

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E ENSAIOS
BIOLÓGICOS DE *Syngonium podophyllum***

LENITA KAZUKO TOMITA

Araraquara - SP

2014

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

LENITA KAZUKO TOMITA

Caracterização fitoquímica e ensaios biológicos de
Syngonium podophyllum

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de
Graduação em Farmácia-
Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de
Araraquara, da Universidade
Estadual Paulista para obtenção
do grau de Farmacêutico-
Bioquímico.

Orientadora: Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado

Araraquara- SP

2014

DEDICATÓRIA

A minha família e amigos, que sempre estiveram ao meu lado, acompanhando-me em minha caminhada. Muito obrigada a todos.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá)

AGRADECIMENTOS

A minha família, em especial aos meus pais, Marcia e Celso, meus irmãos, Haroldo e Arnaldo e minha avó, Kazuka por todo apoio, incentivo, força e amor durante minha faculdade.

Agradeço a minha orientadora Prof^a. Dra Hérica Regina Nunes Salgado pela dedicação, paciência, ajuda e o conhecimento que me transmitiu durante todo este período.

À técnica do laboratório de Controle de Qualidade Maria de Fátima Rodrigues Moreti pela ajuda e conhecimento.

Às minhas amigas Camila, Maisa, Marina, Leandro e Monique por toda a alegria e companheirismo que tivemos durante toda a trajetória da faculdade, fazendo este momento ser inesquecível.

Aos companheiros do laboratório de Controle de Qualidade, Eliane Gandolpho Tótolli, Lucas Chierentin, Ana Carolina Kogawa, Flávia Fiorentino, Lucélia Magalhães da Silva, Joselene Corrêa e Thaís Harumi Sato, pelo espaço e momentos vividos.

Ao Laboratório de Farmacobotânica e Farmacognosia, e aos professores Luis Vitor Silva do Sacramento e André Gonzaga dos Santos, pelo espaço cedido no laboratório para realização do trabalho. Aos técnicos Victor Legramandi e Eduardo Santos pela paciência, cuidado e atenção.

À professora Maria Virgínia C. Scarpa, por ceder espaço do seu laboratório de Controle de Qualidade para realização de parte do trabalho.

Ao laboratório de Bioquímica e Enzimologia Clínica e ao professor Iguatemy Lourenço Brunetti pelo espaço cedido durante este trabalho.

À seção de graduação, em especial ao Alexandre por toda competência, atenção e eficiência.

Ao CNPq-PIBIC, pela ajuda financeira com bolsa de Iniciação Científica.

A todos aqueles que de forma direta ou indireta colaboraram para realização deste trabalho, meus agradecimentos.

Sumário

Resumo	6
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1 MATERIAL	13
2.2 EQUIPAMENTOS	16
2.3 MÉTODOS	17
2.3.1 Preparação dos extratos	17
2.3.2 Caracterização fitoquímica	19
2.3.3 Ensaaios biológicos	24
2.3.4 Avaliação da capacidade antioxidante	29
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	30
3.1.1 Extratos	30
3.1.2 Caracterização fitoquímica	30
3.1.3 Ensaaios biológicos	34
3.1.4 Avaliação da capacidade antioxidante	45
4. CONCLUSÃO	48
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

Resumo

O *Syngonium podophyllum* popularmente conhecido como singônio, planta-cabeça-de-flecha, ponta de seta videira, planta-pata-de-ganso ou nephthytis pertence ao gênero *Syngonium*, possui aproximadamente 33 espécies, é membro da família Araceae. São herbáceas sempre-verdes nativas das florestas de piso úmido da América Central e da América do Sul. Devido à sua tolerância a ambientes com pouca luz, o *Syngonium* é, em sua fase juvenil, cultivada como planta ornamental. Devido ao pouco estudo da referida planta, este trabalho teve como finalidade realizar ensaios fitoquímicos e ensaios biológicos para avaliar a atividade antimicrobiana, antioxidante e alelopática do extrato etanólico 70% e de suas frações diclorometano, acetato de etila e fração aquosa final das folhas de *Syngonium podophyllum*. O extrato vegetal foi preparado por turbólise a partir do pó de folhas secas trituradas, utilizando como solvente para extração o etanol 70%. O extrato etanólico foi fracionado com os solventes diclorometano e acetato de etila. O estudo fitoquímico não identificou a presença de alcaloides, saponinas, antraquinonas, flavonoides, taninos e glicosídeos cardiotônicos. Na avaliação antimicrobiana, o extrato e as frações nas concentrações de 100 mg/mL, 50 mg/mL, 25 mg/mL, 12,5 mg/mL, 6,25 mg/mL não apresentaram atividade frente aos micro-organismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Bacillus subtilis*. O extrato e as frações a 100 mg/mL apresentaram atividade alelopática significativa sobre a germinação e o crescimento das sementes de tomate, atividade importante, pois plantas com essa propriedade pode ser utilizada como inseticidas naturais ou até mesmo pode ser verificada sua atividade citotóxica frente a células tumorais. O resultado do teste com radical DPPH demonstrou que a fração acetato de etila apresentou maior capacidade antioxidante com IC₅₀ de 0,333, seguida pela fração diclorometano com IC₅₀ de 0,417, atividade em seqüestrar o radical DPPH maior comparada ao marcador ácido gálico utilizado como padrão, o qual apresentou IC₅₀ 0,500. O

extrato etanólico 70% exibiu IC₅₀ 0,500 e a fração aquosa final demonstrou menor capacidade antioxidante com IC₅₀ 0,625. No teste de redução de Fe³⁺ em Fe²⁺, conforme a concentração das amostras testadas foram aumentadas, o mesmo ocorria com a capacidade em reduzir o ferro. A fração final a 290-500 µg/mL apresentou maior poder de redução seguida pelo extrato etanólico, fração diclorometano e pela fração acetato de etila.

Palavras-chave: *Syngonium podophyllum*, atividade antimicrobiana, alelopatia, ação antioxidante, ensaios fitoquímicos.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. <i>Syngonium podophyllum</i>	11
Figura 2. Esquema de extração e fracionamento das folhas de <i>Syngonium podophyllum</i>	18
Figura 3. Esquema para teste de difusão em ágar.	25
Figura 4. Esquema para o teste da concentração inibitória mínima (CIM).....	27
Figura 5. Esquema do teste de germinação em sementes de tomateiro.....	28
Figura 6. Teste de flavonoides. Reação oxalato-bórica.....	31
Figura 7. Teste de flavonoides. Reação de Pew.....	31
Figura 8. Teste de taninos. Reação com gelatina.	32
Figura 9. Teste de antraquinonas livres. Reação de Borntraeger.	33
Figura 10. Teste de alcaloides. Reação com reagentes de Dragendorff, Bouchardat, Mayer, Bertrand.	33
Figura 11. Teste de saponinas. Teste de formação de espuma.	34
Figura 12. Teste de difusão em ágar com <i>S. epidermidis</i> . Onde (A) representa o extrato etanólico 70% (B) fração diclorometano, (C) fração acetato de etila e (D) fração aquosa final. Utilizando (1) ciprofloxacino 36 µg/mL e as concentrações do extrato e frações a (2) 100 mg/mL, (3) 50 mg/mL, (4) 25 mg/mL, (5) 12,5 mg/mL, (6) 6,25 mg/mL.	35
Figura 13. Teste de difusão em ágar com <i>S. aureus</i> . Onde (A) representa o extrato etanólico 70% (B) fração diclorometano, (C) fração acetato de etila e (D) fração aquosa final. Utilizando (1) ciprofloxacino 36 µg/mL e as concentrações do extrato e frações a (2) 100 mg/mL, (3) 50 mg/mL, (4) 25 mg/mL, (5) 12,5 mg/mL, (6) 6,25 mg/mL.	35
Figura 14. Teste de difusão em ágar com <i>B. subtilis</i> . Onde (A) representa o extrato etanólico 70% (B) fração diclorometano, (C) fração acetato de etila e (D) fração aquosa final. Utilizando (1) ciprofloxacino 36 µg/mL e as concentrações do extrato e frações a (2) 100 mg/mL, (3) 50 mg/mL, (4) 25 mg/mL, (5) 12,5 mg/mL, (6) 6,25 mg/mL.	36
Figura 15. Teste de difusão em ágar com <i>E.coli</i> . Onde (A) representa o extrato etanólico 70% (B) fração diclorometano, (C) fração acetato de etila e (D) fração aquosa final. Utilizando (1) ciprofloxacino 36 µg/mL e as concentrações do extrato e frações a (2) 100 mg/mL, (3) 50 mg/mL, (4) 25 mg/mL, (5) 12,5 mg/mL, (6) 6,25 mg/mL.	36
Figura 16. Teste de concentração inibitória mínima utilizando extrato etanólico 70% e a fração diclorometano em meio contendo <i>E. coli</i>	38
Figura 17. Teste de concentração inibitória mínima utilizando fração acetato de etila e a fração aquosa final em meio contendo <i>E. coli</i>	38
Figura 18. Teste de concentração inibitória mínima utilizando extrato etanólico 70% e a fração diclorometano em meio contendo <i>S. aureus</i>	38

Figura 19. Teste de concentração inibitória mínima utilizando fração acetato de etila e a fração aquosa final em meio contendo <i>S. aureus</i>	39
Figura 20. Teste de concentração inibitória mínima utilizando extrato etanólico 70% e a fração diclorometano em meio contendo <i>S. epidermidis</i>	39
Figura 21. Teste de concentração inibitória mínima utilizando fração acetato de etila e a fração aquosa final em meio contendo <i>S. epidermidis</i>	39
Figura 22. Teste de concentração inibitória mínima utilizando extrato etanólico 70% e a fração diclorometano em meio contendo <i>B. subtilis</i>	40
Figura 23. Teste de concentração inibitória mínima utilizando fração acetato de etila e a fração aquosa final em meio contendo <i>B. subtilis</i>	40
Figura 24. Teste de germinação com semente de tomateiro. (A) Controle, (B) extrato etanólico 70%, (C) fração diclorometano, (D) acetato de etila e (E) a fração aquosa final em concentração 100 mg/mL.	42
Figura 25. Pós teste de Tukey a partir de um teste ANOVA com nível de significância de 5%.	44
Figura 26. Gráfico de comparação da atividade antioxidante do padrão e marcador ácido gálico, extrato, fração diclorometano, fração acetato de etila e fração aquosa final exibidos através do sequestro do radical DPPH.....	45
Figura 27. Gráfico de valiação da capacidade antioxidante pela redução do Fe^{3+} em Fe^{2+}	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC - *American Type Culture Collection*

B.O.D. - Incubadora de demanda bioquímica de oxigênio

BHI - *Brain Heart Infusion*

CIM - Concentração inibitória mínima

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

EE-FA - Extrato etanólico 70% - Fração acetato de etila

EE-FD - Extrato etanólico 70% - Fração diclorometano

EE-FF - Extrato etanólico 70% - Fração aquosa final

IAL – Instituto Adolfo Lutz

IC₅₀ - Concentração necessária do antioxidante para reduzir em 50% o radical DPPH

UFC - Unidade formadora de colônia

1. INTRODUÇÃO

O *Syngonium podophyllum* (Figura 1) é membro da família Araceae. São herbáceas sempre-verdes nativas da floresta de solo úmido da América Central e da América do Sul (Croat, 1981). Na sua fase juvenil, suas hastes são rastejantes e as folhas são simples em forma de flecha. As plantas adultas são epífitas ou hemi-epífitas e as folhas são compostas com folhetos em forma elíptica. Devido à sua tolerância a ambientes com pouca luz, o *Syngonium* desde 1870 é, em sua fase juvenil, cultivado como planta ornamental (Chen, 2002), tomando-se o devido cuidado, pois normalmente plantas que pertencem à família das Araceae contêm oxalato de cálcio, componente considerado nocivo à saúde humana, substância também encontrada, por exemplo, em grande quantidade na arácea *Dieffenbachia seguine*, também conhecida como “Comigo-ninguém-pode”.



Figura 1. *Syngonium podophyllum*.

Entre as espécies reconhecidas, *Syngonium podophyllum*, é popularmente conhecido como singônio, planta-cabeça-de-flecha, ponta de seta videira, planta-pata-de-ganso ou nephthytis. A maioria é amplamente cultivada em vasos, cestos ornamentais ou

em escadarias (Henley e Robinson, 1993) e utilizada principalmente para decoração de interiores ou jardins de inverno (Griffith, 1998).

Estima-se que mais de 6 milhões de *Syngoniums* são propagadas *in vitro* por ano nos Estados Unidos (Kane, 1999), por estarem entre as mais populares plantas cultivadas e produzidas para indústria de folhagem ornamental (Henley e Robinson, 1993; Chen et al., 2002).

O *Syngonium podophyllum* foi tradicionalmente utilizado pelo povo Maia em Belize para preparar infusões, decocções, banhos ou cataplasmas utilizados pelas suas propriedades de cicatrização. Essas preparações foram também usadas como anti-inflamatórios para produzir alívio de várias afecções da pele, tais como feridas, queimaduras e erupções (Dominguez e Alcorn, 1985; Cáceres et al., 1987; Martinez e Pola, 1992; Di Stasi et al., 1994; Arvigo e Balik, 1998).

Estudos de atividade antiproliferativa de células foram realizados, na tentativa de encontrar compostos contra o câncer, pois inúmeros anti-inflamatórios são comumente utilizados para ambas as condições patológicas devido à semelhantes vias de sinalização (Stark et al., 2009). Recentemente na Índia, estudos demonstraram atividade citotóxica contra câncer pulmonar (Kumar et al., 2014).

Devido a poucos estudos encontrados na literatura, este projeto teve como finalidade realizar diversos estudos fitoquímicos e ensaios biológicos para avaliar o efeito alelopático, antioxidante e a atividade antimicrobiana das folhas de *S. podophyllum* para verificar quais os metabólitos secundários presentes no vegetal e presença de atividade biológica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

As folhas de *Syngonium podophyllum* foram coletadas no Campus da Faculdade de Ciências e Letras da Unesp Araraquara, em junho de 2011, foram submetidas à secagem em estufa de ar circulante à 40°C e pulverizadas em moinho de facas. A exsicata foi encaminhada para o Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo e sua identificação foi realizada pelo Dr. Eduardo Luis Martins Catharino.

Para a preparação do extrato e das frações foram utilizadas:

- Folhas secas e pulverizadas de *S. podophyllum*;
- Etanol 70%;
- Diclorometano;
- Acetato de etila.

Foram realizados ensaios fitoquímicos para identificação de flavonóides, saponinas, alcalóides, taninos, glicosídeos cardiotônico e antraquinonas utilizando os seguintes reagentes:

- Éter de petróleo (Synth);
- Metanol (Synth);
- Magnésio metálico;
- Ácido clorídrico concentrado (Synth);
- Acetona (Synth);

- Ácido bórico;
- Ácido oxálico;
- Zinco metálico;
- Solução metanólica de cloreto férrico a 2%;
- Solução de acetato de chumbo a 10%;
- Alumínio a 5% em etanol;
- Ácido clorídrico diluído;
- Solução de gelatina a 2,5%;
- Ácido acético 10%;
- Água deionizada;
- Cloreto férrico a 1% em metanol;
- Éter etílico (Synth);
- Amônia diluída;
- Carbonato de sódio a 10%, clorofórmio (Synth);
- Solução de ácido clorídrico a 2%;
- Reagente de Borntraeger;
- Reagente de Dragendorff;
- Reagente de Bouchardat;

- Reagente de Mayer;
- Reagente de Bertrand;
- Solução de fosfato ácido de sódio 10%;
- Sulfato de sódio anidro;
- Piridina;
- Solução de hidróxido de sódio 10%;
- Nitroprussiato de sódio 10%;
- Reagente Pesez A;
- Reagente Pesez B;
- Ácido sulfúrico concentrado (Synth).

Com o intuito de testar bactérias bacilos gram-positivos e gram-negativos, cocos gram-positivos e gram-positiva arranjada em cachos e tétrades foram utilizadas as bactérias e os reagentes:

- *Bacillus subtilis* ATCC 9372 IAL 1027;
- *Escherichia coli* ATCC 10536 IAL 2393;
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 IAL 1851 ;
- *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228;
- Ágar BHI;
- Ágar Mueller-Hinton;

- Salina 0,85%;
- Ciprofloxacino;
- Resazurina, como indicador de oxi-redução.

Para verificação de atividade alelopática foi necessário:

- Água deionizada;
- Sementes de tomateiro (Isla).

Para os dois ensaios antioxidantes foram utilizados os reagentes:

- *2,2-difenil-1-picril-hidrazila* (DPPH);
- Etanol absoluto (Synth);
- Solução tampão fosfato ph 6,6;
- Hexacianoferrato de potássio 1%;
- Ácido tricloroacético 10%;
- Cloreto férrico 0,1%;
- Água deionizada.

2.2 EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados para a realização dos ensaios foram:

- Agitador de tubos;
- Autoclave (Phoenix/AV50);
- Balança analítica (Bel Mark);

- Câmara de fluxo laminar;
- Espectrofotômetro UV/VIS (Hewlett Packard);
- Estufa de ar circulante (Soc.Fabbe LTDA mod. 170);
- Moinho de facas (Tecnal mod. E340);
- Evaporador rotatório (Marconi-MA120);
- Chapa de aquecimento (Marchesoni 1);
- Estufa microbiológica (Nova Ética);
- Luz UV;
- Turbo-extrator de aço inoxidável (Warning Commercial/ liquidificador 2 mixer);
- Micropipeta 100-1000 µl (Boeco);
- Micropipeta 20-200 µl (Bolco);
- Banho ultrasônico (Unique Ultrasonic Cleaner);
- Aparelho para obtenção de água ultra-pura (milliq).

2.3 MÉTODOS

2.3.1 Preparação dos extratos

A preparação do extrato e das frações está esquematizada na figura 2. Em aparelho turbo-extrator, 50 g da droga vegetal foram adicionados 200 mL de etanol 70% para extração durante 15 minutos, em baixa potência, para que não ocorresse aquecimento e as substâncias termolábeis fossem degradadas. Logo em seguida, o material foi filtrado a vácuo. Repetiu-se o procedimento três vezes para esgotamento da droga vegetal, totalizando 600 mL de etanol utilizado. O extrato foi concentrado até ser obtido o volume de 400 mL. Destes 400 mL, 100 mL foram levados em estufa a 40°C até a secura para ser obtido o extrato seco. Os 300 mL restantes foram submetidos a fracionamento com solventes de polaridade crescente: diclorometano e acetato de etila. Dessa forma,

obtiveram-se as frações EE-FD, EE-FA, respectivamente e a fração aquosa final, denominada EE-FF.

Em capela e utilizando funil de separação, em 300 mL do extrato hidro-etanólico, foram adicionados 300 mL de diclorometano; após agitação, as fases ficaram separadas. Esse método foi repetido três vezes, garantindo uma extração eficiente.

Após a retirada da fração de diclorometano, 300 mL de acetato de etila, foram adicionados à fase aquosa que permaneceu no funil de separação. Repetiu-se o método três vezes e dessa forma foi obtido a fração de acetato de etila e fração final. O extrato etanólico e as frações foram evaporados separadamente em evaporador rotatório em temperatura inferior a 40°C.

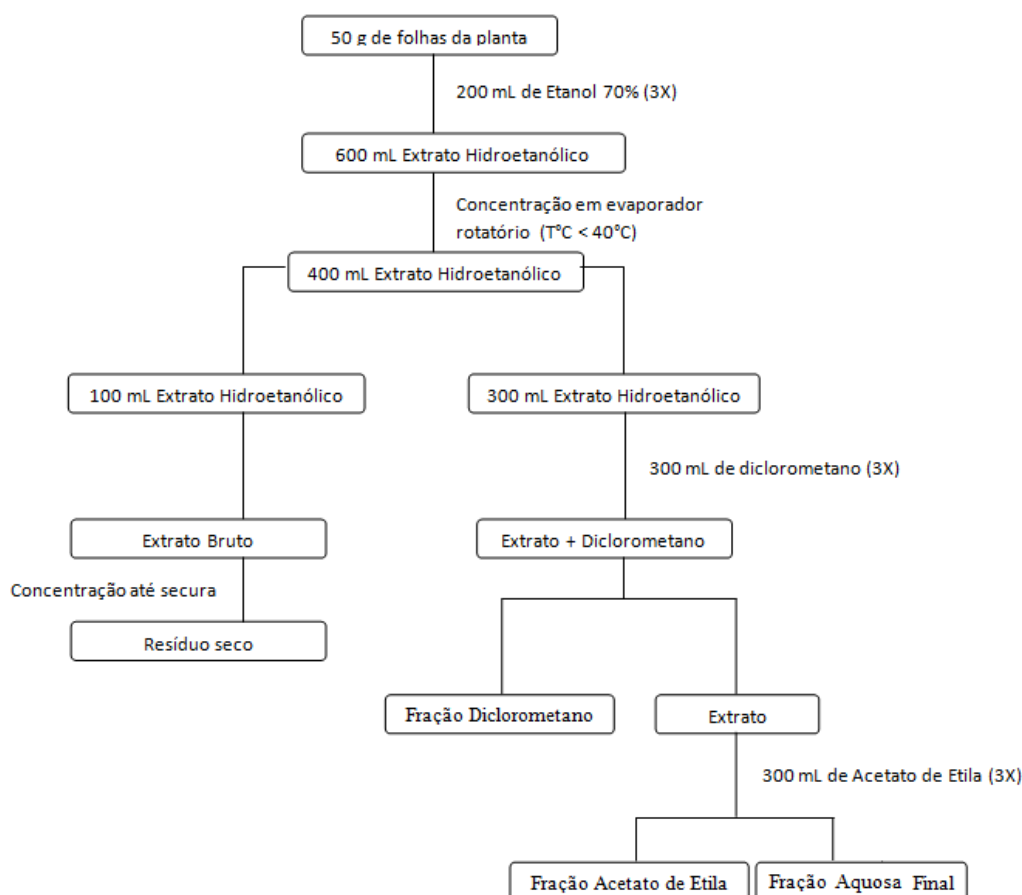


Figura 2. Esquema de extração e fracionamento das folhas de *Syngonium podophyllum*.

2.3.2 Caracterização fitoquímica

Os testes de caracterização fitoquímica foram realizados segundo metodologias estabelecidas por Costa (1982) e pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição (2010), utilizando as folhas secas e pulverizadas de *S. podophyllum*.

2.3.2.1 Flavonoides

Para a realização dos testes de identificação de flavonóides foram utilizados ensaios cromáticos. Primeiramente foi realizado o desengorduramento de 10 g das folhas pulverizadas de *Syngonium podophyllum*, para evitar que a presença de lipídios interferisse no ensaio, com 20 mL com éter de petróleo, em seguida extração das substâncias com 30 mL de metanol em banho-maria durante 10 minutos sob agitação. Por fim, o extrato metanólico obtido foi levado à secura e ressuspendido em 10 mL de etanol. A solução etanólica obtida foi utilizada nos testes 2.3.2.1.1, 2.3.2.1.2, 2.3.2.1.3.

2.3.2.1.1 Reação de Taubock ou reação de oxalato-bórica

Em tubo de ensaio, evaporou-se em banho-maria 3 mL do extrato obtido. Após a secura, adicionou-se 5 gotas de acetona e alguns cristais de ácido bórico e ácido oxálico, em seguida levou-se a solução à secura novamente, que foi ressuspendida em 5 mL de éter e observado em luz UV. A presença de fluorescência amarela-esverdeada indica a presença de flavonoides.

2.3.2.1.2 Reação de Pew

Em um tubo de ensaio, evaporou-se em banho-maria 3 mL do extrato obtido. Após a secura, adicionaram-se 3 mL de metanol, uma pequena porção de zinco metálico e 0,5

mL de ácido clorídrico concentrado. A presença de coloração vermelha é indicativo de flavonoides.

2.3.2.1.3 Reação com cloreto férrico

Em um tubo de ensaio com 1 mL do extrato obtido, foram adicionadas gotas de solução metanólica de cloreto férrico a 2%. A presença de flavonoides exibe a coloração verde, amarela ou violeta dependendo do tipo presente na amostra.

2.3.2.2 Taninos

Os taninos são polifenólicos complexos, hidrofílicos e capazes de complexarem-se com macromoléculas como proteínas polissacarídeos e outras substâncias, formando precipitados em solução aquosa. Dessa forma, foram realizados dois teste de precipitação para verificar a presença desse metabólito secundário.

Antes de se iniciar os testes de identificação de taninos, preparou-se uma solução extrativa da seguinte maneira:

Em um béquer, realizou-se decocção durante 15 minutos com 5 g das folhas secas pulverizadas e 100 mL de água destilada. Em seguida o decocto foi filtrado.

2.3.2.2.1 Reação com gelatina

Em um tubo de ensaio, adicionaram-se 2 mL do decocto descrito no item 2.3.2.2, 2 gotas de ácido clorídrico diluído e solução de gelatina a 2,5% gota a gota. A formação de precipitado indica a presença de taninos.

2.3.2.2.2 Reação com acetato de chumbo

Em um tubo de ensaio adicionaram-se 5 mL do decocto, 10 mL de solução de ácido acético a 10% e 5 mL de solução de acetato de chumbo a 10%. A formação de precipitado esbranquiçado indica a presença de taninos hidrolisáveis.

2.3.2.3 Antraquinonas

2.3.2.3.1 Antraquinonas livres

Em béquer de 50 mL, adicionou-se 1 g das folhas secas e pulverizadas de *S. podophyllum* e 10 mL de éter etílico, após filtrar, adicionou-se 1 mL de amônia diluída e agitou-se. A formação de uma camada rósea é indicativo de formação de fenolatos confirmando a presença de antraquinonas livres.

2.3.2.3.2 Glicosídeos Antraquinônicos

Foram adicionados 20 mL de água destilada ao pó residual da filtração do teste 2.3.2.3.1 e aquecido em ebulição por 5 minutos. Após filtrar a nova extração, adicionaram-se 10 mL de ácido clorídrico e 3 mL de água oxigenada 30% e aqueceu-se à ebulição por 5 minutos para hidrolisar os glicosídeos previamente. Após filtrar, a solução extrativa obtida foi introduzida em funil de separação com éter etílico. A fase etérea obtida no funil de separação foi transferida para tubo de ensaio onde foram adicionados 3 mL de amônia diluída, seguido de agitação. A presença de formação de fenolatos resulta a coloração rósea, indicando a presença de glicosídeos antraquinônicos.

2.3.2.4 Alcaloides

As reações gerais para alcaloides baseiam-se na formação de complexos insolúveis (precipitados) devido à presença de metais. Na caracterização foram adicionadas, em um gral, algumas gotas de carbonato de sódio a 10% em 5 g das folhas pulverizadas, em seguida realizou-se extração com 25 mL de clorofórmio com o auxílio do pistilo. A solução extrativa obtida foi filtrada e submetida à separação em funil de separação com solução de ácido clorídrico a 2%. A fase aquosa ácida, superior, obtida foi utilizada nas reações de caracterização com os reagentes Dragendorff, Bouchardat, Mayer e Bertrand, os quais apresentam metais em sua constituição, em lâminas de vidro. A formação de precipitado ou turvação indica a presença de alcalóides na forma de sal.

2.3.2.5 Saponinas

2.3.2.5.1 Teste de formação de espuma

Em um béquer, foram adicionados 2 g da planta pulverizada e 10 mL de água destilada, em seguida a solução foi aquecida a ebulição por 5 minutos. Após filtrar a solução, agitou-se o tubo vigorosamente por 15 segundos. As saponinas reduzem a tensão superficial formando espuma persistente e abundante, resistente a ácidos

2.3.2.6 Glicosídeos cardiotônicos

Os glicosídeos cardiotônicos são formados por um açúcar e uma porção não açúcar, constituído de um núcleo esteroidal e uma lactona, conectados por uma ligação desoxi-açúcar.

Antes de se iniciar os testes de identificação, preparou-se uma solução extrativa da seguinte maneira:

Adicionaram-se 50 mL de etanol 70%, pois glicosídeos e as geninas são geralmente solúveis nesse meio, em um béquer contendo 5 g das folhas secas de *S. podophyllum* pulverizadas. O material foi submetido a aquecimento em banho-maria por 10 minutos, filtrado e completado com etanol 70% até o volume de 30 mL. Em seguida foram adicionados 15 mL de solução de acetato de chumbo 10%, agitou-se e filtrou-se a solução. Ao filtrado adicionaram-se 10 mL de solução de fosfato ácido de sódio 10%, agitou-se e filtrou-se a solução. O filtrado foi submetido à separação em funil de separação com 15 mL de clorofórmio por duas vezes. À fase orgânica, adicionou-se sulfato de sódio anidro. Esta extração obtida foi utilizada nos testes a seguir:

2.3.2.6.1 Reação com anel lactônico - Reação de Legal

Em um tubo de ensaio evaporou-se até secar, 2 mL do extrato obtido no item 2.3.2.6, em banho-maria. Adicionou-se 1 mL de piridina, 0,5 mL de solução de hidróxido de sódio a 10% e 0,5 mL de solução de nitroprussiato de sódio a 10%. Caso ocorra a reação do grupo carbonila com compostos cetônicos no anel lactônico cardenólico há formação de coloração vinho indicando a presença de glicosídeos cardiotônicos.

2.3.2.6.2 Reação com os desóxi-açúcares - Reação de Pesez

Em um tubo de ensaio evaporou-se até secar, 2 mL do extrato obtido em banho-maria, em seguida adicionou-se 1 mL de reagente Pesez A. A solução foi aquecida a 100°C por 3 minutos. Após resfriar, adicionou-se o reagente de Pesez B. O teste se baseia na reação com o desoxi-açúcar ocorrendo a formação de coloração vermelha após aquecimento. Isso indica a presença de glicosídeos cardiotônicos.

2.3.2.6.3 Reação de Keller-Killiani

Em um tubo de ensaio evaporou-se até secar 2 mL do extrato obtido, em seguida adicionou-se 1 mL de ácido acético, 2 gotas de solução de cloreto férrico 2% e 2 mL de ácido sulfúrico concentrado com cuidado. Reagentes que agem com o açúcar 2-desoxi da molécula faz com que ocorra a presença de um anel castanho avermelhado entre as camadas e a coloração verde-azulada da camada acética indicando a presença de glicosídeos cardiotônicos.

2.3.3 Ensaios Biológicos

2.3.3.1 Ensaio Microbiológico por difusão em ágar (segundo as recomendações do NCCLS, 2002; Bauer et al., 1966 e Farmacopeia Brasileira, 2010)

Com o intuito de testar bactérias bacilos gram-positivas, bacilos gram-negativas, bactérias em forma de cocos e bactérias em forma de cachos como mencionado anteriormente, culturas bacterianas de *Escherichia coli* ATCC 1536, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Bacillus subtilis* ATCC 9372 desenvolvidas em ágar BHI por 24 horas foram diluídas convenientemente (cerca de 1 a 2×10^8 UFC/mL) em solução salina 0,85%. A concentração foi determinada em espectrofotômetro (Quimis[®]) em comprimento de onda de 625 nm em um intervalo de 0,08 a 0,10 de absorvância, valor equivalente a 0,5 da escala de McFarland. Desta solução, 1 mL foi colocado em 50 mL de ágar Mueller-Hinton, correspondendo em 2% de inóculo em meio enriquecido para a camada superficial, e 5 mL foram semeadas em placas de Petri contendo 20 mL de camada basal de ágar Müller-Hinton. Após solidificação do meio superfície, *templates* foram adicionados e em cada orifício foram colocados 100 µL do extrato bruto em diluições seriadas utilizando as seguintes concentrações: 100,0, 50,0, 25,0, 12,5 e 6,25 mg/mL. Para o extrato etanólico 70% e para cada fração, o experimento

foi realizado em triplicata e utilizou-se o ciprofloxacino a 36 µg/mL como controle de acordo com Figura 3.

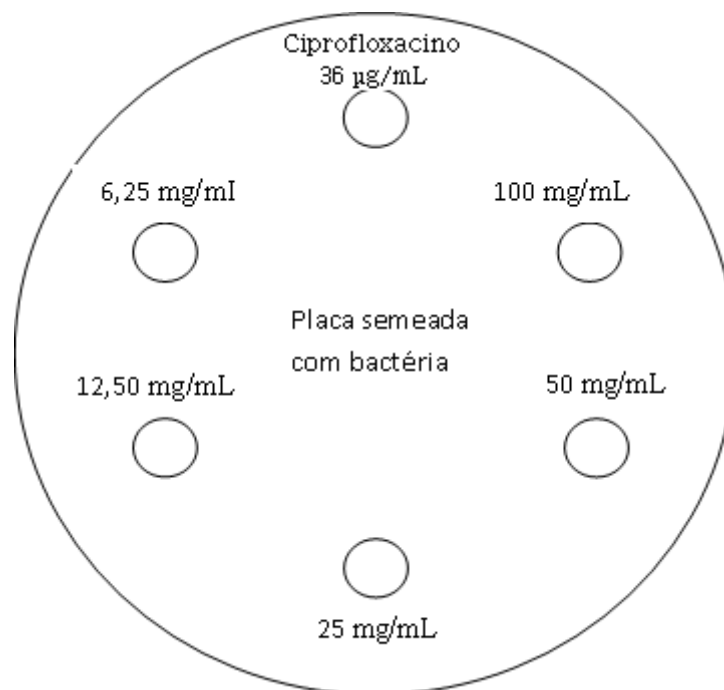


Figura 3. Esquema para teste de difusão em ágar.

Após incubação por 24 horas a 35° C, foram observados os halos de inibição das amostras bacterianas.

2.3.3.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

2.3.3.2.1 Padronização da suspensão bacteriana

O extrato vegetal etanólico e suas frações foram ensaiados utilizando as bactérias *Escherichia coli* ATCC 1536, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Bacillus subtilis* ATCC 9372. As culturas bacterianas desenvolvidas em ágar BHI por 24 horas, foram padronizadas em suspensão bacteriana em solução salina 0,85% estéril, diluídas convenientemente até atingir absorvância de 0,08 à

0,10, em espectrofotômetro e comprimento de onda 625 nm para realizar a leitura da absorvância, correspondendo a aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UFC/mL.

2.3.3.2.2 Método de diluição em micro-placa em determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Na figura 4 mostra de forma esquemática como foi realizado o teste. Vinte miligramas do extrato e de cada fração foram diluídos em 2 mL de água destilada, obtendo-se concentração inicial de 10 mg/mL. Em seguida, as soluções extrativas foram diluídas seriadamente até concentração de 0,039 mg/mL em microplacas com auxílio de um pipetador multicanal.

No teste foi utilizado o meio caldo Mueller Hinton. Na primeira coluna (1) adicionaram-se 200 µL de meio de cultura como controle do meio e a partir da segunda coluna foram adicionados 100 µL de meio de cultura em toda a micro-placa. Na quarta coluna (4), adicionaram-se 100 µL do extrato preparado com concentração inicial de 10 mg/mL. A partir desta coluna, realizou-se a diluição seriada 1:2 homogeneizando-se e transferindo-se 100 µL do quarto poço para os poços subsequentes. Após diluição, foram adicionados, a partir da segunda coluna (2), 100 µL do inóculo preparado. Na terceira coluna (3) foi utilizada como controle 100 µL de ciprofloxacino na concentração de 500 µg/mL.

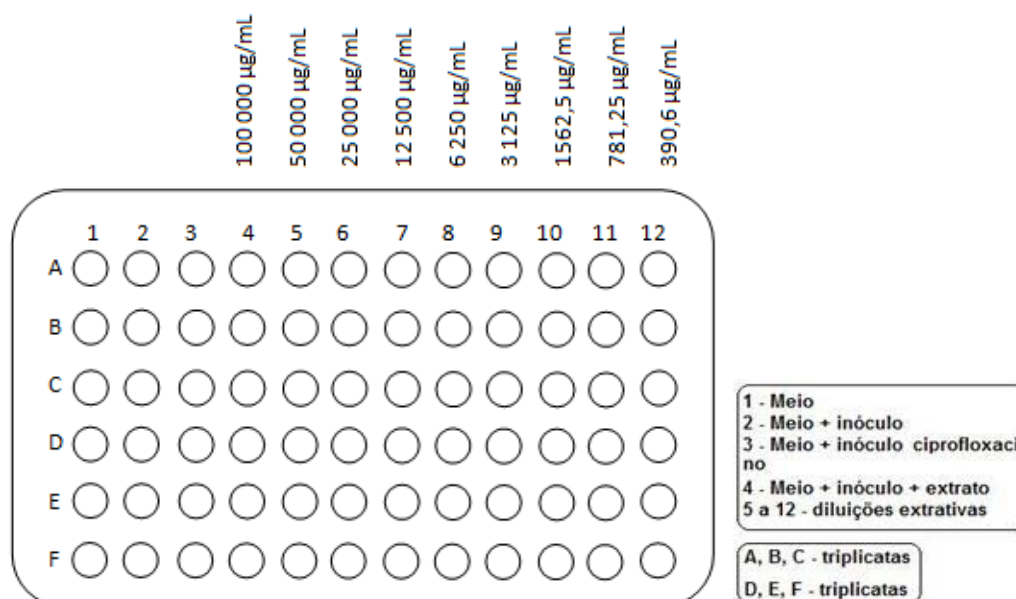


Figura 4. Esquema para o teste da concentração inibitória mínima (CIM)

2.3.3.2.3 Revelação dos testes em micro-placa em determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

2.3.3.2.3.1 Preparação da rezasurina

A rezasurina é um indicador de óxido-redução utilizado para revelar alterações de pH no meio determinado pelo crescimento bacteriano (PALOMINO et AL., 2002), em que a coloração permanece azul se não ocorrer crescimento bacteriano e rosa se ocorrer crescimento.

A rezasurina foi padronizada na concentração 0,1 mg/mL em água deionizada.

2.3.3.3 Atividade alelopática

2.3.3.3.1 Teste de inibição da germinação das sementes de tomateiro

Foram utilizadas placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo dois discos de papel de filtro com 9 cm de diâmetro, esterilizados a 180°C em estufa durante 60 minutos. Em quadruplicata, adicionaram-se 25 sementes de tomateiro em cada placa de Petri. O experimento foi realizado com o extrato etanólico e as três frações, totalizando 500

sementes, pois foram utilizadas ainda, quatro placas como controle contendo 4 mL de água deionizada. Foram adicionados 4 mL da diluição do extrato etanólico e das frações, todas em concentração de 100 mg/mL em cada placa e posteriormente, foram mantidas em B.O.D. à 30°C durante três dias. O esquema do teste de germinação das sementes de tomateiro está esquematizado na Figura 5.

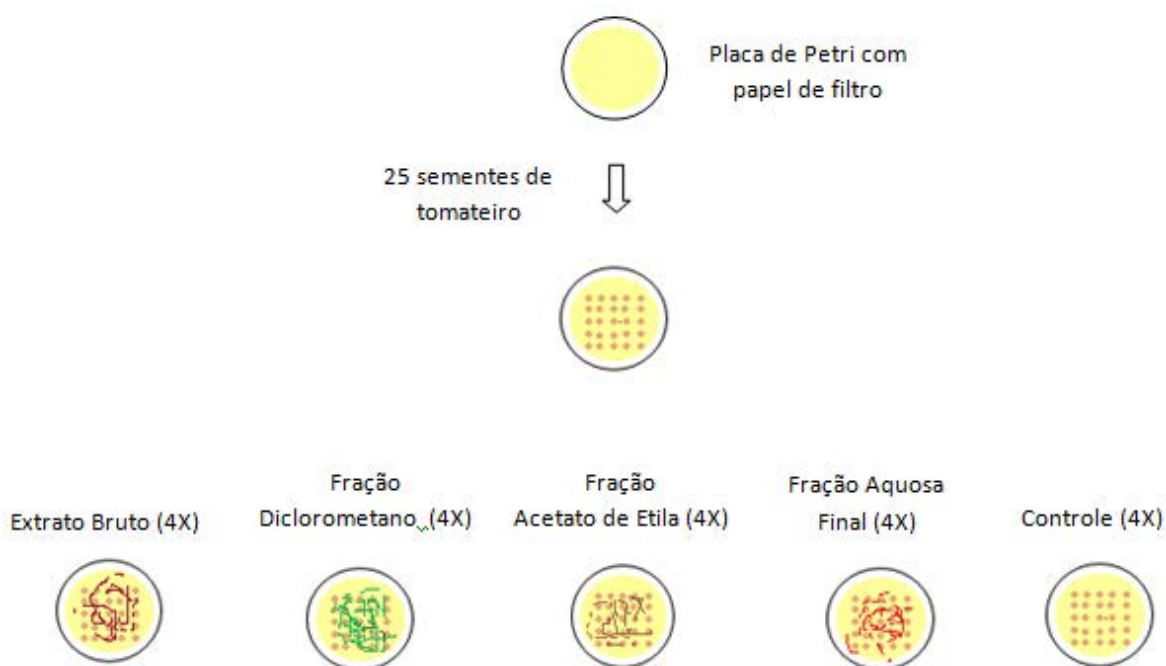


Figura 5. Esquema do teste de germinação em sementes de tomateiro.

2.3.3.4 Capacidade de inibição do crescimento de sementes de tomateiro

Após o período de germinação, cerca de 72 horas, foram adicionados às placas do ensaio anterior, 2 mL das soluções extrativas ressuspensas em água deionizada em concentrações de 100 mg/mL com o intuito de manter os discos de papéis umedecidos. As placas foram mantidas em B.O.D. até completarem 7 dias.

2.3.4 Avaliação da capacidade antioxidante

2.3.4.1 Determinação da capacidade antioxidante frente ao radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)

O DPPH é um radical livre estável de coloração violeta. O ensaio baseia-se na capacidade da substância teste em sequestrar os radicais DPPH ocorrendo a mudança de coloração de violeta para amarelo pálido (Alves et al., 2010). Para isso, preparou-se a solução de DPPH pesando-se 2,4 mg de DPPH diluído em 50 mL de etanol absoluto em balão volumétrico. As soluções extrativas obtidas foram ressuspensas em água deionizada em concentração de 0,025 mg/mL.

O teste foi realizado em micro-placa adicionando-se à amostra, etanol e DPPH, variando o volume das três substâncias até ser obtido 300 µL. As concentrações foram estabelecidas através de testes prévios até se obter uma faixa de volume de amostras onde houvesse aumento crescente da atividade antioxidante. Para o extrato, os volumes analisados foram de 4 a 22 µL; para a fração de diclorometano os volumes variaram de 1 a 25 µL; para a fração acetato de etila os volumes testados variou de 1 a 19 µL e para a fração final o volume necessário foi de 3 a 22 µL.

As placas foram mantidas protegidas da luz durante 30 minutos e as absorvâncias das soluções foram medidas a 515 nm em espectrofotômetro. Como controle negativo, utilizaram-se 150 µL de etanol e 150 µL da solução de DPPH e como branco 300 µL de etanol. Os testes foram realizados em triplicata e a análise dos resultados foram determinadas através do IC₅₀ utilizando-se o programa Origin 8. Para obter a concentração da amostra com capacidade de reduzir 50% do DPPH, utilizou-se a equação da reta, substituindo o valor de y por 50.

2.3.4.2 Capacidade total de redução pela transformação de Fe^{3+} em Fe^{2+} (KOKSAL et al., 2011)

O extrato etanólico 70 % foi diluído em água deionizada para obtenção de concentrações de 340 a 500 $\mu\text{g/mL}$ e as frações obtidas foram diluídas em água deionizada nas concentrações de 290 a 500 $\mu\text{g/mL}$. Em tubos de ensaio, foram adicionados 750 μL de amostra, 1 mL de solução tampão fosfato e 1 mL de hexacianoferrato de potássio a 1%. As misturas foram incubadas a 50 °C por 20 minutos em banho de aquecimento. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de ácido tricloroacético a 10% e 250 μL de cloreto férrico a 0,1%. As soluções foram analisadas em espectrofotômetro a 700 nm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1.1 Extratos

O extrato etanólico 70 % foi facilmente concentrado e levado à secura completa. Para as frações acetato de etila, diclorometano e fração aquosa final foram obtidos extratos de consistência espessa e altamente viscosa.

3.1.2 Caracterização fitoquímica

3.1.2.1 Flavonoides

No estudo atual foram realizados três testes para verificar presença de flavonoides nas folhas de *Syngonium podophyllum*, o qual a reação de Pew, a reação com cloreto férrico e a reação oxalato-bórica apresentaram-se negativas frente à presença de flavonoides. O resultado pode ser visto na Figura 6 para a reação oxalato-bórica em que não foi observado a presença de fluorescência amarela-esverdeada. Na Figura 7 é possível visualizar o resultado da reação de Pew, em que a amostra não apresentou mudança de

coloração para avermelhada. Para a reação de cloreto férrico não foi observada a cor verde, amarela ou violeta.

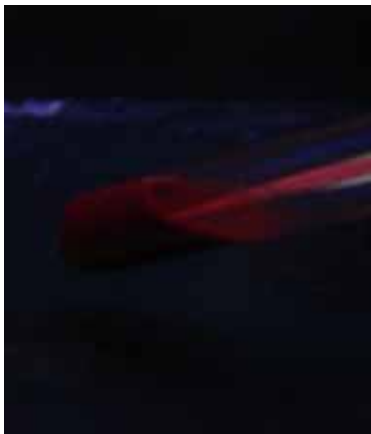


Figura 6. Teste de flavonoides. Reação oxalato-bórica.



Figura 7. Teste de flavonoides. Reação de Pew.

3.1.2.2 Taninos

Foram realizados dois testes para avaliar a presença de taninos. A reação com gelatina e o teste de reação com acetato de chumbo apresentaram resultados negativos para a presença destas substâncias, uma vez que não foi observada a precipitação da amostra no teste com gelatina (Figura 8) e não houve formação de sólido branco no teste com acetato de chumbo.



Figura 8. Teste de taninos. Reação com gelatina.

3.1.2.3 Antraquinonas

Para avaliar a presença de antraquinonas foram realizados dois testes: a reação de Borntraeger para antraquinonas livres e reação de glicosídeos antaquinônicos.

A reação de Borntraeger para antraquinonas livres apresentou resultado negativa, pois após adição a amônia diluída e agitação não houve a formação de uma camada superficial rosa (Figura 9), comprovando a ausência de antraquinonas livres na concentração utilizada do extrato.

Na reação de glicosídeos antaquinônicos não foi detectada a presença do metabólito secundário na concentração estudada, devido à ausência do aparecimento da coloração rósea.



Figura 9. Teste de antraquinonas livres. Reação de Borntraeger.

3.1.2.4 Alcaloides

Para o ensaio de presença de alcaloides foram utilizados quatro reagentes: reagente de Dragendorff, reagente de Bouchardat, reagente de Mayer e reagente de Bertrand. Para todos os reagentes utilizados, não foi observado nenhuma precipitação ou mudança na característica da amostra analisada, desta forma conclui-se que não há presença de alcaloides no extrato analisado, como pode ser visto na Figura 10.



Figura 10. Teste de alcaloides. Reação com reagentes de Dragendorff, Bouchardat, Mayer, Bertrand.

3.1.2.5 Saponinas

No atual estudo, o teste de formação de espuma não apresentou a formação de espuma persistente (Figura 11) após a adição de ácido clorídrico e agitação. Isso indica a ausência de saponinas no extrato testado.



Figura 11. Teste de saponinas. Teste de formação de espuma.

3.1.2.6 Glicosídeos cardiotônicos

Para verificar a presença de glicosídeos cardiotônicos, três ensaios foram realizados. A reação de Legal, a reação de Pesez e a reação de Keller-Killiani não indicaram a presença de glicosídeos cardiotônicos, confirmando a ausência desses metabólitos secundários nas folhas de *Syngonium podophyllum*.

3.1.3 Ensaios Biológicos

3.1.3.1 Ensaio microbiológico por difusão em ágar

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada observando-se a formação de halos de inibição ao redor das cavidades. Como podem ser visualizadas nas Figuras 12 e 13, não houve inibição bacteriana para as bactérias *S. epidermidis* e *S. aureus* mesmo utilizando elevada concentração do extrato etanólico e das frações. Nas Figuras 14 e 15, visualiza-se o mesmo resultado para as bactérias *E. coli* e *B. subtilis*.

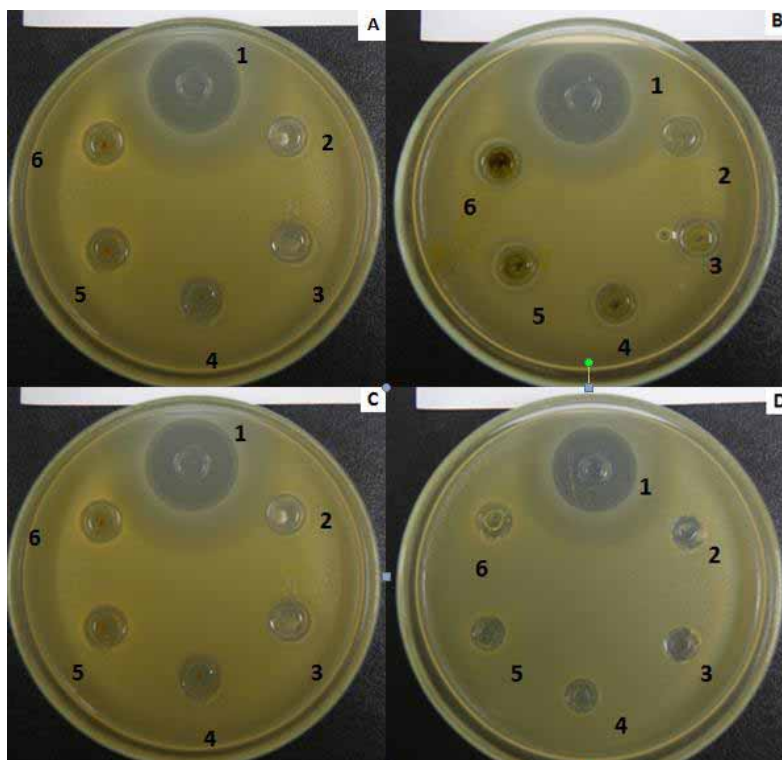


Figura 12. Teste de difusão em ágar com *S. epidermidis*. Onde (A) representa o extrato etanólico 70% (B) fração diclorometano, (C) fração acetato de etila e (D) fração aquosa final. Utilizando (1) ciprofloxacino 36 µg/mL e as concentrações do extrato e frações a (2) 100 mg/mL, (3) 50 mg/mL, (4) 25 mg/mL, (5) 12,5 mg/mL, (6) 6,25 mg/mL.

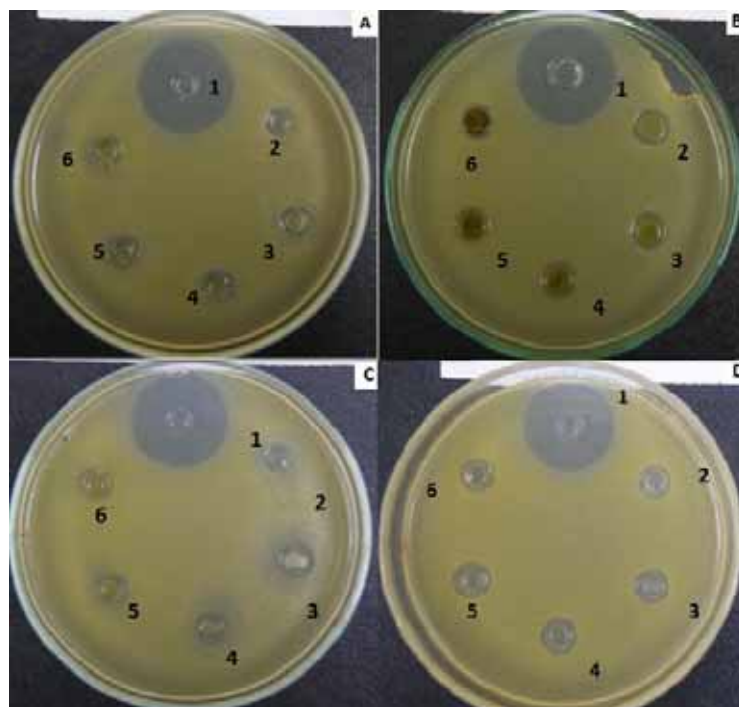


Figura 13. Teste de difusão em ágar com *S. aureus*. Onde (A) representa o extrato etanólico 70% (B) fração diclorometano, (C) fração acetato de etila e (D) fração aquosa final. Utilizando (1) ciprofloxacino 36 µg/mL e as concentrações do extrato e frações a (2) 100 mg/mL, (3) 50 mg/mL, (4) 25 mg/mL, (5) 12,5 mg/mL, (6) 6,25 mg/mL.

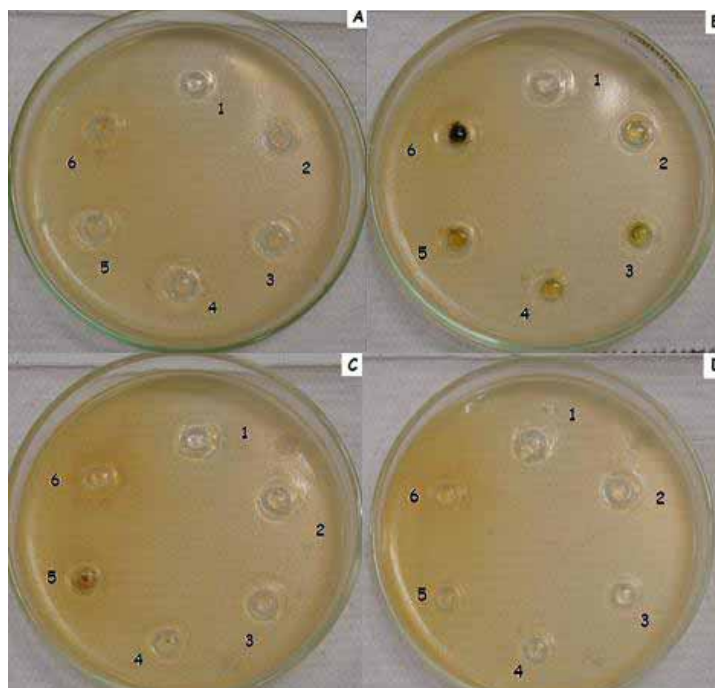


Figura 14. Teste de difusão em ágar com *B. subtilis*. Onde (A) representa o extrato etanólico 70% (B) fração diclorometano, (C) fração acetato de etila e (D) fração aquosa final. Utilizando (1) ciprofloxacino 36 µg/mL e as concentrações do extrato e frações a (2) 100 mg/mL, (3) 50 mg/mL, (4) 25 mg/mL, (5) 12,5 mg/mL, (6) 6,25 mg/mL.

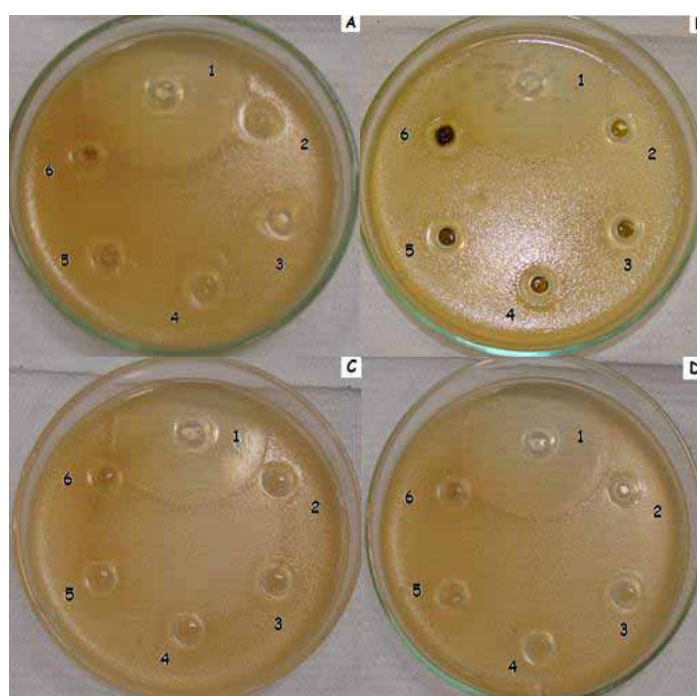


Figura 15. Teste de difusão em ágar com *E. coli*. Onde (A) representa o extrato etanólico 70% (B) fração diclorometano, (C) fração acetato de etila e (D) fração aquosa final. Utilizando (1) ciprofloxacino 36 µg/mL e as concentrações do extrato e frações a (2) 100 mg/mL, (3) 50 mg/mL, (4) 25 mg/mL, (5) 12,5 mg/mL, (6) 6,25 mg/mL.

Em estudo realizado por Kumar e colaboradores (2014), foi observada atividade bactericida para outras bactérias como: *Bacillus cereus*, *Streptococcus mutans*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhi* e *Bordetella bronchiseptica* através da utilização de extrato aquoso obtido em Soxhlet por 6-8 horas em concentração de 100 mg/mL. Basicamente Kumar e colaboradores utilizaram bactérias em forma de bacilos gram-positivos, uma delas beta hemolítica, gram-negativo e bactérias em forma de cocos. Isso indica que o *S. podophyllum* tem atividade contra esses tipos de bactérias e a técnica de extração e o tipo de solvente deve ser verificado a fim de se obter um extrato adequado com possível atividade bactericida.

3.1.3.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

O teste de determinação da concentração inibitória mínima, foi realizado utilizando o extrato etanólico e as três frações nas concentrações de 100 mg/mL a 390 µg/mL e as bactérias *Escherichia coli* ATCC 1536, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Bacillus subtilis* ATCC 9372 devido aos motivos já elucidados previamente.

Utilizando alta concentração inicial do extrato e das três frações, não foi possível determinar a concentração inibitória mínima, comprovando a ausência de atividade antibacteriana contra os micro-organismos testados nas concentrações utilizadas. Os resultados podem ser visualizados nas Figuras 16-23.

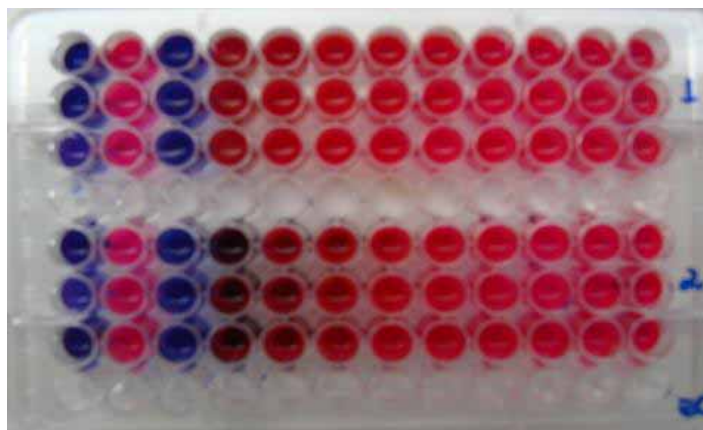


Figura 16. Teste de concentração inibitória mínima utilizando extrato etanólico 70% e a fração diclorometano em meio contendo *E. coli*.

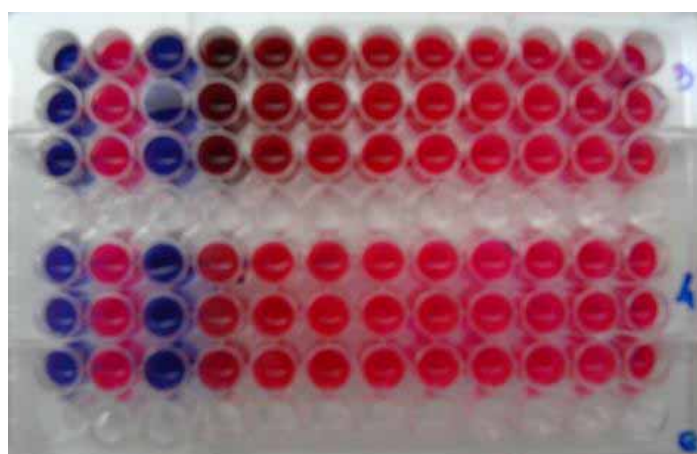


Figura 17. Teste de concentração inibitória mínima utilizando fração acetato de etila e a fração aquosa final em meio contendo *E. coli*.

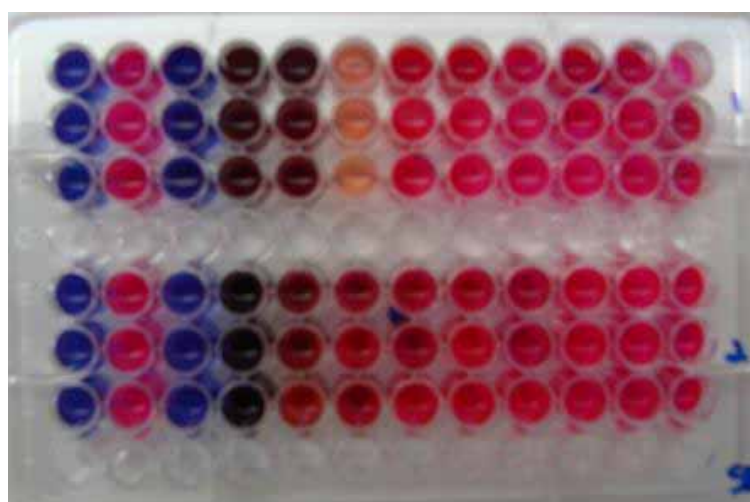


Figura 18. Teste de concentração inibitória mínima utilizando extrato etanólico 70% e a fração diclorometano em meio contendo *S. aureus*.

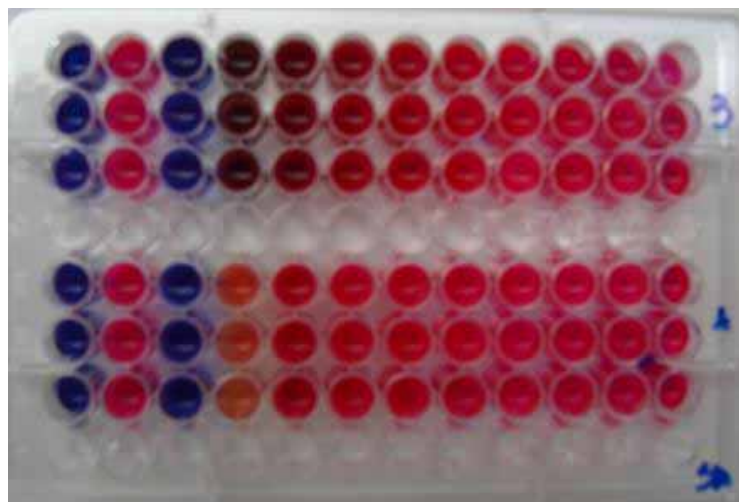


Figura 19. Teste de concentração inibitória mínima utilizando fração acetato de etila e a fração aquosa final em meio contendo *S. aureus*.

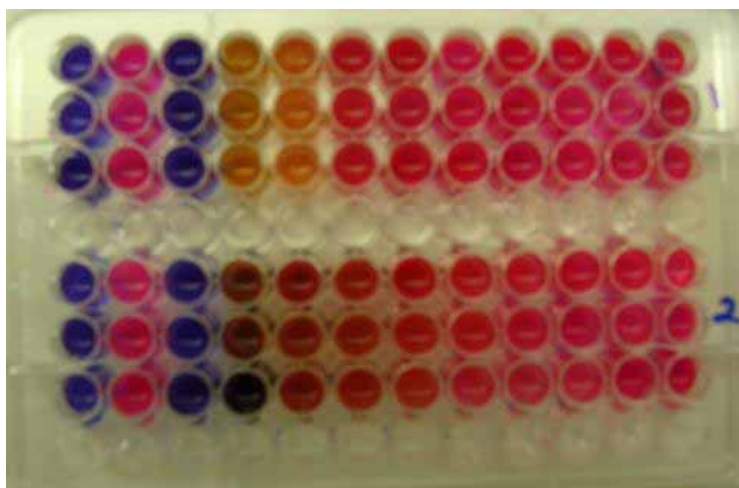


Figura 20. Teste de concentração inibitória mínima utilizando extrato etanólico 70% e a fração diclorometano em meio contendo *S. epidermidis*.

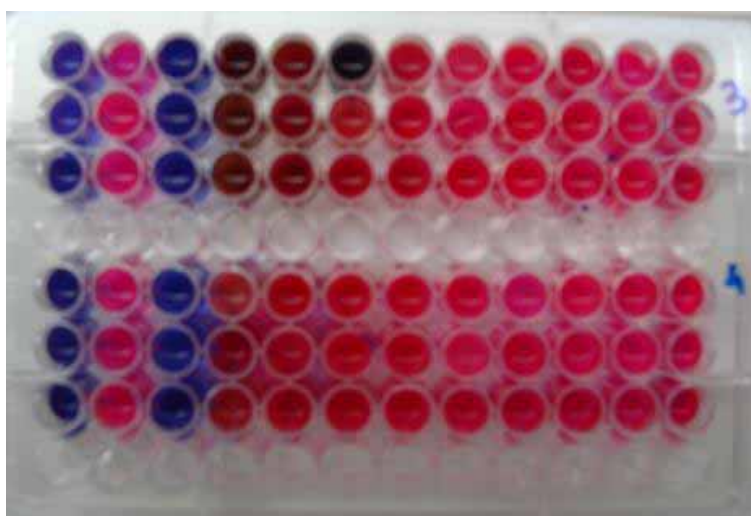


Figura 21. Teste de concentração inibitória mínima utilizando fração acetato de etila e a fração aquosa final em meio contendo *S. epidermidis*.

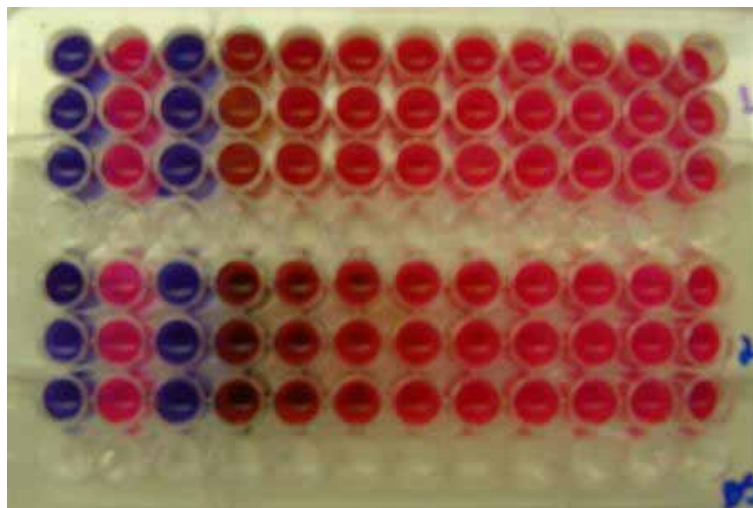


Figura 22. Teste de concentração inibitória mínima utilizando extrato etanólico 70% e a fração diclorometano em meio contendo *B. subtilis*.

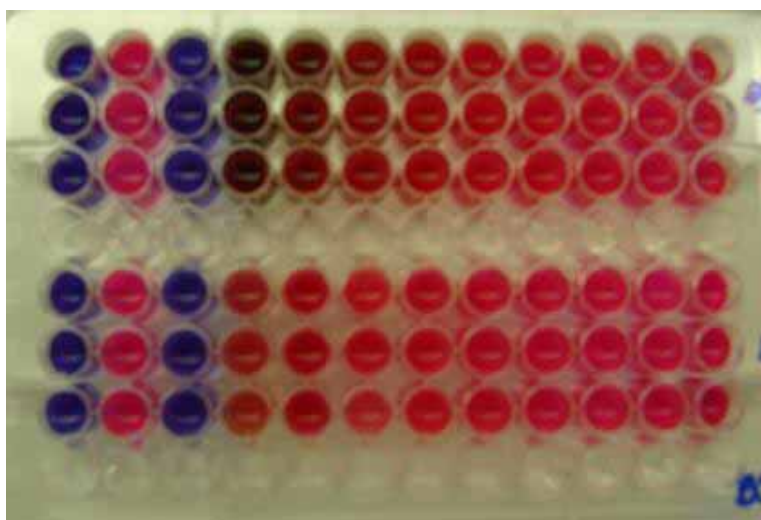


Figura 23. Teste de concentração inibitória mínima utilizando fração acetato de etila e a fração aquosa final em meio contendo *B. subtilis*.

Estudos realizado por Camporese e colaboradores (2003), utilizando as folhas de *Syngonium podophyllum* coletadas em fevereiro de 1999 em Belize, encontraram a CIM de 2,5 mg/mL para as bactérias *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, o qual hexano foi utilizado como solvente extrator e CIM de 1,25 mg/mL para a bactéria *Staphylococcus aureus* em que o pó das folhas da planta foi submetido à maceração com metanol.

As variações referentes à determinação da CIM de extratos de plantas podem ser atribuídas a vários fatores. Dentre eles podemos citar a técnica aplicada, o micro-organismo e a cepa utilizada no teste, a origem da planta, a época da coleta, se os extratos

foram preparados a partir de plantas frescas ou secas e a quantidade de extrato testada. (Fennel et al., 2004).

Desta forma, o fato de não ser possível encontrar a CIM no presente estudo pode ser explicado pelo diferente local que a planta foi coletada; a época e período do dia de coleta; e a idade da planta. Estas variáveis resultam em diferente concentração das substâncias presentes no vegetal. Outro fator que pode explicar o resultado obtido foi a escolha do solvente utilizado em que pode ter resultado em uma extração não eficiente para obter um extrato adequado para realização do teste, no caso da *E. coli* foi utilizado o hexano sendo extremamente mais apolar que o etanol 70% . Ou ainda, a quantidade das folhas pulverizadas utilizada para obtenção do extrato foi insuficiente, uma vez que, Camporese e colaboradores utilizaram uma relação entre quantidade de droga vegetal e solvente dez vezes maior empregada no atual estudo.

3.1.3.3 Atividade alelopática

A alelopátia é um fenômeno químico ecológico no qual metabólitos secundários, produzidos por uma espécie vegetal, são liberados e interferem na germinação e/ou no desenvolvimento de outras plantas num mesmo ambiente, proporcionando maior adaptação evolutiva (Taiz & Zeiger, 2004). Num sentido amplo, os efeitos alelopáticos referem-se tanto à inibição quanto ao estímulo de desenvolvimento de outros organismos (Rice, 1984). Muitas substâncias apontadas como alelopáticas estão também relacionadas com funções de proteção ou defesa das plantas contra o ataque de micro-organismos e insetos (Rodrigues e Lopes, 2001).

A Figura 24 ilustra o resultado, após três dias, do teste de germinação realizado com sementes de tomateiro utilizando o extrato etanólico, a fração acetato de etila, a fração diclorometano e a fração aquosa final em concentrações de 100 mg/mL.

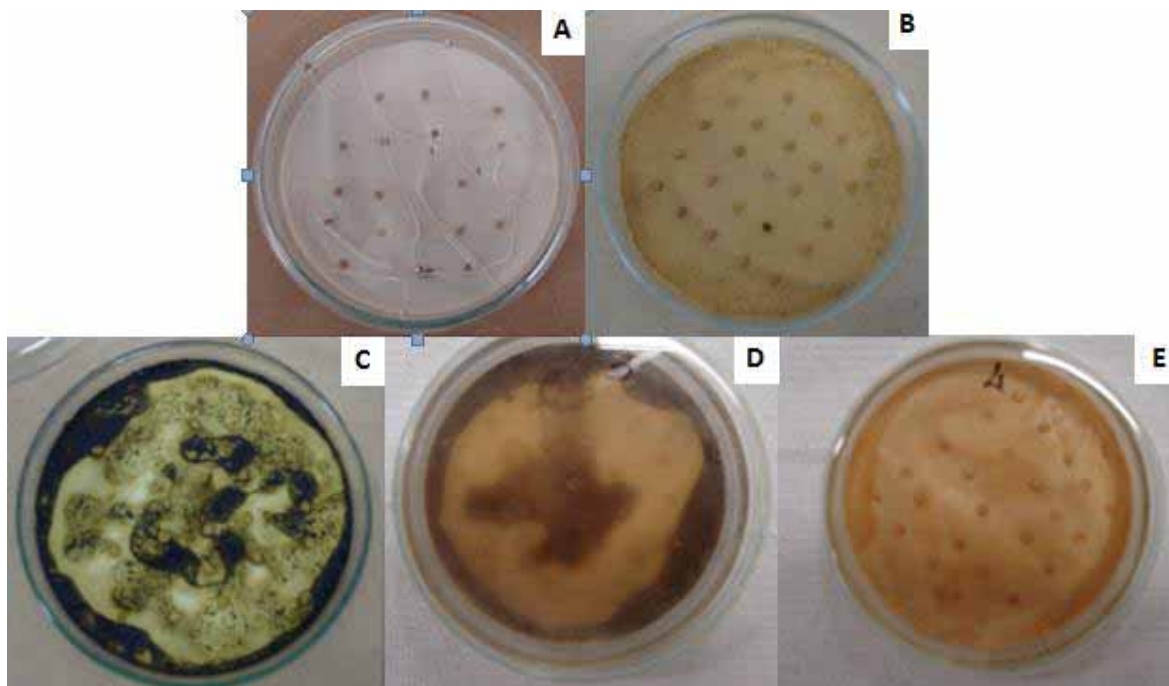


Figura 24. Teste de germinação com semente de tomateiro. (A) Controle, (B) extrato etanólico 70%, (C) fração diclorometano, (D) acetato de etila e (E) a fração aquosa final em concentração 100 mg/mL.

Após 72 horas, nenhuma semente germinou nas amostras que foram utilizadas o extrato e as frações EE-FD, EE-FA e EE-FF, enquanto que 65 % das sementes no controle germinaram, indicando drástica atividade alelopática frente às sementes de tomateiro.

Hoffmann e colaboradores (2007) realizaram estudos alelopáticos em semente de alface (*Lactuca sativa* L.) e picão-preto (*Bidens pilosa* L.), em que foi utilizado extrato aquoso de folhas verdes da arácea *Dieffenbachia picta* nas concentrações 0; 0,0625; 0,125 e 0,25 mg/mL. Foi verificado que à medida que a concentração do extrato era aumentada a porcentagem de sementes de alface germinadas diminuía. Dessa forma, a drástica inibição da germinação das sementes de tomateiro pode ser explicada pela alta concentração do extrato e das frações utilizada no experimento.

3.1.3.4 Capacidade de inibição do crescimento de sementes de tomateiro

Para a avaliação do ensaio, foi utilizada a medida das radículas das sementes de tomateiro (cm) após quatro dias que ocorreu a germinação. Com estas medidas foi realizada uma análise estatística com nível de significância de 5% (ANOVA) com o intuito de verificar se há diferença significativa entre as médias das radículas dos cinco tratamentos, como pode ser vista na Tabela 1.

Tabela 1: Análise de variância (ANOVA) com nível de significância igual a 5%.

ANOVA					
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>
Entre grupos	298,8829	4	74,72072	63,42709	2,83E-43
Dentro dos grupos	583,1382	495	1,178057		
Total	882,0211	499			

SQ: Soma dos quadrados; gl: Graus de liberdade; MQ: Quadrados médios

O resultado da análise de dados mostrou um valor-P menor que o nível de significância. Isso indica que existe alguma diferença significativa ao se comparar as médias das radículas de tomateiro entre as diferentes amostras.

Após ser verificada a existência desta diferença por meio do teste ANOVA, foi avaliada sua magnitude utilizando um teste de comparações múltiplas, o teste de Tukey, o qual permite testar qualquer contraste, sempre entre duas médias de tratamentos, como pode ser visto na Figura 25.

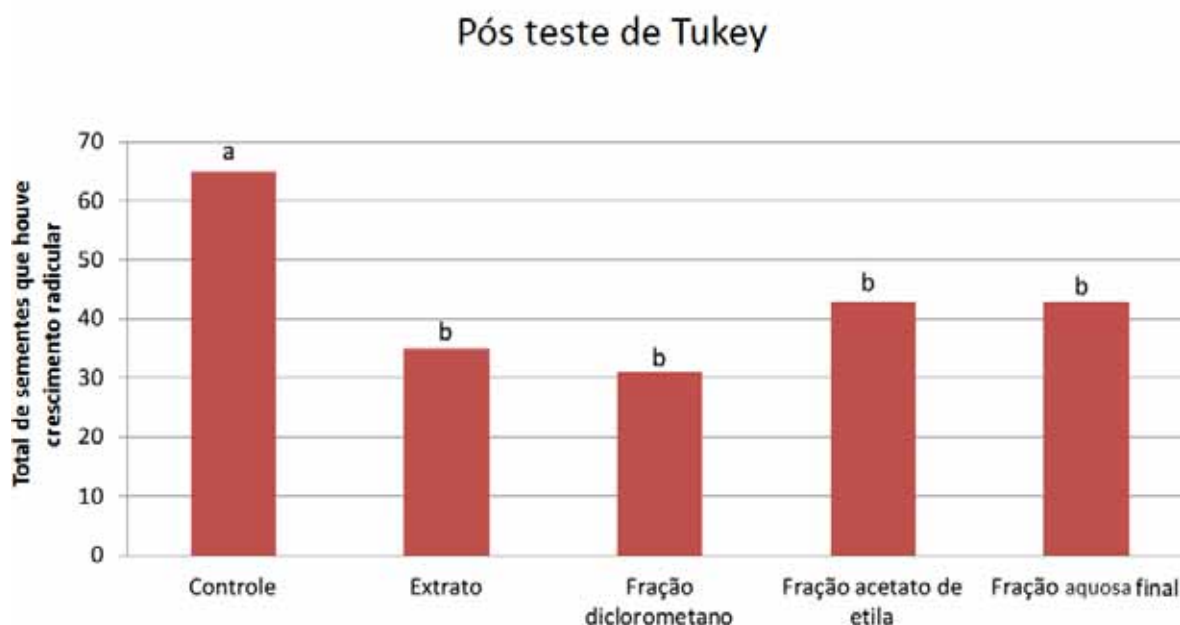


Figura 25. Pós teste de Tukey a partir de um teste ANOVA com nível de significância de 5%.

Foi verificado no pós teste de Tukey a existência de uma diferença significativa entre o controle e as amostras, quando comparados dois a dois e não existe variação significativa entre as amostras.

É possível observar a quantidade de radículas que cresceram em cada tratamento no eixo y da Figura 25. Das cem sementes utilizadas no controle, foi verificado que 65 cresceram ao final do teste, na amostra contendo o extrato etanólico 70% houve crescimento de 35 sementes, 31 sementes apresentaram alongamento radicular utilizando a fração diclorometano e 41 sementes cresceram nas amostras contendo as frações acetato de etila e fração aquosa final.

Essa inibição ocorre, pois o sistema radicular das plantas é o mais sensível a ação de aleloquímicos, porque o seu alongamento depende das divisões celulares, que, se inibidas, comprometem o seu desenvolvimento normal. Além disso, as sementes que levam mais tempo para germinar, possuem maior dificuldade para alongar o sistema radicular,

pois ficam mais tempo em contato com os aleloquímicos presentes nos extratos (Hoffmann, et al., 2007).

3.1.4 Avaliação da capacidade antioxidante

3.1.4.1 Determinação da capacidade antioxidante frente ao radical DPPH-2,2-difenil-1-picril-hidrazila

A Figura 26 mostra de forma comparativa a concentração de amostra necessária para se obter IC_{50} , ou seja, a concentração necessária de amostra que inibe 50% dos radicais DPPH utilizando as substâncias extrativas e o padrão ácido gálico, também utilizado como marcador. As amostras foram solubilizadas em água deionizada e quanto menor o IC_{50} , maior a atividade antioxidante do material, pois é necessário uma quantidade menor da amostra para inibir 50% do radical

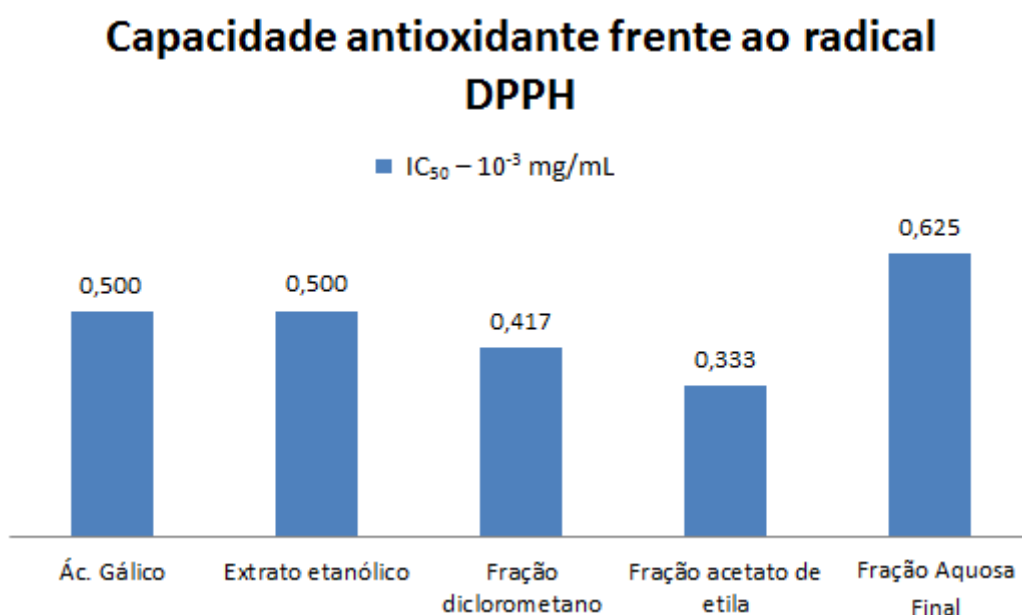


Figura 26. Gráfico de comparação da atividade antioxidante do padrão e marcador ácido gálico, extrato, fração diclorometano, fração acetato de etila e fração aquosa final exibidos através do sequestro do radical DPPH.

A melhor atividade antioxidante foi obtida utilizando a fração acetato de etila, o qual exibiu IC_{50} 0,333, demonstrando melhor poder de redução frente ao radical DPPH até

mesmo do padrão e marcador ácido gálico, IC_{50} 0,500. A fração diclorometano, também apresentou maior atividade comparado com o marcador com IC_{50} 0,417, mas não com a mesma eficiência demonstrada pela fração acetato de etila. O extrato etanólico 70% exibiu atividade similar ao padrão e a fração final exibiu menor capacidade oxidante dentre todas as amostras extrativas testadas com IC_{50} 0,625.

Segundo Kumar e colaboradores (2014), o extrato aquoso obtido das folhas de *Syngonium podophyllum* em Soxhlet durante 6-8h apresentou inibição crescente do radical DPPH conforme o aumento da concentração, 0,025-3,0 mg/mL, do extrato aquoso, o qual também ocorreu no estudo atual utilizando concentrações diferentes das amostras obtidas ao se utilizar o solvente etanol 70% e as frações diclorometano, acetato de etila e aquosa final.

Resultado promissor frente à importância do estudo de atividade antioxidante, devido ao fato, que nos últimos anos, uma quantidade substancial de evidências tem indicado o papel chave dos radicais livres e outros oxidantes como grandes responsáveis pelo envelhecimento e pelas doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (Atoui et al., 2005; Barreiros et al., 2006).

3.1.4.2 Capacidade total de redução pela transformação de Fe^{3+} em Fe^{2+} (KOKSAL et al., 2011)

A presença de compostos antioxidantes na amostra reduz o Fe^{3+} a Fe^{2+} : a adição de $FeCl_3$ à forma ferrosa, Fe^{2+} , irá ocasionar a formação de coloração esverdeada de forma que quanto mais forte for esta coloração maior sua capacidade antioxidante, isto é, em espectrofotômetro quanto maior for absorvância, maior o poder redutor da amostra frente ao ferro.

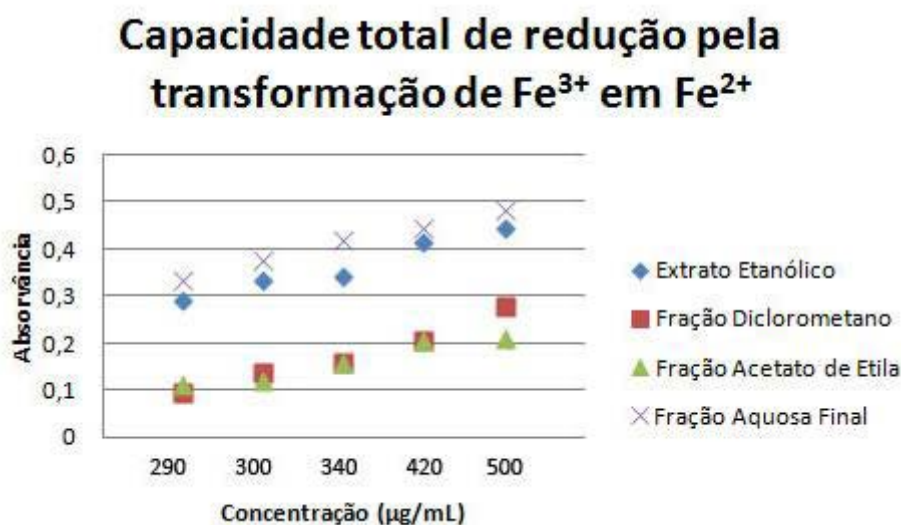


Figura 27. Gráfico de valiação da capacidade antioxidante pela redução do Fe^{3+} em Fe^{2+} .

Conforme mostra a Figura 26, o aumento da concentração das amostras se mostrou proporcional ao poder redutor. A fração aquosa final apresentou maior absorvância conforme o aumento da concentração da substância, indicando maior capacidade em reduzir o ferro ao analisar todos os materiais extrativos utilizados. O extrato etanólico apresentou resultado semelhante à fração aquosa final exibindo atividade redutora um pouco inferior a EE-FF. Esse resultado semelhante ocorre em decorrência da semelhante polaridade das duas amostras. Resultados semelhantes foram obtidos ao se utilizar as frações diclorometano e a fração acetato de etila, em que é possível observar absorvâncias similares conforme o aumento da concentração das duas frações, exceto ao se comparar o gráfico na concentração de 500 µg/mL, o qual a fração diclorometano apresenta maior capacidade redutora que a fração acetato de etila. As frações diclorometano e a fração acetato de etila possuem menor poder redutor quando são comparadas a fração aquosa final e o extrato etanólico, como pode ser constatado na Figura 26.

4. CONCLUSÃO

Nos ensaios fitoquímicos em folhas de *Syngonium podophyllum*, não foram detectados a presença dos metabólitos secundários: alcaloides, saponinas, antraquinonas livres, flavonoides e antraquinonas, taninos, glicosídeos cardiotônicos na quantidade de droga vegetal utilizada.

O extrato e as frações não apresentaram nenhuma atividade bactericida na concentração de 100 mg/mL frente as bactérias *E. coli*, *S. epidermides*, *S. aureus*, *B. subtilis*.

No teste alelopático, após 72 horas não houve germinação das sementes de tomateiro utilizando o extrato e as frações e após quatro dias posteriores ao tempo de germinação foi verificada que há diferença significativa entre o crescimento das radículas das sementes de tomateiro do controle e do extrato e frações. Com esse resultado, o *Syngonium* pode ser um potencial inseticida natural devido a essa atividade alelopática e minimizar os problemas de poluição ambiental em decorrência do uso de inseticidas químicos. Frente a essa atividade, também seria interessante realizar estudos citotóxicos contra células tumorais com o extrato da planta, uma vez que a atividade encontrada pode inibir a divisão celular assim poderia ser possível inibir a multiplicação de células defeituosas.

No teste de atividade antioxidante com DPPH a fração acetato de etila apresentou maior poder antioxidante com IC₅₀ de 0,333 seguida pela fração diclorometano com IC₅₀ de 0,417, ambas apresentaram atividade até mesmo maior que o padrão e marcador ácido gálico, sendo interessante um estudo mais aprofundado da atividade antioxidante do *Syngonium*. O extrato etanólico exibiu IC₅₀ 0,500 e a fração aquosa final apresentou menor capacidade antioxidante com valor de IC₅₀ 0,625. O resultado do teste de redução de Fe³⁺

em Fe^{2+} mostrou que a fração final apresentou maior poder de redução seguida pelo extrato etanólico, fração diclometano e pela fração acetato de etila das folhas de *Syngonium podophyllum*. Dessa forma, é possível afirmar que o extrato e as frações não só podem ser utilizados como antioxidante, mas também apresentam atividade frente a diferentes radicais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v.33, n.10, p.2202-2210, 2010.
- ARVIGO, R.; BALICK, M. **Rainforest Remedies**. Lotus Press: Twin Lakes, WI, 1998.
- ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chem.**, v.89, p.27-36, 2005.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, v.29, n.1, p.113-123, 2006.
- BAUER, A. W.; KIRBY, E.; SHERRIS, E. M.; TURK, M. Antibiotic by standardized single disk method. **Am. J. Clin. Path.** v.45, p.493-496, 1966.
- CÁCERES, A.; GIRÓN, L. M.; ALVARADO, S. R.; TORRES, M. F. Screening of antimicrobial activity of plants popularly used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, v.20, p.223-237, 1987.
- CAMPORESE, A.; BALICK, M.J.; ARVIGO, R.; ESPOSITO, R. G.; MORSELLINO, N.; De SIMONE, F.; TUBARO, A. Screening of anti-bacterial activity of medicinal plants from Belize (Central America). **Journal of Ethnopharmacology**, v.87, p.103-107, 2003..
- CHEN, J.; HENNY, R. J.; MCCONNELL, D. B. Development of new foliage plant cultivars. **Trends in New Crops and New Uses**. Alexandria: ASHS, p.466-472, 2002.
- COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Rev. Virtual Quim.**, v.1, n.3, p.241-256, 2009. Disponível em: <http://www.uff.br/RVQ/index.php/rvq/article/viewFile/51/98>. Acesso: em 21 set. 2014.
- CROAT, T.B. A revision of *Syngonium* (Araceae). **Ann MO Bot Gard.**, v.68, p. 565-651, 1981.

DI STASI, L. C.; HIRUMA, C. A.; GUIMARÃES, E. M.; SANTOS, C. M. Medicinal plants popularly used in Brazilian Amazon. **Fitoterapia**, v.LXV, p.529-540, 1994.

DOMINGUEZ, X. A.; ALCORN, J. B. Screening of medicinal plants used by Huastec Mayans or Northeastern Mexico. **Journal of Ethnopharmacology**, v.13, p.139-156, 1985.

Farmacopeia Brasileira. 5.ed. Brasília: Anvisa, 2010.

FENNEL, C. W.; LINDSEY, K. L.; GAW, L. J. M.; SPARG, S. G.; STAFFORD, G. I.; ELGORASHI, E. E.; GRACE, O. M.; STADEN, J. V. Review: Assessing african medicinal plants for efficacy and safety: pharmacological screening and toxicology. **J. Ethnopharmacol**, v. 94, p.205-217, 2004.

GACHET, M. S.; LECARO, J. S.; KAISER, M.; BRUN, R.; NAVARRETE, H.; MUÑOZ, R. A.; BAUER, R.; SCHÜHLY, W. Assessment of anti-protozoal activity of plants traditionally used in Ecuador in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Ethnopharmacology**, v.128-1, p.184-197, 2010.

GRIFFITH, L.P. **Tropical Foliage Plants. A Grower's Guide**. Batavia (Illinois): Ball Pub, 1998.

HENNY, R. J.; CHEN, J. Foliage plant cultivar development. **Plant. Breed. Rev.**, v.23, p.245–290, 2003.

HENLEY, R. W.; ROBINSON, C. A. Nephthytis cultivars to know and grow. **Proc. Fla. State Hortic Soc.**, v.106, p.343-347, 1993.

HOFFMANN, C. E. F.; NEVES, L. A. S.; BASTOS, C. F.; WALLAU, G. L. Allelopathic activity of *Nerium oleander* L. and *Dieffenbachia picta* schott in seeds of *Lactuca sativa* L. and *Bidens pilosa* L. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.6, n.1, p. 11-21, 2007.

KANE, M. K. Micropropagation of Syngonium by shoot culture. **Plant tissue culture concepts and laboratory exercise**. 2.ed. Boca Raton: CRC, p.87–95, 1999.

KOKSAL, E.; BURSAL, E.; DIKICI, E.; TOZOGLU, F.; GULCIN, I. Antioxidant activity of *Melissa officinalis* leaves. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.5, p. 217-222, 2011.

KUMAR, S.; KUMAR, R.; DWIVEDI, A.; PANDEY, A. K. *In vitro* antioxidant, antibacterial, and cytotoxic activity and *in vivo* effect of *Syngonium podophyllum* and *Eichhornia crassipes* leaf extracts on isoniazid induced oxidative stress and hepatic markers. **Biomed Res Int.**, v.2014, 11 páginas.

MARONA, H. R. N.; SCHENKEL, E. P.; BERGONCI, J. I. Phytotoxic activity of *Ateleia glazioviana* Baill. extracts on lettuce seeds. **Acta Farm. Bonaerense**, v.22, p.17-20, 2003.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico, 6. ed. **NCCLS documento M7-A6**, v.23, n.2, 2003.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão. 8. ed. **NCCLS documento M2-A8**, v.23, n.1, 2003.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, n.8, p.2720-2722, 2002.

PELCZAR Jr., M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. São Paulo: McGraw Hill do Brasil, 1997. v.1, p. 566.

RICE, E.L. **Allelopathy**. 2.ed. New York: Academic Press, 1984.

RODRIGUES, F. C. M. P.; LOPES, B. M. Potencial alelopático de *Mimosa caesalpinaefolia* Benth sobre sementes de *Tabebuia alba* (Cham.) Sandw. **Floresta e Ambiente**, v. 8, n.1, p.130 - 136, 2001.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia - da Planta ao Medicamento**. 5. ed. Santa Catarina: UFSC, 2004.

SIEDENTOPP, U. El regaliz, una planta medicinal eficaz para la tos y las efeciones de estómago. **Revista Internacional de Acupuntura**, v.2, n.4, p.249-252, 2008.

Sociedade Brasileira de Farmacognosia. Disponível em: <http://www.sbfgnosia.org.br/Ensino/antraquinonas.html>. Acesso: em 21 set. 2014.

STARK, N.; GRIDLING, M.; MADLENER, S.; BAUER, S.; LACKNER, A.; POPESCU, R.; DIAZ, R.; TUT, F.M.; VO, T.P.; VONACH, C.; GIESSRIGL, B.; SAIKO, P.; GRUSCH, M.; SZEKERES, M. F.; SZEKERES, T.; KOPP, B.; FRISCH, R.; KRUPITZA, G. A polar extract of the Maya healing plant *Anthurium schlechtendalii* (Aracea) exhibits strong *in vitro* anticancer activity. **International Journal of Molecular Medicine**, v.44, p.513-521, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, p.719, 2004.

ZAMORA, M. C; DEPASCUAL, P, C. N. Medicinal plants used in some rural populations of Oaxaca, Puebla and Veracruz, Mexico. **Journal of Ethnopharmacology**, v.35, p.229-257, 1992.

Araraquara, 19 de Dezembro de 2014

Lenita Kazuko Tomita

De acordo,

Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado