

PAULINE ZONTA DE LIMA

**CULTIVO E TEOR DE CUMARINAS EM *Justicia pectoralis* Jacq. var.
stenophylla Leonar.**

Botucatu

2018

PAULINE ZONTA DE LIMA

**CULTIVO E TEOR DE CUMARINAS EM *Justicia pectoralis* Jacq. var.
stenophylla Leonar.**

Dissertação apresentada à faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Horticultura).

Orientadora: Dr^a Ana Maria Soares Pereira
Coorientadora: Dr^a Bianca Waléria Bertoni

**Botucatu
2018**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

L732c Lima, Pauline Zonta de, 1993-
Cultivo e teor de cumarinas em *Justicia pectoralis* Jacq. var. *stenophylla* Leonar. / Pauline Zonta de Lima. - Botucatu: [s.n.], 2018
73 p.: fots. color., grafs. color., ils., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2018
Orientador: Ana Maria Soares Pereira
Coorientador: Bianca Waléria Bertoni
Inclui bibliografia

1. Plantas medicinais - Cultivo. 2. Cumarina. 3. Umbelíferona. 4. Acanthaceae. I. Pereira, Ana Maria Soares. II. Bertoni, Bianca Waléria. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. IV. Título.

Elaborada por Ana Lucia G. Kempinas - CRB-8:7310

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte"

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

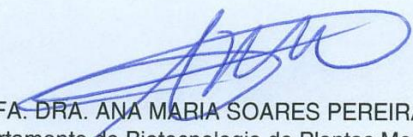
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CULTIVO E TEOR DE CUMARINAS EM *Justicia pectoralis* Jacq. var. *stenophylla* Leonar

AUTORA: PAULINE ZONTA DE LIMA

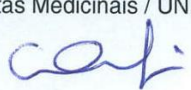
ORIENTADORA: ANA MARIA SOARES PEREIRA

COORDINADORA: BIANCA WALERIA BERTONI

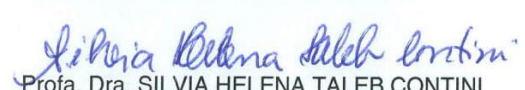
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AGRONOMIA (HORTICULTURA), pela Comissão Examinadora:


PROFA. DRA. ANA MARIA SOARES PEREIRA

Departamento de Biotecnologia de Plantas Medicinais / UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO


Profa. Dra. GIUSEPPINA PACE PEREIRA LIMA

Departamento de Química e Bioquímica / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP


Profa. Dra. SILVIA HELENA TALEB CONTINI

Departamento de Fitoquímica / UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO

Botucatu, 23 de fevereiro de 2018

AGRADECIMENTOS

A Deus pela presença constante em minha vida, me guiando e dando forças para minha jornada.

Aos meus pais e irmão, por me incentivarem e confiarem em minhas escolhas, encorajando-me a seguir meu caminho.

A minha companheira Joice pela compreensão, apoio nas horas mais difíceis e sobretudo pelo amor.

A Prof^a Dr^a Ana Maria Soares Pereira pela orientação, paciência e pelo exemplo de dedicação, trazendo tantas boas contribuições em minha vida pessoal e profissional. Agradeço imensamente!

A professora Prof^a Dr^a Bianca Waléria Bertoni, pela coorientação e por estar sempre presente em todos os passos.

Aos professores, membros da banca de qualificação: Prof. Dr^o Filipe Pereira Giardini Bonfim e Dr^o Lucas Junqueira de Freitas Morel, pela importante contribuição nesta etapa importante da pós-graduação.

Aos membros da banca de defesa, Prof^a Dr^a Giuseppina Pace P. Lima e Prof^a Dr^a Silvia Helena Taleb Contini por dedicarem seu precioso tempo na leitura desse trabalho.

Aos amigos de longa data e os conquistados durante a pós-graduação, em especial Rafaelly, Helena, Gustavo, Juliana, Marielle e Isabela pelo apoio e amizade, meu muito obrigada.

A Valéria e amigos, que auxiliaram a condução do experimento em Araxá.

À todos os professores e funcionários da UNESP e UNAERP pelo auxílio e por contribuir em minha formação, pela colaboração e atenção dispensadas durante toda a realização do trabalho.

À Faculdade de Ciências Agrônômicas – FCA, em especial ao programa de pós-graduação em Agronomia – Horticultura pela oportunidade de realizar o curso de mestrado.

À CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

A todos, que direta e indiretamente, colaboraram de alguma forma com o trabalho.

RESUMO

A espécie *Justicia pectoralis* (Acanthaceae) é uma planta herbácea encontrada em uma ampla distribuição geográfica entre os trópicos de Câncer e Capricórnio. No Brasil, a principal denominação popular é chambá, sendo a espécie prioritariamente utilizada em afecções do sistema respiratório. O presente trabalho visou avaliar o comprimento e diâmetro de parte aérea, massa fresca e seca de parte aérea e raiz, além dos teores de cumarina e umbeliferona utilizando dois genótipos de *J. pectoralis* cultivados em duas localidades, além do cultivo frente a cinco níveis de saturação por base de solo que variou de 17, 40, 60, 80 e 100%, cinco doses de esterco bovino entre os intervalos de 0, 20, 40, 60 e 80 t.ha⁻¹ e três condições de sombreamento sendo a pleno sol, 50 e 80% de sombreamento. Quanto ao acúmulo de cumarina, as doses de esterco e os níveis de saturação por base de solo apresentaram efeito negativo. Considerando a produtividade de massa seca, a adubação com esterco promoveu aumento de biomassa. Os dois genótipos avaliados, independente do local, não apresentaram diferenças, entre si, quanto ao crescimento e acúmulos de massa fresca e seca. Na avaliação entre os genótipos, o Jp2, cultivado em Loc2, produziu maior teor de cumarina (40,20 µg.mg⁻¹ de extrato), enquanto que o Jp1, cultivado em Loc1, apresentou maior acúmulo de umbeliferona (4,33 µg.mg⁻¹ de extrato). Plantas cultivadas a pleno sol apresentaram maior teor de cumarina (57,90 µg.mg⁻¹ de extrato) e acúmulo de massa seca (14,93 g) quando comparada com os níveis de sombreamento. Conclui-se que o cultivo de *Justicia pectoralis* em Loc2, a pleno sol e sem adição de calcário ou adubação são as melhores condições para o desenvolvimento satisfatório da espécie frente aos parâmetros avaliados.

Palavras-chave: Cumarina. Umbeliferona. Acanthaceae. Planta medicinal.

ABSTRACT

Justicia pectoralis (Acanthaceae) is an herbaceous species found in a wide geographic distribution between the Cancer and Capricorn tropics. The mainly folk name In Brazil is chambá, and it is used specially for respiratory system affections. The present work aimed to evaluate the length and diameter of aerial part, fresh and dry mass of aerial part and roots, besides the coumarin and umbelliferone accumulation by using two genotypes of *J. pectoralis* cultivated in Loc1 and Loc2 cities. In addition, we evaluated the influence of five soil saturation levels (17, 40, 60, 80 and 100%), five doses of cattle manure (0, 20, 40, 60 and 80 t.ha⁻¹) and three luminosity conditions (full sun, 50 and 80% of artificial shading). Both the cattle manure and the soil-based saturation levels showed a negative effect in the coumarin accumulation. Moreover, the cattle manure promoted biomass increase. Related to location, we showed that there are no differences between the growth aspects of the both two genotypes. The Jp2 genotype cultured in Loc2 produced a higher coumarin content (40.20 µg.mg⁻¹ of extract), while the Jp1 cultured in Loc1 accumulated more umbelliferone (4.33 µg.mg⁻¹ of extract). Plants grown in full sun showed higher coumarin content (57.90 µg.mg⁻¹ extract) and dry mass accumulation (14.93 g) when compared to shade levels. We concluded that the best conditions to obtain greater development of *J. pectoralis* were in Loc2, in full sun and without addition of cattle manure or calcareous.

Keywords: Coumarin. Umbelliferone. Acanthaceae. Medicinal plant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Anatomia <i>J. pectoralis</i> : (I) visão da planta toda; (II a) folha lado abaxial; (II b) folha lado adaxial; (III) inflorescência; (V) flor; (V) caule subquadrangular ..	25
Figura 2 - Marcadores químicos de <i>J. pectoralis</i> : 1,2-benzopirona ou cumarina (I) e 7-hidroxycumarina ou umbeliferona (II)	26
Figura 3 - Dados meteorológicos do município de Botucatu, no período de agosto a dezembro de 2016.	34
Figura 4 - Visão geral do experimento de calagem em <i>J. pectoralis</i> na casa de vegetação UNESP – Botucatu	36
Figura 5 - Visão geral do experimento de adubação em <i>J. pectoralis</i> na casa de vegetação UNESP – Botucatu	40
Figura 6 - Locais de implementação dos experimentos na região sudeste do Brasil com dois genótipos diferentes de <i>Justicia pectoralis</i>	41
Figura 7 - Dados meteorológicos de Ribeirão Preto entre os meses de junho a setembro de 2017.	46
Figura 8 - Plantas aleatórias do experimento com níveis diferentes níveis de saturação por base do solo (V%) na colheita.....	49
Figura 9 - Curva de calibração do padrão cumarina em mg.mL ⁻¹	49
Figura 10 - Teor de cumarina (µg/mg de extrato) em parte aérea de plantas submetidas a diferentes saturações por base de solo (%)	50
Figura 11- Correlação simples de Pearson entre nutrientes de parte aérea nos tratamentos com níveis de saturação por base de solo com o teor de cumarina encontrado	51
Figura 12 - Comprimento (cm) da parte aérea de plantas de <i>Justicia pectoralis</i> em função das diferentes doses de esterco bovino	53
Figura 13 - Número de brotações em função das diferentes doses de esterco bovino (t.ha ⁻¹) obtidos em <i>Justicia pectoralis</i>	53
Figura 14 - Massa fresca (g) das plantas de <i>Justicia pectoralis</i> em função das diferentes doses de esterco bovino (t.ha ⁻¹)	54
Figura 15 - Massa seca (g) das plantas de <i>Justicia pectoralis</i> em função das diferentes doses de esterco bovino (t.ha ⁻¹)	55

Figura 16 - Plantas aleatórias do experimento com dose de esterco bovino na colheita	55
Figura 17 - Teor de cumarinas ($\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ de extrato) em parte aérea de plantas de <i>Justicia pectoralis</i> cultivadas com diferentes doses de esterco bovino	56
Figura 18 - Correlação simples de Pearson entre nutrientes presentes na parte aérea de <i>Justicia pectoralis</i> nos tratamentos com doses de esterco bovino em relação ao teor de cumarina.....	57
Figura 19 - Cromatogramas CLAE-DAD-EM dos padrões de referência: (a, a1 e a2) umbeliferona (b, b1 e b2), cumarina com os respectivos espectros de UV (ultra-violeta) e MS (massa) e extratos de <i>Justicia pectoralis</i> cultivado a pleno sol (c) com 50 % de sombreamento (d) e 80% de sombreamento (e).....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise do solo utilizado para o preparo dos tratamentos de adubação e calagem em Botucatu.....	35
Tabela 2 - Análise de esterco bovino utilizado no experimento de adubação em Botucatu	40
Tabela 3 - Coordenadas dos locais do experimento com dois genótipos de <i>Justicia pectoralis</i>	41
Tabela 4 - Análise de solo das localidades Loc1 e Loc2.....	42
Tabela 5 - Dados de temperatura e pluviométrico nas localidades 1 e 2 durante o período experimental.....	42
Tabela 6 - Efeito das diferentes doses de calagem e seus respectivos níveis de saturação por base no comprimento de parte aérea, no número de brotações, na massa fresca e seca de parte aérea de <i>Justicia pectoralis</i>	48
Tabela 7 - Valores de nutrientes encontrados parte aérea seca de <i>J. pectoralis</i> de acordo com os níveis de saturação por base (V%)	52
Tabela 8 - Valores de nutrientes encontrados parte aérea seca de <i>Justicia pectoralis</i> de acordo com as doses de esterco bovino	57
Tabela 9 - Comprimento e diâmetro de parte aérea (cm), massa fresca e seca de parte aérea e raízes (g), teor de cumarina e umbeliferona ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ de extrato) de dois genótipos Jp1 e Jp2 cultivados em Loc1 e Loc2	59
Tabela 10 - Comprimento e diâmetro de parte aérea (cm), massa fresca e seca de parte aérea e raízes (g), teor de cumarina e umbeliferona ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ de extrato) nos diferentes níveis de sombreamento	61
Tabela 11 - Relação droga/derivado dos extratos produzidos de plantas de <i>Justicia pectoralis</i> submetidas aos vários tratamentos.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CaCO ₃	Carbonato de cálcio
Carolina Soil®	Substrato comercial
CH	Centesimal Hahnemanianno
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-DAD-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector photodiodearray acoplado ao massas
CP	Comprimento
CTA	Capacidade de troca aniônica
CTC	Capacidade de troca catiônica
CYP2E1	Citocromo P450 2E1
Fe-NTA	Nitrilotriacetato férrico
GLUT4	transportador de glicose tipo 4
H ⁺	íons de hidrogênio
H+Al	Acidez potencial
HepG2	Células de hepatocarcinoma humano
KBrO	Bromato de potássio
M.O.	Matéria orgânica
MF	Massa fresca
MS	Massa seca
N/C	Relação nitrogênio/carbono
NB	Número de brotações
N-P ₂ O ₅ -K ₂ O	Fonte de nitrogênio, fosforo e potássio
Plantmax®	Substrato comercial
PPAR _γ	receptores ativados por proliferadores de peroxissoma
P _{resina}	Suposta absorção de fósforo pelas plantas
PRNT	Poder relativo de neutralização total
SUS	Sistema Único de Saúde
V%	Porcentagem de saturação de bases

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1	Botânica e distribuição	23
2.2	Metabólitos secundários encontrados em <i>Justicia pectoralis</i>	26
2.3	Etnobotânica, etnofarmacologia e atividades farmacológicas	28
2.4	Solo, adubação e calagem	29
2.5	Estudos agronômicos com <i>Justicia pectoralis</i>	31
3	OBJETIVOS	33
3.1	Geral	33
3.2	Específicos	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	Experimento 1: Avaliação do efeito de diferentes níveis de saturação por base de solo no acúmulo de cumarina e no crescimento de parte aérea de <i>Justicia pectoralis</i>	34
4.1.1	Caracterização da área experimental	34
4.1.2	Produção de mudas	35
4.1.2.1	Produção de mudas de níveis de saturação por base de solo e doses de adubação com esterco bovino	35
4.1.3	Realização do experimento de níveis de saturação por base de solo..	35
4.1.4	Manutenção dos experimentos	37
4.1.5	Procedimento da coleta e características analisadas	37
4.1.5.1	Procedimento de coleta e características analisadas dos experimentos de níveis de saturação por base de solo e doses de adubação com esterco bovino	37
4.1.6	Extração e quantificação de cumarina	37

4.2	Experimento 2: Avaliação do efeito de diferentes doses de adubação e calagem no acúmulo de cumarina e no crescimento de parte aérea de <i>Justicia pectoralis</i>	39
4.2.1	Caracterização da área experimental.....	39
4.2.2	Realização do experimento de adubação utilizando esterco bovino e calcário.....	39
4.3	Experimento 3: Avaliação de dois genótipos de <i>Justicia pectoralis</i> cultivadas nos municípios de Loc2-SP e Loc1-MG no crescimento de parte aérea e acúmulo do teor de cumarinas	41
4.3.1	Caracterização das áreas experimentais	41
4.3.2	Produção de mudas	43
4.3.2.1	Produção de mudas dos experimentos com dois genótipos de <i>Justicia pectoralis</i> e diferentes níveis de sombreamento	43
4.3.3	Manutenção do experimento	43
4.3.4	Procedimento de coleta e características analisadas.....	44
4.3.4.1	Procedimento de coleta e características analisadas dos experimentos com dois genótipos de <i>Justicia pectoralis</i> e diferentes níveis de sombreamento.....	44
4.3.5	Extração e quantificação de cumarina e umbeliferona	44
4.4	Experimento 4: Avaliação de diferentes níveis de sombreamento no crescimento de parte aérea e teor de cumarinas em <i>Justicia pectoralis</i>	45
4.4.1	Caracterização da área experimental.....	45
4.4.2	Realização do experimento	46
4.4.3	Cromatografia líquida de ultra eficiência com detector de arranjo de diodos e de massas (CLAE-DAD-EM).....	46
5	Análise estatística	47
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48

6.1	Experimento 1: Avaliação do efeito de diferentes níveis de saturação por base de solo no acúmulo de cumarina e no crescimento de parte aérea de <i>Justicia pectoralis</i>	48
6.2	Experimento 2: Avaliação do efeito de diferentes doses de adubação e calagem no acúmulo de cumarinas e no crescimento de parte aérea de <i>Justicia pectoralis</i>	52
6.3	Experimento 3: Avaliação de dois genótipos de <i>Justicia pectoralis</i> cultivadas nos municípios de Loc2-SP e Loc1-MG no crescimento de parte aérea e acúmulo do teor de cumarinas	58
6.4	Experimento 4: Avaliação de diferentes níveis de sombreamento no crescimento de parte aérea e teor de cumarinas em <i>Justicia pectoralis</i>	60
6.5	Produção de extrato	63
7	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

Ao longo da década de 1990, entre 65% e 80% da população nos países em subdesenvolvimento e em desenvolvimento dependiam de plantas medicinais como única forma de acesso a saúde básica (OMS, 1990). Atualmente, dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) ilustram que 80% da população mundial recorre às plantas medicinais em algum estágio de suas enfermidades em busca de alívio para algum sintoma (OMS, 1990). A *J. pectoralis* é uma destas plantas medicinais utilizadas frequentemente pela população e suas citações de uso datam a partir dos anos 1960 (SIMPSON, 1962; LOPEZ et al., 1963) com indicações populares para o tratamento de enfermidades do sistema respiratório, sistema digestivo, além de alívio para dores diversas no corpo e calmante.

A espécie *Justicia pectoralis* é conhecida também como chambá e nativa do Caribe, mas pode ser encontrar na América Central e na América do Sul, sendo bem adaptada ao clima tropical. Devido às suas várias indicações terapêuticas – as quais demonstram sua importância farmacológica em doenças negligenciadas, a espécie *J. pectoralis* foi incluída na Relação de Plantas Medicinais de Interesse para o SUS (Rénisus). Isto demonstra um importante potencial na produção de fitoterápicos.

Em relação a este mercado, em toda a cadeia produtiva, o setor de fitoterápicos tem movimentado anualmente cerca de US\$ 1 bilhão pelo mundo e tem crescido mais de 15% ao ano enquanto as vendas de medicamentos sintéticos crescem em torno de 4% ao ano (CARVALHO, 2008). No Brasil, esse valor é cerca de US\$ 400 milhões e representa 6,7% das vendas do setor de medicamentos (LIMA, 2006).

Outro fator justificativo do presente trabalho é que a *J. pectoralis*, além de fácil propagação, tem um crescimento relativamente rápido – de 4 a 6 meses – se comparada a outras plantas que produzem cumarina, como *Dipteryx odorata* (Cumaru), que utiliza as sementes e demora pelo menos 4 anos para o início da frutificação (SANTOS, 2002) e a *Mikania levigata*, que possui o tempo ideal de colheita aos 11 meses de plantio (SANTOS, 2016).

Ademais, os estudos sobre a *J. pectoralis* que correlacionam seu cultivo ao acúmulo do teor de metabólitos secundários ainda é escasso na literatura

acadêmica. O aprofundamento nas pesquisas sobre seu cultivo, produção e análise de compostos químicos, se apresenta, desta forma, não apenas como enriquecedor à literatura farmacológica e agronômica, mas também necessário ao pleno conhecimento do potencial da espécie.

Diante do exposto, o presente trabalho propôs-se a avaliar a produtividade e teor de cumarina e umbeliferona em dois genótipos de *J. pectoralis* em diferentes condições de cultivo visando o aprimoramento na produção de biomassa e cumarinas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Botânica e distribuição

A família Acanthaceae possui 39 gêneros, sendo 5 endêmicos do Brasil, e mais de 446 espécies distribuídas nos diversos tipos de vegetações dos biomas brasileiros. Tais espécies ocorrem com maior incidência na Mata Atlântica, Cerrado e Amazônia, presentes nos estados do Acre, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Ceará, Maranhão, Goiás e Mato Grosso. O gênero *Justicia* compreende 126 espécies e é o maior gênero dentro desta família, das quais 70 espécies são endêmicas no Brasil (FLORA DO BRASIL, 2017) .

A ESPÉCIE: *Justicia pectoralis* Jacq. var. *stenophylla* Leonar.

Sinonímia: *Dianthera pectoralis* (Jacq.) J.F. Gmel.

Dianthera pectoralis (Jacq.) Murray

Ecbolium pectorale (Jacq.) Kuntze

Justicia pectoralis var. *latifolia* Bremek.

Justicia stuebelii Lindau

Psacadocalymma pectorale (Jacq.) Bremek.

Rhytiglossa pectoralis (Jacq.) Nees

Stethoma pectoralis (Jacq.) Raf.

Classe: Equisetopsida C. Agardh

Subclasse: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superordem: Asteranae Takht.

Ordem: Lamiales Bromhead

Família: Acanthaceae Juss.

Gênero: *Justicia* L.

Fonte: TROPICOS (2017)

A espécie *Justicia pectoralis* está distribuída na América Tropical (TROPICOS, 2017), uma erva perene de aproximadamente 30 cm de comprimento (Figura 1), com caule verde em formato subcilíndrico a subquadrangular. O caule apresenta ainda tricomas retrorsos e esbranquiçados dispostos em linhas verticais. Possui

raiz fasciculada, que pode estar presente também em gemas inferiores. As folhas são membranáceas e opostas, de coloração verde que podem, no entanto, apresentar pigmentação vinácea. Com formato estreito-ovalada, a lâmina foliar adulta mede em torno de 3 cm, na qual encontram-se tricomas com 0,3 mm de comprimento em ambas as faces e um pecíolo com cerca de 5,0 mm de comprimento (OLIVEIRA; ANDRADE, 2000).

A avaliação da superfície foliar da espécie *J. pectoralis*, realizada em microscópio eletrônico de varredura, mostrou tricomas tectores com formatos ovais, arredondados, elípticos e deltoides. Tricomas tectores subsésseis de quatro células também foram observados sob a superfície foliar, bem como a presença de células epidérmicas com paredes celulares anticlinais sinuosas. Os estômatos são do tipo anfiestomático e diacíticos. Há presença de litocistos, encontrados somente na superfície adaxial. Também foram encontrados depósitos amorfos de cera epicuticular em ambas as faces, sendo mais evidentes na abaxial (AOYAMA; INDRIUNAS, 2014).

A inflorescência paniculada terminal apresenta entre 6-15 cm de comprimento, podendo ser alternadas ou opostas, com flores séssil e axial. O cálice é puberulento de coloração verde claro. A corola pode ser de lilás a violeta personada, com 6 a 7,5 mm de comprimento, tubo reto, lábio superior ereto, triangular, com o inferior 3-lobado, externamente pubérulo. Possui dois estames parcialmente adnatos ao tubo da corola. As anteras são rimosas e o ovário é supero, oblongo, bicarpelar, bilocular, contendo dois óvulos por lóculo. (WASSHAUSEN; WOOD, 2004).

Figura 1- Anatomia *J. pectoralis*: (I) visão da planta toda; (II a) folha lado abaxial; (II b) folha lado adaxial; (III) inflorescência; (IV) flor; (V) caule subquadrangular



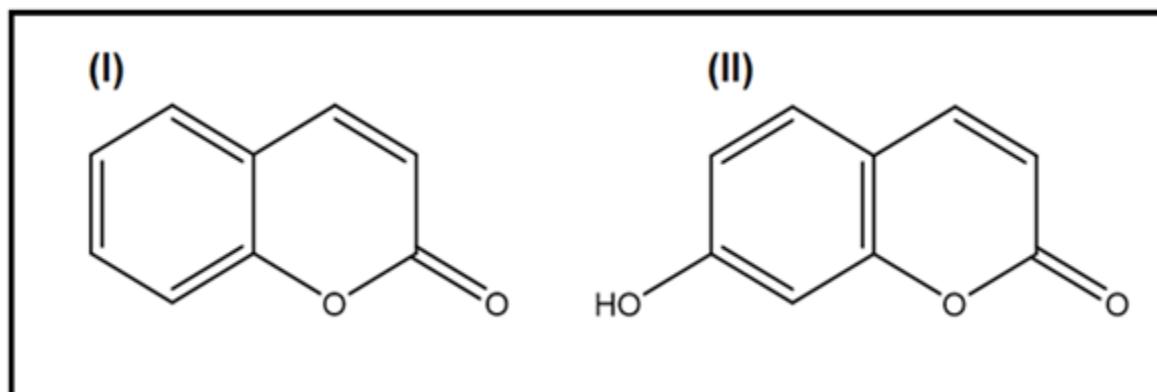
2.2 Metabólitos secundários encontrados em *Justicia pectoralis*

Vários metabólitos secundários foram isolados de *J. pectoralis* sendo os de maior ocorrência a 1,2-benzopirona (cumarina) e a 7-hidroxicumarina (umbeliferona) (Figura 2) 7-metoxicumarina, 2-metoxi-4-cromono, dihidrocumarina, 3-isocromanona, ácido 3-fenilpropiónico, ácido propiónico 3-(2-hidroxifenil) e ácido propiónico metil éster 3-(2-hidroxifenil) (MACRAE; TOWERS, 1984; VRIES et al., 1988).

Um estudo fitoquímico realizado com extrato hidroetanólico, produzido a partir da planta toda, mostrou a presença de outros compostos, tais como, quatro flavonas denominadas swertisina, 2"-O-ramnosilswertisin, swertiajaponina e 2"-O-ramnosilswertiajaponina (JOSEPH et al., 1988a). Foi isolado do extrato etanólico do mesmo material uma lignana denominada justicidina B (JOSEPH et al., 1988b).

Em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) mostrou que as partes aéreas de *J. pectoralis* contêm cumarina, 7-hidroxicumarina, 7-metoxicumarina, 2-metoxi-4-cromono, dihidrocumarina, 3-isocromanone, ácido 3-fenilpropiónico, ácido propiónico 3-(2-hidroxifenil) e ácido propiónico metil éster 3-(2-hydroxyphenyl) (MACRAE; TOWERS, 1984; VRIES et al., 1988).

Figura 2- Marcadores químicos de *J. pectoralis*: 1,2-benzopirona ou cumarina (I) e 7-hidroxicumarina ou umbeliferona (II)



Atualmente são conhecidas aproximadamente 1.300 moléculas pertencentes a classe das cumarinas, isoladas de 150 espécies de plantas, pertencentes a 30 famílias diferentes (CUNHA, 2010; MAISTRO et al., 2014). As cumarinas e seus

derivados encontram-se amplamente distribuídos no reino vegetal, sendo encontradas principalmente nas famílias botânicas *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Rosaceae*, *Rutaceae*, *Rubiaceae*, *Solanaceae* e *Lamiaceae*, (JAIN; JOSHI, 2012; PETRUL'OVÁ-PORACKÁ et al., 2013).

Esta classe de compostos tem um lugar de destaque nas descobertas de drogas, devido à sua diversidade de compostos biologicamente ativos. Consequentemente, grupos de pesquisa em todo o mundo projetam e sintetizam numerosos análogos cumarínicos para uso no tratamento de doenças variadas (KAUR et al., 2015). Em seus potenciais farmacológicos destacam-se a atividade anticancerígena (KAUR et al., 2015) e neurodegenerativas (NDs) (JAMEEL et al., 2016).

O composto 1,2-benzopirona foi descoberto na planta caribenha *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd., *Fabaceae*, de nome popular Cumaru, que deu origem ao nome da substância cumarina. Sua principal característica é o odor de baunilha e sabor amargo. É também bastante utilizada na indústria alimentícia e, por isso, na União Europeia a diretiva 88/388/EEC (EEC, 1988) estabeleceu limites de doses de acordo com o tipo de produto como alimentos e bebidas (2 mg.Kg^{-1}), bebidas alcoólicas (10 mg.Kg^{-1}) e gomas de mascar (50 mg.Kg^{-1}) para evitar o alto consumo.

Entre as atividades farmacológicas da cumarina destacam-se as ações anti-câncer como um agente quimiopreventivo e eficaz também contra o estresse oxidativo renal mediada por KBrO e supresor da nefrotoxicidade induzida por Fe-NTA em ratos (KHAN et al., 2004a; KHAN et al., 2004b), efeito imunomodulador em tratamentos de tumores (STUHLMEIER et al, 1991) e atividade na regulação do hipertireoidismo sem hepatotoxicidade (PANDA; KAR, 2007). Entretanto, estudos têm ressaltado que a cumarina possui influência diferente no metabolismo de acordo com suas dosagens. A redução no CYP2E1 mitocondrial, por exemplo, pode estar relacionada a resistência à cumarina, após doses repetidas. Além disto, estudos indicam que a expressão de CYP2E1 pode também estar envolvida na toxicidade hepatocelular induzida pela cumarina em ratos (TANAKA et al., 2016).

Suspeitas de efeitos anticoagulantes da cumarina não foram comprovados, a possível causa deste problema está relacionada a uma reação de fungos (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Mucor*, entre outros) convertendo a cumarina

em 4-hidroxycumarina, que se dimeriza espontaneamente para dicumarol, que possui efeito anticoagulante (LINK, 1959).

A 7-hidroxycumarina, ou umbeliferona, é um composto hidroxilado da cumarina. Testes farmacológicos com este composto comprovaram sua eficácia para o tratamento da asma (VASCONCELOS et al., 2009), visto a diminuição na produção de muco e inflamação pulmonar em camundongos tratados, destacando o uso. A umbeliferona possui ainda efeitos anticancerígenos significativos através da indução de apoptose, interrupção do ciclo celular e fragmentação de DNA em HepG2 células cancerosas (Yu et al., 2015), além de melhorar o metabolismo de glicose e lipídios no diabetes tipo 2, estimulando a secreção de insulina e os mecanismos relacionados via expressão estimulante de adiponectina, GLUT4, PPAR γ e PPAR-proteína (NAOWABOOT et al., 2015).

Em experimentos de uso conjunto de cumarina e umbeliferona, conclui-se que estes compostos, quando associados, têm atividade antitumoral direta (citostática), bem como atividade imunomoduladora em relação ao câncer de próstata (MARSHALL et al., 1994).

2.3 Etnobotânica, etnofarmacologia e atividades farmacológicas

A utilização de *J. pectoralis* por povos indígenas é bastante antiga, sendo esta espécie amplamente empregada para a produção de rapé, pelos Índios *Yanomamö*, localizados na floresta Amazônica entre Brasil, Venezuela e Colômbia. A planta pode ser consumida como rapé isoladamente ou em misturas com as espécies *Elizabetha princeps* Schomb. ex Benth e *Virola elongata* (Benth.) Warb, além de ser utilizada como ornamento pelas índias em uma espécie de brinco composto por vários ramos unidos, passados por um furo na orelha (BREWER-CARIAS; STEYERMARK, 1976). No Peru e no Equador, a espécie *J. pectoralis* é utilizada como complemento na alimentação de cães, pois há uma crença que a planta melhora as habilidades de caça desses animais (BENNETT; ALARCÓN, 2015) e em Trinidad e Tobago *J. pectoralis* é utilizada para tratar problemas de próstata (LANS, 2007).

Um levantamento etnofarmacológico realizado na região litorânea do estado do Pará, relatou que a população faz uso místico da planta, utilizando-a para banhos ou macerados com a finalidade de “abrir caminho” e dar proteção religiosa. Além disto, utilizam-na para dor de cabeça, reumatismo e acidente vascular cerebral (COELHO-FERREIRA, 2009). Já na região nordeste do Brasil, o chá ou xarope de *J. pectoralis* é amplamente utilizado como expectorante, antiasmático e analgésico (LINO et al., 1997; MATOS, 1994).

Estudos farmacológicos realizados em Cuba mostraram que a planta é efetiva no tratamento de hipertensão arterial (GARCÍA-LAZO et al., 2015). Na Guatemala, o povo Q’eqchi’ Maya recorre à *J. pectoralis* para tratar epilepsia (AWAD et al., 2009). Ensaio realizado *in vitro* na Costa Rica, demonstraram que extrato metanólico de *J. pectoralis* apresenta efeitos anti-inflamatórios, estrogênicos e progestagênicos, confirmando seu uso para tratamento de sintomas da menopausa (LOCKLEAR et al., 2010).

No Brasil, estudos farmacológicos do extrato hidroetanólico, utilizando-se camundongos machos, confirmaram a atividade antinociceptiva, anti-inflamatória (LINO et al., 1997) e efeito ansiolítico (VENÂNCIO et al., 2011). Evidências desta atividade ansiolítica são apontadas em diversos trabalhos publicados na forma de resumo (LIMA et al., 2014; SANTOS JÚNIOR et al., 2014; SOUZA et al., 2014; VASCONCELOS et al., 2014; VENÂNCIO et al., 2014).

2.4 Solo, adubação e calagem

O solo pode ser dividido em três partes: a sólida, onde estão os minerais e matéria orgânica (M.O.); a parte líquida, na qual são encontrados elementos minerais misturados com a água do solo; e a parte gasosa, onde a maior parte é gás carbônico (BRONICK; LAL, 2005).

As partes gasosa e líquida se encontram em equilíbrio dinâmico e quando ocorre alguma cheia ou seca é possível encontrar maior porcentagem de líquidos ou gases no solo. Isso varia de acordo com a porosidade do solo e consequentemente sua compactação (REINERT; REICHERT, 2006). Neste sentido, a matéria orgânica presente no solo é de extrema importância não só para

fornecimento dos nutrientes necessário ao desenvolvimento vegetal como para a micro e macro biota do solo, além do aumento da porosidade do mesmo e a consequente melhora de sua estrutura e maior retenção de umidade (TISDALL; OADES, 1982; MEDA et al., 2002).

O esterco bovino é um adubo relativamente barato quando comparado com outros adubos orgânicos como cama de franco e torta de mamona e é de fácil acesso para o produtor rural. Este adubo contribui muito com a M.O. no solo devido sua proporção de N/C, beneficiando a bioestrutura do solo e aumentando a CTC, a retenção de água e a micro, meso e macrofauna, além de fornecer nutrientes para cultura que são liberados mais lentamente devido o equilíbrio de N/C do material curtido (PRIMAVESI, 2002).

As partículas minerais e orgânicas da porção sólida do solo têm a capacidade de desenvolver cargas negativas e positivas, as quais atraem os íons de cargas opostas e possuem a capacidade de troca catiônica conhecida como CTC ou a capacidade de troca aniônica (CTA). Esta capacidade que o solo tem de “ganhar ou perder cargas” está relacionada ao pH, quanto mais H^+ presente no solo, maior será sua acidez (PAVAN, 1997).

A acidez do solo tem sido considerada uma das principais causas de limitação à produtividade agrícola em todo o mundo por restringir a absorção de água e nutrientes pelas culturas, além da intoxicação das plantas por H^+ , Al^{3+} e Fe^{2+} , afetando também o crescimento radicular (PAVAN et al., 1982; QUAGGIO, 2000; CAIRES, 2013).

Os cátions de interesse para a planta no solo são os amônios (NH_4^+), potássio (K^+), cálcio (Ca^{2+}), magnésio (Mg^{2+}), cobre (Cu^{2+}), manganês (Mn^{2+} ou Mn^{4+}) e zinco (Zn^{2+}). Estes têm menos força de ligação com argilas e são lixiviados e perdidos mais rapidamente (PAVAN, 1997), restando o ferro (Fe^{2+} ou Fe^{3+}) e alumínio (Al^{3+}) em maiores concentrações. Para minimizar estas perdas uma técnica bastante empregada na agricultura é a realização de calagens.

A calagem é uma das práticas agrícolas essenciais para solos tropicais pois visa elevar o pH do solo, neutralizar a toxidez causada pelo H^+ , Al^{3+} e Fe^{2+} trocáveis e aumentar os teores de Ca^{2+} e Mg^{2+} (OLIVEIRA; PAVAN, 1996; RHEINHEIMER et al., 2000). Desta forma há uma maior disponibilidade de nutrientes além de melhorar a eficiência dos fertilizantes (CASTRO; CRUSCIOL, 2014; CAIRES et al.,

2015), favorecendo também o desenvolvimento do sistema radicular (NICOLODI et al., 2008). Ademais, a médio e a longo prazo ocorre um aumento na produção de biomassa por área, de raízes e de parte aérea (BRIEDIS et al., 2012) devido à utilização da calagem. Contudo, mesmo que o calcário se mostre eficiente em melhorias no solo, deve-se levar em consideração o sistema radicular da cultura. Dependendo do tamanho do sistema radicular, é possível conciliar outra técnica de calagem adicional como a gessagem, que atua em maior profundidade do solo em relação ao calcário (CAIRES et al., 2001; CAIRES et al., 2003). Além disto, o tempo de ativação do calcário depende do tipo de solo e do clima, o que interfere diretamente no seu tempo de ativação e no alcance da profundidade dos seus efeitos (SORATTO; CRUSCIOL, 2008).

2.5 Estudos agronômicos com *Justicia pectoralis*

Experimentos realizados com *J. pectoralis*, em canteiros de 5,0 x 1,0 m, com espaçamento entre plantas de 10,0 cm, mostraram ser mais eficientes para evitar o crescimento de plantas indesejáveis em detrimento de um espaçamento de 20,0 cm. Em contrapartida, o maior espaçamento entre plantas (20,0 cm), promoveu maior crescimento devido a diminuição da competição (FERRADÁ et al., 2003).

Quanto à adubação, experimentos comparativos realizados com seis doses de esterco bovino (0; 10; 20; 30; 40 e 50 t.ha⁻¹) e três formulações de N-P₂O₅-K₂O (0-0-0; 40-200-120; 80-400-240, em kg.ha⁻¹), indicaram que o maior crescimento das plantas, em altura, é obtido com a adubação com esterco bovino a 50 t.ha⁻¹. O maior rendimento de massa seca foi alcançado com 40 t.ha⁻¹ de esterco bovino sem adubação mineral e o melhor rendimento de óleo essencial foi obtido de plantas sem a utilização de adubação (MARCOS et al., 2006).

O melhor tempo de colheita de plantas de *J. pectoralis* foi constatado em experimentos realizados em Cuba, no qual as plantas foram cultivadas por 4, 6 e 8 meses. Os resultados demonstraram que a concentração de cumarina e umbeliferona produzidas pela planta mantidas no campo diminuiu a partir do sexto mês (CHANFRAU; FERRADA, 2014).

A produção de mudas por estacas foi estabelecida através de ramos medianos sem folhas, contendo de 4 a 5 gemas, com o substrato Plantmax® em bandejas com 128 células. O número de células, neste aspecto, interferiu diretamente na quantidade de folhas produzidas pelas mudas (FERREIRA et al., 2015).

Outra maneira de avaliar o crescimento e a produção de cumarina encontrada foi frente ao uso de isoterápico de *J. pectoralis*, em diluição CH30 houve significativo crescimento vegetativo das plantas e na dinamização CH6 ocorreu aumento no teor de cumarina (ANDRADE et al., 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a produtividade de massa fresca e seca de parte aérea e o teor de umbeliferona e cumarina presentes em dois genótipos de *Justicia pectoralis* cultivados em diferentes ambientes e condições de cultivo.

3.2 Específicos

1. Determinar a dosagem adequada de esterco bovino na produção de biomassa e teor de cumarina e umbeliferona em parte aérea de *J. pectoralis*;
2. Avaliar o efeito do nível de saturação por base de solo para a produção de fitomassa e teor de cumarina em parte aérea de *J. pectoralis*;
3. Comparar a produtividade de fitomassa, e o teor de cumarina e umbeliferona de dois genótipos de *J. pectoralis* cultivados em duas localidades, Loc1 e Loc2;
4. Avaliar a produtividade de fitomassa e teor de cumarina e umbeliferona em *J. pectoralis* cultivada em três condições de sombreamento.

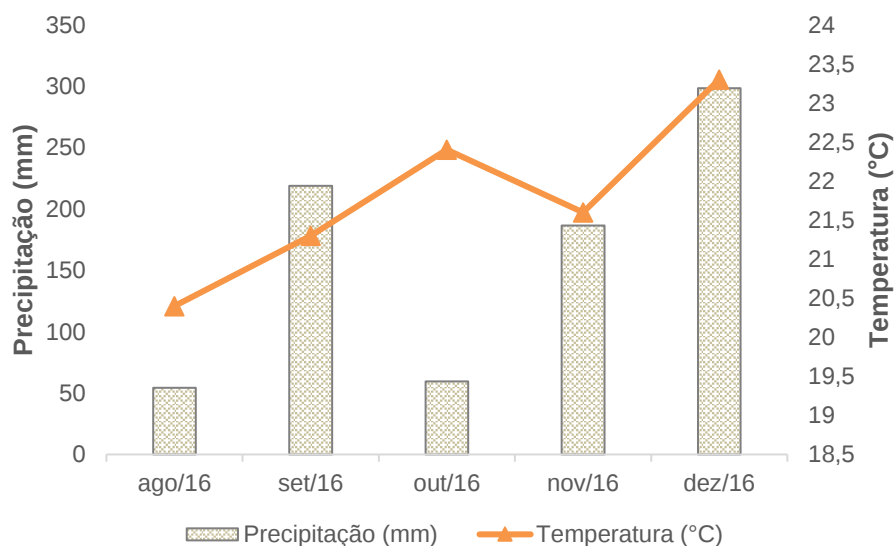
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Experimento 1: Avaliação do efeito de diferentes níveis de saturação por base de solo no acúmulo de cumarina e no crescimento de parte aérea de *Justicia pectoralis*

4.1.1 Caracterização da área experimental

O experimento foi realizado em casa de vegetação no Departamento de Horticultura – Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA/UNESP), na cidade de Botucatu - São Paulo, em um período de 180 dias entre os meses de agosto e dezembro de 2016. A casa de vegetação apresenta sombreamento de 50%, está localizada a 22°50'41.58" sul e 48°25'58.32" oeste, com altitude de 838 m. As médias de temperatura, umidade e precipitação estão apresentadas na Figura 3.

Figura 3 - Dados meteorológicos do município de Botucatu, no período de agosto a dezembro de 2016.



Fonte: Estação Meteorológica da FCA/UNESP¹

¹ Dados meteorológicos obtidos através de funcionários da estação meteorológica.

4.1.2 Produção de mudas

4.1.2.1 Produção de mudas de níveis de saturação por base de solo e doses de adubação com esterco bovino

Para a produção de mudas foram utilizadas plântulas de 15 cm de comprimento, contendo de 5 a 6 gemas, as quais foram distribuídas em vasos de 8 L, com substrato comercial Carolina Soil®, permanecendo durante 20 dias antes do plantio.

O genótipo (Jp1) utilizado foi proveniente do Horto de Plantas Medicinais da UNAERP, Ribeirão Preto - SP. Uma exsicata foi confeccionada e depositada no Herbário Irina Delanova Gemtchujnicov, da UNESP-Botucatu, sob registro BOTU 32995.

4.1.3 Realização do experimento de níveis de saturação por base de solo

Os cálculos da necessidade de calagem foram realizados utilizando o método da saturação de bases trocáveis levando em conta os resultados da análise do solo, a qual foi feita no Departamento de Solos e Recursos Ambientais da FCA/UNESP (Tabela 1). O poder relativo de neutralização total (PRNT) do calcário utilizado foi de 93%.

As doses de calcário correspondentes aos níveis de saturação foram adicionadas ao solo e homogeneizadas com o auxílio de uma enxada, em seguida a mistura foi colocada nos vasos de 5 L. Estes, foram distribuídos de forma aleatória pela área da estufa e mantidos durante 40 dias, sendo irrigados regularmente para ativação do calcário.

Tabela 1 - Análise do solo utilizado para o preparo dos tratamentos de adubação e calagem em Botucatu

pH	M.O.	P _{resina}	Al ³⁺	H+Al	K	Ca	Mg	SB	CTC	V%	S
CaCl ₂	g.dm ³	mg/dm ³	-----			mmol _c /dm ³	-----				mg/dm ³
4,1	9	4	---	45	0,5	7	2	9	53	17	---

Fonte: Departamento de Solos e Recursos Ambientais da FCA/UNESP

Os tratamentos aplicados foram:

- T1= 17% de saturação por base, correspondente à testemunha;
- T2= 40% de saturação por base de solo;
- T3= 60% de saturação por base;
- T4= 80% de saturação por base;
- T5= 100% de saturação por base.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizados (DIC) com 9 repetições (Figura 4). Cada parcela foi constituída de uma planta por vaso. Os dados obtidos foram analisados no teste de regressão e Tukey, ambos a 5% de significância.

Figura 4 - Visão geral do experimento de calagem em *J. pectoralis* na casa de vegetação UNESP – Botucatu



4.1.4 Manutenção dos experimentos

4.1.4.1 Manutenção dos experimentos de níveis de saturação por base de solo e doses de adubação com esterco bovino

As plantas espontâneas que germinaram nos vasos foram retiradas manualmente e a irrigação foi realizada com um auxílio de regador de acordo com as condições climáticas e a necessidade do solo.

4.1.5 Procedimento da coleta e características analisadas

4.1.5.1 Procedimento de coleta e características analisadas dos experimentos de níveis de saturação por base de solo e doses de adubação com esterco bovino

As plantas foram colhidas 180 dias após o plantio, no período da manhã utilizando-se tesoura de poda e o corte foi rente ao solo. Imediatamente após a colheita, foi determinado o número de brotações, comprimento de parte aérea e massa fresca. Posteriormente, o material vegetal foi colocado em sacos de papel “Kraft”, devidamente identificados e levadas à estufa de secagem com ar circulante à temperatura de 45 °C, onde permaneceram por dois dias, até atingirem peso constante. Após a secagem, realizou-se a pesagem utilizando balança semi-analítica para a obtenção de massa seca, além da quantificação de macro e micronutrientes da parte aérea.

4.1.6 Extração e quantificação de cumarina

A extração e a quantificação de cumarina foi realizada no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Biotecnologia da UNAERP, em Ribeirão Preto, sob a supervisão do Dr. Lucas Junqueira de Freitas Morel.

Os tratamentos avaliados com essa metodologia foram o de níveis de saturação por base (17, 40, 60, 80 e 100%) e de adubação com esterco bovino (0, 20, 40, 60 e 80 t.ha⁻¹). Cada tratamento foi constituído de 9 indivíduos, com 3 repetições que foram analisadas em triplicatas.

Para a extração e quantificação de cumarina, as partes aéreas secas foram moídas em moinho de facas (Marconi MA048, série 010892) até a granulometria de 40 mesh.

A droga vegetal obtida na forma de pó (300 mg) foi transferida para tubos de ensaios de 10 mL e foram realizadas extrações com 1 vez de 6 mL de etanol: água (7:3) e, o material foi submetido a sonicação (30 min, Ultrassom Eco-sonics® Q5.9/37, 37kHz). Posteriormente, o extrato foi filtrado em funil de vidro com algodão em cubetas previamente pesadas. O solvente foi evaporado em capela de exaustão a temperatura ambiente, *overnight*.

Para a análise em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) os extratos secos foram ressuspensos em metanol:água (8:2) (5 mg.mL⁻¹) e, em seguida, foi realizado um *clean-up* em cartuchos de sílica C18 (Sep-Pack Supelclean 57054 LC-18, Supelco®). Posteriormente, 1 mL deste do extrato foi analisado em cromatógrafo líquido de alta eficiência analítico LC-10ADVP (Shimadzu, Japão) acoplado a detector de arranjo diodo SPD-M10A. A coluna utilizada para as análises foi Gemini C18 (250 mm x 10 mm, 5 µ Phenomenex). Como fase móvel foi utilizado ácido acético (0,1%) em água (A) e metanol (B) em modo gradiente: de 10 a 66% B (0 até 32 minutos); de 66 a 10% B (32 até 35 minutos); 10% B (35 até 40 minutos), com vazão de 1 mL.min⁻¹. As análises foram realizadas em triplicata e o volume de injeção foi 20 µL, sendo o comprimento de onda utilizado foi de $\lambda = 280$ nm.

A curva de calibração foi preparada com metanol água na mesma proporção das amostras, nas concentrações de 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 e 0,03125 mg.mL⁻¹.

4.2 Experimento 2: Avaliação do efeito de diferentes doses de adubação e calagem no acúmulo de cumarina e no crescimento de parte aérea de *Justicia pectoralis*

4.2.1 Caracterização da área experimental

O experimento foi realizado em casa de vegetação no Departamento Horticultura – Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA/UNESP), na cidade de Botucatu - São Paulo, em um período de 180 dias entre os meses de agosto e dezembro de 2016. A casa de vegetação (Figura 5) apresenta sombreamento de 50%, está localizada a 22°50'41.58" sul e 48°25'58.32" oeste, com altitude de 838 m. As médias de temperatura, umidade e precipitação estão apresentadas na Figura 3.

4.2.2 Realização do experimento de adubação utilizando esterco bovino e calcário

Após análise do solo (Tabela 1), foram adicionadas diferentes doses de esterco (Tabela 2) e calcário (CaCO_3) as quais foram homogeneizadas com o auxílio de uma enxada e colocados nos vasos de 5 L. Estes foram distribuídos de forma aleatória pela área e mantidos durante 40 dias sem plantio, sendo irrigados regularmente para reação do calcário.

Os tratamentos aplicados foram:

- T1= 0,0 t.ha⁻¹ de esterco bovino, correspondente à testemunha;
- T2= 20,0 t.ha⁻¹ de esterco bovino; 240 Kg de N; 140 Kg de P₂O₅; 80 Kg de K₂O;
- T3= 40,0 t.ha⁻¹ de esterco bovino; 480 Kg de N; 280 Kg de P₂O₅; 160 Kg de K₂O;
- T4= 60,0 t.ha⁻¹ de esterco bovino; 720 Kg de N; 420 Kg de P₂O₅; 240 Kg de K₂O;
- T5= 80,0 t.ha⁻¹ de esterco bovino; 960 Kg de N; 560 Kg de P₂O₅; 320 Kg de K₂O;

Em todos os tratamentos foram realizadas correção do solo para nível 70 de saturação por base, fundamentado nos cálculos feitos utilizando os resultados da análise do solo, a qual foi feita no Departamento de Solos e Recursos Ambientais

da FCA/UNESP (Tabela 1). O esterco utilizado foi cedido pelo setor de Zootecnia – Gado de Leite (Tabela 2).

Tabela 2 - Análise de esterco bovino utilizado no experimento de adubação em Botucatu

N	P ₂ O ₅	K ₂ O	Ca	Mg	S	U-65°C	M.O.	C
-----** % ao natural -----								
1,2	0,7	0,4	1,1	0,3	0,3	8	66	37

Na	Cu	Fe	Mn	Zn	C/N	pH
----- ** mg/Kg ao natural -----					ao natural	
920	42	1748	243	121	31/1	7

Fonte: Departamento de Solos e Recursos Ambientais da FCA/UNESP

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) com 9 repetições (Figura 5). Cada parcela foi constituída de uma planta por vaso. Os dados obtidos foram analisados no teste de regressão e Tukey, ambos a 5% de significância.

Figura 5 - Visão geral do experimento de adubação em *J. pectoralis* na casa de vegetação UNESP – Botucatu



Pauline Zonta de Lima - 2017

4.3 Experimento 3: Avaliação de dois genótipos de *Justicia pectoralis* cultivadas nos municípios de Loc2-SP e Loc1-MG no crescimento de parte aérea e acúmulo do teor de cumarinas

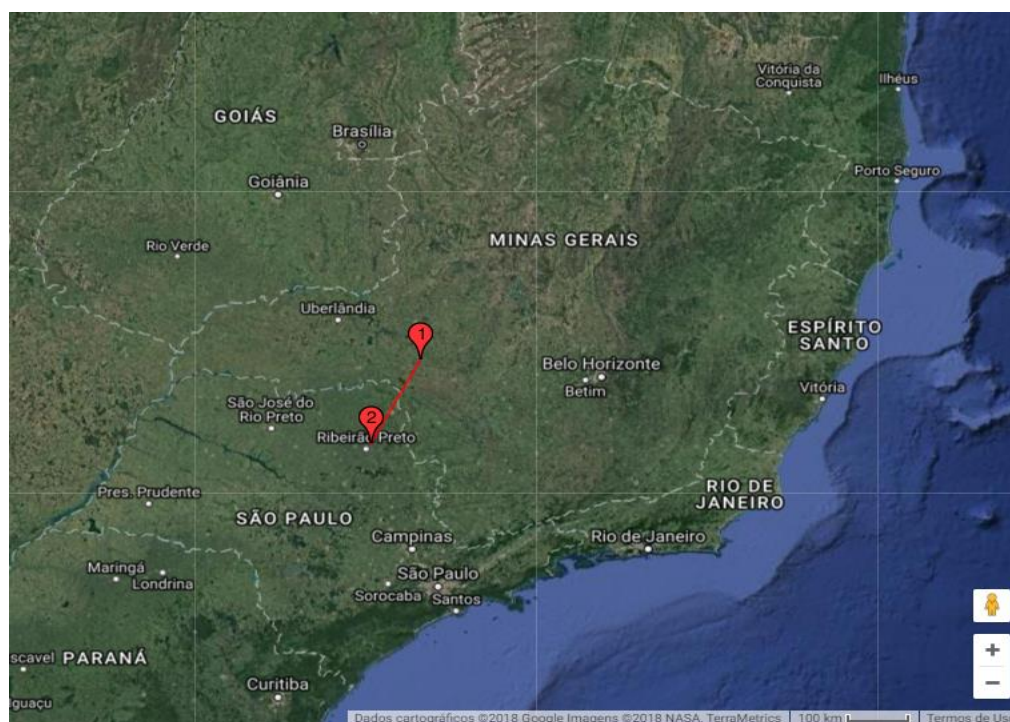
4.3.1 Caracterização das áreas experimentais

O experimento foi realizado em duas localidades: Localidade 1 (Loc1 – Araxá, MG) e localidade 2 (Loc2 – Jardinópolis, SP) (Tabela 3 e Figura 6). Nesse experimento, avaliou-se o desenvolvimento de dois genótipos de *J. pectoralis* (Jp1 e Jp2).

Tabela 3 - Coordenadas dos locais do experimento com dois genótipos de *Justicia pectoralis*

Município- Estado	Código	Latitude	Longitude	Altitude (m)
Araxá-MG	Loc1	19°36'28.76"S	46°55'58.35"O	997
Jardinópolis-SP	Loc2	21° 4'21.68"S	47°44'11.76"O	578

Figura 6 - Locais de implementação dos experimentos na região sudeste do Brasil com dois genótipos diferentes de *Justicia pectoralis*



Fonte: USGS (2018).

O plantio foi conduzido em campo, as condições de solo estão descritas na Tabela 4 e os dados meteorológicos obtido no site do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET - Tabela 5).

Tabela 4 - Análise de solo das localidades Loc1 e Loc2

Amostra	pH	M.O.	K	Ca	Mg	Al	P _{resina}	S	B
	CaCl ₂	g/dm ³	-----	mmol _c /dm ³	-----	-----	-----	mg/dm ³	-----
Loc1	7,3	19	0,9	58,0	4,0	-	237,0	6,0	0,1
Loc2	5,9	39	8,9	66,0	18,0	-	21,0	7,0	0,1

Amostra	Cu	Fe	Mn	Zn	SB	H+Al	C.T.C.	V%
	-----	mg/dm ³	-----	-----	mmol _c /dm ³	-----	-----	-----
Loc1	1,2	11,0	4,7	1,0	62,9	8,0	70,9	89
Loc2	9,0	19,0	19,7	1,5	9,0	45,0	53,0	17

Fonte: Departamento de Engenharia Química da UNAERP-Ribeirão Preto.

Tabela 5 - Dados de temperatura e pluviométrico nas localidades 1 e 2 durante o período experimental

	Temperatura (°C)		Chuva (mm)	
	Loc1	Loc2	Loc1	Loc2
Abril/2017	22,42	23,20	0,08	0,17
Maio/2017	20,45	21,50	0,12	0,11
Junho/2017	19,22	19,50	0,02	0,02
Julho/2017	17,24	18,30	0,00	0,00
Agosto/2017	18,35	21,80	0,00	0,04
Última semana de plantio	17,91	20,74	0,00	0,11
Todo plantio	19,71	20,86	0,05	0,06

Fonte: INMET (2018)

O solo das áreas de estudo foi revolvidos e delimitou-se um espaçamento de 50 x 50 cm entre as plantas. Anteriormente ao transplante das mudas, estas foram

podadas a fim de terem 5 cm de altura, para ter uma homogeneidade quanto à altura. Como adubação, foi utilizado esterco bovino a 13,33 t.ha⁻¹.

O delineamento experimental utilizado foi blocos casualizados em esquema fatorial 2 x 2, sendo dois genótipos em duas localidades com oito blocos em cada local.

4.3.2 Produção de mudas

4.3.2.1 Produção de mudas dos experimentos com dois genótipos de *Justicia pectoralis* e diferentes níveis de sombreamento

As mudas utilizadas foram produzidas 60 dias antes do plantio, no Departamento de Biotecnologia da UNAERP, utilizando terra: areia: esterco bovino 1:1:1. As estacas utilizadas tinham $\approx$ 10 cm de comprimento com 7 a 8 gemas cada uma.

4.3.3 Manutenção do experimento

4.3.3.1 Manutenção dos experimentos com dois genótipos de *Justicia pectoralis* e diferentes níveis de sombreamento

As plantas foram irrigadas por aspersão, realizada de acordo com as necessidades do solo e condições meteorológicas. As capinas foram feitas com o auxílio de enxadas, de acordo com o surgimento de plantas espontâneas. Foi realizado controle de formigas utilizando-se iscas comerciais, em Loc2.

4.3.4 Procedimento de coleta e características analisadas

4.3.4.1 Procedimento de coleta e características analisadas dos experimentos com dois genótipos de *Justicia pectoralis* e diferentes níveis de sombreamento

As plantas foram retiradas com as raízes e, em seguida, mediu-se o comprimento de parte aérea, diâmetro de parte aérea, massa fresca de parte aérea e massa fresca de raiz. A secagem foi realizada em estufa ar circulante à temperatura de 45°C durante dois dias, e posteriormente foi obtido a massa seca de parte aérea e raiz em balança semi-analítica.

4.3.5 Extração e quantificação de cumarina e umbeliferona

Os tratamentos avaliados foram os dois genótipos de *J. pectoralis* (Jp1 e Jp2). Cada tratamento foi constituído de 4 indivíduos, do mesmo genótipo dentro de um bloco, sendo dois genótipos por bloco, gerando um total de 16 amostras em cada localidade. Loc1e Loc2. Além dos tratamentos de três níveis de sombreamento, sendo pleno sol, 50 e 80% de sombreamento. Cada amostra constituída de 5 indivíduos contidos no mesmo bloco, sendo três blocos para cada tratamento, totalizando 9 amostras, que foram avaliadas em triplicata.

Para a quantificação das cumarinas nos dois genótipos de *J. pectoralis* (Jp1 e Jp2) em dois locais diferentes, bem como três níveis de sombreamento foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), os extratos secos foram ressuspensos em metanol:água (8:2) (10 mg.mL⁻¹) e, em seguida, foi realizado um *clean-up* em cartuchos de sílica C18 (Sep-Pack Supelclean 57054 LC-18, Supelco®). Após, 1 mL deste foi analisado em cromatógrafo líquido de alta eficiência analítico LC-6AD (Shimadzu, Japão) acoplado a detector de arranjo diodo SPD-M20A. A coluna utilizada para as análises foi Luna C18, 250 mm x 4,6 mm, 5 µ Phenomenex. Como fase móvel foi utilizado ácido acético (0,1%) em água (A) e metanol (B) em modo gradiente: de 30% B de 0 a 10 minutos; de 30-40% B de 10 a 20 minutos; 40% B de 20 a 30 minutos; de 40-70% B de 30 a 35 minutos;

de 70-100% B de 35 a 37 minutos; de 100% B de 37 a 40 minutos; de 100-30% B de 40 a 42 minutos; e de 30-0% B de 42 a 45 minutos, com vazão de 1 mL min⁻¹. As análises foram realizadas com volume de injeção de 20 µL, sendo o comprimento de onda utilizado foi de $\lambda = 280$ nm para cumarina e $\lambda = 330$ nm para umbeliferona.

A curva de calibração foi preparada com as concentrações de 1,0; 0,75; 0,5; 0,30; 0,20; 0,15; 0,075; 0,050; 0,015 e 0,005 mg.mL⁻¹ de cumarina e 0,30; 0,20; 0,15; 0,075; 0,050; 0,015 e 0,005 mg.mL⁻¹ de umbeliferona.

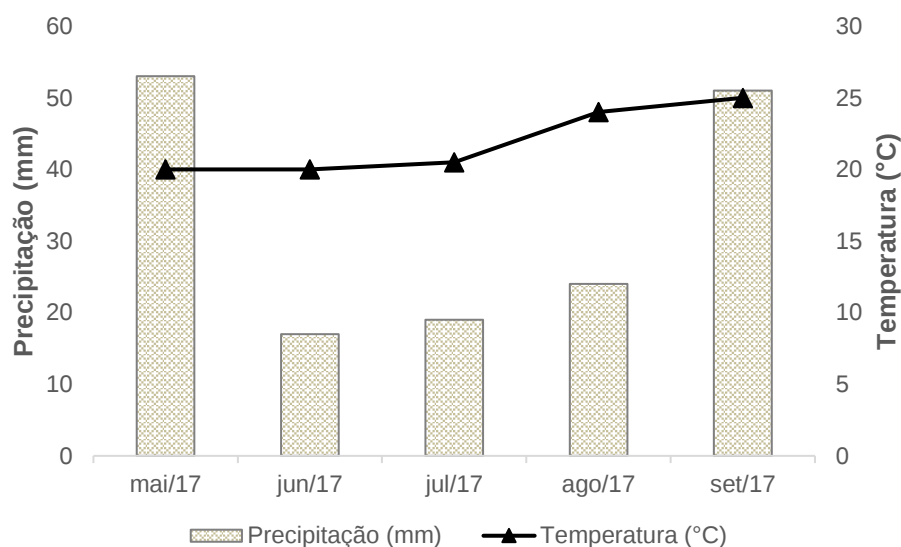
4.4 Experimento 4: Avaliação de diferentes níveis de sombreamento no crescimento de parte aérea e teor de cumarinas em *Justicia pectoralis*

4.4.1 Caracterização da área experimental

O experimento foi conduzido no Horto de Plantas Medicinais da UNAERP em Ribeirão Preto - SP (21°11'57.67" Sul e 47°46'43.03" Oeste), com três níveis de sombreamento: pleno sol, 50% de sombreamento e 80% de sombreamento. Os parâmetros avaliados foram altura da planta, diâmetro de copa, massa fresca e massa seca de parte aérea. O genótipo utilizado foi Jp1.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados sendo três blocos para cada tratamento, com cinco plantas por bloco. O experimento foi conduzido no período de junho a setembro de 2017 e os dados meteorológicos encontram-se na Figura 7.

Figura 7 - Dados meteorológicos de Ribeirão Preto entre os meses de junho a setembro de 2017.



Fonte: Climatempo (2018)

4.4.2 Realização do experimento

Os canteiros foram revolvidos com enxadas e o esterco bovino foi acrescentado uniformemente sobre esses. As mudas foram produzidas a partir de estacas de 10 cm de altura contendo de 7 a 8 gemas. Todas as mudas foram podadas antes do plantio. O espaçamento entre plantas foi de 50 cm. Logo após o plantio, os tratamentos com 50% e 80% de sombreamento receberam o sombrite, que foi esticado sobre o canteiro até o chão.

4.4.3 Cromatografia líquida de ultra eficiência com detector de arranjo de diodos e de massas (CLAE-DAD-EM).

As análises de extratos de plantas que cresceram em três níveis de sombreamento diferentes também foram analisadas em CLAE-DAD-EM para a confirmação das moléculas referências cumarina e umbeliferona. As análises foram realizadas usando um sistema ACQUITY UPLC H-Class acoplado ao detector de arranjo de diodos e ao espectrômetro de massas quadrupolo tandem Xevo® TQ-S

(Waters® Corporation, Milford, MS, USA), equipado com uma fonte de ionização ESI operando em modo negativo de análise.

Os padrões autênticos (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) de cumarina e umbeliferona, bem como as amostras de extratos de *J. pectoralis* (extrato de plantas cultivadas a pelo sol, e dois níveis de sombreamento) foram solubilizados separadamente em metanol ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$) e injetadas em alíquotas de $5 \text{ }\mu\text{L}$. A coluna utilizada foi Sigma-Aldrich Ascentis Express C18 ($100 \times 4,6 \text{ mm id}$, $2,7 \text{ }\mu\text{m}$ tamanho de partícula)

Foi utilizada como fase móvel a solução aquosa de ácido fórmico 0,1% (solvente A) e uma solução de metanol com 0,1% de ácido fórmico (solvente B), em modo gradiente linear, com o solvente B variando de 30 para 90% (v/v) em 30 min, mantendo isocraticamente o solvente B 90% por 5 min, vazão de $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, com volume de injeção de $5 \text{ }\mu\text{L}$.

Os parâmetros de operação utilizados na fonte de ionização foram: voltagem do capilar: 3,2 kV, temperatura da fonte $150 \text{ }^{\circ}\text{C}$, temperatura de dessolvatação do gás N_2 : $350 \text{ }^{\circ}\text{C}$, fluxo de dessolvatação do gás: 600 L/h , escala de varredura de massa foi de: 200 a 1000 m / z no modo de varredura total.

Estas análises foram realizadas no Departamento de Química Orgânica da Universidade de São Paulo, com a colaboração do Dr. Eduardo José Crevelin.

5 Análise estatística

Análises estatísticas foram realizadas usando teste de ANOVA e Tukey e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Experimento 1: Avaliação do efeito de diferentes níveis de saturação por base de solo no acúmulo de cumarina e no crescimento de parte aérea de *Justicia pectoralis*

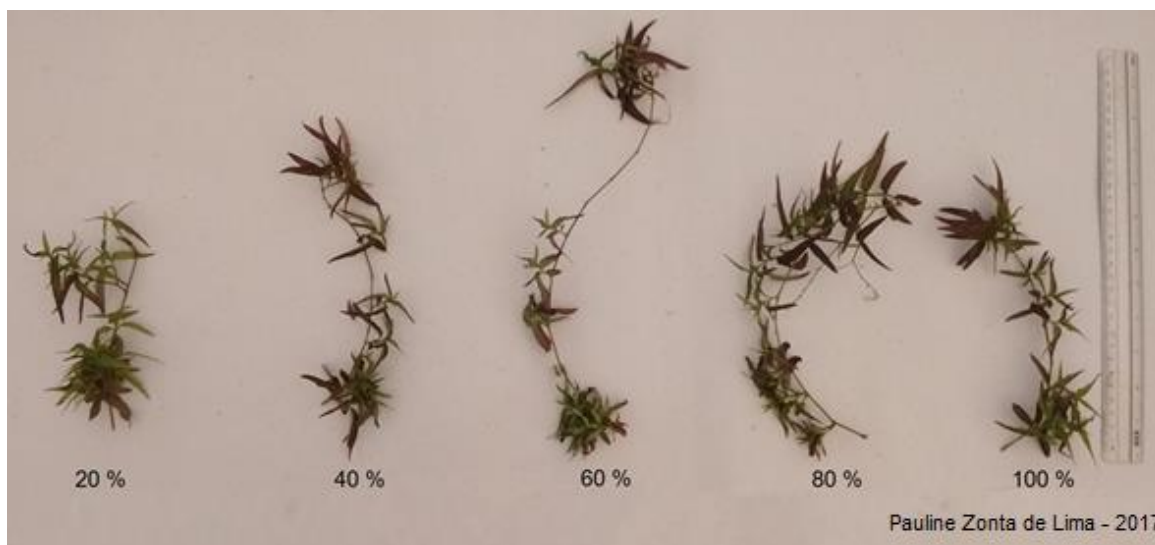
As diferentes doses de calagem utilizados no cultivo de *J. pectoralis* (Figura 8) não influenciaram no comprimento da parte aérea (média 30,28 cm), massa fresca (média 8,83 g) e seca (média 6,12 g). No entanto, o maior número de brotação (Tabela 6) foi obtido quando utilizou-se 0,103 Kg/m² (equivalente ao nível 40% de saturação por base de solo).

Tabela 6 - Efeito das diferentes doses de calagem e seus respectivos níveis de saturação por base no comprimento de parte aérea, no número de brotações, na massa fresca e seca de parte aérea de *Justicia pectoralis*

Níveis (V%)	NB
17	12,89 b
40	24,11 a
60	18,56 ab
80	17,44 ab
100	18,00 ab
CV (%)	40,15

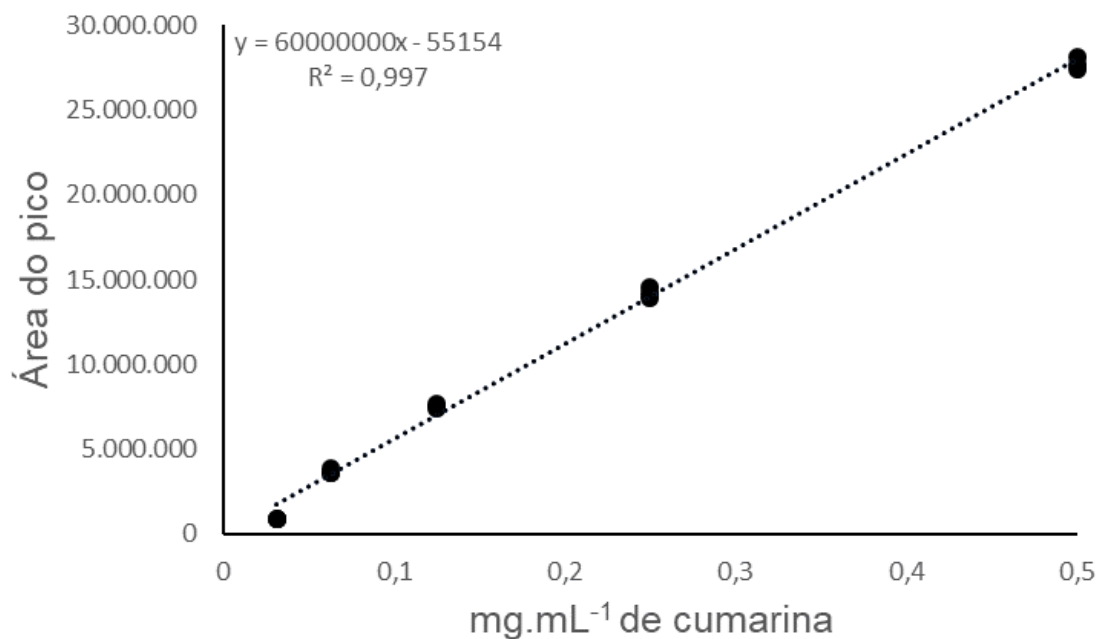
Número de brotações (NB) de *Justicia pectoralis*. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferiram significativamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Figura 8 - Plantas aleatórias do experimento com níveis diferentes níveis de saturação por base do solo (V%) na colheita



Em relação a produção de ativos, verificou-se que em todos os tratamentos de calagem produziu-se cumarina. A linearidade da curva de calibração ($r = 0,9970$ cumarina) comprova a segurança dos resultados obtidos (Figuras 9). As análises em UPLC também comprovaram a presença de cumarina (Figura 19).

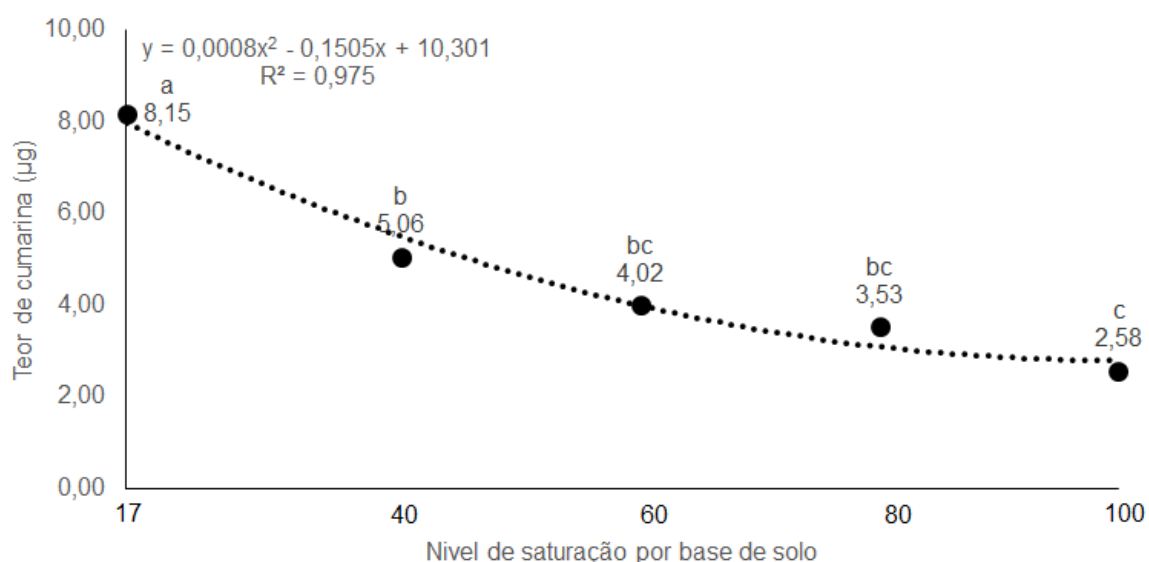
Figura 9 - Curva de calibração do padrão cumarina em mg.mL^{-1}



Quanto a produção de cumarina (Figura 10) o acúmulo foi inversamente proporcional ao aumento do nível de saturação por base do solo, sendo que o

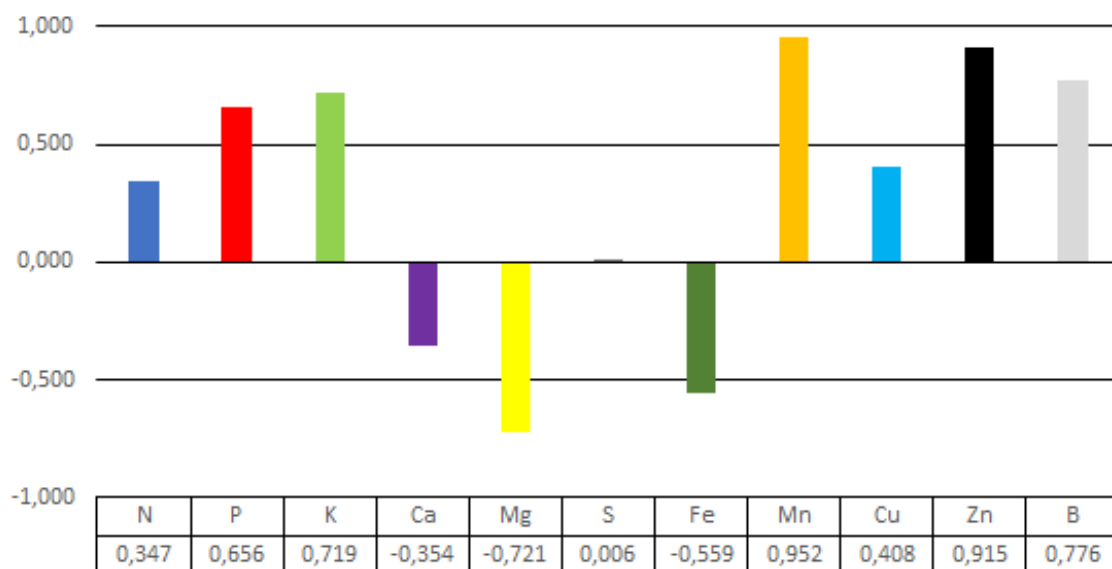
maior desta substância (8,15 µg) foi em plantas cultivadas sem a realização de calagem, mostrando que o aumento da saturação por base do solo não favorece a produção de cumarina nas folhas de *J. pectoralis*.

Figura 10 - Teor de cumarina (µg/mg de extrato) em parte aérea de plantas submetidas a diferentes saturações por base de solo (%)



Em relação ao teor de cumarina, foi observada uma forte correlação positiva (entre 0,7 e 0,9) para os nutrientes K e B e muito forte (maior que 0,9) para os elementos Mn e Zn (Figura 11). Esses resultados indicam que quanto maior o acúmulo destes nutrientes nas folhas, maior a biossíntese de cumarina. Em contrapartida, foi observada uma correlação negativa forte para o elemento Mg, ou seja, o acúmulo de cumarina é inversamente proporcional ao acúmulo deste elemento nas folhas.

Figura 11 - Correlação simples de Pearson entre nutrientes de parte aérea nos tratamentos com níveis de saturação por base de solo com o teor de cumarina encontrado



A biossíntese das cumarinas em plantas se dá pela via do chiquimato (MAZIMBA, 2017). Tem sido demonstrado que o nutriente manganês é responsável pela ativação de diversas enzimas desta via, incluindo às responsáveis por catalisar a formação dos precursores (MARSCHINER, 2012). O zinco, por sua vez, também atua em reações enzimáticas específicas exercendo função sobre desidrogenases, aldolases, isomerases, transfosforilases, entre outras, as quais afetam a expressão e a regulamentação de genes relacionados aos mecanismos de defesa. Desta maneira, o Zn contribui para tolerância das plantas aos fatores de estresse ambiental (CAKMAK et al, 2000 apud MARSCHINER, 2012).

O macronutriente potássio aumenta a resistência da planta a fatores de estresse, através da indução de mecanismos de defesa, como produção de fenilpropanóides, a qual inclui-se a cumarina (ARAUJO, et al., 2015).

Em relação ao boro, foi observada uma divergência entre dados descritos na literatura e os resultados obtidos no presente trabalho. Neste trabalho com *J. pectoralis* foi verificado correlação positiva entre o conteúdo de boro nas folhas e o acúmulo de cumarina. Entretanto, estudos têm demonstrado que uma maior produção de fenilpropanóides está relacionada à deficiência de B (CAMACHO-CRISTÓBAL et al., 2002; SETH; AERY, 2014; AHMED et al., 2016).

Em contrapartida, foi verificado que o magnésio apresenta correlação negativa forte relacionada ao acúmulo de cumarina. De fato, tem sido demonstrado que baixas concentrações de Mg aumentam o acúmulo de compostos fenólicos (AKULA; RAVISHANKAR, 2011).

Os dados de correlação obtidos estão de acordo com as análises de nutrientes realizadas. O tratamento que proporcionou maior acúmulo de cumarinas (controle, sem adição de calcário) apresentou os maiores teores de K, B, Mn e Zn nas folhas (Tabela 7). Da mesma maneira, menor acúmulo de Mg foi observado em folhas de plantas cultivadas sem a calagem.

Tabela 7 - Valores de nutrientes encontrados parte aérea seca de *J. pectoralis* de acordo com os níveis de saturação por base (V%)

Nutrientes	Níveis de saturação por base de solo (V%)				
	17	40	60	80	100
N	22,91	18,29	20,14	19,28	22,13
P	0,92	0,61	0,67	0,73	0,73
K	20,29	18,36	11,13	14,50	15,47
Ca	15,70	24,46	16,38	18,02	21,16
Mg	3,68	13,02	8,86	9,00	11,40
S	0,73	0,86	0,68	0,89	0,68
Fe	432,40	919,30	324,80	765,30	1183,30
Mn	74,00	25,80	10,20	12,20	13,20
Cu	4,20	4,00	4,60	3,50	3,70
Zn	44,00	24,50	17,60	24,10	20,30
B	52,53	47,68	50,07	49,73	46,18

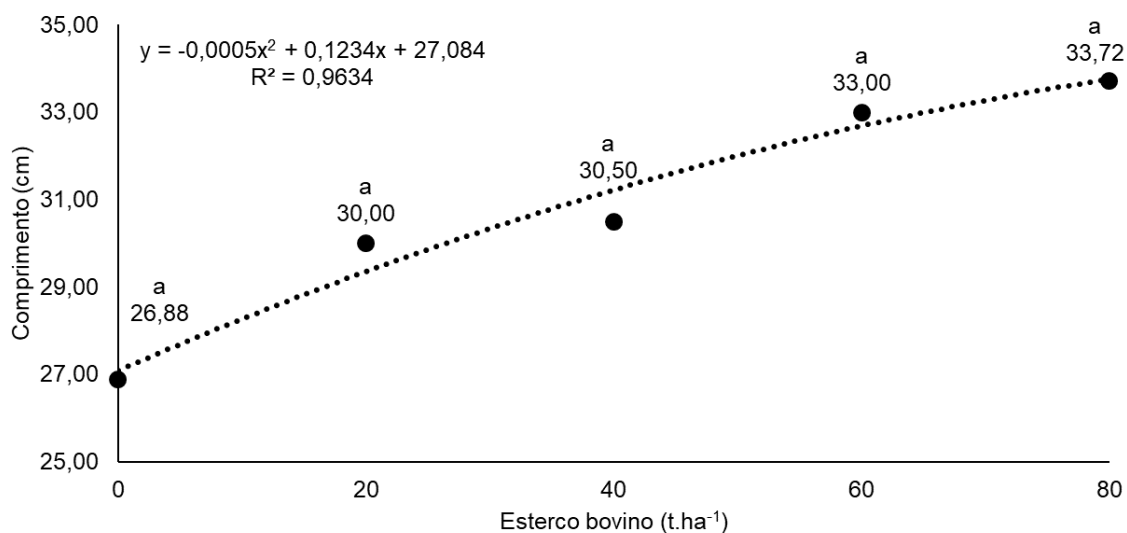
Valores de macronutrientes são expressos em g.Kg⁻¹ de parte aérea seca e de micronutrientes em mg.Kg⁻¹ de parte aérea seca.

6.2 Experimento 2: Avaliação do efeito de diferentes doses de adubação e calagem no acúmulo de cumarinas e no crescimento de parte aérea de *Justicia pectoralis*

A adubação realizada com esterco bovino (Figura 16) não interferiu significativamente no comprimento da parte aérea de *J. pectoralis* (Figura 12),

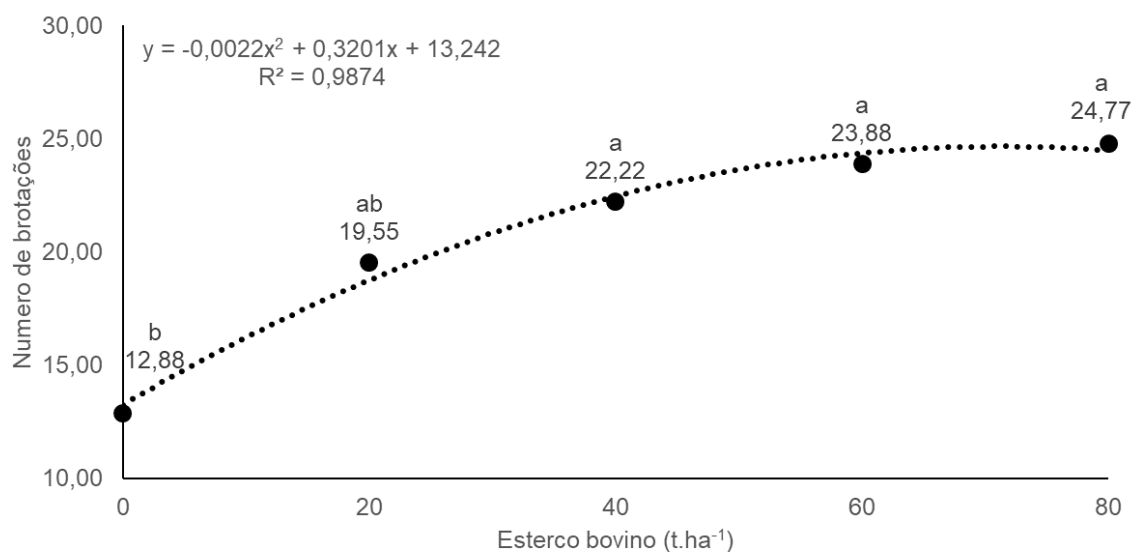
apesar de ter sido observada uma tendência no aumento do comprimento na maior dose de esterco utilizada.

Figura 12 - Comprimento (cm) da parte aérea de plantas de *Justicia pectoralis* em função das diferentes doses de esterco bovino



Houve diferença significativa número de brotações a partir de 40 t.ha⁻¹ e uma tendência no aumento dessa variável conforme a quantidade de esterco bovino foi aumentando, até 80 t.ha⁻¹ (Figura 13).

Figura 13 - Número de brotações em função das diferentes doses de esterco bovino (t.ha⁻¹) obtidos em *Justicia pectoralis*



A maior produção de massa fresca e seca da parte aérea foi obtido em plantas cultivadas com 60 t.ha⁻¹ de esterco bovino (20,98 g e 4,91 g, respectivamente - Figuras 14 e 15). A partir da derivação da equação da curva, verificou-se que a melhor dose para obtenção de maior acúmulo de massa fresca é 65,45 t.ha⁻¹ o que equivale a 785,40 kg.ha⁻¹ de N orgânico; 458,15 kg.ha⁻¹ de P orgânico e 261,80 kg.ha⁻¹ de K orgânico. O cálculo realizado a partir da derivação da equação da curva mostrou que o maior acúmulo de massa seca é 61,25 t.ha⁻¹ de esterco bovino, o que equivale a 735,00 kg.ha⁻¹ de N orgânico; 428,75 kg.ha⁻¹ de P orgânico e 245,00 kg.ha⁻¹ de K orgânico.

Estudos anteriores realizados com adubação de *J. pectoralis*, mostraram que adubações realizadas utilizando esterco bovino e NPK inorgânico não afetaram a produção de massa seca (BEZERRA et al., 2006). No entanto, os resultados obtidos no presente trabalho apontam um incremento na biomassa até a dose de 60 t.ha⁻¹ de esterco bovino (ou 61,25 t.ha⁻¹, referente ao valor calculado).

Figura 14 - Massa fresca (g) das plantas de *Justicia pectoralis* em função das diferentes doses de esterco bovino (t.ha⁻¹)

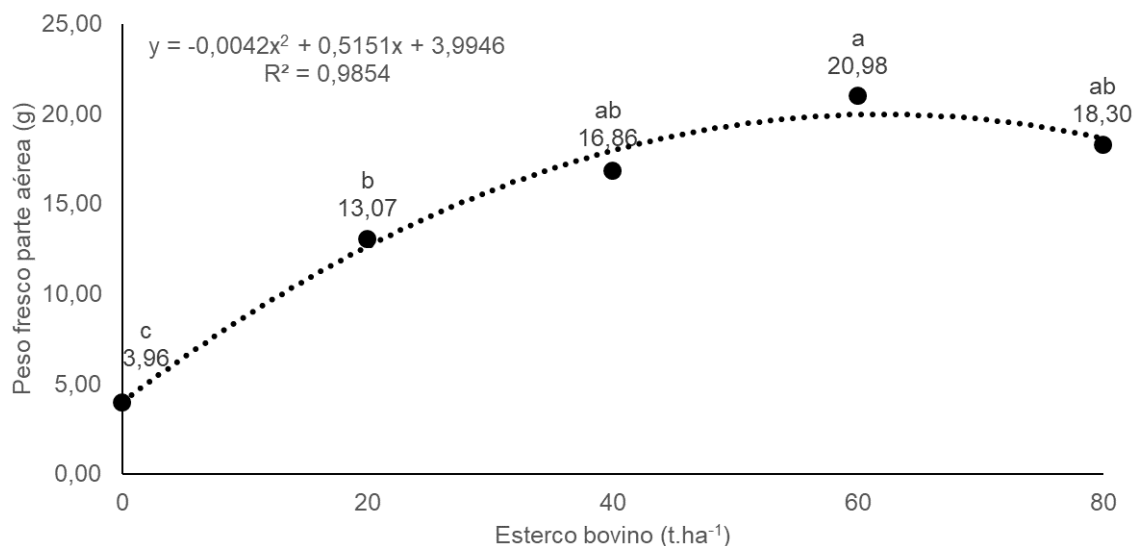


Figura 15 - Massa seca (g) das plantas de *Justicia pectoralis* em função das diferentes doses de esterco bovino (t.ha^{-1})

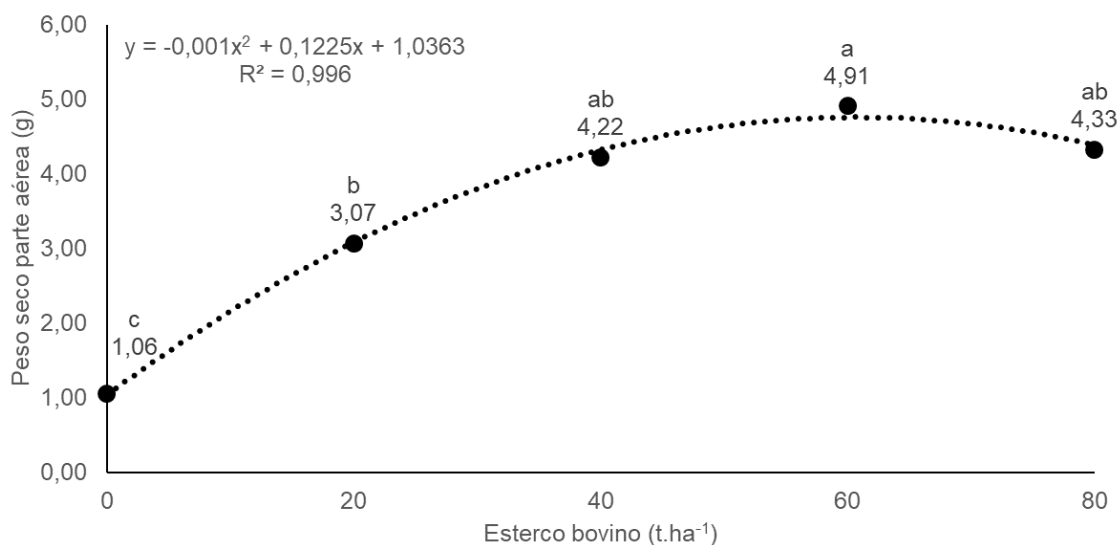
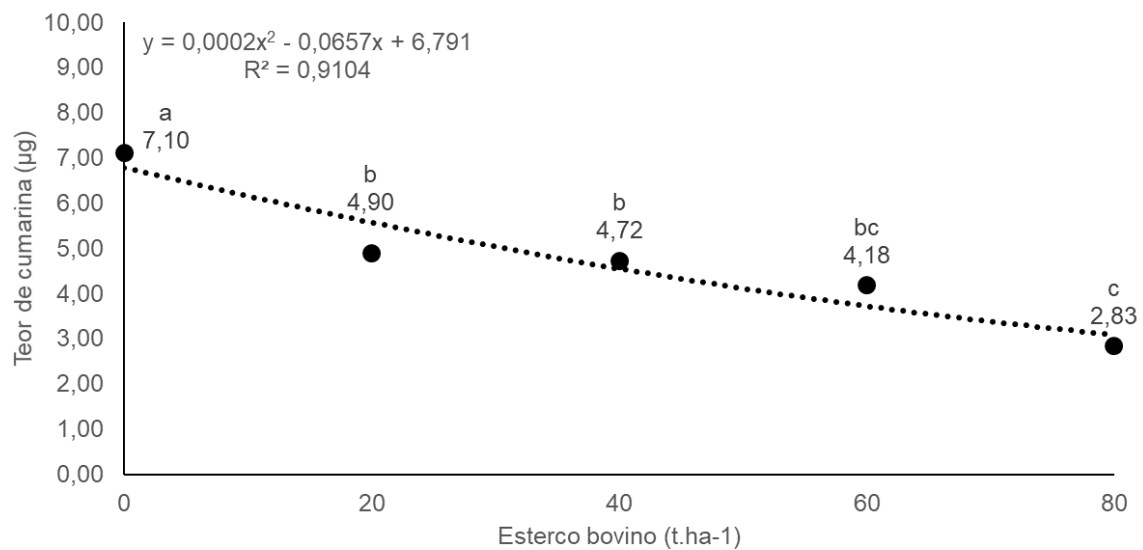


Figura 16 - Plantas aleatórias do experimento com dose de esterco bovino na colheita



O acúmulo de cumarina na parte aérea de *J. pectoralis* em função das diferentes doses de esterco utilizadas foi inversamente proporcional ao crescimento geral da planta, ou seja, maior acúmulo foi observado em plantas cultivadas sem adição de esterco bovino ($7,10 \mu\text{g}$, Figura 17) e, quanto maior a concentração de adubo, menor o acúmulo dessa substância.

Figura 17 - Teor de cumarinas ($\mu\text{g.mg}^{-1}$ de extrato) em parte aérea de plantas de *Justicia pectoralis* cultivadas com diferentes doses de esterco bovino



Em relação ao acúmulo de cumarina (Figura 18) verificou-se uma correlação forte para o nutriente B e uma correlação negativa muito forte para o N. Nos experimentos de calagem e adubação orgânica, verificou-se que o boro está fortemente relacionado com a biossíntese de cumarina na parte aérea de *J. pectoralis*.

Quanto ao nitrogênio, foi observado que o excesso deste na parte aérea inibiu a biossíntese de cumarina por *J. pectoralis*. O excesso deste nutriente na parte aérea na forma de nitrato ou nitrato de amônio, ocasiona uma inibição da atividade da Rubisco, levando a uma diminuição drástica de determinados metabolitos secundários como a cumarina (MARSCHINER, 2012).

Figura 18 - Correlação simples de Pearson entre nutrientes presentes na parte aérea de *Justicia pectoralis* nos tratamentos com doses de esterco bovino em relação ao teor de cumarina



O tratamento que proporcionou maior acúmulo de cumarinas (controle, sem adição de calcário) apresentou os maiores teores de B nas folhas (Tabela 8). Da mesma maneira, menor acúmulo de N foi observado em folhas de plantas cultivadas sem a calagem.

Tabela 8 - Valores de nutrientes encontrados parte aérea seca de *Justicia pectoralis* de acordo com as doses de esterco bovino

Nutrientes	Doses (t.ha ⁻¹)				
	0,00	20,00	40,00	60,00	80,00
N	18,71	27,25	28,32	33,87	35,22
P	0,70	2,28	2,35	2,28	1,55
K	19,81	34,76	38,14	36,69	26,08
Ca	19,56	24,26	24,58	24,74	16,00
Mg	9,68	13,88	13,56	13,60	8,28
S	1,27	1,29	1,23	1,34	1,17
Fe	1114,60	1891,30	1483,60	432,40	722,30
Mn	12,60	16,90	23,00	16,00	11,60
Cu	5,60	8,30	8,20	8,50	5,30
Zn	30,20	31,50	67,30	27,30	12,00
B	58,22	47,34	42,60	51,47	44,53

Valores de macronutrientes são expressos em g.Kg⁻¹ de parte área seca e de micronutrientes em mg.Kg⁻¹ de parte aérea seca.

6.3 Experimento 3: Avaliação de dois genótipos de *Justicia pectoralis* cultivadas nos municípios de Loc2-SP e Loc1-MG no crescimento de parte aérea e acúmulo do teor de cumarinas

O experimento de cultivo *J. pectoralis* em duas localidades (Loc1 e Loc2) utilizando dois genótipos (Jp1 e Jp2) mostrou que não houve diferença estatística entre os genótipos quanto aos parâmetros avaliados, ou seja, o comprimento de parte aérea e da raiz, o diâmetro de parte aérea, a massa fresca de parte aérea e da raiz, bem como a massa seca de parte aérea e da raiz (Tabela 9).

Quanto a influência da localidade, em relação aos mesmos parâmetros analisados, observou-se que em Loc2 houve maior produção de biomassa, quando comparada a Loc1 (Tabela 9).

O teor de cumarina, no genótipo Jp1, não variou entre as localidades avaliadas (Loc2 34,50 µg e Loc1 21,84 µg, Tabela 9). No entanto, maior acúmulo desse metabólito foi verificado no genótipo Jp2 cultivado em Loc2 (40,20 µg), quando comparado ao cultivado em Loc1 (23,81 µg).

Em relação a umbeliferona o genótipo Jp1 cultivado em Loc1 apresentou maior acúmulo (4,33 µg) quando comparado com plantas do mesmo genótipo cultivado em Loc2 (2,39 µg) e quanto ao genótipo Jp2 em ambas as localidades o teor desse metabólito não diferiu estatisticamente (Loc2 3,76 µg e Loc1 4,30 µg).

Tabela 9 - Comprimento e diâmetro de parte aérea (cm), massa fresca e seca de parte aérea e raízes (g), teor de cumarina e umbeliferona ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de extrato) de dois genótipos Jp1 e Jp2 cultivados em Loc1 e Loc2

Variáveis	Localidade	Genótipo	
		Jp1	Jp2
Comprimento de parte aérea	Loc1	9,90 b A	9,61 b A
	Loc2	11,91 a A	12,26 a A
Diâmetro de parte aérea	Loc1	11,46 b A	11,57 b A
	Loc2	16,51 a A	16,89 a A
Massa fresca de parte aérea	Loc1	6,24 b A	6,1262 b A
	Loc2	15,33 a A	14,86 a A
Massa fresca de raiz	Loc1	1,64 b A	1,6087 b A
	Loc2	4,25 a A	4,365 a A
Massa seca de parte aérea	Loc1	1,54 b A	1,7062 b A
	Loc2	2,13 a A	2,3262 a A
Massa seca de raiz	Loc1	0,60 b A	0,6212 b A
	Loc2	0,90 a A	0,9962 a A
Teor de cumarina	Loc1	21,84 a A	23,81 b A
	Loc2	34,50 a A	40,20 a A
Teor de umbeliferona	Loc1	4,33 a A	4,30 a A
	Loc2	2,39 b A	3,76 a A

Médias seguidas de mesma letra na coluna (minúscula) e na linha (maiúscula) não diferiram significativamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

A menor produção de biomassa de plantas de *J. pectoralis* cultivadas em Loc1 pode estar relacionada ao pH do solo, o qual estava 7,3, ou seja, acima da faixa ótima de absorção de nutrientes (5,5 - 6,5), principalmente dos micronutrientes Mn e B e do macronutriente P (TAIZ et al., 2017). O fósforo, especialmente, precisa ser absorvido pela planta em grandes quantidades devido a sua ligação com o metabolismo primário, com a formação de DNA, RNA, ATP, além de ser substrato ou produto em diversas reações enzimáticas (MARSCHINER, 2012). Sua deficiência provoca um atrofiamento de parte aérea e raiz, o que é constatado nos resultados verificados na Tabela 10 (TAIZ et al., 2017).

O manganês, por sua vez, é responsável pela ativação de inúmeras enzimas da via do chiquimato e da biossíntese de aminoácidos aromáticos, entre outros produtos secundários. Além disso, é atribuído ao Mn a estabilização da conformação ativa de fenilalanina amônia-liase (PAL) (MARSCHINER, 2012).

O boro está envolvido em várias vias metabólicas e sua escassez, ou a deficiência, resulta em um "efeito cascata" que ocorre pela interrupção de ciclos importantes de produção de metabolismo primário.

O fato do elevado pH do solo ser um dificultador para a absorção do boro pode ter influenciado na menor produção de cumarina detectada no genótipo Jp2 cultivado em Loc1, considerando que foi constatado uma correlação forte positiva entre o elemento boro e o metabólito cumarina (Figura 22 e 13).

Um dado importante observado no experimento realizado com os dois genótipos, em dois locais diferentes, é que no solo de Loc1 o V% foi alto (89) e as plantas apresentaram maior teor de umbeliferona, em relação a plantas cultivadas em Loc2, cujo V% foi baixo (17). Quanto a cumarina o acúmulo foi inverso, sendo o maior teor obtido em plantas cultivadas em solo com V% foi baixo.

No experimento envolvendo dois genótipos e duas localidades, a produtividade do Jp2 cultivado em Loc2 foi de 92,00 Kg.ha⁻¹ de massa seca de parte aérea, de 30,67 Kg.ha⁻¹ de extrato e 1,23 Kg.ha⁻¹ de cumarina.

6.4 Experimento 4: Avaliação de diferentes níveis de sombreamento no crescimento de parte aérea e teor de cumarinas em *Justicia pectoralis*

O comprimento da parte aérea de plantas desenvolvidas em área sombreada foi maior, o que era esperado pelo efeito natura de estiolamento de plantas desenvolvidas em condição de sombra. O comprimento da raiz e o diâmetro da parte aérea não apresentaram diferença estatística, enquanto a massa fresca e seca de parte aérea e raiz foram maiores em plantas que crescerem a pleno sol quando comparadas ao ambiente com 80% de sombreamento.

O teor de cumarina e umbeliferona responderam de forma diferente de acordo com os tratamentos. A pleno sol e em 50% de sombreamento houve maior acúmulo de cumarina quando comparado a 80% de sombreamento. Quanto a

umbeliferona, o maior teor foi obtido em plantas que cresceram em ambiente com 80% de sombreamento, ocorrendo uma diminuição de umbeliferona com o aumento da luminosidade (Tabela 10).

Tabela 10 - Comprimento e diâmetro de parte aérea (cm), massa fresca e seca de parte aérea e raízes (g), teor de cumarina e umbeliferona ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de extrato) nos diferentes níveis de sombreamento

Variáveis	Sombreamento		
	Pleno sol	50%	80%
Comprimento de parte aérea	21,00 b	27,07 a	31,03 a
Comprimento de raiz	22,56 a	21,00 a	21,97 a
Diâmetro de parte aérea	24,77 a	30,90 a	28,10 a
Massa fresca de parte aérea	64,68 a	48,74 ab	26,23 b
Massa fresca de raiz	12,83 a	3,25 b	2,97 b
Massa seca de parte aérea	14,93 a	13,86 a	6,04 b
Massa seca de raiz	6,46 a	1,63 b	1,77 b
Teor cumarina	57,90 a	39,60 a	18,13 b
Teor umbeliferona	2,97 c	4,60 b	6,34 a

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferiram significativamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

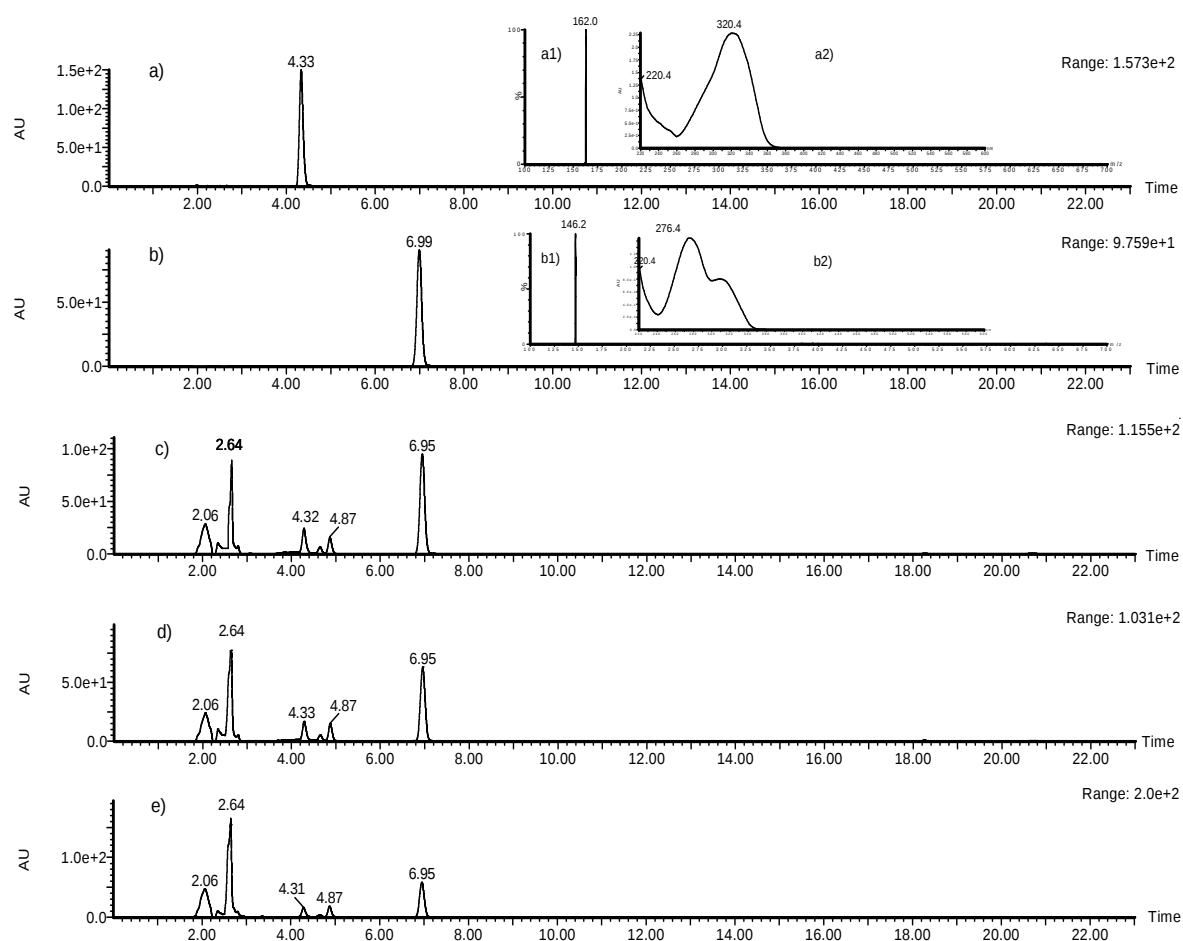
Resultados encontrados na literatura com plantas de outras famílias como por exemplo *Mikania glomerata* e *Melittis melissophyllum* indicam que o teor de cumarina varia de acordo com sazonalidade, órgão vegetal, e a posição da folha no caule (PEREIRA et al., 2000; CASTRO et al. 2006; MAGGI et al., 2011).

Os resultados obtidos neste trabalho com *Justicia pectoralis* no experimento realizado com sombreamento corroboram com os obtidos por Bertolucci et al., (2013) com *Mikania laevigata*. Os autores verificaram que no inverno o maior acúmulo de cumarina ocorreu em plantas cultivadas a pleno sol quando comparada

com 40 e 80% de sombreamento. Considerando que as condições climáticas e mês de colheita dos dois experimentos são semelhantes, pode-se inferir que possivelmente há uma relação entre o acúmulo de cumarina e a intensidade luminosa.

A análise realizada por CLAE-DAD-EM confirmou que as substâncias umbeliferona e cumarina realmente estão presentes nos extratos avaliados e que além destes compostos há três outras substâncias que deverão ser alvo de investigação fitoquímica, pois encontra-se presentes nos extratos de forma constante, independente dos níveis de sombreamento (Figura 19).

Figura 19 - Cromatogramas CLAE-DAD-EM dos padrões de referência: (a, a1 e a2) umbeliferona (b, b1 e b2), cumarina com os respectivos espectros de UV (ultra-violeta) e MS (massa) e extratos de *Justicia pectoralis* cultivado a pleno sol (c) com 50 % de sombreamento (d) e 80% de sombreamento (e)



6.5 Produção de extrato

A relação droga vegetal/derivado (RDD) dos diversos extratos hidroalcóolicos produzido com plantas de *Justicia pectoralis* submetidas aos vários tratamentos encontram-se descritos na tabela 11. Os tratamentos com nível de saturação por base de solo (V%) e doses de adubação com esterco bovino produziram maior RDD e a menor relação droga vegetal/derivado foi registrada no tratamento com o genótipo Jp2 cultivado em Loc2.

Tabela 11 - Relação droga/derivado dos extratos produzidos de plantas de *Justicia pectoralis* submetidas aos vários tratamentos

Extratos hidroálcoolicos	Relação droga/derivado
Nível de saturação por base de solo (V%)	15,0:1
Doses de adubação com esterco bovino	18,8:1
Genótipo Jp1 Loc1-MG	5,8:1
Genótipo Jp2 Loc1-MG	6,3:1
Genótipo Jp1 Loc2-SP	5,7:1
Genótipo Jp2 Loc2-SP	3,1:1
Pleno sol	6,3:1
50% de sombreamento	6,3:1
80% de sombreamento	7,9:1
TOTAL	18,8-3,1:1

Na relação droga/derivado pleno sol a proporção foi de 6,3/1, em 50% de sombreamento obteve a proporção de 6,25/1, e 80% de sombreamento 7,9/1.

Em ambos locais analisados o genótipo Jp2 obteve uma melhor relação droga/derivado. Em Loc2 produziu a melhor proporção (3,13/1) quando comparado com o genótipo Jp1 na mesma localidade (5,68/1). Igualmente em Loc1, em que Jp2 (5,75/1) foi superior em comparação a relação encontrada no genótipo Jp1 (6,25/1).

7 CONCLUSÃO

- Em todas as condições de cultivo apresentadas nesse trabalho, as plantas produziram cumarina;
- O teor de cumarina nas plantas não foi influenciado pela calagem e nem pela adubação com esterco bovino;
- Os dois genótipos avaliados, independente do local, não apresentaram diferenças, entre si, quanto ao crescimento e acúmulos de massa fresca e seca;
- Na avaliação entre os genótipos o Jp2 cultivado em Loc2 produziu maior teor de cumarina enquanto, o Jp1 cultivado em Loc1 acumulou mais umbeliferona;
- O nível de sombreamento interferiu na produção de fitomassa e no teor dos metabólitos avaliados;
- Frente aos resultados obtidos neste trabalho, indicamos o cultivo de *Justicia pectoralis* em Loc2, a pleno sol e sem adição de calcário ou adubação;

REFERÊNCIAS

- AHMED, A. H. H.; NESIEM, M. R. A; ALLAM, H. A.; EL- WAKIL, A. F. Effect of pre-harvest chitosan foliar application on growth, yield and chemical composition of Washington navel orange trees grown in two different regions. **African Journal of Biochemistry Research**, v. 10, n. 7, p. 59-69, 2016. DOI: 10.5897/AJBR2016.0908
- AKULA, R.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 11, p. 1720-1731, 2011. DOI: 10.4161/psb.6.11.17613
- ALBUQUERQUE, U. P. The use of medicinal plants by the cultural descendants of African people in Brazil. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 20, n. 2, p. 139–144, 2001.
- ANDRADE, F. M. C.; CASALI, V. W. D.; CECON, P. R. C. Crescimento e produção de cumarina em plantas de chambá (*Justicia pectoralis* Jacq.) tratadas com isoterápico. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, p. 154–158, 2012.
- AOYAMA, E.M.; INDRIUNAS, A. Micromorfologia e anatomia foliar de duas espécies de *Justicia* L.(Acanthaceae) de uso medicinal-Micromorphology and leaf anatomy of two species of *Justicia* L.(Acanthaceae) that have medicinal use. **Revista de Biologia Neotropical**, v. 11, n. 2, p. 97-106, 2014.
- ARAUJO, L.; SILVA BISPO, W. M.; RIOS, V. S. Induction of the Phenylpropanoid Pathway by Acibenzolar-S-Methyl and Potassium Phosphite Increases Mango Resistance to *Ceratocystis fimbriata* Infection. **Plant disease**, v.99, n.4, p.447-459, 2015.
- AWAD, R.; AHMED, F.; BOURBONNAIS-SPEAR, N.; MULLALLY, M.; TA, C. A.; TANG, A.; MERALI, Z.; MAQUIN, P.; CAAL, F.; CAL, V.; POVEDA, L.; VINDAS, P. S.; TRUDEAU, V. L. ARNASON, JOHN T. Ethnopharmacology of Q'eqchi'Maya antiepileptic and anxiolytic plants: Effects on the GABAergic system. **Journal of ethnopharmacology**, v. 125, n. 2, p. 257-264, 2009.
- BENNETT, B. C.; ALARCÓN, R. Hunting and hallucinogens: The use psychoactive and other plants to improve the hunting ability of dogs. **Journal of ethnopharmacology**, v. 171, p. 171-183, 2015.
- BERTOLUCCIA, S. K. V.; PEREIRA, A. B. D.; PINTO, J. E. B. P.; OLIVEIRA, A. B.; BRAGA, F. C. Seasonal Variation on the Contents of Coumarin and Kaurane-Type Diterpenes in *Mikania laevigata* and *M. glomerata* Leaves under Different Shade Levels. **Chemistry & Biodiversity**, V. 10, p. 288-295, 2013.
- BEZERRA, E.; MARCOS, A.; TERTULIANO, F. Rendimento de biomassa, óleo essencial, teores de fósforo e potássio de chambá em resposta à adubação orgânica e mineral. **Revista Ciência Agronômica**, v. 37, n. 2, p. 124–129, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 971, de 03 de maio de 2006. Brasília, DF, 2006.

BREWER-CARIAS, C.; STEYERMARK, J. A. Hallucinogenic Snuff Drugs of the Yanomamo Caburiwe-Teri in the Cauaburi River , Brazil. **Economic Botany**, v. 30, n. 1968, p. 57–66, 1976.

BRIEDIS, C.; SÁ, J. C. D. M.; CAIRES, E. F.; NAVARRO, J. D. F.; INAGAKI, T. M.; BOER, A.; NETO, C. Q.; FERREIRA, A. D. O.; CANALLI, L. B.; SANTOS, J. B. Dos. Soil organic matter pools and carbon-protection mechanisms in aggregate classes influenced by surface liming in a no-till system. **Geoderma**, v. 170, p. 80–88, 2012.

BRONICK, C. J.; LAL, R. Soil structure and management: a review. **Geoderma**, v. 124, n. 1-2, p. 3–22, 2005.

CAIRES, E. F. Correção da acidez do solo em sistemas de plantio direto. Informações Agronômicas – INPI, n. 147, 1-13, 2013.

CAIRES, E. F.; ALLEONI, L. R. F.; CAMBRI, M. A.; BARTH, G. Surface application of lime for crop grain production under a no-till system. **Agronomy Journal**, v. 97, n. 3, p. 791, 2005.

CAIRES, E. F.; JORIS, A. W.; CHURKA, S. Long-term effects of lime and gypsum additions on no-till corn and soybean yield and soil chemical properties in southern Brazil. Soil Use and Management. **Oxford**, v. 27, p. 45–53, 2011.

CAIRES, E.F.; BLUM, J.; BARTH, G. GARBUIO, F.J.; KUSMAN, M.T. Alterações químicas do solo e resposta da soja ao calcário e gesso aplicados na implantação do sistema de plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.27, n.2, p.275-286, 2003.

CAIRES, E.F.; FELDHAUS, I.C.; BLUM, J. Crescimento radicular e nutrição da cevada em função da calagem e aplicação de gesso. **Bragantia**, Campinas, v.60, p.213-223, 2001.

CAKMAK, I., WELCH, R. M., ERENOGLU, B., RÖMHELD, V., NORVELL, W. A.; KOCHIAN, L. V. Influence of varied zinc supply on re-translocation of cadmium (109Cd) and rubidium (86Rb) applied on mature leaf of durum wheat seedlings. **Plant Soil**, v. 219, p. 279–284, 2000.

CAMACHO-CRISTÓBAL, J. J.; ANZELLOTTI, D.; GONZÁLEZ-FONTES, A. Changes in phenolic metabolism of tobacco plants during short-term boron deficiency. **Plant Physiol. Biochem.**, v.40, p. 997–1002, 2002.

CARVALHO, A. C. B., BALBINO, E. E., MACIEL, A. & PERFEITO, J.P.S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Rev. Bras. Farmacogn**, v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.

CASTRO, E. M.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; MALTA, M. R.; CARDOSO, M. G.; SILVA, F. A. M. Coumarin Contents in Young *Mikania glomerata* Plants (Guaco) under Different Radiation Levels and Photoperiod. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 25, n. 3, p. 387-92, 2006.

CASTRO, G. S. A.; CRUSCIOL, C. A. C. Effects of superficial liming and silicate application on soil fertility and crop yield under rotation. **Geoderma**, v. 195-196, p. 234– 242, 2013.

CHANFRAU, C. J. E. R.; FERRADA, C. R. Harvest time influences on coumarin and umbelliferone. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 48, n. 2, p. 477-485, 2014.

CLIMATEMPO. Disponível em: <<https://www.climatempo.com.br/>>. Acesso em: 19 dez 2016.

COELHO-FERREIRA, M. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, n. 1, p. 159–175, 2009.

CUNHA, A. P.; SALGUEIRO, L.; ROQUE, O. R. **Farmacognosia e Fitoquímica**. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. P. 212-213; 226-227. 2010.

DE SMET, P. A. G.M. A multidisciplinary overview of intoxicating snuff rituals in the western hemisphere. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 13, n. 1, p. 3-49, 1985

EEC (1988) Council Directive on the approximation of the laws of the Member States relating to flavourings for use in foodstuffs and to source materials for their production (88/388/EEC). Off. J. Eur.Comm. L184:61-67, 15 July 1988.

FARINOLA, N.; PILLER, N. Pharmacogenomics: Its Role in Re-establishing Coumarin as Treatment for Lymphedema. **Lymphatic Research and Biology**, v. 3, n. 2, p. 81-86, 2005. DOI: 10.1089/lrb.2005.3.81

FERRADÁ, C. A. R.; SOSA, I. H.; FIALLO, V. R. F. Fecha y distancia de plantación en el cultivo del tilo (*Justicia pectoralis* Jacq. var. *stenophylla* Leonard). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 8, n. 1, p. 0-0, 2003. Disponível em: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962003000100004>. Acesso em: 18 jul. 2017.

FERREIRA, T. A. et al. Produção de mudas de chambá (*Justicia pectoralis* Jacq) em diferentes tipos de substratos e tamanhos de recipientes. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 11, p. 93–96, 2015.

JARDIM BOTANICO DO RIO DE JANEIRO. Flora do Brasil 2020 em construção: *Acanthaceae*. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB33>>. Acesso em: 11 abr. 2018.

GARCÍA-LAZO, G.; LAUZANT-DIAZ, E.; BATISTA, A. D.; GARCIA-MESA, M. Plants considered useful for hypoglycemic, antihypertensive or hypolipidemic treatments by patients with peripheral vascular diseases. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 20, n. 1, 2015.

HADIDI, H.; IRSHAID, Y.; VÅGBO, C. B.; BRUNSVIK, A.; CHOLERTON, S.; ZAHLSEN, K.; IDLE, J. R. Variability of coumarin 7-and 3-hydroxylation in a Jordanian population is suggestive of a functional polymorphism in cytochrome P450 CYP2A6. **European journal of clinical pharmacology**, v. 54, n. 5, p. 437-441, 1998. DOI: 10.1007/s002280050489.

JAIN, P. K., E JOSHI, H. Coumarin: Chemical and pharmacological profile. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, n. 6, p. 236–240. 2012. DOI: 10.7324/JAPS.2012.2643.

JAMEEL, E.; UMAR, T.; KUMAR, J.; HODA, N. *Coumarin: A Privileged Scaffold for the Design and Development of Antineurodegenerative Agents*. **Chem Biol Drug Des.**, v. 87, n. 1, p. 21-38, 2016. DOI: 10.1111/cbdd.12629.

JOSEPH H.; GLEYE J.; FOURASTE I.; SATANISLAS E. 0-Methoxylated C-Glycosylflavones From *Justicia Pectoralis*. **Journal of natural products**, v. 51, n. 4, p. 804-801, 1988a.

JOSEPH, H.; GLEYE J.; MOULIS. C. Justicidin B, a cytotoxic principle from *Justicia pectoralis*. **Journal of natural products**, v. 51, n. 3, p. 599-600, 1988b.

INMET. Portal da Agrometeorologia. Disponível em: <<http://agrometeorologia.seagro.to.gov.br/rede-de-monitoramento/inmet/>>. Acesso em: 27 mar. 2018.

KAUR, M., KOHLI, S., SANDHU, S., BANSAL, Y., & BANSAL, G. Coumarin: A promising scaffold for anticancer agents. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)**, v. 15, n. 8, p. 1032-1048, 2015. DOI: 10.2174/1871520615666150101125503.

KHAN, N.; SHARMA, S.; SULTANA, S. Attenuation of potassium bromate-induced nephrotoxicity by coumarin (1, 2-benzopyrone) in Wistar rats: chemoprevention against free radical-mediated renal oxidative stress and tumor promotion response. **Redox report**, v. 9, n. 1, p. 19-28, 2004a. DOI: 10.1179/135100004225003860.

KHAN, N.; SHARMA, S.; SULTANA, S. Amelioration of ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) induced renal oxidative stress and tumor promotion response by coumarin (1, 2-benzopyrone) in Wistar rats. **Cancer letters**, v. 210, n. 1, p. 17-26, 2004b. DOI: 10.1016/j.canlet.2004.01.011.

LANE, C. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for reproductive problems. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 3, n. 1, p. 13, 2007.

LIMA, G.R. **Proposta de resolução específica para manipulação de plantas medicinais e fitoterápicos**. 2006. Trabalho de conclusão de curso (Especialização em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

LIMA, K. A. et al. 038 — (LIM0157) Evaluation of effects of the standardized extract of *Justicia pectoralis* (chamba) in the pilocarpine model of seizure and antioxidant effect in the hippocampus of mice. **Epilepsy & Behavior**, v. 38, p. 197-198, 2014.

LINK, K. P. The discovery of dicumarol and its sequels. **Circulation**, v. 19, n. 1, p. 97–107, 1959.

LINO, C. S.; TAVEIRA, M. L.; VIANA, G. S. B.; MATOS, F. J. A. Analgesic and antiinflammatory activities of *Justicia pectoralis* Jacq and its main constituents: Coumarin and umbelliferone. **Phytotherapy Research**, v. 11, n. 3, p. 211– 215, 1997.

LOCKLEAR, T. D.; HUANG, Y.; FRASOR, J.; DOYLE, B. J.; PEREZ, A.; GOMEZ-LAURITO, J.; MAHADY, G. B. Estrogenic and progestagenic effects of extracts of *Justicia pectoralis* Jacq., an herbal medicine from Costa Rica used for the treatment of menopause and PMS. **Maturitas**, v. 66, n. 3, p. 315-322, 2010.

LOPEZ, H.; NAVIA, J. M.; CLEMENT, D.; HARRIS, R. S. Nutrient Composition of Cuban Foods III. Foods of Vegetable Origin. **Journal of Food Science**, v. 28, n. 5, p. 600-610, 1963. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1963.tb00250.x

MACÍAS-PEACOK, B.; PÉREZ-JACKSON, L.; SUÁREZ-CRESPO, M. F.; FONG-DOMÍNGUEZ, C.; PUPO-PERERA, E. Consumo de plantas medicinales por mujeres embarazadas. **Rev Med Inst Mex Seguro Soc**, v. 47, n. 3, p. 331-334, 2009.

MACRAE, W. D.; TOWERS, G. H. N. *Justicia pectoralis*: a study of the basis for its use as a hallucinogenic snuff ingredient. **Journal of ethnopharmacology**, v. 12, n. 1, p. 93-111, 1984.

MAGGI, F.; BARBONI, L.; CAPRIOLI, G.; PAPA, F.; RICCIUTELLI, M. SABRATINI, G.; VITTORI, S. HPLC quantification of coumarin in bastard balm (*Melittis melissophyllum* L., Lamiaceae). **Fitoterapia**, v. 82, n. 8, p. 1215-1221, 2011.

MAISTRO, E. L., DE SOUZA MARQUES, E., FEDATO, R. P., TOLENTINO, F., DA SILVA, C. D. A. C., TSUBOY, M. S. F., ... VARANDA, E. A. In Vitro Assessment of Mutagenic And Genotoxic Effects of Coumarin Derivatives 6,7-Dihydroxycoumarin and 4- Methylesculetin. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 78, n. 2, p. 109–118, 2014. DOI: 10.1080/15287394.2014.943865

BEZERRA, A. M. E.; NASCIMENTO JÚNIOR, F. T. D. Rendimento de biomassa, óleo essencial, teores de fósforo e potássio de chambá em resposta à adubação orgânica e mineral. **Revista Ciência Agronômica**, v. 37, n. 2, p. 124–129, 2006.

MARSCHNER, P. **Mineral nutrition of higher plants**. 3rd ed. Adelaide :Academic Press, 2012.

MARSHALL, ME.; KERVIN, K.; BENEFIELD, C.; UMERANI, A.; ALBAINY-JENEI, S.; ZHAO, Q.; KHAZAELI, M. B. Growth-inhibitory effects of coumarin (1,2-benzopyrone) and 7-hydroxycoumarin on human malignant cell lines in vitro. **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 120, n. 1, p 3-10, 1994.

MARTIN, K. W.; ERNST, E. Herbal medicines for treatment of bacterial infections: a review of controlled clinical trials. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 2, p. 241-246, 2003.

MATOS, F. A. A. **Farmácias vivas**. 2. ed. Fortaleza: EUFC, 1994.

MAZIMBA, O. Umbelliferone: Sources, chemistry and bioactivities review. **Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University**, v. 55, n. 2, p. 223-232. 2017. DOI: 10.1016/j.bfopcu.2017.05.001

MEDA, A.R.; CASSIOLATO, M.E.; PAVAN, M.A.; MIYAZAWA, M. Alleviating soil acidity through plant organic compounds. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.44, p.185-189, 2001.

MIYAZAWA, M.; PAVAN, M. A.; FRANCHINI, J. C. Neutralização da acidez do perfil do solo por resíduos vegetais. **Informações Agronômicas**, n. 92, p. 1-8, 2000.

NAOWABOOT, J., SOMPARN, N., SAENTAWEESEK, S., & PANNANGPETCH, P. Umbelliferone Improves an Impaired Glucose and Lipid Metabolism in High-Fat Diet/Streptozotocin-Induced Type 2 Diabetic Rats. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 9, p. 1388-1395, 2015. DOI: 10.1002/ptr.5392

NICOLODI, M.; ANGHINONI, I.; GIANELLO, C. Indicadores da acidez do solo para a recomendação da calagem no sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 237-247, 2008.

OLIVEIRA, A.F. M.; ANDRADE, L. H. C. Caracterização morfológica de *Justicia pectoralis* Jacq. e *J. gendarussa* Burm. F.(Acanthaceae). **Acta amazônica**, v. 30, n. 4, p. 569-569, 2000.

OLIVEIRA, E. L. de; PAVAN, M. A. Control of soil acidity in no-tillage system for soybean production. **Soil and Tillage Research**, v. 38, p. 47–57, 1996.

OMS - Organización Mundial de La Salud [Internet]. Situación regulamentaria de los medicamentos: una resena mundial. 1990. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/whozip58s/whozip58s.pdf>>. Acesso em: jul. 2011.

PANDA, S.; KAR, A. Amelioration of L-Thyroxine-induced hyperthyroidism by coumarin (1, 2-benzopyrone) in female rats. **Clinical and experimental**

pharmacology and physiology, v. 34, n. 11, p. 1217-1219, 2007. DOI: 10.1111/j.1440-1681.2007.04701.x

PAVAN, M. A.; BINGHAM, F. T.; PRATT, P. F. Toxicity of aluminum to coffee in ultisols and oxisols amended with CaCO₃, MgCO₃, and CaSO₄ . 2H₂O. **Soil Science Society of America Journal**, v. 46, p. 1201–1207, 1982.

PAVAN, M.A. Ciclagem de nutrientes e mobilidade de íons no solo sob plantio direto. **Revista Plantio Direto**, Passo Fundo, v.41, p.8-12, 1997.

PEREIRA, A. M. S.; CÂMARA, F. L. A.; CELEGHINI, R. M. S.; VILEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M.; FRANÇA, S. C. Seasonal Variation in Coumarin Content Mikania glomerata. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, v. 7, n. 2, p. 1-10, 2000.

PETRUL'OVÁ-PORACKÁ, V., REPČÁK, M., VILKOVÁ, M., E IMRICH, J. Coumarins of Matricaria chamomilla L.: Aglycones and glycosides. **Food Chemistry**, v.141, n. 1, p. 54– 59 2013. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.03.004

PRIMAVESI, Ana. **Manejo ecológico do solo: a agricultura em regiões tropicais**. NBL Editora, 2002.

QUAGGIO, J. A. Acidez e calagem em solos tropicais. Campinas: Instituto Agrônômico, 2000.

RAUTIO, A.; KRAUL, H.; KOJO, A.; SALMELA, E.; PELKONEN, O. Interindividual variability of coumarin 7-hydroxylation in healthy volunteers. **Pharmacogenetics**, v. 2, n. 5, p. 227-233, 1992. DOI: 10.1097/00008571-199210000-00005.

REINERT, D. J.; REICHERT, J. M. Propriedades físicas do solo. **Universidade Federal de Santa Maria**, Santa Maria, 2006. Disponível em : < http://portais.ufg.br/up/68/o/An_lise_da_zona_n_o_saturada_do_solo__texto.pdf>. Acesso em: 20 mar. 2018.

RHEINHEIMER, D. S.; SANTOS, E. J. S.; KAMINSKI, J.; BORTOLUZZI, E. C.; GATIBONI, L. C. Alterações de atributos do solo pela calagem superficial e incorporada a partir de pastagem natural. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 24, p. 797–805, 2000.

RHEINHEIMER, D. S.; SANTOS, E. J. S.; KAMINSKI, J.; BORTOLUZZI, E. C.; GATIBONI, L. C. Alterações de atributos do solo pela calagem superficial e incorporada a partir de pastagem natural. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 24, p. 797–805, 2000.

RODRÍGUEZ FERRADÁ, C. A.; HECHEVARRÍA SOSA, I.; FUENTES FIALLO, V. R. Fecha y distancia de plantación en el cultivo del tilo (*Justicia pectoralis* Jacq. var. *stenophylla* Leonard). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 8, n. 1, p. 0-0, 2003

SAMPAIO, B. L.; BARA, M. T. F.; FERREI, P. H.; SANTOS, S. C.; PAULA, J. R. Influence of environmental factors on the concentration of phenolic compounds in leaves of *Lafoensia pacari*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 6, p. 1127-1137, 2011.

SANTOS JÚNIOR, M. A. et al. 065 — (SAN0093) Evaluation of anticonvulsant and antioxidant effects of standardized extract of *Justicia pectoralis* (chamba) in the electroshock model in mice. **Epilepsy & Behavior**, v. 38, p. 215, 2014.

SANTOS, D. G. P. O. **Produção de biomassa e teor de cumarina em folhas de guaco (*Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker) em diferentes idades da planta**. 2016. Dissertação (Mestrado em Horticultura) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2016.

SANTOS, S. H. M. dos. *Cumaru Dipteryx odorata* Wild. Família Leguminosae. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2002. 4p. (Recomendações Técnicas).

SETH, K.; AERY, C. N. Effect of Boron on the Contents of Chlorophyll, Carotenoid, Phenol and Soluble Leaf Protein in Mung Bean, *Vigna radiata* (L.) Wilczek. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 84, n. 3, p. 713–719, 2014.

SIMPSON, G. E. Folk medicine in Trinidad. **The Journal of American Folklore**, v. 75, n. 298, p. 326-340, 1962. DOI: 10.2307/538368

SOINE, T. O. Naturally occurring coumarins and related physiological activities. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 53, n. 3, p. 231-264, 1964.

SORATTO, R. P.; CRUSCIOL, C. A. C. Atributos químicos do solo decorrentes da aplicação em superfície de calcário e gesso em sistema plantio direto recém-implantado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 675–688, 2008.

SOUZA, A. G. et al. 076 — (SOU0156) Involvement of calcium and sodium channels in the anticonvulsant and antioxidant effects of standardized extract of *Justicia pectoralis* (chamba) in mice. **Epilepsy & Behavior**, v. 38, p. 215, 2014.

SOUZA, G. S.; CASTRO, E. M.; SOARES, A. M.; PINTO, J. E. B. P.; RESENDE, M. G.; BERTOLUCCI, S. K. V. Crescimento, teor de óleo essencial e conteúdo de cumarina de plantas jovens de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) cultivadas sob malhas coloridas. **Biotemas**, v. 24, n. 3, p. 1-11, 2011. DOI: 10.5007/2175-7925.2011v24n3p1

STUHLMEIER, K., THEYER, G., BAUMGARTNER, G., & ZLABINGER, G. J. Synergistic effect of coumarin (1, 2 benzopyrone) and endotoxin in the induction of human interleukin-1. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 84, n. 2, p. 317-323, 1991. DOI: 10.1111/j.1365-2249.1991.tb08167.x.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6ªed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TANAKA, Y.; FUJII, W.; HORI, H.; KITAGAWA, Y.; OZAKI, K. Relationship between coumarin-induced hepatocellular toxicity and mitochondrial function in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 90, p. 1-9, 2016. DOI: 10.1016/j.fct.2016.01.007.

TISDALL, J.; OADES, J. Organic matter and water-stable aggregates in soils. **Journal of Soil Science**, v. 33, n. 2, p. 141–163, 1982.

TROPICOS. **Justicia pectoralis Jacq.** Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/100660>>. Acesso em: 04 Sep 2017.

USGS. **Earth Explorer**. Disponível em : <<https://earthexplorer.usgs.gov/>>. Acesso em: 27 mar. 2018.

VASCONCELOS, G. S. et al. 082 — (VAS0091) Involvement of glycine in the anticonvulsant and antioxidant effects of standardized extract of *Justicia pectoralis* (chamba) in mice. **Epilepsy & Behavior**, v. 38, p. 217–218, set. 2014.

VASCONCELOS, J. F.; TEIXEIRA, M. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; NUNES, X. P.; GIULIETTI, A. M.; SANTOS, R. R.; SOARES, M. B. Effects of umbelliferone in a murine model of allergic airway inflammation. **European journal of pharmacology**, v. 609, n. 1-3, p. 126-131, 2009.

VENÂNCIO, E. T. et al. 083 — (VEN0161) Anticonvulsant and antioxidant effects of chamba (*Justicia pectoralis*) in mice: Involvement of GABA receptor. **Epilepsy & Behavior**, v. 38, p. 218, 2014.

VENÂNCIO, E. T. et al. Anxiolytic-like effects of standardized extract of *Justicia pectoralis* (SEJP) in mice: Involvement of GABA/benzodiazepine in receptor. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 3, p. 444–450, 2011.

VRIEST, J. X.; TAUSCHER, B.; WURZEL, G. Constituents of *Justicia pectoralis* Jacq. 2. gas chromatography/mass spectrometry of simple coumarins, 3-phenylpropionic acids and their hydroxy and methoxy derivatives. **Biomedical mass spectrometry**, v. 15, n. 8, p. 413-417, 1988.

WASSHAUSEN, D. C.; WOOD, J. R. I. Acanthaceae of Bolivia. **Contributions from the United States National Herbarium**, v. 49, 2004.

YU, S. M., HU, D. H., & ZHANG, J. J. Umbelliferone exhibits anticancer activity via the induction of apoptosis and cell cycle arrest in HepG2 hepatocellular carcinoma cells. **Molecular medicine reports**, v. 12, n. 3, p. 3869-3873, 2015. DOI: 10.3892/mmr.2015.3797