



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO – UFRPE
UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA – UEPB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ETNOBIOLOGIA E CONSERVAÇÃO
DA NATUREZA - PPGETNO

VARIABILIDADE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS
DE *Secondatia floribunda* A. DC. EM FUNÇÃO DA SAZONALIDADE E EM
DIFERENTES FASES FENOLÓGICAS

DAIANY ALVES RIBEIRO

RECIFE – PE

- 2018 -

DAIANY ALVES RIBEIRO

**VARIABILIDADE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS
DE *Secondatia floribunda* A. DC. EM FUNÇÃO DA SAZONALIDADE E EM
DIFERENTES FASES FENOLÓGICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Etnobiologia e Conservação da Natureza em Associação entre a Universidade Federal Rural de Pernambuco, Universidade Estadual da Paraíba e Universidade Regional do Cariri como requisito para obtenção do título de doutora em Etnobiologia e Conservação da Natureza.

Orientador:

Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa/URCA

Coorientadora:

Profa. Dra. Marta Maria de Almeida Souza/URCA

RECIFE – PE

- 2018 -

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Nome da Biblioteca, Recife-PE, Brasil

R484v Ribeiro, Daiany Alves
Variabilidade da composição química e atividades biológicas de
Secundatia floribunda A. DC. em função da sazonalidade e em
diferentes fases fenológicas / Daiany Alves Ribeiro. – 2018.
148 f. : il.

Orientador: José Galberto Martins da Costa.
Coorientadora: Marta Maria de Almeida Souza.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Programa de Pós-Graduação em Etnobiologia e Conservação da
Natureza, Recife, BR-PE, 2018.
Inclui referências e anexo(s).

1. Ecologia química 2. *Apocynaceae* 3. Sazonalidade
4. Composição fenólica 5. Atividade antibacteriana 6. Capacidade
antioxidante I. Costa, José Galberto Martins da, orient.
II. Souza, Marta Maria de Almeida, coorient. III. Título

CDD 574

DAIANY ALVES RIBEIRO

**VARIABILIDADE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS
DE *Secondatia floribunda* A. DC. EM FUNÇÃO DA SAZONALIDADE E EM
DIFERENTES FASES FENOLÓGICAS.**

TESE APRESENTADA E APROVADA EM: 27 de fevereiro de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa

Universidade Regional do Cariri – URCA (Orientador/Presidente da Banca)

Profa. Dra. Marta Maria de Almeida Souza

Universidade Regional do Cariri – URCA (Coorientadora)

Prof. Dr. Rogério de Aquino Saraiva

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE (Membro Externo)

Profa. Dra. Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues

Centro Universitário Leão Sampaio - UNILEÃO (Membro Externo)

Prof. Dr. Edinaldo Fagner Ferreira Matias

Centro Universitário Leão Sampaio - UNILEÃO (Membro Externo)

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho

Universidade Regional do Cariri – URCA (Membro Interno)

Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes

Universidade Regional do Cariri – URCA (Membro Interno - Suplente)

Prof. Dr. Thiago Antônio de Sousa Araújo

Centro Universitário Maurício de Nassau - UNINASSAU (Membro Interno - Suplente)

RECIFE – PE

- 2018 -

As mulheres da minha família.

*Em especial a minha mãe, Maria Zélia Ribeiro da Silva por ser meu motivo de
sempre continuar em frente, com coragem.*

*A minha avó, Maria de Lourdes Silva (In Memoriam) pela lição de vida, por seu
exemplo de caráter, força e amor incondicional.*

DEDICO

“Intelligence is the ability to adapt to change.”

(“Inteligência é a capacidade de se adaptar as mudanças.”)

Stephen Hawking

“Rien dans la vie n’est à craindre. Ce n’est qu’à être compris!”

(“Nada na vida é para ser temido. É apenas para ser entendido!”)

Marie Curie

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sempre guiar e iluminar meu caminho, por me dá coragem para enfrentar os momentos difíceis e sabedoria para transformar tudo em aprendizado. Obrigada Senhor por me dar forças quando preciso e por tornar tudo possível.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa, por ter acreditado e confiado em mim. Por me receber em seu laboratório e dado à oportunidade de aprender e realizar este trabalho, ajudando nos momentos mais importantes. Seus ensinamentos, apoio e incentivo foram essenciais para que tudo se fosse concretizado. Agradeço imensamente por tudo e sempre serei grata.

A minha coorientadora, Prof. Dra. Marta Maria de Almeida Souza, pela valiosa contribuição na realização deste trabalho. Por toda a sua dedicação, disponibilidade, incentivo e amizade. Seus ensinamentos e palavras sábias me motivam a buscar sempre o crescimento acadêmico e pessoal. Serei eternamente grata por tudo.

As professoras, Dra. Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues, Sarah Soares Damasceno e Dra. Aline Augusti Boligon pela disponibilidade e colaboração de grande ajuda para este trabalho, principalmente pelas preciosas sugestões e conhecimentos compartilhados.

Aos professores, Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho, Dr. Irwin Rose Alencar Menezes, Dr. Rogério de Aquino Saraiva, Dra. Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues, Dr. Thiago Antônio de Sousa Araújo e Dr. Edinaldo Fagner Ferreira Matias por aceitarem participar da banca examinadora, obrigada pelas valiosas sugestões, críticas construtivas e por contribuírem para o aperfeiçoamento e melhoria deste trabalho.

Ao Corpo Docente que compõem o Programa de Pós-Graduação em Etnobiologia e Conservação da Natureza, em especial aos coordenadores, Profa. Dra. Elcida de Lima Araújo, Profa. Dra. Marta Regina Kerntopf e Prof. Dr. Ulysses Paulino de Albuquerque por se mostrarem prestativos durante todo o tempo que estive vinculada Programa.

À equipe do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LPPN) pelo acolhimento e colaboração ao longo desses três anos e meio. Em especial aos queridos amigos: Janaine Camilo, Carla Alves e Fábio Galvão. Aos que passaram por lá e também foram importantes nesta trajetória: Camila Nobre, Walmir Miranda, Wégila Costa, Bárbara Fernandes e Erlânio Oliveira. A todos obrigada pela convivência descontraída, ajuda e encorajamento mesmo que indireto de sempre fazer o melhor.

À equipe do Laboratório de Ecologia Vegetal (LEV), ao qual convivi desde a iniciação científica e que contribuíram muito nesta fase atual, em especial as amigas:

Delmácia Macêdo, Liana Oliveira, Bianca Vilar, Maria de Oliveira, Julimery Gonçalves, Jordana Macêdo e Samille Lima. Meu agradecimento por terem proporcionado momentos produtivos, agradáveis e por sempre estarem dispostas a ajudar.

Aos colegas da Pós-Graduação, pelo compartilhar desta trajetória, pelos bons momentos de convivência e aprendizado, por termos juntos vencido tantas disciplinas e mais uma etapa de nossas vidas, em especial agradeço a companheira de turma e de viagens Elba Sobral.

As amigas que me acolheram em Recife: Samara Brito, Débora Barbosa e Audilene Freitas. Serei sempre grata.

À Universidade Regional do Cariri (URCA) e a Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) pelo espaço cedido durante minha permanência nas instituições.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico - FUNCAP, pela colaboração financeira durante todo o desenvolvimento da pesquisa.

Agradeço aos que desde sempre chamo e chamarei de meus...

À minha mãe, Maria Zélia Ribeiro da Silva, minha amiga, exemplo de mulher e mãe guerreira, responsável por tudo que tenho e sou. Ao meu pai, Edvaldo Alves Bezerra por está sempre por perto me apoiando e torcendo para que tudo se torne possível. Tenho certeza do orgulho que demonstram por mim em mais uma etapa que conquistei. Obrigada pelo amor incondicional, por acreditarem nos meus ideais e pelo incentivo diário para buscar meus objetivos.

Aos meus familiares, sempre presentes e que contribuíram muito ao longo da minha vida através de grande apoio e muitas lições. Em especial, agradeço a minha tia Josefa Ribeiro. Obrigada por sempre estarem torcendo por mim e felizes por minhas conquistas.

A Tiago Leite, pelo amor, por estar ao meu lado sempre se mostrando prestativo e compreensivo, pelas palavras de incentivo quando me falta força, pelos conselhos e cumplicidade e por me mostrar que a vida pode ser bem melhor e ainda mais bonita.

Por fim, quero agradecer a todos que fizeram e fazem parte da minha vida e que de alguma forma contribuíram para a minha formação tanto profissional como pessoal e mesmo que indiretamente prestaram sua colaboração e me deram força e perseverança para seguir em frente, realizar este sonho e que com palavras e atitudes me ajudam a crescer, me ensinam diariamente a viver melhor e me mostram que devo sempre compartilhar.

Grata a todos que me ajudaram a chegar até aqui!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xv
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 Caracterização Botânica e Etnobiologia de <i>Secondatia floribunda</i> A. DC.....	22
2.1.1 Família Apocynaceae Juss.	22
2.1.2 Gênero <i>Secondatia</i> A. DC.	23
2.1.3 <i>Secondatia floribunda</i> A. DC.	24
2.2 A etnobiologia na seleção de plantas para a bioprospecção	27
2.3 Variabilidade dos compostos químicos relacionados aos fatores ambientais	29
2.4 Características químicas dos compostos fenólicos	33
3. REFERÊNCIAS	38

CAPITULO 1

Perfil químico e atividade antibacteriana de <i>Secondatia floribunda</i> A. DC. (Apocynaceae)	52
Resumo	53
1. Introdução.....	54
2 Material e Métodos.....	55
2.1 Coleta do material vegetal	55
2.2 Preparação dos extratos	55
2.3 Químicos, reagentes e equipamentos.....	55
2.4 Testes químicos qualitativos	56
2.5 Determinação do teor de fenóis e flavonoides totais	56
2.6 Quantificação de compostos fenólicos e flavonoides por CLAE-DAD	57
2.7 Espectroscopia de Infravermelho de transformada de Fourier (FT-IR)	57
2.8 Determinação da atividade antibacteriana e moduladora dos aminoglicosídeos.....	58
2.9 Análises estatísticas	59
3. Resultados.....	59
3.1 Teste fitoquímico	59

3.2 Conteúdo total de fenóis e flavonoides.....	59
3.3 Análise química por CLAE-DAD.....	60
3.4 Espectroscopia de Infravermelho.....	62
3.5 Atividade Antibacteriana	63
3.6 Atividade moduladora a aminoglicosídeos.....	64
4. Discussão.....	66
Referências	70

CAPITULO 2

Variabilidade dos compostos fenólicos de <i>Secundaria floribunda</i> A.DC (Apocynaceae) em função da sazonalidade e das diferentes fases fenológicas.....	77
Resumo	78
1. Introdução.....	79
2 Material e Métodos.....	80
2.1 Área de estudo/Local de amostragem.....	80
2.2 Coleta do material vegetal	82
2.3. Identificação do material botânico.....	82
2.4. Dados Meteorológicos	82
2.5 Preparação dos extratos	83
2.6 Químicos, reagentes e equipamentos.....	83
2.7 Prospecção qualitativa dos constituintes químicos.....	83
2.8 Quantificação de compostos fenólicos e flavonoides por CLAE-DAD	83
2.9 Análises estatísticas	84
3. Resultados.....	84
3.1 Rendimento dos extratos em função da sazonalidade e da fenologia.....	84
3.2 Análise química qualitativa	87
3.3 Perfil de composição fenólica dos extratos por CLAE-DAD.....	87
3.4 Variação na composição fenólica entre os compostos identificados na entrecasca do caule.....	88
3.5 Variação na composição fenólica entre os compostos identificados no cerne	92
3.6 Análise de Componentes Principais (PCA).....	95
4. Discussão.....	97
4.1 Rendimento dos extratos em função da sazonalidade e da fenologia.....	97

4.2 Variação nos compostos fenólicos identificados na entrecasca do caule e cerne em função da sazonalidade e da fenologia	98
5. Conclusão	100
Referências	101

CAPITULO 3

Variação sazonal no conteúdo total de fenóis e flavonoides e a influência na capacidade antioxidante de <i>Secondatia floribunda</i> A. DC. (Apocynaceae)	107
Resumo	108
1. Introdução	109
2. Material e métodos	110
2.1 Coleta e identificação do material vegetal	110
2.2 Preparação dos extratos	111
2.3 Químicos, reagentes e equipamentos	111
2.4 Determinação do teor de fenóis totais	112
2.5 Determinação do teor de flavonoides totais	112
2.6 Avaliação da Capacidade Antioxidante	112
2.6.1 Determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> pelo método DPPH	112
2.6.2 Captura do radical livre ABTS ^{•+}	113
2.6.3 Método de redução do ferro (FRAP)	114
2.6.4 Atividade quelante do íon Fe ²⁺	115
2.7 Análises estatísticas	115
3. Resultados e discussão	116
3.1 Teor de fenóis e flavonoides totais e a sazonalidade	116
3.2 Atividades antioxidantes	119
3.2.1 Atividade antioxidante <i>in vitro</i> pelo método DPPH [•]	119
3.2.2 Atividade antioxidante <i>in vitro</i> pelo método ABTS ^{•+}	124
3.2.3 Atividade antioxidante <i>in vitro</i> pelo método de redução do ferro (FRAP)	126
3.2.4 Atividade antioxidante <i>in vitro</i> pela capacidade quelante de íons Fe ²⁺	128
3.2.5 A variabilidade entre o conteúdo fenólico e a atividade antioxidante	132
4. Conclusão	135
Referências	136
CONSIDERAÇÕES FINAIS	143

ANEXOS

ANEXO A - Documento de Autorização para atividades com finalidade científica..... 146

ANEXO B - Artigo publicado a partir dos dados referentes ao capítulo 1 da tese..... 147

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração de *Secundatia floribunda* A. DC. 25

Figura 2. *Secundatia floribunda* A. DC. (catuaba-de-rama): (A) Aspecto da planta; (B) Folhas; (C) Flores; (D) Inflorescência (com queda foliar); (E) Caule ramificado; (F) Presença de látex; (G) Fruto. 26

CAPITULO 1

Figura 1. Representação do perfil da cromatografia líquida de alta eficiência de *S. floribunda*, entrecasca (A) e cerne (B). Ácido gálico (pico 1), cianidina (pico 2), catequina (3 pico), ácido clorogênico (4 pico), ácido cafeico (pico 5), cinchonina (pico 6), quercetina (pico 7) e apigenina (pico de 8) 60

Figura 2. Estruturas dos compostos fenólicos detectados no extrato etanólico da entrecasca e cerne de *Secundatia floribunda* 62

Figura 3. Espectro na região do infravermelho do extrato de *S. floribunda*: (A) Entrecasca e (B) Cerne 63

Figura 4. Concentração Inibitória Mínima (CIM) de aminoglicosídeos (Amicacina, Gentamicina ou Neomicina) na ausência e presença do extrato da entrecasca do caule e cerne de *Secundatia floribunda*. (A) Cerne de *S. floribunda* em direção a *E. coli* (ATCC 25922). (B) Cerne de *S. floribunda* em direção a *S. aureus* (ATCC 12692). (C) Entrecasca de *S. floribunda* em direção a *E. coli* (ATCC 25922). (D) Entrecasca de *S. floribunda* em direção a *S. aureus* (ATCC 12692). Valores estatisticamente significativos com ** = $p < 0,01$ e **** = $p < 0,0001$ vs Controle. # vs MIC com $p < 0,05$ significativo. Ns = Não significativo; Sin = Sinergismo e Ant = Antagonismo. 65

CAPITULO 2

Figura 1. Localização geográfica da área de estudo na Chapada do Araripe, Ceará, Brasil 81

Figura 2. Climatograma dos anos de 2015 (A) e 2016 (B). * Meses de coleta..... 85

Figura 3. Representação do perfil da cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos da entrecasca do caule de *S. floribunda*. Pico 1: ácido gálico, Pico 2: cianidina, Pico 3: catequina, Pico 4: ácido clorogênico, Pico 5: ácido caféico, Pico 6: cinchonaina, Pico 7: quercetina, Pico 8: apigenina. A: coleta da entrecasca do caule 1; B: coleta da entrecasca do caule 2; C: coleta da entrecasca do caule 3; D: coleta da entrecasca do caule 4; E: coleta da entrecasca do caule 5; F: coleta da entrecasca do caule 6; G: coleta da entrecasca do caule 7; H: coleta da entrecasca do caule 8. 90

Figura 4. Representação do perfil da cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos do cerne de *S. floribunda*. Pico 1: ácido gálico, Pico 2: cianidina, Pico 3: catequina, Pico 4: ácido clorogênico, Pico 5: ácido cafeico, Pico 6: cinchonaina, Pico 7: quercetina. A: coleta de cerne 1; B: coleta de cerne 2; C: coleta de cerne 3; D: coleta de cerne 4; E: coleta de cerne 5; F: coleta de cerne 6; G: coleta de cerne 7; H: coleta de cerne 8..... 93

Figura 5. Análise de componentes principais dos compostos fenólicos identificados nos extratos etanólicos da entrecasca do caule de *Secondatia floribunda* e os dados pluviométricos, coletada em diferentes períodos sazonais por dois anos..... 95

Figura 6. Análise de componentes principais dos compostos fenólicos identificados nos extratos etanólicos do cerne de *Secondatia floribunda* e os dados pluviométricos, coletada em diferentes períodos sazonais por dois anos..... 96

CAPITULO 3

Figura 1. Variação da concentração de compostos fenólicos (A) e flavonoides totais (B) nos extratos etanólicos da entrecasca do caule e cerne de *Secondatia floribunda* A. DC. coletados em diferentes períodos durante 2015/2016. Os resultados são expressos em média \pm D.P. (n=3). *P < 0,05; **P < 0,01 e ***P < 0,001..... 118

Figura 2. Efeitos de diferentes concentrações dos extratos etanólicos da entrecasca do caule e cerne de *Secondatia floribunda* A. DC. na inibição do radical livre DPPH[•]. Os valores em porcentagem de atividade antioxidante são expressos com médias ± D.P. (n=3). A: janeiro/2015 coleta da entrecasca do caule (E1) e cerne (C1); B: abril/2015 coleta da entrecasca do caule (E2) e cerne (C2); C: julho/2015 coleta da entrecasca do caule (E3) e cerne (C3); D: outubro/2015 coleta da entrecasca do caule (E4) e cerne (C4); E: janeiro/2016 coleta da entrecasca do caule (E5) e cerne (C5); F: abril/2016 coleta da entrecasca do caule (E6) e cerne (C6); G: julho/2016 coleta da entrecasca do caule (E7) e cerne (C7); H: outubro/2016 coleta da entrecasca do caule (E8) e cerne (C8). 120

Figura 3. Valores da capacidade antioxidante equivalente a Trolox (µM trolox/g) para os extratos etanólicos da entrecasca do caule e cerne de *Secondatia floribunda* A. DC. Os resultados da atividade antioxidante são expressos com médias ± D.P. (n=3). 125

Figura 4. Valores da atividade antioxidante pelo método redução do ferro (FRAP) dos os extratos etanólicos da entrecasca do caule e cerne de *Secondatia floribunda* A. DC. Os resultados da atividade antioxidante são expressos com médias ± D.P. (n=3). 127

Figura 5. Atividade quelante de ferro (Fe²⁺) dos extratos etanólicos da entrecasca do caule e cerne de *Secondatia floribunda* A. DC. Os valores em porcentagem de atividade quelante são expressos com médias ± D.P. (n=3). *Indica diferença estatística significativa em relação à concentração anterior para o mesmo extrato (ANOVA, teste de *Tukey* a $P < 0,05$). A: janeiro/2015 coleta da entrecasca do caule (E1) e cerne (C1); B: abril/2015 coleta da entrecasca do caule (E2) e cerne (C2); C: julho/2015 coleta da entrecasca do caule (E3) e cerne (C3); D: outubro/2015 coleta da entrecasca do caule (E4) e cerne (C4); E: janeiro/2016 coleta da entrecasca do caule (E5) e cerne (C5); F: abril/2016 coleta da entrecasca do caule (E6) e cerne (C6); G: julho/2016 coleta da entrecasca do caule (E7) e cerne (C7); H: outubro/2016 coleta da entrecasca do caule (E8) e cerne (C8). 130

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 1

Tabela 1. Identificação das principais classes químicas dos extratos etanólicos de <i>S. floribunda</i>	59
Tabela 2. Composição fenólica e flavonoídica do extrato etanólico da entrecasca e cerne de <i>S. floribunda</i>	61

CAPITULO 2

Tabela 1. Rendimento trimestral dos extratos de <i>Secondatia floribunda</i>	87
Tabela 2. Composição do extrato etanólico da entrecasca do caule de <i>Secondatia floribunda</i> coletada em diferentes períodos	91
Tabela 3. Composição do extrato etanólico do cerne de <i>Secondatia floribunda</i> coletada em diferentes períodos.....	94

CAPITULO 3

Tabela 1. Concentração de compostos fenólicos e flavonoides totais nos extratos etanólicos da entrecasca do caule e cerne de <i>Secondatia floribunda</i> A. DC.	117
Tabela 2. Valores da concentração inibitória a 50% (CI ₅₀ µg/mL) obtidos para o sequestro do radical livre DPPH [•] para os extratos etanólicos da entrecasca do caule e cerne de <i>Secondatia floribunda</i> A. DC. coletada em diferentes períodos.	122
Tabela 3. Valores da atividade antioxidante equivalente a Trolox obtidos para a captura do radical ABTS ^{•+} dos extratos etanólicos da entrecasca do caule e cerne de <i>Secondatia floribunda</i> A. DC. coletada em diferentes períodos.	125

Tabela 4. Valores da atividade antioxidante pelo método redução do ferro (FRAP) dos extratos etanólicos da entrecasca do caule e cerne de *Secondatia floribunda* A. DC. coletada em diferentes períodos. 127

Tabela 5. Conteúdo total de fenóis e flavonoides e atividades antioxidantes dos os extratos etanólicos da entrecasca do caule e cerne de *Secondatia floribunda* A. DC. coletada em diferentes períodos por dois anos. *Referente a valores da ultima concentração do teste quelante..... 134

Ribeiro, Daiany Alves. (Dra.). Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Fevereiro de 2018. Variabilidade da composição química e atividades biológicas de *Secondatia floribunda* A. DC. em função da sazonalidade e em diferentes fases fenológicas. José Galberto Martins da Costa (Orientador); Marta Maria de Almeida Souza (Coorientadora).

RESUMO

As plantas constituem uma das fontes mais importantes de novas substâncias utilizadas diretamente como agentes medicinais e a ecologia química tem se mostrado promissora na busca de espécies medicinais prioritárias para investigações químicas e farmacológicas. *Secondatia floribunda* A. DC. (Apocynaceae) se destaca como medicinal, mas não apresenta sua composição química e atribuições medicinais comprovadas. O presente estudo teve por objetivo estabelecer o perfil químico de *Secondatia floribunda*, analisar a variabilidade nos seus componentes químicos com a influência da sazonalidade e das diferentes fases fenológicas, além de verificar esta variação na sua bioatividade. Foram selecionados três indivíduos e utilizadas amostras de entrecasca do caule e cerne primeiramente para avaliar a composição química. Para analisar a variabilidade dos constituintes químicos da espécie durante dois anos foram realizadas coletas trimestrais compreendendo as estações chuvosa e seca e as fases vegetativas e reprodutivas. Foram preparados extratos etanólicos das amostras e realizada a triagem fitoquímica e a quantificação do teor de fenóis e flavonoides totais destes extratos. A composição fenólica foi determinada e quantificada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD). A Espectroscopia de Infravermelho foi realizada utilizando a medida do tipo Reflexão Total Atenuada com Transformada de Fourier (ATR-FTIR). Foram realizados ensaios antibacterianos para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da modificação a aminoglicosídeos. O potencial antioxidante foi determinado pelos testes de inibição do radical 1-1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), captura do radical 2,2'-azinobis-3-etilbenzenotiazolina-6-sulfônico (ABTS), poder antioxidante de redução do ferro (FRAP) e atividade quelante de íons ferro (Fe^{2+}). Os extratos mostraram ser uma fonte de diversas classes de compostos fenólicos e flavonoides. Os espectros de infravermelho apresentaram características semelhantes, tendo entre suas principais bandas o grupo hidroxila (OH). A atividade antibacteriana apresentou resultados clinicamente significativos frente às linhagens testadas. Na modulação, observaram-se efeitos sinérgicos e antagônicos para ambos os extratos. Para a variabilidade da composição fenólica, o rendimento dos extratos foram maiores no período chuvoso, em baixos níveis de precipitação e durante os dois anos apresentaram alterações nos níveis em todas as coletas e entre as partes vegetais, respondendo tanto quantitativamente como qualitativamente à sazonalidade e a fenologia. Na atividade antioxidante os extratos demonstraram melhores resultados durante o período seco nos testes DPPH e ABTS, e durante o período chuvoso em FRAP e quelante. Este estudo contribui como o primeiro relato para o conhecimento químico e biológico de *Secondatia floribunda* e sugere que seja fonte clinicamente relevante na terapia antibacteriana e antioxidante, pela presença de níveis consideráveis de compostos com atividade já reconhecida. Assim, os presentes resultados também podem ser úteis para ampliar o conhecimento sobre a espécie e favorecer no desenvolvimento de padrões de coleta para obtenção de maiores concentrações de compostos aqui identificados que são destinados ao uso terapêutico.

Palavras-chave: Ecologia Química; Apocynaceae; Sazonalidade; Composição Fenólica; Atividade antibacteriana; Capacidade Antioxidante.

Ribeiro, Daiany Alves. (Dra.). Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). February 2018. Chemical composition and biological activity variability of *Secondatia floribunda* A. DC. in function of seasonality and in different phenological phases. José Galberto Martins da Costa (Orientador); Marta Maria de Almeida Souza (Coorientadora).

ABSTRACT

Plants are one of the most important sources of new substances used directly as medicinal agents and chemical ecology has shown promise in the search medicinal species with priority for chemical and pharmacological investigations. *Secondatia floribunda* A. DC. (Apocynaceae) stands out as medicinal, but does not present its chemical composition and proven medicinal attributions. The present study aimed to establish the *Secondatia floribunda* chemical profile to analyze the variability in its chemical components with the influence of seasonality and different phenological phases, in addition to verifying the variation in its bioactivity. Three individuals were selected where stalk sap and core samples were used to firstly evaluate their chemical composition. To analyze the chemical constituent variability of the species during two years, quarterly collections were performed, including both rainy and dry seasons, as well as vegetative and reproductive phases. The ethanolic extracts were prepared and were performed phytochemical triage and total phenol and flavonoid content quantifications. Phenolic composition was determined and quantified by High Performance Liquid Chromatography (HPLC-DAD). Infrared Spectroscopy was performed using the Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) measure. Antibacterial assays were performed to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and aminoglycoside modification. Antioxidant potential was determined by the 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH[•]) radical inhibition assays, 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS^{•+}) radical scavenging, iron reducing antioxidant power (FRAP) and iron ion (Fe²⁺) chelating activity. The extracts proved to be a source of several classes of phenolic and flavonoid compounds. The infrared spectra presented similar characteristics, having among their main bands the hydroxyl group (HO). The antibacterial activity presented clinically significant results against the tested strains. For antibiotic modulation, synergistic and antagonistic effects were observed for both extracts. For the phenolic composition variability, the extract yields presented the highest quantities in the rainy season, during low levels of precipitation where during the two years changes in the levels in all the collections and between the vegetal parts were observed, responding both quantitatively and qualitatively to seasonality and phenology. In the antioxidant activity assays the extracts showed better results during the dry period for the DPPH and ABTS tests, and during the rainy period for FRAP and chelating assays. This study, as the first to report on the chemical and biological knowledge regarding *Secondatia floribunda*, suggests that it is a clinically relevant source in antibacterial and antioxidant therapy due to the presence of considerable levels of compounds with previously recognized activity. Thus, the present results may also be useful for widening knowledge regarding the species and favoring the development of collection patterns to obtain higher concentrations of the compounds identified herein which are intended for therapeutic use.

Key words: Chemical Ecology; Apocynaceae; Seasonality; Phenolic composition; Antibacterial activity; Antioxidant Capacity.

1 INTRODUÇÃO

O conhecimento a respeito das plantas medicinais e suas utilizações tem sido objeto de estudo em diferentes regiões geográficas. A realização de pesquisas etnobiológicas tem demonstrado o valor da biodiversidade para a bioprospecção (SHELLEY, 2009; ALBUQUERQUE, 2010; RIBEIRO et al., 2014), que surge como uma ferramenta importante ao acesso de novas estratégias para a investigação, desenvolvimento e exploração racional dos recursos medicinais derivados da flora (PATWARDHAN e MASHELKAR, 2009; ALBUQUERQUE et al., 2012).

Estudos etnobiológicos realizados nas diferentes formações vegetais do Brasil são instrumentos promissores na descoberta de novas drogas, uma vez que o Brasil possui uma elevada biodiversidade e endemismo associados a uma riqueza considerável de conhecimento sobre a sua flora (KONG et al., 2009; FONSECA-KRUEL e PEREIRA, 2009). O conhecimento tradicional como estratégia de seleção de plantas e seus tratamentos terapêuticos, abre várias opções para a análise de dados por meio de ordenação das espécies, dando prioridade a um determinado conjunto de plantas para estudos mais aprofundados (ARAÚJO et al., 2008). A busca sistemática por substâncias com potencial medicinal tem sido realizada por diversas abordagens, dentre elas a ecologia química, que auxilia a descoberta de novos medicamentos com base em previsões da distribuição de substâncias oriundas do metabolismo secundário das plantas em função das relações ecológicas (COLEY et al., 2003; ALBUQUERQUE et al., 2012).

Desta forma, as pesquisas com plantas medicinais vão além de investigações da medicina tradicional local, envolvem a bioquímica ecológica para uso e conhecimento dos recursos medicinais disponíveis (ALMEIDA et al., 2005; SILVA et al., 2014). Além disso, favorece na caracterização, isolamento e purificação de compostos bioativos provindos do metabolismo secundário, para utilizações farmacológicas de extratos e de constituintes químicos isolados (MACIEL et al., 2002; CRAGG e NEWMAN, 2012).

Os metabólitos secundários além de apresentarem diversas aplicações que representam grande importância ecológica para as plantas, principalmente no desenvolvimento de defesas químicas, também podem agir em alvos celulares funcionando no tratamento de doenças humanas (FERREIRA e PINTO, 2010; VERMA e SHUKLA, 2015), o que configura uma importante fonte de substâncias utilizadas na prospecção de novos medicamentos (CRAGG e NEWMAN, 2012).

Estes metabólitos secundários nas plantas são frequentemente afetados em função de diversas condições ambientais, peculiares de cada local e podem apresentar variação qualitativa e quantitativa na produção de princípios ativos responsáveis pelas atividades biológicas (ÇIRAK et al., 2007a; CRISTIANS et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2014; OUERGHEMMI et al., 2016). As mudanças nos mecanismos bioquímicos das plantas ocorrem pela influência de inúmeros fatores que atuam correlacionados entre si ou isoladamente (GOBBO-NETO e MORAES, 2007). Entre os principais fatores bióticos e abióticos que interferem no metabolismo da planta e, conseqüentemente, no conteúdo químico total e nas proporções relativas dos compostos químicos estão a sazonalidade climática (GOUVEA et al., 2012), disponibilidade de água, a radiação solar (GOUINGUENÉ e TURLINGS, 2002; ARAÚJO et al., 2015), radiação ultravioleta (UV), o ritmo circadiano (BLANK et al., 2005, SOUZA et al., 2010), a fase fenológica (ÇIRAK et al., 2007b; LAGO et al., 2007), a composição do solo (DUARTE et al., 2010; BARBOSA et al., 2012) entre outros.

Dentre a variedade de constituintes químicos produzidos pelas plantas, os compostos fenólicos estão entre os mais diversificados cujo interesse está relacionado à importância para a saúde humana, uma vez que estes apresentam efeitos biológicos de grande alcance, como por exemplo, atividades anticancerígena, antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, antiviral, antialérgica, anti-hipertensiva, entre outras (MIDDLETON et al., 2000; SOBRATTEE et al., 2005; DAGLIA, 2012; SHARMA et al., 2012; KOOLEN et al., 2013; KARDUM et al., 2014; PISTOLLATO et al., 2015). Esses compostos bioativos são bons sinalizadores de plantas saudáveis e desempenham um papel fundamental para a capacidade de adaptação das espécies vegetais em seu ambiente natural (NACZK e SHAHIDI, 2006), tendo seu conteúdo frequentemente influenciado por diferentes fatores de estresse bióticos e abióticos (HANSEN e WOLD, 2010; SARTOR et al., 2013; OUERGHEMMI et al., 2016), principalmente a sazonalidade e a radiação UV. Assim, as mudanças nos níveis e produção destes compostos refletem igualmente na atividade biológica as quais estão relacionados.

Desta forma, vários estudos têm reconhecido a importância da variabilidade química de espécies vegetais utilizada na terapêutica a fim de comparar estas variações nos componentes químicos ativos em diferentes períodos e também para propor padronizações (SOUSA et al., 2014; YAO et al., 2016).

Os entendimentos de como estes fatores interferem no metabolismo de plantas utilizadas como medicinais podem ser um caminho para uma maior efetividade na

descoberta de novas drogas, e assim, tornar as pesquisas mais rápidas, eficazes e economicamente eficientes no que diz respeito também ao desenvolvimento de técnicas de manejo de plantas medicinais (FIGUEIREDO et al., 2009; ALBUQUERQUE et al., 2012). Estas técnicas podem colaborar com o desenvolvimento de parâmetros de coleta para a obtenção de maiores rendimentos de substâncias alvo com concentrações desejáveis de compostos químicos bioativos e que se encaixam as necessidades das comunidades locais e do mercado (YARIWAKE et al., 2005; YAO et al., 2016).

Entretanto, ainda são poucas as pesquisas que conseguem elucidar a variação dos constituintes químicos das espécies de acordo com as características do ambiente e suas funcionalidades. A maioria dos estudos se concentra em analisar a variação química em óleos essenciais e incluem predominantemente espécies até já comercialmente conhecidas (GOBBO-NETO e LOPES, 2007) poucos avaliando as que possuem relatos medicinais e que ainda estão presentes somente em ambientes naturais e/ou conservados.

Neste contexto, *Secondatia floribunda* A. DC. (Apocynaceae) destaca-se por ser endêmica do Brasil e por sua abundância em áreas de Cerrado da Chapada do Araripe, ao sul do estado do Ceará. Na região a espécie apresenta diversas propriedades terapêuticas relatadas em estudos etnobotânicos, sendo utilizada principalmente suas cascas e entrecascas como afrodisíaca, para impotência sexual, complicações nervosas, depressão, fraqueza, reumatismo e diferentes condições inflamatórias (RIBEIRO et al., 2014; MACEDO et al., 2015; SARAIVA et al., 2015). Mesmo com diferentes atribuições medicinais este é o primeiro estudo sobre a composição e a variabilidade química de *S. floribunda*, assim como das suas bioatividades, também com a influência da variação de compostos.

Diante do exposto, considerando a importância de plantas medicinais e a escassez de pesquisas referentes à composição química destas espécies com a influência de fatores ambientais, este trabalho teve por objetivo estabelecer o perfil químico de *Secondatia floribunda* A. DC, avaliar sua atividade antimicrobiana e moduladora, analisar a variabilidade na sua composição química com a influência da sazonalidade e das diferentes fases fenológicas, além de verificar esta variação e determinar a capacidade antioxidante da espécie.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Caracterização Botânica e Etnobiologia de *Secondatia floribunda* A. DC.

2.1.1 Família Apocynaceae Juss.

Apocynaceae Juss. está inserida na ordem Gentianales (APG IV, 2016) e representa uma das maiores famílias de Angiospermas, compreendendo cerca de 5000 espécies incluídas em 450 gêneros (RAPINI et al., 2009). Está ampla e predominantemente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais, com alguns representantes ocorrendo em regiões temperadas (SENNBLAD e BREMER, 2002; JUDD et al., 2009). No Brasil, o número de espécies compreende cerca de 850 distribuídas em 95 gêneros (SOUZA e LORENZI, 2012), habitando todos os domínios fitogeográficos e com vasta distribuição em todos eles (KOCH et al., 2015; BFG, 2016).

Seus representantes apresentam diversidade de hábito, incluindo árvores, arbusto, lianas, trepadeiras ou raramente ervas. Ocasionalmente podem ser relacionados com base na presença de diversas estruturas secretoras, principalmente laticíferos contendo látex (EVER, 2006) registrados em órgãos vegetativos e reprodutivos que, geralmente, é mantido sob pressão em células vegetais vivas (AGRAWAL e KONNO, 2009) e estão envolvidos na produção de metabólitos secundários com diferentes funções incluindo mecanismos de defesa, de atração de polinizadores e dispersores, entre outros (METCALFE, 1967; JUDD et al., 2009; SOUZA e LORENZI, 2012).

A família Apocynaceae Juss. possui alta importância econômica, com espécies fornecedoras de madeira utilizada na carpintaria, a exemplo dos gêneros *Aspidosperma* Mart. e *Tabernaemontana* L. (JOLY, 2002). Na ornamentação, destacam-se *Allamanda* ssp. (alamanda), *Plumeria rubra* L. (jasmim-manga) e *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. (chapéu-de-napoleão), sendo, algumas consideradas altamente tóxicas e não apropriadas para utilização em paisagens (SENNBLAD e BREMER, 2002; SOUZA e LORENZI, 2012). Por serem tipicamente laticíferas, se destacam pela extensa utilização de seu látex, na fabricação da borracha (*Landolphia* Beauv) e goma de mascar (*Asclepias* ssp.). O látex pode conter hidrocarbonetos poliisoprenicos (borracha), triterpenos, ácidos graxos, aminas, fitoesteróis e alcalóides, entre outros compostos (MATILE, 1987) que confere às plantas maior adaptação em diferentes ambientes, uma vez que tem função relevante na defesa contra microrganismos, redução de herbívoros, como selante de

ferimentos (EVERT, 2006) e no sequestro das defesas químicas (FARRELL et al., 1991). Além disso, a família é uma importante fonte de compostos químicos bioativos, incluindo iridóides, glicosídeos cardioativos e alcaloides, especialmente dos grupos indólicos complexos (derivados de triptofano e triptamina), pirrolizidínicos, esteroidais e piridínicos. Na sua maioria detém propriedades médicas, a exemplo das substâncias vincristina e vimblastina extraídas de *Catharanthus* G. Don., largamente usadas em tratamentos da leucemia (SENNBLAD e BREMMER, 2002).

No Brasil, a diversidade de Apocynaceae relacionadas à utilização medicinal é vasta, havendo registros em estudos etnobotânicos, químicos e farmacológicos, ainda assim, verifica-se que nem todos os exemplares identificados foram devidamente estudados, especialmente por ser um grupo de ampla distribuição e ter espécies com usos diferenciados. Em estudo realizado por Santos et al. (2013) foi verificado um total de 78 espécies de Apocynaceae utilizadas no Brasil para fins medicinais, menos da metade destas tiveram suas propriedades medicinais investigadas. Na região Nordeste estes trabalhos ainda são em menor número, destacando, estudos etnobotânicos realizados na Chapada do Araripe, nos quais evidenciam espécies pertencentes à família Apocynaceae que possuem propriedades medicinais, dentre as mais relatadas nestes estudos etnobotânicos estão, *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (janaguba), *Hancornia speciosa* Gomes (mangaba), *Secondatia floribunda* A. DC. (catuaba-de-rama) e *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. (grão-de-galo), algumas das quais já apresentam estudos químicos e farmacológicos.

2.1.2 Gênero *Secondatia* A. DC.

O Gênero *Secondatia* A. DC. (inserido na subfamília Apocynoideae e tribo Odontadenieae) é pequeno, composto de lianas ou arbustos raramente escandentes, distribuídas exclusivamente na América do sul, abrangendo Brasil, Bolívia, Peru, Venezuela, Paraguai, Equador, Guiana e Colômbia (TROPICOS, 2010) com apenas *Secondatia macnabii* (Urb.) Woodson, ocorrendo na América Central. As espécies deste gênero podem ser distinguidas por suas folhas sem coletores ao longo da nervura central da face adaxial e inflorescências terminais ou subterminais (MORALES, 2003).

No Brasil são encontradas três espécies exclusivamente lianas, *Secondatia densiflora* A. DC., *Secondatia floribunda* A. DC. e *Secondatia duckei* Markgr., sendo duas endêmicas (*S. floribunda* e *S. duckei*), ocorrendo nas regiões do Norte (Roraima, Pará, Amazonas, Acre, Rondônia), Nordeste (Ceará, Bahia, Pernambuco e Piauí), Centro-Oeste (Mato

Grosso, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso do Sul) e Sudeste (Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro) estando presente nos mais diversos ambientes tais como: floresta amazônica, caatinga, cerrado e mata atlântica (KOCH et al., 2015).

Os exemplares do gênero *Secondatia* apresentam estruturas secretoras, envolvidas na produção de diferentes compostos do metabolismo secundário. Além dos lactíferos, que despenham a produção do látex, os idioblastos possuem papel importante, são localizados em órgãos vegetativos e reprodutivos nas espécies do gênero, sendo bem mais comuns no caule. Nesta estrutura secretora são identificados compostos fenólicos, o que sugere uma relação direta com a defesa das espécies (SIMÕES et al., 2004; MARTINS et al., 2013). Em outras partes vegetais, como na corola sugere-se que estas células secretoras de compostos fenólicos possam desempenhar a função de guias de néctar para polinizadores pela sua capacidade de refletir raios ultravioleta (MARTINS et al., 2013), o que demonstra características morfológicas e fisiológicas interessantes a espécies deste gênero.

2.1.3 *Secondatia floribunda* A.DC.

Secondatia floribunda A. DC. (sinônimo heterotípico *Secondatia foliosa* A. DC. e *Angadenia pruinosa* Miers), liana (trepadeira lenhosa), endêmica do Brasil, ocorre no Nordeste (Bahia, Ceará, Pernambuco, Piauí), Sudeste (Minas Gerais e Rio de Janeiro) e possivelmente no Norte (Amazonas) (Morales, 2003), nos domínios Caatinga, Cerrado e Floresta Amazônica (RAPINI et al., 2009; BFG 2015) (Figura 1.).

Conhecida popularmente no Ceará, como 'catuaba-de-rama' ou 'catuaba-de-cipó' *Secondatia floribunda* é frequentemente encontrada em diferentes áreas na Chapada do Araripe, ao sul do estado, onde se destaca por sua inflorescência branca bastante odorífera e presença de látex em seu caule ramificado. Em estudos etnobotânicos e etnofarmacológicos realizados na região as populações locais relatam indicações medicinais para impotência sexual, afrodisíaco, complicações nervosas, depressão, fraqueza, reumatismo e várias condições inflamatórias, usando o látex, raízes e, especialmente, suas cascas e entrecasas na preparação de medicamentos (MACEDO et al., 2015; RIBEIRO et al., 2014; SOUZA et al., 2014; SARAIVA et al., 2015) (Figura 2.). Por outro lado, a espécie não apresentava até o momento registros que comprovassem suas propriedades terapêuticas, sendo desconhecida em relação ao seu perfil químico-farmacológico, o que engrandece o interesse em elucidar a composição química e as propriedades desta planta.



Figura 1. Ilustração de *Secundatia floribunda* A. DC. Fonte: Flora Brasiliensis.

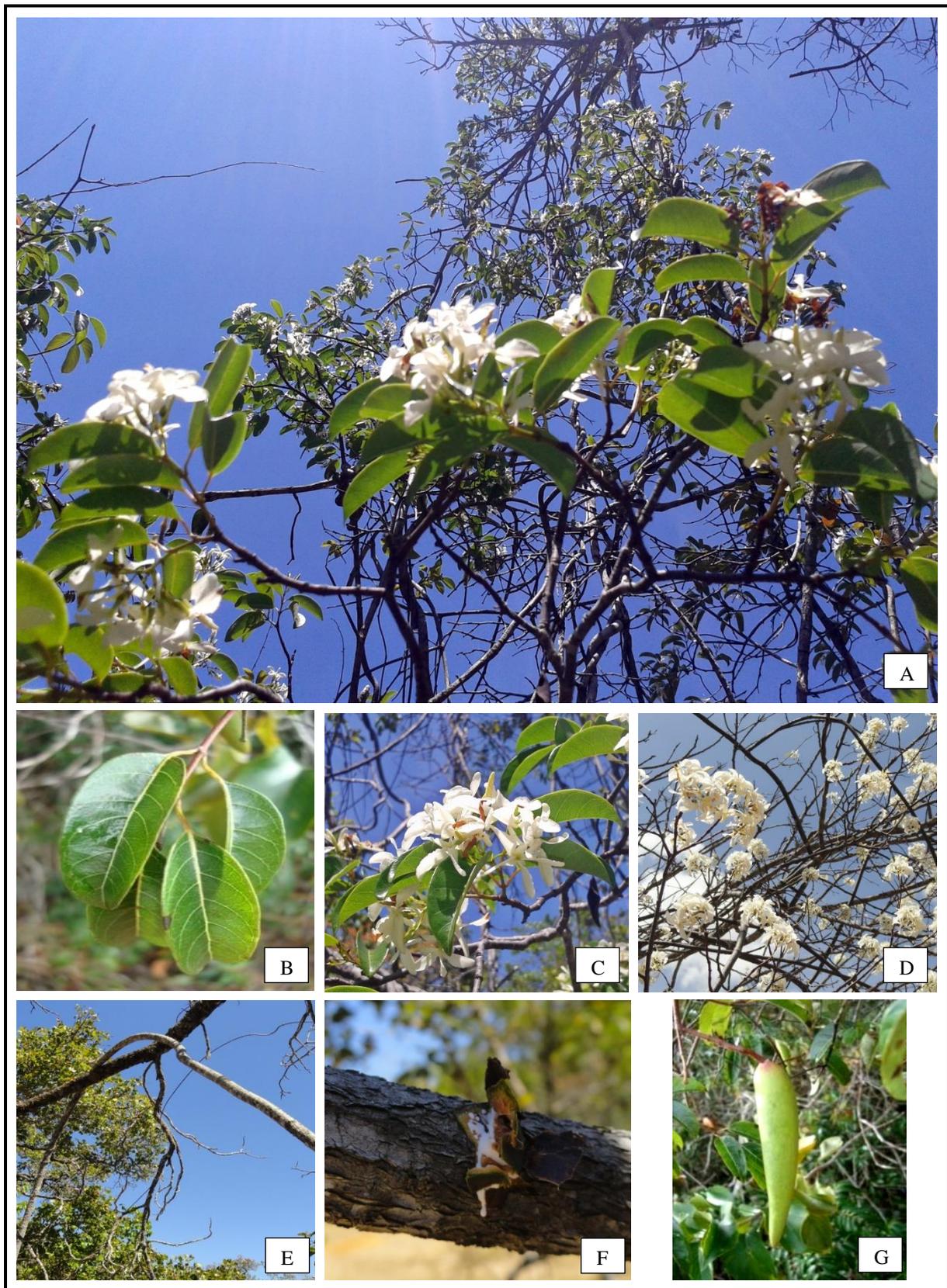


Figura 2. *Secondatia floribunda* A. DC. (catuaba-de-rama): (A) Aspecto da planta; (B) Folhas; (C) Flores; (D) Inflorescência (com queda foliar); (E) Caule ramificado; (F) Presença de látex; (G) Fruto. Fonte: Próprio autor.

2.2 A etnobiologia na seleção de plantas para a bioprospecção

No âmbito da etnobiologia, a valorização da diversidade biológica e cultural, bem como o conhecimento adquirido por diversas práticas tradicionais, torna-se uma ferramenta necessária para conhecer e classificar o uso dos recursos naturais (ALBUQUERQUE e HANAZAKI, 2006; RIBEIRO et al., 2014). A realização de pesquisas com produtos naturais, notadamente com plantas, organismos marinhos e microrganismos, sofreu enorme avanço, propiciando a descoberta de diversas substâncias químicas utilizadas atualmente na terapêutica (CRAGG e NEWMAN, 2013; DIEGUES e ARRUDA, 2001). Nesse contexto, o conhecimento empírico não só tem grande relevância na descoberta de novas plantas medicinais, fornecedoras de substâncias químicas bioativas oriundas principalmente do metabolismo celular secundário do vegetal, mas também são voltados para o planejamento de ações relacionadas à sustentabilidade dos recursos naturais manejados (DIEGUES e ARRUDA, 2001). Alguns grupos sociais possuem vasto conhecimento tradicional sobre as diferentes formas de aproveitamento e manejo dos recursos naturais, principalmente sobre as espécies vegetais (FONSECA-KRUEL e PEREIRA, 2009).

A biodiversidade é uma fonte inestimável de informação e matéria-prima que suporta vários sistemas médico-tradicionais ao redor do mundo. A importância da natureza como fonte de medicamentos tradicionais é demonstrada muitas vezes pelo *corpus* (conjunto de conhecimento) associado ao uso de recursos da flora que se destacam pela diversidade de formas de uso e pelo alto número de doenças e/ou sintomas que são tratadas (ALMEIDA e ALBUQUERQUE, 2002).

Diversos grupos étnicos criaram mecanismos e estratégias para o tratamento e prevenções de doenças. O acúmulo de conhecimento e de práticas formam sistemas médicos empíricos baseados muitas vezes no uso de recursos naturais vegetais (MONTEIRO et al., 2008). O estudo destes mecanismos fornece para a etnofarmacologia uma suposta eficácia das plantas que são selecionadas dependendo do conceito de doença e saúde por esses grupos (BERLIN e BERLIN, 2005; ALBUQUERQUE, 2010), e esta identificação também auxilia no aprimoramento de outras abordagens que utilizam plantas medicinais como objeto de estudo (ALMEIDA et al., 2010).

A obtenção de novas alternativas para o desenvolvimento de novos produtos de origem natural (MONTEIRO et al., 2008), pode caracterizar-se como um novo composto quimicamente definido e com atividade farmacológica determinada (farmacoterápico) ou

uma simples preparação tradicional a partir de partes de uma espécie medicinal (fitoterápico) que tenha avaliada sua eficácia (DI STASI, 1996).

As plantas medicinais são objeto de pesquisa em várias abordagens da etnobiologia, e apresenta dentre várias possibilidades de estudos, os métodos de extração e caracterização de diferentes classes de compostos presentes nestas plantas que formam os pilares da fitoquímica (ALMEIDA et al., 2010). A elucidação estrutural dos princípios ativos de uma planta medicinal constitui um passo indispensável para a compreensão do seu mecanismo de ação (HOSTETTMANN et al., 2003), por esta razão o entendimento e isolamento dos princípios ativos das plantas é uma das prioridades da farmacologia (CRAGG e NEWMAN, 2013).

A busca por novos medicamentos tem sido realizada por muitas abordagens, que permite a eleição de forma racional de plantas medicinais, e a obtenção de alternativas de tratamento e cura de inúmeras doenças que afetam a população (DI STASI, 2005). Shelley (2009) reporta que a abordagem etnodirigida traz melhores resultados na seleção de espécies, já que de acordo com Heinrich (2000) mais da metade da população mundial depende de medicinas tradicionais para suas necessidades médicas. Uma abordagem que vem ganhado espaço nos últimos anos é com base nas previsões da distribuição de metabólitos secundários nas plantas, através da ecologia química, que tem por objetivo promover a descoberta de novos compostos químicos ativos e posteriormente novos medicamentos (ALBUQUERQUE et al., 2012).

Investigações etnobotânicas têm sido realizadas em conjunto à abordagem química ecológica (ALMEIDA et al., 2005; MELO et al., 2017). Ao empregar a abordagem etnobotânica e/ou etnofarmacológica, as informações sobre uso de plantas medicinais fornecidas pela comunidade são combinadas aos resultados obtidos em estudos químicos e farmacológicos (ELISABETSKY e SOUZA, 2004) e caso os dados sejam positivos e efetivos, o entendimento da ecologia química das plantas investigadas se tornam essenciais.

Dentre as alternativas para estudos com espécies medicinais a tentativa de integrar a perspectiva do conhecimento tradicional em pesquisas ecológicas e as ligações entre os conhecimentos tradicionais e a conservação da biodiversidade vem se tornando relevante no âmbito da etnobiologia (SÁNCHEZ-AZOFEITA et al., 2005; CORDELL e COLVARD, 2005; GURIB-FAKIM, 2006). As comunidades locais são fonte valiosa de conhecimento e informações sobre condições específicas do local (BUNTAINE et al., 2007; BYG e SALICK, 2009). As teorias de defesa química das plantas podem ajudar na

descoberta de compostos com atividade biológica, neste sentido, Donaldson e Cates (2004) ressaltam uma maior probabilidade de encontrar extratos ativos em plantas perenes. Isso por que estas plantas investem efetivamente em defesas químicas ao longo da vida e possuem maiores níveis de compostos. No entanto, de acordo com Albuquerque et al. (2012) estudos comparativos com diferentes indivíduos em um mesmo ambiente ou em ambientes distintos são necessários para confirmar se esta relação das plantas com o ambiente pode ser bem sucedida como os estudos etnodirigidos.

Desta forma, é fundamental entender como as plantas medicinais se comportam no ambiente, como estes recursos são utilizados e como esta informação pode contribuir para estratégias de uso sustentável. A partir desta concepção de conhecimento tradicional, é possível desenhar estratégias que levam a alternativas que respeitem a necessidade de conservação, juntamente com as tradições das pessoas que usam esses recursos e o conhecimento científico (ALBUQUERQUE et al., 2011), podendo fornecer informações de melhor época de coleta e melhor período em que a mesma produz alto rendimento de substâncias essenciais para o tratamento medicinal e posteriores utilizações farmacológicas.

Ainda existe uma diversidade de espécies em áreas do Cerrado do Nordeste que não foram investigadas em relação as suas propriedades terapêuticas, diante disso, o potencial fitoquímico e farmacêutico destas espécies ainda se encontram desconhecidos (RIBEIRO et al., 2014). Acredita-se que as investigações etnobiológicas podem servir como base para diferentes estudos, fornecendo informações científicas para o entendimento da ecologia química de plantas, sendo extremamente necessários devido à escassez de trabalhos realizados com ênfase neste assunto.

2.3 Variabilidade dos compostos químicos relacionados aos fatores ambientais

Durante o desenvolvimento das plantas os compostos químicos podem ser afetados por uma variedade de fatores, que interferem na sua produção e concentração (ESTELL et al., 2016). A influencia de fatores estressantes na presença e quantidade de compostos fazem com que as plantas desenvolvem mudanças nos mecanismos bioquímicos (ARAÚJO et al., 2008). O conteúdo de diversas classes de compostos varia entre indivíduos de uma mesma espécie, de espécies para espécies e também nas partes dos vegetais (BARTON e KORICHEVA, 2010; ZHI-LIN et al., 2007). Os fatores que interferem na biossíntese e

consequentemente, ocasionam uma variabilidade no conteúdo total, bem como nas proporções relativas dos compostos químicos de diferentes espécies vegetais, podem ser abióticos tais como sazonalidade, épocas de colheita, temperatura, precipitação, ritmo circadiano, ventos fortes, altitude, solo, radiação UV, intensidade de luz, entre outros (GOUVEA et al., 2012; GOUINGUENÉ e TURLINGS, 2002; RADUSIENE et al., 2012) e bióticos como ataque de patógenos, abundância de polinizadores, dispersores, predadores e herbívoros (GOBBO-NETO e LOPES, 2007; ACHAKZAI et al., 2009; RAMAKRISHNA e RAVISHANKAR, 2011; WOJAKOWSKA et al., 2013). Essa variação possui grande importância devido às substâncias químicas terem significado biossistemático, fisiológico, ecológico, implicações evolutivas, além de importantes propriedades terapêuticas (BAKKALI et al., 2008).

Os fatores abióticos e bióticos causam estresses nas plantas como consequência de condições desfavoráveis, em resposta, as plantas produzem metabólitos secundários específicos para combater esses estresses (WANG et al., 2003; GILL e TUTEJA, 2010; VERMA e SHUKLA, 2015). Assim, os fatores ambientais (ex. umidade, temperatura, composição do solo e radiação) são decisivos na biossíntese do metabolismo secundário.

Para lidar com o a influência de fatores bióticos e abióticos, na maioria dos casos as plantas realizam um acúmulo de metabólitos para proteger a membrana plasmática, apresentam rápido desenvolvimento fenológico ou o retardo destes evitando que algum fator estressante provoque danos fisiológicos (RAMAKRISHNA e RAVISHANKAR, 2011; ZOBAYED, et al., 2005). A resistência à seca é um mecanismo que permite à planta manter o metabolismo, mesmo com a redução do potencial hídrico dos tecidos, devido principalmente ao acúmulo de solutos compatíveis (TAIZ e ZEIGER, 2013; VERSLUES et al., 2006). Esses solutos podem manter o fechamento dos estômatos para evitar a perda de água por transpiração ou por vias não estomáticas das células (turgescência) em ambientes muito secos, sendo importantes para a tolerância das plantas a ambientes estressantes (ŚLESIAK et al., 2007). Por outro lado, em situações mais severas com baixos índices de precipitação podem interferir na produção de compostos químicos, sendo possível ocorrer o mecanismo de degradação de metabólitos secundários para a manutenção do metabolismo primário (VELLOSO et al., 2009).

A época em que uma planta é coletada é um dos fatores de maior importância, visto que a quantidade e, às vezes, até mesmo a natureza dos constituintes ativos não é constante durante o ano. São relatadas, por exemplo, variações sazonais no conteúdo de praticamente todas as classes de metabólitos secundários (SCHWOB et al., 2004). A idade e o

desenvolvimento da planta, bem como dos diferentes órgãos vegetais, também são de considerável importância e podem influenciar não só a quantidade total de metabólitos produzidos, mas também as proporções relativas dos componentes da mistura (EVANS, 1996; CARNEIRO et al., 2010). Yao et al. (2016) verificaram variações notáveis nos componentes ativos dos extratos de *Pyrola incarnata* Fisch., coletados durante seis meses (maio a outubro) nas fases de desenvolvimento da espécie, onde apresentou níveis mais altos do conteúdo fenólico total e expressiva atividade antioxidante no mês de agosto.

Indivíduos de uma mesma espécie que ocorrem em diferentes ambientes podem ter diferenças na concentração de um determinado metabolito secundário (RADUSIENE et al., 2012), assim como em seus estágios vegetativo e reprodutivo (BERNARDI et al., 2008). O período de ocorrência, intensidade e duração das fenofases de floração e frutificação são irregulares, variando entre espécimes e dentro de um mesmo indivíduo. Essa variação é ocasionada devido à interação de fatores abióticos e bióticos (CRISTIANS et al., 2014).

São poucos os estudos com ênfase no acompanhamento das variações químicas ocasionadas por fatores ambientais em conjunto com os eventos fenológicos. Estudos com este objetivo foram realizados verificando a composição química de óleos essenciais. *Hypericum perforatum* L. (SCHWOB et al., 2004) e *Guarea macrophylla* Vahl. (LAGO et al., 2007) foram avaliadas em diferentes fases fenológicas, os autores concluíram que os óleos essenciais de ambas as espécies extraídos das folhas na fenofase de frutificação e no caso da *G. macrophylla* também da fenofase de floração apresentaram níveis mais altos de compostos químicos, relacionando esse aumento ao favorecimento da polinização e dispersão. Entretanto, ainda são poucas as pesquisas que conseguem elucidar a variação dos constituintes químicos das espécies de acordo com as características do ambiente e suas funcionalidades.

As fragmentações florestais mesmo se tratando de um processo ecológico apresentam influência de fatores abióticos que conseqüentemente afetam a produção de compostos em termos de variabilidade e qualidade. O efeito de borda, por exemplo, causa impactos sobre as relações ecológicas e alteram as condições microclimáticas (SAUNDERS et al., 1991). Neste sentido, Sobrinho et al. (2009) avaliando a influência do efeito de borda e da pluviosidade sobre a produção de flavonóides em *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud. no estado de Pernambuco observou que o excesso de luz causado pelo efeito, afeta a produção de flavonoides, mas não conseguiu elucidar como a planta reage com pressões ambientais relacionadas a pluviosidade.

Vários trabalhos associam as variações químicas, biossíntese e concentração aos eventos sazonais. Estes eventos relacionados ao movimento de translação da terra incluem mudanças de fotoperíodo, luminosidade, temperatura, pluviosidade e umidade do ar (MACHADO et al., 2003; SCHWOB et al., 2004; BARROS et al., 2009; BARBOSA et al., 2012; SIQUEIRA et al., 2012; NAGHILOO et al., 2012; SARTOR et al., 2013; SILVA et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2014; VERMA e SHUKLA, 2015; OUERGHEMMI et al., 2016).

Os efeitos da sazonalidade em plantas podem alterar o seu metabolismo e, conseqüentemente, vias biossintéticas (SALMINEN et al., 2001). No entanto, estes efeitos também podem ser confundidos com alterações metabólicas sob controle do processo de desenvolvimento vegetal, controlado por processos fisiológicos, desta forma é importante ressaltar que alguns fatores apresentam correlações entre si e não atuam isoladamente, podendo influir em conjunto na composição química, como por exemplo, a fase fenológica e sazonalidade (GOBBO-NETO e LOPES, 2007; YAO et al., 2016).

Considerando a sazonalidade (estações seca e chuvosa), Almeida et al. (2014) traçou os perfis fitoquímicos dos óleos essenciais das folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf. foram analisados em três áreas de cerrado no estado de São Paulo (duas áreas de floresta estacional semidecídua e uma área de cerrado *strictu sensu*) e constataram diferenças em períodos secos e chuvosos na florestas estacionais semidecíduais, enquanto que no cerrado *strictu sensu* não mostraram diferenças significativas na composição química dos compostos voláteis. O mesmo autor concluiu que fatores ecofisiológicos devem ser considerados ao se discutir sobre variações químicas em plantas, já que a sazonalidade não foi a principal causa responsável pela variação total do teor dos óleos essenciais das folhas de *C. langsdorffii* em diferentes formações do cerrado.

Para diferentes indivíduos os resultados mostraram uma elevada variabilidade intra-populacional na composição e concentração dos compostos químicos dos óleos essenciais extraídos dos diferentes órgãos (folhas, pericarpo, ramo e semente) de *C. langsdorffii* (NASCIMENTO et al., 2012). Essas observações reforçam que as condições ambientais são fundamentais na determinação da natureza bem como nas proporções relativas dos compostos químicos (GOBBO-NETO e LOPES, 2007). Monteiro et al. (2006) estudando cascas e folhas de *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All. e *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, para avaliar os níveis de taninos observaram que a sazonalidade possui forte relação com a quantidade de taninos, os quais se apresentam mais elevados no período de estiagem. Borella et al. (2001) estudando os níveis de flavonoides da espécie

Baccharis trimera Less. observaram que as amostras coletadas no verão apresentaram maior rendimento neste período que nas demais estações.

Desta forma, existe a necessidade de uma análise química detalhada de plantas destinadas ao uso terapêutico. Sabendo-se dos inúmeros fatores que podem levar a variações no conteúdo de metabólitos secundários, fica clara a necessidade de estudos visando detectar as condições e épocas para coleta que conduzam a uma matéria-prima vegetal com concentrações desejáveis de princípios ativos (GOBBO-NETO e LOPES, 2007). Além disso, o reconhecimento e a compreensão dessas variações poderão, no futuro, auxiliar na ampliação dos conhecimentos sobre interações ecológicas do vegetal com seu ambiente (LIMA et al., 2003; MARTINS et al., 2006).

2.4 Características químicas dos compostos fenólicos

As plantas superiores constituem uma das fontes mais importantes de novas substâncias utilizadas diretamente como medicinais. Para sobreviver e evoluir, os vegetais têm que competir por espaço, atrair polinizadores e se defender do ataque de herbívoros e patógenos. Neste embate, as plantas foram desenvolvendo suas próprias defesas químicas também contra estresse ambiental. Esta é uma das razões pelas quais a constituição química das plantas é tão complexa. Metabólitos secundários de plantas são produzidos para modular seus próprios metabolismos e, conseqüentemente, alcançam diversas aplicações que representam além de grande importância ecológica, alvos terapêuticos de doenças humanas (VERMA e SHUKLA, 2015; FERREIRA e PINTO, 2010).

O reino vegetal produz mais de 100 mil metabólitos secundários que se limitam a certos grupos taxonômicos (VERMA e SHUKLA, 2015). A grande variedade de metabólitos secundários, com base na via biosintética, são classificados em três grupos principais: terpenos (ou isoprenóides), compostos nitrogenados (alcalóides, glucosinolatos e glicosídeos cianogênicos) e compostos fenólicos (fenilpropanóides, flavonoides e taninos) (VIZZOTTO et al., 2010; FANG et al., 2011).

Os compostos fenólicos ou polifenóis constituem um dos grupos mais numerosos e ubiquamente distribuído, com mais de 10.000 estruturas fenólicas conhecidas (TAIZ e ZEIGER, 2006; MOORE et al., 2014; VERMA e SHUKLA, 2015). São compostos formados por moléculas que possuem um ou mais anéis aromáticos ligados a pelo menos um radical hidroxila (ACHAKZAI et al., 2009). A maioria destes compostos não é encontrada no estado livre na natureza, mas sob forma de ésteres ou de heterosídeos sendo,

portanto, solúveis em água e em solventes orgânicos polares, podendo estar ligados a açúcares, apresentando-se instáveis facilmente oxidáveis em pH alcalino (TAIZ e ZEIGER, 2006).

Estruturalmente os compostos fenólicos são diversos devido a grande variedade de combinações que ocorrem na natureza, permitindo agrupá-los em diferentes classes de acordo com sua estrutura básica, sua associação com carboidratos e formas polimerizadas, sendo classificados de acordo com o tipo de esqueleto principal (C6), que constituirá o anel benzênico e com a cadeia substituinte (C_n) (FARAH e DONANGELO, 2006; ANGELO e JORGE, 2007) (Quadro 1.).

Quadro 1. Classe dos compostos fenólicos em plantas.

Classe	Estrutura
Fenólicos simples, benzoquinonas	C6
Ácidos hidroxibenzóicos	C6-C1
Ácidos fenilacéticos, acetofenol	C6-C2
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides	C6-C3
Nafitoquinonas	C6-C4
Xantonas	C6-C1-C6
Estilbenzenos, antoquinonas	C6-C2-C6
Flavonóides	C6-C3-C6
Lignanas, neolignanas	(C6-C3) ₂
Ligninas	(C6-C3) _n
Taninos condensados	(C6-C3-C6) _n

FONTE: FARAH e DONANGELO (2006); ANGELO e JORGE (2007).

Os compostos fenólicos naturais estão presentes nos tecidos vegetais principalmente como glicosídeos e/ou associados com vários ácidos orgânicos (DAGLIA, 2012). Podem variar de moléculas simples (ex. ácidos fenólicos, fenilpropanóides, flavonóides) a compostos altamente polimerizados (ex. ligninas, melaninas, taninos), cujo papéis são essenciais ao equilíbrio da planta em seu ambiente natural, estando envolvidos no crescimento e reprodução além de sua capacidade de adaptação, atuando como agentes antipatogênicos e contribuindo na pigmentação, aroma e estabilidade oxidativa, sendo importante também para humanos na farmacologia e na alimentação (OUERGHEMMI et al., 2016; ANGELO e JORGE, 2007; MACHEIX et al., 2005; FANG et al., 2011). Esses

compostos bioativos tem seu conteúdo influenciado, entre outros fatores, pelo nível de estresse ambiental causado por fatores bióticos e/ou abióticos (ACHAKZAI et al., 2009; HANSEN e WOLD, 2010; MACHEIX et al., 2005). Além disso, estes compostos são investigados cada vez mais para implantação de pesquisas.

Dentre os compostos fenólicos, os flavonoides (antocianinas, flavonas, flavonóis e isoflavonas) são os mais representativos e amplamente distribuídos na natureza, têm um papel crucial no crescimento da planta e mecanismo de defesa contra microrganismos e insetos (SOARES, 2002; SOOBRAATTEE et al., 2005; TAIZ e ZEIGER, 2006). Alguns flavonoides como as antocianinas atuam no desenvolvimento da cor das pétalas para atrair os polinizadores (SOUSA et al., 2007; KHATIWORA et al., 2010).

Os ácidos fenólicos em geral designam fenóis que possuem um ácido carboxílico funcional. São subdivididos em derivados do ácido benzóico, como ácido gálico e ácido protocatequídico, e derivados do ácido cinâmico, que consistem principalmente de ácido cumárico, cafeico e ferúlico (DAGLIA, 2012). A maior classe de ácidos fenólicos está representada pelos ácidos hidroxicinâmicos. O composto mais representativo da classe é o ácido 3-(3,4-dihidroxifenil) 2-propenóico (ácido cafeico), a ocorrência natural se dá principalmente como um éster, chamado de ácido clorogênico (TAPIERO et al., 2002).

Os taninos são facilmente oxidáveis tanto através de enzimas vegetais específicas quanto por influência de metais. São compostos muito reativos quimicamente, subclassificados em proantocianidinas (taninos condensados) e galotaninas e elagitaninos (taninos hidrolizáveis) (DAGLIA, 2012). Estes compostos possuem uma grande diversidade de estruturas que são encontradas nas plantas com reconhecidas atividades, agem como antioxidantes por sua capacidade de ligar-se a proteínas suprimindo sua atividade enzimática, como quelantes de metais e por agirem no sequestro de radicais livres (PEREIRA et al., 2009; ARAÚJO et al., 2012).

Os compostos fenólicos possuem grande interesse econômico e ecológico, com isso apresentam diversos papéis sendo essenciais na fisiologia das plantas, garantindo sua proteção e tendo potenciais atividades no organismo humano, envolvidos na prevenção de inúmeras patologias (HEIM et al., 2002; AIRES et al., 2016), apresentando entre as diversas ações a antitumoral, anti-inflamatória, antiviral, antialérgicos, anti-hipertensivos, antimicrobianos e principalmente a mais bem relatada a antioxidante (DAGLIA, 2012; YANG et al., 2016).

Dentre as diversas propriedades biológicas atribuídas aos compostos fenólicos a antimicrobiana vem se mostrando promissora, com objetivo de encontrar nestes

constituintes mecanismos que possuam ação direta contra os microrganismos e que funcionem como agentes modificadores de resistência (KONATE et al., 2012; MATIAS et al., 2015). A prevalência de cepas bacterianas resistentes tem aumentado em todo o mundo, onde antibióticos usuais não apresentam mais eficácia para certos patógenos (CROXEN et al., 2013). Esforços para encontrar uma maneira alternativa de tratar infecções microbianas resistentes é crescente (EUMKEB et al., 2012; SOBRAL-SOUZA et al., 2018).

Estudos moleculares têm revelado que compostos fenólicos podem exercer ações moduladoras na célula através da interação com uma gama de alvos de sinalização (SOBRATTEE et al., 2005). A associação entre agentes antimicrobianos sintéticos e substâncias fenólicas tem sido estudada, onde algumas combinações tiveram efeito sinérgico para inibir o crescimento bacteriano (MATIAS et al., 2010; KONATE et al., 2012; HASSAN et al., 2016). Desta forma, a utilização destes compostos tem sido visto como uma alternativa, para que possam atuar modificando a eficácia dos agentes antimicrobianos (VERAS et al., 2012).

As substâncias designadas como antioxidantes têm a capacidade de prevenir, impedir ou reduzir danos oxidativos aos ácidos nucleicos, proteínas e lipídios. Nas plantas as tensões abióticas levam à superprodução de espécies reativas de oxigênio (ERO). Conseqüentemente estes vegetais geram um mecanismo de defesa antioxidante utilizado principalmente substâncias não enzimáticas (ácido ascórbico, compostos fenólicos, alcaloides, aminoácidos não proteicos e α -tocoferóis) que agem isoladas ou em conjunto, na proteção das células vegetais contra danos e controlando as cascatas de oxidação a partir da eliminação das ERO (GILL e TUTEJA, 2010).

Assim como agem nas plantas, algumas destas substâncias, como os compostos fenólicos, conseguem atuar como sequestradoras de espécies reativas de oxigênio em sistemas biológicos, evitando o início ou a propagação de doenças (ALVES et al., 2010). Além disso, os antioxidantes também agem na prevenção de distúrbios causados por reações com radicais livres, os quais são encontrados em excesso em casos de doenças cardíacas, arteriosclerose, alguns tipos de câncer, Alzheimer e diabetes. Grande parte destas doenças, ou seus agravamentos, está relacionado ao desequilíbrio de substâncias pró-oxidantes e antioxidantes no corpo, ou seja, quando ocorre um aumento das substâncias pró-oxidantes ao ponto dos antioxidantes não inibirem a oxidação dos substratos, causando estresse oxidativo, que causa danos na estrutura e função das células levando até à sua destruição (GOVINDARAJAN et al., 2005).

Diante dos efeitos prejudiciais de antioxidantes sintéticos á saúde humana, pesquisas com plantas para buscar antioxidantes naturais tem intensificado. Desta forma, os compostos fenólicos presentes na diversidade de plantas já estudadas, atuam interrompendo a cadeia de reação através da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis (ANGELO e JORGE, 2007), estando envolvidos tanto no sequestro de radicais livres como também, quelando metais (RAMALHO e JORGE, 2006).

Variações no conteúdo destes compostos bioativos nas plantas ocorrem influenciadas por inúmeros fatores que alteram sua acumulação e biossíntese, e o entendimento destes são essenciais para a busca de novas substâncias promissoras ao desenvolvimento de possíveis medicamentos.

Pacífico et al. (2014), verificando influência da sazonalidade no rendimento de compostos fenólicos e nas atividades biológicas de *Calamintha nepeta* (L.), verificaram que o extrato da espécie coletada durante o inverno mostrou maior rendimento de polifenóis e conseqüentemente alto potencial antioxidante, efeitos citoprotetores e anti-inflamatórios durante esse período, podendo assim definir condições experimentais úteis para obter o composto acetinina responsável pelas efetividade dos testes realizados. Sartor et al. (2013) verificaram em *Baccharis dentata* (Vell.) que as concentrações de quercetina, kaempferol e apigenina foram maiores durante a primavera e verão, o que favoreceu nas atividades antimicrobianas, já a atividade antioxidante para a espécie foi melhor durante o verão e o inverno. Em diferentes períodos de coleta durante um ano Yao et al. (2016) relataram que *Pyrola incarnata* Fisch. quando em situações de estresse causado pela seca apresenta níveis altos de componentes fenólicos os quais reforçaram a forte capacidade antioxidante, além disso, os autores definem como sendo este o momento adequado para a colheita da espécie.

Desta forma, conhecer os fatores que podem levar a variabilidade química de cada espécie vegetal é importante, principalmente, para aquelas destinadas ao uso terapêutico e que possuem interesse medicinal e comercial (ALBUQUERQUE et al., 2012; YARIWAKE et al., 2005). Contudo, estudos que visam à variabilidade química se concentram predominantemente em espécies até já comercialmente conhecidas (GOBBO-NETO E LOPES, 2007) e poucos avaliam as que possuem relatos medicinais e que ainda estão presentes somente em ambientes naturais e/ou conservados.

3. REFERÊNCIAS

ACHAKZAI, A. K. K.; ACHAKZAI, P.; MASOOD, A.; KAYANI, S. A.; TAREEN, R. B. Response of plant parts and age on the distribution of secondary metabolites on plants found in quetta. **Pakistan Journal of Botany**, v. 41, p. 2129–2135, 2009.

AGRAWAL, A.A.; KONNO, K. Latex: a model for understanding mechanisms, ecology, and evolution of plant defense against herbivory. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 40, p. 311-331, 2009.

AIRES, A.; CARVALHO, R.; SAAVEDRA, M. J. Valorization of solid wastes from chestnut industry processing: Extraction and optimization of polyphenols, tannins and ellagitannins and its potential for adhesives, cosmetic and pharmaceutical industry. **Waste Management**, v. 48, p. 457-464, 2016.

ALBUQUERQUE, U. P. Implications of ethnobotanical studies on bioprospecting strategies of new drugs in semi-arid regions. **The Open Complementary Medicine Journal**, v. 2, p. 21-23, 2010.

ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, T. A.; RAMOS, M. A.; NASCIMENTO, V. T.; MONTEIRO, J. M.; ALENCAR, N. L.; ARAÚJO, E. L. How ethnobotany can aid biodiversity conservation: Reflections on investigations in the semiarid region of NE Brazil. **Biodiversity and Conservation**, v. 18, p. 127–150. 2009.

ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 678-689, 2006.

ALBUQUERQUE, U. P.; SOLDATI, G. T.; SIEBER, S. S.; MEDEIROS, P. M.; SÁ, J. C.; SOUZA, L. C. Rapid ethnobotanical diagnosis of the Fulni-ô Indigenous lands (NE Brazil): floristic survey and local conservation priorities for medicinal plants. **Environment Development and Sustainability**, v.13, p. 277-292, 2011.

ALBUQUERQUE, U.P.; RAMOS, M. A.; MELO, J. G. New strategies for drug discovery in tropical forests based on ethnobotanical and chemical ecological studies. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 140, p. 197– 201. 2012.

ALMEIDA, C. F. C. B. R.; ARAÚJO, T. A. S.; SOBRINHO, T. J. S. P.; AMORIM, E. L. C. Ferramentas químicas aplicadas aos estudos etnobotânicos. In: ALBUQUERQUE, U. P.; LUCENA, R. F. P.; CUNHA, L. V. F. C. (Eds.). **Métodos e técnicas na pesquisa etnobiológica e etnoecológica**. Recife: NUPEEA, P. 23-37. 2010.

ALMEIDA, C. F. C. B. R.; LIMA E SILVA, T. C.; AMORIM, E. L. C.; MAIA, M. B. S.; ALBUQUERQUE, U. P. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the Caatinga (Northeast Brazil). **Journal of Arid Environments**, v. 62, p. 127 – 142. 2005.

ALMEIDA, C. F. C. B. R.; ALBUQUERQUE, U. P. Uso e conservação de plantas e animais medicinais no estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil): um estudo de caso. **Interciência**, v. 26, p. 276-285, 2002.

ALMEIDA, L. F. R., PORTELLA, R. O.; FACANALI, R.; MARQUES, M. O. M.; FREI, F. Dry and wet seasons set the phytochemical profile of the *Copaifera langsdorffii* Desf. essential oils, **Journal of Essential Oil Research**, v. 26, n. 4, p. 292-300, 2014.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Phenolic compounds in foods-A brief review. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 01-09, 2007.

APG IV (ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**. v. 181, p. 1-20. 2016.

ARAÚJO, T. A. S.; SILVA SOLON, L. G.; DA SILVA, G. A.; DAS GRAÇAS ALMEIDA, M.; DA COSTA, J. G. M.; DE AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Does rainfall affect the antioxidant capacity and production of phenolic compounds of an important medicinal species?. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 550-556. 2015.

ARAÚJO, T. A. S.; ALMEIDA, V. T. C.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Habitat influence on antioxidant activity and tannin concentrations of *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae). **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 6, p. 754–759. 2012

ARAÚJO, T. A. S.; ALENCAR, N. L.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents form the local knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 72–80, 2008.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. **Food and chemical toxicology**, v.46, n.2, p.446-475, 2008.

BARBOSA, C. S. P.; MEDEIROS S. R.; SAMPAIO T. B. P.; VIEIRA, G.; WIEDEMANN S. M. L.; VEIGA JUNIO, V. F. Influence of Abiotic Factors on the Chemical Composition of Copaiba Oil (*Copaifera multijuga* Hayne): Soil Composition, Seasonality and Diameter at Breast Height. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 10, p.1823-1833, 2012.

BARROS, F. M. C.; ZAMBARDA, E. O. E HEINZMANN, B. M. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 4, p.861-867, 2009.

BARTON, K. E.; KORICHEVA, J. The ontogeny of plant defense and herbivory: characterizing general patterns using meta-analysis. **American Naturalist**. v. 175, p. 481–493. 2010.

BERNARDI, A. P. M.; DE MATOS NUNES, J.; MARCHIORO, M. K.; ROSA, L. M. G.; VON POSER, G. L.; RECH, S. B. Phenolic compounds profiles during ex vitro acclimatization of micropropagated *Hypericum polyanthemum*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 7, p. 694-700. 2008.

BERLIN, E.; BERLIN, B. Some field methods in medical ethnobiology. **Field Methods**, v. 17, n. 3, p. 235-268, 2005.

BLANK, A. F.; FONTES, S. M.; CARVALHO FILHO, J. L. S.; ALVES, P.B.; SILVA-MANN, R.; MENDONÇA, M. C.; ARRIGONI BLANK, M. F.; RODRIGUES, M. O. Influência do horário de colheita e secagem de folhas no óleo essencial de melissa (*Melissa officinalis* L.) cultivada em dois ambientes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 1, p. 73-78, 2005.

BORELLA, J. C.; FONTOURA, A.; MENEZES, J. R. A.; FRANÇA, S. C. Influência da adubação mineral (N-P-K) e sazonalidade no rendimento e teor de flavonóides em indivíduos masculinos de *Baccharis trimera* (Asteraceae) - Carqueja. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 4, p. 99-102. 2001.

BFG (BRAZILIAN FLORA GROUP). Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**. v. 66, p. 1085-1113. 2015.

BRUNETON, J. **Pharmacognosy: phytochemistry medicinal plants**. 2º ed. Hampshire: Intercept. p. 1119, 1999.

CARNEIRO, F. B.; JÚNIOR, I. D.; LOPES, P. Q.; MACÊDO, R. O. Variação da quantidade de β -cariofileno em óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng., Lamiaceae, sob diferentes condições de cultivo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 600-606, 2010.

CIRAK, C.; RADUSIENE, J.; JANULIS, V.; IVANAUSKAS, L. Secondary metabolites in *Hypericum perforatum*: variation among plant parts and phenological stages. **Botanica Helvetica** v.117, p. 29-36. 2007a.

CIRAK, C.; RADUSIENE, J.; IVANUSKAS, L.; JANULIS, V. Variation of bioactive secondary metabolites in *Hypericum origanifolium* during its phenological cycle. **Acta Physiologiae Plantarum**. v. 29, p. 197–203. 2007b.

COLEY, P. D.; HELLER, M. V.; AIZPRUA, R.; ARAÚZ, B.; FLORES, N.; CORREA, M.; GUPTA, M.; SOLIS, P. N.; ORTEGA-BARRÍA,E.; ROMERO, L. I.; GÓMEZ, B.; RAMOS, M.; CUBILLA-RIOS, L.; CAPSON T. L.; KURSAR, T.A. Using ecological criteria to design plant collection strategies for drug discovery. **Frontiers in Ecology and the Environment**. v.1, p. 421-428. 2003.

CORDELL, G. A.; COLVARD, M. D. Some thoughts on the future of ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 100, p. 5–14, 2005.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. **Biodiversidade: Um componente essencial na descoberta de fármacos. Química de Produtos Naturais**. In: YUNES, R. A.; FILHO, V. C. (orgs) *Novos Fármacos e a Moderna Farmacognosia*, 2nd ed. Edited by Universidade do Vale do Itajaí. Itajaí, pp. 319-340. 2012.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

CRISTIANS, S.; MATA, R.; BYE, R. Phenological and geographical influence in the concentration of selected bioactive 4-phenylcoumarins and chlorogenic acid in *Hintonia latiflora* leaves. **Journal of ethnopharmacology**, v. 152, n. 2, p. 308-313. 2014.

CROXEN, M. A.; LAW, R. J.; SCHOLZ, R.; KEENEY, K. M.; WLODARSKA, M.; FINLAY, B. B. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical microbiology reviews**, v. 26, n. 4, p. 822-880, 2013.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current opinion in biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 174-181, 2012.

DI STASI, L. C. Química de produtos naturais: principais constituintes ativos. In: DI STASI, L. C. (Ed.). **Plantas Medicinais: Arte e Ciência**. Um Guia de Estudos Multidisciplinar. Editora da Universidade Estadual Paulista. pp. 109-127, 230 p., 1996.

DI STASI, L. C. An integrated approach to identification and conservation of medicinal plants in the tropical forest – a Brazilian experience. **Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization**, v. 3, p. 199-205, 2005.

DIEGUES, A. C.; ARRUDA, R. S. V. **Saberes tradicionais e biodiversidade no Brasil**. Ministério do Meio Ambiente- MMA: Brasília/ USP: São Paulo. 2001.

DUARTE, A. R.; SANTOS, S. C.; JOSÉ C.; SERAPHIN, J. C.; PEDRO H. FERRI, PEDRO H. Environmental influence on phenols and essential oils of *Myrciaria cauliflora* leaves. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 9, p. 1672-1680, 2010.

ESTELL, R. E.; FREDRICKSON, E. L.; JAMES, D. K. Effect of light intensity and wavelength on concentration of plant secondary metabolites in the leaves of *Flourensia cernua*. **Biochemical systematics and ecology**. v. 65, p. 108-114. 2016.

EUMKEB, G.; SIRIWONG, S.; THUMANU, K. Synergistic activity of luteolin and amoxicillin combination against amoxicillin-resistant *Escherichia coli* and mode of action. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 117, p. 247-253, 2012.

EVANS, W. C. **Trease and Evans' Pharmacognosy**. 14. ed. London: WB Saunders Company. 1996.

EVERT, R. F. **Esau's plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development**. 3ed. John Wiley & Sons Interscience: New York, 2006.

FANG, X.; YANG, C. M. A. Q.; YANG, L.; CHEN, X. Genomics grand for diversified plant secondary metabolites. **Plant Diversity and Resources**. v. 33, p. 53–64. 2011.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffe. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18, p. 23-36. 2006.

FARRELL, B. D.; DUSSOURD, D. E.; MITTER, C. Escalation of plant defense: do latex/resin canals spur plant diversification? **American Naturalist**, v. 138, n. 4, p. 881-900, 1991.

FERREIRA, V. F.; PINTO, A. C. A fitoterapia no mundo atual. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1829, 2010.

FIGUEIREDO, L. S.; BONFIM, F. P. G.; SIQUEIRA, C. S.; FONSECA, M. M.; SILVA, A. H.; MARTINS, E. R. Efeito da época de colheita na produção de fitomassa e rendimento de óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham). **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 11, n. 2, p. 154-158, 2009.

FONSECA-KRUEL, V. S.; PEREIRA, T. S. A **Etnobotânica e os Jardins Botânicos/ Recife**. NUPEEA/Sociedade Brasileira de Etnobiologia e Etnoecologia (Serie Estudos e Debates), v. 7, pp. 88, 2009.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant physiology and biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n.2, p. 374-381, 2007.

GOUINGUENÉ, S. P.; TURLINGS, T. C. J. The effects of abiotic factors on induced volatile emissions in corn plants. **Plant Physiology**, v.129, p.1296-1307, 2002.

GOUVEA, D. R.; GOBBO-NETO, L.; SAKAMOTO, H. T.; LOPES, N. P.; LOPES, J. L. C.; MELONI, F.; AMARAL, J. G. Seasonal variation of the major secondary metabolites present in the extract of *Eremanthus matto grossensis* Less (Asteraceae: Vernoniaeae) leaves. **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2139-2145, 2012.

GOVINDARAJAN, R.; VIJAYAKUMAR, M.; PUSHANGADAN, P. Antioxidant approach to disease management and the role of 'Rasayana' herbs of Ayurveda. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 99, p. 165–178. 2005.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**. n. 27, p. 1–93, 2006.

HASSAN, S. T.; BERCHOVÁ, K.; MAJEROVÁ, M.; POKORNÁ, M.; ŠVAJDLENKA, E. In vitro synergistic effect of *Hibiscus sabdariffa* aqueous extract in combination with standard antibiotics against *Helicobacter pylori* clinical isolates. **Pharmaceutical biology**, v. 54, n. 9, p. 1736-1740, 2016.

HANSEN, M., WOLD, A. B. **Contents of bioactive compounds in food plants as affected by traditional breeding and environmental factors**. In: OSLO, A. B. (Ed.), Bioactive Compounds in Plants benefits and Risks for Man and Animals. The Norwegian Academy of Science and Letters, pp. 212–222. 2010.

HEINRICH, M. Ethnobotany and its role in drug development. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 479-488, 2000.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores**, São carlos: EDUFSCAR, v. 6, 152 p., 2003.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal**. 13 ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, v. 4, 777 p., 2002.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. **Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético**. Tradução André Olmos Simões *et al.* 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 632 p., 2009.

KONATE, K.; HILOU, A.; MAVOUNGOU, J. F.; LEPENGUÉ, A. N.; SOUZA, A.; BARRO, N.; DATTÉ, J. Y.; M'BATCHI, B.; NACOUлма, O. G. Antimicrobial activity of polyphenol-rich fractions from *Sida alba* L. (Malvaceae) against co-trimoxazol-resistant bacteria strains. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 11, n. 1, p. 5, 2012.

KARDUM, N.; TAKIĆ, M.; ŠAVIKIN, K.; ZEC, M.; ZDUNIĆ, G.; SPASIĆ, S.; KONIĆ-RISTIĆ, A. Effects of polyphenol-rich chokeberry juice on cellular antioxidant enzymes and membrane lipid status in healthy women. **Journal of Functional Foods**, v. 9, p. 89-97. 2014.

KHATIWORKA, E.; ADSUL, V. B.; KULKARNI, M. M.; DESHPANDE, N. R.; KASHALKAR, R.V. Spectroscopic determination of total phenol and flavonoid contents of Ipomoeacarneae. **International Journal of Chem Tech Research**, v. 2, p. 1698–1701. 2010.

KOCH, I.; RAPINI, A.; SIMÕES, A.O.; KINOSHITA, L. S.; SPINA, A. P.; CASTELLO, A.C.D. 2015. **Apocynaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB4508>>. Acesso em 10 maio 2016.

KONG, D. X.; LI, X. J.; ZHANG, H. Y. Where is the hope for drug discovery? Let history tell the future. **Drug discovery today**, v. 14, p. 115-119. 2009.

KOOLEN, H. H.; DA SILVA, F. M.; GOZZO, F. C.; DE SOUZA, A. Q.; SOUZA, A. D. Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) by UPLC–ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 51, p. 467-473. 2013.

LAGO, J. H. G.; ROMOFF, P.; PIRANI, J. R.; ROQUE, N. F. Essential oil from *Guarea macrophylla* Vahl var. *Tuberculata vellozo* (Meliaceae) leaves – variation in the chemical component proportions. **Journal of essential oil research**, v. 19, p. 338-341. 2007.

LIMA, H. R. P.; KAPLAN, M. A. C.; CRUZ, A. V.M. Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas. **Floresta e ambiente**, v. 10, n. 2, p. 71-77, 2003.

MACEDO, D. G.; RIBEIRO, D. A.; COUTINHO, H. D. M.; MENEZES, I. R. A.; SOUZA, M. M. A. Práticas terapêuticas tradicionais: uso e conhecimento de plantas do cerrado no estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 14 n. 6, p. 491 – 508. 2015.

MACHADO, B. M.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A. Seasonal variation in the composition of the essential oil from the leaves, thin branches and resin of *Protium spruceanum* (Benth.) Engl. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 18, p. 338-341, 2003.

MACHEIX, J. J.; FLEURIET, A.; JAY-ALLEMAND, C. Les Composés Phénoliques Des végétaux: Un Exemple De métabolites Secondaires d'importance économique. **Presses polytechniques et universitaires romandes**, CH – 1015 Lausanne, pp. 192, 2005.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR., V.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, 429-438, 2002.

MARTINS, F. M.; MASCARENHAS, A. A. S.; MACEDO, T. P.; CUNHA NETO, I. L. Estruturas secretoras em órgãos vegetativos e florais de *Secondatia densiflora* A. DC.(Apocynaceae–Apocynoideae–Odontadenieae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 1, p. 13-24, 2013.

MARTINS, F. T.; SANTOS, M. H.; POLO, M. Variação química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit., sob condições de cultivo. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p.1203-1209, 2006.

MATIAS, E. F. F.; ALVES, E. F.; SILVA, M. K. N.; CARVALHO, V. R. A.; MEDEIROS, C. R., SANTOS, F. A. V.; BITU, V. C. N.; SOUZA, C. E. S.; FIGUEREDO, F. G.; MENEZES, I. R. A.; COUTINHO, H. D. M.; FERREIRA, J. V. A.; LIMA, L. F.; COSTA, J. G. M. Phytochemical characterization by HPLC and evaluation of antibacterial and aminoglycoside resistance-modifying activity of chloroform fractions of *Cordia verbenacea* DC leaf extracts. **European Journal of Integrative Medicine**. v. 7, p. 251–257, 2015.

MATILE, P. The sap of the plant cells. **New Phytologist** v.105, p. 1-26. 1987.

MELO, J. G.; RODRIGUES, M. D.; NASCIMENTO, S. C.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U.P. Cytotoxicity of plants from the Brazilian semi-arid region: A comparison of different selection approaches. **South African Journal of Botany**, v.113, p. 47-53. 2017.

METCALFE, C. R. Distribution of latex in the plant kingdom. **Economic Botany**, v. 21, n. 2, p. 115-127. 1967.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological reviews**, v. 52, n. 4, p. 673-751. 2000.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; NETO, E. M. F. L.; ARAÚJO, E. L.; ALBUQUERQUE, M. M.; AMORIM, E. L. C. The effects of seasonal climate changes in the Caatinga on tannin levels in *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All. And *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p. 338-344. 2006.

MONTEIRO, J. M.; LUCENA, R. F. P.; ALENCAR, N. L.; NASCIMENTO, V. T.; ARAÚJO, T. A. S. **When intention matters: Comparing three ethnobotanical data collection strategies**. In: ALBUQUERQUE, U.P.; RAMOS, M.A. (Eds.). Current Topics in Ethnobotany, pp. 113-124, 2008.

MOORE, B. D.; ANDREW, R. L.; KÜLHEIM, C.; FOLEY, W. J. Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. **New Phytologist**, v. 201, n. 3, p. 733-750. 2014.

MORALES, J. F. Studies in Neotropical Apocynaceae. III: A revision of the genus *Secondatia* A. DC., with discussion of its generic classification. **Candollea**, v. 58, p. 305-319. 2003.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 1523–1542. 2006.

NAGHILOO, S.; MOVAFEGHI, A.; DELAZAR, A.; NAZEMIYEH, H.; ASNAASHARI, S.; DADPOUR, M. R. Ontogenetic variation of total phenolics and antioxidant activity in roots: leaves and flowers of *Astragalus compactus* Lam. (Fabaceae). **BioImpacts**, v. 2, p. 105–109. 2012.

NASCIMENTO, F. G.; FAQUETI, A.; WILHELM, J. F.; WITTKOWSKI, C.; TOMCZAK, F. D.; BORGES, S. L.; YUNES, R. A.; FRANCHI JR., G. C.; NOWILL, A.E.; FILHO, V.C.; MACHADO, M. S.; FREITAS, R. A.; MALHEIROS, A. Seasonal influence and cytotoxicity of extracts, fractions and major compounds from *Allamanda schottii*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 5, p. 545-552. 2014.

NASCIMENTO, M. E.; ZOGHBI, M. G. B.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. B. Chemical variability of the volatiles of *Copaifera langsdorffii* growing wild in the Southeastern part of Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 43, p. 1-6, 2012.

OUERGHEMMI, S.; SEBEI, H.; SIRACUSA, L.; RUBERTO, G.; SAIJA, A.; CIMINO, F.; CRISTANI, M. Comparative study of phenolic composition and antioxidant activity of leaf extracts from three wild *Rosa* species grown in different Tunisia regions: *Rosa canina* L., *Rosa moschata* Herrm. and *Rosa sempervirens* L. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 167-177. 2016.

PACIFICO, S.; GALASSO, S.; PICCOLELLA, S.; KRETSCHMER, N.; PAN, S. P.; MARCIANO, S.; BAUER, R.; MONACO, P. Seasonal variation in phenolic composition and antioxidant and anti-inflammatory activities of *Calamintha nepeta* (L.) Savi. **Food Research International**, v. 69, p. 121-132. 2015.

PATWARDHAN, B.; MASHELKAR, R. A. Traditional medicine-inspired approaches to drug discovery: can Ayurveda show the way forward? **Drug discovery today**, v.14, p. 804-811. 2009.

PEREIRA, D. M.; VALENTÃO, P.; PEREIRA, J. A.; ANDRADE, P. B. Phenolics: From Chemistry to Biology. **Molecules**, v. 14, p. 2202-2211. 2009.

PISTOLLATO, F.; GIAMPIERI, F.; BATTINO, M. The use of plant-derived bioactive compounds to target cancer stem cells and modulate tumor microenvironment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 75, p. 58-70, 2015.

RADUŠIENĖ, J.; KARPAVIČIENĖ, B.; STANIUS, Ž. Effect of external and internal factors on secondary metabolites accumulation in St. John's wort. **Botanica Lithuanica**, v. 18, n. 2, p. 101-108, 2012.

RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 11, p. 1720–1731. 2011.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29 n. 4, p. 755-760. 2006.

RAPINI, A.; SILVA, R. F. S.; SAMPAIO, L. N. P. Apocynaceae. In: GIULIETTI, A. M.; RAPINI, A.; ANDRADE, M. J. G.; QUEIROZ, L. P., SILVA, J. M. C. (Orgs.), **Plantas raras do Brasil. Conservação Internacional**, Belo Horizonte. pp. 54-64. 2009.

RIBEIRO, D. A.; OLIVEIRA, L. G. S.; MACÊDO, D. G.; MENEZES, I. R. A.; COSTA, J. G. M.; SILVA, M. A. P.; LACERD, S. R.; SOUZA, M. M. A. Promising medicinal plants for bioprospection in a cerrado area of Chapa do Araripe, Northerastern Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 155, p. 1522-1533, 2014.

RODRIGUES, E.; CARLINI, E. A. Possíveis Efeitos sobre o Sistema Nervoso Central de Plantas Utilizadas por Duas Culturas Brasileiras (quilombolas e índios). **Arquivos Brasileiros de Fitomedicina Científica**. v. 11, n. 33, p. 147-154, 2003.

SALMINEN, J.P.; OSSIPOV, V.; HAUKIOJA, E.; PIHLAJA, K. Variação sazonal no conteúdo de taninos hidrolisáveis em folhas de *Betula pubescens*. **Fitoquímica**, v. 57, n. 1, p. 15-22. 2001.

SÁNCHEZ-AZOFEITA, G. A.; QUESADA, M.; RODRIGUEZ, J. P.; NASSAR, J. M.; STONER, K. E.; CASTILLO, A.; GARVIN, T.; ZENT, E. L.; CALVO-ALVARADO, J. C.; KALACSKA, M. E. R.; FAJARDO, L.; GAMON, J. A.; CUEVAS-REYES, P. Research priorities for neotropical dry forests. **Biotropica**. v. 37, n. 4, p. 477–485. 2005.

SANTOS, A. C. B., SILVA, M. A. P., SANTOS, M. A. F., LEITE, T. R. Levantamento etnobotânico, químico e farmacológico de espécies de Apocynaceae Juss. ocorrentes no Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15. n. 3, p. 442-458. 2013.

SARAIVA, M. E.; ULISSES, A.V.R.A.; RIBEIRO, D. A.; OLIVEIRA, L. G. S.; MACÊDO, D. G.; SOUSA, F. F. S.; MENEZES, I. R. A.; SAMPAIO, E. V. S. B.; SOUZA, M. M. A. Plant species as a therapeutic resource in áreas of the savann in the state of Pernambuco, Northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 171, p. 141–153, 2015.

SARTOR, T.; XAVIER, V. B.; FALCÃO, M. A.; MONDIN, C. A.; SANTOS, M. A.; CASSEL, E.; ASTARITA, L. V.; SANTARÉM, E. R. Seasonal changes in phenolic compounds and in the biological activities of *Baccharis dentata* (Vell.) GM Barroso. **Industrial crops and products**, v. 51, p. 355-359. 2013.

SAUNDERS, D. A.; HOBBS, R. J.; MARGULES, C. R. Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review. **Conservation Biology**. v. 5, p. 18–32, 1991.

SCHWOB, I.; BESSIERE, J. M.; MASOTTI, V.; VIANO, J. Changes in essential oil composition in Saint John's wort (*Hypericum perforatum* L.) aerial parts during its phenological cycle. **Biochemical systematics and ecology**, v. 32, n. 8, p. 735-745, 2004.

SENNBLAD, B.; BREMER, B. Classification of Apocynaceae *s.l.* according to a new approach combining Linnaean and phylogenetic taxonomy. **Systematic Biology**, v. 51, p. 389-409. 2002.

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, 2012.

SHELLEY, B. C. L. Ethnobotany and the process of drug discovery: A laboratory exercise. **The American Biology Teacher**, v. 71, n. 9, p. 541-547, 2009.

SILVA, E. B. P.; SOARES, M. G; MARIANE, B.; VALLIM, M. A.; PASCON,R. C.; SARTORELLI, P.; LAGO, J. H. The seasonal variation of the chemical composition os essential oils from *Porcelia macrocarpa* R. E. Fries (Annonaceae) and their antimicrobial activity. **Molecules**, v.18, p. 13574-13587, 2013.

SILVA, H. C. H.; CARACIOLO, R. L. F.; MARANGON, L. C.; RAMOS, M.A.; SANTOS, L.L.; ALBUQUERQUE, U. P. Evaluating different methods used in ethnobotanical and ecological studies to record plant biodiversity. **Journal of ethnobiology and ethnomedicine**, v. 10, n. 1, p. 48. 2014.

SIQUEIRA, C. F.; CABRAL, D. L.; PEIXOTO SOBRINHO, T.; AMORIM, E. L. C.; MELO, J. G.; ARAUJO, T. A. S.; ALBUQUERQUE, U. P. Levels of tannins and flavonoids in medicinal plants: evaluating bioprospecting strategies. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 434782. 2012.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5a Ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 833p., 2004.

ŚLESIAK, I.; LIBIK, M.; KARPINSKA, B.; KARPINSKI, S.; MISZALSKI, Z. The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. **Acta Biochimica polonica**, v. 54 n. 1, p. 39–50. 2007.

SOARES, S. E. Phenolic acids as antioxidants. **Revista de Nutrição**, v. 15, p. 71-81. 2002.

SOBRAL-SOUZA, C. E.; SILVA, R. A.; LEITE, N. F.; COSTA, J. G.; MENEZES, I. R.; CUNHA, F. A.; ROLIM, L. A.; COUTINHO, H. D. LC-MS Analysis and Cytoprotective effect against the Mercurium and Aluminium Toxicity by Bioactive products of *Psidium brownianum* Mart. ex DC. **Journal of hazardous materials**. v. 353, p. 1-9, 2018.

SOBRINHO, T. J. S. P.; CARDOSO, K. C. M.; GOMES, T. L. B.; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C. Análise da pluviosidade e do efeito de borda sobre os teores de flavonóides em *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud., Fabaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.3, p. 740-745. 2009.

SOBRATTEE, M. A.; NEERGHEEN, V. S.; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA, O. I.; BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 579, n. 1, p. 200-213. 2005.

SOUSA, R. R.; QUEIROZ, K. C.; SOUZA, A. C.; GURGUEIRA, S. A.; AUGUSTO, A. C.; MIRANDA, M. A.; PEPPELENBOSCH, M. P.; FERREIRA, C.V.; AOYAMA, H. Phosphoprotein levels, MAPK activities and NfκB expression are affected by fisetin. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v.22, p. 439–444. 2007.

SOUSA, A.; MALHEIRO, R.; CASAL, S.; BENTO, A.; PEREIRA, J.A. Antioxidant activity and phenolic composition of Cv: *Cobrancosa* olives affected through the maturation process. **Journal of Functional Foods**, v. 11, p. 20–29. 2014.

SOUZA, O. E.; COLARES, A. V., RODRIGUES, F. F. G.; CAMPOS, A. R.; LIMA, G. S., COSTA, J. G. M. Effect of collection time on essential oil composition of *Lantana câmara* Linn (Verbenaceae) growing in Brazil Northeastern. **Records of natural products**, v. 4, n. 1, p. 31-37, 2010.

SOUZA, R. K. D.; SILVA, M. A. P.; MENEZES, I. R. A.; RIBEIRO, D. A.; BEZERRA, L. R.; SOUZA, M. M. A. Ethnopharmacology of medicinal plants of Carrasco, northeastern of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v.157, p. 99–104. 2014.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III**. 3 ed. São Paulo: Instituto Plantarum. 2012.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**. Nova Odessa, Instituto Plantarum. pp.703, 2005.

TAIZ, L., ZEIGER, E. **Plant Physiology**. Universitat Jaume I. Sinauer Associates Publishers, Sunderland. Vol. 10, 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 5th edn (Porto Alegre: Artmed). 2013.

TAPIERO, H.; TEW, K. D.; NGUYEN BA, G.; MATHÉ, G. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? **Biomed. Pharmacother**. v. 56, p. 200-2007. 2002.

TROPICOS. **Apocynaceae** **Juss.** Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/42000278?tab=maps>> Acesso em: 21 Dezembro de 2016.

VELLOSO, M. A. L.; ABREU, I. N.; MAZZAFERA, P. Indução de metabólitos secundários em plântulas de *Hypericum brasiliense* Choisy crescendo in vitro. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 2, p. 267-272. 2009.

VERAS, H. N. H.; SANTOS, I. J. M.; SANTOS, A. C. B.; FERNANDES, C. N.; MATIAS, E. F. F.; LEITE, G. O.; SOUZA, H. H. F.; COSTA, J. G.; COUTINHO, H. D. Comparative evaluation of antibiotic and antibiotic modifying activity of quercetin and isoquercetin in vitro. **Current Topics in Nutraceuticals Research**, v. 9, n. 1/2, p. 25, 2011.

VERMA, N.; SHUKLA, S., Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plant**. v.2, n.4, p. 105–113. 2015.

VERSLUES, P. E.; AGARWAL, M.; KATIYAR-AGARWAL, S.; ZHU, J.; ZHU, J. K. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. **The Plant Journal**, v. 45, n. 4, p. 523-539. 2006.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A.C.R.; WEBER, G. E. B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. **Embrapa Clima Temperado-Docmentos (INFOTECA-E)**, 2010.

WANG, W.; VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, v. 218, p. 1–14. 2003.

WOJAKOWSKA, A.; MUTH, D.; NAROZNA, D.; MADRZAK, C.; STOBIECKI, M.; KACHLICKI, P. Changes of phenolic secondary metabolite profile in the reaction of narrow leaf lupin (*Lupinus angustifolius*) plants to infections with *Colletotrichum lupinifungus* or treatment with its toxin. **Metabolomics**, v. 9, p. 575–589. 2013.

YAO, X. H.; ZHANG, Z. B.; SONG, P.; HAO, J. Y.; ZHANG, D. Y.; ZHANG, Y. F. Different harvest seasons modify bioactive compounds and antioxidant activities of *Pyrola incarnata*. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 405-412. 2016.

YARIWAKE, J. H.; LANÇAS, F. M.; CAPPELARO, E. A.; VASCONCELOS, E. C. D.; TIBERTI, L. A.; PEREIRA, A. M. S.; FRANCA, S. D. C. Variabilidade sazonal de constituintes químicos (triterpenos, flavonóides e polifenóis) das folhas de *Maytenus aquifolium* Mart.(Celastraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 162-168. 2005.

ZHI-LIN, Y.; CHUAN-CHAO, D.; LIAN-QING, C. Regulation and accumulation of secondary metabolites in plant-fungus symbiotic system. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 1266–1271. 2007.

ZOBAYED, S. M. A.; AFREEN, F.; KOZAI, T. Temperature stress can alter the photosynthetic efficiency and secondary metabolite concentrations in St. John's wort. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, n. 10, p. 977-984, 2005.

CAPÍTULO 1

Perfil químico e atividade antibacteriana de *Secondatia floribunda* A.DC (Apocynaceae)

O capítulo a seguir representa o manuscrito publicado e redigido (em língua portuguesa) segundo as normas estruturais e bibliográficas do periódico *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*.

Resumo

O presente estudo teve por objetivo estabelecer o perfil químico e avaliar a atividade antibacteriana e moduladora dos extratos etanólicos da entrecasca e cerne de *Secondatia floribunda* A.DC. As quantificações de fenóis e flavonoides totais foram determinadas pelo método de Folin-Ciocalteu e cloreto de alumínio, respectivamente. Os compostos fenólicos foram identificados e quantificados por CLAE-DAD (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos) e a espectroscopia de Infravermelho foi realizada utilizando a medida do tipo Reflexão Total Atenuada com Transformada de Fourier (ATR-FTIR). Os ensaios antibacterianos para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da modificação a aminoglicosídeos foram realizados por microdiluição. Os extratos mostraram ser uma fonte de diversas classes de flavonoides. Os espectros de infravermelho apresentaram características semelhantes, tendo entre suas principais bandas de absorção o grupo hidroxila (OH). A atividade antibacteriana mostrou resultados clinicamente significativos para cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. No ensaio de modulação, observou-se efeito sinérgico e antagônico para ambos os extratos. O extrato do cerne em combinação com os antibióticos mostrou uma redução significativa da CIM em 19,8% ($P < 0,0001$) - 79,3% ($P < 0,01$). Este estudo é o primeiro relato de informações químicas e biológico de *Secondatia floribunda* e ressalta a necessidade de elucidar o potencial terapêutico de espécies utilizadas por comunidades locais, além disso, sugere que seja fonte clinicamente relevante de uma nova terapia antibacteriana, especialmente devido à presença de níveis significativos de compostos fenólicos.

Palavras-chave: Composição química; CLAE; Cinchonina; Produto natural; Resistência à modificação.

1. Introdução

Ao longo dos anos, vários estudos têm sido desenvolvidos para demonstrar a eficácia das plantas medicinais em relação a sua atividade biológica [1]. Anterior a isso, diversas plantas já eram utilizadas como alternativa de recurso terapêutico disponível [2, 3]. Através do conhecimento médico tradicional uma infinidade de extratos vegetais se tornaram conhecidos por apresentarem substâncias ativas, as quais são de interesse para o desenvolvimento de novos medicamentos. Dentre estas substâncias, grande atenção tem sido atribuída aos estudos dos compostos fenólicos, tanto por suas propriedades químicas quanto por suas ações farmacológicas [4, 5]. Assim, diversos compostos desta classe têm sido isolados, para melhor entender o seu potencial [6, 7].

Entre as atividades relacionadas aos compostos fenólicos, à antimicrobiana se mostra importante, pois essas substâncias possuem características favoráveis para afetar vários componentes e funções da célula bacteriana e até facilitar a absorção na célula [8]. Assim, torna-se relevante realizar pesquisas com o objetivo de encontrar mecanismos que atuem não apenas diretamente contra microrganismos, mas também os agentes modificadores de resistência [9,10].

O gênero *Secondatia* (Apocynaceae) contém 12 espécies distribuídas exclusivamente na América do sul. No Brasil são encontradas três espécies sendo duas endêmicas (*Secondatia floribunda* e *Secondatia duckei*), ocorrendo no Norte, Nordeste e Centro-Oeste, estando presentes em ambientes de cerrado, caatinga, mata atlântica e floresta amazônica. A família deste gênero é uma das maiores e mais representativas no Brasil [11]. Seus representantes destacam-se como importante fonte de constituintes químicos usuais da medicina tradicional e moderna, abrangendo espécies ricas em compostos fenólicos e iridóides [9,12].

Nesse contexto, destacamos a espécie *Secondatia floribunda* A.DC (Apocynaceae) frequentemente encontrada em áreas de cerrado na Chapada do Araripe, ao sul do estado do Ceará. Conhecida popularmente na região como “catuaba-de-rama” ou “catuaba-de-cipó”, a espécie tem se destacado em estudos etnobotânicos, onde populações locais relatam indicações medicinais para impotência sexual, afrodisíaca, complicações nervosas, depressão, fraqueza, reumatismo e diferentes condições inflamatórias, utilizando o látex, raízes e principalmente suas cascas na preparação de medicamentos [1,3,13,14]. No entanto, não há relatos na literatura sobre estudos químicos, biológicos e farmacológicos sobre a espécie.

Desta forma, considerando a importância medicinal dessa espécie para as comunidades e a ausência de informações científicas relacionadas a dados químicos e biológicos, esse estudo trata do primeiro relato sobre o perfil químico da entrecasca e cerne de *Secundatia floribunda*, bem como a sua atividade antibacteriana e moduladora.

2. Material e Métodos

2.1 Coleta do material vegetal

Amostras de entrecasca e o cerne de *Secundatia floribunda* foram coletadas na Floresta Nacional do Araripe - Apodi (FLONA - Araripe) (07° 11' S e 39° 13' W), Crato, Ceará, Brasil. O material vegetal testemunho (N° 9259) foi depositado no Herbário Carirense Dárdano de Andrade Lima da Universidade Regional do Cariri (URCA). A autorização para a coleta de material botânico foi fornecida pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), registrado sob o número 51674-1.

2.2 Preparação dos extratos

Os extratos foram preparados usando 334 g de entrecasca do caule e 294 g de cerne. As amostras foram adicionadas separadamente em frascos contendo 2 L de etanol, durante 72h à temperatura ambiente. Após este período, o etanol foi removido utilizando aparelho evaporador rotativo a vácuo (modelo Q-344B, Quimis, Brasil) e banho ultratermal (modelo Q-214M2, Quimis) sob pressão reduzida, a uma temperatura de 50° C. Os rendimentos para os extratos foram de 36.0% e 8,8% (ww⁻¹) para a entrecasca do caule e cerne, respectivamente.

2.3 Químicos, reagentes e equipamentos

Todos os produtos químicos utilizados eram de grau analítico. O metanol e ácido trifluoroacético foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). A Cianidina foi adquirida da ChromaDex. O ácido gálico, ácido clorogénico, ácido cafeico, apigenina, cinchonafina, catequinas e quercetina foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de

diodos (CLAE-DAD) foi realizada utilizando o sistema de CLAE (Shimadzu, Kyoto, Japão) destaque Auto Sampler (SIL-20A), equipado com Shimadzu LC-20AT com bombas alternadas conectadas ao degaseificador DGU 20A5 e com o integrador CBM 20A com detector DAD (diodo) SPD-M20A e software LC solução 1,22 SP1. Os espectros da transmitância (Fourier Transform-Infrared Spectroscopy) FT-IR foram obtidos no espectrômetro da série Agilent Technologies Cary 600. As mensurações das absorvâncias em função das concentrações foram feitas em espectrofotômetro de UV-visível (Thermo Fisher mod. G10S UV-Vis).

2.4 Testes químicos qualitativos

Os testes fitoquímicos foram realizados para detectar a presença de heterosídeos, taninos, flavonóides, esteroides, triterpenos, cumarinas, quinonas, ácidos orgânicos e de alcaloides, conforme descrito por Matos [15] baseando-se em leituras colorimétricas ou formação de precipitado após a adição de reagentes específicos.

2.5 Determinação do teor de fenóis e flavonoides totais

A determinação do conteúdo fenólicos seguiu o método descrito por Singleton [16], em que as diluições dos extratos foram preparadas em concentrações que variaram de 0,05 a 5,0 µg/mL. As soluções permaneceram em estufa por 15 minutos a uma temperatura de 45°C. Após este período, a leitura foi realizada em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 765nm. O teste foi realizado em triplicata. O teor de compostos fenólicos foi calculado a partir da curva de calibração utilizando ácido gálico em µgEq.AG/g.

O teor de flavonoides foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Kosalec [17], com adaptações, utilizando cloreto de alumínio (AlCl₃). As amostras de cada extrato foram preparadas a uma concentração inicial de 20 µg/mL e diluídas para se obter as concentrações de 10, 5, 2 e 1 µg/mL. Em 50 µl de cada concentração dos extratos foram adicionados 760 µL de metanol, 40 µL de acetato de potássio (10%), cloreto de alumínio (10%) e 1,120 µL de água destilada. No ensaio em branco, o volume de cloreto de alumínio e acetato de potássio a 10% foi substituído por água destilada. A incubação ocorreu à temperatura ambiente durante 30 min e a leitura realizada em espectrofotômetro a 415 nm. A curva de calibração foi realizada com quercetina, o teste foi realizado em triplicata e o valor médio expresso em µgEq.Q/g.

2.6 Quantificação de compostos fenólicos e flavonoides por CLAE-DAD

As análises cromatográficas com fase reversa foram realizadas utilizando Coluna C₁₈ (250mm x 4,6 mm) com partículas medindo 5µm de diâmetro. A fase móvel consistiu de fase A = metanol e fase B = solução de água com 0,05% de ácido trifluoroacético, previamente desgaseificada utilizando um banho de ultrassons. Um programa de gradiente, do seguinte modo: 0 min, 15% de fase A; 35 min, 30% de fase A; 45 min, 40% de fase A, continuou até 60 minutos, e seguiu-se á 2 minutos pós-tempo para reequilibrar o sistema, a uma taxa de fluxo de 0.5 mL/min [18]. O eluente foi monitorizado por um PDA, e os comprimentos de onda de detecção foram de 254nm para o ácido gálico, 280nm para catequina e cinchonaína; 327nm para clorogênico e ácido cafeico; 356nm para quercetina e apigenina; e 520nm para cianidina. O volume de injeção de amostra foi de 50 µL.

O extrato etanólico (entrecasca do caule e cerne) de *S. floribunda* e a fase móvel foram filtradas através de filtro de membrana de 0,45 µm (Millipore) e, em seguida, desgaseificou-se por banho de ultrassons antes da sua utilização, os extratos de *S. floribunda* foram analisados a uma concentração de 20 mg/mL. As soluções de substâncias padrões de referência foram preparadas em fase móvel de CLAE numa concentração de 0,03 - 0,50 mg/mL. Picos cromatográficos foram confirmados por comparação do seu tempo de retenção com os de padrões de referência e por espectros de DAD (200 - 700 nm). Todas as operações cromatográficas foram realizadas a temperatura ambiente e em triplicata. A curva de calibração para cianidina: $Y = 11853x + 1347.5$ ($r = 0.9998$); ácido gálico: $Y = 12675x + 1284.9$ ($r = 0.9999$); catequina: $Y = 1308x + 1249.0$ ($r = 0.9995$), ácido clorogênico: $Y = 12895x + 1176.1$ ($r = 0.9997$), ácido cafeico: $Y = 11963x + 1375.8$ ($r = 0.9996$), quercetina: $Y = 13572x + 1263.6$ ($r = 0.9999$), apigenina: $Y = 13580x + 1195.4$ ($r = 0.9998$) e cinchonaína: $Y = 11985x + 1273.4$ ($r = 0.9997$).

O limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) foi calculado com base no desvio padrão das respostas e a inclinação por meio de três curvas de análise independentes. LOD e LOQ foram calculados como 3,3 e 10 σ/S , respectivamente, onde σ é o desvio padrão da resposta e S é o declive da curva de calibração [19].

2.7 Espectroscopia de Infravermelho de transformada de Fourier (FT-IR)

As medições de transmitância FT-IR dos extratos de *S. floribunda* foram obtidas na região do infravermelho médio (4000 cm^{-1} a 600 cm^{-1}) com o espectrômetro Agilent

Technologies Cary 600 series. Aproximadamente 1 mg de amostra foi triturado com cerca de 100 mg de brometo de potássio (KBr), depois prensado em peletes de 1 mm sob pressão a cerca de 7 (sete) toneladas. Em seguida, os espectros foram obtidos com 32 varreduras e uma resolução espectral de 4 cm^{-1} .

2.8 Determinação da atividade antibacteriana e moduladora dos aminoglicosídeos

A atividade antibacteriana dos extratos foi avaliada utilizando o método de microdiluição em caldo [20]. Foram utilizadas quatro estirpes de bactérias padrão fornecidas pela Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, *Staphylococcus aureus* (ATCC 12692), *Enterococcus faecalis* (ATCC 4083), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Proteus vulgaris* (ATCC 13315) e os isolados clínicos multirresistentes: *Escherichia coli* (27) obtida de escarro e *Staphylococcus aureus* (358) de ferida cirúrgica, doadas pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Na concentração inibitória mínima (CIM) utilizou-se um inóculo bacteriano de 100 μL suspenso em caldo BHI 10% em placas de microtitulação com 96 poços. Em seguida, 100 μL de cada extrato foram adicionados em cada poço com diluições seriadas (1:2), obtendo-se concentrações no intervalo de 512 a 8 $\mu\text{g/mL}$. Para os controles foram utilizados os últimos poços de cada coluna e as placas de microtitulação foram incubadas a 37°C por 24 h. A atividade antibacteriana foi detectada através da adição de 25 μL do reagente de resazurina [21]. A CIM foi definida como as menores concentrações para a inibição do crescimento.

Para avaliar os extratos como moduladores da resistência aos antibióticos da classe dos aminoglicosídeos (neomicina, gentamicina e ampicilina) foram utilizadas uma linhagem Gram (+) (*S. aureus* ATCC 12692) e uma Gram (-) (*E. coli* ATCC 25922). O teste de modulação foi determinado na presença ou ausência dos extratos, em triplicata. Inóculos bacterianos (CIM/8) em BHI 10% foram distribuídos nas placas com a adição de 100 μL das soluções de antibióticos (1024 $\mu\text{g/mL}$), avaliados em concentrações de 512 a 0,5 $\mu\text{g/mL}$ e seguindo o ensaio de microdiluição e colorimétrico descrito anteriormente. Os mesmos controles utilizados na avaliação da CIM para os extratos foram utilizados para a modulação [22].

2.9 Análises estatísticas

As diferenças entre os grupos de CLAE foram avaliadas por uma análise de modelo de variância e teste de Tukey. Os resultados microbiológicos foram expressos como média geométrica e a análise dos resultados foi aplicada a ANOVA bidirecional seguida de pós-teste de Bonferroni utilizando o software GraphPad Prism 6.0. Os resultados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3. Resultados

3.1 Teste fitoquímico

A prospecção química de extratos *S. floribunda* indicaram a presença de taninos flababênicos e flavonoides (flavonas, flavonóis, xantonas, chalconas, Auronas, Flavononois, Leucoantocianidinas, Catequinas e flavononas) (Tabela 1), não revelando diferença de fitoquímicos entre as partes distintas da planta.

Tabela 1 Identificação das principais classes químicas dos extratos etanólicos de *S. floribunda*.

Extratos	Classes de Metabólitos Secundários														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Entrecasca	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Cerne	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

1 – Fenóis; 2 – Taninos Pirogálicos; 3 – Taninos Flababênicos; 4 – Antocianinas; 5 – Antocianidinas; 6 – Flavonas; 7 – Flavonóis; 8 – Xantonas; 9 – Chalconas; 10 – Auronas; 11 – Flavononois; 12 – Leucoantocianidinas; 13 – Catequinas; 14 – Flavononas; 15 – Alcaloides; (+) presença; (-) ausência.

3.2 Conteúdo total de fenóis e flavonoides

O conteúdo fenólico obtido para o extrato etanólico da entrecasca e do cerne de *S. floribunda* foi de $37,71 \pm 0,40 \mu\text{g eq.AG/g}$ e $33,65 \pm 1,40 \mu\text{g eq.AG/g}$, respectivamente. O teor de flavonoides obtido foi de $27,84 \pm 1,60 \mu\text{g eq.Q/g}$ para a entrecasca do caule e $45,62 \pm 3,00 \mu\text{g eq.Q/g}$ para o cerne. Os dados indicam concentração pouco variável destes

compostos entre as partes vegetais avaliadas. O cerne apresentou concentração significativamente maior de flavonoides quando comparado ao obtido pela entrecasca, em contra partida apresentou alta quantidade de fenóis.

3.3 Análise química por CLAE-DAD

A análise por CLAE do extrato etanólico de *S. floribunda* (entrecasca do caule e cerne) revelou a presença de ácido gálico (tempo de retenção - t_R = 10,45 min; pico 1), cianidina (t_R = 15,09 min; pico 2), catequina (t_R = 19,54 min; pico 3), ácido clorogênico (t_R = 25,41 min; pico 4), ácido caféico (t_R = 27,83 min; pico 5), cinchonina (t_R = 33,01 min; pico 6), quercetina (t_R = 43,76 min; pico 7) e apigenina (t_R = 52,95 min; pico 8) (Figura 1 e Tabela 2).

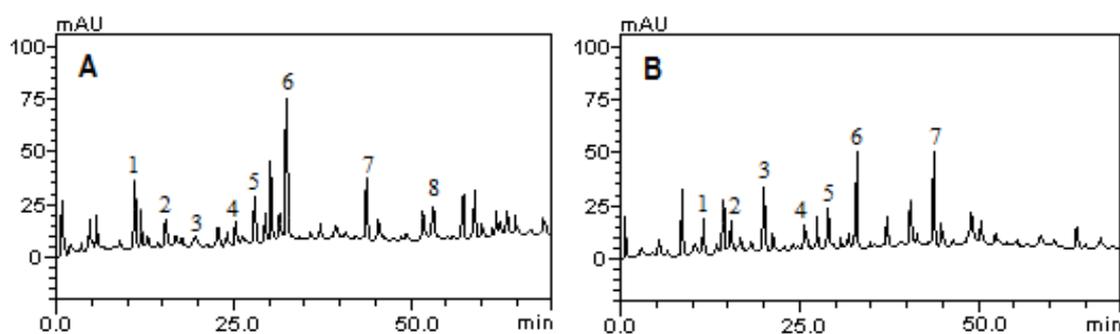


Figura 1 Representação do perfil da cromatografia líquida de alta eficiência de *S. floribunda*, entrecasca (A) e cerne (B). Ácido gálico (pico 1), cianidina (pico 2), catequina (3 pico), ácido clorogênico (4 pico), ácido cafeico (pico 5), cinchonina (pico 6), quercetina (pico 7) e apigenina (pico de 8).

De acordo com as partes vegetais analisadas, os resultados dos teores totais e individuais dos compostos mostram variabilidade quantitativa. O extrato da entrecasca do caule apresentou maior concentração de compostos fenólicos em relação ao extrato do cerne que não revelou a presença do composto apigenina (Figura 2 e Tabela 2). Estes resultados corroboram com o teor total de fenóis e flavonoides mostrados neste trabalho.

Dentre os compostos, cinchonina apresentou quantidade substancialmente maior entre os extratos avaliados, com valores de $10,17 \pm 0,01$ mg/g para a entrecasca do caule e $5,03 \pm 0,01$ mg/g para o cerne, embora tenha apresentado os valores mais altos para ambas

as partes vegetais, cinchonaína foi quantitativamente mais elevado para a entrecasca do caule. Por outro lado, o composto de catequina demonstrou-se em menor quantidade para o extrato da entrecasca ($0,61 \pm 0,03$ mg/g), enquanto que para o cerne apresentou valor consideravelmente maior ($3,29 \pm 0,02$ mg/g). Além disso, o extrato do cerne apresenta o flavonoide quercetina em quantidade similar ao composto cinchonina e superior ao apresentado pelo extrato da entrecasca ($5,03 \pm 0,01$ mg/g e $3,26 \pm 0,01$ mg/g, respectivamente). Com valores semelhantes, cianidina apresentou para o extrato da entrecasca do caule $1,48 \pm 0,01$ mg/g e para o cerne de $1,34 \pm 0,01$ mg/g.

Tabela 2 Composição fenólica e flavonoídica do extrato etanólico da entrecasca e cerne de *Secundatia floribunda*.

Compostos	Entrecasca (mg/g)	Cerne (mg/g)	LOD (µg/mL)	LDQ (µg/mL)
Ácido gálico	$3,27 \pm 0,02^a$	$1,38 \pm 0,03^a$	0,008	0,027
Cianidina	$1,48 \pm 0,01^b$	$1,34 \pm 0,01^a$	0,019	0,063
Catequina	$0,61 \pm 0,03^c$	$3,29 \pm 0,02^b$	0,025	0,081
Ácido clorogênico	$1,39 \pm 0,01^b$	$1,18 \pm 0,01^c$	0,007	0,024
Ácido cafeico	$3,05 \pm 0,02^d$	$1,40 \pm 0,03^a$	0,034	0,113
Cinchonaína	$10,17 \pm 0,01^e$	$5,06 \pm 0,02^d$	0,023	0,069
Quercetina	$3,26 \pm 0,01^a$	$5,03 \pm 0,01^d$	0,016	0,048
Apigenina	$1,49 \pm 0,04^b$	-	0,030	0,091

Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão (DP) de três determinações. Médias seguidas por letras diferentes diferem pelo teste de Tukey $p < 0,05$.

O ácido fenólico mais abundante foi o ácido gálico apresentando $3,27 \pm 0,02$ mg/g para a entrecasca e $1,38 \pm 0,03$ mg/g para o cerne. No extrato da entrecasca, os ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido cafeico e ácido clorogênico) se destacam com quantidades consideráveis, com exceção do ácido clorogênico que apresentou quantidade semelhante entre as partes distintas da planta ($1,39 \pm 0,01$ e $1,18 \pm 0,01$ mg/g, respectivamente).

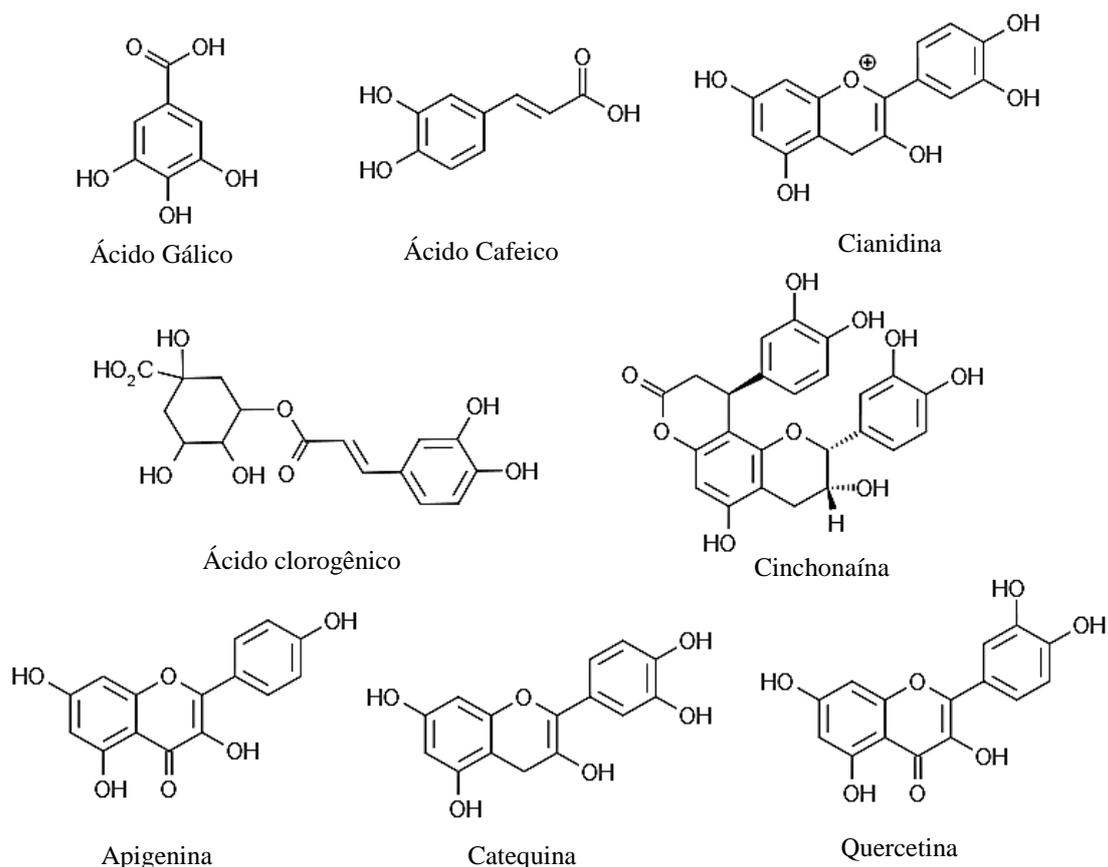


Figura 2 Estruturas dos compostos fenólicos detectados no extrato etanólico da entrecasca e cerne de *Secodontia floribunda*.

3.4 Espectroscopia de Infravermelho

As figuras 3A e 3B apresentam espectros na região do infravermelho dos extratos etanólicos de *S. floribunda* obtidos pelo modo de transmitância e com características muito semelhantes. As absorções específicas observadas auxiliaram na identificação dos compostos fenólicos e flavonoides, em que o perfil espectroscópico obtido para o extrato da entrecasca (Figura 3A) apresentou entre as principais absorções: banda larga referente à deformação axial de O–H em 3.376 cm^{-1} , na região de 2.929 e 2.852 cm^{-1} bandas referente à deformação axial dos grupos CH_2 e CH_3 , deformação axial C=C de anel aromático em 1.612 , 1.520 e 1.447 cm^{-1} .

O espectro de infravermelho do extrato do cerne (Figura 3B) apresenta as seguintes bandas de absorção: banda larga referente à ligação O–H em 3.365 cm^{-1} , deformação axial C–H em 2.925 cm^{-1} referente ao grupo CH_2 , deformação axial C–H em 2.854 cm^{-1} referente ao grupo CH_3 , banda de deformação axial da ligação C=O em 1.733 cm^{-1} , e

deformação angular no plano de C–H em 1.055 cm^{-1} . Entre as principais bandas, a deformação OH proveniente de grupos fenólicos foi obserada na Figura 3.

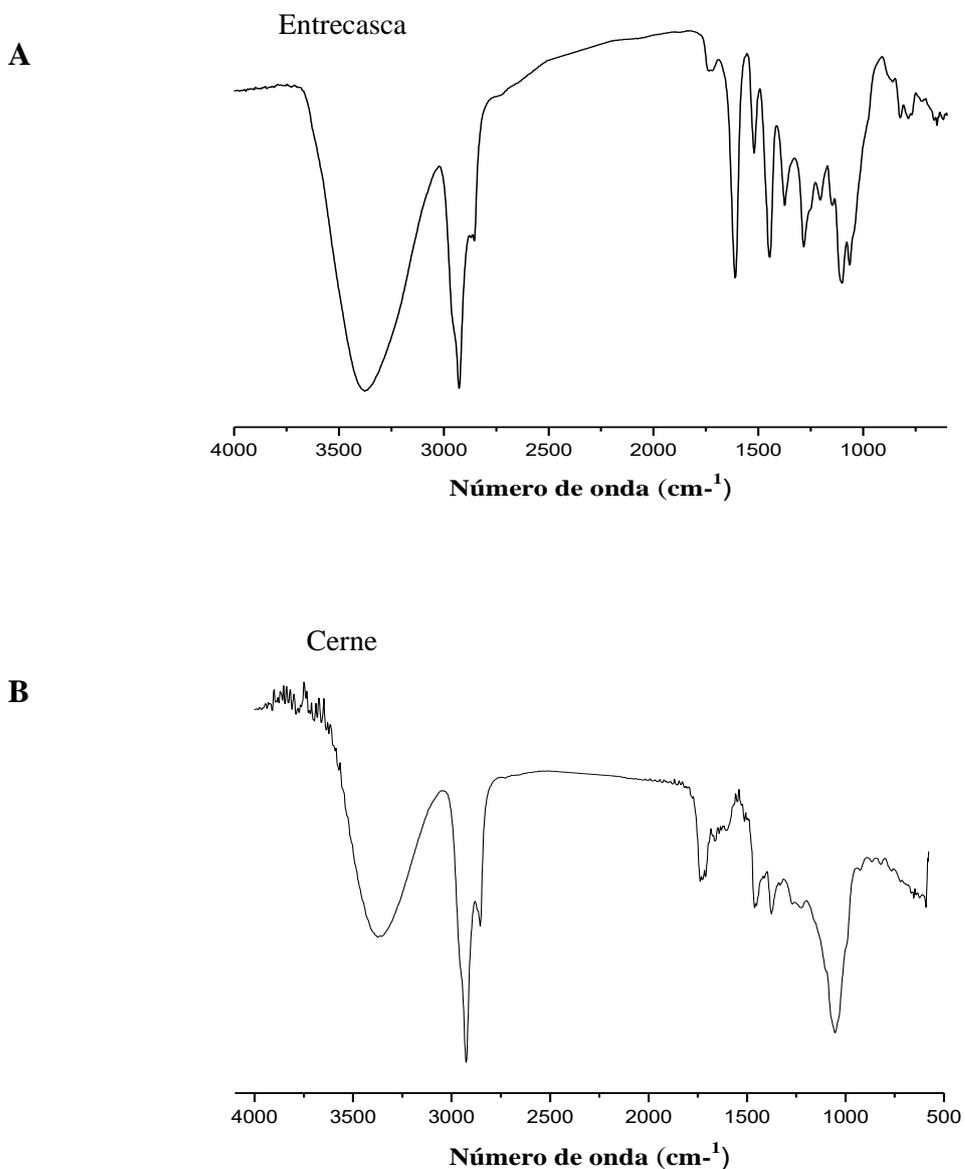


Figura 3 Espectro na região do infravermelho do extrato de *S. floribunda*: (A) Entrecasca e (B) Cerne.

3.5 Atividade Antibacteriana

Na avaliação da atividade antibacteriana por microdiluição foi observado que o extrato da entrecasca do caule apresentou Concentração Inibitória Mínima de $512\text{ }\mu\text{g/mL}$ em todas as linhagens bacterianas, exceto para as linhagens de *S. aureus* ATCC 12692 com CIM de $128\text{ }\mu\text{g/mL}$ e para *E. coli* ATCC 25922 com CIM de $64\text{ }\mu\text{g/mL}$. Enquanto o

extrato do cerne apresentou CIM de 512 µg/mL para *E. coli*, *S. aureus* ATCC 12692 e *S. aureus* 358 e uma CIM \geq 1024 µg/mL para o restante das linhagens testadas, efeito considerado não substancial.

3.6 Atividade moduladora a aminoglicosídeos

A atividade moduladora dos extratos foi realizada com uma linhagem bacteriana Gram-positiva e uma Gram-negativa, as quais obtiveram resultados com CIM \leq 512 µg/mL. Na associação dos extratos com os antibióticos aminoglicosídeos em concentrações subinibitórias (CIM 1/8), verificou-se atividade sinérgica, antagônica e em alguns casos não influenciou a atividade do antibiótico (Figura 4). O valor mais representativo para a atividade sinérgica foi observado para o extrato do cerne contra a cepa *S. aureus*, com redução da CIM da neomicina para menos de 20%. Em relação ao efeito antagônico, observou-se aumento na CIM quando ambos os extratos foram combinados com gentamicina contra *E. coli*.

Para o extrato da entrecasca do caule, foi observado efeito sinérgico quando combinado com a neomicina frente às duas linhagens padrão testadas (*S. aureus* and *E. coli*), reduzindo a CIM do antibiótico em 63% para ambas as estirpes. Na estirpe padrão de *E. coli*, a interação do extrato com gentamicina gerou um aumento no CIM do antibiótico (efeito antagonista). O extrato do cerne apresentou sinergismo significativo com dois dos antibióticos testados. Quando associado à neomicina, reduziu a CIM em 19,8% e 79,3% frente à linhagem padrão de *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente. Quando combinado com amicacina contra *E. coli*, reduziu a CIM do antibiótico em 31,4% ($p < 0.0001$). Além disso, o extrato apresentou antagonismo quando associado à gentamicina frente à mesma linhagem bacteriana. Nas demais interações testadas não foram observadas atividade moduladora significativa para ambos os extratos avaliados.

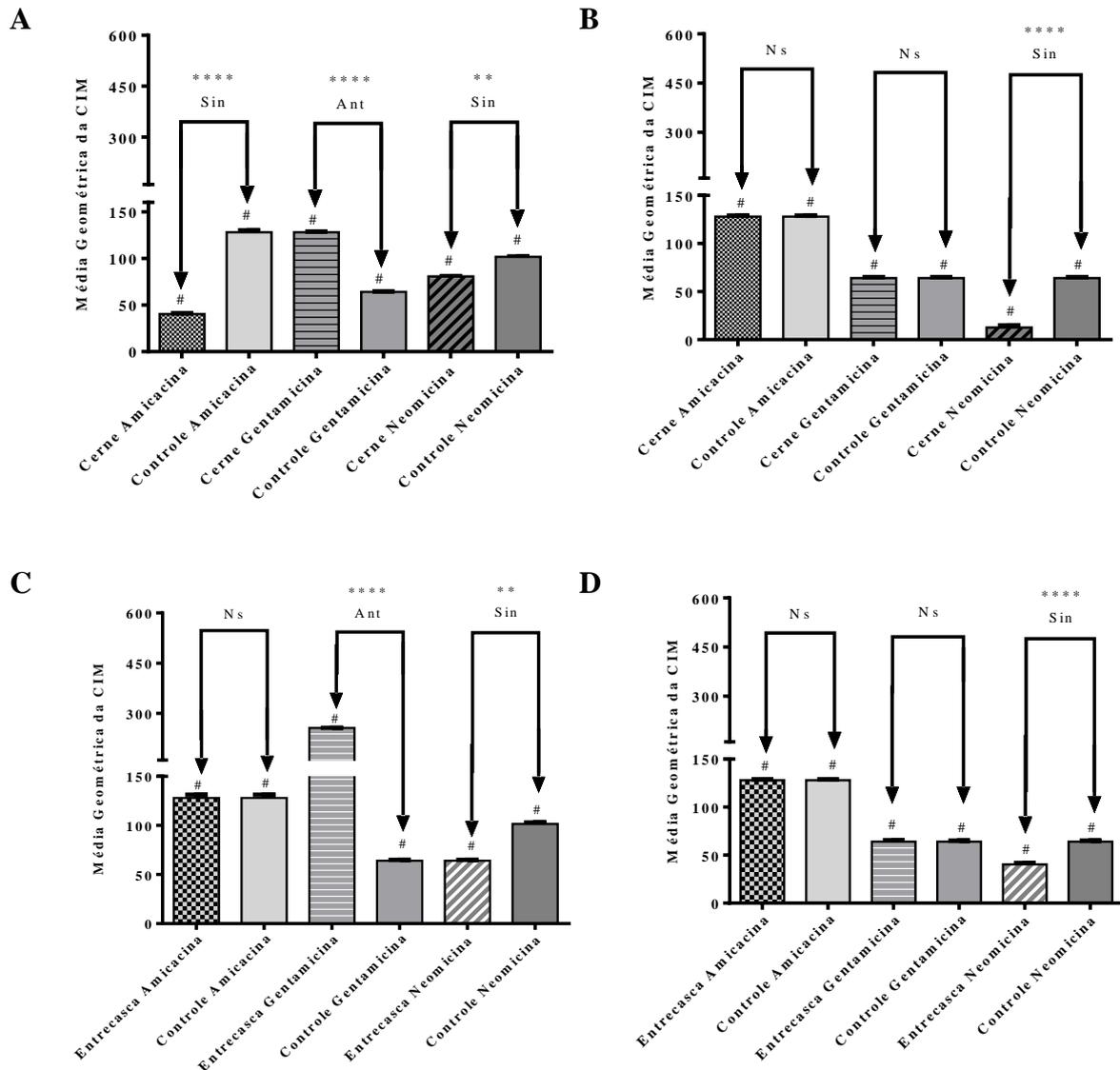


Figura 4 Concentração Inibitória Mínima (CIM) de aminoglicosídeos (Amicacina, Gentamicina ou Neomicina) na ausência e presença do extrato da entrecasca do caule e cerne de *Secundatia floribunda*. (A) Cerne de *S. floribunda* em direção a *E. coli* (ATCC 25922). (B) Cerne de *S. floribunda* em direção a *S. aureus* (ATCC 12692). (C) Entrecasca de *S. floribunda* em direção a *E. coli* (ATCC 25922). (D) Entrecasca de *S. floribunda* em direção a *S. aureus* (ATCC 12692). Valores estatisticamente significativos com ** = $p < 0,01$ e **** = $p < 0,0001$ vs Controle. # vs MIC com $p < 0,05$ significativo. Ns = Não significativo; Sin = Sinergismo e Ant = Antagonismo.

4. Discussão

Os compostos fenólicos identificados são amplamente encontrados no reino vegetal e utilizados na medicina popular para diferentes terapias, desempenhando um papel fundamental no benefício para a saúde humana. O grande interesse por este uso medicinal tem intensificado estudos que avaliem o potencial de tais substâncias, algumas apresentando atividades terapêuticas já reconhecidas, como exemplo, os flavonoides que dentre as inúmeras atividades, podemos citar a anticancerígena, antiinflamatória e antioxidante e os taninos que possuem ação antimicrobiana, antiviral, antitumoral e acelera o processo de cicatrização [23-27].

Os compostos fenólicos incluindo flavonoides estão entre os constituintes naturais que apresentam propriedades físico-químicas e características estruturais capazes de atuar e serem eficientes em diferentes atividades biológicas [28, 29]. As determinações destas substâncias bioativas são importantes, pois sua presença é atribuída a diversos mecanismos entre eles a capacidade antibacteriana, onde podem auxiliar na inibição do crescimento de microrganismos, incluindo enzimas, toxinas e receptores de sinal e atuar como agentes moduladores no tratamento de doenças infecciosas [30,31]. Além disso, eles são capazes de formar complexos com proteínas extracelulares solúveis que se ligam à parede celular da bactéria ou realizam a ruptura da membrana celular, exercendo ação antimicrobiana [32].

Entre os compostos testados por CLAE, a análise revelou maior quantidade para flavonoides em ambas as partes do vegetal avaliadas. Alguns autores relatam a presença prioritária desta classe em outras espécies de Apocynaceae [19,33,34]. Apresentando variabilidade quantitativa, cinchonaína seguido de quercetina e ácido gálico foram os principais compostos encontrados em *S. floribunda*.

Muitos fatores são responsáveis pela variação qualitativa e quantitativa da concentração de compostos. Esta variação pode ocorrer entre espécie ou em um mesmo indivíduo e constantemente é ocasionada por condições ambientais [35]. O conhecimento destes fatores é importante, pois podem ajudar na obtenção de maiores concentrações de compostos químicos alvo através do estabelecimento de um período de coleta específico [36]. Entre os fatores que interferem estão sazonalidade [37], estresse hídrico [38], composição do solo [39], radiação solar e temperatura [40], fase fenológica [41] entre outros.

Estruturalmente, os compostos fenólicos representam uma ampla variedade de substâncias que possuem um ou mais anéis aromáticos ligados a pelo menos um radical hidroxila e/ou outros substituintes [28, 29] (Figura 2). A determinação de sua atividade biológica está diretamente ligada à vasta diversidade estrutural destes compostos [42] que pode ser bem reconhecida pela espectroscopia infravermelha, de acordo com Schulz e Baranska [43]. Devido ao grupo hidroxila (OH), os compostos fenólicos têm potencial de ligação de hidrogênio e podem interagir com proteínas e enzimas, bem como quelar íons metálicos [8,18,43].

Cinchonaína é um flavolignano, que possui um substituinte fenilpropanóide, esta classe foi detectada pela primeira vez na casca de uma espécie do gênero *Cinchona* sp. (Rubiaceae) [44] e mais tarde foi observado em espécies de famílias distintas, dentre elas a Apocynaceae [45]. Este composto se tornou marcador químico da espécie *Trichillia catigua* Adr. Juss (Meliaceae) por ser majoritário no extrato [46]. Além disso, possui atividades biológicas promissoras, algumas já relatadas, como a antioxidante [47-49] e a antibacteriana [46, 50].

Os ácidos fenólicos apresentam um grupo funcional carboxila em sua estrutura básica, que embora permaneça a mesma, os números e as posições do grupo hidroxila (OH) no anel aromático variam [29]. O ácido clorogênico possui maior capacidade de hidroxilação, seguido de ácido gálico e ácido cafeíco, que é o composto mais representativo da classe [51]. Nos sistemas biológicos, estes ácidos possuem um considerável fator que se refere à capacidade de interagir em ambientes lipofílicos e hidrofílicos [52], portanto, estes ácidos possuem uma importante capacidade biológica que inclui minimizar processos oxidativos [53, 54].

Os resultados contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas mostram que ambos os extratos tiveram efeitos inibitórios, uma vez que uma MIC ≤ 256 $\mu\text{g/mL}$ apresenta um nível clinicamente relevante [32], no entanto, o efeito com MIC ≥ 1000 $\mu\text{g/mL}$ de acordo com Houghton et al. [55], não mostra um nível de confiança do ponto de vista clínico, uma vez que exigiria grandes quantidades de produto natural para atingir uma concentração em níveis plasmáticos. Os efeitos inibitórios observados podem estar relacionados a uma interação entre os ácidos fenólicos e os flavonóides, uma vez que essas classes de metabolitos secundários possuem atividade antibacteriana bem reconhecida até mesmo em baixas concentrações de conteúdo [56,57]. Além disso, a atividade significativa demonstrada pelo extrato da entrecasca pode ser atribuída a quantidade em nível considerável do composto cinchonina, o qual possui ação antibacteriana relatada [50] e/ou

pela presença de apigenina identificada em sua composição, e que possui efeito antimicrobiano descrito na literatura [30, 58].

Avaliando as propriedades antimicrobianas do extrato bruto e frações (diclorometano, acetato de etila e butanólica) das folhas e cascas de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC (Apocynaceae), Boligon et al. [19] descreveram que as frações de diclorometano e butanólica apresentaram melhores resultados contra bactérias Gram-positivas, esta atividade está relacionada a ação sinérgica de diferentes compostos presentes na planta, particularmente os ácidos fenólicos, flavonoides, terpenos e alcaloides, em combinação.

Pallant et al. [59], atribuíram boa atividade para o extrato bruto e fração alcalóidica de *Tabernaemontana elegans* (Stapf.), contra bactérias Gram-positivas, incluindo *S. aureus* e *E. faecalis*. Da mesma forma, Assis et al. [60] testando a atividade antibacteriana do caule de *Tabernaemontana angulata* Mart. ex Müell. Arg. (Apocynaceae) pelo método de diluição em caldo, observou que o extrato bruto apresentou atividade significativa contra *S. aureus*. No entanto, Suffredini et al. [61] mostram que apenas o extrato do da mesma espécie não mostrou atividade contra *S. aureus*. Além disso, o extrato metanólico do caule de *Aspidosperma ramiflorum* Müll.Arg. (Apocynaceae) foi inativo contra *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* nas concentrações $\leq 1000\mu\text{g/mL}$ [62].

Observa-se que os trabalhos relativos à ação antibacteriana para espécies da família Apocynaceae geralmente divergem. Esta variação pode estar relacionada à composição química do extrato, que enquanto mistura apresenta várias substâncias derivadas do metabolismo primário e secundário, que, em conjunto, podem aumentar a atividade ou mascarar seus efeitos [19]. Além disso, as variações relativas à atividade podem estar relacionadas com as diferentes técnicas de cada ensaio ou até mesmo através dos diferentes mecanismos que as substâncias vegetais podem atuar [63].

A pesquisa de produtos naturais com propriedades moduladoras tem sido amplamente divulgada. Muitos desses produtos vegetais têm efeitos sinérgicos consideráveis, alterando positivamente o efeito dos antibióticos e constituindo uma alternativa importante para combater o aumento da resistência microbiana [64]. Os antibióticos da classe dos aminoglicósidos atuam na inibição da síntese proteica [65], de modo que os mecanismos de resistência bacteriana envolvem principalmente a ativação dos sistemas de efluxo e modificação do alvo [66]. Desta forma, os efeitos sinérgicos que geralmente são obtidos pela associação de produtos naturais com antibióticos estão relacionados ao aumento do influxo da droga, que altera a permeabilidade da membrana

celular, favorecendo a penetração de antibióticos e potencializando seu efeito [30]. Assim, estudos sobre a associação de produtos naturais e drogas sintéticas ainda são promissores na tentativa de descobrir novas classes químicas com potencial antibiótico [67,68].

Sabe-se que os compostos fenólicos, incluindo taninos e flavonóides, devido à sua constituição e concentração podem se revelar potencialmente ativos, afetando o crescimento e o metabolismo das bactérias e a inibição da síntese de ácidos nucleicos [19, 69]. Alguns pesquisadores relataram potencialização da ação antibiótica quando combinados com extratos contendo compostos fenólicos contra cepas bacterianas resistentes [10]. Esta associação afeta principalmente a fluidez da membrana celular [70] e interage com enzimas bacterianas responsáveis por mecanismos envolvidos na replicação, transcrição e reparação da DNA-topoisomerase, causando um efeito inibitório significativo [71]. Muitos destes estudos enfatizam o isolamento destes compostos para avaliar de forma mais eficaz o seu potencial [8, 30].

Analisando a atividade antibacteriana de sete compostos fenólicos puros contra *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Flavobacterium* sp. Vaquero et al. [69] verificaram que o ácido cafeico apresentou atividade antibacteriana eficaz e a quercetina era o inibidor mais forte contra todas as bactérias investigadas. Do mesmo modo, Fattouch et al. [72] avaliando um extrato e compostos fenólicos puros descobriram que o ácido clorogênico apresentava maior atividade antibacteriana, particularmente contra *S. aureus*.

Em um estudo de Lima et al., [57] avaliando os efeitos da atividade antibiótica de ácido gálico, ácido cafeico e pirogalol, verificaram que todos os compostos fenólicos testados foram efetivos na atividade antibacteriana contra *S. aureus*, sendo que o ácido cafeico potencializou a atividade contra todas as cepas bacterianas testadas, dentre elas *E. coli*. Parveen et al. [73] descreveu que um flavonóide isolado das folhas de *Alstonia macrophylla* (Apocynaceae) causou a inibição significativa do crescimento para *S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella typhimurium*. Em estudo realizado por Camargo e Raddi [74] foi observada a ação antibacteriana da quercetina contra *S. aureus*.

Entre os compostos fenólicos identificados por CLAE-DAD a maioria apresentam relação com atividade antibacteriana em outros estudos. Apigenina e quercetina, foram relatados anteriormente por apresentarem atividade antibacteriana atuando através de vários alvos, incluindo inibição enzimática em *E. coli* [58]. Embora a apigenina não esteja presente na composição do cerne e a quercetina não é predominante em ambos os extratos, as ações sinérgicas demonstradas por esses extratos indicam a contribuição desses

compostos mesmo em quantidades menores. Além disso, essa ação sinérgica também sugere a participação de outros fenólicos como a cinchonina, predominante nos extratos avaliados, na atividade e em possíveis combinações com os antibióticos. Desta forma, as atividades não significativas relatadas estão possivelmente ligadas aos vários tipos e concentrações de substâncias não fenólicas presentes nos extratos que podem refletir sobre o efeito modulador.

Os dados obtidos neste estudo são relatados pela primeira vez para *S. floribunda* e sugerem que os extratos etanólicos da entrecasca do caule e do cerne sejam fonte clinicamente relevante de nova terapia antibacteriana, devido à presença de níveis significativos de compostos com atividade já reconhecida, como fenólicos e flavonóides. O conteúdo individual de compostos fenólicos por CLAE foi maior no extrato da entrecasca do caule, no entanto, foi o extrato do cerne que demonstrou maior atividade sinérgica, indicando a possibilidade do uso desses constituintes associados a antibióticos usuais contra linhagens Gram-positivas e Gram negativas. Além disso, os resultados observados neste trabalho para *Secondatia floribunda* ressaltam seu potencial terapêutico e a necessidade de estudos que avaliem espécies vegetais que são utilizadas por comunidades locais como fonte de produtos naturais biologicamente ativos, abrindo caminho para contribuir na busca e desenvolvimento de novos medicamentos.

Referências

- [1] Ribeiro DA, Oliveira LGS, Macêdo DG, Menezes IRA, Costa JGM, Silva MAP, et al. Promising medicinal plants for bioprospection in a Savanna woodland area of Chapada do Araripe, Northeastern Brazil. *J Ethnopharmacol* 2014; 155: 1522–1533.
- [2] Kong DX, Li XJ, Zhang HY. Where is the hope for drug discovery? Let history tell the future. *Drug discov today* 2009; 14: 115-119.
- [3] Saraiva ME, Ulisses AVRA, Ribeiro DA, Oliveira LGS, Macêdo DG, Sousa FFS, et al. Plant species as a therapeutic resource in areas of the savann in the state of Pernambuco, Northeast Brazil. *J Ethnopharmacol* 2015; 171: 141–153.
- [4] Oliveira I, Souza A, Valentão P, Andrade PB, Ferreira ICRF, Ferreres F, et al. Hazel (*Corylus avellana* L.) leaves as source of antimicrobial and antioxidative compounds. *Food Chem* 2007; 105: 1018–1025.

- [5] Ríos JL, Recio MC. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol* 2005; 100: 80–84.
- [6] Alberto MR, Farías ME, Manca de Nadra, MC. Effect of wine phenolic compounds on *Lactobacillus hilgardii* 5w viability. *J Food Prot* 2002; 65(1): 148–150.
- [7] Lee E-R, Kang GH, Cho SG, Effect of flavonoids on human health: old subjects but new challenges. *Recent Pat Biotechnol* 2007; 1: 139–50.
- [8] Cushnie TP, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Ag* 2005; 26: 343-356.
- [9] Konate K, Hilou A, Mavoungou JF, Lepengué AN, Souza A, Barro N, et al. Antimicrobial activity of polyphenol-rich fractions from *Sida alba* L. (Malvaceae) against cotrimoxazol-resistant bacteria strains. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2011; 11: 1-6.
- [10] Rauha JP, Remes S, Heinonen M, Hopia A, Kähkönen M, Kujala T, et al. Antimicrobial effects of finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int. J. Food Microbiol* 2000; 56: 3–12.
- [11] Souza VC, Lorenzi H. *Botânica sistemática*. Nova Odessa, Instituto Plantarum. 2005.
- [12] Bruneton J. *Pharmacognosy: phytochemistry medicinal plants*. 2° ed. Hampshire: Intercept; 1999.
- [13] Macedo DG, Ribeiro DA, Coutinho HDM, Menezes IRA, Souza MMA. Práticas terapêuticas tradicionais: uso e conhecimento de plantas do cerrado no estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil). *Bol Latino Am Caribe Pl* 2015; 14(6): 491 – 508.
- [14] Souza RKD, Silva MAP, Menezes IRA, Ribeiro DA, Bezerra LR, Souza MMA. Ethnopharmacology of medicinal plants of Carrasco, northeastern of Brazil. *J Ethnopharmacol* 2014; 157: 99–104.
- [15] Matos FJA. *Introdução à fitoquímica experimental*. 2nd ed. Fortaleza, Brazil: Edições UFC; 1997.
- [16] Singleton VL, Orthofer R, Lammela-Ranvenson RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 1999; 299: 152-178.
- [17] Kosalec I, Bakmaz M, Pepeliniak S, Vladimir-Knezevic S. Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *A Pharmaceutica* 2004; 54: 65-72.

- [18] Sousa EO, Miranda CMBA, Nobre CAB, Boligon AA, Athayde ML, Costa JGM. Phytochemical analysis and antioxidant activities of *Lantana camara* and *Lantana montevidensis* extracts. *Ind Crop Prod* 2015; 70(2): 7-15.
- [19] Boligon AA, Piana M, Kubiça TF, Mario DN, Dalmolin TV, Bonez PC, et al. HPLC analysis and antimicrobial, antimycobacterial and antiviral activities of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. *J Appl Biomed* 2015; 13: 7-18.
- [20] CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-third Informational Supplement M100-S23. CLSI, Wayne, PA, USA. 2013.
- [21] Salvat A, Antonnacci L, Fortunato RH, Suarez EY, Godoy HM. Screening of some plants from North Argentina for their antimicrobial activity. *Lett Appl Microbiol Biotech* 2001; 32: 293-297.
- [22] Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior JP. Enhancement of the Antibiotic Activity against a Multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and Chlorpromazine. *Chemotherapy* 2008; 54: 328-330.
- [23] Bruyne TD, Pieters L, Deelstra H, Vlietinck A. Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. *Biochem Syst Ecol* 1999; 27: 445-59.
- [24] Monteiro JM, Albuquerque UP, Araújo EL, Amorim ELC. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Quim Nova* 2005; 28: 892-896.
- [25] Okuda T, Yoshihara T, Hatano T. Classification of oligomeric hydrolysable tannins and specificity of their occurrence in plants. *Phytochemistry* 1993; 32: 507-521.
- [26] Scalbert A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 1991; 30: 3875-3883.
- [27] Verdi LG, Brighente IMC, Pizzolatti MG. Gênero *Baccharis* (asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. *Quim Nova* 2005; 28(1): 85-94.
- [28] D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanità* 2007; 43: 348-361.
- [29] Oliveira DM, Bastos DHM. Biodisponibilidade de Ácidos Fenólicos. *Quim Nova* 2011; 34: 1051-1056.
- [30] Cushnie TP, Lamb AJ. Recent advances in understanding the antimicrobial properties of flavonoids. *Int J Antimicrob Ag* 2011; 38: 99-107.

- [31] Tripoli E, Giammanco M, Tabacchi G, Di Majo D, Giammanco S, La Guardia M. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutr Res Rev* 2005; 18: 98-112.
- [32] Matias EFF, Alves EF, Silva MKN, Carvalho VRA, Medeiros CR, Santos FAV, et al. Phytochemical characterization by HPLC and evaluation of antibacterial and aminoglycoside resistance-modifying activity of chloroform fractions of *Cordia verbenacea* DC leaf extracts. *Eur J Integr Med* 2015; 7: 251–257.
- [33] An H, Wang H, Lan Y, Hashi Y, Chen S. Simultaneous qualitative and quantitative analysis of phenolic acids and flavonoids for the quality control of *Apocynum venetum* L. leaves by HPLC–DAD–ESI–IT–TOF–MS and HPLC–DAD. *J Pharmaceut Biomed* 2013; 85: 295–304.
- [34] Pallant C, Steenkamp V. In-vitro bioactivity of Venda medicinal plants used in the treatment of respiratory conditions. *Hum Exp Toxicol* 2008; 27: 859–866.
- [35] Gobbo-Neto LE, Lopes NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim Nova* 2007; 30: 374-381.
- [36] Figueiredo LS, Bonfim FPG, Siqueira CS, Fonseca MM, Silva AH, Martins ER. Efeito da época de colheita na produção de fitomassa e rendimento de óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham). *Rev bras plantas med* 2009; 11: 154-158.
- [37] Monteiro JM, Albuquerque UP, Lins Neto EMF, Araújo EL, Albuquerque MM, Amorim ELC. The effects of seasonal climate changes in the Caatinga on tannin levels in *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All. And *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. *Braz J Pharm* 2006; 16: 338–344.
- [38] Araújo TAS, Castro VTNA, Solon LGS, Silva GA, Almeida MG, et al. Does rainfall affect the antioxidant capacity and production of phenolic compounds of an important medicinal species?. *Ind Crop Prod* 2015; 76: 550–556.
- [39] Rezende WP, Borges LL, Alves NM, Ferri PH, Paula JR. Chemical variability in the essential oils from leaves of *Syzygium jambos*. *Resv Bras Farmacogn* 2013;23: 433-440.
- [40] Jaleel CA, Riadh K, Gopi R, Manivannan P, Inés J, Al-Juburi HJ. et al. Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. *Acta Physiol Plant* 2009; 31: 427–436.
- [41] Lago, JHG, Romoff P, Pirani JR, Roque NF. Essential oil from *Guarea macrophylla* Vahl var. *tuberculata* vellozo (Meliaceae) leaves – variation in the chemical component proportions. *J Essent Oil Res* 2007; 19: 338-341.

- [42] Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 2006; 99: 191–203.
- [43] Schulz H, Baranska M. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vib Spectrosc* 2007; 43: 13–25.
- [44] Nonaka G, Kawahara O, Nishioka I. Tannins and related compounds VIII. A new type of proanthocyanidin, cinchonains IIa and Ib from *Chinchona succirubra* (2). *Chem Pharm Bull* 1982; 30: 4277–4282.
- [45] Xiong Q, Fan W, Tezuka Y, Adnyana IK, Stampoulis P, Hattori M, et al. Hepatoprotective effect of *Apocynum venetum* and its active constituents. *Planta Med* 2000; 66: 127-133.
- [46] Tang W, Hioki H, Harada K, Kubo M, Fukuyama Y. Antioxidant phenylpropanoid-substituted epicatechins from *Trichilia catigua*. *J Nat Prod* 2007; 70: 2010-2013.
- [47] Ao C, Higa T, Khanh TD, Upadhyay A, Tawata S. Antioxidant phenolic compounds from *Smilax sebeana* Miq. *LWT-Food Sci Technol* 2011; 44: 1681-1686.
- [48] Hong Y, Qiao Y, Lin S, Jiang Y, Chen M. Characterization of antioxidant compounds in *Eriobotrya fragrans* Champ leaf. *Sci Hort* 2008; 118: 288–292.
- [49] Resende FO, Rodrigues-Filho E, Luftmann H, Petereit F, Palazzo de Mello JC. Phenylpropanoid substituted flavan-3-ols from *Trichilia catigua* and their in vitro antioxidative activity. *Rev Soc Bras Quim* 2011; 22: 2087-2093.
- [50] Pizzolatti MG, Venson FA, Smania Júnior A, Smânia FA, Braz Filho R. Two epimeric flavalignans from *trichilia catiguá* (Meliaceae) with antimicrobial activity. *Z Naturforsch C* 2002; 57: 483-488.
- [51] Tapiero H, Tew KD, Nguyen Ba G, Mathé G. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomed Pharmacother* 2002; 56: 200- 2007.
- [52] Fiúza SM, Gomes C, Teixeira LJ, Cruz MTG, Cordeiro MNDS, Milhazes N. et al. Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties –a structure–activity relationship study. Part 1: Methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. *Bioorg Med Chem* 2004; 12: 3581–3589.
- [53] Fernandes A, Fernandes I, Cruz L, Mateus N, Cabral M, Freitas V. Antioxidant and Biological Properties of Bioactive Phenolic Compounds from *Quercus suber* L. *Agr Food Chem* 2009; 57: 11154-11160.

- [54] Sun Waterhouse D, Thakorlal J, Zhou J. Effects of added phenolics on the storage stability of avocado and coconut oils. *Int J Food Sci Tech* 2011; 46: 1575-1585.
- [55] Houghton PJ, Howes MJ, Lee CC, Steventon G. Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. *J Ethnopharmacol* 2007; 110: 391-400.
- [56] Boligon AA, Kubiça TF, Mario DN, Brum TF, Piana M, Weiblen R, et al. Antimicrobial and antiviral activity-guided fractionation from *Scutia buxifolia* Reissek extracts. *Acta Physiol Plant* 2013; 35: 2229–2239.
- [57] Lima, V.N., Oliveira-Tintino, M.D.M., Santos, E.S., Morais, L.P., Tintino, S.R., Freitas, T.S., Geraldo, Y.S., Pereira, R.L.S., Cruz, R.P., Menezes, I.R.A., Coutinho, H.D.M., 2016. Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: Gallic acid, caffeic acid and pyrogallol. *Microb Pathog.* 99, 56-61.
- [58] Wu D, Kong Y, Han C, Chen J, Hu L, Jiang H, et al. D-Alanine: D-alanine ligase as a new target for the flavonoids quercetin and apigenin. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 32(5): 421–426.
- [59] Pallant CA, Cromarty AD, Steenkamp V. Effect of an alkaloidal fraction of *Tabernaemontana elegans* (Stapf.) on selected micro-organisms. *J Ethnopharmacol* 2012; 140: 398–404.
- [60] Assis CM, Moreno PRH, Young MCM, Campos IPA, Suffredini IB. Isolamento e avaliação da atividade biológica dos alcalóides majoritários de *Tabernaemontana angulata* Mart. ex Müll. Arg., Apocynaceae. *Rev Bras Farmacogn* 2009; 19: 626-631.
- [61] Suffredini IB, Bacchi EM, Sakuda TMK, Ohara MT, Younes RN, Varella AD, Antibacterial activity of Apocynaceae extracts and MIC of *Tabernaemontana angulata* stem organic extract. *Braz J Pharm Sci* 2002; 38: 89-94.
- [62] Tanaka JCA, Silva CC, Oliveira AJB, Nakamura CV, Dias-Filho BP, Antibacterial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. *Braz J Med Biol Res* 2006; 39: 387-391.
- [63] Veras HNH, Santos IJM, Santos ACB, Fernandes CN, Matias EFF, Leite GO, et al. Comparative evaluation of antibiotic and antibiotic modifying activity of quercetin and isoquercetin in vitro. *Curr Top Nutraceut R* 2011; 9(1): 25-30.
- [64] Fernandes CN, Figueredo FG, Tintino SR, Costa JGM, Coutinho HDM, Menezes IRA. Et al. Evaluation of the modulatory and antibacterial activity of the ethanolic extract and fractions of *Duguetia furfuracea* (A. St.-Hil.). *Afr J Pharm Pharmacol* 2014; 8: 16-20.

- [65] Kotra LP, Haddad J, Mobashery S. Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance, *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 3249–3256.
- [66] Shakil S, Khan R, Zarrilli R, Khan AU. Aminoglycosides versus bacteria—a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground. *J Biomed Sci* 2008;15: 5–14.
- [67] Figueredo FG, Matias EFF, Tintino SR, Leite NF, Costa JGM, Coutinho HDM, et al. Chemical composition and evaluation of modulatory of the antibiotic activity from extract and essential oil of *Myracrodruon urundeuva*. *Pharm Biol* 2014; 55: 560-565.
- [68] Matias EFF, Alves EF, Silva MKN, Carvalho VRA, Medeiros CR, Santos FAV, et al. Potentiation of antibiotic activity of aminoglycosides by natural products from *Cordia verbenacea* DC. *Microb Pathog* 2016; 95: 111-116.
- [69] Vaquero MJR, Alberto MR, Manca de Nadra MC. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control* 2007; 18: 93–101.
- [70] Junior FE, Matias EF, Oliveira DR, Ramos AGB, Fernandes CN, Souza HHF, et al. Modulatory antibiotic activity and chemical composition of hydroalcoholic extract of *Croton campestris*. *J Med Plants Res* 2011; 5: 4400–4404.
- [71] Daglia M. Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotechnol* 2012; 23: 174–181.
- [72] Fattouch S, Caboni P, Coroneo V, Tuberoso CIG, Angioni A, Dessi S. et al. Antimicrobial Activity of Tunisian Quince (*Cydonia oblonga* Miller) Pulp and Peel Polyphenolic Extracts. *J Agr Food Chem* 2007; 55: 963-969.
- [73] Parveen M, Khanam Z, Ali A, Ahmad SM. A novel antimicrobial flavonoid glycoside from the leaves of *Alstonia macrophylla* Wall ex A. DC (Apocynaceae). *Chinese Chem Lett* 2010; 21: 593–595.
- [74] Camargo MS, Raddi MSG. Efeito da Quercetina sobre o Crescimento e Atividade Hemolítica de *Staphylococcus aureus*. *Rev eletrônica farm* 2008; 5: 71-78.

CAPÍTULO 2

Variabilidade dos compostos fenólicos de *Secondatia floribunda* A.DC (Apocynaceae) em função da sazonalidade e das diferentes fases fenológicas

O capítulo a seguir representa o manuscrito submetido segundo as normas estruturais e bibliográficas do periódico *Environmental and Experimental Botany*.

Variabilidade dos compostos fenólicos de *Secondatia floribunda* A.DC (Apocynaceae) em função da sazonalidade e das diferentes fases fenológicas

Resumo

O uso de plantas como alternativa terapêutica intensifica estudos que investigam seus componentes químicos ativos que nem sempre relatam como estes compostos se comportam nas plantas sob a influência de fatores ambientais. A variabilidade quantitativa e qualitativa de compostos fenólicos é frequentemente afetada pela sazonalidade e por eventos fenológicos. Desta forma, este estudo teve como objetivo analisar a variabilidade da composição fenólica da entrecasca do caule e cerne de *Secondatia floribunda* A.DC pela influência da sazonalidade e em diferentes fases fenológicas. Para analisar a variação na composição química foram realizadas coletas trimestrais durante dois anos compreendendo as estações chuvosa e seca e as fases vegetativas e reprodutivas da espécie. Os compostos fenólicos foram identificados e quantificados por CLAE-DAD. Durante o período de estudo, *S. floribunda* apresentou queda de folhas, brotação, floração e frutificação sendo as duas últimas fases coincidindo com o período de chuvas. Os extratos etanólicos da entrecasca do caule e do cerne apresentaram rendimentos variando de 1,8 a 36%, com maiores valores entre a estação chuvosa (com baixos níveis de precipitação) e a estação seca, não apresentando relação com as fases fenológicas. A composição fenólica nos dois anos de estudo para os extratos da entrecasca do caule e do cerne foram qualitativamente idênticos, com exceção da ausência do flavonoide apigenina no cerne. Os compostos variaram entre as partes vegetais e apresentaram alterações nos níveis durante todas as coletas, respondendo tanto quantitativamente como qualitativamente à sazonalidade e a fenologia. Os extratos apresentaram quantidades elevadas de compostos fenólicos na estação chuvosa, principalmente durante as fases reprodutivas. Essas informações são úteis para ampliar o conhecimento sobre a espécie e contribuem para o estabelecimento do período de coleta mais adequado de *S. floribunda* visando maiores rendimentos e concentrações de compostos químicos responsáveis por diferentes atividades terapêuticas.

Palavras-chave: Perfil Químico; Compostos Fenólicos; Sazonalidade; Fenologia; Variação Química.

1. Introdução

A busca sistemática por substâncias com potencial medicinal tem sido realizada por diversas abordagens, permitindo a seleção de plantas que representem uma alternativa eficaz na obtenção de novos compostos bioativos e conseqüentemente de novos medicamentos (Nascimento et al., 2014; Verma e Shukla, 2015). Entre as diversas abordagens, a ecologia química vem impulsionando a descoberta de novos potenciais terapêuticos com base na distribuição de metabólitos secundários nas plantas (Albuquerque et al., 2012; Melo et al., 2017).

A composição química das plantas é influenciada por processos adaptativos em resposta a vários fatores bióticos e abióticos que afetam na sua produção, quantidade e natureza, tais como diferentes níveis de estresse, sazonalidade, radiação solar, fase fenológica e herbívoros (Gobbo-Neto e Lopes, 2007). Com isso, a biossíntese desses compostos é influenciada e apresentam variações qualitativas e quantitativas não sendo constantes ao longo do ano e não sendo produzidos por todas as partes da planta. Os estresses abióticos, como variações sazonais ou exposição a níveis elevados de luz, podem levar a redução de alguns dos processos bioquímicos associados ao desenvolvimento da planta (Ilić e Fallik, 2017; Ramakrishna e Ravishankar, 2011). Conseqüentemente permite o aumento a defesa e alteram os mecanismos bioquímicos dos compostos, principalmente os fenólicos, que estão diretamente relacionados à proteção da planta e na sua capacidade de adaptação (Nascimento e Fett-Neto, 2010; Sartor et al., 2013).

Os compostos fenólicos nos tecidos das plantas apresentam variações nos níveis e na produção de princípios ativos responsáveis por efeitos biológicos de grande alcance para a saúde humana (Almeida et al., 2005; Ouerghemmi et al., 2016). Aspectos que envolvem a variabilidade destes compostos são considerados importantes para orientar pesquisas que visam o isolamento de produtos naturais, especialmente para os que são de interesse medicinal (Figueiredo et al., 2009). Conseqüentemente, vários estudos têm reconhecido a importância de comparar as variações dos componentes bioativos nas plantas em diferentes épocas de colheita, sendo úteis as informações que confirmam o período ideal para obtenção de rendimentos consideráveis de compostos alvos (Chen et al., 2010; Sousa et al., 2014; Yao et al. 2016). Entretanto, ainda são poucas as pesquisas que avaliam as variações químicas das espécies relacionadas a fatores ambientais e a maioria se concentra em analisar a variação química em óleos essenciais incluindo predominantemente espécies até já comercialmente conhecidas (Gobbo-Neto e Lopes, 2007) e pouco investindo nas

espécies que possuem relatos medicinais e que ainda estão presentes somente em ambientes naturais e/ou conservados.

Secondatia floribunda A. DC. é uma liana endêmica do Brasil que ocorre em diferentes regiões do Nordeste e Sudeste, sendo frequentemente relatada em estudos etnobotânicos realizados em áreas de cerrado na Chapada do Araripe, onde evidenciam diversas propriedades terapêuticas (Macedo et al., 2015; Ribeiro et al., 2014; Saraiva et al., 2015). Até pouco tempo seu perfil químico-biológico era desconhecido, sendo relatado por Ribeiro et al., (2017), a presença de níveis consideráveis de compostos fenólicos, os quais forneceram ação antimicrobiana. No entanto, não existem relatos sobre a variabilidade química da espécie coletada durante diferentes períodos. Desta forma, este estudo pretende contribuir com informações sobre o perfil fenólico de *S. floribunda*, avaliando as variações químicas durante períodos sazonais distintos e nas diferentes fases fenológicas.

2. Material e Métodos

2.1. Área de estudo/Local de amostragem

A pesquisa foi realizada na Floresta Nacional do Araripe (FLONA), no município de Crato, Nordeste do Brasil (Figura 1.). A área de amostragem é conhecida por Malhada Bonita (07° 11' S e 39° 13' W e 640 m de altitude) localizada em uma área de Cerradão (vegetação savânica semidecídua) aparentemente conservada e que apresenta abundância de indivíduos da espécie em estudo. O solo é constituído predominantemente de Latossolos Vermelho-Distróficos e o clima Tropical Quente Úmido apresentando pouca variação térmica com temperatura média anual entre 24°C e 26°C (Cavalcanti e Lopes, 1994; Costa et al., 2004). A região possui duas estações distintas, uma chuvosa concentrada entre os meses de janeiro a abril e outra longa seca que dura cerca de sete meses, com escassez crítica entre julho e setembro, apesar disso, a região não apresenta características acentuadas de déficit hídrico, devido à ressurgência de água infiltrada em toda a área do topo (Loiola et al., 2015). A Chapada do Araripe dependendo das condições atmosféricas e do mar recebe em média 1.043 milímetros (mm) de chuvas por ano, resultando em uma média de 700-1000 mm/ano, sua topografia influencia diretamente as condições climáticas, interagindo com as massas de ar e proporcionando um clima brando em relação às outras regiões semiáridas circundantes, causando interferência direta a flora local (Costa et al., 2004).

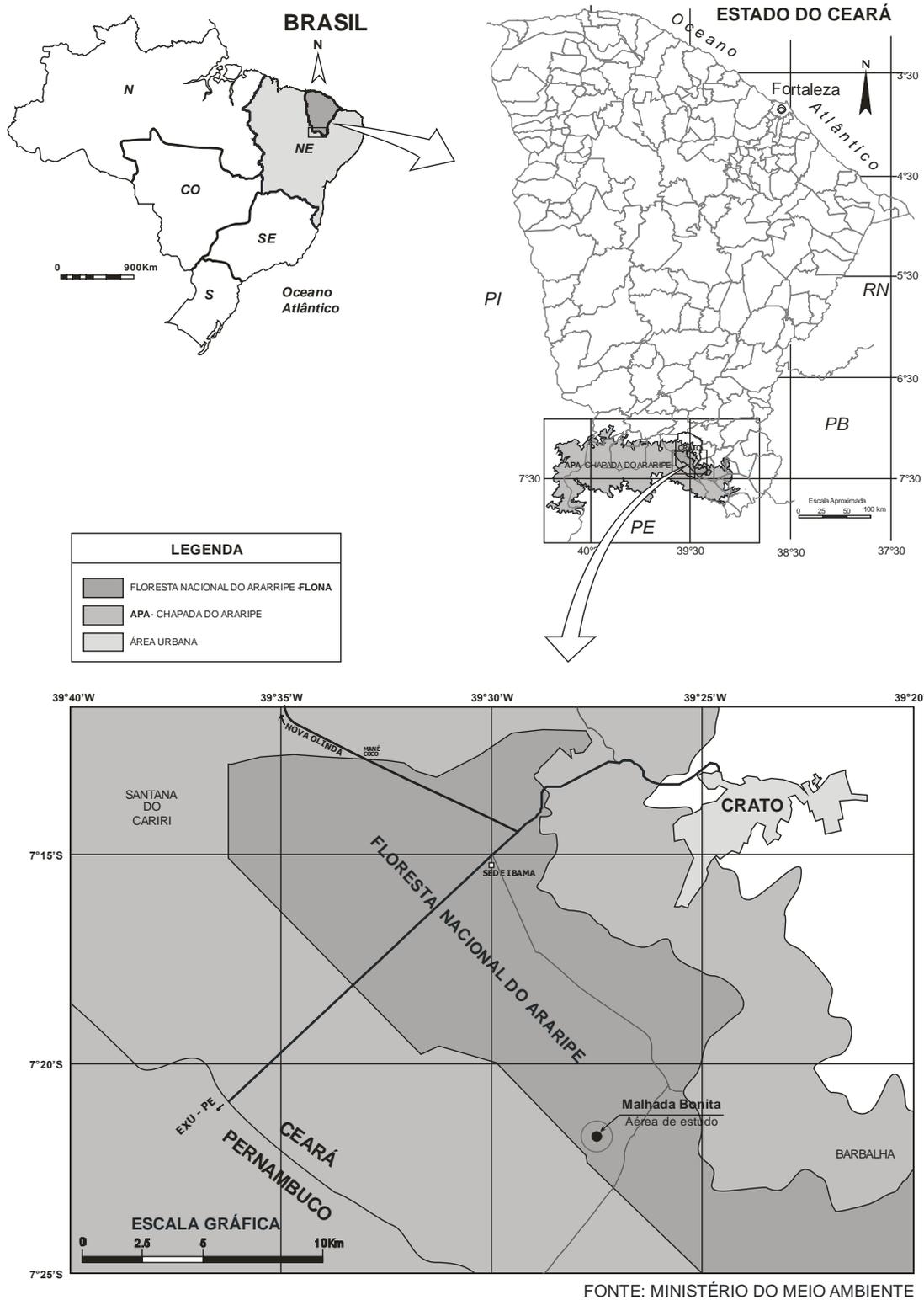


Figura 1. Localização geográfica da área de estudo na Chapada do Araripe, Ceará, Brasil.

2.2. Coleta do material vegetal

Para o monitoramento dos compostos fenólicos e flavonoides foram selecionados três indivíduos de *S. floribunda* com aspecto visualmente saudável no interior da área de cerradão, com características semelhantes em relação ao comprimento, diâmetro e por conta da proximidade de um indivíduo a outro (cerca de 6 metros), permitiu-se condições ambientais homogêneas relacionadas ao nível do solo, temperatura, umidade e luminosidade.

Coletas trimestrais entre os quinze primeiros dias dos meses de janeiro, abril, julho e outubro de 2015 e 2016, foram realizadas compreendendo distintos períodos sazonais (chuvoso e seco) e diferentes fases fenológicas (vegetativa e reprodutiva). Para a obtenção de amostras de entrecasca do caule e cerne foram coletados ramos de 50 cm de comprimento e com cerca de 20 a 15 cm de diâmetro, para evitar o comprometimento e a capacidade de recuperação dos indivíduos.

2.3. Identificação do material botânico

O material vegetal testemunho foi acondicionado e tratado segundo as técnicas usuais de herborização (Mori et al., 1989). Posteriormente identificado e depositado no Herbário Carirense Dárdano de Andrade Lima da Universidade Regional do Cariri (URCA) com registro N° 9259. A autorização para a coleta de material botânico foi fornecida pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), registrado sob o número 51674-1.

2.4. Dados Meteorológicos

Os dados meteorológicos de temperatura e índice pluviométrico foram obtidos a partir dos registros da Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos (FUNCEME), a qual mantém postos pluviométricos em pontos específicos do Ceará. Foram utilizadas as informações referentes ao posto Lameiro localizado a pouco mais de 8 km do local de coleta. Os dados foram empregados para fins de comparação, com as variações quantitativas e qualitativas observadas para os extratos de *S. floribunda*.

2.5. Preparação dos extratos

Foram obtidos 16 extratos, oito da entrecasca do caule e oito do cerne, durante dois anos. As amostras foram trituradas e adicionadas separadamente em frascos contendo 2 L de etanol, durante 72h à temperatura ambiente. Após este período, o etanol foi destilado utilizando evaporador rotativo a vácuo (modelo Q-344B, Quimis, Brasil) e banho ultratermal (modelo Q-214M2, Quimis) sob pressão reduzida, a uma temperatura de 50° C, para evitar a degradação de substâncias termosensíveis (Matos,1997).

2.6. Químicos, reagentes e equipamentos

Todos os produtos químicos utilizados eram de grau analítico, metanol e ácido trifluoroacético foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). A Cianidina foi adquirida da ChromaDex. O ácido gálico, ácido clorogênico, ácido cafeico, apigenina, cinchonaína, catequina e quercetina foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) foi realizada utilizando o sistema de CLAE (Shimadzu, Kyoto, Japão) destaque Auto Sampler (SIL-20A), equipado com Shimadzu LC-20AT com bombas alternadas conectadas ao degaseificador DGU 20A5 e com o integrador CBM 20A com detector DAD (diodo) SPD-M20A e software LC solução 1,22 SP1.

2.7. Prospecção qualitativa dos constituintes químicos

Os testes fitoquímicos foram realizados para detectar a presença de heterosídeos, taninos, flavonóides, esteroides, triterpenos, cumarinas, quinonas, ácidos orgânicos e de alcaloides, conforme descrito por Matos (1997) baseando-se em leituras colorimétricas ou formação de precipitado após a adição de reagentes específicos.

2.8. Quantificação de compostos fenólicos e flavonoides por CLAE-DAD

As análises cromatográficas de fase reversa foram realizadas utilizando coluna C₁₈ (250 mn x 4,6 mm) com partículas medindo 5 µm de diâmetro. A fase móvel consistiu de fase A = metanol e fase B = solução de água com 0,05% de ácido trifluoroacético, previamente degaseificada utilizando um banho de ultrassom. Um programa de gradiente,

do seguinte modo: 0 min, 15% de fase A; 35 min, 30% de fase A; 45 min, 40 % de fase A, continuou até 60 minutos, e seguiu-se á 2 min pós-tempo para reequilibrar o sistema, a uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min (Sousa et al., 2015; Ribeiro et al., 2017). O eluente foi monitorizado por detectores baseados em arranjos de diodos (PDA, “*Photodiode Array*”), e os comprimentos de onda foram detectados a 254 nm para o ácido gálico, 280 nm para catequina e cinchonaína; 327 nm para ácido clorogênico e ácido cafeico; 356 nm para quercetina e apigenina; e 520 nm para cianidina. O volume de injeção de amostra foi de 50 μ L.

Todas as amostras de *S. floribunda* e a fase móvel foram filtradas através de filtro de membrana de 0,45 μ m (Millipore) e depois desgaseificadas por banho de ultrassom. Os extratos (entrecasca e cerne) de *S. floribunda* foram analisados a uma concentração de 20 mg/mL. As soluções de substâncias padrões de referências foram preparadas em concentrações de 0,030 - 0,500 mg/mL. Os picos cromatográficos foram confirmados por comparação do seu tempo de retenção com os de padrões de referência e por espectros de detector de arranjos de diodos (DAD) (200 a 700 nm). Todas as operações cromatográficas foram realizadas a temperatura ambiente e em triplicata.

2.9. Análises estatísticas

As diferenças estatísticas entre os cromatogramas por CLAE-DAD foram avaliadas por análise de modelo de variância de duas vias e teste de Tukey. O nível de significância foi definido como $P < 0,05$ usando o software R 3.1.1. (R Core Team, 2014). A variabilidade entre os compostos fenólicos da entrecasca do caule e cerne identificados e os dados pluviométricos foi avaliada pelo uso da Análise de Componentes Principais (PCA). Essa análise qualitativa permitiu obter uma melhor visualização da dimensionalidade dos diferentes conjuntos de dados e uma visão mais distinta da relação entre as variáveis, utilizando o software Minitab 18.

3. Resultados

3.1. Rendimento dos extratos em função da sazonalidade e da fenologia

Os dados meteorológicos registrados para o ano de 2015, mostraram precipitação de 1.069 mm (média de 89,08 mm/mês) com pico máximo no mês de março (473 mm). Para

2016, o nível mais elevado de precipitação foi em janeiro (409 mm), sendo registrado neste ano um total de 968 mm (média de 80,41 mm/mês) (Figura 2). Nos dois anos de estudo, o período de chuva foi registrado nos meses de janeiro a maio e o seco de junho a dezembro não tendo sido registrada precipitação em agosto e setembro de 2015 e em julho, agosto, outubro e novembro de 2016, sendo este considerado o ano mais seco quando relacionado ao primeiro. Apesar de inserida em um ambiente semiárido, a Chapada do Araripe apresenta diferenças peculiares em seu clima, tornando as alterações climáticas diferentes das que ocorrem nas áreas circundantes e não apresentando temperaturas muito elevadas, variando durante o ano de 2015 de 20 a 30 °C com elevações ao final da estação chuvosa. Para 2016 as temperaturas foram mais altas quando comparadas ao ano anterior e variaram de 18 a 32 °C, com níveis elevados durante o período seco.

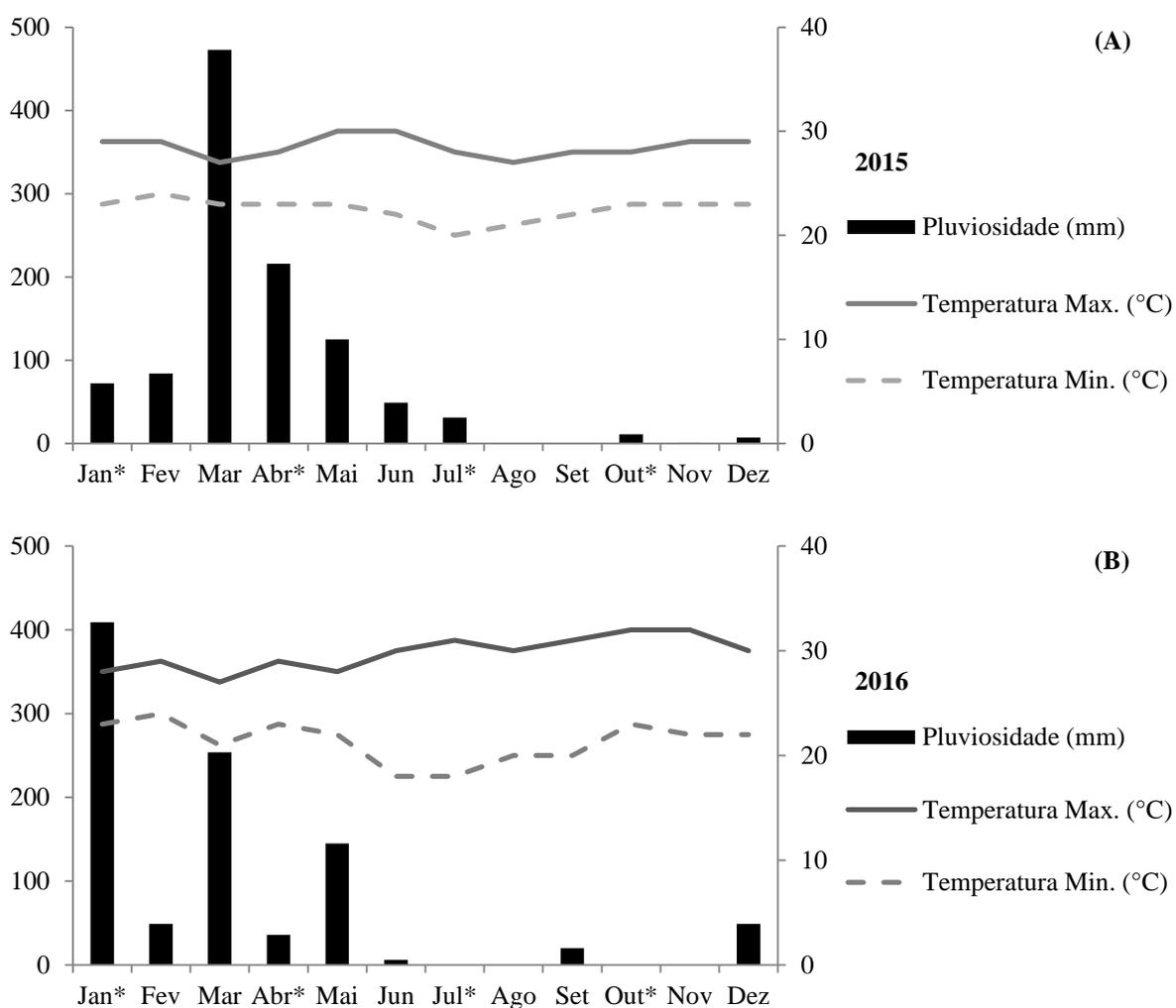


Figura 2. Climatogramas dos anos de 2015 (A) e 2016 (B) referentes à região da Chapada do Araripe (posto pluviométrico Lameiro, Crato). * Meses de coleta.

Durante os dois anos de estudo, *S. floribunda* apresentou fase vegetativa (queda de folhas e brotação) e reprodutiva (floração e frutificação), sendo que os períodos de coleta da espécie não coincidiram com a fase de brotamento. Durante a estação chuvosa, as coletas de janeiro e abril (2015 e 2016) coincidiram com as fases de floração e frutificação, respectivamente. Na estação seca, observou-se que a troca de folhas foi gradual, havendo desfolhação completa, de modo que os indivíduos dessa espécie por um período do ano não possuíam folhas (julho a outubro de 2015 e 2016). Em outubro de 2016, foi observado um adiantamento do estágio reprodutivo, tendo sido verificado pouco depois da queda das folhas a ocorrência de floração intensa (fenofase irregular), situação incomum observada para a espécie. A distribuição das fenofases nessa espécie obedece ao regime das chuvas.

O rendimento dos extratos da entrecasca do caule e cerne, durante os dois anos de coleta, apresentaram as maiores quantidades no período chuvoso, em baixos níveis de precipitação (Tabela 1). Os resultados mostram variações no rendimento de 1,8 a 36%, evidenciando a influência das diferentes épocas de coleta sobre os teores. Dessa forma, no ano de 2015, na estação chuvosa associada ao início do período de floração (janeiro) ocorreram os maiores rendimentos de extrato, os quais decaíram na frutificação (abril) ao final do mesmo período e voltaram a subir na estação seca no período de queda foliar (julho e outubro).

Em 2016, os melhores valores também estiveram associados ao período reprodutivo (frutificação) na estação chuvosa (abril), com baixa precipitação. Na estação seca, os rendimentos mantiveram valores semelhantes à estação chuvosa (com pouca precipitação) coincidindo com o período de queda foliar (julho).

Entre as partes vegetais, os extratos da entrecasca do caule apresentaram os rendimentos mais altos, variando de 5,6 a 36%, com maiores valores ao final da estação chuvosa e início da seca. Em 2015 os maiores rendimentos foram no período de floração, seguido de queda foliar e frutificação, enquanto que em 2016 foi na frutificação, seguido de queda foliar e floração. Já os extratos do cerne mostraram rendimentos menores quando comparados a entrecasca, apresentando valores que variaram de 1,8 a 11,8%. Os valores mais altos de rendimento para o cerne também estiveram associados a baixos níveis de precipitação, na fase de frutificação, seguida de floração e queda foliar.

Tabela 1. Rendimento trimestral dos extratos de *Secondatia floribunda*.

Período sazonal/ Precipitação (mm)	Mês/Ano	Período Fenológico	Massa seca (g)		Massa final do extrato (g)		Rendimento (%)		
			EEE	EEC	EEE	EEC	EEE	EEC	
Chuvoso									
72	Jan 2015	Floração	334,0	382,0	120,0	26,0	36,0	6,8	
216	Abr 2015	Frutificação	228,0	318,0	20,0	8,0	8,7	2,5	
Seco									
31	Jul 2015	Queda foliar	233,0	467,0	36,0	8,0	15,5	1,8	
11	Out 2015		79,0	60,0	12,0	4,0	15,2	6,7	
Chuvoso									
409	Jan 2016	Floração	258,0	188,0	18,0	10,0	7,0	5,3	
36	Abr 2016	Frutificação	56,0	68,0	8,0	8,0	14,3	11,8	
Seco									
0	Jul 2016	Queda foliar	71,0	105,0	8,0	4,0	11,3	3,8	
0	Out 2016	Queda foliar/ floração	252,0	66,0	14,0	6,0	5,6	9,1	

EEE: Extrato Etanólico da Entrecasca; EEC: Extrato Etanólico do Cerne.

3.2. Análise química qualitativa

Os testes químicos qualitativos realizados com os extratos etanólicos da entrecasca do caule e cerne de *S. floribunda* para todos os meses de coleta indicaram a presença e ausência de algumas classes de metabólitos secundários. Verificou-se a presença de taninos condensados e flavonóides (flavonas, flavonóis, flavononas, flavononóis, xantonas, chalconas, auronas, leucoantocianidinas) e catequinas, não sendo verificados alcaloides. Os testes não revelaram diferenças na presença de fitoquímicos nos extratos e nas distintas partes da planta durante as coletas.

3.3. Perfil de composição fenólica dos extratos por CLAE-DAD

No total, oito componentes fenólicos principais foram identificados nos extratos etanólicos da entrecasca do caule e do cerne de *S. floribunda*. As análises por CLAE-DAD

revelaram a presença de ácido gálico (tempo de Retenção - $t_R = 10,03$ min; pico 1), cianidina ($t_R = 14,26$ min; pico 2), catequina ($t_R = 18,61$ min; pico 3), ácido clorogênico ($t_R = 24,53$ min; pico 4), ácido caféico ($t_R = 27,36$ min; pico 5), cinchonina ($t_R = 34,98$ min; pico 6), quercetina ($t_R = 45,35$ min; pico 7) e apigenina ($t_R = 52,12$ min; pico 8). As amostras contêm outros compostos, além dos aqui identificados e quantificados, e devido à diversidade de compostos fenólicos em extratos, é difícil caracterizar cada um deles, desta forma, somente os identificados foram utilizados no presente estudo como marcadores quimiotaxonômicos para avaliar diferenças e semelhanças em todo o lote analítico.

A composição de fenólicos presente nos extratos da entrecasca do caule e do cerne durante os dois anos de estudo foram qualitativamente idênticos, com exceção da ausência do flavonoide apigenina no cerne. No aspecto quantitativo, os extratos da entrecasca do caule apresentaram maior quantidade de compostos fenólicos em relação aos do cerne, embora indicando para ambas as partes variabilidade quantitativa dos teores totais e individuais.

Cinchonina foi o composto mais elevado quantitativamente, com a maior concentração observada no início da estação chuvosa (fase de floração), nos dois anos de estudo, seguidos por quercetina que apresentou rendimentos mais altos principalmente no segundo ano de coleta, no período chuvoso (janeiro e abril de 2016) quando coletado nas fases de floração e frutificação e no final da estação seca (outubro de 2016) na fase de queda foliar, apresentando valores próximos a cinchonina.

Os ácidos fenólicos, caféico e gálico também apresentaram quantidades elevadas, com valores mais altos ao final da estação seca (período de queda foliar) e início da chuvosa (período de floração). Os outros flavonoides identificados, cianidina, catequina e apigenina mostraram padrões sazonais de produção, com as menores concentrações ao final da estação chuvosa e na seca. Entre as estações nos dois anos de estudo, verificou-se que no período de chuvas os extratos de *S. floribunda* foram mais abundantes, com destaque para o ano de 2015 em que os níveis de precipitação foram mais elevados.

3.4. Variação na composição fenólica entre os compostos identificados na entrecasca do caule

Os extratos da entrecasca do caule apresentaram maiores teores de compostos fenólicos, principalmente no primeiro ano de coleta onde houve maior índice pluviométrico (Tabela 2. e Figura 3.). Entre os compostos, cinchonina foi mais abundante

nos dois anos de estudo, com maior concentração observada nas estações chuvosas, coincidindo com o período de floração, apresentando valor de $10,17 \pm 0,01$ mg/g em janeiro de 2015 (precipitação baixa) e de $6,94 \pm 0,03$ mg/g em janeiro de 2016 (precipitação alta). Quercetina também apresentou quantidades elevadas durante a estação chuvosa na fase de floração, entretanto os valores mais altos ($5,01 \pm 0,04$ mg/g em 2015 e $6,81 \pm 0,04$ mg/g em 2016) foram associados a níveis de precipitação maiores.

Os flavonoides, cianidina e apigenina durante os dois anos de estudo, mostraram afinidade com os períodos de floração (janeiro) e queda foliar (julho) apresentando maiores concentrações tanto no período chuvoso quanto no seco, não havendo um padrão para o rendimento entre as estações. Os níveis mais baixos para cianidina durante os dois anos, coincidiram com a ausência de catequina, que obteve rendimento significativo somente no mês de julho de 2015 ($1,98 \pm 0,01$ mg/g) no início do período seco coincidindo com a queda foliar. Catequina não foi presente nos meses de abril (final da estação chuvosa) e outubro (estação seca) de 2015 e 2016, nas fases de frutificação e queda das folhas, respectivamente.

Entre os ácidos fenólicos, o ácido cafeico foi o mais abundante com valores elevados durante a estação seca no ano de 2015 ($3,64 \pm 0,02$ mg/g e $5,63 \pm 0,02$ mg/g – queda foliar). Já na estação chuvosa este composto apresentou valores de $3,05 \pm 0,02$ mg/g e $3,28 \pm 0,01$ mg/g, que foram semelhantes aos verificados no segundo ano de estudo na mesma estação, com redução observada apenas em outubro de 2016, na fase de queda foliar associada com a floração. O ácido gálico apresentou-se em maior quantidade em 2015 no período de chuva ($3,27 \pm 0,02$ mg/g e $3,19 \pm 0,01$ mg/g – floração e frutificação, respectivamente) reduzindo seus valores ao final da estação seca ($2,97 \pm 0,03$ mg/g e $1,87 \pm 0,02$ mg/g – queda foliar) e voltando a subir ($3,01 \pm 0,04$ mg/g) somente em 2016 com início da mesma estação, quando foi observado flores (outubro de 2016). O ácido clorogênico obteve seu melhor rendimento apenas em janeiro de 2015 (floração), no período chuvoso com baixa precipitação, verificando-se ausência durante os meses de julho de 2015 e 2016 (estação seca) no período de queda foliar e em janeiro de 2016 na floração (estação chuvosa com alta precipitação).

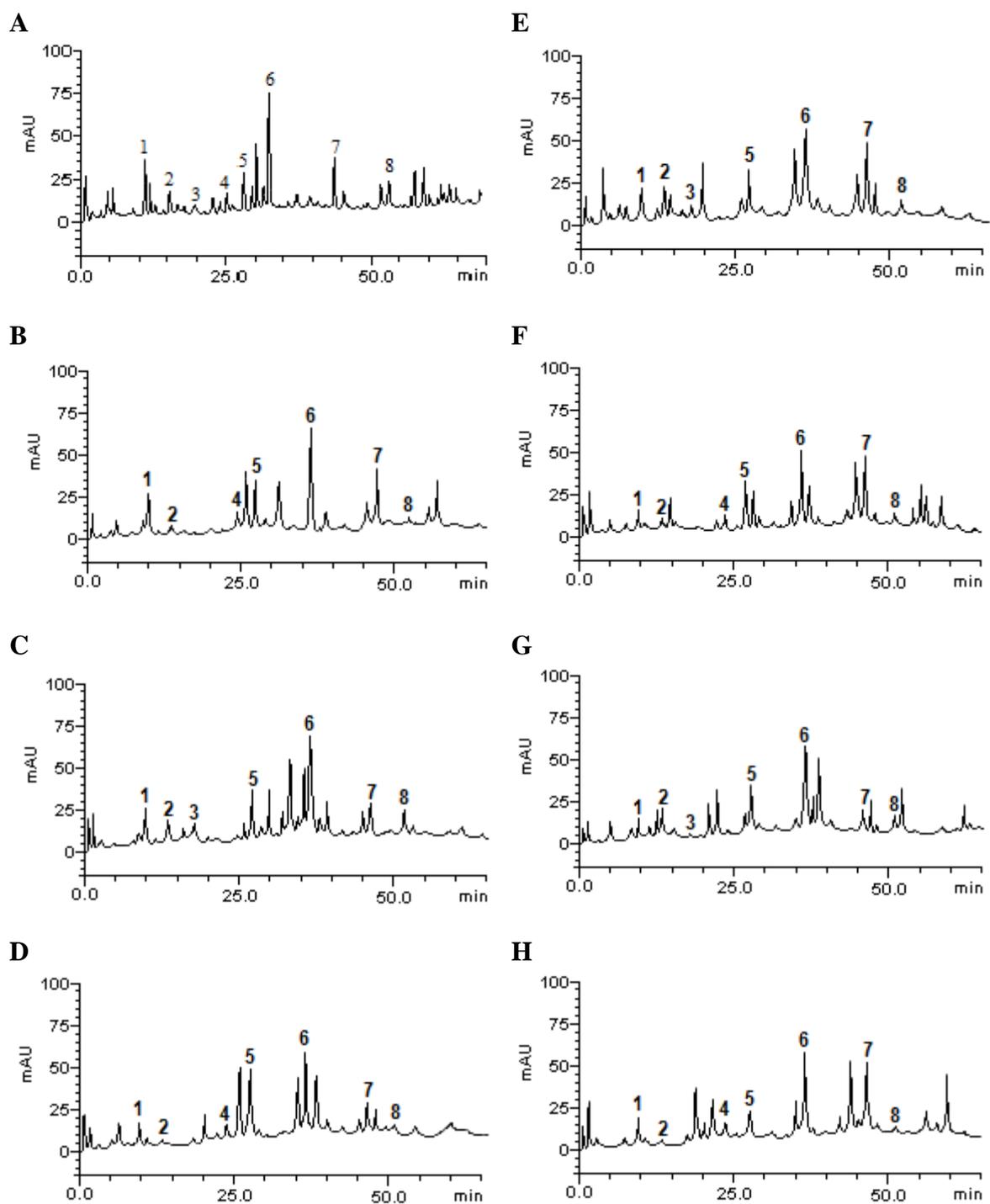


Figura 3. Representação do perfil da cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos da Entrecasca do caule de *S. floribunda*. Pico 1: ácido gálico, Pico 2: cianidina, Pico 3: catequina, Pico 4: ácido clorogênico, Pico 5: ácido caféico, Pico 6: cinchonina, Pico 7: quercetina, Pico 8: apigenina. A: coleta da entrecasca do caule 1; B: coleta da entrecasca do caule 2; C: coleta da entrecasca do caule 3; D: coleta da entrecasca do caule 4; E: coleta da entrecasca do caule 5; F: coleta da entrecasca do caule 6; G: coleta da entrecasca do caule 7; H: coleta da entrecasca do caule 8.

Tabela 2. Composição do extrato etanólico da entrecasca do caule de *Secondatia floribunda* coletada em diferentes períodos.

Entrecasca	Chuvoso		Seco		Chuvoso		Seco	
	72 mm	216 mm	31 mm	11 mm	409 mm	36 mm	0 mm	0 mm
Compostos	Floração	Frutificação	Queda foliar		Floração	Frutificação	Queda foliar	Queda foliar/ floração
	Jan/2015	Abr/2015	Jul/2015	Out/2015	Jan/2016	Abr/2016	Jul/2016	Out/2016
	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g
Ácido gálico	3,27 ± 0,02 ^a	3,19 ± 0,01 ^a	2,97 ± 0,03 ^a	1,87 ± 0,02 ^a	0,67 ± 0,03 ^a	0,71 ± 0,04 ^a	1,83 ± 0,02 ^a	3,01 ± 0,04 ^a
Cianidina	1,48 ± 0,01 ^b	0,25 ± 0,01 ^b	2,05 ± 0,05 ^b	0,15 ± 0,01 ^b	3,05 ± 0,05 ^a	0,21 ± 0,01 ^b	1,24 ± 0,01 ^b	0,19 ± 0,01 ^b
Catequina	0,61 ± 0,03 ^c	-	1,98 ± 0,01 ^b	-	0,56 ± 0,01 ^b	-	0,15 ± 0,01 ^c	-
Ácido clorogênico	1,39 ± 0,01 ^b	0,31 ± 0,03 ^b	-	0,42 ± 0,03 ^c	-	0,59 ± 0,03 ^a	-	0,61 ± 0,03 ^c
Ácido cafeico	3,05 ± 0,02 ^d	3,28 ± 0,01 ^a	3,64 ± 0,02 ^c	5,63 ± 0,02 ^d	3,72 ± 0,02 ^c	3,15 ± 0,04 ^c	3,19 ± 0,03 ^d	1,79 ± 0,02 ^d
Cinchonaína	10,17 ± 0,01 ^e	7,42 ± 0,02 ^c	7,83 ± 0,02 ^d	6,84 ± 0,01 ^e	6,94 ± 0,03 ^d	5,93 ± 0,02 ^d	6,08 ± 0,02 ^e	6,53 ± 0,01 ^e
Quercetina	3,26 ± 0,01 ^a	5,01 ± 0,04 ^d	3,01 ± 0,01 ^a	2,58 ± 0,01 ^f	6,81 ± 0,04 ^d	5,83 ± 0,04 ^d	1,17 ± 0,05 ^b	5,98 ± 0,05 ^f
Apigenina	1,49 ± 0,04 ^b	0,13 ± 0,01 ^e	2,14 ± 0,01 ^b	0,39 ± 0,04 ^c	1,69 ± 0,03 ^e	0,54 ± 0,01 ^a	0,64 ± 0,01 ^a	0,21 ± 0,04 ^b
Total	24,72 ± 0,15	19,59 ± 0,13	23,62 ± 0,15	17,88 ± 0,14	23,44 ± 0,21	16,96 ± 0,19	14,30 ± 0,15	18,32 ± 0,20
Total por estação	44,31 ± 0,28		41,50 ± 0,29		40,40 ± 0,40		33,62 ± 0,35	

Os resultados são expressos como média ± desvio padrão (DP) de três determinações. Por coleta as médias seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de *Tukey* $P < 0,05$. Precipitação em milímetros (mm).

3.5. Variação na composição fenólica entre os compostos identificados no cerne

Os extratos do cerne se comportaram qualitativamente iguais durante os dois anos (2015 e 2016), com exceção da última coleta (outubro de 2016) em que não foi verificado o composto catequina (Tabela 3. e Figura 4.). De acordo com as estações, os extratos apresentaram melhores rendimentos de compostos fenólicos durante a estação chuvosa no primeiro ano e durante a seca no segundo. O valor mais elevado registrado para os compostos foi em abril de 2015, no período chuvoso, coincidindo com a fase de frutificação, porém, no segundo ano (abril de 2016) no mesmo período foi verificado o menor rendimento de compostos fenólicos identificados no extrato, tendo por possível influência os níveis de precipitação, que foi mais elevado em abril de 2015.

Assim como os extratos da entrecasca do caule, os do cerne tiveram como principal composto entre os fenólicos identificados a cinchonina com maiores quantidades observadas ao final da estação chuvosa (frutificação) e início da seca (queda foliar), mantendo-se com valores similares até o início da estação chuvosa de 2016 (floração), apresentando redução na fase de frutificação e voltando a subir com o início do período seco (queda foliar - 2016). Os valores mais altos para quercetina ($5,03 \pm 0,01$ mg/g e $4,03 \pm 0,04$ mg/g) estiveram associados aos períodos de floração durante as estações chuvosas, com diferentes níveis de precipitação e ao final das estações secas, com destaque para outubro de 2016 que obteve rendimento de $5,94 \pm 0,03$ mg/g, na fase de queda foliar com floração. O ácido cafeico apresentou quantidade significativa ($6,78 \pm 0,03$ mg/g) somente em janeiro de 2016 (período de chuva com alta precipitação) durante a floração, com valores consideráveis ainda na frutificação para os dois anos. O ácido clorogênico também apresentou relação com o período chuvoso, mas somente em 2015 na fase de frutificação, apresentando níveis ainda altos no período seco relacionados à queda foliar. Desta forma, o ácido gálico obteve afinidade com os períodos secos, com valores significativos nesta estação associadas à queda foliar.

Cianidina e catequina, não apresentaram afinidade com o período de seca mesmo quando registrado níveis de precipitação, sendo verificado na ausência de cianidina (julho de 2015 e 2016) valores mínimos de catequina no período de queda foliar e a ausência destes dois flavonoides no período de queda foliar/floração em 2016.

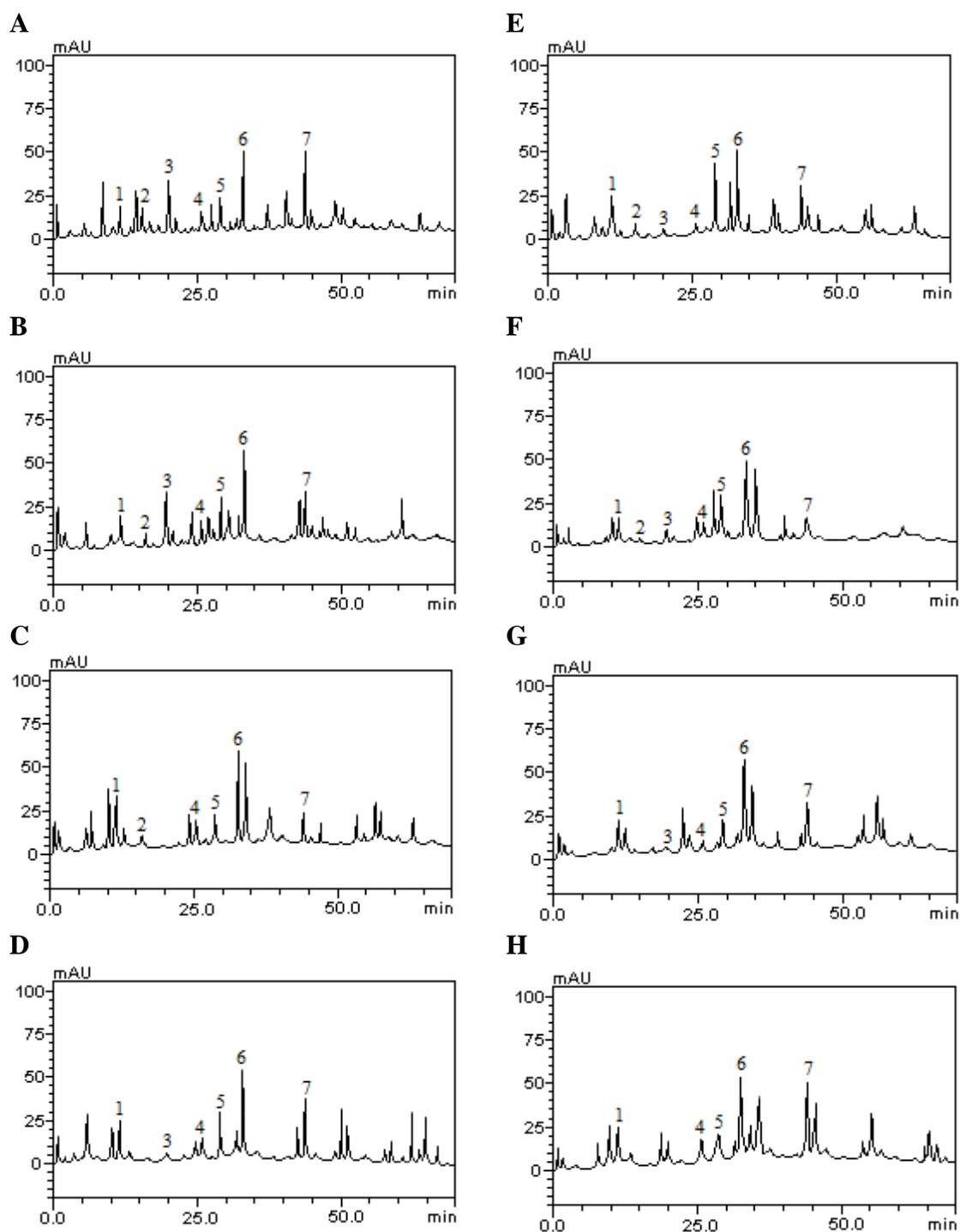


Figura 4. Representação do perfil da cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos do Cerne de *S. floribunda*. Pico 1: ácido gálico, Pico 2: cianidina, Pico 3: catequina, Pico 4: ácido clorogênico, Pico 5: ácido caféico, Pico 6: cinchonina, Pico 7: quercetina. A: coleta de cerne 1; B: coleta de cerne 2; C: coleta de cerne 3; D: coleta de cerne 4; E: coleta de cerne 5; F: coleta de cerne 6; G: coleta de cerne 7; H: coleta de cerne 8.

Tabela 3. Composição do extrato etanólico do cerne de *Secondatia floribunda* coletada em diferentes períodos.

Cerne	Chuvoso		Seco		Chuvoso		Seco	
	72 mm	216 mm	31 mm	11 mm	409 mm	36 mm	0 mm	0 mm
Compostos	Floração	Frutificação	Queda foliar		Floração	Frutificação	Queda foliar	Queda foliar/ Floração
	Jan/2015	Abr/2015	Jul/2015	Out/2015	Jan/2016	Abr/2016	Jul/2016	Out/2016
	mg/g							
Ácido gálico	1,38 ± 0,03a	2,79 ± 0,05a	3,94 ± 0,01a	2,18 ± 0,03a	0,73 ± 0,01a	1,69 ± 0,01a	1,96 ± 0,03a	3,76 ± 0,04a
Cianidina	1,34 ± 0,01a	0,45 ± 0,01b	0,51 ± 0,02b	-	0,41 ± 0,05b	0,14 ± 0,03b	-	-
Catequina	3,29 ± 0,02b	4,01 ± 0,01c	-	0,39 ± 0,01b	0,36 ± 0,01b	0,50 ± 0,04c	0,18 ± 0,04b	-
Ácido clorogênico	1,18 ± 0,01c	2,08 ± 0,01d	1,97 ± 0,03c	1,25 ± 0,03c	0,35 ± 0,01b	0,49 ± 0,01c	0,57 ± 0,05c	1,85 ± 0,01b
Ácido cafeico	1,40 ± 0,03a	3,83 ± 0,02c	2,03 ± 0,02c	2,47 ± 0,02a	6,78 ± 0,03c	3,07 ± 0,01d	1,73 ± 0,01a	1,98 ± 0,02a
Cinchonáina	5,06 ± 0,02d	7,52 ± 0,04e	7,68 ± 0,01d	7,35 ± 0,01d	7,19 ± 0,01d	5,46 ± 0,02e	6,28 ± 0,03d	6,07 ± 0,02c
Quercetina	5,03 ± 0,01d	3,96 ± 0,05c	2,11 ± 0,01c	4,16 ± 0,01e	4,03 ± 0,04a	0,81 ± 0,02a	3,91 ± 0,02e	5,94 ± 0,03c
Total	18,68 ± 0,13	24,64 ± 0,19	18,24 ± 0,10	17,80 ± 0,11	19,85 ± 0,16	12,16 ± 0,14	14,63 ± 0,18	19,60 ± 0,12
Total por estação	43,32 ± 0,32		36,04 ± 0,21		32,01 ± 0,30		34,23 ± 0,30	

Os resultados são expressos como média ± desvio padrão (DP) de três determinações. Por coleta as médias seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de *Tukey* $P < 0,05$. Precipitação em milímetros (mm).

3.6 Análise de Componentes Principais (PCA)

A PCA permitiu avaliar o grau de semelhança entre os compostos fenólicos identificados nos extratos etanólicos da entrecasca do caule e cerne e os dados pluviométricos. Essa análise agrupou as amostras com as mesmas características e reduziu o número de dimensões no conjunto de dados sem perder informações relevantes. A PCA foi realizada com 7 e 8 compostos fenólicos identificados nos extratos do cerne e da entrecasca do caule, respectivamente.

Para o extrato da entrecasca do caule, o primeiro componente (PC 1) explica 33,7%, o segundo (PC 2) 26,9% e o terceiro (PC 3) 18,3%. Os diagramas de dispersão do PC 1 versus PC 2 (Figura 5.), que representam 60,6% da variância total, foram escolhidos para serem apresentados e analisados aqui porque o primeiro explica a maior quantidade de variação, no entanto, analisando o gráfico, foi possível observar que a concentração dos compostos é menos afetada pela sazonalidade. Para PC 1 (eixo vertical) são observadas cargas positivas para cianidina, catequina, cinchonina, ácido gálico, apigenina e para a precipitação, e cargas negativas para ácido clorogênico, ácido cafeico e quercetina.

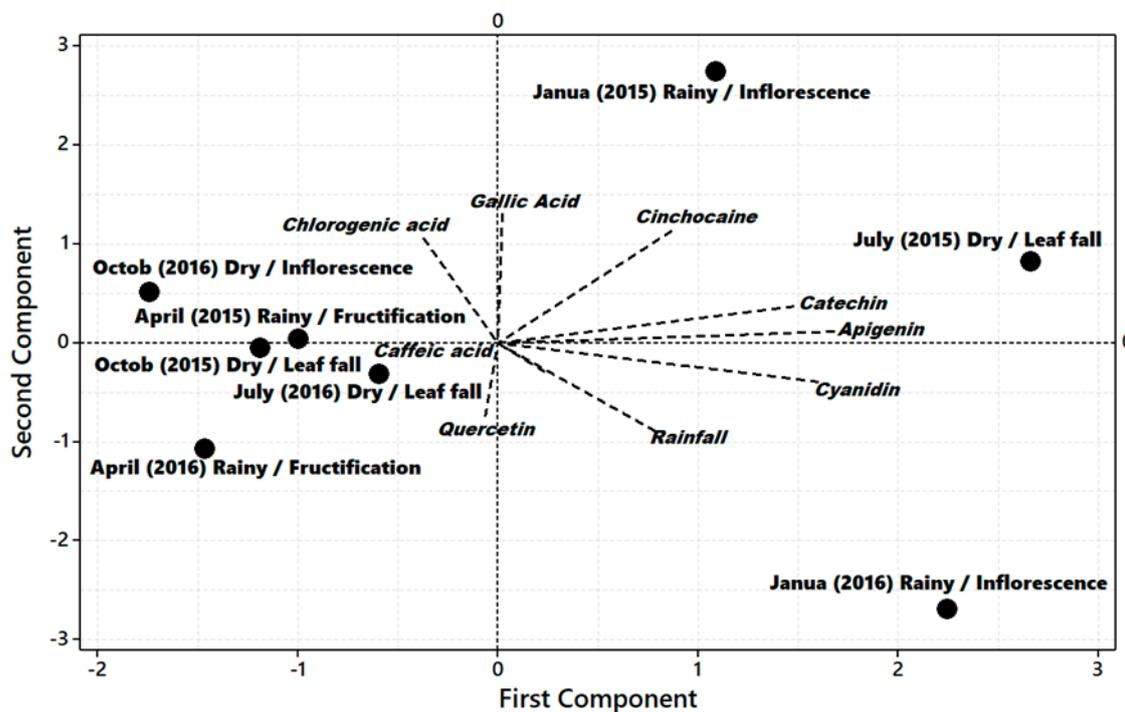


Figura 5. Análise de componentes principais dos compostos fenólicos identificados nos extratos etanólicos da entrecasca do caule de *Secondatia floribunda* e os dados pluviométricos, coletada em diferentes períodos sazonais por dois anos.

PC 2 (eixo horizontal) possui cargas positivas para o ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, cinchonina e apigenina e carregamento negativo apenas para precipitação, cianidina, ácido cafeico e quercetina. A Figura 5, demonstra que os compostos cujos vetores apontam para os marcadores de chuva, indicam uma homogeneidade no rendimento dos extratos nos diferentes períodos sazonais e fases fenológicas, corroborando com os dados apresentados na Tabela 2.

Para o cerne, o primeiro componente (PC 1) explica 69,0%, o segundo (PC 2) 18,6% e o terceiro (PC 3) 9,1%. Os diagramas de dispersão de PC 1 versus PC 2 (Figura 6.), representam 87,6% da variância total, foram escolhidos para serem apresentados e analisados aqui porque o primeiro explica a maior quantidade de variação e o segundo, além de explicar uma variância geral significativa também dá uma boa separação.

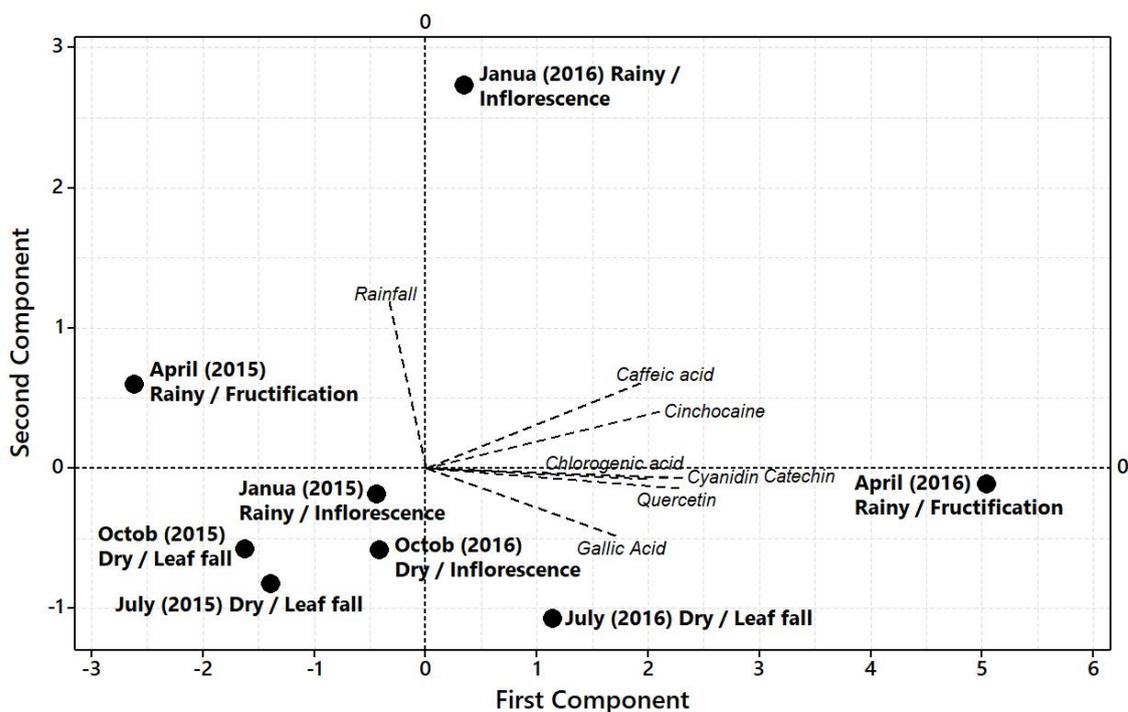


Figura 6. Análise de componentes principais dos compostos fenólicos identificados nos extratos etanólicos do cerne de *Secondatia floribunda* e os dados pluviométricos, coletada em diferentes períodos sazonais por dois anos.

O PC 1 possui cargas positivas para todos os compostos e cargas negativas para a precipitação. PC 2 possui cargas positivas apenas para o ácido cafeico, cinchonina e a precipitação, e carga negativa para ácido gálico, ácido clorogênico, cianidina, catequina e quercetina. Analisando a Figura 6, os compostos cujos vetores apontam para os marcadores de chuva indicam que há maior rendimento nos extratos do cerne na estação chuvosa. No

entanto, vale a pena notar que o vetor de ácido gálico aponta em julho de 2016 (início do período seco – fase de queda foliar), este composto foi o quarto entre os mais elevados. Para ambos os extratos ácido cafeico, cinchonina e quercetina tem uma grande influência na separação da estação seca e chuvosa estando fortemente correlacionados, devido à maior produção destes compostos nas partes vegetais avaliadas.

4. Discussão

4.1. Rendimento dos extratos em função da sazonalidade e da fenologia

A influência da sazonalidade no rendimento dos extratos da entrecasca do caule e cerne (Tabela 1) evidenciou que a combinação de fatores entre as estações chuvosa com baixa precipitação e seca (período de transição) favorece o aumento da produção de metabólitos secundários, refletindo em rendimentos com valores consideráveis. De modo geral, a fenologia parece não influenciar no rendimento dos extratos, uma vez que os maiores teores foram nas fases de floração e queda foliar em 2015 e na frutificação em 2016. Esta variação no conteúdo entre as estações e as fases fenológicas está mais relacionada com os níveis de precipitação, que quando baixos favoreceu nos rendimentos. Diversos estudos evidenciam que o conteúdo químico de uma determinada planta medicinal pode variar substancialmente com a sazonalidade, níveis de precipitação e com seu o ciclo fenológico (Carvalho et al., 2014; Estell et al., 2016; Oliveira et al., 2017; Yao et al., 2016).

Dentre as partes vegetais avaliadas, os maiores rendimentos foram obtidos para os extratos da entrecasca do caule quando comparados aos do cerne, este fato, possivelmente está relacionado a processos fisiológicos recorrentes em espécies lenhosas, principalmente quando expostas a situações estressantes. Por certo período *S. floribunda* tende a perder suas folhas deixando suas estruturas perenes expostas. Nas plantas, as áreas mais vulneráveis exigem maior proteção e a produção de metabólitos secundários que estão diretamente ligados à adaptação da planta com o meio (Verma e Shukla, 2015). Ao longo das estações e durante as fases de desenvolvimento fenológico, as plantas tendem a aperfeiçoar suas defesas para a proteção de partes vegetais mais valiosas, para isso ocorre distribuição e/ou realocação de compostos entre os tecidos (Nyman e Julkunen-Tiitto, 2005; Rasmann et al., 2011). Carvalho et al. (2014) verificaram que a concentração de compostos químicos primários e secundários em folhas e flores de *Jacobaea vulgaris*

Gaertn. além de diferirem na sua concentração e composição, variou ao longo das estações e foi afetada pelas fases fenológicas revelando alocação de nutrientes do estágio vegetativo (folhas) para as partes reprodutivas (flores) da planta.

4.2. Variação nos compostos fenólicos identificados na entrecasca do caule e cerne em função da sazonalidade e da fenologia

A concentração de compostos fenólicos variou entre as partes vegetais avaliadas, durante os dois anos de estudo, entre os períodos chuvoso e seco considerando diferentes fases fenológicas. Essa variação pode ser parcialmente explicada pela ocorrência de diversos fatores que podem afetar certos compostos fenólicos, enquanto exerce determinada influência sobre a produção de outros (Laitinen et al., 2000; Lavola et al., 2003). Sendo assim, este estudo confirma que a composição qualitativa e quantitativa dos compostos fenólicos depende de partes vegetais de um mesmo indivíduo, bem como de condições ambientais diversas (Deng et al., 2015; Macheix et al., 2005; Moore et al., 2014; Siracusa e Ruberto, 2014; Verma e Shukla, 2015). De fato, a sazonalidade afeta na composição química, fazendo com que alguns compostos apresentem concentrações variáveis ao longo do ano, enquanto outros não chegam a ser sintetizados (Bulbovas et al., 2005; Munné-Bosch e Cela, 2006).

Na estação chuvosa principalmente no ano em que houve maiores níveis de precipitação, *S. floribunda* exibiu concentrações elevadas de compostos fenólicos na entrecasca do caule em relação ao cerne. Essa observação reforça que as condições ambientais são fundamentais na determinação da natureza bem como nas proporções relativas dos compostos químicos (Gobbo Neto e Lopes, 2007). Os compostos fenólicos, incluído taninos e flavonoides podem responder tanto quantitativa como qualitativamente à sazonalidade, sendo interessante estudar como estes grupos variam em cada parte da planta durante as fases fenológicas. Situação similar também foi encontrada para *Dydimopanax vinosum* (Cham. & Scltdl.) Seem., proveniente do cerrado central, que apresenta níveis de taninos elevados em formações florestais com maior disponibilidade de água (Pais e Varanda, 2003). Em áreas com clima semiárido, Monteiro et al. (2006) estudando cascas e folhas de *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All. e *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan para avaliar os níveis de taninos observaram que a sazonalidade possui forte relação com a quantidade destes compostos que se apresentam mais elevados no período de estiagem nas cascas. Borella et al. (2001) estudando os níveis de flavonóides da espécie

Baccharis trimera Less. observaram que as amostras coletadas no verão apresentaram maior rendimento que nas demais estações, o que sugere que a espécie neste período, devido a condições estressantes, investiu mais em rotas biossintéticas antioxidantes.

A maior quantidade de compostos fenólicos na entrecasca do caule foi obtida durante a floração enquanto no cerne na fase de frutificação e floração. Os eventos reprodutivos proporcionam a atração de insetos e seu contato com a planta estimula a produção de compostos como um dos mecanismos de defesa vegetal. Desta forma, a translocação de compostos defensivos não é apenas induzível por situações de estresse, mas está relacionada a estágios específicos na reprodução das plantas, como o início da floração ou o desenvolvimento de frutos (Kaplan et al., 2008). Fillipini et al. (2010), avaliando variações nos conteúdos de flavonoides de *Hypericum perforatum* L., mostraram que foi maior no período em que se inicia a floração e menor durante a frutificação.

Cinchonaina foi o principal composto em ambas as partes vegetais ao longo do período de análise, seguido de quercetina. Esses flavonoides apresentaram-se abundantes no período chuvoso durante as fases reprodutivas. A presença de cinchonaina é pouco relatada em outros estudos, tendo sido verificada pela primeira vez nas cascas de algumas espécies do gênero *Cinchona* sp. (Rubiaceae) (Nonaka e Nishioka, 1982) e mais tarde se tornou marcador quimiosistemático da espécie *Trichilia catigua* Adr. Juss (Meliaceae) (Tang et al., 2007) que coincidentemente também é conhecida popularmente como ‘catuaba’. Além disso, este flavonoide é descrito em algumas espécies da família Apocynaceae (Xiong et al., 2000). Quercetina se comportou de forma semelhante, em *Hypericum brasiliense* Choisy (Abreu et al., 2004) e *Hypericum organifolium* Willd (Çirak et al., 2007) onde seu conteúdo atingiu maior nível na floração e diminuiu durante a frutificação, esta resposta ecofisiológica demonstra que este composto pode estar diretamente relacionado na ativação de vias metabólicas que investem na floração.

No presente estudo a ausência de catequina coincidiu com níveis mais elevados de cianidina que tanto na entrecasca do caule como no cerne não mostraram padrão de rendimento entre as estações seca e chuvosa. Ao longo do ano compostos similares podem ser alterados simultaneamente pelo mesmo fator (Yao et al., 2005). Durante as fases de queda foliar cianidina foi ausente na entrecasca do caule e presente em quantidades consideráveis no cerne. Em estudo realizado com as folhas de *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, observando ao longo do ano fatores que podem atuar em conjunto ou isoladamente (ciclo circadiano e/ou temperatura) perceberam variações em catequinas (galato de epigalocatequina, epicatequina), onde galato de epigalocatequina teve sua produção

estimulada em períodos com temperaturas mais elevadas e epigalocatequina em períodos mais frios (Yao et al., 2005).

Entre os ácidos fenólicos, o cafeico é o mais representativo da classe (Tapiero et al., 2002), e apresentou afinidade com baixos níveis de precipitação durante as fases reprodutivas, obtendo alto rendimento no cerne. O ácido clorogênico esteve presente em maiores quantidades nos extratos do cerne, já na entrecasca do caule estiveram ausentes em dois períodos distintos durante os dois anos de estudo. Desta forma, é possível que haja uma translocação de metabolitos em relação a órgãos reprodutivos (Konchar et al., 2011; Taiz e Zeiger, 2006). Cristians et al. (2014) avaliando o melhor período de coleta de ácido clorogênico nas folhas de *Hintonia latiflora* DC. verificaram que o composto atingiu nível máximo de concentração durante a fase de senescência pouco antes da troca folhosa e declínio no estágio de floração.

A aplicação de técnicas quimiométricas proporciona uma melhor interpretação dos dados, através da classificação e discriminação das amostras. Os dados fornecidos pela PCA foram importantes para comparação e exploração de dados complexos, possibilitando investigar a similaridade dos compostos fenólicos presentes nos extratos da entrecasca do caule e cerne de *S. floribunda* em diferentes períodos sazonais. Os resultados da PCA evidenciam diferenças nos níveis de compostos fenólicos entre os extratos da entrecasca do caule e cerne. Desta forma, os modelos obtidos mostram que os compostos fenólicos presentes na entrecasca do caule são mais afetados pela sazonalidade estando correlacionados entre si quando comparado aos compostos do cerne que não apresentaram correlação significativa entre as estações.

5. Conclusão

Os resultados mostraram que o rendimento dos extratos da entrecasca do caule e do cerne de *S. floribunda* variaram durante os dois anos de estudo, entre eles e em diferentes períodos sazonais, com níveis elevados associados a baixos índices pluviométricos. Os compostos fenólicos identificados entre as partes vegetais apresentaram mudanças qualitativa e quantitativa durante as estações e estágios fenológicos, com predominância do flavonoide cinchonaina em ambas. A estação chuvosa nos dois anos favoreceu para a produção de quantidades mais elevadas de compostos fenólicos, durante as fases reprodutivas, principalmente na floração. Com base nas variações, pode-se verificar uma relação entre a sazonalidade e o conteúdo químico nas distintas partes da planta durante

seu ciclo fenológico. A PCA confirmou a correlação existente entre os compostos fenólicos e a sazonalidade, principalmente para a entrecasca do caule. Este é o primeiro relato sobre as variações no conteúdo fenólico de *S. floribunda*. Assim, os presentes resultados além de servirem como base para posteriores estudos também podem ser úteis para o desenvolvimento de padrões de coleta para obter maiores concentrações de compostos aqui identificados e que são destinados ao uso terapêutico.

Referências

Abreu I.N, Porto A.L.M, Marsaioli A.J, Mazzafera P. 2004. Distribution of bioactive substances from *Hypericum brasiliense* during plant growth. *Plant Sci.* 167, 949–54.

Albuquerque, U.P., Ramos, M.A., Melo, J.G. 2012. New strategies for drug discovery in tropical forests based on ethnobotanical and chemical ecological studies. *J Ethnopharmacol.* 140, 197– 201.

Almeida, C.F.C.B.R., Lima e Silva, T.C., Amorim, E.L.C., Maia, M.B.S., Albuquerque. U.P., 2005. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the Caatinga (Northeast Brazil). *J Arid Environ.* 62, 127 – 142.

Borella, J.C., Duarte, D.P., Novaretti, A.A., Menezes Jr, A., França, S.C., Rufato, C.B Santos, P.A.S., Veneziani, R.C.S., Lopes, N.P. 2006. Variabilidade sazonal do teor de saponinas de *Baccharis trimera* (Less.) DC (Carqueja) e isolamento de flavona. *Rev Bras Farmacogn*, 16, 557-561.

Bulbovas, P., Rinaldi, M.C.S., Delitti, W.B.C., Domingos, M. 2005. Variação sazonal em antioxidantes em folhas de plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). *Revista Brasil. Bot*, 28(4), 687-696.

Carvalho, S., Macel, M., Mulder, PP, Skidmore, A., Putten, W.H. 2014. A variação química em *Jacobaea vulgaris* é influenciada pela interação do estágio sucessional da estação e da vegetação. *Phytochemistry.* 99, 86-94.

Cavalcanti, A.C., Lopes, O.F., 1994. Condições edafoclimáticas da Chapada do Araripe e viabilidade de produção sustentável de culturas. Brasília, Embrapa, 42p.

Chen, H.J., Li, X., Chen, J.W., Guo, S., Cai, B.C., 2010. Simultaneous determination of eleven bioactive compounds in *Saururus chinensis* from different harvesting seasons by HPLC-DAD. *J Pharm Biomed*, 51, 1142–1146.

Çirak, C., Radušienė, J., Ivanauskas, L., Janulis, V. 2007. Variation of bioactive secondary metabolites in *Hypericum origanifolium* during its phenological cycle. *Acta Physiol Plant*, 29 (3), 197-203.

Costa, I.R., Araujo, F.S., Lima-Verde, L.W. 2004. Flora e aspectos auto-ecológicos de um enclave de cerrado na chapada do Araripe, Nordeste do Brasil. *Acta Bot Bras*, 18(4), 759-770.

Cristians, S., Mata, R., Bye, R. 2014. Phenological and geographical influence in the concentration of selected bioactive 4-phenylcoumarins and chlorogenic acid in *Hintonia latiflora* leaves. *J Ethnopharmacol*, 152(2), 308-313.

Deng, Y., Zhao, Y., Padilla-Zakour, O., Yang, G., 2015. Polyphenols, antioxidant and antimicrobial activities of leaf and bark extracts of *Solidago Canadensis* L. *Ind Crops Prod*, 74, 803–809.

Di Stasi, L.C. 2005. An integrated approach to identification and conservation of medicinal plants in the tropical forest – a Brazilian experience. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 3, 199-205.

Endara, M.J., Coley, P.D. 2011. The resource availability hypothesis revisited: a meta-analysis. *Funct Ecol*, 25(2), 389-398.

Estell, R.E., Fredrickson, E.L., James, D.K. 2016. Effect of light intensity and wavelength on concentration of plant secondary metabolites in the leaves of *Flourensia cernua*. *Biochemical systematics and ecology*, 65, 108-114.

Figueiredo, L.S., Bonfim, F.P.G., Siqueira, C.S., Fonseca, M.M., Silva, A.H., Martins, E.R. 2009. Efeito da época de colheita na produção de fitomassa e rendimento de óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham). *Rev bras plantas med*, 11(2), 154-158.

Fillipini, R., Piovan, A., Borsarini, A., Caniato, R., 2010. Study of dynamic accumulation of secondary metabolites in three subspecies of *Hypericum perforatum*. *Fitoterapia* 81, 115–119.

Gobbo-Neto, L., Lopes, N.P. 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim Nova*, 30(2)374-381.

Ilić, Z. S., Fallik, E. 2017. Light quality manipulation improves vegetable quality at harvest and postharvest: A review. *Environ Exp Bot*, 139, 79-90.

Kaplan, I., H. Rayko, A. Kessler, S. Sardanello, R. Denno. 2008. Constitutive and induced defenses to herbivory in above and belowground plant tissues. *Ecology*, 89(2), 392–406.

Konchar, K., Li, X.L., Yang, Y.P., Emshwiller, E. 2011. Phytochemical Variation in *Fritillaria cirrhosa* D. Don (*Chuan Bei Mu*) in Relation to Plant Reproductive Stage and Timing of Harvest. *Econ Bot*, 65(3), 283.

Laitinen, M.L., Julkunen-Tiitto, R., Rousi, M., 2000. Variation in Phenolic Compounds within a Birch (*Betula pendula*) Population. *J Chem Ecol*, 26(7), 1609–1622.

Lavola, A., Aphalo, P.J., Lahti, M., Julkunen-Tiitto, R., 2003. Nutrient availability and the effect of increasing UV-B radiation on secondary plant compounds in Scots pine. *Environ Exp Bot*, 49, 49–60.

Loiola, M.I.B., Araújo, F.S., Lima-Verde, L.W., Souza, S.S.G., Matias, L.Q., Menezes, M.O.T., Silva, M.A.P., Souza, M.M. de A., Mendonça, A.C.A.M., Macedo, M.S., Oliveira, S.F., Sousa, R. S., Balcázar, A.L., Crepaldi, C.G., Campos, L.Z.O., Nascimento, L.G. S., Cavalcanti, M.C.B.T., Oliveira, R.D., Silva, T.C., Albuquerque, U.P. 2015. Flora da Chapada do Araripe. In: Albuquerque, U.P., Meiado, M.V. (eds.). *Sociobiodiversidade na Chapada do Araripe*. 1. NUPEEA, Recife. pp. 103-148.

Macedo, D.G., Ribeiro, D. A., Coutinho, H.D.M., Menezes, I.R.A., Souza, M.M.A. 2015. Práticas terapêuticas tradicionais: uso e conhecimento de plantas do cerrado no estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil). *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat*, 14(6), 491 – 508.

Macheix, J.J., Fleuriet, A., Jay-Allemand, C., 2005. *Les Composés Phénoliques Desvégétaux: Un Exemple De métabolites Secondaires d'importance économique*. Presses polytechniques et universitaires romandes, CH –1015 Lausanne, pp.192.

Matos, F.J.A. *Introdução à fitoquímica experimental: edições UFC*; 1997.

Melo, J.G., Rodrigues, M.D., Nascimento, S.C., Amorim, E.L.C., Albuquerque, U.P. 2017. Cytotoxicity of plants from the Brazilian semi-arid region: A comparison of different selection approaches. *S Afr. J Bot*, 113, 47-53.

Monteiro, J.M., Albuquerque, U.P., Lins Neto, E.M.F., Araújo, E.L., Albuquerque, M.M., Amorim, E.L.C., 2006. The effects of seasonal climate changes in the Caatinga on tannin levels in *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All. and *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. *Braz J Pharm*, 16(3), 338–344.

Moore, B.D., Andrew, R.L., Külheim, C., Foley, W.J. 2014. Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. *New Phytol*, 201(3), 733-750.

Mori, S.A., Bonn, B.M., Carvalho, A.M., Santos, T.S. 1989. Southern Bahian Forests. *Botanical Review*, 49, 155-232.

Munné-Bosch, S., Cela, J. 2006. Effects of water deficit on photosystem II photochemistry and photoprotection during acclimation of lyreleaf sage (*Salvia lyrata*L.) plants to high light. *J Photochem Photobiol B*, 85, 191–197.

Nascimento, F.G., Faqueti, A., Wilhelm, J.F., Wittkowski, C., Tomczak, F.D., Borges, S.L., Yunes, R.A., Franchi Jr., G.C., Nowill, A.E., Filho, V.C., Machado, M.S., Freitas, R.A., Malheiros, A. 2014. Seasonal influence and cytotoxicity of extracts, fractions and major compounds from *Allamanda schottii*. *Rev bras farmacogn*, 24(5), 545-552.

Nascimento, N.C., Fett-Neto, A.G. 2010. Plant secondary metabolism and challenges in modifying its operation: An overview. *Methods Mol Biol*, 643, 1–13.

Nonaka, G., Kawahara, O., Nishioka, I. 1982. Tannins and related compounds VIII. A new type of proanthocyanidin, cinchonains IIa and Ib from *Chinchona succirubra* (2). *Chem Pharm Bull*, 30, 4277–4282.

Nyman, T., Julkunen-Tiitto, R. 2005. Chemical variation within and among six northern willow species. *Phytochemistry*, 66(24), 2836-2843.

Oliveira, L.G.S., Ribeiro, D.A., Saraiva, M.E., Macêdo, D.G., Macedo, J.G.F., Pinheiro, P.G., Costa, J.G.M., Souza, M.M.A., Menezes, I.R.A. 2017. Chemical variability of essential oils of *Copaifera langsdorffii* Desf. in different phenological phases on a savannah in the Northeast, Ceará, Brazil. *Ind Crops Prod*, 97, 455-464.

Ouerghemmi, S., Sebei, H., Siracusa, L., Ruberto, G., Saija, A., Cimino, F., Cristani, M. 2016. Comparative study of phenolic composition and antioxidant activity of leaf extracts from three wild *Rosa* species grown in different Tunisia regions: *Rosa canina* L., *Rosa moschata* Herrm. and *Rosa sempervirens* L. *Ind Crops Prod*, 94, 167-177.

Pais, M.P., Varanda, E.M. 2003. Variation in plant defenses of *Didymopanax vinosum* (Cham. & Schltdl.) Seem.(Apiaceae) across a vegetation gradient in a Brazilian cerrado. *Acta Bot Bras*, 17(3), 395-403.

R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

Ramakrishna, A.; Ravishankar, G.A. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signal Behav*, 6(11), 1720–1731.

Rasmann, S., De Vos, M., Casteel, C.L., Tian, D., Halitschke, R., Sun, J.Y., Agrawal, A.A., Felton, G.W., Jander, G. 2012. Herbivory in the previous generation primes plants for enhanced insect resistance. *Plant Physiol*, 158(2), 854-863.

Ribeiro, D.A., Damasceno, S.S., Boligon, A.A., de Menezes, I.R.A., Souza, M.M.A., Costa, J.G.M. 2017. Chemical profile and antimicrobial activity of *Secondatia floribunda* A. DC (Apocynaceae). *Asian Pac J Trop Biomed*, 7(8), 739-749.

Ribeiro, D.A., Oliveira, L.G.S., Macêdo, D.G., Menezes, I.R.A., Costa, J.G.M., Silva, M.A. P., Lacerd, S.R., Souza, M.M.A. 2014. Promising medicinal plants for bioprospection in a cerrado area of Chapa do Araripe, Northerastern Brazil. *J Ethnopharmacol*, 155, 1522-1533.

Saraiva, M.E., Ulisses, A.V.R.A., Ribeiro, D.A., Oliveira, L.G.S., Macêdo, D.G., Sousa, F.F.S., Menezes, I.R.A., Sampaio, E.V.S.B., Souza, M.M.A. 2015. Plant species as a therapeutic resource in áreas of the savann in the state of Pernambuco, Northeast Brazil. *J Ethnopharmacol*, 171, 141–153.

Sartor, T., Xavier, V.B., Falcão, M.A., Mondin, C.A., Dos Santos, M.A., Cassel, E., Astarita, L.V., Santarém, E.R. 2013. Seasonal changes in phenolic compounds and in the biological activities of *Baccharis dentata* (Vell.) GM Barroso. *Ind Crops Prod*, 51, 355-359.

Siracusa, L., Ruberto, G., 2014. Chapter II: Plant polyphenol profiles as a tool fortraceability and valuable suort to biodiversity. In: *Polyphenols in Plants: Isolation, Purification and Extract Preparation*, 1st edition. Elsevier Books, pp.15–33.

Sousa, A., Malheiro, R., Casal, S., Bento, A., Pereira, J.A., 2014. Antioxidant activity and phenolic composition of Cv: *Cobrancosa* olives affected through the maturation process. *J Funct Foods* 11, 20–29.

Sousa, E.O., Miranda, C.M.B.A., Nobre, C.A.B., Boligon, A.A., Athayde, M.L., Costa, J.G.M., 2015. Phytochemical analysis and antioxidant activities of *Lantana camara* and *Lantana montevidensis* extracts. *Ind Crop Prod*, 70, 7-15.

Taiz,L., Zeiger,E., 2006. *Plant Physiology*. (Vol. 10). Universitat Jaume I. Sinauer Associates Publishers, Sunderland.

Tang, W., Hioki, H., Harada, K., Kubo, M., Fukuyama, Y., 2007. Antioxidant phenylpropanoid-substituted epicatechins from *Trichilia catigua*. *J Nat Prod*, 70, 2010-2013.

Tapiero, H., Tew, K.D., Nguyen B, G., Mathé, G., 2002. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomed Pharmacother*, 56, 200- 2007.

Verma, N., Shukla, S., 2015. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *J Appl Res Med Aromat Plants*, 2(4), 105–113.

Xiong, Q., Fan, W., Tezuka, Y., Adnyana, I.K., Stampoulis, P., Hattori, M., Namba, T., Kadota, S., 2000. Hepatoprotective effect of *Apocynum venetum* and its active constituents. *Planta Med*, 66, 127.

Yao, L., Caffin, N., D'arcy, B., Jiang, Y., Shi, J., Singanusong, R., Liu, X., Datta, N., Kakuda, Y., Xu, Y., 2005. Seasonal variations of phenolic compounds in Australia grown tea (*Camellia sinensis*). *J Agric Food Chem*, 53(16), 6477–6483.

Yao, X.H., Zhang, Z.B., Song, P., Hao, J.Y., Zhang, D.Y., Zhang, Y. F. 2016. Different harvest seasons modify bioactive compounds and antioxidant activities of *Pyrola incarnata*. *Ind Crop Prod*, 94, 405-412.

CAPÍTULO 3

**Variação sazonal no conteúdo total de fenóis e flavonoides e a influência
na capacidade antioxidante de *Secundatia floribunda* A. DC.
(Apocynaceae)**

O capítulo a seguir representa o manuscrito a ser submetido segundo as normas estruturais e bibliográficas do periódico *Industrial Crops and Products*.

Variação sazonal no conteúdo total de fenóis e flavonoides e a influência na capacidade antioxidante de *Secundatia floribunda* A. DC. (Apocynaceae)

Resumo

O conteúdo de compostos fenólicos em uma planta medicinal não é constante durante todo o ano e numerosos fatores, incluindo a sazonalidade podem influenciar na sua produção e consequentemente refletir na sua atividade biológica, por esta razão tem se intensificado pesquisas que demonstrem esta variabilidade. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da variação sazonal no conteúdo total de fenóis e flavonoides e nas atividades antioxidantes dos extratos de *Secundatia floribunda* A. DC. Para realizar uma triagem química e biológica da planta e explorar a influência da sazonalidade, amostras de entrecasca do caule e cerne foram coletadas de forma trimestral durante dois anos compreendendo as estações chuvosa (janeiro e abril) e seca (julho e outubro). A quantificação de fenóis totais e flavonoides nos extratos orgânicos foram determinadas pelo método de *Folin-Ciocalteu* e cloreto de alumínio, respectivamente. A verificação da capacidade antioxidante foi determinada usando variados métodos *in vitro*: inibição do radical 1-1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), captura do radical 2,2'-azinobis-3-etilbenzenotiazolina-6-sulfônico (ABTS), poder antioxidante de redução do ferro (FRAP) e atividade quelante de íons ferro (Fe^{2+}). Durante os dois anos de coleta os resultados indicaram variações no conteúdo total de fenóis e de flavonoides dos extratos, refletindo nas atividades antioxidantes. Os extratos da entrecasca do caule e cerne coletados durante o período seco apresentam melhor desempenho nos teste DPPH e ABTS e os coletados durante o período chuvoso possuem atividades antioxidantes mais elevadas em FRAP e Quelante, estes últimos ensaios que demonstraram os melhores resultados. Este é o primeiro relato sobre a influência sazonal em atividades biológicas para *S. floribunda* o que em muito pode contribuir para novos estudos voltados a investigação de mudanças no conteúdo de compostos fenólicos bioativos e para o estabelecimento de condições experimentais úteis na obtenção de quantidades mais elevadas de compostos com propriedades antioxidantes.

Palavras-chave: Variabilidade química; Atividades antioxidantes; Ecologia química; capacidade redutora.

1. Introdução

A composição química das plantas é frequentemente influenciada por fatores externos e a produção de compostos está suscetível a variações qualitativas e quantitativas que geram acúmulo ou ausência de constituintes por determinado período, para responder às mudanças ambientais (Hussain et al., 2008; Oliveira et al., 2017). A atividade biológica que é dependente da composição química está igualmente sujeita a variações, com isso, espécies vegetais coletadas em diferentes períodos do ano podem apresentar além de mudanças nos níveis em sua composição, o surgimento de constituintes bioativos que refletem na resposta biológica (Lemos et al., 2017; Sartor et al., 2013; Yao et al., 2016).

Dentre a diversidade de componentes químicos sintetizados pelas plantas, os compostos fenólicos, amplamente distribuídos no reino vegetal, são uma importante classe que apresentam efeitos biológicos de grande alcance, com ações contra o câncer, microrganismos, inflamações, distúrbios cardiovasculares e envelhecimento (Flores et al., 2012; Koolen et al., 2013; Tapiero et al., 2002), esta ação positiva frente a diversos processos patológicos está diretamente relacionada com os inúmeros estudos que atribuem a capacidade antioxidante para estes compostos (Art e Hollman, 2005; Fernandes et al., 2009; Hooper et al., 2008; Kardum et al., 2014; Macheix et al., 2005; Middleton et al., 2000; Soares, 2002; Soobrattee et al., 2005; Sousa et al., 2015).

A produção e conteúdo destes componentes químicos antioxidantes nas plantas são influenciados, na maioria das vezes, por condições de estresse abiótico, tais como a sazonalidade, temperatura e radiação, com isso, os compostos fenólicos, incluindo taninos e flavonoides também são responsáveis pela defesa antioxidantes nas plantas auxiliando na proteção e capacidade de adaptação as condições de estresse (Araújo et al., 2015; Gill e Tuteja, 2010; Jaleel et al., 2009; Nour et al., 2014; Ouerghemm et al., 2016; Sartor et al., 2013).

Desta forma, muitas plantas medicinais apresentam grandes quantidades de compostos fenólicos, que variando ou não, desempenham um papel importante na adsorção, neutralização e eliminação de radicais livres, ou nos peróxidos em decomposição (Djeridane et al., 2006; Pacifico et al., 2015), potencialmente impedindo em sistemas biológicos a ocorrência de doenças degenerativas crônicas e estimulando as defesas celulares para evitar danos oxidativos (Bhatt e Negi, 2012; Nascimento e Fett-Neto, 2010; Ncube et al., 2012).

Os efeitos das variações sazonais sobre a composição química e as características biológicas de compostos fenólicos estão sendo relatadas na literatura de forma promissora (Araújo et al., 2015; Cristians et al., 2014; Jaleel et al., 2009; Ouerghemmi et al., 2016; Yao et al., 2016). Tendo em vista, a resposta positiva destes estudos reforçam a importância de comparar a variabilidade química destas e de outras classes de compostos biologicamente ativos em plantas coletada durante diferentes períodos, sob condições ambientais diversas (Chen et al., 2010; Sousa et al., 2014; Verma et al., 2014).

Secondatia floribunda A.DC (Apocynaceae), conhecida popularmente no Ceará como 'catuaba-de-rama' ou 'catuaba-de-cipó', é uma das três espécies ocorrentes no Brasil do seu gênero, presentes nas regiões Nordeste e Sudeste. Frequentemente encontrada em áreas de cerrado da Chapada do Araripe, *S. floribunda* apresenta diversos atributos medicinais destacado em estudos etnobotânicos (Macedo et al., 2015; Ribeiro et al., 2014; Saraiva et al., 2015; Souza et al., 2014), por outro lado seu perfil químico-biológico era desconhecido até pouco tempo, sendo relatado quantidades significativas de compostos fenólicos (Ribeiro et al., 2017), o que engrandece o interesse em elucidar as variações na composição química e as propriedades biológicas desta planta.

Neste sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar a variabilidade do conteúdo total de fenóis e flavonoides dos extratos etanólicos da entrecasca do caule e cerne de *S. floribunda* A.DC coletados em distintos períodos sazonais e a influência desta variação nas atividades antioxidantes mediante a aplicação de quatro ensaios diferentes.

2. Material e métodos

2.1 Coleta e identificação do material vegetal

Amostras de entrecasca do caule e cerne de *S. floribunda* foram coletadas na Floresta Nacional do Araripe (FLONA - Araripe), em área conhecida por Malhada Bonita (07° 11' S e 39° 13' W), no município de Crato, no Estado do Ceará, Nordeste do Brasil. A área de amostragem é composta por vegetação savânica semidecídua (cerradão) e as coletas trimestrais foram realizadas a partir de três indivíduos (equidistante em cerca de 6 metros) com aspectos saldáveis e com características semelhantes em comprimento e diâmetro e em condições ambientais homogêneas (nível do solo, temperatura, umidade e luminosidade), durante quinze primeiros dias dos meses de janeiro, abril, julho e outubro de 2015 e 2016 compreendendo distintos períodos sazonais.

O material vegetal foi acondicionado e tratado segundo as técnicas usuais de herborização (Mori et al., 1989) e posteriormente identificado e depositado no Herbário Carirense Dárdano de Andrade Lima da Universidade Regional do Cariri (URCA) com registro N° 9259. A autorização para a coleta de material botânico foi fornecida pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), registrado sob o número 51674-1. Os parâmetros meteorológicos utilizados na discussão dos resultados foram adquiridos da Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos (FUNCEME) com informações referentes ao posto Lameiro.

2.2 Preparação dos extratos

Amostras de 16 extratos (oito da entrecasca do caule e oito do cerne) foram trituradas e adicionadas separadamente em frascos contendo 2 L de etanol, durante 72h à temperatura ambiente. Após este período, o etanol foi destilado utilizando evaporador rotativo a vácuo (modelo Q-344B, Quimis, Brasil) e banho ultratermal (modelo Q-214M2, Quimis) sob pressão reduzida, a uma temperatura de 50°C. Os rendimentos dos extratos coletados durante dos meses de janeiro, abril, julho e outubro para a entrecasca do caule foram respectivamente de 36,0%, 8,7%, 15,5% e 15,2% em 2015 e de 7,0%, 14,3%, 11,3% e 5,6% (ww^{-1}) em 2016. Já os extratos do cerne para os mesmos meses de coleta apresentaram rendimentos em 2015 de 6,8%, 2,5%, 1,8% e 6,7% e em 2016 de 5,3%, 11,8%, 3,8% e 9,1% (ww^{-1}), respectivamente.

2.3 Químicos, reagentes e equipamentos

Todos os produtos químicos utilizados eram de grau analítico. *Folin-Ciocalteu*, 1-1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH), 2,2'-azinobis-3-etilbenzenotiazolina-6-sulfônico (ABTS), 1,10-fenantrolina e TRIS-HCl foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Álcool etílico, Álcool metílico, Ácido L-(+)-ascórbico, butil-hidroxitolueno (BHT), 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ), sulfato ferroso (FeSO_4), cloreto férrico (FeCl_3), cloreto de alumínio (AlCl_3), acetato de potássio ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$), carbonato de sódio (Na_2CO_3) foram obtidos da empresa Merck (Darmstadt, Alemanha). As mensurações das absorbâncias em função das concentrações foram feitas em espectrofotômetro de UV-visível (Thermo Fisher mod. G10S UV-Vis).

2.4 Determinação do teor de fenóis totais

A determinação do conteúdo fenólico seguiu o método espectrofotométrico de *Folin-Ciocalteu* descrito por Singleton et al., (1999). Uma quantidade de 0,5 mL dos extratos etanólicos (1 mg/mL) foi misturada separadamente com 1,25 mL do reagente *Folin Ciocalteu* na concentração de 10% (v/v), seguido da adição de 1 mL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 7,5% (p/v). As diluições dos extratos foram preparadas em concentrações que variaram de 0,05 a 5,0 $\mu\text{g/mL}$. As soluções permaneceram em estufa por 15 min a temperatura de 45°C e após este período, a leitura foi realizada em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 765 nm. O teste foi realizado em triplicata, o teor de compostos fenólicos foi calculado a partir da curva de calibração utilizando ácido gálico e o resultado expresso em $\mu\text{gEq.AG/g}$.

2.5 Determinação do teor de flavonoides totais

O teor de flavonoides foi medido de acordo com a metodologia descrita por Kosalec et al., (2004), com adaptações, utilizando cloreto de alumínio (AlCl_3). As amostras de cada extrato foram preparadas a concentração inicial de 20 $\mu\text{g/mL}$ e diluídas para concentrações de 10, 5, 2 e 1 $\mu\text{g/mL}$. Foram misturados 760 μL de metanol, 40 μL de acetato de potássio ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$) a 10% (p/v), 40 μL cloreto de alumínio (p/v) (10%) e 1,120 μL de água destilada que foram adicionados a 50 μL de cada concentração de extrato. Para o ensaio em branco, o volume de AlCl_3 a 10% e de $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$ a 10% foi substituído pelo mesmo volume de água destilada. A incubação ocorreu à temperatura ambiente durante 30 min e a leitura em espectrofotômetro a 415nm. A curva de calibração foi determinada com quercetina, o teste realizado em triplicata e o valor médio expresso em $\mu\text{gEq.Q/g}$.

2.6 Avaliação da Capacidade Antioxidante

2.6.1 Determinação da atividade antioxidante *in vitro* pelo método DPPH

A atividade antioxidante dos extratos etanólicos da entrecasca do caule e cerne de *S. floribunda* foi verificada pelo método do sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH^{\bullet}). A técnica foi adaptada de Rufino et al. (2007a) e baseia-se no princípio de que o radical livre DPPH^{\bullet} , de coloração violeta, aceita elétrons ou átomos de hidrogênio

de compostos antioxidantes para tornar-se uma molécula estável de forma reduzida (DPPH-H), adquirindo coloração amarela (Mensor et al., 2001; Miliauskas et al., 2004).

Foram preparadas diferentes concentrações de cada extrato a partir das soluções estoque (50 mL), variando de 14 a 1400 µg/mL, diluídas em metanol. Para análise, uma alíquota de 100 µL de cada concentração da amostra foi adicionada a 3,9 mL da solução metanólica do radical DPPH^{*} (60 µM), as misturas reagiram em temperatura ambiente, na ausência de luz, por de 30 minutos. Como controle negativo foi preparado uma solução, utilizando-se 3,9 mL da solução do radical DPPH^{*} adicionado a 100 µL de metanol e como controles positivos foram utilizados a vitamina C (ácido ascórbico) (100 µL) e o BHT (butil-hidroxitolueno) (100 µL). Foi utilizado metanol como branco, o teste foi realizado em triplicata, seguido de três repetições e as absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro de UV-Visível em 515 nm e depois convertida em atividade antioxidante (AA) expressa em porcentagem, e calculada segundo a equação:

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

Onde:

Abs._{amostra} é a absorbância da amostra na presença de concentrações dos extratos, Abs._{branco} é absorbância do branco e Abs._{controle} é absorbância na ausência da amostra.

De acordo com os dados obtidos da atividade antioxidante (AA%) em diferentes concentrações determinados em triplicata foi calculada através de regressão linear a concentração inibitória capaz de consumir 50% do radical DPPH^{*} (CI₅₀) e o valor final foi expresso em µg/mL.

2.6.2 Captura do radical livre ABTS^{•+}

O método ABTS [2,2'-azinobis(3-etilbenzenotiazolina-6-sulfônico)] apresenta boa estabilidade, assim como o DPPH^{*}, contudo, pelo fato do radical ABTS^{•+} ser gerado através de reações químicas ou enzimáticas algumas diferenças são apontadas em determinadas condições de análise (Miliauskas et al., 2004). O ensaio para a determinação da atividade antioxidante pela captura do radical ABTS^{•+} foi realizado conforme Rufino et al. (2007b), este radical apresenta coloração esverdeada, que decresce de intensidade à medida que sofre redução pelo agente antioxidante. A formação do radical ABTS^{•+} é obtida

a partir da reação de 7 mM de solução estoque de ABTS com 140 mM da solução de persulfato de potássio, incubados em temperatura ambiente na ausência de luz, por 16 horas. Em seguida, a solução contendo o radical $ABTS^{+}$ foi diluída em etanol até obter absorvância de 0,70 (\pm 0,05) nm em espectrofotômetro de UV-Visível em 734 nm.

Foram preparadas diferentes concentrações dos extratos etanólicos, variando de 14 à 1400 $\mu\text{g/mL}$. Para a realizações das análises foram adicionadas uma alíquota de 30 μL de cada concentração dos extratos (14 a 1400 $\mu\text{g/mL}$) juntamente com 3,0 mL da solução do radical $ABTS^{+}$. Após 6 min de reação ao abrigo da luz, as absorvâncias foram lidas em espectrofotômetro de UV-Visível em 734 nm. O etanol foi utilizado como branco e o teste realizado em triplicata, seguido de três repetições. Como referência, foi utilizado o Trolox, um antioxidante sintético análogo à vitamina E. A atividade antioxidante (AA) foi expressa em μM trolox/g amostra.

2.6.3 Método de redução do ferro (FRAP)

Para determinação da atividade antioxidante, através do poder de redução do ferro (*Ferric Reducing Antioxidant Power* - FRAP), utilizou-se a metodologia descrita por Rufino et al. (2006). O método FRAP, baseia-se na medida direta dos agentes antioxidantes redutores, a reação ocorre pela formação de um complexo TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) com o Fe(III) ($[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$) de cor azul clara, para formar por redução, na presença de um antioxidante, $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{2+}$, de colocação azul escura (Rufino et al., 2006).

Diferentes concentrações dos extratos variando de 14 a 1400 $\mu\text{g/mL}$ foram preparadas. O reagente FRAP foi preparado no momento da análise, a partir da combinação de 25 mL de tampão acetato 0,3 M (pH 3,6), 2,5 mL de solução TPTZ (10 mM) e 2,5 mL de solução aquosa de cloreto férrico (FeCl_3) 20 mM. A mistura reacional foi então composta a partir de uma alíquota de 90 μL de cada diluição dos extratos, 270 μL de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP, incubados ao abrigo da luz por 30 min em banho-maria a 37° C, as absorvâncias foram lidas em espectrofotômetro de UV-Visível em 595 nm. O reagente FRAP foi utilizado como branco e sulfato ferroso (FeSO_4) como controle positivo. O teste foi realizado em triplicata, seguido de três repetições, e a atividade antioxidante total obtida pela substituição da equação da reta das absorvâncias equivalente a 1000 μM do padrão de FeSO_4 , os resultados foram expressos em μM de FeSO_4 /g de extrato.

2.6.4 Atividade quelante do íon Fe²⁺

A atividade quelante de íons Fe²⁺ foi determinada pelo método proposto por Puntel et al. (2005) com adaptações. Foram preparadas diferentes concentrações dos extratos etanólicos, variando de 14 a 1400 µg/mL. Para a análise, foram adicionadas em volume de 100 µL da cada amostra, 300 µL da solução de sulfato ferroso (FeSO₄; 2 mM), preparada no momento da análise e 336 µL de TRIS HCl 0,1 M (pH 7,4). As misturas reacionais foram incubadas ao abrigo da luz, durante 5 min, antes de iniciar a reação com a adição de 26 µL de solução de fenantrolina a 0,25%. A Fenantrolina reage com íons Fe²⁺ resultantes para formar um complexo [Fe(fenantrolina)₃]²⁺ de coloração vermelha cuja intensidade de cor é proporcional a quantidade concentrada desse íon na reação da mistura (Puntel et al., 2005).

O controle foi obtido através da adição de todas as soluções, com exceção do extrato e o branco sem a adição de fenantrolina (0,25%). A análise foi realizada em triplicata e a absorbância medida em espectrofotômetro de UV-Visível em 510 nm.

A atividade quelante (AQ%) de ferro das amostras foi expressa em porcentagem (%) e calculada conforme equação:

$$AQ (\%) = (Abs_{controle} - Abs_{amostra}) / Abs_{controle} \times 100$$

Onde:

Abs_{amostra} é a absorbância da amostra na presença de concentrações dos extratos e Abs_{controle} é a absorbância na ausência dos extratos.

2.7 Análises estatísticas

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os dados expressos como média (n=3) ± Desvio Padrão (D.P.) usando a Análise de Variância (ANOVA) de uma e duas vias sucedida pelo teste de *Tukey* por comparação múltipla para dados com distribuição normal e desvios padrões significativamente semelhantes com valores de P < 0,05; P < 0,01 e P < 0,001. As análises estatísticas e apresentação gráfica dos resultados foram realizadas utilizando o programa *GraphPad Prism* (versão 6.0). As curvas de calibração e coeficientes de correlação (r) foram construídos e calculados por regressão linear usando o MS Excel para Windows.

3. Resultados e discussão

3.1 Teor de fenóis e flavonoides totais e a sazonalidade

Os extratos da entrecasca do caule e do cerne de *S. floribunda* demonstraram ser uma considerável fonte de compostos fenólicos e flavonoides, mesmo apresentando variações durante os meses de coleta.

O conteúdo fenólico para entrecasca do caule variou de $68,96 \pm 0,16 \mu\text{gEq.AG/g}$ a $33,93 \pm 0,05 \mu\text{gEq.AG/g}$, sobressaindo-se significativamente ($P < 0,05$) aos valores obtidos pelos extratos do cerne que variaram de $17,62 \pm 1,20 \mu\text{gEq.AG/g}$ a $9,20 \pm 0,14 \mu\text{gEq.AG/g}$ (Tabela 1). Durante os dois anos de coleta, a entrecasca do caule e o cerne concentram mais fenóis no período seco, até mesmo quando foram registradas precipitação, com destaque para a entrecasca do caule na coleta de julho/2015 ($68,96 \pm 0,16 \mu\text{gEq.AG/g}$) e embora os extratos do cerne tenham apresentado valores próximos entre as estações, em julho/2016 com a ausência de chuvas, obteve concentração alta com $17,62 \pm 1,20 \mu\text{gEq.AG/g}$, seguido de outubro/2015 ($11,95 \pm 0,06 \mu\text{gEq.AG/g}$) e janeiro/2016 ($11,36 \pm 0,17 \mu\text{gEq.AG/g}$), o mês que foi registrado o maior índice de chuva, demonstrando não haver entre os extratos do cerne, relação direta entre conteúdo fenólico e a precipitação.

Os teores de flavonoides dos extratos da entrecasca do caule variaram de $18,05 \pm 0,26 \mu\text{gEq.Q/g}$ a $4,08 \pm 0,37 \mu\text{gEq.Q/g}$, com maiores concentrações durante o período chuvoso e início do seco no ano de 2015 ($18,05 \pm 0,26 \mu\text{gEq.Q/g}$ e $9,91 \pm 0,15 \mu\text{gEq.Q/g}$ - abril e julho) e ao final da estação chuvosa e durante a estação seca em 2016 ($10,90 \pm 0,12 \mu\text{gEq.Q/g}$ e $9,81 \pm 0,08 \mu\text{gEq.Q/g}$ - abril e julho, respectivamente) (Tabela 1). O maior teor para a entrecasca em 2015 coincidiu com elevado índice de precipitação (216 mm), mesmo assim, não se pode afirmar que a precipitação influenciou nas concentrações, visto que no ano de 2016, quando foi registrado índice de chuva mais elevado (409 mm) a concentração de flavonoides do extrato foi menor ($5,58 \pm 0,19 \mu\text{gEq.Q/g}$).

Do mesmo modo, os extratos do cerne mantiveram concentrações de flavonoides mais altas durante o período chuvoso em 2015 ($10,46 \pm 0,15 \mu\text{gEq.Q/g}$ - abril) e durante o seco sem registros de precipitação no ano de 2016 ($8,25 \pm 0,25 \mu\text{gEq.Q/g}$ - julho), apresentando durante as coletas conteúdos que variaram de $10,46 \pm 0,15 \mu\text{gEq.Q/g}$ a $3,40 \pm 0,26 \mu\text{gEq.Q/g}$.

Tabela 1. Concentração de compostos fenólicos e flavonoides totais nos extratos etanólicos da entrecasca do caule e cerne de *Secondatia floribunda* A. DC.

Mês/ano	Precipitação	Fenóis ($\mu\text{gEq. AG/g}$)				Flavonoides ($\mu\text{gEq. Q/g}$)			
	(mm)	Entrecasca	%	Cerne	%	Entrecasca	%	Cerne	%
Jan/2015	72	67,34 \pm 0,03 ^a	6,7	11,07 \pm 0,47 ^a	1,1	9,65 \pm 0,09 ^a	1,0	5,43 \pm 0,84 ^a	0,5
Abr/2015	216	43,94 \pm 0,02 ^b	4,4	10,49 \pm 0,20 ^b	1,0	18,05 \pm 0,26 ^b	1,8	10,46 \pm 0,15 ^b	1,0
Jul/2015	31	68,96 \pm 0,16 ^a	6,9	10,04 \pm 0,55 ^b	1,0	9,91 \pm 0,15 ^a	1,0	3,95 \pm 0,21 ^c	0,4
Out/2015	11	51,48 \pm 0,08 ^c	5,1	11,95 \pm 0,06 ^a	1,2	4,08 \pm 0,37 ^c	0,4	3,40 \pm 0,26 ^c	0,3
Jan/2016	409	33,93 \pm 0,05 ^d	3,4	11,36 \pm 0,17 ^a	1,1	5,58 \pm 0,19 ^d	0,6	4,98 \pm 0,18 ^a	0,5
Abr/2016	36	46,18 \pm 0,03 ^e	4,6	10,73 \pm 0,13 ^b	1,1	10,90 \pm 0,12 ^e	1,1	5,22 \pm 0,05 ^a	0,5
Jul/2016	0	52,11 \pm 1,41 ^c	5,2	17,62 \pm 1,20 ^d	1,8	9,81 \pm 0,08 ^a	1,0	8,25 \pm 0,25 ^d	0,8
Out/2016	0	53,22 \pm 1,42 ^c	5,3	9,20 \pm 0,14 ^c	0,9	9,63 \pm 0,08 ^a	1,0	6,91 \pm 1,13 ^e	0,7

Os resultados são expressos em média \pm D.P. (n=3) e equivalem a μg de ácido gálico (AG)/g de extrato para fenóis e μg de quercetina (Q)/g de extrato para flavonoides. Médias seguidas por diferentes letras (a, b, c, d, e) diferem-se estatisticamente (ANOVA, teste de *Tukey* a $P < 0,001$).

Entre as partes vegetais a entrecasca demonstrou maiores concentrações de flavonoides se sobressaindo estatisticamente dos extratos do cerne em todas as coletas ($P < 0,05$) com exceção dos meses de outubro/2015 e janeiro de 2016 ($P = 0,29$ e $P = 0,45$ respectivamente) entre o final da estação seca e início da chuvosa, onde os valores apresentaram-se semelhantes.

A variação dos teores de compostos fenólicos e flavonoides além de estarem relacionadas com a influência sazonal (pluviosidade), também podem ser explicados, em parte, devido a fatores fisiológicos, no caso a fase fenológica e por mecanismos de defesa, como quando ocorre um período de seca intensa, podendo haver uma translocação de metabólitos entre os tecidos para reforçar a proteção de partes mais expostas (Konchar et al., 2011; Gobbo-Neto e Lopes, 2007). Além disso, o conteúdo destes compostos também pode ser influenciado pelo parâmetro em que é analisado, mesmo considerando os sistemas de extração homogêneos para todos os extratos, não devendo ser considerados como uma medida absoluta (Cujic et al., 2016; Dent et al., 2013; Yu et al., 2015).

Considerando os mesmos meses em que a espécie foi coletada de um ano para o outro, foram observadas diferenças significativas para os conteúdos de fenóis na entrecasca do caule, demonstrando que houve influências sobre os teores, além da sazonalidade, provavelmente ocasionadas pelas variações na precipitação e temperatura. Para o cerne diferenças significativas não foram verificadas nos meses de janeiro e abril ($P = 0,99$), correspondendo ao período chuvoso (Figura 1).

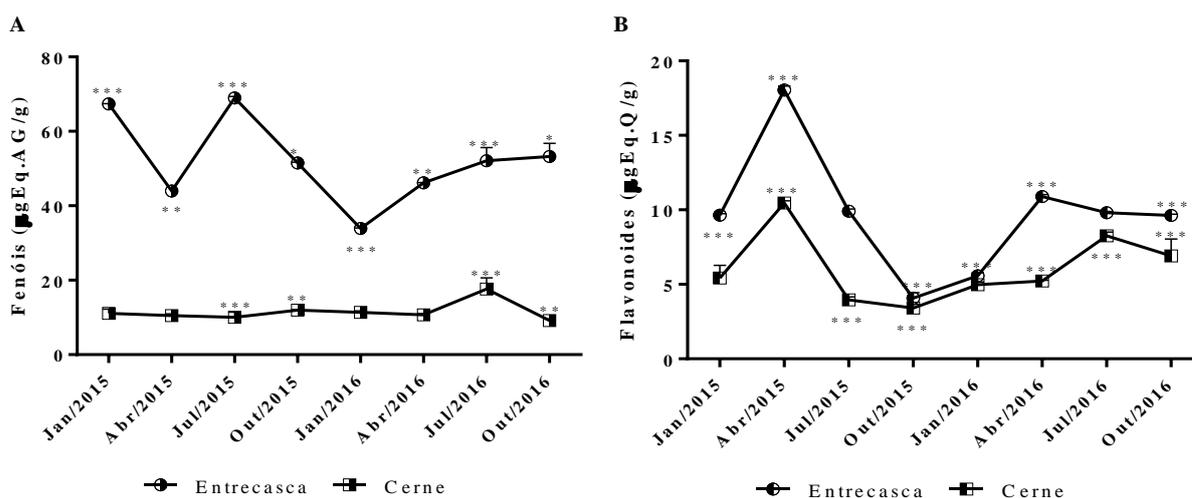


Figura 1. Variação da concentração de compostos fenólicos (A) e flavonoides totais (B) nos extratos etanólicos da entrecasca do caule e cerne de *Secodontia floribunda* A. DC. coletados em diferentes períodos durante 2015/2016. Os resultados são expressos em média \pm D.P. (n=3). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

Nas concentrações de flavonoides não houve diferenças para a entrecasca nos meses de julho ($P = 0,99$) (período seco) e nos meses de janeiro ($P = 0,85$) (período chuvoso) para os dois anos de coleta. Esta situação demonstra que a composição dos tecidos vegetais além de apresentarem relação com a sazonalidade, outros fatores em conjunto podem exercer influência, como uma parte vegetal como a entrecasca do caule está em uma região mais superficial que o cerne. Nos níveis de flavonoides, ambos os extratos apresentaram seus melhores conteúdos durante a estação chuvosa (abril), fase de frutificação e os mais baixos durante a estação seca na fase de queda foliar (outubro/2015).

3.2 Atividades antioxidantes

3.2.1 Atividade antioxidante *in vitro* pelo método DPPH^{*}

Por ser um radical livre e estável o DPPH^{*} tem sido amplamente utilizado para avaliar *in vitro* os efeitos de eliminação de radicais livres de várias substâncias antioxidantes naturais. O ensaio de capacidade de eliminação de radicais DPPH^{*} permitiu medir e avaliar a atividade antioxidante de amostras da entrecasca do caule e cerne de *S. floribunda*, coletada em diferentes períodos por dois anos. Os resultados mostraram potencial capacidade antioxidante ($AA > 50\%$) onde os extratos da entrecasca do caule promoveram uma maior inibição do radical livre DPPH^{*} de forma concentração-dependente (14 - 1400 $\mu\text{g/mL}$) do que quando comparadas com a inibição promovida pelos extratos do cerne (Figura 2).

Os extratos da entrecasca do caule apresentaram atividade antioxidante significativa observada a partir da concentração de 350 $\mu\text{g/mL}$. Na concentração de 1400 $\mu\text{g/mL}$ o percentual variou de 92,78 a 90,14%, indicando forte atividade similar ao do BHT e do ácido ascórbico, sendo verificados altos percentuais na coleta de janeiro/2015 (92,78%), seguido de outubro/2016 (92,54%) e abril/2015 (92,08%). Já entre os extratos do cerne, foram obtidos menores percentuais para a atividade de eliminação de radicais DPPH^{*}, variando de 92,28% a 46,45%, com melhores efeitos relacionados à coleta de abril/2016, seguido de julho/2016 e outubro/2016 (92,28%, 91,46% e 74,76%, respectivamente).

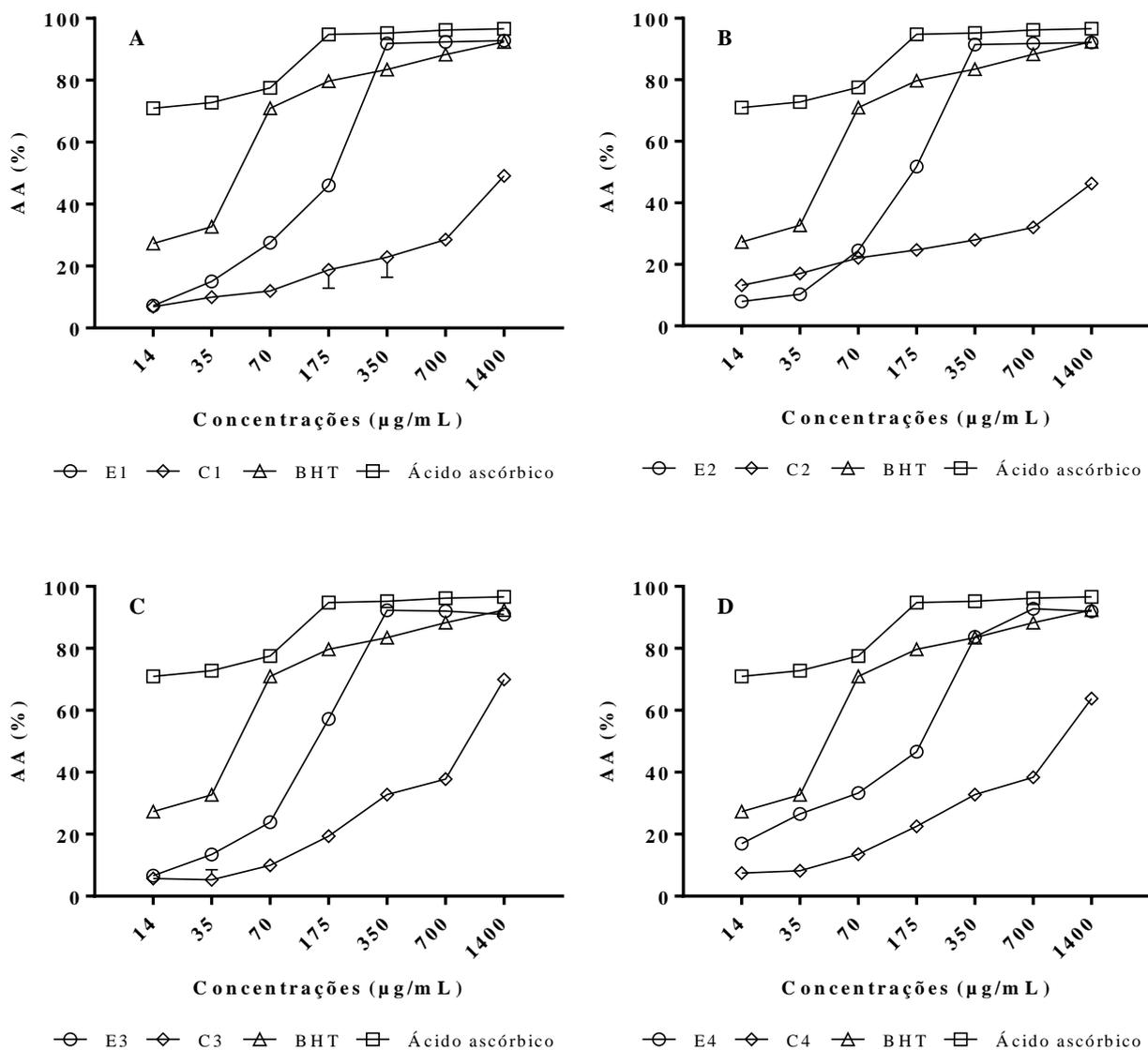


Figura 2. Efeitos de diferentes concentrações dos extratos etanólicos da entrecasca do caule e cerne de *Secondatia floribunda* A. DC. na inibição do radical livre DPPH[•]. Os valores em porcentagem de atividade antioxidante são expressos com médias ± D.P. (n=3). A: janeiro/2015 coleta da entrecasca do caule (E1) e cerne (C1); B: abril/2015 coleta da entrecasca do caule (E2) e cerne (C2); C: julho/2015 coleta da entrecasca do caule (E3) e cerne (C3); D: outubro/2015 coleta da entrecasca do caule (E4) e cerne (C4); E: janeiro/2016 coleta da entrecasca do caule (E5) e cerne (C5); F: abril/2016 coleta da entrecasca do caule (E6) e cerne (C6); G: julho/2016 coleta da entrecasca do caule (E7) e cerne (C7); H: outubro/2016 coleta da entrecasca do caule (E8) e cerne (C8). Continua...

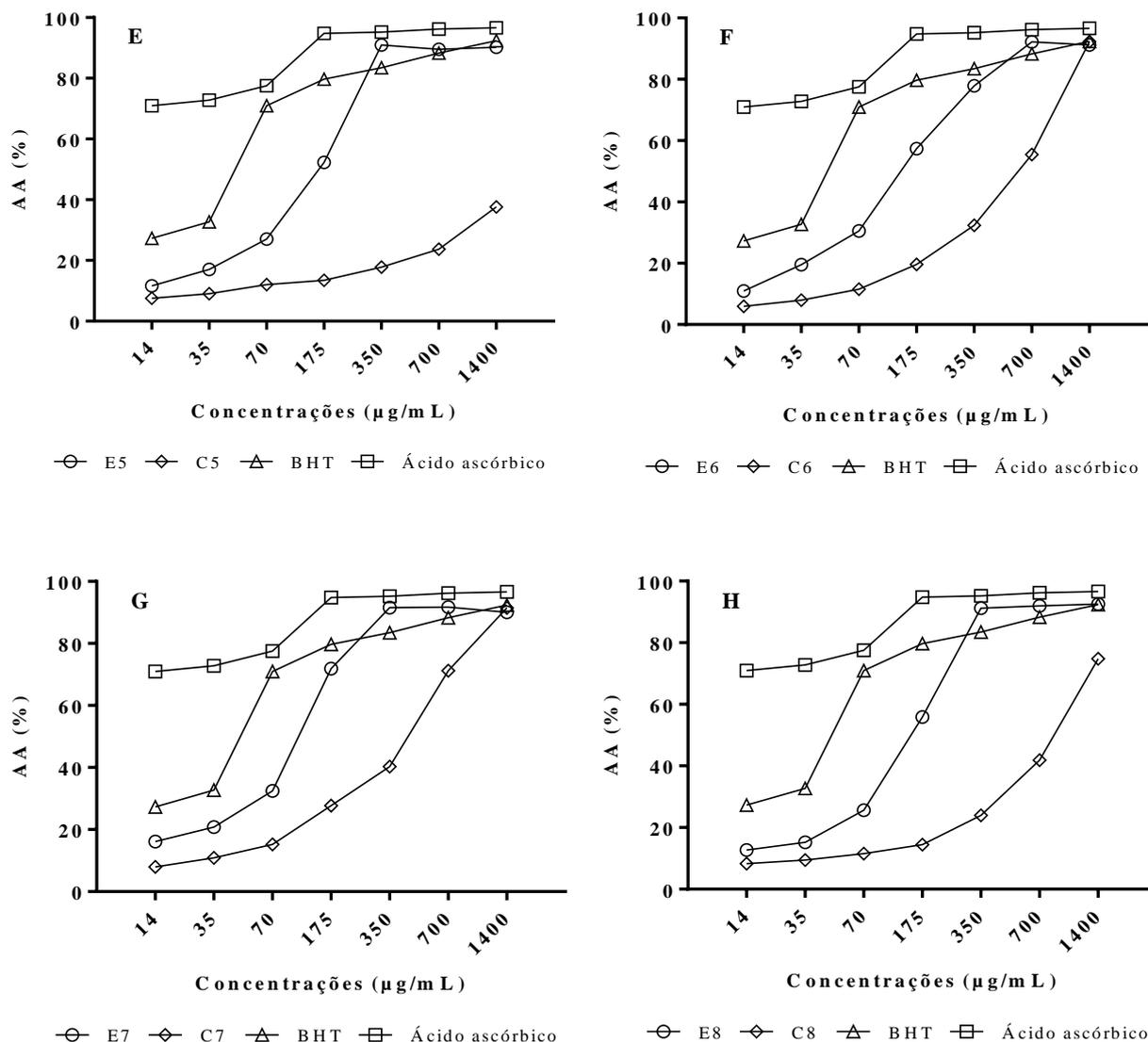


Figura 2. Efeitos de diferentes concentrações dos extratos etanólicos da entrecasca do caule e cerne de *Secodontia floribunda* A. DC. na inibição do radical livre DPPH[•]. Os valores em porcentagem de atividade antioxidante são expressos com médias ± D.P. (n=3). A: janeiro/2015 coleta da entrecasca do caule (E1) e cerne (C1); B: abril/2015 coleta da entrecasca do caule (E2) e cerne (C2); C: julho/2015 coleta da entrecasca do caule (E3) e cerne (C3); D: outubro/2015 coleta da entrecasca do caule (E4) e cerne (C4); E: janeiro/2016 coleta da entrecasca do caule (E5) e cerne (C5); F: abril/2016 coleta da entrecasca do caule (E6) e cerne (C6); G: julho/2016 coleta da entrecasca do caule (E7) e cerne (C7); H: outubro/2016 coleta da entrecasca do caule (E8) e cerne (C8).

O valor da CI_{50} , quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH^{*} em 50%, foram maiores que os controles em todas as coletas tanto para os extratos da entrecasca do caule quanto os do cerne. Embora os valores tenham sido significativamente mais elevados que o BHT (padrão sintético) e Acido Ascórbico (padrão natural), foram menores para os extratos da entrecasca do caule, demonstrando poder de inibição maior que os extratos do cerne ($P < 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2. Valores da concentração inibitória a 50% (CI_{50} $\mu\text{g/mL}$) obtidos para o sequestro do radical livre DPPH^{*} para os extratos etanólicos da entrecasca do caule e cerne de *Secondatia floribunda* A. DC. coletada em diferentes períodos.

Meses	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
	Entrecasca	Cerne
Jan/2015	337.18 \pm 0.79 ^a	1413.81 \pm 1.84 ^a
Abr/2015	344.27 \pm 1.68 ^a	1538.76 \pm 4.14 ^b
Jul/2015	324.07 \pm 5.23 ^{a,b}	927.68 \pm 4.01 ^{d,e}
Out/2015	278.99 \pm 5.47 ^c	992.54 \pm 0.58 ^d
Jan/2016	318.34 \pm 0.95 ^b	1981.84 \pm 5.27 ^c
Abr/2016	314.11 \pm 1.68 ^b	678.30 \pm 0.97 ^f
Jul/2016	206.22 \pm 3.99 ^d	588.93 \pm 1.61 ^g
Out/2016	301.52 \pm 5.20 ^{b,c}	882.12 \pm 1.30 ^e
BHT	2.15 \pm 0.05	
Ácido ascórbico	17.46 \pm 2.10	

Os resultados são expressos em média \pm D.P. (n=3). Médias seguidas por diferentes letras (a, b, c, d, e, f, g) diferem-se estatisticamente (ANOVA, teste de *Tukey* a $P < 0,05$).

Para a entrecasca do caule os resultados de CI_{50} variaram de 206,22 \pm 3,99 a 344,27 \pm 1,68 $\mu\text{g/mL}$. Neste sentido, o efeito dos extratos etanólicos da entrecasca do caule na inibição do radical DPPH^{*} permitiu distribuí-los na seguinte ordem: jul/2016 (E7) > out/2015 (E4) > out/2016 (E8) > abr/2016 (E6) > jan/2016 (E5) > jul/2015 (E3) > jan/2015 (E1) > abr/2015 (E2) ($P < 0.05$).

Para os extratos do cerne os valores de CI_{50} variaram de 588,93 \pm 1,61 a 1981,84 \pm 5,27 $\mu\text{g/mL}$, demonstrando resultados significativamente mais altos refletindo menor efeito de inibição do radical DPPH^{*} permitindo a seguinte ordem: jul/2016 (C7) > abr/2016 (C6)

> out/2016 (C8) > jul/2015 (C3) > out/2015 (C4) > jan/2015 (C1) > abr/2015 (C2) > jan/2016 (C5) (P < 0.05).

Entre os meses de coleta os resultados indicaram que a os extratos de julho/2016 apresentaram a melhor concentração eficiente capaz de reduzir 50% do DPPH^{*} com 206,22 ± 3,99 µg/mL para a entrecasca do caule e 588,93 ± 1,61 µg/mL para o cerne. As diferenças nos valores de CI₅₀ entre as partes vegetais avaliadas eram esperadas devido às variações percebidas nos níveis de fenóis e flavonoides, compostos reconhecidos por apresentarem atividade antioxidante importante. Vale ressaltar que os melhores resultados de CI₅₀ para ambos os extratos, durante os dois anos, estão associados ao período seco coincidindo com os mais altos níveis de fenóis. Ainda assim, em 2015, quando foram registradas chuvas durante na estação seca os níveis de flavonoides foram os mais baixos, já em 2016 o mesmo período não apresentou precipitação e os níveis de flavonoides foram maiores juntamente com fenóis o que refletiu melhores resultados de CI₅₀ dos extratos.

Os resultados observados estão de acordo com outros trabalhos que mostraram que a atividade antioxidante pelo método de sequestro do DPPH^{*} é proporcional ao conteúdo total de compostos fenólicos presentes (Najjaa et al., 2011; Sousa et al., 2015). Em trabalho recente, Ribeiro et al. (2017), identificaram e quantificaram os compostos fenólicos presentes na entrecasca do caule e cerne de *S. floribunda*, revelando a presença de níveis consideráveis do flavonoide cinchonaina, seguido de quercetina e os ácidos gálico e cafeico. Estes compostos apresentam atividade antioxidante significativa em diversos estudos.

O flavonoide cinchonaina isolado a partir da casca de *Trichillia catigua* A. Juss. exibiu potente atividade antioxidante no teste de eliminação de radicais DPPH^{*}, com valores de CI₅₀ de 9,4 µM para cinchonaina Ia, 5,1 µM para cinchonain Ib, 2,5 µM para cinchonain Ic e 2,3 µM para cinchonaina Id (Tang et al., 2007). Da mesma forma, Resende et al. (2011) testando nove substâncias isoladas das cascas de *Trichilia catigua*, dentre elas quatro derivados de cinchonaina (cinchonaina Ia, cinchonaina Ib, cinchonaina IIb e cinchonaina IIa) atribuíram a estes compostos elevada atividade antioxidante com CI₅₀ variando de 5,05 a 7,87 µM, atividade maior que o ácido ascórbico.

No trabalho de Hong et al. (2008) entre os 11 compostos isolados das folhas de *Eriobotrya fragrans* Champ, Cinchonaina Ib e cinchonaina Ia exibiram a atividade antioxidante mais forte, com CI₅₀ de 0,595 e 0,639 mmol, respectivamente, sendo considerado pelos autores um potente antioxidante natural para ser usado nas indústrias alimentares ou farmacêuticas.

Estes dados demonstram a importância dos compostos fenólicos na atividade antioxidante relatada para *S. floribunda*, mesmo se tratando de extratos, o que gera uma interação entre os compostos podendo causar sinergismo ou antagonismo que influenciam na capacidade de reduzir Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) (Hidalgo et al., 2010), possivelmente o composto Cinchonina tenha apresentando influência na eliminação do radical DPPH[•] e as variações nos resultados demonstram que estão diretamente relacionados com os níveis destes compostos durante as coletas.

3.2.2 Atividade antioxidante *in vitro* pelo método ABTS^{•+}

O ensaio de atividade de eliminação de radicais ABTS^{•+} mede a capacidade antioxidante total. O radical ABTS^{•+} é gerado pela reação de ABTS e persulfato de potássio, e quando um antioxidante é adicionado o ABTS^{•+} é convertido em uma forma não radical. Verificou-se que todos os extratos da entrecasca do caule e cerne exibiram atividades de remoção de ABTS^{•+} com efeito dependente da concentração (14 a 1400 µg/mL). Os valores estão representados na Tabela 3, com resultados expressos como a capacidade antioxidante equivalente a Trolox. Diferença significativa ($P < 0,05$) entre as partes vegetais foram observadas, sendo que em todas as coletas a entrecasca do caule apresentou melhor desempenho quando comparado com o cerne (Figura 3).

A maior atividade de eliminação de radicais ABTS^{•+} para a entrecasca do caule e cerne foi encontrada em julho/2016 (1968.26 ± 7.04 e 900.54 ± 0.41 µM trolox/g, respectivamente), resposta condizente com o resultado do ensaio de DPPH[•], sendo que os extratos apresentaram maior afinidade e desempenho na remoção de radicais da classe ABTS^{•+}. Os melhores resultados para os testes ABTS^{•+}, estão associados ao período seco, em ambos os anos e por sua vez aos altos níveis de fenóis e flavonoides, desta forma, dependendo do envolvimento destes compostos no extrato os valores altos pode ser devido a diferenças nos potenciais redox, na reação estequiométrica e/ou efeito estérico (impedimento) dos radicais (Nickavar et al., 2010).

Nos extratos da entrecasca do caule, com resultados significativamente mais fortes ($P < 0,05$), os valores variaram de $1968,26 \pm 7,04$ µM trolox/g a $1370,49 \pm 2,75$ µM trolox/g, sendo distribuídos, na seguinte ordem: Jul/2016 (E7) > Out/2016 (E8) > Jul/2015 (E3) > Jan/2015 (E1) > Jan/2016 (E5) > Abr/2015 (E2) > Abr/2016 (E6) > Out/2015 (E4) ($P < 0.05$). Com resultados mais baixos, variando de $900,54 \pm 0,41$ µM trolox/g a $276,23 \pm 1,29$ µM trolox/g, os extratos do cerne também apresentaram diferenças significativas entre as

coletas ($P < 0,05$), com exceção dos meses de abril/2015 e janeiro/2016 ($P = 0,25$). Desta forma para o cerne a capacidade de eliminação radical $ABTS^{\bullet+}$ foi encontrada na ordem: Jul/2016 (C7) > Abr/2016 (C6) > Out/2015 (C4) > Jul/2015 (C3) > Out/2016 (C8) > Abr/2015 (C2) > Jan/2016 (C5) > Jan/2015 (C1) ($P < 0,05$).

Tabela 3. Valores da atividade antioxidante equivalente a Trolox obtidos para a captura do radical $ABTS^{\bullet+}$ dos extratos etanólicos da entrecasca do caule e cerne de *Secondatia floribunda* A. DC. coletada em diferentes períodos.

Meses	AA ($\mu\text{M trolox/g}$)	
	Entrecasca	Cerne
Jan/2015	1642,48 \pm 1,03 ^a	276,23 \pm 1,29 ^a
Abr/2015	1508,29 \pm 1,14 ^b	291,63 \pm 0,26 ^b
Jul/2015	1828,82 \pm 2,32 ^c	618,87 \pm 1,06 ^c
Out/2015	1370,49 \pm 2,75 ^{d,e}	685,32 \pm 2,26 ^d
Jan/2016	1575,22 \pm 5,35 ^b	287,47 \pm 1,84 ^b
Abr/2016	1460,38 \pm 1,41 ^e	883,49 \pm 4,50 ^e
Jul/2016	1968,26 \pm 7,04 ^f	900,54 \pm 0,41 ^e
Out/2016	1890,37 \pm 5,16 ^c	596,48 \pm 1,07 ^f

Os resultados são expressos em média \pm D.P. (n=3). Médias seguidas por diferentes letras (a, b, c, d, e, f) diferem-se estatisticamente (ANOVA, teste de *Tukey* a $P < 0,05$).

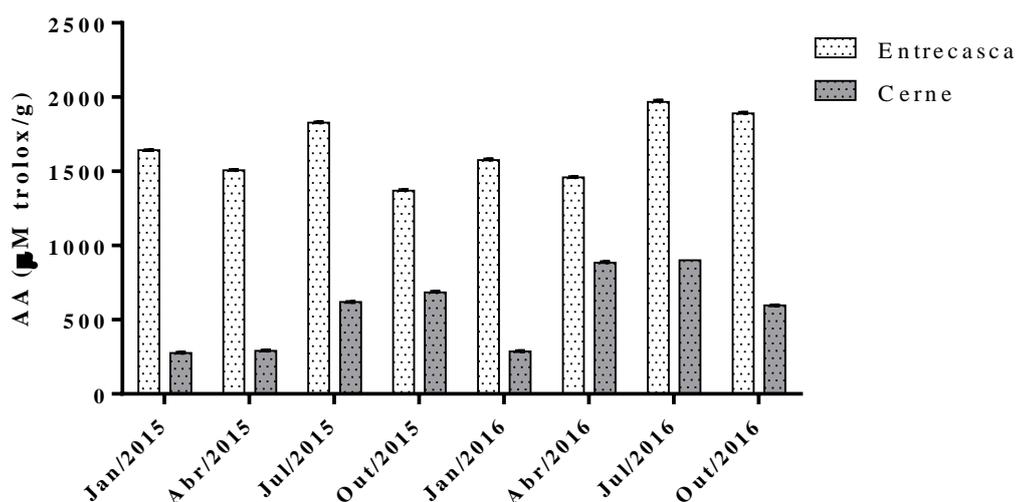


Figura 3. Valores da capacidade antioxidante equivalente a Trolox ($\mu\text{M trolox/g}$) para os extratos etanólicos da entrecasca do caule e cerne de *Secondatia floribunda* A. DC. Os resultados da atividade antioxidante são expressos com médias \pm D.P. (n=3).

A vantagem do radical ABTS^{•+} é sua alta reatividade e, portanto, provavelmente a capacidade de reagir com um maior número de antioxidantes, principalmente os hidrofílicos, no caso dos compostos fenólicos. Por outro lado, a preparação do reagente ABTS é mais difícil e sua estabilidade é menor em comparação com DPPH[•], o que pode levar a resultados imparciais (Stratil et al., 2007).

Alguns antioxidantes são capazes de retardar a formação do radical ABTS^{•+}, e outros de removê-lo dando origem a outros radicais (Böhm et al., 2004), como no caso de alguns ácidos fenólicos, que possuem importante fator em relação estrutura atividade em sistemas biológicos, com capacidade de interagir em ambientes lipofílicos (por exemplo, membrana) e hidrofílicos (por exemplo, citoplasma) (Fiúza et al., 2004).

S. floribunda, apresenta em sua composição fenólica a presença dos ácidos clorogênico, cafeico e gálico em concentrações significativas (ver capítulo 2). Estes ácidos possuem estudos que relatam potentes efeitos redutores do radical ABTS^{•+}. Yeh e Yen (2006) cita que entre todos os ácidos hidrobenczoicos, o ácido gálico é o que apresenta maior efetividade na inativação do radical ABTS^{•+}. Gülçin et al. (2005) atribuíram ao ácido cafeico, alta capacidade de eliminação de radicais ABTS^{•+}. Este ácido mesmo sendo um metabolito do ácido clorogênico, principal representante de ácidos hidroxicinâmicos que possui potencial capacidade de eliminar espécies reativas de oxigênio (ERO), apresenta atividade antioxidante mais forte (Sato et al., 2011; Wu et al., 2012).

3.2.3 Atividade antioxidante *in vitro* pelo método de redução do ferro (FRAP)

No ensaio FRAP (*Ferric-Reducing Antioxidant Power*), a atividade antioxidante é avaliada com base na capacidade de uma determinada substância reduzir ferro férrico (Fe³⁺) a ferro ferroso (Fe²⁺) no solvente TPTZ. A curva de calibração foi feita com sulfato ferroso, e os resultados foram expressos em µM de sulfato ferroso/mg (µM Fe₂SO₄/g) de amostra.

Os extratos da entrecasca do caule reduziram significativamente maiores quantidades de Fe³⁺ a Fe²⁺ que os extratos do cerne (P < 0,05), expressando melhor desempenho com altos valores de atividade antioxidante (Tabela 4 e Figura 4). Possivelmente, a entrecasca além de apresentar maiores níveis de compostos fenólicos e flavonoides, contém outros compostos que podem está efetuando ação sinérgica e potencializando a atividade.

Os valores de FRAP para os extratos da entrecasca do caule durante os dois anos foram significativamente diferentes e variaram de 12381,20 ± 2,68 µM Fe₂SO₄/g a 5108,8

$\pm 0,96 \mu\text{M Fe}_2\text{SO}_4/\text{g}$ sendo distribuídos a partir da mais altos para os mais baixos como segue: Jan/2015 (E1) > Out/2016 (E8) > Jul/2015 (E3) > Abr/2015 (E2) > Jul/2016 (E7) > Abr/2016 (E6) > Out/2015 (E4) > Jan/2016 (E5) ($P < 0,05$).

Tabela 4. Valores da atividade antioxidante pelo método redução do ferro (FRAP) dos extratos etanólicos da entrecasca do caule e cerne de *Secondatia floribunda* A. DC. coletados em diferentes períodos.

Meses	AA ($\mu\text{M Fe}_2\text{SO}_4/\text{g}$)	
	Entrecasca	Cerne
Jan/2015	12381,20 \pm 2,68 ^a	1093,09 \pm 0,53 ^a
Abr/2015	8048,29 \pm 2,02 ^b	594,41 \pm 2,25 ^b
Jul/2015	8624,44 \pm 5,21 ^c	2388,22 \pm 1,92 ^c
Out/2015	5533,49 \pm 6,48 ^d	1625,9 \pm 0,38 ^d
Jan/2016	5108,8 \pm 0,96 ^d	857,63 \pm 0,19 ^f
Abr/2016	6615,56 \pm 3,82 ^e	2432,92 \pm 0,75 ^c
Jul/2016	7237,93 \pm 4,48 ^f	1688,71 \pm 1,09 ^{d,e}
Out/2016	10774,41 \pm 3,63 ^a	1747,72 \pm 0,48 ^e

Os resultados são expressos em média \pm D.P. (n=3). Médias seguidas por diferentes letras (a, b, c, d, e, f) diferem-se estatisticamente (ANOVA, teste de Tukey a $P < 0,05$).

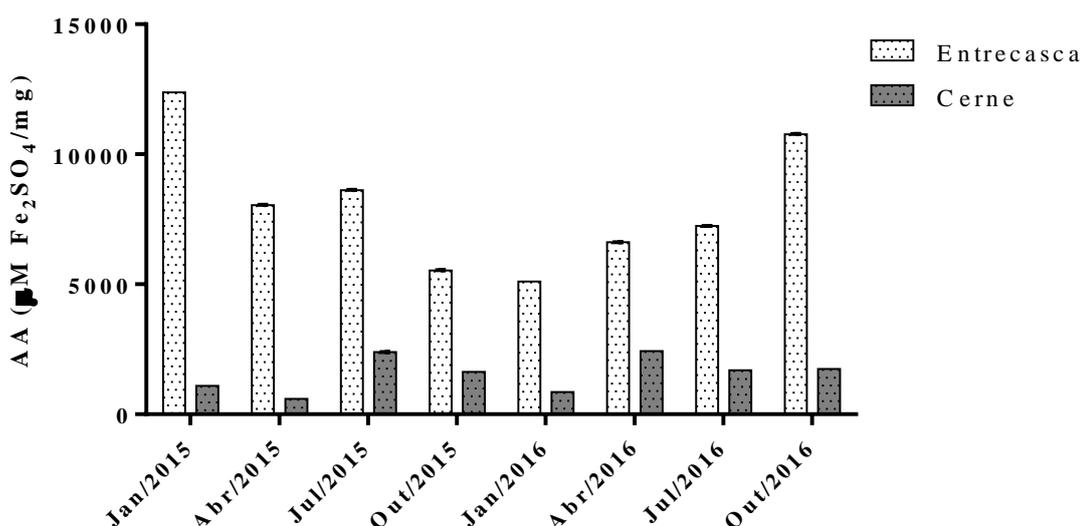


Figura 4. Valores da atividade antioxidante pelo método redução do ferro (FRAP) dos extratos etanólicos da entrecasca do caule e cerne de *Secondatia floribunda* A. DC. Os resultados da atividade antioxidante são expressos com médias \pm D.P. (n=3).

Para os extratos do cerne, o maior valor de FRAP foi de $2432,92 \pm 0,75 \mu\text{M Fe}_2\text{SO}_4/\text{g}$ (abril/2016 – período chuvoso) e o menor de $594,41 \pm 2,25 \mu\text{M Fe}_2\text{SO}_4/\text{g}$ (abril/2015 – período chuvoso) apresentando diferenças significativas entre os meses de coleta. A atividade foi distribuída na ordem: Abr/2016 (C6) > Jul/2015 (C3) > Out/2016 (C8) > Jul/2016 (C7) > Out/2015 (C4) > Jan/2015 (C1) > Jan/2016 (C5) > Abr/2015 (C2) ($P < 0,05$). Os resultados mais representativos para a entrecasca estiveram associados à estação chuvosa em 2015 e durante a seca em 2016, coincidindo com níveis altos de fenóis. Não apresentando relação bem definida com a sazonalidade. Assim como o cerne que apresentou resultado mais elevado e o mais baixo na mesma estação.

A presença de um agentes redutores em extratos orgânicos, causa a redução do complexo $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ à forma ferrosa (Fe^{2+}). Este potencial é atribuída à doação de elétrons (hidrogênio), mecanismo de ação que está relacionado com a atividade antioxidante de compostos fenólicos (Mohamed et al., 2013). Alguns compostos identificados em *S. floribunda*, como a quercetina, o ácido gálico, cinchonina, são citados pela capacidade de reduzir Fe^{3+} em análise com o método FRAP (Bangou et al., 2012; Hong et al., 2008; Pulido et al., 2000; Resende et al., 2011; Soobrattee et al., 2005), estes compostos mesmo não sendo predominante em todas as coletas podem estar contribuindo na atividade dos extratos avaliados.

3.2.4 Atividade antioxidante *in vitro* pela capacidade quelante de íons Fe^{2+}

O agente quelante captura, transporta e/ou elimina substâncias (principalmente metais) do organismo, e embora alguns metais como o ferro seja um elemento essencial para os organismos vivos, o excesso deste pode levar a níveis mais altos de espécies reativas de oxigênio (Sousa et al., 2015). A capacidade quelante de ferro dos extratos etanólicos foi avaliada pela inibição da formação do complexo $[\text{Fe}(\text{fenantrolina})_3]^{2+}$ e determinada em porcentagem de atividade quelante (AQ%) de íons ferro em função das diferentes concentrações dos extratos.

Na presença dos extratos etanólicos da entrecasca do caule e cerne a formação do complexo foi interrompida, sugerindo que os extratos possuem alta habilidade de quelar Fe^{2+} , apresentando resposta dependente da concentração (14 - 1400 $\mu\text{g/mL}$) e diferenças significativas entre as concentrações testadas para o mesmo extrato ($P < 0,05$) (Figura 5.). Estes resultados demonstram que os extratos possivelmente estejam mantendo o ferro na forma oxidada, o que pode prevenir a produção de radicais livres e consequentemente

danos oxidativos, podendo ser fundamental em outros mecanismos do sistema de defesa antioxidante, e influenciar também a atividade de enzimas em reações oxidativas (Niki, 2012).

Os extratos etanólicos da entrecasca do caule e cerne promoveram na concentração de 1400 µg/mL uma redução da cor do complexo em 83,89% (abril/2015) e 83,80% (janeiro/2015), respectivamente. Embora entre as partes vegetais os resultados tenham sido semelhantes durante as coletas, de modo geral, os extratos do cerne obtiveram melhores desempenhos, com atividade quelante máxima variando de 83,30% a 78,20%, apresentando a seguinte ordem: Jan/2015 (C1) > Jan/2016 (C5) > Abr/2015 (C2) > Abr/2016 (C6) > Jul/2015 (C3) > Out/2015 (C4) > Out/2016 (C8) > Jul/2016 (C7) (P < 0,05).

Enquanto que os extratos da entrecasca do caule variaram de 83,89% a 74,01%, sugerindo também são capazes de capturar íons ferrosos antes da ferrozina. Desta forma, atividade quelante de ferro dos extratos etanólicos da entrecasca do caule permitiu a seguinte ordem: abr/2015 (E2) > jan/2016 (E5) > abr/2016 (E6) > jan/2015 (E1) > out/2015 (E4) > jul/2015 (E3) > jul/2016 (E7) > out/2016 (E8) (P < 0,05).

A capacidade de quelação do metal pelos extratos da entrecasca do caule e cerne foi significativa, uma vez que reduziu a concentração do metal de transição catalisador na peroxidação lipídica. Gülçin et al. (2005) ressalta que os agentes quelantes são eficazes como antioxidantes secundários porque reduzem o potencial redox, estabilizando assim a forma oxidada do íon metálico.

Entre as várias espécies de íons metálicos, o Fe^{2+} é conhecido como a oxidação lipídica mais importante, pró-oxidante devido à sua alta reatividade (Halliwell e Gutteridge, 2007; Niki, 2012). A ferrozina pode formar quantitativamente complexos com Fe^{2+} e acelerar a oxidação lipídica pela degradação de hidrogênio e peróxidos lipídicos em radicais livres reativos através da reação de Fenton (Cheng e Breen, 2000; Djerrad et al., 2015), na presença de agentes quelantes, esta formação complexa é interrompida (Gülçin et al., 2005).

Ambos os extratos durante os dois anos apresentaram melhor capacidade de quelação durante o período chuvoso juntamente com altos níveis de flavonoides. Alguns compostos fenólicos em virtude da capacidade de quelação podem oferecer benefícios consideráveis como inibidores da reação de Fenton, como o flavonoide quercetina que inibem fortemente a oxidação induzida por Fenton (Heim et al., 2002; Ska-Kordala et al., 2001).

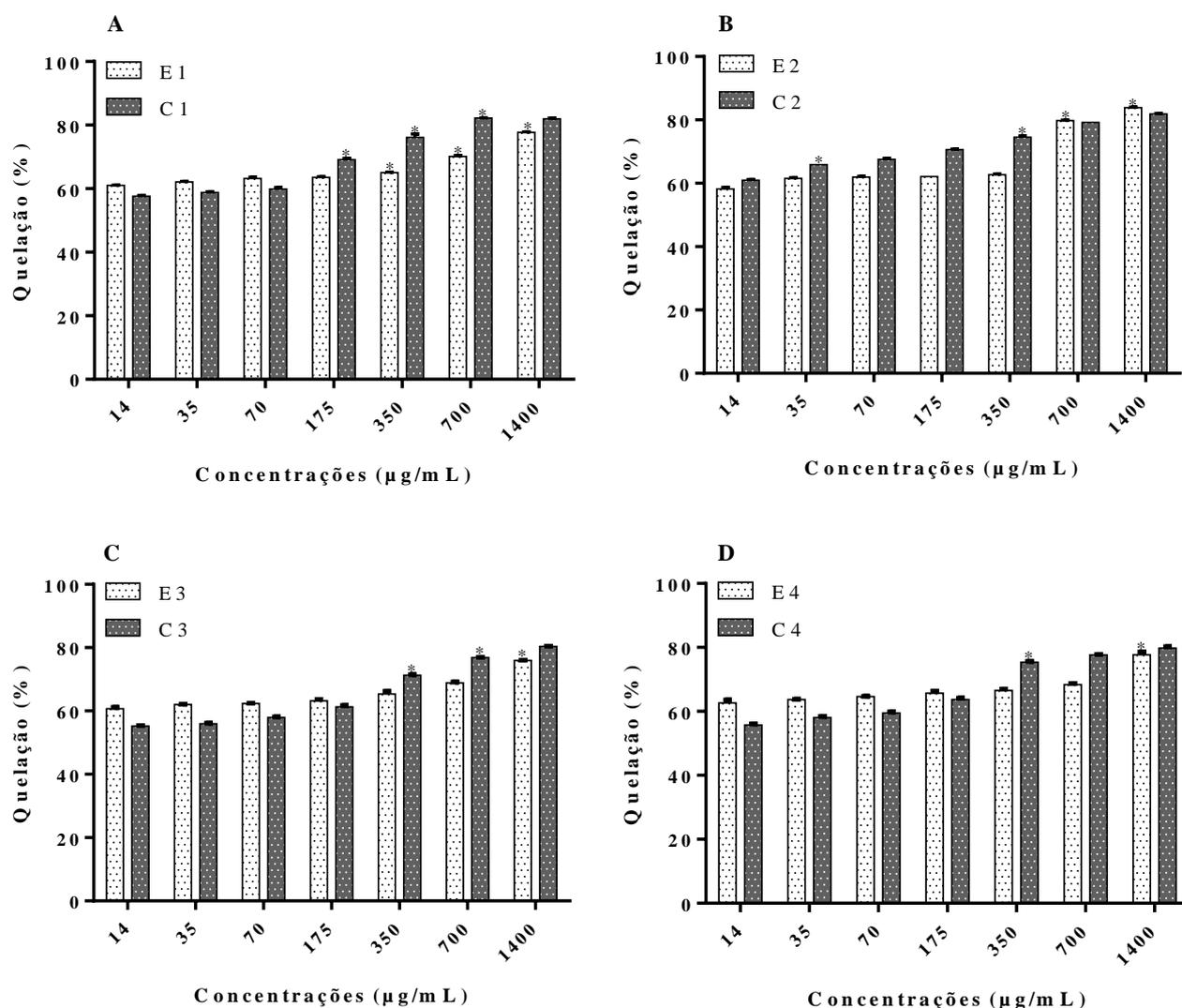


Figura 5. Atividade quelante de ferro (Fe^{2+}) dos extratos etanólicos da entrecasca do caule e cerne de *Secodontia floribunda* A. DC. Os valores em porcentagem de atividade quelante são expressos com médias \pm D.P. (n=3). * Indica diferença estatística significativa em relação à concentração anterior para o mesmo extrato (ANOVA, teste de *Tukey* a $P < 0,05$). A: janeiro/2015 coleta da entrecasca do caule (E1) e cerne (C1); B: abril/2015 coleta da entrecasca do caule (E2) e cerne (C2); C: julho/2015 coleta da entrecasca do caule (E3) e cerne (C3); D: outubro/2015 coleta da entrecasca do caule (E4) e cerne (C4); E: janeiro/2016 coleta da entrecasca do caule (E5) e cerne (C5); F: abril/2016 coleta da entrecasca do caule (E6) e cerne (C6); G: julho/2016 coleta da entrecasca do caule (E7) e cerne (C7); H: outubro/2016 coleta da entrecasca do caule (E8) e cerne (C8). Continua...

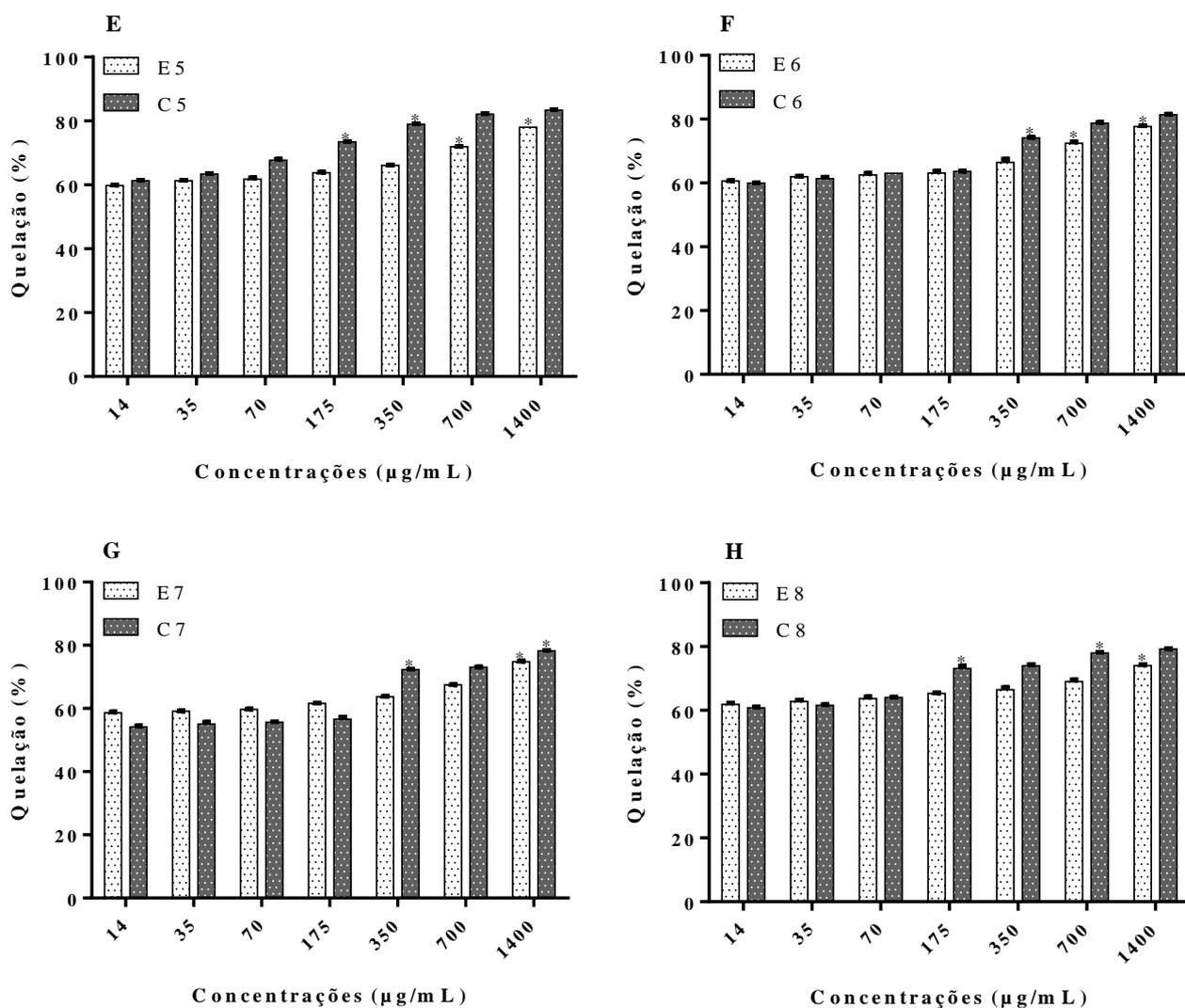


Figura 5. Atividade quelante de ferro (Fe^{2+}) dos extratos etanólicos da entrecasca do caule e cerne de *Secodontia floribunda* A. DC. Os valores em porcentagem de atividade quelante são expressos com médias \pm D.P. (n=3). * Indica diferença estatística significativa em relação à concentração anterior para o mesmo extrato (ANOVA, teste de *Tukey* a $P < 0,05$). A: janeiro/2015 coleta da entrecasca do caule (E1) e cerne (C1); B: abril/2015 coleta da entrecasca do caule (E2) e cerne (C2); C: julho/2015 coleta da entrecasca do caule (E3) e cerne (C3); D: outubro/2015 coleta da entrecasca do caule (E4) e cerne (C4); E: janeiro/2016 coleta da entrecasca do caule (E5) e cerne (C5); F: abril/2016 coleta da entrecasca do caule (E6) e cerne (C6); G: julho/2016 coleta da entrecasca do caule (E7) e cerne (C7); H: outubro/2016 coleta da entrecasca do caule (E8) e cerne (C8).

Quercetina além de possuir capacidade de quelar metais está presente em quantidades significativas na entrecasca e cerne de *S. floribunda* (Ribeiro et al., 2017) o que pode estar promovendo uma atividade de quelação significativa. Outra importante atuação dos compostos identificados na espécie em estudo é a do ácido cafeico que se liga ao ferro impedindo ou minimizando a participação destes nas reações (Genaro-Mattos et al., 2008). Gülçin et al. (2005), avaliando a atividade do ácido cafeico relataram que em uma concentração de 10 µg/mL, reduziu íons ferrosos em até 53,2%. Alguns flavonóides que exibem forte atividade antioxidante sobre radicais livres, podem vir a demonstrar atividade pró-oxidante na presença de metais de transição (Alves et al., 2010) porém como a ação pró-oxidante não foi avaliada neste trabalho não é possível afirmar a influência dessa ação nos resultados apresentados.

3.2.5 A variabilidade entre o conteúdo fenólico e a atividade antioxidante

A sazonalidade, incluindo precipitação e temperatura, é um fator importante para a biossíntese dos compostos fenólicos, induzindo sua produção e acumulação. As plantas podem aumentar a produção fenólica diretamente em resposta à pressão oxidativa a partir de excesso de radiação (Close e McArthur, 2002; Gill e Tuteja, 2010). Várias investigações anteriores demonstram que o estresse oxidativo desempenha um papel importante na síntese de compostos fenólicos em plantas (Nour et al., 2014; Shohael et al., 2006; Yao et al., 2016). Este aumento na composição aparentemente para proteção da planta está relacionado ao potencial antioxidante desta classe de metabolitos secundários em organismos humanos (Araújo et al., 2015).

As partes vegetais de *S. floribunda*, analisadas neste estudo mostraram variações no conteúdo total de fenóis e de flavonoides, refletindo de modo geral na atividade antioxidante. O teor de fenóis nos dois anos para a entrecasca e cerne foram maiores durante o período seco, em comparação ao chuvoso, já flavonoides aparentemente não apresentou relação com a precipitação, sendo maiores no período chuvoso em 2015 e no seco em 2016 (Tabela 6).

A condição de seca e a ausência de precipitações definem em *S. floribunda* melhor atividade de eliminação de espécies reativas de oxigênio e um aumento do conteúdo total de fenóis em ambas as partes vegetais. Tanto os ensaios DPPH quanto ABTS apresentaram melhores resultados em julho/2016.

O poder de redução e quelação de ferro foram maiores durante a estação chuvosa demonstrando que os flavonoides são mais eficazes nos ensaios FRAP e Quelante, visto que os teores destes compostos tanto na entrecasca como no cerne foram maiores com a presença de precipitação.

De modo geral, existe variabilidade clara entre os extratos de *S. floribunda*, considerando todos os valores obtidos para cada amostra nos quatro métodos (DPPH, ABTS, FRAP, Quelante). A entrecasca do caule possui capacidade antioxidante mais forte que o cerne para todas as amostras estudadas, no entanto, na quelação os extratos do cerne mostraram atividade melhor. Esta diferenciação nos resultados está fortemente ligada à produção de compostos fenólicos, que por sua vez é influenciado pela sazonalidade, através dos índices pluviométricos. Esta variabilidade levou a concluir que devemos selecionar os compostos fenólicos e flavonoides a serem investigados cuidadosamente dependendo do período sazonal, a fim de ter uma maior eficácia em termos de atividades biológicas para fins de saúde humana.

Tabela 5. Conteúdo total de fenóis e flavonoides e atividades antioxidantes dos os extratos etanólicos da entrecasca do caule e cerne de *Secondatia floribunda* A. DC. coletada em diferentes períodos por dois anos. * Referente a valores da última concentração do teste quelante.

Meses	Precipitação (mm)	Amostras	Fenóis ($\mu\text{gEq. AG/g}$)	Flavonoides ($\mu\text{gEq. Q/g}$)	DPPH CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	ABTS AA ($\mu\text{M trolox/g}$)	FRAP AA ($\mu\text{M Fe}_2\text{SO}_4/\text{g}$)	Quelante AQ (%) (1400 $\mu\text{g/mL}$)*
Chuvoso								
Jan/2015	72	E1	67,34 \pm 0,03 ^a	9,65 \pm 0,09 ^a	337,18 \pm 0,79 ^a	1642,48 \pm 1,03 ^a	12381,20 \pm 2,68 ^a	77,72 \pm 0,07 ^a
		C1	11,07 \pm 0,47 ^a	5,43 \pm 0,84 ^a	1413,81 \pm 1,84 ^a	276,23 \pm 1,29 ^a	1093,09 \pm 0,53 ^a	83,79 \pm 0,08 ^a
Abr/2015	216	E2	43,94 \pm 0,02 ^b	18,05 \pm 0,26 ^b	344,27 \pm 1,68 ^a	1508,29 \pm 1,14 ^b	8048,29 \pm 2,02 ^b	83,89 \pm 0,07 ^b
		C2	10,49 \pm 0,20 ^b	10,46 \pm 0,15 ^b	1538,76 \pm 4,14 ^b	291,63 \pm 0,26 ^b	594,41 \pm 2,25 ^b	82,22 \pm 0,08 ^{a,b}
Seco								
Jul/2015	31	E3	68,96 \pm 0,16 ^a	9,91 \pm 0,15 ^a	324,07 \pm 5,23 ^{a,b}	1828,82 \pm 2,32 ^c	8624,44 \pm 5,21 ^c	75,99 \pm 0,03 ^c
		C3	10,04 \pm 0,55 ^b	3,95 \pm 0,21 ^c	927,68 \pm 4,01 ^{d,e}	618,87 \pm 1,06 ^c	2388,22 \pm 1,92 ^c	80,39 \pm 0,04 ^c
Out/2015	11	E4	51,48 \pm 0,08 ^c	4,08 \pm 0,37 ^c	278,99 \pm 5,47 ^c	1370,49 \pm 2,75 ^{d,e}	5533,49 \pm 6,48 ^d	77,70 \pm 0,34 ^a
		C4	11,95 \pm 0,06 ^a	3,40 \pm 0,26 ^c	992,54 \pm 0,58 ^d	685,32 \pm 2,26 ^d	1625,9 \pm 0,38 ^d	79,81 \pm 0,14 ^d
Chuvoso								
Jan/2016	409	E5	33,93 \pm 0,05 ^d	5,58 \pm 0,19 ^d	318,34 \pm 0,95 ^b	1575,22 \pm 5,35 ^b	5108,8 \pm 0,96 ^d	78,02 \pm 0,06 ^a
		C5	11,36 \pm 0,17 ^a	4,98 \pm 0,18 ^a	1981,84 \pm 5,27 ^c	287,47 \pm 1,84 ^b	857,63 \pm 0,19 ^f	83,35 \pm 0,08 ^a
Abr/2016	36	E6	46,18 \pm 0,03 ^e	10,90 \pm 0,12 ^e	314,11 \pm 1,68 ^b	1460,38 \pm 1,41 ^e	6615,56 \pm 3,82 ^e	77,74 \pm 0,08 ^a
		C6	10,73 \pm 0,13 ^b	5,22 \pm 0,05 ^a	678,30 \pm 0,97 ^f	883,49 \pm 4,50 ^e	2432,92 \pm 0,75 ^c	81,37 \pm 0,05 ^b
Seco								
Jul/2016	0	E7	52,11 \pm 1,41 ^c	9,81 \pm 0,08 ^a	206,22 \pm 3,99 ^d	1968,26 \pm 7,04 ^f	7237,93 \pm 4,48 ^f	74,78 \pm 0,13 ^b
		C7	17,62 \pm 1,20 ^d	8,25 \pm 0,25 ^d	588,93 \pm 1,61 ^g	900,54 \pm 0,41 ^e	1688,71 \pm 1,09 ^{d,e}	78,20 \pm 0,17 ^{a,d}
Out/2016	0	E8	53,22 \pm 1,42 ^c	9,63 \pm 0,08 ^a	301,52 \pm 5,20 ^{b,c}	1890,37 \pm 5,16 ^c	10774,41 \pm 3,63 ^a	74,01 \pm 0,11 ^{b,c}
		C8	9,20 \pm 0,14 ^c	6,91 \pm 1,13 ^e	882,12 \pm 1,30 ^e	596,48 \pm 1,07 ^f	1747,72 \pm 0,48 ^e	79,21 \pm 0,04 ^d

Os valores são expressos com médias \pm D.P. (n=3). Médias seguidas por diferentes letras diferem-se estatisticamente (ANOVA, teste de Tukey a $P < 0,05$). E: Entrecasca do caule; C: Cerne.

4. Conclusão

Os resultados mostram que a atividade antioxidante e os teores de compostos fenólicos e flavonoides apresentam variabilidade ao longo dos anos, apesar de poucas diferenças significativas entre alguns meses.

Os ensaios antioxidantes demonstraram resultados elevados, perfazendo uma boa atividade frente aos testes, podendo afirmar que os extratos da entrecasca do caule e cerne são bons antioxidantes, especificadamente no teste FRAP e quelante, na capacidade de reduzir e quelar ferro. Porém os extratos não demonstraram boa atividade para reduzir espécies reativas de oxigênio semelhantes à classe do DPPH, devido aos valores elevados de CI_{50} , em contra partida quando testado com o radical ABTS, a resposta foi melhor, conduzindo o que se tem na literatura, onde o agente depende de vários fatores. Desta forma, este trabalho se torna relevante, diante dos fatores necessários para avaliar a capacidade antioxidante dos extratos, podendo afirmar uma resposta específica, dando suporte para trabalhos futuros com a mesma espécie e ampliando a discussão sobre o mecanismo de ação dos extratos sobre a classe de compostos que demonstram potencial efeito sinérgico e melhoram a atividade.

A análise antioxidante por quatro sistemas de teste diferentes, demonstraram que os extratos da entrecasca do caule e cerne de *S. floribunda* coletados durante o período seco apresentam melhor desempenho nos teste DPPH e ABTS e os coletados durante o período chuvoso possui atividades antioxidantes mais altas em FRAP e Quelante, embora os resultados de todos os testes não tenham apresentado grandes diferenças.

Os dados coletados ao longo dos dois anos estabelecem as bases para novos estudos voltados para investigar as mudanças no conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides por um longo período de tempo, considerando outros fatores ambientais, a fim de definir condições experimentais úteis para obter, quantidades mais elevadas destes compostos bioativos com propriedades antioxidantes únicas.

Referências

- Alves, C.Q., David, J.M., David, J.P., Bahia, M.V., Aguiar, R.M. 2010. Métodos para determinação de atividade antioxidante em vitro em substratos orgânicos. *Quím. Nova.* 33, 2202-2210.
- Araújo, T.A.S., Silva Solon, L.G., Silva, G.A., Almeida, M.G., Costa, J.G.M., Amorim, E. L.C., Albuquerque, U.P. 2015. Does rainfall affect the antioxidant capacity and production of phenolic compounds of an important medicinal species? *Ind. Crops Prod.* 76, 550-556.
- Art, I.C., Hollman, P.C., 2005. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 317S–325S.
- Bangou, M.J., Almaraz-Abarca, N., Méda, N.T.R., Zeba, B., Kiendrebéogo, M., Millogo-Rasolodimby, J., Nacoulma, G. 2012. Polyphenolic composition of *Lantana camara* and *Lippia chevalieri*, and their antioxidant and antimicrobial activities. *Inter. J. Phytomed.* 4, 115-124.
- Bhatt, P., Negi, P. S. 2012. Antioxidant and antibacterial activities in the leaf extracts of Indian borage (*Plectranthus amboinicus*). *F. Nutri. Sci.* 3, 146.
- Böhm, V., Schlesier, K. 2004. Methods to evaluate the antioxidant activity. In *Production practices and quality assessment of food crops*. Springer, Dordrecht. pp. 55-71.
- Chen, H.J., Li, X., Chen, J.W., Guo, S., Cai, B.C., 2010. Simultaneous determination of eleven bioactive compounds in *Saururus chinensis* from different harvesting seasons by HPLC-DAD. *J. Pharm. Biomed.* 51, 1142–1146.
- Cheng, I.F., Breen, K. 2000. On the ability of four flavonoids, baicilein, luteolin, naringenin, and quercetin, to suppress the Fenton reaction of the iron-ATP complex. *Biometals.* 13, 77-83.
- Close, D.C., McArthur, C., 2002. Rethinking the role of many plant phenolics protection from photodamage not herbivores? *Oikos.* 99, 166–172.
- Cristians, S., Mata, R., Bye, R. 2014. Influência fenológica e geográfica na concentração de 4-fenilcumarinas e ácido clorogênico selecionados em folhas de *Hintonia latiflora*. *J Ethnopharmacol.* 152, 308-313.
- Cujic, N., Savikin, K., Jankovic', T., Pljevljakusic', D., Zdunic', G., Ibric', S., 2016. Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food Chem.* 194, 135–142.

Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N. 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.* 97, 654–660.

Djerrad, Z., Kadik, L., Djouahri, A. 2015. Chemical variability and antioxidant activities among *Pinus halepensis* Mill. essential oils provenances, depending on geographic variation and environmental conditions. *Ind. Crops Prod.* 74, 440-449.

Fernandes, A.; Fernandes, I.; Cruz, L.; Mateus, N.; Cabral, M.; Freitas, V. 2009. Antioxidant and Biological Properties of Bioactive Phenolic Compounds from *Quercus suber* L. *J Agric Food Chem.* 57, 11154-11160.

Fiuza, S.M., Gomes, C., Teixeira, L.J., Cruz, M.G., Cordeiro, M.N.D.S., Milhazes, N., Marques, M.P.M. 2004. Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties—a structure–activity relationship study. Part 1: Methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. *Bioorganic Med. Chem.* 12, 3581–3589.

Flores, M.I.A., Romero-González, R., Frenich, A.G., Vidal, J.L.M., 2012. Analysis of phenolic compounds in olive oil by solid-phase extraction and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 134, 2465–2472.

Genaro-Mattos, T.C., Mauricio, A.Q., Rettori, D., Vautier-Giongo, C., Alonso, A., Hermes-Lima, M. 2008. In Vitro Antioxidant Activity of the Iron Chelator Caffeic Acid: Mechanistic Considerations. *Free Radic. Biol. Med.* 45, S82.

Gill, S. S., Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem.* 48, 909-930.

Gobbo-Neto, L., Lopes, N.P. 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quím. Nova*, 30, 374-381.

Gülcin, I., Berashvili, D., Gepdiremen, A. 2005. Antiradical and antioxidant activity of total anthocyanins from *Perilla pankinensis* decne. *J. Ethnopharmacol.* 101, 287-293.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4ed, Oxford University Press, Oxford.

Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* 13, 572-584.

Hidalgo, M., Sánchez-Moreno, C., Pascual-Teresa, S. 2010. Flavonoid–flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. *Food Chem.* 121, 691-696.

- Hong, Y., Qiao, Y, Lin, S, Jiang, Y, Chen, M. 2008. Characterization of antioxidant compounds in *Eriobotrya fragrans* Champ leaf. *Sci Hortic.* 118, 288–292.
- Hooper, L., Kroon, P.A., Rimm, E.B., Cohn, J.S., Harvey, I., Le Cornu, K.A., Ryder, J.J., Hall, W.L., Cassidy, A., 2008. Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.* 88, 38–50.
- Hussain, A.I., Anwar, F., Sherazi, S.T.H., Przybylski, R. 2008. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food chem.* 108, 986-995.
- Jaleel, C.A., Riadh, K., Gopi, R., Manivannan, P., Inés, J., Al-Juburi, H.J. 2009. Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. *Acta Physiol Plant.* 31, 427–436.
- Kardum, N., Takic', M., Savikin, K., Zec, M., Zdunic', G., Spasic', S., Konic'-Ristic', A., 2014. Effects of polyphenol-rich chokeberry juice on cellular antioxidant enzymes and membrane lipid status in healthy women. *J. Funct.* 9, 89–97.
- Konchar, K., Li, X.L., Yang, Y.P., Emswiller, E. 2011. Phytochemical variation in *Fritillaria cirrhosa* D. Don (Chuan Bei Mu) in relation to plant reproductive stage and timing of harvest. *Econ. bot.* 65, 283.
- Koolen, H.H., Silva, F.M., Gozzo, F.C., Souza, A.Q., Souza, A.D. 2013. Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) by UPLC–ESI-MS/MS. *Food Res Int.* 51, 467-473.
- Kosalec, I.; Bakmaz, M.; Pepeliniak, S.; Vladimir-Knezevic, S. 2004. Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *A. Pharmaceutica.* 54, 65-72.
- Lemos, M.F., Lemos, M.F., Pacheco, H.P., Guimarães, A.C., Fronza, M., Endringer, D.C., Scherer, R. 2017. Seasonal variation affects the composition and antibacterial and antioxidant activities of *Thymus vulgaris*. *Ind. Crops Prod.* 95, 543-548.
- Macedo, D.G.; Ribeiro, D. A.; Coutinho, H.D.M.; Menezes, I.R.A.; Souza, M.M.A. 2015. Práticas terapêuticas tradicionais: uso e conhecimento de plantas do cerrado no estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil). *Bol. Latino Am. Caribe Pl.* 14, 491 – 508.
- Macheix, J.J., Fleuriet, A., Jay-Allemand, C., 2005. Les Composés Phénoliques Des végétaux: Un Exemple De métabolites Secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires romandes, CH –1015 Lausanne, pp.192.

- Mensor, L.L.; Menezes, F.S.; Reis, A.S.; Santos, T.C.S.; Coube, C.S.; Leitão, S.G. 2001. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research. Pytother. Res.* 15, 127-130,
- Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.* 52, 673-751.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P. R., Van Beek, T. A. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food chem*, 85, 231-237.
- Mohamed, A.A.; Ali, S.I.; El-Baz, F.K. 2013. Antioxidant and antibacterial activities of crude extracts and essential oils of *Syzygium cumini* leaves. *PLoS ONE*, 8, 1-7.
- Mori, S.A.; Bonn, B.M.; Carvalho, A.M.; Santos, T.S. 1989. Southen Bahian Forests. *Bot Rev.* 49, 155-232.
- Najjaa, H., Zerria, K., Fattouch, S., Ammamar, E., Neffati, M., 2011. Antioxidant and antimicrobial activities of *Allium roseum* L. “Lazoul,” a wild edible endemic species in North Africa. *Int J Food Prop.* 14, 371-380.
- Nascimento, N.C., Fett-Neto, A.G. 2010. Plant secondary metabolism and challenges in modifying its operation: An overview. *Methods Mol Biol.* 643, 1–13.
- Ncube, B., Finnie, J.F., Van Staden, J. 2012. Quality from the field: The impact of environmental factors as quality determinants in medicinal plants. *S. Afr. J. Bot.* 82, 11–20.
- Nickavar, B., Alinaghi, A., Kamalinejad, M. 2010. Evaluation of the antioxidant properties of five *Mentha* species. *Iran J. Pharm. Res.* 203-209.
- Niki, E. 2012. Do antioxidants impair signaling by reactive oxygen species and lipid oxidation products? *FEBS letters*, 586, 3767-3770.
- Nonaka, G., Kawahara, O., Nishioka, I., 1982. Tannins and related compounds VIII. A new type of proanthocyanidin, cinchonains IIa and Ib from *Chinchona succirubra* (2). *Chem. Pharm. Bull.* 30, 4277–4282.
- Nour, V., Trandafir, I., Cosmulescu, S., 2014. Antioxidant capacity: phenolic compounds and minerals content of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) leaves as influenced by harvesting data and extraction method. *Ind. Crop. Prod.* 53, 133–139.

Oliveira, L.G.S., Ribeiro, D.A., Saraiva, M.E., Macêdo, D.G., Macedo, J.G.F., Pinheiro, P.G., Costa, J.G.M., Souza, M.M.A., Menezes, I.R.A. 2017. Chemical variability of essential oils of *Copaifera langsdorffii* Desf. in different phenological phases on a savannah in the Northeast, Ceará, Brazil. *Ind. Crop. Prod.* 97, 455-464.

Ouerghemmi, S., Sebei, H., Siracusa, L., Ruberto, G., Saija, A., Cimino, F., Cristani, M. 2016. Comparative study of phenolic composition and antioxidant activity of leaf extracts from three wild *Rosa* species grown in different Tunisia regions: *Rosa canina* L., *Rosa moschata* Herrm. and *Rosa sempervirens* L. *Ind. Crop. Prod.* 94, 167-177.

Pacifico, S., Galasso, S., Piccolella, S., Kretschmer, N., Pan, S. P., Marciano, S., Bauer, R., Monaco, P. 2015. Seasonal variation in phenolic composition and antioxidant and anti-inflammatory activities of *Calamintha nepeta* (L.) Savi. *Food Res Int.* 69, 121-132.

Pulido, R.; Bravo, L.; Saura-Calixto, F. 2000. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chem.* 48, 3396-3402.

Puntel, R.L.; Nogueira, C.W.; Rocha, J.B.T. 2005. Krebs cycle intermediates modulate thiobarbituric acid reactive species (TBARS) production in rat brain in vitro. *Neurochem. Res.* 30, 225-255.

Resende, F.O., Rodrigues-Filho, E., Luftmann, H., Petereit, F., Palazzo de Mello, J.C. 2011. Phenylpropanoid substituted flavan-3-ols from *Trichilia catigua* and their in vitro antioxidative activity. *J. Braz. Chem. Soc.* 22, 2087-2093.

Ribeiro, D.A., Damasceno, S.S., Boligon, A.A., de Menezes, I.R.A., Souza, M.M.A., Costa, J.G.M. 2017. Chemical profile and antimicrobial activity of *Secondatia floribunda* A. DC (Apocynaceae). *Asian Pac J Trop Biomed.* 7, 739-749.

Ribeiro, D.A., Oliveira, L.G.S., Macêdo, D.G., Menezes, I.R.A., Costa, J.G.M., Silva, M.A. P., Lacerd, S.R., Souza, M.M.A. 2014. Promising medicinal plants for bioprospection in a cerrado area of Chapa do Araripe, Northerastern Brazil. *J Ethnopharmacol.* 155, 1522-1533.

Rufino, M. S. M.; Alves, R. E.; Brito, E. S.; Morais, S. M.; Sampaio, C. G.; Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F. D. 2007a. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. EMBRAPA.

Rufino, M. S. M.; Alves, R. E.; Brito, E. S.; Morais, S. M.; Sampaio, C. G.; Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F. D. 2007b. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS⁺. EMBRAPA.

Rufino, M. S. M.; Alves, R. E.; Brito, E. S.; Morais, S. M.; Sampaio, C. G.; Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F. D. 2006. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Fedução do Ferro (FRAP). EMBRAPA.

Saraiva, M.E., Ulisses, A.V.R.A., Ribeiro, D.A., Oliveira, L.G.S., Macêdo, D.G., Sousa, F.F.S., Menezes, I.R.A., Sampaio, E.V.S.B., Souza, M.M.A. 2015. Plant species as a therapeutic resource in áreas of the savann in the state of Pernambuco, Northeast Brazil. J Ethnopharmacol. 171, 141–153.

Sartor, T., Xavier, V.B., Falcão, M.A., Mondin, C.A., Dos Santos, M.A., Cassel, E., Astarita, L.V., Santarém, E.R. 2013. Seasonal changes in phenolic compounds and in the biological activities of *Baccharis dentata* (Vell.) GM Barroso. Ind. Crops Prod. 51, 355-359.

Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., Sugawara, M., Iseki, K. 2011. *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. Int. J. Pharm. 403, 136-138.

Shohael, A.M., Ali, M.B., Yu, K.W., Hahn, E.J., Islam, R., Paek, K.Y., 2006. Effect of light on oxidative stress, secondary metabolites and induction of antioxidant enzymes in *Eleutherococcus senticosus* somatic embryos in bioreactor. Process Biochem. 41, 1179–1185.

Singleton, V.L.; Orthofer, R.; Lammela-Ranverson, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods Enzymol. 299, 152-178.

Ska-Kordala, M. S., Kowska, A. B., Ski, J. O., Gabrielska, J. 2001. Metal ion flavonoid associations in bilayer phospholipid membranes. Cell Mol. Biol. Lett. 6, 277-281.

Soares, S. E. 2002. Ácidos Fenólicos como Antioxidante. Rev. Nutri. 15, 1, 71-81.

Soobrattee, M. A., Neergheen, V. S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O. I., Bahorun, T. 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. Mutat. Res. 579, 200-213.

Sousa, A., Malheiro, R., Casal, S., Bento, A., Pereira, J.A., 2014. Antioxidant activity and phenolic composition of Cv: *Cobrancosa olives* affected through the maturation process. J. Funct. Foods 11, 20–29.

Sousa, E.O., Miranda, C.M.B.A., Nobre, C.A.B., Boligon, A.A., Athayde, M.L., Costa, J.G.M. 2015. Phytochemical analysis and antioxidant activities of *Lantana camara* and *Lantana montevidensis* extracts. Ind. Crops Prod. 70, 7-15.

Souza, R.K.D., Silva, M.A.P., Menezes, I.R.A., Ribeiro, D.A., Bezerra, L.R., Souza, M.M.A. 2014. Ethnopharmacology of medicinal plants of Carrasco, northeastern of Brazil. *J Ethnopharmacol.* 157, 99–104.

Stratil, P.; Klejdus, B.; Kubán, V. 2007. Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. *Talanta.* 71, 1741-1751.

Tang, W., Hioki, H., Harada, K., Kubo, M., Fukuyama, Y., 2007. Antioxidant phenylpropanoid-substituted epicatechins from *Trichilia catigua*. *J. Nat. Prod.* 70, 2010-2013.

Tapiero, H.; Tew, K. D.; Nguyen Ba, G.; Mathé, G. 2002. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomed. Pharmacother.* 56, 200- 2007.

Verma, N., Shukla, S., 2015. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants.* 2, 105–113.

Wu, X., Lin, S., Zhang, X. 2012. Antioxidant and antiapoptotic properties of chlorogenic acid on human umbilical vein endothelial cells. *J. Med. Plants Res.* 6, 708-715.

Yao, X.H., Zhang, Z.B., Song, P., Hao, J.Y., Zhang, D.Y., Zhang, Y. F. 2016. Different harvest seasons modify bioactive compounds and antioxidant activities of *Pyrola incarnata*. *Ind. Crops Prod.* 94, 405-412.

Yeh, C.T.; Yen, G.C. 2006. Effects of phenolic acids on human phenolsulfotransferases in relation to their antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 51, 1474-1479.

Yu, X., Bals, O., Grimi, N., Vorobiev, E., 2015. A new way for the oil plant biomass valorization: polyphenols and proteins extraction from rapeseed stems and leaves assisted by pulsed electric fields. *Ind. Crops Prod.* 74, 309–318.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos demonstram que as investigações etnobiológicas podem servir como base para diferentes trabalhos, fornecendo informações para estudos mais aprofundados com espécies que são relatadas pelas comunidades locais e que são desconhecidas por seu caráter químico biológico, além de favorecer ao entendimento da ecologia química destas espécies, visto à escassez de trabalhos realizados com ênfase neste assunto.

A grande diversidade de compostos fenólicos que são encontrados nas plantas possuem reconhecidas atividades terapêuticas, que na maioria das vezes são investigadas sem compreender como estes compostos fenólicos estão distribuídos, como se comportam entre as partes vegetais em períodos sazonais e em diferentes fases fenológicas. O entendimento da variabilidade destes compostos é considerado importante para orientar pesquisas que visam o isolamento de produtos naturais, e o estabelecimento de épocas mais favoráveis para rendimentos mais elevados, especialmente de substâncias que são de interesse medicinal, visando futuras investigações farmacológicas e diferentes formas de manejo das espécies frequentemente utilizadas na terapêutica.

O conjunto dos resultados obtidos no presente trabalho é de grande relevância, uma vez que contribuiu ao conhecimento do perfil químico de *S. floribunda* apresentando em sua composição níveis consideráveis de compostos fenólicos, com predominância do flavonoide cinchonina tanto na entrecasca do caule quanto no cerne. Estes compostos nos extratos etanólicos apresentaram variabilidade qualitativa e quantitativa durante os anos de estudo, com a existência de relação entre a sazonalidade e seu ciclo fenológico.

O extrato etanólico tanto da entrecasca como do cerne apresentaram atividade antibacteriana significativa e essas ações sinérgicas demonstraram a possibilidade do uso associados dos constituintes presentes nos extratos e antibióticos usuais contra linhagens Gram-positivas e Gram negativas.

Quanto ao potencial antioxidante dos 16 extratos nos quatro métodos utilizados foi verificada além de variações entre as partes vegetais e nas coletas, ocasionadas pela sazonalidade, melhor desempenho na redução e quelação de ferro, principalmente durante o período chuvoso.

Este é o primeiro relato sobre a composição e as variações no conteúdo fenólico de *S. floribunda* em função da sazonalidade e da fenologia que refletiram nas atividades biológicas da espécie. Assim, esses dados podem contribuir não só ao conhecimento sobre

a espécie, mas servir como base para posteriores estudos buscando aliar informações do conhecimento local e o entendimento da distribuição de metabólitos destinados ao uso medicinal, também para o desenvolvimento de padrões de coleta na obtenção de maiores concentrações de compostos bioativos.

Além disso, demonstram a necessidade de mais estudos com objetivo de entender como esses fatores ambientais e fisiológicos estão associados à biossíntese de compostos químicos responsáveis por atividades antimicrobianas e antioxidantes importantes e seus mecanismos de ação, bem como os períodos mais apropriados para a obtenção dos maiores teores destes constituintes que são destinados ao uso terapêutico.

ANEXOS

ANEXO A - Documento de Autorização para atividades com finalidade científica



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 51674-2	Data da Emissão: 09/03/2017 09:26	Data para Revalidação*: 08/04/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Daiany Alves Ribeiro	CPF: 026.608.973-95
Título do Projeto: ESTUDO QUÍMICO DE Secundatia floribunda A.DC, EM DIFERENTES FASES FENOLÓGICAS EM UMA ÁREA DE CERRADO NA CHAPADA DO ARARIPE, NORDESTE DO BRASIL	
Nome da Instituição : Universidade Regional do Cariri	CNPJ: 06.740.864/0001-26

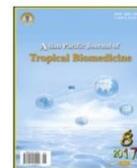
* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.



Contents lists available at ScienceDirect

Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/apjtb



Original article <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.07.009>

Chemical profile and antimicrobial activity of *Secondatia floribunda* A. DC (Apocynaceae)



Daiany Alves Ribeiro^{1,2*}, Sarah Soares Damasceno², Aline Augusti Boligon³, Irwin Rose Alencar de Menezes^{1,5}, Marta Maria de Almeida Souza^{1,4}, José Galberto Martins da Costa^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Etnobiologia e Conservação da Natureza, Universidade Regional do Cariri, Crato, CE, Brazil

²Departamento de Química Biológica, Laboratório de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Regional do Cariri, Crato, CE, Brazil

³Laboratório de Fitoquímica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

⁴Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Ecologia Vegetal, Universidade Regional do Cariri, Crato, CE, Brazil

⁵Departamento de Química Biológica, Laboratório de Farmacologia e Química Molecular, Universidade Regional do Cariri, Crato, CE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 Jun 2017

Received in revised form 29 Jun 2017

Accepted 26 Jul 2017

Available online 1 Aug 2017

Keywords:

Chemical composition

HPLC

Cinchonain

Natural product

Modification resistance

ABSTRACT

Objective: To establish the chemical profile, and to evaluate the antibacterial and modulatory activity of the ethanolic extracts of the stalk's inner bark and heartwood of *Secondatia floribunda*.

Methods: Quantification of total phenols and flavonoids was determined by the Folin-Ciocalteu method and aluminum chloride, respectively. Phenolic compounds were identified and quantified by HPLC-DAD (High Performance Liquid Chromatography-Diodearray Detector) and the Infrared Spectroscopy was performed using the measure by Attenuated Total Reflectance with Fourier Transform (ATR-FTIR). Antibacterial assays for determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and modification of aminoglycosides were performed by microdilution.

Results: Infrared spectra showed similar characteristics, having among its main absorption bands hydroxyl group (OH). The antibacterial activity showed clinically significant results for the strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. In modulation assay, synergic and antagonistic effect for both extracts was observed. Heartwood extract in combination with antibiotics showed a significant MIC reduction at 19.8% ($P < 0.0001$)-79.3% ($P < 0.01$).

Conclusions: This study is the first report of chemical and biological information of *Secondatia floribunda* suggesting that it is clinically relevant source of a new antibacterial therapy, especially due to the presence of significant levels of phenolic compounds.

1. Introduction

Over the years, various studies have been performed to demonstrate the efficacy of medicinal plants regarding their biological activities [1]. Previous to this, various plants were

already used for this purpose as an alternative therapeutic option [2,3]. Through traditional medical knowledge a multitude of plant extracts became known to have active substances which are of interest for the development of new drugs. Among these substances, great attention has been given to studies of phenolic compounds, both by their chemical properties and pharmacological actions [4,5], thus, many compounds of this class have been isolated to better understand their potentials [6,7].

Among the activities that related to phenolic compounds, antimicrobial has shown its importance, because these

*Corresponding author: Daiany Alves Ribeiro, Universidade Regional do Cariri, Departamento de Química Biológica, Av. Cel. Antônio Luiz, 1161, CEP: 63105-000, Crato, CE, Brazil.

E-mail: daiany_ars@hotmail.com (D.A. Ribeiro).

Peer review under responsibility of Hainan Medical University. The journal implements double-blind peer review practiced by specially invited international editorial board members.