

MAIRA CHRISTINA MARQUES FONSECA

**ESTUDO ANATÔMICO E ISOENZIMÁTICO, RESPOSTA À
APLICAÇÃO DE HOMEOPATIAS, ATIVIDADE ANTIFÚNGICA
E TRIAGEM FITOQUÍMICA DE *Porophyllum ruderale*
(ASTERACEAE)**

Tese apresentada à
Universidade Federal de
Viçosa, como parte das
exigências do Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia
para obtenção do título de
Doctor Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2005

MAIRA CHRISTINA MARQUES FONSECA

ESTUDO ANATÔMICO E ISOENZIMÁTICO, RESPOSTA À
APLICAÇÃO DE HOMEOPATIAS, ATIVIDADE ANTIFÚNGICA
E TRIAGEM FITOQUÍMICA DE *Porophyllum ruderale*
(ASTERACEAE)

Tese apresentada à
Universidade Federal de
Viçosa, como parte das
exigências do Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia
para obtenção do título de
Doctor Scientiae.

APROVADA: 18 de Agosto de 2005.

Prof. Renata Maria Strozi Alves Meira
(Conselheira)

Prof. Maurício Dutra Costa
(Conselheiro)

Prof. Paulo Roberto Cecon

Prof. Ricardo Henrique Silva Santos

Prof. Vicente Wagner Dias Casali
(Orientador)

“Em Jesus Cristo conhecemos a Deus como Ele é, e ao homem como deve ser”.

(Aliança Bíblica Universitária)

AGRADECIMENTOS

Neste tempo de Viçosa aprendi muitas coisas dentro e fora da universidade... Descobri que os relacionamentos são muito mais preciosos do que os feitos, o “ser” é mais valioso do que o “ter” ou do que o “fazer”. Agradeço ao Deus pessoal que se relaciona conosco, que viveu entre nós por todos os aprendizados, por todas as amizades que foram construídas, por todo o amor que recebi de tantas pessoas diferentes... Agradeço pela família formada aqui, ao Reinaldo por seu amor, respeito, paciência e companheirismo; ao João Marcos (nosso primeiro filho) por me ensinar o que é amar de graça... agora entendo melhor o amor gratuito de Deus por cada um de nós... entendo o que é dar a sua própria vida em favor de outro... Agradeço à família maior, meus pais Célio e Miriam; minhas irmãs Myriam e Rachell e meus sobrinhos Henrique, Mateus e Bernardo; presentes de Deus que tornam a minha vida mais feliz!

Mas de todas as lições que aprendi até aqui, a melhor foi esta:

A melhor lição...

*Toda criação é perfeita lição
Da existência de um Ser, do seu grande poder
Tudo o que foi feito tem valor, tem seu jeito
tem beleza, tem missão, tem sentido, tem razão*

*Basta a gente olhar para a terra, o céu e o mar
Ver os bichos, as flores, movimentos e cores
Sentir a luz, sentir o vento, saborear o alimento
O “semear”, o “germinar”, o ventre, um filho gerar...*

*O mistério da vida é o amor sem medida
De um Deus Criador, Amigo, Pai e Senhor
É difícil entender, mas é possível crer
Nessa fonte real, Naquele que venceu o mal*

*Basta a gente se entregar aos Seus cuidados e confiar
Vivendo com alegria, aprendendo a cada dia
Plantar o bem, colher o certo e não deixar de estar perto
Daquele que consolo traz, da plenitude da paz...*

(Myriam Marques Fonseca)

Agradeço também ao professor Casali pela paciência de me ensinar a pesquisar, pelas conversas, conselhos e humanidade... À professora Renata pelos sorrisos e dedicação, ao professor Maurício pela amizade e incentivo e ao professor Cecon pelo aconselhamento estatístico e pela disposição em ensinar. Ao CNPq pelo apoio financeiro. Ao pessoal da ABU-PÓS e da IPV por não me deixarem esquecer de que a vida na universidade vai muito mais além do que a obtenção de um título. À querida amiga Sarita, sempre presente, por todo o carinho! Às colegas Cíntia, Elen Viviane, Rosana e Suzana, pela ajuda nos experimentos, pelos momentos agradáveis que passamos juntas. Ao Ribeiro pelo apoio constante no laboratório. Ao seu Vicente pela boa vontade e simpatia. À Universidade Federal de Viçosa pela formação acadêmica.

BIOGRAFIA

MAIRA CHRISTINA MARQUES FONSECA, filha de Célio Santos Fonseca e Alda Miriam Marques Silva Fonseca, nasceu em Belo Horizonte, MG, no dia 02 de Julho de 1973.

Em dezembro de 1997, graduou-se Engenheira Agrônoma, pela Universidade Federal de Viçosa.

No período de março de 1998 a julho de 1999 aperfeiçoou-se na área de Nutrição Mineral de Plantas na mesma Universidade.

Em agosto de 1999, iniciou o curso de Mestrado em Fitotecnia, área de Plantas Medicinais, Aromáticas e Homeopatia, concentrando seus estudos em fitoquímica.

Em agosto de 2001, submeteu-se à defesa de tese para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

Em agosto de 2001, iniciou o curso de doutorado em Fitotecnia, área de área de Plantas Medicinais, Aromáticas e Homeopatia

Em Agosto de 2005, submeteu-se à defesa de tese para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

ÍNDICE

Página

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	xi
CAPÍTULO 1	1
ANATOMIA DOS ÓRGÃOS VEGETATIVOS DE <i>POROPHYLLUM RUDERALE</i> E HISTOLOCAÇÃO DE COMPOSTOS LIPÍDICOS E FENÓLICOS	
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Descrição da morfologia externa da planta.....	2
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Estruturas secretoras e suas funções em <i>Porophyllum ruderale</i> (asteraceae).....	3
2.1.2 Ductos e Cavidades.....	4
2.3 Algumas substâncias secretadas por <i>Porophyllum ruderale</i>	5
2.3.1 Metabólitos secundários.....	6
2.3.2 Óleo Essencial.....	7
2.3.3 Tanino.....	7
3. OBJETIVOS.....	8
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	8
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	9
5.1 Raiz.....	9
5.2 Caule.....	9
5.3 Folha.....	10
6. CONCLUSÕES.....	14
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15
CAPÍTULO 2	19
Ação antifúngica de <i>Porophyllum ruderale</i> contra <i>candida</i> e dermatófitos	
1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
3. OBJETIVOS.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 Obtenção das plantas.....	26
4.2 Preparação dos extratos.....	26
4.3 Microrganismos.....	26
4.4 Método de diluição em ágar.....	27
4.5 Análise estatística.....	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
6. CONCLUSÕES.....	36
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
CAPÍTULO 3	42
EFEITO DA APLICAÇÃO DE HOMEOPATIAS NA CONCENTRAÇÃO DE TANINO DE <i>POROPHYLLUM RUDERALE</i>	

1. INTRODUÇÃO.....	42
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	43
2.1 História e princípios da homeopatia.....	43
2.2 A homeopatia na agricultura.....	44
2.3 Visão química, física e biofísica da homeopatia.....	45
3. OBJETIVOS.....	50
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	51
4.1 Efeito da aplicação única do preparado homeopático <i>Sulphur</i> no teor de tanino de <i>Porophyllum ruderale</i> (Jacq.) Cassini.....	51
4.2 Efeito da aplicação de oito preparados homeopáticos no teor de tanino, ao longo do ciclo de <i>Porophyllum ruderale</i> (Jacq.) Cassini.....	51
4.3 Efeito da aplicação única dos preparados homeopáticos: <i>Calcarea carbonica</i> , <i>Kalium phosphoricum</i> , <i>Magnésia carbonica</i> , <i>Natrum muriaticum</i> e <i>Silicea</i> , na dinamização CH 4, no teor de tanino em <i>Porophyllum ruderale</i> (Jacq.) Cassini.....	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
5.1 Efeito da aplicação única do preparado homeopático <i>Sulphur</i> no teor de tanino de <i>Porophyllum ruderale</i> (Jacq.) Cassini.....	54
5.2 Efeito da aplicação de oito preparados homeopáticos no teor de tanino, ao longo do ciclo de <i>Porophyllum ruderale</i> (Jacq.) Cassini.....	55
5.3 Efeito da aplicação única dos preparados homeopáticos: <i>Calcarea carbonica</i> , <i>Kalium phosphoricum</i> , <i>Magnésia carbonica</i> , <i>Natrum muriaticum</i> e <i>Silicea</i> , na dinamização CH 4, no teor de tanino em <i>Porophyllum ruderale</i> (Jacq.) Cassini.....	58
6 CONCLUSÕES.....	61
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
CAPÍTULO 4	
CARACTERIZAÇÃO ISOENZIMÁTICA DE CINCO ACESSOS DE <i>Porophyllum ruderale</i>..	67
1. INTRODUÇÃO.....	67
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	67
2.1 Isoenzimas.....	69
2.2 Extração de proteínas de plantas.....	69
2.3 Eletroforese.....	69
2.3.1 Suportes da eletroforese.....	70
2.3.2 Eletroforese em gel de amido.....	70
2.4 Identificação de enzimas e zimograma.....	71
3. OBJETIVOS.....	71
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	72
4.1 Obtenção e preparo das amostras.....	72
4.2 Preparo do gel.....	73
4.3 Aplicação das amostras e eletroforese.....	73
4.4. Fatiamento, coloração, fixação e secagem dos géis.....	74
4.5 Leitura das "bandas", confecção dos zimogramas e identificação dos resultados.....	74
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	75

5.1 Chiquimato desidrogenase (SKDH).....	76
5.2 Malato desidrogenase (MDH).....	76
5.3 Isocitrato desidrogenase (IDH).....	76
6 CONCLUSÕES.....	81
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
CAPÍTULO 5	85
TRIAGEM QUÍMICA DE <i>Porophyllum ruderale</i> (ASTERACEAE)	
1. INTRODUÇÃO.....	85
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	87
3. OBJETIVOS.....	90
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	90
4.1 Método geral de extração.....	91
4.2 Extração para detecção de alcalóides.....	92
4.3 Procedimentos cromatográficos	92
4.4 Revelação dos cromatogramas.....	92
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	93
5.1 Testes positivos.....	93
5.2 Testes negativos.....	96
6 CONCLUSÕES.....	97
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
APÊNDICE	100

RESUMO

FONSECA, Maira Christina Marques, D.S., agosto de 2005. **Estudo anatômico e isoenzimático, resposta à aplicação de homeopantias, atividade antifúngica e triagem fitoquímica de *Porophyllum ruderale* (Asteraceae).** Orientador: Vicente Wagner dias Casali. Conselheiros: Renata Maria Strozi Alves Meira, Maurício Dutra Costa E Efraim Lázaro Reis

Porophyllum ruderale (Asteraceae), erva ruderal e aromática, conhecida popularmente como couve-cravinho. Na medicina popular é utilizada como cicatrizante e antiinflamatória, antifúngica, antibacteriana, calmante, no combate à hipertensão arterial, no tratamento de leishmaniose, no tratamento de edemas e traumatismos, no tratamento de picada de cobra, doenças reumáticas e dores em geral. A atividade cicatrizante tem sido relacionada à presença de teores variáveis de compostos fenólicos do tipo taninos. Os objetivos do trabalho foram descrever a anatomia da raiz, caule e folha de couve-cravinho e preceder a histolocalização dos compostos fenólicos e lipídicos. De cinco plantas cultivadas, em fase de pré-floração, foram coletadas e fixadas em FAA₅₀ ou em sulfato ferroso em formalina neutra tamponada (para observação de compostos fenólicos), a raiz, o caule e as folhas. O laminário foi obtido utilizando-se metodologia tradicional. As raízes são tetrarcas, desenvolvem estrutura secundária precocemente, e possuem ductos secretores no córtex. Nos caules ductos também estavam presentes, entretanto somente nos jovens a reação de compostos fenólicos foi positiva. Nas folhas foram observados ductos delimitados por várias camadas de células epiteliais cujo conteúdo reagiu positivamente indicando a presença de compostos lipídicos e fenólicos. Conclui-se que os ductos são provavelmente as estruturas responsáveis pela secreção de taninos. As infecções micóticas de pele, de unha e de cabelo são comuns em vários países. Os fungos conhecidos como dermatófitos causam infecções crônicas e demandam tratamentos prolongados com drogas antimicóticas caras e às vezes pouco efetivas. O uso de plantas no tratamento de doenças de pele é prática antiga, entretanto são necessários estudos científicos visando a comprovação dos efeitos medicinais. Na terapêutica popular, *Porophyllum ruderale* é utilizada como antifúngica dentre outros usos. O óleo essencial e os taninos das folhas têm mostrado efeitos inibitórios sobre bactérias e fungos. O objetivo do trabalho foi verificar “in vitro” a atividade antifúngica do extrato das folhas de *Porophyllum ruderale* sobre dermatófitos (*Trichophyton rubrum* e *T. mentagrophytes*) e cândida

(*Cândida albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*). As folhas utilizadas no preparo do extrato metanólico foram coletadas de plantas cultivadas em fase de pré-floração, secas à temperatura ambiente e trituradas. O extrato foi filtrado, pesado, concentrado, dissolvido em 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), resultando nas diluições desejadas (0, 1, 2, 3, 4, 6, 8 e 10 mg/mL, e adicionado ao meio de cultura dos microrganismos. As concentrações de 8 e de 10 mg do extrato metanólico/mL do meio foram efetivas na redução do crescimento das colônias de *T. rubrum* e não reduziram o crescimento das espécies de cândida testadas. A concentração de 3 mg/mL reduziu significativamente as colônias de *T. mentagrophytes* quando comparada ao controle. Foi concluído que há evidência da couve-cravinho conter propriedades antimicóticas efetivas no tratamento de infecções causadas por *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*, validando o uso popular da planta entre as pessoas que praticam terapêuticas tradicionais. Experiências do uso da homeopatia em vegetais vêm sendo realizadas por agricultores. São vários os benefícios da homeopatia no cultivo, destacando-se a obtenção de plantas livres de resíduos, o que é muito importante em plantas medicinais. O objetivo do trabalho foi determinar a resposta de plantas a preparados homeopáticos quanto ao teor de tanino nas folhas e nas raízes. O experimento foi instalado em blocos casualizados com três repetições e uma testemunha, sendo submetidos a análise de variância e regressão. Os preparados homeopáticos, tanto em altas quanto em baixas dinamizações, causaram efeito significativo no teor de tanino em folhas e raízes de *Porophyllum ruderale*, ora aumentando, ora reduzindo. *Silicea* (CH5) e *Sulphur* (C200), aplicadas, no intervalo de 10 dias, proporcionaram menor concentração de tanino na folha em relação à testemunha. A aplicação única de *Sulphur*, *Natrum muriaticum*, *Kalium phosphoricum*, e *Calcarea carbonica*, na dinamização CH4, incrementaram o teor de tanino entre 240 e 288 horas após a aplicação. *Silicea* e *Magnésia carbonica*, na mesma dinamização, incrementaram o teor de tanino entre 288 e 336 horas após a aplicação. *Kalium phosphoricum* e *Calcarea carbonica* foram os preparados homeopáticos que promoveram maior aumento no teor de tanino das folhas de *Porophyllum ruderale* quando comparados à testemunha. A aplicação de homeopatia nas plantas de couve-cravinho destinadas a alimentação humana reduz o teor de tanino, diminui a adstringência e aumenta a palatabilidade das folhas. Por outro lado, o uso de preparados homeopáticos que incrementam o teor de compostos fármaco-ativos, inclusive o tanino, interessa à fitoterapia. A caracterização isoenzimática tem sido usada na abordagem inicial da diversidade de populações geneticamente pouco estudadas como *Porophyllum ruderale*, quanto a identificação de acessos/genótipos/variedades. O objetivo do trabalho foi caracterizar isoenzimaticamente e fitoquímicamente (quanto ao teor de óleo essencial e de

tanino) seis acessos de *Porophyllum ruderale*. As plantas foram obtidas à partir de sementes colhidas nos municípios de Viçosa (MG), Goianá (MG), Coronel Pacheco (MG), Barra do Garça (MT), Rio Verde (GO) e Jaboticabal (SP). O óleo essencial foi extraído por hidrodestilação em aparelho Clevenger modificado e o tanino foi extraído pelo método recomendado pela AOAC. Os teores de óleo e de tanino não diferiram significativamente entre os acessos. Foram aplicados os seguintes sistemas isoenzimáticos: chiquimato desidrogenase (SKDH), isocitrato desidrogenase (IDH) e malato desidrogenase (MDH), na eletroforese em gel de amido. As amostras de tecidos radiculares e foliares foram coletadas de plantas adultas (aproximadamente 90 dias após a semeadura). Houve variação no número, na espessura e na intensidade de coloração das bandas nos três sistemas avaliados, sendo o sistema SKDH o que melhor separou os acessos. Ocorreram variações entre indivíduos do mesmo acesso, indicando que *Porophyllum ruderale*, como a maioria das plantas medicinais espontâneas, possui grande variabilidade genética devido ao fato de crescer em ambientes variados e ter reprodução sexuada. As espécies do gênero *Porophyllum* são amplamente utilizadas na medicina popular da América do Sul e Central, no entanto, poucas têm sido estudadas quimicamente, como é o caso da couve-cravinho. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi identificar os constituintes químicos presentes nas folhas de *Porophyllum ruderale* por meio da triagem fitoquímica. Foi feita a cromatografia em camada delgada (CCD), os extratos foram preparados a partir da amostra vegetal seca e triturada, visando a identificação de alcalóides, polifenóis, flavonóides, taninos, antraquinonas, cardiotônicos, saponina, cumarina, antranóides e terpenos. Verificou-se nas amostras de *Porophyllum ruderale* analisadas a presença dos seguintes metabólitos secundários: flavonóides (rutina e provavelmente quercetina), taninos (dentre eles o ácido gálico), cumarinas, esteróides e terpenos (dentre eles o terpinol).

ABSTRACT

FONSECA, Maira Christina Marques, D.S., agosto de 2005. **Anatomic and isoenzimatic studies, effect of homeopatic application, antifungic activity and phytochemistry screening of *Porophyllum ruderale* (Asteraceae).** Adviser: Vicente Wagner dias Casali. Committee members: Renata Maria Strozi Alves Meira, Maurício Dutra Costa and Efraim Lazaro Reis.

Porophyllum ruderale (asteraceae) is a ruderal aromatic herb also known as couve-cravinho. In popular medicine it is used in cicatrizing, anti-inflammatory, antifungicide, anti-bacterial and anti-stress treatments, to combat arterial hypertension and additionally in the treatment of leishmaniose, trauma, and snake bite, and for relief of rheumatic and general pain. The cicatrizing effect has been identified as being as a result of the presence of various phenolic composts, such as tannin. The objective of this study was to analyse the anatomy of the root, stem, and leaves of couve-cravinho and the location of the phenolic and lipidic composts. Five cultivated plants were picked during their pre-blossoming phase and fixed in either FAA50 or in a solution of ferrous sulphate in formalin (for observation of the phenolic composts) with respect to the root, stem, and leaves. Laminates were obtained using the usual methodology. The roots are tetrahedral and can be seen to develop an early secondary structure with cortex ducts. These were also present in the stem although only in young samples was the reaction of the phenol compost positive. In the leaves were observed ducts could be identified and were delimited with respect to the differing layers of epithelial cells. These reacted positively, indicating the presence of lipidic and phenolic composts. As such it can be concluded that the ducts are most likely responsible for the secretion of tannin. Micotic infection of skin, nails and hair is common in many countries. Fungi such as dermatophytes may cause chronic infection and demand lengthy treatment involving expensive antimicotic drugs (and these are often ineffective). The use of plants in the treatment of skin disease is an ancient and established practice. Nevertheless scientific study is vital if medicinal effects are to be confirmed. In popular therapeutic treatment *Porophyllum ruderale* is utilized as an antifungal treatment. The essential oils and tannins from the leaves have an inhibitory effects on bacteria and fungi. The objective of this experiment was verify “in vitro” the antifungal effects of leaf extracts from *Porophyllum ruderale* on the above mentioned dermatophytes (*Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*) and candida species (*Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida parapsilosis*). The leaves utilized in the preparation of the

metanolic extracts were collected from cultivated plants in their pre-blooming phase, dried at room temperatures and powdered. The extracts were filtered, weighed, concentrated, dissolved in 5 mL of dimethyl sulphoxid (DMSO), diluted (0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, and 10 mg/mL) and added to a culture of the subject micro-organisms. It was found that the 8 and 10 mg/mL concentrations of metanolic extract reduced the *T. rubrum* colony growth but not the candida growth. The 3 mg/mL concentration reduced significantly the *T. mentagrophytes* colony growth when compared with control tests. It can be concluded that there is evidence that couve-cravinho plants contain effective antimicrobial properties in the treatment of infections caused by *T. mentagrophytes* and *T. rubrum*, thus validated the popular use of this species in traditional medicine. The use of herbs and plants in homeopathic medicine was first realized in the agricultural community and has shown many medicinal benefits, emphasizing that the obtaining of plants free of residue is important in the use of plants within medicine. The objective of the experiment was to determine the response of plants to homeopathic preparations irrespective of the level of tannin in the leaves and roots. The experiment was undertaken in casualized blocks with a repetition of tree subjects and controls, and submitted to different levels of analysis and regression. The homeopathies at both high and low levels of dynamization show significant effects in the yields of tannin from *Porophyllum ruderale* leaves and roots, with these yields both decreasing and increasing. *Silicea* (CH5) and sulphur (C200) applied in ten day intervals decreased the yield of tannin in leaves when compared with control tests. The unique application of sulphur, *natrum muriaticum*, *kalium phosphoricum* and *calcareo carbonica*, all of them in CH4 dynamization, increased tannin yields during the period between 240 and 288 hours after application while *silicea* and *magnesia carbonica*, both in CH4 dynamization, increase tannin yields during the period between 288 and 336 hours after application. *Kalium phosphoricum* and *calcareo carbonica* was the homeopathy prepared that created the greatest increase in tannin yields from *Porophyllum ruderale* leaves when compared with control tests. The application of homeopathy to couve-cravinho plants intended for human alimentation can decrease tannin yields, the astringence of the plants and increase the palatability of leaves. On the other hand, the use of homeopathic preparations with increased pharmaco-active compounds such as tannin is of great interest to phytotherapy. The isoenzymatic characteristics of the plant have been used in initial approaches towards identifying the diversity of lesser studied genetic populations and groupings of *Porophyllum ruderale* in order to identify different

genotypes and varieties. The objective of this study was to identify the isoenzymatic and phytochemical (essential oil and tannin) characteristics of six varieties of *Porophyllum ruderale*. The plants were obtained from seeds collected in Viçosa (MG), Goiana (MG), Coronel Pacheco (MG), Barra do Garça (MT), Rio Verde (GO) and Jaboticabal (SP). The essential oil was extracted by the modified instrument Clevenger and tannin was extracted using the AOAC recommended methods. The amount of oil and tannin do not differ significantly between varieties. The following isoenzymatic systems were applied: desidrogenase shiquimate (SKDH), desidrogenase isocitrate (IDH) and desidrogenase malate (MDH) in the gel electrophoresis of starch. The vegetal tissue (root and leaf) sample was collected from adult plants (approximately 90 days after seeding). There was some variation in the number, thickness and intensity of color bands in tree tested systems and the SKDH system was the one that was found to best separate differing varieties. There was some variation between individuals of the same type indicating that *Porophyllum ruderale*, as the most spontaneous of the medicinal plants, has significant genetic variability due to growing in different kind of environments and methods of sexual reproduction. The species of the genus *porophyllum* are extensively utilized in popular medicine throughout South America and Central America however few (such as couve-cravinho) of these species have been chemically studied. Therefore the objective of this study was to identify the chemical compounds present in *Porophyllum ruderal* leaves through phytochemical screening. This was done by way of thin layer chromatography (CCD), the extracts were prepared from vegetal samples, were dried and powdered, in order to identify alkaloids, phenols, flavonoids, tannins, quinones, cardiac glycosides, saponins, coumarins, antranoid and terpene. It was verified that the analysed samples of *Porophyllum ruderale* have some secondary metabolites: flavonoids (rutine and quercetine), tannins (among them gallic acid), coumarins, steroids and terpenes (among them terpinol).

CAPÍTULO 1

Anatomia dos órgãos vegetativos de *Porophyllum ruderale* e histolocalização de compostos lipídicos e fenólicos

1. INTRODUÇÃO

As plantas da família Asteraceae são cosmopolitas, sendo encontradas em ambientes secos e/ou em locais altos. Constituem o maior grupo dentre as Angiospermas com cerca de 1535 gêneros e 23000 espécies (BREMER, 1994; JUDD et al, 1999) e têm ampla representação em regiões tropicais, subtropicais e temperadas (BARROSO et al., 1986). O sucesso das plantas desta família pode ser atribuído à presença de tipos particulares de estruturas secretoras, como canais resiníferos (contendo poliacetileno e lactonas) e de laticíferos (contendo alcalóides, óleos essenciais e lactonas), responsáveis pelo sistema de defesa química (CRONQUIST, 1981).

O potencial científico e medicinal da família Asteraceae constitui importante tópico a ser investigado. Existe conexão direta entre as propriedades físico-químicas dos compostos predominantemente lipofílicos e as atividades biológicas e farmacológicas encontradas nessa família (WAGNER, 1977).

Dentre as espécies que compõem essa família, encontra-se *Porophyllum ruderale* (Figura 1), planta ruderal e aromática, largamente utilizada na medicina popular como cicatrizante, antiinflamatória (SILVA et al., 1996), antifúngica (DEVINCENZI et al., 1996), antibacteriana, calmante, usada contra a hipertensão arterial (chá), nos tratamentos de leishmaniose, edemas e traumatismos (infusão), no tratamento de picada de cobra e de doenças reumáticas (infusão), assim como nas inflamações do aparelho genital (infusão) e dores em geral (MARQUESINI, 1996).

Dentre os nomes comuns encontram-se várias sinonímias, quais sejam: couve-cravinho, erva-fresca, erva-de-veado, arnica-brasileira, arnica-do-campo, arruda-de-galinha, cravo-de-urubu e picão-branco.

Considera-se o lugar de origem a América do Sul, sendo amplamente distribuída por todas as regiões do Brasil (Paraná, Santa Catarina, Minas Gerais, Pará, Mato Grosso, Espírito Santo, Bahia e Rio Grande do Sul).



Figura 1 – Aspecto geral de *Porophyllum ruderale*

1.1 Descrição da morfologia externa da planta

Quanto às características botânicas, é anual, herbácea, ereta, com 1,0 a 1,3 m de altura. Caule, em geral, simples, glabro, esverdeado e levemente reluzente. Folhas alternas, membranáceas, pecioladas, glabras, oblongo-lanceoladas, de ápice obtuso, base levemente atenuada e bordos nitidamente crenados, na face superior verde clara e na inferior mais pálida. Inflorescência axilar e terminal formada por capítulos pedunculados, isolados ou em corimbos. Invólucro unisseriado, com brácteas membranáceas, esverdeadas, glabras e com pontuações glandulosas mais escuras. Flores hermafroditas de corola tubulosa, glabra e branco-esverdeada ou levemente amarelada. Reprodução por sementes, com ciclo de 100 a 120 dias. Floresce abundantemente nos meses de maio a setembro.

Plântula com hipocótilo cilíndrico, glabro e pigmentado de antocianina junto ao colo. Folhas cotiledonares carnosas, glabras, lanceoladas, de ápice ligeiramente agudo e base atenuada, na face superior verde-claras e na inferior mais pálidas. Epicótilo curto e verde-brancacento.

Folhas definitivas opostas, membranáceas, glabras, lanceoladas, de ápice agudo e base atenuada, na face superior verdes, na inferior mais pálidas e de bordas levemente crenadas na base e íntegros no ápice.

É considerada invasora de ocorrência bem mais comum em terrenos baldios, nas margens de estradas e trilhas do que em áreas cultivadas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Estruturas secretoras e suas funções em *Porophyllum ruderale*

As estruturas secretoras têm recebido atenção especial por parte dos pesquisadores, principalmente nas últimas décadas. Porém, poucos foram os trabalhos desenvolvidos nesse campo com espécies da família Asteraceae, da qual faz parte a espécie *Porophyllum ruderale* cuja anatomia ainda não foi descrita. Há grande número de estudos desenvolvidos em estruturas secretoras e geralmente constam de algumas obras como FAHN (1979), MARGARIS et al. (1982), BENTLEY & ELIAS (1983) e RODRIGUEZ et al (1984). É grande o número de espécies nesta família – 22718 de acordo com LEITÃO FILHO (1987), mas poucas são efetivamente utilizadas e de reconhecido valor medicinal/econômico. A gama de conhecimentos acumulados resulta da tradição, de antigos estudos e de pesquisas recentes efetuadas nas áreas de sistemática, quimiotaxonomia e farmacologia, as quais elucidaram o modo de ação de algumas drogas já conhecidas por meio de técnicas de isolamento e de novos métodos de investigação da terapêutica moderna (WAGNER, 1977).

Segundo WAGNER (1977), há mais de 25 espécies na família que possuem aplicação terapêutica. Com relação ao valor econômico, destaca-se as plantas que contêm princípios ativos amargos de importância industrial, substâncias consideradas tóxicas e os óleos essenciais, devido ao seu extenso uso na perfumaria, cosméticos, produtos alimentícios e farmacêuticos, considerando-se em especial a utilização de produtos naturais em detrimento dos artificiais (MARGARIS et al., 1982). Ainda de acordo com o mesmo autor, há conexão direta entre as propriedades físico-químicas dos compostos predominantemente lipofílicos e as atividades biológica/ farmacológica encontradas em Asteraceae, sendo que o potencial científico e medicinal desta família constitui importante campo de estudo a ser explorado.

Diversas substâncias podem ser encontradas em espaços intercelulares especiais, que podem ser quase esféricos ou isodiamétricos, chamados de cavidade ou bolsa, ou alongados, chamados ducto ou canal (ESAU, 1965; CUTTER, 1978; FAHN, 1979, 1982; METCALFE, 1983). Dentre estas substâncias, são encontrados compostos economicamente importantes, como óleos, resinas, taninos, borracha natural, gomas, ceras e tinturas (BALANDRIN et al., 1985), que, de acordo com sua natureza, podem exercer determinada função.

O gênero *Porophyllum* (Asteraceae) é caracterizado pela presença de cavidades secretoras glandulares translúcidas, as quais se localizam longitudinalmente à margem da folha, e prolongando-se ao interior, dispersas em toda a lâmina (MONTEIRO, 1986).

Foi relatado em estudo prévio que tais cavidades glandulares conferem resistência contra a herbivoria por insetos em *Porophyllum gracile* (Jacq.) Cassini var. *macrocephalum* (D.C.) e *Porophyllum ruderale* Benth (Asteraceae) (GUILLET et al., 1997). O mesmo estudo confirmou, em condições de laboratório, que os compostos voláteis emitidos das glândulas foliares das duas espécies exercem atividade repelente contra adultos de *Melanoplus femurrubrum femurrubrum* (Orthoptera: Acrididae). Provavelmente, os monoterpenos que constituem a maior parte dos metabólitos sintetizados pelas glândulas secretoras de *Porophyllum ruderale* são responsáveis pela atividade repelente (GUILLET et al., 1997).

Várias sugestões têm sido propostas sobre as possíveis funções das substâncias lipofílicas, especialmente os terpenos. Estas substâncias provavelmente desempenham várias funções e atuam de forma bastante complexa, o que tem dificultado conclusões mais abrangentes sobre o exato papel fisiológico e ecológico (FAHN, 1979). Segundo KESLEY et al (1984), os terpenóides têm várias funções biológicas: ações inseticidas, repelentes, dissuasiva alimentar de insetos, antifúngica, antimicrobiana e citostática.

Apesar de todas estas tentativas de esclarecer quais as funções destas substâncias, os dados existentes ainda são insuficientes impossibilitando determinar com exatidão o papel exato da estrutura que as secreta (FAHN, 1979).

2.2 Ductos e Cavidades

O lume de cavidades e ductos é mais ou menos isodiamétrico (ou esférico) nas cavidades e consideravelmente alongado em um único plano nos ductos (CUTTER, 1978; FAHN, 1979, METCALFE, 1983).

Foram denominados respectivamente aparelho secretor e espaço secretor interno em ambas as estruturas: ducto e cavidade (CLARO, 1994). As cavidades secretoras estão presentes na a forma de pontos translúcidos (transparentes) ou estrias finas em folhas de *Athanasia*, *Baccharis*, *Liatris*, *Pectis*, *Porophyllum*, *Pulicaria* e *Tagetes* (METCALFE & CHALK, 1950), e identificadas em vários gêneros da família Asteraceae, inclusive no gênero *Porophyllum* (MONTEIRO, 1986; MONTEIRO et al., 1995). Em folhas de *Porophyllum ruderale* elas estão envolvidas por ramificações finas do sistema vascular (MONTEIRO, 1986). Convém ainda salientar que SOLEREDER (1908) destacou no gênero *Porophyllum*, a origem lisígena das cavidades presentes nas folhas.

MONTEIRO (1986) trabalhou com a morfologia, a histoquímica e a ultra-estrutura das cavidades foliares de *Porophyllum lanceolatum* DC definindo-as como alongadas, com posições marginal e laminar em áreas intensamente vascularizadas. As marginais encontram-se na depressão existente entre crenas. Testes histoquímicos revelaram a natureza aproximada das substâncias secretadas por estas estruturas, são elas: lipídios, taninos e proteínas. Cortes transversais da lâmina foliar revelaram que essas cavidades ocorrem em áreas extremamente vascularizadas do mesofilo.

As cavidades de *Porophyllum ruderale* são morfologicamente semelhantes às de *P. lanceolatum*, porém nesta espécie foram identificados quimicamente óleo essencial e tanino (FONSECA, 2001).

Os ductos são caracterizados pelo lume (espaço alongado em direção única) circundado por estrato de células epiteliais único e estão associados direta ou indiretamente aos feixes vasculares das nervuras foliares (FAHN, 1979).

Com relação aos compostos químicos secretados em *Porophyllum ruderale*, o estudo de estruturas secretoras pode indicar sítios de secreção e/ou acúmulo de compostos de reconhecido valor econômico, como é o caso dos terpenos componentes dos óleos essenciais e presentes em vários tipos de glândulas lipofílicas.

2.3 Algumas substâncias secretadas por *Porophyllum ruderale*

A secreção é comum entre as plantas. Envolve a separação de diversas substâncias do protoplasto das células que podem ser depositadas em vacúolos ou outros compartimentos intracelulares (ESAU 1965, 1977; CUTTER 1978; FAHN 1979, 1982).

Células individualizadas ou tecidos podem estar envolvidos no processo secretor. Estruturas secretoras ou células individualizadas podem ocorrer também em todos os órgãos da planta ou podem estar limitados a alguns órgãos (ESAU, 1977; FAHN 1979, 1982).

Pelo fato de nas estruturas secretoras haver grande variação quanto à morfologia, anatomia, função, localização e tipos de compostos que secretam, a classificação torna-se difícil. ESAU (1965, 1977), considerando a localização das estruturas no vegetal, classificou-as em externas e internas. As externas são encontradas na superfície da planta (tricomos glandulares, nectários e hidatódios) e as internas estão incluídas nos tecidos (idioblastos, ductos, cavidades e laticíferos).

As substâncias secretadas podem ou não ser produto final do metabolismo, como por exemplo: alcalóides, taninos, terpenos, resinas, látices, mucilagens e soluções salinas. Podem, também ser substâncias com função fisiológica especial, como os polissacarídeos, enzimas e hormônios (ESAU, 1977). Muitos destes produtos como cânfora, borracha, ópio, bálsamo e óleo possuem grande importância econômica (CUTTER, 1978); terpenos, resinas, látices, etc. podem ser utilizados na indústria farmacêutica, alimentícia e de cosméticos (METCALFE & CHALK, 1950; WAGNER, 1977; FAHN, 1979, MARGARIS et al., 1982).

É difícil determinar, satisfatoriamente, se as substâncias secretadas são produtos inúteis, ou se o vegetal poderá reutilizá-las, já que a exata função da maior parte de tais substâncias ainda não é conhecida, como por exemplo látices, resinas, cristais, etc., razão pela qual adota-se o termo secreção num sentido amplo (SCHNEPF, 1974; ESAU, 1977; CUTTER, 1978; FAHN, 1982).

2.3.1 Metabólitos secundários

Alguns vegetais possuem o arsenal metabólico (enzimas, coenzimas e organelas) capaz de produzir, transformar e acumular inúmeras substâncias. Esse conjunto metabólico tem sido definido como metabolismo secundário, cujos produtos, embora não necessariamente essenciais ao organismo produtor, garantem vantagens na sobrevivência e perpetuação da espécie no ecossistema (SANTOS, 1999). Podem ser divididos em três grupos principais: terpenóides, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (TAIZ & ZEIGER, 1998).

As plantas terrestres se adaptaram ao meio e se relacionaram com os herbívoros por meio destes metabólitos secundários, que inclusive podem tanto atrair como repelir insetos (MANN, 1987). Muitos desses metabólitos são responsáveis por qualidades atribuídas aos vegetais, principalmente propriedades medicinais, o que vem sendo corroborado pelas pesquisas, tornando cada vez maior o interesse em se entender e controlar esses processos de síntese de metabólitos secundários, tanto por parte da comunidade científica quanto por parte da indústria (SILVA & CASALI, 2000; ANDRADE E CASALI, 1999).

É importante ressaltar que a maioria dos compostos químicos utilizados na defesa das plantas são terpenóides (componentes do óleo essencial) e compostos fenólicos (tanino) (MEYER & KARASOV, 1991).

2.3.2 Óleo Essencial

WATERMAN (1993) define os óleos essenciais como misturas complexas, contendo freqüentemente mais de 100 compostos. De forma geral, são voláteis, lipofílicos, freqüentemente odoríferas e líquidas.

Normalmente são sintetizados nas folhas, armazenados em espaços extracelulares, entre a cutícula e a parede celular e constituídos basicamente de terpenos.

A composição química das secreções das cavidades presentes nas folhas de *P. ruderale* encontra-se no trabalho realizado por FONSECA (2001).

Na tribo Tagetae, da qual faz parte o gênero *Porophyllum*, é importante a presença de estruturas glandulares que contêm óleos essenciais (RODRIGUEZ & MABRY, 1977).

2.3.3 Taninos

São considerados os compostos secundários mais importantes envolvidos na defesa das plantas contra insetos e doenças (SWAIN, 1979). Tais compostos são responsáveis pela adstringência de muitos frutos e outros órgãos vegetais.

São efetivos como repelentes de predadores por tornarem os tecidos menos palatáveis, devido à precipitação das proteínas salivares ou a imobilização de enzimas, impedindo a invasão e os danos do parasita (BATE-SMITH, 1973).

Nas células vegetais os taninos estão localizados separadamente das proteínas e das enzimas do citoplasma. Estão dissolvidos dentro de vacúolos ou outras estruturas especializadas. Quando os herbívoros se alimentam, os tecidos são danificados e os taninos reagem com as proteínas, tornando-os menos acessíveis ao suco digestivo dos animais. A sua localização foi possível por meio do uso de corantes vitais (não destroem as células), como o azul de metileno (COSTA, 1975; HARBORNE, 1984).

Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional no tratamento de diversas moléstias orgânicas, tais como diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais (azia, náusea, gastrite e úlcera gástrica), problemas renais e do sistema urinário e processos inflamatórios em geral (HASLAM, 1996).

3. OBJETIVOS

- Descrever a anatomia da raiz, do caule e da folha com ênfase na caracterização das estruturas secretoras.
- Identificar sítios de síntese e/ou acúmulo de compostos fenólicos e de compostos lipídicos nos órgãos vegetativos de *Porophyllum ruderale*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Folhas, caules e raízes foram removidos de 5 plantas coletadas no viveiro do Grupo Entre Folhas de Plantas Medicinais na Universidade Federal de Viçosa, no mês de maio de 2003, onde a planta se encontrava no período de pré-floração. As amostras imediatamente fixadas em FAA 50% (formol, ácido acético e álcool etílico) foram estocadas em etanol 70% e utilizadas nas análises histológicas (SASS, 1951). As amostras fixadas em solução de sulfato ferroso preparada em formalina (JOHANSEN, 1940; JENSEN, 1962) foram utilizadas na evidenciação de compostos fenólicos.

As folhas foram divididas em três partes: apical, mediana e basal. O caule coletado foi separado de acordo com o calibre: maior (ramo principal), médio (ramificações laterais) e menor (próximo ao botão floral). As raízes foram separadas de acordo com o diâmetro: maior (raiz principal), médio e menor.

As amostras das folhas foram desidratadas em série butílica, incluídas em parafina (JOHANSEN, 1940), e cortadas transversal e longitudinalmente em micrótomo rotativo na espessura de 12 µm. Esses cortes foram corados com fuccina básica (4 minutos) e azul de astra (2 minutos) (GERLACH, 1969). As lâminas foram montadas em meio permanente com bálsamo. Os fragmentos de caule e de raiz foram cortados transversalmente em micrótomo de mesa, e as lâminas foram montadas em gelatina glicerinada (BERLYN & MIKSCHE, 1976), sendo utilizados os mesmos corantes citados acima. Apenas nas amostras de raiz foi utilizado o corante safrablau.

Quanto aos testes histoquímicos, foram aplicados dois tratamentos aos cortes, de acordo com as técnicas apropriadas: o sudan III visa a identificação dos compostos lipídicos, enquanto a solução de sulfato ferroso em formalina visa a identificação de compostos fenólicos.

As observações e a documentação fotográfica foram realizadas em fotomicroscópio (Olympus AX 70) equipado com sistema U-Photo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Raiz

As raízes são tetrarcas e desenvolvem estrutura secundária precocemente (Fig. 2). No córtex parenquimático, a endoderme é evidente até o início da produção de tecidos secundários (Fig. 3). A epiderme é substituída pela periderme e foram visualizados pequenos ductos nas proximidades da feloderme de raízes de maior diâmetro. Os ductos não reagiram aos testes para compostos fenólicos, entretanto, testes fitoquímicos evidenciaram a presença de taninos em raízes trituradas (FONSECA, informação pessoal). Como a coleta das amostras destinada aos estudos anatômicos foi realizada quando a planta estava em pré-floração, é possível que nesta fenofase, a produção de compostos na raiz estivesse comprometida por causa do investimento energético na produção de estruturas reprodutivas. Tais informações deverão ser confirmadas em testes complementares e são relevantes no manejo e utilização destas plantas.

5.2 Caule

Possui epiderme unisseriada recoberta por cutícula relativamente espessa (Fig. 5). O parênquima cortical é intercalado com o colênquima subepidérmico, a medula é parenquimática e os feixes são colaterais (Fig. 4, 5).

No córtex, próximo ao xilema e ao floema, são observados pequenos ductos secretores (Fig. 4, 5, 6). O conteúdo desses ductos reagiu positivamente com o sulfato ferroso, indicando a presença de compostos fenólicos (Fig. 4). Na porção mais velha dos caules a reação negativa aos compostos fenólicos indica que tais estruturas não estavam mais ativas. Apesar da espécie ser conhecida pela produção de taninos na folha (Fonseca, 2001), provavelmente, os ductos dos caules jovens também produzam taninos, já que reagiram positivamente ao teste de compostos fenólicos.

5.3 Folha

O contorno das células epidérmicas é sinuoso na face adaxial e na abaxial. Estômatos anomocíticos ocorrem nas duas faces (Fig. 7). A epiderme é unisseriada com cutícula delgada (Fig. 7), não ocorrendo tricomas tectores e ou glandulares. Na nervura central são evidentes duas a três camadas de colênquima subepidérmico, e, imerso no parênquima fundamental, está o feixe colateral. O mesofilo é dorsiventral (Fig. 7, 8), possui parênquima paliçádico típico, localizado abaixo da epiderme da face adaxial e na margem não foram identificados hidatódios. Hidatódios são estruturas secretoras de água, responsáveis pela gutação, consideradas comuns dentre as espécies de Asteraceae (Lersten, 1985), mas não no gênero *Porophyllum*.

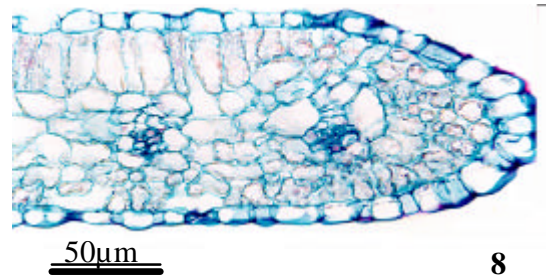
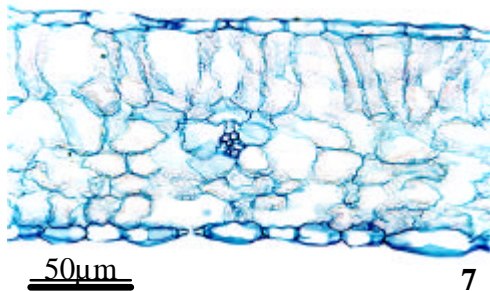
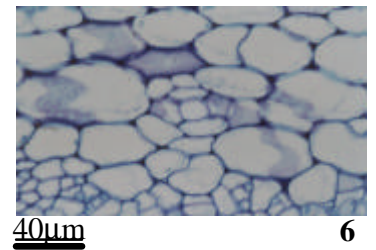
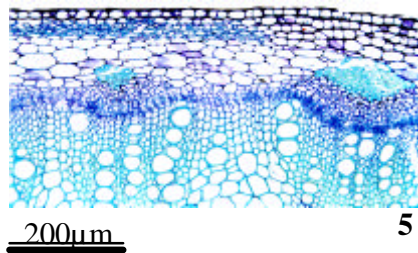
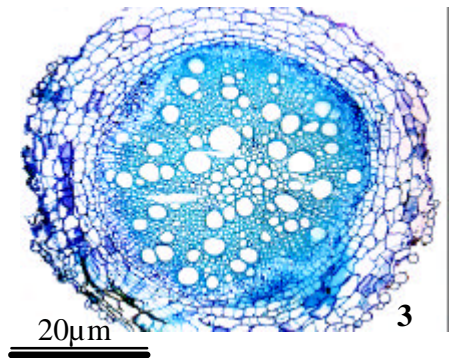
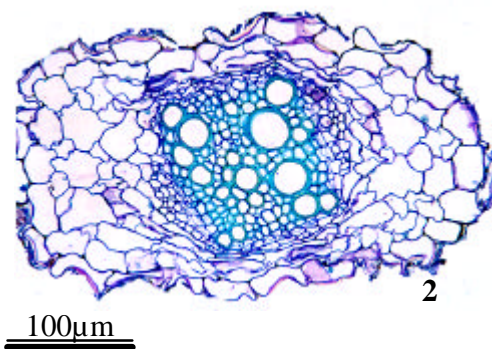
Distribuídas em toda a lâmina foliar, foram observadas estruturas secretoras com formato alongado nos cortes longitudinais (Fig. 9 a 14), inclusive na margem (Fig. 9 e 13). Estas estruturas estavam constituídas por várias camadas epiteliais que delimitam o lume alongado (Fig. 10), diferenciando-as das estruturas presentes na raiz e no caule que são delimitadas por apenas uma camada de células. Distribuí-se aleatoriamente no mesofilo (Fig. 9, 10 e 14) e regularmente no bordo foliar (Fig. 9, 13), inclusive na porção apical (Fig. 12). Como o lume é alongado, estas estruturas foram denominadas ductos, conforme proposto por FAHN (1979).

Entretanto, estruturas semelhantes foram descritas na folha de *Porophyllum lanceolatum* e denominadas cavidades alongadas (MONTEIRO, 1986). LERSTEN E CURTIS (1988) adotaram o termo “reservatórios” em ambos os tipos de estruturas secretoras (ductos e cavidades),

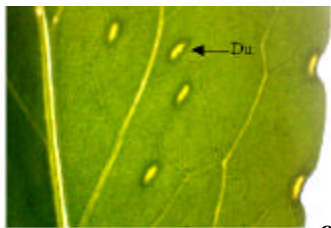
considerando não o comprimento, mas apenas a estocagem de secreções nestas estruturas. Os ductos visualizados em *Porophyllum ruderale*, marginal ou laminar, localizam-se em área intensamente vascularizada e se posicionam próximos à epiderme (Fig. 9), indicando que o processo de eliminação de compostos possa ser facilitado por essa disposição. A secreção é extracelular, endógena, já que as substâncias ficam no interior da cavidade.

De acordo com os testes histoquímicos realizados, tanto em amostras frescas quanto em fixadas, os ductos secretam substância de natureza mista, compostos lipídicos (Fig. 11) e fenólicos (Fig.12,13 e 14). Tais compostos foram evidenciados respectivamente por meio dos seguintes reagentes: Sudan III e solução de sulfato ferroso em formalina. Em trabalho anterior foi verificado que as folhas de *Porophyllum ruderale* contém óleo essencial e tanino (FONSECA, 2001).

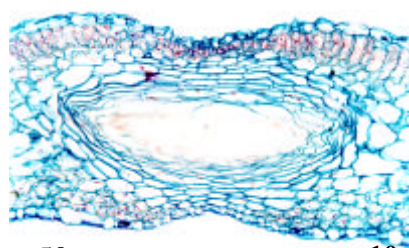
RODRIGUEZ & MABRY (1977) citam que é muito comum a presença de monoterpenos voláteis, constituintes majoritários do óleo essencial de *Porophyllum ruderale* (FONSECA, 2001), em espécies de *Porophyllum*. MONTEIRO (1995) verificou, em testes histoquímicos, que a secreção das folhas de *Porophyllum lanceolatum* consistiu-se de compostos lipofílicos, fenólicos e polissacarídeos, concordando em parte com o observado em *Porophyllum ruderale*, uma vez que a reação de substâncias pécticas e de proteínas totais mostrou-se negativa.



Figuras: 2 e 3 - Cortes transversais da raiz de *Porophyllum ruderale* corada com azul de toluidina; 4- Caule fixado em sulfato ferroso; 5 - Caule corado com azul de toluidina; 6 - Detalhe do ducto no caule; 7 - corte transversal do mesofilo; 8- corte transversal da margem.

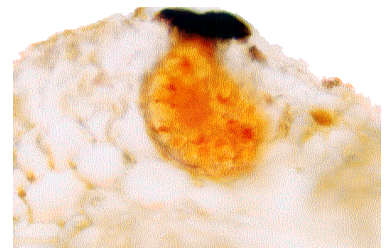


9



50µm

10



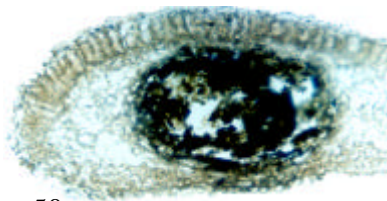
50µm

11



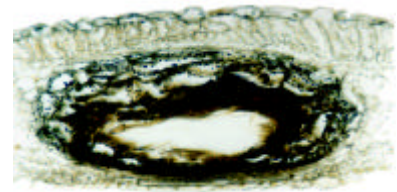
150µm

12



50µm

13



50µm

14

Figuras: 9 – Vista superficial da folha; 10– corte longitudinal do ducto; 11 – corte transversal submetido ao sudan III glicerinado, evidenciando compostos lipídicos; 12 a 14 – cortes de amostras fixadas com sulfato ferroso em formalina neutra tamponada evidenciando compostos fenólicos; 12 – corte transversal do ápice; 13 – corte transversal da margem; 14- corte longitudinal do mesofilo.

6. CONCLUSÕES

- As únicas estruturas secretoras identificadas foram os ductos formados por uma camada epitelial nos caules jovens e nas raízes de maior diâmetro e por várias camadas nas folhas.
- Os ductos do caule e da folha reagiram positivamente ao teste de compostos fenólicos, considerados os responsáveis diretos pela síntese e/ou acúmulo de taninos na espécie.
- A reação de compostos lipídicos positiva indicou que o óleo essencial provavelmente é sintetizado apenas nos ductos foliares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, F.M.C., CASALI, L. A. **Plantas medicinais e aromáticas: relação com o ambiente, colheita e metabolismo secundário**. Viçosa: UFV – Departamento de Fitotecnia, 1999. 139p.
- BATE-SMITH, E.C. Haemanalysis of tannins: the concept of relative astringency. **Phytochemistry**, v.12, p.907-912, 1973.
- BARROSO, G.M., PEIXOTO, A.L., COSTA, C.G., ICHASO, C.L.F., GUIMARÃES, E.F. & LIMA, A.C. 1986. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. v.3, Impr. Univ. da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.
- BENTLEY, B. & ELIAS, T.S. 1983. **The biology of nectarines**. Columbia University Press, New York.
- BERLYN, G.P. & MIKSCHE, J.P. 1976. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. The Iowa State University Press, Ames.
- BREMER, K. 1994. **Asteraceae: cladistics and classification**. Timber Press. Portland, Oregon. 752p.
- CASTRO, M. de M. 1987. **Estruturas secretoras em folhas de espécies da família Asteraceae: aspectos estruturais e histoquímicos**. São Paulo, SP: USP. 118p. Dissertação (Doutorado em Botânica) - Universidade de São Paulo.
- CLARO, S. M. C. A. 1994. **Levantamento dos tipos de estruturas secretoras em folhas de Asteraceae da restinga de Setiba, Guarapari (ES)**. Tese de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
- COSTA, A.F. **Farmacognosia**, 3.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v.1, 1975. 988p.
- CUTTER, E. G. 1978. **Plant anatomy. Part I: Cells and tissues**. 2nd. Ed., Edward Arnold, London.
- CRONQUIST, A. 1981. **An integrated system of classification of flowering plants**. Columbia University Press. New York.
- DEVINCENZI, I.A.A., HONDA, N.K., BRUM, R.L., MOREIRA, R.M. Atividade fungitóxica e citotóxica do óleo essencial de *Porophyllum ruderale*. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14, Florianópolis, SC, 1996. **Anais ...** Florianópolis, SC: UFSC, 1996.
- ESAU, K. 1965. **Plant Anatomy**. John Wiley & Sons Inc., New York.

- ESAU, K. 1977. **Anatomy of seed plants**. 2nd. Ed., John Wiley & Sons Inc., New York.
- FAHN, A. 1979. **Secretory tissues in plants**. Academic Press, Oxford.
- FAHN, A. 1982. **Plant anatomy**. 3rd. ed., Pergamon Press, Oxford.
- FONSECA, M. C. M. 2001. **Crescimento, composição do óleo essencial, teores de óleo e tanino em *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cassini**. Viçosa, MG: UFV, 2001, 68p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- FOSTER, A.S. **Practical plant anatomy**. D. van Nostrand Co., Inc. New York. 1949.
- GERLACH, G. 1969. **Botanische Mikrotechnik, eine Einführung**. Gorg Thieme, Stuttgart.
- GUILLET, G., BÉLANGER, A., ARNASON, J.T. Volatile monoterpenes in *Porophyllum gracile* and *P. ruderale* (Asteraceae): identification, localization and insecticidal synergism with α -terthienyl. **Phytochemistry**, v.49, n.2, p.423-429, 1998.
- HARBORNE, J.B. **Phytochemical methods**. 2.ed. Hong Kong: Chapman and Hall, 1984. 288p.
- HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs and medicines: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v.59, p.205-215, 1996.
- KESLEY, R.G., REYNOLDS, G.W. & RODRIGUEZ, E. 1984. The chemistry of biologically active constituents secreted and stored in plant glandular trichomes. **In: Biology and chemistry of plant trichomes**. (E. Rodriguez, P.L. Healey & I Mehta, eds), Plenum Press, New York, p. 133-241.
- JENSEN, W.A. 1962. **Botanical histochemistry: principles and practice**. W.H. Freeman & Co., San Francisco.
- JOHANSEN, D.A. 1940. **Plant microtechnique**. McGraw-Hill Book Co. Inc., New York.
- JUDD, W.S. et al. 1999. **Plant systematics, a phylogenetic approach**. Massachusetts: Publishers Sunderland, 464p.
- LEITÃO FILHO, H. de F. 1987. **Contribuição ao conhecimento taxonômico da tribo Vernoniae no estado de São Paulo**. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- MANN, J. **Secondary metabolism**. 2.ed. Oxford: Clarendon, 1987. 374p.
- MARGARIS, N.; KOEDAM, A. & VOKOU, D. 1982. **Aromatic plants: basic and applied aspects. World crops: production, utilization and description**. v.7, Martinus Nijhoff Publishers, The Hague.

MARQUESINI, N.R. Plantas usadas como medicinais pelos índios do Pará e Santa Catarina, Sul do Brasil. Família Asteraceae. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14, Florianópolis, 1996. **Anais...** SC: UFSC, 1996.

MEIRA, R. M. S. A. 1991. **Levantamento dos tipos de estruturas secretoras em folhas de espécies de Asteraceae em vegetação de floresta (Atibaia, SP)**. Campinas, SP: UNICAMP. 118p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

METCALFE, C.R. & CHALK, L. 1950. **Anatomy of the Dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses**. 2v., Clarendon Press, Oxford.

METCALFE, C.R. & CHALK, L. 1983. **Anatomy of the Dicotyledons: Wood, structure and conclusion of the general introduction**. 2nd ed., v.2, Clarendon Press, Oxford.

MEYER, M.W. & KARASOV, W.H. Chemical aspects of herbivory in arid and semiarid habitats. In: Palo, R.T. and Robbins, C.T. (eds.). **Plants Defenses Against Mammalian Herbivory**. Boca Raton: CRC Press, p.167-187, 1991.

MONTEIRO, W. R. 1986. **Estruturas secretoras da folha de *Porophyllum lanceolatum* DC. (Asteraceae): estudos morfológicos, histoquímicos e ultra-estruturais**. São Paulo, SP: USP. Dissertação (Livre-docência em botânica). 64p. Universidade de São Paulo.

MONTEIRO, W. R., CASTRO, M de M. & FAHN, A. 1995. Observations on development of the foliar secretory cavities of *Porophyllum lanceolatum* (Asteraceae). **Nord. J. Bot.** 15: 69-76.

MUNZ, P.A. & KECK, D.D. **A California flora**. University of California Press, Berkeley, 1973.

RODRIGUEZ, E. & MABRY, T.J. **Tagetae chemical review**. In: The biology and chemistry of the Compositae. Heywood, C.V.H., HARBORNE, J.B. & TURNER, B.L., eds. Academic Press. London, p.785-797, 1977.

RODRIGUES, E., HEALEY, P.L. & MEHTA, I. 1984. **Biology and chemistry of plant trichomes**. Plenum Press, New York.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico de origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P. GOSMAN, G., MELLO, J.C.P., MENTS, L.A., PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre, Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS Ed. UFSC, 1999. 821p.

SASS, J.E. 1951. **Botanical microtechnique**. 2 ed., xi + 288p., ilustr., The Iowa State College Press, Ames, Iowa.

SILVA, S.A.R., ARAÚJO, L.C.L., AKISUE, M.K. Estudo das atividades farmacológicas (antiinflamatória e antiulcerogênica) e determinação da toxicidade aguda do extrato bruto hidroalcoólico de *Porophyllum ruderale* (JACQ.) Cassini. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14, Florianópolis, 1996. **Anais...** SC: UFSC, 1996.

SILVA, F., CASALI, V.W.D. **Plantas medicinais e aromáticas: pós-colheita e óleo essencial.** 2.ed. Viçosa, MG: UFV, Departamento de Fitotecnia, 2000. 153p.

SCHNEPF, E. 1974. Gland cells. **In: Dynamic aspects of plant ultrastructure**, (A.W. Robards, ed.), McGraw-Hill Book Co. Ltd., Maidenhead, p.331-357.

SOLEREDER, H. 1908. **Systematic anatomy of the Dicotyledons. A handbook for laboratories of pure and applied Botany.** Translated by L.A. Boodle & F.G. Fritsch, 2v., Clarendon Press, Oxford.

SWAIN, T. 1979. Phenolics in the environment. p.624-637. In: T-Swain, J.B. Harbone and C.F. Van Sumere (ed.). **Recent Advances in Phytochemistry.** v.12. Plenum Press, N.Y.

TAIZ, L., ZEIGER, E. **Plant Physiology.** 2.ed. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, 1998. 792p.

WAGNER, H. 1977. Pharmaceutical and economic uses of the Compositae. **In: The biology and chemistry of the Compositae.** (V> H> Heywood, J. B. Harborne & B. L. Tuner, eds.) v.1, Academic Press, London, p.411-433.

WATERMAN, P.G. The chemistry of volatile oils. In: HAY, R.K.M., WATERMAN, P.G. **Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production.** Essex: Longman Group, 1993, p. 47-61.

CAPÍTULO 2

Ação antifúngica de *Porophyllum ruderale* sobre candida e dermatófitos

1. INTRODUÇÃO

O interesse pelas plantas medicinais é crescente, seja pela população, na busca de remédios mais baratos e eficazes, ou pelas indústrias, na busca de novos compostos farmacologicamente ativos (OLIVEIRA, 2001).

A Organização Mundial da Saúde reconhece a importante contribuição da medicina tradicional na assistência social, especialmente às populações com acesso limitado aos sistemas de saúde, e solicitou aos Estados membros que intensifiquem a cooperação entre praticantes da medicina tradicional e da assistência sanitária moderna, especialmente no tocante ao emprego de remédios tradicionais de eficácia científica demonstrada, a fim de reduzir gastos com medicamentos. Sugeriu também que todos esses remédios sejam aproveitados plenamente, e que os produtos naturais, em particular os derivados de plantas, poderiam ser pesquisadas quanto à presença de novas substâncias terapêuticas (OMS, 1991).

“Planta medicinal é toda aquela que, administrada ao ser humano ou animais por qualquer via e sob qualquer forma, exerce alguma espécie de ação farmacológica” (OMS, 1987). O desenvolvimento de medicamentos originados destas plantas é geralmente mais rápido e envolve custos menores quando comparados aos obtidos por síntese. As plantas já têm suas propriedades conhecidas na medicina popular, e muitas delas são comercializadas na forma de fitoterápico (CALIXTO, 1997).

Na manipulação químico-farmacêutica substâncias são extraídas predominantemente dos vegetais, visto que suas estruturas químicas são protótipos de muitos dos medicamentos sintéticos e semi-sintéticos obtidos a partir de modelos de moléculas vegetais (SANDES & DI BLASI, 2000).

Atualmente, 121 substâncias químicas de estrutura conhecida são extraídas diretamente de plantas e usadas na indústria de medicamentos. A principal fonte de plantas superiores fornecedoras de drogas, tanto na medicina tradicional como na moderna, é a flora silvestre de países em desenvolvimento (FARNSWORTH & SOEJARTO, 1991).

O Brasil, com a maior diversidade genética vegetal do mundo, cerca de 55.000 espécies catalogadas do total estimado entre 350.000 e 550.000 espécies (SANDES & DI BLASI, 2000), com tradição no uso de plantas medicinais e detentor de tecnologia, tem

grandes chances de progresso da indústria dos fitofármacos, que movimentam US\$ 40 bilhões por ano (CALIXTO, 1997).

A abordagem das plantas medicinais a partir da adoção por sociedades autóctones, de tradição oral, pode ser útil na elaboração de estudos farmacológicos, fitoquímicos e agrônômicos, evitando perdas econômicas e de tempo. É possível planejar a pesquisa a partir do conhecimento tradicional consagrado pelo uso contínuo, que deverá então ser testado em bases científicas (AMOROZO, 1996). Daí o interesse da indústria farmacêutica e de pesquisadores em se concentrar na busca de novos compostos extraídos das plantas, conscientes da importância das informações obtidas das práticas tradicionais.

As pesquisas realizadas em laboratórios com plantas medicinais não devem ocorrer de forma isolada, desarticulada da realidade cultural, nem do contexto etnográfico que envolve o usuário de plantas medicinais, assim como do detentor do saber acerca dessas plantas, pois estes são os que fornecem em primeira instância as informações que poderão orientar na escolha de qualquer planta a ser pesquisada (RODRIGUES, 2002). Somente por meio da correlação entre os conceitos tradicionais e os conceitos do sistema biomédico convencional, pode-se levantar boas hipóteses de trabalho e, portanto, otimizar os estudos sobre desenvolvimento de novas drogas ou preparações terapêuticamente úteis (ELIZABETSKY, 1987).

A relação entre fármacos e uso popular de plantas está reforçada por vários estudos, a exemplo do realizado por Gonçalves (1999), no qual 62% das indicações populares, feitas pelos informantes de Santo Antônio do Leverger – MT, coincidiram com as ações farmacológicas descritas na literatura científica e o relatado por Cox et al. (citados por VOEKS, 1996), em que mais de 86% das plantas indicadas pelos informantes possuíam atividades farmacológicas, demonstrando assim a importância da medicina popular para agilizar a descoberta de novas drogas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A Organização Mundial de Saúde (OMS) tem sido a instituição internacional maior estimuladora do uso de plantas medicinais pela raça humana, face aos dados exagerados sobre o uso de antibióticos e alopáticos diversos. A OMS revela que 80% da população do planeta utiliza plantas medicinais em alguma terapia. São muitos os fatores que colaboram na preferência pelas práticas alternativas de saúde, destacando-se, o declínio das condições sociais (MARTINS et al., 1994).

A ocorrência de infecções micóticas de pele, de unha e de cabelo é comum em vários países (GRUSECK et al, 1996). O grupo de fungos conhecidos como dermatófitos são importantes patógenos da pele. Três gêneros são conhecidos pela capacidade de infectar o ser humano. *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*, que incluem 39 espécies. Cinco espécies ocasionam a maioria das dermatites no mundo, as outras são de baixa infectividade, raras ou em extinção. Em revisão de quadros clínicos diagnosticados, Logeman (1983) relata que os principais agentes etiológicos foram: *Trichophyton rubrum* (73,6%), *T. menta* (16,3%), *Epidermophyton floccosum* (3,1%) e *Microsporum canis* (2,5%). Em 3,6% dos casos, as infecções dermatofíticas associam-se as infecções causadas por *Candida albicans*, o que indica complicação no diagnóstico e no tratamento.

Dermatófitos causam infecções crônicas e requerem tratamentos prolongados com drogas antimicóticas caras e às vezes pouco efetivas (CACERES et al, 1991). O número limitado de drogas efetivas (JACOBS, 1990), os efeitos colaterais (LOPEZ-GOMEZ et al, 1994; KULLBERG, 1997), a toxicidade (FERESIN et al, 2001) e a resistência dos microrganismos às drogas disponíveis (STERNBERG, 1994) têm incentivado a pesquisa de novos agentes antimicóticos. Basicamente quatro drogas são utilizadas no tratamento oral de dermatomicoses, todas com suas limitações (JANSSEN & CAUWENBERGH, 1990): A) Iodeto de potássio: com pequeno espectro de atividade e intolerância gastrointestinal (o que faz necessário pequenos acréscimos nas doses); B) Griseofulvina: em geral é bem tolerada, mas tem sérios efeitos colaterais. Nos últimos anos os dermatófitos têm desenvolvido resistência à este medicamento (ARTIS, 1985); C) Cetoconazol: é altamente efetivo contra infecções micóticas comuns, mas há raros e sérios efeitos colaterais, a exemplo da hepatite em 1 de cada 15 pacientes tratados (LEWIS et al, 1984) e efeitos endócrinos, que juntos, têm restringido o uso de cetoconazol (SANTEN et al, 1983).

Na tabela 1 encontram-se as principais classes de agentes quimioterápicos sintéticos ou obtidos de microrganismos utilizados no tratamento de dermatomicoses e seu mecanismo de ação sobre a célula fúngica.

Tabela 1 – Principais classes de agentes quimioterápicos sintéticos ou obtidos de microrganismos utilizados no tratamento de dermatomicoses e seu mecanismo de ação sobre a célula fúngica

Classe	Quimioterápico	Mecanismo de ação
Diaminopirimidina	Trimetroprim	Atua inibindo a enzima diidrofoloreductase, responsável pela transformação do ácido diidrofólico no ácido tetraidrofólico
Composto nitrofurânico	Nitrofurazona	O mecanismo de ação não está perfeitamente elucidado, sugere-se que sua ação esteja relacionada à redução destes compostos por flavoproteínas, formando intermediários altamente reativos que causam danos ao DNA do microrganismo e conseqüentemente morte
Imidazóis	Cetoconazol, Miconazol, Cortrimazol e Econzol	Alteração da permeabilidade de membrana através da inibição da síntese do ergosterol (principal esteróide da membrana fúngica)
Triazóis	Itraconazol e Fluconazol	Idem aos imidazóis
Antifúngico sintético	Fluocitosina	Conversão da fluocitosina em 5-fluoro-2'-deoxiuridina 5'-monofosfato, um antimetabólico que inibe a timidilatosintetase (enzima fundamental na síntese do DNA fúngico)
Antibióticos poliênicos (apresentam várias múltiplas ligações)	Anfotericina B e Nistatina	Atuam através de ligações irreversíveis aos esteróides da membrana celular, permitindo que íons K^+ e Mg^{2+} saiam da célula. Com a saída destes íons (principalmente do K^+) há comprometimento do metabolismo celular
Antibiótico não-poliênico	Griseofulvina	Penetra na célula fúngica causando ruptura do fuso mitótico, inibindo a mitose do fungo e conseqüentemente impedindo o crescimento deste microrganismo. Causa alterações morfogênicas na parede celular do fungo.
	Iodeto de sódio e potássio	Pouco se sabe sobre seu mecanismo de ação; sugere-se que afeta a resposta imune do hospedeiro através do aumento da atividade do sistema halida-peroxidase, nas células fagocitárias
Antifúngico sintético	Tolnaftato	Não se sabe o mecanismo de ação, mas o tolnaftato é ativo apenas em células fúngicas em crescimento
	Ácido undecilênico	Não se sabe o mecanismo de ação

Adaptado de Spinosa et al. (1996)

Particularmente, a espécie *Trichophyton rubrum*, que causa infecções comuns no ser humano, é difícil de ser controlada efetivamente e o arsenal farmacêutico contra esta espécie de dermatófito é mais limitado (JANSEN et al, 1991). Por esta razão produtos derivados de plantas que inibam seu crescimento, sem causar dano ao hospedeiro, poderão ser agentes terapêuticos potencialmente efetivos (MAOZ & NEEMAN, 1998) e seguros em relação aos agentes antimicrobianos produzidos sinteticamente (KURITA et al, 1981). No entanto, algumas plantas medicinais têm mostrado ação farmacológica e toxicidade humana em altas dosagens (VOLLEKOVÁ et al, 2003) devido à não concentração de um único composto fármaco-ativo como é o caso da maioria dos agentes quimioterápicos sintéticos.

O uso de plantas medicinais no tratamento de doenças de pele, incluindo micoses, é prática antiga em várias partes do mundo (IROBI & DARAMOLA, 1993) e também no Brasil (COSTA et al, 2000).

O reconhecimento das potencialidades das plantas medicinais correspondeu ao crescente interesse pelos temas ecológicos e pelos remédios naturais. Por esta razão o uso encontra-se atualmente outra vez em franca expansão. À incorporação de plantas e práticas vindas de todo o mundo, seguiu-se a pesquisa contínua de várias outras plantas.

A pesquisa científica internacional, além de confirmar as virtudes medicinais de muitas plantas usadas popularmente, trouxe novas descobertas, como a da composição química das diversas espécies vegetais, com interesse medicamentoso (BENOR et al., 1997).

As plantas medicinais podem ser vistas como precursoras da farmacologia moderna. Com efeito, muitos medicamentos potentes têm origem na matéria vegetal (BENOR et al., 1997).

A flora medicinal é, sem dúvida, considerada arsenal terapêutico, entretanto, faz-se necessário estudos científicos das plantas utilizadas na medicina popular, comprovando os efeitos terapêuticos e os possíveis efeitos colaterais. Existem poucos estudos sobre a validação do uso das plantas medicinais, o que incita a investigação sistemática de sua farmacologia. Na medicina popular, *Porophyllum ruderale* é utilizada como cicatrizante e antiinflamatória (SILVA et al., 1996), antifúngica (DEVINCENZI et al., 1996), antibacteriana, calmante, combate a hipertensão arterial (chá), tratamento de leishmaniose, tratamento de edemas e traumatismos (infusão), tratamento de picada de cobra e de doenças reumáticas (infusão), assim como de inflamações do aparelho genital (infusão), dores em geral, machucadura interna causada por batidas (MARQUESINI, 1996). No trabalho etnobotânico realizado por Rodrigues (2002), a família mais utilizada com fins medicinais foi a Asteraceae (42,5%).

Dentre as espécies encontrava-se *Porophyllum ruderale*, a qual foi indicada no tratamento de “manchas” de pele, utilizando-se a folha.

Dentre os compostos fármaco-ativos presentes nas folhas de *Porophyllum ruderale* se encontram os óleos essenciais e os taninos, os quais têm efeitos inibitórios sobre bactérias e fungos (WAAGE et al., 1984; MARWAN & NAGEL, 1986; SCALBERT, 1991). Na tabela 2 encontram-se as principais classes de agentes quimioterápicos derivados de plantas utilizados no tratamento de dermatomicoses e seu mecanismo de ação sobre a célula fúngica.

Embora existam na bibliografia científica e popular dados a respeito dos constituintes químicos e da fitoquímica de *Porophyllum ruderale*, pouco se sabe sobre sua farmacologia (LIMA NETO et al, 1993).

Por ser utilizada na alimentação, o uso desta planta pode ser possível e seguro comparado aos antimicóticos sintéticos. No entanto, é de extrema importância continuar o aprofundamento na caracterização (agrícola, fitoquímica e farmacológica) desta espécie medicinal, embasando estudos clínicos sobre o potencial dos medicamentos naturais no Brasil.

Tabela 2 – Principais classes de agentes quimioterápicos derivados de plantas utilizados no tratamento de dermatomicoses e seu mecanismo de ação sobre a célula fúngica

Classe	Quimioterápico	Mecanismo de ação
Compostos lipídicos derivados de fenilpropanóides ou de terpenóides, (Simões e Spitzer, 1999)	Óleo essencial	? efeitos tóxicos na estrutura da membrana explicam a ação antimicrobiana dos óleos essenciais e de seus componentes monoterpênicos (Andrews et al., 1980; Uribe et al. 1985; Knobloch et al., 1988), e vários estudos têm mostrado que os monoterpênicos causam danos na membrana dos microrganismos (Sikkema et al., 1995)
		? α -pineno e β -pineno (monoterpenos presentes em alguns óleos essenciais) destroem a integridade celular, inibem a respiração e o processo de transporte de íons, além de aumentar a permeabilidade da membrana (Andrews et al., 1980; Uribe et al., 1985)
Compostos fenólicos (Oliveira, 1988)	Taninos	? inibição das enzimas de bactérias e fungos e/ou complexação com os substratos destas enzimas; (Hattori et al., 1990; Ooshima et al., 1993; Waage et al., 1984; Marwan & Nagel, 1986; Scalbert, 1991)
		? ação sobre as membranas celulares dos microrganismos, modificando o seu metabolismo (Waage et al., 1984; Marwan & Nagel, 1986; Scalbert, 1991)
		? complexação de taninos com íons metálicos, diminuindo, assim, a disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo dos microrganismos (Simões et al., 1999; Haslam, 1996).
		? atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres (Haslam, 1996)
Glicosídeos esteroidais (Schenkel et al., 2002)	Saponinas	? habilidade de complexar outras moléculas, incluindo macromoléculas tais como proteínas e polissacarídeos (Simões et al., 1999)
		? ação sobre membranas celulares, alterando sua permeabilidade ou causando sua destruição (Schenkel et al., 2002; Osbourn, 1996)

3. OBJETIVO

Verificar “in vitro” a atividade antifúngica do extrato das folhas de *Porophyllum ruderale* sobre dermatófitos (*Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*) e cândida (*Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção das plantas:

As plantas foram cultivadas no viveiro de plantas ornamentais da Universidade Federal de Viçosa (UFV). As mudas foram transplantadas para o campo no espaçamento de 40 cm entre linhas e plantas. Na adubação, foi utilizado 0,5 L de húmus por cova. A irrigação foi feita quando necessária, além de capinas manuais periódicas quando a presença de plantas indesejáveis se tornava excessiva. Em Janeiro de 2005, período de pré-floração, as plantas foram colhidas, sendo um exemplar identificado e registrado no herbário da UFV sob o número VIC 25169. As folhas foram colocadas em sala de secagem, à temperatura ambiente, até atingirem massa constante, trituradas e acondicionadas em saco de polietileno até a preparação dos extratos.

4.2 Preparação dos extratos:

Folhas desidratadas e trituradas (100 g) foram submetidas a extrações sucessivas durante 24 horas a 100 rpm, à temperatura ambiente, com metanol. Foram colocadas 100 g de “folhas em pó” em frascos de vidro, as quais foram cobertas com 200 mL do solvente. Após 8 horas filtrou-se o sobrenadante em filtro de papel quantitativo e cobriu-se novamente com o respectivo solvente. Tal procedimento foi realizado a cada 8 horas, totalizando três extrações. Os extratos foram reunidos e levados ao evaporador rotativo (60°C), fornecendo o extrato metanólico.

4.3 Microrganismos

Os microrganismos utilizados no teste biológico foram: *Candida krusei* - ATCC 6258, *Candida parapsilosis* - ATCC 22019, *Candida albicans* - ATCC 64548, *Trichophyton rubrum* - ATCC 40051 e *Trichophyton mentagrophytes* - ATCC 40004. As ATCC (American Type Culture Collection) de *Candida* foram gentilmente cedidas pela prof. Dra Márcia Melhem - Instituto Adolf Lutz (IAL) e as de *Trichophyton* foram gentilmente cedidos pela

Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - Laboratório de Materiais de Referência, via Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

As culturas foram estocadas em tubo inclinado, contendo ágar dextrose de Sabouraud, pH 5,6, em geladeira, à aproximadamente 10° C.

4.4 Método de diluição em ágar

O extrato da planta foi pesado, dissolvido em 5 mL de DMSO (dimetilsulfóxido) e adicionado ao meio de cultura, resultando nas diluições desejadas (0, 1, 2 e 3 mg/mL de meio, e, posteriormente, nas diluições: 0, 2, 4, 6, 8 e 10 mg/mL). No controle, acrescentou-se apenas DMSO.

Os isolados de dermatófitos testados foram inoculados em ágar Sabouraud e incubados a 25°C por 10 dias visando obter culturas jovens com crescimento ativo do micélio. Discos miceliais de 8 mm de diâmetro, das espécies de dermatófitos testadas, foram assepticamente inoculados ao meio de cultura, no centro da placa. As placas de Petri (9 cm de diâmetro) inoculadas foram incubadas a 25°C por 7 dias, sendo o diâmetro da colônia mensurado diariamente. As medidas foram feitas em quadrantes desenhados no fundo das placas, sendo realizadas quatro repetições no total

Os isolados de cândida foram repicados em meio Sabouraud líquido e incubados a 25°C por 48 horas visando ativar as culturas. Um mililitro da cultura ativada de cada espécie de cândida foi espalhada com alça de Drigalsky sobre o meio ágar Sabouraud, suplementado com o extrato metanólico de *Porophyllum ruderale* nas seguintes diluições: 0, 2, 4, 6, 8 e 10 mg/mL. As placas foram incubadas por 72 horas e avaliou-se o crescimento de colônias.

4.5 Análise estatística

O experimento foi montado no esquema de parcelas subdivididas, tendo nas parcelas o esquema fatorial 4 x 2 (4 diluições e duas espécies de dermatófitos) e nas subparcelas os tempos, no delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições. Os dados foram analisados por meio da análise de variância e regressão. Para o fator qualitativo as médias foram comparadas utilizando-se o teste de Tukey, adotando-se o nível de 5% de probabilidade. Para o fator quantitativo os modelos foram escolhidos com base na significância dos coeficientes da regressão. Independentemente de a interação ser ou não significativa, optou-se pelo desdobramento da mesma.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas primeiras diluições testadas: 0, 1, 2 e 3 mg/mL, a presença do extrato reduziu significativamente o crescimento das colônias de *Trichophyton mentagrophytes* a partir de 192 horas (Tabela 2), sendo mais efetiva a diluição de 3 mg/mL. Na figura 1 pode-se verificar o aumento do diâmetro das colônias com o aumento das horas, entretanto, verifica-se que o crescimento das mesmas é menor na presença do extrato das folhas de couve-cravinho. Nas figuras 2A e 2B tem-se a ilustração das colônias de *Trichophyton mentagrophytes* nas diluições 0 mg/mL e 3 mg/mL, respectivamente, mostrando a redução do diâmetro das colônias ao se comparar o controle com a diluição de 3 mg/mL. O extrato não reduziu significativamente o crescimento das colônias de *Trichophyton rubrum* (Tabela 2), mas percebe-se que na diluição de 3 mg/mL (Figura 2C) a colônia não se desenvolveu tão bem quanto no controle (Figura 2D).

Como entre as diluições 2 e 3 mg/ml do extrato de *Porophyllum ruderale*, percebeu-se redução no crescimento das colônias, decidiu-se testar diluições maiores visando a inibição do crescimento destes fungos.

Nas outras diluições testadas: 0, 2, 4, 6, 8 e 10 mg/mL, à partir de 96 horas, tem-se diferença significativa no crescimento das colônias de *Trichophyton rubrum* (Tabela 4), sendo mais efetivas as concentração de 8 e 10 mg/mL. Na figura 3 tem-se a estimativa do crescimento das colônias de dermatófitos. As figuras 4A (0 mg/mL) e 4B (10 mg/mL) ilustram a redução do diâmetro das colônias de *Trichophyton rubrum* ao se comparar o controle com a diluição de 10 mg/mL.

Os resultados mostram o potencial do extrato de couve-cravinho, sendo importante fonte de compostos antifúngicos, podendo ser útil no tratamento de infecções dermatofíticas.

O efeito antifúngico do extrato indica a importância de muitas espécies de plantas como recurso natural no tratamento de algumas micoses. A atividade antidermatofítica de outras plantas medicinais tem sido relatadas (HEISEI & GORHAM, 1992; CACERES et al., 1991) e extratos de outras espécies pertencentes à mesma família de *Porophyllum ruderale* (Asteraceae) reduziram o crescimento de *Trichophyton rubrum* (MAOZ & NEEMAN, 1998) e de *Trichophyton mentagrophytes* (MAOZ & NEEMAN, 2000).

Tabela 1 – Resumo da análise de variância da variável diâmetro da colônia (cm) em função das diluições (0, 1, 2, 3 mg/mL) do extrato de couve-cravinho (*Porophyllum ruderale*) (T), da espécie de dermatófitos (E1 = *Trichophyton mentagrophytes* e E2 = *Trichophyton rubrum*) e do tempo (H)

FV	GL	QM
T	3	6,88**
E	1	46,21**
T x E	3	2,23*
Resíduo (a)	32	0,51
H	10	63,98**
H x T	30	0,54
H x E	10	4,21**
H x E x T	30	0,52
Resíduo (b)	320	0,45
CV (%) parcela		46,8
CV (%) subparcela		28,30

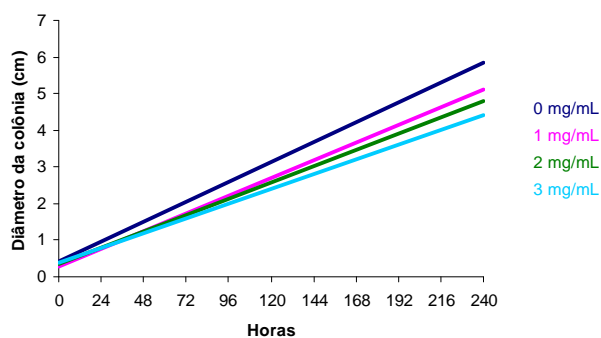
** Significativo à 1% de probabilidade pelo teste F

* Significativo à 5% de probabilidade pelo teste F

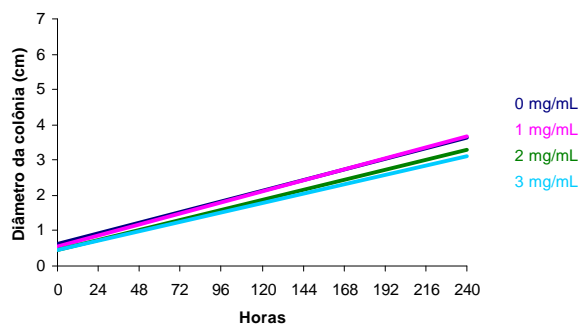
Tabela 2 – Valores médios da variável diâmetro da colônia (cm) em função das diluições (0, 1, 2, 3 mg/mL) do extrato de couve-cravinho (*Porophyllum ruderale*), da espécie de dermatófitos (E1 = *Trichophyton mentagrophytes* e E2 = *Trichophyton rubrum*) e do tempo.

Diluição (mg/mL)	Tempo (horas)																					
	0		24		48		72		96		120		144		168		192		218		242	
	E1	E2	E1	E2	E1	E2	E1	E2	E1	E2	E1	E2	E1	E2	E1	E2	E1	E2	E1	E2	E1	E2
0	0,8Aa	0,8Aa	1,0Aa	0,9Aa	1,3Aa	1,1Aa	1,8Aa	1,5Aa	2,4Aa	1,9Aa	3,1Aa	2,1Ab	3,6Aa	2,4Ab	4,2Aa	2,6Ab	4,8Aa	3,1Ab	5,3Aa	3,4Ab	6,0Aa	3,7Ab
1	0,8Aa	0,8Aa	0,8Aa	0,9Aa	1,1Aa	1,0Aa	1,5Aa	1,4Aa	1,9Ab	1,8Aa	2,5Aa	2,0Aa	3,0Aa	2,4Aa	3,6Aa	2,7Ab	4,3ABa	3,1Ab	4,6ABa	3,5Ab	5,4ABa	3,7Ab
2	0,8A	0,8Aa	0,8Aa	0,9Aa	1,1Aa	0,8Aa	1,6Aa	1,2Aa	1,9Aa	1,4Aa	2,4Aa	1,7Aa	2,9Aa	2,0Aa	3,4Aa	2,4Ab	3,9ABa	2,8Ab	4,5ABa	3,1Ab	5,0ABa	3,5Ab
3	0,8Aa	0,8Aa	0,8Aa	0,8Aa	1,0Aa	0,9Aa	1,4Aa	1,1Aa	1,8Aa	1,4Aa	2,3Aa	1,6Aa	2,7Aa	2,0Aa	3,2Aa	2,2Ab	3,7Ba	2,7Ab	4,1Ba	2,9Ab	4,5Ba	3,3Ab

As médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, para cada tempo, não diferem a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey



(A)



(B)

Equações:

0 mg/mL – $Y = 0,4151 + 0,0225^{**} x$ ($r^2=0,99$)
 1 mg/mL – $Y = 0,2727 + 0,02^{**} x$ ($r^2=0,97$)
 2 mg/ mL – $Y = 0,3654 + 0,0183^{**} x$ ($r^2=0,98$)
 3 mg/ mL – $Y = 0,3924 + 0,0167^{**} x$ ($r^2=0,98$)

Equações:

0 mg/mL – $Y = 0,6298 + 0,0125^{**} x$ ($r^2=0,99$)
 1 mg/mL – $Y = 0,8848 + 0,0124^{**} x$ ($r^2=0,57$)
 2 mg/ mL – $Y = 0,4662 + 0,0118^{**} x$ ($r^2=0,96$)
 3 mg/ mL – $Y = 0,4877 + 0,0108^{**} x$ ($r^2=0,96$)

Figura 1 -Estimativa do diâmetro de colônias de (A) *Trichophyton mentagrophytes* e (B) *Trichophyton rubrum*, cultivadas em agar Sabouraud, à 25°C, suplementado com extrato metanólico de *Porophyllum ruderale* em diferentes concentrações, durante dez dias de incubação

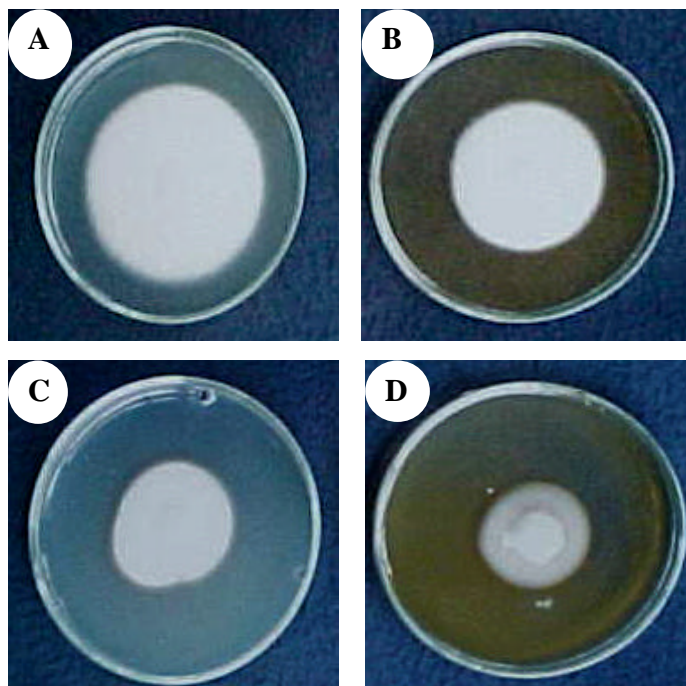


Figura 2: Colônias de *Trichophyton mentagrophytes*, (A e B) e de *Trichophyton rubrum* (C e D) cultivadas em meio agar Sabouraud, suplementado com extrato metanólico de *Porophyllum ruderale*, à 25°C, por dez dias. (A e C – 0 mg/mL, controle; B e D - 3 mg/mL).

Sabe-se que dentre os componentes do extrato de *Porophyllum ruderale* encontram-se compostos fenólicos e lipídicos (ácidos graxos e óleo essencial). Compostos fenólicos isolados do fruto da oliveira inibiram o crescimento de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* (MARKIN et al, 2003). Todas as plantas, pertencentes à família Asteraceae, testadas por Salie et al (1996) foram positivas quanto à presença de taninos e quanto à atividade antimicrobiana.

Alguns óleos essenciais são considerados promissores devido à atividade antifúngica. Componentes do óleo como pineno, 1,8 cineol, timol e limoneno são responsáveis por amplo espectro de propriedades farmacológicas, incluindo a atividade antifúngica (LIMA ET AL, 1993). Alguns destes componentes estão presentes no óleo essencial de *Porophyllum ruderale* (FONSECA, 2001. Resultados “in vitro” mostram que óleos essenciais exibem atividade antidermatofítica (GARG &MÜLLER, 1993; LIMA et al, 1993). No entanto, esta propriedade não pode ser atribuída somente aos óleos, os quais podem agir sinergisticamente com outros compostos fármaco-ativos presentes nas plantas medicinais (LIMA et al, 1993).

Tabela 3 - Resumo da análise de variância da variável diâmetro da colônia (cm) em função das diluições (0, 2, 4, 6, 8 e 10 mg/mL) do extrato de couve-cravinho (*Porophyllum ruderale*) (T) da espécie de dermatófitos (E2 = *Trichophyton rubrum*) e do tempo (H)

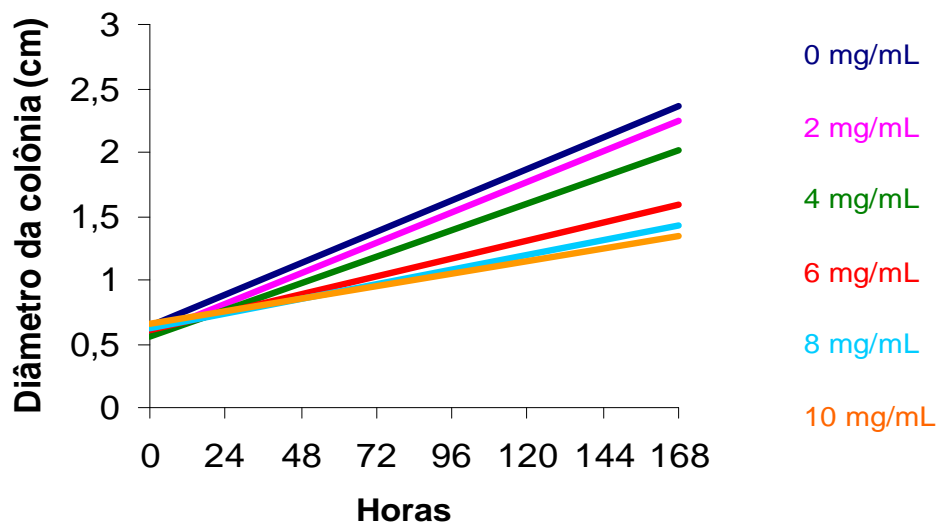
FV	GL	QM
BLOCO	2	0,0175
T	5	1,3816**
Resíduo (a)	10	0,0209
H	7	3,3271**
H x T	35	0,1256**
Resíduo (b)	84	0,0054
CV(%) parcela		11,68
CV(%) subparcela		5,95

**Significativo à 1% de probabilidade pelo teste F

Tabela 4 - Valores médios da variável diâmetro da colônia de *Trichophyton rubrum* (cm) em função das diluições (0, 2, 4, 6, 8 e 10 mg/mL) do extrato de couve-cravinho (*Porophyllum ruderale*) e do tempo.

Diluição (mg/mL)	Tempo (horas)						
	0	24	48	96	120	144	168
0	0,8A	0,8A	1,1A	1,5A	1,9A	2,2A	2,4A
2	0,8A	0,8A	0,8A	1,6A	1,9A	2,1A	2,2B
4	0,8A	0,8A	0,9A	1,2B	1,7B	1,8B	2,2B
6	0,8A	0,8A	0,8A	0,9C	1,3C	1,6BC	1,7C
8	0,8A	0,8A	0,8A	0,9C	1,1D	1,4CD	1,6CD
10	0,8A	0,8A	0,8A	0,9C	1,1D	1,3D	1,5D

As médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey



Equações:

0 mg/mL – $Y = 0,8278 + 0,00929^{**} x$ ($r^2=0,7954$)

2 mg/mL – $Y = 0,5444 + 0,00859^{**} x$ ($r^2=0,8902$)

4 mg/ mL – $Y = 0,5944 + 0,00979^{**} x$ ($r^2=0,9227$)

6 mg/mL – $Y = 0,6361 + 0,00463^{**} x$ ($r^2=0,8194$)

8 mg/mL – $Y = 0,6083 + 0,005903^{**} x$ ($r^2=0,8421$)

10 mg/mL – $Y = 0,661 + 0,004084^{**} x$ ($r^2=0,8428$)

** Significativo à 1% de probabilidade pelo teste “t”

Figura 3 – Estimativa do diâmetro das colônias (cm) de *Trichophyton rubrum*, cultivadas em ágar Sabouraud, à 25°C, suplementado com extrato metanólico de *Porophyllum ruderale*, em diferentes diluições (0, 2, 4, 6, 8 e 10 mg/mL), durante 7 dias

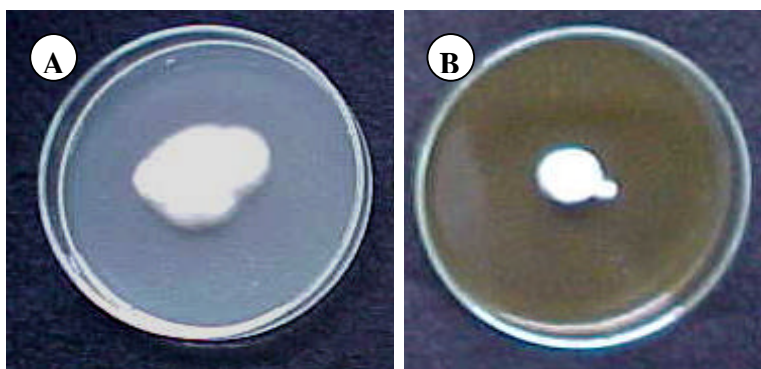


Figura 4: Colônias de *Trichophyton rubrum* cultivadas em agar Sabouraud suplementado com (A) 0 mg/mL e (B) 10 mg/mL de extrato metanólico de *Porophyllum ruderale*, à 25°C, por sete dias.

Não houve redução no crescimento das espécies de cândida testadas. Muitas espécies que mostraram atividade antifúngica sobre dermatófitos (YAGHMOUR, 1997; ALI-SHTAYEH et al, 1999) foram inativas sobre *Candida albicans*, dando suporte a hipótese que compostos anticandida não estejam presentes no tipo de extrato testado (metanólico). Extratos hidroalcoólicos de guaco (*Mikania glomerata*) e mil-folhas (*Achillea millefolium*), as quais pertencem à mesma família de *Porophyllum ruderale* apresentaram atividade contra *Candida krusei* (HOLETZ et al, 2002). Testes posteriores com extratos de outros órgãos da planta devem ser avaliados quanto à ação anticândida.

6. CONCLUSÕES

Existe evidência científica preliminar de que o uso popular de couve-cravinho no tratamento de infecções dérmicas causadas por *Trichophyton mentagrophytes* e de *Trichophyton rubrum* corresponde às propriedades antimicóticas atribuídas.

O extrato das folhas de *Porophyllum ruderale* reduziu o crescimento das colônias de *Trichophyton mentagrophytes* e de *T. rubrum* comparado ao controle e não inibiu as espécies de *Candida*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI-SHTAYEH, M.S., SUHEIL, I.A.G., Antifungal activity of plant extracts against dermatophytes. **Mycoses**, v.42, p. 665-672, 1999.

AMOROZO, M.C. de M. Abordagem etnobotânica na pesquisa de plantas medicinais. In: DI STASI, L.C. **Plantas medicinais: arte e ciência; um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: UNESP, p. 47-68, 1996.

ANDREWS, R.E., PARKS, L.W., SPENCE, K.D. Some effects of Douglas fir terpenes on certain microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 40, p. 301-304, 1980.

ARTIS, W.M. Final pathway for delivery of oral antifungals to keratinized cornified skin. In: Oral therapy in dermatomycoses: A step forward. (Proceedings of a symposium, Frankfurt, February, 1985). **Medicine Publishing Foundation Symposium Series**, n.6, pp. 61-70, 1985.

BENOR, D.J., ATTENBOROUGH, A., BROWN, P.T., BUTLER, B.H., CHASE, D. **Dicionário da Medicina Natural** – Seleções Reader's Digest Brasil, Ltda. [S. I.: s. n.], novembro, 1997. 411 p.

CACERES, A., LOPEZ, B.R., GIRON, M.A., LOGEMANN, H. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 1. Screening for antimycotic activity of 44 plant extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v.31, p. 263-273, 1991.

CACERES, A., LOPEZ, B.R., GIRON, M.A., LOGEMANN, H. Actividad antimicótica de plantas usadas em Guatemala para el tratamiento de dermatofitosis. **Revista Mexicana de Micología**, v.7, p.21-38, 1991.

CALIXTO, J.B. Fitofármacos no Brasil: agora ou nunca! **Ciência Hoje**, v. 21, n. 1234, p. 26-30, 1997.

COSTA, T.R., FERNANDES, °F.L, SANTOS, S.C. et al. Antifungal activity of volatile constituents of *eugenia dysinterica* leaf oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.72, p.111-117, 2000.

DEVINCENZI, I.A.A., HONDA, N.K., BRUM, R.L., MOREIRA, R.M. Atividade fungitóxica e citotóxica do óleo essencial de *Porophyllum ruderale*. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14, Florianópolis, SC, 1996. **Anais ...** Florianópolis, SC: UFSC, 1996.

ELIZABETSKY, E. Pesquisa em plantas medicinais. **Ciência e cultura**, São Paulo, v. 39, n. 8, p. 697-702, ago, 1987.

FARNSWORTH, N.R. Global importance of medicinal plants. In: **The conservation of medicinal plants**. Cambridge University Press, p. 25-51, 1991.

FERESIN, G.A. TAPIA, A., LÓPES, S.N., ZACCHINO, S.A. Antimicrobial activity of plants used in traditional medicine of San Juan Province, Argentine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, p.103-107, 2001.

GARG, A.P., MÜLLER, J. Fungitoxicity of fattyacids aganist dermatophytes. **Mycoses**, v.31, p.40-51, 1993.

GONÇALVES, M.J.A. **O conhecimento popular na terapêutica com plantas medicinais no município de Santo Antônio do Leverger, Mato Grosso – Brasil**. Cuiabá: UFMT, 1999. 273p. (Tese – Doutorado em Saúde e Ambiente).

GRUSECK, E., SPLANEMANN, V., BLECK, O., RING, J., ABECK, D. Oral terbinafine in tinea capitis in children. **Mycoses**, v. 39, p. 237-240, 1996.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs and medicines: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 205-215, 1996.

HATTORI, M., KUSUMOTO, L.T., NAMBA, T., ISHIGAMI, T., HARA, Y. Effect of tea polyphenols on glucan synthesis by glucosil transferase from *Streptococcus mutans*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 38, p. 717-720, 1990.

HEISEY, R.M., GORHAM, A.B.K. Antimicrobial effect of plant extracts on *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum* and other microrganisms. **Lett. Appl. Microbiology**, v.14, p.136-139, 1992.

HOLETZ, F.B., PESSINI, G.L., SANCHES, N.R. et al. Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem. Int. Oswaldo Cruz**, v.97, n.7, p.1027-1031, 2002.

IROBI, O.N., DARAMOLA, S.O. Antifungal activities of crude extract of *Mitracarpus villosus* (Rubiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.40, p. 137-140, 1993.

JACOBS, P.H. Treatments of fungal skin infections: state of the art. **Journal of the Americam Academy of Dermatology**, v.23, p.549-551, 1990.

JANSEN, T., BORGERS, M., VAN DEN VEN, M.A. et al. The effects of Saperconazole on the morphology of *Candida albicans*, *P. Ovale e Trichophyton rubrum* in vitro. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v.29, p. 293-303, 1991).

JANSSEN, P.A.J., CAUWENBERGH, G. Antifungal therapy of the future. In: Jacobs PH, Nall, L (Eds.). **Antifungal drug therapy**. Marcel Dekker, New York. 1990.

KNOBLOCH, K. PAULI, A., IBERL, B., WEIS, N., WEIGAND, H. Antibacterial activity and antifungal properties of essential oil components. **Journal of Essential Oil Research**, v. 1, p. 119-128, 1988.

- KULLBERG, B.J. Trends in immunotherapy of fungal infections. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.16, p.51-55, 1997.
- KURITA, N., MIVAJI, M., KURANE, R., TAKAHARA, Y. Antifungal activity of compounds of essential oils. **Agricultural Biological Chemistry**, v.45, p. 945-952, 1981.
- LIMA, E.O., GOMPERTZ, O.F., GIESBRECHT, A.M., PAULO, M.Q. In vitro antifungal activity of essential oils obtained from officinal plants against dermatophytes. **Mycoses**, v.36, p. 333-336, 1993.
- LEWIS, J.H., ZIMMERMAN, H.J., BENSON, G.D., ISHAK, K.G. Hepatic injury associated with ketoconazole therapy: Analysis of 33 cases. **Gastroenterology**, v. 86, p.503-513, 1984.
- LIMA NETO, D.A., JOSÉ, J.L., VEIGA, M.C.F.A, GUIMARÃES, A., GAMA, M.L.G. Atividade antimicrobiana das plantas arnica, bardana e tanchagem. **Folha Médica**, v.106, n.3, p.59-62, 1993.
- LOGEMANN, H. Incidência dermatofítica en Guatemala. Revisión de 4862 pacientes. **Anais... VI CONGRESSO CENTROAMERICANO Y II NACIONAL DE MICROBIOLOGIA**, Guatemala, pp. C-41, 1983.
- LOPEZ-GOMEZ, S., DEL PALACIO, A., VAN GUTSEM, J., SOLEDAD CUETARA, M. IGLESIAS, L., RODRIGUEZ-NORIEGA, A. Itraconazole versus griseofulvin in the treatment of tinea capitis: a double-blind randomised study in children. **International Journal of Dermatology**, v.33, p. 743-747, 1994.
- MAOZ, M., NEEMAN, I. Antimicrobial effects of aqueous plant extracts on the fungi *Microsporum canis* and *Trichophyton rubrum* and on three bacterial species. **Letters in Applied Microbiology**, v.26, p. 61-63, 1998.
- MAOZ, M., NEEMAN, I. Effect of *Inula viscosa* extract on chitin synthesis in dermatophytes and *Candida albicans*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.71, p. 479-482, 2000.
- MARQUESINI, N.R. Plantas usadas como medicinais pelos índios do Pará e Santa Catarina, Sul do Brasil. Família Asteraceae. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14, Florianópolis, 1996. **Anais ... SC: UFSC**, 1996.
- MARKIN, D., DUEK, L., BERDICEVSKY, I. In vitro antimicrobial activity of olive leaves. **Mycoses**, v.46, p. 132-136, 2003.
- MARTINS, E. R. et al., **Plantas medicinais**, Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1994, 220p.
- MARWAN, A.G., NAGEL, C.W. Microbial inhibitors of cranberries. **J. Food Sci.**, v.51, p.1009-1013, 1986.

OLIVEIRA, J.E.Z. **Plasticidade fenotípica da morfologia, de marcadores químicos e da anatomia de acessos de *Bidens pilosa* L. crescidos em quatro altitudes.** Viçosa: UFV, 2001. 239 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento). Universidade Federal de Viçosa, 2001.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Conselho executivo. Medicina tradicional Y assistência sanitária moderna. **Foro Mundial de la Salud; Revista Internacional de Desarrollo sanitario**, v. 12, n. 1, p. 120, 1991.

OSBOURN, A. Saponins and plant defense. **Trends Plant science**, v. 1, p. 4-9, 1996.

OOSHIMA, T., MINAMI, T., AONO, W., IZUMATANI, A., SOBUE, S., FIJIWARA, T., KAWABATA, S., HAMADA, S. Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in SPF rats infected with *Streptococcus mutans*. **Caries Research**, v. 27, p. 124-129, 1993.

RODRIGUES, A.G. **As plantas medicinais da comunidade Miguel Rodrigues – MG: obtenção, utilização e diversidade.** Viçosa, MG: UFV, 2002, 154p. Dissertação (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 2002.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v.30, p.3875-3883, 1991.

SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., ATHAYDE, M.L. **Saponinas.** In: Farmacognosia da planta ao medicamento. In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P. GOSMAN, G., MELLO, J.C.P., MENTS, L.A., PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento.** Porto Alegre, Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS Ed. UFSC, 2002. 833p.

SALIE, F., EAGLES, P.F.K., LENG, H.M.J. Preliminary antimicrobial screening of four South African Asteraceae species. **Journal of Ethnopharmacology**, v.52, p.27-33, 1996.

SANDES, A.R.R., DI BLASI, G. Biodiversidade e diversidade química e genética. **Biotecnologia: Ciencia & Desenvolvimento**, s.v., n. 13, março/abril, p. 28-32, 2000.

SANTEN, R.J., BRUGMANS, J., SYMOENS, J., DECOSTER, R., VANDEN BOSSCHE, H. Ketoconazole inhibits androgen production by blocking the 17-alpha-hydroxyprogesterone aldolase (C17-20 lyase) enzyme. **Clinical Research**, v.31, p. 473A, 1983.

SIKKEMA, J., DE BONT, J.A.M., POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, v. 59, p. 201-222, 1995.

SILVA, S.A.R., ARAÚJO, L.C.L., AKISUE, M.K. Estudo das atividades farmacológicas (antiinflamatória e antiulcerogênica) e determinação da toxicidade aguda do extrato bruto hidroalcoólico de *Porophyllum ruderale* (JACQ.) Cassini. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14, Florianópolis, 1996. **Anais ... SC: UFSC**, 1996.

SIMÕES, C.M.O., SPITZER, V. **Óleos voláteis**. In: Farmacognosia da planta ao medicamento. In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P. GOSMAN, G., MELLO, J.C.P., MENTS, L.A., PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre, Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS Ed. UFSC, 1999. 821p.

SPINOSA, H.S., GÓRNIAC, S.L., BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro. 1996.

STERNBERG, S. The emerging fungal threat. **Science**, v.226, p. 1632-1634, 1994.

URIBE, S., RAMIREZ, T., PENA, A. Effects of β -pinene on yeast membrane functions. **Journal of Bacteriology**, v. 161, p. 1195-1200, 1985.

VOEKS, R.A. Tropical forest healers and habitat preference. **Economic Botany**, v. 50, n. 4, p. 381-400, 1996.

VOLLEKOVÁ, A., KOST'ÁLOVÁ, D., KETTMANN, V., TÓTH, J. Antifungal activity of *Mahonia aquifolium* extract and its major protoberine alkaloids. **Phytoterapy Research**, v.17, p. 834-837, 2003.

WAAGE, S.K., HEDIN, P.A., GRIMLEY, E. A biologically-active procyanidin from *Machaerium floribundum*. **Phytochemistry**, v.23, p.2785-2787, 1984.

YAGHMOUR, R. Antimicrobial activity of twenty plants used in folkloric medicine in palestine. **MSc Thesis**. Nablus, Palestine: An-Najah National University.

CAPÍTULO 3

Resposta de *Porophyllum ruderale* à aplicação de homeopatia

1. INTRODUÇÃO

A utilização das plantas com fins medicinais é tão antiga quanto a própria humanidade. No Ocidente, essa forma de tratamento era usual até o século XVIII; no Brasil o uso de espécies consideradas medicinais pela população é bastante difundido. A Organização Mundial de Saúde calcula que, no plano mundial, as terapias que utilizam plantas medicinais são três a quatro vezes mais utilizadas do que a medicina convencional e suas potencialidades são amplamente reconhecidas.

As espécies medicinais respondem aos fatores do meio promovendo reações no metabolismo secundário, responsável pela defesa da planta. Essas reações de defesa se caracterizam pela síntese de compostos bioativos diversos, de acordo com cada espécie. A aplicação de preparados homeopáticos causa resposta no metabolismo da plantas (NUNES, 2005), podendo diminuir ou aumentar o teor de compostos bioativos de grande importância, dependendo da dinamização (CASTRO, 2000; ARMOND, 2003).

O aumento do teor de compostos bioativos significa incremento no valor terapêutico da planta utilizada na fitoterapia, assim como implica em valorização da planta como matéria prima da indústria farmacêutica.

Ao se produzir plantas medicinais deve-se primar pela obtenção de produtos saudáveis e de boa qualidade, uma vez que serão utilizadas na melhoria da saúde, devendo ser isentas de resíduos químicos, ou seja, não se deve utilizar agrotóxicos na produção das mesmas. Esta qualidade pode ser alcançada por meio de formas alternativas ou não convencionais de produção, como é o caso da homeopatia, a qual possui, dentre outras vantagens, o baixo custo, não ser poluente (não deixa resíduos), acessível a todos e possibilita a independência do produtor.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 História e princípios da homeopatia

A Homeopatia teve como pesquisador pioneiro Samuel Hahnemann. A tecnologia homeopática, ou seja, a aplicação desse “novo princípio”, captado pelas diluições sucessivas, seguidas de sucussão, foi primeiramente estudada nos seres humanos.

A similitude ou lei dos semelhantes é a premissa básica e consiste na aplicação em seres vivos doentes, de substâncias capazes de produzir em seres saudáveis alterações assemelhadas (SCHEMBRI,1976).

O conhecimento na ciência da homeopatia é adquirido com investigação experimental em seres vivos considerados sadios, que são submetidos a doses do preparado homeopático. Os efeitos são metodicamente registrados e sistematizados. Portanto, a experimentação em homeopatia consiste em provocar sintomas (ações primárias) nas plantas, que são descritas e analisadas detalhadamente visando caracterizar o medicamento.

Na preparação de medicamentos utiliza-se métodos especiais da farmacotécnica homeopática (KATER, 1983). Os medicamentos homeopáticos são preparados a partir de substâncias provenientes do reino animal, vegetal e mineral. O poder curativo dessas substâncias é despertado pela diluição e pela agitação (LOPES et al.,1999). Os medicamentos são preparados a partir da substância básica, por meio da diluição gradual em álcool seguida pela sucussão ou trituração em lactose (TIEFENTHALER, 1996). A nomenclatura homeopática é universal, tendo sido criada por Hahnemann, que optou pela expressão latina com a designação da escala e a dinamização (SCHEMBRI, 1976), por exemplo, *Sulphur* CH3 (elemento enxofre dinamizado na escala centesimal).

O ato de dinamizar visa reduzir a quantidade de substância e aumentar a eficácia do medicamento (TIEFENTHALER, 1996). Os medicamentos homeopáticos desenvolvem sua eficácia principalmente por meio de suas energias específicas intrínsecas, as quais são transferidas ao veículo de diluição por meio dos processos continuados de dinamização (TIEFENTHALER, 1996). Portanto, somente as potências mais baixas (CH1, CH2, CH3...CH11) possuem matéria que é nula a partir da CH12.

A aplicação de substâncias homeopatizadas provoca reação no princípio vital do ser vivo. O princípio vital mantém em vida os constituintes orgânicos, e promove a integridade do organismo vivo por leis ainda desconhecidas. Essa reação dos seres vivos à homeopatia depende não da quantidade, porém, da potencialidade, ou seja, número de diluições e dinamizações.

2.2 A homeopatia na agricultura

A legislação brasileira possui instrução normativa sobre a utilização das chamadas “práticas alternativas”, que são bastante usadas na obtenção de produtos agropecuários orgânicos com o intuito de causar o menor impacto possível sobre o meio ambiente, inclusive sem o uso de

agrotóxicos (BRASIL, 1999). De acordo com estimativas do “International Trade Center” (Genebra), o volume de vendas de alimentos orgânicos na Europa, nos Estados Unidos e no Japão alcançou 10 bilhões de dólares em 1997 e 17,5 bilhões em 2000 (75% de aumento em três anos), com crescimento médio previsto até 2005 entre 10 e 30%, de acordo com o país. O Brasil possuía em 2001 aproximadamente 803.000 ha cultivados organicamente, distribuídos por 12.590 propriedades rurais, o que representa apenas 0,23% da área total (YUSSEFI e WILLER, 2002), ou seja, o potencial de expansão da agricultura orgânica é realidade do empreendedorismo.

Entre as diversas práticas previstas e permitidas aos produtores orgânicos na legislação brasileira está incluída a utilização da homeopatia nos diversos setores da agropecuária. Essa prática também é permitida como técnica a ser utilizada em produtos orgânicos certificados (FAO, 2001).

Muitas experiências de uso de homeopatia em vegetais vêm sendo realizadas por agricultores de várias regiões. São vários os benefícios da homeopatia no cultivo das plantas:

- homeopatia não depende da importação de produtos químicos de alto preço (MORENO, 1999).
- obtenção de alimentos mais saudáveis além de solo, água e ar livres de resíduos uma vez que o medicamento homeopático é energético (CASALI, 1998; ARENALES, 1998)
- reaparecimento de animais, insetos predadores e plantas indicando a recuperação do equilíbrio (ARENALES, 1998)
- controle de pragas (FAZOLIN, 1999) e doenças (CASALI, 2002) com uso do nosódio (agente causador do problema).
- tolerância a condições impróprias, florescimento, quebra de dormência de sementes e produção de mudas saudáveis (ARENALES, 1998, 1999).
- desintoxicação de plantas comprovada experimentalmente em feijão e manjeriço (CASTRO, 1999; ALMEIDA, 2002).

O potencial da homeopatia na agricultura já é reconhecido, embora seja necessária a preparação de agrônomos visando a utilização deste recurso (CASALI, 1998). É preciso praticar analogia entre a matéria médica humana e o vegetal, já que ainda não existe a “matéria médica homeopática das plantas”.

O levantamento histórico do organismo doente é fundamental. Deve-se levar em consideração características físicas (porte, formato de folhas e flores, coloração, pilosidade, espessura, sistema radicular, tipo de sementes e frutos, etc), características comportamentais

(respostas em ambiente de luz e sombra, de água ou sem água, com ou sem nutrientes, relação com plantas vizinhas e animais, forma de dispersão das sementes, época de florescimento e preferência por temperatura, dentre outros) e características sutis (as finalidades do uso da planta como medicinal, alimentícia, ornamental, etc).

Portanto a homeopatia aplicada às plantas tem suporte bibliográfico, metodológico e teórico; tem dispositivo legal que a recomenda na produção orgânica brasileira; tem demanda comercial pela presença, no Brasil, do primeiro laboratório industrial que produz homeopantias aplicadas a vegetais e animais; tem apoio dos produtores por causa da qualidade de vida e do respeito ambiental (CASALI *et al*, 2002).

Na Universidade Federal de Viçosa estão sendo realizadas pesquisas sobre o uso da homeopatia em plantas, com o objetivo de incrementar o conhecimento e propor tecnologias sobre o uso da homeopatia na agricultura.

2.3 Visão química, física e biocibernética da homeopatia

a) Ciência das preparações não-moleculares:

A concentração final da substância diluída atinge em CH12 magnitudes menores que 10^{-24} mol L⁻¹, significando ausência probabilística da substância original, fenômeno que constitui a maior barreira quanto ao entender ou aceitar a ação física e atividade biológica dos sistemas dinamizados (ZACHARIAS, 2002). Por este motivo a abordagem da química analítica não é pertinente a homeopatia (há dificuldade de se identificar os princípios ativos nas preparações homeopáticas, já que esses têm baixíssima materialidade) face às diluições/dinamizações que ao atingirem a solução CH11 ficam abaixo do número de Avogadro (constante física que expressa o número de moléculas existente na molécula-grama de qualquer substância, e que é igual a $6,022137 \times 10^{23}$ moléculas). Assim, a probabilidade de ser encontrada qualquer molécula do soluto é tão pequena que se admite a inexistência da substância original (CASALI, 2002). Conseqüentemente, a utilização de preparações homeopáticas altamente diluídas, ultrapassando em muitos casos o limite molecular (diluição além do número de Avogadro), tem gerado desconfiança e até mesmo preconceito por parte da ciência ortodoxa ou convencional em relação à Homeopatia (CARLINI, 1983).

b) Ciência das soluções altamente diluídas e dinamizadas:

POITEVIN (1991) mencionou que o mecanismo de ação da Homeopatia está relacionado à informação biológica contida nas diluições hahnemanianas, característica essa intimamente ligada com o modo de preparação das soluções homeopáticas, por diluições sucessivas seguidas de sucussão (agitação).

A ressonância é o transmissor da informação entre dois sistemas similares (é considerada frequência vibracional ou harmônica) sem modificações estruturais e sem a transmissão de matéria. Efeitos de ressonância podem explicar o longo alcance (distância física) e efeitos locais durante o procedimento da dinamização, assim como a ação biológica. A estabilidade e as propriedades físicas das soluções altamente diluídas foram preditas teoricamente por meio da teoria eletrodinâmica “quantum” (DEL GIUDICE et al., 1988; DEL GIUDICE & PREPARATA, 1991; PREPARATA, 1990), e, evidências experimentais foram observadas em soluções 10^{-5} mol L^{-1} (SCHULTE;1998).

ANAGNOSTATOS (1994) sugeriu a formação de pequenos clusters de água como parte do mecanismo da informação estruturada em diluições infinitesimais. O movimento mecânico no processo de dinamização promoveria a origem de cópias similares destes clusters.

O papel do veículo (no caso, a água) é altamente relevante, pois atuaria como suporte e como condutor da informação, devido a alterações conformacionais que ocorrem nos “clusters” submetidos à dinamização (agitação). A própria dinamização, utilizada no processo de preparo das soluções homeopáticas, teria sua importância também por causa da adição de energia ao sistema solvente–soluto. A presença do oxigênio atmosférico e de partículas de sílica desprendidos das paredes dos frascos de vidro e de radicais livres dentro das soluções homeopáticas também foram citados como fatores a se considerar quanto ao modo de ação das altas diluições.

A física dos sistemas dinamizados continua sendo o grande desafio à comunidade acadêmica. Duzentos anos de experiência clínica e resultados são expressivos e não desprezíveis. Por outro lado, a insuficiência de informações na caracterização do fenômeno limita a proposição de hipóteses e teorias e, até o momento, admite-se que a ação biológica de agentes não moleculares seja de natureza física desconhecida. Porém a ausência de evidências não é evidência de ausência. Trabalhos recentes têm tentado utilizar conceitos aceitáveis cientificamente visando explicar o fenômeno da homeopatia. Entender o que é o sistema dinamizado e como interage com

organismos biológicos implica na revisão das práticas terapêuticas, das pesquisas de biologia molecular e das políticas de saúde (ZACHARIAS, 2002).

c) Ciência das diluições infinitesimais:

Atribuiu-se o efeito da Homeopatia ao fato de que, em altas diluições, as informações de moléculas da substância são passadas mais eficientemente às moléculas do meio.

O álcool e a água (solvente universal) são utilizados como veículos nas preparações homeopáticas. A combinação água-álcool permite maior conservação da informação (GARBI, 1998). Pela Farmacologia Informacional, acredita-se que a água veicula informações, sem, no entanto, estarem presentes moléculas (BIGNARDI, 1999). A água seria “carregada” com diversos tipos de informações sutis, o que seria verificado por espectroscopia de infravermelho. Essa água “carregada” ainda seria capaz de induzir alterações mensuráveis na fisiologia e no crescimento das plantas ou dos organismos vivos em geral, embora nenhuma substância física seja acrescentada (BERDEN *et al*, 1997)

BACHELARD (1995), ressaltou que, em baixas diluições, a substância entraria em ressonância consigo mesma, passando pouca ou nenhuma informação ao meio onde se encontra. Assim, quanto maior a diluição, mais estável a informação contida na solução, e, a presença molecular do soluto não seria mais necessária após haver contato suficiente com o sistema molecular do solvente.

Neste sentido, algumas teorias têm procurado resolver a incógnita. Os rearranjos estruturais das moléculas do solvente (STEPHENSON, 1966), como a mudança de ângulo da molécula de água ou a formação de “clusters” específicos foram alvo de alguns experimentos físicos realizados com o objetivo de observar estas estruturas (BERNAL, 1993; SCHULTE, 1994; PORTO, 1998). Além disso, o interesse no estudo de “clusters” de água vem crescendo não só na física, mas também na química e na biologia (ANBAR *et al.*, 1998) e métodos experimentais modernos, utilizando espectrometria de massa (KNIGHT *et al.*, 1985) têm sido utilizados no estudo de “clusters” formados por moléculas de água.

Com base em diversos resultados de pesquisas relativas às altas diluições, POITEVIN (1994) relatou que fatores físico-químicos podem ser responsáveis pelo efeito das soluções homeopáticas sobre os seres vivos, destacando também a importância na transmissão da informação do tipo “alta diluição”. O mesmo autor destaca a possibilidade de existir alguma especificidade molecular dos constituintes da solução de base utilizada na preparação das altas diluições, especificidade essa que seria conservada mesmo nas altas diluições.

Shui Yin Lo, ao estudar o comportamento molecular da água em soluções que ultrapassam o número de Avogadro, verificou que moléculas de água, normalmente dispostas de modo aleatório em estado normal, após a ultradiluição passaram a formar “cachos” de 6 a 100 unidades, todos alinhados de forma original e exibindo as características específicas de campo eletromagnético singular além da adesão firme entre as moléculas. Ainda mais impressionante é o fato de que tais cachos se replicavam a cada nova diluição, mesmo que na água não mais existissem resquícios da substância adicionada ao início. Investigações espectroscópicas (Raman) têm mostrado que as estruturas se replicam (WALRAFEN, 1968). A manifestação física das ligações de hidrogênio da água e do gelo torna-se aparente na espectroscopia de infravermelho e Raman (PORTO, 1998). A técnica de espectroscopia de infravermelho vibracional de tunelamento tem provado ser ferramenta poderosa acessando informações estruturais e da dinâmica da água (LUCAS et al., 1997), além de apoiar as hipóteses (SAYKALY e BLAKE, 1993).

Em estudo recente realizado na Universidade da Califórnia, em Los Angeles, o imunologista Benjamin Bonavida constatou que a água com cachos moleculares (descobertas por Lo) possui outra característica não menos surpreendente: a solução é capaz de estimular células do sistema imunológico, em tubos de ensaio, até 100 vezes mais do que a água pura, revelando assim atividade biológica ainda inexplicada (MORAIS, 2002).

BENVENISTE et al. (1988) relataram resultados a partir de produtos obtidos após forte diluição. Os trabalhos apoiavam-se sobre o modelo bem conhecido em imunologia: o teste de degranulação de basófilos. Nos anos que se seguiram, a pesquisa enfocou efeitos das altas diluições sobre os sistemas biológicos, confirmando o fenômeno extraordinário porém ainda incompreensível: as ultra diluições (até $1/10^{120}$ de anti-soro anti-IgE) seriam capazes de provocar a degranulação das células basófilas do sangue.

KRAUSS et al (1988) concluíram em seu trabalho que a mediação das drogas via “clusters” de água é possível. Por meio de cristalografia por raio-X, foi detectado que cinco moléculas de água ocupavam o campo de ligação da biotina com excepcional afinidade, as quais estavam distribuídas na região ativa de modo similar ao do arranjo da biotina (LIVINE, 1993). Pela análise de raio-x, as posições dos átomos de oxigênio podem ser detectadas. BURLAKOVA (1994) constatou efeito inibitório na atividade enzimática em concentração muito baixa de substrato (10^{-15}) causado provavelmente por “clusters” de água que se arranjaram de forma similar ao da molécula do substrato original.

d) Ciência da informação e dos sistemas:

Teorias modernas têm surgido sobre a estrutura não molecular dos preparados homeopáticos tendo como referência a informação (BASTIDE et al., 1995; BASTIDE & LAGACHE, 1997; BASTIDE, 1999; PORTO, 1998). Estas teorias se baseiam no fato de que a informação contida em algumas substâncias é transferida por meios não conservativos (soluto). Sistemas biológicos poderiam interpretar esta informação produzindo resposta bioquímica, portanto com ausência do agente material (ZACHARIAS, 2002). Davenas et al., 1987; citado por POITEVIN (1994a), utilizando a metodologia de rnm, pesquisou eventuais modificações em diversas soluções homeopáticas e em água pura dinamizada. Com base nos resultados obtidos, a hipótese mais considerável é a desestruturação da água livre, com ruptura de pontes de hidrogênio provocando maior mobilidade da água. GARBI (1998) discutiu se a informação (energia da substância) seria armazenada em pontes de hidrogênio, sendo liberadas com o processo de agitação.

KHRENNIKOV (2000) propôs o modelo matemático em que a informação contida na preparação homeopática interage com a “informação potencial do organismo receptor” (informação capaz de responder a estímulos visando o equilíbrio do indivíduo), alterando-o e atuando, inclusive, nos sistemas fisiológicos. O autor propôs seu modelo matemático como conexão entre processos mentais e fisiológicos, psicanálise freudiana, hipnotismo e comportamento coletivo consciente, além da Homeopatia, os quais não são explicados, ou explicados insatisfatoriamente, pelo formalismo clássico. O modelo considera a existência de nova realidade além da dimensão física, denominando-a “realidade da informação”, sustentada por leis da mecânica quântica. Os especialistas da teoria quântica, dos campos eletromagnéticos demonstram matematicamente que a água em contato com alguma molécula de características dielétricas (que não conduz corrente elétrica), organiza-se de modo coerente e conserva assim a assinatura eletromagnética da molécula (informação) com a qual está em contato. Não se trata de construção de impressão, de molde, mas da organização dinâmica das moléculas de água que, segundo a mecânica quântica, se configuram de modo coerente (POITEVIN, 1994a) e a coerência quântica é inevitável (SILVA, 2004).

Resultados de experimentos recentes se referem à natureza eletromagnética desta informação (HADJI et al., 1991; AISSA et al., 1993 a, AISSA et al., 1993 b; ENDLER et al., 1994; ENDLER et al., 1995). A desordem do líquido (solvente) daria propriedades termodinâmicas típicas e efeitos biológicos inesperados. Desde o início, de acordo com a teoria homeopática, tem sido afirmado que, nas soluções ultradiluídas, a água guarda a “imagem” do soluto (substância

dissolvida), tornando-se veículo de transmissão de suas propriedades ainda que não mais contenha moléculas da substância original. A descoberta dos “cachos auto replicantes” colocou a homeopatia mais próxima da validação científica.

A informação contida pelas soluções homeopáticas é preservada graças ao mecanismo de memória sistêmica presente nos sistemas dinâmicos, tanto orgânicos quanto inorgânicos. Esse mecanismo de memória resulta de interação entre as vibrações de cada partícula e o somatório das vibrações que recebe das outras partículas, ou seja, os sistemas estão em constante ressonância. Como esse processo é contínuo, cíclico e envolve retroalimentação, informações e energia podem ser “armazenados” tanto pelos sistemas moleculares quanto entre eles (SCHWARTZ & RUSSEK, 1998).

Como já foi dito, a ressonância é o transmissor da informação entre dois sistemas similares (é considerada frequência vibracional ou harmônica) sem modificações estruturais e sem a transmissão de matéria. Esse fenômeno é observado em diversas situações nos organismos vivos. Essa hipótese pode ainda explicar a natureza da transmissão que pode ser eletromagnética (POITEVIN, 1994b).

Os mecanismos de atuação da Homeopatia portanto são desconhecidos, havendo muitas dúvidas, teorias e idéias sobre esse fenômeno. Tal como os fenômenos que instigaram pesquisadores no início do século XX a repensar a maneira clássica de se observar o mundo, a homeopatia permanece ainda hoje como algo a ser entendido, talvez pelas leis da Física Quântica, uma vez que pela Física Clássica não se consegue (POITEVIN, 1991; GUTMANN, 1990).

3. OBJETIVO

Determinar o efeito da aplicação de preparados homeopáticos sobre o teor de tanino em plantas de *Porophyllum ruderale*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Efeito de aplicação única do preparado homeopático *Sulphur* no teor de tanino de *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cassini

Com o objetivo de determinar o intervalo de aplicação dos preparados homeopáticos, visando o efeito quanto ao teor de tanino, realizou-se o ensaio preliminar. O experimento foi montado no

delineamento em blocos casualizados contendo um tratamento, três repetições e a testemunha. No momento da aplicação única, preparou-se em água destilada *Sulphur* CH4 (homeopatia e dinamização normalmente utilizada em plantas visando obter efeitos físicos). Foi derramado no solo, ao redor de cada planta envasada, 100 mL deste preparado homeopático, e, de 48 em 48 horas, coletou-se ramos da mesma posição e localizados no mesmo internódio, totalizando sete coletas. Na testemunha aplicou-se apenas água. As folhas foram desidratadas, trituradas e submetidas à análise de tanino, utilizando o método oficial de análises da Association of Agricultural Chemist (AOAC, 1970). Os dados foram analisados por meio de regressão.

4.2 Efeito da aplicação de oito preparados homeopáticos no teor de tanino, ao longo do ciclo de *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cassini

Foram obtidos clones de *Porophyllum ruderale* a partir de estacas de uma única planta coletada no Grupo Entre Folhas de Plantas Medicinais na Universidade Federal de Viçosa. As estacas foram enraizadas em caixa de areia, e, posteriormente, transplantadas aos vasos de oito litros contendo solo e húmus de minhoca (na proporção de 3:1), em casa de vegetação de plantas medicinais (com telado de sombrite 30% e cobertura de filme transparente de polietileno), do Departamento de Fitotecnia, entre os meses de janeiro e abril de 2004.

O experimento foi montado em blocos casualizados, no esquema fatorial $8 \times 3 + 1$ (8 homeopatias, 3 dinamizações e a testemunha), com 2 repetições. Os dados foram analisados por meio de análise de variância e regressão. Para o fator qualitativo as médias foram comparadas utilizando-se o teste de Tukey, adotando-se o nível de 5% de probabilidade. Para o fator quantitativo os modelos foram escolhidos com base na significância dos coeficientes da regressão.

Quando as plantas atingiram cerca de 30cm, iniciou-se a aplicação dos preparados homeopáticos (*Acidum humicum*, *Alumina*, *Calcareo carbonica*, *Carbo vegetabilis*, *Magnesia carbonica*, *Natrum muriaticum*, *Silicea* e *Sulphur*), em água destilada, em três dinamizações (CH5, CH30 e C200), de 10 em 10 dias.

As dinamizações CH2, CH25 e C190 foram obtidas de laboratório homeopático especializado, CH3, CH30 e C200 foram preparadas no Laboratório de Homeopatia do Departamento de Fitotecnia da UFV, de acordo com as normas da FARMACOPÉIA (1977). As homeopatias utilizadas foram preparadas em álcool até a dinamização anterior à aplicada na planta (ex: CH2) e preparada em água destilada, no momento da aplicação, na dinamização

desejada (ex: CH3). As soluções foram diluídas em água na proporção de 20 gotas por litro de água e homogeneizadas, aplicando-se 100 mL, no solo, ao redor de cada planta envasada. Na testemunha aplicou-se apenas água.

As folhas foram desidratadas, trituradas e submetidas à análise de tanino, utilizando o método oficial de análises da Association of Agricultural Chemist (AOAC, 1970).

A padronização do preparo das homeopatia foi realizada da seguinte forma: obteve-se o peso em gramas de 99 gotas (recolhidas de bureta graduada “quimex-abmex” com capacidade de 50 mL) de água destilada e de álcool 90.

Veículo	Peso (g) de 99 gotas
Água Destilada	4,455
Álcool 90	1,485

a) Preparo da homeopatia em álcool 90:

Proporção: $\left\{ \begin{array}{l} 1 \text{ parte} : 99 \text{ partes} \\ (0,015\text{g}) : (1,485\text{g}) \end{array} \right.$

Frasco com 30 mL
(proporção x 9) $\left\{ \begin{array}{l} 0,135\text{g} : 13,365\text{g} \\ (\text{homeopatia}) : (\text{álcool } 90) \end{array} \right.$

b) Preparo da homeopatia em água destilada:

Proporção: $\left\{ \begin{array}{l} 1 \text{ parte} : 99 \text{ partes} \\ (0,045\text{g}) : (4,455\text{g}) \\ (0,045\text{mL}) : (4,455\text{mL}) \end{array} \right.$

Frasco com 30 mL
(proporção x 4,5) $\left\{ \begin{array}{l} 0,2025\text{g} : 20,0475\text{g} \\ (0,2025\text{mL}) : (20,0475\text{mL}) \\ (\text{homeopatia}) : (\text{álcool } 90) \end{array} \right.$

obs: no preparo das homeopatia apenas 2/3 do frasco foi preenchido, ou seja, 20 mL em frascos de 30 mL.

4.3 Efeito de aplicação única dos preparados homeopáticos *Calcarea carbonica*, *Kalium phosphoricum*, *Magnesia carbonica*, *Natrum muriaticum* e *Silicea*, na dinamização CH4, no teor de tanino em *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cassini

Com o objetivo de verificar o efeito da aplicação única dos preparados homeopáticos *Calcarea carbonica*, *Kalium phosphoricum*, *Magnesia carbonica*, *Natrum muriaticum* e *Silicea* quanto ao teor de tanino em couve-cravinho, aplicou-se 100 mL de cada preparado nas parcelas,

e, de 48 em 48 horas, coletou-se ramos da mesma posição e localizados no mesmo internódio, totalizando oito coletas. As folhas foram desidratadas, trituradas e submetidas à análise de tanino, utilizando o método oficial de análises da Association of Agricultural Chemist (AOAC, 1970).

O experimento foi montado no esquema de parcelas subdivididas, tendo nas parcelas o esquema fatorial $5 \times 3 + 1$ (5 homeopáticas, 3 repetições e a testemunha) e nas subparcelas os tempos, no delineamento em blocos casualizado, com 3 repetições. Os dados foram analisados por meio da análise de variância e regressão. Para o fator qualitativo as médias foram comparadas utilizando-se o teste de Tukey, adotando-se o nível de 5% de probabilidade. Para o fator quantitativo os modelos foram escolhidos com base na significância dos coeficientes da regressão. Independentemente de a interação ser ou não significativa, optou-se pelo desdobramento da mesma.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeito do preparado homeopático *Sulphur* no teor de tanino de *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cassini

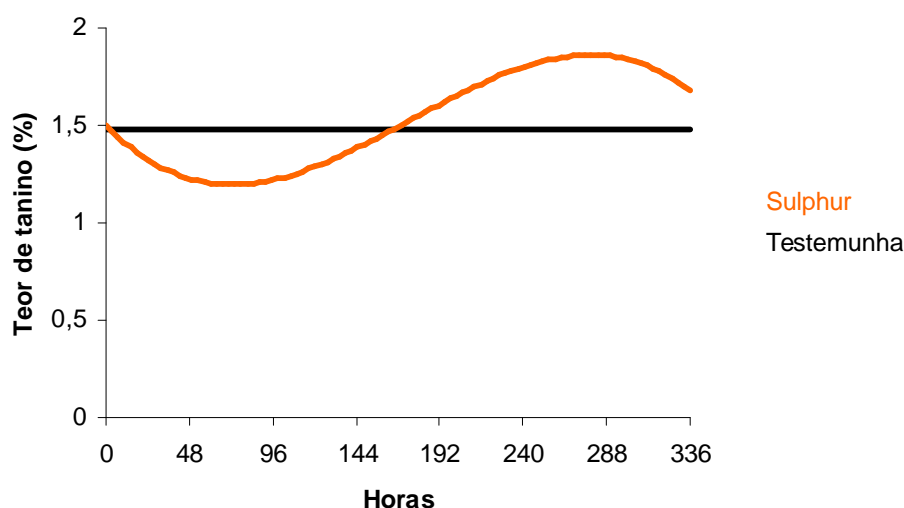
Na Tabela 1 encontram-se os valores do teor de tanino (%) nas folhas de *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cassini após aplicação única de *Sulphur* CH4.

Na figura 1 tem-se a estimativa do efeito da aplicação única de *Sulphur* CH4 no teor de tanino (%) das folhas de *Porophyllum ruderale*, em função de horas, e, percebe-se que o teor de tanino da testemunha não alterou. Como se pode observar na tabela 1, o maior teor de tanino após a aplicação única do preparado homeopático encontra-se entre o 7º e o 11º dia (192 a 288 horas após a aplicação). Assim, determinou-se o intervalo de 10 dias para a aplicação dos preparados homeopáticos. NUNES (2005) verificou que na planta medicinal *Sphagneticola trilobata* que até 3 gotas de *Sulphur* CH2 por litro provocaram aumento de tanino, persistindo o efeito por 16 horas no mínimo.

Tabela 1 – Valores do teor de tanino (%) nas folhas de *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cassini após aplicação única de *Sulphur* CH4

Amostra	Teor de tanino (%) após a aplicação de <i>Sulphur</i> CH4							
	Antes da aplicação	1º dia (48 h)	3º dia (96 h)	5º dia (144 h)	7º dia (192 h)	9º dia (240 h)	11º dia (288 h)	13º dia (336 h)
Testemunha	1,393	1,356	1,336	1,510	1,210	1,880	1,466	1,680
<i>Sulphur</i> CH4	1,497	1,644	1,268	1,285	1,671	1,803	1,839	1,684

Figura 1 – Estimativa do efeito da aplicação única de *Sulphur* CH4 no teor de tanino (%) das folhas de *Porophyllum ruderale*, em função de horas



Equações:

Sulphur: $Y = 1,50182 - 0,00921548 * x + 0,0000800738 * x^2 - 0,000000152016 * x^3$ ($R^2 = 0,95$)

Testemunha: $Y = 1,4768$

CASTRO (2002) comprovou que a homeopatia *Sulphur* causou aumento do teor de óleo essencial, metabólito secundário responsável pela defesa da planta assim como o tanino.

5.2 Efeito da aplicação de oito preparados homeopáticos em *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cassini sobre o teor de tanino

A tabela 2 resume a análise de variância da concentração de tanino de plantas de *Porophyllum ruderale* tratadas com oito homeopatas (*Acidum humicum*, *Alumina*, *Calcarea carbonica*, *Carbo vegetabilis*, *Magnesia carbonica*, *Natrum muriaticum*, *Silicea* e *Sulphur*), em três dinamizações (CH5, CH30 e C200).

Pelo teste F, a 5% de probabilidade, observa-se que o tratamento homeopático alterou significativamente a concentração de tanino nas folhas e nas raízes.

Tabela 2 – Resumo da análise de variância das variáveis TF (tanino na folha) e TR (tanino na raiz) em função da aplicação de oito homeopatas (H) em três dinamizações (D)

F.V.	G.L.	Quadrados Médios	
		TF	TR
REPETIÇÃO	1	0,0357	0,0548
H	7	0,3324**	0,0798*
D	2	0,8382**	0,1499*
H x D	14	0,2038**	0,0977*
Fatorial vs Testemunha	1	0,1690 ^{ns}	0,2496**
Resíduo	24	0,0618	0,0268
CV (%)		11,23	31,59

* F significativo a 5% de probabilidade;** F significativo a 1% de probabilidade; ns F não significativo a 5% de probabilidade; H – homeopatia; D – dinamização; TF – Tanino na folha; TR – Tanino na raiz

Na tabela 3, constata-se, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, que:

- na dinamização CH₅, a homeopatia *Sulphur* aumentou o teor de tanino nas folhas quando comparada à *Silicea*, *Calcarea carbonica* e *Alumina*; não ocorrendo o mesmo com o teor de tanino na raiz. *Silicea* diminuiu o teor de tanino nas folhas quando comparada aos outros preparados homeopáticos.
- na dinamização CH₃₀, *Natrum muriaticum* causou decréscimo no teor de tanino da folha quando comparado a *Magnesia Carbonica* e *Acidum humicum*. Na raiz, *Natrum muriaticum* causou decréscimo no teor de tanino quando comparado a *Magnesia Carbonica* e *Alumina*.

- na dinamização CH₂₀₀, não houve diferença significativa entre os preparados homeopáticos quanto ao teor de tanino na folha e na raiz.

Na tabela 4, constata-se, pelo teste de Dunnet a 5% de probabilidade, que:

- *Natrum muriaticum*, nas três dinamizações testadas, reduziu o teor de tanino na raiz quando comparado à testemunha.

- *Silicea*, na dinamização CH5, reduziu o teor de tanino na folha quando comparado à testemunha, e, na dinamização C200, reduziu o teor de tanino na raiz quando comparado à testemunha.

- *Sulphur*, na dinamização C200, reduziu o teor de tanino na folha quando comparado à testemunha.

- *Alumina*, na dinamização C200, reduziu o teor de tanino na raiz quando comparado à testemunha.

Segundo ANDRADE (2000), considerando a planta sadia, pode-se inferir que, nas dinamizações mais baixas, o preparado homeopático gera patogenesia no corpo físico, ou seja, aumenta o porte, enquanto em dinamizações mais altas o metabolismo secundário é acionado. Porém esse tipo de manifestação é característico de cada espécie, não podendo ser considerado resposta padrão.

Algumas plantas demonstram responsividade aos preparados homeopáticos em baixas dinamizações. Segundo BRUNINI (1993), a baixa dinamização não indica necessariamente baixa eficiência. Portanto, *Sulphur*, *Silicea* e *Natrum muriaticum* (na dinamização CH5) continham suficiente estímulo que afetasse a produção de tanino em couve-cravinho. Assim, *Sulphur* CH5 demonstrou potencial no cultivo de plantas de couve-cravinho, visando o aumento de seu princípio ativo. *Silicea* e *Natrum muriaticum*, na mesma dinamização (CH5), promoveram o decréscimo deste composto bioativo, podendo ser utilizado na atenuação do sabor desta espécie, já que é utilizada na alimentação humana (na forma de salada) na América Latina.

Como pode ser observado, tanto as altas quanto as baixas dinamizações provocaram efeito na produção de tanino em *Porophyllum ruderale*. Efeito semelhante foi observado por DUARTE (2003) em experimento realizado com mentrasto (*Ageratum conyzoides* L.), planta pertencente à mesma família.

CASTRO (2000) também verificou a existência de atuação diferenciada entre preparados homeopáticos e entre as dinamizações, o mesmo preparado homeopático que causa aumento de produção em determinada dinamização pode ocasionar diminuições ou ser nulo em outras. Pode ser observado que *Natrum muriaticum* na dinamização CH5 causou o decréscimo do teor de tanino na folha, na dinamização CH30 que proporcionou o decréscimo do teor de tanino na folha e na raiz, e, na dinamização C200 aumentou o teor de tanino nas folhas. FIDELIS (2004) identificou quatro preparados homeopáticos que diminuíram o teor de tanino

Observa-se na tabela 4, pelo teste de Dunnet a 5% de probabilidade, que a testemunha proporcionou maior concentração de tanino na raiz em relação às homeopantias: *Alumina* (C200), *Natrum* (CH5, CH30 e C200) e *Silicea* (C200). Com relação à concentração de tanino na folha, na planta testemunha houve maior concentração do que as homeopantias: *Silicea* (CH5) e *Sulphur* (C200). Os demais preparados homeopáticos não diferiram estatisticamente da testemunha quanto aos efeitos sobre o teor de tanino.

Tabela 3 – Valores médios das variáveis TF (tanino na folha) e TR (tanino na raiz) em função da aplicação de oito homeopantias (H) em três dinamizações (D)

Homeopatia	TF (%)			TR (%)		
	Dinamizações					
	CH5	CH30	C200	CH5	CH30	C200
<i>Ácidum húmicum</i>	2,227 ABCb	2,952 Aa	2,305 Ab	0,52 ABa	0,417 BCa	0,656 Aa
<i>Alumina</i>	1,72 BCb	2,4 ABa	2,102 Aab	0,429 ABb	1,158 ABa	0,252 Ab
<i>Calcarea carbônica</i>	1,71 BCa	2,215 ABa	1,845 Aa	0,592 ABa	0,523 BCa	0,378 Aa
<i>Carbo vegetabilis</i>	2,34 ABCa	2,2 ABa	1,832 Aa	0,696 ABa	0,472 BCa	0,442 Aa
<i>Magnesia carbônica</i>	2,447 ABa	2,902 Aa	2,34 Aa	0,37 ABb	0,884 ABa	0,532 Aab
<i>Natrum muriaticum</i>	2,2 ABCa	1,947 Ba	2,262 Aa	0,253 Ba	0,288 Ca	0,261 Aa
<i>Silicea</i>	1,565 Cb	2,412 ABa	1,935 Aab	0,86 Aa	0,553 BCab	0,337 Ab
<i>Sulphur</i>	2,742 Aa	2,645 ABa	1,57 Ab	0,424 ABa	0,452 BCa	0,353 Aa

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, para cada variável, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Tabela 4 – Valores médios das variáveis TF (tanino na folha) e TR (tanino na raiz) de *Porophyllum ruderale*, em função das respectivas combinações de preparados homeopáticos dinamizações

Tratamentos	TF (%)			TR (%)		
	Dinamizações					
	CH5	CH30	C200	CH5	CH30	C200
<i>Acidum humicum</i>	2,227	2,952	2,305	0,520	0,417	0,656
<i>Alumina</i>	1,720	2,400	2,102	0,429	1,158	0,252*
<i>Calcarea carbonica</i>	1,710	2,215	1,845	0,592	0,523	0,378
<i>Carbo vegetabilis</i>	2,340	2,200	1,832	0,696	0,472	0,442
<i>Magnesia carbonica</i>	2,447	2,902	2,340	0,370	0,884	0,532
<i>Natrum muriaticum</i>	2,200	1,947	2,262	0,253*	0,288*	0,261*
<i>Silicea</i>	1,565*	2,412	1,935	0,860	0,553	0,337*
<i>Sulphur</i>	2,742	2,645	1,570*	0,424	0,452	0,353
Testemunha	2,497			0,865		

As médias com asterisco (*) diferem significativamente da testemunha ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Dunnet.

5.3 Efeito de aplicação única dos preparados homeopáticos *Calcarea carbonica*, *Kalium phosphoricum*, *Magnesia carbonica*, *Natrum muriaticum* e *Silicea*, na dinamização CH4, no teor de tanino em *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cassini

A tabela 5 resume a análise de variância da concentração de tanino em plantas de *Porophyllum ruderale* tratadas com *Calcarea carbonica*, *Kalium phosphoricum*, *Magnesia carbonica*, *Natrum muriaticum* e *Silicea*, na dinamização CH4.

Pelo teste F, a 1% de probabilidade, observa-se que os tratamentos homeopáticos alteraram significativamente a concentração de tanino nas folhas, assim como o tempo após a aplicação. NUNES (2005) verificou que na planta medicinal *Sphagneticola trilobata*, em 15 minutos, há síntese de tanino em resposta à presença de *Sulphur* CH3 e que até 3 gotas de *Sulphur* CH2 por litro provocaram aumento de tanino, persistindo o efeito por 16 horas no mínimo.

Na tabela 6, tem-se o efeito de *Kalium phosphoricum* (após 192 horas) e o de *Calcarea carbonica* (após 240 horas) no aumento do teor de tanino em *Porophyllum ruderale*. ARMOND (2003) constatou que plantas de *Bidens pilosa* responderam à aplicação de homeopatia aumentando o teor de óleo essencial e de outros compostos de defesa. A experimentação de

BATIROLA DA SILVA (2005) demonstrou que as plantas respondem à aplicação de homeopatia aumentando seus compostos de defesa.

Na figura 2 tem-se a estimativa do efeito da aplicação única de *Calcarea carbônica*, *Kalium phosphoricum*, *Magnesia carbônica*, *Natrum muriaticum*, *Silicea*, na dinamização CH4, e da testemunha no teor de tanino (%) das folhas de *Porophyllum ruderale*, em função das horas.

Tabela 5 – Resumo da análise de variância em função da aplicação de cinco preparados homeopáticos (*Calcarea carbonica*, *Kalium phosphoricum*, *Magnesia carbonica*, *Natrum muriaticum* e *Silicea*)

F.V.	G.L.	QM
BLOCO	2	0,007
HOMEOPATIA	4	0,8223**
RESÍDUO (a)	8	0,0349
HORA	7	3,0635**
HORA x HOMEOPATIA	28	0,2516
RESÍDUO (b)	70	0,221
CV (%) parcela		15,96
CV (5) subparcela		12,71

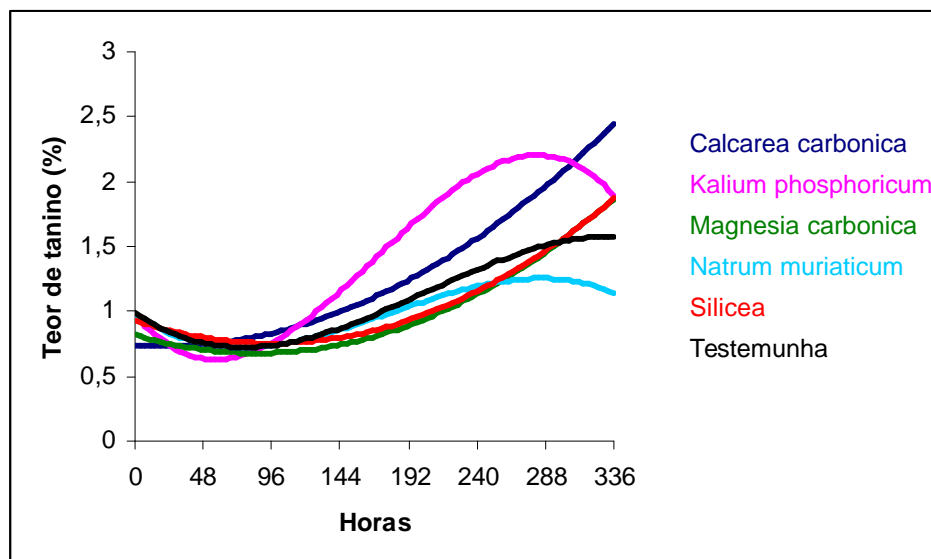
** F significativo a 1% de probabilidade

Tabela 6 – Valores médios do teor de tanino (%) nas folhas de *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cassini após aplicação única de *Calcarea carbonica*, *Kalium phosphoricum*, *Magnesia carbonica*, *Natrum muriaticum* e *Silicea*, na dinamização CH4

Preparados homeopáticos	Teor de tanino (%)							
	Antes da aplicação	1º dia (48 h)	3º dia (96 h)	5º dia (144 h)	7º dia (192 h)	9º dia (240 h)	11º dia (288 h)	13º dia (336 h)
<i>Calcarea carbonica</i>	0,68 A	0,94 A	0,79 A	0,81 A	1,05 B	1,72 A	2,31 AB	2,20 A
<i>Kalium phosphoricum</i>	0,87 A	0,87 A	0,77 A	0,90 A	1,84 A	1,82 A	2,50 A	1,78 B
<i>Magnésia carbonica</i>	0,81 A	0,57 A	0,83 A	0,83 A	0,97 B	0,91 B	1,38 C	1,98 AB
<i>Natrum muriaticum</i>	0,96 A	0,68 A	0,98 A	0,75 A	0,92 B	1,15 B	1,47 C	1,05 C
<i>Silicea</i>	1,09 A	0,63 A	0,68 A	0,70 A	1,22 B	0,80 B	1,98 B	1,61 B

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Figura 2 – Estimativa do efeito da aplicação única de *Calcarea carbonica*, *Kalium phosphoricum*, *Magnesia carbonica*, *Natrum muriaticum* e *Silicea*, na dinamização CH4, no teor de tanino (%) das folhas de *Porophyllum ruderale*, em função de horas



Equações:

Calcarea carbonica: $Y = 0,739167 - 0,000672123 * x + 0,0000171028 ** x^2$ ($R^2 = 0,85$)

Kalium phosphoricum: $Y = 0,978434 - 0,0131228 ** x + 0,000139088 ** x^2 - 0,000000273627 ** x^3$ ($R^2 = 0,81$)

Magnesia carbonica: $Y = 0,8175 - 0,00323413 * x + 0,0000189112 ** x^2$ ($R^2 = 0,86$)

Natrum muriaticum: $Y = 0,973636 - 0,00728946 x + 0,0000616016 * x^2 - 0,000000114246 ** x^3$ ($R^2 = 0,56$)

Silicea: $Y = 0,932361 - 0,00371321 x + 0,0000193504 ** x^2$ ($R^2 = 0,62$)

Testemunha: $Y = 0,990212 - 0,00764435 * x + 0,0000618429 * x^2 - 0,0000001009 * x^3$ ($R^2 = 0,52$)

** Significativo à 1% e * significativo à 5% pelo teste “t”

6. CONCLUSÕES

- Os preparados homeopáticos, tanto em altas quanto em baixas dinamizações, causaram efeito significativo no teor de tanino em folhas e raízes de *Porophyllum ruderale*
- o maior teor de tanino, após a aplicação única do preparado homeopático Sulphur CH4, encontra-se entre o 7º e o 11º dia (192 a 288 horas após a aplicação)
- na dinamização CH5, a homeopatia *Sulphur* aumentou o teor de tanino nas folhas quando comparada à *Silicea*, *Calcarea carbonica* e *Alumina*; não ocorrendo o mesmo com o teor de tanino na raiz. *Silicea* diminuiu o teor de tanino nas folhas quando comparada aos outros preparados homeopáticos.
- na dinamização CH 30 *Natrum muriaticum* causou decréscimo no teor de tanino da folha quando comparado a *Magnésia Carbônica* e *Acidum humicum*. Na raiz, *Natrum muriaticum* causou decréscimo no teor de tanino quando comparado a *Magnesia carbonica* e *Alumina*.
- na dinamização C 200 não houve diferença significativa entre os preparados homeopáticos quanto ao teor de tanino na folha e na raiz.
- *Natrum muriaticum*, nas três dinamizações testadas, reduziu o teor de tanino na raiz quando comparado à testemunha.
- *Silicea*, na dinamização CH5, reduziu o teor de tanino na folha quando comparado à testemunha, e, na dinamização C200, reduziu o teor de tanino na raiz quando comparado à testemunha.
- *Sulphur*, na dinamização C200, reduziu o teor de tanino na folha quando comparado à testemunha.
- *Alumina*, na dinamização C200, reduziu o teor de tanino na raiz quando comparado à testemunha.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALISSA, J., LITIME, M.H. ATTIAS, E., BENVENISTE, J. Molecular signalling at high dilution and by means of electronic circuitry. **J. Immunol.**, v. 150, A146, 1993 a.

ALISSA, J., LITIME, M.H. ATTIAS, E., ALLAL, A., BENVENISTE, J. Transfer of molecular signals via electronic circuitry. **FASEB**, v. 7, A602, 1993 b.

ALMEIDA, M.A.Z. **Resposta do manjeriço (*Ocimum basilicum*) à aplicação de preparações homeopáticas.** Viçosa: UFV, 2002, 101 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

ANAGNOSATOS, G.S. Small water clusters (clathrates) in the preparation process of homeopathy. In: Ultra High Dilution. Endler, P.C., Schulte, J. (ed.) Kluwer Academic Publishers: Netherlands, p. 121-128, 1994.

ANBAR, G., ELIAS, Y., MOSS, K., ARAD, D. **Structure-function properties of water clusters in proteins.** In: High dilution effects on cells and integrate systems. Ed. C. Taddei-Ferretti & P. Marotta. World Scientific, London, 381 p., 1998.

ANDRADE, F.M.C. **Homeopatia no crescimento e produção de cumarina em chambá (*Justicia pectoralis*, Jacq.)** Viçosa, MG: UFV, Impr. Univ., 2000. 214p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

ARENALES, M.C. A homeopatia na agropecuária orgânica. In: Encontro Mineiro sobre Produção Orgânica de Hortaliças, 1, 1998, Viçosa, MG. **Anais...**p. 24-35/1998.

ARENALES, M.C. A homeopatia na agropecuária orgânica. In: Seminário Brasileiro sobre Homeopatia na Agropecuária Orgânica, 1, 1999, Viçosa, MG.

ARMOND, C. **Crescimento e marcadores químicos em plantas de *Bidens pilosa* I. (Asteraceae) tratadas com homeopatia.** Viçosa, MG: UFV, Impr. Univ., 2003. 127p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

ASSOCIATION OF AGRICULTURAL CHEMIST – A.O.A.C.. **Official methods of analysis.** 11 ed. Washington, D.C.: 1970, 1051 p.

BACHELARD, G. A Homeopatia e seus ritmos. **Revista de Homeopatia**, v. 60, n. 1, p. 25-26, 1995.

BASTIDE, M. LAGACHE, A. LEMAIRE-MISONNE, C. Le paradigme des signifiants: schème d'information applicable à l'immunologie et à l'homéopathie. **Revue. Intern. Systémique**, v. 9, p. 237-249, 1995.

BASTIDE, M. Immunologie et globalité. **Aesculape**, v. 21, p. 17-20, 1999.

BASTIDE, M. LAGACHE, A. A communication process: a new paradigm applied to high dilution effects on the living body. **Alther Ther Health Med.**, v. 3, n. 4, p. 35-40, 1997.

BATIROLA DA SILVA, M.R. **Assimilação de CO₂, em plantas de *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski tratadas com preparados homeopáticos.** Viçosa, MG: UFV, Impr. Univ., 2005. 54p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

BERDEN, M., JERMAN, I., SKARJA, M. A possible physical basis for the healing touch (biotherapy) evaluated by high voltage eletrophotography. **Acupuncture e Electro-Therapeutics Research**, v. 22, n. 2, p. 127-146, 1997.

BENVENISTE, J., DAVENAS, E. BEAUVAIS, F., AMARA, J. et al. Human basophil degranulation triggered by dilute antiserum against IgE. **Nature**, v. 333, Issue n. 6176, 1988.

BERNAL, G.G. Homeopathy and physics. **Br. Hom. J.**, v. 82, p. 210-216, 1993.

BIGNARDI, F. Ecologia médica, homeopatia e agricultura orgânica. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO SOBRE HOMEOPATIA NA AGROPECUÁRIA ORGÂNICA, 1, 1999, Viçosa. **Anais...** Viçosa, MG: UFV, Imprensa Universitária, 1999. p. 7-17.

BRASIL. Instrução Normativa nº 07 de 17 de maio de 1999. Dispõe sobre normas para a produção de produtos orgânicos vegetais e animais. **Diário Oficial** [da República Federativa do Brasil], Brasília, v. 99, n. 94, p. 11-14, 19 de maio de 1999. (Seção 1).

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Estatísticas agrícolas. Disponível em: (<http://www.agricultura.gov.br/spa/pagespa/index.htm>), [02/03/ 2002]. (2002).

BURLAKOVA, e.b., KURNAKOVA, n.v., MAL'TSEVA, E.L., PAL'MINA, N.P. **Biochemistry**, v. 59, n. 2, p. 135-139, 1994.

CARLINI, E. A. Homeopatia: ontem, hoje e amanhã. **Rev. da Associação Médica Brasileira**, v. 29, n. 11-12, p. 210-214, 1983.

CASALI, V.W.D. A homeopatia e seu potencial na agricultura. In: Seminário sobre Homeopatia na Agricultura Orgânica, 1, 1998, Viçosa, MG. **Seminário...** 1998 (palestra).

CASALI, V.W.D; CASTRO, D.M.; ANDRADE, F.M.C. Pesquisa sobre homeopatia nas plantas. In: **Seminário Brasileiro Sobre Homeopatia na Agropecuária Orgânica, III.** 2002. Campinas do Sul – RS. ANAIS, 2002, Viçosa – MG. P.16-24.

CASTRO, J.P. Patogenias em plantas. In: Seminário brasileiro sobre homeopatia na agropecuária orgânica, 1, 1999, Viçosa, MG.

CASTRO, D.M., CASALI, V.W.D., ARMOND, C., HENRIQUES, E., DUARTE, E. S. M., ARRUDA, V. M., ALMEIDA, A. A. Resposta do rabanete à homeopatia *Phosphorus* na escala centesimal. **Horticultura Brasileira**, v. 18, p. 550, jul. de 2000. (Suplemento).

CASTRO, D.M. **Preparações homeopáticas em plantas de cenoura, beterraba, capim-limão e chambá.** Viçosa, MG: UFV, Impr. Univ, 2002. 101p. Dissertação (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

DEL GIUDICE, E., PREPARATA, G.A., VITIELLO, G. Water as a free electric dipole laser. **Phys. Rev. Lett.**, v. 61, p. 1085-1088, 1988.

DEL GIUDICE, E., PREPARATA, G.A. A collective approach to dynamics of water in hydrogen bonded liquids. In: NATO ASI series. Dore, J., Teixeira, J. (ed.) Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, 1991.

DUARTE, E. S. M. **Soluções homeopáticas, crescimento e produção de compostos bioativos em *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae).** Viçosa, MG: UFV, Impr. Univ., 2003. 92 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

ENDLER, P.C. PONGRATZ, W. KASTBERGER, G. WIEGANT, F.A.C., SCHULTE, J. The effect of highly diluted agitated thyroxine on the climbing activity of frogs. **J. Vet. Hum. Tox.**, v. 36, p. 56-59, 1994.

ENDLER, P.C. PONGRATZ, W., SMITH, C., SCHULTE, J. Non-molecular information transfer from thyroxine to frogs with regards to homeopathic toxicology. **J. Vet. Hum. Tox.**, v. 37, p. 259-260, 1995.

FAO. Guidelines for the production, processing, marketing and labelling of organically produced foods. In: ORGANICALLY PRODUCED FOODS. **Codex Alimentarius Commission.** 24th session, 71 p. 2001.

FARMACOPÉIA homeopática brasileira. São Paulo: Andrei, 1977. 115 p.

FAZOLIN, M.; ESTRELA, J.L.V.; ARGOLO, V.M.; Utilização de medicamentos homeopáticos no controle de *Cerotoma tingomarianus* Bechyné (Coleoptera Chrysomelidae) Em Rio Branco, Acre
(http://www.hospvirt.org.Br/homeopatia/port/biblioteca/port/biblioteca/pesquisahomeopática/emb_rapa.htm). 1999.

FIDELIS, I. **Crescimento, armazenamento, homeopatia, produção de metabólitos secundários e teste biológico do extrato de *Shageticola trilobata* L. Pruski em coelhos diabéticos.** Viçosa, MG: UFV, Impr. Univ., 2003. 185p. Dissertação (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

GARBI, E. Farmácia homeopática. In: ENCONTRO INFORMATIVO DE HOMEOPATIA NA AGROPECUÁRIA, 1., 1998, São Paulo. **Anais...** São Paulo: [s. n.], 1998.

GUTMANN, V. Estudos sobre a organização do sistema molecular. **Revista de Homeopatia**, v. 55, n. 4, p. 111-114, 1990.

HADJI, L., ARNOUX, B., BENVENISTE, J. Effect of dilute histamine on coronary flow of guinea-pig isolated heart. Inhibition by a magnetic field. **FASEB**, V. 5, A1583, 1991.

KHRENNIKOV, A. Classical and quantum dynamics on p -adic trees of ideas. **BioSystems**, v. 56, p. 95-120, 2000.

KNIGHT, D., CLEMENGER, K., HAAR, W.A., SAUNDERS, W.A. **Phys. Rev. Lett.**, v. 31B, p. 25-39, 1985.

LIVINE, O. Coordinates available from O. Livine, private communication. Ref: O. Livine, E.A. Bayer, M. Wilchek, J.L. Sussman. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 90, 55076-5080, 1993.

LOPES et al. (1999)

LUCAS, D., LIU, K., CRUZAN, J.D., VIANT, M.R., BROWN, M.G. SAYKALLY, R.J. **J. Phys. Chem.**, v. 101, p. 9032-9041, 1997).

MORAIS, J. O poder das bolinhas. **Revista Super Interessante**, Janeiro, p. 66-71. 2002.

MORENO, J.A. Geografia e homeopatia. In: Seminário Brasileiro sobre Homeopatia na Agropecuária Orgânica, 1, 1999, Viçosa, MG.

MIKLÓS, A. A. W. A terra e o homem. In: MIKLÓS, A. A. W. (Coord.). CONFERÊNCIA BRASILEIRA DE AGRICULTURA BIODINÂMICA, 4, 2000, São Paulo. A dissociação entre homem e natureza: reflexos no desenvolvimento humano. **Anais...** São Paulo/Botucatu: Ed. Antroposófica/ Associação Brasileira de Agricultura Biodinâmica, 2001. p. 25-39.

NUNES, R.O. **Teor de tanino em *Sphagneticola trilobata* com aplicação da homeopatia Sulphur**. Viçosa, MG: UFV, Impr. Univ., 2005. 101p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

OLSZEWER, E. Não acredito, não parece ser científico. **Revista de Oxidologia**, p. 35, 2000.

POITEVIN, B. Mecanismos de ação dos medicamentos de uso homeopático. Dados recentes e hipóteses. 1ª parte: mecanismos físico-químicos. **Revista de Homeopatia**, v. 59, n. 1, p. 24-30, 1994 a.

POITEVIN, B. Mecanismos de ação dos medicamentos de uso homeopático. Dados recentes e hipóteses. 2ª parte: mecanismos biológicos. **Revista de Homeopatia**, v. 59, n. 2, p. 27-31, 1994 b.

POITEVIN, B. É possível avaliar a homeopatia? **Revista de Homeopatia**, v. 56, n. 1-4, p. 3-9, 1991.

PORTO, M.E.G. **Alterações de propriedades biológicas e físico-químicas da água induzidas por campos magnéticos**. Campinas: UNICAMP, 1998, 98 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Campinas, Campinas.

PREPARATA, g. Quantum field theory of superradiance. In: Problems of fundamental modern physics. Cherubini, R., Dal Piaz, P., Minetti, B. (ed.) World Scientific Publishers: Singapore, 1990.

SAYKALY, R.J., BLAKE, G.A. **Science**, v. 259, p. 1570-1575, 1993.

SCHEMBRI, J. **Conheça a homeopatia**. Belo Horizonte, MG: Comunicação, 1976. 18p.

SCHWARTZ, G. E. R.; RUSSEK, L. G. S. The plausibility of homeopathy: the systemic memory mechanism. **Integrative Medicine**, v. 1, n. 2, p. 53-59, 1998.

SCHULTE, J. ENDLER, P.C. Outline of experimental physics methods to investigate specific structures of ultra highly diluted solvents. In: **Ultra High Dilution**. Endler, P.C., Schulte, J. (ed.) Kluwer Academic Publishers: Netherlands, p. 99-104, 1994.

SCHULTE, J. Bio-information between quantum and continuum physics. The mesoscopic picture. In: Fundamental Research in Ultra High Dilution and Homeopathy. Endler, P.C., Schulte, J. (ed.) Kluwer Academic Publishers: Netherlands, p. 45-68, 1998.

SILVA, W.R.G. **As ultradiluições e as estruturas virtuais quânticas**. In: SEMINÁRIO SOBRE CIÊNCIAS BÁSICAS EM HOMEOPATIA, IV., Lages – SC, **Anais...UDESC**, P.62-85, 2004.

STEPHENSON, J. On possible field effects of the solvent phase of succussed high dilutions. **J. Am. Inst. Hom.**, v. 59, p. 259-262, 1966.

TIEFENTRALER (1996)

WALRAFEN, G.E. **J. Chem. Phys.**, v. 47, p. 20-79, 1968.

YUSSEFI, M.; WILLER, H. **Organic agriculture worldwide 2002** – statistics and future prospects. Bad Dürkheim, Alemanha: Stiftung Ökologie & Landbau, 2002. 100 p.

ZACHARIAS, C.R. Physical research in dynamized systems. **Medical Hypothesis**, v. 58, n. 6, p. 523-526, 2002.

CAPÍTULO 4

Caracterização isoenzimática, teor de óleo essencial e de tanino em seis acessos de *Porophyllum ruderale*

1. INTRODUÇÃO

Dentre as espécies medicinais ainda não caracterizadas isoenzimaticamente, encontra-se *Porophyllum ruderale*: herbácea ruderal, invasora sobre o ponto de vista agrônômico, porém de uso medicinal sob o ponto de vista fitoterapêutico. Popularmente é conhecida como couve-cravinho, picão-branco, erva-de veado, dentre outras sinônimas. Tem origem na América do Sul e é amplamente distribuída em todo o território brasileiro e possui emprego alimentício ou medicinal. Embora todas as partes da planta sejam empregadas medicinalmente, as folhas têm maior destaque no uso interno ou externo. Externamente, o sumo da planta é utilizado no tratamento de dermatoses. Internamente, as folhas são usadas na forma de chá nos casos de partos difíceis. Estudos etnobotânicos relatam seu uso pelos indígenas brasileiros no tratamento de várias doenças, entretanto, poucos trabalhos têm sido realizados com esta espécie.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Os estudos relativos à variabilidade ou estrutura genética em populações naturais de plantas têm permitido grandes avanços no conhecimento dos processos microevolutivos envolvidos em sua diferenciação (REIS, 1996). A introdução da técnica de eletroforese de isoenzimas como método de avaliação desta variabilidade revolucionou a genética de populações em meados dos anos 60 e ainda mostra potencial, apesar de outras técnicas moleculares de detecção de polimorfismo genético ao nível de DNA (RAPD, microssatélites, RFLP, AFLP, por exemplo) estarem disponíveis atualmente (FERREIRA & GRATTAPAGLIA 1998, NEWTON *et al.* 1999). A análise da estrutura genética das populações é útil na caracterização dos níveis de diversidade (porcentagem de locos polimórficos, número de alelos por loco e heterozigosidade média) e na quantificação da variabilidade genética entre ou dentro das populações (WRIGHT, 1951).

2.1 Isoenzimas

Isoenzimas são definidas como múltiplas formas moleculares da enzima, com especificidade similar ou idêntica por algum substrato, ocorrendo no mesmo organismo (GOTTLIEB, 1971).

O uso de isoenzimas, é, particularmente, interessante na abordagem inicial de parâmetros genéticos populacionais, em espécies pouco estudadas (ROBINSON, 1998), como é o caso de *Porophyllum ruderale*.

As técnicas isoenzimáticas têm sido utilizadas em estudos sobre a diversidade genética de plantas medicinais, auxiliando a identificação e caracterização de acessos, genótipos, variedades e tipos (BISÃO, 2002).

Analisando isoenzimaticamente duas populações de *Ocimum nidicaule*, ALMEIDA e FIGUEIREDO-RIBEIRO (1986) possibilitaram a inclusão de duas variedades botânicas. Diversidade genética entre e dentro de cinco populações de hissopo anis (*Agastache foeniculum*) foi detectada por FUENTES-GRANADOS *et al* (1998).

Quatro espécies do gênero *Plantago* foram separadas utilizando o polimorfismo isoenzimático de esterase superóxido dismutase, sendo considerados marcadores bioquímicos eficientes na determinação de espécies do gênero (PRAMANIK e RAYCHAUDHURI, 1997).

Foi detectada a variabilidade entre e dentro de duas populações de alfavaca (*Ocimum selloi*) utilizando os resultados do polimorfismo de cinco enzimas (fosfatase ácida, esterase, glutamato oxaloacetato transaminase, peroxidase e chiquimato desidrogenase) (AMARAL e CASALI, 2000).

Na análise isoenzimática de sete acessos de *Bidens pilosa* (picão) detectou-se variantes de fosfatase ácida, esterase e peroxidase, sendo que entre os acessos de altitudes extremas (5 e 1.160 m) as variações foram mais marcantes (OLIVEIRA E CASALI, 1999). LOPES (1997) caracterizou isoenzimaticamente subgrupos de indivíduos em oito acessos de erva-de-bicho (*Polygonum punctatum* Ell.).

A detecção das isoenzimas envolve, basicamente, três passos: 1) a extração de proteínas do tecido vegetal, 2) a separação dessas proteínas por meio de eletroforese e 3) a coloração histoquímica do gel, permitindo a visualização do produto da reação enzimática na forma de “bandas” no gel (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996).

2.2 Extração de proteínas de plantas

A maioria dos tecidos vivos de mudas, plantas adultas ou microculturas, seja raízes, casca, lenho, brotações, folhas, flores, pólen, frutos, sementes, pode ser usada na análise eletroforética de proteínas e isoenzimas, desde que mantidos em temperatura baixa e macerado em soluções-tampão adequadas. No entanto, as folhas são vantajosas, pois podem ser obtidas em qualquer época do ano (exceto espécies caducifólias) e permitem amostragem não destrutiva de todos os indivíduos da população. Não obstante são geralmente ricas em compostos fenólicos (fenóis, polifenóis e taninos) e enzimas oxidativas, que mascaram a atividade e resolução enzimáticas. Com o objetivo de amenizar estes problemas, é necessário que certos cuidados sejam tomados no manuseio das amostras. A coleta, o transporte e o armazenamento devem ser feitos de modo a manter ao máximo a integridade e a turgescência dos tecidos. Deve-se, preferencialmente, efetuar a coleta pela manhã, evitando possíveis efeitos da variação ambiental sobre o metabolismo e, possivelmente, sobre a atividade de certas enzimas. No ato da coleta, é boa prática acondicionar a amostra em sacos plásticos devidamente fechados e etiquetados e, dependendo da distância de transporte, manter em caixa de isopor contendo gelo e serragem fina ou vermiculita. O uso de gelo e serragem ou vermiculita garante a temperatura baixa e obviamente conserva as amostras por várias horas (36-48 horas) (ALFENAS *et al.*, 1998).

A trituração pode ser feita manualmente em almofariz de porcelana, e a proporção de tecido por volume de solução extratora deve ser determinada previamente, de modo a se obter extratos com boa atividade e resolução. O extrato bruto deste macerado contém as enzimas com estabilidade e atividade catalítica preservadas (ALFENAS *et al.*, 1998).

2.3 Eletroforese

Existem vários métodos bioquímicos que determinam a presença de isoenzimas. Entretanto, a eletroforese é o método que mais tem se destacado (BROWN JR, 1988). A evidenciação de proteínas e ácidos nucléicos pela eletroforese é precisa e valiosa na caracterização e identificação de acessos, genótipos, variedades e tipos de espécies cultivadas ou silvestres (BISÃO, 2002), em estudos taxonômicos, filogenéticos, fisiológicos e genéticos em plantas (ALFENAS, 1998).

A eletroforese representa a migração de íons submetidos à corrente elétrica. O método se baseia na aplicação da diferença de potencial elétrico nas extremidades do gel, possibilitando o movimento das moléculas da amostra. O princípio é simples: moléculas com carga negativa migram ao pólo positivo e moléculas com carga positiva migram ao pólo negativo. Durante a eletroforese, a separação das isozimas pode ser processada pela sua carga elétrica, sua dimensão e sua forma, assim, cada isoenzima assumirá determinada posição no gel. Tais moléculas enzimáticas, na presença de substratos ou corante específicos, formam complexos insolúveis, permitindo a visualização de bandas coloridas nos locais correspondentes às suas posições de migração. As bandas que aparecem na análise eletroforética da mesma enzima são chamadas isozimas (GOTTLIEB, 1971; SCANDALIOS, 1975).

2.3.1 Suportes da eletroforese

A eletroforese pode ser desenvolvida em suportes como papel-filtro, sílica-gel, membranas de acetato de celulose, géis de amido ou de poliacrilamida. No caso de enzimas, géis de amido e poliacrilamida oferecem melhor separação do que outros suportes. Além do efeito de carga, a separação dá-se também de acordo com a dimensão e a estrutura das moléculas (peneiramento molecular). Enquanto o movimento de proteínas de alto peso molecular é retardado pelo pequeno diâmetro dos poros do gel, proteínas de baixo peso molecular migram livremente de acordo com as respectivas cargas. A eletroforese em géis de amido é bem mais barata do que aquela em géis de poliacrilamida, mas suas lâminas não têm porosidade rigorosamente controlável e a capacidade de separação é, em consequência, inferior. Por outro lado, géis de amido são compatíveis com sistemas-tampão, o que permite otimizar a atividade e a distinção entre as enzimas em função dos componentes da solução-tampão e de seu valor de pH

plantas

2.3.2 Eletroforese em gel de amido

A introdução da técnica de eletroforese de isoenzimas nos estudos de populações e de evolução também foi de grande importância, porque além de iniciar a era da genética molecular, forneceu o meio direto de avaliação da variação genética (TORGGLER, 1995).

Sob aquecimento, a suspensão aquosa de amido torna-se viscosa. Sua viscosidade aumenta acentuadamente a 65° C, ponto em que os grânulos de amido se desfazem; a partir daqui, à medida a temperatura aumenta, a viscosidade diminui abruptamente e atinge valor mínimo e uniforme a 95° C . Nesse ponto, a suspensão deve ser desgaseificada e vertida a molduras próprias. Após resfriamento, a suspensão geleifica-se, formando a rede tridimensional de polímeros de glucose. Quando frio, o gel está preparado podendo receber o extrato protéico e ser submetido à eletroforese. A concentração do gel define sua consistência e porosidade. Seu preparo é relativamente empírico, o que requer habilidade do pesquisador.

A eletroforese em gel de amido é, usualmente, conduzida em posição Horizontal. Preparam-se, convenientemente, géis espessos (em torno de 10 mm), os quais são laminados, horizontalmente, depois da eletroforese. Assim, cada lâmina pode ser revelada individualmente possibilitando a detecção de enzimas específicas, e em virtude da corrida eletroforética idêntica fazer comparações entre enzimas e interpretação conjunta destas (ALFENAS, 1998).

2.4 Identificação de enzimas e zimograma

Quanto à identificação de isozimas no gel, utilizam-se reações químicas baseadas em suas atividades catalíticas específicas. Nesse processo são fornecidos os substratos e o cofatores necessários à reação da enzima *in vitro*, e os produtos gerados pela ação enzimática podem, por meio de reação secundária, formar produtos coloridos e insolúveis que permitem identificar exatamente a sua posição no gel. Esses produtos formam “bandas” que visualizadas no gel são transpostas ao papel milimetrado, ou fotografadas. O conjunto de bandas reveladas é denominado zimograma (ALFENAS *et al*, 1998, ROBINSON, 1998).

3. OBJETIVO

Caracterizar isoenzimaticamente e fitoquimicamente (quanto ao teor de óleo essencial e de tanino) seis acessos de *Porophyllum ruderale*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Foram caracterizados isoenzimaticamente seis acessos de *Porophyllum ruderale*, com 8 repetições, totalizando 48 plantas, obtidas a partir de sementes colhidas nos municípios de Viçosa (MG), Goianá (MG), Coronel Pacheco (MG), Barra do Garça (MT), Rio Verde (GO) e Jaboticabal (SP) (Quadro 1). O local de coleta variou entre zona rural e zona urbana, bem como o habitat da planta fornecedora de sementes. O experimento foi realizado, em casa de vegetação, no delineamento inteiramente casualizado, com oito repetições.

Foram testados os seguintes sistemas isoenzimáticos: chiquimato desidrogenase (SKDH), isocitrato desidrogenase (IDH) e malato desidrogenase (MDH). Como não havia disponibilidade de estudos sobre isoenzimas em *Porophyllum ruderale*, foi necessário a adaptação da técnica de eletroforese em gel de amido.

Além da caracterização isoenzimática, quantificou-se o teor de óleo essencial e de tanino em quatro acessos de couve-cravinho. A metodologia utilizada na extração destes compostos se encontra no item 4.6.

Quadro 1 – Código do acesso, origem e habitat de coleta dos seis acessos de *Porophyllum ruderale*

Código	Origem e local de coleta	Habitat
CEM	Viçosa – MG (zona urbana)	(em barranco, crescendo junto à grama)
GO	Goianá – MG (zona rural)	(beira de estrada, crescendo junto a outras plantas)
CP	Coronel Pacheco (zona rural)	(beira de estrada, crescendo junto a outras plantas)
BG	Barra do Garça (zona urbana)	(campus da UFMT, crescendo junto à grama)
RV	Rio Verde (zona rural)	(terreno baldio, crescendo junto a outras plantas)
JAB	Jaboticabal (zona rural)	(beira de estrada, crescendo junto a outras plantas)

4.1 Obtenção e preparo das amostras de tecido vegetal

As amostras de tecidos radiculares e foliares foram coletadas de plantas adultas (aproximadamente 90 dias), no período da manhã, colocadas em papel toalha, acondicionadas em caixa de isopor contendo gelo picado e levadas ao Laboratório de Melhoramento de Hortaliças, do Departamento de Fitotecnia da UFV. Imediatamente, as folhas foram maceradas em almofariz

de porcelana, previamente resfriado, contendo PVPP (polivinilpolipirrolidina) e solução extratora.

A proporção de tecido por volume de solução extratora (APÊNDICE – Quadro 1) foi de 3:1. Utilizou-se a solução extratora sugerida por ALFENAS *et al* (1991), aumentando-se somente a concentração do PVP (polivinilpolipirrolidona) a 10% a fim de remover compostos fenólicos (interferentes). Após a trituração, com auxílio de pinça cirúrgica, o macerado foi adsorvido por tiras de papel cromatográfico Whatman 3M, medindo 1,5 x 0,6 cm, que foram envoltos em papel alumínio previamente identificados e esses transferidos a recipientes contendo nitrogênio líquido.

Em seguida, foram retirados, acondicionados em sacos plásticos e mantidos em refrigerador a - 70° C. A corrida eletroforética foi realizada com estas amostras contidas nas tiras de papel aplicada nos géis.

4.2 Preparo do gel

Foi empregado o sistema de eletroforese horizontal em gel de amido (ALFENAS *et al*, 1998), utilizando-se amido nacional na concentração de 11%.

O gel foi preparado a partir da suspensão de amido em solução tampão do gel, à temperatura ambiente, em erlenmeyer com agitação constante. A solução tampão do gel variou de acordo com o sistema isoenzimático.

A suspensão foi levada ao forno microondas por 5 minutos, agitando-se a cada fervura. Posteriormente, o conteúdo foi vertido em formas de acrílico. O gel foi coberto com placa de vidro para uniformizar a superfície e evitar evaporação excessiva. Os géis, preparados à tarde, foram conservados em geladeira até o dia seguinte, quando se procedeu a eletroforese.

4.3 Aplicação das amostras tecido vegetal e eletroforese

Os géis foram retirados da geladeira, e, com o auxílio de bisturi, fez-se um corte transversal a 4 cm da extremidade catodal (-). A parte menor do gel foi afastada a fim de facilitar a aplicação das amostras de tecido vegetal.

As amostras de tecido vegetal foram colocadas na face cortada do maior gel, em posições equidistantes, num total de 8 amostras em cada gel. Nas extremidades foram inseridos papelotes de azul-de-bromofenol com a finalidade de permitir a visualização da frente de migração e do

término da corrida. Em seguida, as duas partes do gel foram unidas, seguindo-se a corrida eletroforética na posição horizontal.

As formas de acrílico, contendo os géis foram colocadas em suportes, entre duas cubas com eletrodos, cada cuba contendo 100 mL do tampão adequado ao sistema isoenzimático. Tecido “perfex”, dobrado uma vez, foi utilizado como ponte conectando o gel às cubas.

O aparelho foi ligado, sendo realizada uma pré-corrida, com duração de 30 minutos, a 20 mA (150 V), visando a transferir as enzimas das tiras de papel ao gel, uniformizando a partida de todas as amostras. Após esse período, o aparelho foi desligado, as cubas desconectadas e as tiras removidas com o auxílio de uma pinça. Finalmente, as partes do gel foram reunidas, reconectando-se o gel às cubas e o aparelho ligado, reiniciando a corrida eletroforética até que a frente de azul de bromofenol atingisse 9,0 cm, a partir da origem..

4.4 Fatiamento, coloração, fixação e secagem dos géis

Com o auxílio de guias de vidro de 2,0 mm de espessura, e um fio de náilon n ° 20 , procedeu-se o corte horizontal do gel, em fatias de mesma espessura das guias. As fatias foram, cuidadosamente, retiradas e colocadas distendidas em formas do tipo “pirex”, onde foram imersas na solução corante específica de cada enzima (APÊNDICE – Quadros 2, 3 e 4).

Após o período de incubação, visando o favorecimento da coloração, a solução foi descartada e os géis lavados em água corrente, sendo, em seguida, feita a fixação em solução de glicerina a 10% por cerca de 12 horas, em refrigerador a aproximadamente 4° C. Os géis, após adquirirem consistência, foram colocados entre duas folhas de papel celofane, previamente embebidas em água. O conjunto gel-placa de vidro foi mantido à temperatura ambiente na posição vertical (conforme descrito em ALFENAS *et al.*, 1991), por aproximadamente 24 horas. Após este período, secou-se o conjunto gel-placa de vidro em estufa a 37° C, por mais algumas horas, sendo posteriormente identificado e analisado.

4.5 Leitura das “bandas”, confecção dos zimogramas e identificação dos resultados

A análise dos géis foi feita com o auxílio de diafanoscópio e as bandas reveladas foram registradas. As bandas foram identificadas de acordo com a mobilidade relativa (MR), sendo atribuído valor 1,0 à banda de maior migração, a partir do ponto de aplicação, enquanto a

mobilidade relativa das demais bandas foi obtida, dividindo-se a distância percorrida pela referida banda pela distância percorrida pela banda de maior migração.

4.6 Extração de óleo essencial e de tanino

Na extração do óleo essencial das folhas de *Porophyllum ruderale* foi utilizado o aparelho “Clevenger” modificado, adaptado a um balão de fundo redondo com capacidade de 1000 ml (SKRUBIS, 1982; MING et al., 1996).

O balão de fundo redondo foi carregado com no máximo 100g de folhas frescas e 500 ml de água destilada, em cada extração, iniciando-se o processo de hidrodestilação. O tempo de extração foi 60 minutos.

Obtido o hidrolato (mistura de água + óleo), procedeu-se à extração com solvente orgânico pentano (3 x 30 ml), em funil de separação agitado vigorosamente por cerca de 10 segundos, repetindo-se a operação cinco vezes. O óleo solubilizou-se na fase orgânica e descartou-se a fase aquosa. A fração orgânica obtida foi tratada com sulfato de magnésio anidro para retirar a água presente. Após alguns minutos em repouso, a solução foi filtrada e concentrada em evaporador rotativo a 40° C, até redução expressiva do volume do solvente, de onde foi transferida para um frasco com tampa rosqueada, devidamente tarado.

Após evaporação completa do solvente, o frasco foi pesado novamente, calculando-se assim o rendimento de óleo. Determinada a massa de óleo obtida, calculou-se a quantidade de óleo em mg/100g de folha.

O método adotado na determinação de tanino foi o preconizado pela AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Esse método se fundamentou na redução do ácido fosfomolibídico – fosfotungístico pelos taninos em meio básico, produzindo coloração azul-forte, que é medida espectrofotometricamente no comprimento de onda 760 nm.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica utilizada foi eficiente na separação das bandas isoenzimáticas dos sistemas SKDH e MDH, possibilitando a revelação de bandas nítidas e com fácil identificação, permitindo separar os acessos. Esse meio-suporte foi utilizado com grande eficiência por AMARAL JÚNIOR (1994). O sistema IDH não teve boa resolução, não sendo indicado na separação dos acessos.

Ocorreram variações entre indivíduos, indicando que *Porophyllum ruderale*, como a maioria das espécies medicinais espontâneas, possui grande variabilidade genética devido ao fato de ocorrer em ambientes variados e ter reprodução sexuada (OLIVEIRA, 2001). A variação do padrão SKDH entre e dentro de populações também foi detectada por AMARAL e CASALI (2000) quando analisaram duas populações de alfavaca (*Ocimum selloi*).

Houve variação no número, na espessura, na intensidade da coloração das bandas nos três sistemas avaliados. Essa variação pode estar relacionada ao grau de ploidia (MATSUMOTO e MARIN-MORALES, 1996) na espécie. Segundo GOTTLIEB (1982), a diferença no grau de ploidia pode ser observada no gel, pela presença do número maior de bandas. Por sua vez, MESSINA *et al.* (1991) afirmaram que essa diferença pode ser averiguada pelo aumento da intensidade e da espessura das bandas, causado pela variação na dose de alelos presentes.

Quanto aos teores de óleo essencial e de tanino, não houve diferença significativa entre os acessos (Quadro 2).

Quadro 2 - Valores médios das variáveis OE (óleo essencial), TF (tanino na folha) e TR (tanino na raiz) de quatro acessos de *Porophyllum ruderale*

Acessos	OE (mg/100g folha)	TF (%)	TR (%)
Barra do Garça	5,00 a	1,375 a	2,209 ab
Viçosa	5,00 a	1,379 a	1,334 b
Goianá	3,25 a	1,410 a	2,531 a
Coronel Pacheco	5,50 a	1,289 a	2,113 ab

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

5.1 Chiquimato desidrogenase (SKDH)

No sistema chiquimato desidrogenase (SKDH) houve atividade no tecido foliar e, sendo detectada a presença de uma banda. SKDH pode possuir característica monomórfica adaptativa por estar envolvida no metabolismo secundário (rota do chiquimato) e na síntese de compostos de defesa da planta (TAIZ e ZIGER, 1991). ALFENAS *et al* afirmam ser desconhecido o número de subunidades da enzima chiquimato desidrogenase. BISÃO (2002) também encontrou resultado semelhante trabalhando com *Eclipta Alba*, planta que pertence à mesma família de *Porophyllum ruderale*.

As bandas com diferença na intensidade de coloração, altura e largura formaram os padrões A, B e C, e permitiram diferenciar os acessos RV, CP, GO e BG do acesso CEM (Figura 1).

5.2 Malato desidrogenase (MDH)

Na enzima malato desidrogenase, houve formação de várias bandas (Figura 2). A ocorrência de enzimas monoméricas e diméricas no sistema MDH foi constatada por SCHUELTER (1996) em pimenta, e por SOUZA (1996) e LOPES (1999), ambos trabalhando com acerola.

O estudo de herança das isoenzimas de malato desidrogenase, em plantas, tem sido considerado complexo, uma vez que essas isoenzimas encontram-se associadas a estruturas multicelulares como mitocôndrias ou citosol, podendo promover a sobreposição de bandas (ARULSEKAR *et al*, 1986).

5.3 Isocitrato desidrogenase (IDH)

Esta enzima é importante no metabolismo de carboidratos (HURLEY *et al*, 1989; CUPP *et al*, 1991). Em eucariontos há pelo menos três tipos de IDH: Duas estão localizadas na matriz mitocondrial (uma NAD⁺ dependente e outra NADP⁺), enquanto a terceira (NADP⁺-dependente) é citoplasmática.

No sistema IDH não houve boa resolução (Figura 3).

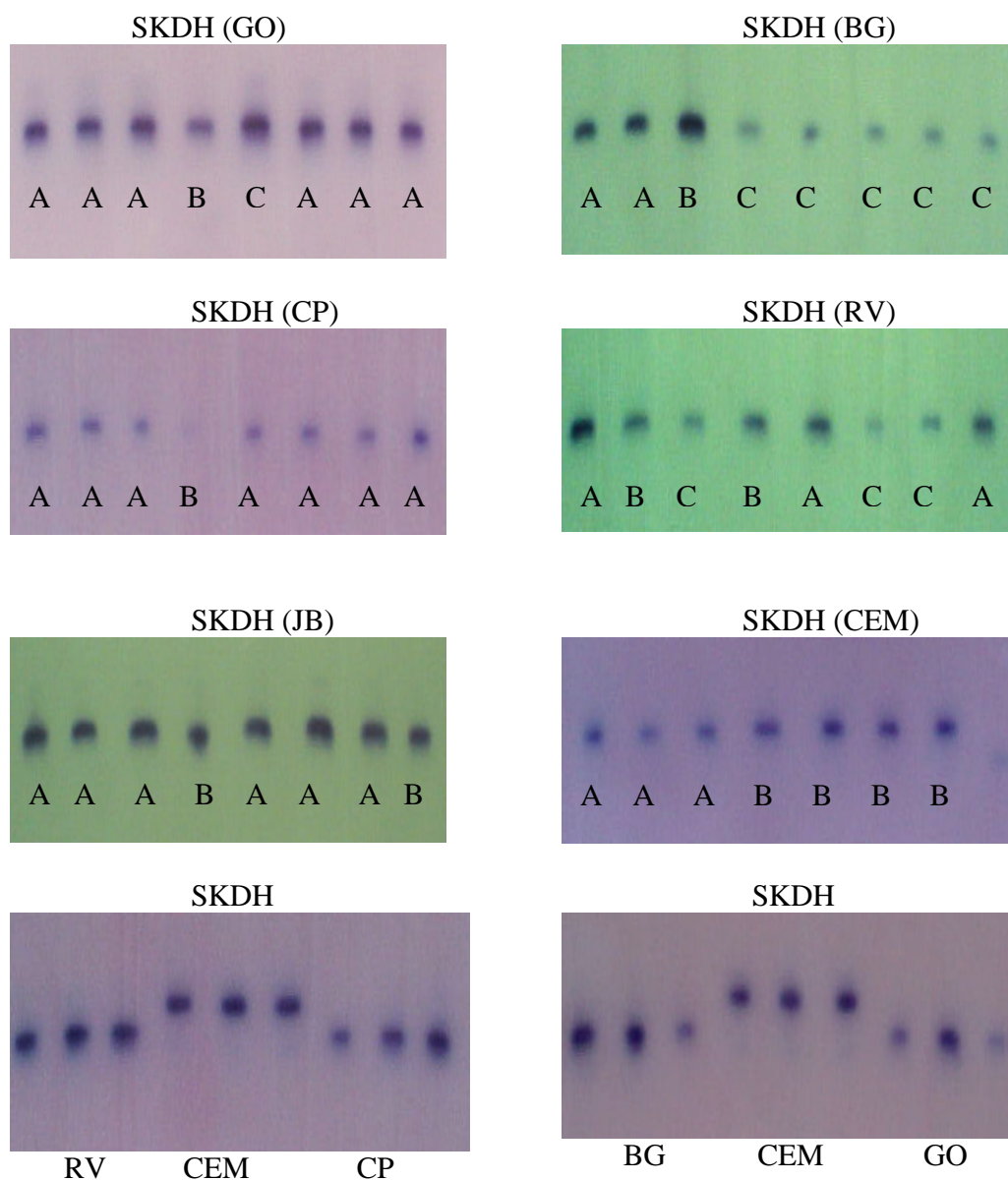


Figura 1 – Caracterização isoenzimática de SKDH, observada nas análises eletroforéticas de amostras obtidas de folhas de *Porophyllum ruderale*. GO – Goiana, CP – Coronel Pacheco, JB- Jaboticabal, BG – Barra do Garça, RV – Rio Verde e CEM – Viçosa.

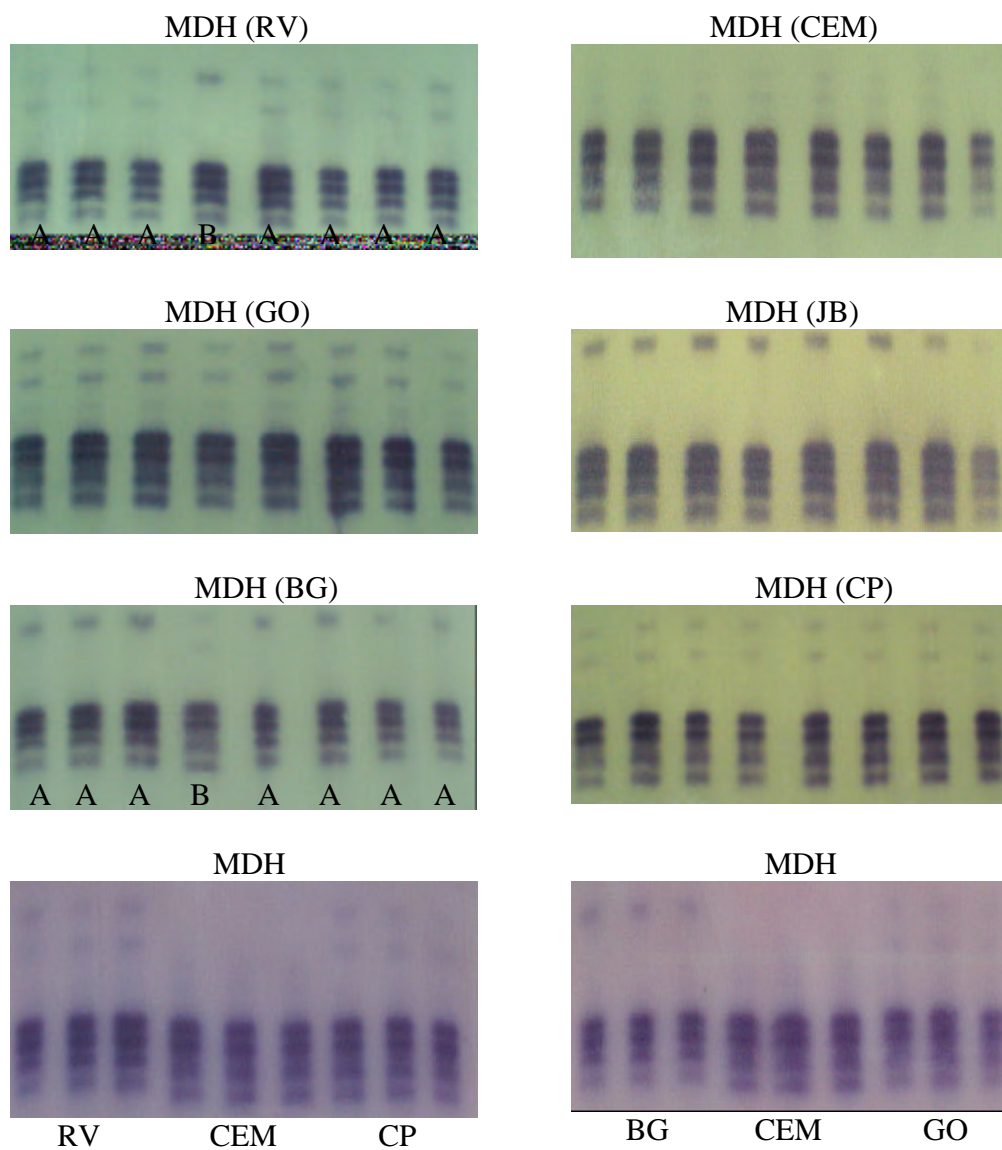


Figura 2 – Caracterização isoenzimática de MDH, observada nas análises eletroforéticas de amostras obtidas de folhas de *Porophyllum ruderale*.

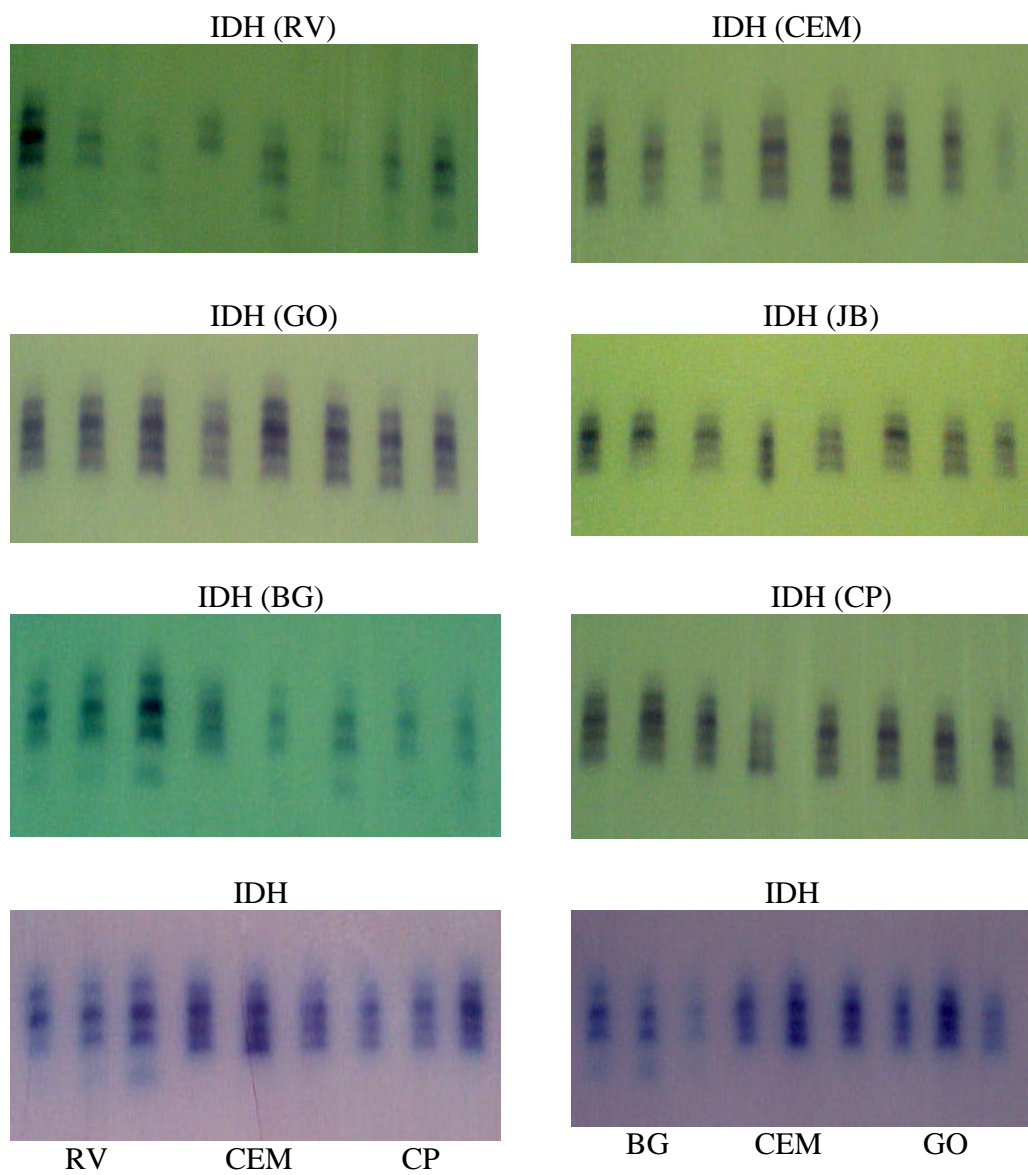


Figura 3 – Caracterização isoenzimática de IDH, observada nas análises eletroforéticas de amostras obtidas de folhas de *Porophyllum ruderale*.

6. CONCLUSÕES

- As variações ocorreram entre acessos e entre indivíduos do mesmo acesso.
- O sistema SKDH foi o que melhor separou os acessos

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C. (Ed.) **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa, MG: UFV, 1998. 574p.
- ALMEIDA, V.P., FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Análise enzimática e quimiotaxonomia de duas variedades de *Ocimum nudicale* Benth (Labiatae). **Revista Brasileira Botânica**, v. 9, p. 75-80, 1986.
- AMARAL, C.L.F., CASALI, V.W.D. Identificação e caracterização de populações de alfavaca (*Ocimum selloi*) Benth por meio de marcadores isozimáticos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 2, n. 2, p. 9-15, 2000.
- AMARAL JÚNIOR., A.T.; CASALI, V.W.D.; ALFENAS, A.C. BRUNE, W. Análise isozimática de acesso de moranga. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 12, n. 1, p. 37-39, 1994.
- ARULSEKAR, S., PARFITT, D.A., BERES, W., HANCHE, P.E. Genetics of malate dehydrogenase isozymes in peach. **Journal Heredity**, v.77, p. 49-51, 1986.
- BISÃO, N. **Interação genótipo X ambiente, caracterização isoenzimática, diversidade genética e química em *eclipta Alba* (L.) Hassk**. Viçosa, MG:UFV. 2002. 148 p. Tese (Doutorado Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 2002.
- BROWN JR, K.S. Engenharia ecológica: novas perspectivas de seleção e manejo de plantas medicinais. **Suplemento da Acta Amazônica**, v. 18, n. 1-2, p. 291-303, 1988.
- CUPP J.R., MCALISTER-HENN L. **J. Biol. Chem**, v. 266, p.22199-22205, 1991.
- FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1996. 220p.
- FUENTES-GRANADOS, R.G., WIDRLECHENER, M.P., WILSON, L.A. Allozyme inheritance in Anise hyssop (*Agastache foeniculum* (Pursh) Kuntze (Lamiaceae)). **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 123, n. 5, p. 868-874, 1998.
- GOTTLIEB, L.D. Gel electrophoresis: new approach to the study of evolution. **Bioscience**, v. 21, n. 18, p. 939-944, 1971.
- GOTTLIEB, L.D. Conservation and duplication of isozyme in plants. **Science**, v. 216, n. 4544, p. 373-379, 1982.
- HURLEY J.H., THORSNESS P.E., RAMALINGAM V., HELMERS N.H., KOSHLAND D.E. Jr., STROUD R.M. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 86, p.8635-8639, 1989.

LOPES, R.C. **Caracterização isozimática, diversidade genética e produção de óleo essencial em acessos de *Polygonum punctatum* Ell.** Viçosa, MG: UFV, 1997. 88 p. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 1997.

LOPES, R. **Polimorfismo, sistema de acasalamento, polinizações, repetibilidade de características do fruto e avaliação de genótipos de aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.)** Viçosa, MG: UFV, 1999. 146 p. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 1999.

MATSUMOTO, S.T., MARIN-MORALES, M.A. Análise citogenética de cinco populações de *Bidens pilosa* (Asteraceae) In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 47, 1996, Nova Friburgo. **Resumos...** Nova Friburgo: Colégio Anchieta, 1996. p. 503.

MESSINA, R.; TESTOLIN, R.; MORGANTE, M. Isozymes for cultivar identification in Kiwifruit. **HortScience**, v. 26, p. 899-902, 1991.

NEWTON, A.C., ALLNUTT, T.R., GILLIES, A.C.M., LOWE, A.J. & ENNOS, R.A. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 14, p. 140-145, 1999.

OLIVEIRA, J.E.Z., CASALI, V.W.D. Caracterização isozimática de acessos de *Bidens pilosa* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 2, n. 1, p. 19-26, 1999.

PRAMANIK, s., RAYCHAUDHURI, S.S. DNA content, chromosome composition, and isozyme patterns in *Platago* L. **The Botanical Review**, v. 63, n. 2, p. 124-139, 1997.

REIS, M.S. Dinâmica da movimentação dos alelos: subsídios para conservação e manejo de populações naturais de plantas. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 19, p. 37-47, 1996.

ROBINSON, I.P. Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: ALFENAS, A.C. (Eds.) **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos.** Viçosa, MG: UFV, 1998, p. 329-380.

SCANDALIOS, J.G. Genes, isozymes and evolution. In: MARKET, C.L. (Ed.). **Isozymes: genetic and evolution.** New York: Academic Press, 1975. v. 4, p. 1-7.

SCHUELTER, A.R. **Análise isozimática, dialéctica e diversidade genética de pimenta silvestre (*Capsicum flexuosum* Sendt.)** Viçosa, MG: UFV, 1996. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 1996.

SHAW, C.R., PRASSAD, R. Starch gel electrophoresis of enzymes: a compilation of recipes. **Biochem. Genetic**, v. 4, p. 297-320, 1970.

SOLTIS, D.E., HAUFLE, C.H., DARROW, D.C. Starch gel electrophoresis of fern: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. **American Fern Journal**, v. 73, n. 1, p. 9-27, 1983.

SOUZA, J.C. **Diversidade genética entre acessos de acerola (*Malpighia* sp) com base em dados isozimáticos e agronômicos.** Viçosa, MG: UFV, 1996, 67 p. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 1996.

TAIZ, L., ZEIGER, E. **Plant Physiology.** Redwood City, California: The Benjamin cummings, 1991. 559 p.

TORGGLER, M.G.F. **Isoenzimas: variabilidade genética em plantas.** Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 1995. 186 p.

WRIGTH, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics** v. 15, p. 323-354, 1951.

Capítulo 5

Triagem fitoquímica das folhas de *Porophyllum ruderale* (Asteraceae)

1. INTRODUÇÃO

Os metabólitos secundários são expressão da individualidade química das plantas e diferem, qualitativa e quantitativamente, entre espécies, sendo produzidos em pequenas quantidades (MARTINS et al., 1996). No metabolismo secundário, os produtos, embora não necessariamente essenciais ao organismo produtor, garantem vantagens na sobrevivência e perpetuação da espécie no ecossistema (SANTOS, 1999). Os metabólitos secundários podem ser divididos em três grupos principais: terpenóides, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (TAIZ & ZEIGER, 1998).

Os terpenóides são sintetizados a partir do acetil CoA, via rota do ácido mevalônico. Os compostos fenólicos são substâncias aromáticas formadas via rota do ácido chiquímico. Os compostos nitrogenados, como alcalóides, são sintetizados a partir dos aminoácidos (SANTOS, 1999) (Figura 1).

O metabolismo do acetil CoA gera o diversificado grupo de metabólitos secundários, os isoprenóides ou terpenóides (MANN, 1987), que constituem a segunda classe com maior número de fármacos ativos, na qual se encontram os óleos essenciais.

Entende-se por triagem química o estudo fitoquímico preliminar da amostra vegetal por meio de reações cromáticas que permitam o reconhecimento dos grupos de marcadores químicos (COSTA, 2000). A triagem permite inferir quais as possíveis substâncias presentes na amostra vegetal e a respectiva origem.

As espécies do gênero *Porophyllum* são amplamente utilizadas na medicina popular na América do Sul e Central. No entanto, poucas espécies têm sido estudadas quimicamente (HERZ et al., 1979).

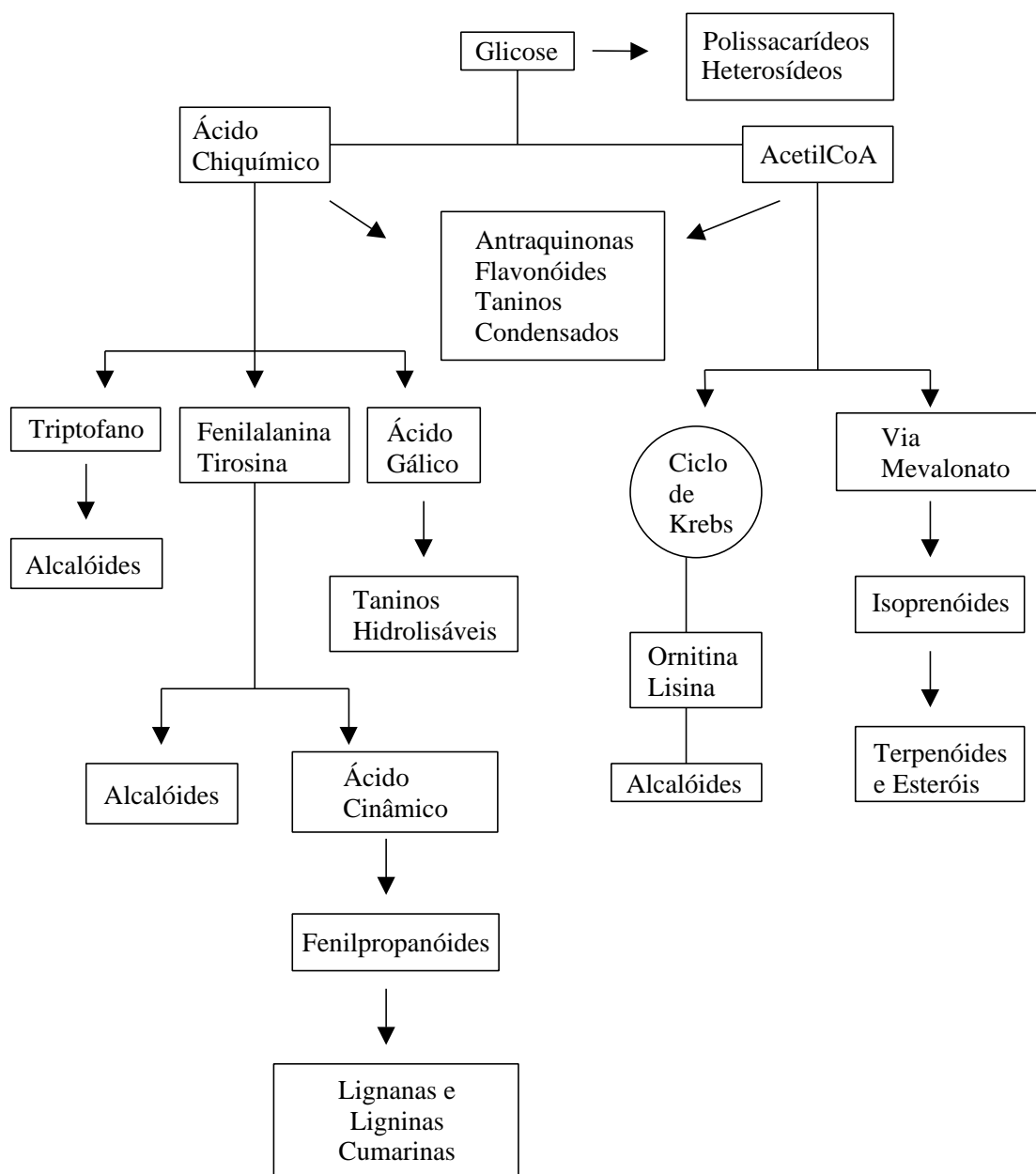


Figura 1 – Ciclo biossintético dos metabólitos secundários. Adaptado de SANTOS (1999).

2. REVISÃO DE LITERATURA

Dentre os metabólitos secundários encontram-se: os polifenóis, os taninos, os flavonóides, as cumarinas, os antranóides, os terpenos, as antraquinonas, os heterosídeos cardiotônicos, as saponinas.

Os polifenóis são substâncias redutoras e, portanto, oxidam com facilidade, resultando em substâncias coloridas. Oxidantes, como o cloreto férrico (FeCl_3), são empregados visando facilitar a visualização da reação que caracteriza estes compostos. Praticamente, todos os compostos fenólicos são formados a partir do ácido chiquímico, cuja síntese ocorre com intermediação da fenilalanina, da fenilalanina amônia liase (PAL) e do ácido cinâmico (KAY, 1991).

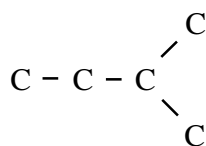
Os taninos fazem parte da classe de compostos denominadas fenólicos. A expressão “compostos fenólicos” abrange numeroso grupo de compostos que possuem um anel aromático ligado a um ou mais grupos hidroxílicos junto a vários outros substituintes, com distribuição ampla no reino vegetal (OLIVEIRA, 1988). Os taninos são substâncias fenólicas solúveis em água, com possibilidade de formar complexos insolúveis em água, com alcalóides, gelatinas e outras proteínas (SIMÕES et al., 2002). São considerados os compostos secundários mais importantes envolvidos na defesa das plantas contra insetos e doenças (SWAIN, 1979). Tais compostos são responsáveis pela adstringência de muitos frutos e outros produtos vegetais. A complexação entre taninos e proteínas é a base das suas propriedades como fator de controle de insetos, fungos e bactérias, assim como dos seus principais usos industriais, como na manufatura do couro. Os taninos ajudam no processo de cura de feridas, queimaduras e inflamações por meio da formação da camada protetora (complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo) sobre a pele ou mucosa danificada. Debaixo dessa camada, o processo natural de cura pode, então, ocorrer. Processo similar ocorre, provavelmente, em casos de úlcera gástrica, em que uma camada “tanino-proteína” complexados protege a mucosa do estômago (HASLAM, 1989).

Os flavonóides constituem importante classe de polifenóis, presente com relativa abundância entre os metabólitos secundários (são conhecidos mais de 1200 tipos de flavonóides). Possuem diversas formas estruturais, a maioria dos componentes desta classe contém 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, com duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos. Diversas funções são atribuídas aos flavonóides: proteção dos vegetais contra

incidência de raios ultravioleta, proteção contra insetos, herbívoros e patógenos, atração de polinizadores e antioxidante (SIMÕES, 2002).

As cumarinas são derivadas do metabolismo da fenilalanina. Estruturalmente são lactonas do ácido o-hidróxi-cinâmico (2H-1-benzopiran-2-onas), sendo o representante mais simples a cumarina 1,2-benzopirona (SIMÕES, 2002). Estão distribuídas predominantemente nas angiospermas, mas também podem ser encontradas em fungos e bactérias. As cumarinas, pelas vantagens decorrentes do seu odor acentuado, estabilizante e baixo custo, são amplamente utilizadas nas indústrias de produtos de limpeza e de cosméticos. Como medicamento, destaca-se os derivados da 4-hidroxi-cumarina pela ação anticoagulante (SIMÕES, 2002).

Os óleos voláteis, na sua grande maioria, são constituídos quimicamente de derivados fenilpropanóides, sendo os derivados terpenóides os predominantes (SIMÕES, 2002; SPITZER, 1999). Os terpenos são formados pela junção de unidades isoprênicas, constituídas por cinco unidades de carbono (figura 2) e são sintetizados a partir do acetil CoA, via rota do ácido mevalônico (SANTOS, 1999).



Fonte: WATERMAN (1993)

Figura 2 – Representação esquemática do esqueleto carbônico da unidade isoprênica.

Os principais terpenóides encontrados nos óleos essenciais podem ser divididos em monoterpenos e sesquiterpenos (LOPES, 1997). Vários derivados terpênicos, como a pulegona, têm sido empregados como matéria-prima em síntese de artemisina, derivado sesquiterpênico com importantes propriedades antimaláricas (AVERY et al, 1992).

As antraquinonas fazem parte do grupo das quinonas (compostos orgânicos considerados produtos da oxidação de fenóis). Sua principal característica é a presença de dois grupos carbonílicos. Plantas com antraquinonas têm sido tradicionalmente utilizadas como fonte de corantes naturais. A alizarina (antraquinona obtida de raízes de *Rubia tinctorum*) foi uma das primeiras matérias-primas corantes utilizadas pelo ser humano (SIMÕES, 2002).

Os heterosídeos cardiotônicos são compostos resultantes da ligação entre uma ou mais unidades de açúcares e a aglicona; e foram empregados em tratamentos de insuficiência cardíaca,

devido à sua ação sobre o músculo cardíaco. Os heterosídeos podem ser distinguidos em primários e secundários, os primários são encontrados em plantas frescas, contendo uma molécula terminal de glicose facilmente eliminada por hidrólise durante o processo de secagem, formando assim os heterosídeos secundários (SIMÕES, 2002).

As saponinas são glicosídeos de esteróides ou de terpenos policíclicos. Esse tipo de estrutura; parcialmente com característica lipofílica (triterpenos ou esteróides) e parte hidrofílica (açúcares); determina a propriedade de redução da tensão superficial da água e suas ações detergentes e emulsificantes. Em solução aquosa formam espuma persistente. Ocorrem em misturas complexas devido à presença concomitante da estrutura com número variado de açúcares ou ainda devido à presença de várias agliconas. São componentes importantes na ação de muitas drogas vegetais, destacando-se aquelas tradicionalmente utilizadas como expectorantes (com 30 átomos de carbono) e diuréticas (formada por esqueleto de 27 átomos de carbono dispostos em sistema tetracíclico). Foi relacionada também ação sobre membranas, com ação hemolítica, hipocolesterolemiantes, antiinflamatória e antiviral (SIMÕES, 2002).

Os alcalóides, de maneira geral, contém um átomo de nitrogênio em anel heterocíclico, quimicamente com caráter alcalino e são formados a partir de aminoácidos. O uso de extratos vegetais contendo alcalóides como medicamento e como veneno pode ser traçado desde os primórdios da civilização. Muitos alcalóides foram descritos inclusive com detalhamento de seu uso induzido na terapêutica a exemplo os alcalóides antitumorais isolados de *Catharanthus roseus* (SIMÕES, 2002).

É possível proceder a análise dos constituintes ativos (metabólitos secundários) mediante testes de reações de caracterização química. Deste modo é confirmada a presença e quantificados os grupos de substâncias tais como alcalóides, flavonóides, taninos, antraquinonas, heterosídeos. São analisados os caracteres individuais de produção (inibição dos constituintes químicos) e reações químicas como Mayer na detecção de compostos como alcalóides ou de Liebermann-Bouchard na detecção de esteróides cardiotônicos, dentre outras. Pode-se também proceder à detecção dos constituintes ativos nas amostras em análise por cromatografia de camada delgada (CCD), pela comparação dos vegetais-testes com padrões de identidade e constituição conhecidos (COSTA, 2000).

A CCD consiste em depositar gotas da solução em estudo na extremidade de determinada placa revestida de camada uniforme de dada substância, na maioria dos casos, sílica, e promover o desenvolvimento do cromatograma por algum solvente que percorre a placa no mesmo sentido.

Assim, a substância aderida à superfície atua como adsorvente e o líquido como eluente, portanto o processo se baseia no fenômeno da adsorção (COSTA, 2000). Na CCD, a fase estacionária é a camada fina formada por algum sólido granulado (sílica, alumina, poliamida, etc.), depositado sobre a placa de vidro, alumínio ou outro suporte inerte. Pequenas gotas de solução das amostras a serem analisadas são aplicadas em um ponto próximo ao extremo inferior da placa. Deixa-se a placa secar, que em seguida é colocada em recipiente contendo a fase móvel (solvente ou mistura de solventes). A polaridade do solvente deverá ser de acordo com a substância que se deseja separar. Como somente a base da placa fica submersa, o solvente atinge a fase estacionária e sobe por capilaridade. Deixa-se secar a placa após o deslocamento da fase móvel. A revelação da placa é feita com aplicação do reagente que dá cor às substâncias de interesse (COLLINS, 1995). A CCD é utilizada com frequência na análise vegetal em virtude da simplicidade, da rapidez e pelo rigor dos resultados, sendo utilizado na padronização dos fármacos (controle de qualidade) pelas farmacopéias (RODRIGUES DAS DORES, 2004).

3. OBJETIVO

Identificar os constituintes químicos presentes nas folhas de *Porophyllum ruderale*

4. MATERIAL E MÉTODOS

A triagem dos constituintes químicos foi realizada por meio da Cromatografia em Camada Delgada (CCD) (WAGNER et al,1996).

Foram preparados extratos da amostra vegetal em pó, acrescidos de solventes visando à identificação de alcalóides, polifenóis, taninos, antraquinonas, cardiotônicos, saponina, cumarina, antranóides, óleos essenciais e flavonóides.

Na fase estacionária, utilizou-se sílica Merck F₂₅₄; as fases móveis e os reveladores utilizados na identificação dos compostos fármaco-ativos se encontram na tabela 1.

Tabela 1 - Fases móveis e reveladores utilizados na triagem química

<i>Grupo</i>	<i>Fase móvel(v/v)</i>	<i>Reveladores</i>
Polifenóis	hexano/ acetato (112,5:37,5)	$K_3Fe(CN)_6 + FeCl_3$
Antraquinona	hexano/ acetato/ác. acético (75:25:1)	KOH
Cardiotônicos	acetato/metanol/água (100:13,5:10)	NaOH (2M) + ac.3,5 dinitrobenzóico
Saponina	clorofórmio/metanol/água (65:35:5)	vanilina e anisaldeído
Taninos	clorofórmio/ acetato/ água (50:45:5)	$FeCl_3$
Cumarina	clorofórmio/etanol (98,5:1,5)	anisaldeído e KOH
Antranóides	Hexano/acetato (25:75)	KOH
Flavonóides	acetato/metanol (50:50)	$AlCl_3$
Terpenos	diclorometano/acetato (70:30)	anisaldeído e H_2SO_4

4.1 MÉTODO GERAL DE EXTRAÇÃO

As folhas de *Porophyllum ruderale*, desidratadas e trituradas, foram extraídas sucessivamente com os solventes abaixo:

A) 2g da planta em pó foram aquecidas em banho maria (50°C) com 15 mL de hexano (pode ser usado qualquer solvente de baixa polaridade). O solvente foi descartado e o resíduo submetido às extrações seguintes:

A.1) O resíduo obtido em A foi extraído com 10 mL de clorofórmio/ácido acético (99:1), em banho maria (50°C), por 15 minutos. O extrato foi filtrado em filtro de papel, fornecendo a “**solução A**” para a cromatografia em camada delgada e o resíduo para as extrações posteriores. Nestas condições são extraídas substâncias lipofílicas.

A.2) O resíduo obtido em A.1 foi extraído com 15 mL de metanol/clorofórmio/ácido acético (49,5:49,5:1), em banho maria (50°C), por 15 minutos. O extrato foi filtrado fornecendo a “**solução B**” para a cromatografia em camada delgada e o resíduo para a extração seguinte. Neste caso são extraídas substâncias lipofílicas e ligeiramente hidrofílicas.

A.3) O resíduo obtido em A.2 foi extraído com 15 mL de metanol/água (1:1, v/v) em banho maria (50°C), por 15 minutos. O extrato foi filtrado fornecendo a “**solução C**” para a cromatografia em camada delgada. Neste caso são extraídas substâncias hidrofílicas.

4.2 EXTRAÇÃO PARA DETECÇÃO DE ALCALÓIDES:

A planta finamente pulverizada (2g) foi extraída com 15 mL de HCl a 1%, em banho maria (40°C), por 30 minutos, e a suspensão filtrada em papel de filtro. O filtrado foi alcalinizado até pH 8-9 com solução concentrada de hidróxido de amônio e extraído, por duas vezes, com 10 mL de clorofórmio/éter (1:1). Foram obtidas duas fases:

a) Fase orgânica (inferior)

Foi extraída, por duas vezes, com 7,5 mL de HCl a 1% e a fase aquosa ácida separada constituiu a “**solução D**” visando a CCD.

b) Fase aquosa (superior)

Foi neutralizada com ácido acético e constituiu a “**solução E**” visando a CCD

4.3 PROCEDIMENTOS CROMATOGRÁFICOS

As soluções A, B, C, D e E obtidas foram submetidas à CCD utilizando diferentes fases móveis, conforme descrito na tabela 1.

4.4 REVELAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS

Após o desenvolvimento as placas foram secas e aspergidas com reagentes específicos (Tabela 1), sendo posteriormente feita a medida dos R_f's (relação entre a distância percorrida pela substância em análise e o eluente).

5. RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 TESTES POSITIVOS

POLIFENÓIS – TANINOS E FLAVONÓIDES

O teste realizado na detecção de polifenóis foi positivo na amostra de folhas de *Porophyllum ruderale*, sendo evidenciado pela formação de cor azul intenso. Os polifenóis por serem substâncias redutoras se oxidaram com facilidade, resultando em substâncias coradas.

Apesar dos flavonóides serem facilmente reconhecidos como pigmentos de flores em muitas famílias, sua ocorrência não é restrita às flores, mas incluem todas as partes da planta (SALATINO, 2002), como é o caso das folhas de *Porophyllum ruderale*. A rutina, com RF = 0,90, está presente nas soluções A, B e C, juntamente com outro flavonóide de Rf = 0,65, indicativo de quercetina (Figura 1).

Detectou-se flavonóides em folhas e caule de *Arctotis auriculata* e *Felicia erigeroides* e em caule de *Eriosephalus africans* (SALIE et al, 1996), plantas pertencentes à mesma família de *Porophyllum ruderale*. Flavonóides também foram identificados em flores de *Porophyllum lanceolatum*. Portanto, havia expectativa de se detectar flavonóides em *Porophyllum ruderale*.

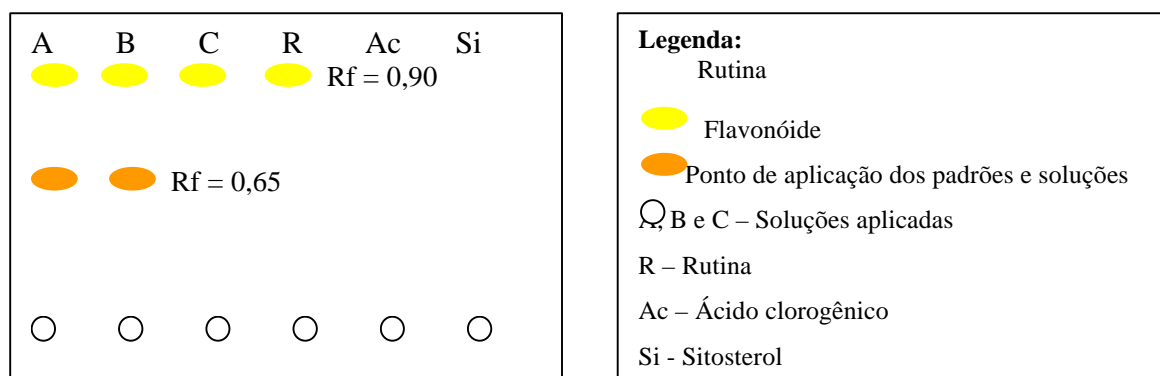


Figura 1 – Perfil cromatográfico em CCD de flavonóides em *Porophyllum ruderale*

Com relação aos taninos, a amostra de folhas *Porophyllum ruderale* reagiram positivamente ao teste de detecção, desenvolvendo coloração azul. Todas as soluções testadas (A, B e C) possuem ácido gálico (RF=0,78) e padrão de taninos (0,55) (Figura 2).

As principais fontes de taninos condensados são cascas (*Acacia mimosa* e *Schinopsis lorenzetti*) e de taninos hidrolisáveis são lenhos (*Terminalia chebula*) (RIBEREAU-GAYON, 1972). No entanto, pode-se encontrar este metabólito secundário em outras partes da planta, como é o caso das folhas de *Porophyllum ruderale* (Asteraceae). Testes realizados com outras espécies da mesma família apresentaram resultado positivo para taninos (SALIE et al, 1996).

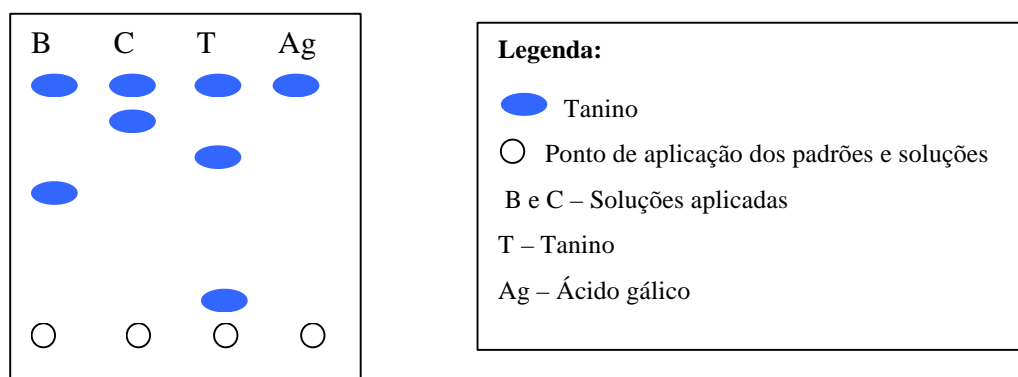


Figura 2 – Perfil cromatográfico em CCD de taninos em *Porophyllum ruderale*

ESTERÓIDES E TERPENOS

Devido à coloração verde-azulada, característica de revelação com anisaldeído, as bandas superiores das soluções A e B indicam compostos de origem terpênica com RF = 0,50. As bandas intermediárias com RF = 0,78, semelhante à banda presente no padrão de terpinol (Tp), indica ser o mesmo composto (Figura 3).

5.2 TESTES NEGATIVOS

ANTRAQUINONAS

No teste, a coloração vermelha é indicativa da presença de antraquinonas. Apesar de não ter sido detectada a presença de quinonas, *Porophyllum ruderale* apresentou atividade antifúngica contra *Trichophyton metagrophytes* e *T. rubrum*, como descrito no capítulo 2. Em *Senna alata*, a presença de quinonas confere à planta o efeito antimicótico (SARDINÃ et al, 1995, citado por PÉREZ &HERNANDÉZ, 2002). Algumas espécies pertencentes à mesma família de *Porophyllum ruderale* também apresentaram resultado negativo no teste de detecção de antraquinonas (TONA et al, 1998).

HETEROSÍDEOS CARDIOTÔNICOS

A coloração castanha-avermelhada não foi desenvolvida na amostra analisada. A cor característica decorre da presença de cardenolídeos que apresentam γ -lactona, detectado pela utilização de derivado aromático nitrado em meio alcalino (NaOH). Todos os órgãos da planta podem conter heterosídeos cardioativos (SIMÕES, 2002).

SAPONINAS

Na revelação em cromatografia, as manchas azuis ou azul-violeta e, algumas vezes, zonas amareladas são reveladoras das saponinas, porém, na amostra analisada não foram observadas. O resultado confirma o relatado por SIMÕES et al (2002): as saponinas triterpênicas encontram-se predominantemente nas famílias Sapindaceae, Hippocastanaceae, Sapotaceae, Polygalaceae, Caryophyllaceae, Primulaceae e Araliaceae; pois a espécie em estudo pertence à família Asteraceae. No entanto, saponinas estavam presentes nas folhas de *Helichrysum crispum* e de *Felicia erigeroides* (SALIE et al, 1996), as quais pertencem à família Asteraceae.

ALCALÓIDES

Apesar dos alcalóides ocorrerem em várias partes da planta, dentre elas as folhas (SALATINO, 2002), as manchas marrons ou alaranjadas características da presença de alcalóides não se desenvolveram na amostra analisada. Não parece ser comum a presença deste metabólito secundário em folhas de espécies da família Asteraceae, com exceção da tribo Senecioneae caracterizada por possuir alcalóides pirrolidizínicos. Dentre as espécies de Asteraceae analisadas por Salie et al (1996), foram detectados alcalóides apenas em folhas de *Arctotis auriculata* e, de 11 espécies analisadas quimicamente por Coe & Anderson (1996), apenas 3 foram positivas.

6. CONCLUSÃO

Verificou-se, na amostra de folhas de *Porophyllum ruderale* analisada, a presença dos seguintes metabólitos secundários: polifenóis (taninos e flavonóides), cumarinas, esteróides e terpenos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AVERY, M.A., CHONG, W.K.M., JENNINGS-WHITE, C. Stereoselective total synthesis of (+)-artemisin, the antimalarial constituent of *Artemisia annua* L. **J. Am. Chem. Soc.**, v.114, p.974, 1992.
- COE, F.G., ANDERSON, G.J. Screening of medicinal plants used by the Garífuna of Eastern Nicaragua for bioactive compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v.53, n.1, p.29-50, 1996. *Porophyllum ruderale*
- COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S **Introdução a métodos cromatográficos**.6 ed. Campinas: Editora UNICAMP, 1995.
- COSTA, A.F., PROENÇA DA CUNHA, A. **Farmacognosia – Farmacognosia experimental**. 3 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2000. v.3.
- HASLAM, E. **Plant polyphenols**. Cambridge: Cambridge University, 1989.
- JUAREZ, B.E., MEDIONDO, M.E., SEELIGMANN, P. Los flavonoides florales de *Porophyllum lanceolatum* DC (Compositae). **Lilloa**, v.37, n.2, p.75-77, 1990.
- LOPES, R.C. **Caracterização isozimática, divergência genética e produção de óleo essencial em acessos de *Polygonum punctatum* Ell.** Viçosa – MG: UFV, 1997. 91p. Dissertação (Mestrado em genética e melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- MARTINS, E.R., CASTRO, D.M., CASTELLANI, D.C., DIAS. J.E. **Plantas medicinais**. Viçosa, MG: UFV, Imprensa Universitária, 1996. 220p.
- MANN, J. **Secondary metabolism**. 2.ed. Oxford: Clarendon, 1987. 374p.
- MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Edições UFC, 1988.
- OLIVEIRA, J.R. de. **Idade da folha e suscetibilidade do cafeeiro a *Pseudomonas cichorii* e a *P. syringae* pv *garcae*.** Viçosa, MG: UFV, 1988. 79p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, 1988.
- RIBEREAU-GAYON, P. **Plant phenolics**. Oliver & Boyd, Edinburg. 1972.
- RODRIGUES DAS DÔRES, R.G. **Qualidade da preparação fitoterápica da carqueja (*Baccharis genistelloides* (Lam.) Pers.) em cápsula.** Viçosa, MG: UFV, 2004. 219 p. Tese (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 2004.
- SALATINO, A. **Plantas medicinais e tóxicas**. Universidade de São Paulo – SP. 87p. 2002.

SALIE, F., EAGLES, P.F.K., LENG, H.M.J. Preliminary antimicrobial screening of four South African Asteraceae species. **Journal of Ethnopharmacology**, v.52, p.27-33, 1996.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico de origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P. GOSMAN, G., MELLO, J.C.P., MENTS, L.A., PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre, Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS Ed. UFSC, 1999. 821p.

SARDINÃ, C.R., GARCIA, T.M., ÁLVAREZ, V. Uso de la guacamaya francesa en el tratamiento de micosis superficiales dermatológicas. **Revista Cubana Plant Méd.** v.7, n.3, p.129-130, 2002.

TONA, L., KAMBU, K. et al. Antiamoebic and phytochemical screening of some congolese medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.61, n.1, p.57-65, 1998.

TAIZ, L., ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 2.ed. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, 1998. 792p.

SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P. GOSMAN, G., MELLO, J.C.P., MENTS, L.A., PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre, Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS Ed. UFSC, 2002. 833p.

SWAIN, T. 1979. Phenolics in the environment. p.624-637. In: T-Swain, J.B. Harbone and C.F. Van Sumere (ed.). **Recent Advances in Phytochemistry**. v.12. Plenum Press, N.Y.

APÊNDICE

Capítulo 2

Tabela 1 – Resumo da análise de variância da variável diâmetro da colônia (cm) em função das diluições (0, 1, 2, 3 mg/mL) do extrato de couve-cravinho (*Porophyllum ruderale*) (T) da espécie de dermatófitos (E1 = *Trichophyton mentagrophytes* e E2 = *Trichophyton rubrum*) e do tempo (H)

FV	GL	SQ	QM	F
T	3	20,65	6,88	13,24**
E	1	46,21	46,21	88,90**
T x E	3	6,71	2,23	4,30*
Resíduo (a)	32	16,63	0,51	
H	10	639,84	63,98	141,88**
H x T	30	16,35	0,54	1,21
H x E	10	42,13	4,21	9,34**
H x E x T	30	15,75	0,52	1,16
Resíduo (b)	320	144,31	0,45	
Total	439	948,59		
CV (%) parcela			46,81	
CV (%) subparcela			28,3%	

* Significativo à 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

Tabela 3 - Resumo da análise de variância da variável diâmetro da colônia de *Trichophyton rubrum* (cm) em função das diluições (0, 2, 4, 6, 8 e 10 mg/mL) do extrato de couve-cravinho (*Porophyllum ruderale*) (T) e do tempo (H)

FV	GL	SQ	QM	F
BLOCO	2	0,035	0,0175	0,84
T	5	6,91	1,3816	66,06**
Resíduo (a)	10	0,209	0,0209	
H	7	23,290	3,3271	613,11**
H x T	35	4,399	0,1256	23,16**
Resíduo (b)	84	0,456	0,0054	
Total	143	35,30		
CV(%) parcela			11,68	
CV (%) subparcela			5,95	

** Significativo à 1% de probabilidade pelo teste de Tukey

Capítulo 3

Tabela 5 – Resumo da análise de variância em função da aplicação de cinco preparados homeopáticos (*Calcarea carbonica*, *Kalium phosphoricum*, *Magnesia carbonica*, *Natrum muriaticum* e *Silicea*)

F.V.	G.L.	SQ	QM	F
BLOCO	2	0,0141	0,007	0,20
HOMEOPATIA	4	3,2893	0,8223	23,53**
RESÍDUO (a)	8	0,2795	0,0349	
HORA	7	21,4448	3,0635	138,4**
HORA x HOMEOPATIA	28	7,0463	0,2516	
RESÍDUO (b)	70	1,5494	0,221	11,37**
CV (%) parcela			15,96	
CV (%) subparcela			12,71	

** F significativo a 1% de probabilidade

Capítulo 4

1 – Modo de preparo dos reagentes utilizados na análise do rendimento de tanino em *Porophyllum rurerale*:

- a) Folin-Denis: foram adicionados em 75 ml de água, 10g de tungstato de sódio, 2g de ácido fosfomolibídico e 5 ml de ácido fosfórico. A mistura foi refluxada por duas horas, e, após resfriamento à temperatura ambiente, completou-se o volume para 100 ml;
- b) Solução saturada de carbonato de sódio: adicionaram-se 35 g de Na_2CO_3 anidro em 100 ml de água destilada, dissolvido a 70-80°C. Deixou-se resfriar por toda a noite e, então, a solução saturada com cristais de $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ foi filtrada;
- c) Solução padrão de ácido tânico: foram dissolvidos 25 mg de ácido tânico em 250 ml de água destilada. Em cada determinação da curva-padrão preparou-se solução-padrão de ácido tânico fresca.

2 – Extração de tanino

- a) Na extração de tanino tomou-se 100 mg da planta desidratada e triturada, submetendo a três extrações consecutivas com metanol (3 ml) a quente (aproximadamente a 62°C), sendo cada extração com duração de 10 minutos. Os extratos resultantes foram pipetados e filtrados em algodão, no balão volumétrico, e o volume foi completado para 10 ml com metanol.
- b) Preparo da curva-padrão: No preparo da curva-padrão, foram adicionados em tubos de ensaio: solução padrão de ácido tânico (0; 0,2; 0,4; 1,6; 0,8 e 1,0 ml), 7,5 ml de água destilada, 0,5 ml do reagente Folin-Denis e 1,0 ml de solução saturada de Na_2CO_3 , diluindo-se a 10 ml com água. Misturou-se bem e foi determinada a absorvância, depois de 30 minutos, em 760 nm, obtendo-se a curva-padrão com a absorvância em função de mg de ácido tânico/ 100ml. A concentração da solução de ácido tânico e o modo de preparo dos reagentes encontram-se no apêndice.

c) **Leitura em espectrofotômetro:** As leituras das amostras foram feitas em espectrofotômetro de duplo feixe Hitachi U – 2000. Na preparação da amostra destinada à leitura de absorvância, pipetou-se 0,1 ml do extrato em tubo de ensaio, ao qual foram adicionados 7,5 ml de água destilada, 0,5 ml do reagente Folin-Denis e 1 ml de solução saturada de carbonato de sódio, sendo completado o volume de 10 ml com água destilada. Após adição dos reagentes, esperou-se 30 minutos para leitura de absorvância em 760 nm. Determinada, de acordo com a curva-padrão, a concentração das amostras em mg de ácido tânico/100ml, estas foram convertidas em porcentagem de tanino por 100 mg de amostra de planta desidratada.

Tabela 1 – Resumo da análise de variância da variável CM (centímetros) em função das diluições (0, 1, 2, 3 mg/mL) do extrato de couve-cravinho (TRAT) da espécie de dermatófitos (ESP) e do tempo (HORA)

FV	GL	SQ	QM	F
Trat	3	20,65	6,88	13,24*
Esp	1	46,21	46,21	88,90*
Trat x esp	3	6,70	2,23	4,30*
Resíduo (a)	32	16,63	0,52	
Hora	10	639,83	63,98	141,88*
Hora x trat	30	16,35	0,54	1,21
Hora x esp	10	42,13	4,21	9,34*
Hora x esp x trat	30	15,74	0,52	1,16
Resíduo (b)	320	144,31	0,45	
Total	439	948,59		
CV (%)	28,3			

Tabela 2 - Resumo da análise de variância da variável CM (centímetros) em função das diluições (0, 2, 4, 6, 8 e 10 mg/mL) do extrato de couve-cravinho (TRAT) e do tempo (HORA)

FV	GL	SQ	QM	F
Trat	5	6,91	1,38	66,06*
Bloco	2	0,035	0,017	0,84
Resíduo (a)	10	0,21	0,021	
Hora	7	23,29	3,33	613,11*
Hora x trat	35	4,40	0,12	23,16*
Resíduo (b)	84	0,45	0,0054	
Total	143	35,30		
CV (%)	5,95			

Quadro 1 – Composição da solução extratora de enzimas de *Porophyllum ruderale*

Fosfato de sódio bibásico (0,034 M)	0,60 g
Sacarose (0,2 M)	7,00 g
PVP (10%)	10,00 g
DTT (Ditiotreitol) (3mM)	50,00 mg
L-ácido ascórbico (5,7 mM)	100,00 mg
DIECA (Dietilditiocarbamato de sódio) (5,8mM)	100,00 mg
Bissulfito de sódio (2,6 mM)	50,00 mg
Borato de sódio (2,5mM)	50,00 mg
2-mercaptoetanol (0,2%)	0,20 mL
Polietilenoglicol-6.000 (1%)	1,00 g
Água deionizada (ou destilada)	100,00 mL

Fonte: ALFENAS *et al* (1991), modificado

Durante a trituração adiciona-se aproximadamente 30 mg de PVPP (polivinilpirrolidona) com a finalidade de remover compostos fenólicos e aumentar a estabilidade das enzimas.

Quadro 2- Protocolo da detecção de atividade da enzima chiquimato desidrogenase (SKDH)

Ácido chiquímico	10,00 mg
NADP ⁺	2,00 mL (20 mg)
MTT ou NBT	2,00 mL (20 mg)
PMS (Fenazina metosulfato)	2,00 mL (20 mg)
Tris – HCl 0,1 M, pH 8,5	10,00 mL

SOLTIS *et al* (1983)

Quadro 3 – Protocolo da detecção de atividade da enzima isocitrato desidrogenase (IDH)

DL – Ácido isocítrico	200,00 mg
NADP ⁺ , Na ₂	2,00 mL (20 mg)
MTT ou NBT	2,00 mL (20 mg)
PMS	2,00 mL (20 mg)
MgCl ₂ (1%)	2,00 mL (20 mg)
Tris – HCl (0,1 M), pH 8,0	100,00 mL

SHAW e PRASAD (1970), modificado. Incubar no escuro à 37° C até o aparecimento das bandas

Quadro 4– Protocolo da detecção de atividade da enzima malato desidrogenase (MDH)

NAP ⁺	100,00 mg
MTT	15,00 mg
PMS	1,00 mg
Na-L-malato (0,1 M), pH 7,0	5,00 mL
NaCl (0,1 M)	2,50 mL
Tampão tris-HCl (0,5 M), pH 7,1	7,5 mL
Água destilada	35,00 mL

SHAW e PRASAD (1970), modificado. Incubar no escuro à 37° C até o aparecimento das bandas