esquema da partição líquido-líquido do extrato metanólico bruto de <i>A. repens</i> para a obtenção das partições orgânicas e o resíduo aquoso.....	88
Figura 27-	Fotografia da coluna cromatográfica do extrato hexânico do caule utilizando como fase estacionária a resina XAD-16. Dimensões da coluna: 57 cm de altura x 4 cm de diâmetro.....	90
Figura 28-	Morfogênese <i>in vitro</i> a partir de explantes <i>A. repens</i> inoculados em meio MS suplementado com TDZ.....	102
Figura 29-	Acúmulo de biomassa (g) de calos compactos de <i>A. repens</i> provenientes de segmentos internodais, cultivados em meio suplementado com diferentes concentrações de TDZ, após 30 dias de cultura, a temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$ (A) e $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (B). PF = peso fresco; PS = peso seco.....	104
Figura 30-	Acúmulo de biomassa (g) de calos compactos de <i>A. repens</i> provenientes de segmentos nodais, cultivados em meio suplementado com diferentes concentrações de TDZ, após 30 dias de cultura, a temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$ (A) e $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (B).....	105
Figura 31-	Teor de resveratrol em extratos metanólicos (80%) de calos de <i>A. repens</i> , provenientes de segmentos nodais cultivados em meio MS suplementado com TDZ a $13,6 \mu\text{M}$ , elicitados por diferentes tempos (1, 5 e 10 minutos) e incubados por diferentes períodos (0, 72 e 120 horas), em temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ).....	106
Figura 32-	Teor de resveratrol e captura do radical DPPH em extratos de folhas de <i>A. repens</i> em solução aquosa de metanol em diferentes proporções (40, 60, 80 e 100%).....	107
Figura 33-	Efeito do tempo de exposição ao ultrassom sobre a eficiência de extração de resveratrol e da captura do radical DPPH a partir de folíolos de <i>A. repens</i> em metanol a 80%.....	109
Figura 34-	Teor de resveratrol e percentual de captura do radical DPPH em extratos de <i>A. repens</i> , em diferentes tempos de pré-tratamento por maceração antes da exposição ao ultrassom por 5 minutos. ....	110
Figura 35-	Teor de resveratrol e percentual de captura do radical DPPH em extratos metanólicos (80%) de folíolos de <i>A. repens</i> , em diferentes proporções sólido/líquido. ....	111

Figura 36-	Avaliação do tempo de extração de resveratrol por micro-ondas sob as seguintes condições: St = 600 rpm; T = 30°C; S = 60% e m = 1:60.....	112
Figura 37-	Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para a extração de resveratrol em função da temperatura e da agitação.....	117
Figura 38-	Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para a extração de resveratrol em função da agitação e da concentração do solvente.....	117
Figura 39-	Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para a extração de resveratrol em função da massa e da agitação.....	118
Figura 40-	Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para a extração de resveratrol em função da temperatura e da concentração do solvente.....	118
Figura 41-	Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para a extração de resveratrol em função da temperatura e da massa.....	119
Figura 42-	Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para a extração de resveratrol em função da concentração do solvente e da massa.....	119
Figura 43-	Análise por CCD das partições hexânica dos extratos metanólicos de folhas (PHF) e caules (PHC) e dos extratos brutos em hexano das folhas (HF) e caules (HC) de <i>Arachis repens</i> . Res – padrão de resveratrol. Como eluente foi utilizado clorofórmio: acetato de etila: ácido fórmico (2,5:1:0,1), revelados com ANS. (A) CCD observada a 365 nm e (B) CCD após revelação.....	121
Figura 44-	Análise por CCD em gel de sílica das frações M1 (ND), M2 (37,6 mg), M3 (12,4 mg) e M4 (5,2 mg) provenientes do fracionamento do extrato bruto em <i>n</i> -hexano de caules.....	122
Figura 45-	Análise por CCD em gel de sílica das frações M2A23 a M2A28, reveladas com ANS e eluída em <i>n</i> -hexano:acetato (8:2).....	122
Figura 46-	Estruturas químicas dos esteróides estigmasterol, sitosterol, campesterol e $\Delta^5$ -avenasterol.....	124
Figura 47-	Espectro de ressonância magnética de $^{13}\text{C}$ (100 MHz em $\text{CDCl}_3$ ) da amostra M2A23-25 purificada do extrato hexânico do caule de <i>A. repens</i> .....	125
Figura 48-	Espectro de ressonância magnética de hidrogênio (500 MHz em $\text{CDCl}_3$ ) da amostra M2A23-25 purificada do extrato hexânico do caule de <i>A. repens</i> .....	126
Figura 49-	Análise por CCD em gel de sílica a 254 nm (A); 365 nm (B) e reveladas com anisaldeído sulfúrico (C) das frações M13-M17 (17) e M18-M20 (20).....	128

Figura 50-	Análise por CCD em gel de sílica das sub-frações de M 2 do extrato hexânico do caule de <i>Arachis repens</i> . A – visualização a 365 nm e B – visualização após revelação com ANS. Eluente: hexano/acetato de etila 8/2.....	128
Figura 51-	Perfil cromatográfico em CG-EM da sub-fração H2 proveniente de sucessivos fracionamentos de EHF. Pico majoritário (nº 24) em 16,8 minutos.....	129
Figura 52-	A - Espectro de massas da substância (pico nº 24) identificada como ácido <i>n</i> -hexadecanoico, $t_R$ 16,80 min. B – Espectro do banco de dados.....	130
Figura 53-	Perfil cromatográfico em CG do extrato hexânico de caules de <i>A. repens</i> .....	131
Figura 54-	Perfil cromatográfico em CG da sub-fração M11 proveniente de sucessivos fracionamentos de EHC. Pico majoritário (nº 10) em 30,17 min.....	132
Figura 55-	A - Espectro de massas da substância (pico nº 10) identificada como lupeol em 30,17 min. B – Espectro do banco de dados.....	132
Figura 56-	Perfil cromatográfico em CG da sub-fração M18-19 proveniente de sucessivos fracionamentos de EHC. Picos majoritários (nº 16, 17 e 19) em 27,76, 28,11 e 28,97 minutos, respectivamente.....	133
Figura 57-	A - Espectro de massas da substância (pico nº 16) identificada como campesterol, $t_R$ 27,76 min. B – Espectro do banco de dados.....	133
Figura 58-	A - Espectro de massas da substância (pico nº 17) identificada como estigmasterol. $t_R$ 28,11 min. B – Espectro do banco de dados.....	133
Figura 59-	A - Espectro de massas da substância (pico nº 19) identificada como $\gamma$ -sitosterol, $t_R$ 28,97 min. B – Espectro do banco de dados.....	134
Figura 60-	Perfil cromatográfico em CG da sub-fração H4 proveniente de sucessivos fracionamentos de EHF.....	134
Figura 61-	A - Espectro de massas da substância (nº 10) identificada como $\alpha$ -metoxi-p-cresol, $t_R$ 8,999 min. B – Espectro do banco de dados.....	134
Figura 62-	A - Espectro de massas da substância (nº 92) identificada como campesterol, $t_R$ 27,765 min. B – Espectro do banco de dados.....	135
Figura 63-	A - Espectro de massas da substância (nº 93) identificada como estigmasterol, $t_R$ 28,097 min. B – Espectro do banco de dados.....	135
Figura 64-	A - Espectro de massa da substância (nº 94) identificada como $\beta$ -sitosterol, $t_R$ 28,918 min. B – Espectro do banco de dados.....	135

Figura 65-	Avaliação da atividade alelopática dos extratos brutos de folíolos de <i>Arachis repens</i> em n-hexano de hipocótilos (A) e radículas (B); diclorometano em hipocótilos (C) e radículas (D) e metanol em hipocótilos (E) e radículas (F).....	137
Figura 66-	Avaliação da atividade alelopática dos extratos brutos de caules de <i>Arachis repens</i> em n-hexano de hipocótilos (A) e radículas (B); diclorometano em hipocótilos (C) e radículas (D) e metanol em hipocótilos (E) e radículas (F).....	138
Figura 67-	Avaliação da atividade alelopática das partições orgânicas do extrato metanólico de caules em: n-hexano em hipocótilos (A) e radículas (B), diclorometano em hipocótilos (C) e radículas (D) e acetato de etila em hipocótilos (E) e radículas (F).....	140
Figura 68-	Avaliação da atividade alelopática da partição butanólica sobre hipocótilos (A) e radículas (B) e resíduo aquoso sobre hipocótilos (C) e radículas (D) de caules de <i>Arachis repens</i> em <i>L. sativa</i> .....	141
Figura 69-	Avaliação da atividade alelopática da partição n-hexano sobre hipocótilos (A) e radículas (B) diclorometano sobre hipocótilos (C) e radículas (D) e acetato de etila sobre hipocótilos (E) e radículas (F) de folhas de <i>Arachis repens</i> .....	143
Figura 70-	Avaliação da atividade alelopática da partição butanólica sobre hipocótilos (A) e radículas (B) e resíduo aquoso sobre hipocótilos (C) e radículas (D) de folhas de <i>Arachis repens</i> .....	144
Figura 71-	Avaliação da atividade alelopática das frações da partição em AcOEt do extrato metanólico de folhas de <i>A. repens</i> sobre hipocótilos (A) e radículas (B) em <i>L. sativa</i> à 194 ppm.....	146
Figura 72-	Avaliação da atividade alelopática das frações da partição butanólica do extrato metanólico de folhas de <i>A. repens</i> sobre hipocótilos (A) e radículas (B) em <i>L. sativa</i> à 424 ppm.....	148
Figura 73-	Avaliação da atividade alelopática dos padrões de $\beta$ -sitosterol e stigmasterol sobre hipocótilos (A) e radículas (B) em <i>L. sativa</i> .....	152
Figura 74-	Perfil cromatográfico da partição em diclorometano do extrato metanólico do caule de <i>A. repens</i> .....	155
Figura 75-	Perfil cromatográfico da partição em diclorometano do extrato metanólico de folhas de <i>A. repens</i> .....	157



Figura 76-	Avaliação da inibição da produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos RAW 264.7 na presença da espécie vegetal <i>Arachis repens</i> .....	159
Figura 77-	Avaliação da inibição da produção da TNF- $\alpha$ em macrófagos RAW 264.7 na presença da espécie vegetal <i>Arachis repens</i> .....	160
Figura 78-	Efeito citotóxico em macrófagos RAW 264.7 na presença da espécie vegetal <i>Arachis repens</i> .....	162

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Valores reais e codificados para as variáveis independentes utilizadas no planejamento fatorial $2^{4-1}$ .....	82
Tabela 2-	Variáveis independentes estudadas no Planejamento fatorial fracionário (FFD).	83
Tabela 3-	Valores reais e codificados (+ nível superior, 0 nível intermediário, - nível inferior) para as variáveis independentes utilizadas no Delineamento Composto Central Rotacional $2^{4-1}$ .....	83
Tabela 4-	Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) proposto para a otimização do processo.....	84
Tabela 5-	Sistema de solventes utilizados como fase móvel para o refractionamento da fração M2.....	91
Tabela 6-	Sistema de solventes utilizados como fase móvel para o refractionamento da reunião das frações M13-M20.....	92
Tabela 7-	Sistema de solventes utilizados como fase móvel para o refractionamento da sub-fração 2 da reunião das frações M13-M20.....	92
Tabela 8-	Calogênese <i>in vitro</i> a partir de segmentos nodais e internodais de <i>A. repens</i> em meio suplementado com diferentes concentrações de TDZ, após 30 dias de cultura.....	103
Tabela 9-	Conteúdo de fenóis totais em extratos metanólicos de folhas de <i>A. repens</i> em resposta a diferentes concentrações do solvente.....	108
Tabela 10-	Conteúdo de fenóis totais em extratos metanólicos de folhas de <i>A. repens</i> em resposta a exposição ao ultrassom por 5 minutos, após pré-tratamento por maceração por 5 minutos, em diferentes proporções (sólido-líquido).....	111
Tabela 11-	Planejamento fatorial e resultados da FFD para cada extração estudada.....	112
Tabela 12-	Estimativa dos efeitos para as variáveis estudadas na otimização da extração de resveratrol assistida por micro-ondas.....	113
Tabela 13-	Delineamento Composto Central Rotacional e resultados cada extração estudada.....	115
Tabela 14-	Estimativa dos efeitos para as variáveis estudadas pelo DCCR na otimização da extração de resveratrol assistida por micro-ondas.....	116

Tabela 15-	Estimativa dos efeitos para as variáveis estudadas pelo teste de Fisher e teste de T de Student na otimização da extração de resveratrol assistida por micro-ondas.....	116
Tabela 16-	Rendimento dos extratos brutos de folhas e caules de <i>Arachis repens</i> .....	120
Tabela 17-	Rendimento das partições líquido-líquido obtidas dos extratos metanólicos brutos das folhas (3,76 g) e caules (3,65 g).....	121
Tabela 18-	Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C de M2 a 23-25 solubilizado em CDC <sub>13</sub> isolado de <i>A. repens</i> e comparação com a literatura.....	127
Tabela 19-	Valores de concentração inibitória 50% (CI <sub>50</sub> ) para os extratos brutos em n-hexano, diclorometano e metanol.....	136
Tabela 20-	Valores de concentração inibitória de 50% (CI <sub>50</sub> ) para as partições dos extratos brutos em metanol.....	145
Tabela 21-	Rendimento das frações da partição acetato de etila de folhas <i>A. repens</i> em coluna Sephadex LH-20 dos extratos metanólicos bruto.....	145
Tabela 22-	Avaliação do efeito da inibição na germinação de sementes de <i>L. sativa</i> das partições do extrato metanólico de folhas de <i>A. repens</i> .....	146
Tabela 23-	Rendimento das frações da partição butanólica de folhas <i>A. repens</i> em coluna Sephadex LH-20 dos extratos metanólicos bruto.....	147
Tabela 24-	Avaliação da atividade antioxidante das partições em AcOEt e Butanol proveniente dos extratos brutos metanólicos de folhas de <i>A. repens</i> pela captura do radical DPPH.....	150
Tabela 25-	Conteúdo de fenóis totais das frações das partições em AcOEt e Butanólica do extrato metanólico de folhas de <i>A. repens</i> .....	150
Tabela 26-	Avaliação da porcentagem de inibição da germinação em sementes de <i>L. sativa</i> dos padrões $\beta$ -sitosterol e Stigmasterol.....	151
Tabela 27-	Avaliação da atividade alelopática de extratos metanólicos brutos de folhas de <i>A. repens</i> na inibição do crescimento de hipocótilos e radículas de <i>Panicum maximum</i> e <i>Calopogonium mucunoides</i> .....	153
Tabela 28-	Substâncias identificadas na partição em diclorometano do extrato metanólico de caules de <i>A. repens</i> e seus respectivos índices de similaridades (IS), tempo de retenção (TR), área relativa do pico (área), pico base (PB), fórmula molecular (FM) e massa.....	154

Tabela 29- Substâncias identificadas na partição em diclorometano do extrato metanólico de folhas de *A. repens* e seus respectivos índices de similaridades (IS), tempo de retenção (TR), área relativa do pico (área), pico base (PB), fórmula molecular (FM) e massa.....

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%AA	Atividade antioxidante
Abs	Absorvância
ACN	Acetonitrila
AIA	Ácido indolacético
AIB	Ácido Indolbutírico
ANOVA	Análise de variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAP	6-benzilaminopurina
BHA	Butilhidroxianisol
BHT	Butilhidroxitolueno
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG-EM	Cromatografia em fase Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DFE	Delineamento Fatorial Fracionário
DIBOA	<i>2,4-dihydroxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one</i>
DIMBOA	<i>2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one</i>
DMEM	<i>Dulbecco Medium Eagle Modified</i>
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazila
EAG	Equivalência em Ácido Gálico
EAM	Extração Assistida por Micro-ondas
EAU	Extração Assistida por Ultrassom
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>

EFS	Extração com Fluido Supercrítico
ELP	Extração com Líquido Pressurizado
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
HRJ	Herbário do Rio de Janeiro
IFN-g	Interferon-g
KIN	Kinetin (6-furfurilaminopurina)
LPS	Lipopolissacarídeo
MS	Meio de cultura Murashige e Skoog
MØ	Macrófagos
MOI	Macrófagos infectados
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazol
NO	<i>Nitric Oxide</i>
PAF	<i>Platelet Activating Factor</i>
PIC	Picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico)
SC-CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono supercrítico
TDZ	Tidiazuron
TNF- $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Factor-alfa</i>
TNF- $\beta$	<i>Tumor Necrosis Factor-beta</i>
TBHQ	<i>terc</i> -butilhidroxiquinona
US	Ultrassom

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	30
1	<b>METABOLISMO VEGETAL</b> .....	31
1.1	<b>Respostas fisiológicas a fatores bióticos</b> .....	32
1.1.1	<u>Proteção contra herbivoria e doenças</u> .....	32
1.2	<b>Alelopatia</b> .....	35
1.2.1	<u>Plantas daninhas</u> .....	37
1.3	<b>Fitoquímica</b> .....	38
1.3.1	<u>Principais classes de aleloquímicos e suas aplicações</u> .....	39
1.3.1.1	Esteróides.....	39
1.3.1.2	Compostos fenólicos.....	40
1.3.1.3	Quinonas.....	43
1.3.1.4	Terpenos.....	44
1.3.1.5	Ácido hidroxinâmicos.....	45
1.3.1.6	Alcalóides.....	46
1.4	<b>Técnicas de extração</b> .....	47
1.4.1	<u>Química verde e as técnicas extrativas associadas</u> .....	48
1.5	<b>O gênero <i>Arachis</i></b> .....	52
1.5.1	<u><i>Arachis repens</i></u> .....	54
1.5.2	<u>Constituintes químicos <i>versus</i> Atividade biológica no gênero <i>Arachis</i></u> .....	54
1.5.2.1	Atividade antioxidante de substâncias bioativas em <i>Arachis</i> .....	56
1.5.2.2	Resveratrol.....	59
1.6	<b>Cultura de tecidos de vegetais</b> .....	64
1.6.1	<u>Cultura de tecidos de espécies do gênero <i>Arachis</i></u> .....	65
1.7	<b>Inflamação</b> .....	67
1.7.1	<u>Fator de necrose tumoral (TNF<math>\alpha</math>)</u> .....	73
1.7.2	<u>Neutrófilos e a produção de óxido nítrico</u> .....	74
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	78
2.1	<b>Objetivo geral</b> .....	78
2.1.1	<u>Objetivos específicos</u> .....	78
3	<b>METODOLOGIA</b> .....	79
3.1	<b>Material vegetal</b> .....	79

3.2	<b>Indução de calogênese.....</b>	79
3.3	<b>Metodologias extrativas para obtenção de reverastrol e fenólicos totais: estudos da correlação com atividade antioxidante.....</b>	80
3.3.1	<u>Extração por maceração do material <i>in vitro</i>.....</u>	80
3.3.2	<u>Elicitação por ultrassom do material <i>in vitro</i>.....</u>	80
3.3.3	<u>Extração por maceração do material <i>in vivo</i>.....</u>	81
3.3.4	<u>Extração assistida por ultrassom do material <i>in vivo</i>.....</u>	81
3.3.5	<u>Extração assistida por reator micro-ondas do material <i>in vivo</i>.....</u>	82
3.3.5.1	Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para a otimização da extração de resveratrol assistida por micro-ondas.....	83
3.4	<b>Avaliação de atividades antioxidante.....</b>	84
3.4.1	<u>Capacidade de captura do radical DPPH.....</u>	84
3.5	<b>Determinação de fenóis totais.....</b>	85
3.6	<b>Análise dos extratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – detector "photodiodearray" (CLAE-DAD) para determinação da concentração de reverastrol.....</b>	86
3.7	<b>Estudos fitoquímicos.....</b>	87
3.7.1	<u>Obtenção dos extratos brutos do material <i>in vivo</i>.....</u>	87
3.7.1.1	Obtenção das partições a partir do extrato metanólico.....	88
3.7.2	<u>Fracionamento da partição acetato de etila de folhas de <i>A. repens</i> em coluna Sephadex LH-20 .....</u>	88
3.7.3	<u>Fracionamento da partição em butanol de folhas de <i>A. repens</i> em coluna Sephadex LH-20.....</u>	89
3.7.4	<u>Fracionamento cromatográfico em coluna XAD-16 do extrato bruto hexânico de caules de <i>Arachis repens</i>.....</u>	89
3.7.4.1	Reunião das frações oriundas do extrato hexânico dos caules após eluição em metanol em coluna empacotada com XAD-16.....	90
3.7.4.2	Fracionamento por cromatografia em coluna aberta da sub-fração M2 proveniente da eluição com metanol no fracionamento do extrato hexânico de caules de <i>A. repens</i> .....	90
3.7.4.3	Fracionamento por cromatografia em coluna aberta da sub-fração M13-20 proveniente do extrato hexânico de caules de <i>A. repens</i> .....	91



3.7.5	<u>Fracionamento cromatográfico em coluna XAD-16 do extrato bruto hexânico de folhas de <i>Arachis repens</i>.....</u>	93
3.7.6	<u>Análises Cromatográficas.....</u>	93
3.7.6.1	Análises em cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas.....	93
3.7.6.2	Análises em cromatografia em camada delgada.....	94
3.8	<b>Avaliação de atividades biológicas e farmacológicas dos extratos e partições do material <i>in vivo</i> de <i>A. repens</i>.....</b>	95
3.8.1	<u>Determinação da atividade alelopática.....</u>	95
3.8.1.1	Crescimento de hipocótilos e raízes.....	96
3.8.2	<u>Metodologia utilizada nos bioensaios com sementes das espécies daninhas <i>Commelina benghalenses</i> e <i>Panicum maximum</i>.....</u>	97
3.9	<b>Atividade imunomoduladora em cultura de macrófagos RAW 264.7.....</b>	97
3.9.1	<u>Linhagens celulares (Macrófagos RAW 264.7 e Fibroblastos L929).....</u>	98
3.9.2	<u>Cultura e preparação dos ensaios em macrófagos RAW 264.7.....</u>	98
3.9.3	<u>Ensaio da capacidade de inibição da produção de óxido nítrico (NO).....</u>	99
3.9.4	<u>Produção de TNF-<math>\alpha</math> por macrófagos (bioensaio com células L929).....</u>	99
3.9.5	<u>Avaliação da citotoxicidade na linhagem de macrófagos RAW 264.7.....</u>	100
3.10	<b>Análise estatística.....</b>	101
4	<b>RESULTADOS.....</b>	102
4.1	<b>Morfogênese <i>in vitro</i>.....</b>	102
4.1.1	<u>Morfogênese <i>in vitro</i> em resposta a TDZ.....</u>	102
4.1.2	<u>Elicitação de calos de <i>A. repens</i> por ultrassom.....</u>	106
4.2	<b>Estudo da correlação da concentração de reverastrol e fenóis totais obtidos sob diferentes condições extrativas com a atividade antioxidante..</b>	106
4.2.1	<u>Avaliação da extração por maceração do material <i>in vivo</i>.....</u>	106
4.2.1.1	Avaliação da proporção metanol-água como solvente de extração.....	107
4.2.1.2	Avaliação do teor de fenóis totais em extratos com diferentes proporções de MeOH . H <sub>2</sub> O.....	107
4.3	<b>Avaliação da extração assistida por ultrassom do material <i>in vivo</i>.....</b>	108
4.3.1	<u>Otimização do período de extração.....</u>	108
4.3.2	<u>Otimização do tempo de pré-tratamento.....</u>	109

4.3.3	<u>Otimização da proporção sólido-solvente para a extração.....</u>	110
4.4	<b>Extração assistida por micro-ondas.....</b>	111
4.4.1	<u>Delineamento do Composto Central Rotacional (DCCR) para a otimização da extração de resveratrol assistida por micro-ondas.....</u>	113
4.5	<b>Estudo fitoquímico com o material <i>in vivo</i>.....</b>	119
4.5.1	<u>Rendimento dos extratos brutos e partições.....</u>	119
4.5.2	<u>Análise por CCD dos extratos brutos em hexano das folhas (HF) e caules (HC) e das partições hexânicas de folhas (PHF) e caules (PHC).....</u>	121
4.5.3	<u>Fracionamento do extrato hexânico de caules por cromatografia em coluna utilizando XAD-16 como adsorvente.....</u>	122
4.5.3.1	Fracionamento da fração M13-M20.....	127
4.6	<b>Fracionamento do extrato hexânico de folhas por cromatografia em coluna utilizando XAD-16 como adsorvente.....</b>	129
4.7	<b>Análise do extrato hexânico de caules (EHC) de <i>Arachis repens</i> por CG-EM.....</b>	131
4.8	<b>Atividade alelopática.....</b>	136
4.8.1	<u>Atividade alelopática das partições do extrato metanólico de caules de <i>A. repens</i>.....</u>	139
4.8.2	<u>Atividade alelopática das partições do extrato metanólico de folhas de <i>A. repens</i>.....</u>	142
4.8.2.1	Fracionamento biomonitorado da partição acetato de etila de folhas de <i>A. repens</i> em coluna Sephadex LH-20.....	145
4.8.2.2	Fracionamento biomonitorado da partição em butanol de folhas de <i>A. repens</i> em coluna Sephadex LH-20.....	147
4.8.3	<u>Avaliação da atividade antioxidante em DPPH das frações das partições em AcOEt e Butanol dos extratos brutos de folhas de <i>A. repens</i>.....</u>	149
4.8.4	<u>Avaliação do teor de fenóis totais das frações das partições em AcOEt e butanólica proveniente do extrato metanólico bruto de folhas de <i>A. repens</i>.....</u>	150
4.8.5	<u>Avaliação do efeito alelopáticos dos fitosteróis <math>\beta</math>-sitosterol e Stigmasterol.....</u>	151
4.8.6	<u>Bioensaios com sementes das espécies daninhas <i>Panicum maximum</i> e <i>Calopogonium mucunoides</i>.....</u>	153
4.9	<b>Análise da partição em diclorometano do extrato metanólico de caules (EMC) e folhas (EMF) de <i>Arachis repens</i> por CG-EM.....</b>	154

4.10	<b>Atividade imunomoduladora</b> .....	159
	<b>DISCUSSÃO</b> .....	163
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	182
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	183
	<b>ANEXO A</b> - Tabela de composição do meio MS.....	203
	<b>ANEXO B</b> - Espectro de massa da substância identificada como <i>p</i> -Vinilguaiacol, tr. 12,57 min, 7,53%.....	204
	<b>ANEXO C</b> - Espectro de massas da substância identificada como ácido salicílico, tr. 12,95 min.....	205
	<b>ANEXO D</b> - Espectro de massas da substância identificada como methylisoborneol, tr. 19,15 min. ....	206
	<b>ANEXO E</b> - Espectro de massas da substância identificada como 3-hidroxi- $\beta$ -damascona, tr. 19,83 min. ....	207
	<b>ANEXO F</b> - Estrutura do 3-hidroxi- $\beta$ -damascona. ....	208
	<b>ANEXO G</b> - Espectro de massas da substância identificada como 3-oxo- $\alpha$ -ionol, tr. 20,52 min. ....	209
	<b>ANEXO H</b> - Estrutura do 3-oxo- $\alpha$ -ionol. ....	210
	<b>ANEXO I</b> - Espectro de massas da substância identificada como siringaldeído, tr. 20,83 min. ....	211
	<b>ANEXO J</b> - Estrutura do siringaldeído. ....	212
	<b>ANEXO K</b> - Espectro de massas da substância identificada como trans- $\beta$ -ionona-5,6-epóxido, tr. 21,49 min. ....	213
	<b>ANEXO L</b> - Estrutura do trans- $\beta$ -ionona-5,6-epóxido.....	214
	<b>ANEXO M</b> - Espectro de massas da substância identificada como diidro- $\alpha$ -ionona, tr. 22,30 min.....	215
	<b>ANEXO N</b> - Estrutura do diidro- $\alpha$ -ionona.....	216
	<b>ANEXO O</b> - Espectro de massas da substância identificada como <i>p</i> -hidroxi-cinamato de metila, tr. 23,06 min.....	217
	<b>ANEXO P</b> - Estrutura do <i>p</i> -hidroxi-cinamato de metila.....	218
	<b>ANEXO Q</b> - Espectro de massas da substância identificada como Loliolideo, tr. 23,30 min.....	219
	<b>ANEXO R</b> - Estrutura do loliolideo.....	220

<b>ANEXO S</b> - Espectro de massas da substância identificada como $\beta$ -asarona, tr. 24,71 min.....	221
<b>ANEXO T</b> - Estrutura do $\beta$ -asarona.....	222
<b>ANEXO U</b> - Espectro de massas da substância identificada como ferulato de metila, tr. 25,39 min.....	223
<b>ANEXO V</b> - Estrutura do ferulato de metila.....	224
<b>ANEXO W</b> - Espectro de massas da substância identificada como palmitato de metila, tr. 26,53 min.....	225
<b>ANEXO X</b> -Espectro de massa da substância identificada como ácido hexadecanóico, tr. 27,22 min.....	226
<b>ANEXO Y</b> -Espectro de massas da substância identificada como <i>trans</i> -asarona ( $\alpha$ -asarona), tr. 27,54 min.....	227
<b>ANEXO Z</b> - Estrutura do <i>trans</i> -asarona.....	228
<b>ANEXO AA</b> - Espectro de massas da substância identificada como 1-heptadeceno, tr. 29,57 min.....	229
<b>ANEXO BB</b> - Espectro de massa da substância identificada como esqualeno, tr. 41,19 min.....	230
<b>ANEXO CC</b> - Espectro de massas da substância identificada como 4-vinilfenol, tr. 10,24 min.....	231
<b>ANEXO DD</b> - Espectro de massa da substância identificada como 2-Methoxy-5-vinylphenol, tr. 12,55 min.....	232
<b>ANEXO EE</b> -Espectro de massas da substância identificada como ácido salicílico, tr. 12,94 min.....	233
<b>ANEXO FF</b> - Espectro de massas da substância identificada como 3-oxo- $\alpha$ -ionol, tr. 20,52 min.....	234
<b>ANEXO GG</b> - Espectro de massas da substância identificada como siringaldeído, tr. 20,81 min.....	235
<b>ANEXO HH</b> - Espectro de massas da substância identificada como <i>p</i> -hidroxicinamato de metila, tr. 23,0 min.....	236
<b>ANEXO II</b> - Espectro de massas da substância identificada como loliolídeo, tr. 23,34 min.....	237
<b>ANEXO JJ</b> - Espectro de massa da substância identificada como vomifoliol, tr. 23,74 min.....	238

<b>ANEXO KK</b> - Estrutura do vomifoliol.....	239
<b>ANEXO LL</b> - Espectro de massas da substância identificada como alfa- asarona, tr. 27,52 min.....	240
<b>ANEXO MM</b> - "Optimized Extraction of Resveratrol from <i>Arachis repens</i> Handro by Ultrasound and Microwave: A Correlation Study with the Antioxidant Properties and Phenol Contents," .....	241

## **INTRODUÇÃO**

As plantas superiores são uma das fontes mais extraordinárias de substâncias que podem ser utilizadas diretamente como agentes medicinais. Também fornecem modelos para modificações estruturais e otimização das propriedades farmacológicas e bioquímicas (BRAZ-FILHO, 2010).

Desde os primórdios das civilizações, mesmo que empiricamente, as plantas foram usadas pela população como fontes de produtos medicinais e jamais foram ou serão completamente substituídas pelos fármacos sintéticos (BRESOLIN e CECHINEL-FILHO, 2003).

## 1 METABOLISMO VEGETAL

Sabe-se que boa parte dos fármacos de origem vegetal utilizados atualmente foi pesquisada e, posteriormente, levada ao mercado baseando-se em informações da medicina tradicional ou da popular, demonstrando assim que as substâncias de origem vegetal têm papel essencial na obtenção de medicamentos e, que partindo do conhecimento popular, bons resultados podem ser obtidos (COLOMBO, 2008).

A quimiotaxonomia, classificação de espécies vegetais pela química, quando associada às observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para o estudo das propriedades terapêuticas dos vegetais. Isto mantém em evidência o consumo de fitoterápicos, validando as informações acumuladas por gerações sobre o uso popular das plantas medicinais. Apesar de muitos desses metabólitos especiais serem bastantes valorizados economicamente, conhecemos apenas uma pequena fração desse arsenal químico. Estima-se que apenas 10 a 30% das espécies de Angiospermas, e cerca de 1% das espécies brasileiras, tenham sido investigadas do ponto de vista químico (GOTTLIEB e BORIN, 2012). O Brasil contém 40.982 espécies da flora brasileira catalogadas, sendo 3.608 de fungos, 3.495 de algas, 1.521 de briófitas, 1.176 de pteridófitas, 26 de gimnospermas e 31.156 de angiospermas (MMA, 2016).

As avaliações fitoquímicas podem contribuir significativamente para a concretização da investigação da flora e seu quimismo, para a divulgação e geração de novos conhecimentos e da formação de recursos humanos qualificados. A química de produtos naturais (QPN) vegetais – fitoquímica, como é concebida atualmente, se dedica principalmente à caracterização estrutural, avaliação de propriedades e investigações biossintéticas de substâncias naturais produzidas pelo metabolismo secundário de organismos vivos (BRAZ-FILHO, 2010).

A vida dos organismos - nascimento, crescimento, reprodução, envelhecimento, doenças e morte – é assegurada e controlada pelas transformações químicas realizadas por metabolismo primário (estudada pelos bioquímicos) e secundário - especializado (objeto de estudo do químico de produtos naturais). Assim, os organismos utilizam biossínteses para transformações e interconversões químicas de metabólitos do seu acervo vivo e dinâmico (BRAZ-FILHO, 2010).

As vias metabólicas são cadeias de reações químicas com ligações catalisadas por enzimas que convertem substratos em produtos através de uma série de compostos intermediários que podem ainda ser de cadeia linear, cíclica ou dispostos em uma rede tridimensional. Eles podem ser

unidirecionais ou reversíveis, podendo existir pontos de conversão. As enzimas podem ser específicas ou podem atuar sobre famílias de moléculas relacionadas com grupos químicos comuns. Os produtos de vias metabólicas podem acumular-se na célula, muitas vezes dentro de compartimentos específicos ou podem ser exocitados. Nas plantas, a complexidade das vias metabólicas pode ser aumentada pela necessidade de intermediários de transporte entre compartimentos celulares ou até mesmo diferentes tipos de células. O fluxo de moléculas através de uma via metabólica pode ser regulado pelos próprios metabólitos, o que muitas vezes influenciam a atividade das enzimas na mesma via (controladas por proteínas de sinalização ou por fatores de transcrição) em um processo conhecido como regulação por *feedback*. Assim, existe um desafio para entender, reconstruir, analisar ou monitorar as vias metabólicas (CASPI, DREHER e KARP, 2013). Este é o objetivo da engenharia genética, que geralmente visa otimizar a acumulação de um metabólito desejável, que naturalmente é produzido em pequenas quantidades. Isso pode envolver a intervenção direta para aumentar a acumulação do produto alvo, aumentando o fluxo através de vias e/ou através da redução do fluxo através de vias concorrentes ou catabólitos que removem intermediários do próprio produto alvo (CAPELL e CHRISTOU, 2004). A engenharia genética pode também ser usada para produzir metabolitos que não são naturalmente produzidos pela célula porque as vias metabólicas correspondentes estão ausentes. Isto requer a importação de um caminho heterólogo parcial ou completa para aumentar a capacidade metabólica celular (FARRÉ *et al.*, 2014).

## 1.1 Respostas fisiológicas a fatores bióticos

### 1.1.1 Proteção contra herbivoria e doenças

As plantas dependem de imunidade inata para proteger-se de ameaças de agentes patogênicos. Essa imunidade é baseada em respostas de defesa pré-formadas ou induzidas (MYSORE e RYU, 2004). Respostas de defesa pré-formadas não são específicas e incluem compostos com propriedades antimicrobianas ou barreiras estruturais tais como a parede celular e o citoesqueleto, que atrapalham os patógenos (MYSORE e RYU, 2004; SENTHIL-KUMAR e MYSORE, 2013). Defesas induzidas são ativadas pela percepção de moléculas dos patógenos, presentes na sua superfície de contato (BOLLER e HE, 2009) ou pelo reconhecimento de proteínas translocadas pelo patógeno para a célula hospedeira (JONES e DANGL, 2006; BONARDI e



DANGL, 2012). As respostas de defesa incluem a reorganização do citoesqueleto celular (HIGAKI *et al.*, 2011), fortificação da parede celular (HARDHAM, JONES e TAKEMOTO, 2007), ativação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (TORRES, 2010) e a síntese de fitoalexinas (AHUJA, KISSEN, e BONES, 2012). Posteriormente, ocorre a transcrição das proteínas patogênicas (VAN LOON, REP e PIETERSE, 2006) e o desenvolvimento da apoptose celular devido a resposta hipersensível aos limites patogênicos, evitando que a contaminação se dissipe (COLL, EPPL e DANGL, 2011). Embora tenham sido feitos progressos consideráveis para entender os mecanismos de defesa das plantas, muito pouco se conhece sobre as vias metabólicas necessárias para o desenvolvimento e a regulação das respostas imunes (ROJAS *et al.*, 2014).

A associação entre o metabolismo primário e mecanismos de defesa foi estudado a partir da análise da expressão de fatores de transcrição de genes que codificam enzimas metabólicas, após a exposição das plantas *Arabidopsis* a estresse biótico, tais como os agentes patogênicos como *Phytophthora infestans* virulentos e não-virulentos e os agentes patogênicos de *Pseudomonas syringae* pv. Tomate DC3000 (Hrc<sup>-</sup>) e *P. syringae* pv. Tomate DC3000 (*AvrRpm1*), e a exposição a patógenos derivado de elicitores Flg22 e HrpZ (moléculas purificadas que induzem mecanismos de defesa) (LESS *et al.*, 2011). Observou-se que após o tratamento com agentes patogênicos virulentos ou não-virulentos ou elicitores derivados de organismos patogênicos, transcritos a partir de categorias funcionais específicas foram regulados positivamente, enquanto outros foram regulados negativamente (ROJAS *et al.*, 2014).

Durante muitos anos, tem sido sugerido que o papel do metabolismo primário, durante a infecção, é suprimir as necessidades metabólicas celulares para o desenvolvimento dos mecanismos de defesa (BOLTON, 2009; KANGASJARVI *et al.*, 2012). Ocorre um grande gasto de energia durante a execução de respostas de defesa da planta, devido à expressão de centenas de genes a partir de várias vias metabólicas (SCHEIDELER *et al.*, 2002). Plantas de *Arabidopsis* mutantes que expressam constitutivamente respostas de defesa são raquíticas e reduziram a fertilidade enquanto que plantas mutantes com inibição de vias de sinalização de defesa crescem mais e são mais altas (HEIL e BALDWIN, 2002). Portanto, parece que, a fim de estabelecer um balanço energético favorável à defesa, ocorre o regulamento acima da média para vias relacionadas a defesa celular, onde este gasto energético é compensado pela baixa tradução de genes envolvidos em outras vias metabólicas. Consistente com esta noção, genes envolvidos na fotossíntese e biossíntese da clorofila foram expressados abaixo da média enquanto que para cima da média os genes relacionados com a proteção contra patógenos virulentos, assim como com derivados de eliciadores ou de organismos patogênicos (SCHOLES e ROLFE, 1996; EHNESS *et al.*, 1997; MOULY *et al.*, 1998; BERGER *et*

*al.*, 2004; SWARBRICK *et al.*, 2006; TRUMAN *et al.*, 2006; DENOUX *et al.*, 2008; BILGIN *et al.*, 2010). Curiosamente, quando se usa a avaliação da produção de clorofila por imagens de fluorescência em diferentes interações planta-microorganismo, foi relatado que as mudanças na fotossíntese ocorreram localmente nas infecções e nos tecidos adjacentes (BERGER *et al.*, 2004; SCHARTE *et al.*, 2005; BONFIG *et al.*, 2006), embora exista a formação de ROS, de forma branda, durante a fotossíntese, estas ROS podem ser usadas para as respostas de defesa e a regulação por diminuição da fotossíntese em contra-partida (ZEIER *et al.*, 2004; ZURBRIGGEN *et al.*, 2009) e nenhuma evidência experimental está disponível para explicar porquê acontece. No entanto, foram propostos dois mecanismos possíveis: (1) supressão da fotossíntese desencadeada por agentes patogênicos efetores (TRUMAN *et al.*, 2006) e (2) a regulação por *feedback*, por mediadores químicos (glicídios) (HERBERS *et al.*, 1996a; SCHARTE *et al.*, 2005; ROLLAND *et al.*, 2006). Independentemente do mecanismo, a regulação para diminuir a taxa fotossintética provavelmente alivia o gasto de energia e isto é associado com a regulação de outras vias que fornecem energia. Por exemplo, a energia pode ser derivada através do aumento das atividades do metabolismo respiratório, invertases na parede celular e os transportadores de carboidratos (SCHARTE *et al.*, 2005; ESSMANN *et al.*, 2008). Essa mudança metabólica pode melhorar a expressão de genes relacionados com a defesa e a produção de metabolitos secundários de plantas, tais como fitoalexinas (BOLTON, 2009).

Embora a maioria destas respostas também ocorram com patógenos virulentos [que efetivamente causam doenças (ALFANO e COLLMER, 1996)], diversos trabalhos já demonstraram que as proteínas efetoras de patógeno bacterianos são translocadas através da maquinaria de secreção especializado em respostas de defesa para suprimir a percepção das plantas e, em alguns casos, a contaminação bacteriana específica ou modifica o metabolismo das plantas para que consiga se desenvolver na planta (TRUMAN *et al.*, 2006; ESPINOSA e ALFANO, 2004; MUDGETT, 2005; RICO, MCCRAW e PRESTON, 2011; ROJAS *et al.*, 2014).

A super-regulação de transcrições está associada com processos envolvidos na produção de energia, tal como a glicólise e a via da pentose fosfato, ciclo do TCA, de transporte de elétrons mitocondriais, biossíntese de ATP, e a biossíntese de alguns aminoácidos como a lisina e a metionina, cujo catabolismo leva à produção de energia, bem como biossíntese de ácido glutâmico, arginina, serina e glicina, que estão associadas com a foto-respiração. A supressão de genes foi associada com processos tais como a fotossíntese, metabolismo do amido, metabolismo lipídico, o metabolismo e a biossíntese dos aminoácidos leucina, isoleucina e valina (LESS *et al.*, 2011; ROJAS *et al.*, 2014). Antes do estudo de todo o genoma, vários outros estudos laboratoriais,

envolvendo poucos genes, associados ao metabolismo primário também tinham fornecido indícios da função do metabolismo primário na regulação de vias metabólicas de defesa. Dado a complexidade da abundância das vias metabólicas primárias, existem evidências experimentais convincentes envolvendo vias metabólicas de carboidratos, aminoácidos e lipídios para apoiar a ligação entre metabolismo primário e os mecanismos de respostas de defesa (ROJAS *et al.*, 2014).

Nos últimos anos verificou-se um esperado crescimento envolvendo a caracterização química de fenótipo. Tal caracterização química pode ser realizada através de análise de macromoléculas (*e.g.* proteômicas e caracterização de polissacarídeos e ligninas) e de moléculas (micromoléculas) de baixo peso molecular (o metaboloma). O metaboloma consiste de dois tipos de substâncias, os metabólitos primários e os secundários. O metabolismo primário fornece as substâncias envolvidas nas funções básicas essenciais da vida celular – respiração e biossíntese de aminoácidos e outras substâncias necessárias para a vida da célula. Basicamente, todos os organismos convivem com os mesmos tipos de metabólitos primários e da incompetência para autoprodução de tais produtos, pela sua própria rota biossintética; surge a necessidade de providências para superar tal incapacidade orgânica pela busca de fornecimento usando fonte externa. Os metabólitos secundários são específicos das espécies e participam das interações intra- e intercelular do próprio organismo ou com células de outros organismos, atuam em processos de polinização pela produção de substâncias que atraem os agentes vivos deste processo ou contribuem para a resistência dos organismos pela defesa contra pestes e outras doenças e estabelecendo a competência para a guerra química dos ajustes necessários à convivência e sobrevivência ambiental. Assim, por exemplo, o metabolismo primário assume importância transcendental no crescimento e rendimento agrícola e o metabolismo secundário contribui com os aromas, as cores dos alimentos e com a resistência contra pestes e doenças, mantendo a sobrevivência nas condições ambientais favoráveis (BRAZ-FILHO, 2010).

## 1.2 Alelopatia

Os primeiros relatos sobre a capacidade que certas espécies vegetais possuem de interferir no desenvolvimento fisiológico de outras espécies vegetais foram inicialmente feitos por Theophrastus (300 A.C.), que seguiu os trabalhos de Plínio (1 D.C.), (RICE, 1984). Em 1937, Hans Molisch reuniu as palavras gregas "*allélon*" e "*pathos*" e definiu pioneiramente o termo alelopatia, que significam respectivamente, *mútuo* e *prejuízo*. Segundo Molisch, alelopatia é "a capacidade de as plantas, produzirem substâncias químicas que, liberadas no ambiente de outras, influenciam de forma favorável ou desfavorável o seu desenvolvimento" (FERREIRA e AQUILA, 2000). Ferrarese (2000) considera a alelopatia como efeitos prejudiciais de plantas de uma espécie (doadora) na

germinação, crescimento ou no desenvolvimento de plantas de outras espécies (receptoras). A alelopatia pode ocorrer entre microorganismos, entre microorganismos e plantas, entre plantas cultivadas, entre plantas daninhas, e entre plantas daninhas e plantas cultivadas. A definição mais ampla de alelopatia foi proposta em 1996 pela Sociedade Internacional de Alelopatia, a qual define alelopatia como: “qualquer processo que envolve metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos, que influem no crescimento e desenvolvimento biológicos e agrícolas” (OLIVEIRA, 2009; PERON 2012). Segundo Gottlieb (1982), os aleloquímicos são sinais químicos transmitidos ao ambiente, geralmente em pequena quantidade, e são responsáveis pelas múltiplas interações químicas entre os diferentes organismos. As interações positivas (promoção, atração, etc) e negativas (inibição, repelência, etc) influenciam diretamente nas interações ecológicas dessas substâncias, tornando-se importantíssimas para a evolução e co-evolução das espécies vegetais e animais.

No âmbito da ecologia, o fenômeno da alelopatia pode explicar os mecanismos da sucessão vegetal, onde espécies invasoras podem excluir espécies nativas a partir de resíduos e substâncias liberados para o ambiente (HIERRO e CALLAWAY, 2003). Portanto, a presença dessas espécies numa área de cultivo pode acarretar em significativa influência no desenvolvimento das culturas, como também, no padrão natural de formação e sucessão das populações e comunidades vegetais (FERREIRA e AQUILA, 2000).

As substâncias com atividade alelopática são substâncias produzidas pelas plantas e são chamadas de fitotoxinas, substâncias alelopáticas, aleloquímicos ou apenas metabólitos secundários. Seus efeitos podem ser intra e interespecíficos e podem proporcionar vantagem tanto ao produtor (doador) como ao receptor (OLIVEIRA, 2009).

A atividade dos aleloquímicos tem sido usada como alternativa ao uso de herbicidas, inseticidas e nematicidas (defensivos agrícolas), porque na evolução das plantas representaram alguma vantagem contra a ação de micro-organismos, vírus, insetos, e outros patógenos ou predadores, seja inibindo a ação destes ou estimulando o crescimento ou desenvolvimento das plantas (WALLER, 1999).

Assim, a vegetação de uma determinada área pode ter um modelo de sucessão condicionado às plantas pré-existentes e às substâncias químicas que elas liberaram no meio. Da mesma forma, no manejo agrícola, florestal e na horticultura, a ocupação prévia da área pode ter significativa influência sobre os cultivos que estão sendo instalados. O conhecimento dos efeitos alelopáticos das plantas torna-se muito importante principalmente para a agricultura, pois impede que plantas invasoras instalem-se dentro de um cultivo causando a diminuição da safra (OHNO *et al.*, 2001).

Existem diversas formas dos vegetais liberarem os aleloquímicos, podendo ser pelas folhas das plantas, lavados das folhas verdes, volatilizados das folhas, lixiviados de folhas secas, exsudados das raízes ou liberados até mesmo durante a decomposição (GLIESSMAN, 2000). Mesmo flores, frutos e sementes podem ser fontes desses metabólitos secundários. Também existem casos em que os produtos não são tóxicos até terem sido alterados no próprio ambiente, seja por degradação química normal ou pela ação de micro-organismos (PERON e BONINI, 2012).

Os aleloquímicos podem ser evidenciados em substâncias químicas pertencentes a diferentes classes químicas, não apresentando uma classe química definida, como por exemplo, fenóis, terpenos, alcalóides, poliacetilenos, ácidos graxos, peptídeos, alcalóides glicosilados e lactonas sequiterpênicas, entre outras (MACÍAS *et al.*, 1992; VYVYAN, 2002; BHOWMIK e INDERJIT, 2003; PERIOTTO e PEREZ, 2004).

### 1.2.1 Plantas daninhas

As plantas daninhas são definidas como plantas que ocorrem em locais e momentos indesejáveis às atividades humanas, interferindo nos diversos sistemas de manejo de culturas economicamente importantes. Plantas daninhas caracterizam-se por interferirem no crescimento e desenvolvimento das plantas cultivadas. A competição interespecífica entre as plantas daninhas e as culturas ocorre pelos recursos limitados no meio, tais como os nutrientes, a luz, a água e espaço físico (VARGAS e ROMAN, 2008). Quanto mais semelhantes forem as características morfofisiológicas entre plantas cultivadas e plantas daninhas, maior será a perda de produtividade da cultura (LAMEGO e VIDAL, 2004).

A supressão da emergência de plantas daninhas pode ocorrer devido à produção de metabólitos secundários, aleloquímicos, os quais são liberados no ambiente em função da decomposição dos resíduos vegetais, podendo interferir na germinação, pela inativação dos mecanismos de dormência, e também no crescimento inicial de plantas daninhas ocorrentes (GOMES JR. e CHRISTOFFOLETI, 2008; MONQUERO *et al.*, 2009; LAMEGO *et al.*, 2015).

*Ipomoea* é o gênero que mais se destaca em número de espécies no âmbito da família Convolvulaceae, com 1300 espécies no mundo. Dentre as espécies do gênero, existem diversas plantas daninhas que são importantes infestantes de culturas anuais e perenes. No Brasil, *Ipomoea nil* apresenta vasta e expressiva ocorrência, sendo uma das espécies do gênero mais frequentes nas áreas de produção agrícola (KISSMANN e GROTH, 1999). Esta espécie tem sido crítica em

plantações de cana-de-açúcar, milho, soja e outras culturas, tornando-se uma grande preocupação para os produtores brasileiros (DUARTE *et al.*, 2008).

*Commelina benghalensis* L, família Commelinaceae, é uma erva daninha invasora que é considerada como uma séria ameaça para a agricultura no sudeste dos Estados Unidos. Originário da Ásia tropical e África, *C. benghalensis* inicialmente não foi identificada como uma praga séria na produção agrícola até a década passada (CULPEPPER, 2006). Embora não seja comumente relatada para invadir áreas naturais, esta planta possui rápida reprodução e é considerada como uma das plantas daninhas mais problemáticas para 25 culturas em 29 países diferentes (EMMANUEL, ELSIE e PATIENCE, 2014). A sobrevivência e expansão desta planta daninha pelas áreas agrícolas foi auxiliado pela sua tolerância ao herbicida glifosato, amplamente utilizado na agricultura (CULPEPPER *et al.* 2004; CULPEPPER, 2006) e seus vários mecanismos de reprodução, podendo ser por sementes ou por propagação vegetativa (RIAR *et al.*, 2014).

*Panicum maximum* Jacq é uma espécie muito utilizada em sistemas agroflorestais. No entanto, esta espécie pode se tornar um problema se não for bem gerida. Ela pode ter impactos significativos como erva daninha por ser altamente agressiva e mostrar forte capacidade competitiva durante os estágios iniciais de crescimento das culturas (TOLEDO *et al.*, 2000; CRUZ *et al.*, 2010). Assim, para a gestão adequada de *P. maximum*, devem ser utilizadas medidas para reduzir o efeito da concorrência com as culturas (CARVALHO *et al.*, 2015).

### 1.3 Fitoquímica

Nos últimos anos, tem sido observado um aumento expressivo na utilização de aditivos artificiais e produtos químicos como ácidos, sais e nitritos nos alimentos. Isto também indicará um aumento na demanda por produtos naturais e alimentos orgânicos, devido, geralmente, a razões de saúde. Também tem sido observado que as indústrias alimentares estão a cada dia buscando utilizar aditivos alternativos, considerados de rótulo limpo (SULLIVAN *et al.*, 2012).

De acordo com o Departamento de Agricultura e regulamentos para a produção e rotulagem de alimentos naturais dos Estados Unidos (2005), o uso de aromatizantes artificiais, químicos e conservantes sintéticos tem sido proibido nos Estados Unidos. Isto pode estar acontecendo devido ao medo de ocorrer contaminação por produtos carcinogênicos. A possível contaminação pela presença de substâncias cancerígenas, em aditivos, tem sido um tema relevante no mundo ocidental. Um estudo recente feito pela Organic Trade Association (2009) trouxe resultados interessantes; ele

afirmou que 73% dos lares norte-americanos frequentemente adquirem alimentos orgânicos e nutraceuticos e 47% afirmaram que evitaram adquirir alimentos com ingredientes artificiais e conservantes. Estas questões emergentes levaram a um foco crescente no uso de produtos naturais para preservar alimentos para inibir o crescimento de patógenos e infecções, ao invés de utilizar ingredientes químicos (THERON *et al.*, 2007; ADEYINKA e RICHARD, 2015)

O conhecimento sobre as plantas sempre caminhou junto com a evolução das civilizações humanas ao longo dos anos. O uso de plantas medicinais datam de tempos remotos, sendo utilizadas pelas civilizações egípcias e chinesas há aproximadamente 3000 anos atrás (JEON *et al.*, 2011). Atualmente, isto tem sido visto como uma alternativa por possuir baixo risco à saúde, toxicidade e ser de fácil preparação (SETTE-DE-SOUZA *et al.*, 2014).

A fitoterapia tem sido recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) desde 1970. No Brasil, o uso de chás pela medicina popular é regulamentado pela resolução RDC n°267, de 22 de setembro de 2005 “REGULAMENTO TÉCNICO DE ESPÉCIES VEGETAIS PARA O PREPARO DE CHÁS”, da ANVISA e garantido pela política nacional de práticas integrativas e complementares em saúde pública (Brasil, 2010).

Devido a estes fatores é extremamente importante o isolamento e a determinação estrutural de substâncias orgânicas produzidas pelo metabolismo secundário de organismos vivos representam importância fundamental para o desenvolvimento científico da própria química de produtos naturais e contribuem para avanço de outras atividades científicas e tecnológicas no País (BRAZ-FILHO, 2010).

Técnicas modernas de extração e isolamento são alternativas para a redução considerável do consumo de solventes e aceleração do processo de extração, e incluem extração com fluido supercrítico (EFS), extração com líquido pressurizado (ELP), extração assistida por micro-ondas (EAM) e extração assistida por ultrassom (EAU) (KLEJDUSA *et al.*, 2009).

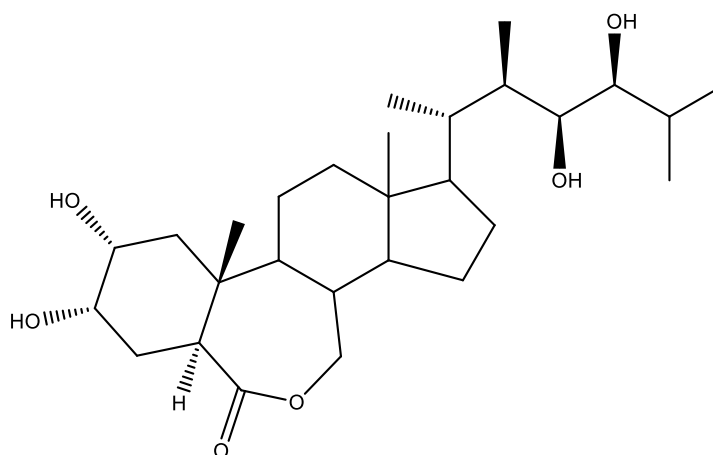
### 1.3.1 Principais classes de aleloquímicos e suas aplicações

#### 1.3.1.1 Esteróides

Os aleloquímicos podem ser encontrados em diferentes classes químicas, sendo formados por estruturas simples como, por exemplo, o brassinolídeo isolado do nabo (MALLIK, 2005)

(Figura 1). O sitosterol glicosilado isolado de *Terminalia cattapa* (Combretaceae) foi capaz de inibir o desenvolvimento de raízes de *Lactuca sativa* a 336 ppm, sendo este um dos constituintes da fração ativa obtida por biofracionamento da partição em diclorometano da referida espécie. Segundo a literatura o sitosterol glicosilado tem o seu mecanismo de ação alelopático envolvendo a redução dos níveis de clorofila (BARATELLI *et al.* 2012).

Figura 1–Estrutura química do Brassinolídeo



### 1.3.1.2 Compostos fenólicos

Esta classe de aleloquímicos é muito ampla compreendendo estruturas de derivados simples dos ácidos benzóico e cinâmico a complexos polifenóis (MACÍAS *et al.*, 2007) (Figura 2 - 3).

Figura 2- Estrutura química dos derivados do ácido benzóico que apresentam atividade alelopática.

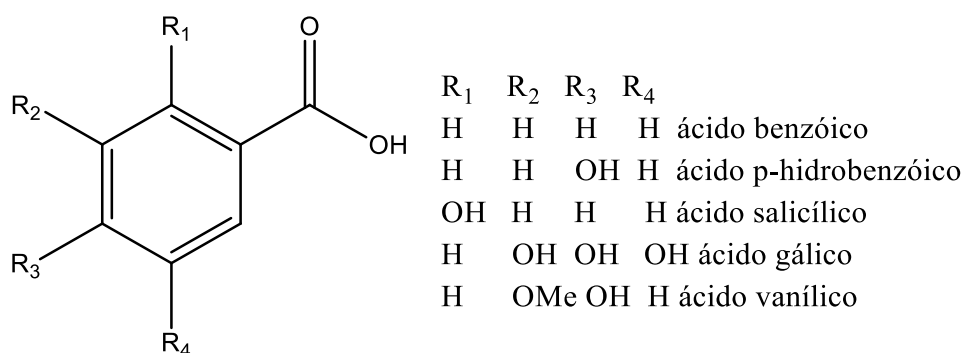
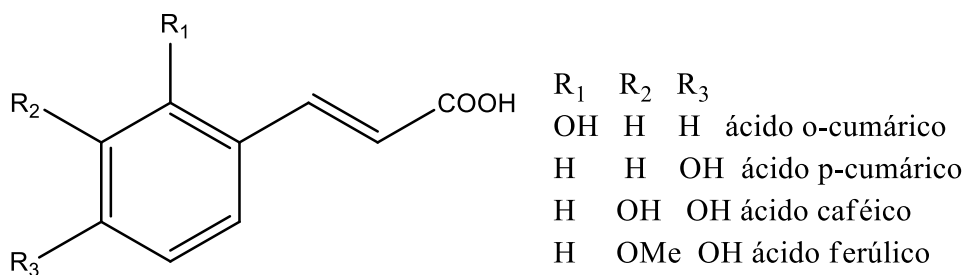


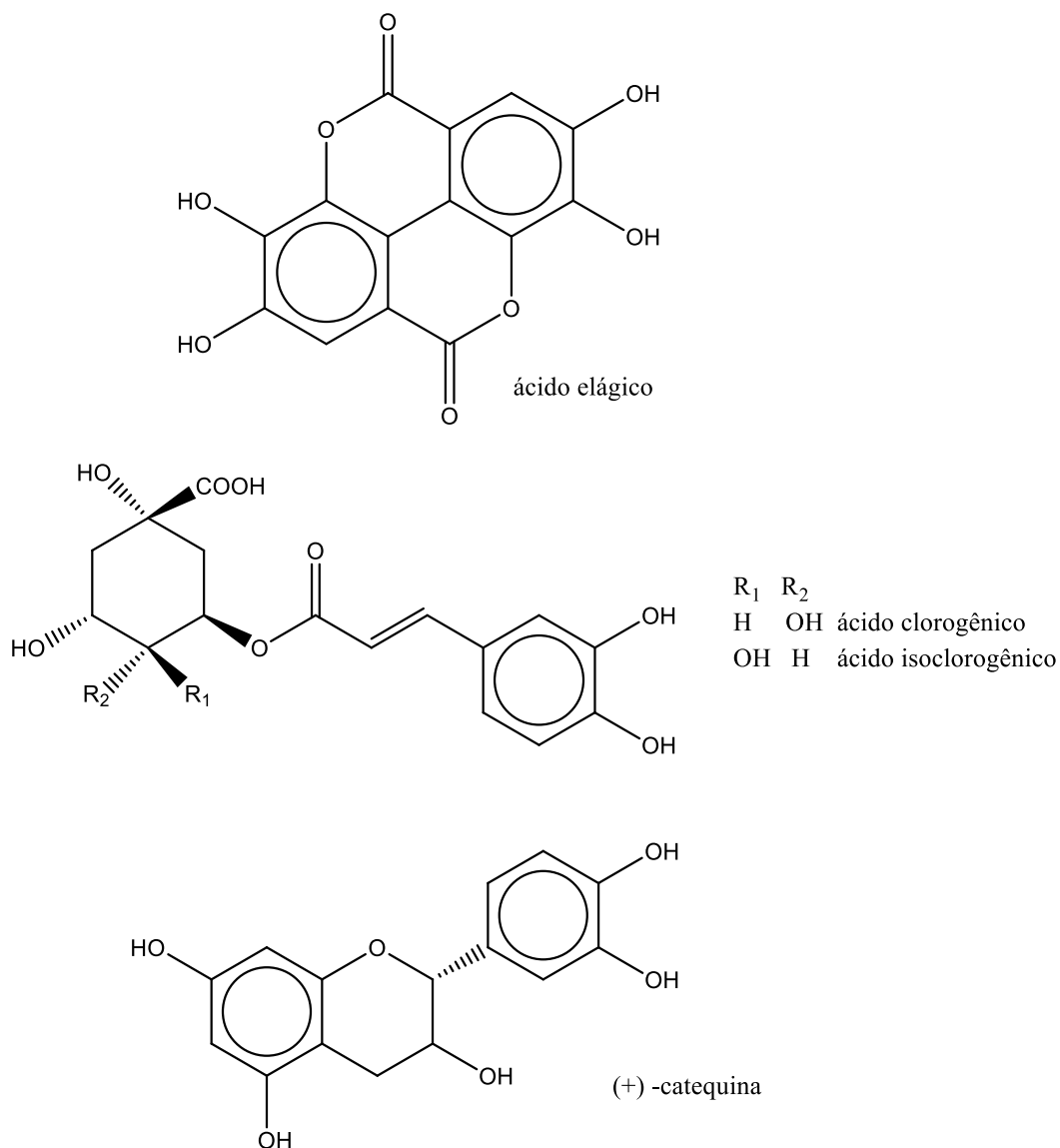


Figura 3 – Estrutura química dos derivados do ácido cinâmico que apresentam atividade alelopática



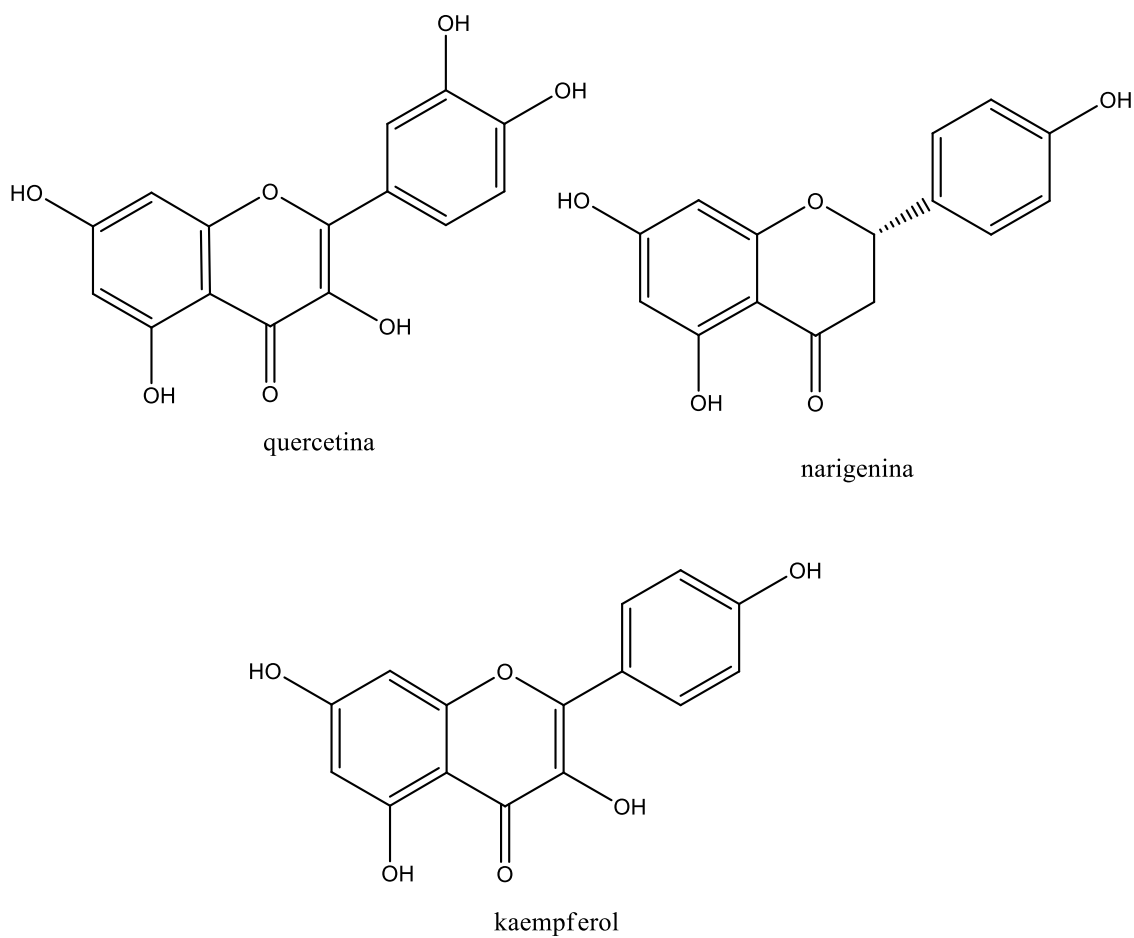
De acordo com Macías *et al.*, 2007, alguns fenóis como o ácido elágico, clorogênico e isoclorogênico juntamente com o flavonóide (+)-catequina, isolados de *Myriophyllum spicatum* L., tem sido atribuída a atividade de inibição de crescimento da alga azul *Microcystis aeruginosa* (Figura 4).

Figura 4 - Fenóis com atividade alelopática em *Microcystis aeruginosa*.



Alguns flavonóides são responsáveis pela coloração apresentada pelas flores, que estão envolvidos no processo de polinização e resistência a doenças. Como aleloquímicos, os mais citados são a quercetina, a narigenina e o kampfêrol, este último isolado de *Quercus mongólica* (MACÍAS *et al.*, 2007) (Figura 5). Atuam também como compostos de defesa e moléculas sinalizadoras dos processos de patogênese, simbiose e reprodução, que são produzidas pelas plantas em grande escala e no ambiente têm efeito significativo na composição química do solo, tendo importância nas interações planta-planta e planta-microrganismo. São considerados potentes inibidores da germinação de sementes, crescimento da parte aérea e alongamento das raízes (RICE, 1984; SHIRLEY, 1996).

Figura 5 - Flavonóides com atividade alelopática.

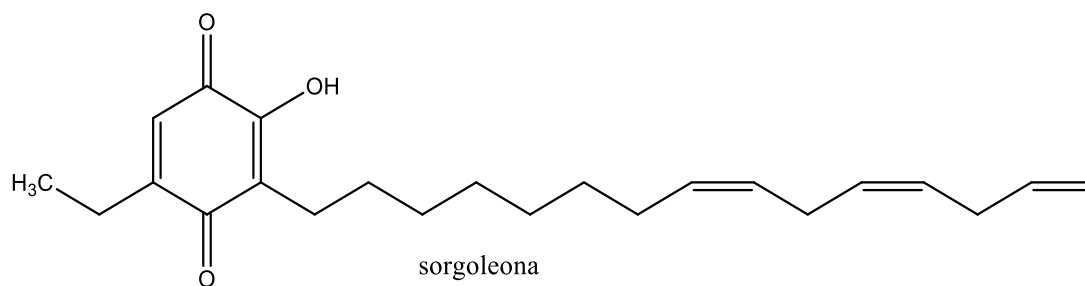


### 1.3.1.3 Quinonas

A primeira quinona com atividade alelopática relatada é a juglona.

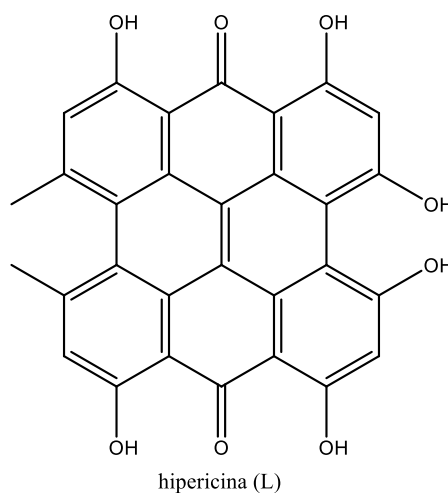
A sorgoleona também possui atividade alelopática agindo na inibição do transporte de elétrons no ciclo fotossintético, porém sua meia-vida no solo é de 7 a 10 semanas, dependendo das condições ambientais. Sendo considerado um herbicida fraco (MARCÍAS *et al.*, 2007; VYVYAN, 2002) (Figura 6).

Figura 6 - Estrutura química da Sorgoleona.



De acordo com Bidlack *et al* (2000), a hipericina (L) é um efetivo inseticida fotoativo e fitotóxico (Figura 7). E, além disso, possui diversas aplicações farmacêuticas, incluindo atividade antiviral, anticarcinogênica e é também utilizada em tratamentos para prevenir a degeneração macular.

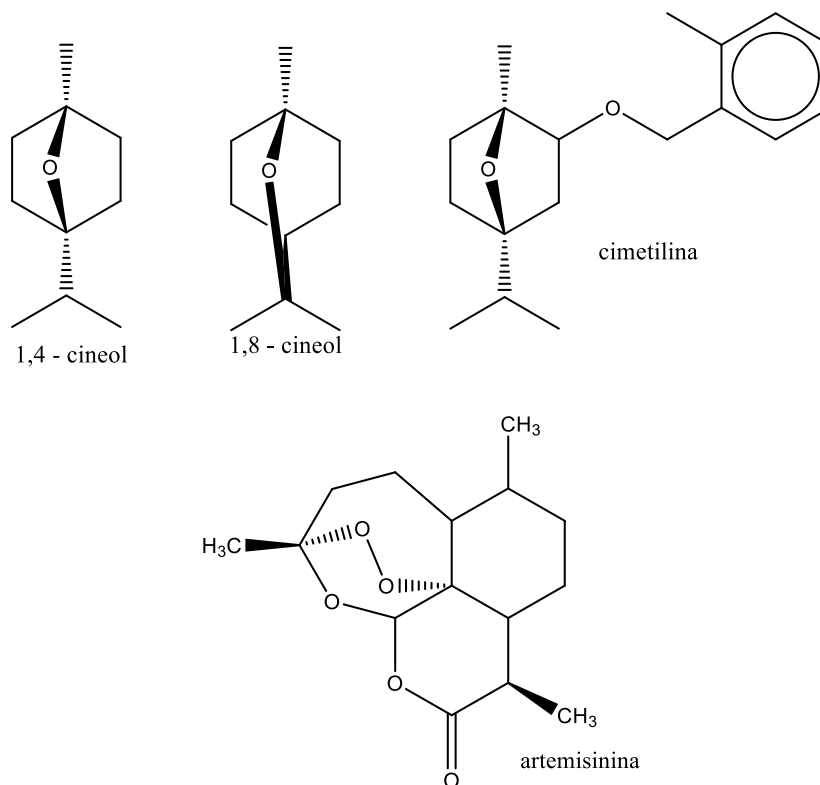
Figura 7 – Estrutura química da Hipericina.



#### 1.3.1.4 Terpenos

Vários monoterpenos apresentam atividade aleloquímica como o 1,4-cineol e o 1,8-cineol, e a cimetilina (MARCÍAS *et al.*, 2007). Outro exemplo de aleloquímico terpenóide altamente fitotóxico é a artemisina, uma lactona sesquiterpênica (BIDLACK *et al.*, 2000) (Figura 8).

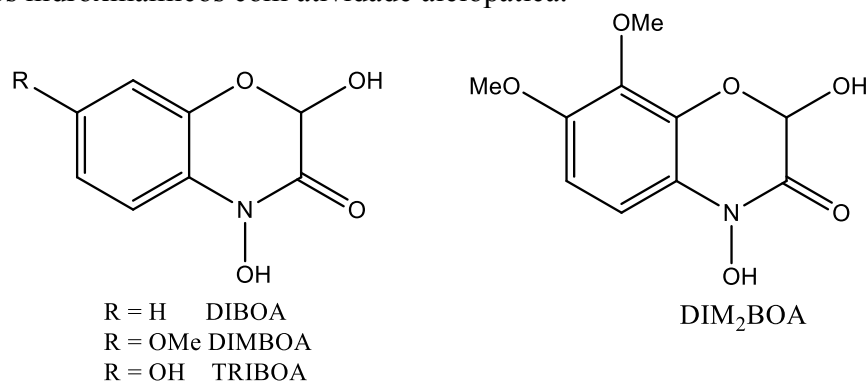
Figura 8 – Terpenos com atividade alelopática



### 1.3.1.5 Ácido hidroxinâmicos

Os ácidos hidroxinâmicos possuem atividade antifúngica, antimicrobiana, inseticida e fitotóxica. São secretados pelas raízes ou por lesões no tecido vegetal ocasionada por herbivoria. Os glicosídeos, quando liberados no solo, são degradados por microorganismos presentes no solo, liberando a aglicona. As agliconas são compostos instáveis e passam por hidrólise seguida por contração de anel formando produtos ainda mais tóxicos (MARCÍAS *et al.*, 2007) (Figura 9).

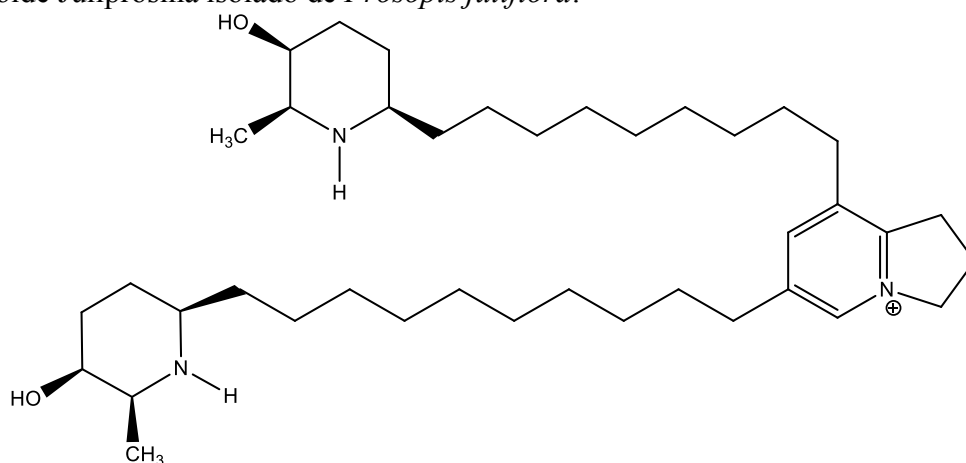
Figura 8 – Ácidos hidroxinâmicos com atividade alelopática.



### 1.3.1.6 Alcalóides

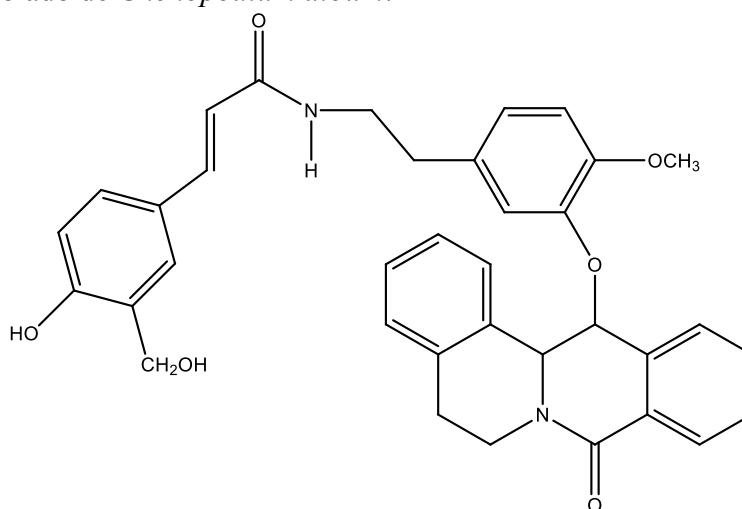
Alguns alcalóides isolados demonstraram acentuada atividade inibitória sobre o crescimento de algumas plantas. O alcaloide juliprosina apresentou atividade aleloquímica sobre a germinação em plantas de alface e o arroz (NAKANO *et al.*, 2004) (Figura 10).

Figura 9– Alcalóide Juliprosina isolado de *Prosopis juliflora*.



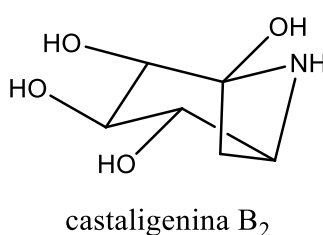
Do extrato da raiz da erva daninha *Chenopodium album* foi isolada uma amida do ácido cinâmico ligada a um alcaloide que apresentou atividades inibitórias sobre o crescimento da raiz da alface (*Lactuca sativa*) a  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  mol/L e sobre o crescimento da raiz e do caule, nas concentrações  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  mol/L (CUTILLO *et al.*, 2004) (Figura 11).

Figura 10 – Alcalóide isolado de *Chenopodium album*.



As calisteginas são uma nova classe de aleloquímicos caracterizadas pela ausência de N-metilção no anel nortropânico, alto grau de hidroxilação e uma funcionalização aminocetal pouco usual na posição da cabeça de ponte, como a calistegina B<sub>2</sub> (Figura 12). A calistegina B<sub>2</sub> tem atividade alelopática comprovada sobre a espécie teste *Medicago sativa* com inibição da germinação e do crescimento da raiz (GOLDMANN *et al.*, 1996).

Figura 11 – Estrutura química da Castaligenina B<sub>2</sub>.



#### 1.4 Técnicas de extração

A extração é o principal passo para a recuperação e isolamento de compostos bioativos a partir de materiais de planta. A escolha da metodologia a ser utilizada deve levar em consideração a natureza química do produto, o tamanho da amostra e a presença de substâncias que possam interferir no processo extrativo. Dependendo do objetivo, pode ser necessária a utilização de um pré-tratamento para a remoção de substâncias indesejadas, tais como ceras, gorduras, terpenos e clorofilas (STALIKAS, 2007).

As técnicas extrativas mais comumente utilizadas para a obtenção de produtos vegetais são as realizadas em fases líquido-líquido e sólido-líquido, principalmente por causa de sua facilidade, eficiência e ampla aplicabilidade. Dentre os solventes de extração mais empregados encontram-se os álcoois (metanol, etanol), acetona, hexano, diclorometano e acetato de etila. No entanto, substâncias muito polares como o ácido benzóico e o ácido cinâmico não podem ser completamente extraídas com solventes orgânicos puros, sendo necessária a utilização de solventes hidroalcoólicos. Solventes menos polares (diclorometano, clorofórmio, hexano e benzeno) são adequados para a extração de compostos apolares como as ceras, óleos, esteróis e clorofilas. Outros fatores, tais como pH, temperatura, proporção solvente-material e intervalos de tempo e número de etapas de extração individuais também desempenham um importante papel (STALIKAS, 2007).

Assim, a otimização do procedimento de extração é essencial para a obtenção de uma boa metodologia extrativa. No final, o esforço empregado para a obtenção de uma técnica eficiente equivale à redução de custos e de tempos de amostragem (ESCARPA e GONZALEZ, 2008).

Neste trabalho, foram avaliados extratos obtidos diferentes métodos de extração, maceração, extração assistida por ultrassom e extração assistida por micro-ondas, para estabelecer as melhores condições de extração de resveratrol para *A. repens*.

#### 1.4.1 Química verde e as técnicas extrativas associadas

Hoje em dia há um grande apelo pela preservação do meio ambiente, sendo assunto presente em diversas pautas de discussão nos diversos governos com o objetivo de tentar diminuir a poluição e os males ocasionados no ambiente.

A Química verde tem se difundido cada vez mais a fim de desenvolver e implementar produtos químicos e processos para reduzir ou eliminar o uso ou geração de substâncias nocivas à saúde e ao ambiente (ANASTAS *et al.*, 1996; LENARDÃO *et al.*, 2003).

De acordo com Collins (2001) e Singh *et al* (1999), a química verde também é atribuída à tecnologia limpa, já está se tornando comum em aplicações industriais, principalmente em países com indústria química desenvolvida e que apresentam controle rigoroso na emissão de poluentes, sendo gradativamente incorporado ao meio acadêmico, no ensino e pesquisa.

A química verde dissemina a ideia, ética e politicamente forte da diminuição dos problemas ambientais, que são causados por produtos químicos, possa ser gradativamente substituído por alternativas menos poluentes ou não poluentes. Alguns termos estão associados como: tecnologia



limpa, prevenção primária, redução na fonte, química ambientalmente benigna ou “*green chemistry*”, para definir este importante pensamento.

“*Green chemistry*” é o termo mais utilizado atualmente e foi adotado pela IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), pois associa o desenvolvimento na química com o objetivo cada vez mais buscado pelo homem moderno: o desenvolvimento auto-sustentável (ANASTAS *et al.*, 1998).

Os produtos ou processos da química verde podem ser divididos em três grandes categorias:

- i) o uso de fontes renováveis ou recicladas de matéria-prima;
- ii) aumento da eficiência de energia, ou a utilização de menos energia para produzir a mesma ou maior quantidade de produto;
- iii) evitar o uso de substâncias persistentes, bioacumulativas e tóxicas.

Alguns autores procuraram, em seus trabalhos, definir os principais pontos ou os princípios elementares da química verde. Basicamente, há doze princípios que precisam ser perseguidos quando se pretende implementar a química verde em uma indústria ou instituição de ensino e/ou pesquisa na área de química (LENARDÃO *et al.*, 2003; PRADO, 2003).

- 1. Prevenção.** Evitar a produção do resíduo é melhor do que tratá-lo após sua geração.
- 2. Economia de Átomos.** Deve-se procurar desenvolver metodologias sintéticas que possam maximizar a incorporação de todos os materiais de partida no produto final.
- 3. Síntese de Produtos Menos Perigosos.** Sempre que praticável, a síntese de um produto químico deve utilizar e gerar substâncias que possuam pouca ou nenhuma toxicidade à saúde humana e ao ambiente.
- 4. Desenho de Produtos Seguros.** Os produtos químicos devem ser desenhados de tal modo que realizem a função desejada e ao mesmo tempo não sejam tóxicos.
- 5. Solventes e Auxiliares mais Seguros.** O uso de substâncias auxiliares (solventes, agentes de separação, secantes, etc.) precisa, sempre que possível, tornar-se desnecessário e, quando utilizadas, estas substâncias devem ser inócuas.
- 6. Busca pela Eficiência de Energia.** A utilização de energia pelos processos químicos precisa ser reconhecida pelos seus impactos ambientais e econômicos e deve ser minimizada. Se possível, os processos químicos devem ser conduzidos à temperatura e pressão ambientes.
- 7. Uso de Fontes Renováveis de Matéria-Prima.** Sempre que técnica e economicamente viável, a utilização de matérias-primas renováveis deve ser escolhida em detrimento de fontes não renováveis.
- 8. Evitar a Formação de Derivados.** A derivatização desnecessária (uso de grupos bloqueadores, proteção/desproteção, modificação temporária por processos físicos e químicos) deve ser

minimizada ou, se possível, evitada, porque estas etapas requerem reagentes adicionais e podem gerar resíduos.

**9. Catálise.** Reagentes catalíticos (tão seletivos quanto possível) são melhores que reagentes estequiométricos.

**10. Desenho para a Degradação.** Os produtos químicos precisam ser desenhados de tal modo que, ao final de sua função, se fragmentem em produtos de degradação inócuos e não persistam no ambiente.

**11. Análise em Tempo Real para a Prevenção da Poluição.** Será necessário o desenvolvimento futuro de metodologias analíticas que viabilizem um monitoramento e controle dentro do processo, em tempo real, antes da formação de substâncias nocivas.

**12. Química Intrinsecamente Segura para a Prevenção de Acidentes.** As substâncias, bem como a maneira pela qual uma substância é utilizada em um processo químico, devem ser escolhidas a fim de minimizar o potencial para acidentes químicos, incluindo vazamentos, explosões e incêndios.

O questionamento global sobre os danos gerados ao planeta por uma miríade de atividades humanas tem se apresentado cada vez mais em destaque na mídia. A resposta encontrada para ajudar na solução destes problemas está baseada em uma combinação de fatores, entre os quais destacam-se os econômicos, científicos, bem como os sociais. Assim, a adoção da química verde é só mais uma das iniciativas para a prevenção da poluição desenfreada. Este novo pensamento científico incentiva tal combinação e a implantação da química verde nos currículos e na prática científica, bem como aplicá-la em escala comercial e industrial (THORNTON, 2001; MOZETO, 2002).

As técnicas modernas de extração e isolamento incluem a extração com fluido supercrítico (EFS), extração com líquido pressurizado (ELP), extração assistida por micro-ondas (EAM) e extração assistida por ultrassom (EAU) (KLEJDUSA *et al.*, 2009).

A EFS é uma técnica relativamente recente que apresenta várias vantagens sobre os métodos tradicionais, tais como o uso de baixas temperaturas e pouco consumo de energia, além de possibilitar a obtenção de alta qualidade do produto, devido à ausência de solventes, na fase de soluto. No entanto, esta técnica é limitada a compostos de baixa ou média polaridade. A principal característica da EFS é a necessidade de altas porcentagens de modificadores orgânicos, o que geralmente significa que o processo ocorre sob condições subcríticas.

O dióxido de carbono supercrítico (SC-CO<sub>2</sub>) é o solvente mais utilizado, devido às suas características especiais, tais como: condições críticas moderadas (31,1 °C e 73,8 MPa), alta disponibilidade imediata, não ser tóxico e nem inflamável e quimicamente estável. No entanto, EFS utilizando CO<sub>2</sub> como o solvente de extração não é indicado para os compostos fenólicos, devido à baixa polaridade de CO<sub>2</sub>. Geralmente, para o processo de extração, são realizadas várias etapas:

inicialmente as amostras são colocadas com o solvente em um cartucho de EFS, que é inserido na célula de extração de fase sólida (EFS)/EFS. O fluido supercrítico utilizado pode ser o dióxido de carbono, que deve passar pelo cartucho de SPE preenchido com a amostra hidrolisada. Assim, os analitos (compostos fenólicos) são quantitativamente retidos por um solvente de aprisionamento (por exemplo, metanol) à temperatura ambiente (o solvente de aprisionamento é resfriado naturalmente durante a extração pela expansão de CO<sub>2</sub>). Em seguida, os extratos são evaporados, dissolvidos na fase móvel e injetados diretamente no sistema de CLAE/EM (MAHUGO *et al.*, 2009).

A extração com líquido pressurizado (ELP) utiliza solventes orgânicos em altas pressões e temperaturas acima do seu ponto de ebulição normal. É o método moderno mais recente para o isolamento de analitos em amostras sólidas (KLEJDUSA *et al.*, 2009). Em geral, uma amostra sólida é embalada em uma célula de extração de aço inoxidável e a extração é realizada com um solvente adequado em altas temperaturas (40-200 °C) e pressão (500-3000 psi) por períodos curtos de tempo (5-15 min). O extrato é removido para um frasco de recuperação com a ajuda de um gás comprimido. Os extratos são filtrados, evaporados, ressuspensos em metanol e injetados em CLAE. As principais vantagens deste método envolvem o baixo consumo de solvente e baixos tempos de extração (DOBIÁŠ *et al.*, 2010).

A extração assistida por ultrassom (EAU) é comumente utilizada no pré-tratamento de amostras sólidas, uma vez que facilita e acelera os processos extrativos, tais como a homogeneização e a extração de compostos orgânicos e inorgânicos. A EAU é uma técnica eficaz para extrair analitos de diferentes matrizes em espaços curtos de tempo, comparado a técnicas convencionais, sendo (DOBIÁŠ *et al.*, 2010) considerada uma das técnicas extrativas mais simples, devido à sua fácil execução e utilização em laboratório. Neste método, a amostra triturada é misturada com o solvente de extração e colocado no banho ultrassônico, com o ajuste da temperatura e do tempo (KLEJDUSA *et al.*, 2009).

NA EAU, os solventes podem ser substituídos por solventes hidroalcoólicos, geralmente reconhecidos como seguros. A redução do uso de solventes com a utilização de processos de extração ultrassônicos é uma alternativa econômica importante em comparação com os processos de extração tradicional, sendo esta uma demanda para o desenvolvimento industrial sustentável (VILKHU *et al.*, 2008).

A extração assistida por micro-ondas (EAM) tem sido aplicada no desenvolvimento de métodos de extração de compostos orgânicos a partir de amostras de solo, sedimento, matrizes vegetais e alimentos. Esses estudos mostram que a extração é mais eficaz quando é utilizada a energia micro-onda. Assim como ocorre com os sistemas de EFS e ELP, na EAM é possível realizar

extrações na ausência de luz, o que representa uma grande vantagem para a extração de compostos fenólicos. No caso do resveratrol, isto é particularmente importante porque suas moléculas podem ser encontradas em duas formas isoméricas (*cis* ou *trans*), mas apenas o *trans*-resveratrol apresenta atividade biológica, e a presença da luz pode catalisar a transformação do composto ativo para a forma inativa. Além disso, tempos reduzidos de extração evitam a ação de enzimas presentes na amostra (GARCIA-SALAS *et al.*, 2010). Na EAM, ondas eletromagnéticas com energia muito baixa, entre 0,3 e 300 GHz, são utilizadas para gerar uma oscilação no campo magnético. A capacidade extrativa é determinada pelo aumento da probabilidade de choques intermoleculares, devido às sucessivas mudanças de orientação das moléculas polares. Na EAM, o processo ocorre com o controle de fatores que influenciam na eficiência de extração, tais como agitação, temperatura, pressão, potência e tempo (DE SOUZA; MIRANDA, 2011).

### 1.5 O gênero *Arachis*

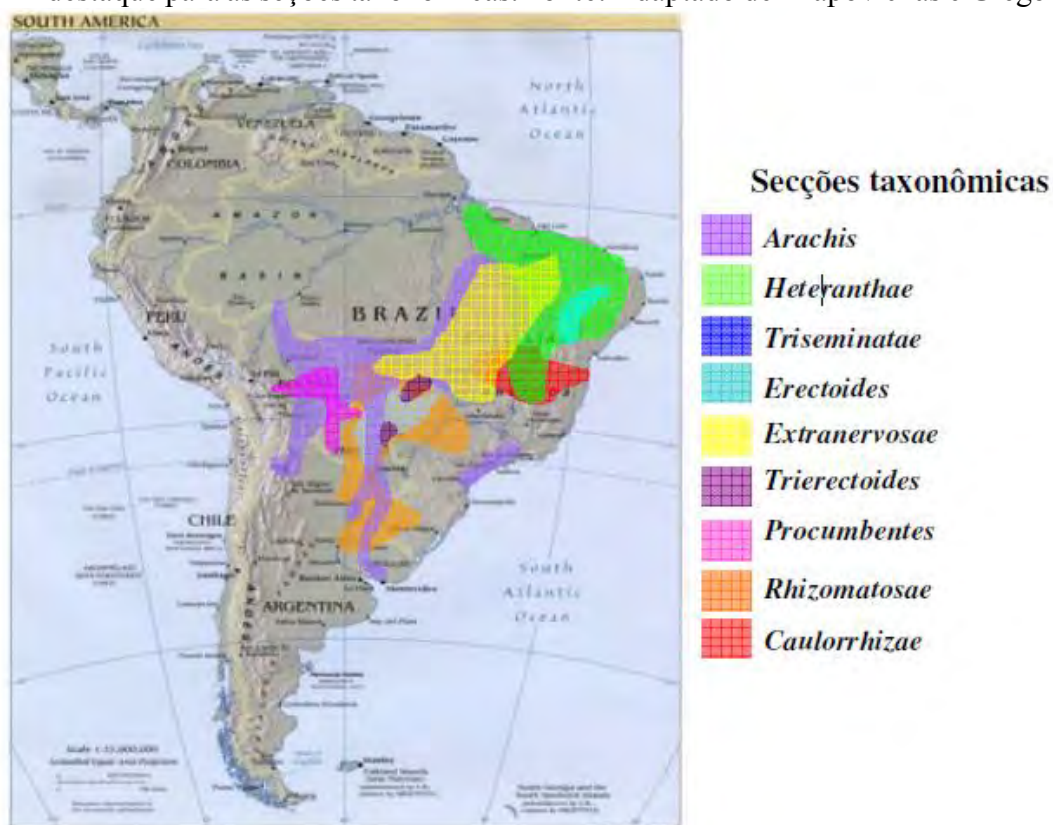
O gênero *Arachis* pertence à família Fabaceae, sendo composto por 81 espécies conhecidas, distribuídas em nove seções taxonômicas (*Arachis*, *Caulorrhizae* Krapov. e W.C. Greg., *Erectoides* Krapov. e W.C. Greg., *Extranervosae* Krapov. e W.C. Greg., *Heteranthae* Krapov. e W.C. Greg., *Procumbentes* Krapov. e W.C. Greg., *Rhizomatosae* Krapov. e W.C. Greg., *Triectoides* Krapov. e W.C. Greg. e *Triseminatae* Krapov. e W.C. Greg.). As espécies silvestres do gênero são restritas à América do Sul, sendo encontradas na Argentina, Brasil, Bolívia, Paraguai e Uruguai (KRAPOVICKAS e GREGORY, 1994; Valls e Simpson, 2005; Valls, Costa e Custodio, 2013) (Figura 13). O Brasil abriga a possível área de origem do gênero, na região localizada entre o sudoeste do estado do Mato Grosso do Sul e o Sul de Goiás. Além disso, as seções *Caulorrhizae*, *Triseminatae*, *Heteranthae* e *Extranervosae* ocorrem somente no país, que possui 65 espécies do gênero, sendo 47 endêmicas (VALLS, 2000).

Os representantes do gênero são conhecidos como amendoim, e suas sementes possuem grande quantidade de óleos e proteínas, podendo ser consumidas cruas. Estas características fizeram do amendoim uma das espécies mais utilizadas pelo homem pré-histórico, que não dominava as técnicas do fogo necessárias para o cozimento do alimento (KRAPOVICKAS e GREGORY, 1994; VALLS e SIMPSON, 2005). Vestígios da cultura de amendoim foram encontrados em achados arqueológicos com mais de 3.700 anos, indicando que faziam parte da dieta pré-colombiana

(HAMMONS, 1994). Os primeiros a cultivarem o amendoim foram os membros da tribo indígena Arawak, que viviam no norte da América do Sul, na época da chegada de Cristóvão Colombo, em 1492 (HOFMAN, 1993).

A espécie mais cultivada do gênero é *A. hypogaea* L., que possui grande importância comercial (VALLS e SIMPSON, 2005). Outras espécies são também utilizadas para controle das ervas daninhas e cobertura do solo, assim como ornamentais e na alimentação (STALKER e SIMPSON, 1995; KERRIDGE e HARDY, 1994; VALLS, 2000). Por exemplo, *Arachis villosulicarpa* Hoehne e *A. stenosperma* Krapov. e W.C. Greg., são utilizadas como alimento por tribos indígenas brasileiras (KRAPOVICKAS *et al.*, 1985; FREITAS, 2004). *Arachis glabrata* Benth. e *Arachis pintoii* Krapov e W.C. Greg. possuem grande valor como plantas forrageiras e para a cobertura de pomares, paisagismo e controle da erosão do solo (VALLS, 2000).

Figura 123 - Área de ocorrência natural das espécies do gênero *Arachis* na América do Sul, com destaque para as seções taxonômicas. Fonte: Adaptado de Krapovickas e Gregory, 1994.



### 1.5.1 *Arachis repens*

*Arachis repens* Handro, pertence à família Fabaceae, secção *Caulorrhizae*, é popularmente conhecida como grama amendoim, é utilizada como planta ornamental, na formação de pastagens, como forragem e para cobertura do solo, em substituição a várias espécies comuns de grama. É uma planta herbácea rasteira, estolonífera, perene e nativa do Brasil, de regiões do cerrado e costeiras do país (VALLS, 1992). Pode alcançar 0,10 a 0,20 m de altura, resistente ao Sol e solos de moderada fertilidade, tolerante à acidez do solo (pH em torno de 5) e à alta saturação de alumínio (75%) (VALLS, 1992; RINCÓN *et al.*, 1992). Tem notável efeito decorativo devido à sua coloração verde-escura e formato das folhas, além das suas flores amarelas que surgem no verão. Pode também ser utilizada para revestir taludes íngremes, atuando no controle da erosão do solo, e sua poda é totalmente dispensável (STALKER e SIMPSON, 1995; VALLS, 1996) (Figura 14). Além disso, possibilita a fixação de nitrogênio atmosférico devido à associação simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio, gênero *Bradyrhizobium*, que infectam suas raízes e criam nódulos radiculares, os quais fornecem a maior parte do nitrogênio necessário a sua sobrevivência.

**Figura 134** -*Arachis repens*.

Foto: Disponível em: <<http://www.flickr.com/photos/mercadanteweb/page25/>>

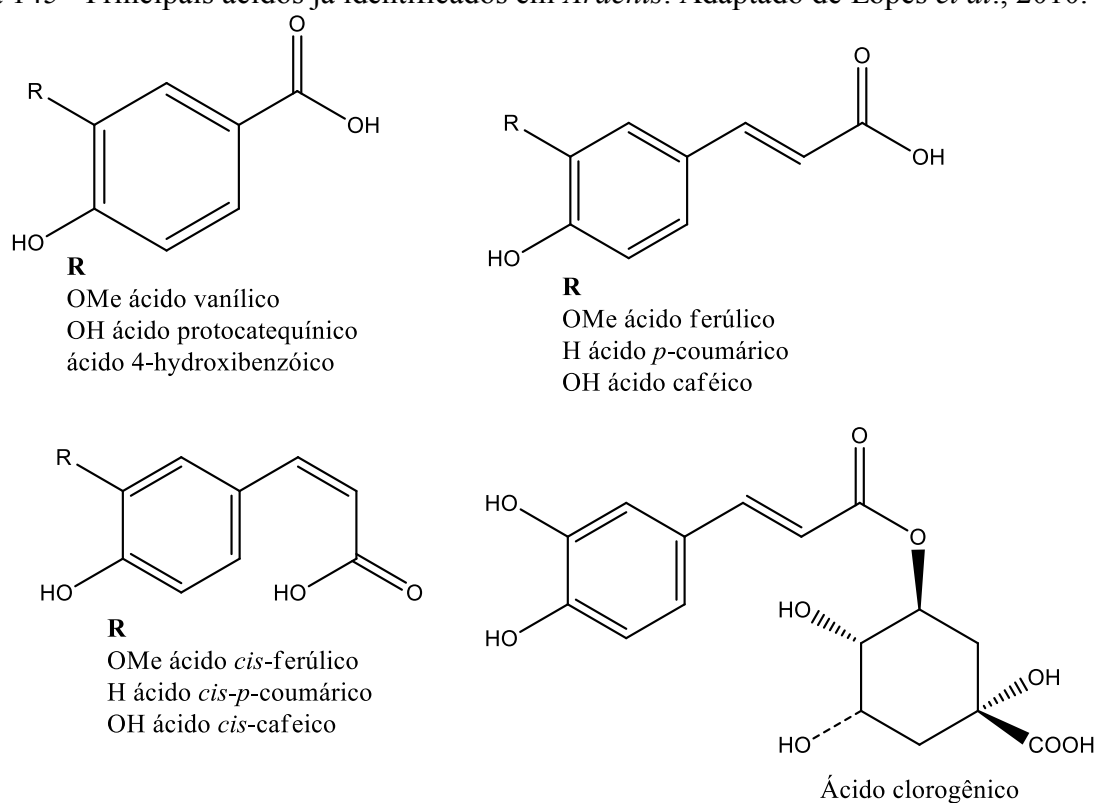
Acesso em: 07 Out. 2011.



### 1.5.2 Constituintes químicos versus Atividade biológica no gênero *Arachis*

Diversas substâncias bioativas têm sido identificadas em espécies de *Arachis*, como os ácidos fenólicos, derivados dos ácidos cinâmicos e benzóicos. Os ácidos fenólicos estão envolvidos em diferentes processos fisiológicos, como dormência, em atividades enzimáticas e na síntese de proteínas. Além disso, devido ao seu potencial antioxidante, estão relacionados à redução de doenças cardiovasculares (KIM *et al.*, 2006). Os ácidos vanílico (ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzóico), ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxicinâmico) e 4-hidroxicinâmico (Figura 15) isolados a partir dos exsudatos originados da germinação de sementes de *A. hypogaea* possuem efeito hipotensivo, contribuem para a redução dos níveis de glicose, colesterol total e LDL no sangue, além de apresentarem potencial terapêutico na doença de Alzheimer (BALASUBAHINI *et al.*, 2003; ONO *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2007). Além disso, explantes de raízes inoculadas com *Mycorrhiza* e *Rhizobium* em *A. hypogaea* apresentaram, além dos ácidos vanílico, protocatecuico, ferúlico e *p*-cumárico, os ácidos 4-hidroxibenzóico, caféico e os isômeros *cis* do ácido ferúlico, *p*-cumárico e clorogênico (CHARITHA e REDDY, 2002). No amendoim torrado, os ácidos ferúlico e *p*-cumárico foram os compostos encontrados em maior abundância. Stevenson *et al.* (1993) descreveram a presença dos ácidos clorogênico, neoclorogênico e 1-cafeoil-4-deoxiquinico em folhas da espécie silvestre *A. paraguariensis*.

Figura 145 - Principais ácidos já identificados em *Arachis*. Adaptado de Lopes *et al.*, 2010.



Além dos ácidos fenólicos, diferentes fitoesteróis, incluindo  $\beta$ -sitosterol, campesterol, estigmasterol,  $\alpha$ -espinasterol,  $\Delta_5$ -avenasterol,  $\Delta_7$ -avenasterol, sitostanol e campestanol, já foram isolados de sementes, assim como da manteiga e do óleo de amendoim (PHILLIPS *et al.*, 2005; SHIN *et al.*, 2010). Segundo Ohr (2003), os fitoesteróis funcionam bloqueando a absorção do colesterol ingerido na dieta, prevenindo a aterosclerose. Além disso, o  $\beta$ -sitosterol possui ação comprovada sobre cânceres de cólon, mama e próstata (AWAD *et al.*, 2007). Composições similares de esteróides foram encontradas em outras espécies de *Arachis* como *A. sylvestris* A. Chev., *A. pintoi* Krapov. e W.C. Grag., *A. chiquitana* Krapov. e W.C. Greg., *A. appresipila* Hermann, *A. kretschmeri* Krapov. e W.C. Greg., *A. matiensis* Krapov. e W.C. Greg., *A. trinitensis* Krapov. e W.C. Greg., *A. kempff-mercadoi* Krapov. e W.C. Greg., *A. diogoi* Hoehne, *A. benensis* Krapov. e W.C. Greg., *A. valida* Krapov. e W.C. Greg., *A. helodes* Mart. Ex Krapov. e Rigoni, *A. kuhlmannii* Krapov. e W.C. Greg., *A. williamsii* Krapov. e W.C. Greg., *A. hoehnei* Krapov. e W.C. Greg., *A. villosa* Benth, *A. stenosperma* Krapov. e W.C. Greg. e *A. hypogaea* var. *fastigiata* Krapov. (GROSSO *et al.*, 1997; 2000). Nas partes aéreas de *A. hypogaea* foram encontrados  $\beta$ -sitosterol e daucosterol (LIU *et al.*, 2009). Outros fitoesteróis, como lofenol, 24-etilofenol, obtusifoliol, 31-norcicloartenol, cicloleucalenol, gramisterol e citrostadienol também foram encontrados em espécie do gênero (GAYDOU *et al.*, 1983).

O amendoim também é rico em triterpenos, como cicloartanol, cicloartenol, ciclobranol, 24-etileno-cicloartenol,  $\beta$ -amirina e lupeol (GAYDOU *et al.*, 1983; BANSAL *et al.*, 1993). De um modo geral, os triterpenóides possuem ampla aplicação na medicina, apresentando atividades bactericida, fungicida, antiviral, analgésica, proteção cardiovascular e antitumoral (PATOCKA, 2003). Essas moléculas são precursoras dos esteróides na via metabólica do mevalonato.

Além dos ácidos fenólicos e triterpenos, já foram encontrados em espécies do gênero *Arachis* glicosídeos como a medicarpina, dimetilmedicarpina e isomedicarpina (LIU *et al.*, 2009), assim como as isoflavonas biocanina A, daidzeína, genisteína e formonetina (EDWARDS e STRANGE, 1991; EDWARDS *et al.*, 1995).

Pterocarpanos como o aracarpeno-1 e aracarpeno-2 também já foram identificados em folhas de *A. hypogaea* infectadas com fungos. No grupo dos flavonóides, dentro da classe das fitoalexinas, o pterocarpano é considerado a classe com maior atividade antifúngica. Além disso, já foi descrita a presença de catequina e epi-catequina em extratos aquosos de tegumentos de sementes (JIMÉNEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2008).

#### 1.5.2.1 Atividade antioxidante de substâncias bioativas em *Arachis*



Algumas substâncias, denominadas antioxidantes, são capazes de retardar ou prevenir significativamente a oxidação de lipídios ou outras moléculas ao inibirem a iniciação ou a propagação da reação de oxigênio em cadeia (AL-MAMARY *et al.*, 2002; MOREIRA *et al.*, 2002; CHANWITHEESUK *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2005; LIMA *et al.*, 2006; ANDRADE *et al.*, 2007), além de prevenirem ou repararem danos ocasionados às células pelas EROs (CHANWITHEESUK *et al.*, 2005).

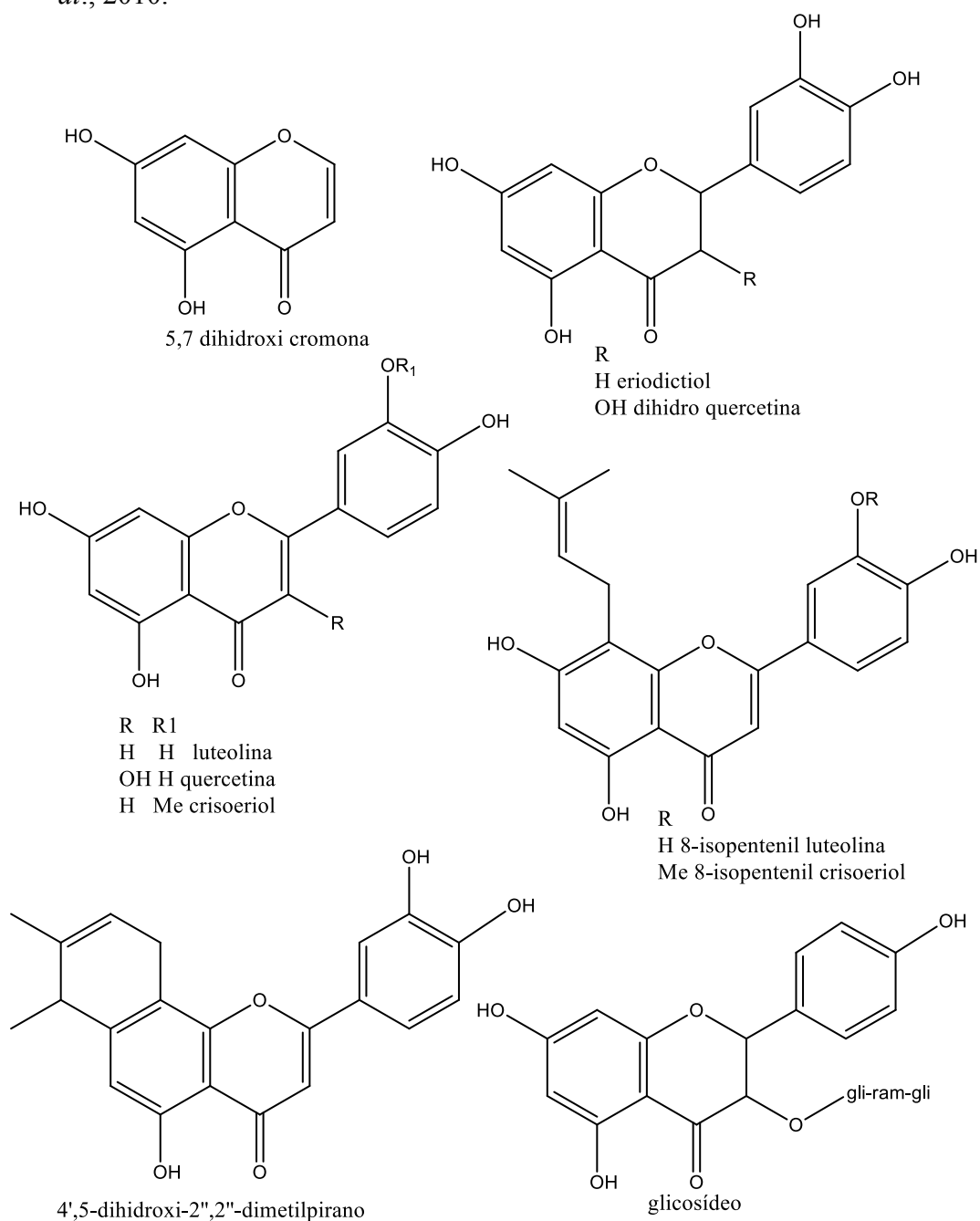
Algumas das moléculas bioativas descritas nas espécies de *Arachis* possuem comprovada ação antioxidante, incluindo os flavonóides 5,7-dihidroxicromona, eriodictiol, luteolina (3',4',5',7-tetrahidroxiflavona), dihidroxi-quercetina e crisoeriol, e seus derivados como o 8-isopentanol-luteolina, 8-isopentanolcrisoeriol e 4',5'-dihidroxi-2'',2''-dimetilpirano [5'',6'':7,8]-flavona (NASCIMENTO *et al.*, 2015) (Figura 16). Além dos flavonóides, os estilbenos estão associados a mecanismos que protegem os constituintes celulares contra danos oxidativos. O oxigênio molecular e seus derivados possuem grande importância na bioquímica dos radicais livres nas células aeróbicas. As “espécies reativas de oxigênio” (EROs) incluem os radicais livres contendo oxigênio, como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o radical hidroxila ( $HO\cdot$ ), o radical peroxila ( $ROO\cdot$ ) e espécies não radicalares, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o oxigênio singleto ( $^1O_2$ ), que são frequentemente gerados como subprodutos de reações biológicas ou por fatores exógenos (ANDRADE *et al.*, 2007). O desequilíbrio entre a formação e a neutralização desses pró-oxidantes leva ao estresse oxidativo, considerado uma das principais causas de doenças, uma vez que os radicais livres buscam a estabilidade através do emparelhamento de elétrons com as macromoléculas biológicas, como proteínas, lipídios e DNA, causando danos ao DNA, juntamente com peroxidação lipídica. Essas injúrias contribuem para inúmeras complicações biológicas, incluindo o desenvolvimento de carcinogêneses, mutagêneses, ateroscleroses, inflamações crônicas, doenças neurodegenerativas, auto-imunes das glândulas endócrinas e envelhecimento precoce (MAXWELL, 1995; BRACA *et al.*, 2002; ANDRADE *et al.*, 2007).

As células possuem um complexo sistema antioxidante contra os danos causados pelos radicais livres, incluindo enzimas e compostos antioxidantes, como o ácido ascórbico e o tocoferol (NIKI *et al.*, 1995; CLARKSON e THOMPSON, 2000). No entanto, quando a produção de radicais livres excede a capacidade de proteção desses sistemas, as defesas celulares tornam-se insuficientes para impedir os estresses oxidativos mais graves e, portanto, podem ocorrer danos teciduais (WANG, 2008). Uma enorme variedade de moléculas que bloqueiam os efeitos dos radicais livres já foram descritas em plantas, incluindo compostos fenólicos, nitrogenados, vitaminas, terpenos e

outros metabólitos endógenos. Assim, diversas espécies vegetais têm sido estudadas com o propósito de avaliar o seu potencial antioxidante, em busca de benefícios para a saúde humana (CAI *et al.*, 2004; SAMARTH *et al.*, 2008).

Os compostos fenólicos de plantas estão distribuídos em várias categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados dos ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, ligninas e lignanas (NACZK *et al.*, 2004).

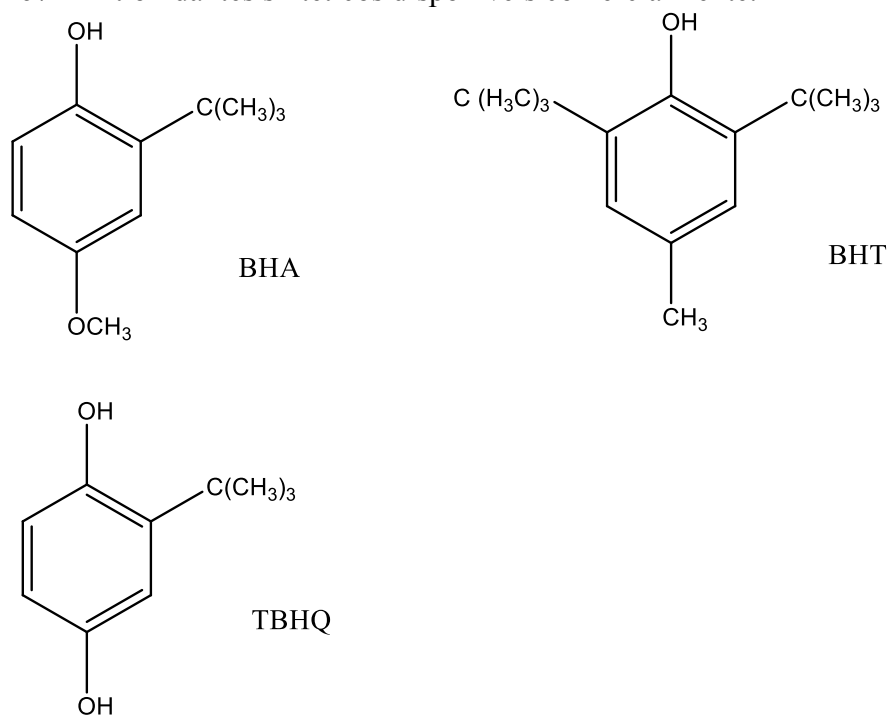
Figura 156 - Principais flavonóides e derivados já identificados em *Arachis*. Adaptado de Lopes *et al.*, 2010.



Atualmente, diversos antioxidantes sintéticos encontram-se disponíveis comercialmente, como butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT) e terc-butilhidroquinona (TBHQ) (Figura 17). Contudo, sua utilização é controlada devido aos riscos potenciais à saúde ocasionados por estas substâncias não estarem totalmente elucidados (VALENTÃO *et al.*, 2002).

Diversas substâncias bioativas com propriedade antioxidante têm sido descritas no gênero *Arachis*, principalmente em *A. hypogaea*. Estudos epidemiológicos sugerem que o consumo frequente de amendoim pode reduzir o risco de doença cardíaca coronariana (FRASER *et al.*, 1992) e certos tipos de câncer (AWAD *et al.*, 2000). Os efeitos benéficos à saúde podem ser atribuídos principalmente aos flavonóides e ao resveratrol (PENNINGTON, 2002). Entretanto, a realização de estudos dessa natureza com outras espécies do gênero ainda é muito restrita.

Figura 167– Antioxidantes sintéticos disponíveis comercialmente.



### 1.5.2.2 Resveratrol

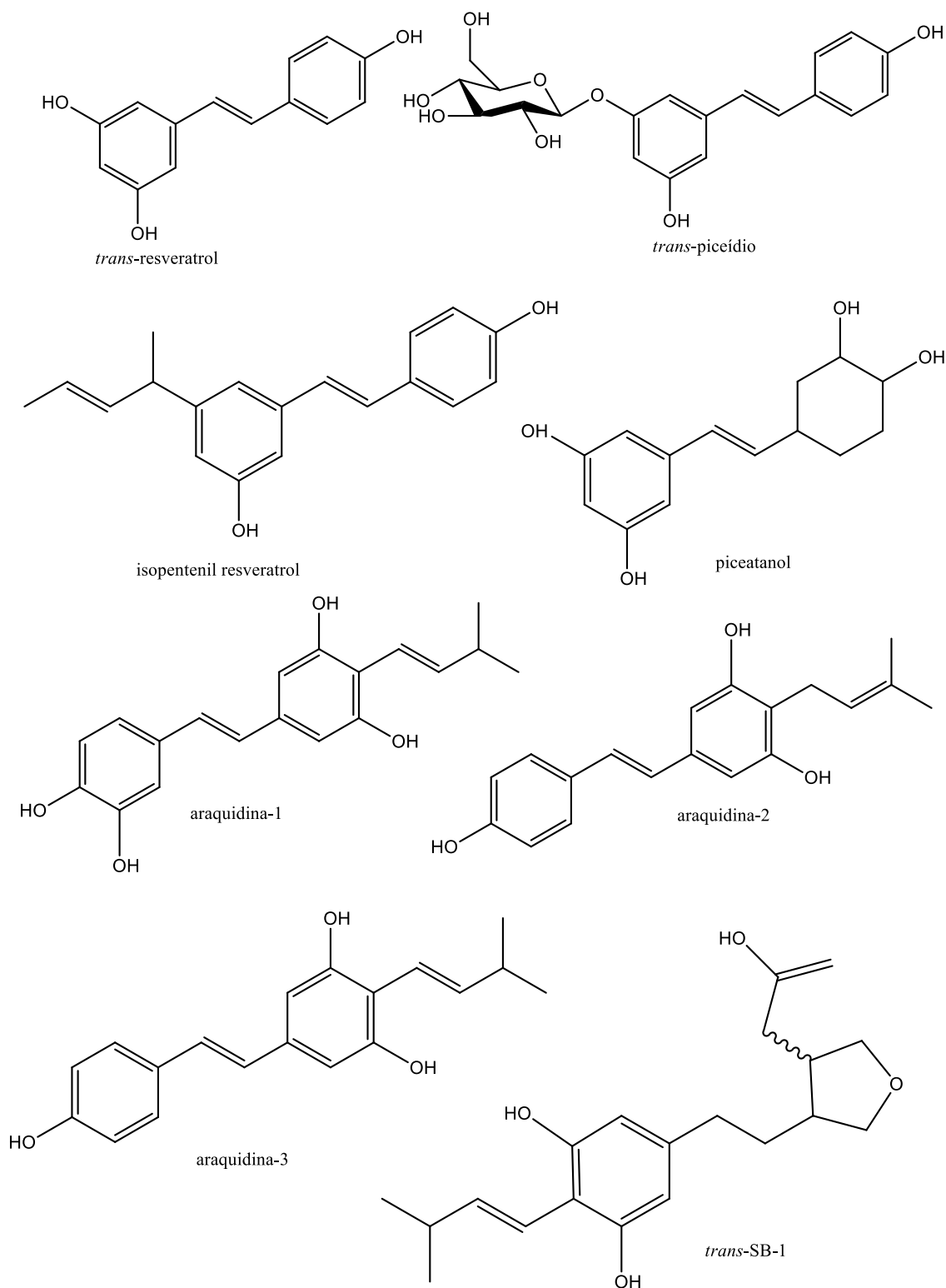
Os estilbenos são uma classe de fitoalexinas e podem ser encontrados em plantas não infectadas e não lesadas, apesar de, nesses casos, estarem presentes em menores quantidades. Esta classe de substâncias têm sido encontrada em diversas variedades de *A. hypogaea*, estando presente em diferentes órgãos da planta, como folhas, raízes e sementes (SOBOLEV *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2008). As fitoalexinas são substâncias químicas produzidas como uma forma de defesa do vegetal

em resposta aos estresses bióticos ou abióticos. A produção de fitoalexinas é induzida por ferimentos, contaminação por fungos, insetos e outros tipos de injúrias.

O resveratrol é o representante mais conhecido dos estilbenóides e já foi encontrado em mais de 72 espécies vegetais, incluindo eucalipto, uvas (*Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*), pinho escocês (*Pinus sylvestris*), duas espécies de lírio (*Veratrum grandiflorum* e *Veratrum formosanum*), amendoim (*Arachis hypogaea*), amora (*Morus sp*), framboesa (*Rubus idaeus*), *Polygonum multiflorum*, *Polygonum cuspidatum*, pinheiros e no epicarpo dos frutos do tomateiro (HILLIS *et al.*, 1974; INGHAM, 1976; LANGCAKE *et al.*, 1979; KUBO *et al.*, 1981; SOLEAS *et al.*, 1997; PASSOS *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2002; SAUTTER *et al.*, 2005; RAGAB *et al.*, 2006; SAIKO *et al.*, 2008) (Figura 18).

As pesquisas sobre o resveratrol foram iniciadas no final do século XX com o chamado “Paradoxo Francês”, já que os franceses, mesmo possuindo uma dieta rica em colesterol, desenvolviam menos doenças cardiovasculares que os americanos. Este fato foi associado ao hábito francês de beber vinho diariamente, inicialmente os benefícios à saúde foram associados ao álcool, mas estudos mais aprofundados revelaram que, na verdade, o resveratrol era o verdadeiro responsável. A partir de então, iniciou-se a busca por novas fontes de resveratrol (SAUTTER *et al.*, 2005).

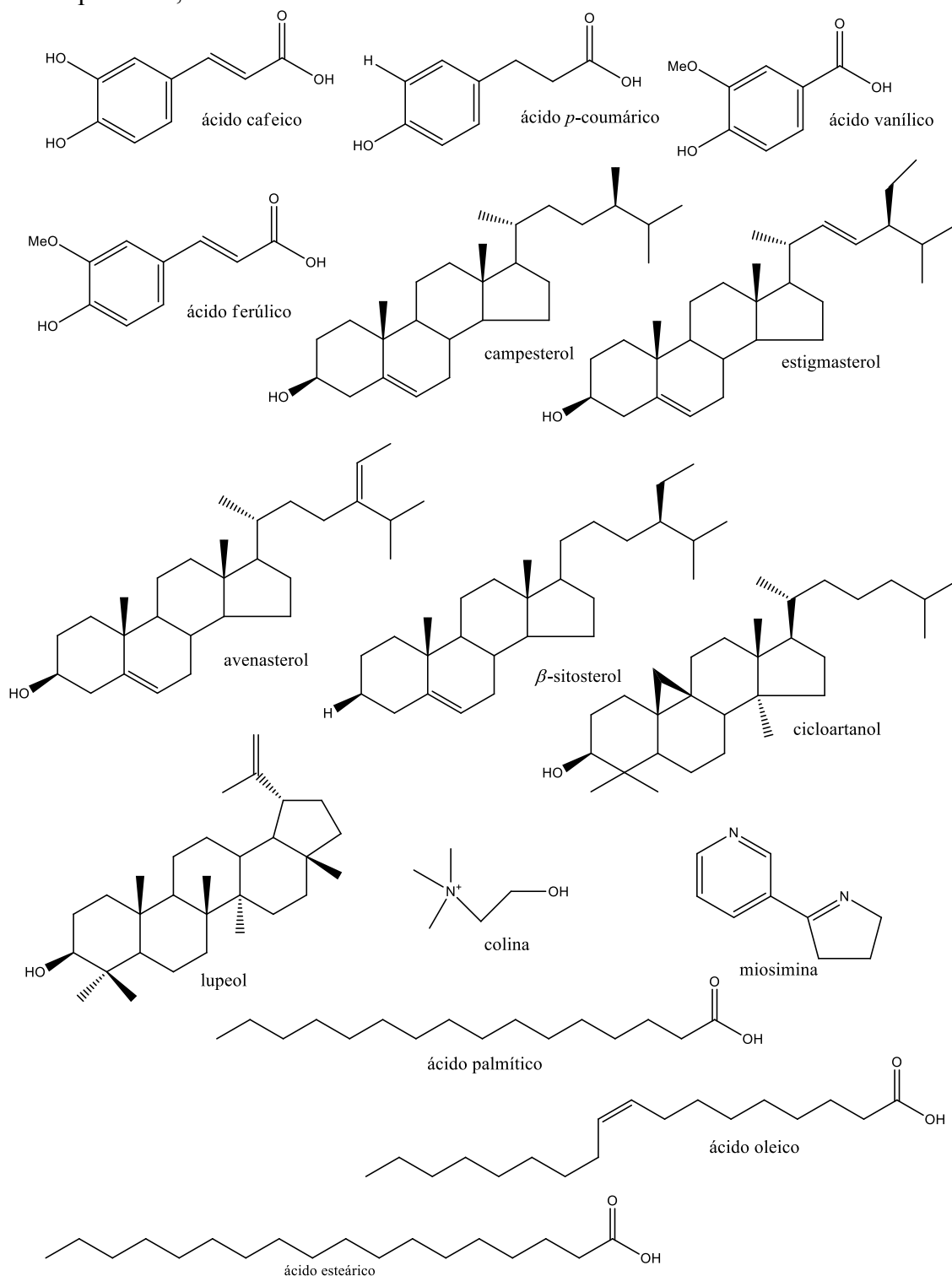
Desde que o resveratrol foi relacionado a benefícios à saúde, plantas que possuem estilbenos, entre as quais o amendoim, tornaram-se objeto de grande interesse (STERVBO *et al.*, 2007). O resveratrol possui vários efeitos benéficos à saúde humana, como prevenção de doenças cardiovasculares, alívio de algumas complicações na diabetes, atividade antitumoral, prevenção da osteoporose e atividade antiinflamatória, entre outros (JANG *et al.*, 1997). Algumas dessas propriedades são atribuídas à sua ação antioxidante, como consequência da inibição da atividade da enzima lipoxigenase (PINTO *et al.*, 1999; SOUZA *et al.*, 2006).



A quase totalidade dos estudos citados acima foram realizados com o amendoim cultivado comestível (*A. hypogaea*), existindo poucas informações sobre a produção de metabólitos especiais e atividades biológicas em outras espécies do gênero. No entanto, os dados obtidos permitem supor que outras espécies de *Arachis*, em especial aquelas que possuem altos graus de resistência a pragas

e doenças, possuam também níveis elevados de metabólitos especiais (Figura 19). Portanto, avaliações fitoquímicas e farmacológicas de outras espécies são extremamente importantes na busca de novas fontes de substâncias bioativas. No caso das espécies que constituem estas novas opções, como *A. repens*, estes estudos justificam-se tanto pela necessidade de ampliar o conhecimento desse aspecto do gênero, como pela possibilidade de agregação de valor a essas culturas.

Figura 19 - Metabólitos secundários já identificados em espécies do gênero *Arachis*. Adaptado de Lopes *et al.*, 2010.



Além das aplicações na produção de plantas e na conservação de germoplasma, o uso de técnicas de cultura de tecidos vegetais pode resultar na criação de sistemas sustentáveis para a produção de metabólitos especiais. Tendo em vista que as condições de cultura podem ser manipuladas no sentido de possibilitar maiores níveis de produção em comparação a plantas

cultivadas no campo, é importante estabelecer diferentes sistemas de cultura, visando à avaliação das condições adequadas para a biossíntese de metabólitos especiais *in vitro*.

### 1.5 Cultura de tecidos vegetais

As técnicas de cultura de tecidos vegetais permitem o cultivo *in vitro* de células, tecidos e órgãos vegetais, em meio sólido ou líquido, em ambiente asséptico e espaço reduzido. Assim, devido à totipotência das células vegetais, qualquer propágulo vegetal pode ser utilizado para a produção de plantas *in vitro*, levando-se em consideração o nível de diferenciação celular e a finalidade da propagação (GEORGE, 2008).

Pode-se adicionar compostos precursores ou intermediários ao meio de cultura celular (SILVESTRINI *et al.*, 2002). Outra estratégia interessante é a elicitação. Esta técnica consiste na aplicação de um estresse químico ou físico nas células em suspensão para induzir a produção de metabólitos secundários que frequentemente não são produzidos. Isto é feito geralmente com elicitores bióticos (quitosanas, micélios de fungos patogênicos, vários extratos de proteínas) ou fatores abióticos (temperatura, luz UV, metais pesados, pH, ultrassom, etc.). Os elicitores normalmente atuam reduzindo o tempo necessário para se atingir altas concentrações do produto de interesse. O uso de diferentes tipos de elicitores para induzir e aumentar a produção de metabólitos secundários de interesse comercial tem sido descrito em diversos trabalhos (LEE e SHULER, 2000; HU *et al.*, 2001; DONG e ZHONG, 2001; WANG e ZHONG, 2002).

As culturas de calos e de células em suspensão são as técnicas mais utilizadas para a produção de compostos bioativos. As culturas em suspensão podem ser obtidas através do cultivo de células individuais ou em grupos, dispersas em meio líquido, agitação. Estes sistemas possibilitam o cultivo de células relativamente uniformes, ausentes da interferência de microorganismos e com um ciclo vegetativo reduzido (CROTEAU *et al.*, 2000). As culturas de células podem sintetizar grandes quantidades de metabólitos especiais em intervalos curtos de tempo, e as taxas de biossíntese podem ser aumentadas, devido a eliminação da influência de fatores ambientais que afetam a produção de metabólitos secundários; seleção de cultivares com produções mais altas; e possibilidade do uso de agentes elicitores (JHA *et al.* 1998; ABDIN *et al.* 2003;



KARUPPUSAMY, 2009; JUNAID *et al.*, 2009), facilitando os estudos *in vitro* (CROTEAU *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2007).

As culturas de raízes são também amplamente empregadas para a produção de metabólitos secundários *in vitro*, uma vez que são os sítios naturais de produção e acúmulo de várias substâncias vegetais derivadas do metabolismo primário e secundário (VERPOORTE e MEMELINK, 2002).

### 1.6.1 Cultura de tecidos de espécies do gênero *Arachis*

O desenvolvimento de sistemas de cultura de tecidos para espécies do gênero *Arachis* teve início no final da década de 70, com o estabelecimento de protocolo para micropropagação de *A. hypogaea* (RUSSO e VARNELL 1978). Desde então, diversos sistemas de regeneração *in vitro* foram estabelecidos para as diversas espécies do gênero, principalmente *A. hypogaea*, utilizando diferentes tipos de explantes, como ápices caulinares, anteras, nós, entrenós, cotilédones, eixos embrionários, folíolos maduros e embrionários, estames, pecíolos, epicótilos e hipocótilos (MROGINSKI e FERNANDEZ, 1979; MROGINSKI *et al.*, 1981; SASTRI *et al.*, 1981; ILAHI e AMEEN, 1986; STILL *et al.*, 1987; DAIMON e MII, 1991; KANYAND *et al.*, 1994; GUPTA e SINGHAL, 1996; VENKATACHALAM e JAYABALAN, 1996; CUCCO e JAUME, 2000; NAZIR *et al.*, 2011). A morfogênese *in vitro* a partir desses materiais foi avaliada utilizando diferentes reguladores de crescimento, incluindo ácido indol-3-acético (AIA), ácido 1-naftalenoacético (ANA), benzilaminopurina (BAP), centrofenoxina, dicamba, ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), cinetina (KIN), picloram (PIC), tidiazuron (TDZ) e ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), utilizados isoladamente ou em combinação (RUSSO e VARNELL, 1978; BAJAJ *et al.*, 1981; ROLFS *et al.*, 1981; SELLARS *et al.*, 1990; SAXENA *et al.*, 1992; GUPTA e SINGHAL, 1996; FENG *et al.*, 1996; VENKATACHALAM e JAYABALAN, 1997; LITTLE *et al.* 2000; SHAN *et al.*, 2009).

De um modo geral, a resposta morfogênica em *Arachis*, que pode ocorrer tanto por organogênese como por embriogênese somática, está mais relacionada à concentração e ao tipo de regulador de crescimento utilizado que à escolha do explante inicial (PACHECO *et al.*, 2009).

A regeneração por organogênese ocorreu em espécies da seção *Extranervosae*, quando os cotilédones foram cultivados em meio contendo BAP e BAP com ANA (MANSUR *et al.*, 1993;

GAGLIARDI *et al.*, 2000 e 2002). Nas espécies da seção *Arachis*, por outro lado, a indução da organogênese ocorreu em resposta a BAP ou ANA, em combinação com TDZ (McKENTLY *et al.*, 1990; GENG *et al.*, 2011). A produção de brotos também ocorreu a partir de eixos embrionários cultivados em meio contendo BAP (GAGLIARDI *et al.*, 2000) e em segmentos nodais cultivados em meio contendo ANA (GAGLIARDI *et al.*, 2002). Em explantes foliares, a indução de brotos ocorreu em meio suplementado com ANA e BAP, utilizados isoladamente ou em combinação ou em meio contendo TDZ (McKENTLY, 1991; MANSUR *et al.*, 1993; REY *et al.*, 2000; MROGINSKI *et al.*, 2004).

Os primeiros estudos com as espécies da seção *Caulorrhizae* foram realizados em 1985, quando explantes foliares de *A. pintoi* foram cultivadas em meio suplementado com BAP + ANA, houve a regeneração por organogênese indireta (BURTNIK e MROGINSKY, 1985). Após este estudo inicial, as culturas com as espécies da seção *Caulorrhizae* só foram retomadas no ano 2000, com o cultivo de explantes foliolares de *A. pintoi* em meios com PIC + BAP, tendo sido observada a indução de embriogênese somática (REY *et al.*, 2000). Em 2006, folíolos da mesma espécie e citotipos diferentes, um citotipo diplóide,  $2n = 2x = 20$  (Fernández e Krapovickas, 1994) e um citotipo triplóides,  $2n = 30 = 3x$  (Peñaloza *et al.*, 1996), cultivados sob as mesmas condições de cultura, obtiveram uma resposta similar, novamente com a indução da embriogênese somática (REY e MROGINSKI, 2006).

A indução de embriogênese somática nas espécies silvestres de *Arachis* já foi descrita para as espécies *A. archeri* e *A. porphyrocalix* (secção *Erectoides*) e *A. appressipila* (Secção *Procumbentes*), em resposta a BAP (PACHECO *et al.*, 2007). Por outro lado, essa mesma via morfogênica foi induzida a partir de folhas de *A. pintoi* (Secção *Caulorrhizae*), *A. glabrata* (secção *Rhizomatosae*) e de gema apical e folíolo de *A. correntina* (secção *Arachis*), em meios suplementados com PIC (REY *et al.*, 2000; VIDOZ *et al.*, 2004, 2006).

Alguns dos sistemas de regeneração descritos acima foram ainda utilizados como base para o desenvolvimento de metodologias de conservação *in vitro*, com o objetivo de preservar e aumentar a disponibilidade de germoplasma, que pode ser utilizado em programas de melhoramento genético das espécies cultivadas. Além disso, a produção de moléculas bioativas também vem sendo avaliada em diferentes sistemas *in vitro*, principalmente em *A. hypogaea*.

## 1.7 INFLAMAÇÃO

O processo inflamatório é conhecido desde a antiguidade (aproximadamente 3.000 A.C.), e suas características clínicas foram descritas inicialmente pelos egípcios (ROBBINS *et al.*, 2001).

A palavra inflamação, do grego *phlogosis* e do latim *flamma*, significa fogo, área em chamas, foi descrita pela primeira vez por Celsus, um escritor romano que viveu entre os anos 30 A.C. e 38 D.C., onde observou os quatro sinais cardinais da inflamação: calor (aumento da temperatura local), rubor (hiperemia), tumor (edema) e dor, as quais Virchow acrescentou o quinto sinal clínico, a perda da função (ROCHA e GARCIA, 2006). Recentemente, com o advento dos microscópios eletrônicos foi possível descrever as reações celulares e fenômenos vasculares do processo inflamatório (DA SILVA *et al.*, 2003). Nos últimos anos, desenvolveu-se um grande interesse na tentativa de buscar respostas à etiologia fisiopatológica e controle farmacológico do processo inflamatório. Desde os organismos unicelulares mais simples, como as bactérias, até os mais complexos mamíferos, como os humanos, possuem mecanismos que respondem a estímulos celulares hostis e apresentam um sistema que busca manter a homeostase do organismo agredido. A resposta deste sistema envolve a fisiologia, bioquímica e imunologia do organismo e é denominada de inflamação (VOLTARELLI, 1994).

A resposta inflamatória representa um dos mecanismos de defesa do nosso organismo. A palavra inflamação pode ser apropriadamente referida como uma cascata inflamatória, e que consiste de uma longa cadeia de reações e atividades celulares com o intuito de reparar o tecido, em que ocorre uma lesão ou destruição celular, ocorrendo atividades celulares, dilatação de arteríolas e vênulas, assim como aumento da permeabilidade vascular e fluxo sanguíneo, como consequência, o acúmulo de líquidos (CARVALHO, 2004). A inflamação ocorre em decorrência da ativação de alguns mecanismos que provocam alterações nos componentes humorais e celulares após injúria tecidual. A exposição a um patógeno gera uma migração de células circulantes, que são direcionadas pela presença de substâncias quimiotáticas no sítio inflamatório. A resposta na área da lesão caracteriza a área inflamada que apresenta sinais clínicos como rubor, calor, edema, dor e prejuízo funcional (CRUVINEL *et al.*, 2010). Cada estímulo provoca um padrão característico de resposta que, apesar da diversidade e complexidade dos mediadores químicos, apresentam variação relativamente pequena (CARVALHO, 2004).

O sistema imune está presente em praticamente todos os tecidos do organismo. O termo imunidade refere-se à proteção. As células do sistema imunológico agem de forma coletiva e desenvolvem a resposta de defesa contra micro-organismos infecciosos ou substâncias estranhas. A capacidade de circular e realizar trocas entre o sangue, à linfa e os tecidos é de fundamental

importância para a geração das respostas imunológicas, inclusive a inflamação (ABBAS *et al.*, 2011).

O processo inflamatório envolve tecido conjuntivo, incluindo o plasma, células circulantes, vasos sanguíneos e constituintes celulares e extracelulares. As respostas vasculares e celulares são mediadas por fatores químicos derivados do plasma ou de células quando há estímulo inflamatório. A interação destes mediadores, juntos ou em sequência, com componentes celulares e vasculares influencia a duração e evolução da resposta inflamatória (ROBBINS *et al.*, 2001). No decorrer do processo inflamatório podem ser reconhecidas reações de curta duração e rápida instalação, que duram de 1 a 2 semanas, pertencentes ao grupo das inflamações agudas, e/ou reações que persistem por mais tempo, meses ou anos, de velocidade lenta e insidiosa, pertencentes ao grupo das inflamações crônicas (DA SILVA *et al.*, 2003; RANG *et al.*, 2007).

A inflamação aguda é a resposta inicial ao agressor e pode tornar-se desconfortável para o paciente devido ao edema formado e a dor. Além do combate ao agente agressor, de forma a evitar a sua disseminação a outras regiões do corpo, a resposta inflamatória tem a finalidade de eliminar produtos resultantes da destruição celular, assim, promovendo condições ideais para a reparação do tecido lesado. Todo esse processo de restituição da normalidade tecidual é concluído pela reparação, fenômeno inseparável da inflamação (TEDGUI e MALLAT, 2001). Contudo as vias de integração da sinalização do sistema imune são altamente coordenadas, o que assegura que o processo seja autolimitante (SERHAN *et al.*, 2007). Supondo que não existisse o processo inflamatório, teríamos consequências graves: haveria um descontrole das infecções, não haveria cicatrização das feridas além de o processo destrutivo nos órgãos atacados seria permanente. As reações inflamatórias, por exemplo, são o pilar de doenças crônicas, tais como a artrite reumatóide, a aterosclerose e a fibrose pulmonar, assim como de reações de hipersensibilidade potencialmente fatais a picadas de insetos, drogas e toxinas. Existe uma série de fenômenos biológicos envolvidos no processo inflamatório, que se associam e se complementam, com isso, formam reações em cascata, envolvem a interação complexa entre as células inflamatórias, tais como macrófagos, neutrófilos e linfócitos (TEDGUI e MALLAT, 2001).

Os eventos vasculares iniciam logo após a lesão e se desenvolvem em velocidades variáveis dependendo da intensidade da agressão. Primeiramente, ocorrem alterações no calibre vascular conduzindo ao aumento do fluxo sanguíneo, causador do calor e do rubor na área inflamada, logo seguido pelo alentecimento da circulação e instalação do processo de estase sanguínea permitindo a marginalização leucocitária (SZEKANECZ *et al.*, 2004). O aumento da permeabilidade vascular devido às alterações estruturais na rede microvascular permite as proteínas plasmáticas deixarem a circulação e se acumularem no tecido intersticial (exsudação), o que causa o edema. O

extravasamento plasmático pode ocorrer por alargamento das junções intercelulares endoteliais das vênulas ou por lesão direta nas mesmas (DA SILVA *et al.*, 2003; ROBBINS *et al.*, 2001). A vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular com exsudação são provocados por mediadores químicos produzidos a partir do plasma e das células. As células residentes do tecido são estimuladas. A vasodilatação local e o aumento da permeabilidade capilar são mediados por aminas vasoativas, histamina e serotonina liberados por mastócitos e monócitos. (COUTINHO *et al.*, 2009). Além disto, o endotélio ativado passa a expressar moléculas de superfície que favorecem a aderência e migração de leucócitos para o tecido. Também são ativados componentes do sistema complemento, do sistema de cininas e do sistema de coagulação. Adicionalmente, os macrófagos residentes liberam citocinas inflamatórias, como IL-1, TNF- $\alpha$  e quimiocinas.

A migração leucocitária (figura 20) acontece com a ativação do endotélio. As selectinas permitem a adesão fraca dos neutrófilos, as integrinas promovem a adesão forte e as quimiocinas ativam e estimulam a migração dos neutrófilos para o foco inflamatório. Estas interações fazem com que os neutrófilos rolem pela parede do vaso e sejam expostos aos fatores quimiotáticos. Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes no ser humano e expressam uma gama de moléculas de adesão (LUSTER *et al.*, 2005). O gradiente quimiotático crescente direciona a migração dos neutrófilos ao sítio inflamatório. Simultaneamente a este processo, mediadores lipídicos também são produzidos. Estes mediadores são derivados do ácido araquidônico; são produzidos em consequência da ativação de fosfolipases que clivam fosfolipídios constituintes da membrana celular, gerando prostaglandinas, leucotrienos e PAF (fator de ativação plaquetária). As prostaglandinas produzidas têm funções inflamatórias que induz a febre, a hiperalgesia e a vasodilatação (MESQUITA JR *et al.*, 2008).

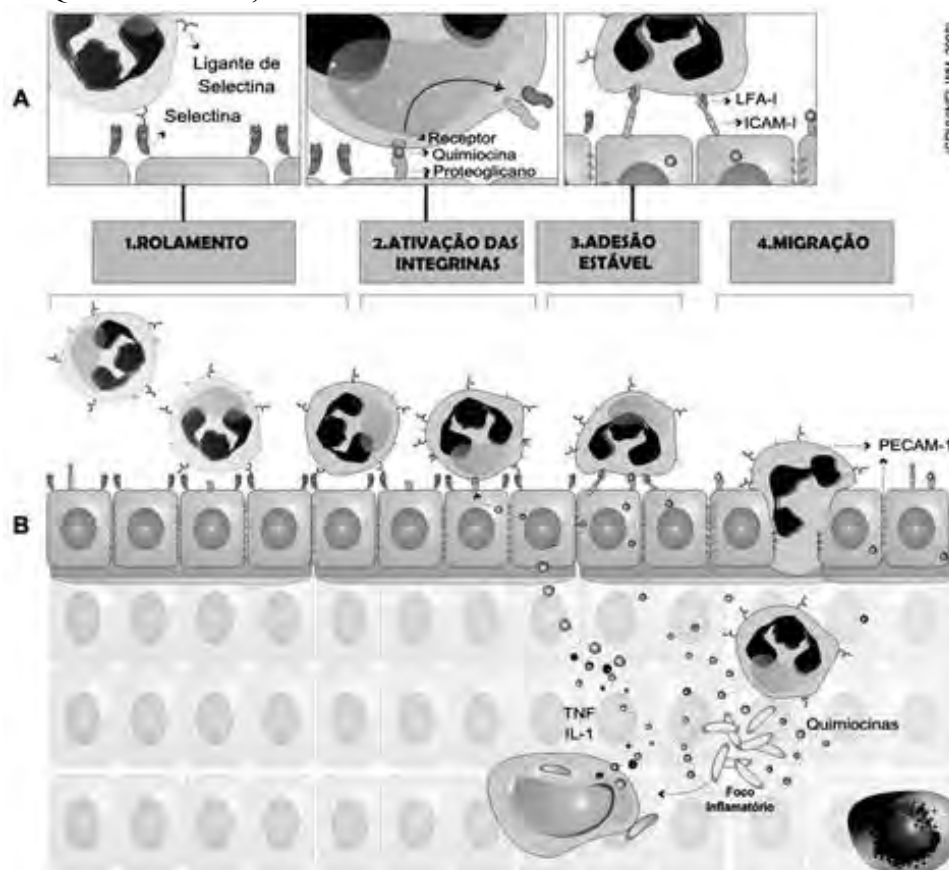
O desenvolvimento da estase local permite a orientação periférica dos leucócitos e a interação destes com moléculas de adesão na parede das células endoteliais que são estimuladas por fatores químicos a serem liberadas de grânulos para a superfície das células. Primeiramente a interação é frágil, ocasionando o processo de rolamento do leucócito sobre a superfície endotelial. Posteriormente, sobre ação do TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , as células endoteliais expressam E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1 que permite maior estabilidade a interação leucócito-endotélio propiciando a adesão leucocitária, projeção de pseudópodes por entre as células endoteliais e diapedese (DA SILVA *et al.*, 2003; ROBBINS *et al.*, 2001). Após atravessarem a membrana basal os leucócitos aderentes migram até o local da infecção ao longo de um gradiente de fatores quimiotáticos.

Ainda no foco inflamatório, ocorre um importante evento: a ativação dos mastócitos e agregação plaquetária, que também resultam na liberação de mais mediadores quimiotáticos. Dentre os mediadores quimiotáticos citam-se: os prostanóides (PGI<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> e PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ), derivados da

via da lipoxigenase (5 HETE, LTB<sub>4</sub>), cininas, substâncias liberadas de neutrófilos ativados, entre outros (TAN *et al.*, 1999).

Figura 2018 - Mecanismos de migração dos leucócitos para o sítio inflamatório. (A) detalhe e (B) visão geral das etapas da migração: 1. Rolamento, 2. Ativação das integrinas, 3. Adesão estável e 4. Migração/diapedese.

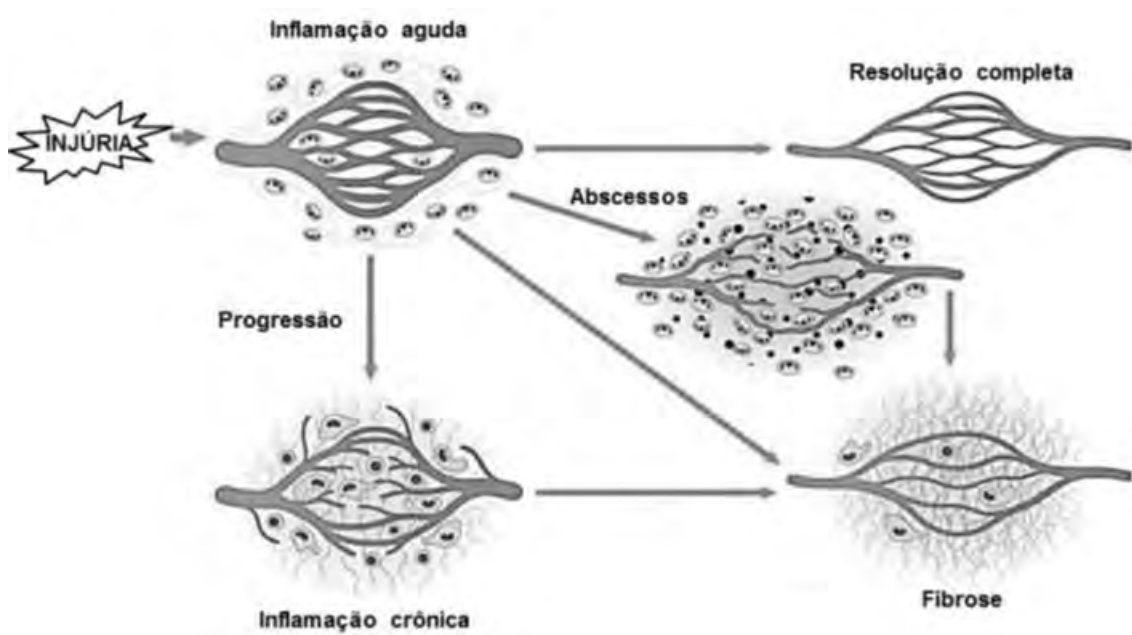
Fonte: MESQUITA JR *et al.*, 2008.



As primeiras células a migrar para o local da inflamação são os neutrófilos, seguidos pelos monócitos e linfócitos. Os agentes quimiotáticos ativam as células conduzindo a fagocitose, a desgranulação e secreção enzimática, produção de mediadores químicos e lesão tecidual devido à liberação moderada de produtos não apenas no interior do fagossomo, mas no espaço extracelular (ROBBINS *et al.*, 2001; DA SILVA *et al.*, 2003). Após a eliminação ou neutralização do agente causador do estímulo inflamatório ocorre a diminuição do estímulo celular, auto-limitando a síntese de mediadores químicos e reduzindo a sinalização pró-inflamatória. Posteriormente inicia-se o processo de resolução da resposta inflamatória aguda e o retorno a homeostasia, evitando danos teciduais devido à produção prolongada ou inapropriada de mediadores químicos pelos polimorfonucleares juntamente com a limpeza de debris celulares (SERHAN *et al.*, 2007; SERHAN *et al.*, 2008). As rotas de saída disponíveis a leucócitos incluem recirculação sistêmica ou morte local seguida pela fagocitose realizada pelos macrófagos recrutados. Uma vez completada a

fagocitose, o macrófago pode permanecer no tecido ou morrer através de apoptose. A inflamação aguda pode culminar em resolução completa, com a cicatrização e reconstituição tecidual ou cura por fibrose, quando a destruição tecidual é significativa, posterior ou não a formação de abscessos. Caso a inflamação aguda não resolva por completo o quadro inflamatório, pode ocorrer a formação da inflamação crônica (Figura 21) (GAESTEL *et al.*, 2009; SERHAN *et al.*, 2008).

Figura 21 - Representação esquemática dos possíveis eventos de evolução do processo inflamatório agudo (ROBBINS *et al.*, 2001).



A inflamação crônica pode iniciar quase ao mesmo tempo ou após a inflamação aguda (RUÈGG, 2006). A transição de aguda para crônica pode ocorrer devido à persistência do agente lesivo, interferência no processo de reparo tecidual, desregulação de qualquer etapa acima citada ou resultado de surtos agudos repetitivos. Além disso, podem ser originadas de exposição prolongada ao agente infeccioso ou a reações auto-imunes (DA SILVA *et al.*, 2003; ROBBINS *et al.*, 2001). Embora possa suceder a inflamação aguda, a crônica geralmente começa de maneira insidiosa, como uma resposta de baixo grau, latente e muitas vezes assintomática. Este último tipo de inflamação crônica inclui algumas doenças humanas, como: artrite reumatóide, aterosclerose, tuberculose e doenças pulmonares crônicas.

A inflamação crônica pode ocorrer devido a diversos fatores como: Infecções persistentes por determinados patógenos que possuem baixa toxicidade e suscitam uma reação imune conhecida como hipersensibilidade tardia; Exposição prolongada a agentes potencialmente tóxicos exógenos ou endógenos; Auto-imunidade: sob certas condições, reações imunes são criadas contra os próprios

tecidos do indivíduo, levando á Doenças auto-imune. Nessas doenças, os auto-antígenos suscitam uma reação imune autopetpetuadora que resulta em diversas doenças inflamatórias crônicas.

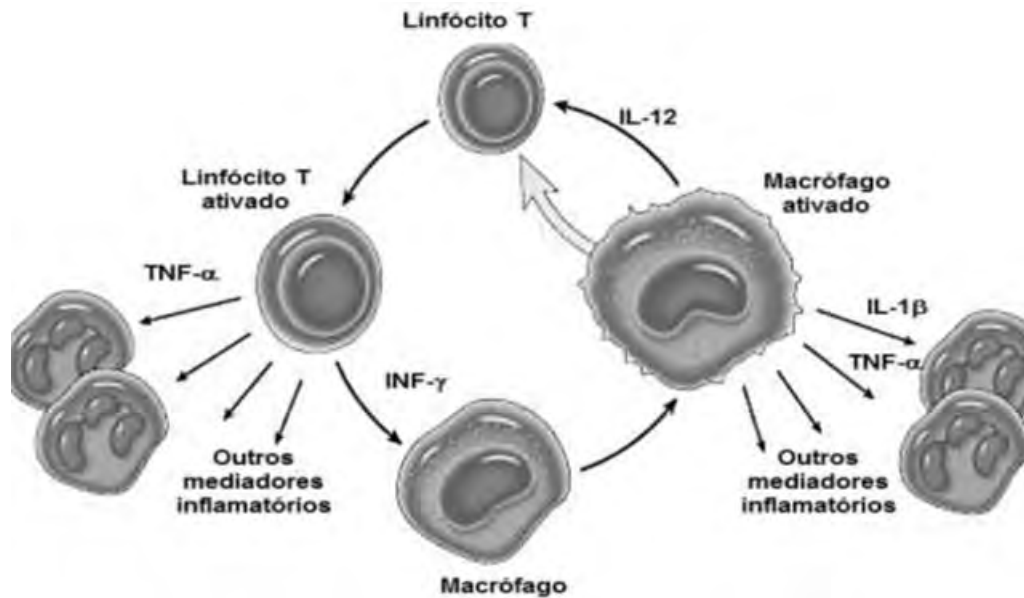
Distintamente da inflamação aguda, a inflamação crônica caracteriza-se por: Infiltração de células mononucleares (macrófagos, linfócitos e plasmócitos), reflexo de uma reação persistente à lesão; Destruição tecidual induzida, sobretudo pelas células inflamatórias; Tentativas de cicatrização por substituição do tecido danificado por tecido conjuntivo rico em fibroblasto (fibrose), realizada por proliferação de pequenos vasos sanguíneos (angiogênese) (DA SILVA *et al.*, 2003; GAESTEL *et al.*, 2009).

Os monócitos circulantes de acordo com seu fenótipo e estímulo apropriado podem migrar para o sítio de inflamação e se diferenciar em macrófagos teciduais residentes ou células dendríticas (DCs) (CASTELLHEIM *et al.*, 2009; CHO *et al.*, 2008). Os macrófagos estão estrategicamente dispostos nos tecidos e apesar de responderem quase tão rápido quanto os neutrófilos possuem uma meia-vida maior e persistem por mais tempo no sítio inflamatório e não são terminalmente diferenciados o que propicia a proliferação (CASTELLHEIM *et al.*, 2009).

Os linfócitos T são mobilizados nas reações imunológicas mediadas por anticorpos e células, mas também, por razões desconhecidas na inflamação sem mediação imune (DA SILVA *et al.*, 2003). As DCs, por serem células profissionais na apresentação de antígenos migram até os linfonodos onde ativam células T. As células NKs também são importantes fontes de IFN-g e dependem de sinais de células acessórias para se ativarem (CASTELLHEIM *et al.*, 2009). Os plasmócitos produzem anticorpos direcionados a antígenos persistentes no local da inflamação (ROBBINS *et al.*, 2001; LUSTER *et al.*, 2005; CASTELLHEIM *et al.*, 2009).

Figura 192 - Sinalização de citocinas (ROBBINS *et al.*, 2001).





As citocinas são moduladores-chave da inflamação, participando da inflamação aguda e crônica, através de um complexo e, por vezes aparentemente contraditórias redes de interações. Melhor compreensão de como estas vias são reguladas ajuda a facilitar a identificação mais precisa dos agentes que mediam a inflamação e o tratamento de doenças inflamatórias. É possível classificar as citocinas com base na natureza da resposta imune. As citocinas também realizam papéis específicos, dependendo do tipo de célula e do local de atuação. As citocinas pró-inflamatórias são a interleucina-1 (IL-1), IL-6 e do fator de necrose tumoral (TNF), os quais sinalizam através da citocina tipo I, receptores que são estruturalmente divergentes de outros tipos de receptores de citocina. Em contraste, a quimioquina pró-inflamatória crítica, IL-8, as vias de sinalização são através de receptores acoplados à proteína (GPCRs) (Figura 22).

### 1.6.1 Fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ )

O termo fator de necrose tumoral foi inicialmente atribuída a duas moléculas, a TNF- $\alpha$  um fator de necrose tumoral derivado de monócitos, e a TNF- $\beta$ , fator de necrose tumoral derivado de linfócitos. A TNF- $\alpha$  foi inicialmente identificada na década de 1970 como fator de indução de endotoxina do soro, responsável pela necrose de tumores, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (CARSWELL *et al.*, 1975). Posteriormente a TNF- $\alpha$  foi isolada (AGGARWAL *et al.*, 1985); e o gene responsável pela sua expressão foi identificado (PENNICA *et al.*, 1984). É um potente mediador inflamatório que é central para a ação inflamatória do sistema imune inato, incluindo a

indução da produção de citocinas, ativação ou expressão de moléculas de adesão, e estímulo ao crescimento (TARTAGLIA e GOEDDEL, 1992; LOCKSLEY *et al.*, 2001). Ele estimula a proliferação de células normais, exerce atividade citolítica ou citostática contra células tumorais, e provoca efeitos inflamatórios, anti-virais e imunomoduladores (GUPTA, 2002). A TNF- $\alpha$  também tem demonstrado que realiza funções adicionais ligadas com o metabolismo dos lipídios, a coagulação, a resistência à insulina, e a função endotelial. De fato, tem sido mostrado ser uma das mais importantes citocinas pleiotrópicas, mediando respostas inflamatórias e imunes.

A TNF- $\alpha$  é sintetizada como um precursor da proteína transmembranar (mTNF- $\alpha$ ), com uma massa molecular de 26kDa (TRACEY *et al.*, 2008). Após ser sintetizado, é transportado através do retículo endoplasmático rugoso (RER), complexo de Golgi, reciclando o endossoma na superfície celular (STOW *et al.*, 2009).

Assim, o TNFR1 é considerado o mais importante receptor para a ativação das vias de sinalização pró-inflamatória. É importante ressaltar que vários receptores de citocinas submetem-se ao ectodomínio influenciado por enzimas proteolíticas localizada na membrana. Este processo liberta uma forma solúvel do receptor que pode ter uma função biológica de limitar a disponibilidade de citocina para outras células. Ambos TNFR1 e TNFR2 são clivados pela TACE posteriormente limitando os ligantes, terminando o sinal por diminuição da disponibilidade dos receptores de membrana plasmática, bem como a liberação da TNFR solúvel para sequestrar as TNF- $\alpha$  livres. A produção de TNFR1 solúvel tem sido relatada em condições inflamatórias (SAKIMOTO, 2009). Como mencionado anteriormente, a TNFR1 forma um trímero antes da ligação, o que poderia levar à ativação de sinais de transdução, reunindo o DD dos receptores. Este pode ser suprimida pela associação dos supressores de DD (SODD) com o TNFR DD. Após ligação de TNF $\alpha$ , SODD se desassocia dos TNFR, permitindo que adaptadores moleculares sejam recrutados. Assim, existem mecanismos intrínsecos para limitar a sinalização da TNFR, sinalizando a ausência dos ligantes, bem como a reduzir a sinalização seguinte (TURNER *et al.*, 2014).

### 1.7.2 Neutrófilos e a produção de óxido nítrico

Após ser estimulado por fatores ambientais, durante o processo inflamatório, os neutrófilos sofrem diversas alterações metabólicas que disseminam a formação de EROs, referido na literatura como “*burst*”, surto ou explosão metabólica ou oxidativa, caracterizado pelo aumento do consumo de oxigênio e de ATP, aumentando a oxidação da glicose pela via hexose monofosfato, do transporte

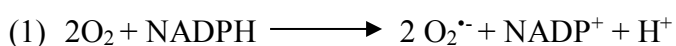
de elétrons e da geração de radicais livres, dentre estes, os EROs e também de espécies reativas de nitrogênio (ERN). Ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o  $H_2O_2$ , HOCL, radical hidroxila ( $HO^{\bullet}$ ) e o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) são as EROs mais importantes. Dentre as ERNs destacam-se o óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ), óxido nitroso ( $N_2O_3$ ), ácido nitroso ( $HNO_2$ ), nitritos ( $NO_2^-$ ), nitratos ( $NO_3^-$ ) e peroxinitritos ( $ONOO^-$ ). Alguns destes são reativos somente com os lipídios, porém outros podem reagir tanto com os lipídios como atacar também as proteínas e o DNA. Outros, mesmo sendo pouco reativos, são capazes de gerar espécies danosas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

O NO é produzido por células dendríticas, NKs, mastócitos, monócitos, macrófagos, células de Kupffer, eosinófilos e neutrófilos e também por outras células envolvidas na resposta imune como células endoteliais, células epiteliais, fibroblastos, queratinócitos, condrócitos, hepatócitos, células mesangiais e células de Schwan (BOGDAN *et al.*, 2001). O NO não atua por meio de receptores, a especificidade do alvo celular depende de sua concentração, sua reatividade química e da proximidade com as células-alvo (COLEMAN *et al.*, 2001).

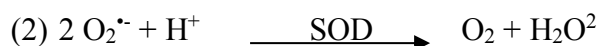
O NO tem vários papéis no sistema imune, sendo um agente tóxico para organismos infecciosos, indutor ou supressor de apoptose, imunoregulador principalmente pró-inflamatório, vasoregulador, na agregação plaquetária e também na neurotransmissão (BOGDAN *et al.*, 2001; AZADMEHR *et al.*, 2009). É um potente vasodilatador, aumentando a permeabilidade vascular e a produção de prostaglandinas, regula o recrutamento de leucócitos e exerce ação citotóxica contra micro-organismos. A expressão aumentada de *i*NOS tem sido observada em pacientes com infecção do trato urinário, tuberculose, malária, sepse e em tumores, onde as altas concentrações de NO são responsáveis pela angiogênese, hiperpermeabilidade vascular e consequentemente desenvolvimento do tumor. Existe um tênue limite de concentração tissular entre a não-toxicidade às células do hospedeiro e a toxicidade necessária para ação antimicrobica. (GUZIK *et al.*, 2003).

O metabolismo oxidativo é ativado a partir do complexo enzimático denominado NADPH-oxidase (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase) formado por componentes citosólicos (p67phox, p47phox e p40phox) e de membrana plasmática (gp91phox e p22phox) que coexistem em um heterodímero denominado flavocitocromo b558.

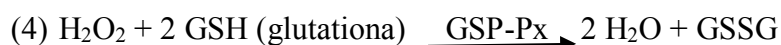
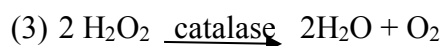
O complexo NADPH-oxidase ativo transporta elétrons do NADPH no sítio citoplasmático para o  $O_2$  no fluido extracelular ou no espaço intrafagossômico, formando o radical ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) (reação 1)



Os ânions  $O_2^{\cdot-}$  são muito reativos e logo são removidos pela enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD), formando o  $H_2O_2$ , que pode ser utilizado como substrato para a produção de outras ERRO e/ou ERN mais efetivas como microbicidas (reação 2)



O  $H_2O_2$  forma o radical  $HO^{\cdot}$  e não existe nenhuma enzima que o remova. Com isso, as enzimas catalase e glutathione peroxidase (GSH-Px) tornam-se extremamente importantes para os seres vivos, atuando na remoção do  $H_2O_2$  (reação 3 e 4) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).



As EROs e ERNs são decorrentes de diversos processos fisiológicos e exercem funções importantes no organismo, como: atividades bactericidas, fungicidas e viróicas. Participam de processos de sinalização celular, estão envolvidos na síntese e regulação de muitas proteínas e também são utilizadas para acelerar a liberação de oxigênio ligado a hemoglobina das hemácias para o interior dos tecidos, favorecendo as atividades metabólicas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Apesar de serem vitais para a sobrevivência humana, estas reações são relacionadas também com o aparecimento de processos degenerativos das inflamações crônicas e diversas patologias como a aterosclerose, envelhecimento, infarto, câncer, asma, mal de Alzheimer, diabetes, dentre outros (NUR *et al.*, 2011).

Quando os fagócitos são ativados, as defesas antioxidantes enzimáticas (catalase, GSH-Px, SOD) e não enzimáticas (vitamina A, C, E, flavonóides, carotenóides), atuam contra as toxidades dessas espécies reativas que são geradas e são responsáveis pela manutenção da homeostase, equilíbrio entre a produção e a eliminação das EROs. O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante, com predomínio dos oxidantes, com dano consequente (NUR *et al.*, 2011).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Promover estudos biotecnológicos com a espécie vegetal *Arachis repens* visando à obtenção de extratos por diferentes técnicas, o encaminhamento do estudo fitoquímico e, ainda, a investigação das atividades antioxidante e anti-inflamatória.

#### 2.1.1 Objetivos específicos

##### **Para o material *in vitro*:**

- I. Otimizar os sistemas de cultura *in vitro* na indução de calos;
- II. Estudar o efeito da elicitação por ultrassom na produção de resveratrol;

##### **Para o material *in vivo*:**

- III. Analisar diferentes métodos de preparo de extratos hidroalcoólicos de folhas de *A. repens*, a saber: maceração, ultrassom e micro-ondas, a fim de se comparar o rendimento bruto obtido e, a presença de substâncias bioativas, com foco para o resveratrol;
- IV. Otimizar a extração de resveratrol assistida por reator de micro-ondas, utilizando o planejamento experimental estratégico em diferentes condições de temperatura, proporção do material vegetal:solvente, concentração do solvente e agitação;
- V. Determinar, a partir de diferentes extratos e partições obtidos do processo de maceração, a atividade alelopática e a atividade anti-inflamatória;
- VI. Promover a caracterização química das substâncias e/ou grupo de substâncias responsáveis pelo efeito alelopático e/ou imunomodulador através de técnicas de RMN-<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (mono e bidimensionais), CLAE-DAD, CLAE-EM e CG-EM.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Material vegetal

Mudas de *A. repens in vivo* foram adquiridas comercialmente (CADEG – Centro de abastecimento do Estado da Guanabara, Benfica, RJ). A identificação botânica foi realizada pelo professor Dr. José Francisco Valls (EMBRAPA) e, a excicata foi depositada no Herbário da Universidade do Estado do Rio de Janeiro sob o número HRJ 11.767. As mudas foram mantidas em telado, em vasos contendo substrato Plantmax®.

#### 3.2 Indução de calogênese

Para os experimentos *in vitro*, foi utilizado o meio basal MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), contendo sacarose a 3% e solidificado com ágar a 0,7%. O pH do meio foi ajustado para 5,8, antes da esterilização em autoclave (Fabbe-Primar®) (15 min a 121°C e 1,0 atm).

As culturas foram mantidas em câmara de crescimento à 25°C ± 2°C, sob fotoperíodo de 16h, com intensidade luminosa média de 46  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia (branca fria).

Segmentos nodais e internodais (0,5 cm) foram excisados de plantas *in vitro* com 30 dias de cultura, inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de TDZ (Thidiazuron) (13,6 – 31,8  $\mu\text{M}$ ) e mantidos a 25° ± 2°C por 30 dias (GARCIA, 2012).

Os calos obtidos foram subcultivados a cada 30 dias. O acúmulo da biomassa dos calos foi avaliado por meio da aferição do peso de matéria fresca e seca, sendo o peso seco aferido após secagem em estufa a 45°C, por 24h.

### 3.3 Metodologias extrativas para obtenção de reverastrol e análise de fenólicos totais: estudos de correlação com atividade antioxidante

#### 3.3.1 Extração por maceração do material *in vivo*

Para a preparação dos extratos foram utilizadas folhas excisadas de plantas de *A. repens* mantidas em telado, sendo estas maceradas em metanol:água em diferentes concentrações (40, 60, 80 e 100%) (v/v) (0,1 g de peso seco / 4 mL de solvente), por 1h. Foram utilizadas ainda amostras de calos oriundos de segmentos nodais inoculados em meio MS suplementado com TDZ a 13,6 $\mu$ M, mantidos a 25  $\pm$  2°C, com aproximadamente 30 dias de cultura. Os materiais foram secos em estufa (TECNAL® TE-393L) (45 °C) por 24 h, triturados em moinho (IKA – A11) e armazenados a -4°C até a utilização. Paralelamente, foi realizada a análise do teor de resveratrol, avaliação da atividade antioxidante através do teste de captura do radical DPPH e, a determinação de fenóis totais pelo método de equivalência do ácido gálico, segundo as metodologias descritas a seguir, a fim de estabelecer uma possível correlação entre estes.

#### 3.3.2 Elicitação por ultrassom do material *in vitro*

Para elicitação por ultrassom foram utilizadas amostras de calos de segmentos nodais inoculados em meio MS suplementado com TDZ 13,6  $\mu$ M com 30 dias de cultura. Foi utilizado um banho ultrassônico, com frequência de 40 KHz, por diferentes tempos (1, 5 e 10 minutos). Após a sonicação, as amostras foram mantidas no mesmo frasco em que foram elicítadas por tempos distintos (0 - 72 e 120 horas). Decorridos estes tempos, foi realizada a preparação dos extratos por US nas condições otimizadas (ultrassom por 5 minutos em MeOH 80%, após pré-tratamento por maceração no mesmo solvente por 5 minutos). Posteriormente, as soluções extrativas foram filtradas em papel filtro qualitativo (3 micras – NAIGON 3400) e rotaevaporados (Marconi – M120) a 45°C, pesados e armazenados a - 4°C previamente a análise por CLAE-DAD.

### 3.3.3 Extração por maceração do material *in vivo*

Para a preparação dos extratos, folhas de plantas *in vivo* foram maceradas em metanol P.A. (TEDIA®) em diferentes concentrações (40, 60, 80 e 100%) (v/v) (0,1 g de peso seco / 4 mL de solvente), por 1h. As soluções extrativas foram filtradas em papel filtro e colocados em frascos âmbar, para posterior concentração em evaporador rotativo. Os extratos foram armazenados em freezer (-20°C) e posteriormente, para as análises, foram solubilizados em metanol, na concentração de 10 mg/mL.

### 3.3.4 Extração assistida por ultrassom do material *in vivo*

Para a extração assistida por ultrassom em materiais obtidos a partir de plantas *in vivo*, foram testados diferentes fatores que influenciam na eficiência da extração, a saber:

- a) Tempo de extração: A exposição ao ultrassom foi avaliada por 5, 10, 20 ou 30 minutos. As amostras foram suspensas em frascos âmbar (10 mL), a proporção de metanol em água foi de 80%, com uma relação sólidos/solvente de 1g / 40 mL.
- b) Tempo de pré-tratamento por maceração: As amostras foram maceradas por diferentes períodos (5, 10, 20 ou 30 minutos) antes da exposição ao ultrassom por 5 minutos. A proporção de metanol em água foi de 80%, com uma relação sólido/solvente de 1g / 40 mL.
- c) Relação sólido/solvente para a extração: Foram utilizadas as proporções de 20, 30, 40 e 50 mL por grama de material seco. A proporção de metanol em água foi de 80% e os extratos foram sonicados por 5 minutos sem a utilização do pré-tratamento.

A extração assistida por ultrassom foi realizada em um banho ultrassônico com potência de 120 W e frequência de 40 KHz. O equipamento consiste em uma cuba retangular (0.30 x 0.15 x 0.10 m) com volume de 3.8 L e controle de tempo. Posteriormente, os extratos foram filtrados em papel



filtro e rotaevaporados a 45°C, pesados e armazenados a -4°C antes da análise por CLAE. Os ensaios foram realizados em triplicata.

### 3.3.5 Extração assistida por reator micro-ondas do material *in vivo*

Para a extração assistida por micro-ondas foram utilizadas folhas de plantas *in vivo*. Os experimentos foram realizados em aparelho de micro-ondas Anton Paar®, modelo Monowave™ 300. Foram avaliados, através de um planejamento experimental do tipo Delineamento Fatorial Fracionário (DFF), o efeito da temperatura (30 - 70°C), concentração do solvente (metanol:água 60 – 100%) (v / v), agitação (600 - 1200 rpm) e massa (solido-solvente) (1:20 - 1:60 massa/volume) na concentração do resveratrol. A extração foi realizada a uma pressão fixa de 6 bar e o tempo fixado em 20 minutos. O equipamento de irradiação por micro-ondas foi operado em modo de controle de temperatura, medida internamente por um termômetro de rubi. Após a reação, as soluções extrativas foram filtradas em papel de filtro, rotaevaporadas a 45°C, pesadas e analisadas por CLAE-DAD a fim de se estabelecer a concentração de resveratrol extraída.

Os valores reais e codificados para as variáveis independentes utilizados no planejamento fatorial  $2^{4-1}$  (DFF) na extração de resveratrol são apresentados na Tabela 1. As combinações das variáveis independentes utilizadas no DFF são demonstradas na Tabela 2.

Tabela 1 – Valores reais e codificados (+ nível superior, 0 nível intermediário, - nível inferior) para as variáveis independentes utilizadas no planejamento fatorial  $2^{4-1}$ .

Variáveis	-1	0	+1
Agitação (rpm)	600	900	1200
Temperatura (°C)	30	50	70
Solvente (%)	60	80	100
Massa (g/mL)	1:60	1:40	1:20

Tabela 2 – Variáveis independentes estudadas no Planejamento fatorial fracionário (FFD).

Entrada	Agitação (rpm)	Temperatura (°C)	% de Solvente	Massa
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	1
3	-1	1	-1	1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	1
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0

### 3.3.5.1 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para a otimização da extração de resveratrol assistida por micro-ondas.

Tendo sido estabelecidas as variáveis independentes que efetivamente apresentaram significância, nas faixas estudadas, sobre o modelo investigado, um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi empregado para obter as condições ideais para a otimização do processo de extração do resveratrol. Os parâmetros de extração envolvidos foram os mesmos descritos anteriormente (Tabela 1), com a otimização dos intervalos estudados. As variáveis, juntamente com os valores codificados e não codificados são apresentados na Tabela 3. Os valores codificados para a otimização da EAM via DCCR estão demonstrados na tabela 4.

Tabela 3 - Valores reais e codificados (+ nível superior, 0 nível intermediário, - nível inferior) para as variáveis independentes utilizadas no Delineamento Composto Central Rotacional  $2^{4-1}$ .

Variável	-2	-1	0	+1	+2
Agitação (rpm)	900	975	1050	1125	1200
Temperatura (°C)	30	37.5	45	52.5	60
Proporção solvente / sólido (mL/g)	70	75	80	85	90
m (g)	1:35	1:30	1:25	1:20	1:15

Tabela 4 – Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) proposto para a otimização do processo.

Entrada	Níveis das variáveis			
	Agitação	Temperatura	Concentração do solvente	massa
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	-1
9	-1	-1	-1	1
10	1	-1	-1	1
11	-1	1	-1	1
12	1	1	-1	1
13	-1	-1	1	1
14	1	-1	1	1
15	-1	1	1	1
16	1	1	1	1
17	-2	0	0	0
18	-2	0	0	0
19	0	-2	0	0
20	0	-2	0	0
21	0	0	-2	0
22	0	0	-2	0
23	0	0	0	-2
24	0	0	0	-2
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0

### 3.4 Avaliação de atividades antioxidante

#### 3.4.1 Capacidade de captura do radical DPPH

A capacidade dos extratos de plantas *in vivo* em sequestrar o radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila – SIGMA ALDRICH®) (Figura 23) foi determinada utilizando a metodologia descrita por Rufino *et al.* (2007). Para a avaliação da atividade antioxidante os extratos de plantas

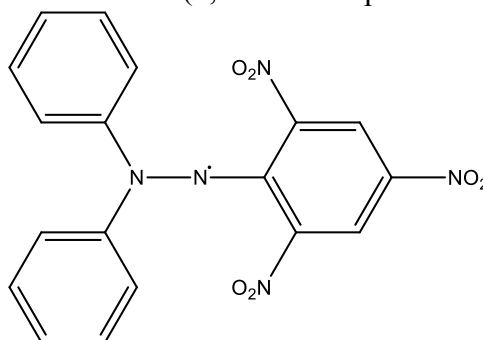
*in vivo*, provenientes das diferentes metodologias extrativas (itens 3.3) foram ressuspensos na concentração de 10 mg/mL. As amostras (25  $\mu$ L) foram adicionadas à solução de DPPH (60  $\mu$ M) (975  $\mu$ L), completando um volume de 1 mL, em ambiente iluminado com luz vermelha. A absorvância foi medida a 515 nm, 60 min após o início da reação, sendo as leituras de absorvância efetuadas em espectrofotômetro (Thermo Scientific, UV-Visible Spectrophotometer, Biomate 3s). O metanol foi utilizado como branco e a solução metanólica de DPPH foi utilizada como controle negativo. Como controle positivo foi utilizada a quercetina, cuja capacidade de captura do radical DPPH é mostrada na Figura 24. Os experimentos foram realizados em triplicata. A densidade ótica das leituras das amostras foi correlacionada com as leituras do controle, estabelecendo-se a porcentagem de sequestro do radical DPPH. Os valores de absorvância em todas as concentrações testadas foram convertidos em porcentagem de atividade antioxidante (%AA), determinada pela equação:

$$\%AA = \{ [Abs_{controle} - (Abs_{amostra}) / Abs_{controle}] \times 100 \}$$

Onde  $Abs_{controle}$  é a absorvância inicial da solução metanólica de DPPH (60  $\mu$ M) e  $Abs_{amostra}$  é a absorvância da mistura reacional (DPPH+amostra) (Sousa, *et al* 2007).

A atividade antioxidante dos extratos foi determinada com base na de concentração-resposta da captura do radical DPPH pela quercetina (Figura 24).

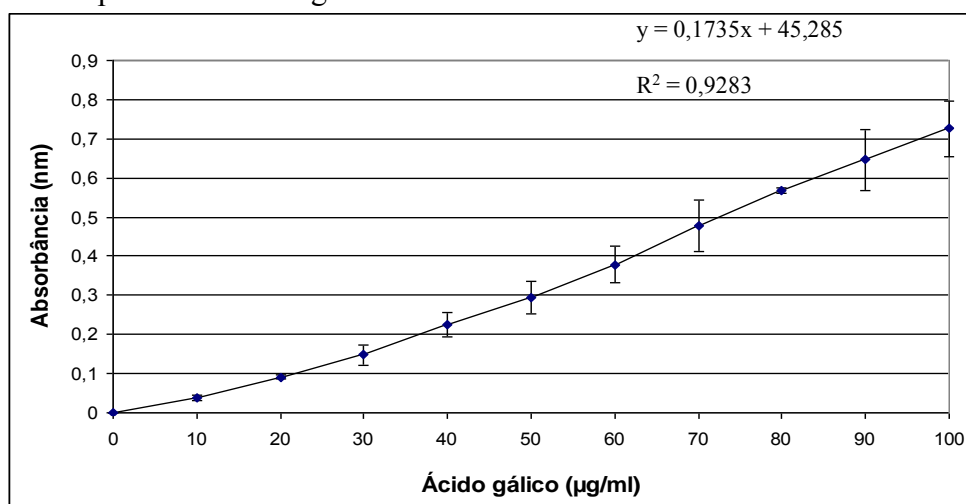
Figura 20–Estrutura química do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila).



### 3.5 Determinação de fenóis totais

A determinação do teor de fenóis totais presentes nos extratos metanólicos, de folhas *in vivo* e dos calos, foi realizada por quantificação espectrofotométrica utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, de acordo com HOLLAND *et al.* (2011). Para cada amostra, 180µL de reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich®, Milwaukee, Wisconsin, EUA) a 10% (v/v) foram adicionados a 90µL de extrato a 10 mg/mL. Após cinco minutos, foram adicionados 730µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 100mM, seguindo-se uma incubação no escuro por 2h após esse período. A absorbância da amostra foi medida a 765 nm em espectrofotômetro UV160A (Shimadzu®, Tóquio, Japão), utilizando como branco uma solução contendo todos os reagentes, com exceção do extrato. As amostras foram preparadas em triplicata e os experimentos foram realizados duas vezes. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalente em ácido gálico (EAG) / g extrato seco, de acordo com a curva-padrão mostrada na Figura 24.

Figura 21 - Curva padrão do ácido gálico.



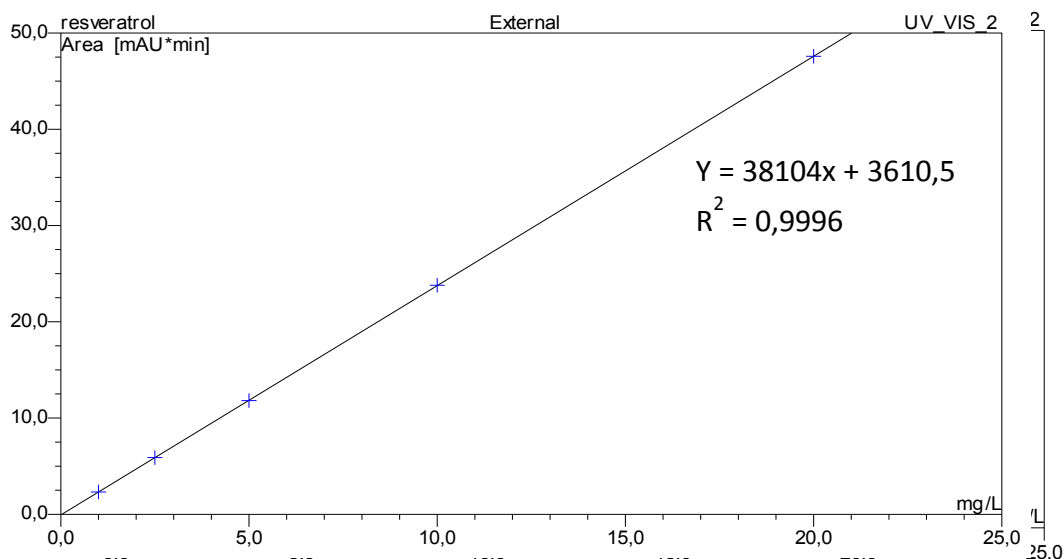
### 3.6 Análise dos extratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – detector "arranjo de diodos" (CLAE-DAD) para determinação da concentração de reverastrol

Para as análises por CLAE, foi utilizado um cromatógrafo Dionex, modelo Ultimate 3000, com um detector de Arranjo de Diodos e coluna ACCLAIM, C18 (Dionex Bonded Silica Products, 5 µm, 120 Å; 4,6 x 250 mm). As amostras foram analisadas utilizando-se a temperatura de 30°C, com um gradiente de eluição iniciado com 90% água ultrapura acidificada com ácido acético, 8% de metanol e 2% de acetonitrila por 2min. Após 10min, o gradiente estabelecido foi de 70% de água, 8% de metanol e 22% de acetonitrila, finalizando em 18 min com 5% de água e 95% de acetonitrila.

A concentração de resveratrol (Sigma Aldrich®) foi determinada com base na curva padrão construída com o mesmo método de análise (Figura 25).

O volume injetado para todas as amostras (10 mg/mL) preparadas foi de 20 µL e o comprimento de onda utilizado para monitoramento da análise cromatográfica foi de 307 nm. O pico do componente principal dos extratos encontrados nos cromatogramas foram comparados com a curva padrão de resveratrol.

Figura 22 – Curva padrão de resveratrol em cinco diferentes concentrações (mg.L<sup>-1</sup>).



### 3.7 Estudos fitoquímicos

#### 3.7.1 Obtenção dos extratos brutos do material *in vivo*

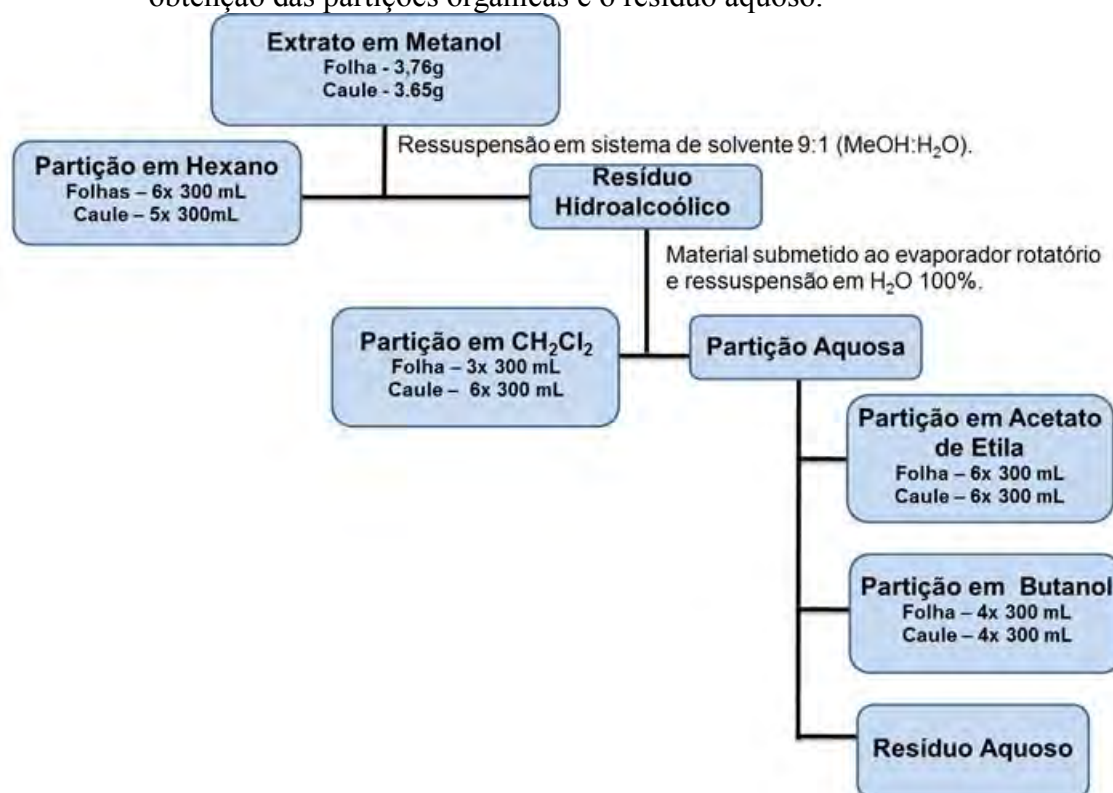
A fim de se estabelecer um perfil fitoquímico da espécie vegetal e uma investigação quanto ao potencial biológico e farmacológico, folhas e segmentos caulinares excisados de plantas de *Arachis repens* *in vivo* foram utilizados para a obtenção dos extratos. Inicialmente, 44 g do material triturado de folhas e 65 g do material triturado de segmentos caulinares secos foram macerados, à temperatura ambiente, em frascos âmbar (1 L), com solventes orgânicos (TEDIA®) na seguinte sequência de polaridade crescente: *n*-hexano (5L) < diclorometano (5L) < metanol (5L). Os solventes foram renovados diariamente em um total de 5 dias. As mudanças de solventes foram realizadas sempre que o material vegetal não apresentava mais evidência de extração. As soluções

extrativas foram filtradas em papel de filtro e concentradas em evaporador rotativo a 40 °C, obtendo-se os respectivos extratos brutos secos.

### 3.7.1.1 Obtenção das partições a partir do extrato metanólico

Os extratos metanólicos brutos de caules (3,65 g) e folhas (3,76 g) foram solubilizados em uma solução de 300 mL de metanol:água (9:1) e, em seguida, submetidos a sucessivas partições líquido-líquido com solventes orgânicos de diferentes polaridades iniciando-se com *n*-hexano, seguido do diclorometano, acetato de etila e butanol. Ao final do processo foi obtido ainda o resíduo aquoso. As partições obtidas foram concentradas em evaporador (Marconi – M120) rotatório sob pressão reduzida e, o peso seco final obtido calculado a fim de se estabelecer os rendimentos finais em massa e em valores percentuais. Foram adotados os solventes em ordem crescente de polaridade, como demonstra o esquema a seguir (Figura 26).

Figura 23 - Esquema da partição líquido-líquido do extrato metanólico bruto de *A. repens* para a obtenção das partições orgânicas e o resíduo aquoso.



### 3.7.2 Fracionamento da partição em acetato de etila de folhas de *A. repens* em coluna Sephadex LH-20.

A partição em acetato de etila foi dissolvida em metanol e posteriormente fracionada por cromatografia em coluna aberta (20 mm diâmetro x 30 cm altura) utilizando Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich®) como fase estacionária. A coluna foi eluída inicialmente com água destilada, seguido de água/metanol (1:1) e por fim metanol, gerando 3 frações distintas. Estas frações foram secas em evaporador rotativo e em seguida congeladas e submetidas ao processo de liofilização para eliminação do resíduo de água, obtendo-se assim as amostras secas, as quais foram devidamente pesadas.

### 3.7.3 Fracionamento da partição em butanol de folhas de *A. repens* em coluna Sephadex LH-20

A partição em butanol foi fracionada por cromatografia em coluna aberta utilizando o gel de Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich®) como fase estacionária e a coluna (40 mm diâmetro x 38 cm altura) foi eluída inicialmente com água destilada, seguido pelas misturas de água/metanol (7,5:2,5; 10 mL), água/metanol (1:1; 10 mL), água/metanol (2,5:7,5; 10 mL) e finalmente eluída com metanol, gerando 5 frações distintas. Estas frações foram secas em evaporador rotativo e em seguida passaram pelo processo de liofilização para eliminação do resíduo de água, obtendo-se assim as amostras secas.

### 3.7.4 Fracionamento cromatográfico em coluna Amberlite XAD-16® do extrato bruto hexânico de caules de *Arachis repens*

O extrato bruto em *n*-hexano dos caules quando submetido a análise por CCD, foi evidenciada a presença de substâncias azuladas, observada após revelação com luz ultravioleta à 365 nm, e, após revelação utilizando anisaldeído/ácido sulfúrico (ANS) observou-se que estas substâncias azuladas revelaram em roxo. Estas mesmas substâncias parecem estar presentes, em menor concentração, nas partições hexânicas de folhas e caules e, no extrato hexânico de folhas.

Uma alíquota de 1,5 g do extrato hexânico do caule foi diluída em 3 mL de diclorometano (TEDIA®) e aplicado em coluna cromatográfica de vidro. O material foi submetido à separação por coluna aberta utilizando a resina XAD 16 (Sigma Aldrich®) como fase estacionária (dimensões da



coluna: 40 mm de diâmetro x 57 cm de altura) e, metanol (M) e acetato de etila (A) como eluentes, gerando 20 frações de 250 mL para o metanol e 13 frações de 250 mL para o acetato de etila (2,8 mL/min) (Figura 27).

**Figura 24** – Fotografia da coluna cromatográfica do extrato hexânico do caule utilizando como fase estacionária a resina XAD-16. Dimensões da coluna: 57 cm de altura x 4 cm de diâmetro.



3.7.4.1 Reunião das frações oriundas do extrato hexânico dos caules após eluição em metanol em coluna empacotada com XAD-16.

O fracionamento do extrato hexânico dos caules em coluna empacotada com XAD-16 resultou em 20 frações (M1-M20) que foram eluídas em metanol. Estas frações foram reunidas de acordo com as semelhanças cromatográficas por CCD, resultando em nove sub-frações (M1, M2, M3, M4-6, M7, M8, M9-11, M12, M13-20).

3.7.4.2 Fracionamento por cromatografia em coluna aberta da sub-fração M2 proveniente da eluição com metanol no fracionamento do extrato hexânico de caules de *A. repens*.

A fração M2 (87,9 mg) apresentou-se enriquecida em substância que fluoresce em azul no ultravioleta em onda longa (365 nm) e revela em roxo com ANS, sob aquecimento. Esta amostra foi diluída em 2 mL de *n*-hexano e re-fracionada em coluna cromatográfica, utilizando gel de sílica *flash* como fase estacionária (17 mm de diâmetro x 40 cm de altura) e como fase móvel foi utilizado os solventes hexano e acetato de etila em modo gradiente (Tabela 5).

Tabela 5 – Sistema de solventes utilizados como fase móvel para o refractionamento da fração M2.

Hexano: Acetato de etila (v:v)	mL
95:5	150
9:1	100
8:2	100
7:3	100

A M2 resultou em 31 sub-frações (25 mL) que foram reunidas de acordo com as suas semelhanças cromatográficas em CCD. Dentre estas frações reunidas, as frações M2A23-25 (12,2 mg) apresentou na revelação com VAS uma mancha majoritária arrochada. Esta amostra foi analisada em RMN (500 MHz) utilizando clorofórmio deuterado como solvente.

#### 3.7.4.3 Fracionamento por cromatografia em coluna aberta da sub-fração M13-20 proveniente do extrato hexânico de caules de *A. repens*.

A fração de M13–20 (171 mg) apresentou um perfil cromatográfico em CCD em que, sob luz ultravioleta em ondas curtas, observou-se principalmente tres bandas com  $F_R$  (Fator de Retenção)  $> 0,5$ . Uma destas bandas é observada em azul sob ultravioleta de onda longa e que revelou em violeta em ANS. Além deste, outra banda foi observada em coloração violeta escuro. Esta amostra foi fracionada em coluna cromatográfica utilizando sílica *flash* como fase estacionária (17 mm de diâmetro X 40 cm de altura) e como eluentes a mistura dos solventes hexano e acetato de etila em modo gradiente (Tabela 6). As 16 frações totais obtidas foram coletadas em volumes de 25 mL cada.

Tabela 6 – Sistema de solventes utilizados como fase móvel para o refração da reunião das frações M13-M20.

Hexano: Acetato de etila (v:v)	mL
6:4	100
7:3	100
8:2	100
9:1	100

Dentre as 16 frações oriundas de M13-20, obteve-se a sub-fração 2 (37 mg) com a coloração azulada (UV-365) e revelando lilás com ANS, sob aquecimento. Esta amostra foi fracionada em coluna cromatográfica, utilizando gel de sílica *flash* como fase estacionária (5 mm de diâmetro x 20 cm de altura) utilizando como eluentes a mistura dos solventes hexano e acetato de etila em gradiente (Tabela 7). Desta fração obteve-se 20 sub-frações e cada uma foi coletada em volume de 25 mL.

Tabela 7 – Sistema de solventes utilizados como fase móvel para o refração da sub-fração 2 da reunião das frações M13-M20.

Hexano: Acetato de etila (v:v)	mL
9:1	100
8:2	100
7:3	100
6:4	100

Dentre as 20 frações oriundas do fracionamento da sub-fração 2, obteve-se a sub-fração 5 (19,9 mg) cujo perfil em CCD apresentou uma banda de coloração azulada em ultravioleta de ondas longas a qual revelou em violeta com o reagente ANS. Esta sub-fração foi novamente re-fracionada em coluna de gel de sílica (*flash*) (5 mm de diâmetro x 20 cm de altura) utilizando-se como fase móvel uma solução de hexano/acetato de etila em modo gradiente, sendo coletadas a cada 20 mL, gerando 37 sub-frações. Após reunião das frações de acordo com a semelhança de perfil cromatográfico, as sub-frações de número 11 e 18-19 foram enviadas para análise por CG/EM devido a relativa pureza do perfil cromatográfico e presença de bandas majoritárias.

### 3.7.5 Fracionamento cromatográfico em coluna XAD-16 do extrato bruto hexânico de folhas de *Arachis repens*

O extrato bruto em *n*-hexano das folhas evidenciou a presença de substâncias de coloração azul observada após revelação com luz ultravioleta à 365 nm, o qual após revelação utilizando ANS destacou uma revelação em roxo.

O extrato foi fracionado em coluna XAD-16 após eluição com metanol como fase móvel. As frações foram coletadas a cada 250 mL, gerando 20 frações no total, codificadas com a letra H e seus respectivos números (H1, H2, H3, H4-5, H6-8, H9-10, H11-15, H16-17, H18, H19-20). As frações obtidas apresentaram substâncias fluorescentes em tons azulados em todas as frações, além de outras que não apresentaram fluorescência. As frações H2 e H4-5 foram analisadas por CG/EM para identificação dos constituintes

### 3.7.6. Análises Cromatográficas

#### 3.7.6.1 Análises por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas

As partições/extratos com caráter mais apolar (1 µL) foram analisados em cromatógrafo a gás (CG-2010-Shimadzu), com detector de ionização de chama (DIC), coluna DB-1MS (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,2 µm de espessura de filme), usando hélio como gás de arraste a 1 mL.min<sup>-1</sup> e razão de separação (50:1). A temperatura foi elevada a cada 10 °C/min iniciando-se a rampa à 60°C até 300°C, permanecendo o final por mais 15 minutos. A temperatura do injetor foi mantida a 290 °C e do detector a 300 °C. Uma sub-amostra foi injetada em espectrometro de massas (CG/EM-QP2010 Plus Shimadzu) usando detector de massas, sob as mesmas condições acima, exceto a coluna (coluna ZB-5MS 30 m x 0.25 mm x 0.2 µm) e a

verificação de EM na faixa entre 50-650 da a 2 sec decade-1 com um potencial de ionização por impacto de elétrons (feixe de 70 eV).

A identificação das substâncias foi realizada através de comparação dos espectros de massas obtidos com aqueles das espectrotescas NIST07.LIB. Os parâmetros utilizados nas análises dos espectros de massa para a identificação dos constituintes químicos foram presença do pico do íon molecular, o pico base e a comparação visual com os espectros fornecidos pelas espectrotescas do equipamento; padrão de fragmentação em relação aos espectros de massa descritos na literatura e índice de similaridade acima de 90%, a qual pode ser aceita como confiável.

### 3.7.6.2 Análises por cromatografia em camada delgada

Para a identificação das classes químicas das substâncias presentes nos extratos e em cada fração foi realizada a análise por CCD em gel de sílica (Gel de sílica 60 F254-MERCK®). Para avaliar os extratos brutos em n-hexano e diclorometano utilizou-se diversas proporções de hexano/acetato de etila de 9:1 variando até 3:7, diclorometano/metanol 95:5 e 100:0 como eluentes. Para os extratos metanólicos utilizou-se BAW (butanol, ácido acético e água) (4 mL) 8:1:1 e 4:1:5; acetato de etila/metanol/água/ácido acético (4 mL) 8:10:5:5 e diclorometano/metanol (4 mL) 9:1 e 8:2. Após eluição, as placas foram secas e observadas sob luz de ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm, sendo registrados por fotografia os resultados.

Visando evidenciar as principais classes de substâncias químicas presentes nos extratos de folhas e caules de *A. repens*, foram testados os seguintes reagentes de revelação das cromatoplasas (WAGNEReBLADT, 1996; GIANVECHIO *et al.*, 2006; MACIEL *et al.*, 2006):

- NP/PEG (difetilboriloxietilamina/polietilenoglicol), aplicado sobre cromatoplasa para a detecção de cumarinas/fenilpropanóides (azul-verde) e flavonóides (amarelo, laranja) sobre luz ultravioleta de comprimento de onda de 365 nm.
- VAS (vanilina sulfúrica ácida), aplicada sobre cromatoplasa para a detecção de terpenoides (amarelo marrom) e ácidos graxos (azul).
- ANS (anisaldeído/ácido sulfúrico) aplicada sobre a cromatoplasa para a visualização de esteróides, prostaglandinas, carboidratos, fenóis, glicosídeos, parte aglicona de saponinas, componentes de óleos essenciais ou terpenos, antibióticos (macrolídeos e tetraciclina) e micotoxinas – tricotecenos.

- sulfato cérico aplicada sobre a cromatoplaça para investigação de substância de natureza terpenoídica (manchas rosas e azuis) e flavonoídica (manchas cinza e amareladas).

Os aspectos considerados foram cor antes e após exame com luz UV, e mudanças de coloração com o uso de reveladores e cálculo para a altura das manchas. Cor: dependendo da tonalidade predominante, a cor da imagem em conjunto se define como vivamente colorida, pouco colorida ou muito pouco colorida.

Os extratos de segmentos caulinares e folhas de *A. repens* foram ressuspensos no mesmo solvente de extração (1 mg/mL) e em cada extrato foi realizada a análise em cromatografia em camada delgada em sílica gel. As soluções foram aplicadas em placas de cromatografia de sílica gel 60 com indicador de fluorescência UV 254 nm (Marcherey-Nagel), com o auxílio de capilares de vidro, a uma distância de 1 cm da margem inferior. Foram realizadas duas aplicações no mesmo ponto para fins de concentração da amostra e a placa foi seca à temperatura ambiente. A cromatografia foi desenvolvida em cuba de vidro com tampa, à temperatura ambiente. A placa foi eluída de acordo com a polaridade do solvente que originou a amostra. Posteriormente a observação dos constituintes foi feita em câmara ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm e em seguida reveladas com o reagente adequado, onde a condição cromatográfica que permitiu uma boa separação dos constituintes foram fotografadas.

### **3.8 Avaliação de atividades biológicas e farmacológicas dos extratos e partições do material *in vivo* de *A. repens*.**

#### **3.8.1 Determinação da atividade alelopática**

As amostras-teste provenientes dos extratos e partições e os padrões sitosterol e estigmasterol (Sigma-Aldrich) foram dissolvidas no mesmo solvente de extração nas concentrações de 100, 200, 500 e 1.000 ppm. Cada placa de Petri (d=3,5 cm, h=1 cm) contendo discos de papel de filtro Whatman n° 1 (d=3,3 cm), recebeu 0,5 mL da solução teste. Após a evaporação do solvente em temperatura ambiente (24h), foram adicionados 2,5 mL de água destilada a 0,1% de DMSO e 10 sementes de *Lactuca Sativa*. Todos os bioensaios foram conduzidos em triplicata, com três repetições. Partições do extrato metanólico foram avaliadas pelo mesmo bioensaio. Discos de papel

contendo menadiona na concentração de 200 ppm serviram como controle positivo, enquanto discos de papel de filtro contendo 2,5mL de água ou 2,5mL de água a 0,1% de DMSO serviram como controles negativos. Os bioensaios realizados neste trabalho foram conduzidos em câmara de crescimento na ausência de luz, com temperatura em torno de 25°C. A leitura da germinação foi efetuada 24 h após a introdução das sementes. O critério para leitura da germinação foi à protrusão radicular. As sementes podem ser consideradas germinadas quando a protrusão da radícula através do tegumento se torna visível (ADEGAS *et al.*, 2003).

As percentagens de inibição da germinação foram calculadas por comparação com o controle sem tratamento, utilizando o seguinte cálculo: % Inibição =  $(C-X)/C \times 100$ , onde C= n° de sementes germinadas no controle e X= n° de sementes germinadas na amostra-teste.

### 3.8.1.1 Crescimento de hipocótilos e raízes

O crescimento das plântulas foi avaliado medindo-se o comprimento dos hipocótilos e radículas, 5 dias após a introdução das sementes. A leitura do crescimento foi realizada no último dia de experimento (5° dia após a introdução das sementes) com abertura das placas e retirada das plântulas uma a uma para medição em papel milimetrado do comprimento da radícula e do hipocótilo. As percentagens de inibição do crescimento das raízes e dos hipocótilos foram calculadas por comparação com o controle sem tratamento, utilizando o seguinte cálculo: % Inibição =  $(C-X)/C \times 100$ , onde C= tamanho médio do hipocótilo/raízes no controle e X= tamanho médio do hipocótilo/raízes na amostra-teste (CHIAPUSIO *et al.*, 1997; FUKUHARA e KUBO, 1991). Os resultados foram analisados através da análise de variância (ANOVA) segundo teste *T* (teste de Tukey), ao nível de significância de 5% com o uso do aplicativo “*Graph Pad Instart*” versão 5.1.

### 3.8.2 Metodologia utilizada nos bioensaios com sementes das espécies daninhas *Commelina*

*benghalenses* e *Panicum maximum*.

Para realizar os bioensaios com as espécies daninhas, sementes foram adquiridas comercialmente com o responsável técnico Francisco Assis Pedroso, da empresa Agro Cosmos – Cosmos Agrícola Produção e Serviços Rurais Ltda.

O bioensaio com as espécies daninhas foi conduzido em câmara de crescimento na ausência de luz, e a temperatura foi mantida em torno de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . As amostras-teste foram dissolvidas no mesmo solvente de extração nas concentrações de 500 e 1.000 ppm. Cada placa de Petri (d=3,5 cm, h=1 cm) contendo discos de papel de filtro Whatman n° 1 (d= 3,3 cm), recebeu 0,5 mL da solução teste. Após a evaporação do solvente em temperatura ambiente (24h), foram adicionados 2,5 mL de água destilada a 0,1% de DMSO e 10 sementes da espécie daninha. O DMSO foi utilizado para otimizar a solubilização das amostras. Discos de papel de filtro contendo 5mL de água a 0,1% de DMSO serviram como controles sem tratamento.

A leitura de crescimento para as espécies *Commelina benghalenses* e *Panicum maximum* foram 30 dias após, e 30 dias após a introdução das sementes para. A cada 7 dias, cada placa recebeu adicionalmente 2,5 ml de água destilada a 0,1% de DMSO. Todos os bioensaios foram conduzidos em triplicata, com três repetições.

### **3.9 Atividade imunomoduladora em cultura de macrófagos RAW 264.7**

Estes experimentos foram realizados em colaboração com a Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Michelle Frazão Muzitano, do Laboratório de Produtos Naturais, localizados no Instituto Macaé de Metrologia e Tecnologia, Campus UFRJ-Macaé e, Prof.<sup>ª</sup> Vera L. G. Koatz, do Laboratório Integrado de Bioquímica e Imunofarmacologia (UENF).



### 3.9.1 Linhagens celulares (Macrófagos RAW 264.7 e Fibroblastos L929)

Para os bioensaios de determinação a inibição da produção de NO, TNF- $\alpha$  e citotoxicidez, foram utilizados macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 e Fibroblastos murinos da linhagem L929 forma obtidos da *American Type Culture Collection* (ATCC).

### 3.9.2 Cultura e preparação dos ensaios em macrófagos RAW 264.7

Macrófagos murinos peritoneais da linhagem celular RAW 264.7 obtidos da ATCC (*American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA*), foram cultivados em *Dulbecco's Modified Medium F-12* (DMEM F-12) (Gibco BRL), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco BRL) em estufa (Forma Scientific – water-jacketed incubator) à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Células RAW 264.7 foram cultivadas em garrafas de plástico de 25 ou 75 cm<sup>2</sup> (Corning) com meio *Dulbecco's Eagle modificado F-12* (DMEM-F12) (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco BRL) e mantidas em estufa (SANYO-MCO-19AIC-UV) à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, durante o período necessário para formação de uma monocamada celular. Para o ensaio, as células RAW 264.7 foram delicadamente soltas da garrafa com o auxílio de um raspador de células “rodinho” e contadas em câmara de Neubauer. Após contagem, 2 x 10<sup>5</sup> células/mL foram plaqueadas em microplaca de 96 poços, mantida em estufa por 16 horas para aderência dos macrófagos e estabilidade da cultura. Após este período, o sobrenadante da cultura foi removido cuidadosamente para retirada de células não aderentes e substituído por DMEM-F12 suplementado com 2% de SFB contendo ou não lipopolissacarídeo, [1µg/mL] (LPS, *Escherichia coli* 055:B5; Sigma-Aldrich, USA). Simultaneamente as células foram tratadas com as amostras nas concentrações de 0,8; 4; 20 e 100 µg/mL. Após 24h em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> o sobrenadante da cultura foi coletado para avaliação da capacidade de inibição da produção de NO, TNF- $\alpha$  e citotoxicidez.

### 3.9.3 Ensaio da capacidade de inibição da produção de óxido nítrico (NO)

A produção de NO foi estimada indiretamente, medindo-se a concentração de nitrito no sobrenadante através de uma curva padrão com nitrito de sódio diluído nas concentrações de 200  $\mu\text{M}$  a 1.56  $\mu\text{M}$ . Uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  dos sobrenadantes (obtido conforme item 3.11.2) foram transferidos para uma nova microplaca e sofreram adição de 50  $\mu\text{L}$  de reagente de Griess (p-aminobenzenosulfonamida 1% + diidrocloreto de naftiletlenodiamino 0,1% em 5% de ácido fosfórico, Sigma Chemical Co.), recém-preparado (GRIESS, 1939; CHI, *et al.*, 2001). Após 10 minutos, a absorbância foi medida no comprimento de onda de 540 nm em espectrofotômetro de placa. Controle positivo da produção de NO, macrófagos estimulados com LPS à 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e não tratados. Controle negativo, macrófagos não estimulados e não tratados. Acetato de NG-Metil-L-Arginina (L-NMMA à 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Sigma-Aldrich), inibidor não-específico de óxido nítrico sintase induzida (iNOS), foi utilizado como padrão para comparação da capacidade de inibição da produção de NO. O percentual de inibição foi calculado através da fórmula (2):

$$(2) = 100 - (\text{NO}_{\text{amostra}} - \text{NOC}^-) * 100 / (\text{NOC}^+ - \text{NOC}^-)$$

NO (concentração estimada de óxido nítrico)

### 3.9.4 Produção de TNF- $\alpha$ por macrófagos (bioensaio com células L929)

Células L929 foram cultivadas em garrafas de plástico de 25 ou 75  $\text{cm}^2$  (Corning) em meio DMEM-F12 suplementado com 10% de SFB e mantidas em estufa à 37°C e 5% de  $\text{CO}_2$  durante o período necessário para a formação de uma monocamada celular. Para o bioensaio, o sobrenadante da garrafa de cultura foi removido e a monocamada celular lavada com PBS para remoção completa de SFB e, em seguida, tratadas com solução de tripsina 0,025% + EDTA 0,2% para remoção das células aderidas. As células foram centrifugadas (1200 rpm, 5', 22°C) e ressuspensas em meio DMEM-F12 contendo 10% de SFB e plaqueadas na concentração 2,5 x 10<sup>5</sup> células/mL, em microplaca de 96 poços. Após incubação à 37°C e 5%  $\text{CO}_2$  por 24h, o sobrenadante da cultura foi

removido cuidadosamente e 50  $\mu$ L de DMEM-F12 suplementado com 10% de SFB e 2  $\mu$ g/mL de actinomicina D (Sigma, USA) (utilizada para parar o crescimento celular) foram adicionados em cada poço. Após estes procedimentos foram acrescentados os 50  $\mu$ L do sobrenadante proveniente da cultura celular de RAW 264.7. A microplaca foi incubada por mais 24h à 37°C e 5% CO<sub>2</sub> e a produção da TNF- $\alpha$  foi avaliada através da viabilidade celular da L929 (linhagem celular sensível a TNF- $\alpha$ ) através do ensaio com solução de MTT (MOSMANN, 1983; SHIAU *et al.*, 2001). Para estimar a concentração de TNF- $\alpha$  produzida, utilizou-se uma curva-padrão com TNF- $\alpha$  recombinante murino (Biosource, USA) na faixa de concentração de 1,96 à 4000 pg/mL. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro de placa no comprimento de onda de 570 nm. Controle positivo da produção de TNF- $\alpha$ , sobrenadante da cultura de macrófagos estimulados com 1  $\mu$ g/mL de LPS e não tratados. Controle negativo, sobrenadante da cultura de macrófagos não estimulados e não tratados. Para calcular o percentual de morte celular das células L929 e estimar a produção de TNF- $\alpha$  foi utilizada a fórmula (1).

$$(1) 100 - \frac{(D.O._{amostra} - D.O.C^+)}{(D.O.C^- - D.O.C^+)} * 100$$

### 3.9.5 Avaliação da citotoxicidade na linhagem de macrófagos RAW 264.7

O teste de citotoxicidade das amostras foram efetuados utilizando o ensaio de MTT. As células foram plaqueadas e tratadas conforme item 3.10.2. Ao fim da incubação, foram adicionados 10  $\mu$ L/poço de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazol (MTT, 5 mg/mL em PBS estéril) e após 2 horas, o sobrenadante na placa foi removido e os cristais de formazan formados foram solubilizados por HCl (4 mM) adicionado em isopropanol. A leitura foi feita por espectrofotômetro de placa no comprimento de onda de 570 nm (RASO *et al.*, 2001). Controle positivo, obtenção da lise máxima através do tratamento com 1% de Triton X-100 (Vetec Chemical). Controle negativo, lise mínima obtida no sobrenadante de cultura de macrófagos estimulados e não tratados. Para o cálculo de percentual de citotoxicidade foi utilizado a fórmula (3).

$$(3) 100 - \frac{(D.O._{amostra} - D.O.C^+)}{(D.O.C^- - D.O.C^+)} * 100$$

### 3.10 **Análise estatística**

Os experimentos foram repetidos pelo menos duas vezes, utilizando-se grupos de dez explantes. A avaliação estatística dos dados experimentais foi realizada através da análise de variância (ANOVA) e do teste de comparação Tukey-Kramer, com o auxílio do programa Graphpad InStat. Foram considerados significativos os valores de  $p \leq 0,05$ , tendo sido adotado um intervalo de confiança de 95%.

A análise dos dados referentes à otimização da extração assistida por micro-ondas, foi realizada com o auxílio do programa *Statistica 7.0*® (Statsoft, Inc., USA). A significância dos coeficientes de regressão e as probabilidades foram determinadas pelo teste “*t*” de *student*. A variância explicada pelo modelo é dada pelo coeficiente de múltipla determinação,  $R^2$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Morfogênese *in vitro*

Segmentos nodais, internodais e foliares excisados de plantas *in vitro* e inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de AIA, AIB e PIC não apresentaram respostas morfogênicas significativas.

#### 4.1.1 Morfogênese *in vitro* em resposta a TDZ

Segmentos nodais e internodais cultivados em meio MS suplementado com TDZ em diferentes temperaturas ( $25$  e  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ ) apresentaram a formação de calos compactos e desenvolvimento de gemas adventícias em todas as concentrações testadas (90 - 100%) (Figura 28), quando cultivados a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Culturas mantidas a  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  apresentaram frequências de calogênese entre 40 e 100% (Tabela 8). Após 30 dias de cultura, foi observada a formação de brotos (10%) em resposta à menor concentração de TDZ ( $13,6 \mu\text{M}$ ), somente a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

A maior produção de massa calogênica foi obtida em resposta a TDZ a  $27,2 \mu\text{M}$  a partir de segmentos nodais cultivados a  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  (Figura 30). Em calos originados de segmentos internodais, o maior acúmulo de biomassa foi observado em meio suplementado com TDZ a  $22,7 \mu\text{M}$  nos materiais incubados em ambas as temperaturas testadas. (Figura 29).

**Figura 25**– Morfogênese *in vitro* a partir de explantes *A. repens* inoculados em meio MS suplementado com TDZ.

Legenda: (A) Calo organogênico obtido a partir de segmento nodal (4,5  $\mu\text{M}$ ; 30°C), (B) calo compacto obtido em segmentos nodais (18,1  $\mu\text{M}$ ; 30°C), (C) Calo mixto obtido a partir de segmento internodal (13,6  $\mu\text{M}$ ; 30°C). Barra = 1 cm. Foto: Leonardo de Carvalho Garcia, 2012.

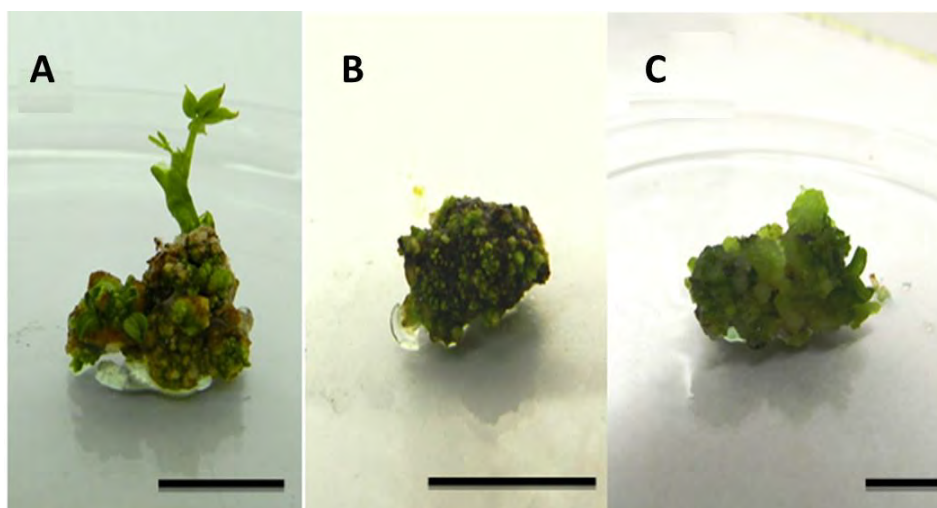


Tabela 8 - Calogênese *in vitro* a partir de segmentos nodais e internodais de *A. repens* em meio suplementado com diferentes concentrações de TDZ, após 30 dias de cultura.

Explante	Concentração de TDZ ( $\mu\text{M}$ )	Calogênese (%)	
		25 $\pm$ 2°C	30 $\pm$ 2°C
Nodal	13,6	100	60
	18,1	90	100
	22,7	100	40
	27,2	100	50
	31,8	100	60
Internodal	13,6	100	100
	18,1	90	40
	22,7	100	90
	27,2	100	100
	31,8	100	60

Figura 26 – Acúmulo de biomassa (g) de calos compactos de *A. repens* provenientes de segmentos internodais, cultivados em meio suplementado com diferentes concentrações de TDZ, após 30 dias de cultura, a temperatura de  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  (A) e  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  (B). PF = peso fresco; PS = peso seco. Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão. A mesma letra indica não haver diferença significativa, valores de  $p \leq 0,05$ , pelo teste de Tukey-Kramer.

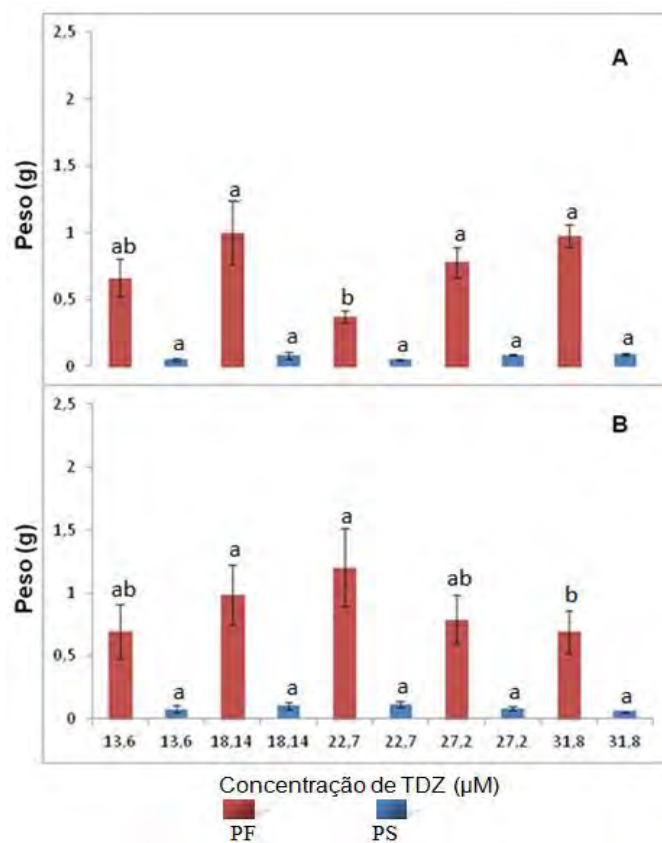
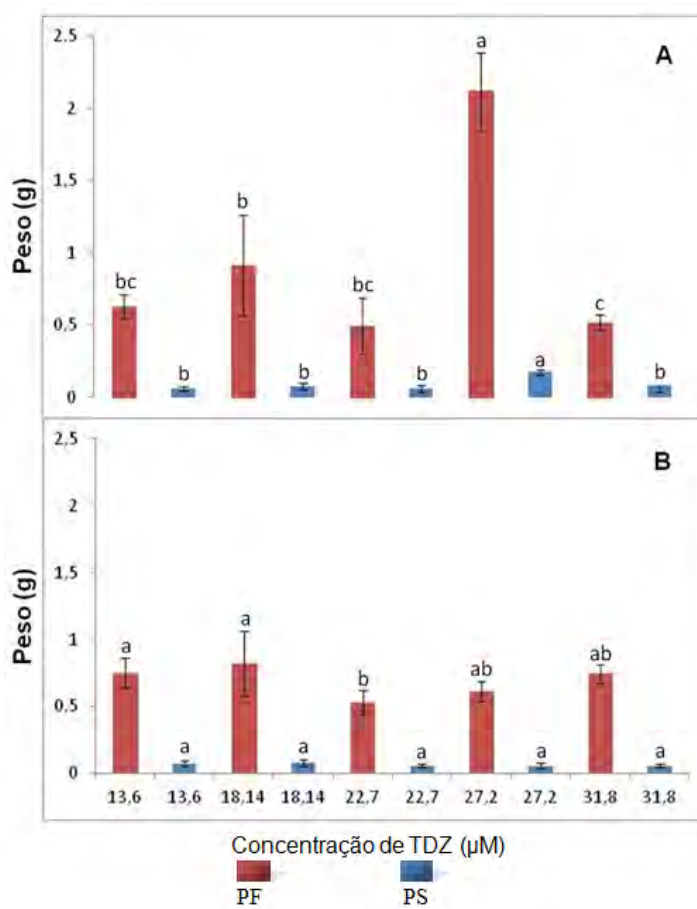


Figura 27 - Acúmulo de biomassa (g) de calos compactos de *A. repens* provenientes de segmentos nodais, cultivados em meio suplementado com diferentes concentrações de TDZ, após 30 dias de cultura, a temperatura de  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  (A) e  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  (B). Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão. A mesma letra indica não haver diferença significativa, valores de  $p \leq 0,05$ , pelo teste de Tukey-Kramer.

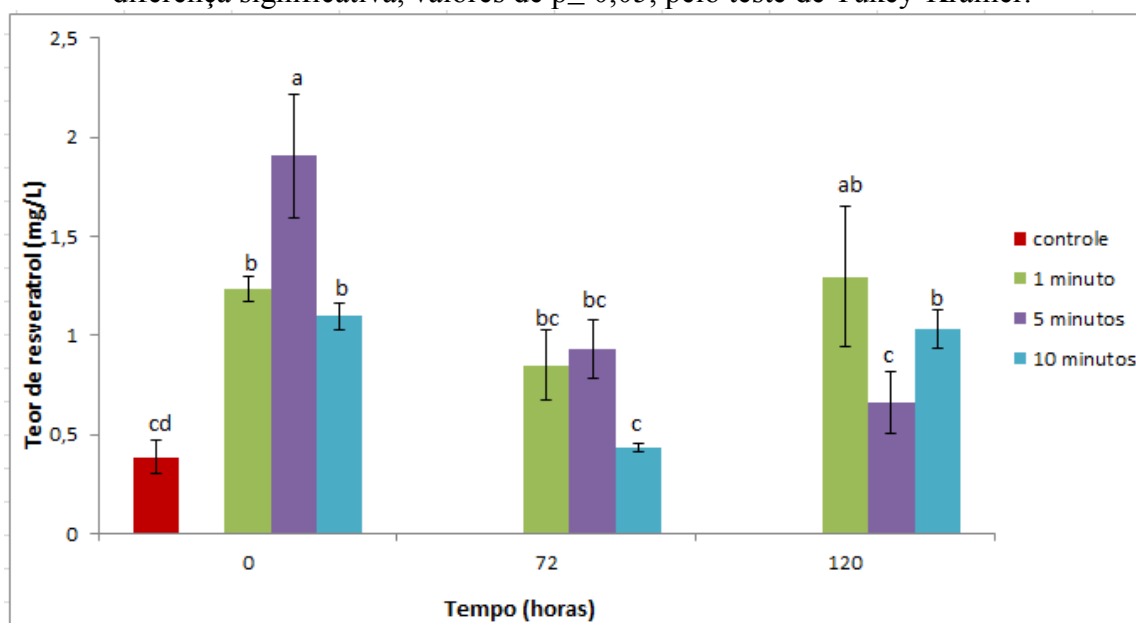




#### 4.1.2 Elicitação de calos de *A. repens* por ultrassom

Os dados apresentados na figura 31 demonstram que o tratamento com US afetou significativamente o teor de resveratrol dos calos oriundos de segmentos nodais inoculados em meio MS suplementado com TDZ a  $13,6 \mu\text{M}$  ( $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ ). A elevação nos teores de resveratrol em relação à amostra controle representou um acréscimo de até  $496,09 \pm 80,72\%$ . O tempo de exposição de 5 minutos ao US sem haver pós-tratamento indicou ser o mais favorável para a elicitação, alcançando o teor de resveratrol de  $1,905 \pm 0,310 \text{ mg/g}$ .

Figura 28 - Teor de resveratrol em extratos metanólicos (80%) de calos de *A. repens*, provenientes de segmentos nodais cultivados em meio MS suplementado com TDZ a  $13,6 \mu\text{M}$ , elicitados por diferentes tempos (1, 5 e 10 minutos) e incubados por diferentes períodos (0, 72 e 120 horas), em temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão. A mesma letra indica não haver diferença significativa, valores de  $p \leq 0,05$ , pelo teste de Tukey-Kramer.



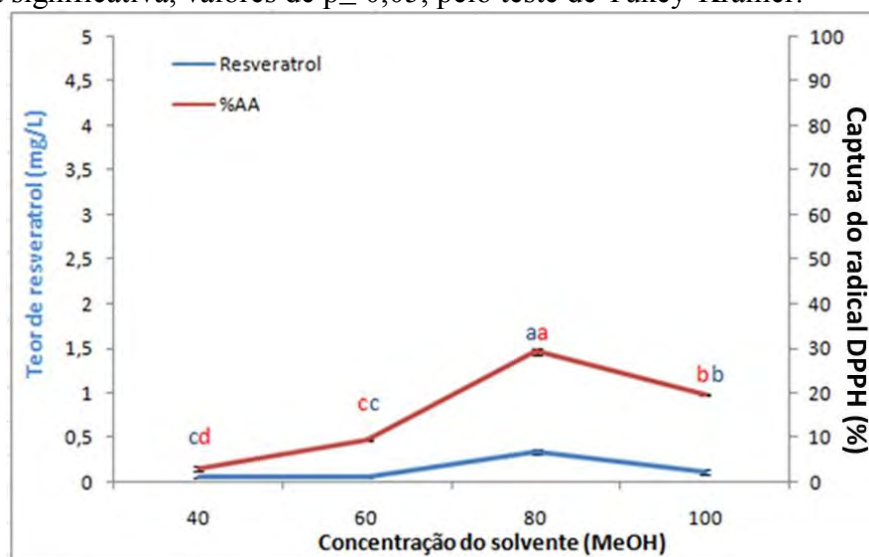
## 4.2 Estudo da correlação da concentração de resveratrol e fenóis totais obtidos sob diferentes condições extrativas com a atividade antioxidante

### 4.2.1 Avaliação da extração por maceração do material *in vivo*

#### 4.2.1.1 Avaliação da proporção metanol-água como solvente de extração

Após avaliação dos extratos obtidos a partir de folhas de plantas *in vivo*, por maceração, por 1 h, em diferentes concentrações de metanol, verificou-se que a proporção à 80% apresentou o maior teor de resveratrol, sendo este de  $0,34 \pm 0,02$  mg/g. E, ainda, apresentou o maior percentual de captura do radical DPPH ( $29,27 \pm 0,59\%$ ) (Figura 32). Com base neste resultado, o percentual de metanol em água foi fixado em 80% para as próximas etapas experimentais.

Figura 29 - Teor de resveratrol e captura do radical DPPH em extratos de folhas de *A. repens* em solução aquosa de metanol em diferentes proporções (40, 60, 80 e 100%). Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão. A mesma letra indica não haver diferença significativa, valores de  $p \leq 0,05$ , pelo teste de Tukey-Kramer.



#### 4.2.1.2 Avaliação do teor de fenóis totais em extratos com diferentes proporções de MeOH . H<sub>2</sub>O

Os resultados obtidos na determinação dos fenóis totais pelo método do Folin-Ciocalteu, na extração realizada pela técnica da maceração, estão apresentados na tabela 9. A análise do conteúdo de fenóis totais revelou que o extrato preparado com metanol (80 %) (v/v), com 1 h de exposição à maceração, e utilizando 40 mL de solvente por grama de material seco, apresentou  $27,26 \pm 0,26$  mg/g de EAG (Tabela 9).

Tabela 9 - Conteúdo de fenóis totais em extratos metanólicos de folhas de *A. repens* em resposta a diferentes concentrações do solvente.

Concentração do solvente (%)	EAG (500 mg/g)
40	15,38 ± 0,30 <sup>d</sup>
60	18,55 ± 0,28 <sup>c</sup>
80	27,26 ± 0,26 <sup>a</sup>
100	25,88 ± 0,33 <sup>b</sup>

Os dados representam média ± desvio padrão; A mesma letra em cada coluna significa não haver diferença estatística significativa, valores de  $p \leq 0,05$  pelo teste de Tukey-Kramer.

### 4.3 Avaliação da extração assistida por ultrassom do material *in vivo*

#### 4.3.1 Otimização do período de extração

A análise das amostras de extratos de folhas de *A. repens*, na concentração de 80%, em diferentes períodos de exposição à sonicação, mostrou que houve uma diferença estatística significativa no teor de resveratrol com o aumento da exposição. Verificou-se que o aumento do período de tempo ao ultrassom diminui a eficiência da extração. Sendo assim, foi adotado o período de 5 min de sonicação, que permitiu a obtenção de:  $1,60 \pm 0,18$  mg/L de resveratrol (Figura 33), o maior percentual de captura do radical DPPH ( $66.98 \pm 0.85\%$ ) (Figura 34) e os maiores teores de fenóis totais (Tabela 10).

Figura 30 - Efeito do tempo de exposição ao ultrassom sobre a eficiência de extração de resveratrol e da captura do radical DPPH a partir de folíolos de *A. repens* em metanol a 80%. Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão. A mesma letra indica não haver diferença estatística significativa, valores de  $p \leq 0,05$ , pelo teste de Tukey-Kramer.

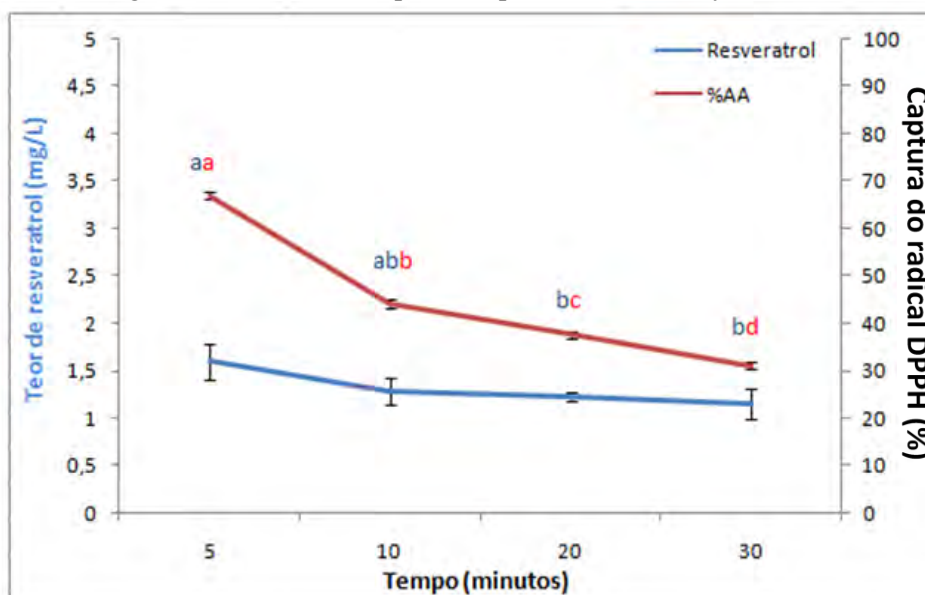


Tabela 10 - Conteúdo de fenóis totais em extratos metanólicos de folhas de *A. repens* em resposta a diferentes tempos de exposição ao ultrassom.

Tempo (minutos)	EAG (500 mg/g)
5	212,51 $\pm$ 2,22 <sup>a</sup>
10	185,82 $\pm$ 3,06 <sup>b</sup>
20	144,77 $\pm$ 0,22 <sup>c</sup>
30	140,82 $\pm$ 1,13 <sup>d</sup>

Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão; A mesma letra em cada coluna significa não haver diferença estatística significativa, valores de  $p \leq 0,05$ , pelo teste de Tukey-Kramer.

#### 4.3.2 Otimização do tempo de pré-tratamento

Folhas de *A. repens* foram maceradas em diferentes tempos (5 – 30 min) e posteriormente sonicadas por 5 min. A extração realizada com o pré-tratamento por 5 minutos, em metanol à 80%, foi considerada ideal, pois apresentou o maior teor de resveratrol (2,14  $\pm$  0,62 mg/L) (Figura 34), o qual foi reduzido ao longo do tempo. Da mesma forma, o percentual de captura do radical DPPH foi influenciado pelo tempo de exposição ao pré-tratamento, tendo sido o tempo de 5 min aquele que produziu o extrato com maior percentual de captura do radical DPPH 70,95  $\pm$  0,83% (Figura

34). Além disso, a análise do conteúdo de fenóis totais na extração assistida por ultrassom revelou que o extrato preparado com 5 min de exposição ao ultrassom (Tabela 10), após 5 min de pré-tratamento por maceração no mesmo solvente (Tabela 11) apresentou o maior teor de compostos fenólicos.

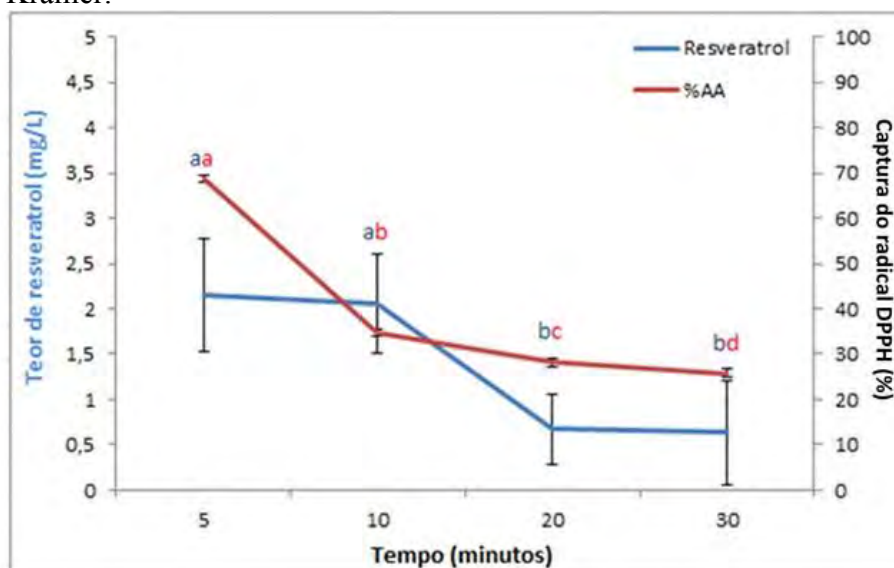
Tabela 11 - Conteúdo de fenóis totais em extratos metanólicos de folhas de *A. repens* em resposta a exposição ao ultrassom por 5 minutos, após diferentes tempos de pré-tratamento por maceração.

Tempo (minutos)	EAG (500mg/g)
5	357,18 ± 1,83 <sup>a</sup>
10	189,47 ± 2,95 <sup>b</sup>
20	136,50 ± 1,01 <sup>c</sup>
30	104,14 ± 1,52 <sup>d</sup>

Notas: Os dados representam média ± desvio padrão; A mesma letra em cada coluna significa não haver diferença significativa, valores de  $p \leq 0,05$ , pelo teste de Tukey-Kramer.

Figura 31 - Teor de resveratrol e percentual de captura do radical DPPH em extratos de *A. repens*, em diferentes tempos de pré-tratamento por maceração antes da exposição ao ultrassom por 5 minutos. Os dados representam média ± desvio padrão.

A mesma letra indica não haver diferença significativa, valores de  $p \leq 0,05$ , pelo teste de Tukey-Kramer.



#### 4.3.3 Otimização da proporção sólido-solvente para a extração

Uma série de extrações foi realizada para verificar a proporção sólido-líquido ideal para a extração de resveratrol mais satisfatória. Dentre as proporções estudadas, a proporção de 1:40 (sólido-líquido) apresentou o maior teor de resveratrol ( $3,93 \pm 0,35$  mg/g) e a maior captura do

radical DPPH ( $68,93 \pm 0,81\%$ ). Sendo assim, esta proporção foi considerada a mais adequada para a extração (Figura 35). Além disso, a análise do conteúdo de fenóis totais na extração assistida por ultrassom revelou que o extrato preparado com 5 min de exposição ao ultrassom, após 5 min de pré-tratamento por maceração no mesmo solvente, na proporção e 40 mL/g de material seco apresentou o maior teor de compostos fenólicos (Tabela 10).

Figura 32 - Teor de resveratrol e percentual de captura do radical DPPH em extratos metanólicos (80%) de folíolos de *A. repens*, em diferentes proporções sólido/líquido. Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão.

Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão. A mesma letra indica não haver diferença significativa, valores de  $p \leq 0,05$ , pelo teste de Tukey-Kramer.

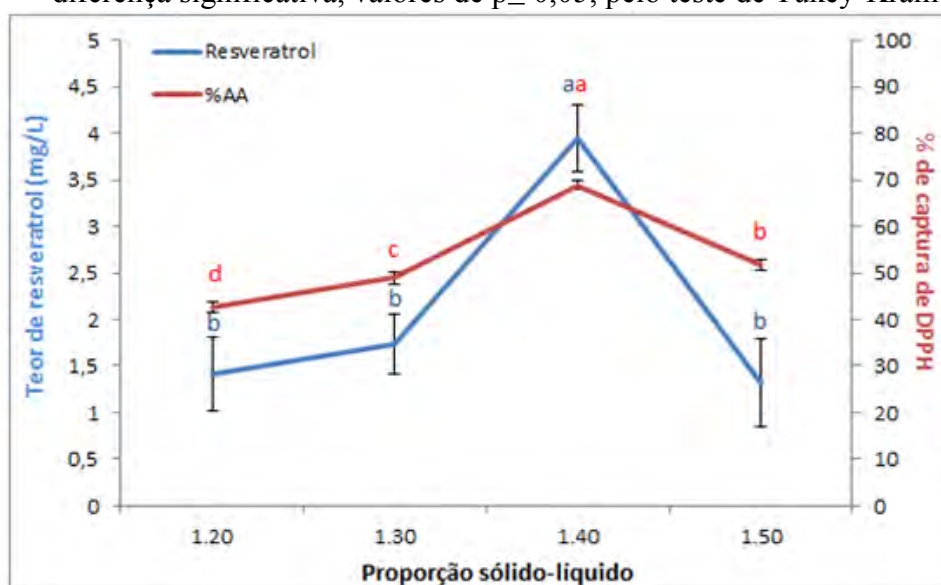


Tabela 10 - Conteúdo de fenóis totais em extratos metanólicos de folhas de *A. repens* em resposta a exposição ao ultrassom por 5 minutos, após pré-tratamento por maceração por 5 minutos, em diferentes proporções (sólido-líquido).

Proporção (sólido-líquido)	EAG (500mg/g)
1.20	$246,83 \pm 2,48^e$
1.30	$315,51 \pm 0,84^b$
1.40	$356,17 \pm 1,36^a$
1.50	$299,61 \pm 1,14^c$

Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão; A mesma letra em cada coluna significa não haver diferença significativa, valores de  $p \leq 0,05$ , pelo teste de Tukey-Kramer.

#### 4.4 Extração assistida por micro-ondas

Neste trabalho, foi realizada a otimização da extração de resveratrol em folhas de *Arachis repens* mantidos em telado. Para a otimização da extração assistida por micro-ondas foi utilizada a metodologia de superfície de resposta.

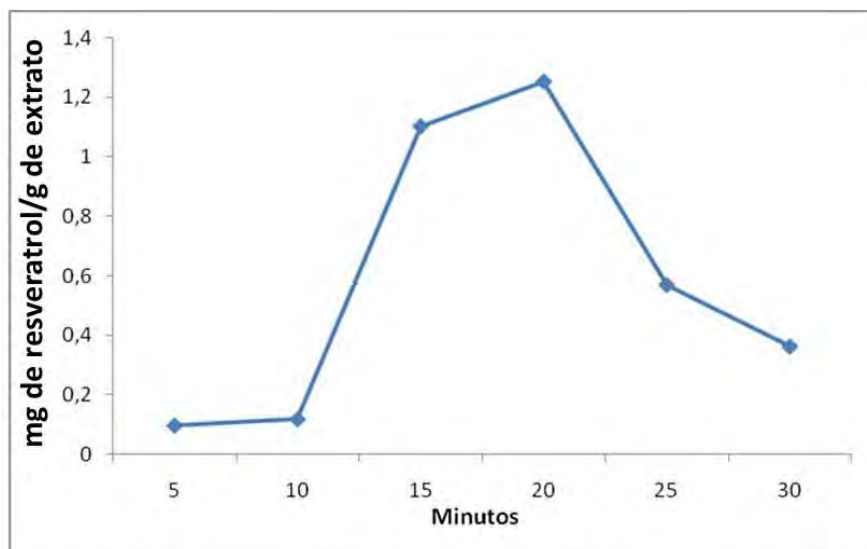
Nesta primeira parte do estudo, foram realizados 11 experimentos. Como variável dependente foi avaliado o teor de resveratrol (mg/g). Os níveis das variáveis independentes utilizadas em ordem crescente (-1, 0, +1) foram 600, 900 e 1200 rpm para agitação; 30, 50 e 70°C para temperatura; 60, 80 e 100% para concentração de solvente e 1:60, 1:40 e 1:20 para razão massa:solvente (Tabela 11).

O tempo de extração não foi considerado como uma variável no presente desenho experimental, uma vez que, em um estudo previamente realizado, foi estabelecido o melhor tempo de extração, o qual determinou-se como sendo de 20 minutos (Figura 36).

Tabela 11 – Planejamento fatorial e resultados da FFD para cada extração estudada.

Entrada	Agitação (rpm)	Temperatura (°C)	% de Solvente	Massa/solvente (g/mL)	Teor de resveratrol (mg/g)
1	-1 (600)	-1 (30)	-1 (60)	-1 (1:60)	0,235
2	1 (1200)	-1 (30)	-1 (60)	1 (1:40)	0,786
3	-1 (600)	1 (70)	-1 (60)	1 (1:40)	0,075
4	1 (1200)	1 (70)	-1 (60)	-1 (1:60)	0,456
5	-1 (600)	-1 (30)	1 (80)	1 (1:40)	0,231
6	1 (1200)	-1 (30)	1 (80)	-1 (1:60)	0,085
7	-1 (900)	1 (70)	1 (80)	-1 (1:60)	0,103
8	1 (1200)	1 (70)	1 (80)	1 (1:40)	0,289
9	0 (900)	0 (50)	0 (100)	0 (1:20)	0,143
10	0 (900)	0 (50)	0 (100)	0 (1:20)	0,117
11	0 (900)	0 (50)	0 (100)	0 (1:20)	0,124

Figura 33– Avaliação do tempo de extração de resveratrol por micro-ondas sob as seguintes condições: St = 600 rpm; T = 30°C; S = 60% e m = 1:60.



Em extratos metanólicos de folhas, a estimativa dos efeitos para as variáveis estudadas e os valores de  $p$  são mostrados na Tabela 12, onde é possível ver que todos os parâmetros avaliados foram significativos ( $p < 0.05$ ) no processo de otimização da extração de resveratrol assistida por micro-ondas. A agitação e a massa tiveram efeitos positivos com magnitudes de 0,243 e 0,125 respectivamente, dentro do intervalo estudado. Ou seja, um aumento na agitação e na concentração provoca um aumento significativo no processo de extração do resveratrol, como pode ser visto na Tabela 11, entrada 2. Na Tabela 12, podemos também observar que a temperatura e a concentração do solvente apresentaram um efeito negativo de -0,103 e -0,211 respectivamente. Estes resultados demonstram que os menores valores apresentam maiores influências, dentro dos intervalos estudados, como pode ser observado na tabela 11, entrada 2. Conforme observado, vale ressaltar que a influência das variáveis testadas no planejamento fatorial fracionado foi estatisticamente significativa, pois todas as variáveis apresentaram um valor de  $p < 0.05$ , havendo, portanto, a necessidade do delineamento de um modelo com curvatura, incluindo também os pontos axiais.

Tabela 12 – Estimativa dos efeitos para as variáveis estudadas na otimização da extração de resveratrol assistida por micro-ondas.

Estimativa dos efeitos; Var.: Y; $R^2 = ,6856$ ; Adj,;37119 (planilha) 2**(4-1) design; MS Erro Puro = ,000181						
DV: Y						
Fator	Efeito	Erro padrão Erro puro	t(2)	p	-95% lim. De conf.	+95% lim. De conf.



Média	0,282500	0,004757	59,3915	0,000283	0,262034	0,3029
Curvatura*	-0,309000	0,018216	-16,9628	0,003457	-0,387378	-0,2306
(1) St	0,243000	0,009513	25,5436	0,001529	0,202068	0,2839
(2) T	-0,103500	0,009513	-10,8797	0,008343	-0,144432	-0,0625
(3) [S]	-0,211000	0,009513	-22,1798	0,002027	-0,251932	-0,1700
(4) m	0,125500	0,009513	13,1923	0,005697	0,084568	0,1664

\*St= *Stirring* (Agitação); T= Temperatura; [S]=Concentração do Solvente; m= massa/solvente; Y= quantidade de resveratrol extraído (mg/g)

#### 4.4.1 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para a otimização da extração de resveratrol assistida por micro-ondas.

Após o primeiro desenho fatorial mencionado anteriormente, um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi empregado para obter as condições ideais para a otimização do processo de extração do resveratrol. Os parâmetros de extração envolvidos foram os mesmos descritos anteriormente, com a otimização dos intervalos estudados. As variáveis, juntamente com a sua codificação, e os valores não codificados estão apresentados na Tabela 13. No DCCR, as variáveis selecionadas foram variadas em cinco níveis, resultando em 27 experimentos, incluindo os oito pontos axiais e três pontos centrais, os quais permitem verificar a curvatura e o erro puro experimental. A fim de ajustar um modelo de segunda ordem, oito pontos extras com a mesma distância a partir do ponto central, foram adicionadas à matriz.

Os resultados obtidos para a extração de resveratrol (mg/g) são apresentados na Tabela 13. Os resultados apresentados na Tabela 14 demonstram que houve um erro puro baixo, o que sugere que os valores testados devem estar bem ajustados para o processo de extração de resveratrol e todas as variáveis exercem influência no processo de extração.

A Tabela 15 apresenta a análise de variância (ANOVA), que mostra a validade do modelo de teste  $F$  e que mostra o resíduo e a magnitude do erro experimental. O  $F$  calculado (12,32) apresentou-se maior do que o  $F$  tabelado (2,63), demonstrando a validade do modelo experimental. A veracidade do modelo pode ser verificada pela determinação de ( $R^2$ ). O coeficiente de múltipla determinação  $R^2$  (93%) implica que a variação da amostra de 93% para a extração de resveratrol é atribuída às variáveis independentes e podem ser precisamente explicados pelo modelo.

Tabela 13 – Delineamento Composto Central Rotacional e resultados cada extração estudada.

Entrada	Níveis das variáveis				Resveratrol (mg/g de extrato)
	Agitação	Temperatura	Proporção do solvente	Massa (m/v)	
1	-1 (975)	-1 (37.5)	-1 (75)	-1 (1:30)	0,149
2	1 (1125)	-1 (37.5)	-1 (75)	-1 (1:30)	0,062
3	-1 (975)	1 (52.5)	-1 (75)	-1 (1:30)	0,064
4	1 (1125)	1 (52.5)	-1 (75)	-1 (1:30)	0,343
5	-1 (975)	-1 (37.5)	1 (85)	-1 (1:30)	0,065
6	1 (1125)	-1 (37.5)	1 (85)	-1 (1:30)	0,071
7	-1 (975)	1 (52.5)	1 (85)	-1 (1:30)	0,302
8	1 (1125)	1 (52.5)	1 (85)	-1 (1:30)	0,809
9	-1 (975)	-1 (37.5)	-1 (75)	1 (1:20)	0,527
10	1 (1125)	-1 (37.5)	-1 (75)	1 (1:20)	0,090
11	-1 (975)	1 (52.5)	-1 (75)	1 (1:20)	0,120
12	1 (1125)	1 (52.5)	-1 (75)	1 (1:20)	0,070
13	-1 (975)	-1 (37.5)	1 (85)	1 (1:20)	0,058
14	1 (1125)	-1 (37.5)	1 (85)	1 (1:20)	0,048
15	-1 (975)	1 (52.5)	1 (85)	1 (1:20)	0,087
16	1 (1125)	1 (52.5)	1 (85)	1 (1:20)	0,133
17	-2 (1200)	0 (45)	0 (80)	0 (1:25)	0,092
18	-2 (1200)	0 (45)	0 (80)	0 (1:25)	0,067
19	0 (1050)	-2 (30)	0 (80)	0 (1:25)	0,076
20	0 (1050)	-2 (30)	0 (80)	0 (1:25)	0,280
21	0 (1050)	0 (45)	-2 (90)	0 (1:25)	0,124
22	0 (1050)	0 (45)	-2 (90)	0 (1:25)	0,256
23	0 (1050)	0 (45)	0 (80)	-2 (1:35)	0,195
24	0 (1050)	0 (45)	0 (80)	-2 (1:35)	0,058
25	0 (1050)	0 (45)	0 (80)	0 (1:25)	0,074
26	0 (1050)	0 (45)	0 (80)	0 (1:25)	0,070
27	0 (1050)	0 (45)	0 (80)	0 (1:25)	0,076

Tabela 14 - Estimativa dos efeitos para as variáveis estudadas pelo DCCR na otimização da extração de resveratrol assistida por micro-ondas.

Estimativa dos efeitos; Var.: Y;  $R^2 = ,935$ ; Adj.,85916 (planilha) 4 fatores, 1 bloco, 27 corridas; MS Erro Puro = ,0000093  
DV: Y

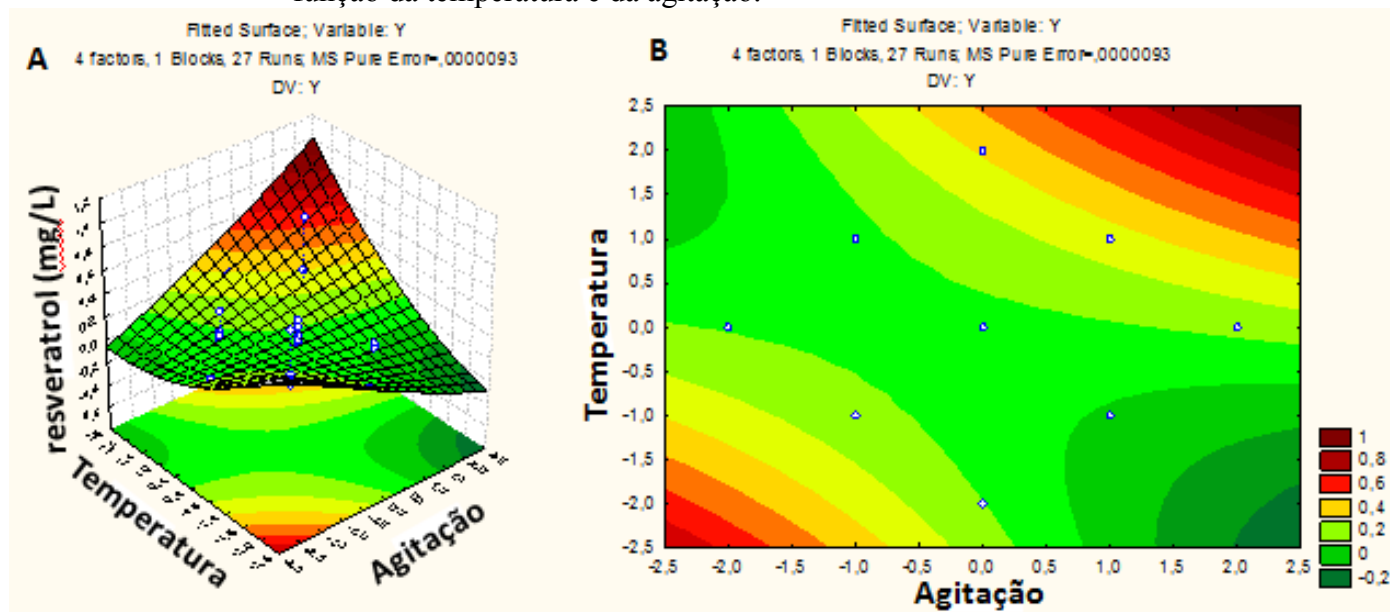
Fator	Efeito	Erro padrão Erro puro	t(2)	p	-95% lim. de conf.	+95% lim. de conf.
Média	0,073333	0,001764	41,576	0,000578	0,065744	0,080922
(1)St (L)	0,017000	0,001247	13,630	0,005339	0,011634	0,022366
St (Q)	0,017708	0,001323	13,386	0,005534	0,012016	0,023400
(2) T (L)	0,105500	0,001247	84,588	0,000140	0,100134	0,110866
T (Q)	0,066958	0,001323	50,616	0,000390	0,061266	0,072650
(3) S (L)	0,034333	0,001247	27,528	0,001317	0,028967	0,039700
S (Q)	0,072959	0,001323	55,151	0,000329	0,067266	0,078650
(4) m (L)	-0,083833	0,001247	-67,216	0,000221	-0,089200	-0,078467
m (Q)	0,041208	0,001323	31,151	0,001029	0,035516	0,046900
1L / 2L	0,163750	0,001528	107,200	0,000087	0,157178	0,170322
1L / 3L	0,105500	0,001528	69,066	0,000210	0,098928	0,112072
1L / 4L	-0,144500	0,001528	-94,597	0,000112	-0,151072	-0,137928
2L / 3L	0,165000	0,001528	108,018	0,000086	0,158428	0,171572
2L / 4L	-0,185500	0,001528	-121,438	0,000068	-0,192072	-0,178928
3L / 4L	-0,138750	0,001528	-90,833	0,000121	-0,145322	-0,132178

Tabela 15 – Estimativa dos efeitos para as variáveis estudadas pelo teste de *Fischer* e teste de *T de Student* na otimização da extração de resveratrol assistida por micro-ondas.

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Valor quadrático médio	<i>F</i> calculado	<i>F</i> tabelado	Valor de <i>p</i>
Regressão	0,720000	14	0,051317	12,32923	2,637124	4,9469E-05
Resíduos	0,050000	12	0,004162	0,833645		
Falta de ajuste	0,049928	10	0,004993	534,9393		
Erro puro	0,000019	2	9,33E-06			
TOTAL	0,768380	26				

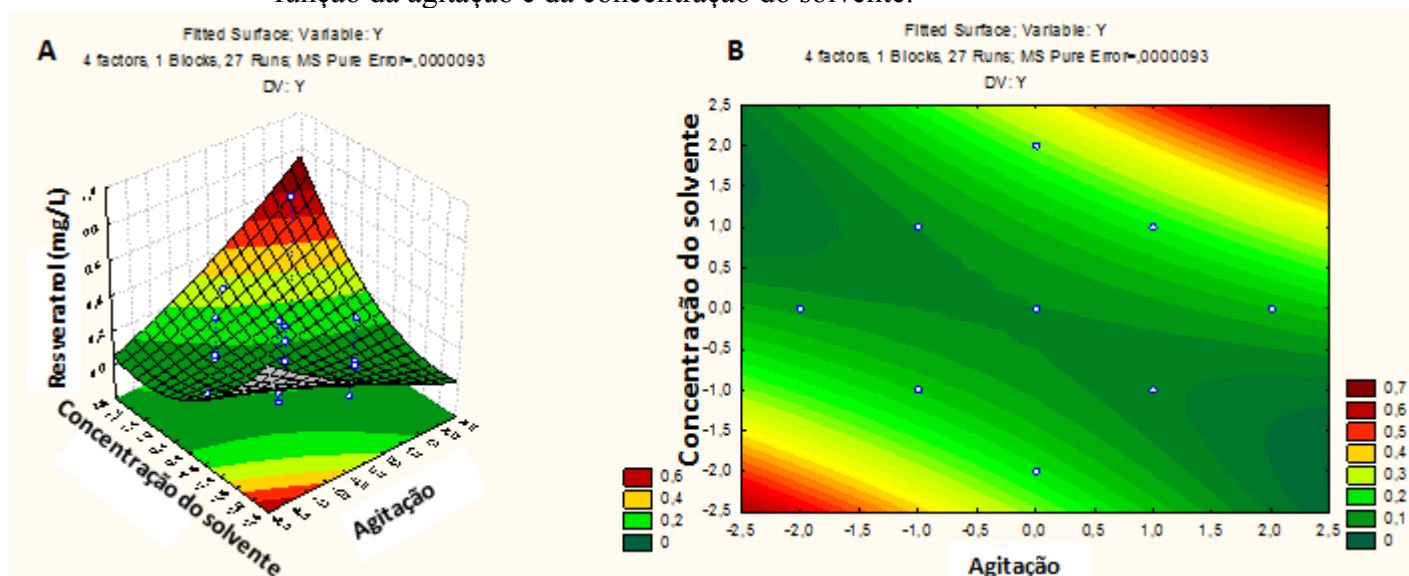
Na análise entre a relação da agitação e da temperatura é possível observar uma melhor interação quando há um aumento do valor das variáveis gerando uma maior extração de resveratrol (Figura – 37, A e B).

Figura 34 - Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para a extração de resveratrol em função da temperatura e da agitação.



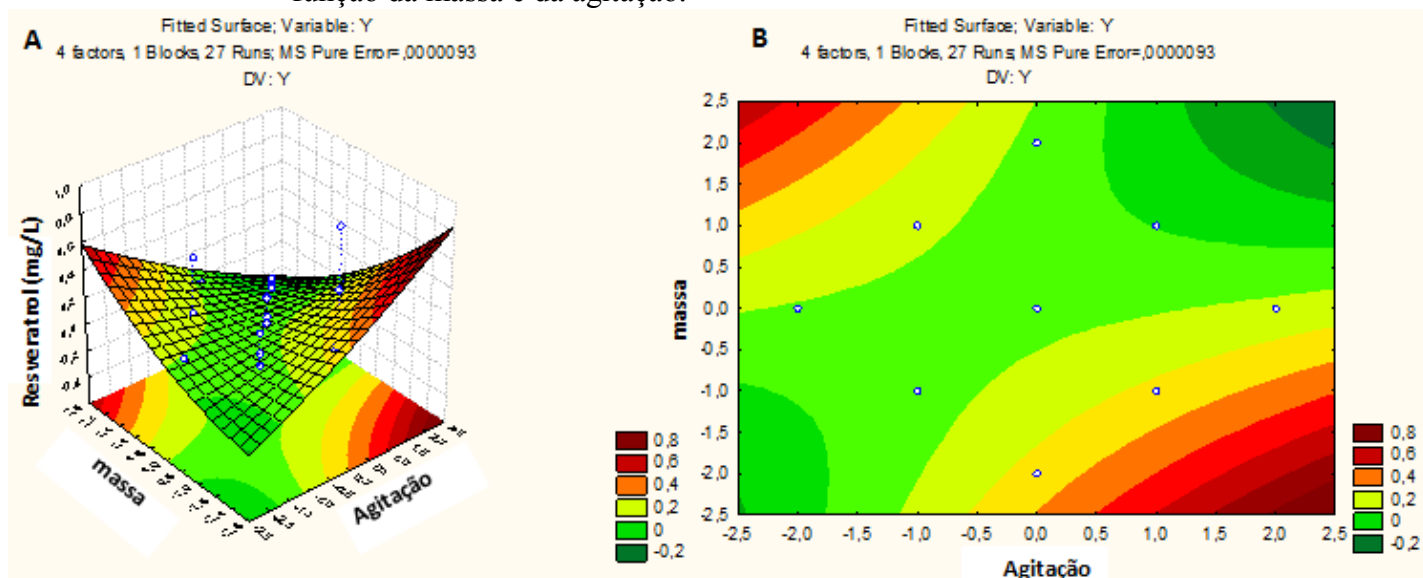
Com relação à interação entre as variáveis agitação e concentração do solvente, observou-se que a maior agitação e concentração do solvente proporcionaram a maior capacidade de extração do resveratrol (Figura – 38, A e B).

Figura 35 - Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para a extração de resveratrol em função da agitação e da concentração do solvente.



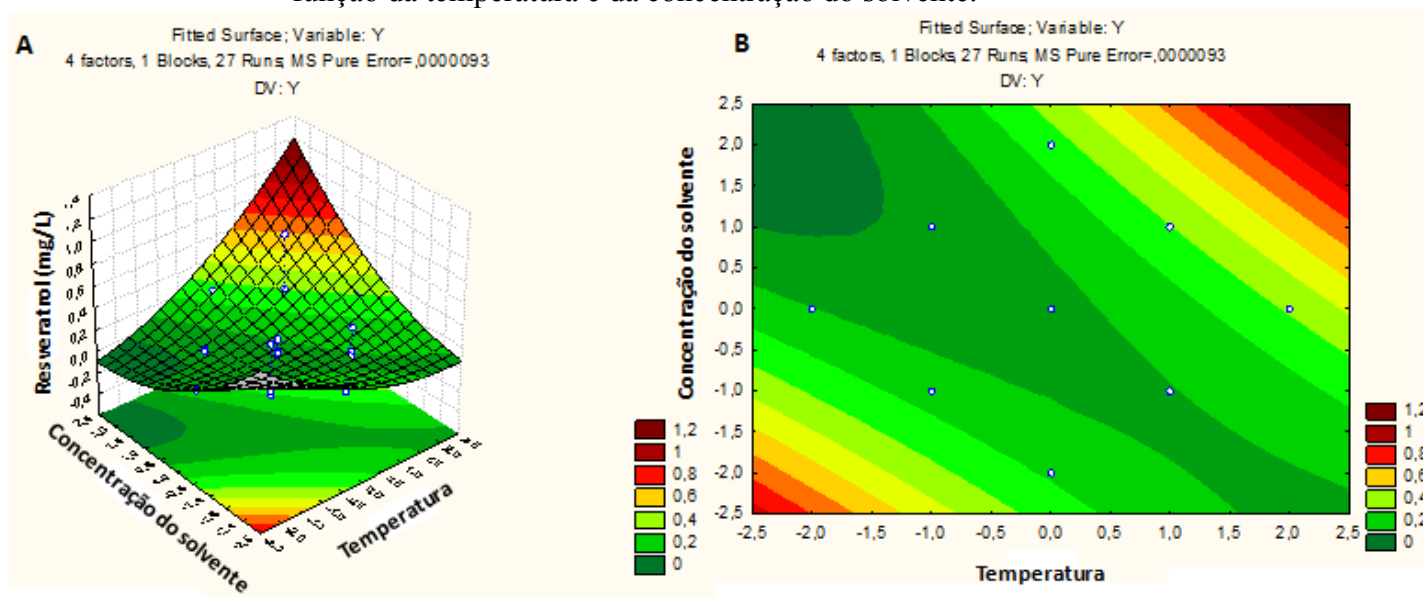
Na interação entre as variáveis agitação e massa, observou-se que a maior agitação possível proporcionou a maior capacidade de extração, enquanto as menores massas proporcionaram uma maior extração do resveratrol (Figura – 39, A e B).

Figura 36 - Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para a extração de resveratrol em função da massa e da agitação.



Analisando a figura 40, A e B, é possível concluir que, dentro das faixas estudadas, os maiores teores de resveratrol apontam para uma maior temperatura combinada com a maior concentração do solvente.

Figura 37 - Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para a extração de resveratrol em função da temperatura e da concentração do solvente.



O efeito das variáveis concentração do solvente, temperatura e massa, é claramente observado nas figuras 41, A e B; e 42 A e B, onde é possível concluir que dentro das faixas estudadas, os maiores teores de resveratrol apontam para as maiores temperaturas, concentrações do solvente e as menores massas.

Figura 38 - Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para a extração de resveratrol em função da temperatura e da massa.

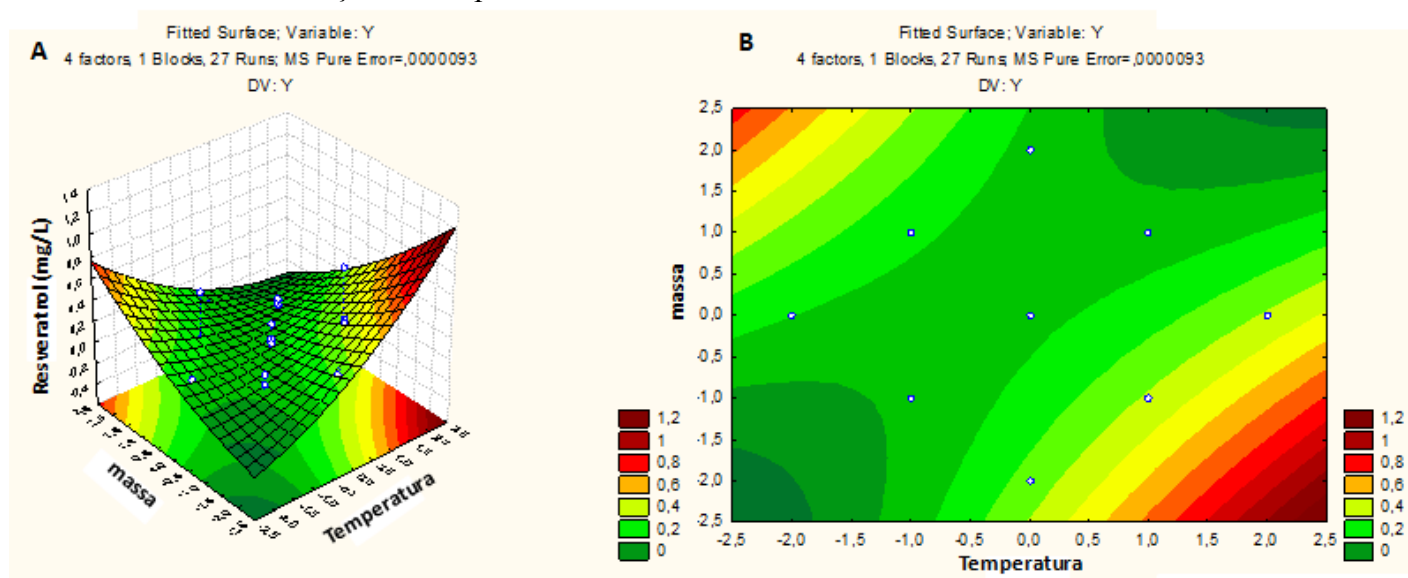
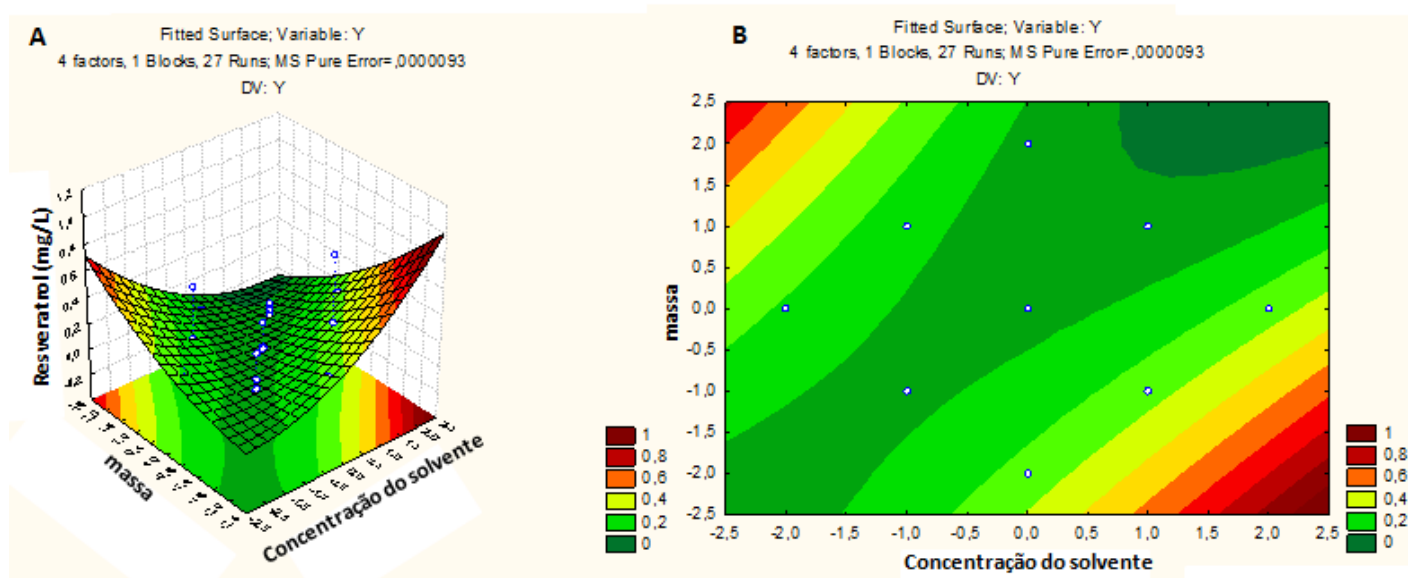


Figura 39 - Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para a extração de resveratrol em função da concentração do solvente e da massa.



#### 4.5 Estudo fitoquímico com o material *in vivo*

#### 4.5.1 Rendimento dos extratos brutos e partições

Os extratos brutos obtidos de folhas e caules, utilizando os solventes em ordem crescente de polaridade, iniciando-se pelo hexano, seguido do diclorometano e por fim o metanol, mostrou que as folhas fornecem maiores rendimentos quando comparado aos caules. As folhas apresentaram rendimentos em torno de 11% tanto no extrato hexânico quanto no metanólico. Já o rendimento dos caules ficou entre 2,7 a 7,3% (Tabela 16).

Tabela 16 – Rendimento dos extratos brutos de folhas e caules de *Arachis repens*.

Solvente	Material vegetal	Massa (g)	Rendimento (%)*
<i>n</i> -hexano	Folhas	4,8789	11,08
	Caules	1,7435	2,68
Diclorometano	Folhas	1,7497	3,97
	Caules	3,0524	4,69
Metanol	Folhas	4,8588	11,04
	Caules	4,7449	7,29

\*Cálculo de rendimento baseado em um total de 44 g de folhas e 65 g de caules utilizados

As partições apolares como em hexano e em diclorometano e, ainda, a partição de média polaridade como em acetato de etila, tanto de folhas como caules, apresentaram rendimentos baixos situados entre 1,4 a 7,0 %. Os maiores rendimentos foram observados para as partições polares como em butanol e o resíduo aquoso, com rendimentos acima de 20 %. Dentre os polares os maiores rendimentos foram encontrados na partição em butanol de folhas (39 %) e caules (52 %) (Tabela 17).

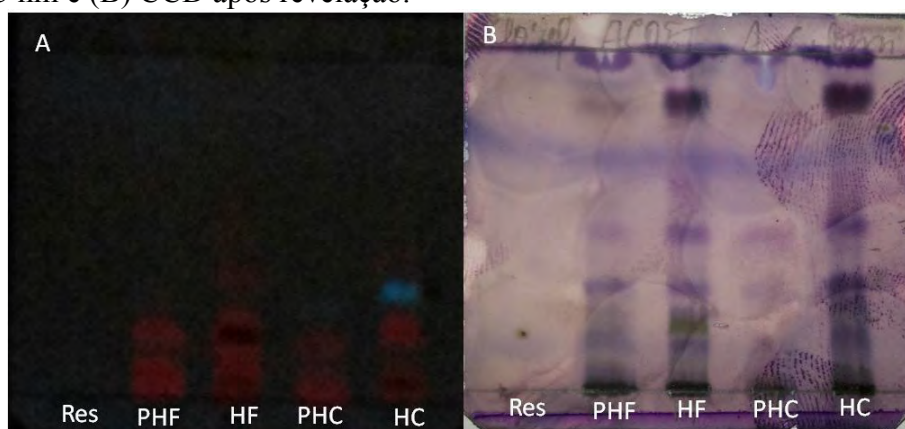
Tabela 17 – Rendimento das partições líquido-líquido obtidas dos extratos metanólicos brutos das folhas (3,76 g) e caules (3,65 g).

Solvente	Material vegetal	Massa (g)	Rendimento (%)
<i>n</i> -hexano	Folha	0,0531	1,41
	Caule	0,1068	2,9
Diclorometano	Folha	0,0522	1,38
	Caule	0,0951	2,6
Acetato de etila	Folha	0,2650	7,04
	Caule	0,1310	3,58
Butanol	Folha	1,4683	39,05
	Caule	1,9131	52,41
Resíduo aquoso	Folha	0,7175	19,08
	Caule	1,1015	30,17

#### 4.5.2 Análise por CCD dos extratos brutos em hexano das folhas (HF) e caules (HC) e das partições hexânicas de folhas (PHF) e caules (PHC).

O extrato bruto em *n*-hexano do caule apresentou, sugestivamente, as mesmas substâncias, entretanto, em concentrações diferentes, daquelas presentes nas partições hexânicas de folhas e caules e, no extrato hexânico de folhas (Fig 43 B).

Figura 40 - Análise por CCD das partições hexânica dos extratos metanólicos de folhas (PHF) e caules (PHC) e dos extratos brutos em hexano das folhas (HF) e caules (HC) de *Arachis repens*. Res – padrão de resveratrol. Como eluente foi utilizado clorofórmio: acetato de etila: ácido fórmico (2,5:1:0,1), revelados com ANS. (A) CCD observada a 365 nm e (B) CCD após revelação.





#### 4.5.3 Fracionamento do extrato hexânico de caules por cromatografia em coluna utilizando XAD-16 como adsorvente.

O extrato hexânico foi fracionado em coluna de XAD-16 fornecendo duas frações principais, uma metanólica e outra em acetato de etila. Destas, a fração metanólica foi fracionada sucessivamente passando pela fração M2 (37,6 mg) (Figura 44) e por fim resultando na fração M2A23-25 (14 mg), proveniente da junção das frações M2A23 (12,2 mg) e M2A24-25 (2,5 mg) (Figura 45).

Figura 41 – Análise por CCD em gel de sílica das frações M1 (ND), M2 (37,6 mg), M3 (12,4 mg) e M4 (5,2 mg) provenientes do fracionamento do extrato bruto em *n*-hexano de caules.

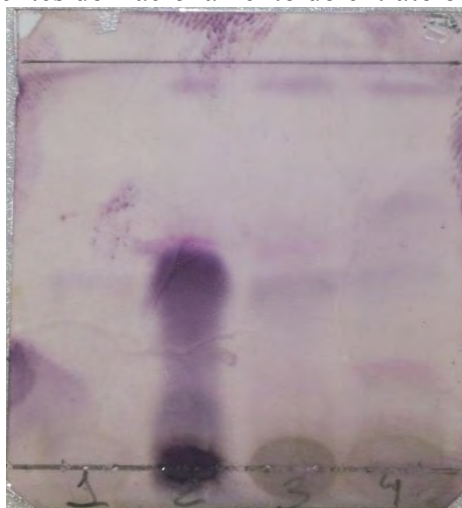
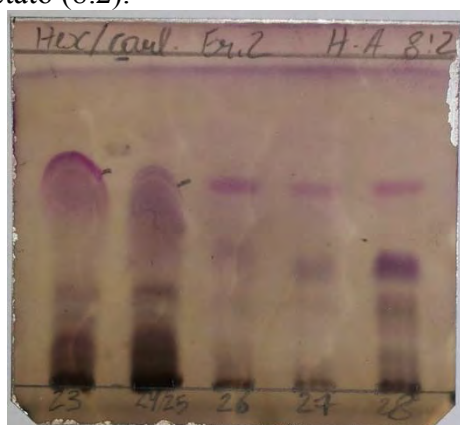


Figura 42 – Análise por CCD em gel de sílica das frações M2A23 a M2A28, reveladas com ANS e eluída em *n*-hexano:acetato (8:2).



A sub-fração M2A23-25 observada em CCD apresentou característica de pertencer a classe dos triterpenos/esteroides devido a coloração violeta observada quando revelada com o reagente ANS (Figura 46). Para auxiliar na elucidação estrutural a amostra M2A23-25 foi submetida à análise por espectroscopia de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 47) e  $^{13}\text{C}$  (Figura 48). Analisando-se os espectros de

ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) observa-se grupos de sinais na região de 5 a 5,5 ppm, em 3,5 ppm e outro grupo maior na região de 2,5 a 0,5 ppm. O sinal multipletto em 3,54 ppm característico de hidrogênio oximetínico da posição-3 do esqueleto dos esteroides confirma a coloração observada na CCF. Dois grupos de sinais multiplettos na região de 5,25 a 5,0 ppm indicam a presença de hidrogenios olefinicos que são comuns em esteróides naturais, além dos singletos largos entre 5,5 a 5,25 ppm. Os sinais de 2,5 a 0,5 ppm representam sinais de hidrogênios metilénicos e metilas, dentre os quais o sinal em 1,62 ppm indicativo de metila se destacam no espectro (Tabela 18).

O espectro de Carbono treze (RMN  $^{13}\text{C}$ ) confirma as observações do espectro de RMN $^1\text{H}$  onde os sinais olefinicos são observados na região de 140 a 120 ppm, o sinal do carbono oximetínico em 71,8 ppm e sinais de metilenos e metilas na região de 60 a 10 ppm. Figura (48). Estes dados comparados com a literatura são coincidentes para os fitoesteróides sitosterol e estigmasterol (PATEH *et al.* 2009, QUADER *et al.* 2012) (Figura 46). Os valores de deslocamentos químicos para estes dois esteroides são apresentados na Tabela 19 a fim de comparação dos dados. Outros deslocamentos encontrados são sugestivos da presença de avenasterol e de campesterol, visto que estes são análogos dos esteroides determinados (MATSUMOTO *et al.* 1974, KIM *et al.* 2007) (Figura 46).

Figura 43 - Estruturas químicas dos esteróides estigmasterol, sitosterol, campesterol e  $\Delta^5$ -avenasterol.

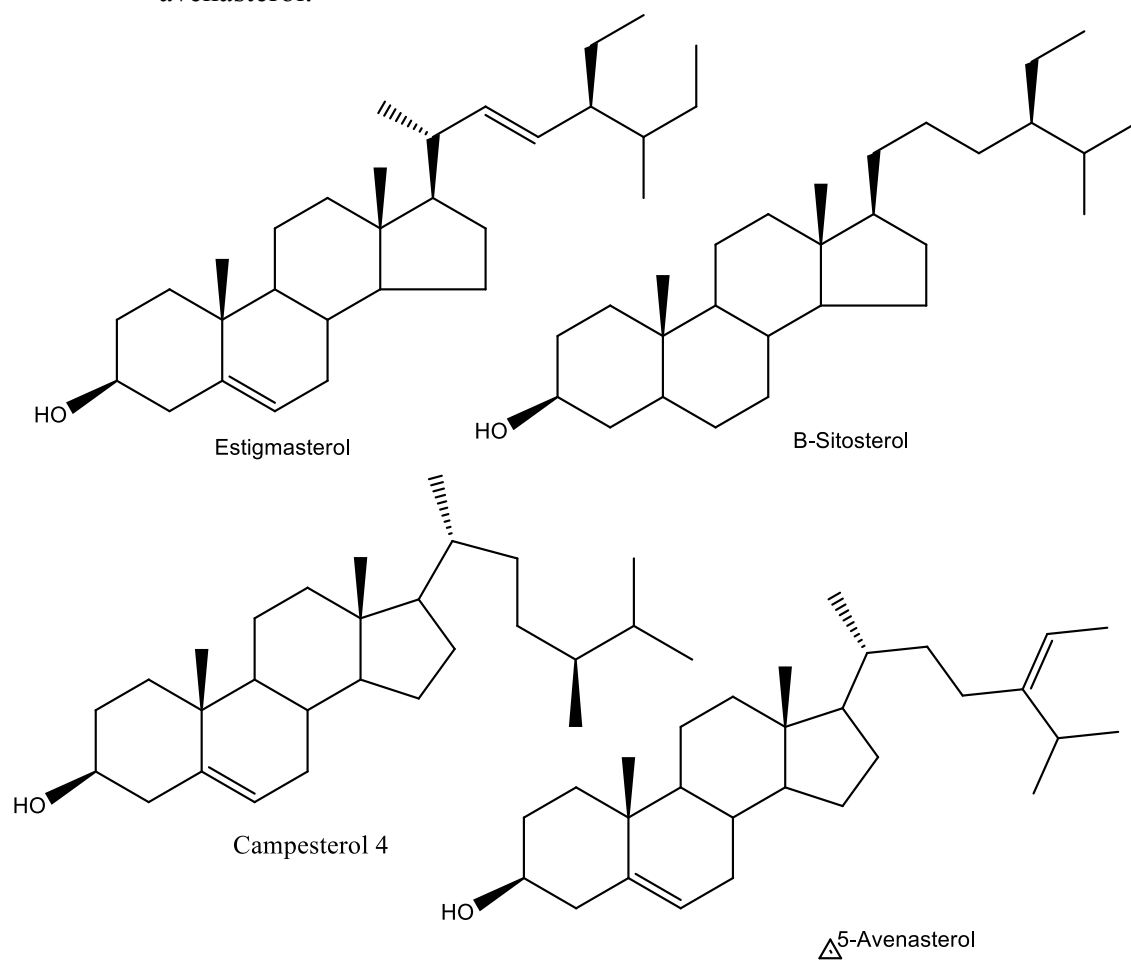


Figura 44 - Espectro de ressonância magnética de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz em  $\text{CDCl}_3$ ) da amostra M2A23-25 purificada do extrato hexânico do caule de *A. repens*.

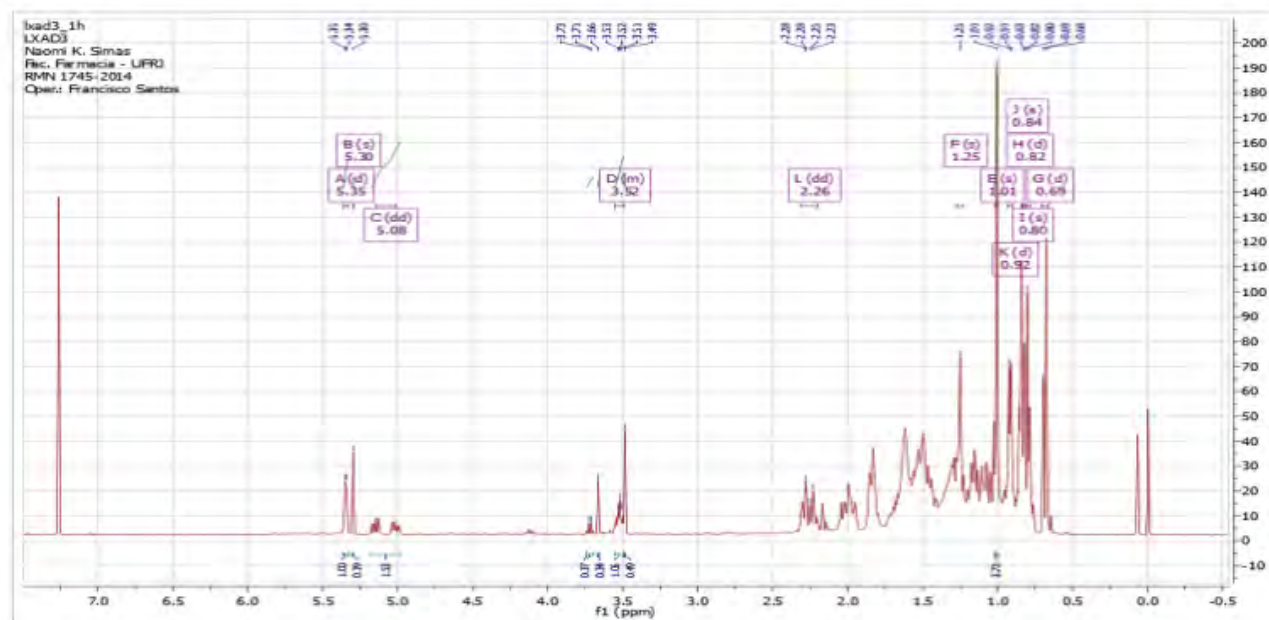


Figura 45 - Espectro de ressonância magnética de hidrogênio (500 MHz em CDCl<sub>3</sub>) da amostra M2A23-25 purificada do extrato hexânico do caule de *A. repens*.

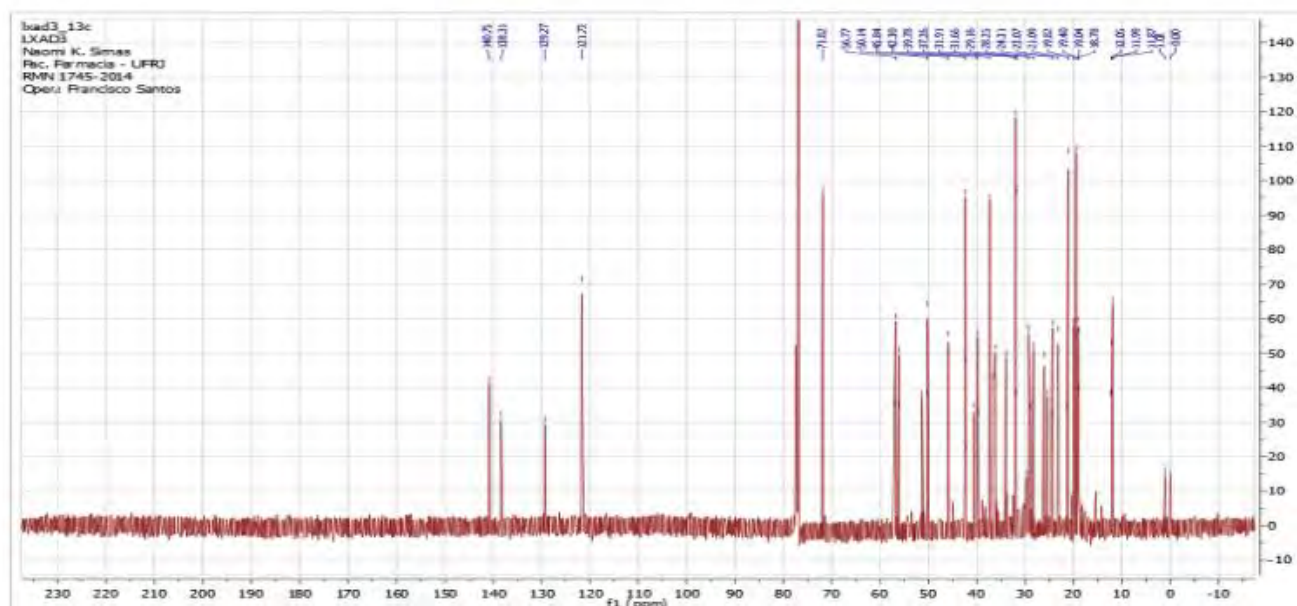


Tabela 18 – Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de M2 a 23-25 solubilizado em  $\text{CDCl}_3$  isolado de *A. repens* e comparação com a literatura.

Numeração	LXAD3 $^1\text{H}$ $\delta$ (ppm)	LXAD3 $^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm) Sitosterol/ Estigmasterol (PATEH <i>et al.</i> 2009)	$^{13}\text{C}$ (ppm) Sitosterol/ estigmasterol (PATEH <i>et al.</i> 2009, QUADER <i>et al.</i> 2012)	Avenasterol (MATSUMOTO <i>et al.</i> 1974)	Campesterol (KIM <i>et al.</i> 2007)
3	3,55 – 3,49 (m, 1H)	71,82	3,47-3,55 (m)	71,8	-	3,51 (1H, brdd, $J = 7,3, 7.3$ Hz, H-3)
5	-	140,75	-	140.8	-	-
6	5,30 (sl, 1H)	121,72	5,34 (sl)	121,7	-	-
	5,35 (d, $J = 3,8$ Hz, 1H)		-		-	5,34 (1H, brd, $J$ $= 5,2$ Hz, H-6)
18	0,68 (s)	11,99/ 11,87	0,68 (s)	11,9/11,0	0,70 (s, H-18)	0,68 (3H, s, H-18)
19	1,01 (s, 4H)	19,40/ 21,22	1,01 (s)	19,4/21,2	1,02 (s, H-19)	1,01 (3H, s, H- 19)
21	0,92 (d, $J$ $= 6,4$ Hz, 3H)	18,78/21,09	0,92 (d, $J=6,4$ Hz)	18,8/21,2	-	0,92 (1H, d, $J =$ 6,6 Hz, H-21)
22	5,08 (dd, $J = 52,7;$ 8,6 Hz, 1H)	138,0	5,07 (dd)	139,8	5,11 (q, $J = 7,2$ Hz, H-28)	-
23		128,0	5,14 (dd)	128,0	-	-
25	2,27 (m)	-	-	-	2,2 (hept, $J = 7,2$ Hz)	-
26	0,82 (d, $J$ $= 4,2$ Hz, 2H)	19,82/21,09	0,814 (d, $J=6,5$ )	19,8/21,2	-	0,81 (3H, d, $J =$ 7,2 Hz, H-26)
27	0,84 (s, 2H)	19,40/19,04	0,833 (d, $J=6,5$ )	19,3/19,0	0,98 (d, $J = 6,0$ Hz, H-26 e H-27)	0,84 (3H, d, $J =$ 7,2 Hz, H-27)
28	-	-	-	-	5,11 (q, $J = 7,2$ Hz)	-
29	1,62 (sl)	-	-	-	1,58 ( $J = 6.0$ Hz)	-

(-) dados não observados

## 4.5.3.1 Fracionamento da fração M13-M20 proveniente do fracionamento do extrato hexânico de caules

As frações M13-M17 (103 mg) e M18-M20 (68 mg) apresentaram um perfil cromatográfico em que sob luz ultravioleta em ondas curtas observou-se principalmente tres bandas acima do meio da placa ( $F_R > 0,5$ ). Uma destas bandas é observada em azul em ultravioleta de onda longa e que revelou em violeta em ANS (Figura 49). Devido a este fato elas foram reunidas e codificadas como M13-M20 (171 mg). Sucessivos fracionamentos cromatográficos desta amostra resultaram na amostra M2 (37 mg) seguido pela amostra M5 (19,9 mg), a qual apresentou absorção forte em onda longa sob irradiação do ultravioleta (Figura 50 A) e bandas que revelaram em violeta com anisaldeído sob aquecimento (Figura 51B); o fracionamento desta amostra resultou na obtenção das frações M11 (0,7 mg) e M18-19 (3,2 mg) que devido ao perfil químico sem muitas impurezas (Figura 50) foram analisadas por CG/EM.

Figura 46 - Análise por CCD em gel de sílica a 254 nm (A); 365 nm (B) e reveladas com anisaldeído sulfúrico (C) das frações M13-M17 (17) e M18-M20 (20).

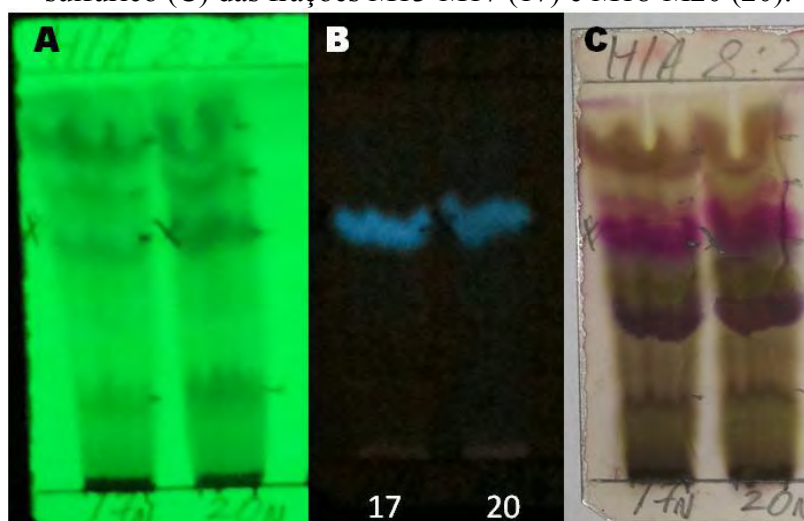
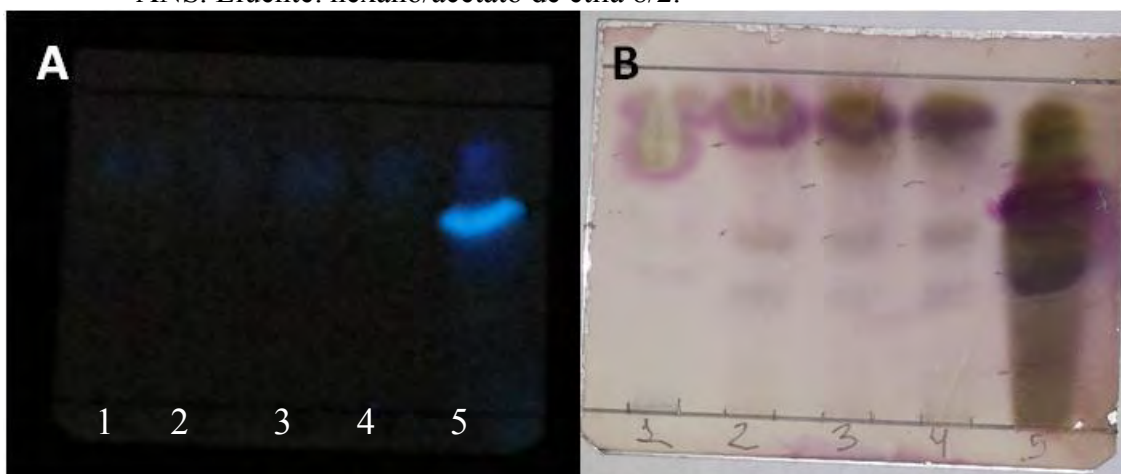


Figura 50 – Análise por CCD em gel de sílica das sub-frações de M 2 do extrato hexânico do caule de *Arachis repens*. A – visualização a 365 nm e B – visualização após revelação com ANS. Eluente: hexano/acetato de etila 8/2.



#### 4.6 Fracionamento do extrato em hexano das folhas por cromatografia em coluna utilizando XAD-16 como adsorvente.

Conforme já mencionado anteriormente, o extrato bruto em *n*-hexano de folhas em análise por CCD evidenciou a presença de substâncias que em ANS revelaram em roxo, de forma semelhante as substâncias presentes no extrato hexânico de caules e nas partições hexânicas de folhas e caules (Fig 43). Além disso, o extrato bruto hexânico de folhas apresentou importante atividade de inibição da produção de NO e da produção de TNF- $\alpha$ , à 100  $\mu\text{g/mL}$  (conforme será descrito a seguir). Este perfil de atividade mostrou-se diferente dos demais extratos em diclorometano e em metanol, os quais também mostraram excelente atividade inibitória da produção de NO, mas, com alta citotoxicidade.

Após o fracionamento, estas frações foram reunidas de acordo com as semelhanças cromatográficas por CCD, resultando na fração H2 (53,6 mg) e fração H4 (68,9 mg). A análise da fração H2 em CG evidenciou um pico majoritário em  $t_R$  16,8 min (pico n<sup>o</sup> 24) com área relativa de 84,92% (Figura 51). A sequência de fragmentações e o íon molecular  $m/z$  256 indicaram que trata-se do ácido *n*-hexadecanoico (Figura 52).

Figura 51 – Perfil cromatográfico em CG-EM da sub-fração H2 proveniente de sucessivos fracionamentos de EHF. Pico majoritário (n<sup>o</sup> 24) em 16,8 minutos.

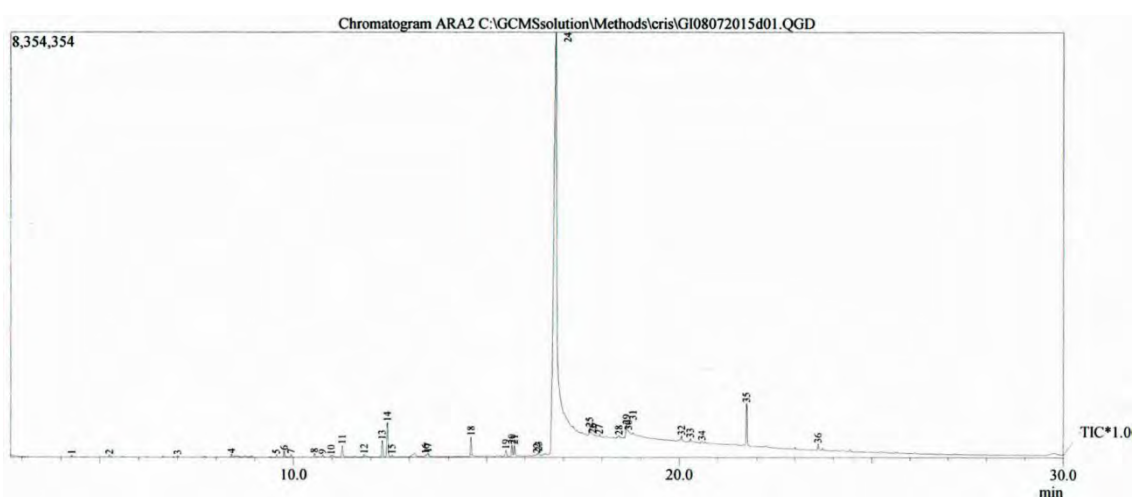
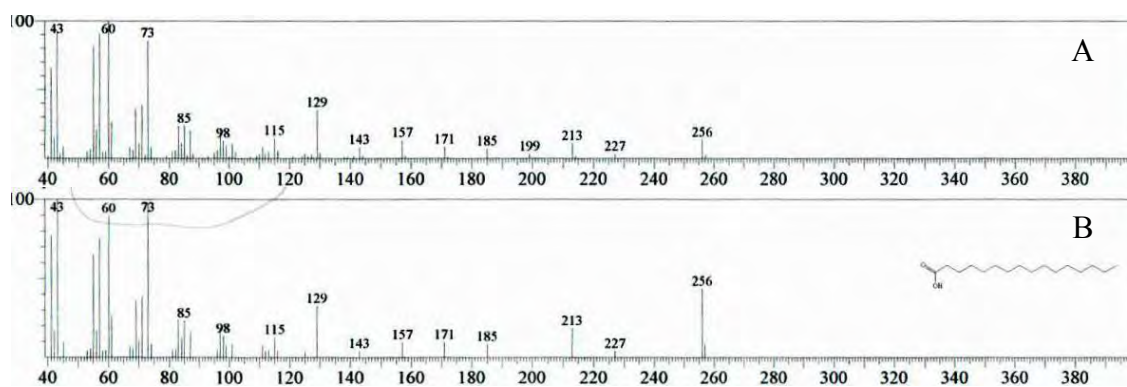




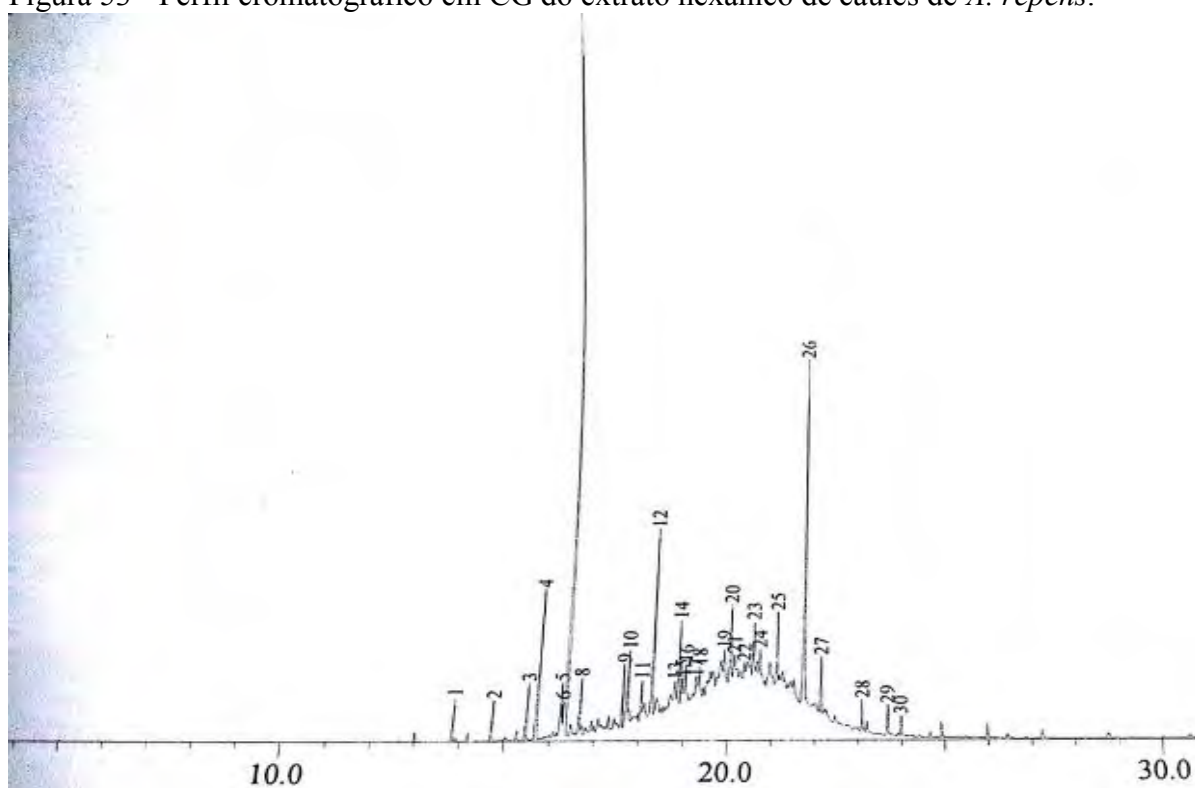
Figura 52 – A - Espectro de massas da substância (pico n° 24) identificada como ácido *n*-hexadecanoico,  $t_R$  16,80 min. B – Espectro do banco de dados.



#### 4.7 Análise do extrato hexânico de caules (EHC) de *Arachis repens* por CG-EM

A análise do extrato hexano dos caules sugeriu a identificação de triterpenos (Lupeol), lactona terpenoidica (4,8,12,16-tetrametil-heptadecano-4-olide), Fitosterol (campesterol [Ergost-5-en-3-ol]; stigmasterol;  $\gamma$ -Sitosterol), Éster metílico dos ácidos: hexadecanoico; azelaico [ácido nonanóico; ácido *n*-hexadecanoico];e decanoico), esteróides (Coletano-3,5-diol; Coletan-5-en-3-ol) e gordura saturada (ácido tridecanoico) (Figura 53).

Figura 53 - Perfil cromatográfico em CG do extrato hexânico de caules de *A. repens*.



O perfil cromatográfico em CG da fração M11 evidenciou uma substância majoritária (pico de número 10 no cromatograma) com uma área relativa de 64,8%, no tempo de retenção de 30,17 minutos (Figura 54). A análise do espectro de massas deste pico permitiu a identificação desta substância como sendo o lupeol, um triterpeno (Figura 55).

Figura 54 – Perfil cromatográfico em CG da sub-fração M11 proveniente de sucessivos fracionamentos de EHC. Pico majoritário (nº 10) em 30,17 min.

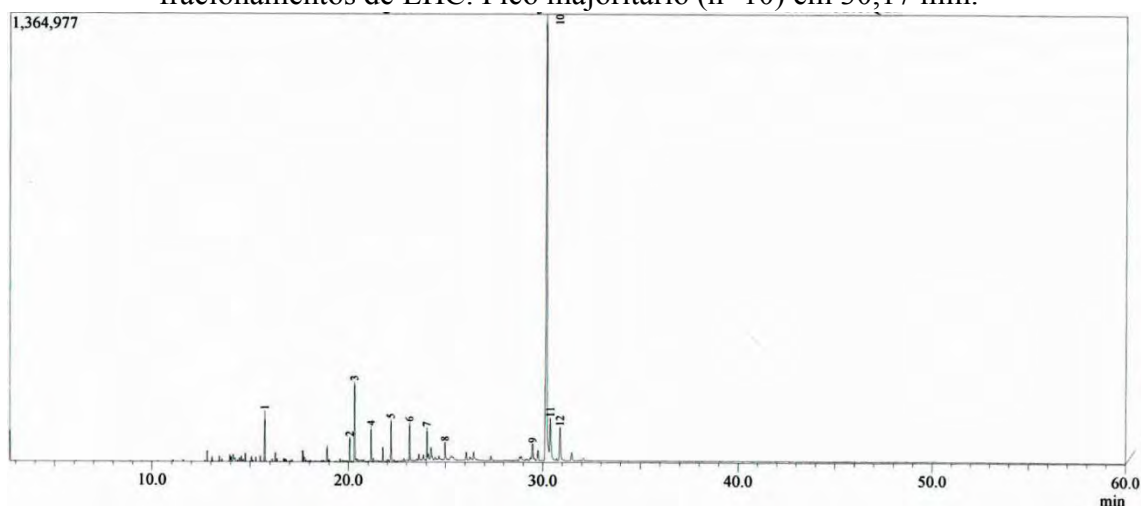
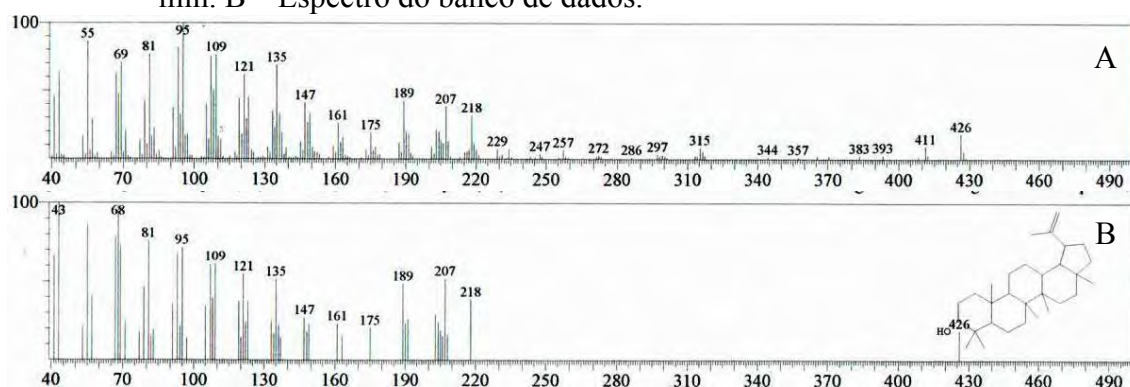


Figura 55 – A - Espectro de massas da substância (pico nº 10) identificada como lupeol em 30,17 min. B – Espectro do banco de dados.



O cromatograma da amostra M18-19 (figura 56) evidenciou a presença de três picos majoritários cujo percentual alcançavam 10,59% (27,76 min; pico de nº 16), 27,80% (28,11 min; pico de nº 17) e 54,61% (28,97 min; pico de nº 19) na amostra. Os picos foram identificados de acordo com seus perfis de fragmentação como sendo campesterol, estigmasterol e  $\gamma$ -sitosterol, respectivamente (Figuras 57, 58 e 59).

Figura 56– Perfil cromatográfico em CG da sub-fração M18-19 proveniente de sucessivos fracionamentos de EHC. Picos majoritários (n° 16, 17 e 19) em 27,76, 28,11 e 28,97 minutos, respectivamente.

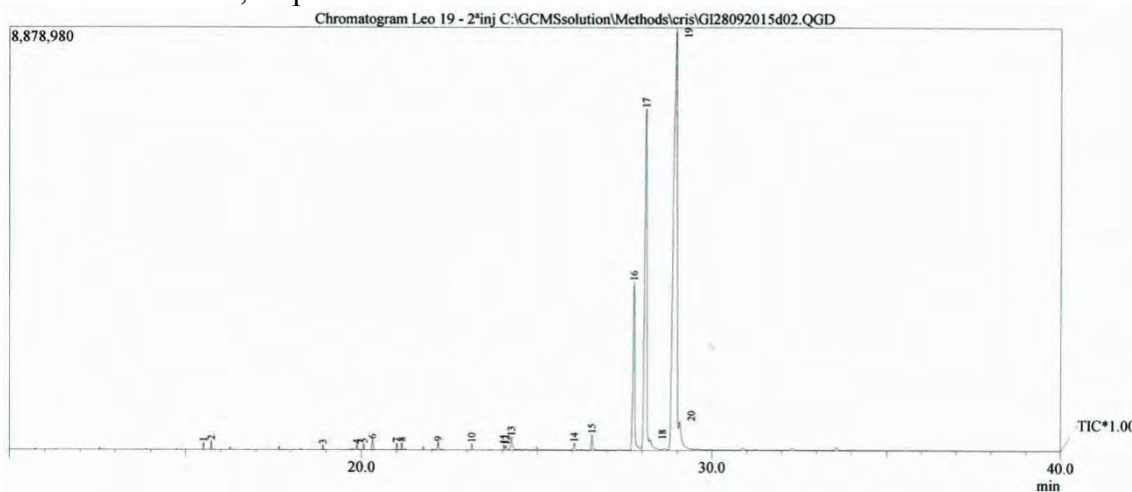


Figura 57 – A - Espectro de massas da substância (pico n° 16) identificada como campesterol,  $t_R$  27,76 min. B – Espectro do banco de dados.

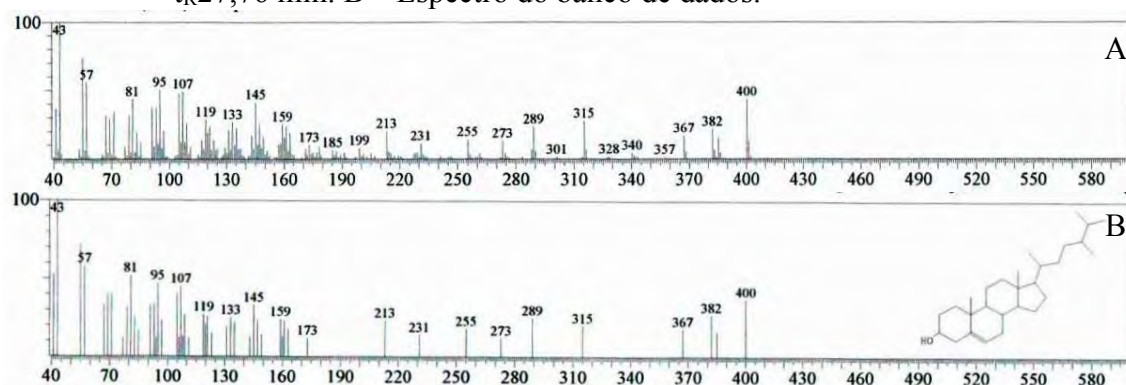


Figura 58 – A - Espectro de massas da substância (pico n° 17) identificada como estigmasterol.  $t_R$  28,11 min. B – Espectro do banco de dados.

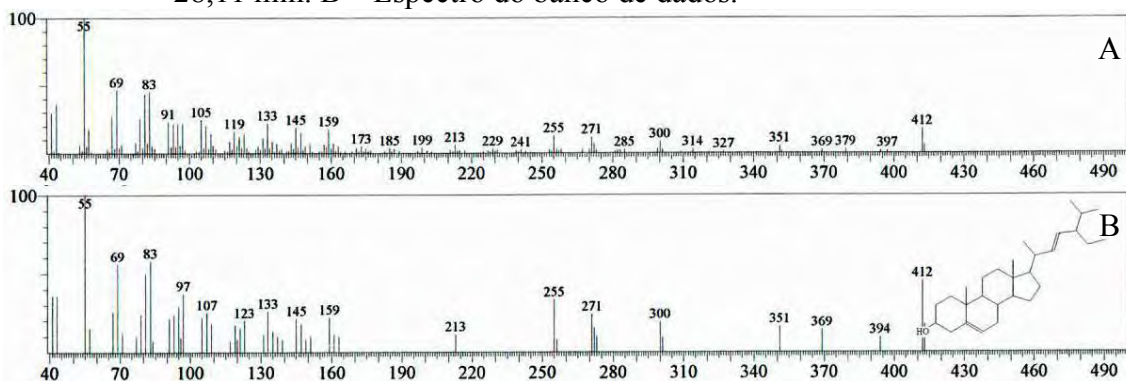
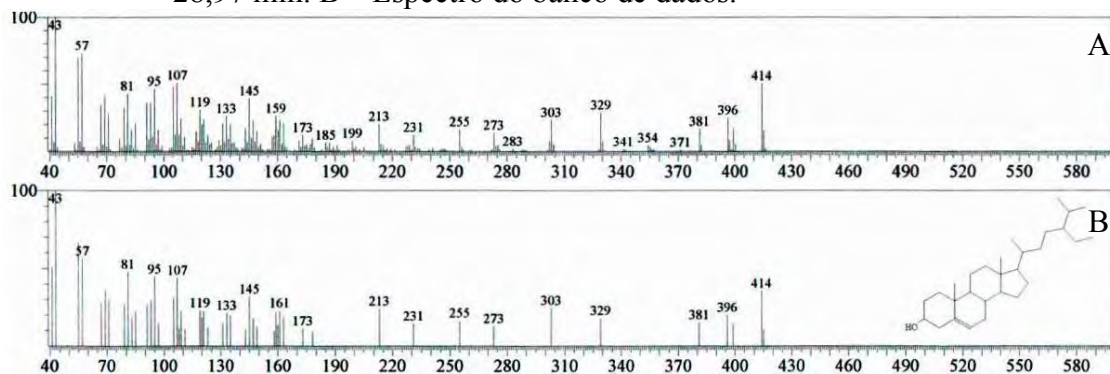


Figura 59 – A - Espectro de massas da substância (pico n°19) identificada como  $\gamma$ -sitosterol,  $t_R$  28,97 min. B – Espectro do banco de dados.



O cromatograma em CG da amostra H4 (Figura 60) apresenta 4 picos considerados como majoritários nos  $t_R$  de 8,999 (5,20 %, pico n° 10),  $T_R$  de 27,765 (5,09 %, n° 92),  $T_R$  de 28,097 (12,72 %, n° 93) e  $T_R$  de 28,918 (15,32 %, n° 94) min. As substâncias foram identificadas de acordo com padrão de fragmentação e seus respectivos íons moleculares como  $\alpha$ -metoxi-p-cresol, campesterol, estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol, respectivamente (SHENG e CHEN, 2009) (Figuras 61, 62, 63 e 64).

Figura 60 – Perfil cromatográfico em CG da sub-fração H4 proveniente de sucessivos fracionamentos de EHF. Picos majoritários (n° 10, 92, 93 e 94) em 8,99; 27,765; 28,097 e 28,918 minutos, respectivamente.

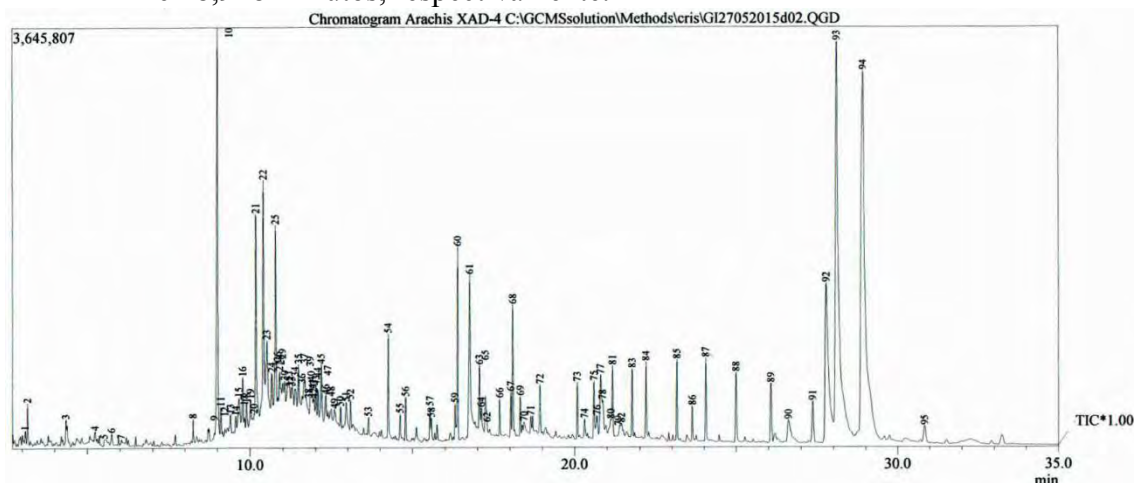
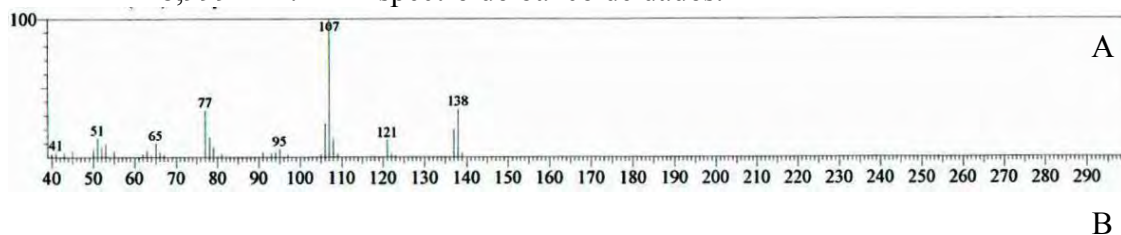


Figura 61 – A - Espectro de massas da substância (n° 10) identificada como  $\alpha$ -metoxi-p-cresol,  $t_R$  8,999 min. B – Espectro do banco de dados.



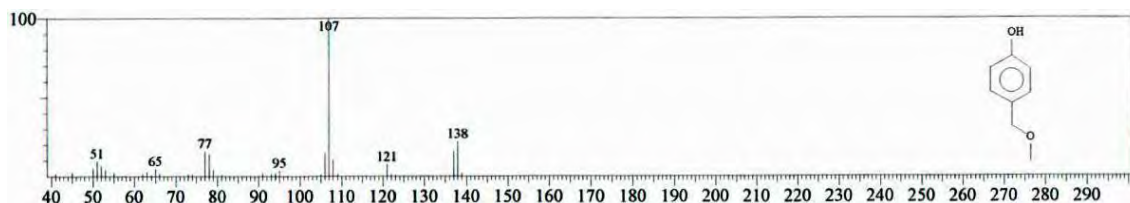


Figura 62 – A - Espectro de massas da substância (n° 92) identificada como campesterol,  $t_R$ . 27,765 min. B – Espectro do banco de dados.

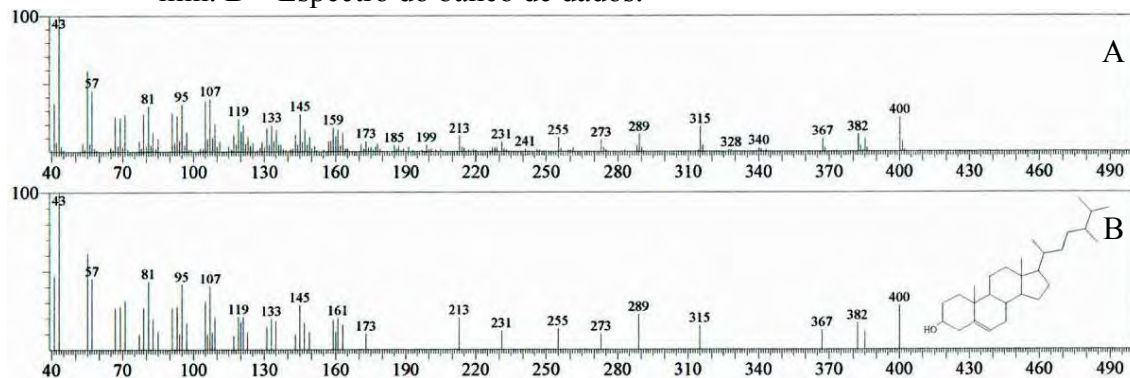


Figura 63 – A - Espectro de massas da substância (n° 93) identificada como estigmasterol,  $t_R$ . 28,097 min. B – Espectro do banco de dados.

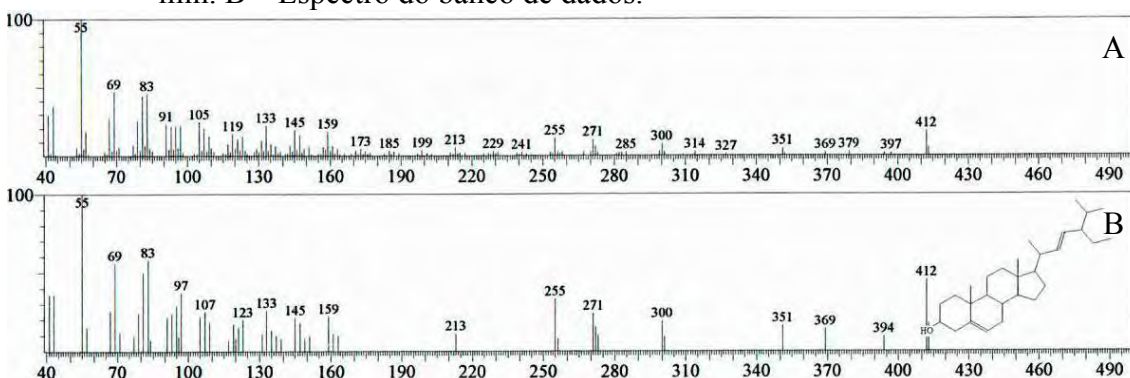
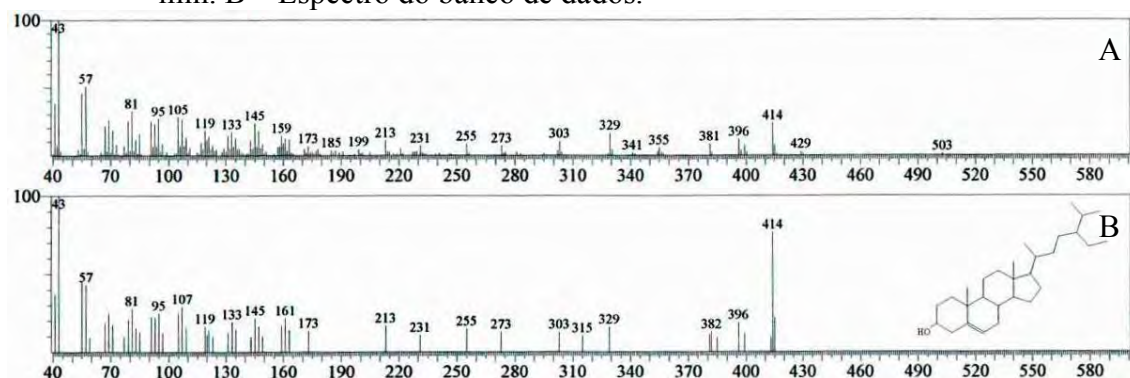


Figura 64 – A - Espectro de massa da substância (n° 94) identificada como  $\beta$ -sitosterol,  $t_R$  28,918 min. B – Espectro do banco de dados.



#### 4.8 Atividade alelopática

Os testes alelopáticos foram realizados com extratos brutos em *n*-hexano, diclorometano e metanol de folhas e caules de *A. repens* com o objetivo de escolher o extrato que apresentasse atividade alelopática mais significativa.

O potencial alelopático foi monitorado através do bioensaio que avalia a porcentagem de inibição da germinação e do crescimento de hipocótilos e raízes em sementes de *Lactuca sativa*.

Os diferentes extratos de *A. repens* foram testados nas concentrações de 100, 200, 500 e 1.000 ppm. Nessas concentrações não foi observado qualquer efeito sobre a germinação. Todos os extratos testados apresentaram tendência a inibir o crescimento; entretanto, o extrato metanólico do caule na concentração de 1.000 ppm foi capaz de inibir com maior significância o crescimento dos hipocótilos de *L. sativa* em 42,43% e das radículas em 79,17%. Não foi observada nenhuma anormalidade morfológica, como oxidação dos ápices e ausência de pêlos absorventes, tanto nos hipocótilos como nas radículas de *L. sativa*. Os efeitos alelopáticos decaíam conforme as concentrações foram diminuindo (Figura 65 - 66). Dentre os valores de CI calculados, o extrato diclorometânico e metanólico de caules apresentaram as melhores atividades, com uma faixa de CI entre 77,0 a 130,8 ppm. Os valores de concentração inibitória de 50% (CI<sub>50</sub>) para os extratos brutos em *n*-hexano, diclorometano e metanol são demonstrados na tabela 19.

Devido ao baixo rendimento de massa do extrato diclorometânico (4,7%), o extrato metanólico de folhas e caules, com rendimentos de massa respectivos de 11,0 e 7,3 %, foram selecionados para serem particionados.

Tabela 19 - Valores de concentração inibitória 50% (CI<sub>50</sub>) para os extratos brutos em *n*-hexano, diclorometano e metanol.

Solvente		CI <sub>50</sub> (ppm)	
n-Hexano	Folha	Hipocótilo	287,7
		Radícula	97,5
	Caule	Hipocótilo	1.642
		Radícula	521
Diclorometano	Folha	Hipocótilo	267,1
		Radícula	331
	Caule	Hipocótilo	77,8
		Radícula	130,8
Metanol	Folha	Hipocótilo	122
		Radícula	509,4
	Caule	Hipocótilo	103,8
		Radícula	111

Figura 65 – Avaliação da atividade alelopática dos extratos brutos de folíolos de *Arachis repens* em *n*-hexano de hipocótilos (A) e radículas (B); diclorometano em hipocótilos (C) e radículas (D) e metanol em hipocótilos (E) e radículas (F).

Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão. A mesma letra indica não haver diferença significativa, valores de  $p \leq 0,05$ , pelo teste de Tukey-Kramer.

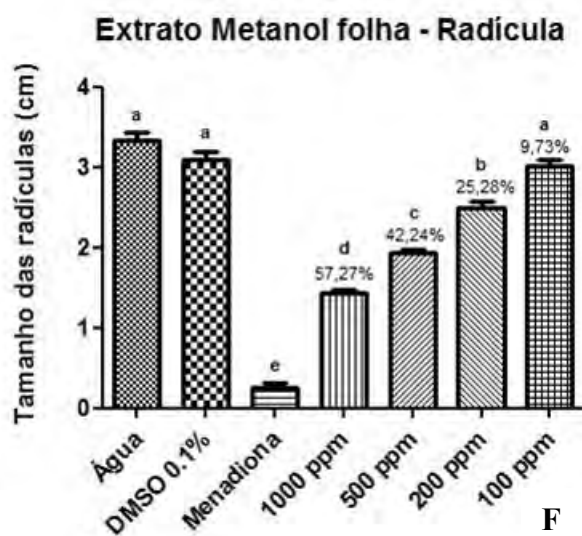
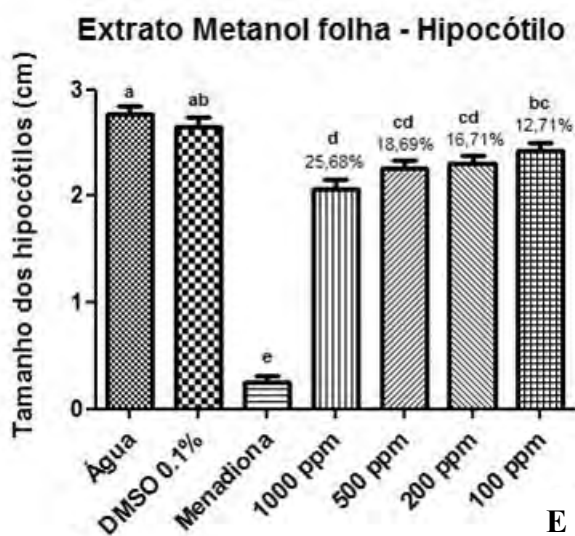
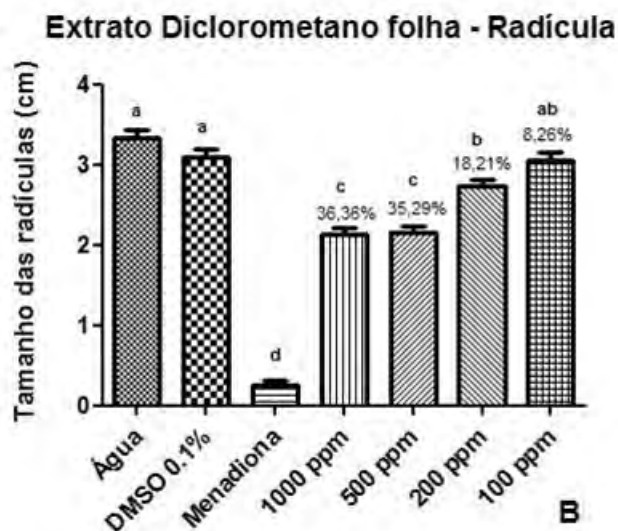
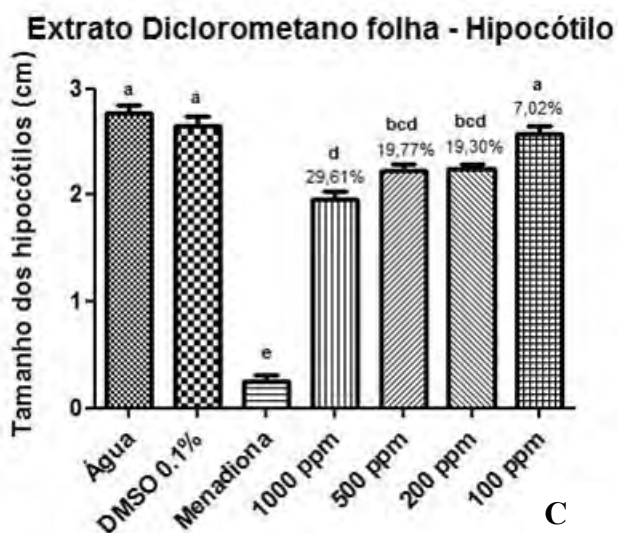
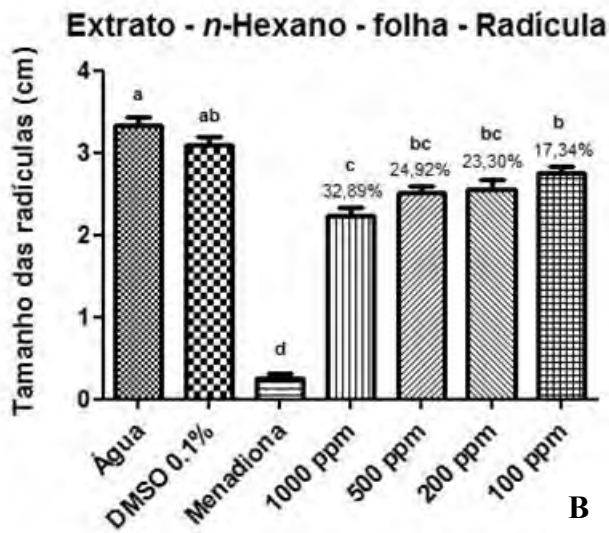
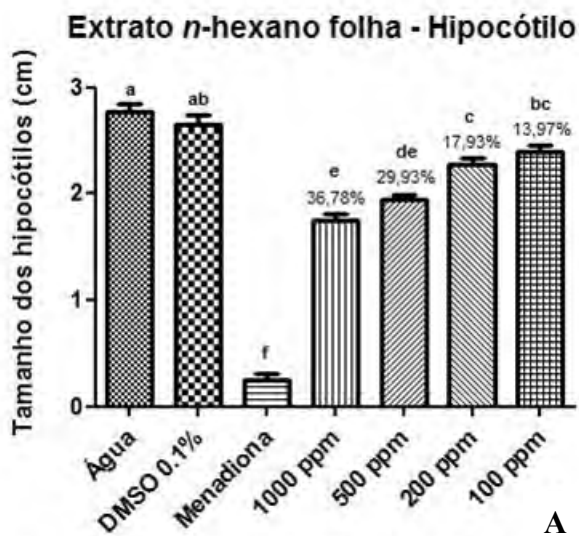
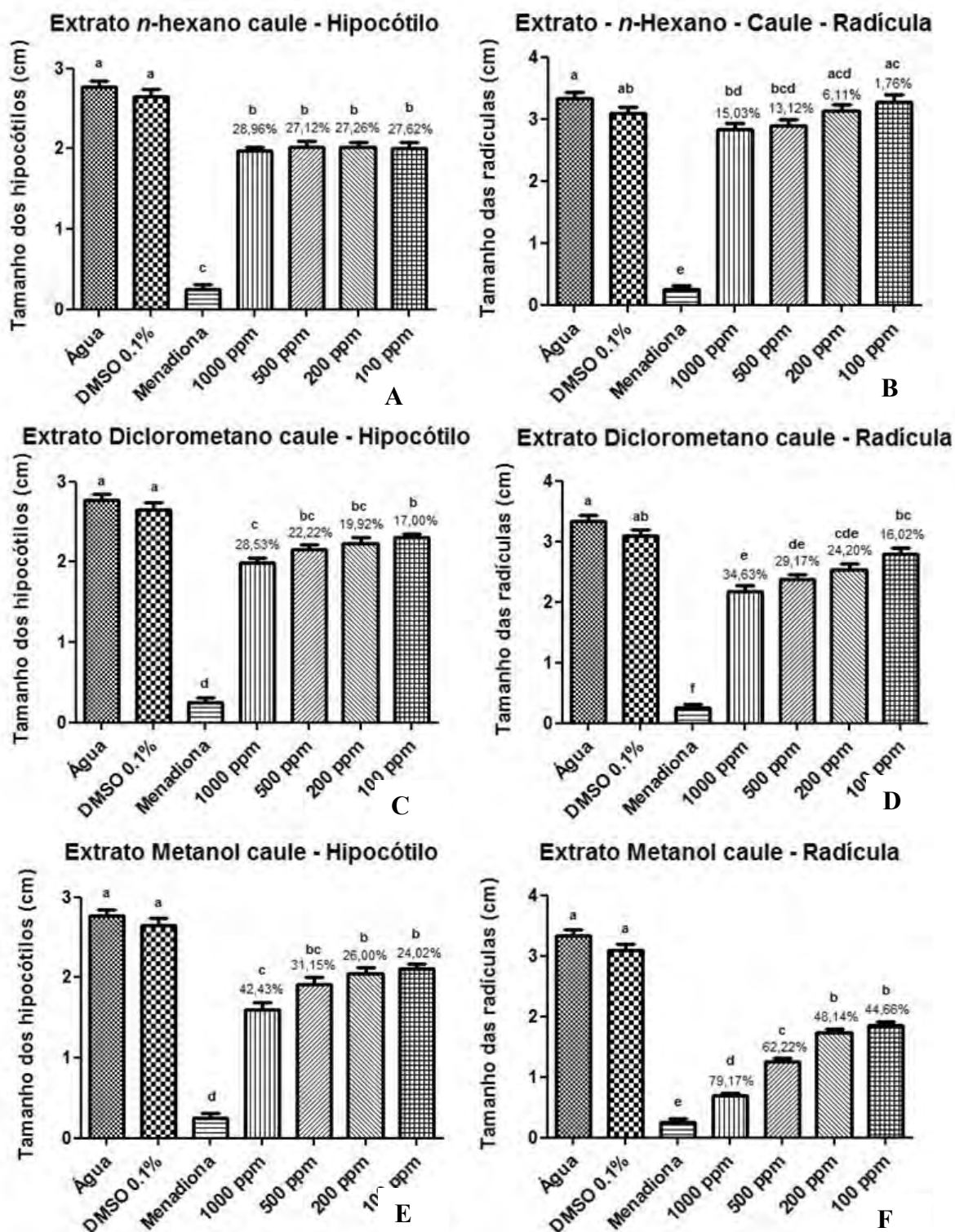




Figura 66 – Avaliação da atividade alelopática dos extratos brutos de caules de *Arachis repens* em n-hexano de hipocótilos (A) e radículas (B); diclorometano em hipocótilos (C) e radículas (D) e metanol em hipocótilos (E) e radículas (F).

Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão. A mesma letra indica não haver diferença significativa, valores de  $p \leq 0,05$ , pelo teste de Tukey-Kramer.



#### 4.8.1 Atividade alelopática das partições do extrato metanólico dos caules de *A. repens*

Foram testadas as partições orgânicas e o resíduo aquoso do extrato metanólico do caule de *A. repens* nas mesmas concentrações determinadas anteriormente com os extratos brutos (100, 200, 500 e 1.000 ppm). Nenhuma das partições apresentou efeito sobre a germinação nas concentrações testadas, mantendo os mesmos níveis de germinação do controle sem tratamento.

Comparando-se os efeitos aleloquímicos de inibição do crescimento de hipocótilos e radículas, verificamos que as raízes possuem maior sensibilidade à presença de substâncias alelopáticas em relação aos hipocótilos, uma vez que, como podemos observar no resíduo aquoso, não existe diferença estatística significativa em relação ao controle sem tratamento nas menores concentrações testadas (100 e 200 ppm) dos hipocótilos. Em todas as partições avaliadas a radícula sempre demonstrou ser mais sensível em relação aos hipocótilos (Figura 67 e 68).

Observou-se importante efeito de inibição do crescimento de hipocótilos e das raízes principalmente nas partições orgânicas em diclorometano e em acetato de etila, alcançando níveis de inibição de 98,62% na partição diclorometânica (1.000 ppm) sobre as radículas e 95,28% sobre os hipocótilos e na partição em acetato de etila, também a 1.000 ppm, de 80,22% de inibição do crescimento das radículas e 59,14% nos hipocótilos (Figura 67).

Assim como nos extratos brutos, nas partições também não foram observadas nenhuma anormalidade morfológica, como oxidação dos ápices e ausência de pêlos absorventes, tanto nos hipocótilos como nas radículas de *L. sativa*. Os efeitos alelopáticos decaíam conforme as concentrações foram diminuindo.

Figura 67 – Avaliação da atividade alelopática das partições orgânicas do extrato metanólico de caules em: n-hexano em hipocótilos (A) e radículas (B), diclorometano em hipocótilos (C) e radículas (D) e acetato de etila em hipocótilos (E) e radículas (F) de *Arachis repens* sobre hipocótilos e radículas de *L. sativa*. Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão. A mesma letra indica não haver diferença significativa, valores de  $p \leq 0,05$ , pelo teste de Tukey-Kramer.

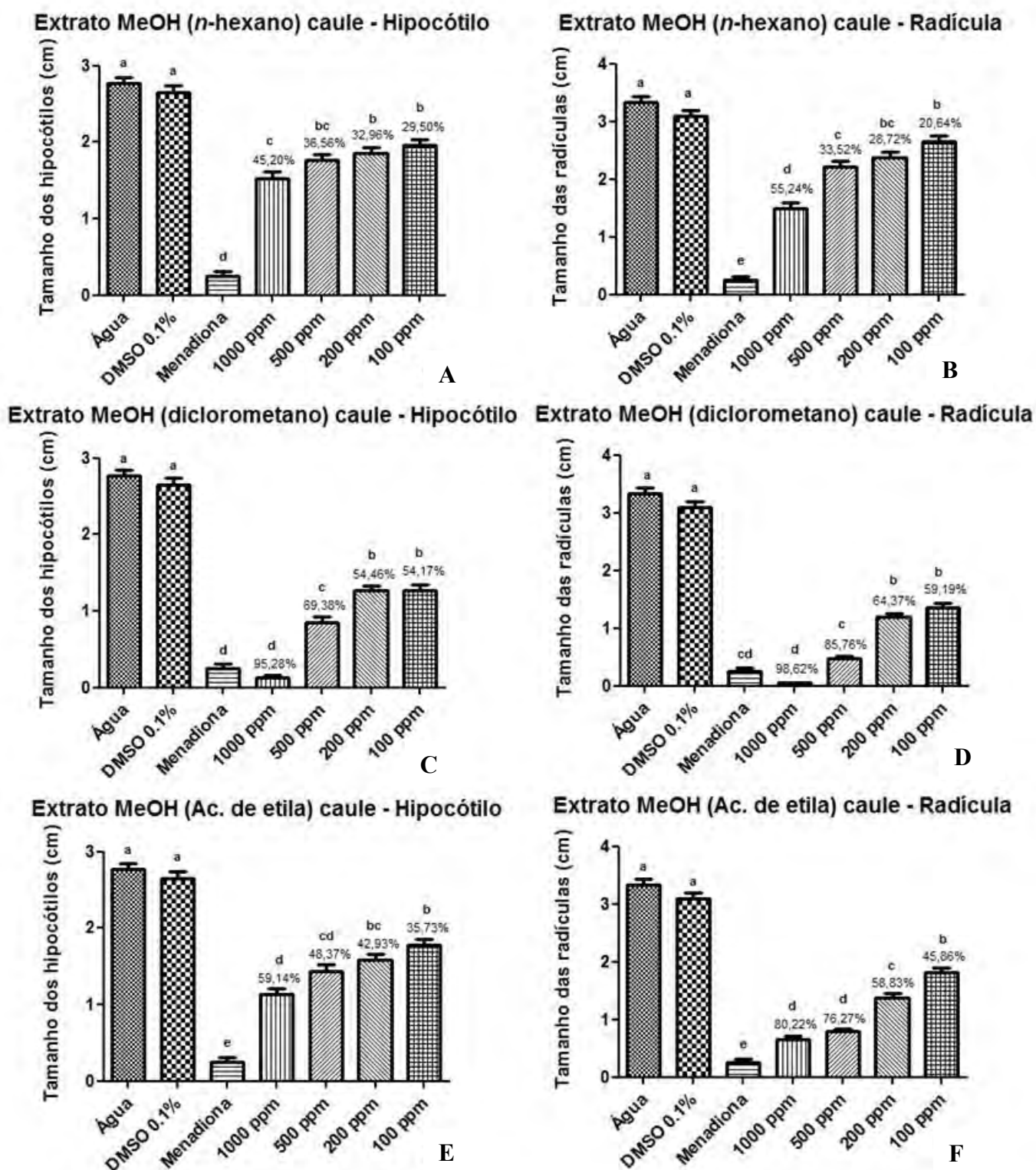
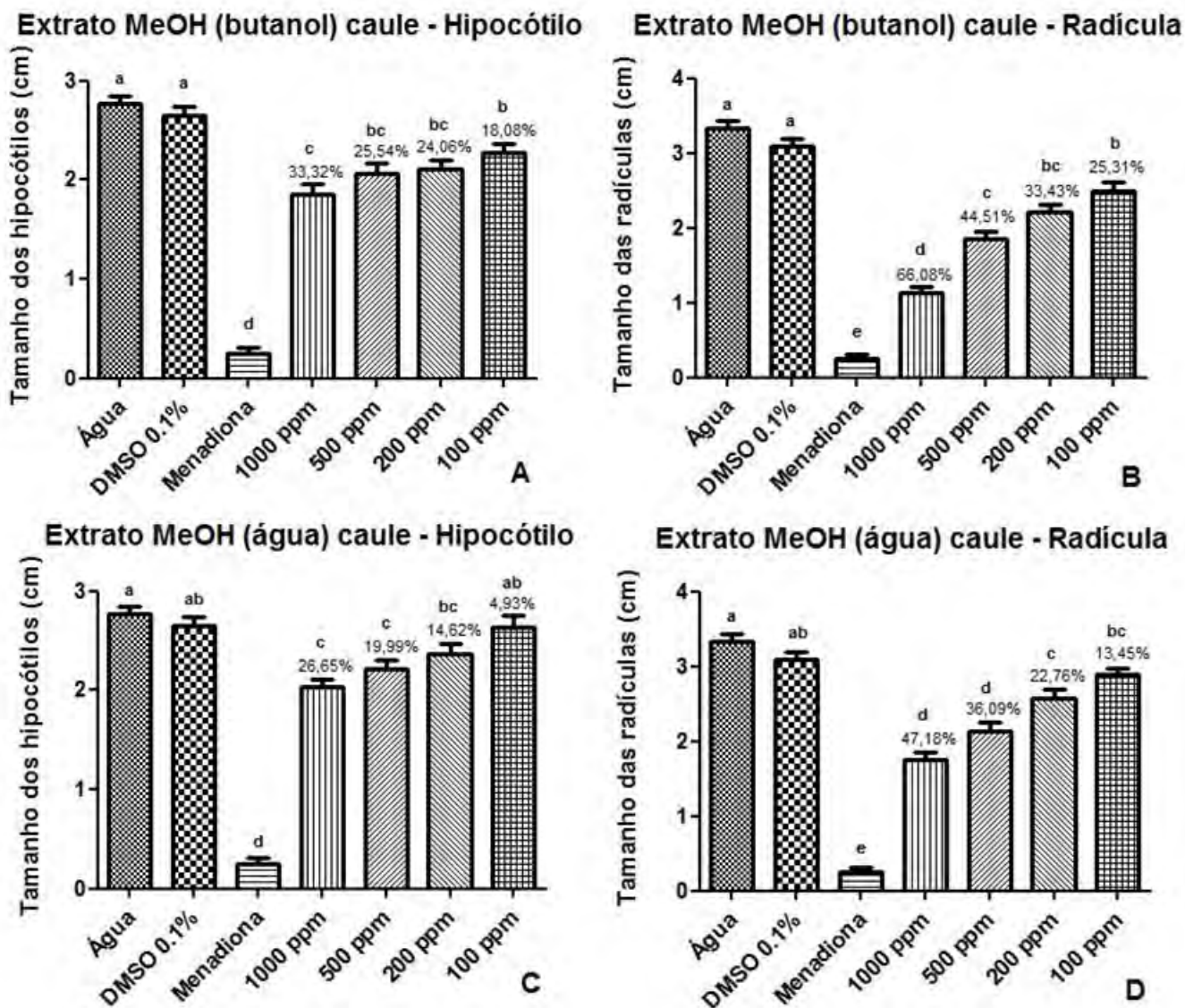


Figura 68 - Avaliação da atividade alelopática da partição butanólica sobre hipocótilos (A) e radículas (B) e resíduo aquoso sobre hipocótilos (C) e radículas (D) de caules de *Arachis repens* em *L. sativa*. Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão. A mesma letra indica não haver diferença significativa, valores de  $p \leq 0,05$ , pelo teste de Tukey-Kramer.



#### 4.8.2 Atividade alelopática das partições do extrato metanólico das folhas de *A. repens*

Foram testadas as partições orgânicas e o resíduo aquoso do extrato metanólico de folhas de *A. repens* nas mesmas concentrações determinadas anteriormente com os extratos brutos (100, 200, 500 e 1.000 ppm).

Nenhuma das partições apresentou efeito sobre a germinação nas concentrações testadas, mantendo os mesmos níveis de germinação do controle sem tratamento.

Comparando-se os efeitos aleloquímicos de inibição do crescimento de hipocótilos e radículas, verificamos que, exceto na partição hexânica, as raízes possuem maior sensibilidade à presença de substâncias alelopáticas em relação aos hipocótilos. Geralmente a radícula, assim como nas partições de extrato metanólico do caule, demonstrou ser mais sensível em relação aos hipocótilos (Figura 69 e 70).

Observou-se importante efeito de inibição do crescimento de hipocótilos e das raízes principalmente nas partições orgânicas em diclorometano e em acetato de etila, alcançando níveis de inibição de 89,44% na partição diclorometânica (1.000 ppm) sobre as radículas e 71,82% sobre os hipocótilos e na partição em acetato de etila, também a 1.000 ppm, de 68,18% de inibição do crescimento das radículas e 45,74% nos hipocótilos (Figura 69).

Assim como nas partições do extrato metanólico do caule, nas partições de folhas também não foram observadas nenhuma anormalidade morfológica, como oxidação dos ápices e ausência de pêlos absorventes, tanto nos hipocótilos como nas radículas de *L. sativa*. Os efeitos alelopáticos decaíam conforme as concentrações foram diminuindo. Valores de concentração inibitória 50% (CI<sub>50</sub>) para as partições dos extratos brutos em metanol são demonstrados na tabela 20.

Dentre a partição diclorometânica de caules e de folhas, os valores de CI<sub>50</sub> determinados foram melhores para os caules, que apresentaram valores entre 90,7 e 93,4 ppm enquanto que nas folhas foi entre 96,5 e 187,1ppm (Tabela 21). Apesar da melhor atividade alelopática, inibidora do crescimento de *L. sativa*, esta partição apresentou rendimentos massa seca abaixo de 2,6%, o que inviabilizou o estudo de fracionamento da partição.

Entretanto, as partições em acetato de etila e butanólica de folhas, apesar de a atividade alelopática ser inferior (CI<sub>50</sub> entre 109,0 – 1236,0 ppm) à partição diclorometânica (Tabela 21), ambas apresentaram maiores rendimentos de massa de 7,0 e 39,0 %, respectivamente, o que direcionou para o fracionamento cromatográfico destas e posterior avaliação da atividade alelopática.

Figura 69 – Avaliação da atividade alelopática da partição n-hexano sobre hipocótilos (A) e radículas (B) diclorometano sobre hipocótilos (C) e radículas (D) e acetato de etila sobre hipocótilos (E) e radículas (F) de folhas de *Arachis repens* em *L. sativa*. Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão. A mesma letra indica não haver diferença significativa, valores de  $p \leq 0,05$ , pelo teste de Tukey-Kramer.

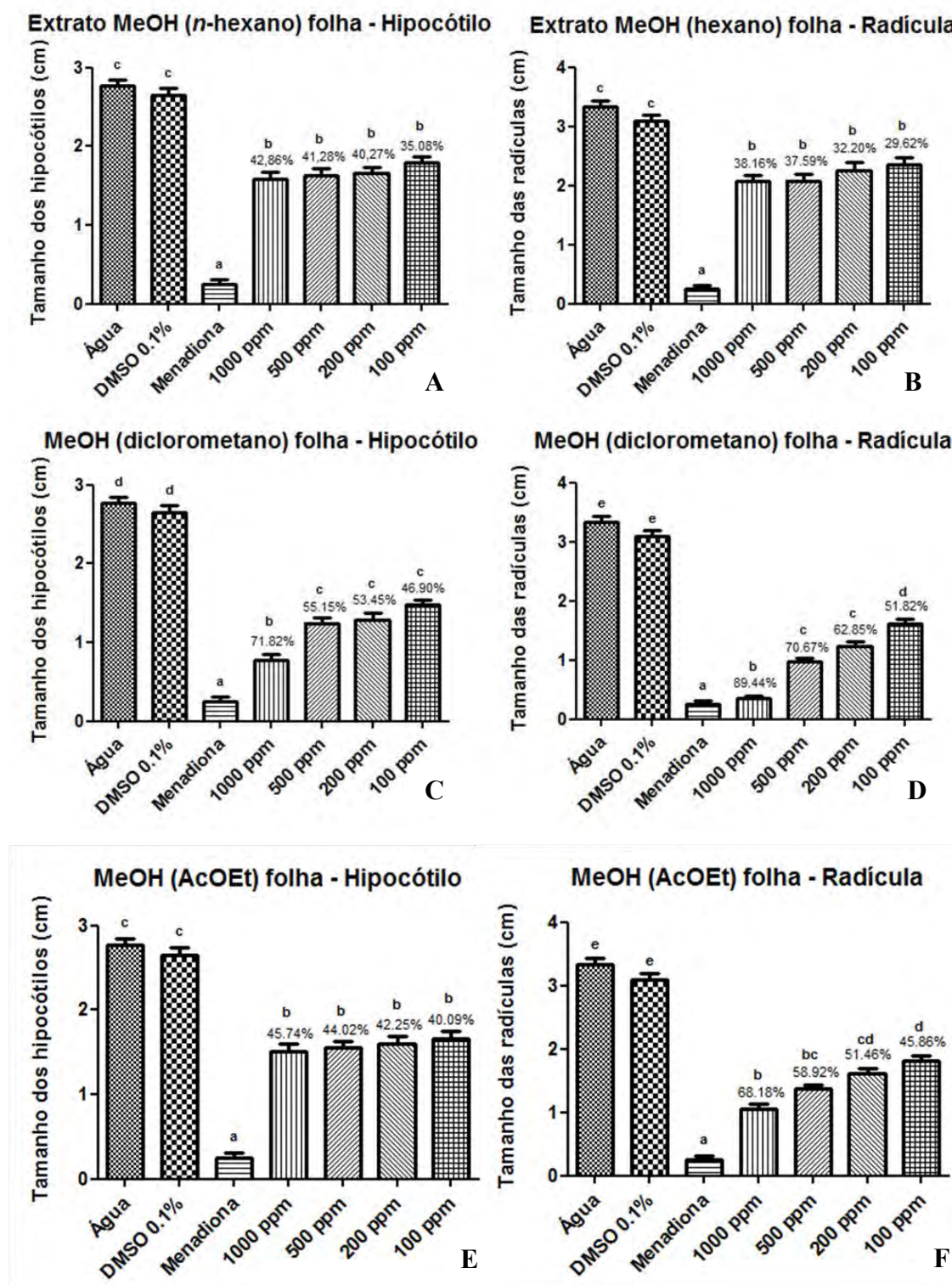


Figura 70 – Avaliação da atividade alelopática da partição butanólica sobre hipocótilos (A) e radículas (B) e resíduo aquoso sobre hipocótilos (C) e radículas (D) de folhas de *Arachis repens* em *L. sativa*. Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão. A mesma letra indica não haver diferença significativa, valores de  $p \leq 0,05$ , pelo teste de Tukey-Kramer.

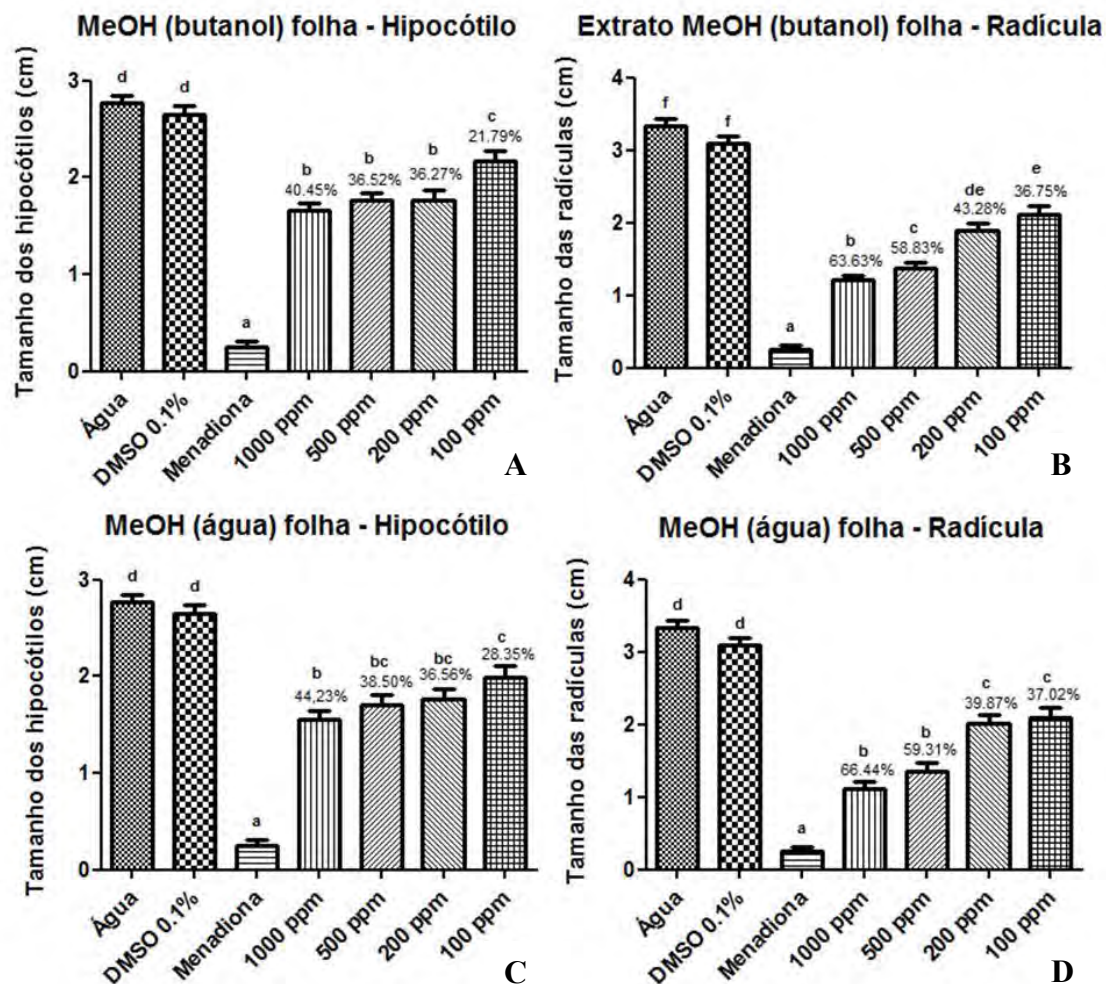


Tabela 20 - Valores de concentração inibitória de 50% (CI<sub>50</sub>) para as partições dos extratos brutos em metanol.

Partição		CI <sub>50</sub> (ppm)	
n-Hexano	Folha	Hipocótilo	1166.58
		Radícula	1310.27
	Caule	Hipocótilo	1106.19
		Radícula	905.14
Diclorometano	Folha	Hipocótilo	187.09
		Radícula	96.48
	Caule	Hipocótilo	90.73
		Radícula	93.42
AcOEt	Folha	Hipocótilo	1093.13
		Radícula	194.32
	Caule	Hipocótilo	516.84
		Radícula	109.02
Butanol	Folha	Hipocótilo	1236.09
		Radícula	424.95
	Caule	Hipocótilo	1500.60
		Radícula	561.67
Aquoso	Folha	Hipocótilo	1130.45
		Radícula	421.51
	Caule	Hipocótilo	1876.17
		Radícula	1059.77

4.8.2.1 Fracionamento biomonitorado da partição em acetato de etila das folhas de *A. repens* em coluna Sephadex LH-20.

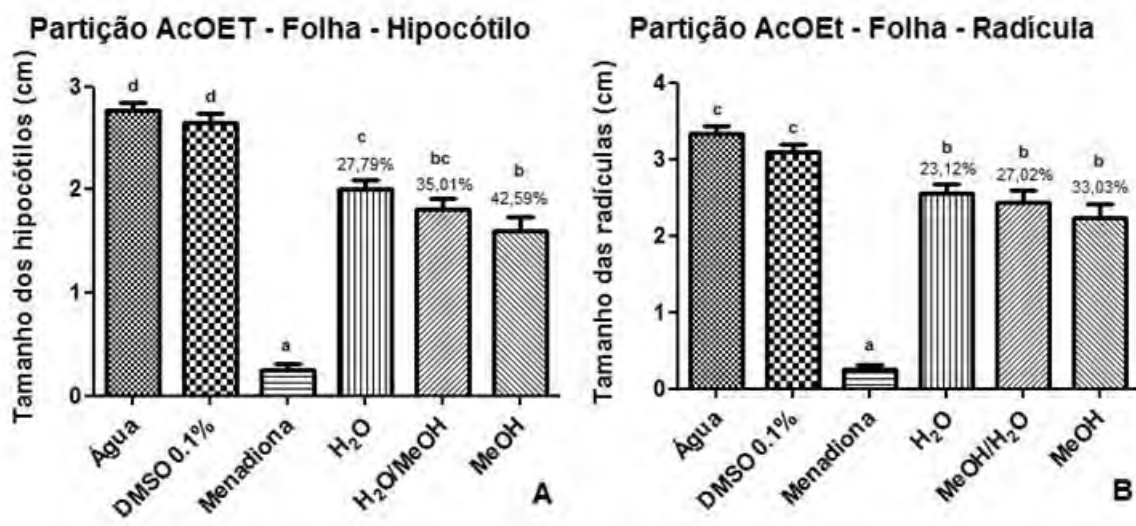
As três frações obtidas, a partir do fracionamento cromatográfico da partição em acetato de etila, apresentaram rendimentos em massa superiores a 11% (Tabela 22). As frações, foram avaliadas quanto a atividade alelopática em *L. sativa* na concentração de 194 ppm, que foi previamente estabelecida para inibição de raízes, na partição em acetato de etila de folhas (Figura 71).

Tabela 21 – Rendimento das frações da partição acetato de etila de folhas *A. repens* em coluna Sephadex LH-20 dos extratos metanólicos bruto.

Frações	Proporção (%)	Massa (mg)	Rendimento (%)
H <sub>2</sub> O	100	130	70,27
H <sub>2</sub> O/MeOH	50/50	29,2	15,78
MeOH	100	21,8	11,78



Figura 71 – Avaliação da atividade alelopática das frações da partição em AcOEt do extrato metanólico de folhas de *A. repens* sobre hipocótilos (A) e radículas (B) em *L. sativa* à 194 ppm. Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão. A mesma letra indica não haver diferença significativa, valores de  $p \leq 0,05$ , pelo teste de Tukey-Kramer.



A fração metanólica inibiu a germinação das sementes em 35,55%, ou seja, a percentagem de germinação foi diferente do controle sem tratamento. Conforme a polaridade do solvente aumentava a percentagem de inibição da germinação diminuía, chegando a 8,88% na fração aquosa (Tabela 23).

Tabela 22 – Avaliação do efeito da inibição na germinação de sementes de *L. sativa* das partições do extrato metanólico de folhas de *A. repens*.

Partição Butanol Folhas	
H <sub>2</sub> O/MeOH	% de inibição
100/0	21,11
75/25	15,55
50/50	17,77
25/75	14,44
0/100	5,55
Partição AcOEt Folhas	
100/0	8,88
50/50	23,33
0/100	35,55

Comparando-se o efeito alelopático em hipocótilos e radículas, observa-se que os hipocótilos são mais sensíveis à presença de substâncias com efeito alelopático. Conforme a polaridade foi diminuindo a percentagem de inibição do crescimento aumentou, variando de 27,79% (fração H<sub>2</sub>O) a 42,59% (fração MeOH) em hipocótilos e 23,12% (fração H<sub>2</sub>O) a 33,03% (fração MeOH) em radículas. Nas radículas não foram observadas diferenças estatísticas significativas, diferentemente dos hipocótilos, onde a fração metanólica foi considerada a mais ativa apresentando um percentual de 42,6% de inibição (Figura 71).

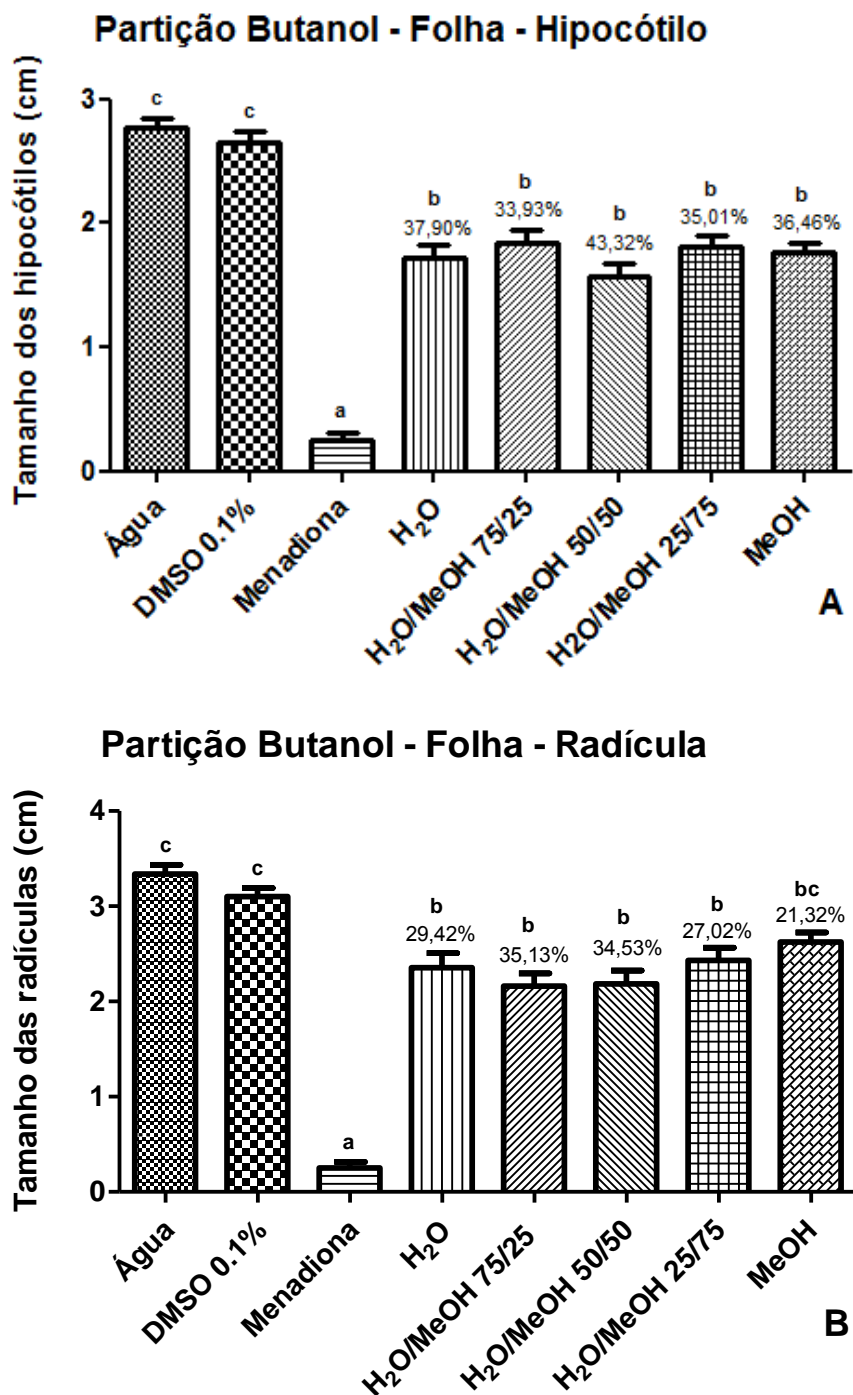
#### 4.8.2.2 Fracionamento biomonitorado da partição em butanol das folhas de *A. repens* em coluna Sephadex LH-20.

A partição em butanol foi fracionada gerando 5 frações distintas como H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O/MeOH (nas proporções 75:25, 50:50, 25:75) e a fração MeOH. As cinco frações obtidas apresentaram rendimentos em massa diversos que variou de 1,63 a 44,7% (Tabela 24). Estas frações foram avaliadas quanto a atividade alelopática em *L. sativa* na concentração de 424 ppm, que foi previamente estabelecida para inibição de raízes, na partição em butanol de folhas (Figura 72).

Tabela 23 – Rendimento das frações da partição butanólica de folhas *A. repens* em coluna Sephadex LH-20 dos extratos metanólicos bruto.

Frações H <sub>2</sub> O/MeOH	Massa (mg)	Rendimento (%)
100/0	0,892	44,7
75/25	0,338	16,94
50/50	0,032	1,63
25/75	0,040	2,0
0/100	0,180	9,0

Figura 72 – Avaliação da atividade alelopática das frações da partição butanólica do extrato metanólico de folhas de *A. repens* sobre hipocótilos (A) e radículas (B) em *L. sativa* à 424 ppm. Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão. A mesma letra indica não haver diferença significativa, valores de  $p \leq 0,05$ , pelo teste de Tukey-Kramer.



A fração aquosa inibiu a germinação das sementes em 21,11%, ou seja, a porcentagem de germinação foi diferente do controle sem tratamento. Conforme a polaridade do solvente diminuía a porcentagem de inibição da germinação também diminuía, chegando a 5,55% na fração metanólica (Tabela 23).

Comparando-se o efeito alelopático em hipocótilos e radículas, observa-se que os hipocótilos são mais sensíveis à presença de substâncias com efeito alelopático. Todas as frações testadas apresentaram percentuais de inibição de hipocótilos entre 36 a 43% e de raízes entre 21 a 35%. Dentre estas, destaca-se a fração hidrometanólica (50:50) que foi a que apresentou a maior taxa de inibição de hipocótilos (43%), nas raízes esta fração inibiu o crescimento em 34%, (Figura 72).

#### 4.8.3 Avaliação da atividade antioxidante em DPPH das frações das partições em AcOEt e Butanol dos extratos brutos de folhas de *A. repens*.

As partições foram avaliadas quanto a atividade antioxidante pelo potencial de captura do radical DPPH, na concentração de 700µg/mL.

Os resultados da atividade antioxidante estão apresentados na tabela 24. Verifica-se que houve atividade antioxidante em todas as amostras testadas, com grandes variações entre as diferentes frações. Foi observado o maior percentual de captura do radical DPPH na fração H<sub>2</sub>O (86,81%), enquanto que o menor percentual de atividade antioxidante (14,49%) ocorreu na fração MeOH, dentre as frações obtidas a partir da partição em acetato de etila.

Quando comparou-se a atividade antioxidante das frações da partição butanólica, observou-se que não houve um padrão de porcentagem de captura do radical DPPH, em relação a polaridade das amostras. Dentre as diferentes frações, a que obteve o maior potencial de atividade antioxidante foi a fração em MeOH com 93,18% de atividade antioxidante e na fração H<sub>2</sub>O/MeOH (75/25) foi observado 28% de atividade, o menor potencial (Tabela 25).

Tabela 24 – Avaliação da atividade antioxidante das partições em AcOEt e Butanol proveniente dos extratos brutos metanólicos de folhas de *A. repens* pela captura do radical DPPH.

Partição AcOEt	
H <sub>2</sub> O/MeOH	% de AA
100/0	86,81
50/50	79,00
0/100	14,49
Partição Butanol	
100/0	48,62
75/25	28,87
50/50	65,03
25/75	84,61
0/100	93,18

#### 4.8.4 Avaliação do teor de fenóis totais das frações das partições em AcOEt e em butanol proveniente do extrato metanólico bruto das folhas de *A. repens*.

Pelos resultados obtidos na Tabela 25 observou-se que a fração H<sub>2</sub>O/MeOH (25/75), proveniente da partição butanólica, apresentou a maior concentração de compostos fenólicos (3,79 mg/g). Nas frações provenientes da partição em acetato de etila, a fração hidrometanólica apresentou a maior concentração (3,5 mg/g) de fenólicos.

Tabela 25 - Conteúdo de fenóis totais das frações das partições em AcOEt e Butanólica do extrato metanólico de folhas de *A. repens*.

Fração H <sub>2</sub> O/MeOH	EAG (mg/g)
Partição AcOEt	
100/0	2,93
50/50	3,50
0/100	2,29
Partição butanólica	
100/0	2,33
75/25	3,15
50/50	2,93
25/75	3,79
0/100	2,44

#### 4.8.5 Avaliação do efeito alelopáticos dos fitosteróis $\beta$ -sitosterol e Stigmasterol.

Os efeitos alelopáticos dos padrões dos fitosteróis  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol, ressolubilizados em diferentes concentrações (200, 150, 100 e 50 ppm) se mostraram ativos quanto atividade alelopática em *L. sativa*. A figura 73 ilustra os efeitos destes padrões sobre o crescimento dos hipocótilos e das radículas e tabela 26 a avaliação da porcentagem de inibição da germinação de sementes.

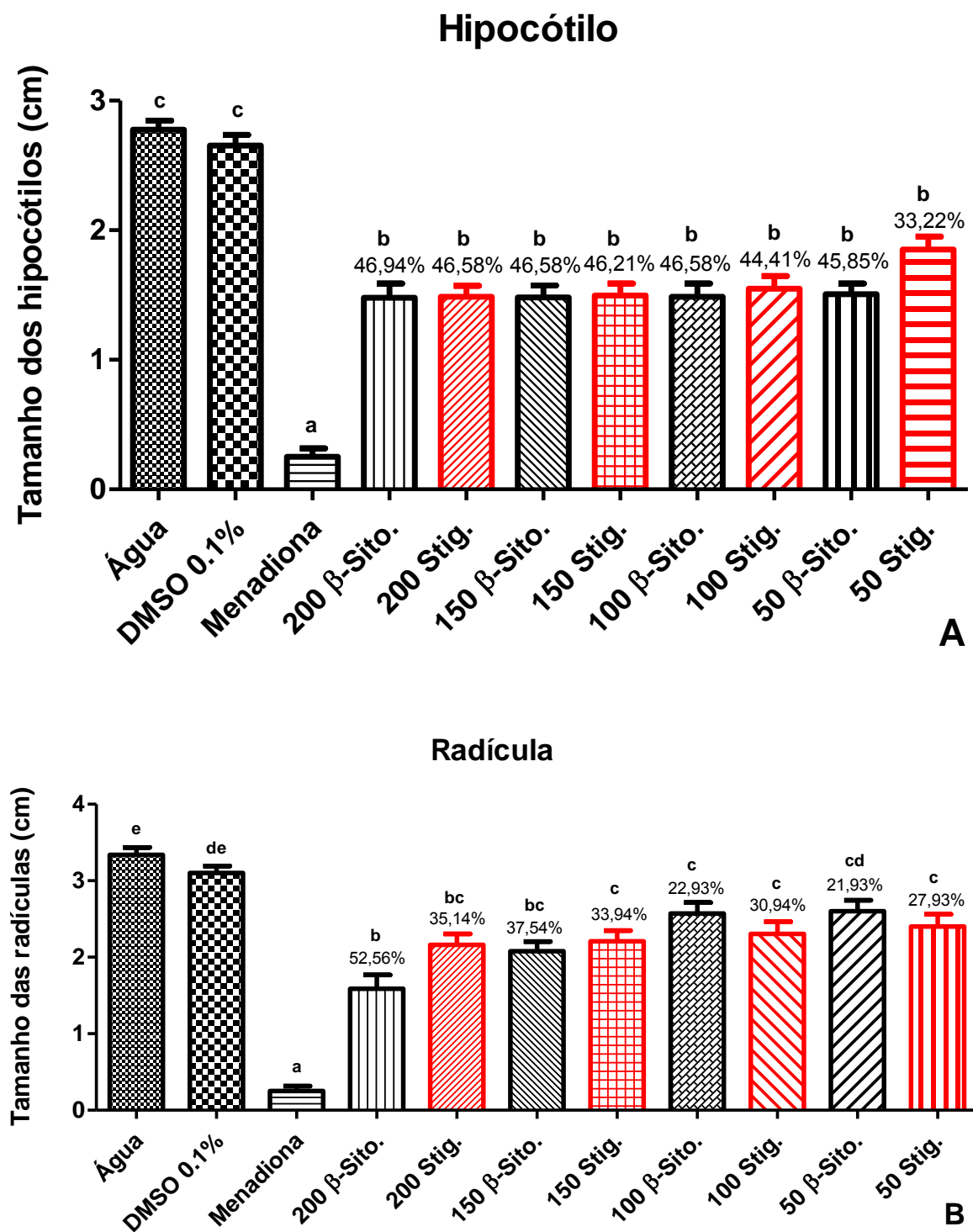
Comparando-se o efeito alelopático em hipocótilos e radículas, observa-se que os hipocótilos, em geral, foram mais sensíveis à presença dos padrões de fitosteróis, apresentando as porcentagens de inibição variando 46,94% (200 ppm) a 45,85 % (50 ppm) para  $\beta$ -sitosterol e de 46,58% (200 ppm) a 33,22% (50 ppm) para estigmasterol. Nas radículas o  $\beta$ -sitosterol (200 ppm) foi considerado o mais ativo, com 52,56% de inibição do crescimento. Não foi observada diferença estatística significativa para os hipocótilos, nas diferentes concentrações de padrões testados e para as radículas, as concentrações de 200 e 150 ppm foram consideradas as que proporcionaram a maior redução do tamanho (Figura 73).

Quanto a avaliação da porcentagem de inibição da germinação em sementes de *L. sativa* dos padrões avaliados, o padrão de  $\beta$ -sitosterol a 200 ppm inibiu 50% das radículas, obtendo a maior porcentagem de inibição dentre as diferentes concentrações testadas. O estigmasterol, na maior concentração de 200 ppm, inibiu 30% da germinação. Ambos os padrões apresentaram uma diminuição da inibição de acordo com a diminuição das concentrações (Tabela 26).

Tabela 26 – Avaliação da porcentagem de inibição da germinação em sementes de *L. sativa* dos padrões  $\beta$ -sitosterol e Stigmasterol.

$\beta$ -sitosterol	
(ppm)	% inibição
200	50,00
150	20,00
100	16,66
50	16,66
Stigmasterol	
200	30,00
150	23,33
100	20,00
50	16,66

Figura 73 - Avaliação da atividade alelopática dos padrões de  $\beta$ -sitosterol e stigmasterol sobre hipocótilos (A) e radículas (B) em *L. sativa*. Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão. A mesma letra indica não haver diferença significativa, valores de  $p \leq 0,05$ , p, pelo teste de Tukey-Kramer.



#### 4.8.6 Bioensaios com sementes das espécies daninhas *Panicum maximum* e *Calopogonium mucunoides*.

O extrato metanólico bruto de folhas de *A. repens* foi testado em diferentes concentrações (1000, 500, 200 e 100 ppm) quanto a inibição do crescimento de hipocótilos e radículas das plantas daninhas *Panicum maximum* e *Calopogonium mucunoides* (Tabela 27).

O extrato metanólico de folhas de *A. repens* exerceu atividade inibidora do crescimento das ervas daninhas *Panicum maximum* e *Calopogonium mucunoides* nas concentrações entre 1000 e 100 ppm. Os resultados obtidos de inibição permitiram o cálculo da  $CI_{50}$  do extrato em cada uma das espécies daninhas. Ambas daninhas apresentaram maior sensibilidade nos hipocótilos, apresentando uma  $CI_{50}$  numa faixa de 93-169 ppm enquanto que as raízes necessitaram uma concentração maior do extrato, entre 518-581 ppm, para inibição (Tabela 27).

Tabela 27 - Avaliação da atividade alelopática de extratos metanólicos brutos de folhas de *A. repens* na inibição do crescimento de hipocótilos e radículas de *Panicum maximum* e *Calopogonium mucunoides*.

Espécie teste		Concentração de extrato metanólico de <i>A. repens</i> (ppm)		$IC_{50}$ (ppm)
			% de inibição	
<i>Panicum maximum</i>	hipocótilos	1000	71,42 <sup>a</sup>	93,23
		500	65,97 <sup>a</sup>	
		200	60,51 <sup>a</sup>	
		100	51,42 <sup>a</sup>	
	radícula	1000	62,61 <sup>a</sup>	581,53
		500	42,99 <sup>a</sup>	
		200	42,05 <sup>a</sup>	
		100	36,44 <sup>a</sup>	
<i>Calopogonium mucunoides</i>	hipocótilo	1000	79,02 <sup>ab</sup>	169,03
		500	73,22 <sup>ab</sup>	
		200	59,16 <sup>bc</sup>	
		100	40,02 <sup>c</sup>	
	radícula	1000	66,12 <sup>a</sup>	518,99
		500	48,17 <sup>ab</sup>	
		200	28,38 <sup>ab</sup>	
		100	23,64 <sup>b</sup>	

#### 4.9 Análise da partição em diclorometano do extrato metanólico de caules (EMC) e folhas (EMF) de *Arachis repens* por CG-EM



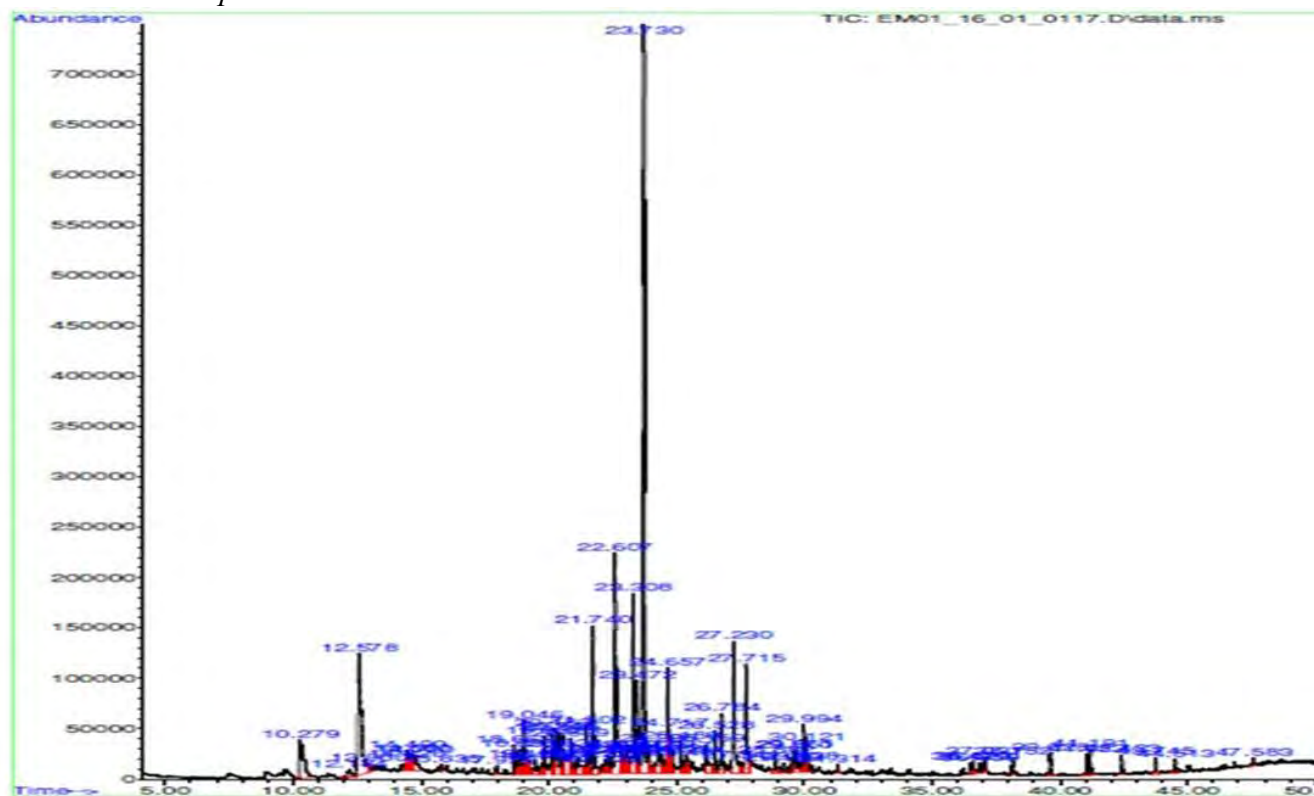
A seguir é apresentado o perfil cromatográfico da partição em diclorometano oriunda do EMC. Os espectros de massas de cada um dos picos detectados e as suas correspondentes identificações, sugestivas da biblioteca NIST (Tabela 28), encontram-se sequencialmente apresentadas após o cromatograma (Figura 74).

Após a análise do cromatograma apresentado na figura 74, destacaram-se como constituintes principais o *p*-vinilguaiaicol (7,53 %) como representante da classe dos fenólicos, loliolideo (4,33 %) como nor-isoprenóide, cinamato e ferulato de metilas (0,67-0,56 %) como fenilpropanóides e ácido palmítico (3,75 %) como representante dos ácidos graxos.

Tabela 28 - Substâncias identificadas na partição em diclorometano do extrato metanólico de caules de *A. repens* e seus respectivos índices de similaridades (IS), tempo de retenção (TR), área relativa do pico (área), pico base (PB), fórmula molecular (FM) e massa.

<b>Substância</b>	<b>I.S. (%)</b>	<b>T.R (min.)</b>	<b>Área (%)</b>	<b>P.B. (m/z)</b>	<b>F.M.</b>	<b>M.M.</b>
<i>p</i> -Vinil-guaiacol	91	12,57	7,53	150,1	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	150,1
ácido salicílico	80	12,95	0,37	120,0	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> COOH	122,1
2-metilisoborneol	35	19,15	0,46	95,2	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O	168,7
3-hidroxi- $\beta$ -damascone	87	19,83	0,82	69,1	C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	208,3
3-oxo- $\alpha$ -ionol	96	20,52	0,98	108,1	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub>	96,1
siringaldeído	95	20,83	1,48	182,1	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O	106,1
<i>trans</i> - $\beta$ -ionona-5,6-epóxido	59	21,49	1,16	123,1	C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	208,2
diidro- $\alpha$ -ionona	30	22,33	0,61	43,1	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> O	192,2
<i>p</i> -hidroxi-cinamato de metila	38	23,06	0,67	93,1	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	178,1
loliolideo	98	23,30	4,33	111,1	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	196,2
$\beta$ -asarona	70	24,71	1,36	208,1	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	208,2
ferulato de metila	50	25,39	0,56	43,1	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	208,2
palmítato de metila	93	26,53	1,10	74,1	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	256,4
ácido palmítico	99	27,22	3,75	73,1	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	256,4
$\alpha$ -asarona	58	27,54	0,45	208,1	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	208,2
1-heptadecano	91	29,57	0,66	43,1	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> CH=CH <sub>2</sub>	238,4
esqualeno	64	41,19	0,56	69,1	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub>	410,7

Figura 74 - Perfil cromatográfico da partição em diclorometano do extrato metanólico do caule de *A. repens*.



A seguir é apresentado o perfil cromatográfico da partição em diclorometano oriunda do EMF. Os espectros de massas de cada um dos picos detectados e as suas correspondentes identificações, sugestivas da biblioteca NIST (Tabela 29), encontram-se sequencialmente apresentadas após o cromatograma (Figura 75).

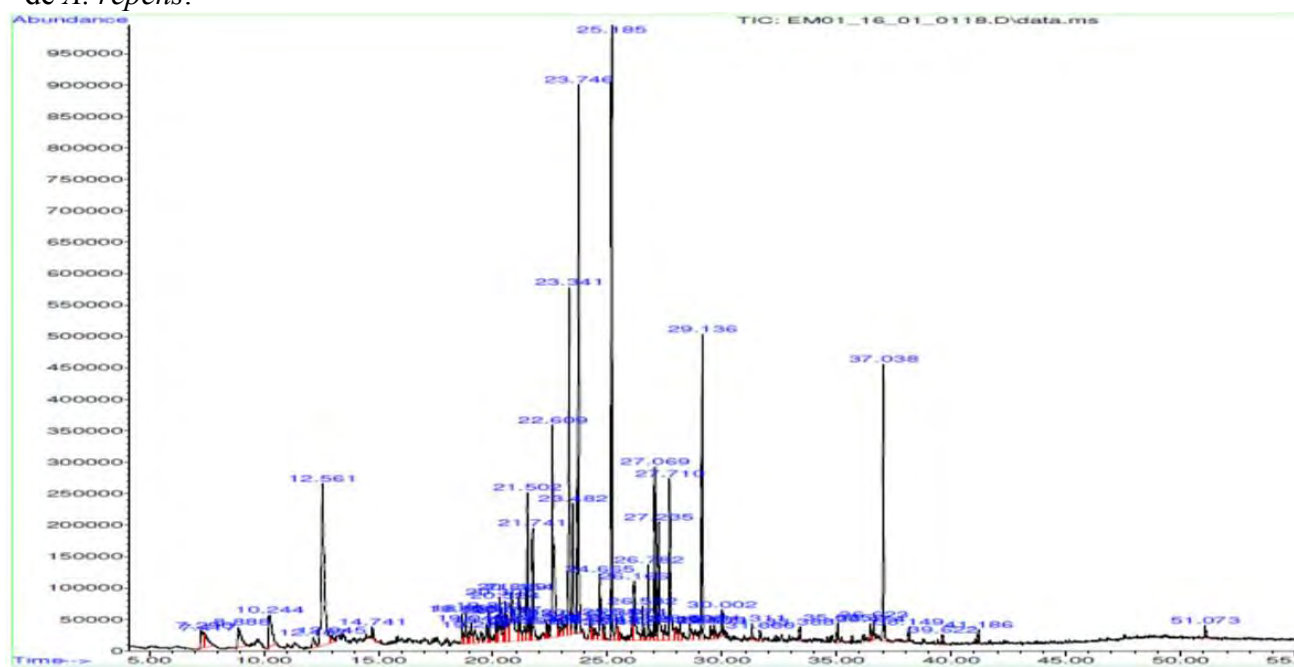
Após a análise do cromatograma apresentado na figura 102, destacaram-se como constituintes principais o ácido salicílico (3,35 %) como representante da classe dos fenólicos e vomifoliol (11,11 %) como nor-isoprenóide.

As mesmas classes de substâncias majoritárias do EMF, fenólicos e nor-isoprenóides, foram no EMC.

Tabela 29 - Substâncias identificadas na partição em diclorometano do extrato metanólico de folhas de *A. repens* e seus respectivos índices de similaridades (IS), tempo de retenção (TR), área relativa do pico (área), pico base (PB), fórmula molecular (FM) e massa.

Substância	I.S. (%)	T.R. (min.)	Área (%)	P.B. (m/z)	F.M.	M.M.
4-vinilfenol	91	10,24	1,68	120,1	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O	120,1
Ácido salicílico	92	13,00	3,35	120,1	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> COOH	122,1
3-oxo-alfa-ionol	90	20,52	0,82	108,1	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub>	96,1
siringaldeído	90	20,81	2,75	182,1	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O	106,1
<i>p</i> -hidroxi-cinamato de metila	46	23,01	0,55	147,1	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	178,1
Loliolídeo	96	23,34	6.65	111,10	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	196,2
vomifoliol	50	23,74	11.11	124,1	C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub>	224,2
$\alpha$ -asarona	94	27,52	0.51	208,1	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	208,2

Figura 75 – Perfil cromatográfico da partição em diclorometano do extrato metanólico de folhas de *A. repens*.



#### 4.10 Atividade imunomoduladora

Extratos brutos do material *in vivo* de *Arachis repens* e partições do extrato metanólico foram avaliados quanto a capacidade de modular o processo inflamatório frente ao NO e TNF- $\alpha$ , assim como a sua citotoxicidade.

Para estudar o perfil imunofarmacológico dos extratos da espécie selecionada, utilizou-se como modelo: Macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 e Fibroblastos murinos da linhagem L929 forma obtidos da *American Type Culture Collection* (ATCC).

A imunomodulação baseada na inibição da produção de NO e TNF- $\alpha$  foi avaliada em macrófagos RAW 264.7 estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) na concentração de 1  $\mu\text{g/mL}$  e tratados com as amostras nas concentrações de 0,8; 4; 20 e 100  $\mu\text{g/mL}$ .

A presença de doses crescentes dos extratos adicionados no momento da ativação resultou em uma redução na produção de NO em todos os extratos testados. Como pode ser observado na figura 76, dentre os melhores resultados apresentados, destacam-se a fração em acetato de etila (FR AcOEt) de folhas (100 $\mu\text{g/mL}$ ) que inibiu  $93,77 \pm 3,87\%$  e a fração em diclorometano de caules (FR DCM) (100 $\mu\text{g/mL}$ ) que inibiu  $95,22 \pm 8,84\%$  da produção de NO. A fração hexânica de folhas (FR HEX) à 100 $\mu\text{g/mL}$  também apresentou excelentes resultados, com inibição  $87,32 \pm 1,33\%$ , bem como o extrato bruto em diclorometano (EB DCM) que inibiu  $72,08 \pm 15,23\%$  à 100 $\mu\text{g/mL}$ . Quando observamos a concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ , os extratos metanólicos (FR DCM) obtiveram a maior inibição da produção de NO com  $49,62 \pm 3,52\%$  para os extratos de caules e  $52,95 \pm 16,68\%$  para os extratos de folhas.

Ao analisarmos a inibição da TNF- $\alpha$  (Figura 77), observamos que a fração aquosa do extrato metanólico das folhas (FR Aq - 4 $\mu\text{g/mL}$ ) e FR DCM (100 $\mu\text{g/mL}$ ) apresentaram as maiores taxas, com  $31,59 \pm 27,10\%$  e  $21,99 \pm 6,36\%$ . Quando ocorre um aumento na concentração do FR Aq há uma diminuição da porcentagem de inibição. Além destes, o extrato bruto hexano do caule apresentou  $35,63 \pm 17,91\%$  de inibição da TNF- $\alpha$ . Os extratos brutos e partições do caule obtiveram uma porcentagem de inibição menor que as folhas, com exceção para o EB HEX, que se destacou, em diversos extratos não foi possível observar atividade inibitória. Os extratos EB HEX, EB MeOH, FR DCM, na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$  obtiveram  $35,63 \pm 17,91\%$ ;  $18,64 \pm 11,14\%$ ;  $16,68 \pm 6,18\%$  de inibição, respectivamente (Figura 77).

Figura 76 - Avaliação da inibição da produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos RAW 264.7 na presença da espécie vegetal *Arachis repens*. (A) Extratos e frações das folhas e (B) Extratos e frações do Caule. As amostras foram avaliadas nas concentrações de 0,8, 4, 20e 100  $\mu\text{g/mL}$ . A concentração de nitrito no sobrenadante foi determinada usando como referência uma curva de nitrito de sódio. O percentual de inibição da produção de NO foi analisado através do método de Griess em comparação com os percentuais dos controles. Controle positivo da produção de NO: macrófagos estimulados com 1  $\mu\text{g/mL}$  de LPS e não tratados. Controle negativo: macrófagos não estimulados e não tratados. \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\* $P < 0,01$  e \* $P < 0,05$  diferença estatística quando comparado com o controle positivo (M $\Phi$  + LPS). Média aritmética  $\pm$  desvio padrão (n=3).

Experimento I – MO (macrófagos) – Gráfico Inibição da Produção de Óxido Nítrico (NO) – Método de Griess

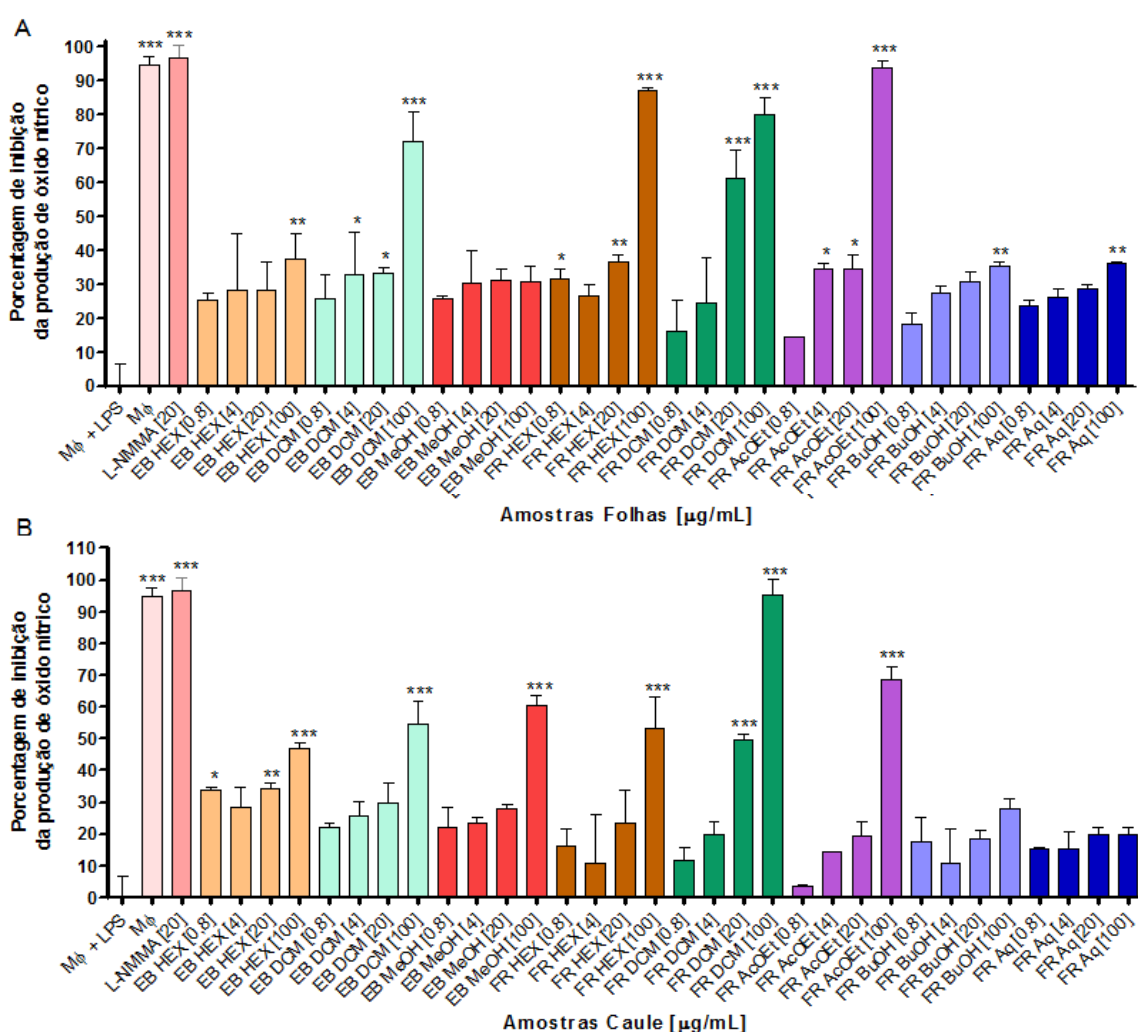
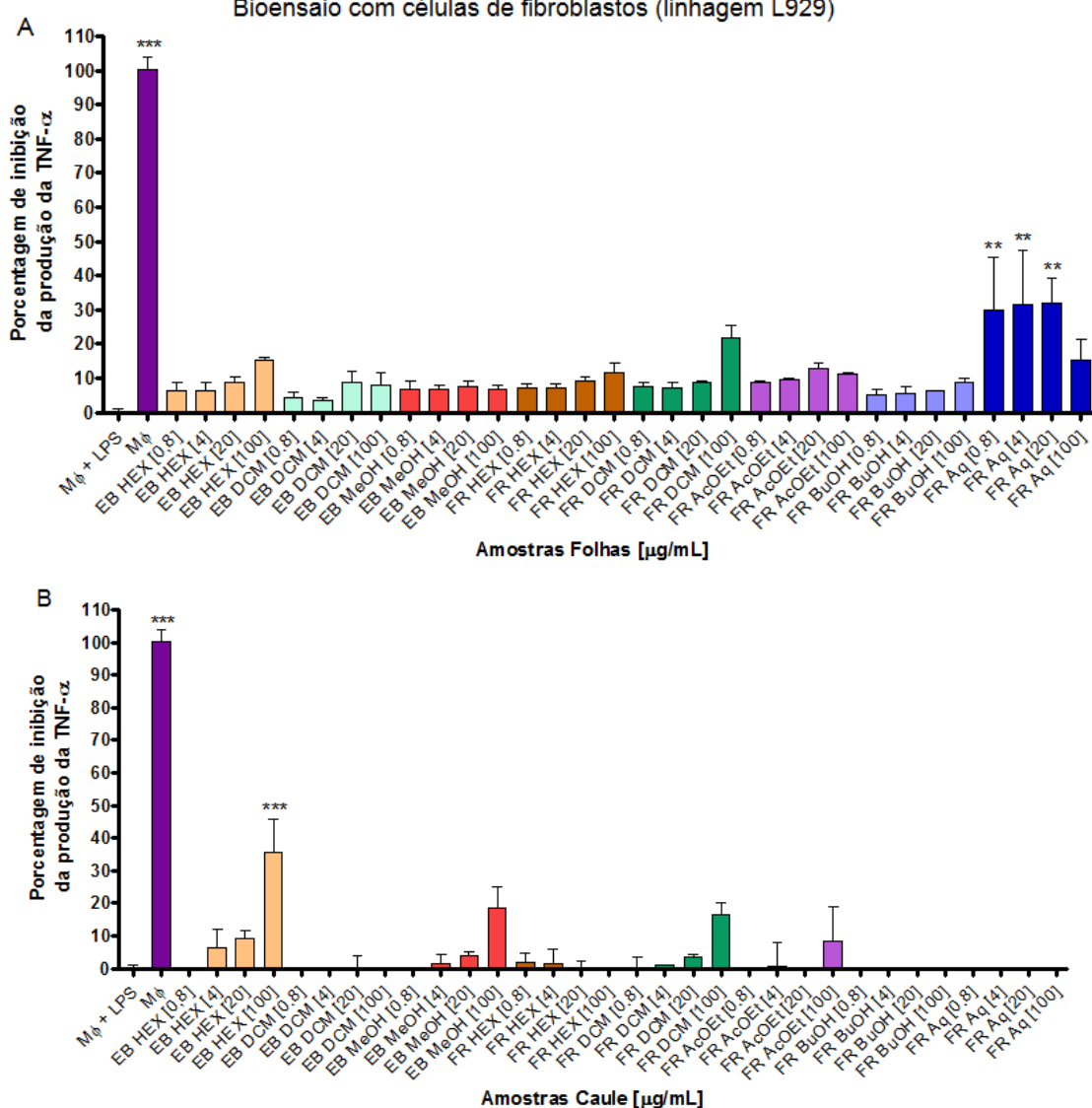


Figura 77 - Avaliação da inibição da produção da TNF- $\alpha$  em macrófagos RAW 264.7 na presença da espécie vegetal *Arachis repens*. (A) Extratos e frações das folhas e (B) Extratos e frações do Caule. As amostras foram avaliadas nas concentrações de 0,8, 4, 20 e 100  $\mu\text{g/mL}$ . A produção da TNF- $\alpha$  foi estimada através do bioensaio com L929 (linhagem celular sensível a TNF- $\alpha$ ) através do método de MTT. A concentração da TNF- $\alpha$  no sobrenadante foi determinada usando como referência uma curva-padrão com TNF- $\alpha$  e o percentual de inibição foi comparado com os percentuais dos controles. Controle positivo da produção da TNF- $\alpha$ : macrófagos estimulados com 1  $\mu\text{g/mL}$  de LPS e não tratados. Controle negativo: macrófagos não estimulados e não tratados. \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\* $P < 0,01$  e \* $P < 0,05$  diferença estatística quando comparado com o controle positivo (M $\Phi$  + LPS). Média aritmética  $\pm$  desvio padrão (n=3).

Experimento I – MO (macrófagos) – Gráfico Inibição da Produção da TNF- $\alpha$  – Bioensaio com células de fibroblastos (linhagem L929)



O efeito citotóxico foi avaliado a partir do sobrenadante dos macrófagos murinos RAW 264.7 estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) na concentração de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e tratados com as amostras nas concentrações de 0,8; 4; 20 e 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

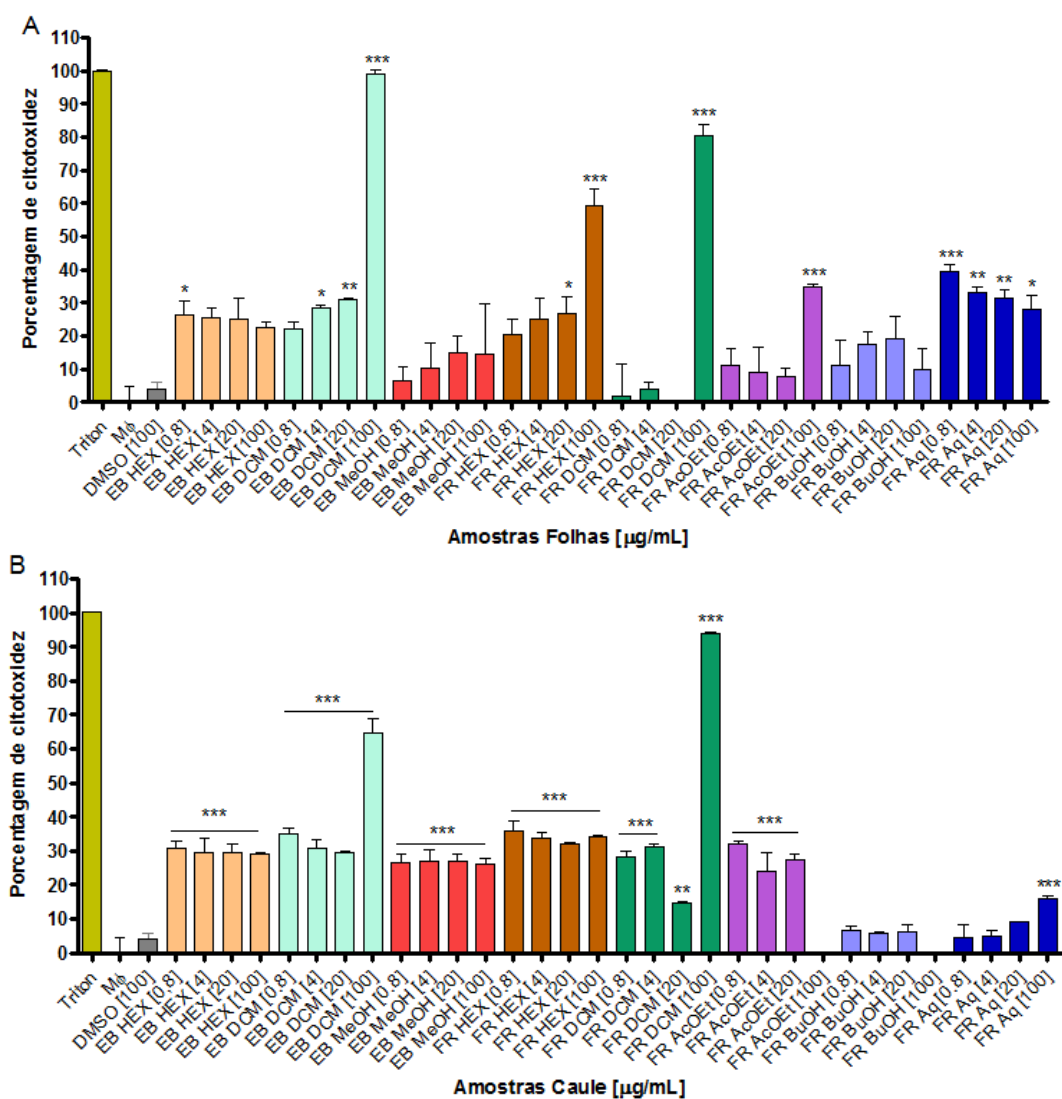
A análise do efeito citotóxico em macrófagos da linhagem RAW 264.7 mostrou que os extratos de folhas Eb DCM (extrato bruto em diclorometano) e FR DCM (fração em diclorometano) na concentração de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  obtiveram a maior taxa de citotoxicidade, com  $98,93 \pm 2,37\%$  e  $80,33 \pm 6,23\%$ , respectivamente. A análise do efeito citotóxico dos extratos de caules mostrou  $64,85 \pm 7,12\%$  para Eb DCM e  $93,99 \pm 0,57\%$ , também na concentração de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figura 78).

No entanto, não foram observados efeitos citotóxicos na fração em diclorometano (FR DCM) (extrato metanólico) dos extratos de folhas, na concentração de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Na avaliação dos extratos de caules, as frações em acetato de etila (FR AcOEt) e fração em butanol (FR BuOH), do extrato metanólico, não foram observados efeitos citotóxicos estatisticamente significativos quando comparado com o controle negativo, ambos testados na concentração de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figura 78).



Figura 78 - Efeito citotóxico em macrófagos RAW 264.7 na presença da espécie vegetal *Arachis repens*. (A) Extratos e frações das folhas e (B) Extratos e frações do Caule. As amostras foram avaliadas nas concentrações de 0,8, 4, 20 e 100  $\mu\text{g/mL}$ . O percentual de citotoxicidade foi analisado através do método com MTT em comparação com os percentuais dos controles. Controle positivo: macrófagos estimulados e tratados com Triton 1% (Lise total). Controle negativo: macrófagos não tratados (Viabilidade total). \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\* $P < 0,01$  e \* $P < 0,05$  diferença estatística quando comparado com o controle negativo. Média aritmética  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ).

Experimento I – MO (macrófagos) – Gráfico Efeito Citotóxico – MTT



## 5 DISCUSSÃO

### Morfogênese *in vitro*

O amendoim comestível é a espécie mais estudada do gênero, com diferentes substâncias descritas e associadas a efeitos benéficos à saúde humana (BALASUBAHINI *et al.*, 2003; ONO *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2007). Considerando o potencial para a produção de substâncias bioativas, e levando-se em conta a escassez de estudos envolvendo outras espécies do gênero, estudos correlatas à estas tornam-se extremamente relevantes.

A maioria dos trabalhos realizados com espécies do gênero *Arachis* tem relatado a ocorrência de organogênese a partir de explantes cultivados em meios suplementados com auxinas e/ou citocininas (BAJAJ *et al.*, 1981; BURTNİK e MROGINSKI, 1985; MCKENTLY *et al.*, 1991; CHENG *et al.*, 1992; CHENGALRAYAN *et al.*, 2001).

A indução de calogênese e organogênese indireta foram observadas neste trabalho, em cultura de segmentos nodais e internodais em meio suplementado com TDZ, nas diversas concentrações testadas (13,6 – 31,8  $\mu\text{M}$ ). Entretanto, vale ressaltar que a resposta ao TDZ varia de acordo com a espécie. Em *Cajanus cajan*, como exemplo, menores concentrações de TDZ induziram a formação de brotos e em concentrações mais elevadas houve uma mudança na via de regeneração, levando à formação de embriões somáticos (SINGH *et al.*, 2003). Por outro lado, em *Echinacea purpurea*, a mesma concentração de TDZ induziu dois tipos de respostas, embriogênese somática e organogênese (JONES *et al.*, 2007).

Geralmente, nos trabalhos de cultura de tecidos realizados com o gênero *Arachis*, ocorre à suplementação do meio de cultura com citocininas isoladas ou em combinação com auxinas, havendo a indução de organogênese (BAJAJ *et al.*, 1981; BURTNİK e MROGINSKI, 1985; MCKENTLY *et al.*, 1991; CHENG *et al.*, 1992; CHENGALRAYAN *et al.*, 2001). Além disso, os principais tipos de explantes utilizados são sementes, eixos embrionários, cotilédones ou hipocótilos. Outros estudos obtiveram a regeneração de plantas em algumas espécies de *Arachis* e, em outras leguminosas, usando apenas citocininas (GILL e OZIAS-AKINS, 1999; RADHAKRISHNAN *et al.*, 2000; SINGH *et al.*, 2003).

Além das condições de cultura e do tipo de explante, o genótipo desempenha um importante papel ao regulador de crescimento, na indução da resposta morfogênica (MROGINSKI *et al.*,

1981; MCKENTLY *et al.*, 1991.) e, pode explicar a diferença de respostas obtidas em várias espécies (BANERJEE *et al.*, 2007).

Muitas estratégias podem ser utilizadas para induzir ou aumentar a produção de metabólitos secundários (SHEPHERD, 1995). Em relação à elicitação das culturas *in vitro* foi observado neste trabalho que a elevação dos teores de resveratrol, após diferentes tempos de exposição ao ultrassom, ocorreu com o tempo de 5 min sem pós-tratamento. Sob esta melhor condição, observou-se um aumento no teor de resveratrol em até  $496,09 \pm 80,72$  %. Para os materiais *in vitro*, os valores em massa mais significativos ( $1,905 \pm 0,310$  mg/g) foram observados em calos derivados de segmentos nodais e intermodais em resposta a TDZ a  $13,6 \mu\text{M}$  elicitados por 5 minutos. De uma maneira geral, os maiores teores de resveratrol foram observados em extratos derivados de calos em meio suplementado com as menores concentrações de TDZ testadas.

O teor de resveratrol encontrado em calos de *A. repens* provenientes de meio MS suplementado com TDZ a  $13,6 \mu\text{M}$  é equivalente ao relatado na literatura para o gênero *Arachis*. Coodsey *et al.* (1988), Ku *et al.* (2005) e Yang *et al.* (2010), observaram teores de 4,3; 3,93 e 2,13  $\mu\text{g/g}$  de resveratrol, respectivamente, em culturas de calos de *A. hypogaea* elicitadas por microorganismos ou UV-C (Ultravioleta C). Estes mesmos autores não detectaram resveratrol em culturas não elicitadas.

Rudolf e Resurreccion (2005) observaram que a exposição ao ultrassom (US) causou um aumento significativo na concentração de resveratrol em amostras de *A. hypogaea* após 24 h de incubação no escuro. A maior quantidade de conteúdo de resveratrol ( $3,96 \mu\text{g/g}$ ) foi encontrada em grãos de amendoim em fatias tratadas com exposição ao US por 4 min e incubados por 36 h (RUDOLF e RESURRECCION, 2005). Do mesmo modo, o aumento da quantidade de resveratrol para  $0,32$ - $6,39 \mu\text{g/g}$  após exposição ao US, foi de 16 a 319 vezes superior aos controles (SALES e RESURRECCION, 2009). Tem sido relatado que o tratamento por US provoca um aumento rápido na atividade enzimática da PAL (*phenylalanine amonium liase*), que é a principal enzima responsável pela desaminação da fenilalanina para a biossíntese de resveratrol. A biossíntese do *trans*-resveratrol parte de uma molécula de *p*-cumaril-CoA e três moléculas de malonil-CoA, formando uma molécula instável que pode formar chalcona ou resveratrol em presença das enzimas chalcona sintase e estilbeno sintase, respectivamente (SOLEAS *et al.*, 1997; WU e LIN, 2002). Assim, o aumento do teor de resveratrol pode ser atribuído a maior expressão de PAL devido à exposição ao tratamento por US (HASAN *et al.*, 2013).

Avaliou-se neste trabalho o conteúdo de fenóis totais encontrado em extratos metanólicos de folhas de plantas *in vivo* de *A. repens*. Os resultados mostraram valores em equivalência de  $356,17 \pm 1,36 \mu\text{g}$  de ácido gálico/mg de extrato (EAG/mg extrato), o qual pode ser considerado alto quando

comparado com teores relatados em trabalhos com outros gêneros. Sarkar *et al.* (2009) observaram valores de EAG em torno de 91,47 µg de ácido gálico/mg de extrato de *Spondias pinnata*. Além disso, Sousa *et al.* (2007) encontraram valores de 45,82; 66,14; 38,70 e 11,55 mg de EAG/g de material vegetal em espécies dos gêneros *Terminalia*, *Cenostigmata*, *Qualea* e *Copernia*, respectivamente. Já em trabalhos realizados por Camargo *et al.* (2008) com duas cultivares de *A. hypogaea* (IAC-Tatu ST e IAC-Runner 886), foram determinados teores de compostos fenólicos totais de  $33,27 \pm 0,3$  e  $51,59 \pm 7,1$  mg.g<sup>-1</sup> de extrato, respectivamente.

Além da avaliação de produção de polifenóis em extratos de *A. repens*, a capacidade de redução do radical DPPH também foi avaliada neste trabalho pela primeira vez, a fim de se estabelecer uma possível correlação entre a produção de polifenóis totais e a atividade antioxidante. Os extratos preparados a partir de folhas de plantas *in vivo* apresentaram poder redutor de até 70,95 ± 0,83%, assemelhando-se aos resultados descritos para *A. hypogaea* (YEN e DUH, 1995; NEPOTE *et al.*, 2002), onde foram obtidos valores de inibição do radical DPPH em torno de 90%. Nos trabalhos realizados por Camargo *et al.* (2008) com as cultivares IAC-Tatu ST e IAC-Runner 886 de *A. hypogaea*, o poder redutor do DPPH foi de  $51,90 \pm 15,2$  e  $39,76 \pm 13,7\%$ , respectivamente.

De acordo com esses resultados, podemos sugerir que o extrato metanólico bruto de folhas de *A. repens* mantidas *in vivo* apresenta um teor de fenóis totais relativamente alto, o que pode estar associado à atividade antioxidante, devido às propriedades redutoras associadas as estruturas químicas dessas substâncias.

Neste trabalho, a determinação da presença de resveratrol (RSV) em *A. repens* foi realizada por CLAE, em materiais obtidos *in vivo* e *in vitro*. No que diz respeito à otimização da metodologia de extração por ultrassom para a obtenção do RSV, inicialmente, foram avaliadas diferentes proporções do solvente. Os ensaios foram realizados usando misturas de metanol: água de 40% à 100%. Como pode ser observado, as condições que produziram a melhor extração do resveratrol era 80% metanol. A separação e a extração de compostos fenólicos dependem, dentre outros, da polaridade dos solventes e do próprio constituinte, e, portanto, um único solvente pode não ser eficaz para a extração de um determinado composto bioativo. Assim, uma combinação de álcool com água pode ser mais eficaz na extração de compostos fenólicos (MARKHAM, 1982; MARKOM *et al.*, 2007). Quando a concentração do metanol aumentou de 40% para 80%, houve um aumento do teor de RSV de  $0,34 \pm 0,02$  mg/g, possivelmente, devido ao aumento da solubilidade do composto fenólico neste sistema (JAYAPRAKASHA, GIRENNAVAR e PATIL, 2008). Nossos resultados estão de acordo com Liyana-Parthirana e Shahidi (2005), onde o total do teor de polifenóis em trigo aumentou quando a concentração de etanol foi elevada. Spigno, Tramelli e Faveri (2007) relataram um maior conteúdo de fenólicos nas sementes de uva quando foi usado etanol a 50%. Lu *et al.*

(2011) obtiveram um alto teor de compostos fenólicos quando utilizou etanol a 67% na extração da casca da raiz de *Wikstroemia indica*. No entanto, quando a concentração de metanol ultrapassou os 80%, o teor do RSV nas amostras reduziu.

Com a finalidade de estabelecer o tempo ótimo de extração em ultrassom, tendo-se como critério o maior rendimento na extração de RSV, estabeleceu-se uma curva cinética (rendimento da extração em função do tempo) utilizando-se o sistema metanol: água (8:2 v/v). Através dos resultados apresentados verificou-se que o tempo de extração melhora o rendimento do processo. Porém, é importante considerar que a escolha do tempo de extração deve ser criteriosa, pois, quanto maior o tempo de exposição das substâncias ao ultrassom, maior a possibilidade de ocorrer degradação dos mesmos. Além disso, vale ressaltar que, resultados semelhantes podem ser encontrados em períodos mais curtos comparativamente a exposições mais longas (LIST e SCHIMIDT, 1989). No presente trabalho, verificou-se que a partir de 5 min o processo de extração não mostrou-se significativo em relação ao aumento de tempo; portanto, optou-se por adotar 5 min como sendo o tempo ótimo de extração por maceração com ultrassom. Celeghini *et al.* (2007) verificaram que para extrair psoraleno e bergapteno em amostras de *Dorstenia brasiliensis* foi necessário um tempo de 60 minutos de exposição a maceração e ao ultrassom.

No presente estudo, o teor de RSV aumentou com o aumento da proporção sólido-líquido. As proporções mais baixas de sólido-líquido (1:20 e 1:30), resultaram em menor extração de RSV, sendo 1,4 e 1,55 mg/g de extrato, respectivamente. Quando a proporção sólido-líquido aumentou de 1:30 para 1:40, o conteúdo de RSV foi igualmente aumentado, o que provavelmente ocorreu devido ao fato de uma quantidade maior de solvente penetrar nas células sob as condições de alta razão de sólidos para líquido (PRASAD *et al.*, 2009). Com novo aumento da proporção sólido-líquido, de 1:40 para 1:50, uma redução do teor de RSV foi observado. Kojic *et al.* (2007) obtiveram maior conteúdo de polifenol nas sementes de uva quando foi usado uma relação sólido-líquido de 1:40 (m/v). Pompeu *et al.* (2009) relataram que a extração de compostos fenólicos era altamente dependente da proporção líquido-sólido. Eles relataram que a proporção de 1:40 (g/mL) foi suficiente para extrair grandes quantidades de compostos fenólicos a partir de frutos de *Euterpe oleraceae*. Gan e Latiff (2011) relataram que a relação sólido-líquido de 20 mL/g desempenharam um papel significativo no rendimento de compostos fenólicos.

O desenvolvimento de métodos mais eficientes para a extração de compostos vegetais torna-se cada vez mais necessário, a fim de aumentar o apelo comercial. Alguns autores (BALLARD *et al.*, 2009; NEPOTE *et al.*, 2002; NEPOTE, GROSSO e GUZMÁN, 2005; YU *et al.*, 2006; YU *et al.*, 2005) têm utilizado técnicas de extração líquido-sólido tradicionais utilizando diferentes solventes orgânicos para extrair os antioxidantes de peles de amendoim. Nepote *et al.* (2005)

estudaram os efeitos de diversos parâmetros na extração de compostos fenólicos de peles de amendoim, usando várias concentrações de EtOH aquoso como solvente de extração. O rendimento máximo de fenóis totais encontrado foi de 0,118 g/g<sup>-1</sup>. Wang *et al.* (2007) extraíram compostos fenólicos de peles de amendoim desengordurados por maceração com 50% (v / v) de EtOH aquoso à temperatura ambiente e relataram um total de compostos fenólicos de 90 mg/g<sup>-1</sup> do extrato.

O interesse na extração assistida por micro-ondas (EAM) aumentou significativamente ao longo dos últimos 5-10 anos como um resultado das suas inerentes vantagens (redução do tempo de extração e volume de solvente) sobre técnicas mais tradicionais de extração (por exemplo, maceração e extração por Soxhlet). Métodos de extração convencionais têm sido associados à elevados volumes de solventes, tempos mais longos e, aumento do risco de degradação de componentes termolábeis. Na EAM, o solvente e amostra estão acondicionados em recipientes de extração selados em condições de temperatura e de pressão controladas. Os recipientes fechados permitem que a temperatura do solvente possa subir bem acima do seu ponto de ebulição, o que reduz o tempo de extração e, posteriormente, aumenta a eficiência da extração. A capacidade de extração do micro-ondas é determinada pelo aumento da probabilidade de choques intermoleculares devido a alterações sucessivas na orientação de moléculas polares onde é possível controlar fatores que influenciam a eficiência de extração, tais como agitação, temperatura, pressão e tempo (GEDYE e WEI, 1998; DE LA HOZ *et al.*, 2005). A eficiência do processo está diretamente relacionada com as condições de operação eleitos. Deve ser dada especial atenção aos parâmetros que podem influenciar o desempenho da extração por micro-ondas, tais como composição do solvente, relação sólido-líquido, temperatura de extração, de energia de micro-ondas, de tempo, e as características da matriz, incluindo o conteúdo de água (VEGGI *et al.*, 2013).

Neste trabalho temos aperfeiçoado um processo para extração de RSV utilizando a metodologia de superfície de resposta em um ambiente de laboratório (Júnior *et al.*, 2001). A metodologia de superfície de resposta (MSR) tem sido utilizada como uma ferramenta para otimizar as condições de extração a fim de se maximizar a obtenção de produtos. MSR é uma ferramenta estatística para o desenvolvimento e otimização de processos com uma ou mais respostas influenciadas por diversas variáveis (GUNAWAN *et al.*, 2005). A vantagem da MSR é que ele permite ao utilizador recolher grandes quantidades de informação a partir de um pequeno número de experimentos (JÚNIOR *et al.*, 2013). O uso da MSR também permite observar os efeitos das variáveis individuais e sua combinação de interações sobre as respostas. A extração assistida por micro-ondas foi utilizada para extração de RSV a partir de uma grande variedade de matrizes de amostra e, como uma técnica alternativa promissora para diferentes aplicações (GAO *et al.*, 2006; ROSTAGNO *et al.*, 2007).

No estudo do melhor tempo para a extração, o tempo de 20 min demonstrou ser suficiente. Embora seja esperado que quanto mais longo o tempo de exposição, mais eficiente seria a extração, longos tempos de extração podem promover a degradação do composto de interesse (CORRÊA *et al.*, 2012). Quando as melhores condições encontradas para a extração de RSV são comparados com outros estudos sobre fenólicos, como a otimização da extração de flavonolignanas (DHOBBI *et al.*, 2009) e antocianinas (SUN *et al.*, 2007), estes resultados são semelhantes no que diz respeito ao tempo.

Um aumento na massa acima de 1:35 (m/v) ocasionou uma redução da eficiência de extração. Este resultado foi surpreendente uma vez que se esperava um aumento do teor de RSV com o aumento da massa. Uma possível explicação para esse resultado é que o aumento da massa ocasionou a diminuição da área de superfície disponível para o solvente penetrar na matriz da amostra e, com isso, solubilizar os compostos, provocando uma redução no rendimento da extração (BALLARD *et al.*, 2010).

Em relação à temperatura e a agitação é possível observar uma melhor interação quando há um aumento do valor das variáveis, gerando uma maior extração. Os valores elevados de agitação e de temperatura proporcionam uma maior extração de RSV, provavelmente, pelo aumento da desorção e dissolução de substâncias ligados à matriz da amostra (RUANet *et al.*, 2007).

Para a extração assistida por micro-ondas, o modelo matemático proposto apresentou as melhores condições de extração, dentre os parâmetros testados, conseguindo otimizar as condições de extração para o RSV. A condição otimizada pelo modelo matemático resultou em uma proporção sólido/solvente de 1:35, concentração do solvente de 90% MeOH/H<sub>2</sub>O, agitação de 1.200 rpm e 60°C de temperatura. Com estas condições é possível alcançar o teor de 2.516 mg/g de RSV.

Em relação à quantidade de RSV, os resultados apresentados neste trabalho estão de acordo com os relatados na literatura em trabalhos com *A. hypogaea*. Geralmente os processos de extração são realizados com sementes e usa-se apenas a extração por maceração. Chukwumah *et al.* (2007) testaram diferentes métodos de extração, e relataram a extração assistida por micro-ondas como a mais eficiente para recuperar os maiores teores de *trans*-resveratrol ( $1,998 \pm 0,226$  mg/100 g de amendoim).

#### Atividade Alelopática

Os extratos brutos obtidos por maceração a partir de folhas e caules de plantas *in vivo* de *Arachis repens* foram utilizados para avaliar o potencial alelopático. Os bioensaios foram realizados utilizando *L. sativa* como organismo teste. Todos os extratos brutos a saber: *n*-hexano,

diclorometano e metanol, mostraram efeito alelopático. Em geral, os extratos metanólicos de caules exibiram maior bioatividade em relação aos extratos hexânicos e diclorometânicos, nas concentrações testadas de 1000 a 100 ppm. Assim como observado por Ladhari *et al.* (2013), a atividade alelopática inibidora do crescimento apresentada neste trabalho foi destacada para o extrato o metanólico, em vez dos mais apolares como hexano e diclorometano. As substâncias envolvidas nos processos alelopáticos são metabolitos secundários, com diversas estruturas químicas (TODOROVA, 1996). Compostos polifenólicos de *Myriophyllum spicatum* foram responsáveis por reduzir o desenvolvimento de fitoplâncton e epífitas no período inicial de crescimento (GROSS, 2000; PLANAS *et al.*, 1981). WIUM-ANDERSEN *et al.* (1983) sugeriram que um composto lábil, o qual facilmente libera enxofre elementar, é responsável pelo baixo potencial epifítico de *Ceratophyllum demersum*. Compostos alelopáticos ativos também foram encontrados em várias microalgas com ênfase em cianobactérias (SCHAGERL *et al.*, 2001; TODOROVA, 1996; SMITH e DOAN, 1999; DOAN *et al.*, 2000; CARMICHAEL, 1991). Muitas destas substâncias isoladas exibiram efeitos antimicrobianos, tóxicos, citotóxicos e são, portanto, de grande interesse para a farmacologia, biotecnologia, medicina e agricultura (BERGER e SCHAGERL, 2004).

O extrato metanólico de caules e folhas de *A. repens* foi particionado e estas partições foram avaliadas quanto ao potencial alelopático. Observou-se importante efeito de inibição do crescimento de hipocótilos e das raízes, principalmente nas partições orgânicas em diclorometano e em acetato de etila, alcançando níveis de inibição de 98,62% na partição diclorometânica (1.000 ppm) sobre as radículas e 95,28% sobre os hipocótilos. Desta forma, verificou-se que o processo de fracionamento do extrato metanólico propiciou o aumento da atividade alelopática inibidora, em 98,62 %, do crescimento de raízes de *L. sativa*. Em termos de  $CI_{50}$  partiu-se, por exemplo, de uma faixa de 122-509 ppm determinada para o extrato metanólico de folhas para uma faixa de  $CI_{50}$  de 96-187 ppm para a partição em diclorometano, demonstrando que o processo de fracionamento do extrato possibilitou a concentração dos aleloquímicos na partição em diclorometano.

Estes mesmos resultados foram verificados por Baratelli *et al.* (2012) quando testaram as partições do extrato etanólico, onde a  $CI_{50}$  partiu de 1.054 ppm e passou a 336 ppm na partição em diclorometano. Ou seja, a atividade alelopática inibidora do crescimento de *L. sativa* aumentou com o processo de purificação do extrato bruto. Os resultados obtidos na partição em diclorometano de Baratelli *et al.* (2012) foram específicos para inibição do crescimento de raízes de *L. sativa*, enquanto que no caso de *A. repens* tanto as raízes como os hipocótilos foram inibidos em percentagem superior a 95%, o que torna esta partição importante do ponto de vista de avaliação dos seus constituintes responsáveis pela atividade alelopática. Este dado torna-se relevante visto que



se observa na literatura que a atividade inibidora do crescimento está relacionada a um ou outro órgão, seja raiz ou hipocótilo (Ladhari *et al.*, 2013, Othman *et al.*, 2012). Neste estudo detectamos uma fração capaz de inibir os dois órgãos, raízes e hipocótilos, o que torna esta fração bastante promissora para o desenvolvimento de um futuro herbicida.

A análise do cromatograma em CG/EM das partições em diclorometanos tanto de caules como das folhas indicou que ambos apresentavam um perfil qualitativo de constituintes semelhantes. A constituição química destas partições mostrou a presença de fenólicos, nor-sesquiterpenoides, fenilpropanóides, triterpenos e ácidos graxos. Os constituintes identificados nesta partição, exceto os ácidos graxos e triterpenos, ainda não foram descritos para esta espécie. Dentre eles, destacam-se os fenólicos (LI *et al.*, 2010), nor-sequiterpenos (KATO-NOGUCHI *et al.* 2010) e fenilpropanóides (POLLIO *et al.*, 1993) que são reconhecidos como classe de substâncias aleloquímicas na literatura.

O constituinte identificado como  $\alpha$ -asarona, um fenilpropanóide, foi capaz de interferir no padrão de crescimento, fotossíntese, respiração e ainda na estrutura celular de duas microalgas (*Ankistrodesmus braunii* e *Selenastrum capricornutum*) (POLLIO *et al.*, 1993). Os fenólicos, como o siringaldeído aqui identificado, possui hidroxilas em posição orto, o que possibilita quelar metais, propriedade esta que influencia na acumulação e na disponibilidade de metais pelo vegetal, inibindo desta forma o seu desenvolvimento (LI *et al.*, 2010). Os nor-sequiterpenos são muito encontrados, por exemplo, em girassóis *Helianthus annuus* (Macias *et al.* 2002) e são reconhecidos pela atividade inibitória seletiva sobre o desenvolvimento de espécies monocotiledôneas (MACIAS *et al.*, 1998). Através destes dados, pode-se sugerir que a atividade inibidora do desenvolvimento de *L. sativa* e das ervas daninhas (*Commelina benghalenses* e *Panicum maximum*) esteja relacionada pelo conjunto de substâncias identificadas na partição diclorometânica de *A. repens* e que estes constituintes estejam atuando sinergicamente por diferentes mecanismos de ação.

*Commelina benghalenses* e *Panicum maximum* são ervas daninhas difíceis de serem controladas pelo glifosato, herbicida não seletivo atualmente utilizado e que age por inibição da enzima enol-piruvil-shikimato-fosfato-sintetase (EPSPS) da rota de síntese dos ácidos aminados aromáticos e do ácido chiquimico (Meschede, Velini e Cabonari, 2008). Por esta razão, pelo desenvolvimento de resistência destas daninhas ao glifosato e, mais ainda, pelo fato destas daninhas serem infestantes de commodities de importância econômica para o nosso país, como os cultivos de cafés, soja e cana de açúcar, a busca por herbicidas alternativos se torna relevante. Desta forma, a determinação de uma partição diclorometânica rica na mistura de fenóis, nor-sesquiterpenos, fenilpropanóides, ácidos graxos e triterpenos proveniente de *A. repens* poderá indicar um possível uso desta espécie especificamente para o combate destas daninhas resistentes, tendo em vista ao fato

de que esta espécie já possui utilização, em jardinagens, com a finalidade de inibir daninhas em geral. Os resultados obtidos de inibição da germinação e desenvolvimento das duas daninhas sob a ação de extratos de *A. repens* estão sendo pela primeira vez descritos através deste estudo.

Estes resultados sugerem que os extratos de caules e folhas de *A. repens* possuem propriedades alelopáticas e, portanto, reúne substâncias aleloquímicas. Dessa forma, a planta poderia ser utilizada como um candidato para o isolamento e identificação das substâncias ativas, podendo explorar as interações de *A. repens* com outras plantas vizinhas sob ambientes naturais. Além disso, os extratos de caules e folhas e/ou o seu resíduo pode ser utilizado diretamente *in natura* como bioherbicidas, ou as substâncias ativas isoladas a partir desta planta usadas como herbicidas ou em modelos para novos herbicidas naturais, biodegradáveis, como alternativas aos herbicidas sintéticos de uma forma mais sustentável. Para o melhor de nosso conhecimento, este é o primeiro relato sobre constituintes aleoquímicos e de atividade alelopática *in vitro* de *A. repens*.

Os resultados encontrados neste trabalho corroboram com o descrito na literatura (MIRANDA *et al.*, 2003). Pois, além do *A. repens* apresentar como característica a fixação biológica de nitrogênio atmosférico, através de associações com bactérias do gênero *Rhizobium*, fixando entre 65 a 101 kg de nitrogênio/ha/ano, esta espécie também possui atividade alelopática inibindo o desenvolvimento de outras espécies concorrentes ao mesmo espaço em que se desenvolvem. Desta forma, a utilização desta espécie no consórcio com culturas perenes, além de fornecer nitrogênio, auxilia no controle de plantas daninhas, cobrindo completamente o solo e, assim, diminuindo a incidência das plantas daninhas

Sabe-se que a presença de cobertura vegetal, viva ou morta, no solo, atrasam e reduzem a emergência de plântulas daninhas onde a semeadura direta está consolidada. A presença de grande quantidade de massa seca sobre o solo tende a reduzir o estabelecimento de espécies daninhas devido a diminuição da amplitude térmica e formação de barreira física, dificultando, ou até mesmo impedindo, a emergência das plantas daninhas (LAMEGO *et al.*, 2015).

Saraiva (2010) verificou, em experimentos com plantas *in vivo*, que os solos cultivados com *A. repens* e *A. repens* var. miúda apresentaram uma redução na velocidade de germinação de sementes de *L. sativa* de 23,3% e 38,83%, respectivamente, em relação ao controle negativo. Estes resultados corroboram os resultados alelopáticos obtidos em extratos e frações de *A. repens* nesta tese. BARATELLI (2006) relatou que o extrato metanólico do látex das folhas de *Euphorbia tirucalli* foi testado a 1.600 ppm e foi capaz de inibir o crescimento das raízes de *L. sativa* em 26% e, ao mesmo tempo, estimular o crescimento dos hipocótilos em 17%. Ambos os efeitos cessaram conforme a concentração foi diminuída. Os extratos metanólicos de folhas de *A. repens*, a 1.000 ppm, foram capazes de inibir 25,68% dos hipocótilos e 57,27% das radículas de *L. sativa*. Este efeito

alelopático, observado nos extratos alcoólicos, possivelmente é associado aos triterpenos (classe de substâncias amplamente descrita na literatura com capacidade de atuar negativamente sobre o crescimento vegetal), conforme evidenciado por pesquisa desenvolvida em nosso grupo de pesquisas e dados da literatura.

BARATELLI (2006), relata que a partição diclorometânica a 1.000 ppm do extrato etanólico de folhas de *Terminalia catappa* apresentou inibição média de 86% sobre as radículas e de 41% para os hipocótilos. Enquanto que, as partições em diclorometano do extrato metanólico do caule de *A. repens*, na mesma concentração testada por Baratelli, apresentou um efeito alelopático inibitório de 95,28% nos hipocótilos e 98,62% nas radículas de *L. sativa*. Esta diferença observada é importante, pois evidencia o fato de que as substâncias responsáveis pela inibição da germinação foram concentradas na partição em diclorometano dos extratos alcoólicos.

É importante salientar que em outros trabalhos descritos na literatura, os efeitos alelopáticos ocorrem em concentrações mais elevadas, as quais vão de 5.000 a 330.000 ppm (BARATELLI *et al.*, 2012). A concentração média efetiva obtida para os extractos de *A. repens* foi menor (1.000 ppm), o que reforça o seu potencial como uma espécie com efeito alelopático. Desta forma, os resultados obtidos em *A. repens* podem ser considerados promissores visto que a  $CI_{50}$  determinada para o extrato metanólico bruto de folhas está na faixa abaixo de 509 ppm e, para o extrato metanólico de caules, a  $CI_{50}$  encontra-se na faixa abaixo de 111 ppm. Estes resultados, a partir dos diferentes órgãos e extratos de diferentes polaridades de *A. repens*, estão sendo pela primeira vez relatados através deste trabalho.

Teoricamente, todas as plantas são capazes de produzir estes compostos. Esta característica é mais comum em precursores selvagens das atuais plantas comerciais, as quais se capacitaram para competir com outras plantas para garantir, não só a formação de estandes puros, mas também para defender-se de inimigos naturais. As principais funções das substâncias com atividade alelopática estão relacionadas à defesa contra micro-organismos (como fungos, bactéria ou vírus), contra animais fitófagos (como os nematóides, insetos, moluscos e vertebrados) e contra competição entre plantas. Estes compostos estão divididos em três principais grupos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados, sintetizados em diferentes órgãos como: folhas, flores, frutos, raízes, sementes, exsudados resinosos e gemas de muitas espécies vegetais (SARAIVA, 2010).

Os fenóis e os terpenos são compostos que estão mais envolvidos nos efeitos alelopáticos de inibição de metabolismo das plantas alvo (INDEJIT e DUKE, 2003). Os compostos fenólicos estão implicados na inibição da germinação de sementes e no estabelecimento de plantas em comunidades vegetais. Dentre os terpenos, os monoterpênicos, constituintes frequentes dos óleos essenciais, estão mais correlacionados com os efeitos inibitórios observados em sementes, plantas e micro-

organismos expostos à sua presença (RICE, 1984; HARBORNE, 1980). Terpenos e compostos fenólicos foram identificados em diferentes partes de *Ocotea odorifera*, sendo associados a efeitos inibitórios sobre a germinação e desenvolvimento do sistema radicular e da parte aérea de *Sorghum bicolor* L. cv. Este efeito alelopático é, em grande parte, associado a essas substâncias, as quais podem ter atuado sobre a permeabilidade das membranas e/ou sobre o balanço hídrico e a aquisição de nutrientes pelo sistema radicular. A modificação da permeabilidade das membranas celulares sob efeitos de aleloquímicos é citada por vários autores, os quais também relatam alterações no balanço hídrico de plantas submetidas a extratos vegetais e efeitos sobre a respiração celular (CARMO, 2007).

Substâncias alelopáticas de *Dactylis glomerata* L atuam sobre a fotossíntese de outras plantas, com ação similar a dos herbicidas fluometuron e linuron (REIGOSA *et al.* 1999), enquanto os ácidos fenólicos, as cumarinas, os polifenóis e os flavonóides são apontados como aleloquímicos que atuam como herbicidas inibitórios da fotossíntese, alterando o transporte de elétrons e a fosforilação nos fotossistemas (RIZVI *et al.*, 1992; DURIGAN e ALMEIDA, 1993).

Inoue *et al.* (2010) confirmaram que esteroides glicosilados, como estigmasterol e sitosterol, alteraram tanto o desenvolvimento de radículas como dos hipocótilos de *Euphorbia heterophylla*, evidenciando a sensibilidade no desenvolvimento dessa espécie ao efeito alelopático destes esteroides. Virtuoso (2008), ao avaliar a fração das cascas de *Erythrina velutina*, em que foram isolados derivados de estigmasterol e sitosterol, observou que essas substâncias foram capazes de inviabilizar o pleno desenvolvimento de *Lactuca sativa*, comprovando o efeito alelopático desses fitosteróides.

Os sinais identificados por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da amostra M2A23-25 são característicos de sinais de esteróides comuns na natureza. Na comparação com dados da literatura com as conhecidas misturas de sitosterol e estigmasterol, identificou-se a presença destes constituintes em *Arachis repens*. Esta análise pode ser corroborada pelo trabalho de Guzman e Cols. (2000), os quais descreveram a composição esteróidica de diversas espécies de *Arachis*, exceto a *A. repens*, sendo este o primeiro relato destes fitoesteróis na espécie.

As substâncias isoladas em *A. repens*, em mistura ou não, indicam a riqueza da espécie nos constituintes triterpenicos. Estes triterpenos, representados pelo sitosterol e estigmasterol, em combinação com a atividade alelopática, mostraram atividades inibidoras da germinação e do desenvolvimento de raízes e hipocótilos. Apesar destes resultados positivos a cerca da inibição do crescimento de *L. sativa*, esta mesma atividade não foi evidenciada em estudos em que utilizaram a planta aquática *Lemna paucicostata* como organismo teste (CHUNG, HAHN e AHMAD; 2005).

Dentre as frações provenientes do fracionamento da partição em acetato de etila, a maior atividade foi evidenciada na fração metanólica (de menor polaridade em relação às frações hidro e hidrometanólicas), cujo teor de fenólicos e de atividade antioxidante foram menores em comparação às demais frações. Nas frações provenientes da partição em butanol, a fração de melhor atividade alelopática foi relacionada à fração hidrometanólica, que apresentou percentuais medianos de fenóis e de atividade antioxidante, em comparação às demais frações de mesma origem. Estes resultados indicam que a atividade alelopática das frações provenientes da partição em acetato de etila não estariam estritamente relacionadas aos constituintes de natureza fenólica, como fenóis simples e flavonoides, que são os constituintes comumente encontrados nesta partição. Para as frações provenientes da partição em butanol, a maior polaridade das frações sugere a natureza heterosídica dos constituintes presentes. A atividade alelopática de substâncias polares, como as que estão relacionadas às partições em acetato de etila e em butanol, não são exemplos comuns na literatura. Entretanto, sabe-se que os aleloquímicos podem ter natureza lipofílica ou hidrofílica, para permitir a passagem através da barreira epicuticular foliar, que apresenta ceras de diferentes polaridades, dependendo de sua composição (Monquero *et al.* 2004).

No presente trabalho, diversos compostos foram identificados nos extratos de *A. repens*. Destes, terpenóides representam um dos mais importantes grupos de aleloquímicos (INDERJIT e KEATING, 1999). Lupenona e lupeol, identificados no presente estudo, são referidos como sendo aleloquímicos e já foram descritos por inibir o crescimento da raiz de tomates (PEGUERO *et al.* 2012). Já foi relatado a atividade alelopática do esqualeno, possuindo efeitos, tanto estimuladores, quanto inibitórios, dependendo da planta alvo (CHOU *et al.* 2009). Os esteróides também foram propostos por possuírem atividade alelopática (MACÍAS *et al.*, 1997; INDERJIT e KEATING, 1999). Neste estudo, ácidos palmítico e esteárico representaram uma proporção significativa dos compostos e seus efeitos alelopáticos já foram descritos por Inderjit e Keating (1999). Além disso, a presença de compostos fenólicos, tais como: catequinas, ácido clorogênico, ácido *p*-cumárico, ácido *o*-cumárico, ácido ferúlico, ácido tânico e ácido cafeico foram associados ao efeito alelopático proporcionado pela serapilheira de nozes (MATOK *et al.*, 2009).

As respostas fisiológicas e morfológicas das sementes ou das plântulas à exposição a compostos alelopáticos são manifestações secundárias decorrentes de alterações moleculares e celulares, cujos mecanismos ainda não foram totalmente elucidados (FERREIRA e ÁQUILA 2000; CARMO *et al.*, 2007). Da mesma forma, o perfil químico da maioria das espécies testadas em bioensaios de alelopátia também não está disponível na literatura. Assim, a caracterização físico-química dos extratos vegetais utilizados nesses bioensaios é extremamente importante para que se possa concluir a respeito dos efeitos biológicos observados.

Os bionsaios de germinação de sementes na presença de extratos vegetais são pontos de partida para a investigação de efeitos de alelopátia intra e interespecíficos, embora haja controvérsia em relação a este tipo de experimento (ANDERSON e LOUCKS 1966; LEATHER e EINHELLIG 1988; HAUGLAND e BRANDSAETER 1996; HAMDI *et al.* 2001; CARMO *et al.*, 2007). O argumento é que as sementes, em decorrência de processos seletivos e evolutivos, são menos sensíveis aos aleloquímicos do que as plântulas (FERREIRA e AQUILA, 2000). Por outro lado, estudos recentes mostram que, embora a porcentagem final de germinação possa não ser significativamente afetada pela ação de aleloquímicos, o padrão de germinação pode ser modificado, verificando-se diferenças na velocidade e na sincronia da germinação de sementes submetidas a tais compostos (SANTANA *et al.* 2006). A importância dessa metodologia se deve ao fato de que as sementes constituem unidades biológicas por meio das quais processos ecológicos, como a competição intra e interespecíficas, a invasão de novos nichos por espécies não nativas, a colonização de novos habitats e a regeneração da vegetação nativa, dentre outros, podem ser desencadeados.

No ambiente, o impedimento da germinação de sementes quimicamente sensíveis a substâncias alelofitotóxicas liberadas por indivíduos da sua própria espécie (autotoxicidade) ou não, pode ter como consequência a diminuição da densidade de seus indivíduos o que, a médio e longo prazos, pode levar à extinção local dessa espécie, com implicações para a biodiversidade local (LEVIN 1970; HEYWOOD 1989; NOBLE 1989; REIGOSA *et al.* 1999; CALLAWAY *et al.* 2003). Assim, a síntese e a liberação de metabólitos secundários capazes de influenciar negativamente a germinação de sementes ao redor do indivíduo que os produziu é uma estratégia de interferência competitiva robusta, que confere vantagens a esses indivíduos quando encontrados em ambientes naturais; porém, no que tange a estruturação de populações em agroflorestas, consórcios silviculturais e de culturas, pode significar a falência do sistema (CARMO *et al.*, 2007).

Os fenóis e os terpenos são compostos que estão mais envolvidos nos efeitos alelopáticos de inibição de metabolismo das plantas alvo (INDEJIT e DUKE 2003). Os compostos fenólicos estão implicados na inibição da germinação de sementes e no estabelecimento de plantas em comunidades vegetais. Dentre os terpenos, os monoterpenos, constituintes frequentes dos óleos essenciais, estão mais correlacionados com os efeitos inibitórios observados em sementes, plantas e micro-organismos expostos à sua presença (RICE 1984; HARBORNE 1980). É possível supor que tais efeitos inibitórios sobre a germinação de plantas e sobre o desenvolvimento do sistema radicular e da parte aérea de espécies teste se devam em grande parte a essas substâncias, que podem ter atuado sobre a permeabilidade das membranas e/ou sobre o balanço hídrico e a aquisição de nutrientes pelo sistema radicular (CARMO *et al.*, 2007).

De acordo com Wang *et al.*, 2014, compostos como  $\beta$ -sitosterol, stigmast-4-eno-3,6-dione,  $\alpha$ -linoleico e linoleico com atividade inibidora contra microalgas. Além disso, Aliotta *et al.* (1990), já havia identificado o ácido linoleico e  $\gamma$ -sitosterol com atividade alelopática.

Diversos autores têm descrito que algumas classes de aleloquímicos inibem a fotossíntese por induzir mudanças no conteúdo de clorofila das plantas receptoras. A aparência clorótica das plantas seria um sintoma da degradação das moléculas de clorofila ou da inibição da sua síntese, ambos os efeitos mediados por aleloquímicos, que impedem a formação das Mg-porfirinas (EINHELLIG, 1986). Em ambos os casos, esses efeitos lembram a atuação dos herbicidas, como as piridazinonas e imidazolinonas (DUKE 1985; CAYON *et al.* 1990; CARMO *et al.*, 2007).

Rizvi *et al.* (1992) e Durigan e Almeida (1993) observaram que os ácidos fenólicos, as cumarinas, os polifenóis e os flavonóides são apontados como aleloquímicos que atuam como herbicidas inibitórios da fotossíntese, alterando o transporte de elétrons e a fosforilação nos fotossistemas.

A respiração celular também pode ser fortemente afetada pela presença de aleloquímicos, a respiração das células radiculares pode ser aumentada ou diminuída, dependendo da natureza química dos compostos presentes nos extratos vegetais empregados (CARMO *et al.*, 2007).

Os ácidos fenólicos são potentes aleloquímicos que induzem o aumento da atividade de enzimas oxidativas, tendo como consequência final a modificação da permeabilidade das membranas e a formação de lignina, que contribuem para a redução do alongamento radicular, além de uma série de alterações no metabolismo de lipídios e de proteínas.

Devido as alterações morfológicas e fisiológicas mencionadas anteriormente, é possível pensar que o metabolismo das plântulas testes foi alterado e que os agentes dessas mudanças afetaram adversamente a atividade respiratória, seja a nível mitocondrial, seja por atuarem sobre as diversas enzimas envolvidas no processo. Independente da resposta respiratória, o efeito foi sempre danoso para a planta receptora, evidenciando que este é um importante mecanismo de ação destas substâncias. Os resultados obtidos evidenciam que os extratos de *Arachis repens* têm ação inibitória sobre o metabolismo das plantas teste, interferindo na captação da energia luminosa, por diminuir o teor de clorofila, e na liberação dessa energia, armazenada em moléculas orgânicas, para o crescimento, multiplicação e manutenção das células, por interferir na respiração celular. Todos esses são processos metabólicos cruciais para o estabelecimento de qualquer planta.

O fenol vinil-guaiacol foi identificado nos óleos essenciais de *C. cretinum*, sendo um dos compostos mais representativos desta fração (5,8%). O óleo essencial foi testado para avaliar a atividade alelopática em rabanetes (*Raphanus sativus* L.), alface (*Lactuca sativa* L.) e agrião

(*Lepidium sativum*), na concentração de 2,5 µg/mL, sendo obtida a inibição de 100% para a germinação (FORMISANO *et al.*, 2007).

Os compostos fenólicos, incluindo o ácido salicílico, são constantemente associados a atividade alelopática por inibirem a absorção de K<sup>+</sup>, influenciando diretamente na atividade celular e ocasionando danos aos tecidos vegetais (HARPER e BALKE, 1981).

A substância 2-metilsoborneol já foi identificada em cianobactérias e a princípio não é tóxica para os organismos. Esta substância está associada ao odor de mofo nos corpos d'água eutrofizados (FREITAS, SIRTORI e PERALTA-ZAMORA, 2008).

Aslani (2014) relatou efeito herbicida exercido pelos extratos em metanol de *Tinospora Tuberculata*, em alface e arroz (*Oryza sativa* f. *spontanea*) (100 g/L<sup>-1</sup>). Aslani sugeriu que caules e folhas possuem compostos fitotóxicos, dentre eles o 3-hidroxi-β-damascone, que quando liberados para o ambiente atuam antagonicamente interferindo nos mecanismos fisiológicos das plantas receptoras.

Kato-Noguchi e colaboradores (2010), utilizou extrato em metanol (80%) de folhas e caules de *Vulpia myuros* em ensaio alelopáticos com *Lepidium sativum*, *Lactuca sativa*, *Medicago sativa*, *Phleum pratense*, *Digitaria sanguinalis* e *Lolium multiflorum*. O extrato inibiu o crescimento de todas as espécies testadas. Após o isolamento e análise dos extratos por CLAE, Kato-Noguchi sugeriu que as substâncias ativas foram determinadas como (-)-3-hidroxi-β-ionona e (+)-3-oxo-α-ionol. Ambas substâncias estavam ativas em concentrações superiores a 0,3 µM e inibiram todas as espécies testadas. Kato-Noguchi indicou que estas substâncias podem desempenhar papéis importantes na atividade fitotóxica.

As iononas são substâncias provenientes da degradação de carotenoides e são compostos encontrados, geralmente, em óleos essenciais. Nos extratos metanólicos de caules de *A. repens*, sugerimos a presença de *trans*-β-ionona-5,6-epóxido e diidro-α-ionona. Kato-Noguchi, Hamada e Clements (2015) associaram estes compostos fitotóxicos a inibição da α-amilase em sementes de agrião. A repartição amilolítica de amido de reserva em sementes é essencial para produção de energia e age como precursores biossintéticos para germinação e crescimento de plântulas. A α-amilase desempenha um papel fundamental na degradação de hidratos de carbono de reserva em açúcares solúveis durante a germinação (VARTAPETIAN E JACKSON 1997). Assim, α-amilase de indução é um pré-requisito tanto para a germinação de sementes quanto para o crescimento de plântulas, até que as mudas utilizam a fotossíntese para produzir carboidratos (CONLEY *et al.*, 1999). A indução de α-amilase em sementes de plantas está associada a transcrição de giberelinas (RITCHIE E GILROY, 1988). As iononas podem inibir a germinação e o crescimento de mudas de agrião pela inibição da indução de atividade da α-amilase (ORACZ *et al.* 2012).



Souza Filho e colaboradores (2009) testaram a atividade alelopática do óleo essencial de *Ocimum americanum* em planas daninhas, *Mimosa pudica* (malícia) e *Senna obtusifolia* (matapasto). Entre os constituintes químicos do óleo essencial da espécie *O. americanum* foram identificados monoterpenos, monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos, compostos alifáticos e fenilpropanoides. Os constituintes em maior proporção percentual foram o limoneno (24,0%), linalol (10,6%), (*E*)-cinamato de metila (17,0%) e carvona (8,6%). Em *A. repens*, após a análise por CG-MS dos extratos metanólicos de caules, foi sugerida a presença de cinamato de metila, possivelmente agindo também como aleloquímico.

A substância loliolida inibiu o crescimento de hipocótilos e raízes de agrião em concentração superior a 0,03  $\mu\text{M}$ . As concentrações de loliolideo necessárias para a  $\text{IC}_{50}$  foram de 0,18 e 0,15  $\mu\text{M}$  de raízes e hipocótilos em agrião, respectivamente (BICH e KATO-NOGUCHI, 2014). Além disso, a loliolida foi associada a atividade anti-algas (LU *et al.* 2011), atividade imunossupressora (OKADA *et al.*, 1994) e atividade citotóxica (AL-MEKHLAFI *et al.* 2012).

Os bioensaios de germinação realizados com o extrato metanólico do caule da sucupira-branca (*Pterodon emarginatus*), a 150 ppm, apresentou percentual de inibição de 83% sobre o desenvolvimento da raiz e 75% da parte aérea e, somente 30% da germinação das sementes do capim-colonião (*Panicum maximum*). Em casa de vegetação, os resultados de inibição, a uma concentração de 400 ppm, foram de 83% para o caule, 80% para a raiz e 63% para a germinação. Frações do extrato metanólico obtidas por cromatografia em coluna cromatográfica não reproduziram os resultados obtidos com o extrato metanólico. Esse fato sugere que a atividade inibitória depende mais da sinergia entre os vários aleloquímicos presentes do que de poucos aleloquímicos isoladamente. A fração mais ativa (diclorometano/clorofórmio, 5/ 5) é constituída fundamentalmente por alifáticos de cadeia longa: fitol (13,5%), ácido oléico (12,8%), linoleiladato de metila (10,9%) e ácido palmítico (6,9%) (HERÁNDEZ-TERRONES *et al.*, 2007)

Os óleos essenciais de folhas de *E. elaterium*, extraídos por hidrodestilação, indicaram alta atividade fitotóxica em sementes de alface. O óleo de folhas foi caracterizado por grandes quantidades de ésteres alifáticos (30,8%) e hidrocarbonetos alicíclicos (20,4). Nos óleos essenciais dos frutos foram encontrados compostos aromáticos (45,33%) e hidrocarbonetos alifáticos (33,0%). O óleo das folhas (0,1  $\text{mg/mL}^{-1}$ ) reduziu a germinação das sementes de alface a 12% e diminuiu significativamente as raízes e parte aérea das mudas. Nas concentrações acima de 0,1  $\text{mg/mL}^{-1}$  a germinação foi totalmente inibida em raízes e partes aéreas. Dentre as diversas substâncias identificadas por Razavia e Nejad-Ebrahimi (2010) pode ser destacada a presença da substância heptadecano, assim como em *A. repens*.

## Atividade anti-inflamatória

Os anti-inflamatórios estão entre os agentes terapêuticos mais utilizados no mundo, porém, apresentam limitações com relação à sua potência, eficácia e efeitos adversos que vão desde efeitos gastrointestinais até alterações cardiovasculares (CALIXTO *et al.*, 2008). Embora alternativas venham sendo desenvolvidas, como os recentes moduladores ou anti-citocinas (anti-IL-1b e anti-TNF- $\alpha$ ), os custos de utilização são muito superiores ao dos anti-inflamatórios convencionais e a via de administração é subcutânea, pelo menos duas vezes por semana (CALIXTO *et al.*, 2008). Deste modo, a busca por novas alternativas que explorem o potencial da biodiversidade brasileira tem sido crescente na área científica e têm elevado o interesse econômico das indústrias farmacêuticas em renovar o quadro atual de baixa eficácia e alta toxicidade dos anti-inflamatórios (VERPOORTE *et al.*, 2005).

Dados da literatura mostram que substâncias de origem vegetal apresentam importantes atividades anti-inflamatórias e que muitas de suas ações estão relacionadas à habilidade de inibir a síntese ou ação de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão, vias do ácido araquidônico e NO (WERZ, 2007; AZADMEHR *et al.*, 2009; KASSUYA *et al.*, 2005).

Inicialmente, os extratos foram avaliados por meio de um *screening* de atividade considerando sua capacidade em modular a produção de óxido nítrico e sua citotoxicidade. Extratos vegetais brutos ou particionados e, às vezes, compostos isolados, são utilizados para realizar *screening* da atividade anti-inflamatória, antioxidante, bem como propriedades psicotrópicas e neurotrópicas (CALIXTO *et al.*, 2008). O *screening* de atividade farmacológica permite avaliar as propriedades medicinais que um extrato vegetal possa exibir, oferecendo alternativas sustentáveis e ambientalmente corretas, onde vários ensaios podem ser utilizados para testar a atividade biológica utilizando-se um fármaco padrão que ateste a efetividade do ensaio. Além disso, o *screening* permite por meio de testes inicialmente simples e rápidos selecionar extratos vegetais promissores para etapas futuras de um estudo comparando sua ação modulatória entre diferentes ensaios (FENNEL, 2004).

O fato das partições FR AcOEt e FR DCM de folhas terem mostrado maior efeito sobre a inibição da produção de NO do que os outros poderia ser explicado por sua média polaridade. Nesse ensaio o LPS age simulando uma infecção e promovendo a ativação dos macrófagos, sendo que este processo de ativação dos macrófagos leva à ativação de fatores de transcrição de vários genes e à síntese de proteínas que medeiam as funções dessas células, desencadeando a produção, por

exemplo, de NO e TNF- $\alpha$ , além de outras moléculas efetoras (ABBAS *et al.*, 2008). Como esses solventes tem uma menor polaridade, e, portanto, as substâncias por ele extraídas uma maior facilidade de permear a membrana das células, possivelmente ocorre um acesso mais fácil ao interior celular, reduzindo então, com doses menores, a produção de NO. A partição FR AcOEt apresentou, portanto, pouca capacidade para a inibição do TNF- $\alpha$  ( $11,17 \pm 0,6\%$ ), especificamente. Já O EB HEX (100  $\mu\text{g/mL}$ ), FR DCM (100  $\mu\text{g/mL}$ ) e FR Aq (20  $\mu\text{g/mL}$ ) de folhas foram os extratos que obtiveram a maior capacidade de inibição do TNF- $\alpha$ , com 10,43%; 21,99% e 20,90%, respectivamente. Na avaliação dos extratos provenientes de caules, as partições EB HEX, EB MeOH e FR DCM, todos na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ , obtiveram 35,63%, 18,64% e 16,68% de inibição, respectivamente.

A fração FR DCM apresentou bons resultados para a inibição da produção de NO e TNF- $\alpha$ . Porém, quando relacionamos estes resultados com a citotoxicidade, podemos observar que esta é a fração com maior percentagem de citotoxicidade para a amostra proveniente de caules e, a segunda maior para a amostra proveniente de folhas. Possivelmente, a inibição da produção de NO, na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ , esteja relacionada com o efeito citotóxico apresentado para os macrófagos.

Para seleção dos extratos utilizamos como critério um percentual de inibição da produção de NO de no mínimo 50%, uma vez que os extratos são compostos por um conjunto de substâncias responsáveis por tal atividade e encontram-se, geralmente, em quantidades minoritárias. Os extratos EB HEX de caules e folhas de *A. repens* foram selecionados para serem fracionados e utilizados nas próximas investigações sobre atividade anti-inflamatória e avaliação fitoquímica, pois, sugerimos que possam reunir substâncias potencialmente promissoras.

## CONCLUSÕES

A otimização da extração de compostos antioxidantes, fenóis totais e teor de resveratrol por maceração permitiu o estabelecimento das melhores condições de proporção metanol/água como solvente para esse processo;

A otimização da extração de resveratrol assistida por micro-ondas permitiu o estabelecimento das melhores condições de tempo, temperatura, proporção solvente/sólido e agitação para esse processo;

A otimização da extração de compostos antioxidantes, fenóis totais e resveratrol pela técnica da extração assistida por ultrassom permitiu o estabelecimento das melhores condições de tempo, pré-tratamento por maceração e proporção solvente/sólido para esse processo;

O uso de TDZ foi capaz de induzir a formação de calos a partir de segmentos nodais e segmentos internodais.

A elicitação pela técnica do ultrassom permitiu a elevação nos teores de resveratrol em relação à amostra controle com um acréscimo de até  $496,09 \pm 80,72\%$  em calos oriundos de segmentos nodais inoculados em meio MS suplementado com TDZ a  $13,6 \mu\text{M}$ ;

A partição em diclorometano do extrato metanólico de caules e folhas exibiu efeito alelopático inibitório tanto para hipocótilos como em radículas de *L. sativa* e nas ervas *daninhas Commelina benghalenses e Panicum maximum*;

A identificação dos constituintes por CG/EM revelou a presença de substâncias aleloquímicas inéditas na espécie.

Substâncias isoladas em mistura ou não indicam a presença de esteroides como sitosterol, estigmasterol e lupeol no extrato hexânico de caules de *A. repens*. A estas substâncias atribui-se a atividade alelopática conhecida na literatura.

Os extratos brutos em *n*-hexano de caules e folhas possuem substâncias potencialmente promissoras para atividade anti-inflamatória em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS.

## REFERÊNCIAS

- ABDIN, M.Z.; ISRAR, R.U.; REHMAN, S.K.; JAIN, S.K. Artemisinin a novel antimalarial drug: biochemical and molecular approaches for enhanced production. *Planta Medica*, v.69, p.289-299, 2003.
- ABBAS, A. K. *Imunologia celular e molecular*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier,2011.
- AGGARWAL, B.B.; EESSALU, T.E.; HASS, P.E. Characterization of receptors for human tumour necrosis factor and their regulation by gamma-interferon. *Nature*.v.318, p.665–667, 1985.
- AHUJA, I.; KISSEN, R.; BONES, A.M. Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends Plant Science*. v.17, n.2, p.73-90, 2012.
- ASLANI, F.; JURAIMIA, A.S.; AHMAD-HAMDANIA, M.S.; OMARB, D.; ALAMA, MD.A.; HASHEMIC, F.S.G.; HAKIMD, MD.A.; UDDINA, MD.K. Allelopathic effect of methanol extracts from *Tinospora tuberculata* on selected crops and rice weeds. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B – Soil e Plant Science*, v.64, n.2, p.165-177, 2014
- ADEYINKA, A e RICHARD, F. Application of phytochemical extracts and essentialoils in food products: A review. *International Journal of Biotechnology and Food Science*. v.3, n.3, p.31-35, 2015.
- AL-MAMARY, M.; AL-MEERI, A.; AL-HABORI M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of Honey. *Nutrition Research*, v. 22, p. 1041-1047, 2002.
- ANASTAS, P. T.; WARNER, J.; *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press: Oxford, 1998.
- ANDRADE, J. C. M.; TAVARES, S. R. L.; MAHLER, C. F. O uso de plantas na melhoria da qualidade ambiental. São Paulo: Oficina de textos, 2007.
- ASH, C. Feeding the future. *Science*, v.327, p.797, 2010
- AWAD, A. B.; CHINNAM, M.; FINK, C. S.; BRADFORD, P. G.  $\beta$ -Sitosterol activated Fas signaling in human breast cancer cells. *Phytomedical*. v. 14, p. 747-754, 2007.
- AWAD, M. A.; DE JAGER, A.; VAN WESTING, L. M. Flavonoid and clorogenic acid levels in apple fruit characterization of variation. *Science Horticultural*, v. 83, n. 3-4, p. 249-263, 2000.
- AZADMEHR, A.; AFSHARI, A.; BARADARAN, B., HAJIAGHAEI, R.; REZAZADEH, S.; MONSEF-ESFAHANI, H. Suppression of nitric oxide production inactivated murine peritoneal macrophages *in vitro* and *ex vivo* by *Scrophularia striata*ethanolic extract. *Journal of Ethnopharmacology*, v.124, p.166–169, 2009.
- BAJAJ, Y.P.S.; RAM, A.K.; LABANA, K.S.; SINGH, H. Regeneration of genetically variable plants from the anther-derived callus of *Arachishypogaea* and *Arachisvillosa*. *Plant Science Letters*, v.23, p.35-39, 1981.

BALASUBAHINI, S.M.; RUKKUMANI, R.; MENON, V.P. Protective effects of ferulic acid on hyperlipidemic diabetic rats. *Acta Diabetologica*. v. 40, p. 118-122, 2003.

BARATELLI, T. G. Estudo das propriedades alelopáticas vegetais: investigação de substâncias aleloquímicas em *Terminalia catappa* L. (Combretaceae). Universidade Federal do Rio de Janeiro. Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais. Pós-graduação em química de produtos naturais. 2006.

BARATELLI, T. G.; GOMES, A. C. C.; WESSJOHANN L. A.; KUSTER, R. M.; SIMAS N. K. Phytochemical and allelopathic studies of *Terminalia catappa* L. (Combretaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 41. 119–125. 2012.

BARI, S. B. e JAIN, P. S. Isolation of Lupeol, Stigmasterol and Campesterol from Petroleum Ether Extract of Wood Stem of *Wrightia tinctoria*. *Asian Journal of Plant Sciences*. 1682-3974. 2010.

BEER, L.L.; BOYD, E.S.; PETERS, J.W.; POSEWITZ, M.C. Engineering algae for biohydrogen and biofuel production. *Current Opinion in Biotechnology*, v.20, n.3, p.264-71, 2009.

BERGER, C.; SCHMID, P.C.; SCHABITZ, W.R.; WOLF, M.; SCHWAB, S.; SCHMID, H.H. Massive accumulation of N-acylethanolamines after stroke. Cell signalling in acute cerebral ischemia? *Journal of Neurochemical*. v.88, n.5, p.1159–67, 2004.

BICH, T.T.N e KATO-NOGUCHI, H. Isolation and identification of a phytotoxic substance from the emergent macrophyte *Centrostachys aquatic*. *Botanical Studies*, p.55-59, 2014.

BIDLACK, W. R.; OMAYE, S. T.; MESKIN, M. S.; TOPHAM, D. K. W. Phytochemicals as bioactive agents. 1<sup>st</sup> Edition, *Technomic Publication*, p.271, 2000.

BILGIN, D.D.; ZAVALA, J.A.; ZHU, J.; CLOUGH, S.J.; ORT, D.R.; DELUCIA, E.H. Biotic stress globally downregulates photosynthesis genes. *Plant Cell Environmental*, v.33, n.10, p.1597-613, 2010.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. *Nature immunology*, v.2, n.10, p.907-16, 2001.

BOLLE, T. e HE S. Y. Innate immunity in plants: An arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science*, v.324, p.742-744, 2009.

BOLTON, M.D. Primary metabolism and plant defense—fuel for the fire. *Molecular Plant–Microbe Interactions*, v.22, p.487–497, 2009.

BONARDI, V.; DANGL, J.L. How complex are intracellular immune receptor signaling complexes? *Front. Plant Science*, v.3, p.237, 2012.

BONOLI, M.; VERARDO, V.; MARCONI, E.; CABONI, M. F. Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: Comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds. *Journal Agriculture Food Chemistry*, n.52, p. 5192-5200, 2004.

- BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. *Quimica Nova*, v.33, n.1, p.229-239, 2010
- BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. Ciências Farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Itajaí, S.C.: UNIVALI, p.239, 2003.
- BURTNIK, O.J.; MROGINSKI, L.A. Regeneration of *Arachispintoi* (Leguminosae) plants through the *in vitro* culture of leaf tissue. *Oleagineux*, v.40, n.12, p.609-611, 1985.
- CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Science*, v.74, p. 2157-2184, 2004.
- CAPELL, T e CHRISTOU, P. Progress in plant metabolic engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, v.15, p.148-154, 2004.
- CARMO, F. M. da S.; BORGES, E. E. de L.; TAKAKI M. Alelopatia de extratos aquosos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer). *Acta botanica brasílica*. 21(3): 697-705. 2007.
- CARRER, H.; BARBOSA, A. L.; RAMIRO, D. A. Biotechnology in agriculture. *Estudos avançados* 24 (70), 2010.
- CARSWELL, A.E.; OLD, L.J.; KASSEL, R.L. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences, Washington*, v.72, p.3666-3670, 1975.
- CARVALHO, J. C. T. Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto, SP, *Tecmedd*, 2004.
- CASPI, R.; ALTMAN, T.; BILLINGTON, R.; DREHER, K.; FOERSTER, H.; FULCHER, C.A.; HOLLAND, T.A.; KESELER, I.M.; KOTHARI, A.; KUBO, A.; KRUMMENACKER, M.; LATENDRESSE, M.; MUELLER, L.A.; ONG, Q.; PALEY, S.; SUBHRAVETI, P.; WEAVER, D.S.; WEERASINGHE, D.; ZHANG, P.; KARP, P.D. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases. *Nucleic Acids Research*. v.42, p.459-471, 2014.
- CASTELLHEIM, A.; BREKKE, O-L.; ESPEVIK, T.; HARBOE, M. AND MOLLNES T. E. Innate Immune Responses to Danger Signals in Systemic Inflammatory Response Syndrome and Sepsis. *Scandinavian Journal of Immunology*, v.69, p.479-491, 2009.
- CHANWITHEESUK, A.; TEERAWUTGULRAG, A.; RAKARIYATHAM, N. Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. *Food Chemistry*, v. 92, p.491-497, 2005.
- CHARITHA, D. M.; REDDY, M. N. Phenolic acid metabolism of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) plants inoculated with VAM fungus and Rhizobium. *Plant Growth Regulation*, v.37, p.151-156, 2002.

- CHE, N.A, Y.T.; SHENB, Y.C.; CHANGA, M.C.; LU M.K. Precursor-feeding strategy on the triterpenoid production and anti-inflammatory activity of *Antrodia cinnamomea*. *Process Biochemistry*. v.51, n.8, p.941–949, 2016.
- CHO, Y-C.; KIM, H. J.; KIM, Y-J.; LEE, H. J. C.; LEE, I-S.; KANG, B. Y. Differential anti-inflammatory pathway by xanthohumol in IFN- $\gamma$  and LPS-activated macrophages. *International Immunopharmacology*, v.8, p.567-573, 2008.
- CHOU, S.C., KRISHNA, V., CHOU, C.H. Hydrophobic metabolites from *Rhododendron formosanum* and their allelopathic activities. *Nat Product Communication*. v.4, p.1189–1192. 2009.
- CHUNGI, M.; HAHN, S.J.; AHMAD, A. Confirmation of potential herbicidal agents in hulls of rice, *Oryza sativa*. *Journal of Chemical Ecology*, v.31, p. 1339–1352, 2005.
- CLARKSON, P. M.; THOMPSON, H. S. *Antioxidants*: what role do they play in physical activity and health. *American journal of Clinical Nutrition*, v.72, p. 637-646, 2000.
- COLEMAN, J.W. Nitric Oxide in immunity and inflammation. *International Immunopharmacology*, p.1397–1406, 2001.
- COLL, N.S.; EPPLE, P.; DANGL, J.L. Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death Differentiation*, v.18, n.8, p.1247-1256, 2011.
- COLOMBO. Utilizando adequadamente as plantas medicinais. Colombo: Herbarium, 2008.
- CONLEY, T.R.; PENG, H.P.; MINGH, C.S. Mutations affecting induction of glycolytic and fermentative genes during germination and environmental stresses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, v.119, p.599–608, 1999.
- COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F. AND COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. *Revista Virtual de Química*, v.1, n.3, p.241-256, 2009.
- CROTEAU R, KUTCHAN TM, LEWIS NG. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1250–1318.
- CRUVINEL, W. M.; MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Sistema imunitário – parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Revista Brasileira de Reumatologia*. v.50, n.4, p.434-461, 2010.
- CUCCO, M.; JAUME, A. Protocol for regeneration *in vitro* of *Arachis hypogaea* L. *Electronic Journal of Biotechnology*, v.3, n.2, 1-7, 2000.
- DAIMON, H.; MII, M. Multiple shoot formation and plantlet regeneration from cotyledonary node in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Japanese Journal of Breeding*, v.41, n.3, p.461-466, 1991.
- DA SILVA, W. D. AND MOTA, I. Bier Imunologia Básica e Aplicada. Ed. Guanabara Koogan, 5ª edição, Rio de Janeiro, RJ. 2003.



DENOUX, C.; GALLETI, R.; MAMMARELLA, N.; GOPALAN, S.; WERCK, D.; DE LORENZO, G.; FERRARI, S.; AUSUBEL, F.M.; DEWDNEY, J. Activation of defense response pathways by OGs and Flg22 elicitors in *Arabidopsis* seedlings. *Mol Plant*, v.1, p.423–445, 2008.

DIGHE, S.B.; KUCHEKAR, B.S.; WANKHEDE, S.B. Analgesic and anti-inflammatory activity of  $\beta$ -sitosterol isolated from leaves of *Oxalis corniculata*. *International Journal of Pharmacological Research*. v.6, n.3, 2016.

DOBIÁŠ, P.; PAVLÍKOVÁ, P.; ADAM, M.; EISNER, A.; BEŇOVÁ, B.; VENTURA, K. Comparison of pressurised fluid and ultrasonic extraction methods for analysis of plant antioxidants and their antioxidant capacity. *Central European Journal of Chemistry*. V.8, p.87-95, 2010.

DURIGAN, J.C. e ALMEIDA, F.L.S. Noções sobre alelopatia. Jaboticabal, FUNEP. 1993.

EDWARDS, C.; STRANGE, R. N. Separation and identification of phytoalexins from leaves of groundnut (*Arachis hypogaea*) and development of a method for their determination by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal Chromatography A*, n.547, p.185-193, 1991.

EDWARDS, C.; STRANGE, R. N.; COLE, D. L. Accumulation of Isoflavonoid Phytoalexins in Leaves of *Arachis hypogaea* Differing in Reaction to Rust (*Puccinia arachidis*) and Early Leafspot (*Cercospora arachidicola*). *Plant Pathology*, n.44, 573-579, 1995.

EHNESS, R. e ROITSCH, T. Co-ordinated induction of mRNAs for extracellular invertase and a glucose transporter in *Chenopodium rubrum* by cytokinins. *Plant Journal*, v.11, p.539–548, 1997.

ESCARPA, A.; GONZALEZ, M.C. An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. n.75, p.57-139, 2008.

FAO. 2014. Disponível em: <https://www.fao.org.br/download/PA20142015CB.pdf> Acesso em: 16/09/2015.

FARRÉ, G.; BLANCQUAERT, D.; CAPELL, T.; VAN DER STRACHTEN, D.; CHRISTOU, P.; AHU, C. Engineering complex metabolic pathways in plants. *Annual Review Plant Biology*, v.65, p.187-223, 2014

FENG, Q.; STALKER, H.T.; PATEE, H.E. Plant recovery of selfs and interspecific hybrids of *Arachis* by *in vitro* culture of peg tips. *Crop Science*, v.36, n.6, p.1660-1666, 1996.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Londrina, v.12, p.175-204, 2000

FERNÁNDEZ, A., KRAPOVICKAS, A.: Cromosomas y evolución em *Arachis* (*Leguminosae*). *Bonplandiav*. v.8, p.187-220, 1994.

Flick. 2011. Disponível em: <http://www.flickr.com/photos/mercadanteweb/page25/>. Acesso em: 19 de dez. 2011.

- FORMISANO, C.; RIGANO, D.; SENATORE, F.; FEO, V.; BRUNO, M., ROSSELLI, S. Composition and allelopathic effect of essential oils of two thistles: *Cirsium creticum* (Lam.) D.'Urv. ssp. *triumfetti* (Lacaita) Werner and *Carduus nutans* L. *Journal of Plant Interactions*, v.2, n.2, p.115-120, 2007.
- FRASER, J.D.; URBAN, R.G.; STROMINGER, L.; ROBINSON, H. Zinc regulates the function of two superantigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, n.89, p.5507-5511, 1992.
- FREITAS, A.M.; SIRTORI, C. e PERALTA-ZAMORA, P.G. Avaliação do potencial de processos oxidativos avançados para remediação de águas contaminadas com geosmina e 2-mib. *Química Nova*, v.31, n.1, p.75-78, 2008.
- FREITAS, F.O. Ampliação da área de ocorrência da espécie *Arachis villosulicarpa* Hoehne. *Comunicado Técnico*, n.106, maio 2004.
- GAESTEL, M.; KOTLYAROV, A. AND KRACHT, M. Targeting innate immunity protein kinase signalling in inflammation. *Nature Reviews Drug Discovery*, v.8, p.480-499, 2009.
- GAGLIARDI, R.F.; PACHECO, G.P.; COCULILO, S.P.; VALLS, J.F.M.; MANSUR, E. *In vitro* plant regeneration from seed explants of wild groundnut species (Genus *Arachis*, Section *Extranervosae*). *Biodiversity and Conservation*. v.9, p.943-951, 2000.
- GAGLIARDI, R.F.; PACHECO, G.P.; VALLS, J.F.M.; MANSUR, E. Germplasm preservation of wild *Arachis* species through culture of shoot apices and axillary buds from *in vitro* plants. *Biologia Plantarum*. v.45, n.3, p.353-357, 2002.
- GARCIA, L.C. Cultura de tecidos e análise fitoquímica de *Arachis repens* HANDRO. 2012. 73 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes; Universidade do Estado do Rio de Janeiro; Rio de Janeiro; 2012.
- GAYDOU, E. M.; BIANCHINI, J. P.; RATOVOHERY, J. V. Triterpene alcohols, methylsterols, sterols, and fatty acids in five Malagasy legume seed oils. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. n.31, 833-836, 1983.
- GENG, L.; NIU, L.; SHU, C.; SONG, F.; HUANG, D.; ZHANG, J. High-efficiency regeneration of peanut (*Arachis hypogaea* L.) plants from leaf discs. *African Journal of Biotechnology*. v.10, n.59, p.12680-12682, 2011.
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; GEERT-JAN K. Plant propagation by tissue culture. 3<sup>rd</sup>. Dordrecht, Netherlands; Norwell, MA, U.S.A.: Springer, 2008. (Volume 1- The Background).
- GOTTLIEB, O.R. Micromolecular, evolution, systematics and ecology: an essay into a novel botanical discipline, Berlin: Springer-Verlag, p.170, 1982.
- GOTTLIEB, O.R.; BORIN, M.R.M.B. Químico-biologia quantitativa: um novo paradigma? *Química Nova*. v.35, n.11, p.2105-2114, 2012.

- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, 1998. v. 1, p. 183-242.
- GROSSO, N. R.; ZYGADLO, J. A.; BURRONI, L. V.; GUZMAN, C. A. Fatty acid, sterol and proximate compositions of peanut species (*Arachis L.*) seeds from Bolivia and Argentina. *Grasas Y Aceites*, n.48, p.219-225, 1997.
- GROSSO, N. R.; NEPOTE, V.; GUZMAN, C. A. Chemical 533 composition of some wild peanut species (*Arachis L.*) seeds. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 48, p.806-9, 2000.
- GUOHAO HE, NOELLE A. BARKLEY, YONGLI ZHAO, MEI YUAN, e C.S. PRAKASH. Phylogenetic relationships of species of genus *Arachis* based on genic sequences. *Genome*, 57: 327–334, 2014.
- GUPTA, A.; SINGHAL, G.S. Effect of sodium and calcium chlorides, abscisic acid and proline on callus cultures of *Arachishypogaea L.* *Biologia Plantarum*, v.38, n.4, p.525-529, 1996.
- GUZIK, T. J.; KORBUT, R. AND ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *Journal of Physiology and Pharmacology*, v.54, p.469-487, 2003.
- HARDHAM, A.R.; JONES, D.A.; TAKEMOTO, D. Cytoskeleton and cell wall function in penetration resistance. *Current Opinion in Plant Biology*. v.10, n.4, p.342-348, 2007.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4<sup>a</sup> ed., Oxford University Press, 2007.
- HAMMONS, R. O. The origin and history of the groundnut. In: SMARTT, J. *The Groundnut Crop. A scientific basis for improvement*. London: Chapman e Hall, 1994. cap. 2, p.24-42.
- HARBORNE, J.B. Plant phenolics. In: E.A. Bell e B.V. Charlwood (eds.). *Secondary Plant Products. Encyclopaedia of Plant Physiology*. v. 8. Berlin, SpringerVerlag. A. Pirson e M.H. Zimmermann (orgs.). Pp. 329-395. 1980.
- HARPER, J.R. e BALKE, N.E. Characterization of the Inhibition of K<sup>+</sup> Absorption in Oat Roots by Salicylic Acid. *Plant Physiology*. V.68, p.1349-1353, 1981.
- HASAN, M. M.; CHA, M.; BAJPAI, V. K.; BAEK, K-H. Production of a major stilbene phytoalexin, resveratrolin peanut (*Arachis hypogaea*) and peanut products: a mini review. *Review Environmental Scienci Biotechnology*, v.12, p.209–221, 2013.
- HEIL, M e BALDWIN, I.T. Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. *Trends Plant Science*, v.7, n.2, p.61-7, 2002.
- HERNÁNDEZ-TERRONES, M.G.; MORAIS, S.A.L.; FERREIRA, S.; SANTOS, D.Q.; NASCIMENTO, E.A.; CHANG, R. Phytochemistry and allelopathic study of pterodon emarginatus stem extract (*Pterodon emarginatus*). *Planta Daninha*, Viçosa-MG, v.25, n.4, p.755-762, 2007.

HIGAKI, K.; LI, L.; BAHRUDIN, U.; OKUZAWA, S.; TAKAMURAM, A.; YAMAMOTO, K.; ADACHI, K.; PARAGUISON, R.C.; TAKAI, T.; IKEHATA, H.; TOMINAGA, L.; HISATOME, I.; IIDA, M.; OGAWA, S.; MATSUDA, J.; NINOMIYA, H.; SAKAKIBARA, Y.; OHNO, K.; SUZUKI, Y.; NANBA, E. Chemical chaperone therapy: chaperone effect on mutant enzyme and cellular pathophysiology in  $\beta$ -galactosidase deficiency. *Hum Mutation*, v.32, p.843–52, 2011.

HILLIS, W.E.; HART, J.H. e YAZAKI, Y. Polyphenols of *Eucalyptus sideroxylon*. *Phytochemistry* (Oxford), v.13, n.8, p. 1591-1959, 1974.

HOFMAN, C. L. *The Native Population of Pre-columbian Saba. Pottery Styles and their Interpretations*. Tese (Ph.D. Dissertation) - University Leiden, Faculty of Archaeology, Leiden, 1993. Pt. 1.

HOLLAND, K.; BALOTA, M.; EIGEL, W.; MALLIKARJUNAN, P.; TANKO, J.; ZHOU, K.; O'KEEFE, S. ORAChromatography and total phenolics content of peanut root extracts. *Journal of Food Science*, v.76, n.3, p.380-384, 2011.

ILAHY, I.; AMEEN, S. Studies on *in vitro* culture of *Arachishypogaea* hypocotyl explants. *Pakistan Journal of Botany*, v.18, n.1, p.21-27, 1986.

INDERJIT e KEATING, K.I. Allelopathy: principles, procedures, processes, and promises for biological control. *Advances in Agronomy*. 67:141–231. 1999

INDERJIT e DUKE, S. O. Ecophysiological aspects of allelopathy. *Planta* 217: 529-539. 2003.

INGHAM, J. L. 3,5,4'-trihydroxystilbene as a phytoalexin from groundnuts (*Arachis hypogaea*). *Phytochemistry*, n.15, 1791-1793, 1976.

INOUE, M.H.; SANTANA, D.C.; VILHENA, K.S.S.; SOUZA FILHO, A.P.S.; GUILHON, G.M.S.P.; POSSAMAI, A.C.S.; SILVA, L.E.; DALLACORT, R. Avaliação do potencial alelopático de substâncias isoladas em sementes de araticum (*annona crassiflora*). *Planta Daninha*, Viçosa-MG, v. 28, n.4, p.735-741, 2010.

ISAAA. 2010. Available at: <<http://www.isaaa.org>>.

JAMES, C. Global status of Commercialized Biotech/GM Crops. The First Fourteen Years, 1996 to 2009. In: international service for the acquisition of agri-Biotech applications. Ithaca, New York, 2010.

JANG, M.; CAI, L.; UDEANI G.O.; SLOWING, K.V.; THOMAS, C.F.; BEECHER, C.W.W.; FONG, H.H.; FARNSWORTH, N.R.; KINGHORN, A.D.; METHA, R.G.; MOON, R.C. ; PEZZUTO, J.M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, n.275 p.218–220, 1997.

JÁUREGUI, O.; GALCERAN, M.T. *Handbook of Analytical Separations*; University of Barcelona: Barcelona, Spain; Chapter 6, p.196, 2001.

JHA, S.D.; SANYAL, B.; GHOSH, T.; JHA, B. Improved taxol yield in cell suspension culture of *Taxus wallichiana* (Himalayan yew). *PlantaMedical*, v.64, p.270-272, 1998.

- JIMÉNEZ-GONZÁLEZ, L.; ÁLVAREZ-CORRAL, M.; MUÑOZ-DORADO, M.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, I. Pterocarpan: interesting natural products with antifungal activity and other biological properties. *Phytochemical Reviews*. v.7, p.125-154, 2008.
- JONES, J.D.G.; DANGL, J.L. The plant immune system. *Nature*, v.444, p.323–329, 2006.
- JUNAID, A.; NASIM, S.A.; MUJIB, A.; SHARMA, M.P. Screening of vincristine yield in *ex vitro* and *in vitro* somatic embryos derived plantlets of *Catharanthus roseus* L. (G.) Don. *Scientia Horticulturae*, v.119, p.325-329, 2009.
- KANGASJARVI, S.; NEUKERMANS, J.; LI, S.; ARO, E.M.; NOCTOR, G. Photosynthesis, photorespiration, and light signalling in defence responses. *Journal of Experimental Botany*, v.63, p.1619–1636, 2012.
- KANYAND, M.; DESSAI, A.P.; PRAKASH, C.S. Thidiazuron promotes high frequency regeneration of peanut (*Arachis hypogaea*) plants *in vitro*. *Plant Cell Reports*, v.14, p.1-5, 1994.
- KARUPPUSAMY, S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants Research*, v.3, n.13, p.1222-1239, 2009.
- KATO-NOGUCHI, H., YAMAMOTO, M., TAMURA, K., TERUYA, T., SUENAGA, K., e FUJII, Y. Isolation and identification of potent allelopathic substances in rattail fescue. *Plant Growth Regulation*, 60(2), 127-131, 2010.
- KATO-NOGUCHI, H.; HAMADA, N.; CLEMENTS, D.R. Phytotoxicities of the invasive species *Plantago major* and non-invasive species *Plantago asiatica*. *Acta Physiol Plant*, v.37, p.60, 2015.
- KERRIDGE, P.C.; HARDY, B. *Biology and agronomy of forage Arachis*. Cali, Colombia: CIAT, 1994.
- KIM, J. S.; LEE, S. Y.; PARK, S. U. Resveratrol production in hairy root culture of peanut, *Arachis hypogaea* L. transformed with different *Agrobacterium rhizogenes* strains. *African Journal of Biotechnology*, n.7, p.3788-3790, 2006.
- KIM, S. H.; CHO, J. M.; LEE, E. O.; LEE, H. J.; KIM, K. H.; AHN, K. S.; SHIM, B. S.; KIM, N. I.; SONG, M. C.; BAEK, N. Identification of Campesterol from *Chrysanthemum coronarium* L. and its Antiangiogenic Activities. *Phytotherapy Research*.v.21, p.954–959. 2007.
- KIM, H.J.; WAATAJA J.J.; THAYER S.A. Cannabinoids inhibit networkdriven synapse loss between hippocampal neurons in culture. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, n.325, p.850– 858, 2008.
- KLEJDUSA, B.; KOPECKÝ, J.; BENESOVÁ, L.; VACEKA, J. Solid-phase/supercritical-fluid extraction for liquid chromatography of phenolic compounds in freshwater microalgae and selected cyanobacterial species. *Journal Chromatography. A*.v.1216,p.763-771.2009.
- KRAPOVICKAS, A.; SIMPSON, C.E. ; VALLS, J.F. *Arachis villosulicarpa* (Leguminosae), un proceso de domesticación aislado. In: CONGRESO ARGENTINO DE GENÉTICA, 16, 1985. *Anais...* [S.l.:s.n.], 1985.

- KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, W. C. Taxonomia del gênero *Arachis* (Leguminosae) *Bonplandia*, v.8, p.1-186, 1994.
- KRAPOVICKAS, A., AND GREGORY, W.C. Taxonomy of the genus *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia*, 16(Suppl.): 1–205, 2007.
- KUBO, M.; KIMURA, Y.; SHIN, H.; HANEDA, T.; TANI, T. e NAMBA, K. Studies on the antifungal substance of crude drug: 2. On the roots of *Polygonum cuspidatum* (Poligonaceae). *Shoyakugaku Zasshe*, v.35, n.1, p.58-61, 1981.
- KUVA, M.A.; GRAVENA, R.; PITELLI, R.A.; CHRISTOFFOLETI, P.J. e ALVES, P.L.C.A. Períodos de interferência das plantas daninhas na cultura dacana-de-açúcar. III – capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) e capim-colonião (*Panicum maximum*). *Planta Daninha*, Viçosa-MG, v.21, n.1, p.37-44, 2003.
- LAMEGO, F. P.; CARATTI, F. C.; REINEHR, M.; GALLON, M.; LUIS-SANTI, A.; BASSO, C. J. Potencial de supressão de plantas daninhas por plantas de cobertura de verão. *Comunicata Scientiae*, v.6, n.1, p.97-105, 2015.
- LANGCAKE, P.; CORNFORD, C. A.; PRYCE, R. J. Identification of pterostilbene as a phytoalexin of *Vitis vinifera* leaves. *Phytochemistry*, v.18, n.6, p.1025-1028, 1979.
- LAVIA, G.I. Karyotypes of *Arachis palustris* and *A. praecox* (section *Arachis*), two species with basic chromosome number  $x=9$ . *Cytologia*, v.63, p.177–181, 1998.
- LEE, J. H.; BAEK, I. Y.; KANG, N. S.; KO, J. M.; KIM, H. 483 T.; JUNG, C. S.; PARK, K. Y.; AHN, Y. S.; SUH, D. Y.; HA, T. J. Identification of phenolic compounds and antioxidant effects from the exudate of germinating peanut (*Arachis hypogaea*). *Food Science Biotechnology*, n.16, p.29-36, 2007.
- LENARDÃO, E. J.; FREITAG, R. A.; BATISTA, A. C. F.; DEABDOUB, M. J.; SILVEIRA, C. C. “GREEN CHEMISTRY” – os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. *Química Nova*, v.26, n.1, p.123-129, 2003
- LI, Z.-H.; WANG, Q.; RUAN, X.; PAN, C.-D.; JIANG, D.-A. Phenolics and Plant Allelopathy. *Molecules*, v.15, p.8933-8952, 2010.
- LIMA A.R, BARBOSA V.C, SANTOS FILHO P.R, GOUVÊA C.M.C.P. Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v.16, p.531-536, 2006.
- LITTLE, E. L.; MAGBANUA, Z. V.; PARROT, W. A. A protocol for repetitive somatic embryogenesis from mature peanut epicotyls. *Plant cell Reports*, v. 19, p. 351-357, 2000.
- LIU, J.; WANG, G.; WANG, G. Chemical constituents in aerial parts of *Arachis hypogaea* (III). *Chinese Traditional Patent Medicine*, v.31, p. 1902-1903, 2009.
- LOCKSLEY, R.M.; KILLEEN, N.; LEONARDO, M.J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. v.104, n.4, p.487-501, 2001.

- LOPES, R. M.; AGOSTINI-COSTA, T. S.; GIMENES, M. A.; SILVEIRA, D. Chemical Composition and Biological Activities of *Arachis* Species. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*. v.59, p.4321–4330, 2011.
- LUSTER, A. D.; ALON, R. e VON ANDRIAN, U. H. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nature Immunology*, v.6, p.1182-1190, 2005.
- MACÍAS, F.A., SIMONET, A.M., GALINDO, J.C. Bioactive steroids and triterpenes from *Melilotus messanensis* and their allelopathic potential. *Journal of Chemical Ecology*. v.23, p.1781–1803. 1997.
- MACIAS, F.A., VARELA, R.M., TORRES, A., OLIVA, R.M. AND MOLINILLO, J.M.G. Bioactive Norsesquiterpenes from *Helianthus Annuus* with Potential Allelopathic Activity. *Phytochemistry*, v.48, p.631-636, 1998.
- MACIAS, F.A., TORRES, A., GALINDO, J.L.G., VARELA, R.M., ALVAREZ, J.A. AND MOLINILLO, J.M.G. Bioactive Terpenoids from Sunflower Leaves Cv. Peredovick. *Phytochemistry*, v.61, p.687-692, 2007.
- MACÍAS, F.A., J.M.G. MOLINILLO, R.M. VARELA AND J.G.G. GALINDO. Allelopathy –a natural alternative for weed control. *Pest Management Science*. v.63: p.327-348, 2007.
- MAHUGO, C.; SOSA, Z.; TORRES, M.E.; SANTANA, J.J. Methodologies for the extraction of phenolic compounds from environmental samples: new approaches. *Molecules*, v.14, p.298-320, 2009.
- MLAKAR, S.G.; JAKOP, M.; BAVEC M.; BAVEC, F. Allelopathic effects of *Amaranthus retroflexus* and *Amaranthus cruentus* extracts on germination of garden cress. *African Journal of Agricultural Research*. v.7, n.10, p.1492-1497, 2012.
- MALLIK, M. A. B.; WILLIAMS, R. D. Allelopathic growth stimulation of plants and microorganisms. *Allelopathy Journal*, v.16, p.175-198, 2005.
- MANSUR, E.; LACORTE, C.; RABELLO, A.; CORDEIRO, A. *In vitro* regeneration of *Arachis villosulicarpa* Hoehne from cotyledon segments, leaves and cell suspension. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.28, n.10, p.1143-1146, 1993.
- MATOK, H., LESZCZYNSKI, B., CHRZANOWSKI, G., SEMPRUCH, C. Effects of walnut phenolics on germination of dandelion seeds. *Allelopathy Journal*. v.24, p.177–182, 2009.
- MATSUMOTO, T.; JEONG, T. M.; ITOH, T.; TAMURA, T. Analysis of sterol fractions from twenty vegetable oils. *LIPIDS*, v.9, n.11, 1974
- MAXWELL, D.G. *Measuring food insecurity. The frequency and severity of "coping strategies"*. Washington, DC: International Food Policy Research Institute. (Discussion Paper n.8)1995.
- MCKENTLY, A.H. *In vitro* plant regeneration of peanut from seed explants. *Crop Science*, v.30, n.1, p.192-196, 1990.

- MCKENTLY, A.H. Regeneration of peanut and perennial peanut from cultured leaf tissue. *Crop science*, v.31, n.3, p.833-837, 1991.
- MESCHEDE, D.K.; VELINI, E.D.; CABONARI, C.A. Baixas doses de glyphosate e seus efeitos no crescimento de *Commelia benghalensis*. *Revista Brasileira de Herbicidas*, v.7, n.2, p.53-58, 2008.
- MESQUITA JR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S. de.; SILVA, N. P. da.; ANDRADE, L. E. C.; CRUVIEL, W de M. Aspectos celulares e moleculares da inflamação. Sinopse de Reumatologia, São Paulo, p.66-81, 2008.
- MIRANDA, C.H.B.; VIEIRA, A.; CADISCHI, G. Determinação da Fixação Biológica de Nitrogênio no Amendoim Forrageiro (*Arachis* spp.) por Intermediário da Abundância Natural de <sup>15</sup>N. *Revista Brasileira Zootecnia*, v.32, n.6, p.1859-1865, 2003.
- MMA. 2016. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/mma-em-numeros/biodiversidade-flora>>. Acesso em: 17 de out. 2016.
- MONQUERO, P.A.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; MATAS, J.A.; HEREDIA, A. Caracterização da superfície foliar e das ceras epicuticulares em *Commelina benghalensis*, *Ipomoea grandifolia* e *Amaranthus hybridus*. *Planta Daninha*, v.22, n.2, p.203-210, 2004.
- MOREIRA D.L, ENGELHARDT R.L, REIS A.S, SANCHES E.M, LEITÃO S.G, LEITÃO G.G. Substâncias fenólicas com atividade antioxidante de *Pseudopiptadenia contorta* (Leguminosae-Mimosoideae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.12, p.124-125, 2002.
- MORETZSOHN, M.C., GOUVEA, E.G., PETER, W.I., LEAL-BERTIOLI, C.M.S., VALLS, J.F.M., AND BERTIOLI, D.J. A study of the relationships of cultivated peanut (*Arachis hypogaea*) and its most closely related wild species using intron sequences and microsatellite markers. *Annals of Botany*. v.111, p.113–126, 2013.
- MOZETO, A. A.; JARDIM, W. F.; *Química Nova*. v.25 – Supl. 1, p.7, 2002.
- MROGINSKI, L.A.; FERNANDEZ, A. *In vitro* culture of anthers from species of *Arachis* (Leguminosae). *Oleagineux*, v.35, p.243-248, 1979.
- MROGINSKI, L.A.; KARTHA, K.K.; SHYLUK, J.P. Regeneration of peanut (*Arachishypogaea* L.) plantlets by *in vitro* culture of immature leaves. *Canadian Journal of Botany*, p.828-830, 1981.
- MROGINSKI, E.; REY, H.Y.; GONZALEZ, A.M.; MROGINSKI, L.A. Thidiazuron promotes *in vitro* plant regeneration of *Arachis correntina* (Leguminosae) via Organogenesis. *Journal of Plant Growth Regulation*, v.23, p.129-134, 2004.
- MYSORE, K.S.; RYU, C.M. Nonhost resistance: how much do we know? *Trends Plant Science*, v.9, p.97–104, 2004.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, v.15, n.3, p.473-497, 1962.



NACZK, M.; WILLIAMS, J.; BRENNAN, K.; LIYANAPATHIRANA, C.; SHAHIDI, F. Compositional characteristics of green crab (*Carcinus maenas*). *Food Chemistry*, v.88, n.3, p.429-434, 2004.

NAKANO, H.; NAKAJIMA, E.; FUJII, Y.; SHIGEMORI, H.; HASEGAWA, K. Structure-activity relationships of alkaloids from mesquite (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC.). *Plant Growth Regulation*, v.44, p.207-210, 2004.

NASCIMENTO, R. R. G.; MONTEIRO, J. A.; PIMENTA, A. T. A.; TREVISANA, M. T. S.; BRAZ-FILHO, R.; DE SOUZA, E. B.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S. Novos flavonoides de *Margaritopsis Carrascoana* com atividade antioxidante. *Química Nova*, v.38, n.1, p.60-65, 2015

NAZIR, F.; HASSAN, M.; AKRAM, Z.; JAVED, M.; ALI, S.; ALI, G.; ZAFAR, Y. *In vitro* regeneration of Pakistani peanut (*Arachis hypogea* L.) varieties using de-embryonated cotyledonary explants. *African Journal of Biotechnology*, v.10, n.43, p.8599-8604, 2011.

NIKI, E., NOGUSHI, N., TSUCHIHASHI, H., GOTOH, N. Interaction among vitamin C, vitamin E, and b-carotene. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.62, n.6, p.1322-1326, 1995.

NUR, E.; BIEMOND, B.J.; OTTEN, H.M.; BRANDJES, D.P.; SCHNOQ, J.J. Oxidative stress in sickle cell disease; pathophysiology and potential implications for disease management. *American journal of hematology*, v.86, n.6, p.484-489, 2011.

OHNO, S.; TOMITA-YOKOTANI, K.; KOSEMURA, S.; NODE, M.; SUZUKI, T.; AMANO, M.; YASUI, K.; GOTO, T.; YAMAMURA, S. E HASEGAWA, K.; A species – selective allelopathic substance from germinating sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds. *Phytochemistry*. v.56, 2001.

OHR, L. M. Fats for healthy living. *Food technology*, v.57, n.7, p.91-96, 2003.

OLIVEIRA, S. C. C. Estudo alelopático de espécies do gênero *Solanum* Distrito Federal. 2009. 180f. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

ONO, K.; HIROHATA, M.; YAMADA, M. Ferulic acid destabilizes preformed b- amyloidi fibrils *in vitro*. *Biocheical and Biophysical Research Communications*, v.36, p.444-449, 2005.

ORACZ, K.; VOEGELE, A.; TARKOWSKA´ D.; JACQUEMOUD, D.; TUREC´KOVA´ V.; URBANOVA´ T.; STRNAD, M.; SLIWINSKA, E.; LEUBNER-METZGER, G. Myriganone A inhibits *Lepidium sativum* seed germination by interference with gibberellin metabolism and apoplastic superoxide production required for embryo extension growth and endosperm rupture. *Plant Cell Physiology*, v.53, p.81-95, 2012.

PACHECO, G.; GAGLIARDI, R.F.; CARNEIRO, L.A.; CALLADO, C.H.; VALLS, J.F.M.; MANSUR, E. The role of BAP in somatic embryogenesis induction from seed explants of *Arachis* species from Section *Erectoides* and *Procumbentes*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.88, n.2, p.121-126, 2007.

- PACHECO, G.; GAGLIARDI, R.F.; VALLS, J.F.M.; MANSUR, E. Micropopagation and *in vitro* conservation of wild *Arachis* species. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*. v.99, p.239-249, 2009.
- PASSOS, R.; CARO, M.S.B.; MARSCHIN, M. A saúde vem embalada em garrafas de vinho. *Ciência Hoje*, v.29, n.173, p.88-89, 2001.
- PATEH, U. U.; HARUNA, A. K.; GARBA, M.; ILIYA, I.; SULE, I. M.; ABUBAKAR, M. S.; AMBI A.A. ISOLATION OF STIGMASTEROL,  $\beta$ -SITOSTEROL AND 2-HYDROXYHEXADECANOIC ACID METHYL ESTER FROM THE RHIZOMES OF *Stylochiton lancifolius* PYER AND KOTCHY (ARACEAE). *Nigerian Journal of Pharmaceutical Sciences*. v.7, n.1, March, 2008.
- PATOCKA, J. "Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification". *Journal of Applied Biomedicine*, v.1, p.7-12, 2003.
- PEGUERO, G., LANUZA, O.R., SAVE' R, ESPELTA, J.M. Allelopathic potential of the neotropical dry-forest tree *Acacia pennatula* Benth.: inhibition of seedling establishment exceeds facilitation under tree canopies. *Plant Ecology*. v.213, p.1945–1953, 2012.
- PEÑALOZA, A.P., POZZOBON, M.T., VALLS, J.F.M.: Cytogenetic findings in wild species of *Arachis* (Leguminosae). - *Revista Brasileira de Genética*. v.19, p.129, 1996.
- PEÑALOZA, A.P.S., AND VALLS, J.F.M. Chromosome number and satellite chromosome morphology of eleven species of *Arachis* (Leguminosae). *Bonpladia*, v.15, p.65–72, 2005.
- PENNICA, D. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature*. v.312, p.724-9, 1984.
- PENNINGTON, B. F. *The development of psychopathology*. New York: Guilford. 2002.
- PERON, F; BONINI, E. A. Contribuição alelopática de extrato de leucena na germinação e desenvolvimento inicial de soja. VI Mostra Interna de Trabalhos de Iniciação Científica, 2012.
- PHILLIPS, K. M.; RUGGIO, D. M.; ASHRAF-KHORASSANI, M. Phytosterol composition of nuts and seeds commonly consumed in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, p.9436-9445, 2005.
- PINTO, M.C.; GARCÍA-BARRADO, J.A.; MACÍAS, P. Resveratrol is a Potent Inhibitor of the Dioxygenase Activity of Lipoxygenase. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v.47, p.4842-4846, 1999.
- POLLIO, A.; PINTO, G.; LIGRONE, R.; ALIOTTA, G. "Effects of the Potential Allelochemical  $\alpha$ -asarone on Growth, Physiology and Ultrastructure of Two Unicellular Green Algae." *J Appl Phycol Journal of Applied Phycology*. v.5.4, p.395-403, 1993.
- PRADO, A. G. S. Química verde, os desafios da química do novo milênio. *Química Nova*, v.26, n.5, p.738-744, 2003

QUADER, MD. A.; KHATUN, M.; BILLAH, M. Sterols and Sterol Glucoside from *Phyllanthus* Species. *Dhaka University Journal Science*. v.60, n.1, p.5-10, 2012.

RAGAB, A., THOMPSON, E.C., TRAVERS, A.A. High mobility group proteins HMGD and HMGZ interact genetically with the Brahma chromatin remodeling complex in *Drosophila*. *Genetics*, v.172, n.2, p.1069-1078, 2006.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. AND FLOWER, R. J. *Farmacologia*. Ed. Elsevier, 6ª edição, Rio de Janeiro, RJ. 2007.

REY, H.Y.; SCOCCHI, A.M.; GONZALEZ, A.M.; MROGINSKI, L.A. Plant regeneration in *Arachis pintoi* (Leguminosae) through leaf culture. *Plant Cell Reports*, v.19, p.856-862, 2000.

REY, H.Y.; MROGINSKI, L.A. Somatic embryogenesis and plant regeneration in diploid and triploid *Arachis pintoi*. *Biologia Plantarum*, v.50, n.1, p.152-155, 2006.

RICE, E.L. Allelopathy. 2<sup>nd</sup>. New York, Academic Press. 1984.

RITCHIE, S.; GILROY, S. Gibberellins: regulation of genes and germination. *New Physiology*, v.140, p.363–383, 1998.

RIZVI, S.J.H.; HAQUE, H.; SINGH, U.K. e RIZVI, S.J.H. A discipline called allelopathy. Pp. 1-10. In: S.J.H. Rizvi e H. Rizvi (eds.). *Allelopathy: Basic and Applied Aspects*. Londres, Chapman e Hall. 1992.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. *Fundamentos de Robbins – Patologia Estrutural e Funcional*. Ed. Guanabara Koogan, 6ª edição. Rio de Janeiro, RJ. 2001.

ROBLEDO, G., AND SEIJO, G. Species relationships among the wild B genome of *Arachis* species (section *Arachis*) based on FISH mapping arrangement. *Theoretical and Applied Genetics*. v.121, p.1033–1046, 2010.

ROCHA, S., GARCIA, L. Chemical mediators of the acute inflammatory reaction. In: *International series of monographs in pure and applied biology. Modern Trends In Physiological Sciences*. v.37, p.1-47, 2006

ROJAS, C.; HERNANDEZ, A.J.; SARMA, K.; LEE, J.T. Regulatory Interactions between RNA and Polycomb Repressive Complex 2. *Molecular Cell*, v.55, p.171–185, 2014.

ROLFS, C.H.; FRITZEMEIER, K.H.; KINDL, H. Cultured cells of *Arachis hypogaea* susceptible to induction of stilbene synthase (resveratrol-forming). *Plant Cell Reports*, v.1, p.83-85, 1981.

RUAN, G.H.; LI, G.K.J. The study on the chromatographic fingerprint of *Fructus xanthii* by microwave assisted extraction coupled with GC-MS. *Journal of Chromatography B*, v.850, p.241–248, 2007.

RUÈGG, C. Leukocytes, inflammation, and angiogenesis in cancer: fatal attractions. *Journal of Leukocyte Biology*, v.80, p.682-684, 2006.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007.

RUSSO, S.L.; VARNELL, R.J. *In vitro* responses of peanut tips to 2,4D and Kinetin. *CropScience*, v.37, p.34-36, 1978.

SAIKO, P.; SZAKMARY, A.; JAEGER, W.; SZEKERES, T. Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? *Mutation Research Review*, v. 658, n.1-2, p. 68-94, 2008.

SAKAMOTO, K.P. Detecção imunoistoquímica de linfócitos t (CD3+) e B (CD79+) no encéfalo de cães com leishmaniose visceral e presença de anticorpos séricos anti-*toxoplasma gondii* e anti-*neospora caninum*. Universidade Estadual Paulista, “Júlio De Mesquita Filho” Faculdade de Odontologia e Curso De Medicina Veterinária, Campus de Araçatuba, 2009.

SALUJA, A. e KAMBOJ, A. Isolation of stigmasterol and  $\beta$ sitosterol From petroleum ether extract of Aerial parts of *ageratum conyzoides* (asteraceae). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. v.3, n.1, 2011.

SAMARTH, R.M.; PANWAR, M.; KUMAR, M.; SONI, A.; KUMAR, M.; KUMAR, A. Evaluation of antioxidant and radicalscavenging activities of certain radioprotective plant extracts. *Food and Chemical*, v.106, p.868-873, 2008.

SANTOS, R. M.; VIEIRA, F. A.; FAGUNDES, M.; NUNES, Y. R. F.; GUSMÃO, E. Riqueza e similaridade florística de oito remanescentes florestais no norte de Minas Gerais, Brasil. *Revista Árvore*, v.31, n.1, p.135-144. 2007.

SARAIVA, T. S. Investigação de efeitos alelopáticos de espécies do gênero *arachis*. Universidade Estadual Paulista “JULIO DE MESQUITA FILHO”. Faculdade De Ciências Agronomicas. Campus de Botucatu. 2010.

SASTRI, D.C.; NALINI, M.S.; MOSS, J.P. Tissue culture and prospects for improvement of *Arachishypogaea* and other oil seed crops. *Tissue Culture of Economically Important Plants*, v.31, p.42-57, 1981.

SAUTTER, C.K.; DENARDIN, S.; ALVES, A.O.; MALLMANN, C. A.; PENNA, N.G.; HECKTHEUER, L.H. Determinação de Resveratrol em sucos de uva no Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.25, n.3, p.437-442, 2005.

SAXENA, P.K.; MALIK, K.A.; GILL, R. Induction by thidiazuron of somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut. *Planta*, v.87, n.3, p.421-424, 1992.

SCHEIDELER, M.; SCHLAICH, N.L.; FELLEBERG, K.; BEISSBARTH, T.; HAUSER, N.C.; VINGRON, M.; SLUSARENKO, A.J.; HOHEISEL, J.D. Monitoring the switch from housekeeping to pathogen defense metabolism on *Arabidopsis thaliana* using cDNA arrays. *Journal Biology Chemical*, v.277, p.10555-10561, 2002.

- SCHOLLES, J.D.; ROLFE, S.A. Photosynthesis in localised regions of oat leaves infected with crown rust (*Puccinia coronata*): quantitative imaging of chlorophyll fluorescence. *Planta*, v.199, p.573–582, 1996.
- SELLARS, R.M.; SOUTHWARD, G.M.; PHILLIPS, G.C. Adventitious somatic embryogenesis from cultured immature zygotic embryos of peanut and soybean. *Crop Science*, v.30, n.2, p.408-414, 1990.
- SENTHIL-KUMAR, M.; MYSORE, K. S. Nonhost resistance against bacterial pathogens: retrospectives and prospects. *Annual Review Phytopathology*, v.51, p.407–427, 2013.
- SERHAN, C.N., BRAIN, S.D., BUCKLEY, C.D., GILROY, D.W., HASLETT, C., O'NEILL, L.A., PERRETTI, M., ROSSI, A.G., WALLACE, J.L. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB Journal*. v.21, p.325-32. 2007.
- SERHAN, C. N.; CHIANG, N. AND VAN DYKE T.E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nature Reviews*, v.8, p.349-361, 2008.
- SHAN, L.; TANG, G.; XU, P.; LIU, Z.; BI, Y. High efficiency *in vitro* plant regeneration from epicotyls explants of Chinese peanut cultivars. *In vitro Cellular Developmental Biology-Plant*, v.45, p.525-531, 2009.
- SHENG, Y.; CHEN, X. B. Isolation and identification of an isomer of  $\beta$ -sitosterol by HPLC and GC-MS. *Health*. v.1, p.203-206, 2009.
- SHIN, E. C.; PEGG, R. B.; PHILLIPS, R. D.; EITENMILLER, R. R. Commercial Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Cultivars in the United States: Phytosterol Composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.58, p.161-167, 2010.
- SMARTT, J., GREGORY, W., AND GREGORY, M. The genomes of *Arachis hypogaea*. L. Cytogenetic studies of putative genome donors. *Euphytica*, v.27, p.665–675, 1978.
- SOBOLEV, V. S.; GUO, B. Z.; HOLBROOK, C. C.; LYNCH, R. E. Interrelationship of phytoalexin production and disease resistance in selected peanut genotypes. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, v.55, p.2195-200, 2007.
- SOLEAS, G.J; DIAMANDIS, E.P; GOLDBERG, D.M. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clinical Biochemistry*, v.30, n.2, p.91–113, 1997.
- SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-JR, G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis Totais E Atividade Antioxidante De Cinco Plantas Medicinais. *Química Nova*, v.30, p.351-355, 2007.
- SOUZA, G.G.; MENEGHIN, L.O.; COELHO, S.P.; MAIA, J.F; SILVA, A.G. A uva roxa, *Vitis vinifera* L. (Vitaceae) – seus sucos e vinhos na prevenção de doenças cardiovasculares. *Natureza on line*, v.4, n.2, p.80-86. 2006.
- SOUZA FILHO, A. P. S.; LOBO, L. T.; ARRUDA, M. S. P. Atividade alelopática em folhas de *Tachigali myrmecophyla* (Leg. - Pap.). *Planta Daninha*, v.23, n.4, p.557-564, 2005.

- SOUZA FILHO, A.P.S.; BAYMA, J.C.; GUILHON, G.M.S.P.; ZOGHBI, M.G.B. Potentially Allelopathic Activity of the Essential Oil of *Ocimum americanum*. *Planta Daninha*, Viçosa-MG, v.27, n.3, p.499-505, 2009.
- STALKER, H.T. A new species in section *Arachis* of peanuts with a D genome. *American Journal of Botany*. v.78, p.630–637, 1991.
- STALKER, H. T. e SIMPSON, C.E. Genetic resources in *Arachis*, In: H. E. Pattee and H. T. Stalker (Ed.). *Advances in Peanut Science. American Peanut Research and Education Society*. p.14-53, 1995.
- STALIKAS, C.D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, v.30, n.18, p.3268-95, 2007.
- STEVENSON, P. C.; ANDERSON, J. C.; BLANEY, W. M.; SIMMONDS, M. S. J. Developmental inhibition of *Spodoptera litura* (Fab.) larvae by a novel caffeoylquinic acid from the wild groundnut, *Arachis paraguariensis* (Chod et Hassl.). *Journal Chemical of Ecology*, v.19, p.2917-2933, 1993.
- STERVBO, U.; VANG, O.; BONNESEN, C. A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. *Food and chemistry*, v.101, n.2, p.449-457, 2007.
- STILL, P.E.; PLATA, M.I.; CAMPBELL, R.J.; BUENO, L.C.; CHICHESTER, E.A.; NIBLETT, C.L. Regeneration of fertile *Arachis paraguariensis* plants from callus and suspension cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v.9, p.37-43, 1987.
- STOW, J.L.; MURRA, Y.R.Z. Intracellular trafficking and secretion of inflammatory cytokines. *Cytokine Growth Factor Review*. v.24, n.3, p.227-39, 2013
- SUASSUNA, T. DE M. F.; MEDEIROS, E. P.; HEUERT, J.; MATOS, R. G.; OLIVEIRA, L. O. R. B. Desenvolvimento de cultivares de amendoim para o mercado de biodiesel. VI Congresso Brasileiro de Mamona III Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas, Fortaleza, CE. 2014.
- SZEKANECZ, Z. AND KOCH, A. E. Vascular endothelium and immuneresponses: implications for inflammation and angiogenesis. *Rheumatics diseases clinics of North America*, v.30,p.97-114. 2004.
- TAKEDA, S.; MATSUOKA, M. Genetic approaches to crop improvement: responding to environmental and population changes. *Nature reviews Genetics*, v.9, p.444-57, 2008.
- TAN, D.; MANCHESTER, L.C.; REITER, R.J.; QI, W.; HANES, M.A.; FARLEY, N.J. High physiological levels of melatonin in the bile of mammals. *Life Science*, v.65, n.23, p.2523-2529, 1999.
- TARTAGLIA, L. A. e GOEDDEL, D. V. Two TNF receptors. *Immunology Today*, v.13, p.151-153, 1992.

- TEDGUI, A.; MALLAT, Z. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. *Circulation Research*. v.88, p.877-887, 2001.
- THERON, M.M e LUES, J.F.R. Organic acids and meat preservation: areview. *Food Rev. Int.* 23:141-158. (2007).
- THORNTON, J.; *Pure Application Chemistry*.v.93, p.1231, 2001.
- TORRES, A.C.; FERREIRA, A.T.; SÁ, F.G.; BUSO, J.A.; CALDAS, L.S.; NASCIMENTO, A.S.; BRÍGIDO, M.M.; ROMANO, E. *Glossário de biotecnologia vegetal*. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2000.
- TRACEY, D.; KLARESKOG, L.; SASSO, E.H.; SALFELD, J.G.; TAK, P.P. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. *Pharmacology e Therapeutics*, v.117, n.2, p.244-279, 2008.
- TURNER, M.L.; CRONIN, J.G.; HEALEY, G.D.; SHELDON, I.M. Epithelial and stromal cells of bovine endometrium have roles in innate immunity and initiate inflammatory responses to bacterial lipopeptides *in vitro* via Toll-like receptors TLR2, TLR1, and TLR6. *Endocrinology*, v.155, p.1453-1465, 2014
- VALENTÃO, P.; FERNANDES, E.; CARVALHO, F.; ANDRADE, P.B.; SEABRA, R.M.; BASTOS, M.L. Antioxidative properties of cardoon (*Cynara cardunculus* L.) infusion against superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. v.50, p.4989-4993, 2002.
- VALLS, J.F.M. Gênero *Arachis* L. (Leguminosae): importante fonte de proteínas na pré-história sul-americana. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE DE ARQUEOLOGIA BRASILEIRA, 8, 1996, Porto Alegre. *Anais ... Porto Alegre: EDIPUCRS*. v.2, 1996.
- VALLS, J.F.M. Diversidade genética no gênero *Arachis* e a origem do amendoim. In: ENCONTRO SOBRE TEMAS DE GENÉTICA E MELHORAMENTO, 17, 2000. *Anais...* Piracicaba: EMBRAPA, 2000.
- VALLS, J.F.M.; DA COSTA, L.C. e CUSTODIO A.R. A novel trifoliolate species of *arachis* (*fabaceae*) and further comments on the taxonomic section *triectoides*. *Bonplandia*. v.22, n.1, p.91-97, 2013.
- VALLS, J.F.M.; SIMPSON, C.E. New species of *Arachis* L. (Leguminosae) from Brazil, Paraguay and Bolivia. *Bonplandia*, v.14, p.35-64, 2005.
- VAN LOON, L.C.; REP, M.; PIETERSE, C.M. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review Phytopathology*, v.44, p.135-62, 2006.
- VARGAS, L., ROMAN, E. S. Manual de Manejo e Controle de Plantas Daninhas.1. Ed. Embrapa Trigo. Passo Fundo, Brasil. p.779, 2008.
- VARTAPETIAN, B.B.; JACKSON, M.B. Plant adaptations to anaerobic stress. *Annals of Botany*, v.79, p.3-20, 1997.

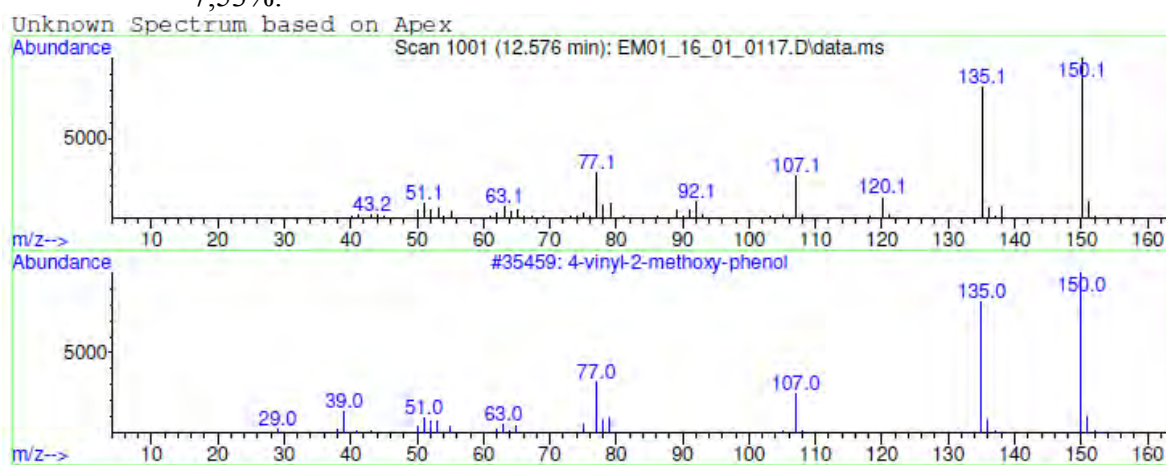
- VENKATACHALAM, P.; JAYABALAN, N. Efficient callus induction and plant regeneration via somatic embryogenesis from immature leaf-derived protoplasts of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Israel Journal of Plant Sciences*, v.44, n.4, p.387-396, 1996.
- VENKATACHALAM, P.; JAYABALAN, N. Effect of auxins and cytokinins on efficient plant regeneration and multiple-shoot formation from cotyledons and cotyledonary-node explants of groundnut (*Arachishypogaea* L.) by *in vitro* culture technology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.67, n.3, p.237-247, 1997.
- VERPOORTE, R.; MEMELINK, J. Engineering secondary metabolite in plants. *Cur. Opinion in Biotechnology*., v.13, p.181-187, 2002.
- VIDOZ, M.L.; KLUSACEK, P.; REY, H.Y.; MROGINSKI L.A. *In vitro* plant regeneration of *Arachis correntina* (Leguminosae) through somatic embryogenesis and organogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v.86, p.111-115, 2006.
- VIDOZ, M.L.; REY, H.Y.; GONZALEZ, A.M.; MROGINSKI L.A. Somatic embryogenesis and plant regeneration through leaf culture in *Arachis glabrata* (Leguminosae). *Acta Physiologiae Plantarum*, v.26, n.1, p.59-66, 2004.
- VILKHU, K.; MAWSON, R.; SIMONS, L.; BATES, D. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v.9, p.161-169, 2008.
- VIRTUOSO, S. Estudo fitoquímico e biológico das cascas de *Erythrina velutina* Willd. - Fabaceae (Leguminosae - Papilionoideae). 2008. 111 f. Dissertação (Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- VOLTARELLI, J.C. Febre e inflamação. *Medicina*, Ribeirão Preto. v.27, n.1/2, p.7-48, 1994.
- VYVYAN, J.R. Allelochemicals for new herbicides and agrochemicals. *Tetrahedron*, v.58, p.1631-1646, 2002.
- WAGNER H e BLADT S. *Plant Drug Analysis. A thin layer chromatography atlas*, second edition, Springer, 2001.
- WALLER, G.R.; FEUG, M.C. e FUJII, Y. Biochemical analysis of allelopathic compounds: plants, microorganisms, and soil secondary metabolites. In: INDERJIT; DAKSHINI, K.M.M. e FOY, C.L. (Eds.). *Principles and practices in plant ecology*. Boca Raton, *CRC Press*, p.75-98, 1999.
- WANG, Q.; XU, Z.; HU, T.; REHMAN, H.; CHEN, H.; LI, Z.; DING, B.; HU, H. Allelopathic activity and chemical constituents of walnut (*Juglans regia*) leaf litter in walnut–winter vegetable agroforestry system. *Natural Product Research*. 2014.
- WANG J., SUN B., CAO Y., TIAN Y., LI X. Optimization of ultrasounded-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chemistry*. v.106, p.804–810, 2008.
- WU J.H.; TUNG Y.T.; WANG S.Y.; SHYUR L.F.; KUO Y.H.; CHANG S.T.; Phenolic antioxidants from the heartwood of *Acacia confusa*. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, v.53, p.5917-5921, 2005.



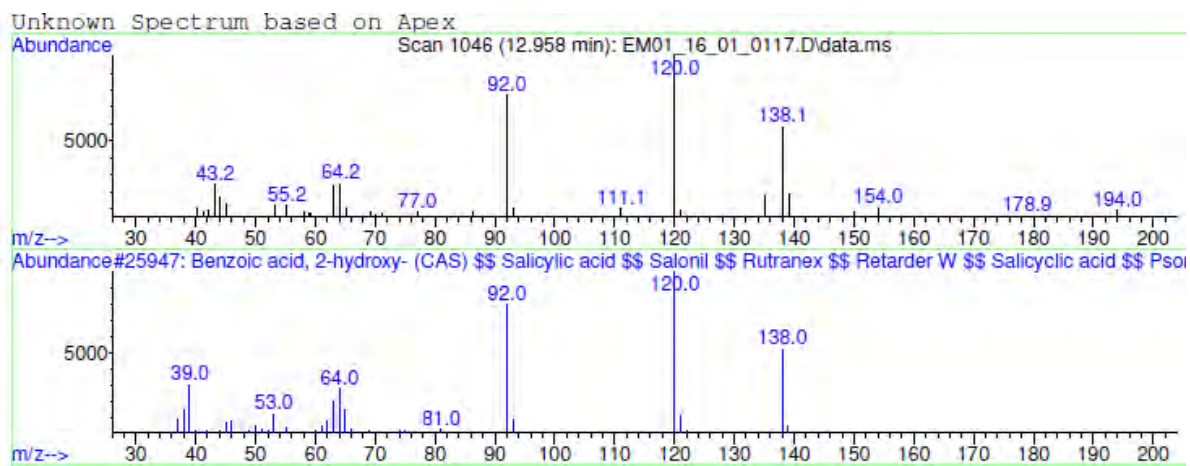
## ANEXO A - Tabela de composição do meio MS

Macronutrientes	Concentração m mol.l <sup>-1</sup>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	20,6
KNO <sub>3</sub>	18,8
CaCl <sub>2</sub> .2 H <sub>2</sub> O	3,0
MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	1,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25
<b>Micronutrientes</b>	
MnSO <sub>4</sub> .4 H <sub>2</sub> O	0,100
ZnSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0,030
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,100
KI	0,005
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2 H <sub>2</sub> O	0,001
CuSO <sub>4</sub> .5 H <sub>2</sub> O	0,0001
CoCl <sub>2</sub> .6 H <sub>2</sub> O	0,0001
<b>FeEDTA</b>	
Na <sub>2</sub> EDTA.2 H <sub>2</sub> O	0,100
FeSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0,100
<b>Vitaminas e aminoácidos</b>	
Ácido nicotínico	0,004
Piridoxina.HCl	0,0024
Tiamina.HCl	0,0003
Glicina	0,027
Mio-inositol	0,55
Sacarose	87,6

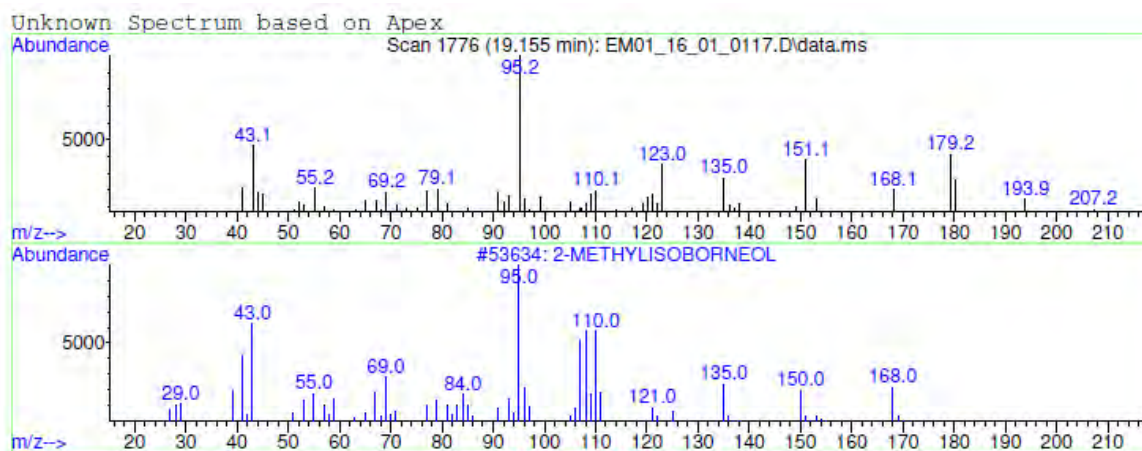
**ANEXO B** - Espectro de massa da substância identificada como *p*-Vinilguaiacol, tr. 12,57 min, 7,53%.



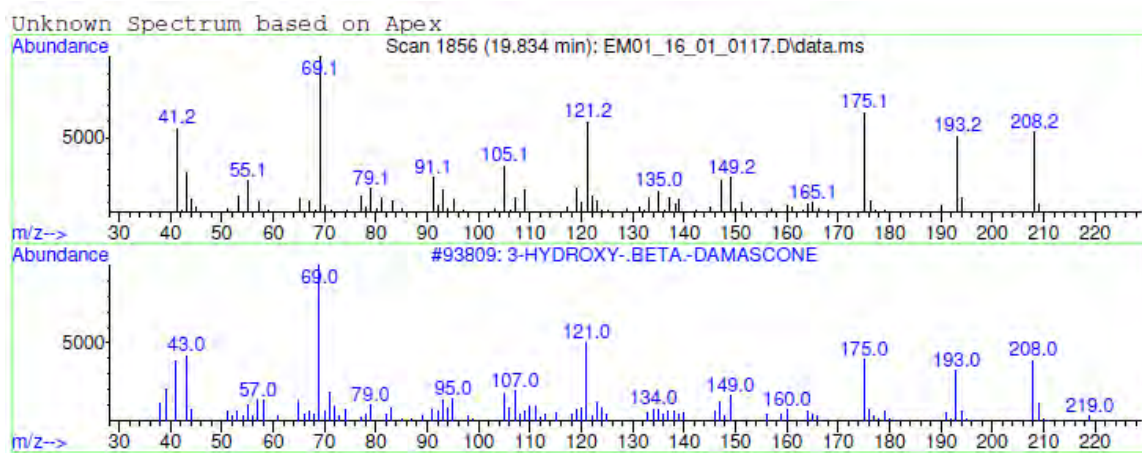
## ANEXO C - Espectro de massas da substância identificada como ácido salicílico, tr. 12,95 min.

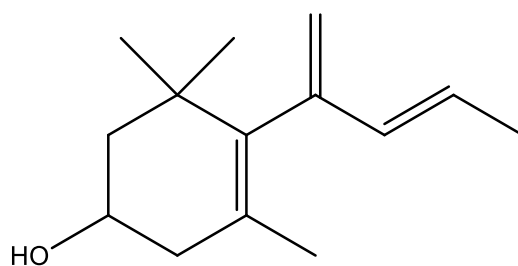


**ANEXO D - Espectro de massas da substância identificada como 2-methylisoborneol, tr. 19,15 min.**

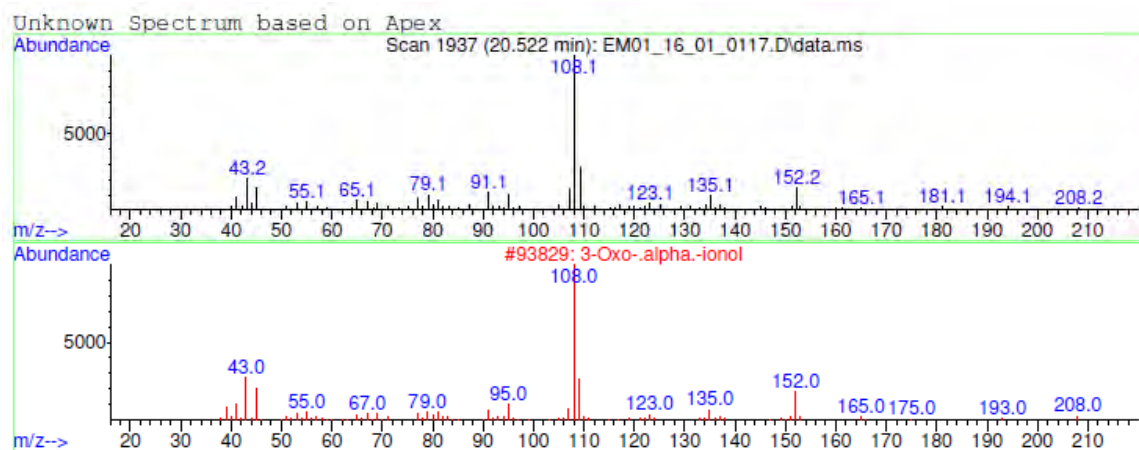


**ANEXO E** - Espectro de massas da substância identificada como 3-hidroxi- $\beta$ -damascona, tr. 19,83 min.

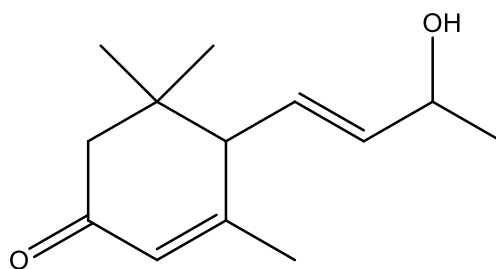


**ANEXO F** - Estrutura do 3-hidroxi- $\beta$ -damascona.

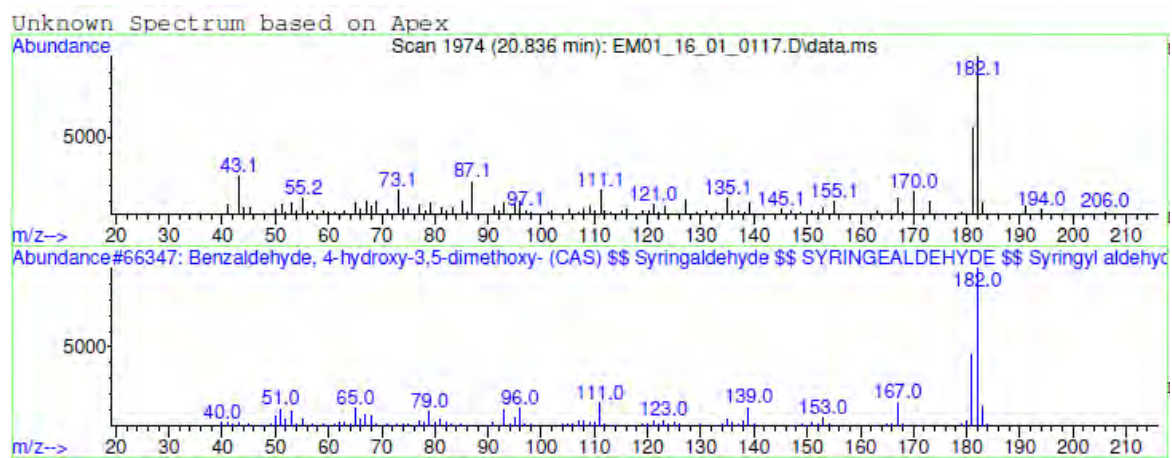
**ANEXO G** - Espectro de massas da substância identificada como 3-oxo-alfa-ionol, tr. 20,52 min.

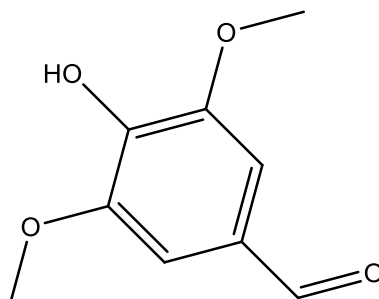


**ANEXO H** - Estrutura do 3-oxo- $\alpha$ -ionol.

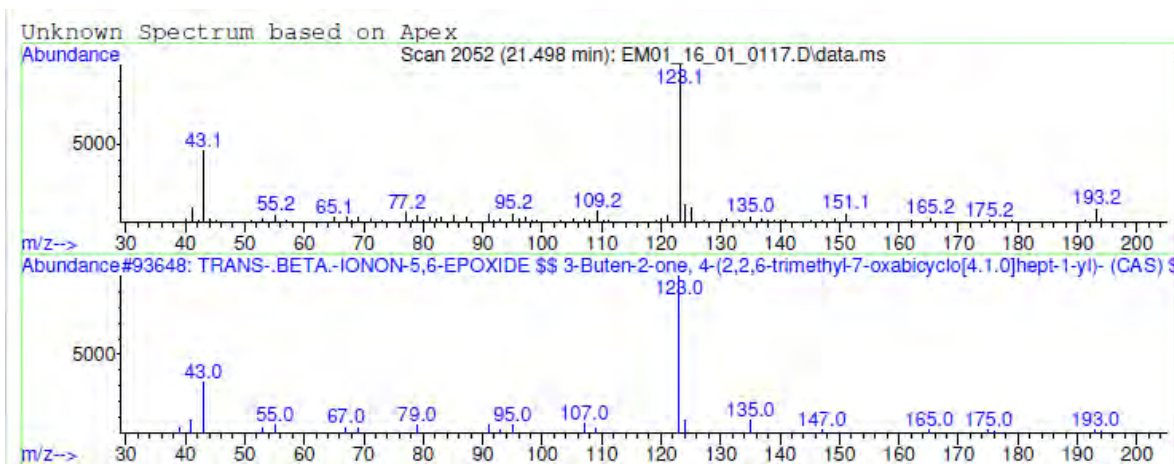




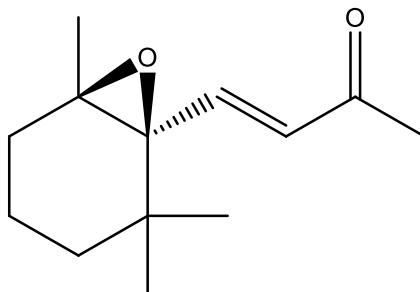
**ANEXO I** - Espectro de massas da substância identificada como siringaldeído, tr. 20,83 min.

**ANEXO J** - Estrutura do siringaldeído.

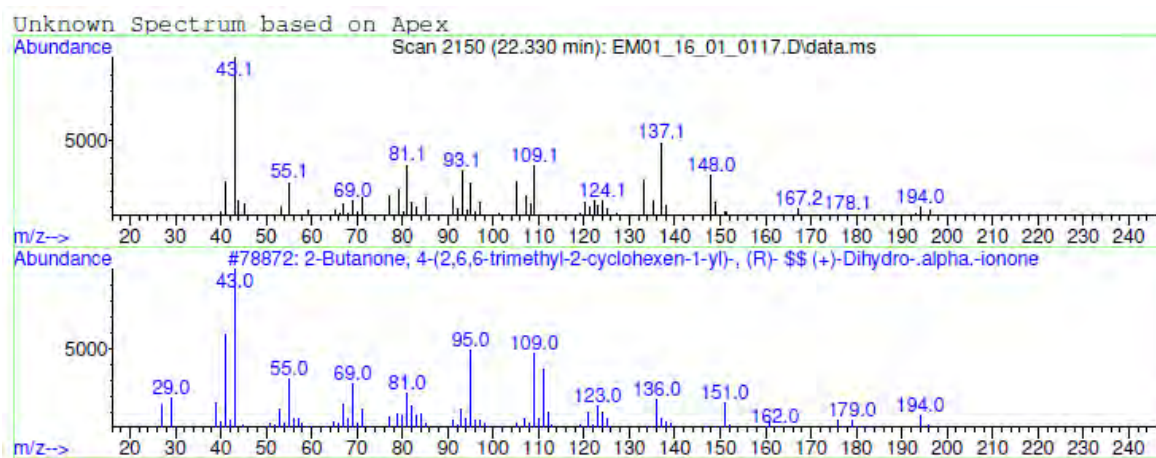
ANEXO K - Espectro de massas da substância identificada como trans- $\beta$ -ionona-5,6-epoxido, tr. 21,49 min.



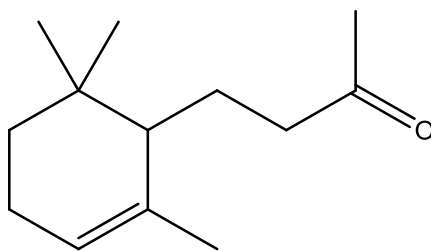
**ANEXO L** - Estrutura do *trans*- $\beta$ -ionona-5,6-epoxido.



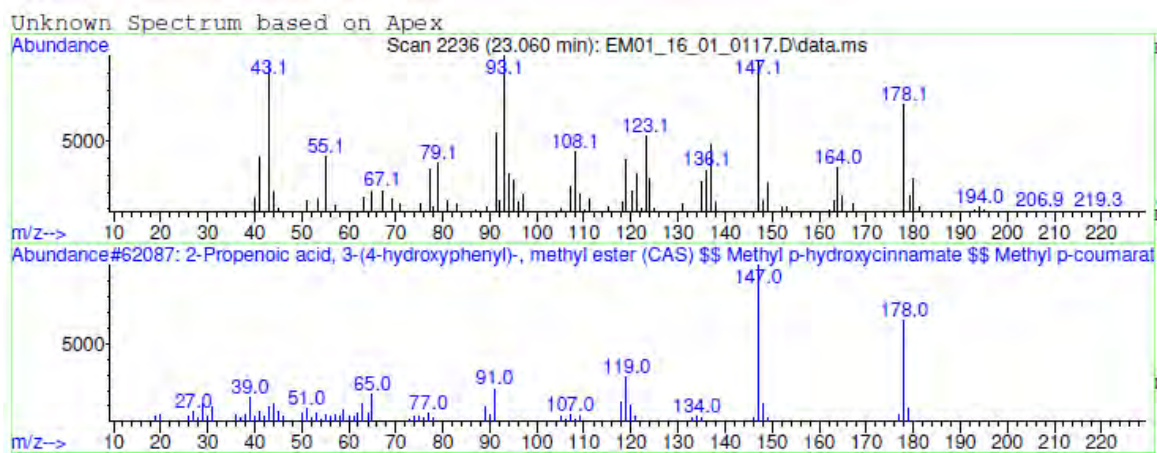
**ANEXO M** - Espectro de massas da substância identificada como diidro- $\alpha$ -ionona, tr. 22,30 min.



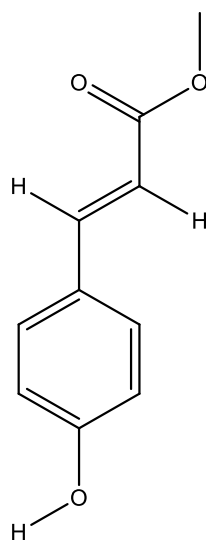
ANEXO N - Estrutura do diidro- $\alpha$ -ionona.



**ANEXO O** - Espectro de massas da substância identificada como p-hidroxi-cinamato de metila, tr. 23,06 min.

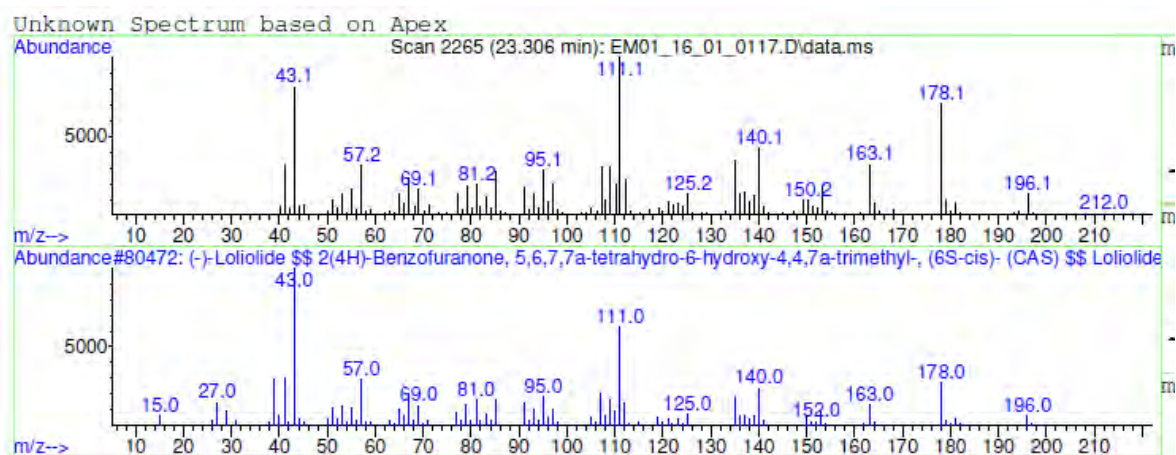


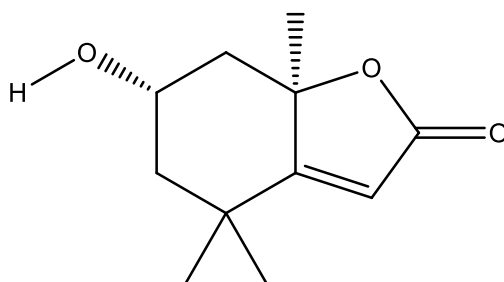
**ANEXO P** - Estrutura do *p*-hidroxi-cinamato de metila.

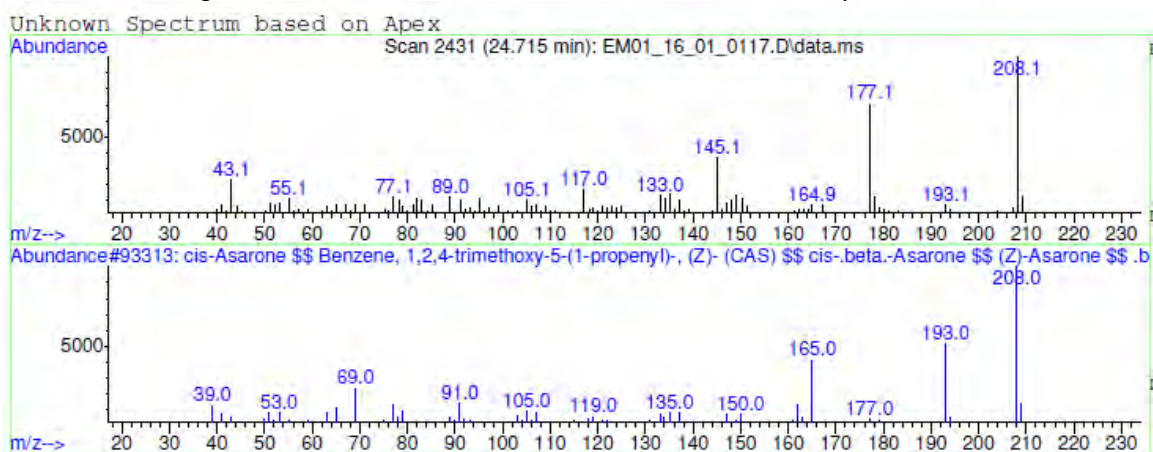


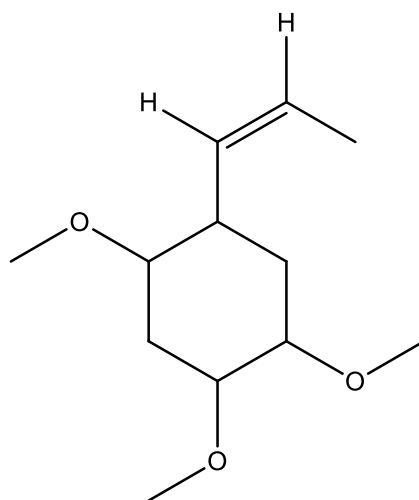


## ANEXO Q - Espectro de massas da substância identificada como Loliolideo, tr. 23,30 min.

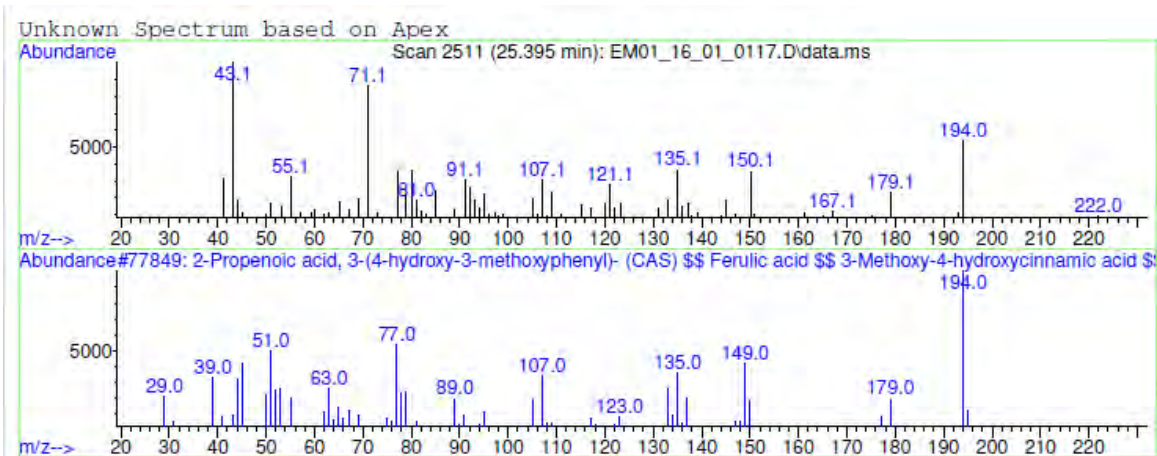


**ANEXO R** - Estrutura do loliolídeo.

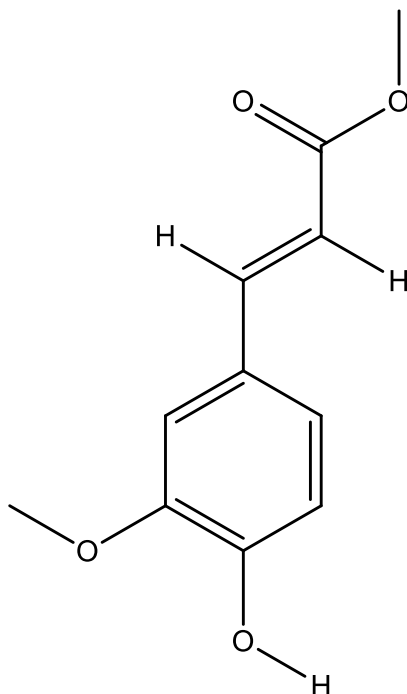
**ANEXO S** - Espectro de massas da substância identificada como  $\beta$ -asarona, tr. 24,71 min.

**ANEXO T** - Estrutura do  $\beta$ -asarona.

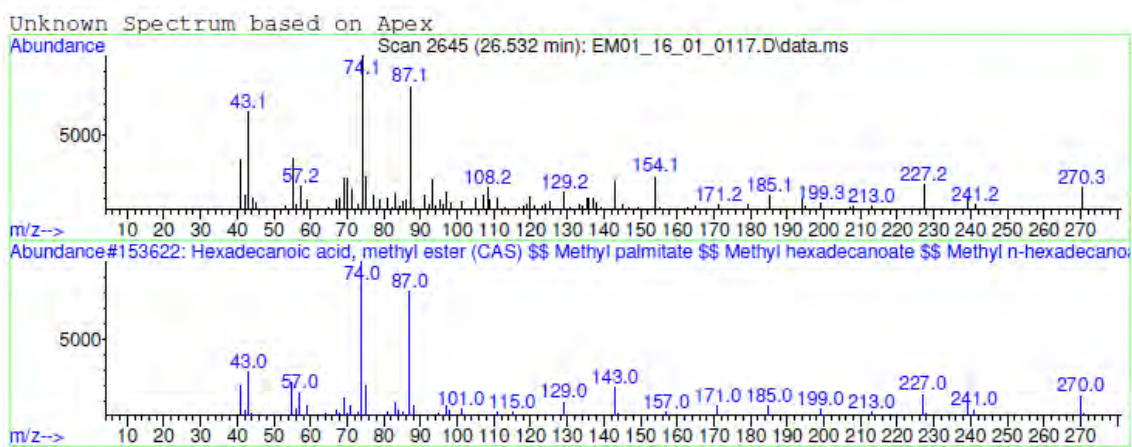
ANEXO U - Espectro de massas da substância identificada como ferulato de metila, tr. 25,39 min.



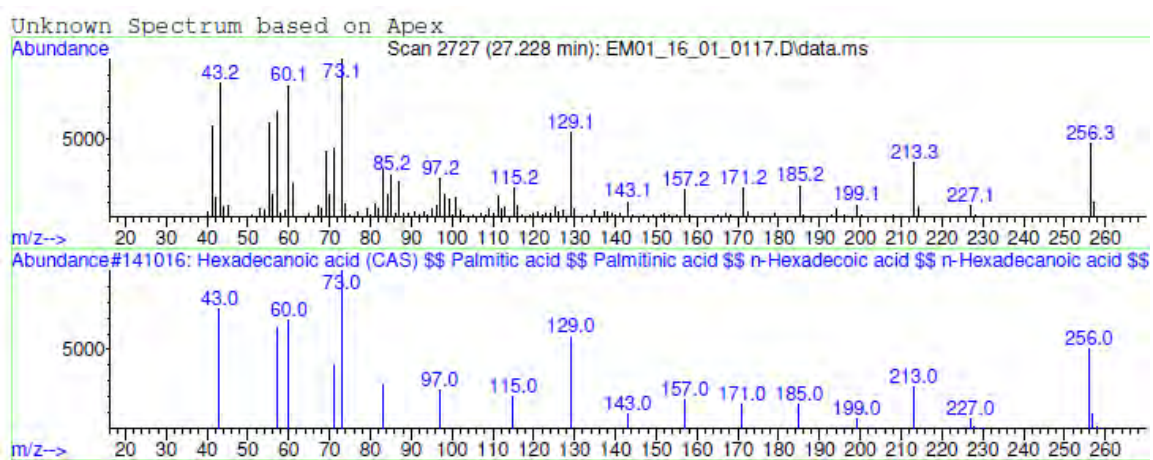
**ANEXO V** - Estrutura do ferulato de metila.



ANEXO W - Espectro de massas da substância identificada como palmitato de metila, tr.  
26,53 min.

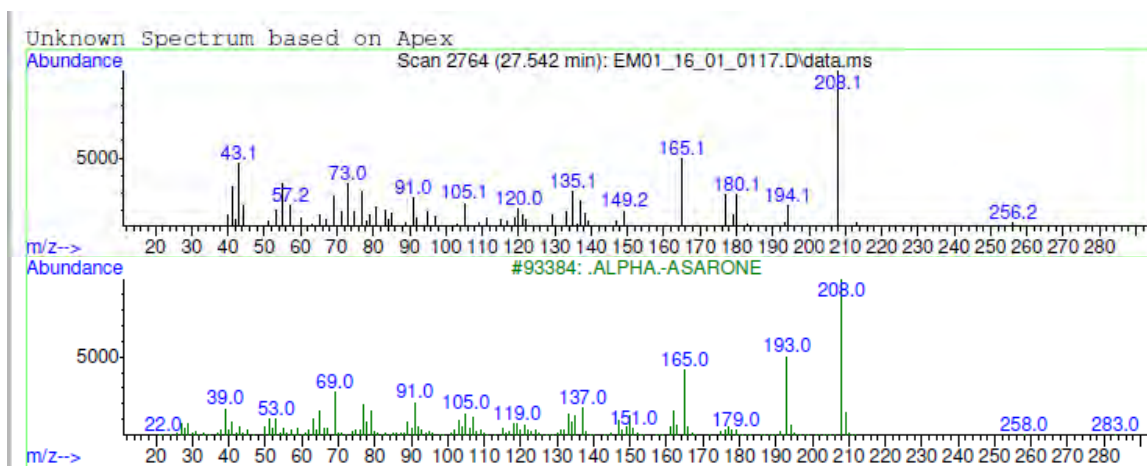


ANEXO X - Espectro de massa da substância identificada como ácido hexadecanóico, tr. 27,22 min.

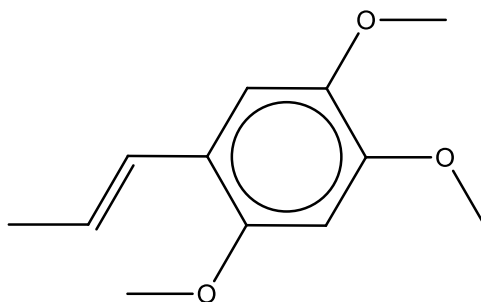




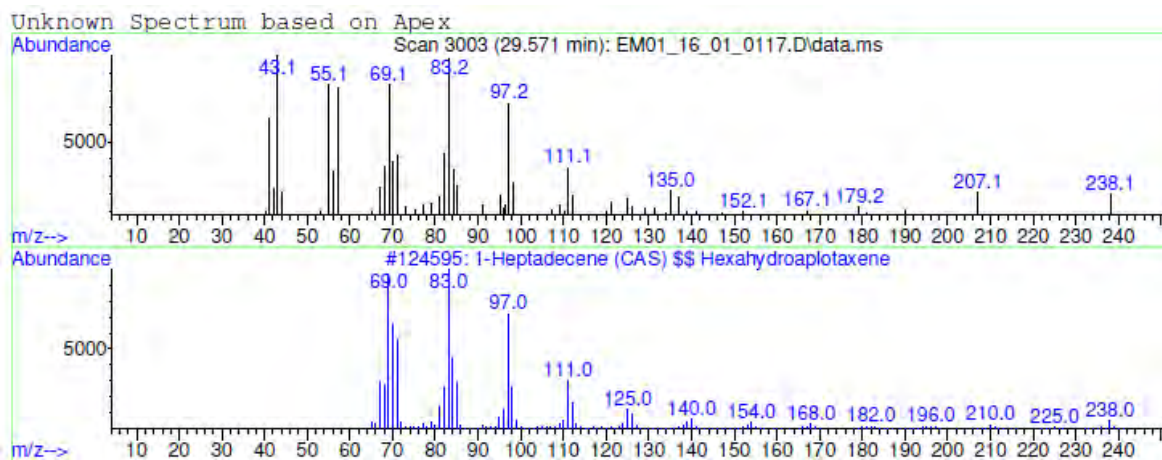
ANEXO Y - Espectro de massas da substância identificada como trans-asarona ( $\alpha$ -asarona), tr.  
27,54 min.

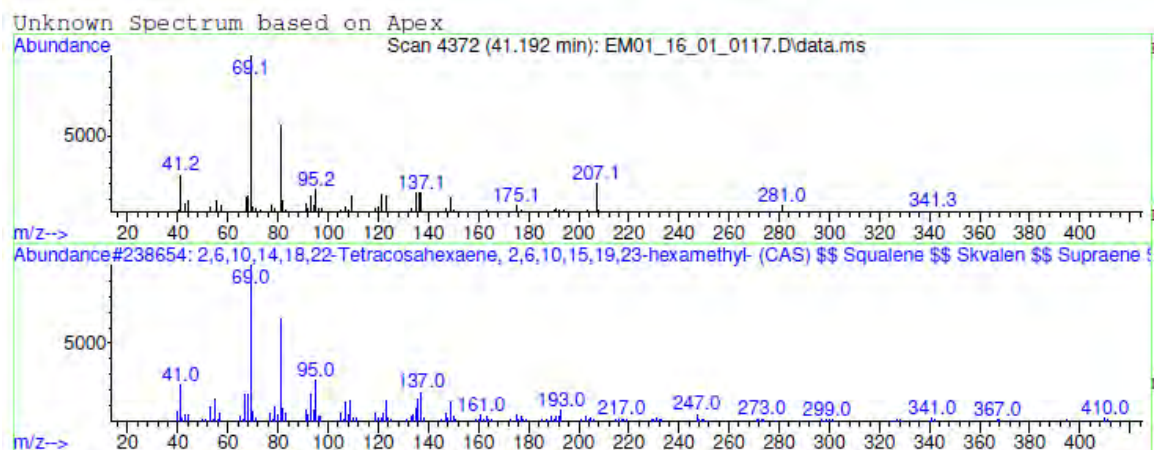


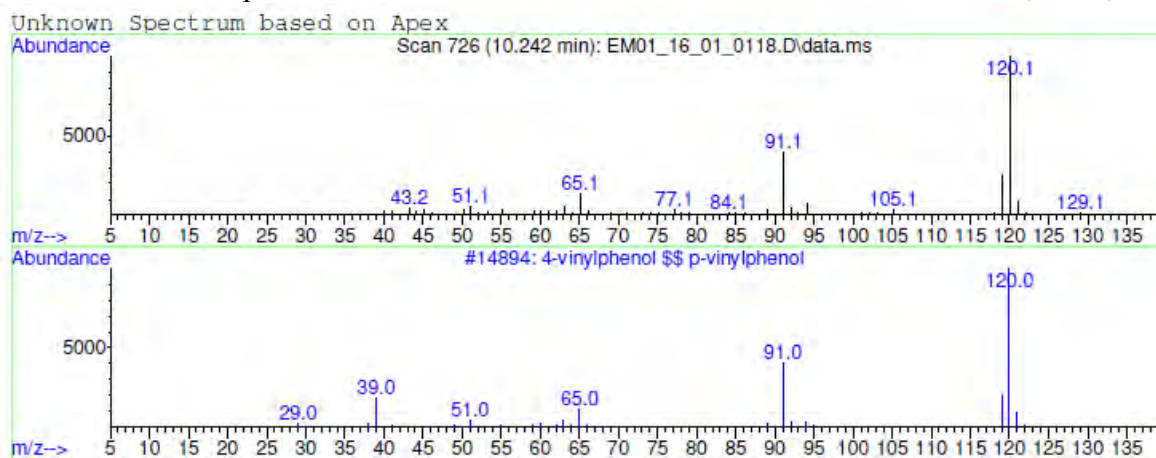
**ANEXO Z** - Estrutura do *trans*-asarona.



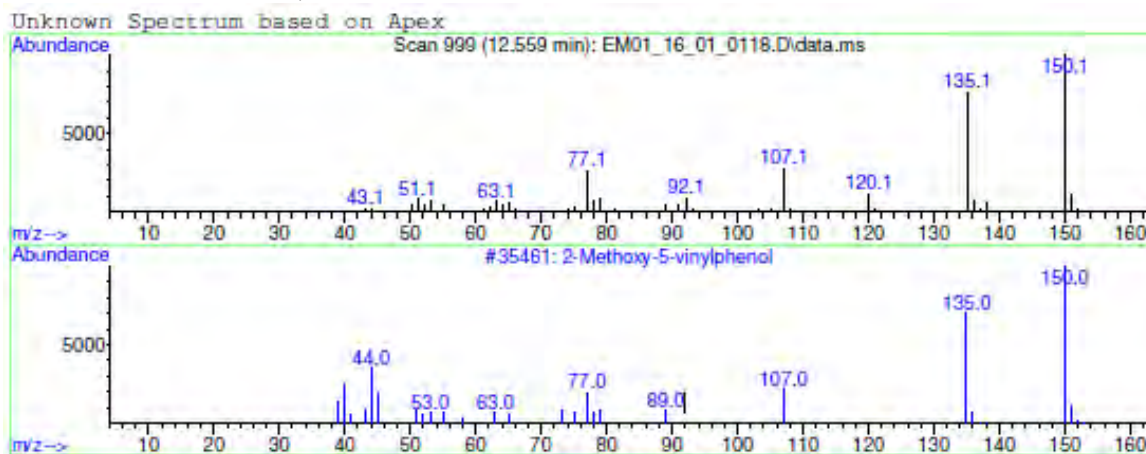
ANEXO AA- Espectro de massas da substância identificada como 1-heptadeceno, tr. 29,57 min.



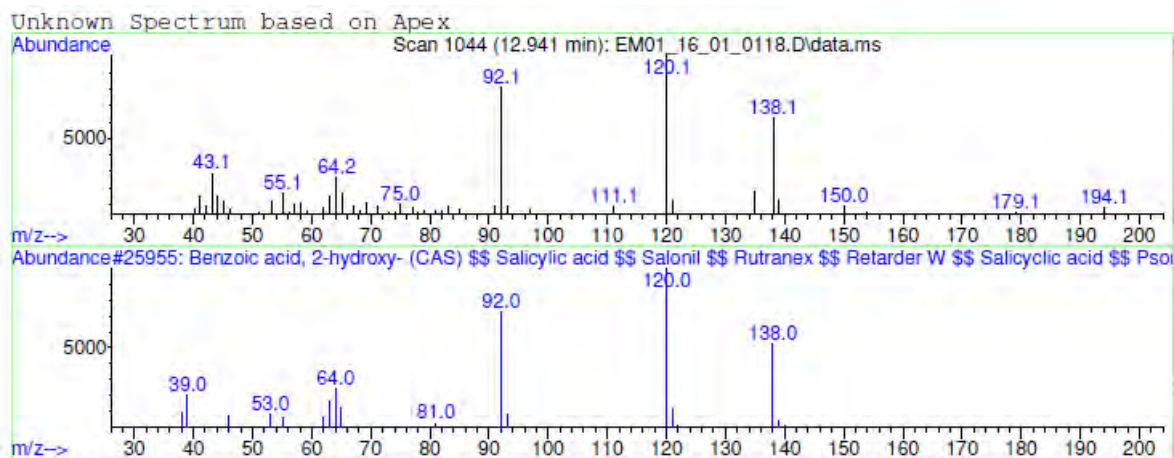
**ANEXO BB** - Espectro de massa da substância identificada como esqualeno, tr. 41,19 min.

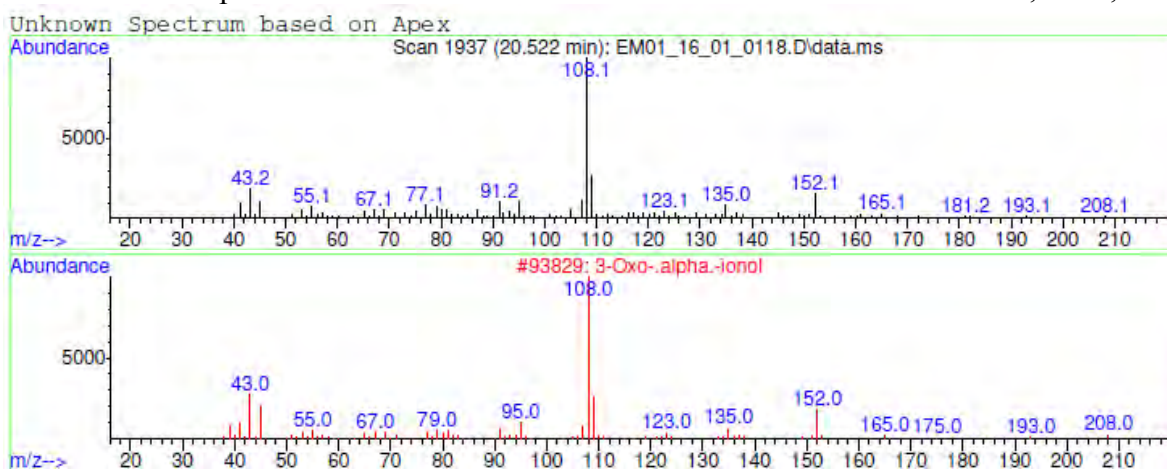
**ANEXO CC - Espectro de massas da substância identificada como 4-vinilfenol, tr. 10,24 min.**

**ANEXO DD** - Espectro de massa da substância identificada como 2-Methoxy-5-vinylphenol, tr. 12,55 min.

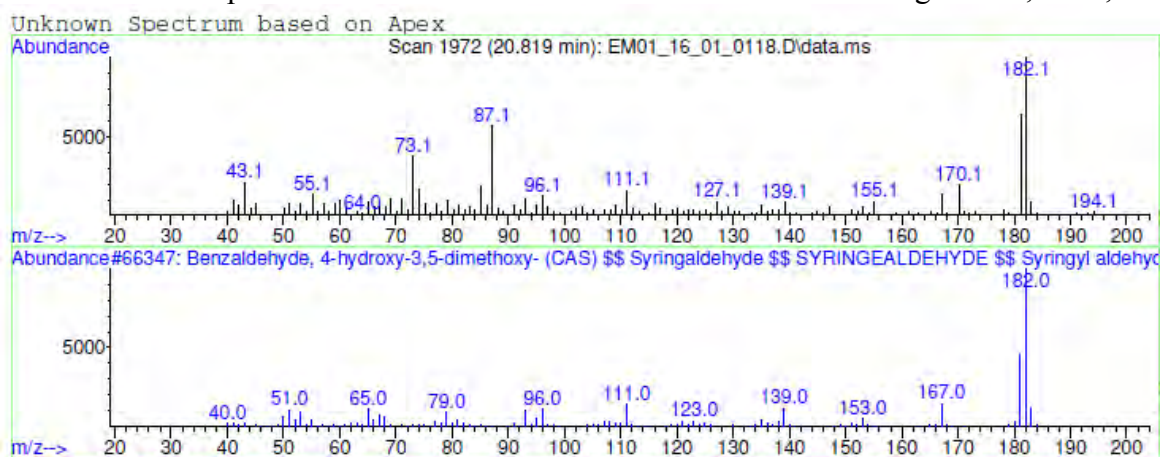


**ANEXO EE** - Espectro de massas da substância identificada como ácido salicílico, tr. 12,94 min.

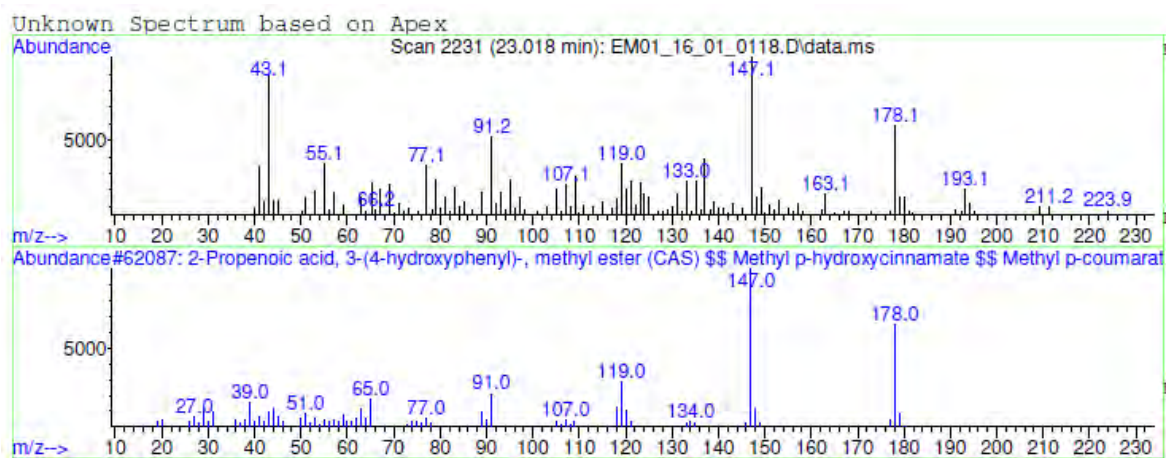


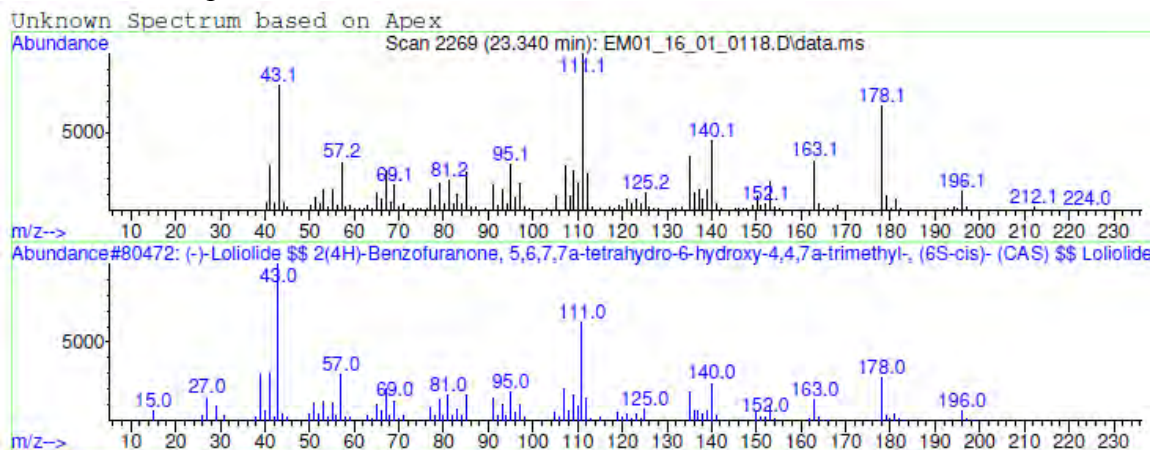
**ANEXO FF** - Espectro de massas da substância identificada como 3-oxo- $\alpha$ -ionol, tr. 20,52 min.

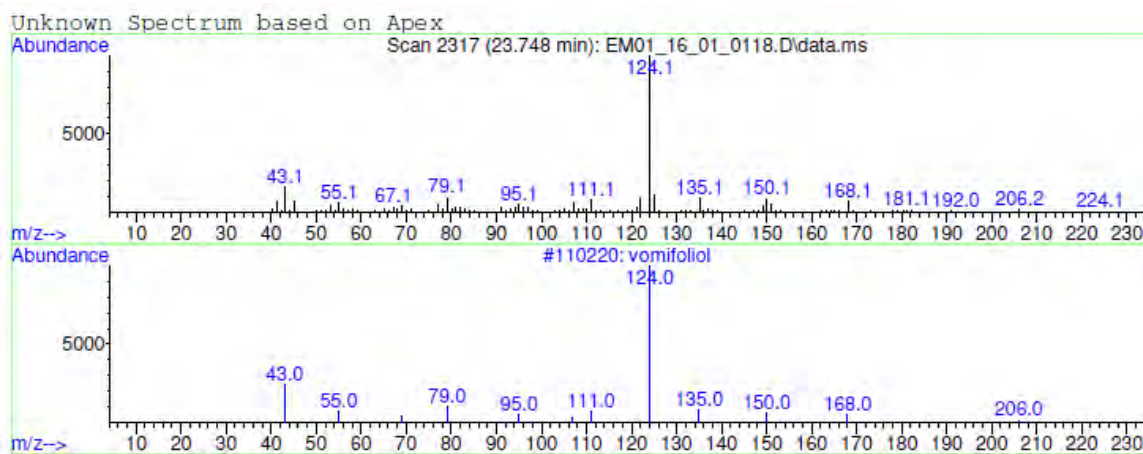


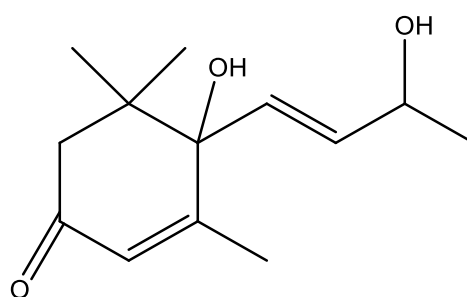
**ANEXO GG** - Espectro de massas da substância identificada como siringaldeído, tr. 20,81 min.

**ANEXO HH** - Espectro de massas da substância identificada como p-hidroxi-cinamato de metila, tr. 23,0 min.



**ANEXO II** - Espectro de massas da substância identificada como loliolídeo, tr. 23,34 min.

**ANEXO JJ** - Espectro de massa da substância identificada como vomifoliol, tr. 23,74 min.

**ANEXO KK** - Estrutura do vomifoliol.

ANEXO LL - Espectro de massas da substância identificada como alfa-asarona, tr. 27,52 min.

