

CAPÍTULO 4
DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM
***Dimorphandra mollis* Benth.**

“A teoria é o que decide o que podemos observar.”

EISTEIN

1. INTRODUÇÃO

Compostos fenólicos pertencem à classe de compostos que inclui diversidade de estruturas simples e complexas, com pelo menos um anel aromático no qual, ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (SIMÕES *et al*, 1999) (figura 1).

Figura 1: Estrutura benzênica (fenólica) C₆ com grupamento hidroxila (OH)

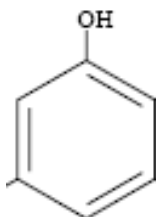
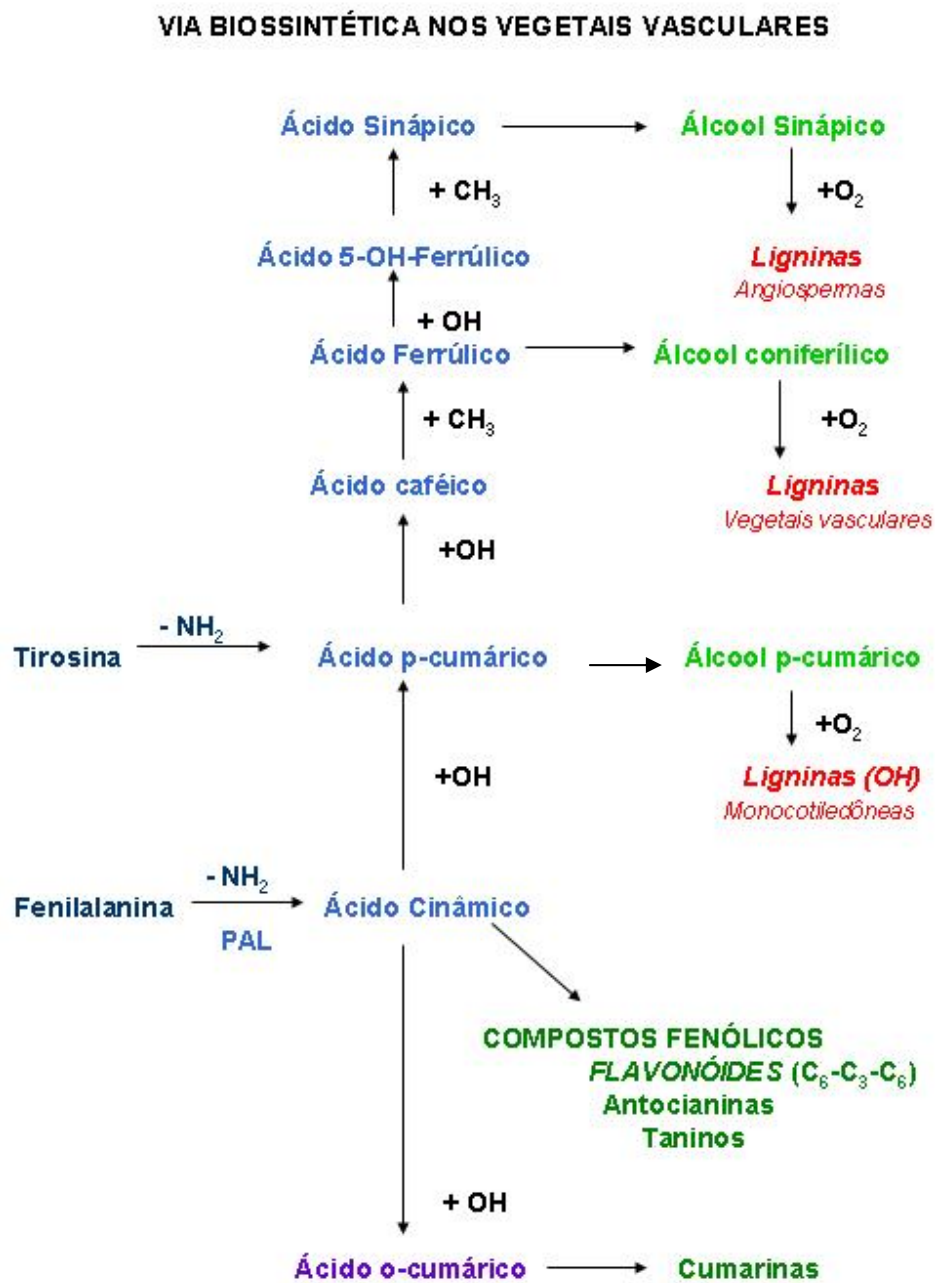


Figura 2: Rota biossintética resumida nos vegetais superiores dos compostos fenólicos, adaptado de CARRAPIÇO (1998).



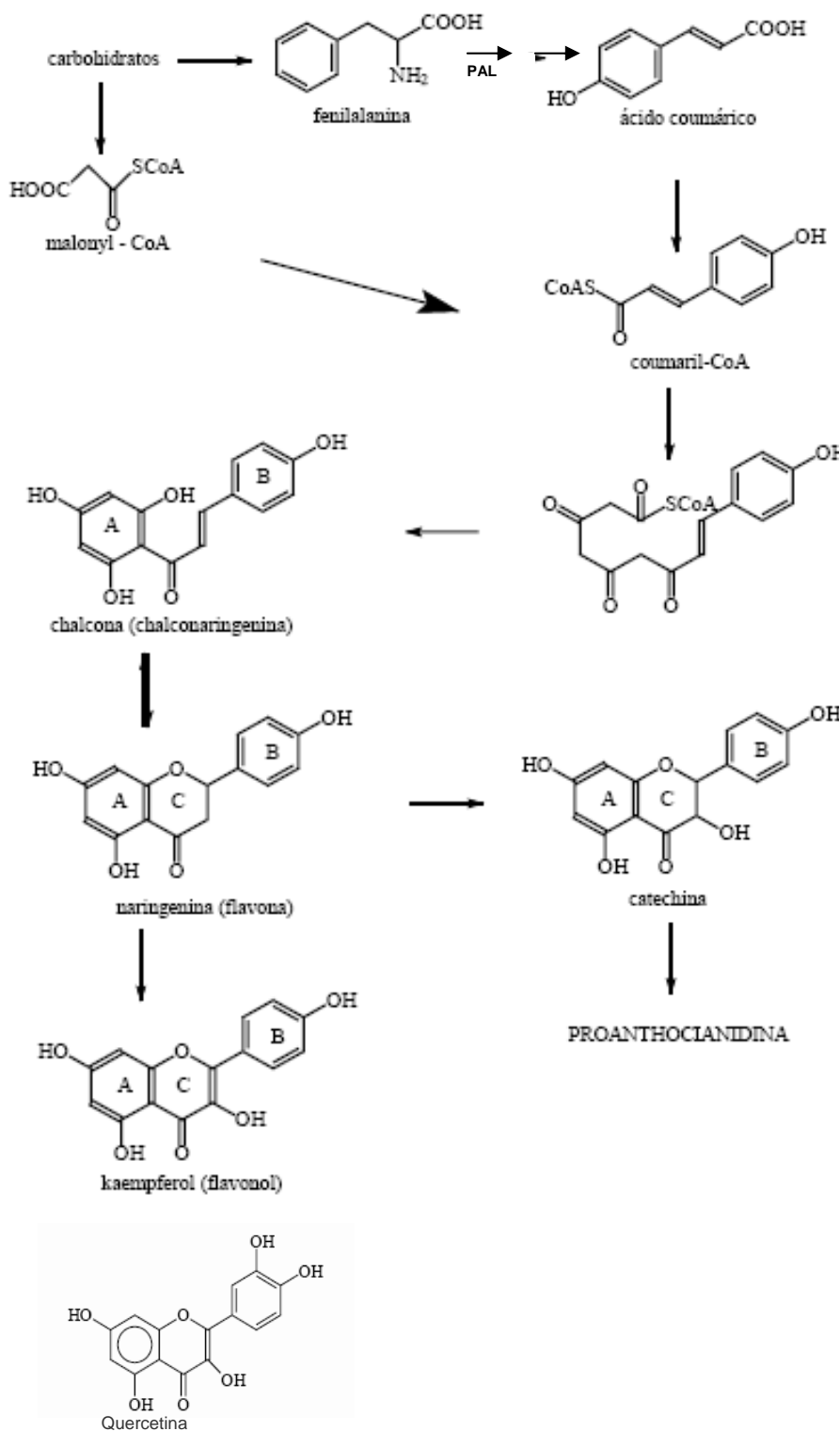


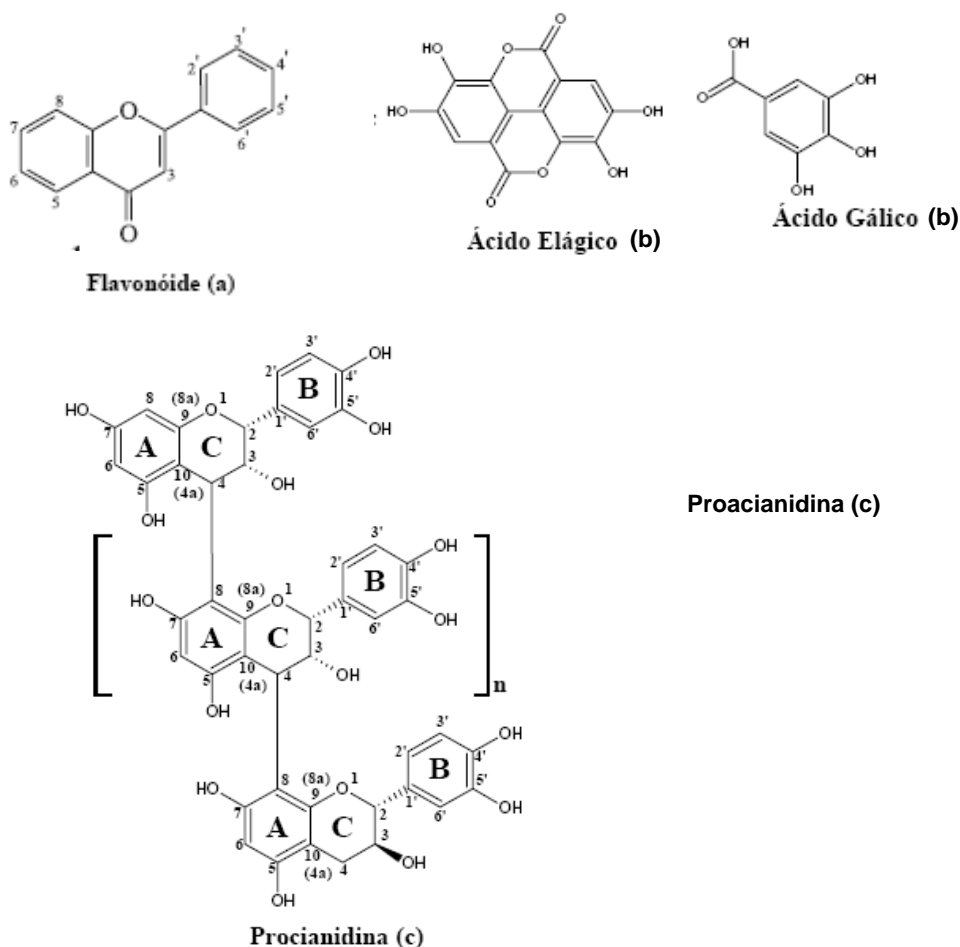
Figura 2: A fenilalanina é transformada pela PAL (phenylalanine ammonia lyase) em ácido cinâmico que sofre hidroxilação formando o cumárico que se une a três moléculas de malonato, ativados por acetil coenzima A (Acetil-CoA), formando respectivamente coumaril-CoA e malonil-CoA, que se condensam em estrutura ativada que servirá de substrato a ação da enzima chalcona sintase, originando os flavonóis como kampeferol e quercetina.

1.2. Classificação, distribuição e propriedades dos compostos fenólicos

a. Classificação

São classificados de acordo com o tipo de esqueleto principal (C6), que constituirá o anel benzênico e com a cadeia substituinte (CX) (figura 1). Assim, por exemplo, os fenóis simples e as benzoquinonas – C6; os flavonóides e isoflavonóides – C6-C3-C6 (figura 3 – a); taninos hidrolisáveis – (C6-C1)_n e taninos condensados – (C6-C3-C6)_n (figura 3 – b e c) (SIMÕES *et al*, 1999).

Figura 3: Estrutura principal de flavonóides (a) e estruturas de taninos hidrolisáveis – ácido elágico, ácido gálico (b) e taninos condensados – procianidina (c).



Fonte: QUEIROZ *et al*, 2002.

Outra classificação está relacionada com a ocorrência no reino vegetal dos compostos fenólicos, assim, são amplamente distribuídos como os derivados de ácidos benzóicos e de ácidos cinâmicos, cumarinas, flavonóides, de polímeros (taninos e ligninas) ou são de distribuição restrita como fenóis simples, antraquinonas, xantonas, naftoquinonas (SIMÕES *et al*, 1999).

b. Distribuição

Compostos fenólicos estão amplamente distribuídos em vegetais e em microorganismos (COSTA & PROENÇA DA CUNHA, 2000).

Dentre os compostos fenólicos pertencentes ao metabolismo secundário dos vegetais encontram-se estruturas como ácidos fenólicos, dos derivados de cumarina, pigmentos hidrossolúveis, ligninas, taninos, e ainda fazem parte de proteínas, alcalóides e terpenóides (PROENÇA DA CUNHA *et al*, 2003).

Os derivados do ácido benzóico são amplamente encontrados nas gimnospermas e angiospermas. O ácido gálico ocorre em plantas lignificadas, as cetonas fenólicas tem distribuição restrita, e os derivados do ácido cinâmico possuem ampla distribuição, podendo ser encontrados como ésteres livres ou heterosídeos (SIMÕES *et al*, 1999).

Os ésteres de ácido caféico são marcadores taxonômicos em Lamiaceae. Os fenóis simples (fenol, pirocatecol, resorsinol e floroglucinol) têm distribuição restrita, exceto a hidroquinona, presente em diversas famílias botânicas. Ainda, são raramente encontrados em bactérias, algas e fungos, mas estão presentes em líquens – depsídeos – com importante valor farmacêutico (SIMÕES *et al*, 1999).

c. Propriedades

Contribuem no sabor, odor e coloração de diversos vegetais sendo muito usados, os compostos fenólicos, como flavorizantes (aldeído cinâmico e vanilina) e corantes na indústria alimentícia, na cosmecêutica (PROENÇA DA CUNHA *et al*, 2003).

Enfatizam-se, também a atividade antioxidante dos derivados fenólicos (*Ilex paraguariensis* – erva mate, *Camellia sinensis* – chá, dentre outros) e a atividade antibacteriana, antiviral e antifúngica dos ésteres do ácido caféico (*Echinaceae purpurea*, *Plantago major*) (SIMÕES *et al*, 1999).

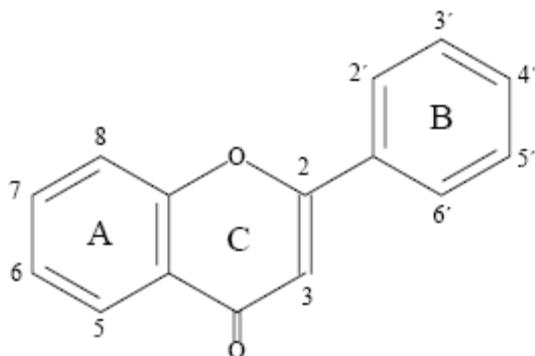
Nos vegetais ressaltam-se na defesa a herbivoria, na inter-relação entre animal-vegetal; na inibição da germinação de sementes, do crescimento de fungos e em alelopatia. HARBORNE (1985) enfatiza a importância marcante dos fenilpropanóides como supressores do apetite de insetos.

1.3. Flavonóides e Taninos

1.3.1. Flavonóides e Flavonóis

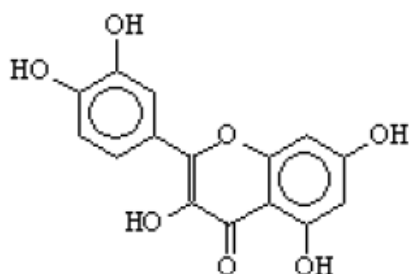
Os flavonóides são compostos fenólicos que possuem 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas (C6-C3-O2-C6) (figura 3a). Nos compostos tricíclicos, as unidades são denominadas núcleos A, B, C e os átomos de carbono recebem numeração com números ordinários nos núcleos A e C, e os mesmos números seguidos de linha (') no núcleo B (figura 3a) (SIMÕES *et al*, 1999).

Figura 3 a – Estrutura e numeração básica de flavonóides

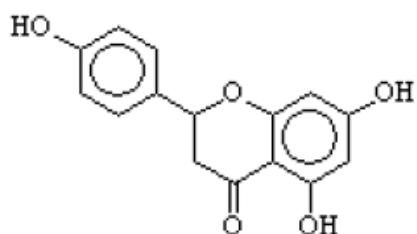


Flavonóides podem ser encontradas na forma aglicosilada, como, por exemplo, a quercitina, naringenina ou ainda miricetina (figuras 4a, 4b e 4c), porém é mais freqüente encontrá-las no reino vegetal na forma glicosilada, unidas a moléculas de açúcares como a ramnose, rutinose (03 moléculas de glicose) (figura 5) ou ainda é possível mistura de glicosídeos, como a rhamno-glicosídeos, formando respectivamente os derivados flavonóides glicosilados (SPANOS & WROLSTAD, 1992).

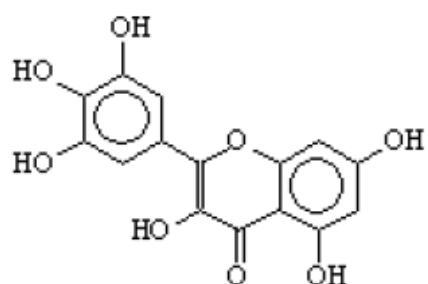
Figura 4: Estruturas químicas de Flavonóides. A. Quercetina, B. Naringerina, C. Miricetina.



a – Quercetina (Flavonol)

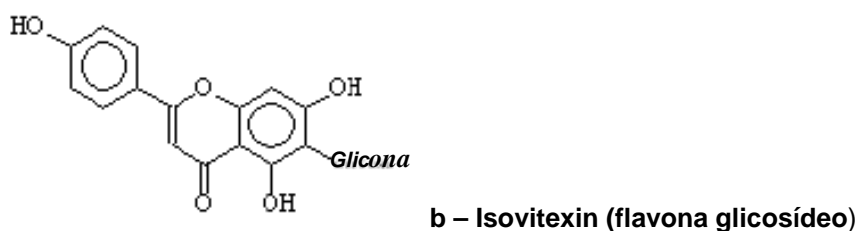
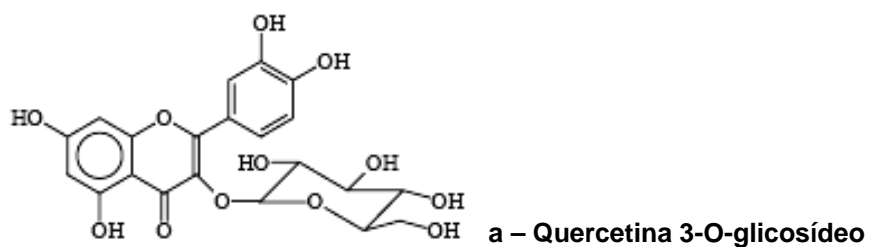


b – Naringerina (Flavanona)



c – Miricetina (Flavonol)

Figura 5: Estrutura química de flavonóides heterosídeos (C e O)



1.3.1.1. Biossíntese de flavonóides

Os flavonóides são biossintetizados a partir da via do acetato e chiquimato. As etapas da biossíntese de flavonóides iniciam-se com o metabolismo de fenilpropanóides. A fenilalanina (figura 6a) passa por desaminação pela enzima phenylalanine ammonia lyase ou fenilalanina amônia liase (PAL) formando ácido cinâmico (figura 6b) (JONES, 1984). As vias subseqüentes envolvem reações de hidroxilação do ácido cinâmico (SEYFERT, 1982) em *p*-Cumaril que origina *p*-Cumarato-CoA que por meio da enzima *p*-Cumarato-CoA ligase forma *p*-Cumaril-SCoA que condensa com três unidades C₂ (Acetil-CoA) por meio da Chalcona sintase produz Chacona que precursora de isoflavanonas; flavononas; flavanonóis; flavonas; flavonóis; catequinas e antocianidinas (figura 7).

Figura 6: Estruturas da fenilalanina (6a) e do ácido cinâmico (6b) e reação de desaminação da PAL

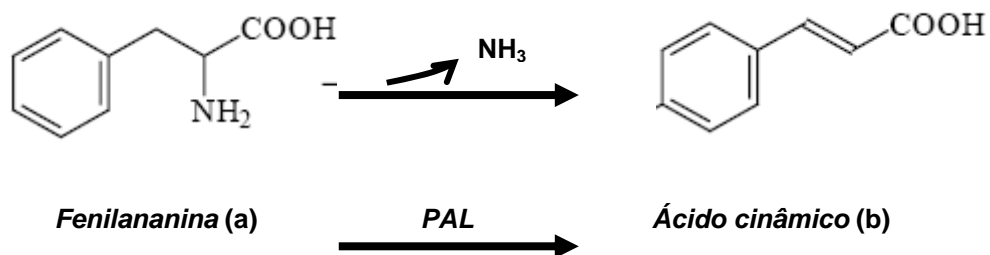
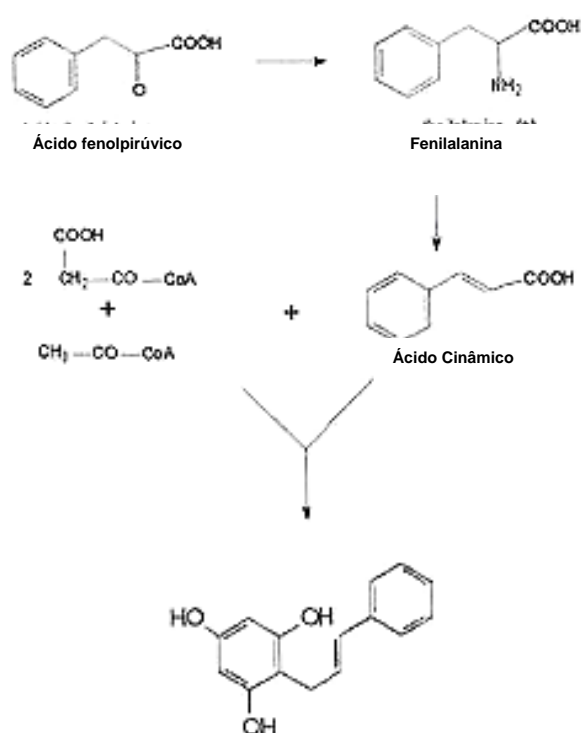
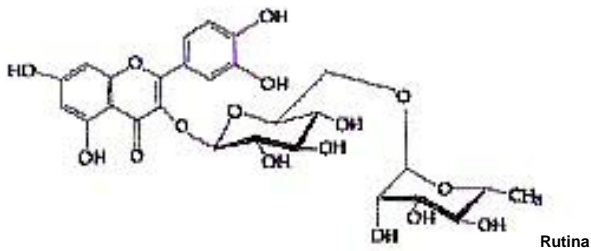
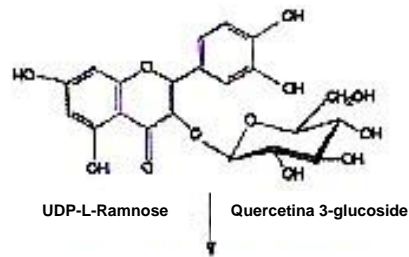
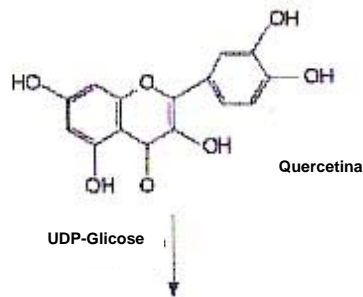
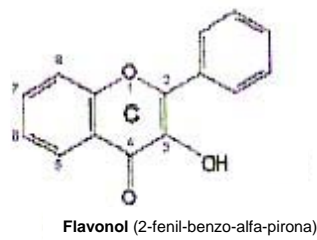


Figura 7. Representação esquemática simplificada da biossíntese de flavonóides (PEDRIALI *et al*, 2005).

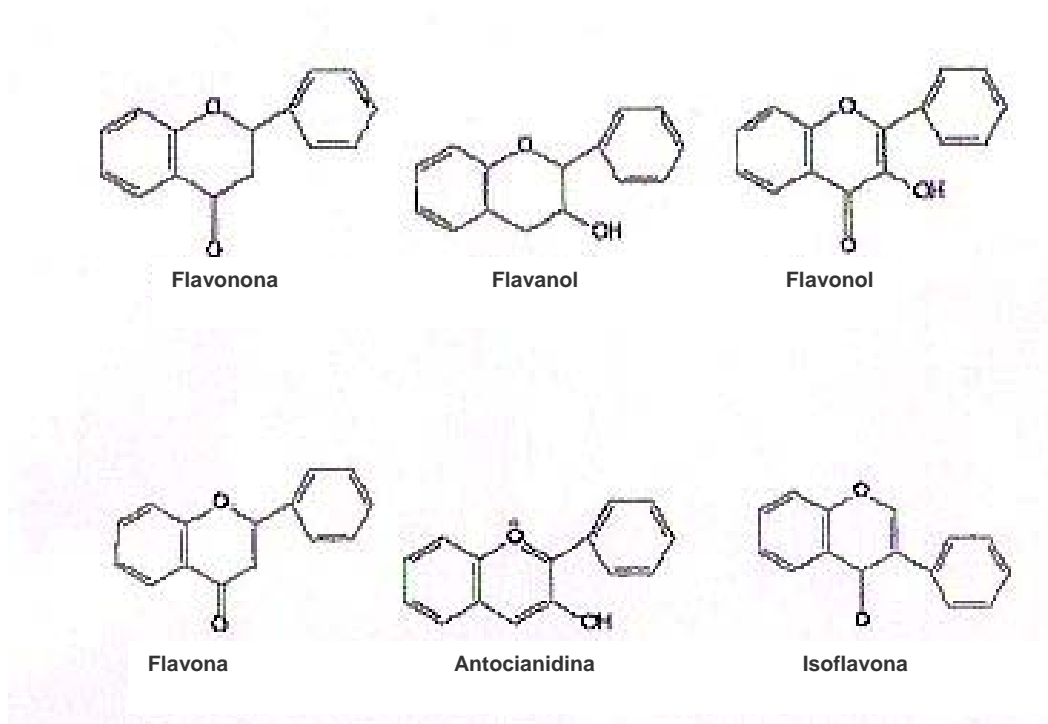




1.3.1.2. Classificação de flavonóides

Flavonóides têm particularidades no que tange aos tipos de ligações, quantidades de grupos hidroxilas, presença ou não de grupos cetonas e são essas características estruturais que determinam a sua classificação (SIMÕES *et al* 1999) (figura 8)

Figura 8: Estruturas químicas dos principais flavonóides



a. Flavonas e Flavonóis e seus heterosídeos (O e C-Heterosídeos)

São compostos que possuem, na posição C3, hidroxila (OH), sendo freqüentemente oxigenados, substituídos com hidroxilas e ou metoxilas ou ainda, acila, C-metila, metileno, pirano, dentre outras. Em flavonas, no núcleo fundamental R=H, e em flavonóis R=OH. A maioria das flavonas e flavonóis identificadas em plantas está sob a forma conjugada, ou seja, ligada a um ou mais açúcares unidos aos grupos hidroxilas por uma ligação hemicetal facilmente destruída por hidrólise ácida.

Suas cores nos vegetais variam do branco ao amarelo, sendo identificados em todo reino vegetal (quadro 5). Em flavonas os compostos mais abundantes são a Apigenina e Luteolina. Em flavonóis são a quercetina, miricetina, canferol (figura4, quadro 1).

Os heterosídeos constituem grupo importante de compostos orgânicos, produzidos, em geral, pelo reino vegetal e que, pela ação dos ácidos, bases ou enzimas, se desdobram numa parte “açúcar” e a outra “não açúcar” (aglicona). Essas partes estão ligadas entre si pelo intermediário do átomo de carbono anomérico do açúcar (SIMÕES *et al*, 1999).

Todos os heterosídeos possuem em comum a característica de, por hidrólise, se desintegrarem em um açúcar e a porção aglicona (genina). São, portanto, carboidratos ligados a não-carboidratos (“aglicona”). A aglicona é que determina, geralmente, a ação do heterosídeo (BRUNETON, 1995).

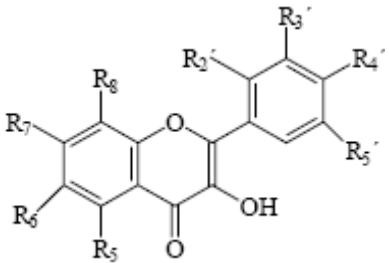
Os heterosídeos mais difundidos na natureza são os O - heterosídeos, nos quais, a parte açúcar é a aglicona, que são normalmente ligadas pela função acetal. Encontram-se, todavia, igualmente N - heterosídeos, S - heterosídeos e C - heterosídeos nos quais, o carbono anomérico do açúcar está unido à aglicona por um átomo de nitrogênio (azoto), ou um átomo de enxofre ou um átomo de carbono (por exemplo, casimiroedine (N - heterosídeo), sinigrina (S - heterosídeo) e aloína (C - heterosídeo). A aglicona está às vezes ligada ao açúcar pela função éster (COSTA, 2000).

Em geral, os heterosídeos são compostos sólidos, incolores e constituem substâncias de reserva dos organismos vegetais ou atuam como estimulantes. A maioria dos heterosídeos tem aplicações terapêuticas. Possuem gosto muito amargo, e são classificados de acordo com a porção genina em: Glicosídeos alcoólicos - genina é álcool; Glicosídeos cianogenéticos - liberam ácido cianídrico quando hidrolisados; Glicosídeos esteróides - genina é esteróide; Glicosídeos antraquinônicos - genina é antraquinona ($C_6H_4(CO)_2 \cdot C_6H_4$) (OLIVEIRA *et al.*, 1991).

Os primeiros heterosídeos isolados eram produtos condensados da glicose, motivo pelo qual foram chamados de glicosídeos; termo depois generalizado aos heterosídeos e hoje, reservado somente àqueles derivados da glicose (EVANS & TREASE, 1996). Reconheceram-se vários compostos da natureza análoga, mas derivados de outras oses designados de galactosídeos, ramnosídeos (TYLER *et al*, 1997). São denominados, de acordo com o número de moléculas de açúcar presente em sua estrutura como oligo-heterosídeos ou poli-heterosídeos.

Nos flavonóis, os heterosídeos, contêm a porção açúcar ligada a porção não-glicídica (genina ou aglicona), que neste caso é pigmento. Entre os flavonóis heterosídeos têm-se 3-rutinosídeo quercetina (rutina) (figura 9) e 7-glicosídeo luteolina.

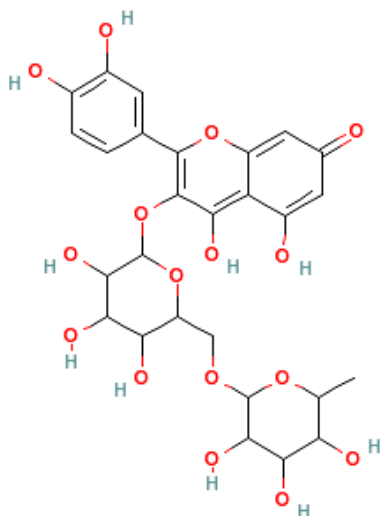
Quadro 1: Estrutura química de flavonas e flavonóis



Nome	R ₅	R ₇	R _{3'}	R _{4'}	
Luteonina	OH	OH	OH	OH	
Apigenina	OH	OH		OH	
Chrysin	OH	OH			
Quercitina	OH	OH	OH	OH	
Myricetina	OH	OH	OH	OH	OH
Kaempferol	OH	OH	OH		
Fisetina		OH	OH	OH	

Fonte: SILVA, S *et al* (2003)

Figura 9: Estrutura química da Rutina (3-rutinosídeo quercetina).



Fonte: PubChem Substance Summary, 2006

b. Di-hidroflavonóides (Flavanonas e Flavanonóis)

As flavanonas são caracterizadas pela ausência da dupla ligação (olefínica) nos carbonos 2 e 3, possibilitando o posicionamento do anel B em posição R ou S (SILVA, S *et al*, 2003). Também é caracterizado pela ausência de hidroxila na posição 3 (quadro 2). As flavanonas são intermediários biossintéticos da maioria das classes de flavonóides. Podem possuir sabor amargo ou doce, devido as configurações esteroquímicas, agindo como defesa a herbivoria e ao mesmo tempo como alimento (SIMÕES *et al*, 1999).

Quadro 2: Estrutura química de Flavanonas:

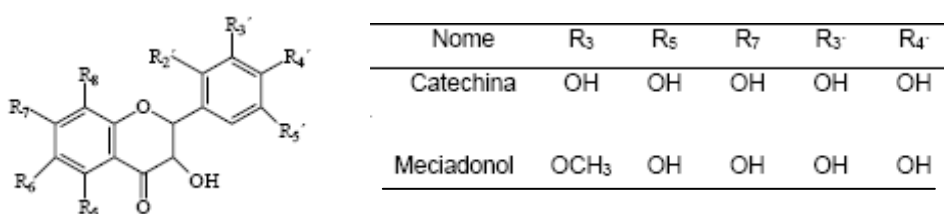
Nome	R ₅	R ₇	R _{3'}	R _{4'}
Hesperetina	OH	OH	OH	OCH ₃
Naringenina	OH	OH		OH

Fonte: SILVA, S *et al* (2003)

c. Flavanas, Leucoantocianidinas e proantocianidinas

Esses compostos fazem parte de uma classe de flavonóides, junto aos biflavonóides e mais recentemente os isoflavonóides, nos quais é possível encontrar estruturas oligomerizadas. Caracterizadas pela ausência de ligação olefínica entre os carbonos 2 e 3, e também da hidroxila na posição 3 (quadros 3 e 5) (SIMÕES *et al*, 1999).

Quadro 3: Estrutura química das flavanas

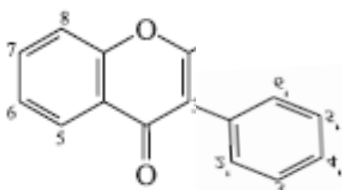


Fonte: SILVA, S *et al* (2003)

Isoflavonóides são caracterizados por uma cadeia arila-C3-arila, mais do tipo difenil-1,2-propano (figura 10– quadro 5). Os substituintes mais comuns são os grupamentos hidroxilas, metoxilas e metilenodioxila. Possuem distribuição taxonômica restrita, ocorrendo em Fabaceae. Biogeneticamente são formados via chaconas. Distribuem-se em isoflavonas, isoflavononas, pterocarpanos, isoflavanas, cumestanos (Costa, 2000).

Nos vegetais comportam-se como fitoalexinas – substância produzida pela planta em resposta a infecção por algum agente patogênico. As propriedades biológicas mais importantes são a atividade estrogênica (isoflavona e cumestanos), antifúngica e antibacterianas (fitoalexinas) e as propriedades inseticidas (rotenóides) (SIMÕES *et al*, 1999).

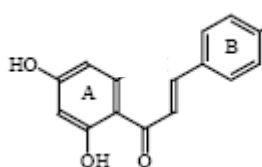
Figura 10: Estrutura química da Isoflavona



d. Chalconas

O termo chalcona é utilizado na caracterização da família de compostos que possui o núcleo fundamental o 1,3-diarilpropano, modificado pela presença de ligação olefínica, de grupamento cetona e ou de grupo hidroxila. Característica marcante desse grupo é possuir pigmentação amarela que passa a vermelha em meio alcalino. As cores têm importante papel em sistemas ecológicos, pois estão implicadas na polinização por insetos e pássaros (quadro 4 e 5).

Quadro 4: Estrutura química da Chalconas



Nome	R2'	R3'	R4'	R3	R4
Mareína	OH	OH	O-glic	OH	OH
Okanina	OH	OH	OH	OH	OH

1.3.1.4 Propriedades Biológicas

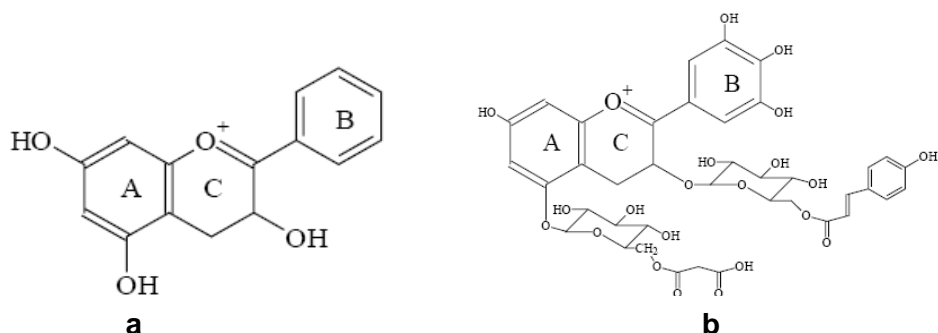
a. Pigmentação vegetal

As antocianinas (figura 11) são utilizadas pelas plantas na formação das cores, sendo o glicosídeo delphinina conhecido como malonilwobanina, responsável pela coloração das flores azuis das angiospermas (*Salvia uliginosa*, Labiatae; *Nymphaea caerulea*, Nymphaeaceae). Essa coloração é formada

quando a delphinina, ou seus derivados, complexa-se com o copigmento do tipo flavona e com metais catiônicos que promovem a emissão de luz característica (quadro 5).

Algumas espécies vegetais têm outro flavonóide, a cianidina, que permite colorações do vermelho até o magenta, como ocorre em plantas como as Rosaceae (GOTTLIEB, 1982; KONDO *et al.*, 1992). Ainda destaca-se a cor vermelha púrpura característica das orquídeas, onde o flavonóide (cianidina, glicosídeo peonidina) associa-se a copigmentos e a metais (FIGUEIREDO *et al.*, 1999; BLOOR;1998).

Figura 11: Antocianinas (a) e Malonilawobanina (delphinina) (b)



Quadro 5: Principais sub-classes de flavonóides e suas colorações

Sub- Classes	Cor	Flavonóides representativos
Antocianidina	Azul, vermelho e violeta	Cianidina
Flavanol	Incolor Amarelo	Catequinas, Epicatequinas Procianidina
Flavonas	Amarelo claro	Apigenina, Luteolina
Flavonol	Amarelo claro	Quercetina, Rutina, Miricetina
Isoflavona	Incolor	Genisteína, Diazeína
Flavanona	Incolor, amarelo	Hesperidina, naringerina

Fonte: ACKER *et al.*, 1996

b. Proteção à radiação UV-B

A radiação ultravioleta B (280-315 nm) é a faixa do espectro solar de menor comprimento de onda e maior energia. Ao incidir nas folhas, a radiação UV-B é absorvida pelos pigmentos complexos formados pelos flavonóides, que, de modo geral, absorvem na mesma região fornecida pelo UV-B, funcionando assim, como filtro e evitando que a radiação atue sobre outras moléculas celulares importantes, como o DNA, modificando-o e levando-o, a formação de células defeituosas (HARBORNE *et al*, 2000). Genótipos mais resistentes aos danos da radiação UV-B promovem aumento nas sínteses de flavonóides e de outros polifenóis, como flavonas e glicosídeos flavonônicos.

Há evidências que plantas submetidas à radiação UV-B artificial promovem mudanças nas rotas sintéticas dos flavonóides, alterando a sua concentração nas células epidérmicas (*Pinus silvestris*, *Oryza sativa*), de folhas cerosas (*Gnaphalium luteo-album*), folhas pilosas (*Quercus ilex*) e talos (*Marchantia polymorpha*) (SILVA, S *et al*, 2003).

c. Proteção antimicrobiana

Os flavonóides são os agentes constitutivos que produzirão as fitoalexinas em resposta a ataques microbianos (GRAYER & HARBORNE, 1994; HARBORNE 1994) atuando como antifúngicos (Luteolina 7-(2'-sulfaglicosídeo), antibacteriano (5,7,2',6'-tetrahydroxi-6-prenil-8-lavanduli-4'-metoxiflavanona) e antiviral (Quercitina-3-(2'-galoilarabinopiranosídeo). Destacam-se os isoflavonóides, flavanas e flavanonas por possuírem hidroxilas fenólicas que inibem o crescimento das micelas, esporos e partículas virais. No entanto PICMAN *et al*. (1995, 1986) afirmam que o aumento do número de substituintes hidroxilas,

metoxilas ou glicosilas provoca a diminuição da atividade do composto; exceto em chalconas hidroxiladas que são mais efetivas, quanto maior o número de hidroxilas, como foi demonstrado por GAFNER *et al.* (1996).

d. Interação Planta-animal

Os polifenóis (flavanas poliméricas, proantocianidinas, flavonas, flavonóis e isoflavonas) de baixo peso molecular têm função de destaque na proteção vegetal contra herbívora (insetos e animais) (HARBORNE, 1995 e 1999).

Três glicoflavonas a schaftosideo, isoschaftosideo e a neoschaftosideo, foram isoladas de plantas de arroz e testadas como inibidores da ação de insetos como o *Niloparvatta lugens*, tendo resultado na inibição da atividade de ingestão da seiva (GRAYER *et al.*, 1994). Em arroz, também, foi identificado que a flavanona sacuranetina e o ácido clorogênico têm suas concentrações foliares aumentadas em respostas à infecção do nematóide *Ditylenchus angustus* (PLOWRIGHT *et al.*, 1996). A sacuranetina, ainda, aumenta no excesso de radiação UV e de fungos, sendo de vital importância na proteção das plantas de arroz (DILLON *et al.*, 1997).

Alguns gêneros de insetos como *Helicoverpa*, *Heliothis*, *Lymantria* e *Trichoplusia*, são pouco tolerantes a flavonóides glicosilados, principalmente no segundo estágio larval. BENINGER & ABOU-ZAID (1997) verificaram que extratos purificados de *Pinnus banksiana* que continham flavonóis glicosilados (rutina; quercitina 3-glicosídeo), quando administrados na dieta de larvas promoviam aumento da mortalidade e diminuição do crescimento.

Espécies de borboletas como a *Danaus plexippus* são dependentes da presença de flavonóides glicosilados encontrados em *Asclepias curassavica* (Asclepiadaceae) na indução da ovoposição. O estímulo ovopositor é devido aos

glicosídeos flavônicos derivados da quercitina 3-galactosídeo (3-dirhamnosil galactosídeo; 3-rutinosídeo; 3-rhamnosil galactosídeo) (HARIBAL & RENWICK, 1996 e 1998).

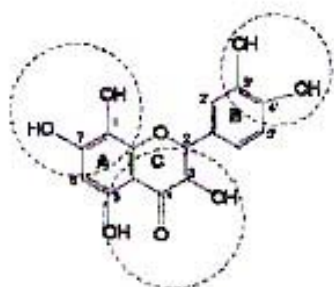
Ainda, na defesa contra a herbivoria, as procianidinas, podem se condensar, em muitas formas, originando taninos (STEVENS *et al.*, 1998). Segundo LAWLER *et al* (1998) plantas como os *Eucalyptus ovata* e o *Eucalyptus viminalis*, que servem de alimentos de ursos Koalas, mostraram a presença de polifenóis floroglucinol, macrocarpol G e jensenona, que estão relacionados as procianidinas geradoras de taninos. Dietas artificiais com concentrações de cerca de 2% de macropol G reduzem o consumo alimentar em cerca de 90%, indicando o caráter protetor dessa substância à herbivoria.

e. Propriedades farmacológicas

Hoje, conhece-se cerca de 4.200 flavonóides que desempenham os mais diversificados funções biológicas no organismo humano (PEDRIALI *et al*, 2005).

Flavonóides possuem a capacidade inibir a xantina oxidase, enzima responsável pela oxidação de tecidos, sendo, portanto, capazes de inibir a formação de radicais livres e o “combater” o envelhecimento precoce. A capacidade de remoção de radicais livres dos flavonóides pode prevenir processos de estresse oxidativo, que causam morte celular como a degeneração de neurônios e membranas celulares (Mal de Parkinson e Alzheimer) (SMITH *et al*, 1987; GIASSON *et al.*, 2002; LIN *et al*, 2002) e de câncer devido aos danos provocados pelos radicais às moléculas de DNA (HALLIWELL, 1999) (figura 12).

Figura 12: Regiões estruturais dos flavonóides com alta atividade de seqüestro de radicais livres (PEDRIALI *et al*, 2005)



Além disso, os radicais livres atuam como pró-oxidantes sobre as lipoproteínas de baixa densidade (LDL), possibilitando a deposição e formação de placas arterioscleróticas no endotélio, facilitada pela aderência dos macrófagos (DE VRIES *et al.*, 1998). Foi demonstrado que certos flavonóides têm a capacidade de impedir que o LDL tenha modificação oxidativa, fornecendo assim proteção contra riscos arteriosclerótico (WHALLEY *et al.*, 1990; MANGIAPANE *et al.*, 1992; RANKIN *et al.*, 1993).

Ainda também foram relatados diversos efeitos biológicos importantes como antitumoral, antiulcerogênica, anti-hemorragicas, tratamento de doenças circulatórias, hipertensão e cofator da vitamina C, atividade estrogênica, atividade antiinflamatória e muitas outras (MANTLE *et al*, 1999; DI CARLO *et al*, 1999; HARBORNE & WILLIAMS, 2000; RAJ NARAYANA *et al*, 2001; SIMÕES *et al*, 1999).

1.3.2. Taninos

Taninos são compostos fenólicos de grande interesse econômico e ecológico estando presentes na maioria das plantas e podendo variar de concentração nos tecidos vegetais, dependendo da idade e do crescimento da planta, da parte coletada, da época ou, ainda, do local de coleta (TEIXEIRA *et al*, 1990; SIMON *et al*, 1999; LARCHER, 2000).

A palavra tanino é largamente usada, particularmente em bibliografia botânica, originalmente derivada do termo “tanante”, implicando que a matéria-prima vegetal curta couro a partir de peles (HASLAN, 1965; 1988).

A maioria dos compostos fenólicos não é encontrada no estado livre na natureza, mas na forma de ésteres ou de heterosídeos sendo, portanto, solúveis em água e em solventes orgânicos polares. Têm peso molecular compreendido entre 500 e 3000 Daltons, possuindo a habilidade de formar complexos insolúveis em água com proteínas, gelatinas e alcalóides (MELLO *et al*, 2001). Ainda são responsáveis pela adstringência de muitos frutos e produtos vegetais, devido à precipitação de glucoproteínas salivares, o que ocasiona a perda do poder lubrificante (BRUNETON, 1995).

A ligação entre taninos e proteínas ocorre, provavelmente, através de pontes de hidrogênio entre os grupos fenólicos dos taninos e determinados sítios das proteínas. Na formação dessas ligações é necessário que o peso molecular dos taninos esteja compreendido entre limites bem definidos; se este é demasiadamente elevado, a molécula não pode se intercalar entre os espaços interfibrilares das proteínas ou macromoléculas; se é muito baixo, a molécula fenólica se intercala, mas não forma número suficiente de ligações que assegure a estabilidade da combinação (BRUNETON, 1995).

Por serem fenólicos, os taninos são muito reativos quimicamente, formam pontes de hidrogênio, intra e intermoleculares. Um mol de taninos pode ligar-se a doze moles de proteínas; e com base nessa propriedade pode-se identificar taninos por teste de precipitação de gelatinas (MELLO *et al*, 2001). Estes compostos são facilmente oxidáveis, tanto pelas enzimas vegetais específicas quanto por influência de metais, como cloreto férrico, o que ocasiona o escurecimento de suas soluções (SIMÕES *et al*, 1999).

No Brasil, várias espécies são pesquisadas por suas propriedades tanantes; entre as principais estão *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville, *Dimorphandra mollis* Benth., *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenam, *Acacia mearnsii* De Wild, *Psidium guajava* L. e *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All. (TEIXEIRA *et al.*, 1990; BRANDÃO, 1992; RODRIGUES *et al.*, 1992; MAGALHÃES *et al.*, 1997; CALDEIRA *et al.*, 1998; SANTOS *et al.*, 2002, MELLO *et al*, 2001).

1.3.2.1. Classificação dos taninos

Classicamente, segundo a estrutura química, os taninos são classificados em dois grupos: hidrolisáveis e condensados (figuras 3b e 3c).

Os taninos hidrolisáveis consistem de ésteres de ácidos gálicos e ácidos elágicos (hexahidroxidifênicos) glicosilados (figura 3b), formados a partir do chiquimato (HELDT, 1997), onde os grupos hidroxila do açúcar são esterificados com os ácidos fenólicos (VICKERY & VICKERY, 1981).

Os taninos elágicos são muito mais freqüentes que os gálicos, e é provável que o sistema bifenílico do ácido hexaidroxidifenílico seja resultante da ligação oxidativa entre dois ácidos gálicos (BRUNETON, 1995).

Amplamente encontrados no reino vegetal, os taninos condensados ou proantocianidinas são polímeros de flavan-3-ol e/ ou flavan-3,4-diol, produtos do metabolismo do fenilpropanol (HELDT, 1997; HEIL *et al*, 2002).

As proantocianidinas, assim denominadas provavelmente pelo fato de possuírem pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas, como cianidina e delphinidina (figuras 10a e 10b) e têm rica diversidade estrutural, resultante de padrões de substituições entre unidades flavânicas, diversidade de posições entre suas ligações e a estereoquímica de seus compostos (BRUNETON, 1995).

MELLO & SANTOS (2001) ressaltaram ainda que a ocorrência desses compostos é comum em angiospermas e gimnospermas, principalmente em plantas lenhosas. Considerando a proporção da ocorrência de taninos em famílias das Angiospermas arranjadas de acordo ao sistema de classificação de Cronquist, somente 4% de 228 espécies testadas por MOLE (1993) foram positivas a taninos. Nas ordens Polygonales e Plumbaginales apenas uma única família de cada tem taninos, e em famílias de Caryophyllales tais compostos estavam ausentes. Nas Moraceae, os taninos presentes estão em quantidade insuficiente a precipitação de proteínas (MONTEIRO *et al*, 2005).

1.3.2.2. Propriedades biológicas de taninos

a. Interação Planta-animal

Os vegetais defendem-se dos herbívoros por vários caminhos, seja por estruturas convencionais como espinhos ou pêlos urticantes ou ainda por sofisticadas defesas químicas como os taninos. Todos estes métodos consomem energia e os produtos fotossintéticos são desviados do crescimento ou reprodução em prol da defesa (MOORE, 1998).

Compostos fenólicos em vegetais, principalmente taninos, têm reconhecidamente a função de inibirem herbívoros, pois em altas concentrações, frutos, folhas, sementes ou demais tecidos jovens tornam-se impalatáveis aos fitófagos e, ainda, combinado a algumas proteínas, estes tecidos resistem fortemente à putrefação (VOLZ *et al* 2001).

Foi verificado por REYNOLDS *et al.* (1965) que macacos africanos tem alta rejeição por plantas com alto teor de tanino, porém, alguns chipanzés possuem tolerância ao tanino, principalmente quando há maior nível de açúcar livre, como no caso de figos (*Ficus carica* L.), onde após a ingestão dos frutos, as sementes (taninos) são regurgitadas.

RODRIGUES *et al* (1992) e MAGALHÃES *et al* (1997) estudam o aspecto antinutricional de cultivares com altos teores de taninos e sua resistência a pragas.

HELDT (1997) informa que em savanas sul africanas, as folhas de acácia são recursos alimentares do antílope “kudu”. Essas folhas contêm taninos que, em baixas quantidades, não afetam sua qualidade nutricional. Quando estas árvores são predadas pelos antílopes, liberam o etileno, hormônio vegetal que induzirá, em cerca de 30 minutos, o aumento da síntese de taninos em árvores vizinhas. Os níveis de taninos aumentam tanto que os mamíferos podem chegar à morte se continuarem a alimentar-se dessas folhas.

Algumas plantas e animais usam estratégias na redução à adstringência causada por estes compostos (SCALBERT, 1991). Em frutos, a redução da adstringência não parece ser devido à diminuição das quantidades de taninos e sim pela produção de moléculas com afinidade por esses. Alguns animais, como

ratos com dieta rica em taninos, conseguem induzir liberação maior de proteínas salivares se protegendo contra o efeito da adstringência.

b. Interação planta-ambiente

Estudos sobre variações do teor de taninos mostram que há diferenças quando as plantas são coletadas e analisadas em períodos distintos (TEIXEIRA *et al*, 1990; SIMON *et al*, 1999; PANSERA *et al*, 2003).

Polifenóis de baixo peso molecular e elagitaninos foram analisados em HPLC, por SIMÓN *et al* (1999) em quatro espécies de carvalho (*Quercus robur* L., *Q. petraea* Liebl., *Q. pyrenaica* Wild. e *Q. faginea* Lam.) obtidos do extrato da madeira. As coletas foram realizadas antes e depois de um ano e, durante este processo, as concentrações de polifenóis de baixo peso molecular aumentaram e a concentração de elagitaninos, dímeros e monômeros, diminuíram, concluindo que a sazonalidade natural afeta a composição química devido a processos de desidratação e maturação. As modificações químicas foram similares nas quatro espécies.

Os efeitos da poluição na atmosfera podem alterar a resistência de *Tibouchina pulchra* Cogn. à herbivoria. O estudo de duas localidades no Sudoeste do Brasil mostrou que as altas taxas de poluição atmosférica induzem o aumento da quantidade de nitrogênio foliar e ao decréscimo de compostos fenólicos nas folhas, devido, provavelmente, ao baixo ganho de carbono (FURLAN *et al*, 1999).

SALMINEN *et al* (2001) avaliaram a variação sazonal de taninos hidrolisáveis em folhas de *Betula pubescens* Ehrh; associados a herbivoria. O nível máximo de compostos fenólicos foi encontrado em folhas jovens e, durante a maturação, o conteúdo decresce rapidamente, pois os taninos hidrolisáveis têm padrões de

sazonalidade distintos e as variações de galoilglucose e elagitaninos são específicas por possuírem caminhos biossintéticos próprios.

c. Propriedades farmacológicas

O uso de medicamentos com taninos está relacionado à suas propriedades adstringentes, sendo empregada como antidiarréico, anti-séptico; cicatrizante na proteção da pele e mucosas (MONTEIRO *et al*, 2005)

Ao precipitar proteínas, os taninos propiciam efeito antimicrobiano e antifúngico. Ainda são hemostáticos e, como precipitam alcalóides, podem servir de antídoto em casos de intoxicações (BRUNETON, 1995).

Em processos de cura de feridas, queimaduras e inflamações, os taninos auxiliam formando camada protetora (complexo tanino-proteína e/ ou polissacarídeo) sobre tecidos epiteliais lesionados (MELLO *et al*, 2001). Provavelmente, devido à habilidade de ligar-se às proteínas e outras macromoléculas, os taninos têm atividades tóxicas.

AYRES *et al* (1997) verificaram que a rápida mortalidade de insetos tratados com taninos condensados parece ser devido à atividade tóxica destes compostos e não pela inibição da digestibilidade. Associa-se a alta toxicidade ao maior peso da molécula.

Outro mecanismo de toxicidade com taninos deve-se ao fato desses complexarem-se com facilidade a íons metálicos. Sistemas biológicos, incluindo microrganismos, necessitam de íons metálicos como cofatores enzimáticos (MONTEIRO *et al*, 2005).

Os taninos são considerados nutricionalmente indesejáveis, pois precipitam proteínas, inibem enzimas digestivas e afetam a utilização de vitaminas e

minerais podendo, ainda, em alta concentração, desenvolver câncer de boca (mucosa) e esôfago (CHUNG *et al*, 1998; SINGH *et al*, 2001).

Várias doenças degenerativas como câncer, esclerose múltipla, arteriosclerose e o próprio processo de envelhecimento estão associados a altas concentrações intercelulares de radicais livres. Taninos, também, atuam como captadores de radicais livres, os quais interceptam o oxigênio ativo formando radicais estáveis (MELLO *et al*, 2001).

CHUNG *et al* (1998) hipotetizam que os taninos têm duplo efeito devido ao efeito quimiopreventivo contra carcinogênese ou antimicrobiano e aos efeitos carcinogênico, hepatotóxico ou antinutricionais. A atividade anticarcinogênica é evidenciada por CHUNG *et al* (1998), que ressaltam que os japoneses consomem o chá verde (*Camelia sinensis*), rico em ácido tânico e outros polifenóis, em grandes quantidades e o risco de câncer gástrico mostra-se baixo. Taninos das espécies *Quercus suber* L. e *Q. coccifera* L. tem efeito gastroprotetor, variando entre 66 e 91% (KHENNOUF *et al*, 2003). CHUNG *et al* (1998) relataram que nozes contendo cerca de 25% de taninos podem ser responsáveis pela alta incidência de câncer de esôfago em determinada localidade dos EUA, onde pessoas comumente as consomem após o almoço.

Moléculas de taninos estão sendo testadas com a intenção de se descobrir algum fármaco eficiente contra o vírus da AIDS (HIV) (KILKUSKIE *et al*, 1992; CHUNG *et al*, 1998). KILKUSKIE *et al* (1992) observaram que galotaninos possuem atividade inibitória somente em concentrações tóxicas, elagitaninos e taninos condensados inibiram fracamente a replicação viral e os taninos complexos mostraram potente atividade contra a replicação do HIV. Concluíram

que a atividade anti-HIV exibida por taninos é devida à inibição da transcriptase reversa, dificultando assim a replicação viral.

SCALBERT (1991) relata que taninos condensados e hidrolisáveis não têm diferenças significantes frente a fungos e bactérias, visto que o efeito da toxicidade relacionado à estrutura molecular do tanino é ainda desconhecido.

Muitas bactérias são sensíveis aos taninos, dentre elas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonia*, *Bacillus anthracis* e *Shigella dysenteriae* e, em concentrações mínimas (0,5 g/L), o fungo *Fomes annosus* tem seu crescimento inibido (CASTRO *et al*, 1999).

NISHIZAWA *et al* (1990) demonstraram significativa atividade bactericida do decocto da raiz de *Nuphar variegatum* Durand contra microorganismos patógenos. Relataram que, por séculos, o rizoma e as raízes foram usados na medicina popular por suas propriedades afrodisíacas, hemostáticas, adstringentes e sedativas. O rizoma, em especial, é empregado na cura de infecções diversas e o decocto da raiz no tratamento de infecções dos olhos, garganta e dores internas. A análise cromatográfica (HPLC) do extrato aquoso da raiz dessa planta evidenciou dois galotaninos e dois elagitaninos, sendo reconhecidos por nupharina A e nupharina B.

2. OBJETIVOS

- Avaliar metodologias de extração do flavonóide rutina em frutos e folhas de *Dimorphandra mollis* Benth., a fim de proporcionar agregação de valor comercial e qualitativo aos coletores/ moradores das regiões de Cerrado.
- Desenvolver nova tecnologia que permita aumento da extração de compostos fenólicos em *Dimorphandra mollis* Benth., especialmente dos flavonóides rutina e quercetina, compostos farmacologicamente ativos, a fim de agregar maior valor financeiro aos coletores da espécie.
- Identificar e quantificar os teores de compostos fenólicos, especialmente os flavonóides rutina e quercetina em *Dimorphandra mollis* Benth.
- Analisar o desenvolvimento, crescimento e os compostos do metabolismo secundário de plântulas jovens de *Dimorphandra mollis* Benth. mediante o uso de preparados homeopáticos.
- Relacionar o uso de preparados homeopáticos a produção de compostos fenólicos e de flavonóides em *Dimorphandra mollis* Benth.

- Comparar os teores de compostos fenólicos e flavonóides em folhas e frutos de plantas adultas de *Dimorphandra mollis* Benth. coletados no Cerrado em áreas do norte de Minas.
- Confrontar os teores de compostos fenólicos e flavonóides em folhas e frutos de plantas adultas de *Dimorphandra mollis* Benth. coletados em áreas de cerrado do norte de Minas e em plantas cultivadas em Viçosa, em ambiente protegido (telado) mediante tratamentos homeopáticos.
- Identificar e separar por meio de cromatografia em camada delgada, grupos específicos de compostos farmacologicamente ativos em *Dimorphandra mollis* Benth. e em seus subprodutos (pó de frutos, folhas, frutos, sementes).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. 1. Obtenção das amostras

3.1.1. Amostras de campo

Folhas totalmente expandidas e frutos no primeiro estágio de maturação (totalmente verdes) (figuras 1 e 2) de plantas adultas de *Dimorphandra mollis* foram coletados no mês de abril/ maio de 2006, no Cerrado do norte de Minas, na macro-região de Montes Claros por meio de podão/ ou tesoura de poda. As coordenadas de campo foram obtidas em GPS, constituindo doze tratamentos, com quatro repetições (TRF-MOC 01 a TRF-MOC 12 e TRF-MOC 01 a TRF-MOC 12), totalizando 96 amostras (Anexo 1/ figura 3).

Figura 1: Folhas totalmente expandidas de *Dimorphandra mollis*.



Fonte: arquivo pessoal

Figura 2: Frutos no primeiro estágio de maturação de *Dimorphandra mollis*.



Fonte: arquivo pessoal

3.1.2. Amostras cultivadas

Frutos de plantas matrizes de *D. mollis* foram coletados em Montes Claros, nos meses de agosto a outubro de 2005. Após a secagem natural (luz solar, a temperatura ambiente média de 35⁰C), os frutos foram abertos manualmente (figura 4), selecionadas as sementes colocadas em sacos de plásticos e em papel Kraft e transportadas ao Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa.

Figura 4: Frutos e sementes de *D. mollis*



Fonte: arquivo pessoal

3. 2. Seleção e Obtenção dos tratamentos

3.2.1. Amostras de campo

Os tratamentos TRF-MOC 01 a TRF-MOC 12 e TRF-MOC 01 a TRF-MOC 12 foram armazenados em sacos plásticos e transportados ao Laboratório de Melhoramento Vegetal, do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa onde foram identificados, pesados, armazenados em embalagens de papel Kraft, dispostos em bandejas em estufa de ventilação forçada a temperatura de 38°C até peso constante.

3.2.2. Amostras cultivadas

As sementes selecionadas foram pesadas em balança analítica (Toledo Mettler) e separadas em 16 tratamentos (25 sementes por repetição) com 4 repetições (TR-VIC 01 a TR-VIC 16), no Laboratório de Melhoramento Vegetal. Em seguida, procederam-se a embebição, germinação e avaliação do crescimento (padrões fitotécnicos) das sementes/ plântulas. Os medicamentos e preparados homeopáticos adotados foram:

- 01 – Água destilada;
- 02 – Água destilada 6 CH;
- 03 – Água destilada 12 CH;
- 04 – *Phosphorus* 6 CH;
- 05 – *Phosphorus* 12 CH;
- 06 – *Cyrtopodium* 1D;
- 07 – *Kali phosphoricum* 6 CH;
- 08– *Sulphur* 6 CH;
- 09 – *Sulphur* 12 CH;

- 10 – Etanol 70% 6 CH
- 11 – Etanol 70% 12 CH
- 12 – *Carbo vegetabilis* 12 CH;
- 13 – *Caryocar brasiliensis* (Pequi) 6 CH;
- 14 – *Caryocar brasiliensis* (Pequi) 12 CH;
- 15 – *Dimorphandra mollis* fungi 6 CH;
- 16 – *Dimorphandra mollis* fungi 12 CH.

3.3. Condução do experimento

3.3.1. Amostras de plantas cultivadas

Na embebição os tratamentos foram dispostos em béqueres, com 10 mL de água destilada e 1mL (20 gotas) de preparados homeopáticos, em delineamento inteiramente casualizado. A aplicação dos tratamentos homeopáticos foi feita em duplo-cego. Em seguida, as sementes dos tratamentos TR-VIC-01 a TR-VIC-16 foram novamente pesadas em balança analítica (Toledo Mettler), distribuídas em 64 caixas gerbox (16 tratamentos com 4 repetições), previamente preparadas, procedendo-se a incubação dos tratamentos em BOD à temperatura de 35°C, com fotoperíodo de 12 horas, por 21 dias. Durante a germinação, foram consideradas sementes germinadas, aquelas que emitiram radícula primária de 4 mm, conforme critério adotado por DICKIE & SMITH (1995).

Após a germinação procederam-se a contagem das sementes germinadas que foram transferidas a vasos de 2 L com substrato constituído de 2/3 de solo proveniente da área do “Tiro de guerra”, Viçosa (anexo 1) e 1/3 de areia; identificados por tratamento (duplo-cego) e distribuídos inteiramente ao acaso, em

casa de vegetação telada nas dependências do Departamento de Fitotecnia, da Universidade Federal de Viçosa.

Acompanhou-se o desenvolvimento das plântulas, avaliando número de folhas, espessura/ diâmetro e altura do caule por 63 dias. A cada sete dias foram reaplicados nos tratamentos TR-VIC-01 a TR-VIC-16, os devidos preparados homeopáticos.

Depois de 65 dias, as plantas dos tratamentos TR-VIC-01 a TR-VIC-16 foram coletadas, identificadas, pesadas em balança analítica (Micronal B200), armazenadas em embalagens de papel Kraft, dispostas em bandejas em estufa de ventilação forçada à temperatura de 38°C até peso constante.

3.4 Manipulação dos Preparados homeopáticos

A manipulação dos preparados homeopáticos foi feita de acordo com o “Manual de Normas Técnicas da Farmácia Homeopática” (ABFH, 2003) e “Manipulação de Preparados Homeopáticos” (RODRIGUES-DAS-DÔRES, ANDRADE & CASALI, 2007).

3.5 Aplicação dos preparados homeopáticos

3.5.1 Embebição e Germinação

Na embebição das sementes dos tratamentos TR-VIC-01 a TR-VIC-16, utilizou-se de 10 mL de água destilada e 1mL (1000µL = 20 gotas) dos respectivos preparados homeopáticos (1:10), por 24 horas. Em seguida, a água destilada/ homeopatia não embebida foi drenada e procedeu-se a germinação.

Durante o período de germinação (21 dias) não houve reaplicação dos tratamentos homeopáticos.

3.5.2 Plantas cultivadas

Nos tratamentos TR-VIC-01 a TR-VIC-16, a cada sete dias, foram reaplicados os devidos preparados homeopáticos sendo cada vaso regado com 100 mL de água com 0,1 mL (100 µL = 2 gotas) de preparado homeopático (1:1000).

3.6. Preparo das amostras

3.6.1. Preparo do extrato metanólico

Após a secagem, pesou-se em balança analítica (Micronal B200) 400 mg dos tratamentos TRF-MOC 01 a TRF-MOC 12, TFR-MOC 01 a TFR-MOC 12, TR-VIC-01 a TR-VIC-16, todos com quatro repetições, que foram tratados com cerca de 5 mL de metanol PA (Merck), por 24 horas. Em seguida, foram filtrados em papel de filtro Reagen (R42, 9cm) e o extrato (5mL) armazenado em frascos de 10 mL transparentes, com tampa.

3.7. Triagem fitoquímica

3.7.1 Preparo dos extratos

O preparo dos extratos seguiu a metodologia de WAGNER *et al* (1996) (esquema I – Extratos 1, 2, 3, 4 e 5), onde foram elaborados extratos, em condições favoráveis à identificação de compostos fenólicos como flavonóides (heterosídeos flavônicos), taninos; terpenos (óleos essenciais), saponinas, cumarinas, alcalóides, antraquinonas (heterosídeos antracênicos) e cardiotônicos (heterosídeos cardiotônicos).

Os extratos foram elaborados de folhas de plantas de *D. mollis* coletadas no Cerrado do norte de Minas (TRF-MOC 01 a TRF-MOC 12) constituindo, após a

homogeneização desses tratamentos, a amostra TRF-MOC e dos frutos (TFR-MOC 01 a TFR-MOC 12) pelo mesmo procedimento, obteve-se a amostra TFR-MOC. Das plantas cultivadas de *D. mollis* (TR-VIC 01 a TR-VIC 16) procedeu-se à idêntica homogeneização dos tratamentos originando a amostra TR-VIC; das sementes provenientes de frutos de plantas matrizes de *D. mollis*, compôs-se à amostra TRS-MOC; e ainda, dos frutos, após secagem em estufa de ventilação forçada a temperatura de 40 °C, moagem em moinho de facas, homogeneização, quarteamento e classificação do pó obtido, teve-se a amostra TR-PO.

Assim, foram elaborados extratos de TF-MOC, TR-VIC, TRS-MOC, TFR-MOC e TR-PO utilizados na identificação de flavonóides, taninos; óleos essenciais, saponinas, cumarinas, alcalóides, antraquinonas e carditônicos.

3.7.1.1. Plantas cultivadas

Em plantas cultivadas de *D. mollis* (TR-VIC 01 a TR-VIC 16) fez-se análise fitoquímica especial de flavonóides e taninos, visando identificar a presença ou ausência de flavonóides (rutina, quercetina) e taninos (ácido tânico vermelho, ácido tânico branco).

De tal forma que foram elaborados extratos metanólicos conforme extrato 1 da metodologia de WAGNER *et al* (1996) (esquema 1) organizados em TR-VIC 01 a TR-VIC 16.

3.7.2 Execução da triagem fitoquímica por Cromatografia em Camada Delgada

A triagem dos compostos foi realizada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) (figura 4) tendo como suporte (fase estacionária) placas

cromatográficas do tipo (Merck GF 254, Alugram SilG UV 254, Polygram SilG UV com espessura de 0,250 mm); como fase móvel solventes (Reagen, Sigma, Merck, Synth) em diversas polaridades segundo WAGNER *et al* (1996), e reveladores adequados (esquema 1). Os reagentes, fases móveis, reveladores foram preparados segundo WAGNER *et al* (1996).

Nas análises cromatográficas foram avaliados os extratos TF-MOC, TR-VIC, TRS-MOC, TFR-MOC e TR-PO e comparados aos Rf's de padrões de flavonóides (rutina, quercetina), taninos (ácido tânico); óleos essenciais (eugenol, terpenol, mentol, anetol); saponinas (saponina padrão Merck); cumarinas (cumarina padrão Merck); alcalóides (reserpina, quinina, estricnina, pilocarpina, atropina, brucina); antraquinonas (antraquinona padrão Merck, aloína, emodina) e carditônicos (digoxina, Digitalis), e ainda padrão de ácido clorogênico. Todas as placas cromatográficas foram refeitas e re-analisadas com quadro repetições.

As placas cromatográficas foram digitalizadas após a revelação, analisados os Rf's das amostras e dos padrões, comparados e identificados quanto à presença ou ausência dos compostos.

3.7.2.1 Plantas cultivadas

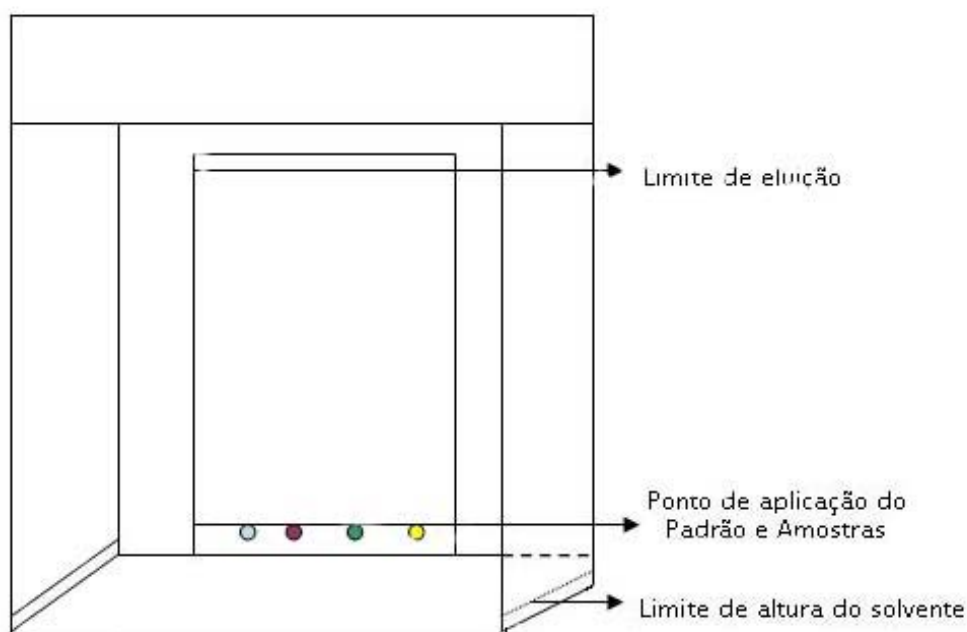
A triagem dos compostos foi realizada por Cromatografia em camada delgada (CCD) (figura 4) tendo como suporte (fase estacionária) placas cromatográficas do tipo (Merck 60 GF 254, Alugram SilG UV 254, Polygram SilG UV com espessura de 0,250 mm); como fase móvel solventes acetato de etila/ metanol (ACOET/MEOH - 75:25) (Reagen e Merck, respectivamente) segundo WAGNER *et al* (1996), e reveladores solução metanólica de cloreto de alumínio 5% (AlCl₃) (Reagen) na detecção de flavonóides e vanilina sulfúrica (vanilina/ H₂SO₄)

(Nuclear) em taninos (esquema 1). Os reveladores e fase móvel foram preparados segundo WAGNER *et al* (1996).

Nas análises cromatográficas foram avaliados os extratos dos 16 tratamentos e suas 4 repetições (TR-VIC 01 a TR-VIC 16), analisados e comparados aos Rf's de padrões de flavonóides (rutina, quercetina – Sigma e Merck) e de taninos (ácido tânico branco e ácido tânico vermelho – CRQ e Vetec).

Todas as placas cromatográficas foram refeitas e re-analisadas com três repetições; sendo, em seguida a revelação, digitalizadas, e por meio dos Rf's das amostras e dos padrões, identificados nos tratamentos (TR-VIC 01 a TR-VIC 16) à presença ou ausência de rutina, quercetina e ácido tânico.

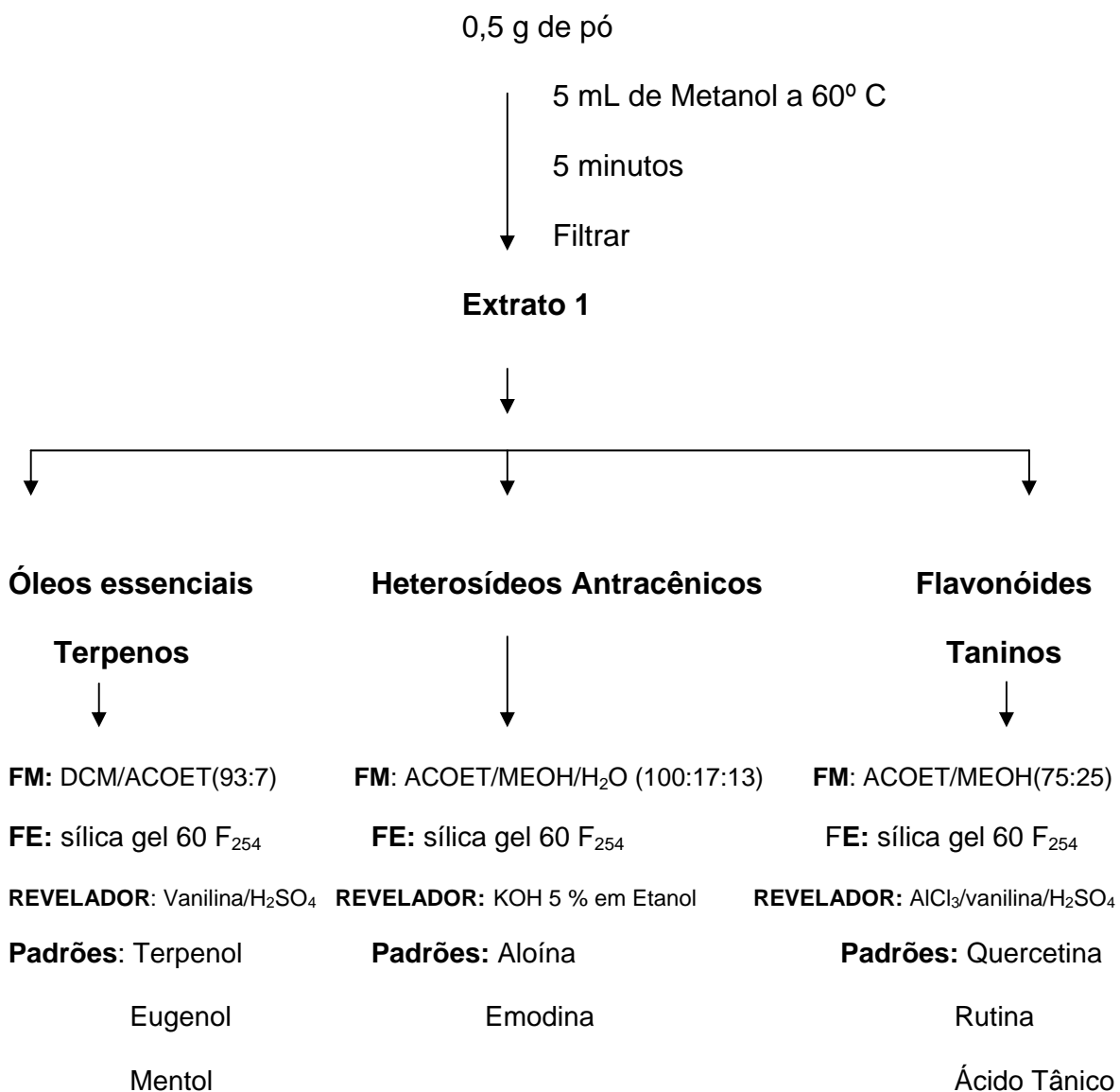
Figura 4: Desenho esquemático de Cromatografia em Camada Delgada



Fonte: RODRIGUES-DAS-DÔRES & CASALI In: Plantas Mediciniais e Aromáticas: Controle de Qualidade. UFV, 2007.

ESQUEMA I: TRIAGEM FITOQUÍMICA – Identificação dos compostos presentes por Cromatografia em camada delgada (CCD) nos extratos 1, 2, 3, 4 e 5 (WAGNER *et al*, 1996)

EXTRATO 1

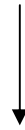


EXTRATO 2.

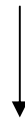
2 g de pó

10 mL ETOH 70%
Refluxo 10 min.
Filtrar
↓ Evaporar a 5 mL

Extrato 2



Saponinas



FM: CHCl₃/MEOH/H₂O(60:30:4)

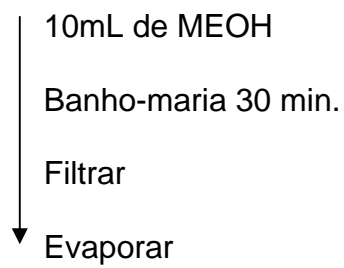
FE: sílica gel 60 F₂₅₄

Revelador: Vanilina/H₂SO₄

Padrões: Saponina Merck

EXTRATO 3

1 g de pó



Extrato 3



Cumarinas



FM: ACOET/MEOH/ÁGUA (100:17:13)

FE: sílica gel 60 F₂₅₄

Revelador: KOH 5% a 10% em MEOH

Padrões: Cumarina Merck

Lapachol

Bergapteno

EXTRATO 4.

1 g de pó

20 mL ETOH 50%

10 ML sol de acetato 10%

Refluxo 15 min.

Resfriar

▼ Filtrar

Filtrado 1

Ácido acético (SR) – pH= 5

Funil de separação

Extrair 15mL de DCM (3X)

Na₂SO₄

Evaporar

▼ Resíduo (1mL DCM/ ETOH 1:1)

Extrato 4



Cardiotônicos



FM: ACOET/ MEOH/ H₂O (100:13,5:10)

FE: sílica gel 60 F₂₅₄

Revelador: SbCl₃

Padrões: Digoxina Merck

Digitalis

EXTRATO 5.

1 g de pó

10 mL H₂SO₄ 0,05M
5 min.
Resfriar
Filtrar

Filtrado 1

1mL NH₄OH conc.
Funil de separação
Diluir 10 mL de H₂O
Extrair com éter
Na₂SO₄
Filtrar
Evaporar
Resíduo (0,25mL de MEOH)

Extrato 5

Alcalóides

FM: ETOH/ MEOH/ H₂O (100:13,5:10)

FE: sílica gel 60 F₂₅₄

Revelador: Dragendorff ou Iodo metálico

Padrões: Estricnina, Brucina, Quinina, Reserpina, Atropina
dentre outros.

3.8. Quantificação de compostos fenólicos por doseamento espectrofotométrico

Determinou-se a concentração de compostos fenólicos nos tratamentos TR-VIC 01 a TR-VIC 16; TRF-MOC 01 a TRF-MOC 12 e TFR-MOC 01 a TFR-MOC 12 de acordo com a metodologia de JAYAPRAKASHA *et al* (2001) e de Singh *et al* (2001).

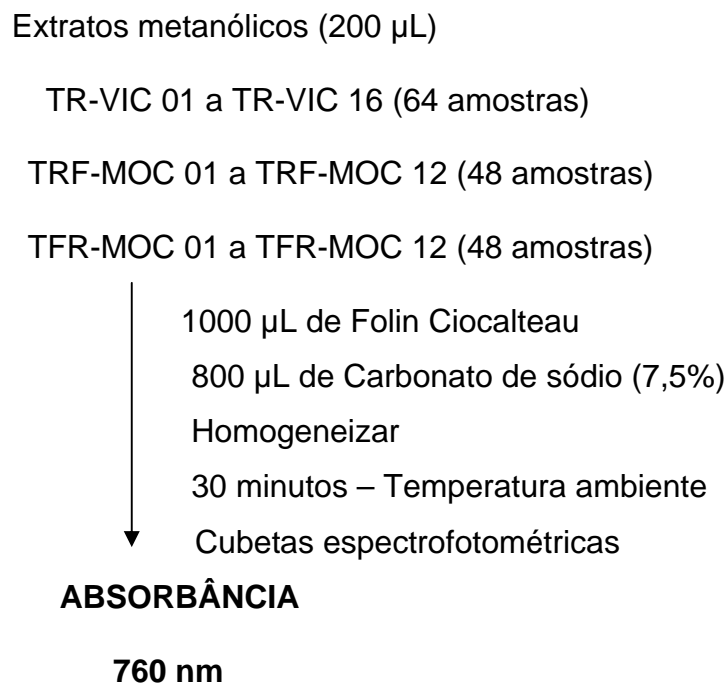
200 µL dos extratos metanólicos dos tratamentos TR-VIC 01 a TR-VIC 16; TRF-MOC 01 a TRF-MOC 12 e TFR-MOC 01 a TFR-MOC 12, foram misturados com 1000 µL do Reagente de Folin Ciocalteu (1:10) e com 800 µL de solução carbonato de sódio a 7,5%. Procedeu-se à homogeneização dos tratamentos, deixando-os em repouso a temperatura ambiente por 30 minutos e em seguida as concentrações de compostos fenólicos foram medidas quantitativamente em 765 nm em espectrofotômetro Shimadzu Modelo UV1601 (esquema 2) e os resultados expressos em µg/mL de ácido tânico.

3.8.1 Curva Padrão

A curva padrão de compostos fenólicos teve como substância padrão ácido tânico (CRQ). Pesou-se 100 mg de ácido tânico e dilui-se com metanol a 80% (Merck), em balão volumétrico de 10 mL, obtendo solução estoque (SE) com 10 mg/ mL de ácido tânico. Da solução estoque (SE) retirou-se uma alíquota de 1mL e dilui-se com metanol 80%, em balão volumétrico de 100 mL constituindo a solução amostra (SA) com 0,1 mg/ mL ou 100 µg/mL, da qual foram retiradas alíquotas de 100 µL a 500 µL, com as concentrações de 10 µg a 50 µg, que foram misturados com 1100 µL a 700 µL do Reagente de Folin Ciocalteu (1:10) e com 800 µL de solução carbonato de sódio a 7,5%.

Procedeu-se à homogeneização, deixando-os em repouso a temperatura ambiente por 30 minutos e em seguida as concentrações de compostos fenólicos foram medidas quantitativamente em 765 nm em espectrofotômetro Shimadzu Modelo UV1601 (esquema 3) e os resultados expressos em $\mu\text{g/mL}$ de ácido tânico.

Esquema 2: Metodologia de quantificação de compostos fenólicos por doseamento espectrofotométrico.



Esquema 3: Curva de calibração de compostos fenólicos

CONCENTRAÇÃO DO PADRÃO DE ÁCIDO TÂNICO ($C_{76}H_{52}O_{46}$) PM = 1700

$$C = \frac{M}{V} \text{ onde: } M = \text{massa em mg;} \\ V = \text{volume em mL.}$$

100 mg (C= 100 mg/10ml = 10 mg/ mL)

q.s.p. de metanol 80% (MEOH 80%)

Balão volumétrico de 10 mL

Homogeneizar

SOLUÇÃO ESTOQUE - SE (0,1:10) = 10 mg/ mL

Alíquota 1 mL

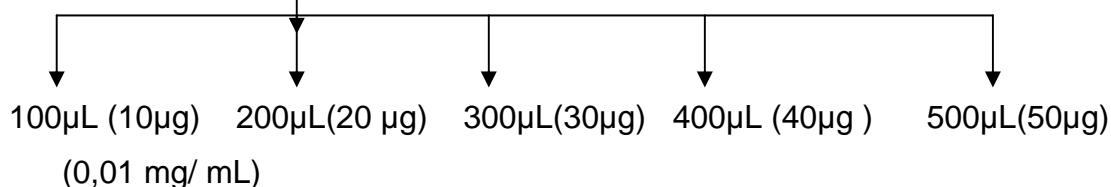
99 mL de MEOH 80%

Balão volumétrico de 100 mL

Homogeneizar

SOLUÇÃO AMOSTRA – SA (10:100) = 0,1 mg/ mL = 100 µg/mL

Alíquotas



Alíquotas de 100 µL a 500 µL de *Solução Amostra*

1000 µL de Folin Ciocalteu (q.s.p 2000 µL)

800 µL de Carbonato de sódio (7,5%)

Homogeneizar

30 minutos – Temperatura ambiente

Cubetas espectrofotométricas

ABSORBÂNCIA

760 nm

3.9 Quantificação de flavonóis por doseamento espectrofotométrico

A concentração de flavonóis nos tratamentos TR-VIC 01 a TR-VIC 16; TRF-MOC 01 a TRF-MOC 12 e TFR-MOC 01 a TFR-MOC 12 foi adaptada da metodologia de JAYAPRAKASHA *et al* (2001) e de BUTLER *et al* (2002).

500 µL dos extratos metanólicos dos tratamentos TR-VIC 01 a TR-VIC 16 e TRF-MOC 01 a TRF-MOC 12 foram misturados com 2500 µL de solução de Vanilina 0,5% (Nuclear) em metanol (Merck) e ácido clorídrico 4% (HCl - Reagen). Procedeu-se à homogeneização dos tratamentos, deixando-os em repouso a temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por 20 minutos e em seguida as concentrações de flavonóis foram medidas quantitativamente em 500 nm em espectrofotômetro Shimadzu Modelo UV1601 (esquema 4). De forma similar, o branco foi preparado com 2500 µL de solução de Vanilina 0,5% (Nuclear) em metanol (Merck) e 2500 µL de ácido clorídrico 4% (HCl) (Reagen) em metanol (Merck) em seguida as foi medido quantitativamente em 500 nm em espectrofotômetro Shimadzu Modelo UV1601 (esquema 4). A concentração do branco foi subtraída dos tratamentos TR-VIC 01 a TR-VIC 16; TRF-MOC 01 a TRF-MOC 12 e TFR-MOC 01 a TFR-MOC 12 e os resultados expressos em µg/mL de rutina.

Os tratamentos TFR-MOC 01 a TFR-MOC 12 (frutos) foram analisados com 200 µL de extratos metanólicos e com 2500 µL de solução de Vanilina 0,5% (Nuclear) em metanol (Merck) e ácido clorídrico 4% (HCl). Procedeu-se à homogeneização dos tratamentos, deixando-os em repouso a temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por 20 minutos e em seguida as concentrações de flavonóis foram medidas quantitativamente em 500 nm em espectrofotômetro

Shimadzu Modelo UV1601 (esquema 4), devido à alta concentração de flavonóis.

3.8.1 Curva Padrão

A curva padrão de flavonóis teve como substância padrão rutina padrão Sigma. Pesou-se 100mg de rutina e diluiu-se com metanol a 70% (Merck), em balão volumétrico de 10mL, obtendo-se a solução estoque (SE) com 10 mg/mL de rutina. Da solução estoque (SE) retirou-se uma alíquota de 1mL e diluiu-se com metanol 70%, em balão volumétrico de 100 mL constituindo a solução amostra (SA) com 0,1 mg/ mL ou 100 µg/mL, da qual foram retiradas alíquotas de 100 µL a 500 µL, com as concentrações de 10 µg a 50 µg, que foram misturados com 2500 µL de solução de Vanilina 0,5% (Nuclear) em metanol (Merck) e ácido clorídrico 4% (HCl). Procedeu-se à homogeneização dos tratamentos, deixando-os em repouso a temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por 20 minutos e em seguida as concentrações de flavonóis foram medidas quantitativamente em 500 nm em espectrofotômetro Shimadzu Modelo UV1601 (esquema 5) e os resultados expressos em µg/mL de rutina.

3.9.2 Quantificação de flavonóis em diversos solventes orgânicos

Na determinação e quantificação de flavonóis em solventes orgânicos, os extratos orgânicos foram preparados em duplicata, pesando-se 1 g de pó de frutos de *D. mollis* proveniente do tratamento TR-PO. Após a pesagem em balança analítica (Micronal B200) e identificação dos tratamentos, transferiu-se a tubo de ensaio, com aproximadamente 5 cm de diâmetro e previamente identificados.

Adicionou-se, em seguida, os 16 tratamentos que foram constituídos por 10 mL dos solventes Metanol e suas diluições (MEOH P.A.; MEOH 70%; MEOH 50%); Etanol e suas diluições (ETOH; ETOH 70%; ETOH 50%); Acetato de etila (ACOET); Acetato de etila/ metanol (ACOET/MEOH (75:25); ACOET/MEOH (50:50); Acetato de etila e diclorometano (ACOET/DCM (50:50); ACOET/DCM (25:75); Diclorometano ou cloreto de metileno (DCM); Acetona (ACONA); Acetona e água (ACONA/H₂O (75:25); ACONA/H₂O (50:50); e da testemunha água (H₂O), organizados em TR-SOLV 01 A TR-SOLV 16.

TR-SOLV 01 – MEOH

TR-SOLV 02 – MEOH 70%

TR-SOLV 03 – MEOH 50%

TR-SOLV 04 - ETOH 70%

TR-SOLV 05 – ETOH 50%

TR-SOLV 06 – ETOH

TR-SOLV 07 – ACOET

TR-SOLV 08 – ACOET/ MEOH 75:25

TR-SOLV 09 – ACOET/ MEOH 50:50

TR-SOLV 10 – ACOET/ DCM 50:50

TR-SOLV 11 – ACOET/DCM 25:75

TR-SOLV 12 – DCM

TR-SOLV 13 – ACONA

TR-SOLV 14 – ACONA/ H₂O 75:25

TR-SOLV 15 – ACONA/ H₂O 50:50

TR-SOLV 16 – Água destilada

Após 24 horas, os tratamentos TR-SOLV 01 A TR-SOLV 16 foram filtrados em papel de filtro Reagen R 42, 9cm. O resíduo foi desprezado e o extrato separado em 4 repetições (TR-SOLV 01 – r1 a r4 até TR-SOLV 16 – r1 a r4). De cada repetição retirou-se alíquota de 500 µL que foram misturados com 2500 µL de solução de Vanilina 0,5% (Nuclear) em metanol (Merck) e ácido Clorídrico 4% (HCl). Procedeu-se à homogeneização dos tratamentos, deixando-os em repouso a temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por 20 minutos e em seguida as concentrações de flavonóis foram medidas quantitativamente em 500 nm em espectrofotômetro Shimadzu Modelo UV1601 (esquema 4) e os resultados expressos em µg/mL de rutina.

Esquema 4: Metodologia de quantificação de flavonóis por doseamento espectrofotométrico

Extratos metanólicos (500 µL)

TR-VIC 01 a TR-VIC 16 (64 amostras)

TRF-MOC 01 a TRF-MOC 12 (48 amostras)

TFR-MOC 01 a TFR-MOC 12 (48 amostras)

↓
2500 µL de Vanilina 0,5% em MEOH
2500 µL de HCl 4% em MEOH
Homogeneizar
20 minutos – Temp. ambiente – Abrigo da luz (escuro)
Cubetas espectrofotométricas

ABSORBÂNCIA

500 nm

Branco

↓
2500 µL de Vanilina 0,5% em MEOH
2500 µL de HCl 4% em MEOH
Homogeneizar
20 minutos – Temp. ambiente - Abrigo da Luz (escuro)
Cubetas espectrofotométricas

ABSORBÂNCIA

500 nm

Esquema 5: Curva de calibração de flavonóis

CONCENTRAÇÃO DO PADRÃO DE RUTINA

$$C = \frac{M}{V} \quad \text{onde: } M = \text{massa em mg; } PM = 610,5 \\ V = \text{volume em mL.}$$

100 mg (C= 100 mg/10ml = 10 mg/ mL)

q.s.p. de metanol 70% (MEOH 70%)

Balão volumétrico de 10 mL

Homogeneizar

SOLUÇÃO ESTOQUE - SE (0,1:10) = 10 mg/ mL

Alíquota 1 mL

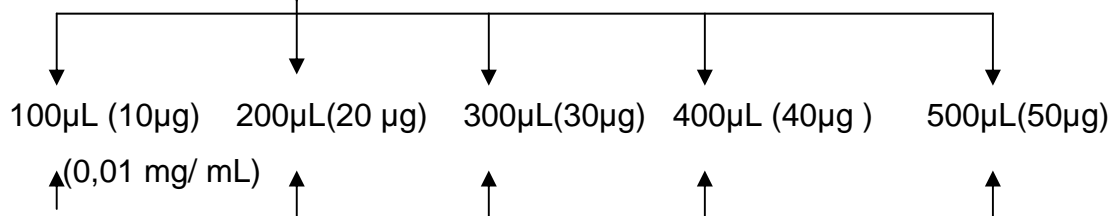
99 mL de MEOH 70%

Balão volumétrico de 100 mL

Homogeneizar

SOLUÇÃO AMOSTRA - SA (10:100) = 0,1 mg/ mL = 100 µg/mL

Alíquotas



Alíquotas de 100 µL a 500 µL de *Solução Amostra*

2500 µL de Vanilina 0,5% em MEOH (q.s.p)

2500 µL de HCl 4% em MEOH

Homogeneizar

20 minutos – Temp. ambiente – Abrigo da Luz (escuro)

Cubetas espectrofotométricas

ABSORBÂNCIA

500 nm

3.10. Avaliação e determinação do flavonóide Rutina por HPLC

A concentração de flavonol rutina nos tratamentos foi adaptada da metodologia de OLIVEIRA *et al* (2001).

Os tratamentos TR-VIC 01 a TR-VIC 16; TRF-MOC 01 a TRF-MOC 12 e TFR-MOC 01 a TFR-MOC 12 foram cromatografados em HPLC/ UV (Shimadzu SPD 10AV), nas seguintes condições: coluna Novapak Water C18; 250 x 4.6 milímetros, tamanho da partícula 5 µm, tendo como fase móvel metanol (Vetec – Espectrofotometria) e água acidificada a pH 3,0 com ácido fosfórico P.A. (Vetec). A eluição foi feita por gradiente tendo como fase móvel metanol/ água 1:1 (0 a 10 minutos) e metanol/ água 7:3 (10 a 20 minutos), com término de eluição em 25 minutos, débito (fluxo) de 1ml/minuto, a 339 nm e injeção de 20 µL.

Alíquotas de 500 µL dos tratamentos TR-VIC 01 a TR-VIC 16 e de TRF-MOC 01 a TRF-MOC 12 diluídas em 500 µL de fase móvel (metanol:água 1:1) constituíram os 20 µL injetados na determinação de rutina nas amostras. Em TFR-MOC 01 a TFR-MOC 12 , utilizou-se de 100 µL diluídos em 900 µL de fase móvel (metanol: água 1:1). Após o cálculo da área dos picos encontrados em cada tratamento e de suas repetições (4) fez-se a integração das áreas calculando a concentração de rutina (µg/ mL) devidamente multiplicada pelos fatores de diluição e os resultados foram expressos em µg/ mL de rutina por tratamento.

3.10.1. Curva Padrão

A curva padrão de quantificação do flavonol rutina em HPLC teve como substância padrão rutina (Merck) na concentração de 5000 ppm em metanol a

70% (Merck) obtendo a solução amostra (SA) da qual tomou-se alíquotas nas concentrações de 1250 ppm a 100 ppm, das quais 20 µL foram injetados em aparelho HPLC UV (Shimadzu SPD 10AV), nas mesmas condições descritas nas análises dos tratamentos TR-VIC 01 a TR-VIC 16; TRF-MOC 01 a TRF-MOC 12 e TFR-MOC 01 a TFR-MOC 12 (OLIVEIRA *et al*, 2001).

3.11. Extração e Processamento de rutina em extrato aquoso

Pesou-se em balança analítica (Micronal B200) 50 gramas de pó de *Dimorphandra mollis* que foram tratados com 250 mL de água destilada a temperatura de 60°C (Banho-maria Tecnal TE – 184) em erlenmeyer de 500 mL, por 15 minutos, formando solução de coloração marrom amarelada, em seguida a preparação obtida foi filtrada em papel de filtro Reagen R42 e aquecida à ebulição em chapa aquecedora (Tecnal). Após aquecimento por cerca de 30 minutos ocorre a formação de precipitados (PPt-PO) que foram filtrados em papel de filtro Reagen R42, transferidos com auxílio de espátula metálica a placas de Petri colocadas em estufa (Fanen) a temperatura de 35°C, até a secagem (peso constante). A água usada na filtração (água-mãe) aquecida foi imediatamente submetida à temperatura de 8°C, em geladeira convencional, por 60 minutos, onde houve a formação de cristais, que foram re-filtrado (filtrações sucessivas) em papel de filtro Reagen R42 e colocado placas de Petri em estufa (Fanen) a temperatura de 35°C, até a secagem (peso constante).

Em seguida, calculou-se o rendimento da extração e identificou-se o precipitado (PPt-PO) por cromatografia em camada delgada (CCD) e doseou-se os flavonóides por espectrofotometria segundo a metodologia da FARM.

BRAS. IV (2003) (esquema 6) e concentração calculada em percentual (m/ m) de flavonóides calculados como quercetina (C₁₅H₁₀O₇).

$$A = \frac{A \times 62500}{50 \times m \times (100 - Pd)}$$

Onde: A = absorvância medida;
m = massa da droga (g);
Pd = determinação de água (%).

A identificação de PPt-PO em CCD (figura 4) teve como suporte (fase estacionária) placas cromatográficas do tipo (Merck 60 GF 254, Alugram SilG UV 254, Polygram SilG UV com espessura de 0,250 mm); como fase móvel solventes acetato de etila/ metanol (ACOET/ MEOH - 75:25) (Reagen e Merck, respectivamente), reveladores cloreto de alumínio (AlCl₃) (Reagen) na detecção de flavonóides e vanilina sulfúrica (vanilina/ H₂SO₄) (Nuclear) e padrões de rutina e quercetina (Sigma e Merck), segundo WAGNER *et al* (1996).

3.12. Extração e Processamento de rutina em extrato metanólico

Pesou-se em balança analítica (Toledo Mettler) 150 gramas de pó de *Dimorphandra mollis* que foram tratados com quantidade suficiente de Metanol P.A. a temperatura de 25°C em erlenmeyer de 1500 mL, por cerca de 168 horas, devidamente tampada e identificada, armazenada em capela exaustiva. Após esse período procedeu-se à filtração do extrato em papel de filtro Reagen R42 (coloração amarelada), e em seguida fez-se à transferência a balão de fundo redondo de 1000 mL (marca Buechi) previamente pesado e procedeu-se concentração em evaporador rotativo (modelo FANEN). O resíduo obtido foi seco em estufa (Fanen) a temperatura de 35°C, até peso constante.

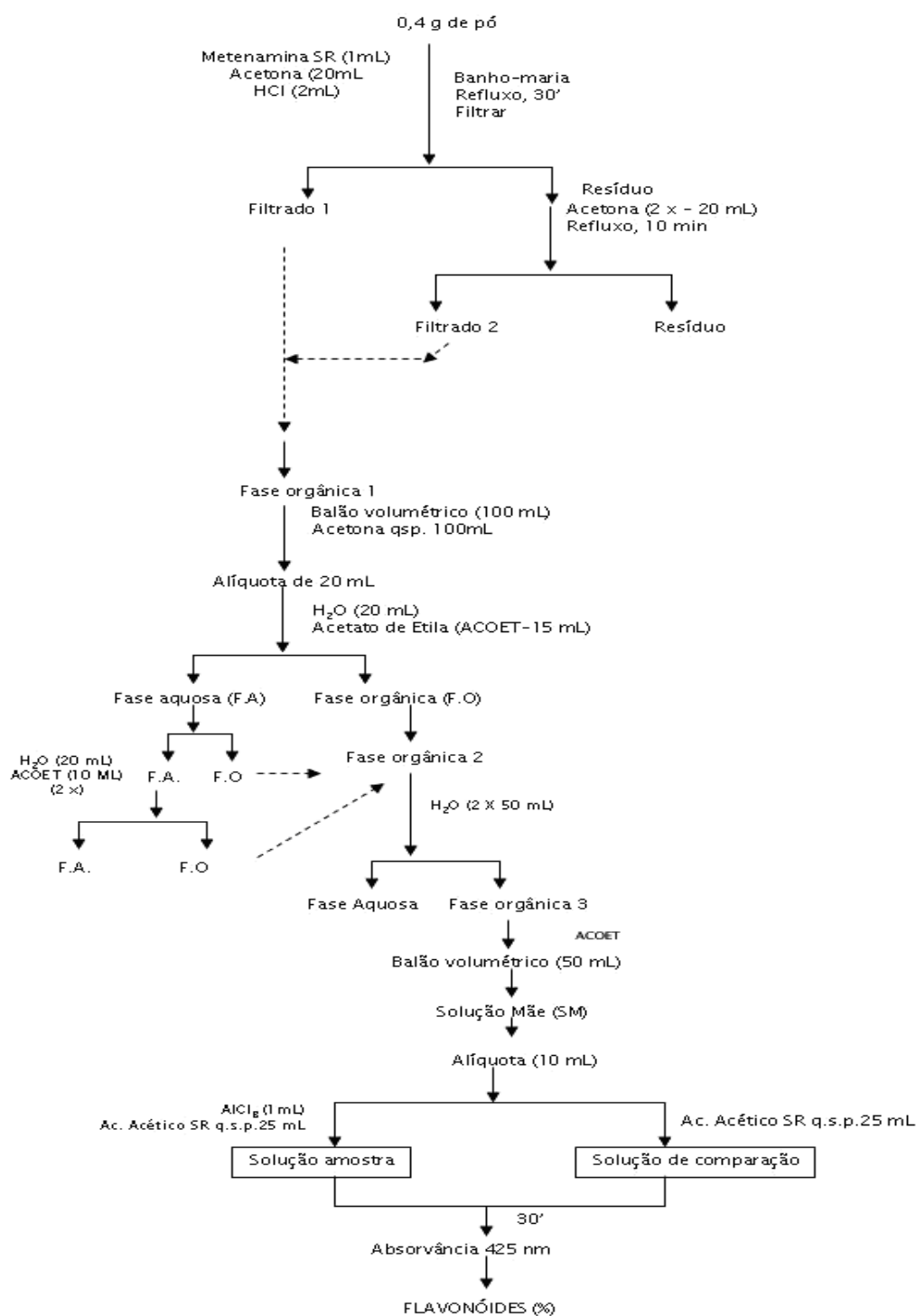
Após a secagem, calculou-se o rendimento obtido na extração e identificou-se o extrato (TR-EXT) por cromatografia em camada delgada (CCD) e doseou-se os flavonóides por espectrofotometria segundo a metodologia da FARM. BRAS. IV (2003) (esquema 6) e concentração calculada em percentual (m/ m) de flavonóides calculados como quercetina (C₁₅H₁₀O₇).

$$A = \frac{A \times 62500}{50 \times m \times (100 - Pd)}$$

Onde: A = absorvância medida;
m = massa da droga (g);
Pd = determinação de água (%).

A identificação de TR-EXT em CCD (figura 4) teve como suporte (fase estacionária) placas cromatográficas do tipo (Merck 60 GF 254, Alugram SilG UV 254, Polygram SilG UV com espessura de 0,250 mm); como fase móvel solventes acetato de etila/ metanol (ACOET MEOH - 75:25) (Reagen e Merck, respectivamente), reveladores cloreto de alumínio (AlCl₃) (Reagen) na detecção de flavonóides e vanilina sulfúrica (vanilina H₂SO₄) (Nuclear) e padrões de rutina e quercetina (Merck), segundo WAGNER *et al* (1996).

Esquema 6: Doseamento de flavonóides segundo FARM. BRAS. IV (2003)
(adaptado de RODRIGUES-DAS-DÔRES & CASALI In: Plantas Mediciniais e
Aromáticas: Controle de Qualidade. UFV, 2007)



3.13 Processamento de dados e análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste de média (Dunnett, Tukey) a 5% de probabilidade, utilizando os programas Sistema para Análises Estatísticas (SAEG) e Genética Quantitativa e Estatística Experimental – VS (GENES).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 RESULTADOS

4.1.1 Triagem fitoquímica nos tratamentos TF-MOC, TFR-MOC, TRS-MOC, TR-VIC e TR-PO

Análises cromatográficas por camada delgada (CCD) dos flavonóides tendo como padrões Rutina ($R_f = 0,54$) e Quercetina ($R_f = 0,68$), com fase estacionária sílica-gel (Merck GF 254, Alugram SilG UV 254, Polygram SilG UV com espessura de 0,250 mm), fase móvel MEOH/ ACEOT (25:75) e revelador $AlCl_3$ foram positivos nos tratamentos TF-MOC, TR-VIC, TR-PO e TFR-MOC e negativo em TRS-MOC. Em TR-VIC não foram detectados outros flavonóides, em TF-MOC detectou-se flavonóides com $R_f = 0,45$ (figura 1); em TFR-MOC com $R_f = 0,56$; em TR-PO com $R_f = 0,45$ e $R_f = 0,78$ (quadro 1, figura 1).

Em CCD de taninos com padrão de ácido tânico ($R_f = 0,65$), com fase estacionária sílica-gel (Merck GF 254, Alugram SilG UV 254, Polygram SilG UV com espessura de 0,250 mm), fase móvel MEOH/ ACEOT (25:75) e revelador vanilina sulfúrica (Nuclear) foram positivos nos tratamentos TF-MOC ($R_f = 0,62$), TR-VIC ($R_f = 0,64$), e negativo em TRS-MOC, TR-PO e TFR-MOC (quadro 1).

Na análise de óleos essenciais (terpenos) por CCD utilizaram-se os padrões de Anetol (R_f 's = 0,85; 0,80; 0,69; 0,53); Mentol (R_f = 0,69); Eugenol (R_f = 0,62) e Terpinol (R_f 's = 0,66, 0,80), com fase estacionária sílica-gel (Merck GF 254, Alugram SilG UV 254, Polygram SilG UV com espessura de 0,250 mm), fase móvel DCM/ ACOET (93:7) e revelador vanilina sulfúrica (Nuclear) foram negativos em todos os tratamentos TF-MOC, TR-VIC, TRS-MOC, TR-PO e TFR-MOC (quadro 1).

Em heterosídeos antracênicos (antraquinonas, antronas) com antraquinona padrão Merck (R_f 's = 0,77; 0,48; 0,32), com fase estacionária sílica-gel (Merck GF 254, Alugram SilG UV 254, Polygram SilG UV com espessura de 0,250 mm), fase móvel ACEOT/ MEOH/ H₂O (100:17:13) e revelador KOH 5% em ETOH foram negativos nos tratamentos TF-MOC, TR-VIC (R_f 's = 0,80; 0,73; 0,43; 0,30); TR-PO (R_f 's = 0,43; 0,30); TFR-MOC (R_f = 0,45; 0,30) e TRS-MOC; (quadro 1, figura 2).

Em cumarinas, tendo como padrão Cumarina Padrão Merck (R_f = 0,62), Bergapteno Merck (R_f = 0,73) com fase estacionária sílica-gel (Merck GF 254, Alugram SilG UV 254, Polygram SilG UV com espessura de 0,250 mm), fase móvel ACOET/MEOH/ÁGUA (100:17:13) e revelador KOH 5% em MEOH, foram negativos em todos os tratamentos (quadro 1).

Não foram detectados os alcalóides Pilocarpina (R_f 's = 0,84; 0,79); Quinina (R_f = 0,66); Reserpina (R_f 's = 0,76; 0,68); Estricnina (R_f = 0,37) e Atropina (R_f = 0,25) nos tratamentos TF-MOC (R_f = 0,80); TR-VIC, TRS-MOC (R_f = 0,84), TR-PO (R_f = 0,85) e TFR-MOC utilizando como fase estacionária sílica-gel (Merck GF 254, Alugram SilG UV 254, Polygram SilG UV com espessura de 0,250 mm), fase móvel ETOH/ MEOH/ H₂O (100:13,5:10) e revelador iodo metálico e

tão pouco saponinas com saponina padrão Merck ($R_f = 0,66$), utilizando como fase estacionária sílica-gel (Merck GF 254, Alugram SilG UV 254, Polygram SilG UV com espessura de 0,250 mm), fase móvel fase móvel $\text{CHCl}_3/\text{MEOH}/\text{H}_2\text{O}(60:30:4)$ e revelador vanilina sulfúrica (Nuclear).

Em análise dos Heterosídeos cardiotônicos e dos padrões de Lanatosídeo C ($R_f = 0,50$) e de Digitonina Merck (R_f 's = 0,77 e 0,11), fase estacionária sílica-gel (Merck GF 254, Alugram SilG UV 254, Polygram SilG UV com espessura de 0,250 mm), fase móvel fase móvel ACOET/MEOH/ H_2O (100:13,5:10) e revelador vanilina sulfúrica (Nuclear), os tratamentos TF-MOC; TFR-MOC ($R_f = 0,50$) e TR-PO (R_f 's = 0,50; 0,11) tiveram R_f 's semelhantes ao Lanatosídeo C e em TR-PO a Digitonina, no entanto, com intensidade de coloração foi menos intensa, sendo identificados como fracamente positivo (\pm).

Quadro 1: Perfil fitoquímico por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) em folhas (TRF-MOC); frutos (TFR-MOC); pó de frutos (TR-PO); sementes (TRS-MOC) provenientes de Montes Claros e em plantas cultivadas (TR-VIC) de *Dimorphandra mollis*.

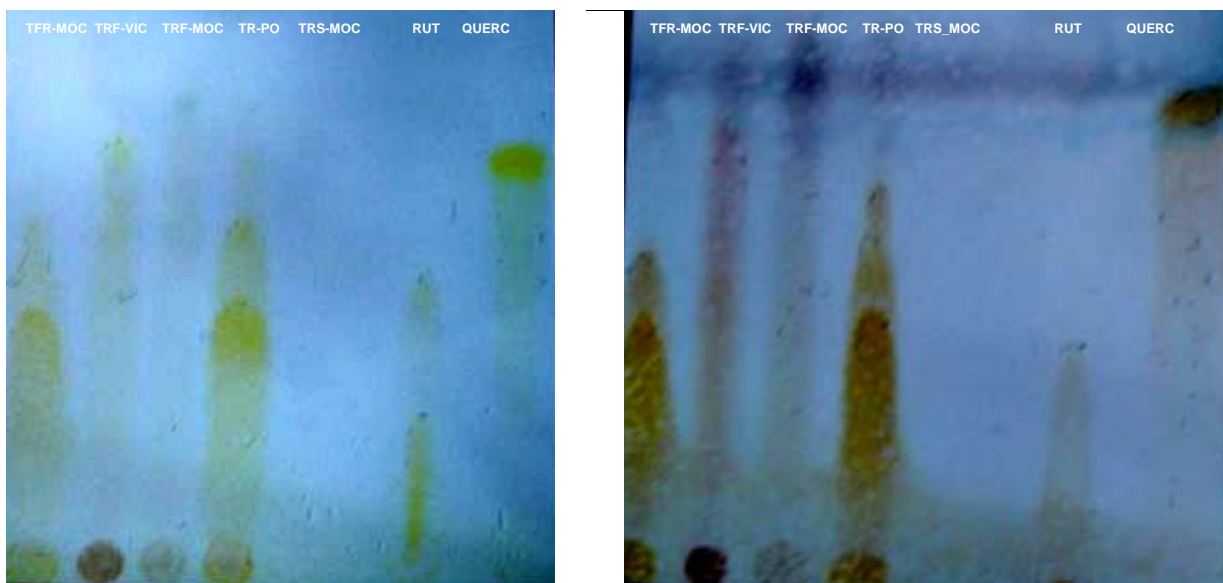
PADRÕES	Rf	TRATAMENTOS				
		TF-MOC	TR-VIC	TFR – MOC	TR – PO	TRS-MOC
FLAVONÓIDES	0,68	+	+	+	+	-
	0,45	+	+	+	+	-
TANINOS	0,65	+	+	-	-	-
ANTRAQUINONA	0,77	-	-	-	-	-
	0,48	-	-	-	-	-
ÓLEOS	0,85	-	-	-	-	-
	0,80	-	-	-	-	-
	0,69	-	-	-	-	-
	0,62	-	-	-	-	-
	0,53	-	-	-	-	-
ALCALÓIDES	0,84	-	-	-	-	-
	0,76	-	-	-	-	-
	0,68	-	-	-	-	-
	0,66	-	-	-	-	-
CARDIOTÔNICOS	0,77	-	-	-	-	-
	0,50	±	-	±	±	-
	0,11	-	-	-	±	-
CUMARINA	0,73	-	-	-	-	-
	0,62	-	-	-	-	-

Legenda: Positivo (+) – valores de Rf's iguais ou muito próximos aos dos padrões.

Negativo (-) – valores de Rf's iguais ou muito próximos aos dos padrões.

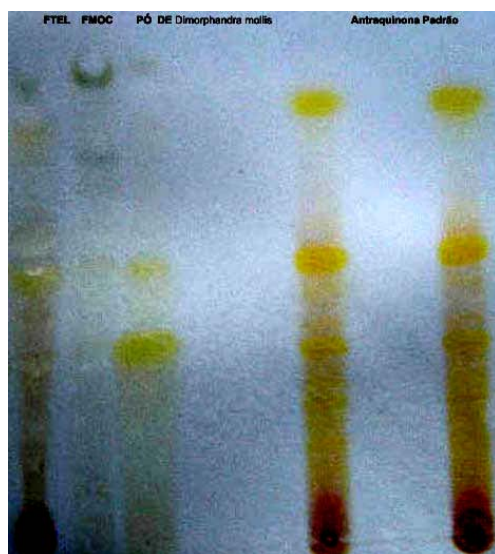
Fracamente positivo (±) – valores de Rf's iguais ou muito próximos aos dos padrões.

Figura 1: Cromatografia em Camada delgada de Flavonóides em sílica gel e revelador $AlCl_3$, com os padrões de Rutina (Rut); Quercetina (Querc) e os tratamentos TF-MOC, TR-VIC, TR-PO, TFR-MOC e TRS-MOC .



FM:ACOET/ MEOH (75:25)
FE: sílica gel 60 F₂₅₄
REVELADOR: Cloreto de Alumínio
Padrões: Rutina
 Quercetina

Figura 2: Cromatografia em Camada delgada de Antraquinonas em sílica gel e revelador KOH 5% em ETOH, com o padrão de Antraquinona padrão e os tratamentos TF-MOC, TR-VIC, TR-PO, TFR-MOC e TRS-MOC.



4.1.1.1. Triagem fitoquímica por Cromatografia em Camada Delgada em Plantas cultivadas

O resultado da triagem por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) nos extratos metanólicos dos 16 tratamentos e suas 4 repetições (TR-VIC 01 a TR-VIC 16) de plantas cultivadas de *D. mollis* revelou a presença (+) ou ausência (-) de compostos fenólicos e comparados aos Rf's de padrões dos flavonóides rutina (Rf = 0,32), quercetina (Rf = 0,78) e de taninos: ácido tânico branco (Rf = 0,48) e ácido tânico vermelho (Rf = 0,68) (quadro 2 – figura 3).

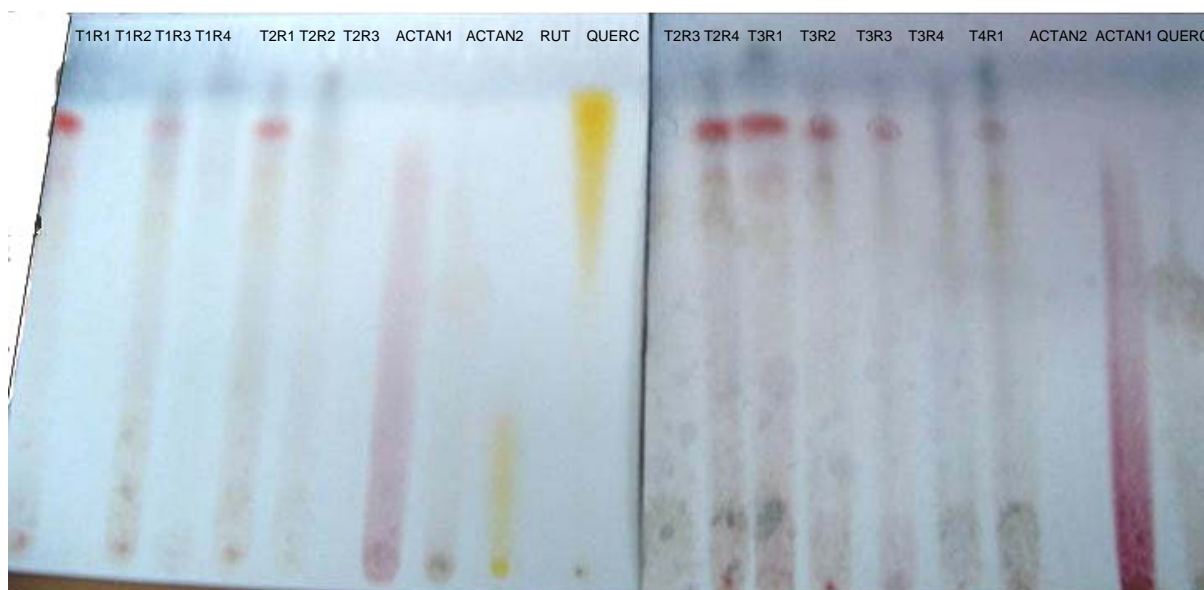
A presença de taninos (Rf = 0,68) foi detectada nos tratamentos Água destilada (Testemunha) (Rf = 0,66), Água destilada 12 CH (Rf = 0,77), *Phosphorus* 6 CH (Rf = 0,80), *Phosphorus* 12 CH (Rf = 0,75), *Kali phosphoricum* 6 CH (Rf = 0,75), *Sulphur* 6 CH (Rf = 0,80), *Sulphur* 12 CH (Rf = 0,75), ETOH 6 CH (Rf = 0,77), ETOH 12 CH (Rf's = 0,66; 0,50), Fungos 6 CH (*Dimorphandra mollis* fungi) (Rf = 0,65), Fungos 12 CH (*Dimorphandra mollis* fungi) (Rf = 0,63, Pequi 12 CH (*Caryocar brasiliensis* frutis) (Rf = 0,65) e não visualizados em Água 6 CH (Rf's = 0,81; 0,60; 0,28 e 0,10), *Cyrtopodium* 1D (Rf = 0,15); *Carbo vegetabilis* 12 CH (Rf = 0,30), e Pequi 6 CH (*Caryocar brasiliensis* frutis) (Rf = 0,10). O tratamento ETOH 12 CH (Rf's = 0,66; 0,50) sobressaiu-se aos demais devido à relativa presença (\pm – fracamente positivo) de ácido tânico branco (taninos Rf = 0,48) (figura 3).

Rutina (Rf = 0,32) foi positiva nos tratamentos Água destilada (Rf = 0,29), Água 6 CH (Rf = 0,28), ÁGUA 12 CH (Rf = 0,29), *Phosphorus* 6 CH (Rf = 0,32), *Phosphorus* 12 CH (Rf = 0,32), *Kali phosphoricum* 6 CH (Rf = 0,35), *Sulphur* 6 CH (Rf = 0,35), *Sulphur* 12 CH (Rf = 0,32), ETOH 12 CH (Rf = 0,27), ETOH 6 CH (Rf = 0,27), *Carbo vegetabilis* 12 CH (Rf = 0,35), Fungos 6 CH

(*Dimorphandra mollis* fungi) (Rf = 0,35), Fungos 12 CH (*Dimorphandra mollis* fungi) (Rf = 0,35), Pequi 12 CH (*Caryocar brasiliensis* frutis) (Rf = 0,24) e negativa em *Cyrtopodium* 1D (Rf = 0,15) e Pequi 6 CH (*Caryocar brasiliensis* frutis) (Rf = 0,10).

O flavonóide Quercetina (Rf = 0,78) foi positivo em Água destilada (Rf = 0,74), Água 6 CH (Rf = 0,81), Água 12 CH (Rf = 0,77), *Phosphorus* 6 CH (Rf = 0,78), *Sulphur* 6 CH (Rf = 0,80), *Sulphur* 12 CH (Rf = 0,75), ETOH 6 CH (Rf = 0,80), ETOH 12 CH (Rf's = 0,78), Fungos 6 CH (*Dimorphandra mollis* fungi) (Rf = 0,79), Fungos 12 CH (*Dimorphandra mollis* fungi) (Rf = 0,78). Pequi 12 CH (*Caryocar brasiliensis* frutis) (Rf = 0,75) e negativo em *Phosphorus* 12 CH, *Carbo vegetabilis* 12 CH, *Cyrtopodium* 1D (Rf = 0,15), *Kali phosphoricum* 6 CH e Pequi 6 CH (*Caryocar brasiliensis* frutis) (Rf = 0,10) e (quadro 2).

Figura 3: Cromatografia em Camada delgada de Flavonóides em sílica gel e revelador vanilina sulfúrica, com os padrões de Rutina (R); Quercetina (Q) e taninos (AC e T) em plantas de *Dimorphandra mollis* (TR-VIC 01 a 16, r1 a r4), cultivadas em Viçosa e tratadas com preparados homeopáticos, nos meses de abril a junho de 2006 (63 dias).



Quadro 2: Análise do perfil fitoquímico em Cromatografia em Camada Delgada (CCD) de plantas de *Dimorphandra mollis*, cultivadas em Viçosa e tratadas com preparados homeopáticos, nos meses de abril a maio de 2006 (63 dias) de compostos fenólicos (Rutina, Quercetina, Ácido tânico e Taninos).

TRATAMENTOS	COMPOSTOS FENÓLICOS			
	Rutina	Quercetina	Ácido tânico	Taninos
TR-VIC 01 – Água destilada (TESTEMUNHA)	+	+	+	-
TR-VIC 02 – Água destilada 6 CH	+	+	+	-
TR-VIC 03 – Água destilada 12 CH;	+	+	-	-
TR-VIC 04 – <i>Phosphorus</i> 6 CH	+	+	+	-
TR-VIC 05 – <i>Phosphorus</i> 12 CH	+	-	+	-
TR-VIC 06 – <i>Cyrtopodium</i> 1D	-	-	-	-
TR-VIC 07 – <i>Kali phosphoricum</i> 12 CH	+	-	+	-
TR-VIC 08 – <i>Sulphur</i> 6 CH	+	+	+	-
TR-VIC 09 – <i>Sulphur</i> 12 CH	+	+	+	-
TR-VIC 10 – Etanol 70% 6 CH	+	+	+	-
TR-VIC 11 – Etanol 70% 12 CH	+	+	+	+/-
TR-VIC 12 – <i>Carbo vegetabilis</i> 12 CH	+	-	-	-
TR-VIC 13 – <i>C. brasiliensis</i> frutis 6 CH	-	-	-	-
TR-VIC 14 – <i>C. brasiliensis</i> frutis 12 CH	+	+	+	-
TR-VIC 15 – <i>D. mollis</i> fungi 6 CH	+	+	+	-
TR-VIC 16 – <i>D. mollis</i> fungi 12 CH	+	+	+	-

Legenda: Positivo (+) – valores de Rf's iguais ou muito próximos aos dos padrões.

Negativo (-) – valores de Rf's iguais ou muito próximos aos dos padrões.

Fracamente positivo (±) – valores de Rf's iguais ou muito próximos aos dos padrões.

4.1.2 Quantificação de flavonóides em diversos solventes orgânicos

A quantificação de flavonóis nos solventes orgânicos visa identificar a polaridade que os flavonóis rutina e quercetina são melhores extraídos e portanto teriam maior rendimento (figura 4). Dentre os tratamentos, TR-SOLV 15 – ACONA/ H₂O (50:50) tem teor médio (tm) de flavonóides de 104,39 µg/mL, seguido de TR-SOLV 14 – ACONA/ H₂O (75:25) (tm =37,68 µg/mL) e de ETOH 50% (tm =36,36 µg/mL) conforme no quadro 3.

As menores solubilidades foram em TR-SOLV 13 – ACONA (tm = 8,10 µg/mL), TR-SOLV 08 – ACOET/ MEOH (75:25) (tm = 8,52 µg/mL) e em TR-SOLV 09 – ACOET/ MEOH (50:50) (tm = 8,57µg/mL) (quadro 3, tabela 1).

Tabela 1: Resumo da análise de variância dos Teores médios de flavonóis (TMF µg/mL) nos tratamentos TR-SOLV 01 a TR-SOLV 15 e a testemunha TR-SOLV 16 – Água destilada.

F.V.	Quadrados Médios	
	G.L.	TMF
TRAT	15	2250,75**
RESÍDUO	48	13,10
CV(%)		16,38

** F significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Quadro 3: Teores médios de flavonóis ($\mu\text{g/mL}$) nos tratamentos TR-SOLV 01 a TR-SOLV 15 comparados as testemunhas TR-SOLV 16 – Água destilada (*) (testemunha 1) e TR-SOLV 04 – ETOH 70% (*) (testemunha 2)

TRATAMENTOS	MÉDIAS	COMPARAÇÕES		
		TUKEY	DUNNETT	
			H ₂ O	ETOH
TR-SOLV 15 – ACONA/ H ₂ O (50:50)	104,39	A	*	*
TR-SOLV 14 – ACONA/ H ₂ O (75:25)	37,68	B	*	*
TR-SOLV 05 – ETOH 50%	36,36	B	*	*
TR-SOLV 16 – H ₂ O (Água destilada - TESTEMUNHA 1)	21,92	C		*
TR-SOLV 03 – MEOH 50%	20,71	CD		*
TR-SOLV 02 – MEOH 70%	19,90	CDE		*
TR-SOLV 12 – DCM	14,00	CDEF	*	
TR-SOLV 10 – ACOET/ DCM (50:50)	13,00	CDEF	*	
TR-SOLV 01 – MEOH	12,60	DEF	*	
TR-SOLV 11 – ACOET/ DCM (25:75)	12,37	DEF	*	
TR-SOLV 04 – ETOH 70% (TESTEMUNHA 2)	12,36	DEF	*	
TR-SOLV 07 – ACOET	11,89	DEF	*	
TR-SOLV 06 – ETOH	11,15	EF	*	
TR-SOLV 09 – ACOET/ MEOH (50:50)	8,57	F	*	
TR-SOLV 08 – ACOET/ MEOH (75:25)	8,52	F	*	
TR-SOLV 13 – ACONA	8,10	F	*	

As médias seguidas de uma mesma letra não variam estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As médias com asterisco (*) diferiram das testemunhas (Água destilada – TR-VIC 01 e ETOH 70% – TR-SOLV 04) ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Dunnett.

Figura 4: Coloração dos extratos dos tratamentos TR-SOLV 01 – MEOH; TR-SOLV 02 – MEOH 70%; TR-SOLV 03 – MEOH 50%; TR-SOLV 04 - ETOH 70%; TR-SOLV 05 – ETOH 50%; TR-SOLV 06 – ETOH; TR-SOLV 07 – ACOET; TR-SOLV 08 – ACOET/ MEOH (75:25); TR-SOLV 09 – ACOET/ MEOH (50:50); TR-SOLV 10 – ACOET/ DCM (50:50); TR-SOLV 11 – ACOET/ DCM (25:75); TR-SOLV 12 – DCM; TR-SOLV 13 – ACONA; TR-SOLV 14 – ACONA/ H₂O (75:25) ;TR-SOLV 15 – ACONA/ H₂O (50:50) comparados à testemunha TR-SOLV 16 – H₂O, utilizados em determinação dos teores médios de flavonóis (µg/mL) .



Fonte: arquivo pessoal

4.1.3 Quantificação de compostos fenólicos por doseamento espectrofotométrico

A concentração de compostos fenólicos nos tratamentos TR-VIC 01 a TR-VIC 16; TRF-MOC 01 a TRF-MOC 12 e TFR-MOC 01 a TFR-MOC 12 e suas repetições (r1, r2, r3 e r4) foram avaliadas estatisticamente por análise de variância e teste de média (Tukey e Dunnett) (quadros 4, 5 e 6).

A equação de calibração de compostos fenólicos, com concentrações de 10 µg/mL (= 0,01 mg/ mL) a 50 µg/mL (0,050 mg/ mL) é $\hat{Y} = 0,0294 x$ ($r^2 = 0,9967$).

Nos tratamentos TR-VIC 01 a TR-VIC 16, os teores médios (tm) maiores que a TR-VIC 01 (testemunha) – H₂O (tm = 179,35 µg/mL) foram nos

tratamentos TR-VIC 09 – *Sulphur* 12 CH (810,14 µg/mL), seguido de TR-VIC 05 – *Phosphorus* 12 CH (tm = 709,83 µg/mL); TR-VIC 11 – ETOH 12 CH (tm = 595,71 µg/mL); TR-VIC 10 – ETOH 6 CH (tm = 536,70 µg/mL); TR-VIC 16 – Fungos 12 CH (*Dimorphandra mollis* fungi) (530,78µg/mL); TR-VIC 03 – H₂O 12 CH (tm = 446,80 µg/mL) e TR-VIC 08 – *Sulphur* 6 CH (tm = 426,23 µg/mL). Os menores que a testemunha foram em TR-VIC 13 – Pequi 6 CH (*Caryocar brasiliensis* frutis 6 CH) (tm = 1,36 µg/mL) e TR-VIC 06 – *Cyrtopodium* 1 D (tm = 55,83µg/mL) (quadro 4, tabela).

Os tratamentos TRF-MOC 01 a TRF-MOC 12 tiveram os teores médios (tm) maiores em folhas TRF-MOC 12 (tm = 126,70 µg/mL), TRF-MOC 04 (tm = 118,91µg/mL), TRF-MOC 05 (tm =117,35 µg/mL) e os menores em TRF-MOC 06 (tm = 76,98 µg/mL) e TRF-MOC 10 (78,20 µg/mL), correspondendo respectivamente aos pontos catalogados na figura 3 (anexo 1 - GPS) Pt-P01, Pt-284, Pt-285, Pt-286 e Pt-290 (quadro 5). Em frutos TFR-MOC 01 a TFR-MOC 12 (quadro 6), os teores médios (tm) maiores foram TFR-MOC 11 (tm = 1430,51 µg/mL), TFR-MOC 12 (tm = 1404,25 µg/mL), TFR-MOC 05 (tm = 1243,63 µg/mL) e os menores em TFR-MOC 10 (tm = 446,43 µg/mL) e TFR-MOC 04 (618,17 µg/mL), correspondendo respectivamente aos pontos catalogados na figura 3 (anexo 1- GPS) Pt-291, Pt-P01, Pt-285, Pt-290 e Pt-284 (quadro 6).

Tabela 2: Resumo da análise de variância dos teores de compostos fenólicos (TCF), flavonóis (TMF), flavonóides por HPLC (FH) em microgramas por mililitro ($\mu\text{g/mL}$) em folhas (TRF-MOC), frutos (TFR-MOC) e plantas cultivadas (TR-VIC) de *D. mollis*.

F.V.	GL	QUADRADOS MÉDIOS						QUADRADOS MÉDIOS			
		TRF-MOC			TFR-MOC			GL	TRF-VIC		
		TCF	TMF	FH	TCF	TMF	FH		TCF	TMF	FH
TRAT	11	1062,93	255,75	153918,4	423692,6	6857,41	24047,07	15	0,86**	187,10**	44377,81**
RESIDUO	36	922,45	219,02	116892	275524,6	10560,54	22422,27	48	0,19	41,33	3723,97
CV (%)		30,37	42,27	58,20	53,96	43,41	43,40		14,94	29,33	54,22

*** F significativo ao nível de 10% de probabilidade.

** F significativo ao nível de 1% de probabilidade.

* F significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Quadro 4: Teores médios de compostos fenólicos ($\mu\text{g/mL}$) de plantas de *Dimorphandra mollis* cultivadas em Viçosa (MG) correspondentes aos tratamentos TR-VIC 02 a TR-VIC 16 comparados a testemunha (TR-VIC 01 – Água destilada).

TRATAMENTOS	MÉDIAS	COMPARAÇÕES	
		TUKEY	DUNNETT
TR-VIC 09 – <i>Sulphur</i> 12 CH	2,70	A	*
TR-VIC 16 – <i>D. mollis</i> fungi 12 CH	2,60	A	*
TR-VIC 05 – <i>Phosphorus</i> 12 CH	2,59	A	*
TR-VIC 10 – Etanol 70% 6 CH	2,58	A	*
TR-VIC 12 – <i>Carbo vegetabilis</i> 12 CH	2,58	A	*
TR-VIC 11 – Etanol 70% 12 CH	2,53	AB	*
TR-VIC 14 – <i>C. brasiliensis</i> frutis 12 CH	2,52	AB	*
TR-VIC 03 – Água destilada 12 CH	2,51	AB	*
TR-VIC 02 – Água destilada 6 CH	2,46	AB	*
TR-VIC 15 – <i>D. mollis</i> fungi 6 CH	2,42	AB	
TR-VIC 08 – <i>Sulphur</i> 6 CH	2,41	AB	
TR-VIC 07 – <i>Kali phosphoricum</i> 12 CH	2,33	AB	
TR-VIC 01 – Água destilada (TESTEMUNHA)	2,24	AB	
TR-VIC 04 – <i>Phosphorus</i> 6 CH	2,09	AB	
TR-VIC 06 – <i>Cyrtopodium</i> 1D	1,76	B	*
TR-VIC 13 – <i>C. brasiliensis</i> frutis 6 CH	0,80	C	*

Obs: dados transformados log (CF+5).

As médias seguidas de uma mesma letra não variam estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As médias com asterisco (*) diferiram da testemunha (Água destilada – TR-VIC 01) ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Dunnett.

Quadro 5: Teores médios de compostos fenólicos (CF) ($\mu\text{g/mL}$) e flavonóis (F) ($\mu\text{g/mL}$) nas folhas de *Dimorphandra mollis* dos tratamentos TRF – MOC 01 a TR-MOC 12.

TRATAMENTOS	MÉDIAS	
	COMPOSTOS FENÓLICOS	FLAVONÓIS
TRF – MOC 12	126,70 A	30,58 A
TRF – MOC 04	118,91 A	38,05 A
TRF – MOC 05	117,34 A	37,42 A
TRF – MOC 11	113,16 A	34,89 A
TRF – MOC 08	100,20 A	31,42 A
TRF – MOC 07	98,91 A	55,10 A
TRF – MOC 09	97,92 A	27,32 A
TRF – MOC 02	96,90 A	34,21 A
TRF – MOC 01	91,80 A	32,00 A
TRF – MOC 03	82,96 A	34,52 A
TRF – MOC 10	78,20 A	38,79 A
TRF – MOC 06	76,97 A	25,74 A

As médias seguidas de uma mesma letra não variam estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quadro 6: Teores médios de compostos fenólicos ($\mu\text{g/mL}$) e flavonóis ($\mu\text{g/mL}$) nos frutos de *Dimorphandra mollis* correspondentes aos tratamentos TFR-MOC 01 a TFR-MOC 12.

TRATAMENTOS	MÉDIAS	
	COMPOSTOS FENÓLICOS	FLAVONÓIS
TFR – MOC 11	1430,51 A	176,21 A
TFR – MOC 12	1404,25 A	211,02 A
TFR – MOC 05	1243,62 A	220,63 A
TFR – MOC 06	1213,87 A	229,47 A
TFR – MOC 02	1187,41 A	263,15 A
TFR – MOC 03	1044,41 A	229,47 A
TFR – MOC 08	886,73 A	221,47 A
TFR – MOC 01	777,31 A	208,63 A
TFR – MOC 09	723,56 A	337,47 A
TFR – MOC 07	695,92 A	231,37 A
TFR – MOC 04	618,71 A	228,00 A
TFR – MOC 10	446,43 A	283,58 A

As médias seguidas de uma mesma letra não variam estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.1.4 Quantificação de flavonóis por doseamento espectrofotométrico

A concentração de flavonóis nos tratamentos TR-VIC 01 a TR-VIC 16; TRF-MOC 01 a TRF-MOC 12 e TFR-MOC 01 a TFR-MOC 12 e suas repetições (r1, r2, r3 e r4) foi avaliada estatisticamente por análise de variância e teste de média (Tukey e Dunnett) (quadros 5, 6 e 7).

A equação de calibração de flavonóis, com concentrações de 10 µg/mL (= 0,01 mg/ mL) a 50 µg/mL (0,050 mg/ mL) é $\hat{Y} = 0,0095 x$ ($r^2 = 0,9933$). Os maiores teores médios (tm) foram nos tratamentos TR-VIC 12 – Fungos 12 CH (*Dimorphandra mollis* fungi) (tm = 29,05µg/mL), TR-VIC 03 – ETOH 6 CH (28,10 µg/mL); TR-VIC 10 – Sulphur 12 CH (tm = 27,79µg/mL) e menores em TR-VIC 13 – Pequi 6 CH (*Caryocar brasiliensis* frutis) (ns**), TR-VIC 06 – *Cyrtopodium* 1D (tm =18 µg/mL) (quadro 7).

Em TRF-MOC 01 a TRF-MOC 12 (folhas) tiveram os teores mais altos em TRF-MOC 07 (tm = 55,10 µg/mL), TRF-MOC 10 (tm = 38,78 µg/mL) e os mais baixos em TRF-MOC 06 (tm = 25,74 µg/mL) e TRF-MOC 09 (tm = 27,31 µg/mL) correspondendo respectivamente aos pontos catalogados na figura 3 (GPS) Pt-287, Pt-290, Pt-286, Pt-289 (quadro 5). Em TFR-MOC 01 a TFR-MOC 12 (frutos), os teores médios (tm) maiores em frutos TFR-MOC 09 (tm = 337,47 µg/mL), TFR-MOC 10 (tm = 283,58 µg/mL) e os menores em TFR-MOC 11 (tm = 176,21 µg/mL) (quadro 6) correspondendo respectivamente aos pontos catalogados na figura 3 (Anexo 1 - GPS) Pt-289, Pt-290 e Pt-291.

Quadro 7: Teores médios de flavonóis ($\mu\text{g/mL}$) de plantas de *Dimorphandra mollis* cultivadas em Viçosa (MG) correspondentes aos tratamentos TR-VIC 02 a TR-VIC 16 comparados a testemunha (TR-VIC 01 – Água destilada).

Tratamentos	Médias	Comparações	
		Tukey	Dunnett
TR-VIC 01 – Água destilada (TESTEMUNHA)	19,47	A	
TR-VIC 02 – Água destilada 6 CH	28,10	A	
TR-VIC 03 – Água destilada 12 CH	19,21	A	
TR-VIC 04 – <i>Phosphorus</i> 6 CH	19,58	A	
TR-VIC 05 – <i>Phosphorus</i> 12 CH	24,63	A	
TR-VIC 06 – <i>Cyrtopodium</i> 1D	18,00	A	
TR-VIC 07 – <i>Kali phosphoricum</i> 12 CH	21,31	A	
TR-VIC 08 – <i>Sulphur</i> 6 CH	24,00	A	
TR-VIC 09 – <i>Sulphur</i> 12 CH	27,79	A	
TR-VIC 10 – Etanol 70% 6 CH	25,58	A	
TR-VIC 11 – Etanol 70% 12 CH	26,79	A	
TR-VIC 12 – <i>Carbo vegetabilis</i> 12 CH	24,32	A	
TR-VIC 13 – <i>C. brasiliensis</i> frutis 6 CH	♦♦	B	*
TR-VIC 14 – <i>C. brasiliensis</i> frutis 12 CH	19,42	A	
TR-VIC 15 – <i>D. mollis</i> fungi 6 CH	23,42	A	
TR-VIC 16 – <i>D. mollis</i> fungi 12 CH	29,05	A	

♦ ♦ = $0,35 \cdot 10^{-14}$

As médias seguidas de uma mesma letra não variam estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As médias com asterisco (*) diferiram da testemunha (Água destilada – TR-VIC 01) pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

4.1.5. Avaliação e determinação do flavonóide Rutina por HPLC

A concentração de rutina nos tratamentos TR-VIC 01 a TR-VIC 16; TRF-MOC 01 a TRF-MOC 12 e TFR-MOC 01 a TFR-MOC 12 e suas repetições (r1, r2, r3 e r4) foi avaliada estatisticamente por análise de variância e teste de média (Tukey e Dunnett) (quadros 8, 9 e 10).

A equação de calibração de rutina padrão, com concentrações de 1000 ppm a 100 ppm é $\hat{Y} = 42161x - 99244$ ($r^2 = 0,999$) e o cromatograma do padrão de Rutina com 1000ppm está disposto na figura 5.

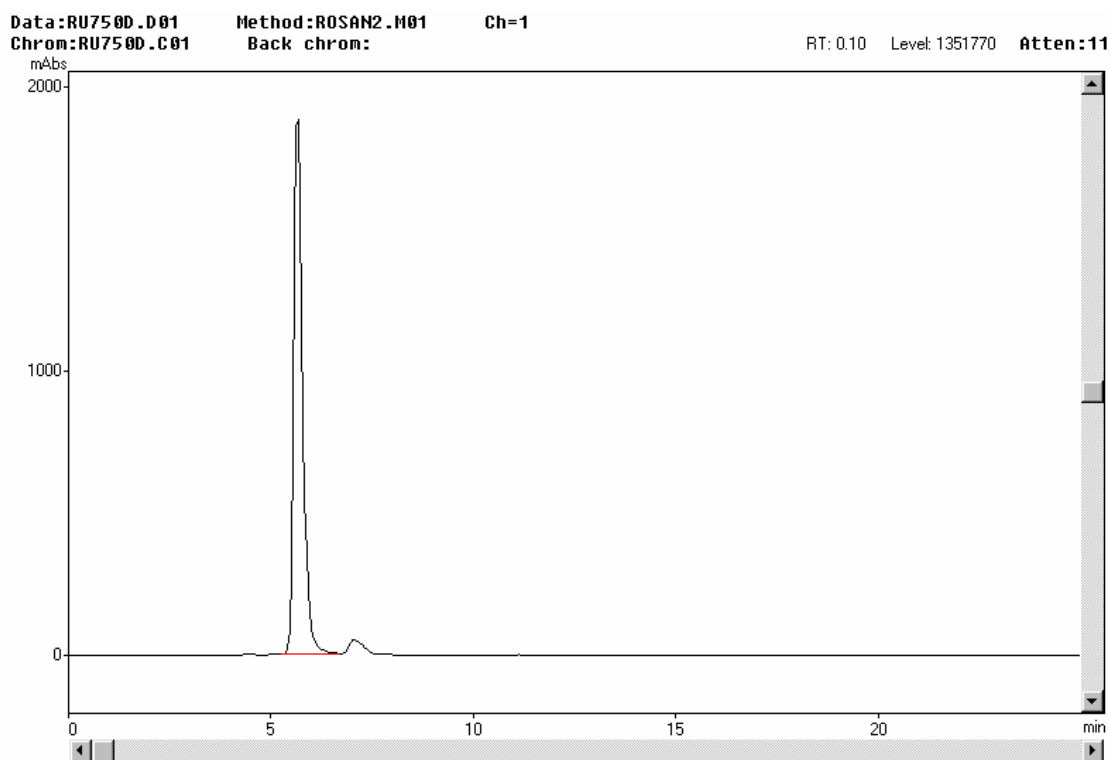
Os maiores teores médios (tm) foram nos tratamentos TR-VIC 15 - Fungos 6 CH (*D. mollis fungi*) (tm = 338,46 µg/mL) (figura 11), TR-VIC 01 – Água destilada (testemunha) (tm = 276,86 µg/mL e TR-VIC 12 - *Carbo vegetabilis* 12 CH (tm = 250,58 µg/mL) e menores TR-VIC 13 – Pequi 6 CH (*Caryocar brasiliensis frutis*) (nd), TR-VIC 07 - *Kali phosphoricum* 12 CH (tm = 7,30 µg/mL) e TR-VIC 03 – Água destilada 12 CH (tm = 9,20 µg/mL) (figura 6) (quadro 8).

Em TRF-MOC 01 a TRF-MOC 12 (folhas) tiveram os teores mais altos em TRF-MOC 09 (tm = 876,31 µg/mL) (figura 7), TRF-MOC 01 (tm = 874,81 µg/mL) e TRF-MOC 08 (tm = 716,60 µg/mL) e os mais baixos em TRF-MOC 12 (tm = 257,29 µg/mL) e TRF-MOC 07 (tm = 318,87 µg/mL) (quadro 9); correspondendo respectivamente aos pontos catalogados na figura 3 (GPS) Pt-289, Pt-280, Pt-288, Pt-292, Pt-287.

Em TFR-MOC 01 a TFR-MOC 12 (frutos), os teores médios (tm) maiores em frutos TFR-MOC 08 (tm = 56.052,03 µg/mL) (figura 8), TFR-MOC 12 (tm = 55.753,46 µg/mL) e os menores em TRF-MOC 06 (tm = 25.720,36 µg/mL) e TFR-MOC 11 (tm = 33.170,04 µg/mL) (quadro 10) correspondendo

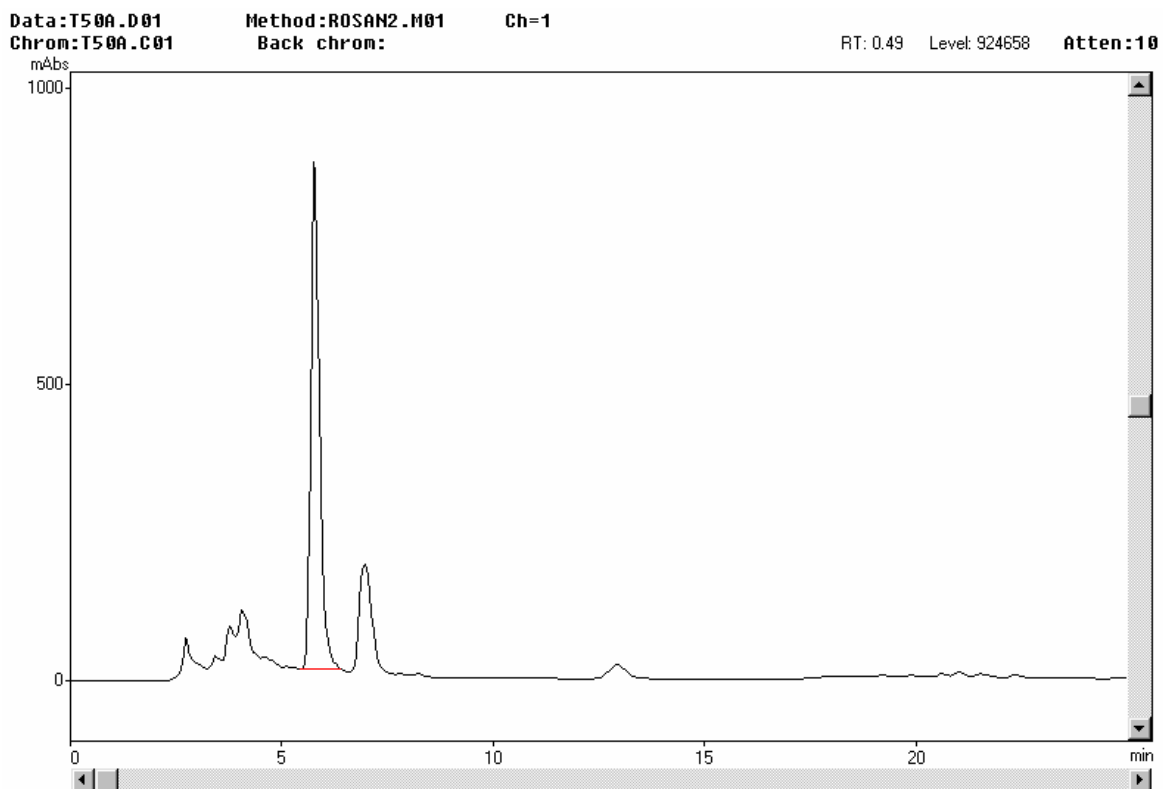
respectivamente aos pontos catalogados na figura 3 (Anexo 1 - GPS) Pt-288, Pt-292, Pt-286, Pt-291.

Figura 5: HPLC Cromatograma de padrão de Rutina na concentração de 750 ppm.



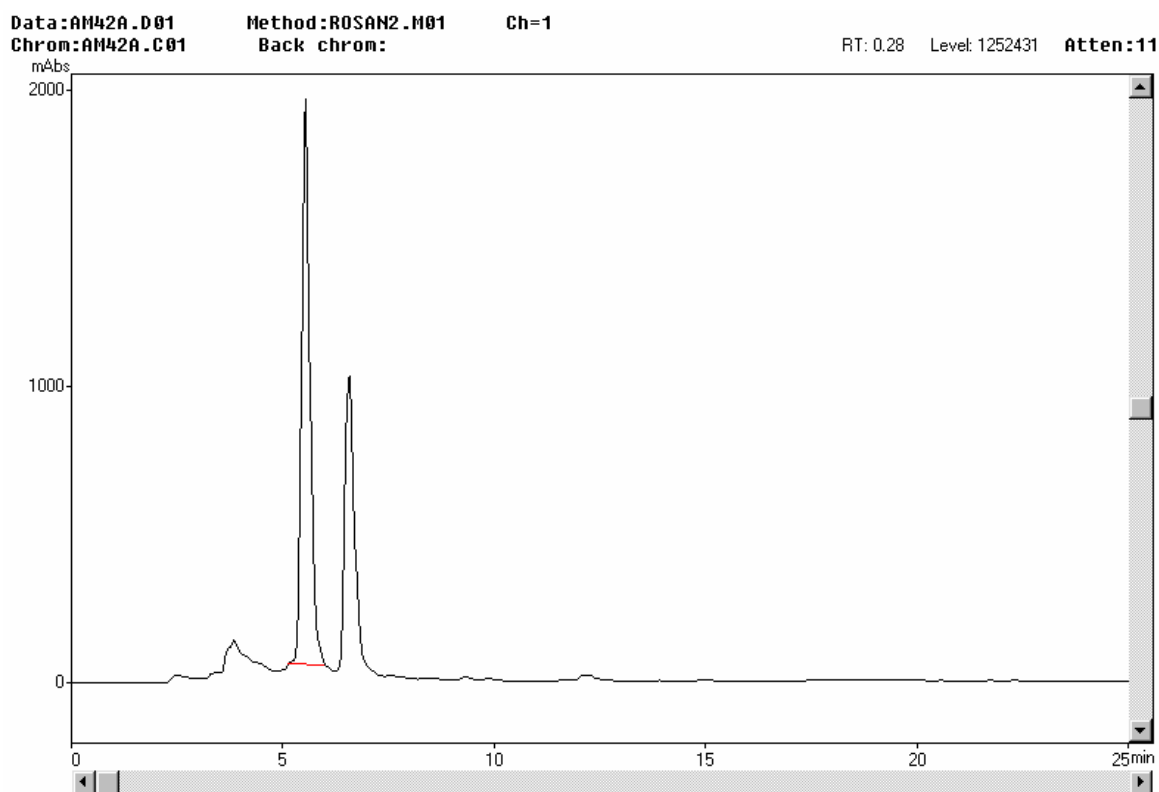
Condições: Coluna Novapak Water C18; 250 x 4.6 milímetros, partícula 5 μ m; eluição por gradiente: fase móvel metanol/ água (1:1) (0-10 min) e (7:3) de (10-20min); fluxo 1mL/min; detecção 339nm. Diluição 500 μ L amostra: 500 μ L de FM.

Figura 6: HPLC Cromatograma de tratamento TR-VIC 12 *Carbo vegetabilis* 12 CH (tm = 250,58 µg/mL).



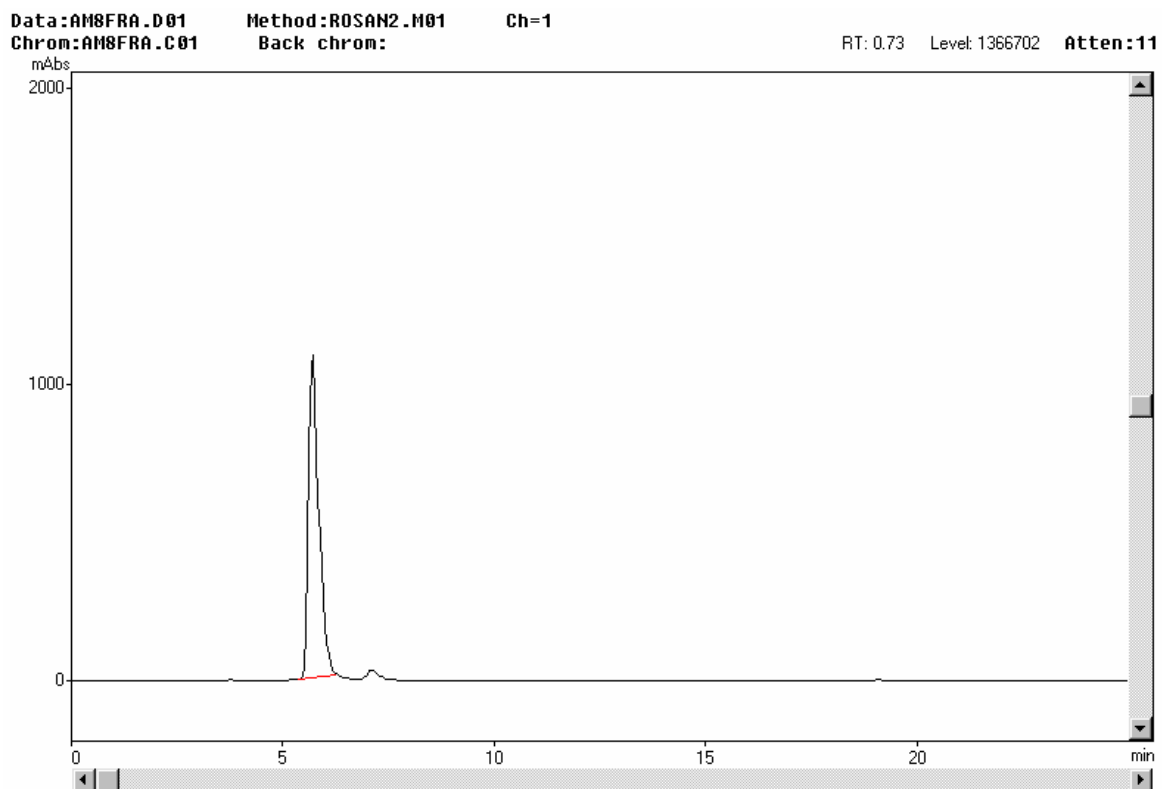
Condições: Coluna Novapak Water C18; 250 x 4.6 milímetros, partícula 5 µm; eluição por gradiente: fase móvel metanol/ água (1:1) (0-10 min) e (7:3) de (10-20min); fluxo 1mL/min; detecção 339nm. Diluição 500 µL amostra: 500 µL de FM.

Figura 7: HPLC Cromatograma de tratamento TRF-MOC 09 ($t_m = 876,31$ $\mu\text{g/mL}$).



Condições: Coluna Novapak Water C18; 250 x 4.6 milímetros, partícula 5 μm ; eluição por gradiente: fase móvel metanol/ água (1:1) (0-10 min) e (7:3) de (10-20 min); fluxo 1mL/min; detecção 339nm. Diluição 500 μL amostra: 500 μL de FM.

Figura 8: HPLC Cromatograma de tratamento TFR-MOC 08 ($t_m = 56052,03$ $\mu\text{g/mL}$).



Condições: Coluna Novapak Water C18; 250 x 4.6 milímetros, partícula 5 μm ; eluição por gradiente: fase móvel metanol/ água (1:1) (0-10 min) e (7:3) de (10-20 min); fluxo 1mL/min; detecção 339nm. Diluição 100 μL amostra: 900 μL de FM.

Quadro 8: Teores médios de rutina ($\mu\text{g/mL}$) em plantas de *Dimorphandra mollis* cultivadas em Viçosa (MG) correspondentes aos tratamentos TR-VIC 02 a TR-VIC 16.

TRATAMENTOS	MÉDIAS	COMPARAÇÕES	
		Tukey	Dunnnett
TR-VIC 15 – <i>D. mollis</i> fungi 6 CH	338,46	A	*
TR-VIC 01 – Água destilada (TESTEMUNHA)	276,86	AB	
TR-VIC 12 – <i>Carbo vegetabilis</i> 12 CH	250,58	AB	
TR-VIC 11 – Etanol 70% 12 CH	206,90	ABC	*
TR-VIC 10 – Etanol 70% 6 CH	149,37	BCD	*
TR-VIC 09 – <i>Sulphur</i> 12 CH	127,92	BCD	*
TR-VIC 14 – <i>C. brasiliensis</i> frutis 12 CH	121,37	CD	*
TR-VIC 04 – <i>Phosphorus</i> 6 CH	87,52	CD	*
TR-VIC 05 – <i>Phosphorus</i> 12 CH	56,74	CD	*
TR-VIC 02 – Água destilada 6 CH	52,88	CD	*
TR-VIC 16 – <i>D. mollis</i> fungi 12 CH	52,88	CD	*
TR-VIC 08 – <i>Sulphur</i> 6 CH	39,34	D	*
TR-VIC 06 – <i>Cyrtopodium</i> 1D	21,34	D	*
TR-VIC 03 – Água destilada 12 CH	9,20	D	*
TR-VIC 07 – <i>Kali phosphoricum</i> 12 CH	7,30	D	*
TR-VIC 13 – <i>C. brasiliensis</i> frutis 6 CH	0,00*	D	*

- não detectados

As médias seguidas de uma mesma letra não variam estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As médias com asterisco (*) diferiram da testemunha (água destilada – TR-VIC 01) ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Dunnnett.

Quadro 9: Teores médios de Rutina, ($\mu\text{g/mL}$) em folhas de *Dimorphandra mollis* correspondentes aos tratamentos TRF-MOC 01 a TRF-MOC 12.

TRATAMENTOS	MÉDIAS
TRF – MOC 09	876,31 A
TRF – MOC 01	874,81 A
TRF – MOC 08	716,60 A
TRF – MOC 05	665,29 A
TRF – MOC 02	660,11 A
TRF – MOC 06	653,32 A
TRF – MOC 11	618,63 A
TRF – MOC 04	490,78 A
TRF – MOC 03	458,46 A
TRF – MOC 10	457,83 A
TRF – MOC 07	318,87 A
TRF – MOC 12	257,29 A

As médias seguidas de uma mesma letra não variam estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quadro 10: Teores médios de Rutina ($\mu\text{g/mL}$) em frutos de *Dimorphandra mollis* correspondentes aos tratamentos TFR-MOC 01 a TFR-MOC 12 .

TRATAMENTOS	MÉDIAS
TFR – MOC 08	56052,03 A
TFR – MOC 12	55753,46 A
TFR – MOC 07	49701,83 A
TFR – MOC 04	48634,74 A
TFR – MOC 02	47729,89 A
TFR – MOC 01	47064,55 A
TFR – MOC 05	43355,13 A
TFR – MOC 09	38222,32 A
TFR – MOC 10	34388,21 A
TFR – MOC 03	33756,02 A
TFR – MOC 11	33170,04 A
TFR – MOC 06	25720,36 A

As médias seguidas de uma mesma letra não variam estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.1.6. Extração e Processamento de rutina em extrato aquoso

O cálculo de rendimento foi feito tendo como base a massa inicial de pó de frutos de *D. mollis* (10g) obtendo-se teores médios de 35% ($t_m = 35\%$) e no doseamento de flavonóides de 29,08%.

Análises cromatográficas por camada delgada (CCD) tendo como padrões Rutina ($R_f = 0,54$) e Quercetina ($R_f = 0,68$), com fase estacionária

sílica-gel (Merck GF 254, Alugram SilG UV 254, Polygram SilG UV com espessura de 0,250 mm), fase móvel MEOH/ ACEOT (25:75) e revelador AlCl_3 foram positivos em PPt-PO ($R_f = 0,56$ e $0,69$).

4.1.7. Extração e Processamento de rutina em extrato metanólico

O cálculo de rendimento foi feito tendo como base a massa inicial de pó de frutos de *D. mollis* (150 g) obtendo teores médios de 38,38% ($t_m = 38,38\%$) e no doseamento de flavonóides de 32,51%.

Análises cromatográficas por camada delgada (CCD) tendo como padrões Rutina ($R_f = 0,54$) e Quercetina ($R_f = 0,68$), com fase estacionária sílica-gel (Merck GF 254, Alugram SilG UV 254, Polygram SilG UV com espessura de 0,250 mm), fase móvel MEOH/ ACEOT (25:75) e revelador AlCl_3 foram positivos em PPt-PO ($R_f = 0,53$ e $0,65$).

4. 2. DISCUSSÃO

4. 2.1 Triagem fitoquímica nos tratamentos TF-MOC, TFR-MOC, TRS-MOC, TR-VIC, TR-PO e em TR-VIC 01 a TR-VIC 16

A triagem fitoquímica é a metodologia mais utilizada na obtenção de informações da constituição química de plantas permitindo inferir quais as possíveis substâncias que estão presentes na amostra e origem biossintética. O conhecimento dos constituintes químicos de diversas partes da planta favorece o seu uso sustentável e contribui na sua preservação.

A cromatografia em camada delgada (CCD) é utilizada com frequência na análise vegetal, em virtude da simplicidade, rapidez, sensibilidade e pelo rigor dos resultados, sendo utilizados na identificação e na padronização dos fármacos pelas farmacopéias. São fixadas condições tais como adsorventes, espessura das placas, umidade, eluentes, que determinam a velocidade de migração de cada constituinte, expresso pelo valor numérico, R_f , que exprime a relação entre a distância percorrida pela substância em análise e pelo solvente. No entanto, não se têm dados investigativos sobre o screening fitoquímico em cromatografia de camada delgada (CCD) em *D. mollis*. É sabido, por HPLC (cromatografia líquida de alta afinidade), que em frutos de *D. mollis* estão presentes compostos fenólicos como os flavonóides rutina e quercetina e

taninos em sua casca (FERREIRA *et al*, 2001; CHAVES *et al*, 2001; SILVA,S *et al*, 2003; FARIA *et al*, 2005; PEDRIALI *et al*, 2005).

O uso de preparados homeopáticos interfere no metabolismo secundário de *D. mollis* inferindo em alteração dos níveis de compostos fenólicos (quadro 4). É interessante salientar que as escolhas dos preparados homeopáticos decorrem de pressuposições e resultados de ANDRADE *et al* (2001); ARMOND *et al* (2004); CASTRO *et al* (2003), BONATO *et al* (2005); SUKUL *et al* (2006, 2002); DATTA (2006); HAMMAN *et al* (2003); BETTI *et al* (2003a, 2003b).

A utilização de água destilada como testemunha, seus preparados dinamizados em 6 CH e 12 CH, bem como de Etanol 70% em 6 CH e 12 CH teve como intenção evitar contestações a respeito da possível ação da água e do álcool etílico dinamizados como fatores de ação ou inibição de taxa de compostos secundários.

O uso dos medicamentos homeopáticos *Phosphorus* 12 CH, *Kali phosphoricum* 12 CH e *Carbo vegetabilis* 12 CH, nas condições dessa análise, favoreceu aumento da síntese de flavonóide (rutina – 3-rutinosídeo quercetina), o que pode ser interessante em cultivos de subsistência em agricultura familiar e na recuperação de sistemas agroflorestais visando o manejo sustentado e conseqüente extração de rutina. Outro aspecto interessante a ser considerado é a dinamização 12 CH, que agiu como indutora-seletiva de rutina em preparações homeopáticas, ressaltando que em *Carbo vegetabilis* 12 CH (TR-VIC 12) detectou-se apenas rutina.

Todos os tratamentos positivos a quercetina, também foram positivos em rutina e ácido tânico, afora em TR-VIC 03 (Água destilada 12 CH). O uso de Água destilada 12 CH, nas condições dessa análise, possibilitou a produção

isolada de flavonóides (rutina e quercetina). Especificamente quando se utilizou o preparado homeopático Água destilada 12 CH relacionou-se ao processo de diluições e dinamizações sucessivas em Homeopatia que visam diminuir a massa molecular (matéria) e aumentar o estado energético vibracional das moléculas, resgatando a informação.

O efeito do solvente (água) pode ser entendido em função da teoria do estado energético de transição, onde o aumento da constante de velocidade devido a um fator entálpico (diluições e dinamizações) pode resultar no aumento da entalpia do estado inicial e decréscimo no estado de transição e liberação energética vibracional (SILVA & JONES JR, 2001).

A segunda lei da Termodinâmica determina que “quanto maior a desordem do sistema, maior entropia”. A entropia é associada ao grau de desordem, mede a parte da energia que não pode ser transformada em trabalho, é função de estado cujo valor cresce durante o processo natural em algum sistema fechado, como acontece quando é dinamizada e succusionada a preparação homeopática.

As relações preparado homeopático/ plantas/ entropia/ entalpia podem ser relacionadas à Teoria dos Sistemas (BERTALANFFY, 1968): “A vida é um estado energético onde o caos (entropia) mantém interação dinâmica e sinérgica com a ordem (entalpia). O equilíbrio da energia vital está no estado entálpico (energia suficiente) e o desequilíbrio é o estado entrópico (energia insuficiente)”, aplicado ao contexto biológico dos sistemas. Portanto a mutação do sistema é a falha na transmissão da mensagens codificadas como mecanismo de defesa, surgindo ou aumentando a produção de compostos

secundários; mostrando que a entropia (desordem da informação) em pequena escala também ajuda no melhoramento/ aprimoramento dos sistemas.

Neste sentido, pode-se explicar a ação da água destilada 12 CH, segundo PORTO *et al* (1998) que analisam as alterações das propriedades biológicas e físico-químicas da água induzidas por campos eletromagnéticos e relatam que a ausência de soluto (partículas) e mudanças no comportamento da água podem ser devido à distribuição de *clusters* de diversos tamanhos e formas na água líquida, destacando que a explicação mais plausível a esse tipo de comportamento seja a reorganização das moléculas de água durante o processo de magnetização. Esclarece que o movimento de um íon, partindo de um estado estacionário, devido a um campo elétrico aplicado, pode ser obtido relacionando-se a FEM (força eletro-motriz), à soma dos retardamentos causados pelo atrito; pela assimetria e eletroforese, que são intensificados à medida que a concentração eletrolítica aumenta, o que causa aumento das forças de retardamento e diminuição da condutividade; logo quanto mais diluída a solução, maior a energia vibracional, maior o campo energético e menor a concentração eletrolítica, como ocorreu em água destilada 12 CH (1×10^{-12} dinamizada e diluída).

Ainda, HARARI & LIN (1989) trabalhando com água magnetizada utilizaram no crescimento de melões e mostraram que o tamanho, o número de frutas e o conteúdo de açúcar (metabolismo primário) nos melões irrigados com água tratada magneticamente foram significativamente maiores do que aqueles irrigados com água normal (sem tratamento magnético).

A presença de ácido tânico somente no tratamento TR-VIC, dentre os tratamentos TF-MOC, TFR-MOC, TRS-MOC e TR-PO e posteriormente em

TR-VIC 01 a TR-VIC 16, exceto em TR-VIC 03 (Água destilada 12 CH); TR-VIC 06 (*Cyrtopodium* 1D); TR-VIC 12 (*Carbo vegetabilis* 12 CH) e TR-VIC 13 (Pequi 6 CH – *Caryocar brasiliensis* frutis) pode ser relacionada à necessidade de defesa da espécie frente aos tratamentos homeopáticos caracterizando patogênese. Entende-se por patogênese nesta situação, o aparecimento de compostos novos, não necessariamente presentes na espécie, quando analisada isoladamente como ocorreu após análise dos frutos (TFR-MOC), das folhas (TF-MOC) e do pó (TR-PO). Segundo BONATO (2004) patogênese é o padrão de desequilíbrio energético ocasionado pelo medicamento homeopático em plantas sadias.

MONTEIRO *et al* (2005) lembram que *D. mollis* possui propriedades tanantes, e por tais, denominada popularmente como falso barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville) sendo muitas vezes, erroneamente coletada como tal, contudo SANTOS *et al* (2002) ao analisar taninos em *D. mollis*, relatam a presença de catequina, epicatequina (monômeros) e de polímeros condensados em cascas, não detectando em folhas, que continham apenas glicosídeos flavônicos.

Não há relatos de cardiotônicos em plantas adultas ou em frutos de *D. mollis* como ocorreu nos tratamentos TF-MOC; TFR-MOC e TR-PO, que correspondem a folhas, frutos e ao pó de frutos. Entretanto SANTOS *et al* (1975) relatam que os frutos e as folhas são usados como forrageira ao gado, porém, podem causar intoxicação em bovinos, levando-os até a morte. FARIA *et al* (2005) destacam que as favas são adocicadas e tóxicas aos bovinos, podendo provocar aborto (rutina) e mortalidade. Os heterosídeos cardiotônicos como a digitalina e digitoxina presentes em *Digitalis purpurea* ou *D. lanatta*, são tônicos

cardíacos que têm dose letal ($DL_{50} = 0,18 \text{ mg/kg}$), com ação imediata (FOERSTER *et al*, 1966 – THE MERCK INDEX, 2003). Dessa forma, a presença de heterosídeos cardiotônicos, mesmo em pequenas proporções, pode ser pertinente à letalidade ou intoxicação com folhas e frutos.

Os demais compostos detectados como taninos e flavonóides eram esperados em todos os tratamentos exceto em sementes (TRS-MOC) que são constituídas de galactomanano, estaquiiose, rafinose e sacarose (carboidratos de reserva) que se decompõem em galactose, glicose e frutose durante a germinação (LIMA & BORGES *et al*, 2002).

4.2.2 Quantificação de flavonóides em diversos solventes orgânicos

Rutina (flavonol) (figura 9) é substância sólida, amarela clara, e altamente solúvel em água, muito mais solúvel que a quercetina (porção aglicona) (THE MERCK INDEX, 2005). É importante lembrar que a ausência de cadeia glucídica ocasiona o acréscimo da solubilidade nos solventes menos polares (COSTA & PROENÇA DA CUNHA, 2000).

A caracterização, extração, identificação e dosagem dos flavonóides compreendem reações cromáticas relacionadas ao grupo cromóforo (cromona) ou com a presença de hidroxilas ligadas a núcleos aromáticos. A extração é feita com metanol a quente; ou outro solvente de maior polaridade. A extração do rutósido é feita com solventes hidratados, a quente (MEOH 70%, ETOH 70%, Acetona, Éter: Água) (COSTA & PROENÇA DA CUNHA, 2000), como propostos nos tratamentos TR-SOLV 02, TR-SOLV 04, TR-SOLV 13.

A escolha dos solventes nos tratamentos TR-SOLV 01 a TR-SOLV 16 seguiu a usualidade em extrações orgânicas, a solubilidade e polaridade. A

prioridade de escolha de determinado solvente não pode ser analisada apenas por suas características macroscópicas; tais como constantes físicas como densidade, constante dielétrica, índice de refração; como também devem ser consideradas as características descontínuas que consistem nas interações entre moléculas de solventes (SILVA & JONES JR, 2001).

Solubilidade é importante propriedade físico-química na determinação da forma farmacêutica e cosmética adequada. A escolha dos tratamentos (TR-SOLV 01 a 16) baseou-se na ordem decrescente de polaridade e respectivas constantes dielétricas (D ou ϵ) a 25⁰C dos solventes: Água (79) > Ácidos orgânicos (Ácido acético) > amidas (N,N-dimetilformamida – 37) > álcoois (Metanol – 32,63; Etanol – 25) > aminas (Trietilamina, Piridina) > aldeídos, cetonas (Acetona – 20,7) > ésteres (Acetato de etila – 6) > haletos (Clorofórmio 4,8; Diclorometano – 4,6) > éteres (Éter dietílico – 4,3) > aromáticos (Benzeno – 2,27; Tolueno – 2,4) > alcanos (Hexano – 1,9) uma vez que quanto maior a constante dielétrica, maior a capacidade de solvatar cargas opostas em dois compostos.

Solventes, como metanol, etanol, propanol, acetona, acetato de etila dimetilformamida e suas combinações são usados na extração de compostos fenólicos combinados ou não com várias proporções de água. Por exemplo, rutina e ácido clorogênico são extraídos eficientemente em ervas de buckwheat (trigo sarraceno, *Fagopirum sagittatum*, *F. esculentum* – Polygonaceae) por maceração com etanol 30% e agitação por 2 horas (NACKZ & SHAHIDI, 2006).

A utilização de água como solvente, presente nesta análise no tratamento TR-SOLV 16, usualmente era descartada nos extratos orgânicos devido à insolubilidade ou incompatibilidade de alguns compostos e extração

de outros compostos indesejáveis (KING *et al*, 1992; LUBINEAU *et al*, 1994). Embora o uso de solventes orgânicos na elaboração de extratos vegetais seja convencional, seu emprego implica em questões relativas a toxicidade ambiental e farmacológica, além da periculosidade existente ao manipulá-los (SILVA & JONES JR, 2001). Assim, a substituição dos solventes orgânicos tradicionais por água ou misturas com água, como nos tratamentos TR-SOLV 01 a TR-SOLV 16, é de grande interesse pelo menor impacto ambiental, custo operacional, periculosidade e toxicidade.

A ordem de polaridade dos solventes aumenta de acordo com o tamanho da cadeia carbônica, número de hidroxilas, e constante dielétrica. Nos tratamentos TR-SOLV 01 a TR-SOLV 16 tem-se a seguinte relação de polaridade decrescente: água destilada (testemunha – H₂O); Metanol/ Água (70% e 50%); Metanol absoluto (CH₃OH); Etanol/ Água (70% e 50%); Etanol absoluto (CH₃-CH₂OH); Acetona/ Água (50% e 75%); Acetato de Etila/ Metanol (50% e 75%), Acetato de Etila (CH₃-COO-CH₂CH₃); Acetona (CH₃-CO-CH₃); Diclorometano/ Acetato de etila (50% e 75%) e Diclorometano P.A. (Cloreto de Metileno – CH₂Cl₂).

Pela rutina ser muito solúvel em água (testemunha – TR-SOLV 16) acreditava-se que teria maior extração de flavonóis em meio aquoso, no entanto, as soluções hidratadas que englobam Acetona/ Água como nos tratamentos TR-SOLV 15 (Acetona/ Água 50:50) e TR-SOLV 14 (Acetona/ Água 75:25) foram mais eficientes. Tal fato pode se relacionado à estrutura química da rutina (figura 9), a presença da água na mistura de solventes que atuam no aumento da permeabilidade celular e facilita as interações hidrofóbicas, e, a presença de quercetina, que pôde ser comprovada em

análise por CCD, na triagem fitoquímica, onde no tratamento TR-PO foram detectados os flavonóides rutina e quercetina (vide quadro 1). É prioridade lembrar que as agliconas (quercetina) têm solubilidade aumentada nos compostos menos polares, hipótese testada em Diclorometano TR-SOLV 12 e na mistura de Acetato de etila e Diclorometano (50:50) e (25:75) TR-SOLV 10 e TR-SOLV 11.

Outra consideração implicada nos extratos em análise é que no TR-SOLV 15 – ACONA/ H₂O (50:50) tem-se 12,88 e 4,76 maior teores de flavonóis do que no solventes isolados TR-SOLV 13 – ACONA e TR-SOLV 16 – H₂O, respectivamente, comprovando a influência do meio aquoso na eficácia do processo extrativo (quadro 3). Relação de similaridade de aumento dos teores pode ser traçada em relação aos demais tratamentos com solventes P.A. e suas misturas, como pode ser comprovado no quadro 3 onde se tem na solução de Etanol 50 % (TR-SOLV 05) 3,26 vezes maior teor que em Etanol P.A. (TR-SOLV) diferindo significativamente entre si; e 1,64 em Metanol 50% (TR-SOLV 03) em relação a Metanol P.A (TR-SOLV 01), não havendo diferença entre estes tratamentos. O aumento da polaridade permite a extração de compostos mais polares como os biflavonóides.

Segundo JAYAPRAKASHA *et al* (2001) em análise da atividade antioxidante e dos teores de flavonóis de extratos de sementes de uvas (*Vitis vinifera*) nos solventes Acetona P.A., Acetato de etila P.A., Metanol P.A., Acetato de etila/ Água (9:1) (17:3) e (4:1), houve maior eficácia em teor médio de flavonóis (tm) em Acetato de etila/ Água (17:3) (tm = 54,0 ± 4,86%), seguido de Acetato de etila/ Água (4:1) e (9:1) com teores médios de 50,5 ± 4,35% e 43,0 ± 3,34% respectivamente concluindo que o emprego de solventes simples

Acetona ($t_m = 15,0 \pm 1,35\%$), Acetato de etila ($t_m = 35,0 \pm 2,10\%$), Metanol ($t_m = 16,0 \pm 2,71\%$) não é tão eficiente na extração de flavonóis em relação à mistura de solventes como Acetato de Etila e Água, atribuindo a eficácia do processo a presença da água que aumenta a permeabilidade dos tecidos nas sementes facilitando o transporte de moléculas por difusão, o que também ocorreu nos tratamentos TR-SOLV 01 a TR-SOLV 16.

4.2.3 Doseamento de compostos fenólicos em folhas, frutos e plantas cultivadas de *Dimorphandra mollis*.

O estudo dos compostos fenólicos, de um modo genérico, e especificamente dos ácidos fenólicos, considera-se de máximo interesse por se encontrarem ligados à maior parte dos fenômenos biológicos, botânicos, genéticos e taxonômicos. Devido à grande diversidade de processos metabólicos na formação das substâncias fenólicas, é difícil estimar o seu teor quantitativo nos tecidos das plantas de modo absoluto (EVARISTO & LEITÃO, 2001).

Normalmente, cada espécie vegetal está associada à determinada classe de polifenóis mais importante, cujos teores aumentam com a idade e variam com o desenvolvimento vegetativo da planta (EVARISTO & LEITÃO, 2001).

A maioria dos compostos fenólicos não é encontrada no estado livre na natureza, mas na forma de ésteres ou de heterosídeos sendo, portanto, solúveis em água e em solventes orgânicos polares (SIMÕES *et al*, 1999). A extração com metanol nos tratamentos TR-VIC 01 a 16, TRF-MOC 01 a 12 e TFR-MOC 01 a 12 mostrou-se eficiente, com teores médios relativamente altos (quadros 4,5 e 6), em conformidade com de SANTOS *et al* (2002) que

determinaram os teores de fenóis totais em folhas e cascas de *D. mollis* tendo $25,3 \pm 10,8$ mg/ g e $59,9 \pm 0,6$ mg/ g respectivamente.

Em Fabaceae (Leguminosae), principalmente em Caesalpinaceae, têm-se altos níveis de compostos fenólicos principalmente em cascas e frutos. Ao analisar folhas provenientes de áreas de coleta do Cerrado de Montes Claros (TRF-MOC 01 a 12) verificaram-se teores médios ($t_m = 126,70$ µg/mL e $118,91$ µg/mL), menores aos encontrados em TR-VIC 01 (testemunha) – H₂O ($t_m = 179,35$ µg/mL), no entanto, tais resultados viabilizam a utilização de folhas como fonte substituinte de compostos fenólicos, destacando que a sua coleta é menos agressiva à planta, já que as cascas quando coletadas de forma errônea podem levar a morte da planta; outro fator que merece destaque é que as folhas estão nas plantas durante todo o ano ao contrário de frutos.

Tais resultados confirmam os estudos de MONTEIRO *et al* (2005) que avaliaram em extratos metanólicos pelo método de Folin-Ciocalteu, o teor de taninos e fenóis totais em três espécies medicinais arbóreas da Caatinga onde não ocorreram diferenças significativas entre cascas e folhas das espécies testadas, propondo o sistema de manejo e extração que promova, em determinadas épocas, a intercalação dos recursos que permitam reduzir a pressão sobre as cascas, exploradas permanentemente como fonte de fenólicos.

As variações individuais entre tratamentos provenientes de regiões de Cerrado nos tratamentos (TRF-MOC e TFR-MOC) podem ser atribuídas à idade das plantas, procedência, insolação e mecanismo de defesa contra herbivoria (COLEY & BARONE, 1996; THOMSON, 1993; HELDT, 1997; KOZLOWSKI & PALLARDY, 1997; MISRA *et al*, 1999), contudo não houve diferenças significativas

entre as médias de folhas (TRF-MOC), diferindo significativamente em frutos (TFR-MOC).

Considerando que os frutos (TFR-MOC 01 a 12) provêm das mesmas plantas adultas de onde foram retiradas as folhas totalmente expandidas (comprimento médio de 366 mm) (tratamentos TRF-MOC 01 a 12) variações semelhantes nos teores de compostos fenólicos entre tratamentos eram esperadas, no entanto, ocorreu apenas em TRF-MOC 12 e em TFR-12 ($t_m = 126,70 \mu\text{g/mL}$ e $t_m = 1404,25 \mu\text{g/mL}$), correspondendo ao maior quantidade de compostos fenólicos, localizada na área Pt-PO1 (292), podendo ser matriz de estudo de germoplasma, já que compostos fenólicos são produzidos rapidamente e se acumulam após a infecção, especialmente em variedades resistentes (CAMPOS *et al*, 2004).

MACHEIX *et al* (1986) afirmam que há distinção entre cultivares e estádios de desenvolvimento das plantas no que tange o acúmulo de compostos fenólicos e a resposta aos ferimentos. A ativação do metabolismo de fenóis após infecção, como mecanismo de defesa, segundo esses autores, pode levar mais ou menos tempo, dependendo da formação de moléculas mais simples e de sua integração com estruturas químicas mais complexas, como a ligninas. Este fenômeno, de acordo com BELL (1981), pode ser interpretado como parte da indução de resistência das plantas.

O aumento da resistência da espécie como mecanismo de defesa a herbivoria (floração), em diversas condições edáfico-climáticas (resposta a radiação/ insolação/ tempo/ período climático/ ciclo vegetativo da espécie/ estádio de desenvolvimento) foi verificado por FONSECA *et al* (2001) ao analisarem os teores de taninos em *Porophyllum ruderale* por 5 épocas, a

partir de 60 dias de plantio, com intervalos de 15 dias, realizando-se a colheita às 7 horas da manhã; 13 horas e 18 horas, no período de Outubro de 2000 (primavera/ verão) e às 7 horas da manhã em março a maio de 2001(outono/ inverno) classificam em os rendimentos de taninos em médios na colheita realizada às 7 horas, altos nas colheitas realizadas as 13 e 18 horas (2000) e em baixos nas épocas I (60 dias), II (75 dias) e III (90 dias), e em médios nas épocas IV (105 dias) e V (120 dias) (2001) e concluem que aos 120 dias de idade constatou-se maior teor de tanino (plena floração).

Os tratamentos (preparados e medicamentos homeopáticos) escolhidos nesse experimento fundamentam-se nos princípios da Homeopatia: A lei dos semelhantes – “*Similia similibus curantur*”; Diluições infinitesimais e Uso de um único preparado homeopático. A melhor compreensão dos princípios acima pode ser fundamentada pela Lei da Ação e Reação de Newton onde “a toda ação corresponde a uma reação igual em sentido contrário”. Na compreensão deste postulado, o preparado homeopático atuará impulsionando o vegetal a produzir efeitos no sentido de defesa e manutenção da sua vitalidade, em menor ou maior intensidade.

Teores de compostos fenólicos em plantas cultivadas com preparados homeopáticos (TR-VIC 01 a 16) como o *Cyrtopodium* 1D e Pequi 6 CH (*Caryocar brasiliensis* frutis), TR-VIC 06 e 13, respectivamente, tiveram os mais baixos teores de compostos fenólicos. Atribuí-se tal fato a pouca similaridade desse preparados a *D. mollis*. Já os tratamentos TR-VIC 09 – *Sulphur* 12 CH (810,14 µg/mL), seguido de TR-VIC 05 – *Phosphorus* 12 CH (tm = 709,83 µg/mL); TR-VIC 11 – ETOH 12 CH (tm = 595,71 µg/mL); TR-VIC 10 – ETOH 6 CH (tm = 536,70 µg/mL); TR-VIC 16 – Fungos 12 CH (*Dimorphandra mollis*

fungi) (530,78µg/mL); TR-VIC 03 – H₂O 12 CH (tm = 446,80µg/mL) e TR-VIC 08 – *Sulphur* 6 CH (tm = 426,23 µg/mL) tem alta similaridade com *D. mollis* no que concerne à produção de compostos fenólicos produzido como mecanismo de defesa (desequilíbrio energético levaria a aumento da produção de compostos secundários).

Por similaridade (*Simillium*) entende-se, o aumento imediato da ação de resposta de dado tratamento em relação à testemunha, no caso, compostos fenólicos. Segundo HAHNEMANN (1810) nos organismos vivos, qualquer afecção dinâmica mais fraca é extinta de maneira durável pela mais forte; e se esta, difere em espécie, se assemelha muito em manifestação. A ação do *simillium* orientará a força vital a fim de atingir o equilíbrio e defesa do vegetal da melhor forma possível (HAHNEMANN, ORGANON, PARÁGS 12, 16, 25 e 26).

Segundo BONATO (2004) o estresse fisiológico em plantas é devido a condições externas que afetam o crescimento, desenvolvimento e produtividade, relacionando-o a condições bióticas ou abióticas que afetariam a energia vital resultando em distúrbio fisiológico. O mecanismo de escape de tais situações em plantas seria no sentido de produzir efeitos opostos a ação dos agentes inóspitos, em maior ou menor intensidade de acordo com suas possibilidades biológicas, visando o reequilíbrio de sua energia vital. Destaca ainda, que a resposta energética ocorre em níveis fisiológicos ou bioquímicos se os agentes agressores forem de densidade quantitativa maior, como 6 CH e 12 CH, e no nível energético se forem qualitativos.

Nos tratamentos TR-VIC 14 - Pequi 12 CH (*C. brasiliensis* frutis) e TR-VIC 13 - Pequi 6 CH (*C. brasiliensis* frutis); TR-VIC 05 - *Phosphorus* 12 CH e TR-VIC 04 - *Phosphorus* 6 CH, os teores de compostos fenólicos são 130,0 e

4,7 vezes superiores em 12 CH em relação a 6 CH, respectivamente, indicando que o aumento da dinamização leva a tentativa de defesa do vegetal, buscando reorganizar a força vital. BONATO (2004) hipotetizou que, em plantas, com base em experimentações de frequência e comprimento de onda (Física Quântica), a medida que se dinamiza o preparado homeopático, muda-se a amplitude do comprimento de onda e a frequência permanece constante. Inferiu também que quanto mais alta a dinamização maior a amplitude da onda, porém não significando que determinado preparado homeopático cause respostas fisiológicas crescentes e tão pouco haja linearidade em tais respostas.

Comprovando tal teoria, ARRUDA *et al* (2005) estudando plantas adultas floridas e não floridas de *Achilleia millefolium* tratadas com o preparado homeopático *Sulphur* 3 CH nos períodos de 5, 9 e 12 dias verificaram que a concentração de compostos fenólicos aumentaram nos quinto e no nono dia, após aplicação, tendo, as plantas floridas maior teor (2,18; 1,8 e 1,87 vezes maior na testemunha não florida, testemunha florida e plantas não floridas, respectivamente). Atribuem a não variabilidade dos teores após o décimo segundo dia a Lei de Royal, em que baixas dinamizações tem efeito rápido, porém, não duradouro e não linearidade das respostas. Concluem que tal aumento proporcionado pelo preparado homeopático estaria relacionado aos ciclos vegetativos da espécie, uma vez que em período de floração, mecanismos naturais de defesa a herbivoria estariam mais ativos, conseqüentemente com maior produção de fenóis totais.

FIDELIS *et al* (2003) trabalhando com a linearidade de resposta comprovaram que em *Sphagneticola trilobata*, ao usarem *Sulphur* 3 CH, as concentrações de compostos fenólicos (taninos) aos 30 dias que era de 1,09%

e aumentava 77 vezes aos 120 dias (1,93%). Ainda em *S. trilobata*, NUNES *et al* (2005) avaliaram a resposta à preparação homeopática *Sulphur*, quantificada pelo teor de tanino no tecido foliar, estudando o efeito aditivo da dose e tempo de persistência da homeopatia; efeito da aplicação em relação à posição das folhas; potências e diluições das soluções aplicadas mostrando que a aplicação da homeopatia causou oscilações nos teores de taninos nas folhas, devido ao fenômeno rítmico, com alterações no metabolismo primário e secundário, indicando ressonância entre a planta e o preparado homeopático, com tempo de persistência durando 10 dias. Conclui ainda, que a aplicação nas folhas do ápice a intensidade de resposta na produção de taninos, tende a ser maior e diminuir com o tempo (10 dias) e houve ausência de efeito aditivo.

4.2.4 Doseamento de flavonóis em folhas, frutos e plantas cultivadas de *Dimorphandra mollis*

Doseamento por espectrofotometria envolve processos elaborados que são expressos pela intensidade da cor desenvolvida por cada classe de compostos e da quantidade extraída de compostos mediante determinados reagentes. A cor da substância não é característica física desta, pois depende do tipo de luz incidente, solventes e reagentes utilizados na sua extração; os flavonóides e flavonóis, por exemplo, reagem com cloreto de alumínio e vanilina-sulfúrico-clorídrica respectivamente, formando complexos de cor amarela, lidos em 425nm e 500nm (COSTA, 2000).

A quantificação de compostos fenólicos e flavonóides em plantas, nessa década, têm tido relevante importância devido a suas propriedades antioxidantes, anticarcinogênicas e cardiovasculares. Desde o século XIX, no

entanto, sabe-se que na medicina tradicional, a maioria das plantas hoje estudadas como potencial fonte de flavonóis, já eram utilizadas como medicamentos no combate a moléstias infecto-urinárias, estomacais e intestinais (CHEN & ZUO, 2006). No século passado, *D. mollis* era usada pelos habitantes do Cerrado, como forrageira de animais, em curtumes e como enchimento de almofadas, selas e cangalhas (PIO CORRÊA, 1984). Hoje, os coletores do norte de Minas acreditam que os frutos são utilizados pelas indústrias na fabricação de ração de suínos; sem uso medicinal, pois é letal a bovinos. Até os meados de 1990, era comum, que se cortassem as árvores adultas e rebrotas das pastagens ocasionando a destruição do hábitat, a formação de distribuição restrita e de populações isoladas, fatores determinantes na sua inclusão na Listas Amarela das espécies ameaçadas de extinção (IBAMA, 2006; COPAM, 1997, DEPRN, 1998).

Os flavonóis não ocorrem livremente nos vegetais, estando quase sempre disponíveis na forma de O-glicosídeos, como ocorre em *D. mollis*, onde o glicosídeo (rutina) após reação de hidrólise libera a aglicona (quercetina) e o açúcar.

A quantificação de flavonóis nos tratamentos (TRF-MOC, TR-VIC e TFR-MOC) e o rendimento do processo estão interligados aos solventes adotados na extração desses e na metodologia de doseamento de flavonóis.

Ao se escolher a metodologia proposta por JAYAPRAKASHA *et al* (2001) e de BUTLER *et al* (2002) levou-se em conta a praticidade da análise e a capacidade que os flavonóis têm de reagir com a vanilina clorídrico-sulfúrica, revelador específico a meta-fenóis (MONTEIRO *et al*, 2005) formando compostos coloridos (flavonóis possuem grupos cromóforos que absorvem radiação

eletromagnética), e aumentando a conjugação dos anéis aromáticos além da especificidade/ sensibilidade da metodologia a flavonóis (QUEIROZ *et al*, 2002)

O solvente e a polaridade escolhida em determinado procedimento extrativo determinam a toxicidade ou pureza do produto final, no caso rotina, acarretando também, maior ou menor teor de flavonóis. Como visualizado na análise de flavonóis em diferentes solventes polares, a análise do extrato (TR-SOLV 15) Acetona/ Água (50:50) proporcionou maior teor de flavonóis, necessitando análises residuais toxicológicas. Ainda, de acordo com PEDRIALI *et al* (2005), o aumento da solubilidade propiciaria melhora de estabilização das cores naturais que os flavonóis possuem por formar complexos moleculares com pigmentos (copigmentação), sendo que essa reação é limitada pela solubilidade dos flavonóis.

A opção por extrato metanólico vem da usualidade e praticidade em trabalhar com solventes polares e de trabalhos referência com flavonóis como JAYAPRAKASHA *et al* (2001), BERNADINI *et al* (2005); KOURI *et al* (2006); GÜLŞEN *et al* (2007), além da facilidade que teriam os produtores/ coletores de obtê-lo.

Em frutos e folhas o teor de flavonóides do TRF-MOC 10 e TFR-MOC 10 foi superior, indicando que os mecanismos de defesa, proteção e interação com o ambiente estariam mais ativados que nos demais tratamentos, sendo necessárias investigações de fitoquímicas, fitosociologias e florísticas da área Pt-290, na tentativa de averiguar outras possíveis interações (planta-ambiente, planta-animais, fatores edáficos-climáticos, variabilidade genética) que permitissem ou justificassem tal comportamento.

Não houve diferenças significativas entre os tratamentos TRF-VIC 01 a 16, exceto em TR-VIC 13 - Pequi 6 CH (*Caryocar brasiliensis* frutis). A não

variabilidade de teores de flavonóides entre os tratamentos TR-VIC 01 a 16 pode ser relacionada à estreita amplitude de resposta, necessitando estudos que propiciassem aplicações dos preparados homeopáticos em escala crescente de dinamizações com acompanhamento diário de teores de flavonóis.

O tratamento com o preparado homeopático Pequi – TR-VIC 13 não teve identificação com a espécie em estudo, ocorrendo pouca similaridade, não induzindo resposta significativa, tão pouco patogenesia, porém, dificultou o desenvolvimento da espécie, funcionando como inibidor, que homeopaticamente pode ser definido como agente causal de agravação. A escolha do tratamento Pequi seguiu indicações agronômicas de produtores locais que utilizam o fruto do pequizeiro na indução de crescimento de plantas do Cerrado e por ser também o *Caryocar brasiliensis* planta nativa do Cerrado brasileiro, rica em vitaminas e flavonóides.

4.2.5 Quantificação de rutina por HPLC em folhas, frutos e plantas cultivadas de *Dimorphandra mollis*

O isolamento de rutina de folhas, frutos e plantas cultivadas de *D. mollis* em metanol seguida do preparo da amostra em meio ácido (água pH = 3,0) promovem a hidrólise parcial da rutina em quercetina, isoquercetina e ramnose (figura 15), tais compostos são mais caros e bem mais difíceis de serem encontrados livremente na natureza. A importância de utilizar metodologia adequada no isolamento é evitar a hidrólise total da rutina. A análise por HPLC e as condições estabelecidas permitiram boa separação entre os picos facilitando a identificação da rutina ($t_r = 5,6$), conforme a figura 9.

A concentração de flavonóis nos tratamentos é diretamente proporcional à eficácia do processo de secagem, do tipo e da polaridade do solvente extrator, no caso Metanol, e do procedimento adotado em sua identificação e quantificação uma vez que, a produção do extrato metanólico em TRF-MOC, TFR-MOC e TR-VIC foi feita com 400 mg de massa seca.

Considerando que todos os tratamentos em análise TR-VIC e TRF-MOC foram secos nos mais rigorosos critérios, há de se supor as variáveis indesejáveis como excesso de umidade residual, contaminação por patógenos, alterações enzimáticas não possam estar interferindo nas análises. EM TFR-MOC torna-se mais improvável o aparecimento de interferentes, pois, o processamento da matéria-prima (frutos) é mais demorado e exige temperaturas mais altas e umidade residual muito baixa (menor que 4%, FARM. BRAS. IV, 2003).

As amostras de TFR-MOC 01 a TFR-MOC 12 têm alta concentração de rutina, confirmando o potencial da espécie *D. mollis* como fonte de obtenção de flavonóides, alcançando os frutos como no TFR-MOC 12 (292) os teores de 982,55 mg/g de massa seca, permitindo destacá-la como matriz de estudos genômicos (DNA, germoplasma, isoenzimas, variabilidade) e estudos fitotécnicos (germinação, crescimento, resistência, melhoramento).

Em TFR-MOC 08 e TRF-MOC 08, os teores de rutina em frutos e folhas foram altos, ao contrário do que observado em TRF-MOC 07 e 12 e TFR-MOC 07 e 12, onde houve maior produção em frutos e mais baixa em folhas, indicando que a produção de rutina (flavonol) está concentrada nos frutos. Tal fato pode ser visto como estratégia adaptativa da espécie a proteção de frutos e aumento da resistência, ou ainda a baixa luminosidade nas folhas e mais

altas nas partes aéreas superiores, estimulando a produção de compostos fenólicos.

Em análise de folhas e frutos confirma-se a hipótese citada anteriormente, ou seja, as folhas funcionam como fonte de rutina ($t_{\text{máx}} = 15,90$ mg/g e $t_{\text{mín}} = 0,53$ mg/g) nas entressafras dos frutos. Tais valores de substância isolada em produto natural podem ser considerados como excelentes, pois é raro conseguir-se rendimentos tão expressivos.

A sensibilidade, especificidade e eficácia do método HPLC também pode ser ressaltada ao serem comparados esses resultados com doseamento quantitativo em espectrofotômetro onde os tratamentos com mais altos teores são em HPLC os menores ou de teores intermediários, como acontece em frutos e folhas (quadros 6 e 10; 5 e 9). Tal variação pode ser relacionada ao limite de saturação, extração e solubilidade da rutina nos tratamentos em meio vanilina metanólica e ácido clorídrico resultando na formação de complexos insolúveis (precipitados), com conseqüente saturação da cor ou hidrólise da rutina, em ácido clorídrico 4%.

Quando se analisaram os menores teores apenas o tratamento TFR-MOC 11 (frutos) tem em ambos métodos, concentrações diminutas, não ocorrendo em folhas. Em TR-VIC (plantas cultivadas com preparados homeopáticos) tal relação também pode ser inferida nos tratamentos TR-VIC 07 (*Kali phosphoricum* 12 CH) e TR-VIC 13 (Pequi 6 CH) (quadros 4 e 8).

Em ambas as metodologias, em plantas cultivadas há nos tratamentos TR-VIC 15 Fungos 6 CH (*D. mollis* fungi), TR-VIC 12 *Carbo vegetabilis* 12 CH e TR-VIC 09 *Sulphur* 12 CH, com indutor de maiores teores de flavonol (rutina) e compostos fenólicos (quadros 4 e 8).

O uso de preparados homeopáticos na estimulação de compostos secundários é de interesse em sistemas de cultivo em ambiente protegido. Os medicamentos homeopáticos como *Sulphur*, *Mercurius*, *Phosphorus*, *Carbo vegetabilis*, *Arsenicum album*, *Cinna* e isoterápicos têm sido utilizados em experimentações com plantas (CASALI, 2000; BONATO, 2004; CASTRO *et al*, 2003; ANDRADE *et al*, 2001; DUARTE *et al*, 2003; ARMOND *et al*, 2003; ARRUDA *et al*, 2005; ROSSI *et al*, 2005; BRIZZI *et al*, 2005, e 2000; BAUMGARTNER *et al* 2004; HAMMAN *et al*, 2003, DITTMANN *et al*, 1996; DATTA, 2006; BINDER *et al*, 2005; BETTI *et al*, 2003) objetivando avaliar o desempenho e relacionar as alterações metabólicas decorrentes desses preparados.

Sulphur (enxofre) é constituinte mineral de plantas bem como *Phosphorus* (fósforo) e ambos funcionam como co-fatores enzimáticos na produção de proteínas, açúcares, aminoácidos e conseqüentemente no processo fotossintético, respiratório e na via biossintética de compostos secundários.

O fósforo está presente na transferência de energia, divisão celular, crescimento das células, promove a formação e crescimento prematuro das raízes, melhora a qualidade de muitas frutas e verduras, sendo vital a formação de sementes e maturação de frutos, auxilia as raízes e plântulas a se desenvolverem mais rapidamente, aumentando a resistência ao frio, a patógenos, herbivoria e ao estresse hídrico (LOPES, 1998). Os fitatos são os compostos de reserva de fósforo em sementes e frutos e representam aproximadamente 50% do fósforo total em sementes de Fabaceae (Leguminosae) e de 60 a 70% em grãos de cereais. A função do fitato na germinação de sementes é atuar, principalmente, nos primeiros estágios de

crescimento das plântulas, quando o embrião tem alta exigência de nutrientes minerais, incluindo o fósforo, na formação dos fosfolipídios das membranas celulares e ácidos nucleicos (MARSCHNER, 1995). O enxofre ainda é constituinte estrutural de membranas, estimula o desenvolvimento vegetativo das plantas, quando há deficiência, as folhas se tornam ligeiramente amareladas (MARSCHNER, 1995).

O medicamento homeopático *Carbo vegetabilis* é o carvão vegetal, onde todos macronutrientes (N, S, P, K, Ca e Mg) e micronutrientes (Zn, Cu, Fe, Mn, B, Mo, Cl e Co) estão presentes, em quantidades diminutas, essenciais ao resgate da informação e de suas funções no organismo vegetal.

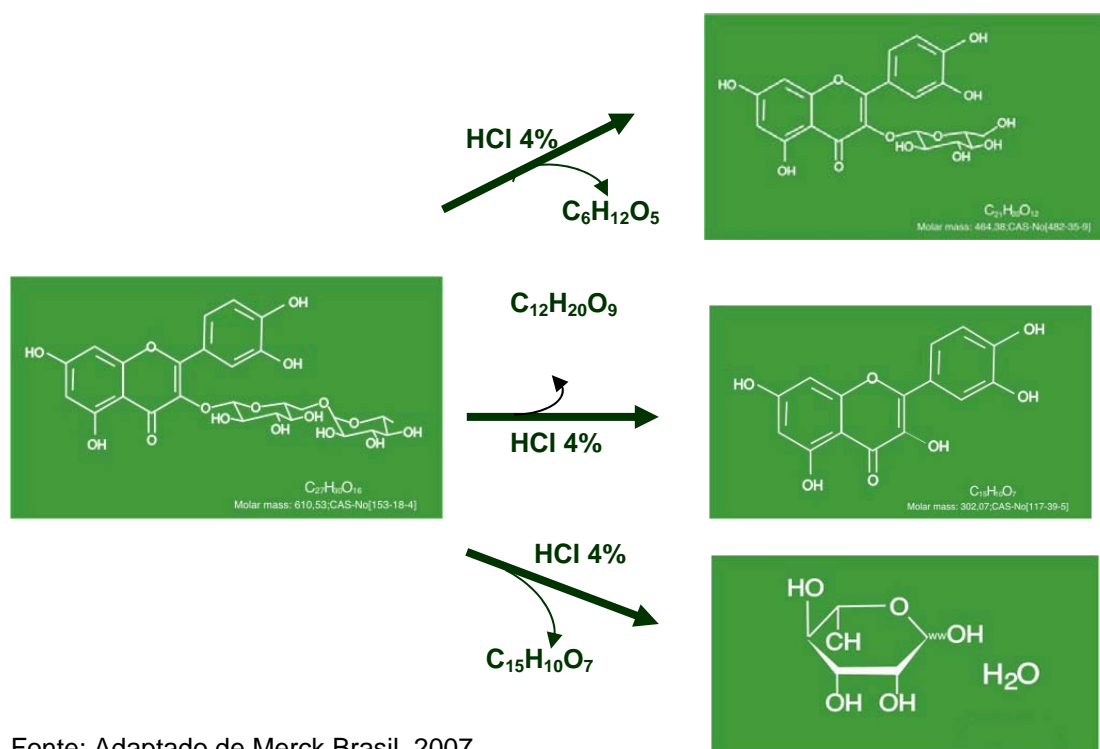
Em Homeopatia, a diluição favorece a resposta do sistema e aumenta a eficácia dos preparados homeopáticos frente ao metabolismo vegetal (primário e secundário), assim quanto menor for a quantidade de matéria (i.e, macro e micronutrientes), mais informação estará disponível. A informação contida no medicamento homeopático pode ser reconhecida pelo metabolismo da espécie, vindo a agir na estimulação/ inibição de determinada substância, como mecanismo de resposta a agentes externos, em favorecimento ou detrimento de uma via metabólica.

Em *D. mollis*, a plântula reconhece a informação homeopática contida nos medicamentos *Sulphur*, *Phosphorus*, *Carbo vegetabilis*, durante a formação de folhas e frutos podem absorver e metabolizar o enxofre e o fósforo elementar, como se fossem os macronutrientes, favorecendo o crescimento e desenvolvimento da planta.

Outro aspecto que pode ser considerado é que *D. mollis* é planta do Cerrado fixadora de alumínio, no entanto, suas folhas não têm o aspecto

xeromórfico, causado pelas condições oligotróficas como solos ácidos, com elevados teores de alumínio e ferro, pobres em nutrientes. Ao administrar a informação contida nos medicamentos homeopáticos, mecanismos de proteção/defesa seriam ativados e conseqüentemente têm-se respostas no metabolismo celular.

Figura 15: Rutina hidrolisada em meio ácido resultando em quercetina, isoquercetina e ramnose.



Fonte: Adaptado de Merck Brasil, 2007

4.2.6. Extração e Processamento de rutina em extrato aquoso

A extração com água destilada e precipitação de flavonóis rutina e quercetina em PPt-PO é considerada processo eficiente, barato e de fácil execução, com excelente rendimento (PPt-PO tm = 35%), demandando mão-

de-obra pouco especializada e equipamentos de baixo custo, facilitando a formação de cooperativas de coleta e beneficiamento de frutos de *D. mollis*.

A importância de obter extrato aquoso de frutos de *D. mollis*, como ocorreu em PPT-PO, está na baixa toxicidade e pureza do produto obtido, visto que a água é veículo de vários produtos farmacêuticos e está presente na constituição dos seres vivos e do planeta.

Ainda existe a possibilidade de após a extração de flavonóis com água destilada, utilizar-se o liofilizador, que retiraria a água e liberaria os flavonóis (rutina e quercetina) em pó (Liofilização), a exemplo do que ocorre com leite em pó (liofilizador e secador de leite fluidizado).

As análises de qualidade deste precipitado (PPT-PO) podem ser feitas com técnicas simples e específicas como identificação dos cristais por CCD, como em PPT-PO com Rf's = 0,56 e 0,69 ou por temperatura de fusão, e ainda, por análises mais elaboradas como doseamento por espectrofotometria ou cromatografia líquida de alta afinidade (HPLC).

A metodologia proposta pode ser adequada aos coletores de favas de *D. mollis* da região de Cerrado do Norte de Minas, visando agregar valor financeiro ao produto, facilitando a comercialização deste e propondo nova frente de trabalho/ renda aos coletores, já que 60kg de frutos de *D. mollis* é comprado por R\$ 0,60 ou \$ 0,24 (sessenta centavos de Real ou vinte e quatro cents de Dólar) e 1 Kg de rutina após beneficiamento, com alto padrão de qualidade, tem custo em torno de \$389,00 dólares (trezentos e oitenta e nove dólares cotação Sigma) e quercetina de \$944,00 (novecentos quarenta e nove dólares) ou R\$ 1050,00 (Um mil e cinquenta reais) e R\$ 2548,00 (dois mil quinhentos e quarenta e oito reais) respectivamente; sendo necessários, com o

rendimento (PPt-PO tm = 35%), cerca de 2,860 kg de frutos na doláres obtenção de 1 Kg de rutina.

Além de agregar valor financeiro e social, o produto pré-beneficiado seria a forma mais barata e adequada de transporte até aos centros tecnológicos, propiciando geração de renda e valorização cultural da população do Cerrado pelas indústrias farmacêuticas.

4.2.7. Extração e Processamento de rutina em extrato metanólico

A extração de frutos de *D. mollis* com metanol (TR-EXT), solvente orgânico, sub-produto de destilação da cachaça, bebida alcoólica produzida com abundância no Norte de Minas Gerais é interessante pois poderia aproveitar os maiores rejeitos dos alambiques locais (produtores), no caso o metanol, constituindo extrato mais elaborado, mas de fácil execução, com excelente rendimento (PPt-PO tm = 38,38%), também propiciando a criação de cooperativas de coleta e beneficiamento de frutos de *D. mollis*.

No mesmo raciocínio da proposição do extrato aquoso, no extrato metanólico (TR-EXT tm = 38,38%) a quantidade de favas (frutos) de *D. mollis* necessários à obtenção de 1 Kg de rutina seria de aproximadamente 2,605 Kg de frutos.

É importante que se pense e viabilize, como em TR-EXT, novas tecnologias que permitam o enriquecimento, uso e manejo sustentado do Cerrado, possibilitando aos seus habitantes, população tão carente, formas de aumento de recursos financeiros e subsistência à família agro-extrativista.

5. CONCLUSÕES

- Os preparados homeopáticos Fungos (*Dimorphandra mollis* fungi) 6 CH e o medicamento *Carbo vegetabilis* 12 CH favoreceram aumento da síntese de flavonóide (rutina – 3-rutinosídeo quercetina).
- A presença de ácido tânico somente no em plantas cultivadas (TR-VIC), dentre os tratamentos TF-MOC, TFR-MOC, TRS-MOC e TR-PO pode ser relacionada à necessidade de defesa da espécie, caracterizando patogênese.
- O tratamento TR-SOLV 15 – ACONA/ H₂O (acetona/ água 50:50) é mais eficiente na extração de flavonóis do que nos solventes isolados TR-SOLV 13 – ACONA (acetona P.A.) e TR-SOLV 16 – H₂O (água) comprovando a influência do meio aquoso na eficácia do processo extrativo.
- O teor médio de compostos fenólicos encontrado em folhas de plantas adultas (TRF-MOC) possibilita a respectiva utilização como fonte de compostos fenólicos e flavonóides.
- As folhas de *Dimorphandra mollis* coletadas em Montes Claros na coordenada Pt-PO1 (292) possui os maiores teores de compostos fenólicos, indicando possível matriz de estudo de germoplasma.

- O tratamento TR-VIC 09 – *Sulphur* 12 CH foi mais eficaz na indução de compostos fenólicos.
- Em frutos e folhas o teor de flavonóides do TRF-MOC 10 (folhas pt-290) e TRF-MOC 01 (folhas pt-280) e TFR-MOC 08 (frutos pt-288) e TFR-MOC 12 (frutos pt-292) foram maiores, indicando que os mecanismos de defesa, proteção e interação com o ambiente estariam mais ativos que nos demais tratamentos, sendo necessárias investigações de fitoquímicas, fitosociologias e florísticas das áreas Pt-280, Pt-290, Pt288 e Pt292, na tentativa de averiguar outras possíveis interações (planta-ambiente, planta-animais, fatores edáficos-climáticos, variabilidade genética) que justificassem tal comportamento.
- O processo de extração com água destilada e precipitação dos flavonóis rutina e quercetina em PPt-PO é eficiente, barato e de fácil execução, com rendimento de 35%.
- A extração com metanol no tratamento TR-EXT permite a utilização do sub-produto de destilação da cachaça, com excelente rendimento (PPt-PO tm = 38,38%).
- A criação de cooperativas de coleta/ beneficiamento utilizando extração aquosa ou metanólica de frutos e de folhas de *D. mollis*, agregaria valor sócio-econômico, como o agro-extrativismo sustentável, o manejo adequado e a conscientização da população/ coletores da importância da biodiversidade do Cerrado.

ANEXO 1

Figura 3: Áreas de coleta de *D. mollis* correspondentes aos tratamentos TRF-MOC 01 a TRF-MOC 12 (folhas) e TFR-MOC 01 a TR-MOC 12 (frutos).

Legenda

PONTOS GPS	TRATAMENTOS	TRATAMENTOS
Pt	FRUTOS	FOLHAS
281	TFR – MOC 01	TRF – MOC 01
282	TFR – MOC 02	TRF – MOC 02
283	TFR – MOC 03	TRF – MOC 03
284	TFR – MOC 04	TRF – MOC 04
285	TFR – MOC 05	TRF – MOC 05
286	TFR – MOC 06	TRF – MOC 06
287	TFR – MOC 07	TRF – MOC 07
288	TFR – MOC 08	TRF – MOC 08
289	TFR – MOC 09	TRF – MOC 09
290	TFR – MOC 10	TRF – MOC 10
291	TFR – MOC 11	TRF – MOC 11
292	TFR – MOC 12	TRF – MOC 12

