



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



Caracterização do potencial inseticida e capacidade antioxidante de *Spathodea campanulata* (Bignoniaceae)

VALTER HENRIQUE MARINHO DOS SANTOS

Tese apresentada à banca avaliadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica) do Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP.

BOTUCATU – SP
2016



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU**

**Caracterização do potencial inseticida e capacidade
antioxidante de *Spathodea campanulata* (Bignoniaceae)**

VALTER HENRIQUE MARINHO DOS SANTOS

ORIENTADORA: GIUSEPPINA PACE PEREIRA LIMA

CO-ORIENTADOR: REGILDO MÁRCIO GONÇALVES DA SILVA

Tese apresentada à banca avaliadora do
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas (Botânica) do
Instituto de Biociências, Câmpus de
Botucatu, UNESP.

**BOTUCATU – SP
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Santos, Valter Henrique Marinho dos.

Caracterização do potencial inseticida e capacidade antioxidante de *Spathodea campanulata* (Bignoniaceae) / Valter Henrique Marinho dos Santos. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Giuseppina Pace Pereira Lima

Coorientador: Regildo Márcio Gonçalves Da Silva

Capes: 20306008

1. Inseticidas. 2. Antioxidantes. 3. Bignoniaceae. 4. Pesticidas naturais. 5. Inseto - Controle biológico. 6. Essências e óleos essenciais.

Palavras-chave: Atividade inseticida; Atividade medicinal; Bioatividade; *Spathodea campanulata*.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por sempre iluminar meus caminhos.

Aos meus pais Valter e Elzimar pela atenção e carinho em todos os momentos.

Aos meus eternos orientadores Dr Regildo Márcio Gonçalves da Silva e Prof^a Dr^a Giuseppina Pace Pereira Lima pela paciência, orientação, confiança e amizade.

À empresa TMG e sua equipe, em especial aos pesquisados Alexandre, Gislaine, Marcelo e Rafael, pela orientação e por cederem toda a estrutura física.

Aos meus amigos de laboratório de Assis e Botucatu pelo carinho e auxílio.

Ao Dr. Oliver Chen e sua equipe por me proporcionarem a oportunidade de estágio no exterior na Tufts University.

À FAPESP, pelo financiamento com bolsas no país e no exterior.

E a todos que de alguma forma participaram do desenvolvimento do trabalho.

Sumário

Lista de Tabelas	1
Lista de Figuras	2
Resumo	3
Abstract	5
1. Introdução.....	7
2. Objetivo	9
3. Revisão Bibliográfica	9
3.1. <i>Spathodea campanulata</i>	9
3.2. Antioxidantes	11
3.2.1. Compostos fenólicos.....	12
3.2.2. Carotenóides	15
3.3. Inseticidas de origem vegetal	16
3.3.1. Compostos com ação inseticida.....	18
3.3.2. Proteínas com potencial inseticida.....	18
4. Referências	21
CAPÍTULO 1	28
Insecticidal activity of nectar from <i>Spathodea campanulata</i> P. Beauv on insect pests of soybean	
Abstract	29
Resumo	30
Introduction	31
Materials and Methods	33
Collection and preparation of nectar <i>Spathodea campanulata</i>	33
Gross nectar dialysis and denaturation	34
Insecticidal tests	34
Insecticidal activity on <i>Euschistus heros</i> (Fabr.)	34
Insecticidal activity on <i>Helicoverpa zea</i> (Boddie) and <i>Anticarsia gemmatilis</i> (Hübner).....	34
Statistical treatment	35
Oxidant tests	35
Albumin degradation oxidative test.....	35
Evaluation of oxidant potential in the production of reactive species with TBARS	36
Protein characterization	36
Precipitation of the gross nectar	36

Protein content.....	37
Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).....	37
Two-dimensional electrophoresis (2D-PAGE).....	37
Results	38
Protein content	38
Insecticidal tests	38
Evaluation of oxidant potential in the production of reactive species with TBARS	39
Albumin degradation oxidative test	40
Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)	41
Two-dimensional electrophoresis (2D-PAGE)	41
Discussion	42
References	45
CAPÍTULO 2.....	51
Atividade antioxidante e caracterização fitoquímica de <i>Spathodea campanulata</i>	
Resumo.....	52
Abstract	53
1-Introdução	54
2-Material e métodos.....	55
2.1-Coleta do material vegetal	55
2.2- Testes antioxidantes	56
2.2.1-Preparação das amostras.....	56
2.2.2-Teste de ORAC	56
2.2.3-Teste de FRAP	57
2.2.4-Teste de DPPH	57
2.3-Fenóis totais	58
2.4-Análise de polifenóis por HPLC/PDA	58
2.5-Análise de polifenóis por HPLC/ECD	59
2.6-Análise de carotenóides por HPLC/PDA	60
2.6.1-Preparo das amostras.....	60
2.6.2-Análise por HPLC	60
2.7-Análise estatística	61
3-Resultados	61
4-Discussão	68
5-Referências.....	72

Lista de tabelas

CAPÍTULO 1

Table 1 - Mortality index of *Euschistus heros* (Fabr.), *Helicoverpa zea* (Boddie) and *Anticarsia gemmatalis* (Hübner).

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Capacidade antioxidante e fenóis totais de diferentes amostras de *Spathodea campanulata* coletadas na cidade de Assis.

Tabela 2 - Capacidade antioxidante e fenóis totais de diferentes amostras de *Spathodea campanulata* coletadas na cidade de Londrina.

Tabela 3 - Capacidade antioxidante e fenóis totais de diferentes amostras de *Spathodea campanulata* coletadas na cidade de Limeira.

Tabela 4 - Quantidade (ug.g-1 de material seco) de compostos fenólicos presentes em folhas, flores e néctar de *Spathodea campanulata* coletado em três diferentes cidades e analisado por HPLC/PDA.

Tabela 5 - Quantidade (ug.g-1 de material seco) de compostos fenólicos presentes em folhas, flores e néctar de *Spathodea campanulata* coletado em três diferentes cidades e analisado por HPLC/ECD.

Tabela 6 - Quantidade (ug.g-1 de material seco) de carotenóides presentes em folhas, flores e néctar de *Spathodea campanulata* coletado em três diferentes cidades e analisado por HPLC/PDA.

Lista de figuras

CAPÍTULO 1

Fig 1 Data is expressed as % TBARS oxidation compared to a positive control (AAPH). The experiment was performed in triplicate. Means with same letter do not differ significantly by Tukey's test ($\alpha=0.05$).

Fig 2 Oxidative analysis of albumin degradation in a polyacrylamide gel stained by Coomassie Brilliant Blue. 1) BSA (negative control); 2) BSA + Cu; 3) BSA + Cu + hydrogen peroxide (positive control); 4) BSA + Cu + undenatured nectar; 5) BSA + Cu + denatured nectar.

Fig 3 Electrophoretic analysis of nectar of *S.campanulata* in the polyacrylamide gel stained with Coomassie Brilliant Blue. 1-molecular marker (kDa); 2-lyophilized nectar; 3- precipitate nectar; 4- gross nectar.

Fig 4 A) All 51 spots assigned as possible protein candidates detected by DeCyder BVA software. B) Identification of subsets most likely to be proteins.

Santos, H.M.S. Caracterização do potencial inseticida e capacidade antioxidante de *Spathodea campanulata* (Bignoniaceae). 2016. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

RESUMO

A família Bignoniaceae é constituída por espécies que estão espalhadas por diversos locais do globo terrestre, porém no Brasil é mais encontrada nas regiões de cerrado, Mata Atlântica e região Amazônica. Dentro dessa grande família, podemos destacar a *Spathodea campanulata*, uma espécie com característica peculiar, pois apresenta atividade inseticida e medicinal, dependendo do órgão vegetal utilizado. Atualmente indústrias e empresas de diversas áreas, desde alimentícias até agronegócios, vêm investindo em estudos para identificação e extração de compostos vegetais com bioatividade, uma vez que podem ser benéficos a saúde humana e menos agressivos ao meio ambiente quando comparados com os químicos sintéticos. Devido à atual demanda por estudos de espécies vegetais capazes de produzir compostos bioativos e as características da espécie *Spathodea campanulata*, o estudo teve como objetivo avaliar o potencial inseticida do néctar de *Spathodea campanulata* sobre os insetos *Euschistus heros*, *Helicoverpa zea* e *Anticarsia gemmatilis*. Também foram analisadas a capacidade antioxidante das flores, folhas e néctar da espécie, por meio de testes antioxidantes (ORAC, DPPH e FRAP) e quantificação de compostos fenólicos e carotenóides por HPLC. Os testes inseticidas demonstraram significativa atividade tóxica do néctar de *S.campanulata* sobre os insetos *Euschistus heros* (Fabr.), *Helicoverpa zea* (Boddie) e *Anticarsia gemmatilis* (Hübner). Posterior análise do néctar por SDS-PAGE e 2D-PAGE, revelaram um conjunto de "spots" característicos que podem ser proteínas ou mesmo peptídeos responsáveis pela atividade inseticida. Nos testes oxidantes, TBARS e degradação de albumina, foram observados alta atividade oxidativa do néctar não desnaturado quando comparado com o desnaturado. Em relação à avaliação da capacidade antioxidante, pelos métodos do FRAP, DPPH e ORAC, as amostras de folhas tiveram os melhores resultados, seguidos das amostras de flores e néctares. O mesmo padrão foi observado no teste de quantificação do teor de fenóis totais. Na caracterização dos compostos bioativos em folhas e flores foi possível detectar predominância de compostos fenólicos (ácido caféico, ácido ferúlico e rutina) e carotenóides (luteína, zeaxantina e β -caroteno). Em ambas as análises, as amostras de

folhas e flores apresentaram maior concentração quando comparadas com os néctares. Diante dos resultados, é possível concluir primeiramente que o néctar de *S.campanulata* apresenta atividade inseticida e que essa ação pode ser promovida por proteínas com efeito tóxico direto ou indireto aos insetos. As folhas e flores da espécie podem servir como uma fonte interessante de metabólitos secundários, com atividade fitoterápica e antioxidante, de destacado interesse industrial nas áreas alimentícia, farmacêutica e cosmetológica.

PALAVRAS-CHAVE:

Atividade inseticida, *Spathodea campanulata*, compostos bioativos, fitoterápicos, metabólitos secundários.

Santos, H.M.S. Characterization of insecticidal activity and antioxidant capacity of *Spathodea campanulata* (Bignoniaceae). 2016. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

ABSTRACT

The family Bignoniaceae consists of species that are spread several parts of globe, but in Brazil is most commonly found in areas of Cerrado, Atlantic Forest and Amazon. Within this big family we can highlight the *Spathodea campanulata*, a species with peculiar characteristic, it has insecticidal and medicinal activity, depending on the plant organ used. Nowadays industries and companies from different fields, they have been investing in studies for the identification and extraction of plant compounds with bioactivity, since they can be beneficial to human health and less harmful to the environment when compared to synthetic chemicals. Due to the present demand for studies of plant species capable of producing bioactive compounds and characteristics of *Spathodea campanulata*, the study aimed to evaluate the insecticidal potential of specie's nectar on *Euschistus heros*, *Helicoverpa zea* e *Anticarsia gemmatilis*. It also analyzed capacity antioxidant of flowers, leaves and nectar of species by antioxidant tests (ORAC, DPPH e FRAP) and quantification of phenolic compounds and carotenoids by HPLC. The insecticidal tests showed significant toxic activity of nectar on insects *Euschistus heros* (Fabr.), *Helicoverpa zea* (Boddie) and *Anticarsia gemmatilis* (Hübner). Later analysis of the nectar by SDS-PAGE and 2D-PAGE revealed a set of "spots" that can be proteins or even peptides responsible for insecticidal activity. In the oxidant tests, TBARS and Albumin degradation oxidative test, were observed high oxidant activity of undenatured nectar compared to the denatured. In relation to the evaluation of the antioxidant capacity by the methods of FRAP, DPPH and ORAC, the leaf samples had the best results, followed by the samples of flowers and nectars. The same pattern was observed in the test quantification total phenols. In the characterization of bioactive compounds in leaves and flowers, it was possible detect predominantly phenolic compounds (caffeic acid, ferulic acid and rutin), and carotenoids (lutein, zeaxanthin and β -carotene). In both analyses, the samples of leaves and flowers showed higher concentration compared with nectars. Based on the results, we can first conclude that the *S.campanulata*'s nectar *campanulata* has insecticidal activity and that this action can be promoted by proteins with direct or

indirect toxic effect on insects. The leaves and flowers of this species can serve as an interesting source of secondary metabolites, with phytotherapeutic and antioxidant activity, of industrial interest in food, pharmaceutical and cosmetology areas.

KEYWORDS:

Insecticidal activity, *Spathodea campanulata*, bioactive compounds, phytotherapeutic, secondary metabolites.

1. INTRODUÇÃO

A família Bignoniaceae é constituída por 113 gêneros e 800 espécies, composta por plantas arbustivas, arbóreas e trepadeiras. As espécies deste táxon encontram-se distribuídas nas regiões tropicais de todo o mundo, sendo de ocorrência freqüente no continente americano (Carvalho et al., 2009). No Brasil, plantas desta família ocorrem desde a Amazônia até o Rio Grande do Sul, não possuindo um habitat único, podendo ser encontradas nos Cerrados, Mata Atlântica e região Amazônica (Lorenzi, 2008).

Dentro desta família a espécie *Sphatodea campanulata* P. Beauv. (Bignoniaceae) caracteriza-se por ser de origem africana e introduzida no Brasil como árvore ornamental (Cintra et al, 2005). Suas flores são avermelhadas e apresentam grande quantidade de néctar (Trigo e Santos, 2000). A espécie apresenta duas características peculiares, a primeira delas é a capacidade de produzir substâncias tóxicas, presentes no néctar, para insetos e pequenas aves e também produzir compostos com atividade medicinal, que estão contidos principalmente em na casca, folhas e flores (Trigo e Santos, 2000; Gisp, 2005; Andreu e Vilà, 2010).

Bioativos de origem vegetal como fenóis, carotenóides, vitaminas, alcalóides e mesmo metabólitos primários como proteínas, vem sendo estudados amplamente por cientistas de diferentes áreas, já que tais compostos podem ser aplicados em diversas áreas, desde em indústrias farmacêuticas e cosmetológicas até empresas que trabalham com agroquímicos (Mariutti e Bragagnolo, 2007).

Algumas classes de compostos como os fenóis, vitaminas e carotenóides são conhecidos por serem benéficos a saúde humana, pois podem apresentar atividades anti-inflamatória, antialérgica, antitrombótica, antimicrobiana e antineoplásica, tais atividades são possíveis devido a sua capacidade antioxidante (Lima et al., 2006). Os antioxidantes são caracterizados como compostos químicos que são capazes de prevenir ou diminuir os danos oxidativos ocasionados por radicais livres em lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, ou seja, os antioxidantes possuem a capacidade de reagir com os radicais livres e assim restringir os efeitos maléficos ao organismo (Monteiro et al., 2005).

Os compostos fenólicos são essenciais para o crescimento e reprodução dos vegetais, além de atuarem como agentes antipatogênicos e contribuírem na pigmentação, adstringência e estabilidade oxidativa. A atividade antioxidante de compostos fenólicos é principalmente devida às suas propriedades de óxido-redução, as

quais podem desempenhar um importante papel na absorção e neutralização de radicais livres, quelando o oxigênio triplete e singlete ou decompondo peróxidos (Aherne e O'Brien, 2002). Dentro das classes dos compostos fenólicos podemos destacar os flavonóides, que são antioxidantes naturais presentes em muitas hortaliças, frutas e verduras (Lin et al., 2008).

Outra classe de metabólitos secundários com atividade antioxidante comprovada cientificamente são os carotenóides (Azevedo-Meleiro e Rodriguez Amaya, 2004). Nas plantas eles atuam como pigmentos fotoprotetores na fotossíntese e como estabilizadores de membranas. Nos cromoplastos, eles são depositados na forma cristalina (ex. tomates e cenouras) ou como gotículas de óleo (ex. manga e páprica) (Kurz et al., 2008). O consumo de frutas e hortaliças com alto teor de carotenóides tem apresentado, também, uma relação inversa com o risco de desenvolvimento de câncer (Krinsky, 1989; Araújo et al., 2007).

Além dos compostos com atividade antioxidante, espécies vegetais também têm a capacidade de produzir substâncias que possuem atividade inseticida, e exemplos de substâncias com tal capacidade são as piretrinas, rotenona, nicotina, cevadina, veratridina, rianodina, quassinoides, azadiractina, biopesticidas voláteis, algumas proteínas e peptídeos (Barbaro et al., 2005). Classes de proteínas com atividade inseticida têm sido muito estudadas no presente momento por especialistas da área agronômica para fins de melhoramento genético (Ferrer et al., 2008). Um exemplo de proteína com atividade inseticida já provada é a canatoxina, essa substância quando ingerida pelo inseto acaba atuando no processo de digestão do indivíduo diretamente nas enzimas proteolíticas (Vasconcelos et al., 2008; Stanisquaski et al., 2009).

Cientistas da área agronômica acreditam que a busca por plantas capazes de produzir substâncias inseticidas vem crescendo cada vez mais, pois tais compostos podem vir a minimizar alguns obstáculos, como a contaminação ambiental, altos custos na compra e desenvolvimento de defensores químicos e também diminuir a presença de agrotóxicos nos alimentos (Salvador, 2006).

Assim, devido às características já relatadas sobre a espécie *Sphatodea campanulata* e a busca de compostos de origem vegetal tanto para serem empregados na área alimentícia, médica e até agronômica, o projeto foi importante para verificar se a espécie africana tem mesmo capacidade de produzir compostos com ambas às

atividades e quais são os órgãos que apresentavam mais ou menos cada uma dessas atividades.

2. OBJETIVO

O presente projeto teve como objetivo avaliar o potencial inseticida do néctar de *Spathodea campanulata* sobre os insetos *Euschistus heros*, *Helicoverpa zea* e *Anticarsia gemmatilis* e a capacidade antioxidante das flores, folhas e néctar da espécie, por meio dos testes antioxidantes ORAC, DPPH e FRAP e quantificação de compostos fenólicos e carotenóides por meio de HPLC.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Spathodea campanulata*

A espécie *Spathodea campanulata* pertence à família Bignoniaceae, é nativa da África equatorial e foi introduzida no Brasil como árvore ornamental (Trigo e Santos, 2000). A polinização das flores em espécies localizadas no oeste Africano é realizada por aves (Gentry, 1974) e por lêmures (Sussman e Raven, 1978) e no Panamá por morcegos (Ayensu, 1974). Possui inflorescências com flores no formato de tulipa, de coloração amarelo-avermelhado, sendo conhecida como tulipeiro do Gabão (Figura 1). De acordo com estudos anteriores a espécie tem a capacidade de produzir substâncias com capacidade inseticida e outras com atividade medicinal (Andreu e Vilà, 2010). Seus botões florais apresentam grande quantidade de néctar, que de acordo com Nogueira-Neto (1997) apresenta potencial tóxico sobre insetos e pequenas aves. Já por outro lado, estudos relatam o uso de extratos florais, foliares e de cascas do caule da espécie na medicina popular (Gisp, 2005; Andreu e Vilà, 2010).

Nogueira-Neto (1997) realizou uma contagem periódica dos insetos encontrados em flores caídas de *S.campanulata* e encontrou um número variável de meliponídeos mortos das espécies *Plebeia droryana*, *Tetragonisca angustula*, *Scaptotrigona postica*, *Trigona spinipes* e *Friesella schrottky*. Foram encontrados também exemplares de *Melipona quadrifasciata* e *Apis mellifera*.

Estudos realizados por Portugal-Araújo (1963) considerou também os efeitos tóxicos de *S. campanulata*, ao relatar a existência de aproximadamente 200 insetos mortos, entre formigas, abelhas e dípteros, em uma só inflorescência. Ele sugeriu

também que o efeito tóxico estava relacionado à presença de substâncias bioativas presentes no néctar.

Em relação ao seu uso medicinal, os extratos florais são ótimos agentes diuréticos e antiinflamatórios, os foliares são bastante utilizados no tratamento contra doenças renais, inflamações na uretra e até como antídoto contra veneno de animais peçonhentos. Extratos da casca do caule já foram empregados no combate de doenças de pele como herpes e para dores de estômago e diarreia (Mendes et al., 1986; Dhanabalan et al., 2008).

Estudos fitoquímicos realizados com diferentes partes de *S.campanulata* demonstraram a presença de ácido spatódico, ácido caféico, outros ácidos fenólicos e flavonóides em suas folhas (El-hela, 2001a; El-hela, 2001b). Já em suas cascas e caule foram determinadas a presença de ácido spatódico, esteróides, saponinas, ácido ursólico, ácido tomentosólico e substâncias pécticas (Amusan et al, 1995; Amusan et al, 1996; Niyonzima et al., 1999). Nas flores foi verificada a presença de antocianinas e nos frutos a presença de polifenóis, taninos, saponinas e glicosídeos (Banerjee e De, 2001). O néctar floral é uma mistura complexa de triterpenóides e esteróides (Amusan et al, 1995).



Figura 1. Espécie *Spathodea campanulata*

3.2 Antioxidantes

Os compostos ou agentes antioxidantes são por definição qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação desse substrato de maneira eficaz (Sies e Stahl, 1995). Essas substâncias fazem parte do sistema de defesa dos organismos vivos, com ação intracelular e extracelular, em meio hidrofílico e hidrofóbico, sendo produzidos pelo organismo ou obtidos da dieta (Kolakowska, 2003).

Tais compostos são de grande interesse para profissionais da saúde e da área alimentícia, pois podem ajudar na proteção do organismo contra os danos causados pelas espécies reativas do oxigênio (ERO's) e doenças degenerativas (Araújo, 2004). Dentre muitas funções desempenhadas pelos antioxidantes em diferentes organismos, podemos citar a inibição da autooxidação e fotoxidação (Kagan et al., 2002).

Na inibição da autooxidação, os antioxidantes podem tanto doar como receber elétrons de outras moléculas, sendo que os doadores de elétrons competem com o lipídeo pelo radical peroxil, resultando na diminuição da velocidade de reação. Os receptores competem com o oxigênio tripleto pelo radical livre, reduzindo a formação do radical peroxil (Asolini et al., 2006). Já no caso da fotoxidação, os compostos atuam como supressos físicos. A transferência de energia de uma molécula primária excitada para o supressor resulta em dissipação de energia luminosa ou térmica. Na oxidação enzimática, flavonóides, ácidos fenólicos e galatos inibem a ação da lipoxigenase. Isso também pode ser feito por inativação térmica, entretanto, pode aumentar a oxidação não enzimática (Kolakowska, 2003).

Uma das maiores fontes de extração de antioxidantes são as diferentes matrizes alimentares ou orgânicas, principalmente as de origem vegetal. Estes abrangem uma série de substâncias químicas com diferentes funções orgânicas e mecanismos de atuação. Uma grande quantidade de frutas, ervas e especiarias são fontes desses compostos (Gu et al., 2008). As principais classes de substâncias vegetais com atividade antioxidante são os tocoferóis, vitamina C, carotenóides e compostos fenólicos (Asolini et al., 2006).

Os compostos antioxidantes provenientes de vegetais atuam protegendo-as contra injúrias em seus tecidos, contra a ação de subprodutos oxidantes provenientes da fotossíntese e também contra a herbivoria. Juntos, representam os antioxidantes que agem por diversos mecanismos de maneira a conferir defesa contra o ataque de radicais livres (Gu et al., 2008).

Devido aos benefícios oferecidos pelos compostos antioxidantes, tais substâncias vêm apresentando grande importância econômica em determinadas regiões do Brasil e mundo para o consumo in natura de frutas, verduras ou legumes com alta concentração desses compostos ou servindo como matéria-prima na indústria farmacêutica e a alimentícia para a elaboração de diversos outros produtos (Nogueira et al., 2002)

3.2.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são substâncias originadas do metabolismo secundário dos vegetais, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução, além disso, se formam em condições de estresse como, infecções, ferimentos, radiações UV, dentre outros (Soares, 2002). Essa categoria de compostos é bastante conhecida pelo seu

potencial antioxidante principalmente na prevenção da autoxidação (Nackz e Shahidi, 2004).

Tais compostos possuem uma grande diversidade estrutural e isso se deve à grande variedade de combinações que acontece na natureza e os compostos resultantes são chamados de polifenóis. Estas combinações fenólicas podem ser categorizadas em várias classes e as principais são flavonóides, os ácidos fenólicos e os taninos como os mais comuns antioxidantes fenólicos de fonte natural (Hertog et al., 1997).

O grupo dos flavonoides apresenta uma estrutura química $C_6-C_3-C_6$ (Figura 2). Esses compostos são amplamente encontrados no reino vegetal, mas sua distribuição é bastante influenciada por alguns fatores ambientais como luminosidade e temperatura. Além dos fatores ambientais, os flavonoides podem ser distribuídos de forma diferente nos vegetais dependendo da ordem e família que esse indivíduo pertence, bem como sua variação dentro das espécies (Skerget et al., 2005). Os flavonoides são originados da combinação de derivados de fenilalanina (via metabólica do ácido chiquímico) e ácido acético. Dentro dos flavonoides temos categorias de compostos muito importantes como, por exemplo, os flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis (ou catequinas), isoflavonas e antocianidinas (Gould e Lister, 2005).

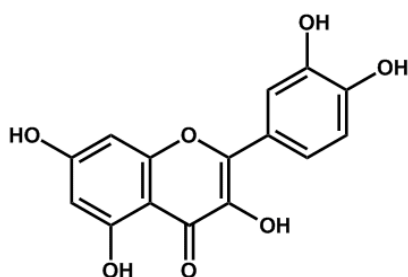


Figura 2. Estrutura básica dos flavanóides.

Fonte: Skerget et al. (2005).

Os ácidos fenólicos são metabólitos aromáticos secundários de plantas, uma subclasse de um grande grupo de metabólitos denominado “fenólicos” e estão distribuídos em todo o reino vegetal. Esses compostos apresentam um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes para os vegetais (Oliveira et al., 2011). Estes compostos podem ser divididos em dois grupos, os derivados do ácido hidroxibenzóico e derivados do ácido hidroxicinâmico (Figura 3).

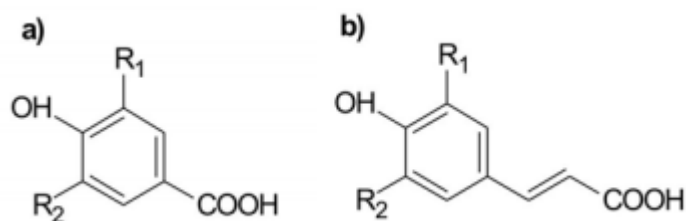


Figura 3. Estrutura básica dos ácidos hidroxibenzoicos (a) e hidroxicinâmicos (b).

Fonte: Robbins (2003).

A classe dos taninos apesar de apresentarem compostos com atividade antioxidantes, tais substâncias são bastante conhecidas pelo seu papel defensivo em vegetais, contra ataque de herbívoros invertebrados e vertebrados, reside nesta característica, apresentando, conseqüentemente, sabor adstringente e difícil digestão, já que as enzimas digestivas não conseguem atacar esses precipitados (Rice, 1984). Tais compostos podem ser divididos em duas categorias de acordo com sua estrutura química, os taninos condensáveis e hidrolisáveis (Gu et al., 2008).

Os taninos condensáveis são constituídos de oligômeros e polímeros de flavan-3-ol (catequina) e/ou flavan-3,4-diol (leucocianidina), produtos do metabolismo do fenilpropanol. Uma importa classe de taninos são as antocianinas, pigmentos avermelhados com alta atividade antioxidante, nos vegetais suas principais funções são a atração de agentes polinizadores e dispersores de sementes e a proteção a diversos tecidos da planta durante as etapas de seu ciclo de vida (Figura 4) (Cardoso et al., 2011).

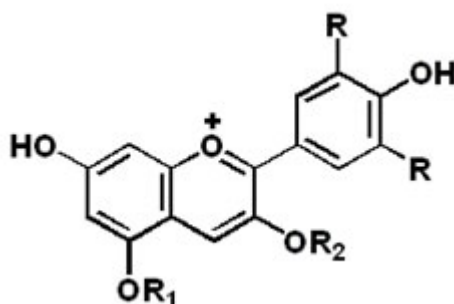


Figura 4. Estrutura básica das antocianinas

Fonte: Cardoso et al. (2011).

3.2.2 Carotenóides

Os carotenóides são pigmentos que apresentam diversas funções em diferentes organismos e possuem uma larga distribuição e diversidade estrutural. São altamente coloridos, insaturados e lipofílicos, apresentando uma variedade de cores desde o amarelo até o vermelho. Os carotenóides são responsáveis pela coloração apresentada por muitos insetos, pássaros, plantas, peixes e crustáceos (Oliver e Palou, 2000).

Em sua grande maioria, os carotenóides são formados por um tetraterpeno (C40) com o esqueleto hidrocarbônico consistindo em oito unidades isoprenóides (Araújo et al., 2007). Na natureza, os carotenóides surgem a partir da reação de acoplamento “cauda-cauda” do análogo C20 do pirofosfato de farnesila, levando inicialmente à formação do fiteno, este por sua vez, dará origem a uma variedade de pigmentos C40, como por exemplo, os abundantes β -caroteno e licopeno (Figura 5). Os carotenóides ainda podem ser divididos em dois grandes grupos, quando formados somente por átomos de carbono e hidrogênio são conhecidos como carotenos, já quando tais compostos são derivados contendo um heteroátomo são conhecidos como xantofilas (Cardoso, 1997).

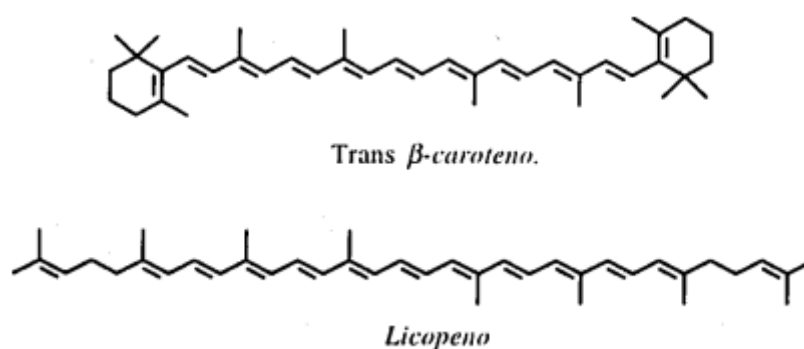


Figura 5. Estrutura química do β -caroteno e licopeno.

Fonte: Cardoso (1997).

Dentre todos os carotenóides, o β -caroteno é um mais conhecido devido a sua propriedade provitamínica A. A vitamina A é muito abundante nas cenouras, principalmente na forma de vitamina A₁ (Figura 6), esta é formada pela quebra oxidativa da dupla ligação central e posterior redução bioquímica do aldeído (Layrisse, 2000).

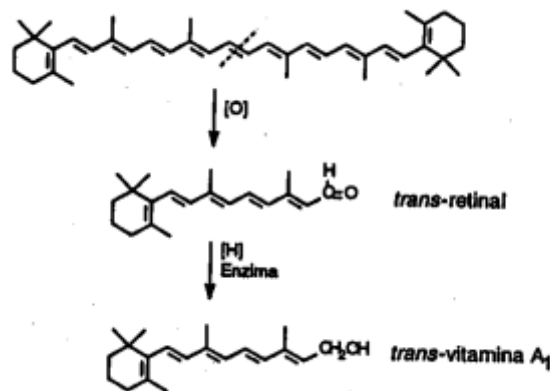


Figura 6. Estrutura química da vitamina A₁.

Fonte: Cardoso (1997).

Na área medicinal, os carotenóides são utilizados no tratamento de certas doenças de pele, como por exemplo, na fotorporfíria eritropoiética. Estudos recentes indicam uma possível atividade anticancerígena como também a provável participação como moduladores das respostas imunológicas (Di Mascio et al., 1989). No caso específico da vitamina A, esta é muito importante a diferenciação celular, para a visão, para o crescimento ósseo, na reprodução e na integração do sistema imunológico, podendo ser utilizada em casos de pessoas com anemia (Dorgan et al., 2004).

Já na área alimentícia, tais compostos vêm sendo utilizados como colorantes e antioxidantes, pois são altamente coloridos, de ocorrência natural e não tóxicos. Além disso, os carotenóides não são particularmente caros, como por exemplo, 3-5 g de β -caroteno para conferir a uma tonelada de margarina a sua cor amarela característica (Dorgan et al., 2004).

3.3 Inseticidas de origem vegetal

O ataque de pragas é um dos principais fatores de perda de produção em áreas agricultáveis no Brasil. Tal problema tem levado pequenos e grandes agricultores praticarem o uso desenfreado de agrotóxicos químicos, prática que tem originado pontos negativos que vão desde problemas de contaminação ambiental, resistência de pragas, desequilíbrio ambiental, presença de altos níveis de resíduos químicos nos alimentos, mortalidade de espécies não alvos, além do aumento dos custos econômicos tanto para aquisição dos produtos como para aplicação nas culturas (Tavares et al., 2009).

Diante desse cenário, iniciou-se uma busca incessante por alternativas viáveis para os agroquímicos, e alguns exemplos mais estudados são o controle biológico por meio da utilização de inimigos naturais (bactérias, fungos, insetos ou mesmo outros predadores que possam vir a controlar uma determinada praga alvo) e o desenvolvimento de cultivares resistentes às pragas, tanto pelo método de melhoramento convencional como pelo melhoramento genético (Sandoval e Senô, 2010). Apesar de ótimas alternativas, ambas necessitam de um alto financeiro inicial, para estrutura e mão de obra altamente qualificada, dentre outros problemas que acabam algumas vezes inviabilizando a prática de tais alternativas, o que levou o crescimento e a maior procura por outras práticas alternativas de menor custo, como a investigação de plantas com potencial inseticida (Altieri et al., 2003; Bettiol e Morandi, 2009).

A investigação de plantas com atividade inseticida é realizada principalmente pelo desenvolvimento de extratos dos seus diferentes órgãos ou mesmo de outras substâncias produzidas pela planta como néctares florais (Tavares et al., 2009; Seo et al., 2013). O uso de compostos de natureza vegetal tem algumas vantagens interessantes como, baixo impacto ambiental, fácil obtenção dos produtos para estudo e sua rápida degradação no ambiente (Silva et al., 2012). Dentro desse contexto, várias são as espécies vegetais estudadas para investigação de seus potenciais inseticidas.

Um dos primeiros relatos sobre plantas inseticidas veio do estudo da espécie *Azadirachta indica*, conhecida por nim. De acordo com Martinez (2002), até 1995, cerca de 400 espécies de insetos já tinham sido relatadas como sensíveis a algum tipo de ação do nim e acredita-se que tal efeito é possível devido à presença de uma molécula conhecida como azadiractina.

Segundo Xie et al. (1994), o gênero *Trichilia* spp. apresenta grande potencial inseticida. Os autores observaram o efeito de várias espécies de *Trichilia* spp. sobre duas espécies de lepidópteros, sendo que os extratos de casca e ramos, em geral, foram mais efetivos do que os de folha.

Lovatto et al. (2004) referem-se à utilização de solanáceas como controladoras de insetos, por apresentarem metabólitos secundários com significativa toxicidade, dentre as espécies testadas nos trabalhos podemos destacar a *Nicotiana tabacum*, planta conhecida por produzir substâncias mundialmente relatadas como inseticidas, que seriam a nicotina e nornicotina.

Estudos de efeitos inseticidas realizados com néctares florais foram realizados por Trigo e Santos (2000), que estudaram a mortalidade de insetos em flores de *S.campanulata*. Em 445 flores examinadas encontraram-se 345 insetos mortos. Em bioensaios com *S.postica* em condições de laboratório, o néctar puro coletado de botões florais reduziu a longevidade das larvas em 95,2% e na concentração de 25%, reduziu em 52,9%.

3.3.1 Compostos com ação inseticida

As espécies vegetais respondem a diversos fatores ambientais, como fertilidade do solo, disponibilidade de água, radiação solar, temperatura, dentre outros. Além disso, é importante ressaltar que interações ecológicas como planta-planta, planta-animal e planta-microorganismo também são fatores que levam a planta responder de alguma forma a estes estímulos (Taiz e Zeiger, 2013). Os fatores bióticos e abióticos quando interagem com tais vegetais acabam ativando novas rotas biossintéticas que levarão a produção de metabólitos de origem primária e secundária que desempenharão diversas funções na planta, desde atração de polinizadores até de defesa química contra herbívoros (Zhao et al., 2005).

Os metabólitos primários (proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos e lipídeos) na sua maioria são considerados substâncias envolvidas na manutenção da sobrevivência e desenvolvimento vegetal, porém trabalhos recentes mostram que também podem estar relacionados com outras funções vegetais, como a defesa contra herbívoros, principalmente algumas classes protéicas (Falco et al., 2001; Seo et al., 2013). Já os metabólitos secundários são mais conhecidos por desempenharem funções não cruciais para a sobrevivência da planta, mas sim de proteção, atração e alguns pontos específicos de cada espécie vegetal, como por exemplo, atração de insetos para transferência de pólen ou animais dispersores de sementes (Verpoorte et al., 1999).

3.3.2 Proteínas com potencial inseticida

Apesar dos metabólitos primários serem mais conhecidos por desempenharem funções vitais para o desenvolvimento e crescimento vegetal, estudos recentes tem mostrado que alguns grupos de proteínas têm sido investigados devido a sua ação inseticida, dentre elas podemos destacar as inibidoras de α -amilase, lectinas e inibidores de proteinases (Carozzi e Koziel, 1997; Falco et al., 2001).

As α -amilases são enzimas monoméricas que constituem uma família da endoamilases, as quais catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas de α -1,4 do amido, glicogênio e outros carboidratos. Essas enzimas têm um papel importante no mecanismo dos carboidratos em plantas, animais e outros organismos (Franco et al., 2000). Diversos autores relatam que os inibidores de α -amilase são abundantes em espécies vegetais, os quais atuam como mecanismo de defesa das plantas (Franco et al., 2000; Iulek et al., 2000).

O estudo mais relevante relacionado à inibição de α -amilase foi realizado no feijão comum (*Phaseolus vulgaris*). Os resultados do estudo demonstraram a presença de dois inibidores de α -amilase conhecidos como: α -A11, α -A12, que diferem em suas especificidades contra diferentes α -amilase (Grossi-de-Sá e Chrispeels, 1997). De acordo com Franco et al. (2002), apesar de trabalhos relatarem a ação de tais inibidores, o mecanismo de interação e especificidade é extremamente complexo, ainda não estando totalmente descrito na literatura.

Outra classe de proteínas relacionadas com proteção vegetal encontradas em leguminosas e principalmente nos órgãos de reserva e estruturas de proteção são as lectinas. Elas representam um grupo de glicoproteínas que se ligam, específica e reversivelmente, a açúcares (Povineli e Finardi, 2002).

Trabalho realizado com feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), mostrou interferência no desenvolvimento dos fitófagos *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera) e *Myzus persicae* (Hemiptera), assim como do hematófago *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) (Gatehouse et al., 1999). Peumans e Van Damme, (1995) relataram em seus estudos que as lectinas agem diretamente em sítio de ligação nas células epiteliais do sistema digestivo do inseto, assim revestindo o lúmen intestinal por lectinas que provocariam efeitos negativos nos insetos, como inibição do crescimento e morte.

E por fim, podem-se citar as inibidoras de proteinases (IPs), que para muitos autores são as principais moléculas desenvolvidas pelas plantas durante a evolução, a fim de reduzir o ataque dos herbívoros. A característica que as torna tão importantes e pesquisadas é de resistem à proteólise e permanecem ativas sob diversos pHs intestinais, devido a produção por amilases e proteinases e pelo complexo aumento dos inibidores que difere das propriedades químicas durante a produção dos mesmos (Roy e Gupta, 2000; Tiffin e Gaut, 2001).

As IPs quando ingeridas pelos insetos tendem a interferir no processo de degradação de proteínas no intestino médio, assim sendo os inibidores são considerados como agentes antimetabólicos, pois interferem no processo digestivo dos insetos, inibindo as atividades proteolíticas (Broadway, 1997; Lawrence e Koundal, 2002). Estudo realizado por Wolfson e Murdock (1995) mostrou que os IPs diminuem a disponibilidade dos aminoácidos, prejudicando o crescimento, desenvolvimento e reprodução dos insetos e eventualmente causariam sua morte. Para Jongsma e Bolter (1997), tais inibidores podem afetar o desenvolvimento dos herbívoros via indireta, aumentando a produção de proteinase digestiva para compensar o baixo nível de aminoácidos disponíveis ou por meio da diminuição de classes de aminoácidos requeridos à produção de proteínas essenciais.

O potencial dos inibidores de proteinases depende da compatibilidade estrutural com a proteinase do organismo alvo, das condições fisiológicas internas do intestino médio (pH) e da qual idade do sistema proteinase, assim as classes de IPs mais conhecidas e estudadas são aquelas que afetam a atividade de serino-proteases, cisteínoproteases, proteases aspárticas e metaloproteases, que são os quatro grandes grupos aos quais pertencem as enzimas proteolíticas (Lawrence e Koundal, 2002).

4. REFERÊNCIAS

- AHERNE, S.A.; O'BRIEN, N.M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and, metabolism. Nutrition. New York: v. 18, n. 1, p. 75-81, 2002.
- ALTIERI, M. C.; SILVA, E. N.; NICHOLLS, C. I. O papéda biodiversidade no manejo de pragas. Ribeirão Preto: Holos, p.226, 2003.
- AMUSAN, O. O. G.; MSONTHI, J. D.; MAKHUBU, L. P. Molluscicidal activity of *Spathodea campanulata*, *Andrachne ovalis*, *Phytolacca dodecandra* and *Hypoxis rooperi*. Fitoterapia, v.66, p.113-116, 1995.
- AMUSAN, O. O. G.; ADESOGAN, E. K.; MAKINDE, J. M. Antimalarial active principles of *Spathodea campanulata* stem bark. Phytotherapy Research, v.10, n.8, p.692-693, 1996.
- ANDREU, J.; VILÀ, M. Risk analysis of potential invasive plants in Spain. Journal of Nature Conservation, v.18, n1, p.34-44, 2010.
- ARAÚJO, J.M.A. Química de Alimentos: teoria e prática. 3. Ed. Viçosa: UFV, p.478, 2004.
- ARAÚJO, P. G. L.; FIGUEIREDO, R. W.; ALVES, R. E.; MAIA, G. A.; PAIVA, J. R. β -caroteno, ácido ascórbico e antocianinas totais em polpa de frutos de aceroleira conservada por congelamento durante 12 meses. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 27, n. 1, p. 104-107, 2007.
- ASOLINI, F. C.; TEDESCO, A. M.; CARPES, S. T. Atividade antioxidante e antimicrobiana dos compostos fenólicos dos extratos de plantas usadas como chás. Brazilian Journal of Food Technology, v. 9, n. 3, p. 209-215, 2006.
- AYENSU, E. S. Plant and bat interactions in West Africa. Annals Missouri Botanical Garden, v.61, p.702-727,1974.
- AZEVEDO-MELEIRO, C. H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. Jour. of Food Composition and Analysis, v. 17, n. 3, p. 385-396, 2004.
- BANERJEE, A.; DE, B. Anthocyanins in some flowers of West Bengal. Journal of Medicinal and Aromatic Plant Science, v.23, p.600-604, 2001.
- BARBARO, K.C.; KNYSACK, I.; MARTINS, R.; HOGAN, C.; WINKEL, K. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles spider* venoms of medical importance in the Americas. Toxicon, v.45, p.489-499, 2005.
- BETTIOL, W.; MORANDI, A.B.M. Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009.

BROADWAY, R.M. Dietary regulation of serine proteinases that are resistant to serine proteinase inhibitors. *Journal of Insect Physiology*, v.43, p.855-874, 1997.

CARDOSO, S.L. Fotofísica de carotenóides e o papel antioxidante de β -caroteno. *Química Nova*, v.20, p. 535-540, 1997.

CARDOSO, L.M.; LEITE, J.P.V.; PELUZIO, M.C.G. Efeitos biológicos das antocianinas no processo aterosclerótico. *Revista Colombiana de Ciências Químico Farmacéuticas*, v.40, p.116-138, 2011.

CAROZZI, N.; KOZIEL, M. *Advances in insect control*. London: Taylor & Francis, 1997.

CARVALHO, C. A.; MATTA, S. L. P.; MELLO, F. C. S. A.; ANDRADE, D. C. F.; CARVALHO, L. M.; NASCIMENTO, P. C.; SILVA, M. B. e ROSA, M. B. *Cipó-cravo (tynnanthus fasciculatus miers–bignoniaceae): estudo fitoquímico e toxicológico envolvendo artemia salina*. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v.6, n.1, p.51-58, 2009.

CINTRA, P.; MALASPINA, O.; BUENO, O. C. Plantas tóxicas para abelhas: artigo de revisão. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.72, n.4, p.547-551, 2005.

DHANABALAN, R.; DOSS, A.; BALACHANDAR, S.; KEZIA, E.; JAGADEESWARI, M.; KARTHIK, M. In vitro Phytochemical Screening and Antibacterial Activity of Organic Leaf Extracts of *Spathodea campanulata* P. Beauv against Hospital Isolated Bacterial Strains. *Ethnobotanical Leaflets*, v.12, p.1022-28, 2008.

DI MASCIO, P.; KAISER, S.; SIES, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.274, p.532-538, 1989.

DORGAN, J.F.; BOAKYE, N.A.; FEARS, T.R.; SCHLEICHER, R.L.; HELSEL, W.; ANDERSON, C. Serum carotenoids and alpha-tocopherol and risk of nonmelanoma skin cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, v.13, p.1276-1282, 2004.

EL-HELA, A. A. Phenolics from *Spathodea campanulata* Beauv. Leaves. *Al-Azhar Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.27, p.152-162, 2001a.

EL-HELA, A. A. A new iridoid glucoside from *Spathodea campanulata* Beauv. leaves. *Al-Azhar Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.27, p.115-120, 2001b.

FALCO, M. C.; MARBACH, P.A. S.; POMPERMAYER, R; LOPES, F. C. C.; SILVA-FILHO, M. C. Mechanism of Sugarcane Response to Herbivory. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v.24, p.113-122, 2001.

FERRER, J.L., AUSTIN, M.B., STEWART, C., NOEL, J.P. Review: Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 46, n. 3, p.356 - 370, 2008.

FRANCO, O. L.; RIGDEN, D. J. MELO, F. R.; BLOCH, C. Jr.; SILVA, C. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Activity of Wheat α -Amylase Inhibitors Towards Bruchid α -Amylase and Structural Explanation of Observed Specificities. *European Journal of Biochemistry*, Oxford, v. 195, p.2166-2173, 2000.

FRANCO, O. L.; RIGDEN, D. J.; MELO, F. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant Alpha-Amylase Inhibitors and Their Interaction with Insect Alpha-Amylases-Structure, Function and Potential for Crop Protection. *European Journal of Biochemistry*, Oxford, v. 269, p. 397-412, 2002.

GATEHOUSE, A. M. R.; DAVISON, G. M.; STEWART, J. N.; GALEHOUSE, L. N.; KUMAR, A.; GEOGHEGAN, I. E.; BIRCH, A. N.E.; GATEHOUSE, J. A. Concanavalin A Inhibits Development of Tomato Moth (*Lacanobia oleracea*) and Peach-Potato Aphid (*Myzus persicae*) when Expressed in Transgenic Potato Plant. *Molecular Breeding*, Dordrecht, v. 5, p. 153-165, 1999.

GENTRY, A. Flora of Panama. Family 172. Bignoniaceae. *Annals Missouri Botanical Garden*, v.60, p.957, 1974.

GISP (El Programa Mundial sobre Especies Invasoras). Sudamérica invadida: El creciente peligro de las especies exóticas invasoras. Cap Town/África do Sul: GISP, p.80, 2005.

GOULD, K.S.; LISTER, C. Flavonoid functions in plants. In: ANDERSEN, O.M.; MARKHAM, K.R (Ed.). *Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications*. Boca Raton: CRC Press, p. 397-441, 2005.

GROSSI-DE-SÁ, M. F.; MIRKOV, T. E.; ISHIMOTO, M.; COLUCCI, G.; BATEMAN, K. S.; CHRISPEELS, M. J. Molecular Characterisation of a Bean α -Amylase Inhibitor that Inhibits the α -Amylase of the Mexican Bean Weevil *Zabrotes subfasciatus*. *Planta*, Springer-Verlag, v. 203, p. 295-303, 1997.

GU, H.F.; LI, C.M.; XU, Y.J.; HU, F.W.; CHEN, M.H.; WAN, Q.H. Structural features and antioxidant activity of tannin from persimmon pulp. *Food Research International*, v. 41, n. 2, p. 208-217, 2008.

HERTOG, M.G.; SWEETNAM, P.M.; FEHILY, A.M.; ELWOOD, P.C.; KROMHOUT, D. Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly Study. *American Society for Clinical Nutrition*, v.65, p. 1489-1494, 1997.

IULEK, J.; FRANCO, O. L.; SILVA, M. SLIVINSKI, C. T.; BLOCH, C. Jr.; RIGDEN, D. J.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Purification, Biochemical Characterization and Partial Primary Structure of a New α -Amylase Inhibitor of Common Bean. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, Malden, v. 79, p. 309-315, 2000.

JONGSMA, M. A.; BOLTER, C. The Adaptation of Insects to Plant Protease Inhibitors. *Journal of Insect Physiology*, Columbus, v. 43, p. 885-895, 1997.

KAGAN, V.E.; KISIN, E.R.; KAWAI, K. Towards mechanism-based antioxidant interventions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.959, p. 188-198, 2002.

KOLAKOWSKA, A. Lipid Oxidation in Food Systems. In: SIKORSKI, Z.E.; KOLAKOWSKA, A. *Chemical and Functional Properties of Food Lipids*. Boca Raton: CRC PRESS, 2003.

KRINSKY, N. I. Carotenoids as chemopreventive agents. *Preventive Medicine*, San Diego, v. 18, n. 5, p. 592-602, 1989.

KURZ, C.; CARLE, R.; SCHIEBER, A. HPLC-DADMSn characterisation of carotenoids from apricots and pumpkins for the evaluation of fruit product authenticity. *Food Chemistry*, v. 110, p. 522-530, 2008.

LAWRENCE, P. K.; KOUNDAL, K. R. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electronic Journal of Biotechnology*, v.5, n.1, p.93-109, 2002.

LAYRISSE, M. New property of vitamin A and β -carotene on human iron absorption: effect on phytate and polyphenols as inhibitors of iron absorption. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v. 50, p. 243-248, 2000.

LIMA M. R.; SOUZA, L. J.; SANTOS, A. F.; ANDRADE, M. C.; SANT'ANA, A. E.; GENET, J. P.; MARQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants, *Journal of Ethnopharmacology*, v. 105, p. 137-147, 2006.

LIN, S-D.; LIU, E-H.; MAU, J-L. Effect of different brewing methods on antioxidant properties of steaming green tea. *Food Science and Technology*, v. 41, n. 9, p. 1616-1623, 2008.

LORENZI, H. Árvores brasileiras - Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Quinta edição, Editora Plantarum, Nova Odessa, 2008.

LOVATTO, P. B.; GOETZE, M.; THOMÉ, G. C. H. Efeito de extratos de plantas silvestres da família Solanaceae sobre o controle de *Brevicoryne brassicae* em couve (*Brassica oleraceae* var. acephala). *Ciência Rural*, v.34 (4), p. 971-978, 2004.

MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. Revisão: Antioxidantes Naturais da Família Lamiaceae. Aplicação em Produtos Alimentícios. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 10, n. 2, p. 96-103, 2007.

MARTINEZ, S.S. O Nim - *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção. Londrina: Instituto Agrônômico do Paraná, p.142, 2002.

MENDES, N.M.; SOUZA, C.P.; ARAÚJO, N.; PEREIRA, J.P.; KATZ, N. Atividade moluscicida de alguns produtos naturais sobre *Biomphalaria glabrata*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.81, p.87-91, 1986.

MONTEIRO, M. J.; LINS, N. F. M. E.; AMORIM, C. L. E.; STRATTMANN, R. R.; ARAÚJO, L. E.; ALBUQUERQUE, P. U. Teor de taninos em três espécies medicinais arbóreas simpáticas da Caatinga. *Revista Árvore*, v. 29, n. 6, p. 999-1005, 2005.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, v. 1054, n. 1/2, p. 95-111, 2004.

NIYONZIMA, G.; LAEKEMAN, G.; WITVROUW, M.; VAN POEL, B.; PIETERS, L.; PAPER, D.; CLERCQ, E.; FRANZ, G.; VLIETINCK, A. J. Hypoglycemic, anticomplement and anti-HIV activities of *Spathodea campanulata* stem bark. *Phytomedicine*, v.6, n.1, p.45-49, mar. 1999.

NOGUEIRA-NETO, P. Vida e criação das abelhas indígenas sem ferrão. Primeira edição, Nogueirapis, São Paulo, 1997.

NOGUEIRA, R.J.M.C.; MORAES, J.A.P.V.; BURITY, H.A.; SILVA JUNIOR, J.F. Efeito do estágio de maturação dos frutos nas características físico-químicas da acerola. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 37, n. 4, p. 463-470, 2002.

OLIVEIRA, D.M.; BASTOS, D.H.M. Phenolic acids bioavailability. *Quimica Nova*, v.34, p.1051-1056, 2011.

OLIVER, J.; PALOU, A. Chromatographic determination of carotenoids in foods. *Journal of Chromatography A*, v. 881, p. 543-555, 2000.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectin as Plant Defense Proteins. *Plant Physiology*, Rockville, v.109, p.347-52, 1995.

PORTUGAL-ARAÚJO, V. O perigo de dispersão da Tulipeira do Gabão (*Spathodea campanulata* Beauv.). *Chácaras e Quintais*, v.107, p.562-563, 1963.

POVINELI, K. L.; FINARDI FILHO, F., As múltiplas funções das lectinas vegetais. *Nutrire*, SP. , v.24, p.135-156, 2002.

RICE, E.L. Allelopathy. New York: Academic Press, p.422, 1984.

ROBBINS, R.J. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 2866-2887, 2003.

ROY, I.; GUPTA, M. N. Purification of a "Double-Headed" Inhibitor of Alpha-Amylase/Proteinase K from wheat Germ by Expanded bed Chromatography. *Bioseparation*, Dordrecht, v. 9, p.239-245, 2000.

SALVADOR, F.L. Manejo e interferência das plantas daninhas em soja: uma revisão. *Revista FZVA*, v.13, p.158-175, 2006.

SANDOVAL, S.S.; SENÔ, K.C.A. Comportamento e controle da *Diatraea saccharalis* na cultura da cana-de-açúcar. *Nucleus*, v.7, n.1, p.243-258, abr. 2010.

- SEO, P.J.; WIELSCH, N.; KESSLER, D.; SVATOŠ, A.; PARK, C.M.; BALDWIN, I.T.; KIM, S.G. Natural variation in floral nectar proteins of two *Nicotiana attenuata* accessions. *BMC Plant Biology*, v.13, p.101, 2013.
- SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 62, n. 6, p.1315-1321, 1995.
- SILVA, R.M.G.; LIVIO, A.A.; SANTOS, V.H.M.; MECINA, G.F.; SILVA, L.P. Allelopathy and phytotoxicity of *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. *Allelopathy Journal* v.30, p.221-234, 2012.
- SKERGET, M.; KOTNIK, P.; HADOLIN, M.; HRAS, A. R., SIMONIC, M.; KNEZ, Z. Phenols, proanthocyanins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemical*, v. 89, n. 4, p. 191-198, 2005.
- SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidants. *Revista de Nutrição*, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.
- SUSSMAN, R. W.; RAVEN, P. H. Pollination by lemurs and marsupials: an archaic coevolutionary system. *Science*, v.200, p.731-734, 1978.
- STANISQUASKI, F.; TE BRUGGE, V.; CARLINI, C.R.; ORCHARD, I. In vitro effect of *Canavalia ensiformis* urease and the derived peptide Jaburetox-2Ec on *Rhodnius prolixus* Malpighian tubules. *Journal of Insect Physiology*, v.55, p.255-263, 2009.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 5. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2013
- TAVARES, W.S.; CRUZ, I.; PETACCI, F.; ASSIS JÚNIOR, S.L.; FREITAS, S.S.; ZANUNCIO, J.C.; SERRÃO, J.E. Potential use of Asteraceae extracts to control *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and selectivity to their parasitoids *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and *Telenomus remus* (Hymenoptera: Scelionidae). *Industrial Crops and Products*, v. 31, p. 384-388, 2009.
- TIFFIN, P.; GAUT, B. S. Molecular Evolution of the Wound-Induced Serine Protease Inhibitor Will in *Zea* and *Related Genera*. *Molecular Biology and Evolution*, Chicago, v. 18, p. 2092-2101, 2001.
- TRIGO, J.R. & SANTOS, W. Insect mortality in *Spathodea campanulata* Beauv. (Bignoniaceae) flowers. *Revista Brasileira de Biologia*, v.60, n.3, p.537-538, 2000.
- VASCONCELOS, I.M.; MORAIS, J.K.; SIEBRA, E.A.; CARLINI, C.R.; SOUSA, D.O.; BELTRAMINI, L.M.; MELO, V.M.; OLIVEIRA, J.T. SBTX, a new toxic protein distinct from soyatoxin and other toxic soybean [*Glycine max*] proteins, and its inhibitory effect on *Cercospora soja* growth. *Toxicon*, v.51, p.952-963, 2008.
- VERPOORTE, R.; HEIJDEN, V. D.; HOOPEN, H. J. G. MEMELINK, J. Review. Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of

fine chemicals. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands. Biotechnology Letters v. 21, p. 467–479, 1999.

WOLFSON, J. L.; MURDOCK, L. L. Potential Use of Protease Inhibitors for Host-Plant Resistance: a Test Case. Environmental Entomology, College Park, v.24, p.52-57, 1995.

XIE, Y.S.; ISMAN, M.B.; GUNNING, P.; MACKINNON,S.; ARNASON, J.T.; TAYLOR, D.R.; SÁNCHEZ, P.; HASBUN,C.; TOWERS, G.H.N. Biological activity of extracts of *Trichilia* species and the limonoid hirtin against lepidopteran larvae. Biochemical Systematics and Ecology, v.22, n.2, p.129-136, 1994.

ZHAOA, J.; DAVIS, B.; VERPOORTEC, R. Transduction do sinal de Elicitor que conduz à produção de metabolitos secundários da planta . Biotechnology Advances, v. 23, p. 283–333, 2005.

CAPÍTULO 1

Insecticidal activity of nectar from *Spathodea campanulata* P. Beauv on insect pests of soybean

ABSTRACT

Nowadays has been increasing the search for compounds of plant origin less harmful for human health and to the environment that are capable to control pests and agricultural diseases that attack important crops, such as soybean. Among the plant species with insecticidal activity one might mention the *Spathodea campanulata*. It is believed that the specie is an excellent source of insecticidal and herbicidal compounds and once in the environment it is highly invasive. Thus, objective of this study was verify the insecticidal effect, measure the oxidant activity and protein characterization of the nectar this species. Insecticidal tests were carried out on *Euschistus heros* (Fabr.), *Helicoverpa zea* (Boddie) and *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) and both tested samples (gross and dialysate nectar) were noticed significant toxic activity against these pests. In the protein characterization by SDS-PAGE and 2D-PAGE, it was noticed the presence of sets of spots that may be proteins or peptides, responsible for the insecticidal effect. As for the oxidant tests, both to the albumin degradation and to the TBARS test, the undenatured nectar showed a higher oxidant activity compared to denatured nectar. Therefore, it is possible to hypothesize that nectar of *S. campanulata* has insecticidal effect and such activity may be linked to the classes of proteins or peptides pro-oxidant present in its chemical composition.

Keywords

Insecticidal tests, nectar, protein characterization, oxidant tests

Atividade inseticida do néctar de *Spathodea campanulata* P. Beauv em insetos pragas de soja

RESUMO

Atualmente tem aumentado a busca por compostos menos nocivos a saúde humana e ao meio ambiente que possam ser capazes também de controlar pragas de importantes culturas, como no caso da soja. Dentre as várias espécies vegetais capazes de produzir compostos inseticidas no meio ambiente podemos citar a *Spathodea campanulata*. Acredita-se que devido a essa característica a espécie possa ser uma ótima fonte de compostos com capacidade inseticida e herbicida com interesse agrônômico. Assim, o estudo teve como objetivo avaliar a atividade inseticida e oxidante e caracterizar as proteínas presentes no néctar de *Spathodea campanulata*. Os testes inseticidas foram realizados utilizando as espécies de insetos *Euschistus heros* (Fabr.), *Helicoverpa zea* (Boddie) and *Anticarsia gemmatilis* (Hübner), em ambos os tratamentos, néctar bruto e dialisado, foi observado significativa atividade tóxica contra os insetos testes. Na caracterização protéica por SDS-PAGE e 2D-PAGE, foi possível observar a presença de conjuntos de pontos que podem ser proteínas ou mesmo peptídeos responsáveis pela atividade inseticida do néctar. Em relação aos testes oxidantes, tanto o teste de degradação de albumina como o teste TBARS apresentaram alta atividade do néctar não desnaturado quando comparado com a amostra de néctar desnaturado. Portanto, devido aos resultados obtidos é possível sugerir que o néctar de *S. campanulata* possua atividade inseticida e que tal efeito pode estar ligado às classes de proteínas ou peptídeos pró-oxidantes presentes em sua composição química.

Palavras-chave

Testes inseticidas, néctar, caracterização protéica, testes oxidantes

Introduction

The search for compounds able to control and protect against plant pests and resulting diseases has been one of the biggest challenges faced by humanity since the beginning of the agricultural age. Before the advent of pesticides, farmers solved their phytosanitary problems using natural insecticides extracted from plant leaves, bark, flowers or nectar. However, with the advance of agricultural technology these natural, insect control practices have been abandoned. The widespread use of pesticides have triggered countless phytosanitary problems, including development of insecticide resistance, mortality of non target species, ecosystem damage, residual accumulation in foods and toxic effects on humans and others organisms (Hernandez-Lambraño *et al* 2015). In addition, there is a considerable increase in acquisition costs and application of pesticides in the affected crops (Tavares *et al* 2009, Barbosa *et al* 2011).

Herbivorous insects are responsible for the annual destruction of crops to a great extent. Insect pests are capable of evolving into biotypes that can adapt to new situations and overcome the effect of toxic materials or natural plant defenses. One of the most important crops in the world is the soybean, which occupies about 32 million hectares in Brazil and is constantly affected by insect pests (Conab 2015). This wide cultivated area can be colonized by pests adapted to culture such as *Anticarsia gemmatalis* (Hübner 1818), *Helicoverpa zea* (Boddie 1850), and *Euschistus heros* (Fabricius 1798), among others. *A. gemmatalis* is the major soybean insect pest, occurring mainly in the growing regions of North and South America (Macrae *et al* 2005), and being responsible for high levels of defoliation and meristem damage when infestation is heavy (Crialesi-Legori *et al* 2014). *H. zea*, in the larval stage, is a major polyphagous agricultural pest, consuming a wide variety of crops such as cotton, tomato, corn and soybean (Reay-Jones & Reisig 2012). Another important soybean pest

is *E.heros*, an insect feeding on various plant structures, mainly fruits and immature seeds, affecting their quality, development and maturation (Timbó *et al* 2014). Due to the large amount of soybean pests, companies working with the crop have supported studies to control insect pests, especially by genetic improvement, biological control or plant derived insecticidal compounds (Batista *et al* 2007, Santos *et al* 2015).

A great arsenal of compounds is produced by plants as a strategic defense mechanism against insects. These compounds may be involved in the normal development of plants or act exclusively in an insecticidal protection system (Ibanez *et al* 2012). Natural chemical compounds are less harmful to human health and the environment, and have reduced negative effects caused by the uncontrolled application of agrochemicals (Vasconcelos *et al* 2006, Bettiol & Morandi 2009). In recent years, many proteins have been tested for repellent, deterrent, or lethal effects against insect pests (Carlini & Grossi-De-Sá 2002, Ibanez *et al* 2012, Vandenborre *et al* 2011). Some of these compounds seem to exert their insecticidal effect by oxidative mechanisms, forming reactive oxygen species and free radicals in insect guts (Barbehenn *et al* 2008). However, it is still unclear whether toxic activity can be directly attributed to these compounds or to the induction of oxidative stress.

The plants investigated to control insects and weeds are species with the potential capacity to produce substances from primary and/or secondary metabolism that affect the growth and development of invaders (Rice 1984, Blüthgen 2012). Within the group of primary metabolites with potential insecticide activity there are a few notable classes of proteins such as inhibitors of α -amylase, lectins and proteinase inhibitors (Falco *et al* 2001). Such compounds can generate several injuries on contact with insects, such as the inhibition of carbohydrate catalytic enzymes in the digestive tract and changing the growth rate and development of pests (Peumans & Van Damme

1996, Iulek *et al* 2000). Others studies have shown that reactive oxygen species (ROS) can be generated in response to these natural substances and cause severe injuries to the organism leading to death. One of the best known modes of action is by interaction with lipids in cell membranes, and generation of a destructive process known as lipid peroxidation (Grant & Loake 2000, Abdollahi *et al* 2004).

Spathodea campanulata is one of the plant species with a high potential for production of metabolites with insecticidal action. It belongs to the Bignoniaceae family, is native to equatorial Africa, and was introduced in Brazil as an ornamental tree (Trigo & Santos 2000). It is believed that the specie is an excellent source of insecticidal and herbicidal compounds and once in the environment it is highly invasive. In addition, it is known to produce toxic substances capable of killing predator insects (Gis, 2005). In this context, a possible oxidative activity due to natural compounds present in the nectar of *S. campanulata* was analyzed in insect pests of soybean. In addition, the proteins present in the nectar were quantified.

Materials and Methods

Collection and preparation of nectar Spathodea campanulata

The nectar was collected in fully opened flowers from *S. campanulata* grown in the urban perimeter region of Bela Vista do Paraíso city, Paraná state (23°00'57.3"S and 51°11'28.4"W). Seven days before collection, plants were randomly selected and their inflorescences packed to protect them from wind, rain and predators. From nine plants, about 0.5 ml of nectar was collected using a Pasteur pipette. After this procedure, the nectar was pooled, frozen, and a portion lyophilized for use in protein analysis.

Gross nectar dialysis and denaturation

Dialysis was performed in 25 mm x 16 mm (Inlab[®], US) membrane, with a cut off molecular weight of 10 kDa, solubilized in deionized water for 24 hours. After the procedure, the dialysate was frozen and stored for use in insecticidal activity assays.

Denaturation of gross nectar was carried out in a water bath for about 20 min at 80 °C.

Insecticidal tests

*Insecticidal activity on *Euschistus heros* (Fabr.)*

E. heros nymphs of 3–5 instar stage were provided by the Agronomic Institute of Campinas (IAC) and feed *Phaseolus vulgaris* L. (jack bean) plants were sprayed with gross nectar, dialysate nectar or control (distilled water). After these procedures, 15 nymphs were put into polyethylene experimental units (boxes of 10 x 11 cm), with food plants (jack bean as described above) and kept under controlled luminosity, temperature and humidity. The test was conducted in a randomized design with four replications for each of the experimental groups, including the control. The mortality of nymphs was assessed daily up to 15 days.

The percentage mortality was calculated as the number of dead insects/total number of insects x 100.

*Insecticidal activity on *Helicoverpa zea* (Boddie) and *Anticarsia gemmatalis* (Hübner)*

Twenty caterpillars of *A. gemmatalis* and *H. zea* were randomly individualized in Petri dishes (60 x 15 mm) and fed a diet as proposed by Greene *et al* (1976) and Navarro (1987). Food was sprayed with gross nectar, dialysate nectar or control

(distilled water) before use and changed every two days. The mortality index was assessed every two days up to day 30 of the experiment.

The percentage mortality was calculated as the number of dead insects/total number of insects x 100.

Statistical treatment

Statistical analysis was performed using the Shapiro-Wilks normality test and the Levene homogeneity test. The data were normally distributed and the variances were homogeneous, therefore the data were analyzed using the parametric ANOVA and Tukey tests ($\alpha = 0.05$). These tests were performed using BioEstat 5.0 software.

Oxidant tests

Albumin degradation oxidative test

The test was adapted from the methodology proposed by Hsieh *et al* (2005). Briefly, bovine serum albumin (2 mg mL^{-1}) was diluted in phosphate buffered saline (PBS) (10 mM, pH 7.4) and incubated with Cu^{2+} (2 mM) at 37°C for 2 days in the presence of 500 μl of gross nectar, denatured nectar, 5 mM hydrogen peroxide solution (positive control) or BSA solution (110 $\mu\text{g/ml}$) in phosphate buffer (negative control). Electrophoresis was carried out using polyacrylamide (12% acrylamide and 5% gel packaging) gel electrophoresis (SDS-PAGE) according to established techniques (Encor Biotechnology Inc[®], US). The oxidant activity was evaluated by comparing the treatments with the negative control (PBS + BSA).

Evaluation of oxidant potential in the production of reactive species with thiobarbituric acid (TBARS)

A thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) test was performed to quantify the level of lipid peroxidation according to the method described by Costa *et al* (2012). Egg yolks were homogenized (1%, w/v) in 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) and used as a lipid rich substrate (Guimarães *et al.*, 2010). A half milliliter of homogenate was sonicated and added to 0.1 mL of gross nectar (1%, 5% and 10%), denatured nectar (1%, 5% and 10%) and negative control with 140 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox). Lipid peroxidation was induced by adding 0.1 mL of a solution of 2,2'-azobis (2-amidino- propane) hydrochloride (AAPH, 0.12 M) (positive control) and incubation in water bath at 37°C for 30 min. After cooling, 0.5 mL of trichloroacetic acid (15%) and 0.5 mL of thiobarbituric acid (0.67%) was added and the mixture was heated at 97°C for 15 min. The samples were centrifuged with 1 mL of n-butanol at 1200 rpm for 10 min, cooled and absorbances measured at 532 nm. The results are expressed as percentage of TBARS ($A_{\text{control}} - A_{\text{sample}} \times 100/A_{\text{control}}$), where A_{control} : is the absorbance obtained with AAPH and A_{sample} : absorbances from treatments and negative control.

Protein characterization

Precipitation of the gross nectar

For better purification and concentration of proteins, 1 mL of gross nectar was mixed with 4 ml of 80% acetone, vortexed and kept for 2 hours in a refrigerator at 3 °C (Lanças *et al* 2003). The supernatant was dried under nitrogen flow, resuspended in PBS (10 mM, pH 7.4) and stored at -10°C.

Protein content

Protein content was quantified in gross, dialyzed, lyophilized and precipitated nectar samples using the method described by Bradford (1976). Bovine serum albumin was used as standard and the results expressed in mg of albumin per ml of PBS buffer (10 mM, pH 7.4).

Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

After the quantification of total protein, samples were solubilized in 4X sample buffer [Tris base 0.5 M pH 6.8; SDS 10%; beta-mercaptoethanol; glycerol; bromophenol blue and distilled water]. The gel was made according to the method of Laemmli (1970), which consists of a separating gel containing 10% acrylamide, SDS 10%, Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, APS 10% and TEMED, and concentration gel containing 3% acrylamide, SDS 10%, Tris-HCl 1 M pH 6.8, APS and TEMED. Fifteen microliters of each sample was applied to the electrophoresis gel and the run was performed under constant voltage (100 volts) at room temperature for 2 hours. After the run, the gel was stained with a solution of Coomassie Brilliant Blue R-250.

Two-dimensional electrophoresis - 2D-PAGE

Lyophilized nectar samples were subjected to 2D polyacrylamide gel electrophoresis because of its higher concentration and better resolution compared with SDS-PAGE. Aliquots of 212 mg of the nectar were resuspended and the total concentration was determined using the kit ToPA (Biosciences[®], US). Then, 120 ug of total protein was transferred to test tubes and proteins were precipitated using the ToPREP kit (Biosciences[®], US) for removing sugars and other interfering substances. The precipitated sample was resuspended in 50 ul buffer ToPI-DIGE (Biosciences[®],

US) and used for 2D-PAGE. For the first dimension we used a strip IPG (gradient of immobilized pH in the polyacrylamide gels) of pH 3–10, 24cm, at 30 volts. Then, proteins were focused at 8000 V for a total of 65000 V/h. In the second dimension, strips were equilibrated under reduction and the run was conducted in a 12,5% polyacrylamide gel of 24 x 20 cm for about 4 hours. The gel was fixed overnight and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. The stained gel was scanned using a Typhoon Digital Imager, and the image obtained was analyzed to detect and record the spots using Biological Variation Analysis (BVA), a module of the DeCyder software v 6.5.

Results

Protein content

Total protein present in samples was calculated using a standard curve obtained by reading of different samples concentrations and BSA ($y = 0.012 + 0.027x$; $R^2 = 0.991$). The gross nectar concentration of total protein was $95.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ and the dialyzed nectar concentration was $10.0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Insecticidal tests

Insecticide tests showed similar toxicities over all groups treated with gross or dialyzed nectar, independent of the species of insect (Table 1). Nectar samples showed statistical differences when compared with the control group. In testing conducted with *Euschistus heros* the gross nectar showed a percentage of mortality of 60%, dialysate nectar 35% and control 20%. Similar results were observed for the test with *Helicoverpa zea*, where gross nectar presented the highest percentage of mortality (80%), followed by dialysate nectar (55%) and control (25%). In the test carried out

with *Anticarsia gemmatalis* no difference was observed between gross and dialysate nectar (50% mortality for both). However, both nectar samples were efficient when compared to control (20%).

Table 1 Mortality index of *Euschistus heros* (Fabr.), *Helicoverpa zea* (Boddie) and *Anticarsia gemmatalis* (Hübner).

Treatments	Mortality*		
	<i>E. heros</i>	<i>H.zea</i>	<i>A. gemmatalis</i>
Gross nectar	12 ± 3 ^a	16 ± 2 ^a	10 ± 1 ^a
Dialysate nectar	7 ± 2 ^b	11 ± 2 ^b	10 ± 1 ^a
Control	4 ± 2 ^c	5 ± 2 ^c	4 ± 2 ^b

*Data are expressed as the mean of three replicates ± SD, (n = 20). Means within a column followed by the same letter are not significantly different (Tukey's test, p < 0.05).

Evaluation of oxidant potential in the production of reactive species with thiobarbituric acid (TBARS)

The quantification of TBARS showed that different concentrations of undenatured nectar of *S. campanulata* had a significant oxidative effect, since the results of treatments with 5% and 10% concentrations did not differ from the AAPH result (Fig 1). No significant oxidative activity was observed using different concentrations of denatured nectar. The highest concentration (10%) presented a similar oxidation percentage with the lowest percentage of undenatured nectar (1%) and negative control (Trolox).

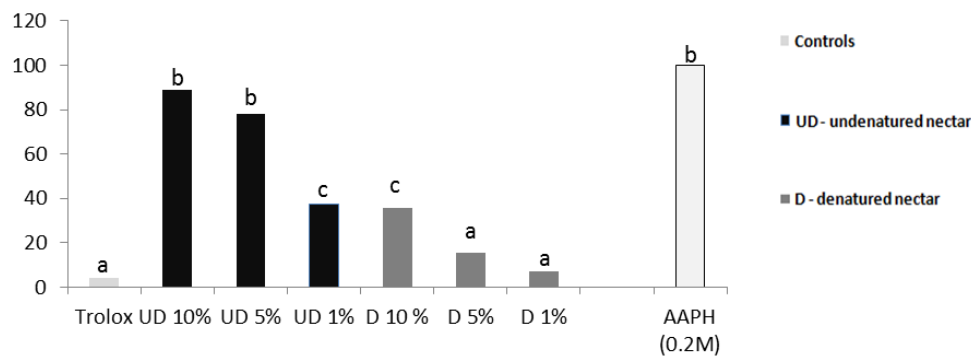


Fig 1 Data is expressed as % TBARS oxidation compared to a positive control (AAPH). The experiment was performed in triplicate. Means with same letter do not differ significantly by Tukey's test ($\alpha=0.05$).

Albumin degradation oxidative test

Oxidative analysis of albumin degradation in a polyacrylamide gel showed high oxidant activity in undenatured nectar (Fig 2). This activity can be observed when comparing the bands for the treated group (BSA + Cu + undenatured nectar) with the positive control (BSA + Cu + hydrogen peroxide) and BSA + Cu. Denatured nectar + BSA + Cu had a lower oxidative activity when compared to undenatured nectar.

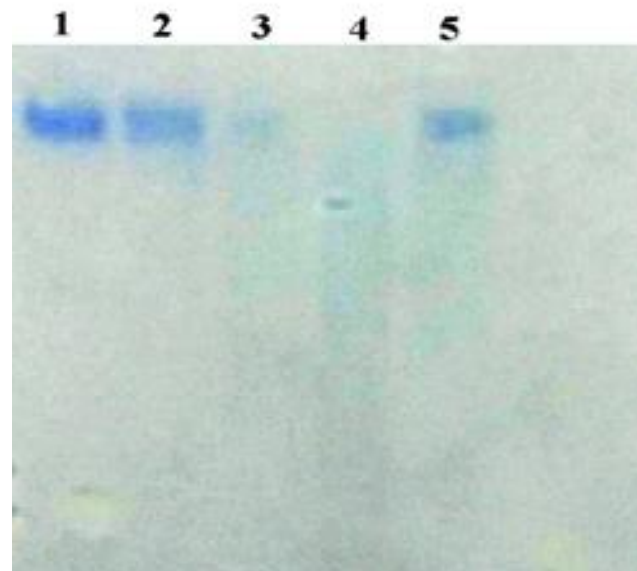


Fig 2 Oxidative analysis of albumin degradation in a polyacrylamide gel stained by Coomassie Brilliant Blue. 1) BSA (negative control); 2) BSA + Cu; 3) BSA + Cu + hydrogen peroxide (positive control); 4) BSA + Cu + undenatured nectar; 5) BSA + Cu + denatured nectar.

Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Before carrying out SDS-PAGE electrophoresis, the total protein content of gross, lyophilized and precipitated nectar was determined as $109.2 \mu\text{g mL}^{-1}$, $784.4 \mu\text{g mL}^{-1}$, and $412.7 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. SDS-PAGE analysis (Fig 3) showed that different nectar preparations had a very similar protein profile. According to this analysis it is possible observe three major bands with molecular masses of approximately 38kDa, 76kDa and a more intense band at 225kDa in all samples. Based on the results obtained in this test, lyophilized nectar was subjected to 2D-PAGE.

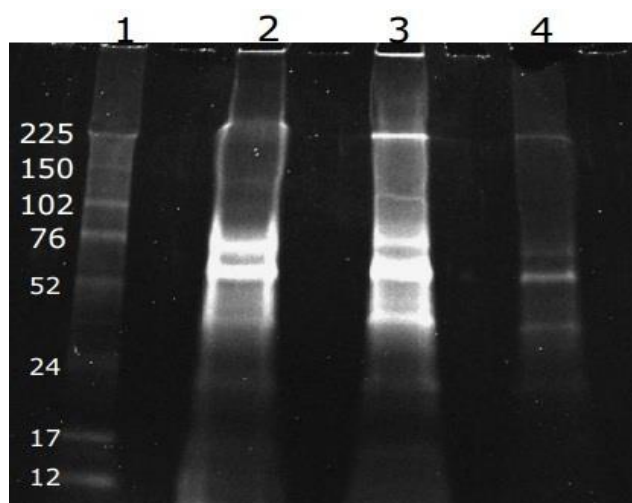


Fig 3 Electrophoretic analysis of nectar of *S.campanulata* in the polyacrylamide gel stained with Coomassie Brilliant Blue. 1-molecular marker (kDa); 2-lyophilized nectar; 3- precipitate nectar; 4- gross nectar.

Two-dimensional electrophoresis - 2D-PAGE

In the two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis each spot identified can be considered as a possible protein candidate. The detection performed using DeCyder BVA software, and according to the analysis it was possible to detect a total of 51 spots (Fig 4A). Despite the results obtained (Fig 4A), most of the detected spots are probably artifacts and not legitimate proteins. It is clear that only some identified

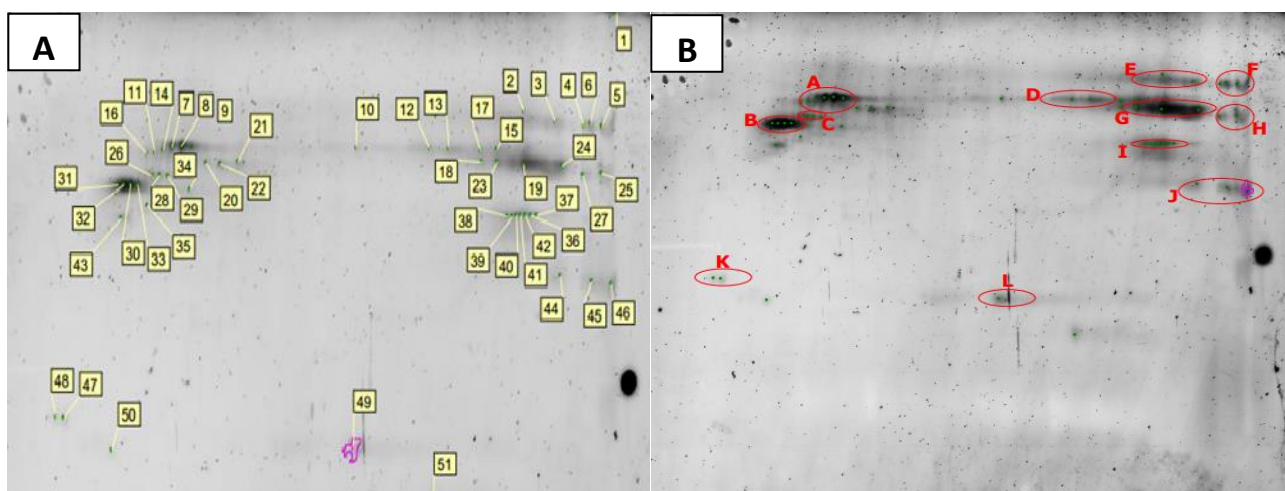


Fig 4 A) All 51 spots assigned as possible protein candidates detected by DeCyder BVA software. B) Identification of subsets most likely to be proteins.

Discussion

Plants have evolved sophisticated defense mechanisms against insects and associated diseases. Nectar, leaves, bark and seeds may accumulate defensive compounds that confer resistance against phytophagous predators and infection by microorganisms. The insecticide tests with *Euschistus heros*, *Helicoverpa zea* and *Anticarsia gemmatilis* demonstrated a toxic effect of gross and dialyzed nectar against all groups. A similar effect was observed with other insects such as *Plebeia droryana*, *Tetragonisca angustula*, *Scaptotrigona postica*, *Trigona spinipes* and *Friesella schrottky* present in the inflorescences of *S.campanulata* (Nogueira-Neto 1997). In other research related to the toxicity of nectar, carried out by Portugal & Araújo (1963), in a single inflorescence of *S. campanulata* 200 dead insects were observed, among them ants, bees and flies.

Characterization of plant constituents is essential to the management of pest control and the insecticide effects may be due to compounds of secondary metabolism and/or classes of peptides and proteins. These compounds are frequently associated with protection against herbivores, a characteristic described in many plant species producing

nectar (Adler 2000). Cintra *et al* (2005) hypothesized that plant-insect interactions, such as between flower and pollinators (nectar action) should be studied together and not separately, as many particularities of selection occur in both interactions.

Chemical compounds (secondary metabolites and some classes of proteins) with insecticide effect can confer biochemical protection for plants by inducing the production of reactive oxygen species (ROS) that can act negatively on insect metabolism when they come in contact (Doke *et al* 1996, Seo *et al* 2013). The results obtained after TBARS quantification and in the oxidative analysis of albumin degradation suggest that the insecticide action may be linked to chemical compounds in the nectar of *S. campanulata*. The active compound may be a protein, since denatured nectar was less effective compared with undenatured nectar in both tests. Grant & Loake (2000) reported that reactive oxygen species (ROS) when present in plant tissues may lead to the death of plant pathogens by mechanisms that affect nutrient absorption, respiratory activity, and synthesis of proteins and enzymes, among other metabolic functions (Lima *et al* 2009).

Another study supportive of this idea was carried out by Seo *et al* (2013) who showed that despite the presence of large amounts of sugars such as sucrose, glucose and fructose, the floral nectar also has some classes of proteins in their chemical composition, such as nectarines (Naqvi *et al* 2005). It is believed that nectarines are not involved in attracting pollinators but in defense against the proliferation of microorganisms in the nectar. A large part of this defense acts through the production of strong oxidants such as hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical ($OH\bullet$), singlet oxygen (1O_2), superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$) and a consequent excess of strong oxidants may not only reduce microorganisms but also some insect classes (Nicolson *et al* 2007). Among the different classes of strong oxidants, we can highlight hydrogen peroxide, a

ROS described in the literature as being highly toxic to plant pathogens. In the presence of iron, H₂O₂ gives rise to the hydroxyl radical, an extremely reactive compound when present in insect metabolism. In addition, H₂O₂ is also involved in the biosynthesis of salicylic acid, known for its antibacterial, antifungal and insecticide activity.

One of the classes of chemical compounds that may be associated with biochemical defense, are pre-formed proteins (Carozzi & Koziel 1997, Falco *et al* 2001). The insecticide activity of proteins was described in a study carried out with *Canavalia ensiformis*, *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera) and *Myzus persicae* (Hemiptera), as well as in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) (Ferreira-da-Silva *et al* 2000). The authors reported that this insecticide effect was possibly due to large amounts of a protein found mainly in the reserve organs, lectins. These proteins are considered important metabolites and can act in defense mechanisms against insects and pathogens because they cause degenerative effects on epithelial cells of the digestive system of insects. Thus they are able to paralyze insect digestion and cause death by malnutrition (Santos 2009, Tajne *et al* 2014). In SDS-PAGE we observed the presence of three major bands, the highest intensity band being at 52kDa. These bands indicate the presence of a protein with possible insecticidal effects, since an important insecticidal activity had already been observed in the nectar.

Based on the current results, we conclude that the nectar of *S. campanulata* has insecticidal activity and that this action may be promoted by proteins that directly affect the insects (a protein with oxidant activity) or indirectly by inducing the production of pro-oxidant substances. Further mass spectrometry analyses are necessary to identify each protein present in nectar.

Acknowledgments The authors thank UNESP and laboratory technician Maria Amábile Sanches. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 2012/24440-7) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 306151/2012-0)

References

- Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S, Rezaie A (2004) Pesticides and oxidative stress: a review. *Med Sci Monit* 10: 141-147
- Adler LS (2000) Alkaloid uptake increases fitness in a hemiparasitic plant via reduced herbivory and increased pollination. *Amer Nat* 156: 92-99
- Barbehenn RV, Maben RE, Knoester JJ (2008) Linking phenolic oxidation in the midgut lumen with oxidative stress in the midgut tissues of a treefeeding caterpillar *Malacosoma disstria* (Lepidoptera: Lasiocampidae). *Environ Entomol* 37: 1113-1118
- Barbosa FS, Leite GLD, Alves SM, Nascimento AF, D'avila VA, Costa CA (2011) Insecticide effects of *Ruta graveolens*, *Copaifera langsdorffii* and *Chenopodium ambrosioides* against pests and natural enemies in commercial tomato plantation. *Acta Sci Agron* 33: 37-43
- Batista JC, Burachik M, Rubinstein C (2007) Evaluación de inocuidad alimentaria de organismos genéticamente modificados. Criterios y recursos para su implementación, 1st ed. United Nations University Tokio, Buenos Aires
- Bettiol W, Morandi MAB (2009) Biocontrole de doenças em plantas: uso e perspectivas. Embrapa Meio Ambiente, São Paulo

- Blüthgen N (2012) Interação plantas-animais e a importância funcional da biodiversidade. Ecologia das interações plantas-animais: uma abordagem ecológico-evolutiva. Technical Books, Rio de Janeiro, pp 261-272
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principal of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248-254
- Carlini CR, Grossi-De-Sá M.F (2002) Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. Toxicon 40: 1515-1539
- Carozzi NB, Koziel MG (1997) Advances in insect control: the role of transgenic plants. Taylor & Francis, London
- Cintra P, Malaspina O, Bueno OC, Petacci F, Fernandes JB, Vieira PC, Silva MFGF (2005) Oral toxicity of chemical substances found in *Dimorphandra mollis* (Caesalpiniaceae) against honeybees (*Apis mellifera*) (Hymenoptera: Apidae). Sociobiol 45:141-149
- Conab - Companhia Nacional de abastecimento (2015) Séries históricas relativas às safras 1976/77 a 2013/2014 de área plantada, produtividade e produção brasileira. <http://www.conab.gov.br/>. Accessed 31 July 2015
- Costa DA, Oliveira GAL, Sousa DP, Freitas RM (2012) Avaliação do potencial antioxidante in vitro do composto ciano-carvona. Rev Ciênc Farm Básica 33: 567-75
- Crialesi-Legor PCB, Davolos CC, Lemes ARN, Marucci SC, Lemos MVF, Fernandes OA, Desidério JA (2014) Interação de proteínas Cry1 e Vip3A de *Bacillus thuringiensis* para controle de lepidópteros-praga. Pesq Agropec Bras 49: 79-87
- Fragoso DB, Jusselino Filho P, Pallini Filho A, Badji CA (2002) Action of organophosphate insecticides used to control *Leucoptera coffeella* (Guérin-

- Mèneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae) on the predator mite *Iphiseiodes zuluagai* Denmark & Muma (Acari: Phytoseiidae). Crop Protect 31: 463-467
- Doke N, Miura Y, Sanchez LM, Park HJ, Noritake T, Yoshioka H, Kwakita K (1996) The oxidative burst protects plants against pathogen attack: mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defence - a review. Gene 179: 45-51
- Falco MC, Marbach PAS, Pompermayer R, Lopes FCC, Silva-Filho MC (2001) Mechanism of sugarcane response to herbivory. Genet Mol Biol 24: 113-122
- Ferreira-da-Silva CT, Gombarovits ME, Masuda H, Oliveira CM, Carlini CR (2000) Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. Arch Insect Biochem Physiol 44: 162-171
- Gisp (El Programa Mundial sobre Espécies Invasoras) (2005) Sudamérica invadida: El creciente peligro de las especies exóticas invasoras. Cap Town, pp 80
- Grant JJ, Loake GJ (2000) Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. Plant Physiol 124: 21-30
- Greene GL, Leppla NC, Dickerson WA (1976) Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. J Econ Entomol 69: 487-488
- Guimarães AG, Oliveira GF, Melo MS, Cavalcanti SC, Antonioli AR, Bonjardim LR, Silva FA, Santos JP, Rocha RF, Moreira JC, Araújo AA, Gelain DP, Quintans-Júnior LJ (2010) Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. Basic Clin Pharmacol 107: 949-957
- Hernández-Lambraño R, Caballero-Gallardo K, Olivero-Verbel J (2014) Toxicity and antifeedant activity of essential oils from three aromatic plants grown in Colombia against *Euprosterna elaeasa* and *Acharya fusca* (Lepidoptera: Limacodidae). Asian Pac J Trop Biomed 4: 695-700

- Hsieh CL, Lin YC, Ko WS, Peng CH, Huang, CN, Peng, RY (2005) Inhibitory effect of some selected nutraceutic herbs on LDL glycation induced by glucose and glyoxal. *J Ethnopharmacol* 102: 357-363
- Ibanez S, Gallet C, Després L (2012) Plant Insecticidal Toxins in Ecological Networks. *Toxins* 4: 228-243
- Iulek J, Franco OL, Silva M, Slivinski CT, Bloch CJr, Rigden DJ, Grossi-de-Sá MF, (2000) Purification, biochemical characterization and partial primary structure of a new α -amylase inhibitor of common bean. *Entomol Exp Appl* 79: 309-315
- Lanças FM, Silva JCR, Bicudo RC, Neto MB (2003) A química analítica no proteoma. *Rev Analyt* 6: 60-67
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lima RK, Cardoso MG, Moraes JC, Melo BA, Rodrigues VG, Guimarães PL (2009) Atividade inseticida do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) sobre lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Amaz* 39: 377-382
- Naqvi SMS, Harper A, Carter C, Ren G, Guirgis A, York WS, Thornburg RW (2005) Nectarin IV, a potent endoglucanase inhibitor secreted into the nectar of ornamental tobacco plants. Isolation, cloning, and characterization. *Plant Physiol* 139: 1389-1400
- Navarro RV (1987) Comportamiento de emergencia y reproducción del gusano del jojoto (*Heliothis zea* Boddie). *Agron Trop* 37: 55-61
- Nicolson SW, Nepi M, Pacini E (2007) Nectaries and nectar. 1st ed. Springer, Netherlands

- Nogueira-Neto P (1997) Vida e criação das abelhas indígenas sem ferrão. 1st ed.
Nogueirapis, São Paulo
- Peumans WJ, Van Damme EJM (1995) Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol*
109: 347-352
- Portugal-Araujo V (1963) O perigo de dispersão da tulipeira do gabão (*Spathodea campanulata* Beauv.). *Chác Quint* 107: 562-563
- Reay-Jones FPF, Reisig DD (2012) Impact of corn earworm injury on yield of transgenic corn producing Bt toxins in the Carolinas. *J Econ Entomol* 3: 1101-1109
- Rice EL (1984) Allelopathy, 2nd ed. Academic Press, Orlando
- Santos AFS, Luz LA, Argolo ACC, Teixeira JA, Paiva PMG, Coelho, LCB (2009) “Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin”. *Process Biochem* 44: 504-508
- Santos VHM, Daneluzzi GS, Silva LP, Silva, RMG (2015) Evaluation of allelopathic potential of leaf extract of *Kielmeyera coriacea* on *Lactuca sativa* L. *Biosci J* 31: 259-267
- Seo PJ, Wielsch N, Kessler D, Svatoš A, Park CM, Baldwin IT, Kim SG (2013) Natural variation in floral nectar proteins of two *Nicotiana attenuata* accessions. *BMC Plant Biol* 13: 1-12
- Tajne S, Boddupally D, Sadumapati V, Vudem DR, Khareedu VR (2014) Synthetic fusion-protein containing domains of Bt Cry1Ac and *Allium sativum* lectin (ASAL) conferred enhanced insecticidal activity against major lepidopteran pests. *J Biotechnol* 171: 71-75
- Tavares WS, Cruz I, Petacci F, Assis Júnior SL, Freitas SS, Zanuncio JC, Serrão JE (2009) Potential use of Asteraceae extracts to control *Spodoptera frugiperda*

- (Lepidoptera: Noctuidae) and selectivity to their parasitoids *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and *Telenomus remus* (Hymenoptera: Scelionidae). Ind Crop Prod 31: 384-388
- Timbó RV, Lima-Herms M, Silva LP, Mehta A, Moares MCB, Paula DP (2014) Biochemical Aspects of the Soybean Response to Herbivory Injury by the Brown Stink Bug *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae). Plos One 9: 1-10
- Trigo JR, Santos W (2000) Insect mortality in *Spathodea campanulata* Beauv. (Bignoniaceae) flowers. Rev Bras Biol 60: 537-538
- Vandenborre G, Smagghe G, Van Damme EJ (2011) Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. Phytochem 72: 1538-1550
- Vasconcelos GJN, Godin Junior MGC, Barros R (2006) Aqueous extracts of *Leucaena leucocephala* and *Sterculia foetida* to the control of *Bemisia tabaci* biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae). Ciênc Rural 36: 1353-1359

CAPÍTULO 2

Atividade antioxidante e caracterização fitoquímica de *Spathodea campanulata*

RESUMO

A busca por compostos naturais benéficos a saúde humana tem aumentado cada vez mais, o que tem levado o aumento de pesquisas direcionadas aos compostos antioxidantes. Dentre os antioxidantes naturais, os tocoferóis, vitamina C, carotenóides e compostos fenólicos são amplamente encontrados em vegetais. A *Spathodea campanulata* P. Beauv. é uma interessante espécie para ser estudada, uma vez que estudos fitoquímicos já relataram presença de compostos com atividade antioxidante em sua composição química e também por ser usada na medicina popular no combate de várias doenças. Devido às informações fitoquímicas e medicinais da espécie, o estudo teve como objetivo avaliar e identificar por meio de HPLC, alguns compostos com possível atividade antioxidantes presentes nas folhas, flores e néctar de espécie *S.campanulata*. Para a realização dos testes, amostras de folhas, flores e néctares foram coletadas em três diferentes regiões, Assis (22°38'53.2"S 50°25'12.8"W) Londrina (23°00'57.3"S 51°11'28.4"W) e Limeira (22°34'34.0"S 47°21'54.1"W). Os testes antioxidantes FRAP, DPPH e ORAC, independente do local de coleta, mostraram que as amostras de folhas tiveram os melhores resultados, seguidos das amostras de flores e néctares. Na quantificação do teor de fenóis totais foi observado o mesmo padrão, os maiores resultados para as folhas, seguido das flores e néctares, independente do local de coleta. Em relação à triagem fitoquímica por HPLC, nas amostras de folhas e flores foi observado predominância dos compostos fenólicos, ácido caféico, ácido ferúlico e rutina e em relação aos carotenóides foram a luteína, zeaxantina e β -caroteno. Em ambas as análises, as amostras folhas e flores apresentaram maior concentração quando comparadas com os néctares. De acordo com os resultados obtidos, acreditamos que a espécie *Spathodea campanulata* pode servir como uma fonte interessante de compostos secundários para indústrias da área alimentícia, farmacêutica e cosmetológica por apresentar compostos com atividade medicinal e antioxidantes em suas folhas e flores.

Palavras-chave

Antioxidantes, carotenóides, compostos fenólicos, HPLC, testes antioxidantes

Antioxidant activity and phytochemical characterization of *Spathodea campanulata*

ABSTRACT

The search for natural compounds beneficial to human health has increased more and more, that led the increased of researches of antioxidant compounds. Within the natural antioxidants we can cite the tocopherols, vitamin C, carotenoids and phenolic compounds widely found in plants. *Spathodea campanulata* P. Beauv. is an interesting species to be studied, since phytochemical studies reported the presence of compounds with antioxidant activity in their chemical composition and also because it is used in folk medicine to combat various diseases. Due to the phytochemical and medicinal informations about the species, the study aimed to evaluate and identify compounds by HPLC with antioxidant activity into leaves, flowers and nectars of *S.campanulata*. For the tests, samples of leaves, flowers and nectar were collected in three different cities, Assis (22°38'53.2"S 50°25'12.8"W) Londrina (23°00'57.3"S 51°11'28.4"W) e Limeira (22°34'34.0"S 47°21'54.1"W). The antioxidant tests FRAP, DPPH and ORAC, independent of the location, they showed that the leaf samples had the best results, followed by flowers and nectars. In the quantification of total phenolic content was observed the same standard, the greatest results were for the leaves, followed by flowers and nectars, regardless of the collection location. In relation the screening phytochemical by HPLC, in the samples of leaves and flowers were observed predominance of phenolic compounds caffeic acid, ferulic acid and rutin and for the carotenoids are lutein, zeaxanthin and β -carotene. In both analyzes, the leaves and flowers samples showed a higher presence of compounds compared with nectars. According to the results, we believe that *Spathodea campanulata* can be used as an interesting source of secondary compounds for industries of food, pharmaceutical and cosmetology because it has compounds with medicinal and antioxidant activities in their leaves and flowers.

Keywords

Antioxidants, carotenoids, phenolic compounds, HPLC, antioxidant tests

1- Introdução

Tem aumentando cada vez mais o interesse por estudos de compostos naturais oriundos de plantas capazes de produzir substâncias bioativas, principalmente quando esses compostos apresentam atividades benéficas à saúde humana, como por exemplo, a atividade antioxidante. Os compostos antioxidantes quando isolados e identificados podem vir a fazer parte do desenvolvimento e formulação de diversos produtos ligados a área alimentícia, cosmetológica e farmacêutica (Boligon et al., 2009; Zadra et al., 2012).

Atualmente, os antioxidantes são algumas das alternativas para prevenção de danos oxidativos nos seres vivos e até na diminuição da deterioração oxidativa em alimentos, pois esses compostos podem retardar as reações de degradação oxidativa, ou seja, reduzem a velocidade da oxidação por um ou mais mecanismos, como inibição de radicais livres e complexação de metais (Pietta, 2000; Silvia et al., 2010). Dentro dos antioxidantes naturais, os tocoferóis, vitamina C, carotenóides e compostos fenólicos, são amplamente encontrados em hortaliças, frutas, cereais e verduras (Asolini et al., 2006).

Antioxidantes têm sido isolados e identificados em inúmeras espécies, e dentre as várias encontradas no Brasil e no mundo, a família Bignoniaceae se destaca pela grande quantidade de trabalhos científicos e estudos relacionados com a capacidade antioxidantes (Lima et. al., 2003; Carvalho et. al., 2009).

Dentre as várias espécies presente na família Bignoniaceae podemos destacar a *Spathodea campanulata* P. Beauv., pois são vários os estudos científicos que relatam o uso de suas diferentes partes na medicina popular (Joly, 1985), como diurético,

antiinflamatório, no combate de doenças renais e complicações estomacais (Heim et al., 2012).

Estudos analíticos realizados com *S.campanulata* mostram que a espécie apresenta alto conteúdo de compostos secundário, sendo que algumas dessas classes identificadas são consideradas antioxidantes, como por exemplo, o ácido caféico, ácido ferúlico, flavonóides, antocianinas, saponinas e algumas classes de terpenos e esteróides (Niyonzima et al., 1999; El-hela, 2001a; El-hela, 2001b).

Devido às informações sobre o uso da espécie na medicina popular e estudos analíticos já realizados, o estudo teve como objetivo avaliar e identificar por meio de HPLC os compostos fenólicos e carotenóides com possível atividade antioxidante presentes nas flores, flores e néctar de espécie *S. campanulata*.

2- Material e métodos

2.1- Coleta do material vegetal

Os néctares, flores e folhas foram coletados de espécimes de *S. campanulata* localizados no perímetro urbano das regiões de Assis (22°38'53.2"S 50°25'12.8"W, clima predominante - subtropical úmida) Londrina (23°00'57.3"S 51°11'28.4"W, clima predominante - subtropical úmido) e Limeira (22°34'34.0"S 47°21'54.1"W, clima predominante - tropical de altitude). Sete dias antes da coleta, os espécimes de cada região foram escolhidos randomicamente por meio de sorteio. As flores e folhas foram coletadas e posteriormente secas em estufa de ar forçado em uma temperatura de 40°C até peso constante. As amostras secas foram trituradas em moinho de facas e o pó resultante foi armazenado em frascos plásticos escuros. O néctar foi coletado de flores completamente abertas usando uma pipeta de Pasteur, e todo conteúdo coletado foi liofilizado para posteriormente ser usado dos testes.

2.2 - Testes Antioxidantes

2.2.1 - Preparação das amostras

Alíquotas de 200 mg de néctar (liofilizado), flores e folhas (secas e pulverizadas) de cada região REGIAO foram pesadas e colocadas em tubos de ensaio onde foram diluídos com 2 mL de metanol (MeOH). As soluções foram homogeneizadas em vortex por 30 segundos e incubadas por 30 minutos em banho ultrassônico (Branson, Georgia, USA). Após centrifugação (1372 RCF) por 10 min, o sobrenadante foi coletado e armazenado em frasco âmbar. O substrato restante de cada amostra foi submetido a mais quatro processos de extração com MeOH (2 mL) e todo sobrenadante foi adicionado no mesmo frasco para cada uma das amostras. As fases metanólicas obtidas nas extrações foram filtradas com papel filtro (7 cm) três vezes para eliminação de todos sólidos. Após a filtragem, a fase metanólica (solução estoque) obtida foi utilizada nos testes antioxidantes, fenóis totais e nas análises para identificação de polifenóis via HPLC usando detector fotodiodo ou eletroquímico.

2.2.2 - Teste de ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

Os valores de ORAC foram determinados usando o AAPH (2,2'-azobis-2-methyl-propanimidamide, dihydrochloride) para geração do radical peroxil, como já descrito na literatura (Bolling et al., 2012). Previamente, as soluções estoques de flores e folhas foram diluídas em metanol (MeOH) em uma proporção de 1:20 (v/v) e as soluções estoques dos néctares foram diluídas em uma razão 1:10 (v/v). As amostras foram incubadas com AAPH 0,32M (2,2'-azobis-2-amidinopropano) e fluoresceína 10

μM por 70 min. A fluorescência foi monitorada no comprimento de onda de 485 nm de excitação e 520 nm de emissão utilizando um espectrofluorímetro FLUOstar OPTIMA (BMG LABTECH Inc., Cary, N.C., USA). Uma curva padrão construída no intervalo de 5 a 50 $\mu\text{mol Trolox L}^{-1}$ foi usada para determinar os valores de ORAC, com base na área sob a curva de resposta de cada amostra. Os resultados foram expressos em $\mu\text{M Trolox.mg}^{-1}$ por peso seco de folhas, flores e néctar.

2.2.3 - Teste FRAP (Ferric reducing ability of plasma)

O ensaio de FRAP determina a capacidade de antioxidantes doadores de elétrons em uma reação colorimétrica, onde o elétron doado irá reduzir o complexo Fe^{3+} - 2,4,6-tri-piridil-S-triazina para Fe^{2+} em pH 3,5 (Benzie e Strain, 1996). As soluções estoques de flores e folhas foram diluídas 1:20 (v/v) com metanol e as soluções estoques dos néctares foram usadas sem diluição. As amostras foram incubadas no escuro, em temperatura ambiente com reagente de FRAP por 1 hora e posteriormente, as leituras dos resultados foram feitas em espectrofotômetro Shimadzu (Scientific Instruments, Columbia, MD, USA) em 593 nm. Valores de FRAP foram calculados usando uma curva de Trolox cujo intervalo foi de 31.25 a 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os resultados foram expressos em $\mu\text{M Trolox.mg}^{-1}$ por peso seco de folhas, flores e néctar.

2.2.4 - Teste de DPPH

O teste de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) foi realizado de acordo com metodologia proposta por Brand-Williams e colaboradores (1995). Para a análise foram usadas as mesmas soluções estoque da análise do FRAP. O volume de 900 μL de DPPH na concentração de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foi misturado com 100 μL de cada uma das amostras e incubadas durante 30 min no escuro e temperatura ambiente. Os resultados foram mensurados em espectrofotômetro Shimadzu (Scientific Instruments, Columbia,

MD, USA) em 517 nm. Valores de DPPH foram calculados usando uma curva de Trolox cujo intervalo foi de 31.25 a 350 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os valores de absorbância foram convertidos em percentual de atividade antioxidante (AA%) usando a seguinte fórmula:

$$\text{AA\%} = [(A_B - A_A)/A_B] \times 100$$

onde A_B = absorbância do branco e A_A = absorbância das amostras.

2.3 - Fenóis totais

O método de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999) foi utilizado para determinação dos valores de fenóis totais das amostras de néctares, flores e folhas. Foram usadas as mesmas soluções para análise de FRAP e DPPH. O volume de 200 μL da solução de Folin-Ciocalteu a 10% e 800 μL de Na_2CO_3 a 700 mM foram misturados a 100 μL de cada uma das amostras e incubadas durante 1 hora no escuro e temperatura ambiente. Os resultados foram mensurados em espectrofotômetro Shimadzu (Scientific Instruments, Columbia, MD, USA) em 765 nm. Os valores foram calculados usando uma curva de ácido gálico (GAE) cujo intervalo foi de 0.0125 to 0.2 mg GAE mL^{-1} . Os resultados foram expressos em mg GAE. g^{-1} por peso seco de folhas, flores e néctar.

2.4 - Análise de polifenóis por HPLC/PDA

As amostras foram preparadas de acordo com a metodologia proposta por Escarpa e González (2001) e adaptada para nossas condições laboratoriais. As soluções estoques das folhas e flores foram diluídas nas proporções de 1:50 (v/v) e 1:20 (v/v) respectivamente, com metanol e os néctares não foram diluídos. O sistema usado foi o Dionex Ultimate 3000 HPLC (Dionex, Idstein, Germany) acoplado com um detector fotodiodo Ultimate 3000 e com o software Chormeleon para quantificar e qualificar os

compostos fenólicos. Foi usada uma coluna (Acclaim® 120), C18 5µm 120A (4.6 mm x 250 mm) para separação dos compostos. A coluna foi mantida a 40°C ao longo da análise e a detecção foi realizada em três comprimentos de onda (225, 280, 300 e 340 nm). O volume de injeção da amostra foi de 10 µL. A fase móvel (A) foi constituída de água acidificada com 1% de ácido fosfórico e a fase (B) de metanol. A identificação e quantificação dos compostos foram realizadas por meio da comparação do tempo de retenção e espectro de padrões purificados (Sigma Aldrich, Brazil).

2.5 - Análise de polifenóis por HPLC/ECD

As soluções estoques das folhas e flores foram diluídas nas proporções de 1:10 (v/v) e 1:4 (v/v) respectivamente, com a fase móvel A (75 mmol L⁻¹ de ácido cítrico e 25 mmol.L⁻¹ de acetato de amônio em 90% H₂O e 10% de acetonitrila) e os néctares não foram diluídos. O sistema usado foi o ESA Biosciences (Chelmsford, MA, EUA), que é constituído de duas bombas (modelo 582), amostrador automático (modelo 542) e um detector Coularray 5600 A. As amostras foram caracterizadas por um detector eletroquímico (ECD) e avaliadas de acordo com a metodologia proposta por Milbury e colaboradores (2006). A separação analítica dos compostos foi realizada em uma coluna Zorbax ODS C18 (4.6 x 150 mm, 3.5 µm) com um fluxo de 0,6mL min⁻¹ e as fases móveis A e B (75 mmol L⁻¹ de ácido cítrico, 25 mmol L⁻¹ de acetato de amônio em 50% H₂O e 50% de acetonitrila) por 68 min. O gradiente da fase móvel usado foi (% de solvente B): 1% (0–15 min), 1–10% (15–25 min), 10–80% (25–60 min), 80–10% (60–65 min), e 10–1% (65–68 min). As detecções foram obtidas por meio dos potenciais entre 60 a 720 mV. A identificação e quantificação dos compostos foram realizadas por meio da comparação do tempo de retenção e resposta eletroquímica de padrões purificados (Sigma Aldrich, USA).

2.6 - Análise de carotenóides por HPLC/PDA

2.6.1 - Preparo das amostras

Aproximadamente 200 mg de nectar liofilizado, folhas e flores (ambos em pó) foram colocado em tubos de ensaio 25 mm x 165 mm e sobrepostos com 2 mL de metanol, homogeneizados em vórtex por 30s e incubadas por 30 min em banho ultrassônico. Os tubos foram então centrifugados a 3500 rpm por 10 min e a fase MeOH transferida para um balão volumétrico de 10 mL. O pellet residual foi submetido a quatro processos similares de extração, utilizando tetrahidrofurano (2 mL em cada processo) e os sobrenadantes destas extrações foram adicionados ao balão volumétrico para atingir o volume final de 10 mL. Todo procedimento foi realizado em luz vermelha ou amarela.

2.6.2 - Análise por HPLC

Um volume de 1 mL de solução estoque de flores, folhas e néctares de cada cidade foram secas em nitrogênio gasoso e reconstituídos em 100 µL de etanol. Posteriormente, as amostras de folhas e flores foram diluídas em uma proporção 1:50 (v/v) com etanol e as amostras de néctar não foram diluídas. As amostras foram caracterizadas de acordo com métodos realizados por Chung et al. (2004). A fase reversa do HPLC consistiu em um sistema Waters 2695 Alliance (Waters Co., Milford, MA, USA), com uma coluna C30 (3µm, 150 x 4.6 mm; YMC, Wilmington, Carolina do Norte, EUA) e um detector fotodiodo Waters 2996. A fase móvel A foi composta por MeOH/MTBE/água (85:12:30, v/v/v, com 1,5% de acetato de amônio na água) e a fase móvel B em MeOH/MTBE/água (8:90:2, v/v/v, com 1% de acetato de amônio na água). A taxa de fluxo foi de 0,4mL/min. O gradiente das fases móveis foi a seguinte: (1) 100% do fase móvel A; (2) um gradiente linear de 45% de A e 55% de B, por 21 min;

(3) 1 min de espera no gradiente 45% A e 55% de B; (4) um gradiente linear de 5% de A e 95% de B, por 11 min; (5) 4 min de espera no gradiente 5% A e 95% de B; (6) retorno ao gradiente linear de 100% de A por 2 min; (7) 28 min de espera no gradiente 100% A. Os carotenóides foram monitorados nos comprimentos de onda de 445 e 455 nm. A identificação e quantificação dos compostos foram realizadas por meio da comparação do tempo de retenção e espectro de padrões purificados (Sigma Chemical).

2.7 – Análise estatística

Os resultados foram expressos em media $\pm$ desvio padrão. Foi aplicada uma análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste Tukey para avaliar a diferença entre os resultados nos testes antioxidantes e de fenóis totais aplicados nas amostras de folhas, flores e néctares. Todas as análises foram interpretadas pelo software R 2.14.1 para Windows. Os valores com $P < 0.05$ foi considerados estatisticamente significante.

3- Resultados

Na tabela 1 estão apresentados os resultados dos testes antioxidantes e fenóis totais das folhas, flores e néctar de *Spathodea campanulata* coletadas nas cidades de Assis, Londrina e Limeira. Na primeira cidade analisada, a amostra com os resultados mais significativos foi a folha que apresentou um valor de porcentagem de inibição de DPPH de 3,97 e os valores de FRAP e ORAC de 16,40 e 44,43 $\mu\text{M TEAC.mg}^{-1}$, respectivamente em relação ao conteúdo de fenóis totais, a folha apresentou um resultado de 6,28 mg GAE.g^{-1} , maior que as demais amostras analisadas.

Para as amostras coletadas em Londrina foi observado o mesmo que anteriormente, a folha também mostrou os resultados mais significativos, pois a amostra apresentou um valor de porcentagem de inibição de DPPH de 3,74 e os valores

de FRAP e ORAC de 14,71 e 40,37 $\mu\text{M TEAC.mg}^{-1}$, respectivamente. Em relação aos valores de fenóis totais, a folha apresentou valor de 5,82 mg GAE.g^{-1} maior do que o encontrado para flores e néctar. Assim como observado para as outras regiões, a folha coletada na região de Limeira apresentou resultados mais significativos, pois a amostra apresentou um valor de porcentagem de inibição de DPPH de 3,54 e os valores de FRAP e ORAC de 13,71 e 32,26 $\mu\text{M TEAC.mg}^{-1}$, respectivamente e para fenóis totais, folhas apresentaram conteúdo de 5,35 mg GAE.g^{-1} .

Tabela 1 - Capacidade antioxidante e fenóis totais de diferentes amostras de *Spathodea campanulata* coletadas nas cidades de Assis, Londrina e Limeira

Amostras		Assis		
	DPPH (% de inibição)	FRAP ¹ ($\mu\text{M TEAC mg}^{-1}$)	ORAC ¹ ($\mu\text{M TEAC mg}^{-1}$)	Fenóis totais ² (mg GAE.g^{-1})
Folha	3,976 $\pm$ 0,002 ^a	16,40 $\pm$ 0,001 ^a	44,43 $\pm$ 0,005 ^a	6,284 $\pm$ 0,002 ^a
Flor	2,396 $\pm$ 0,002 ^b	10,17 $\pm$ 0,001 ^b	30,07 $\pm$ 0,004 ^b	5,773 $\pm$ 0,001 ^b
Néctar	0,079 $\pm$ 0,001 ^c	0,281 $\pm$ 0,004 ^c	1,086 $\pm$ 0,007 ^c	0,249 $\pm$ 0,003 ^c
		Londrina		
Folha	3,740 $\pm$ 0,002 ^a	14,71 $\pm$ 0,003 ^a	40,37 $\pm$ 0,008 ^a	5,825 $\pm$ 0,002 ^a
Flor	2,056 $\pm$ 0,003 ^b	8,477 $\pm$ 0,002 ^b	27,54 $\pm$ 0,005 ^b	5,209 $\pm$ 0,002 ^b
Néctar	0,070 $\pm$ 0,001 ^c	0,243 $\pm$ 0,002 ^c	0,956 $\pm$ 0,002 ^c	0,239 $\pm$ 0,003 ^c
		Limeira		
Folha	3,540 $\pm$ 0,003 ^a	13,71 $\pm$ 0,002 ^a	32,26 $\pm$ 0,003 ^a	5,353 $\pm$ 0,003 ^a
Flor	1,804 $\pm$ 0,001 ^b	6,708 $\pm$ 0,002 ^b	23,29 $\pm$ 0,005 ^b	4,618 $\pm$ 0,002 ^b
Néctar	0,048 $\pm$ 0,001 ^c	0,178 $\pm$ 0,001 ^c	0,727 $\pm$ 0,001 ^c	0,219 $\pm$ 0,002 ^c

¹ A capacidade antioxidante foi expressa em $\mu\text{M Trolox(TEAC).mg}^{-1}$ de peso seco de folha, flor e néctar. ² Os fenóis totais foram expressos em $\text{mg de ácido gálico(GAE).g}^{-1}$ de peso seco de folha, flor e néctar. Os dados estão apresentados com média $\pm$ desvio padrão; médias que possuem a mesma letra dentro de determinada coluna não se diferem pelo testes de Tukey ($\alpha=0.05$).

Na análise dos polifenóis presentes nas amostras de folhas, flores e néctar utilizando HPLC com detector fotodiodo, foi possível observar a presença de 5 compostos para folhas, 8 para flores e 3 para o néctar, independente da cidade avaliada.

Entre as amostras de folhas, os compostos mais abundantes foram ácido caféico e rutina, nas flores foram ácido caféico e ácido clorogênico e na amostra de néctar foi possível identificar somente os ácidos caféico, p-cumárico e a vitexina, todos com concentração bem inferior aos demais encontrados nas folhas e flores, independente da cidade avaliada (Tabela 2).

Tabela 2 - Quantidade ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de material seco) de compostos fenólicos presentes em folhas, flores e néctar de *Spathodea campanulata* coletado em três diferentes cidades e analisado por HPLC/PDA.

Cidades	Amostras	Compostos fenólicos ($\mu\text{g.g}^{-1}$)								
		Ácido caféico	Ácido clorogênico	Ácido trans ferúlico	Ácido p- cumárico	Rutina	Ácido gálico	Isoorientina	Vitexina	Orientina
Assis	Folha	1128	ND	46.07	ND	1127	ND	ND	31.77	0.288
	Flor	571.4	857.1	55.09	535.6	ND	39.25	0.857	0.852	1.307
	Néctar	0.097	ND	ND	0.529	ND	ND	ND	0.012	ND
Londrina	Folha	961.9	ND	40.11	ND	1085	ND	ND	27.07	0.240
	Flor	532.3	696.4	33.03	488.0	ND	21.75	4.55	0.732	1.350
	Néctar	0.608	ND	ND	2.31	ND	ND	ND	0.021	ND
Limeira	Folha	750.1	ND	40.71	ND	1045	ND	ND	27.54	0.255
	Flor	336.0	406.2	33.00	305.0	ND	14.67	0.173	0.133	0.447
	Néctar	0.327	ND	ND	2.34	ND	ND	ND	0.008	ND

ND- não detectado

Na quantificação e identificação de compostos fenólicos das mesmas amostras, usando HPLC/DAD, foi possível observar a presença de 4 compostos para as folhas e flores e 3 para o néctar, independente da cidade estudada. Em relação a cada amostra, nas folhas foi possível observar maior concentração dos compostos rutina e ácido ferúlico, para as flores os mais abundantes foram os ácidos clorogênico e ferúlico e por fim, na amostra de néctar, que apresentou quantidades bem inferiores as outras amostras, ocorre o ácido p-coumárico como o mais abundante entre os três compostos identificados (Tabela 3). Ambos os detectores (PDA e ECD) foram eficientes na identificação e quantificação dos compostos fenólicos, porém alguns compostos foram identificados somente por um detector (Isoorientina, vitexina e orientina, no caso do fotodiodo e quercetina 3-glicosídeo para o eletroquímico) ou observados em ambas as triagens só que com diferentes concentrações, como por exemplo, a rutina e ácido caféico, isso se dá devido à natureza química do composto, que pode ser mais facilmente identificado e quantificado por um determinado detector.

Em relação à análise dos carotenóides existentes nas folhas, flores e néctares das três diferentes cidades (Assis, Londrina e Limeira) foi possível observar a presença seis compostos para as amostras de folhas e flores e 2 para os néctares coletados nas cidades de Assis e Londrina, e 3 compostos para as amostras de folhas, 2 para as amostras de flores e nenhum composto identificado para as amostras de néctar coletados na cidade de Limeira. Independente da cidade analisada, o composto mais abundante nas amostras de folhas foi a luteína (Assis - $178.9 \mu\text{g.g}^{-1}$; Londrina - $378.2 \mu\text{g.g}^{-1}$; Limeira - $186 \mu\text{g.g}^{-1}$), para as flores foi o trans-beta-caroteno (Assis - $32.32 \mu\text{g.g}^{-1}$; Londrina - $30.82 \mu\text{g.g}^{-1}$; Limeira - $4.29 \mu\text{g.g}^{-1}$). Em relação às amostras de néctar, o composto majoritário dentre os encontrado foi a trans-luteína para as cidades de Assis e Londrina (Tabela 4).

Tabela 3 - Quantidade ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de material seco) de compostos fenólicos presentes em folhas, flores e néctar de *Spathodea campanulata* coletado em três diferentes cidades e analisado por HPLC/ECD.

Cidades	Amostras	Compostos fenólicos ($\mu\text{g.g}^{-1}$)						
		Ácido gálico	Ácido clorogênico	Ácido caféico	Ácido p-cumárico	Rutina	Ácido ferúlico	Quercetina-3-glicosídeo
Assis	Folha	ND	ND	68.45	ND	238.4	1415	38.46
	Flor	ND	466.9	13.14	350.7	ND	410.4	ND
	Néctar	0.026	ND	0.109	1.401	ND	ND	ND
Londrina	Folha	ND	ND	61.03	ND	176.8	1351	35.92
	Flor	ND	438.4	13.85	353.8	ND	404.6	ND
	Néctar	0.020	ND	0.093	0.281	ND	ND	ND
Limeira	Folha	ND	ND	54.37	ND	143.5	1299	40.99
	Flor	ND	233.9	14.65	128.4	ND	327.9	ND
	Néctar	0.006	ND	0.051	1.435	ND	ND	ND

ND - não detectado

Tabela 4 - Quantidade ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de material seco) de carotenóides presentes em folhas, flores e néctar de *Spathodea campanulata* coletado em três diferentes cidades e analisado por HPLC/PDA.

Cidades	Amostras	Carotenóides ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)							
		Luteína	Trans-luteína	Zeaxantina	Criptoxantina	13 cis β -caroteno	Alfa-caroteno	trans-beta-caroteno	9-cis-beta-caroteno
Assis	Folha	178.9	ND	5.289	ND	4.457	13.32	62.75	8.575
	Flor	1.404	ND	ND	8.506	11.32	4.392	32.32	4.671
	Néctar	ND	0.064	ND	ND	ND	ND	0.051	ND
Londrina	Folha	378.2	ND	15.93	ND	8.793	27.44	114.3	16.11
	Flor	2.256	ND	2.711	8.255	5.452	4.609	30.82	ND
	Néctar	ND	0.051	ND	ND	ND	ND	0.032	ND
Limeira	Folha	186	ND	2.814	ND	ND	ND	7.059	ND
	Flor	3.246	ND	ND	ND	ND	ND	4.296	ND
	Néctar	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND - não detectado

4 - Discussão

Cosméticos, fármacos e alimentos com propriedades antioxidantes têm sido cada vez mais requisitado pelo mercado devido aos seus efeitos benéficos a saúde. Os vegetais possuem a capacidade de produzirem grande variedade de substâncias antioxidantes, que quando incorporados em suplementos alimentícios ou fármacos podem vir a suprir deficiências metabólicas e prevenir diversos tipos de doenças, como câncer e doenças degenerativas (Manach et al., 2005; Godzien et al., 2011). Devido a isso, muitas espécies vegetais têm sido investigadas, pois são importantes fontes de compostos antioxidantes, e uma das ferramentas mais usadas para identificar e quantificação os antioxidantes atualmente é a cromatografia líquida de alta eficiência (Andarwulan et al., 2012; Shah et al., 2014).

A avaliação da atividade antioxidante é um processo extremamente complexo, pois normalmente pode ser ocasionada por diversos mecanismos. Dessa forma, sempre é aconselhável o uso de mais de um teste na avaliação da capacidade antioxidante de materiais vegetais, pois os resultados de um único ensaio podem indicar apenas indícios de uma possível atividade e dificilmente esse material pode ser considerado de fato uma fonte confiável de compostos antioxidantes (Thaipong et al., 2006). Os resultados obtidos nos testes de DPPH, FRAP e ORAC com amostras de *S. campanulata* mostraram atividade antioxidante significativa em todos os testes, principalmente nas amostras de folhas e flores, sugerindo que de fato, a espécie produz compostos com atividade antioxidantes. Estudos realizados por Nazif (2007) e Heim et al (2012) relataram atividade antioxidante da espécie, sendo que no primeiro caso foi realizado testes com extrato metanólico de partes aéreas e no segundo caso foram utilizados extratos de flores e cascas do caule da espécie. Em ambos os casos, os autores acreditam que tal capacidade antioxidante é possível devido à presença de diversas

classes de compostos secundários na planta, principalmente ácidos fenólicos e flavonoides (Amusan et al., 1996; Banerjee e De, 2001).

Testes de avaliação de teor de compostos químicos realizados dentro da família das Bignoneaceae mostraram que o grupo vegetal apresenta uma gama de compostos em sua composição química e a classe mais abundante são dos compostos fenólicos (Andrade e Wiedenfeld, 2005). Os resultados do teste de fenóis totais apresentaram alta quantidade nas amostras de folhas e flores, diferente do que foi observado para os néctares, que não apresentaram resultados consideráveis. Tais resultados podem, de alguma forma, sustentar os resultados anteriores, já que os compostos fenólicos são substâncias conhecidas por apresentarem atividade antioxidante, principalmente às classes de ácidos fenólicos e flavonoides (Birt et al., 2001; Cartea et al., 2011). Apesar do método de Folin-Ciocalteu ser utilizado para quantificação de compostos fenólicos, o reagente pode interagir com outros constituintes químicos não fenólicos como carotenóides, aminoácidos, açúcares e vitamina C, sendo necessários testes mais sensíveis como a cromatografia líquida de alta eficiência para uma maior confiabilidade da composição química dos extratos em estudo (Antolovich et al., 2002; De Oliveira, 2009).

Investigações fitoquímicas realizadas com espécies da família Bignoneaceae mostraram a presença de muitas classes de metabólitos secundários, que vão desde taninos, flavonóides e ácidos fenólicos até compostos lipofílicos como carotenóides (De Oliveira et al., 2009; Antonisamy et al., 2012). Dentre os polifenóis identificados e quantificados nas análises em HPLC, independe do detector utilizado, podemos destacar os compostos, ácido caféico, ácido ferúlico e rutina, uma vez que, quando comparamos com estudos anteriormente realizados com a espécie em estudo é possível localizar tais substâncias. Um primeiro exemplo disso é o estudo realizado por

Ilodigwe et al (2010), onde eles demonstraram que as folhas da espécie *Spathodea campanulata* apresentam polifenóis em sua composição química, como por exemplo ácidos fenóis (ácido caféico, ácido ferúlico e ácido gálico) e algumas classes de flavonóides (kaempferol, quercetina, quercetina-3-glicosídeo e rutina). Já no caso de investigações realizadas com flores, foi possível identificar outras classes de polifenóis como taninos e alguns flavonóides, como quercetina e rutina (Banerjee e De, 2001).

Os dados experimentais obtidos na triagem de carotenóides mostraram a presença de luteína, zeaxantina e 13 cis β -caroteno, compostos muito conhecidos na literatura pela sua atividade medicinal (Tono et al. 2006). Nagaraja e Padma (2011) mostraram em seu estudo realizado com extratos foliares de *Millingtonia hortensis* Linn a presença de β -caroteno, uma importante classe de carotenos que também foi identificado nesse estudo em algumas amostras, mas na forma de 13 cis β -caroteno. Além disso, Tono et al. (2006) também demonstraram a presença de diversas outras classes de carotenóides por meio de testes fitoquímicos realizados com as espécies *Pyrostegia venusta* e *Tabebuia chrysantha*, os compostos identificados foram luteína, zeaxantina, criptoxantina e β - caroteno. Apesar de até o presente momento não ter estudos relatando a presença de carotenóides em extratos de *S. campanulata*, os estudos relatados anteriormente ajudam a explicar a grande quantidade de carotenóides encontrados nas amostras de folhas e flores analisadas nesse estudo, uma vez que quando comparamos os resultados de luteína e zeaxantina com os obtidos por Tono et al (2006) e Nagaraja e Padma, é possível ver que a espécie em estudo apresenta concentrações iguais ou até maiores.

Os resultados obtidos na cromatografia líquida de alta eficiência com amostras de folhas, flores e néctares de *Spathodea campanulata* complementam os resultados dos testes antioxidantes, uma vez que as folhas e flores que apresentaram as maiores

quantidades de compostos fenólicos e carotenóides foram também as que apresentaram as maiores atividade antioxidante independente da cidade analisada. Os polifenóis e os carotenóides são metabólitos secundários muito conhecidos devido as suas atividades antioxidantes e tais compostos quando presentes em alimentos como frutos, verduras e legumes podem apresentar atividades benéficas à saúde humana, como por exemplo, atividades antialérgica, antiarteriogênica, antiinflamatória, antimicrobiana, antitrombótica, cardioprotetora, dentre outras (De Oliveira et al., 2009; Andarwulan et al., 2012). Os resultados também complementam investigações já realizadas com a espécie *S. campanulata*, como no caso de extratos de flores e cascas da espécie, que demonstraram atividades diuréticas, antiinflamatórias e anti fúngicas para doenças de pele (Mendes et al., 1986) e os realizados com extratos foliares, que apresentaram grande eficiência no tratamento de doenças renais e inflamatórias (Dhanabalan et al., 2008), sugerindo que tais atividades benéficas a saúde esteja ligada com as altas concentrações de compostos fenólicos e carotenóides apresentadas nas amostras de folhas e flores.

Os resultados fitoquímicos e antioxidantes das amostras de néctar também complementam estudos anteriores, uma vez que pesquisadores acreditam que o néctar da espécie apresente compostos com atividade inseticida e oxidante (Amusan et al, 1996; Portugal-Araújo, 1997). Estudos de contagens de insetos mortos dentro de flores de *S.campanulata* mostraram a presença de diversas espécies de insetos, como *Plebeia droryana*, *Tetragonisca angustula*, *Scaptotrigona postica* e *Trigona spinipes* (Nogueira-Neto, 1997). Possivelmente as amostras de néctar apresentaram baixa atividade antioxidante e baixas concentrações de polifenóis e carotenóides devido à presença majoritária de compostos com atividade oxidativa, e não antioxidante.

O estudo demonstra que as amostras de folhas e flores de *Spathodea campanulata* das três regiões analisadas apresentam atividade antioxidante e alto teor de compostos fenólicos. Tais resultados são complementados pelas triagens fitoquímicas realizadas por HPLC, tanto para polifenóis como carotenóides, uma vez que os compostos fenólicos como ácido caféico, ácido ferúlico e rutina e os lipofílicos luteína, zeaxantina e β -caroteno são amplamente descrito na literatura científica como substância com atividade antioxidante. Dessa forma, acreditamos que a espécie *Spathodea campanulata* pode servir como uma fonte interessante de compostos secundários para indústrias da área alimentícia, farmacêutica e cosmetológica por apresentar compostos com atividade medicinal e antioxidantes em suas folhas e flores.

5 - Referências

- AMUSAN, O.O.G.; ADESOGAN, E.K.; MAKINDE, J.M. Antimalarial active principles of *Spathodea campanulata* stem bark. *Phytotherapy Research*, v.10, n.8, p.692-693, 1996.
- ANDARWULAN, N.; KURNIASIH, D.; APRIADY, R.A.; RAHMAT, H.; ROTO, A.V.; BOLLING, B.W. Polyphenols, carotenoids, and ascorbic acid in underutilized medicinal vegetables. *Journal of Functional Foods*, v.4, p.339-347, 2012.
- ANDRADE, C.A.; WIEDENFELD, H. Hypoglycemic effect of *Acosmium panamense* bark on streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v.90, p.217-20, 2004.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, v.127, p.183-198, 2002.
- ANTONISAMY, J.M.; APARNA, J.S.; JEEVA, S.; SUKUMARAN, S.; ANANTHAN, B. Preliminary phytochemical studies on the methanolic flower extracts of some selected medicinal plants from India. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v.2, p.79-82, 2012.
- ASOLINI, F.C.; TEDESCO, A.M.; CARPES, S.T. Atividade antioxidante e antimicrobiana dos compostos fenólicos dos extratos de plantas usadas como chás. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.9, n.3, p. 209-215, 2006.
- BANERJEE, A.; DE, B. Anthocyanins in some flowers of West Bengal. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Science*, v.23, p.600-604, 2001.
- BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, v.239, p.70-76, 1996.
- BIRT, D.F.; HENDRICH, S.; WANG, W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, v.90, p.157-177, 2001.
- BOLIGON, A.A.; PEREIRA, R.P.; FELTRIN, A.C.; MACHADO, M.M.; JANOVIK, V.; ROCHA, J.B.T.; ATHAYDE, M.L. Antioxidant activities of flavonol derivatives from the leaves and stem bark of *Scutia buxifolia* Reiss. *Bioresource Technology*, v.100, p.6592-6598, 2009.
- BOLLING, B.W.; CHEN, Y.Y.; KAMIL, A.G.; CHEN, C.Y. Assay dilution factors confound measures of total antioxidant capacity in polyphenol-rich juices Polyphenols, carotenoids, and ascorbic acid in underutilized medicinal vegetables. *Journal of Food Science*, v.77, p.69-75, 2012.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, v.28, p.25-30, 1995.

CARVALHO, C.A.; LOURENÇO, M.V.; BERTONI, B.W.; FRANÇA, S.C.; PEREIRA, P.S.; FACHIN, A.L.; PEREIRA, A.M.S. Atividade antioxidante de *Jacaranda decurrens* Cham., Bignoniaceae. Revista Brasileira de farmacognosia, v.19, p.592-598, 2009.

CARTEA, M.E.; FRANCISCO, M.; SOENGAS, P.; VELASCO, P. Phenolic compounds in Brassica vegetables. Molecules, v.16, p.251-280, 2011.

CHUNG, H.Y.; HELEN, M.R.; ELIZABETH, J.J. Lutein bioavailability is higher from lutein-enriched eggs than from supplements and spinach in men. The Journal of Nutrition, v.134, p.1887-1893, 2004.

DHANABALAN, R.; DOSS, A.; BALACHANDAR, S.; KEZIA, E.; JAGADEESWARI, M.; KARTHIK, M. In vitro Phytochemical Screening and Antibacterial Activity of Organic Leaf Extracts of *Spathodea campanulata* P. Beauv against Hospital Isolated Bacterial Strains. Ethnobotanical Leaflets, v.12, p.1022-28, 2008.

DE OLIVEIRA, A.C.; VALENTIM, I.B.; GOULART, M.O.F.; SILVIA, C.A.; BECHARA, E.J.H.; TREVISAN, M.T.S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. Química Nova, v. 32, n.3, p. 689-702, 2009.

EL-HELA, A. A. Phenolics from *Spathodea campanulata* Beauv. Leaves. Al-Azhar Journal of Pharmaceutical Sciences, v.27, p.152-162, 2001a.

EL-HELA, A. A. A new iridoid glucoside from *Spathodea campanulata* Beauv. leaves. Al-Azhar Journal of Pharmaceutical Sciences, v.27, p.115-120, 2001b.

ESCARPA, A.; GONZÁLEZ, M.C. Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. Analytica Chimica Acta, v.427, p.119-127, 2001.

GODZIEN, J.; CIBOROWSKI, M.; ÂNGULO, S.; RUPEREZ, F.J.; MARTÍNEZ, M.P.; SEÑORANS, F.J.; CIFUENTES, A.; IBAÑEZ, E.; BARBAS, C. Metabolomic approach with LC-QTOF to study the effect of a nutraceutical treatment on urine of diabetic rats. Journal of Proteomic Research, v.10, p.837-844, 2011.

HEIM, S.C.; GUARNIER, F.A. ; FERREIRA, D.T.; BRAZ-FILHO, R.; CECCHINI, R.; CECCHINI, A.L. Antioxidant activity of *Spathodea campanulata* (Bignoneaceae) extracts. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.14, n.2, p.287-292, 2012.

ILLODIGWE, E.E.; AKAH, P.A.; OKOYE, T.C.; OMEJE, E.O. Anticonvulsant effects of a glycoside isolated from the leaf of *Spathodea campanulata* P. Beauv. Journal of Medicinal Plants Research, v.4, n.18, p.1895-1900, 2010.

JOLY, A.B. Botânica. 7.ed. São Paulo: Editora Nacional, 1985. 723p.

LIMA, C.S.A.; AMORIM, E.L.C.; SENA, K.X.F.R.; CHIAPPETA, A.A.; NUNES, X. P.; AGRA, M.F.; CUNHA, E.L.; SILVA, M.S.; FILHO, J.M. Antimicrobial activity of

a mixture of two isomeric phenylpropanoid glycosides from *Arrabidaea harleyi* A.H. Gentry (Bignoniaceae). Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v.1, p.77-81, 2003.

MANACH, C.; WILLIAMSON, G.; MORAND, C.; SCALBERT, A.; RÉMÉSY, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. American Society for Clinical Nutrition, v.81, p.230-242, 2005.

MENDES, N.M.; SOUZA, C.P.; ARAÚJO, N.; PEREIRA, J.P.; KATZ, N. Atividade moluscicida de alguns produtos naturais sobre *Biomphalaria glabrata*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.81, p.87-91, 1986.

MILBURY, P.E.; CHEN, C.Y.; DOLNIKOWSKI, G.G.; BLUMBERG, J.B. Determination of flavonoids and phenolics and their distribution in almonds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.54, p.5027-5033, 2006.

NAGARAJA, M.S.; PADMAA, M.P. *Millingtonia hortensis* Linn. – a review. Pharmacology online, v.2, p.597-602, 2011.

NAZIF, N.M. Phytochemical and antioxidant activity of *Spathodea campanulata* P.Beauvois. growing in Egypt. Natural Product Sciences, v.13, n.1, p.11-16, 2007.

NIYONZIMA, G.; LAEKEMAN, G.; WITVROUW, M.; VAN POEL, B.; PIETERS, L.; PAPER, D.; CLERCQ, E.; FRANZ, G.; VLIETINCK, A. J. Hypoglycemic, anticomplement and anti-HIV activities of *Spathodea campanulata* stem bark. Phytomedicine, v.6, n.1, p.45-49, 1999.

NOGUEIRA-NETO, P. Vida e criação das abelhas indígenas sem ferrão. Primeira edição, Nogueirapis, São Paulo, 1997.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. Journal of Natural Products, Cincinnati, v.63, n. 7, p. 1035- 1042, 2000.

PORTUGAL-ARAÚJO, V. O perigo de dispersão da Tulipeira do Gabão (*Spathodea campanulata* Beauv.). Chácaras e Quintais, v.107, p.562-563, 1963.

SHAH, N.A.; KHAN, M.R.; SATTAR, S.; AHMAD, B.; MIRZA, B. HPLC-DAD analysis, antioxidant potential and anti-urease activity of *Asparagus gracilis* collected from District Islamabad. BMC Complementary and Alternative Medicine, v.14, p. 344-347, 2014.

SILVA, M.L.C.; COSTA, R.S.; SANTANA, A.S.; KOBLITZ, M.G.B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. Semina: Ciências Agrárias, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods in Enzymology, v.299, p.152-178, 1999.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; BYRNE, D.H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.19, p.669-675, 2006.

TINOI, J.; RAKARIYATHAM, N.; DEMING, R.L. Determination of Major Carotenoid Constituents in Petal Extracts of Eight Selected Flowering Plants in the North of Thailand. *Chiang Mai Journal of Science*, v.33, n.2, p.327-334, 2006.

ZADRA, M.; PIANA, M.; BRUM, T.F.; BOLIGON, A.A.; FREITAS, R.B.; MACHADO, M.M.; STEFANELLO, S.T.; SOARES, F.A.A.; ATHAYDE, A.L. Antioxidant activity and phytochemical composition of the leaves of *Solanum guaraniticum* A. St.-Hil. *Molecules*, v.17, p.12560-12574, 2012.