



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL**

**ANÁLISE FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES  
ANTIOXIDANTE, ANTIMUTAGÊNICA E CITOTÓXICA DE  
EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE *Coriandrum sativum* L.**

**PATRICIA CARARA DOS SANTOS**

VITÓRIA

2016



PATRICIA CARARA DOS SANTOS

**ANÁLISE FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES  
ANTIOXIDANTE, ANTIMUTAGÊNICA E CITOTÓXICA DE  
EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE *Coriandrum sativum* L.**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal do Espírito  
Santo, como requisito parcial para a  
obtenção do título de Mestre em  
Biologia Vegetal, do Programa de Pós-  
Graduação em Biologia Vegetal.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dra Maria do Carmo  
Pimentel Batitucci

Coorientador: Prof. Dr. Hildegardo  
Seibert França

VITÓRIA

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

S237a Santos, Patricia Carara dos, 1991-  
Análise fitoquímica e avaliação das atividades antioxidante,  
antimutagênica e citotóxica do extrato hidroalcoólico de  
*Coriandrum sativum* L. / Patricia Carara dos Santos. – 2016.  
80 f. : il.

Orientador: Maria do Carmo Pimentel Batitucci.  
Coorientador: Hildegardo Seibert França.  
Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade  
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e  
Naturais.

1. Adubação. 2. Antioxidantes. 3. Plantas –  
Desenvolvimento. 4. Mutagênese. 5. Nucléolo. I. Batitucci,  
Maria do Carmo Pimentel. II. França, Hildegardo Seibert. III.  
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências  
Humanas e Naturais. IV. Título.

CDU: 57

---

PATRICIA CARARA DOS SANTOS

**ANÁLISE FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES  
ANTIOXIDANTE, ANTIMUTAGÊNICA E CITOTÓXICA DE  
EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE *Coriandrum sativum* L.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

**Vitória, 28 de março de 2016**

**BANCA EXAMINADORA:**

---

**Prof. Dra. Viviana Borges Corte/UFES/ Membro Interno**

---

**Prof. Dra. Claudia Masrouah Jamal/UFES/ Membro Externo**

---

**Prof. Dr. Maria do Carmo Pimentel Batitucci/ UFES/ Orientador**

---

**Prof. Dr. Hildegardo Seibert França/ IFES/ Coorientador**

VITÓRIA  
2016

A **Deus** seja dada toda a honra.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, meu refúgio, por me fortalecer, iluminar e me guiar na jornada da vida. Obrigada, Senhor!

Agradeço à minha família, meu porto seguro e minha estimulação diária. Obrigada pelo apoio e por sempre me incentivarem nos meus estudos.

Agradeço à Prof<sup>a</sup> Dra Maria do Carmo Pimentel Batitucci, quem aceitou me orientar dedicando muitas horas do seu tempo às minhas indagações.

Agradeço ao Prof. Dr. Hildegardo Seibert Franca pela coorientação neste trabalho e por todo o ensinamento.

Agradeço à Prof<sup>a</sup> Dra. Claudia Masrouah Jamal e a Prof<sup>a</sup> Dra Viviana Borges Corte, que aceitaram fazer parte da banca desta dissertação, trazendo suas preciosas contribuições.

Ao prof. Dr Wanderson Romão, do Labpetro – Universidade Federal do Espírito Santo, pela colaboração nas análises de espectrometria.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Genética Vegetal e Produtos Naturais, minha segunda família, sem vocês nada seria possível;

Agradeço a todos amigos pelos sorrisos e abraços, pela confiança e pelas calorosas discussões e troca de ideias. Obrigada por tornarem minha vida cada vez mais alegre e interativa.

Agradeço ao Christiano, pelo amor, compreensão e companheirismo. Muito obrigada!

## RESUMO

*Coriandrum sativum* L, conhecido como coentro, pertencente à família Apiaceae, trata-se de uma hortaliça originária do continente Europeu e Africano. Desta planta são aproveitáveis as flores, folhas e frutos. Além de seu papel na culinária, desempenha papel relevante na medicina popular sendo recomendada para tratamento de diversas doenças. É rica em compostos fenólicos, frequentemente relacionados a efeitos antioxidantes. Em geral, o substrato envolvido no processo de cultivo de plantas medicinais pode estar relacionado à produção de metabólitos secundários com princípios bioativos de interesse. Além da forma de cultivo, outro fator relevante na produção de metabólitos é o estágio de desenvolvimento na qual a planta se encontra. Devido à carência de trabalhos com esse enfoque envolvendo o coentro, o presente estudo teve o objetivo de avaliar a influência da adubação e de dois estádios de desenvolvimento vegetal (vegetativo e floração), na produção de metabólitos secundários de *Coriandrum sativum*, bem como relacionar essas condições com o potencial quimioprotetor, antimutagênico e antioxidante do extrato hidroalcóolico de suas folhas. As plantas foram cultivadas na região de Venda Nova do Imigrante/ES - Brasil, mantidas, em campo, sob os regimes de adubação orgânica (esterco bovino) e adubação química com nitrogênio, fósforo e potássio (NPK), envolvendo dois estádios de desenvolvimento (vegetativo e a floração). As partes aéreas foram secas e submetidas à maceração em etanol 70% para a obtenção do extrato bruto o qual passou por uma caracterização fitoquímica por métodos fitoquímicos preliminares e espectrometria de massas. Foi detectada a presença de metabólitos como cumarinas, esteroides e flavonoides, em todos os extratos e a espectrometria de massas apontou picos moleculares similares entre os extratos avaliados. O extrato bruto de *C. sativum* no estágio vegetativo e adubação química apresentou melhor atividade antioxidante, segundo o teste DPPH, em comparação aos demais grupos de tratamento e o extrato obtido a partir de plantas no estágio vegetativo apresentou maior redução na frequência de micronúcleos, em relação ao controle positivo, tanto no ensaio de pré-tratamento quanto no simultâneo.

**Palavras-chave:** micronúcleo, adubação, mutagênese, quimioproteção, antioxidante

## ABSTRACT

*Coriandrum sativum* L., known as coentro, is included in the Apiaceae family and It is a vegetable originating from European and African Continent. Flowers, leaves and fruits are commonly used of this plant. In addition it plays an important role in folk medicine and It is recommended for treatment of various diseases. This plant is rich in phenolic compounds that are related to Its antioxidant effects. The substrate involved in medicinal plant cultivation process can interfere in the production of secondary metabolites with bioactive principles . Another important factor in the production of metabolites is the development stage in which the plant is and there is no scientific works with this approach involving *C. sativum*. The aims of this study was evaluate the influence of fertilization on the production of secondary metabolites in two stages of development of *Coriandrum sativum* and relate these conditions with quimioprotetor, antimutagenic and antioxidant potential of hydroalcoholic extract of the leaves of this plant. The plants were grown in the Venda Nova do Imigrante/ES – Brazil under the organic fertilizer regimes (bovine manure) and chemical fertilizer (NPK), field conditions, and was evaluated two stages of development (vegetative and flowering). Aerial parts were dried and subjected to maceration in 70:30 ethanol/water (vol/vol) to obtain the crude extract which were underwent a phytochemical characterization by colorimetric methods and mass spectrometry. All cultivation conditions showed that the extracts had same phytochemical classes of metabolites (coumarins, flavonoids and steroids) and the mass spectrometry indicated similarities between the extracts evaluated. The crude extract of *C. sativum* in the vegetative stage and chemical fertilization showed better antioxidant activity, according to the DPPH test when compared to other treatment groups and the extracts obtained from vegetative stage of the

plants under different cultivation conditions showed a reduction in the micronucleus frequency in relation to the positive control in the pretreatment and simultaneously assay.

**Keywords:** micronucleus, *Coriandrum sativum*, mutagenesis, chemoprotection.

# SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	12
2.1 Plantas Medicinais e o Metabolismo Secundário .....	12
2.2 Família Apiaceae .....	15
2.3 <i>Coriandrum sativum</i> .....	16
2.4 Influência da Adubação na Produção de Metabólitos .....	19
2.5 Mutagênese .....	22
2.6 Teste do Micronúcleo .....	25
3 OBJETIVOS .....	28
3.1 Objetivo Geral .....	28
3.2 Objetivos Específicos .....	28
4 METODOLOGIA .....	29
4.1 Cultivo do Material biológico e Obtenção dos Extratos de <i>Coriandrum sativum</i> .....	29
4.2 Fitoquímica Preliminar .....	30
4.2.1 Alcaloides .....	30
4.2.2 Flavonoides .....	30
4.2.3 Saponina .....	31
4.2.4 Triterpenos e Esteroides .....	31
4.2.5 Taninos .....	31
4.2.6 Cumarina .....	31
4.2.7 Antraquinona .....	32
4.3 Quantificação espectrométrica de flavonoides .....	32
4.3.1 Curva Padrão Para Flavonoides .....	32
4.3.2 Quantificação de Flavonoides Utilizando o EBH .....	33
4.4 Espectrometria de Massas .....	33
4.5 Ensaio Antioxidante .....	34
4.6 Ensaio do Micronúcleo .....	35
4.6.1 Animais .....	35
4.6.2 Ensaio de micronúcleo em células de medula óssea de camundongo .....	36
4.7.4 Análises Estatísticas .....	39

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1 Análise Química de Solo.....	40
5.2 Prospecção Fitoquímica.....	41
5.3 Quantificação de flavonoides .....	42
5.4 Espectrometria de Massas.....	44
5.5 Ensaio Antioxidante .....	47
5.6 Ensaio de Antimutagenicidade.....	50
5.6.1 Tratamento Simultâneo.....	50
5.6.2 Pré-Tratamento.....	52
6 CONCLUSÕES .....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	57
ANEXO A .....	78
APÊNDICE A.....	79

# 1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são empregadas, tradicionalmente, no tratamento de diversas doenças sendo que, cada vez mais, merecem destaque o uso popular e a atividade medicinal dos condimentos, utilizados tanto para dar sabor e aroma aos alimentos quanto para fins medicinais. Neste contexto, *Coriandrum sativum* L. (coentro) tem se inserido como um importante membro da família Apiaceae, utilizado para ambos os fins.

Sugeridos como responsáveis por atividades antioxidantes, quimioprotetora e antimutagênica estão os metabólitos secundários, cuja síntese pode ser influenciada tanto por fatores biológicos quanto ambientais, tais como a espécie, variedade, solo, manejo, condições climáticas, estágio de amadurecimento e temperatura. Pesquisadores têm se dedicado à análise da influência de alguns desses fatores em relação à produção de biomassa, como é o caso da adubação, porém poucos são os estudos que têm relacionado este fator à variação na produção e acúmulo de metabólitos secundários com fins medicinais.

As diferenças na composição dos extratos de plantas decorrentes das flutuações de fatores ambientais podem estar diretamente relacionadas às suas atividades farmacológicas antioxidantes, quimioprotetoras e antimutagênicas.

Assim, pesquisas que tenham o intuito de investigar a possível interferência da adubação e dos estádios de desenvolvimento de plantas medicinais, como a *C. sativum*, sobre a produção de seus metabólitos secundários e dos seus princípios ativos são bastante relevantes, pois ainda o tema tem escassa reflexão neste gênero vegetal.

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência da adubação (química e orgânica) e de dois estádios de desenvolvimento (vegetativo e floração) na produção de metabólitos secundários de *Coriandrum sativum*, que possam estar relacionados a uma atividade quimioprotetora, antimutagênica e antioxidante do extrato hidroalcolico produzido a partir dessas plantas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Plantas Medicinais e o Metabolismo Secundário

A utilização de plantas medicinais é uma prática antiga, baseada muitas vezes, em um conhecimento tradicional adquirido ao longo de uma vivência e transferido de geração a geração. Desde 1978, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda, mundialmente, a propagação de conhecimentos que promovam o uso seguro de plantas e de medicamentos fitoterápicos reconhecendo sua utilização com finalidades profiláticas, curativas, paliativas e para fins de diagnóstico (BRASIL, 2006).

De acordo com a OMS, cerca de 80% da população de países em desenvolvimento fazem utilização de práticas de atenção básica de saúde dentre elas, as plantas medicinais ou preparações a partir das mesmas (MACEDO, OSHIWA, & GUARIDO, 2007).

Diante da importância que as plantas medicinais e fitoterápicos alcançaram, foi criada pelo Ministério da Saúde, em 2001, uma Proposta de Política Nacional de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos visando “garantir a necessária segurança, eficácia e qualidade de plantas medicinais e de medicamentos fitoterápicos”, e assim promover o uso racional (BRASIL, 2006).

As plantas medicinais são empregadas no tratamento de uma gama de doenças (CRAGG 1999 *apud* CAROLLO, 2008; PINTO, PINTO & DONZELES 2013) e a sua utilização farmacológica pode se dar por meio de diferentes formas farmacêuticas, tais como, infusão, cataplasma, compressa, inalação, maceração, sumo, tintura, etc; sendo que uma forma de preparo pode ser mais eficaz que a outra, dependendo da planta a ser utilizada e da doença em questão. (BARBOSA et al, 2014).

A variabilidade de efeitos que as plantas medicinais expõem decorre de sua capacidade de produção de inúmeros componentes oriundos de seu metabolismo. O metabolismo secundário é a principal fonte dos ativos vegetais, e seus produtos, denominados metabólitos secundários, não são relacionados diretamente ao crescimento e desenvolvimento da planta, sendo sintetizados

com diferentes propósitos, tais como agentes atrativos, interações intra e interespecíficas e defesa contra predadores e parasitas (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Os metabólitos secundários podem ser classificados em três grandes grupos: os terpenos (compostos basicamente de carbono e hidrogênio), os compostos fenólicos (constituídos de pelo menos uma hidroxila funcional ligado a um anel aromático) e os compostos nitrogenados (possuem nitrogênio na composição, sendo sintetizados a partir de aminoácidos) (TAIZ & ZEIGER, 2013). Todos derivam de compostos do metabolismo primário do carbono, via dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato (TAIZ & ZEIGER, 2013; SIMÕES et al., 2007). A partir da via do ácido chiquímico formam-se os taninos hidrolisáveis, cumarinas, alcalóides derivados dos aminoácidos aromáticos e fenilpropanóides, ao passo que na via do acetato são originados aminoácidos alifáticos e os alcalóides derivados deles; terpenoides, esteroides, ácidos graxos e triglicerídeos (LEITE, 2008).

Muitos destes produtos estão relacionados a interessantes atividades biológicas e farmacológicas (VERPOORTE, 2000). Alcaloides isolados do gênero *Solanum* apresentaram atividade moluscicida sendo utilizados no combate ao hospedeiro intermediário do *Schistosomo mansoni* (SILVA et al, 2006). A partir de lactonas das famílias Euphorbiaceae e Anonaceae foram obtidos resultados promissores no combate à leucemia (LEE et al, 1982; SANTOS; MORAIS & BRAZ-FILHO, 2003).

Muitos compostos fenólicos como flavonoides, catequinas e taninos também se destacam por efeitos biológicos ao exibirem ações antioxidantes, antimicrobiana, anti-inflamatória e vasodilatadora (AHERNE & O'BRIEN, 2002; BURNS et al., 2001; SELLAPAN, AKOH & KREWER, 2002; SLUIS et al., 2001; ZHENG & WANG, 2001). Algumas cumarinas e flavonoides da família Asteraceae revelaram ainda um potencial anti-HIV (HU et al, 1994; KAUR et al, 2009), enquanto alcaloides, cumarinas, terpenoides e xantoides desta e de outras famílias também revelaram atividade antimalárica (KUMAR et al, 2009).

Outros metabólitos como naftoquinonas isoladas da família Verbenaceae (COSTA et al, 2001), flavonoides isolados da família Fabaceae (ALMEIDA et al, 2005) e Ochnaceae (CARVALHO et al, 2002) apresentaram, eficiente ação tripanocida (VIEIRA et al, 2008) e citostática (ROCHA et al, 2006). A

administração oral de flavonoides da família Anonaceae reduziu os níveis de glicose em ratos, resultando em um efeito hipoglicemiante, além de efeitos antiproliferativo, anti-inflamatório e antioxidante (FORMAGIO et al, 2013).

A ação antioxidante é uma das mais citadas dentre as funções dos metabólitos secundários. Esta ação pode ser atribuída à atividade de enzimas, como superóxido desmutases, ascorbatoreduases, catalases e peroxidases, mas também, a compostos do metabolismo secundário como compostos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonoides) e carotenos, além de vitaminas (C, E e A) (VELIOGLU, 1998; MARTINS, 2013; SARMENTO, SILVA & SBRUZZI, 2013). Radicais livres podem interagir com biomoléculas, dentre as quais se destacam os lipídios, as proteínas ou DNA propriamente dito, os quais podem ser preservados pela ação dos antioxidantes. (SELLAPAN, AKOH & KREWER, 2002; SLUIS et al., 2001; VINSON et al., 2001; YILDRIM, MAVI & KARA, 2002;ZHENG & WANG, 2009).

A formação de radicais livres pelo oxigênio é supostamente a chave para o desenvolvimento de cânceres e doenças coronárias. Um bom antioxidante, portanto, pode se apresentar como um bom agente antimutagênico e antigenotóxico, sendo capaz de reduzir a ação de agentes químicos ou físicos que induzem danos ao material genético (GONTIJO, FIETTO & LEITE, 2014). Os testes antioxidantes se comportam como importantes ferramentas para a verificação de uma potencial neutralização de radicais livres capazes de causar danos genômicos.

Tendo-se em vista que a segurança de alguns antioxidantes comerciais tem sido questionada por induzir efeitos mutagênicos e carcinogênicos (BIRCH et al., 2001), o interesse em antioxidantes naturais, como uma estratégia alternativa, tem aumentado. Em meio a este cenário, tem se inserido as ervas e especiarias, que podem, além de temperar a comida, se apresentar também com propriedades medicinais e antioxidantes importantes (SASAKI et al. 2002), sendo os derivados do ácido cafeico, flavonoides e terpenos sugeridos como os principais responsáveis por este efeito (MADSEN & BERTELSEN, 1995).

O uso popular e medicinal dos condimentos tem sido investigado em diversos estudos (PORTO & SILVA, 2013; LIMA et al, 2012; MENDES et al, 2015). Os condimentos da família Lamiaceae, como o orégano, merecem destaque pelo caráter antioxidante de seus compostos fenólicos, além de

propriedades antimicrobianas (CERVATO et al, 2000; BRAGAGNOLO, 2007). Extrato de folhas de louro, outro condimento muito utilizado, é relatado como agente carminativo e anticonvulsivante (SAYYAH, VALIZADEH, KAMALINEJAD, 2002). A eficácia da canela como agente antioxidante *in vivo* e *in vitro* também foi relatada e atribuída ao composto eugenol, um composto fenólico (4-alil-2-metoxifenol) (ITO, MURAKAMI & YOSHINO, 2005). As pimentas também compreendem um grupo importante da família Solanaceae. Segundo Abbasi (2010), de modo geral, a pimenteira possui ação antimutagênica, antimicrobiana, antioxidante, antidepressivo, ação imunomoduladora, antitumoral, antiapoptótica, antimetastásica, hepatoprotetora, dentre outras. Compostos oriundos da família Apiaceae também apresentam importantes atividades biológicas e farmacológicas sendo comentadas a seguir.

## **2.2 Família Apiaceae**

A família Apiaceae, até pouco tempo tratada como Umbeliferae, agrupa mais de 250 gêneros e mais de 2500 espécies, as quais estão amplamente difundidas pelo mundo. A maioria de suas espécies tem sua origem nas zonas temperadas do hemisfério norte e estão, mesmo em outros locais, adaptadas ao clima temperado, desenvolvendo-se em ambientes com temperaturas entre 15 e 18°C. Em geral são plantas herbáceas, arborescentes e de folhas alternadas, com lâmina finamente dividida e pecíolo abrasador na base. Apresentam flores actinomorfas e hermafroditas, geralmente compostas e com um ovário ínfero, que uma vez fecundado, origina um fruto seco indeiscente, característico da família (MARTINS et al, 2008).

Trata-se de uma família com elevada importância hortícola, sendo a aromaticidade, uma de suas principais características, estando presente alguns constituintes dos óleos essenciais como limoneno e linalol (HADARUGA et al., 2005); monoterpenos e cumarinas (RIBEIRO & KAPLAN, 2002; RAZAVI et al., 2008; SIMÕES & SPITIZER, 2000). É composta por representantes importantes das especiarias, os quais têm ampla utilização como condimentos, não somente úteis para a alimentação mas também auxiliando na prevenção

de enfermidades devido às suas propriedades antioxidantes e/ou farmacológicas (MATIOLLI, 2014).

A família das apiáceas compreende hortaliças importantes, tais como, cenoura, salsa, mandioquinha-salsa, aipo (salsão), erva-doce (funcho) e o coentro, sendo muitas espécies desta família conhecidas pelo seu uso na medicina tradicional. Neste aspecto, podem-se citar alguns exemplos, como a *Centella asiática* (L), uma planta exótica utilizada no tratamento de disfunções cognitivas que atua por inibição da atividade da acetilcolinesterase (HOWES & HOUGHTON, 2003) e que pode atuar ainda como tranquilizante, porém, sua ingestão contínua pode causar hepatotoxicidade em função da presença de di e triterpenos (JORGE & JORGE, 2005). O *Apium leptophyllum*, que possui relatos de emprego no tratamento de artrite, reumatismo, gota, além de indicação para uso externo no tratamento de feridas na pele (NEWAL et al, 2002; ALONSO, 2004), também apresenta capacidade antioxidante e atividades diurética, anti-inflamatória, antimicrobiana e estrogênica, além de estimular a produção de leite, favorecendo a amamentação (CAMEJO-RODRIGUES et al., 2003; NOVAIS et al., 2004; RAHIMI & ARDEKANI, 2013).

Reforçando as potenciais ações biológicas de representantes da família Apiaceae, estudos relatam que óleos essenciais extraídos de várias espécies desta família possuem atividades inseticidas e antifúngicas (EBADOLLAHI, 2013; TINOCO et al 2007). Além disso, furocumarinas isoladas a partir de apiáceas têm sido relatadas com atividade antiproliferativa, podendo inibir a proliferação de células de melanoma *in vitro* e *in vivo* (KIMURA, SUMIYOSHI, SAKANAKA, 2013). Trata-se, portanto, de uma família com grande potencial na medicina tradicional e que é detentora de propriedades associadas a ações antioxidantes e quimioprotetivas.

### **2.3 *Coriandrum sativum***

Uma importante representante das apiáceas é a espécie *Coriandrum sativum* L., conhecida popularmente como coentro (Figura 1), uma hortaliça originária dos continentes Europeu e Africano, cultivada há mais de três mil anos e que é reconhecida por suas propriedades aromáticas, condimentares e

medicinais, podendo ser usada como medicamento natural e, também na indústria cosmética, como fixador (MELO et al, 2009).

Deste vegetal são aproveitáveis as flores, folhas e frutos e, no Brasil, prevalece o consumo de suas folhas frescas empregadas como condimento que dão sabor e aroma, sendo indispensável na culinária do Norte e Nordeste (MELO et al, 2009). Constitui-se de uma planta herbácea de 40 a 60cm de altura, de talos eretos, lisos e cilíndricos, ramificados na parte superior.



**Figura 1.** *Coriandrum sativum*. A- Parte aérea. B-Flores, C-Fruto. Fonte: USDA, ARS

Muito popular, o cultivo de coentro tem se dado em grande escala, com grandes produtores, e em pequenas escala, em hortas domésticas, escolares e comunitárias, assim apresentando relevante importância social e econômica (GRANgEIRO 2008; NASCIMENTO & PEREIRA 2005), sendo a sua colheita, geralmente, realizada entre 40 e 60 dias após o plantio.

Suas sementes, muito comercializadas na Europa, são usadas na extração de óleo essencial, cujo principal componente é o linalol. Além de sua utilização como condimento, as sementes de coentro são utilizadas

medicinalmente para indigestão, contra vermes, reumatismo, e dores nas articulações (WICHTL & BISSET, 1994).

Suas ações medicamentosas são comentadas em alguns estudos, os quais apontam efeitos no metabolismo de carboidratos e ação hipoglicemiante (GRAY & FLATT, 1999; CHITHRA & LEELAMMA, 2000), no tratamento de hemorroidas, dor de cabeça, inchaço, conjuntivites, úlceras na boca, além do uso carminativo e na produção de tônicos gastrintestinais (WANGENSTEEN et al 2004; AHMED SHIVHARE, SINGH 2003 ) e como antiinflamatório, antifúngico e ansiolítico (DUARTE, 2006).

Estudos ainda demonstram que alguns componentes do óleo, tanto de folhas quanto de sementes de coentro, inibem o crescimento de muitos microorganismos (DELAQUIS et al, 2002) e reduzem a peroxidação lipídica (ANILAKUMAR, NAGARAJ, & SANTHANAM, 2001; TANABE, YOSHIDA, & TOMITA, 2002). A redução da peroxidação lipídica pode estar associada a uma possível ação antimutagênica.

Dentre os principais compostos relatados no coentro, encontram-se: componentes heterocíclicos, linalol, isocumarinas, flavonoides, ácidos enólicos e esteróis (PATHAK et al 2011). Tais relatos são importantes, uma vez que os compostos fenólicos como flavonoides e cumarinas têm relevante importância na indústria farmacêutica, pois podem atuar como bons antioxidantes e anticancerígenos (RICE-EVANS, MILLER & PAGANGA 1996; SALEEM et al., 2002). Os esteroides também podem reduzir radicais livres, reduzir os níveis sanguíneos de colesterol, sendo com isso apontados como potenciais redutores de riscos de doenças cardiovasculares e capazes de inibir o crescimento de alguns tipos de tumores malignos (SALGADO, 2009).

Neste contexto, Ramadan e Moersel (2006) relataram a eficácia do óleo de coentro contra a geração de radicais 1,1- difenil - 2- picrilhidrazila, assim como Marcussi (2015), também destaca o coentro por sua elevada concentração de compostos fenólicos totais e sua alta capacidade antioxidante total, quando comparado a outros condimentos. Sreelatha e colaboradores (2009) reforçam esta indicação de atividade protetora do coentro ao relatarem a ação do extrato de hastes de *C. sativum* contra os danos oxidativos induzidos pelo tetracloreto em hepatócitos de ratos. Tais atividades apontadas nos

diferentes estudos reforçam uma possível atividade antimutagênica desempenhada por esta espécie.

Quanto ao cultivo da *Coriandrum sativum*, estudos apontam que a aplicação de adubação orgânica permite razoável crescimento de massa aérea de coentro (SHARMA & ISRAEL, 1991). Seu crescimento vegetativo é favorecido com a aplicação de fósforo e potássio durante o plantio, e nitrogênio em cobertura nos primeiros 20 dias (FILGUEIRA, 2000). Embora o esterco bovino seja um dos resíduos orgânicos com maior potencial de uso como fertilizante na cultura do coentro, principalmente por pequenos agricultores da região nordestina, em produções de grande escala, é comum o uso da adubação química. Pouco se conhece, ainda, a respeito da interferência da adubação do coentro na produção de seus metabólitos secundários.

## **2.4 Influência da Adubação na Produção de Metabólitos**

A produção dos metabólitos secundários pelos vegetais, como todas as características fisiológicas de uma planta é estabelecida tanto pelos fatores intrínsecos (genoma), quanto pela interação desses com os fatores ambientais. Assim, a síntese e acúmulo de compostos fenólicos, carotenoides e vitaminas em plantas é variável em função da espécie, variedade, solo, manejo, condições climáticas, estágio de amadurecimento e condições de armazenamento (LIMA et al., 2005; FERREYRA et al., 2007; VEBERIC COLARIC & STAMPAR, 2008). No entanto, a maioria dos estudos disponíveis ainda versa, principalmente, sobre as plantas de clima temperado (GOBBONETTO & LOPES, 2007).

De acordo com a época do ano, os teores de metabólitos secundários podem ser influenciados, como observado em folhas de *Digitalis obscura* que apresentam as menores concentrações de cardenolídeos, como o lanatosídeo A na primavera e uma fase de rápido acúmulo no verão, seguida por uma fase de decréscimo no outono (PRAKASH, 1990). A temperatura também se apresenta como importante fator influenciando na produção de metabólitos, em *Zea mays* (milho), é relatada quanto maior a intensidade e a duração do frio, maior é a abundância de antocianinas e mRNA para as enzimas chaves como

a PAL (fenilalanina amônia-liase) e chalcona sintase (LIMA et al., 2005). Experimentos com *Plantago lanceolata*, envolvendo a presença de herbívoro e teores diferenciados de nutrientes, demonstraram maior produção de metabólito secundário por esta planta, principalmente daqueles relacionados à herbivoria (VEBERIC, COLARIC & STAMPAR, 2008). A incidência de irradiação solar e índices pluviométricos, também interferem em teores de substâncias fenólicas de espécies vegetais (GOUVEA et al., 2012). Os resultados com *H. ternum* sugerem que a adubação controlada e a re-irrigação de plantas submetidas a estresse hídrico podem aumentar a biomassa e a concentração de metabólitos secundários (PINHATTI, 2010).

No que se refere aos nutrientes, pesquisas agronômicas vêm sendo conduzidas com o intuito de investigar a influência deste fator sobre a biomassa, seja pela disponibilidade dos macro ou micronutrientes pré-existentes no solo, ou pelos diferentes níveis alcançados por meio da adubação química ou orgânica, porém poucos estudos tem relatado o rendimento de metabólitos secundários com princípios medicinais.

O cultivo de plantas sob diferentes condições de adubação tem sido objeto de pesquisas e de discussões acirradas que, de um modo geral, apontam para a necessidade cada vez maior de aprofundamento sobre este aspecto. E esta discussão sobre qual é o tipo ideal de adubação para uma determinada cultura, seja ela com finalidade medicinal ou não, tem sempre pontos de vista e argumentos diferentes envolvidos.

Neste contexto, como uma alternativa aos modos de adubação mais comumente utilizados, temos a adubação orgânica, o cultivo mínimo e as práticas de agricultura alternativa em espécies medicinais, aromáticas e condimentares, como modos de manejo que possibilitariam um melhor desenvolvimento de plantas, nos aspectos referentes à resistência às pragas e doenças e, ao mesmo tempo, contribuiria para uma menor utilização de produtos químicos e, conseqüentemente, determinaria um reflexo na composição química da planta, favorecendo o seu uso medicinal (CHAVES, 2002). Um consenso é o de que a cultura de plantas medicinais e aromáticas, assim como outras plantas, depende de nutrição adequada para a boa produtividade agrícola.

Em literatura, alguns exemplos podem ser citados de estudos relacionando o tipo de adubação e a produtividade da planta.

Em relação à adubação orgânica, Maia (2006) observou aumento na produção de biomassa de *Hyptissu aveolens* em função de doses de esterco orgânico, fato que o autor atribuiu ao aumento na disponibilidade e absorção de nutrientes pelas plantas, devido provavelmente, a melhoria nas condições do solo como retenção de água e minerais. Chaves (2002), trabalhando com *Mentha arvensis* L., var. piperacens, observou que apesar das maiores dosagens de esterco de poedeira terem induzido maior crescimento de plantas, o teor de óleos essenciais reduziu em comparação com o tratamento sem adubação. Já, Biasi e colaboradores (2009), trabalhando com a alfavaca, verificaram que em diferentes concentrações de esterco de carneiro, não houve diferenças significativas quanto ao rendimento do seu óleo e nem foram observadas grandes variações nos componentes. Assim, observa-se que dependendo da espécie em questão, a adubação orgânica pode contribuir de forma positiva ou negativa na produção de biomassa e princípios ativos. Além disso, deve-se considerar alguns fatores importantes ao utilizar adubação orgânica, como sua composição química, a taxa de mineralização e o teor de nitrogênio os quais, por sua vez, podem sofrer influência das condições do ambiente e são responsáveis por sua eficiência.

Quanto à adubação química, estudos indicam que, quando utilizados dentro de limites permitidos, não trazem prejuízo às plantas, mas podem alterar o teor de compostos secundários (HOFFMANN et al., 2001; MAIA et al., 2008). Um dos constituintes principais da adubação química é o nitrogênio, o qual é um dos nutrientes mais exigidos pelas culturas, o que é justificado por tratar-se do elemento que compõe a estrutura das moléculas dos aminoácidos, proteínas, enzimas, pigmentos e muitos dos metabólitos secundários (MALAVOLTA et al. 1997; GOBBO-NETO, 2007). Martins (1995) observou que em *Justicia pectoralis* cultivada em solo com deficiência de fósforo, reduziu a concentração de cumarinas, com significativa redução na produção de biomassa, sendo este elemento essencial no sistema energético das células e na divisão celular (SOUZA et al, 2003).

Silva e colaboradores (2015), em estudos com adubação mineral e orgânica no cultivo de *Ageratum conyzoides* L., observaram que o tipo de

adubação influenciou no teor de flavonoides e nos caracteres agronômicos. Os autores relataram que as plantas cultivadas em solo com adubação orgânica apresentaram menor teor de flavonóides. Acredita-se que o menor aporte de nutrientes possa direcionar o metabolismo da planta para a produção de metabólitos secundários, embora a adubação orgânica disponibilize menos nutrientes no solo, fornece maior diversidade de nutrientes, em relação à adubação mineral (MAIA et al, 2008), o que pode justificar o menor teor de flavonoides observados pelo autor

Mesmo havendo estudos sobre a influência dos aspectos nutricionais das plantas medicinais em relação à adubação, a espécie *C. sativum* apesar de apresentar importância agrícola reconhecida, ainda é pouco explorada sobre os aspectos que relacionam a produção de seus metabólitos secundários de interesse medicinal, aos níveis e tipos de adubação.

## **2.5 Mutagênese**

Mutagênese é a ciência que estuda o processo de danos ao DNA pela ação de agentes químicos, físicos e biológicos. Estes danos são comumente medidos como mutações, aberrações cromossômicas, quebras de fita de DNA, aductos ou por interferências no mecanismo de reparo (GUYTON et al., 2008)

Mutações são definidas como qualquer alteração súbita no material genético da célula, e dentre suas consequências podemos citar a segregação e recombinação gênica, além de contribuição para o surgimento de processos tumorais e morte celular (RABELLO–GAY, 1999).

Apesar de seus efeitos deletérios, por alterar condições estabilizadas das células, as mutações gênicas são importantes para a evolução biológica por produzirem variabilidade genética podendo ocasionar diversidade de características as quais podem ser selecionadas ou não pelas condições ambientais.

Há duas classes de mutações: as somáticas e as germinativas. As mutações germinativas destacam-se no processo evolutivo por serem passadas para as gerações seguintes. Já as mutações somáticas, provocam alterações diretas no indivíduo portador, tais como proliferação celular e

envolver-se com o surgimento de doenças crônicas não transmissíveis tais como ateroscleroses, doenças cardíacas e câncer (FLORA & FERGUSON, 2005).

Diversos agentes físicos, químicos, ou mesmo biológicos presentes na natureza são capazes de ocasionar danos ao DNA. Esses erros, quando fixados, são considerados uma mutação, sendo assim, um agente mutagênico é aquele que induz um dano não passível de reparo e é transmitido a células descendentes durante a proliferação celular (WANG et al, 2009).

O desenvolvimento de câncer é apontado como uma interação de fatores endógenos e ambientais, sendo um dos principais fatores a dieta (MOON & SHIBAMOTO, 2009). Dietas ricas em gorduras, alimentos industrializados, carnes vermelhas entre outros estão relacionados com a elevada frequência de câncer de estômago, mama, cólon, próstata, pâncreas, ovário e endométrio (FRANCY – GUILFORD & PEZZUTO, 2008).

Pesquisas mostram que a maioria dos carcinógenos são mutágenos indicando assim uma grande correlação entre a mutagênese e a carcinogênese (MACGREGGOR et al, 2000). Dentre os mutágenos encontra-se a ciclofosfamida, ou 2-[bis(2-cloroetil)amino]-2-oxo-1,3,2-oxazafosforinana (Figura 2) que se trata de um composto organofosforado muito utilizado como agente antineoplásico, principalmente em câncer de seio, ovário e pulmão (TEICHER et al, 1994), além de sua potente capacidade imunossupressora (BACH & STROM 1986). É inativo quando testada *in vitro* em culturas de linfócitos humanos ou em células neoplásicas humanas. No entanto, quando convertida à sua forma ativa pelas enzimas microssomais do fígado (Struck, 1995), interfere *in vivo* com o crescimento de neoplasias suscetíveis e, até certo ponto, com a regeneração tissular normal.

A ação citotóxica da ciclofosfamida evidente *in vivo* é a base para seu uso terapêutico como agente antineoplásico e para algumas reações adversas associadas ao seu uso. A ciclofosfamida é oxidada com a clivagem da ligação P-N para formar seu metabólito ativo sendo convertida para 4-hidroxíciclofosfamida e aldofosfamida. A aldofosfamida é quimicamente instável, sofrendo conversão para acroleína e fosforamida mostarda, sua forma ativa (Figura 2).

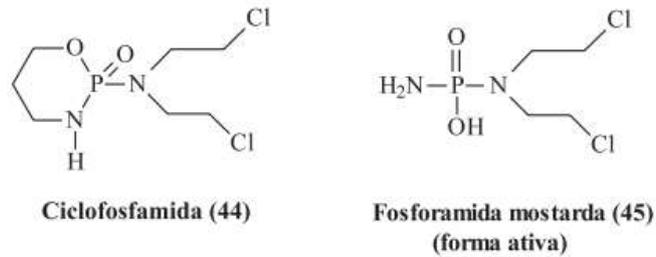


Figura 2 Ciclofosfamida e sua forma ativa. Fonte: (KOOPMAN, 2005)

Além de ser um agente alquilante, a ciclofosfamida ao ser metabolizada no fígado também origina espécies reativas de oxigênio (EROs), como os radicais ânion superóxido ( $O_2^-$ ), hidroxil ( $OH^-$ ) e peroxil ( $ROO^-$ ), oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), compostos altamente reativos que buscam estabilizar sua estrutura química, causando danos às estruturas celulares e envelhecimento do organismo (WILHEM FILHO et al., 2001).

A possibilidade de controle da resposta celular contra os agentes mutagênicos, tais como a ciclofosfamida, por meio da dieta, abre um novo caminho para a prevenção e controle do câncer, uma vez que estes agentes estão relacionados direta ou indiretamente à carcinogênese. Assim, a identificação de compostos quimioprotetivos constitui-se uma importante ferramenta para o tratamento de câncer, uma vez que poderiam atuar como agentes carcinogênicos.

Doll e Petto (1981) já haviam concluído que as modificações na alimentação poderiam reduzir em 35 % a mortalidade por câncer nos Estados Unidos. Diversos cientistas publicaram, dentre outras medidas que a incidência de câncer no mundo pode ser reduzida até 40%, através de adequações na alimentação e estilo de vida (WCRF/AIRC, 2007).

Neste contexto, insere-se o conceito da quimioprevenção, relatado pela primeira vez por Sporn e colaboradores em 1976. A prevenção é o método mais apropriado para se evitar o câncer (Wattenberg, 1997), seja prevenindo, inibindo ou revertendo as etapas iniciais da carcinogênese, ou seja, antes da progressão (STONER, MORSE & KELLOFF, 1997).

Assim, diversos compostos bioativos presentes em alimentos apresentam atividade quimiopreventiva dentre eles, diversos tipos de flavonoides e cumarinas (DAVIS, 2004; ROMAGNOLLO & ORNELLA, 2012). É

essencial que se prossiga a busca de novos mecanismos que elucidem a influência desses compostos no câncer contribuindo para os esclarecimentos de aspectos fundamentais da carcinogênese e do comportamento biológico das neoplasias malignas, além de promover um grande impacto em estratégias de prevenção (AMES & GOLD, 1997; YAO et al., 2004; SURH, 2003).

## 2.6 Teste do Micronúcleo

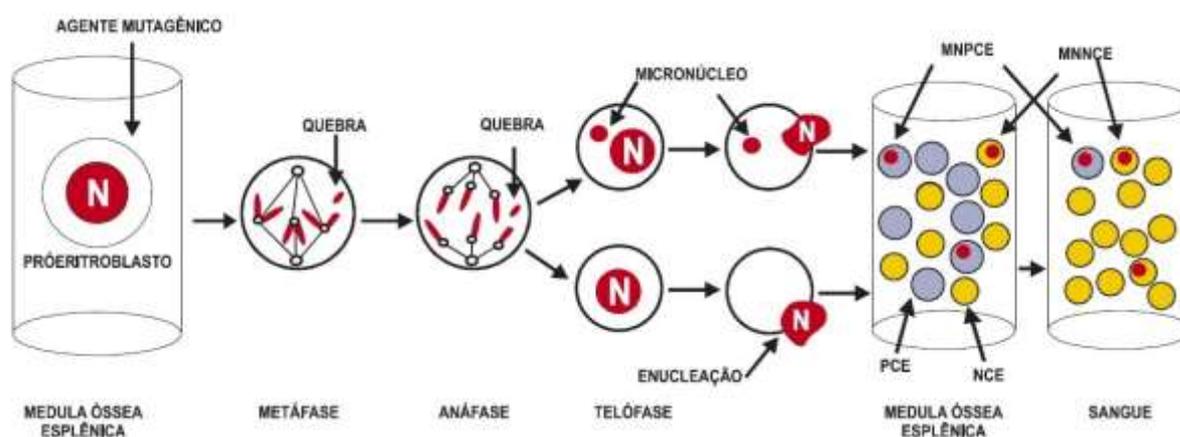
Em se tratando de testes biológicos, o teste de micronúcleo *in vivo* é um dentre uma gama de testes utilizados para o rastreamento de efeitos mutagênicos, recomendado por agências reguladoras no mundo todo como parte da avaliação de segurança de um produto (KLUMPP et al., 2004). O ensaio é capaz de detectar tanto clastogenicidade – quebra de cromossomos – quanto aneugenicidade – aneuploidia ou segregação cromossômica anormal devido a disfunções no aparato mitótico (KRISHNA; HAYASHI, 2000; CHOY, 2001). Além de verificar a mutagenicidade, o teste de micronúcleos em roedores também pode indicar o potencial antimutagênico de diversas substâncias, naturais ou não, pela redução na formação dessas estruturas.

Uma mutação é o primeiro passo rumo à carcinogênese, porém, a maioria das mutações é reparada pelos sistemas de reparo das células e são eliminadas a tempo (HAVSTEEN, 2002). Se os componentes genotóxicos estão presentes, eles podem se intercalar ao DNA levando a danos genéticos em regiões de fundamental importância no ciclo celular e determinar a apoptose, acelerando assim o processo neoplásico. Dessa forma é muito importante uma abordagem genotóxica em avaliações toxicológicas dos compostos terapêuticos (SANTOS et al., 2008).

Micronúcleos são fragmentos cromossômicos formados a partir de quebras ou de cromossomos inteiros que se atrasaram na anáfase, e podem não ser incorporados no núcleo principal das células filhas após a divisão nuclear. Os micronúcleos podem ser analisados em eritrócitos, células da mucosa oral ou linfócitos para a estimativa do dano genético *in vivo* (HAYASHI, 1983).

Na medula óssea, durante o processo de divisão celular, os eritroblastos sofrem duplicação final dos cromossomos diferenciando-se em eritrócitos policromáticos (EPC) (Figura 3). Estes eritrócitos jovens são ricos em ribossomos e, por isso, são facilmente corados diferenciando-se assim dos eritrócitos maduros denominados Eritrócitos Normocromáticos (ENC) que não possuem ribossomos. Na presença de agentes mutagênicos, os fragmentos cromossômicos resultantes de quebras no DNA podem não ser incorporados no núcleo principal das células filhas após a mitose, originando assim o micronúcleo. Este por sua vez permanece no citoplasma e pode ser facilmente visualizado em eritrócitos policromáticos.

Levando em consideração que o eritrócito policromático tem um tempo de vida relativamente curto, qualquer micronúcleo que ele contenha tem grande probabilidade de ter sido gerado recentemente, na presença da substância que causou o dano (SCHMID, 1975).



**Figura 3.** Mecanismo de formação de eritrócitos policromáticos, normocromáticos e micronúcleos (Adaptado de Krishna e Hayashi, 2000). PCE- Eritrócitos policromáticos; NCE- Eritrócitos normocromáticos; MNPCE- Eritrócitos policromáticos micronucleados; MNCE- Eritrócitos normocromáticos micronucleados.

No ensaio de micronúcleo, a relação de EPC em relação ao total de eritrócitos (EPC+ENC) entre o grupo de animais tratados e o grupo controle fornece o índice de citotoxicidade, e o número de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) fornece o índice mutagenicidade (KRISHINA; HAYASHI, 2000). A citotoxicidade é indicada por uma redução significativa na percentagem de EPC (RIBEIRO, 2003).

Por suas características vantajosas, essas análises tornaram-se imprescindíveis em estudos que objetivam a avaliação tanto de efeitos danosos dos diversos agentes, quanto das possíveis ações corretivas ou preventivas de drogas e outros agentes, sendo validada como procedimento em avaliações pré-clínicas e triagens (MORSE; STONER, 1993).

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência da adubação (química e orgânica) e de dois estádios de desenvolvimento (vegetativo e floração) na produção de metabólitos secundários de *Coriandrum sativum*, bem como relacionar essas condições com o potencial protetor, antimutagênico e antioxidante do extrato hidroalcoólico produzido a partir dessas plantas.

### 3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a influência da adubação orgânica e química na composição e atividade biológica do extrato hidroalcoólico de *C. sativum*;
- Avaliar a influência dos estádios de desenvolvimento, vegetativo e floração, na composição do extrato hidroalcoólico de *C. sativum*;
- Identificar as principais classes químicas constituintes do extrato hidroalcoólico de *C. sativum* em dois estádios de desenvolvimento e sob as diferentes condições de cultivo avaliadas;
- Determinar a atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólicos de *C. sativum*, nas diferentes condições avaliadas;
- Avaliar a potencial atividade quimioprotetiva dos extratos de *C. sativum* contra danos induzidos por ciclofosfamida;
- Relacionar os resultados obtidos em cada um dos ensaios de atividade biológica, com as diferentes condições de manejo e estádios de desenvolvimento avaliados.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Cultivo do Material biológico e Obtenção dos Extratos de *Coriandrum sativum*

O cultivo da espécie *Coriandrum sativum* foi realizado em campo, a céu aberto, na região de Venda Nova do Imigrante/ES, em parceria com os agricultores da região, no período de Dezembro a Janeiro. Para atender aos objetivos do presente estudo, que previam comparações entre dois padrões distintos de adubação, foram estabelecidos dois tratamentos, um deles com terra agrícola suplementada com esterco bovino sem a presença de herbicidas (adubação orgânica) e o outro com terra agrícola suplementada com NPK (4-14-8), na concentração de 150g/m<sup>2</sup> (adubação química), sendo que cada canteiro tinha a dimensão de 2m x 6m e as mudas foram plantadas utilizando-se o espaçamento de 25 cm x 10 cm. Todos os tratamentos foram expostos à irrigação diária. A análise de composição de solo foi realizada pelo Laboratório de Análise Agronômica e Consultoria LTDA- FULLIN (Linhares/ES) (ANEXO A), metodologia conforme EMBRAPA, 1998.

Após 45 dias do plantio, as plantas foram coletadas prosseguindo-se os testes em laboratório. Para tanto, toda a parte aérea da planta foi submetida à secagem em estufa de herbário (40°C/48h) e, posteriormente, o material foi moído em liquidificador industrial.

O extrato bruto hidroalcoólico de *C. sativum*, de cada uma das condições (adubação e estádios de desenvolvimento) foi preparado por maceração em etanol 70%, por 72 horas. Cada amostra foi filtrada, em papel filtro, e submetida à rotaevaporação à pressão reduzida, a uma temperatura média de 60 °C. Procedeu-se a secagem do concentrado em estufa, por 24h a 50°C, sendo posteriormente estabelecida a massa seca dos extratos para uso nos ensaios biológicos (DELARMELINA et al 2012).

## **4.2 Fitoquímica Preliminar**

A prospecção química foi realizada com o intuito de identificar grupos de metabólitos secundários tais como alcalóides, flavonóides, saponina, triterpenos, esteróides, taninos, cumarina e naftoquinona. Para tanto, foram utilizadas alíquotas do EBH de cada tratamento que foram submetidas à metodologia sugerida por Costa (1982) e Wagner e Bladt (1996).

As análises de fitoquímicas preliminares foram realizadas no Laboratório de Produtos Naturais da UFES em parceria com a Profa Dra. Claudia M. Jamal do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Espírito Santo.

### **4.2.1 Alcaloides**

Uma alíquota do extrato foi diluída em etanol, adicionou-se 1mL de HCl e gotas do reagente de Dragendorff, reservou e aguardou-se a reação, que em presença de compostos alcaloides desenvolve um precipitado laranja.

### **4.2.2 Flavonoides**

A identificação de flavonoides foi realizada por meio da Reação da Cianidina e de  $AlCl_3$ . Na reação de cianidina, foi adicionado a um tubo de ensaio cerca de 1 mL do extrato diluído em etanol. Ao tubo foi acrescentado 1 mL de HCl concentrado e fragmentos de zinco em pó. A reação com mudança de cor identificará o tipo de composto. A reação de  $AlCl_3$ , procedeu-se em cápsulas de porcelana onde gotas de  $AlCl_3$ , a 2%, foram adicionadas a 1 mL de extrato diluído. As cápsulas passaram por aquecimento, até secagem completa do seu conteúdo e, posteriormente, a coloração foi observada em fluorescência sob luz U.V. A observação de fluorescência de coloração amarela é o indicativo resultado positivo para flavonoides

### **4.2.3 Saponina**

Ao extrato diluído em álcool adicionaram-se gotas de uma solução saturada de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) até obtenção da neutralidade. A cada adição de ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ao extrato era verificado o pH com uma fita de teste. Após atingir o pH neutro a mistura foi aquecida até a ebulição. Aguardou-se o resfriamento e filtrou-se a mistura com algodão separando cerca de 2 mL do filtrado em uma proveta. Completou-se o volume para 100 mL com água destilada. O tubo fechado foi agitado energicamente por 1 minuto e, em seguida, foi observada a formação de espuma persistente, com 1cm ou mais de altura, que ocorre na presença de saponina.

### **4.2.4 Triterpenos e Esteroides**

Em um tubo de ensaio colocou-se uma alíquota do extrato com 10 mL de etanol lavado em clorofórmio. Em seguida, à solução filtrada clorofórmica foram adicionados 2 mL de anidrido acético, o tubo foi agitado suavemente e, por último, foram adicionadas gotas de ácido sulfúrico puro. A formação de uma coloração azul a esverdeado indica a presença de esteroides, a coloração variando de castanho a vermelho é indicativo da presença de triterpenos.

### **4.2.5 Taninos**

Solubilizou-se uma alíquota do EBH em 5mL de solução de gelatina e cloreto de sódio (reagente 2, Kit Quibasa). O aparecimento de precipitado indica a presença de taninos.

### **4.2.6 Cumarina**

Aplicou-se uma gota do EBH em uma tira de papel filtro, depois de seco observou-se a mancha sob luz U.V.. Aplicou-se uma gota de hidróxido de potássio (KOH) a 10% na mancha observada anteriormente e, novamente, se

observou sob luz U.V. A fluorescência azul ou amarelada na parte exposta da mancha indica a presença de cumarinas.

#### **4.2.7 Antraquinona**

Solubilizou-se uma alíquota do EBH em 3 mL de clorofórmio e adicionaram-se 2 mL de hidróxido de amônio (NH<sub>4</sub>OH). Os tubos foram agitados vagarosamente. Avaliou-se a formação de um anel vermelho na parte superior que seria o indicativo da presença de naftoquinona.

### **4.3 Quantificação espectrométrica de flavonoides**

Diversos trabalhos apontam para uma relação estreita entre a concentração de flavonoides na planta e sua atividade antioxidante (TRUEBA et al, 2001; MACEDO, et al, 2013), portanto, prosseguiu-se com a quantificação destes compostos.

A concentração de flavonoides foi determinada através da quantificação espectrométrica, segundo metodologia proposta por Costa (1982) e Rusak et al (1993) com algumas modificações.

#### **4.3.1 Curva Padrão Para Flavonoides**

Foram dissolvidos 25 mg de rutina em metanol, completou-se o volume para 50 mL, obtendo-se concentração final de 0,5 mg.L<sup>-1</sup>. Desta solução foram retiradas 4 alíquotas (0,25 mL; 0,5 mL; 1,0 mL e 1,5 mL), as quais foram colocadas em balões volumétricos de 25 mL. Cada um destes volumes foi completado para 2 mL com metanol e, em seguida foram acrescentados, em cada balão volumétrico: 0,6 mL de ácido acético glacial; 10 mL da solução de piridina e água (20:80); 2,5 mL de solução de cloreto de alumínio em metanol a 6,5% e, em seguida, completou-se o volume da mistura para 25 mL, com água destilada. Após 30 minutos, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 420 nm, utilizando-se como solução “branco” todos os reagentes listados

anteriormente (exceto rutina e o cloreto de alumínio), com o objetivo de calibrar (“zerar”) o aparelho. As análises foram feitas em triplicatas.

### 4.3.2 Quantificação de Flavonoides Utilizando o EBH

Pesaram-se 50 mg do EBH, que na sequência foram diluídos em 15 mL de etanol, após essa adição completou-se o volume para 50mL, com metanol. Desta solução foi retirada uma alíquota de 250 µl, a qual foi vertida em um balão volumétrico, completou-se o volume para 8 mL com metanol, em seguida foram acrescentados: 0,6 mL de ácido acético glacial; 10 mL da solução de piridina e água (20:80); 2,5 mL de solução cloreto de alumínio em metanol a 6,5% e, em seguida, completou-se o volume para 25 mL com água destilada. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 420 nm, utilizando-se como solução “branco” todos os reagentes listados anteriormente (exceto rutina e o cloreto de alumínio) para zerar o aparelho.

## 4.4 Espectrometria de Massas

No sentido de se obter mais informações relativas aos compostos químicos dos extratos de coentro, utilizou-se a espectrometria de massa, que é considerada uma técnica microanalítica útil e uma importante ferramenta para se caracterizar as amostras, quanto ao peso molecular e às estruturas de seus compostos químicos (DINIZ, 2011).

As análises de espectrometria de massas (ESI(-)FT-ICR MS e ESI(-)MS/MS) foram realizadas em parceria com o Prof. Dr. Hildegardo Siebert França do Instituto Federal do Espírito Santo.

Os extratos hidroalcolóicos do coentro foram solubilizados em 1 mL de metanol. Aproximadamente 10 µL do extrato produzido foram diluídos, novamente, em 1 mL de solução de acetonitrila e água basificada com NH<sub>4</sub>OH. A solução resultante foi analisada por ESI(-) FT-ICR MS.

As soluções foram analisadas por infusão direta a uma taxa de fluxo de 5 µL.min<sup>-1</sup>, para a fonte de *electrospray* no modo negativo de aquisição de íons

(ESI(-)) e adquiridos em uma região de  $m/z$  200 a 1000. As condições da fonte de ESI(-) foram as seguintes: pressão de gás nebulizador de 1,0 bar, voltagem capilar de 3,2 kV e temperatura do capilar de 250 °C. O tempo de acumulação de íons foi de  $5 \cdot 10^{-4}$  s, sendo que cada espectro foi adquirido pela acumulação de 32 *scans* com um domínio de tempo de 4 *mega-point* (COSTA et al, 2015).

Todos os espectros de FT-ICR MS foram externamente calibrados utilizando uma solução de NaTFA ( $m/z$  de 200 a 1200). Um poder de resolução de aproximadamente 500 000 a  $m/z$  de 428 e uma exatidão de massa menor do que 1 ppm fornecem fórmulas moleculares inequívocas para íons moleculares monocarregados. Os espectros de FT-ICR MS foram adquiridos e processados utilizando o *software Data Analysis* (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). O grau de instauração para cada molécula foi determinado a partir do seu valor de DBE (*double bond equivalent*), (DESTEFANI et al, 2014; NASCIMENTO et al, 2015) equação 1:

$$DBE = c - h/2 + n/2 + 1 \quad (1)$$

onde c, h, e n correspondem aos números de carbono, hidrogênio e nitrogênio, respectivamente, na fórmula mínima determinada a partir dos dados de FT-ICR MS.

## 4.5 Ensaio Antioxidante

A atividade antioxidante foi avaliada por meio do ensaio da atividade sequestrante do radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) em microplaca (DUARTE et al., 2006) expressa em porcentagem, por comparação ao controle ácido ascórbico.

A capacidade antioxidante de vegetais é um dos principais fatores que contribuem para significativa redução da incidência de doenças crônicas e degenerativas encontradas em populações cujas dietas são altas na ingestão desses alimentos (SHAHIDI, 1996). As substâncias antioxidantes presentes nos extratos reagem com o DPPH que é um radical estável, e converte-o em

2,2-difenil-1-picril hidrazina. O grau de descoloração indica o potencial antioxidante do extrato.

Para o teste DPPH, uma alíquota de 200 µL da solução metanólica de DPPH 120 mg.L<sup>-1</sup> foi adicionada a 100 µL do extrato etanólico de coentro. Após 30 minutos em ausência de luz, realizaram-se as leituras de absorbância a 517 nm em espectrofotômetro para microplaca (ELISA). Foram utilizadas as concentrações de 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 e 15.625 µg.mL<sup>-1</sup> do extrato, em triplicata. Como controle utilizou-se solução de Trolox e foram preparados os “brancos” correspondentes ao ensaio DPPH, aos padrões e às amostras e o álcool metílico foi utilizado para a calibração do aparelho.

. Os cálculos foram efetuados com o auxílio da seguinte fórmula (NOIPA, 2011):

$$\% \text{ descoloração do DPPH} = \frac{A \text{ controle} - (A \text{ amostra} - A \text{ branco da amostra})}{A \text{ controle}} \times 100$$

em que: A amostra = absorbância da amostra a 517 nm; A branco da amostra = absorbância do branco da amostra a 517 nm; A controle DPPH = absorbância do branco do ensaio DPPH a 517 nm.

Os resultados obtidos a partir da avaliação da atividade antioxidante do coentro, em diferentes condições de cultivo e estádios de desenvolvimento, foram comparados com vistas a identificar possíveis diferenças entre os cada um dos tratamentos.

## **4.6 Ensaio do Micronúcleo**

### **4.6.1 Animais**

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA/UFES, processo 019/2015, Apêndice A).

Os animais utilizados nos ensaios foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal do Espírito Santo/Brasil, perfazendo um total de 156 camundongos albinos da linhagem *Swiss (Mus musculus)*, sendo todos machos, com idade entre 6 a 8 oito semanas e, aproximadamente, 40 g de massa corpórea (mc).

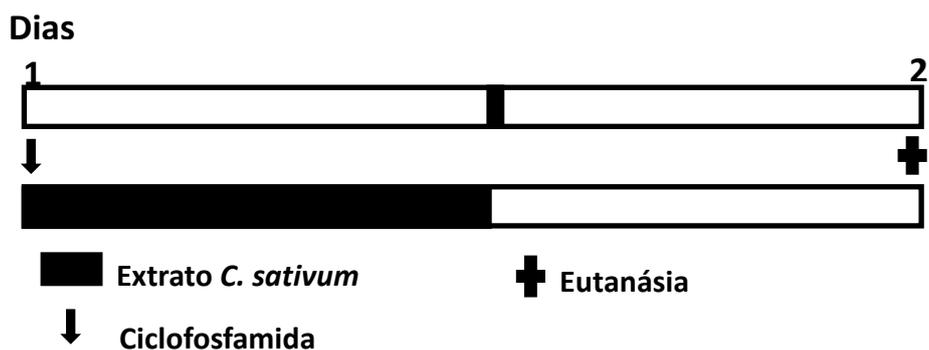
Após serem divididos aleatoriamente entre os grupos experimentais, foram acondicionados em caixas de polipropileno com grades de metal e maravalha. Os animais passaram por um período de aclimatação de 7 dias, no biotério de passagem antes do início dos experimentos, com livre acesso à ração comercial padrão e à água, sendo mantidos sob ciclos claro-escuro de 12h.

Os ensaios de antimutagenicidade foram realizados a partir da análise dos resultados de prospecção fitoquímica e de atividade antioxidante, portanto, foram estabelecidos os seguintes grupos experimentais: Adubação Química Estádio Vegetativo e Adubação Orgânica Estádio Vegetativo.

#### **4.6.2 Ensaio de micronúcleo em células de medula óssea de camundongo**

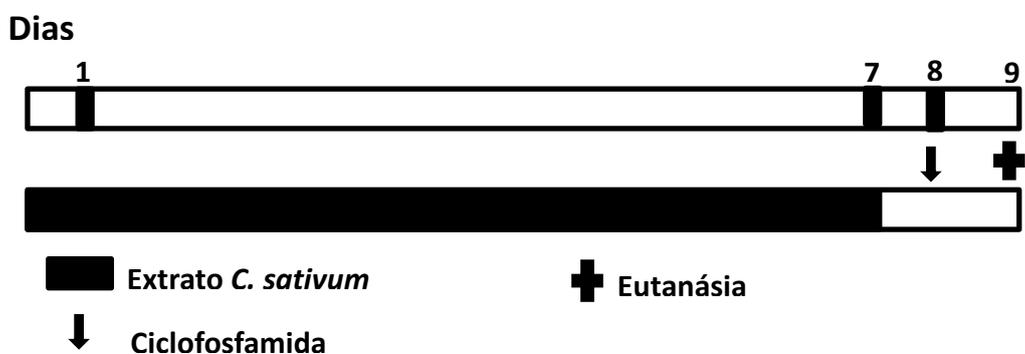
O teste de micronúcleo em medula óssea foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Krishna e Hayashi (2000). A avaliação do efeito antimutagênico dos extratos de *C. sativum* contra os danos induzidos pela Ciclofosfamida foi realizada de acordo com os protocolos de tratamento simultâneo e de pré-tratamento (RIBEIRO et al, 2003).

No tratamento simultâneo, as três concentrações testadas do extrato (50, 100 e 200 mg.kg<sup>-1</sup> m.c.) foram administradas em dose única, por gavagem e, em seguida, os camundongos receberam a ciclofosfamida, intraperitonealmente (100 mg.kg<sup>-1</sup> mc). Após 24 horas da administração dos extratos e da ciclofosfamida, foi realizada a eutanásia (Figura 4).



**Figura 4.** Esquema ilustrativo do protocolo do tratamento simultâneo.

No protocolo de pré-tratamento, os camundongos foram tratados, via gavagem, uma vez ao dia, sempre no mesmo horário, durante 07 dias consecutivos, com extrato de coentro nas três concentrações testadas (50, 100 e 200 mg.kg<sup>-1</sup> mc). No 8º dia de tratamento, os animais receberam o mutágeno ciclofosfamida, i.p. (100 mg.kg<sup>-1</sup> mc) e 24 horas após esta aplicação foi realizada a eutanásia, por deslocamento cervical (Figura 5).



**Figura 5.** Esquema ilustrativo do protocolo de pré – tratamento.

Para cada grupo experimental foram utilizados seis camundongos Swiss, aos quais foram administrados volumes proporcionais de extrato à massa corpórea de cada animal. No grupo experimental Controle Negativo, os camundongos receberam uma única dose de solução salina NaCl 0,9% (via gavagem), os quais foram eutanasiados 24 horas após esta aplicação. Os animais do grupo experimental Controle Positivo receberam a ciclofosfamida, em dose única, na concentração de 100 mg.Kg<sup>-1</sup> mc e 24 horas depois da

aplicação foi realizada a eutanásia. O quadro 1, ilustra todos os tratamentos considerando o Pré-Tratamento e Tratamento Simultâneo.

Posterior à eutanásia, foram retiradas amostras da medula óssea dos fêmures de cada animal, injetando-se 0,5 mL de soro fetal bovino com auxílio de uma seringa e centrifugando-se por 10 minutos, a 1000 rpm. O sobrenatante foi descartado e o material foi submetido, novamente, à centrifugação por 10 minutos, a 1000 rpm. Pelo método de esfregaço, confeccionaram-se 2 lâminas para cada animal, fixadas em álcool metílico por 10 minutos e coradas com Leishman eosina-azul de metileno.

**Quadro 1.** Grupos Experimentais utilizados no Pré-tratamento e no Tratamento Simultâneo.

Teste	Adubação	Estádio	Dose	N	Sexo
Pré- Tratamento Ou Tratamento Simultâneo	Químico	Vegetativo	50 mg.Kg <sup>-1</sup> EBH	6	♂
			100 mg.Kg <sup>-1</sup> EBH	6	♂
			200 mg.Kg <sup>-1</sup> EBH	6	♂
	Orgânico	Vegetativo	50 mg.Kg <sup>-1</sup> EBH	6	♂
			100 mg.Kg <sup>-1</sup> EBH	6	♂
			200 mg.Kg <sup>-1</sup> EBH	6	♂
Controle Positivo	--	--	Ciclofosfamida 100 mg.Kg <sup>-1</sup>	6	♂
Controle Negativo	--	--	Solução salina 0,9%	6	♂

♂ = macho. EBH - extrato hidroalcoólico de coentro

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico com aumento de 1000 vezes, sendo contabilizados 2000 eritrócitos policromáticos (EPC) por animal, considerando-se os eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMNs). A análise de citotoxicidade foi determinada pela relação entre EPC e eritrócitos normocromáticos (ENC) pela razão EPC/EPC+ENC, em um total de 200 células contadas por lâmina.

A porcentagem de redução de danos (diminuição da frequência média de células micronucleadas) nas diferentes concentrações e protocolos, foi

calculada de acordo com Manoharan e Banerjee (1985) e Waters et al. (1990), usando a fórmula:

$$(\%) \text{ Redução} = \frac{\text{frequência de EPCMNs em A} - \text{frequência de EPCMNs em B}}{\text{frequência de EPCMNs em A} - \text{frequência de EPCMNs em C}} \times 100$$

onde “A” é o grupo de células tratadas com ciclofosfamida (controle positivo); “B” é o grupo de células tratadas com o extrato de *C. sativum* e “C” é o grupo controle negativo (NaCl 0,9%).

#### **4.7.4 Análises Estatísticas**

Os dados foram avaliados pela análise de variância e o teste de normalidade. Para a análise estatística foi empregado o Teste de Kruskal Wallis, com significância de 5%. Todos os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do software Assistat 7.6 beta.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Análise Química de Solo

De acordo com a análise química dos solos (Tabela 1, Anexo A) foi verificado que todos os tratamentos apresentaram altos valores para quase todos nutrientes avaliados (P, K, Ca, Mg, MO), e valores variando de médio a alto para os demais (Mg e Al) quando comparado aos valores de referência. A acidez registrada também variou de média a elevada.

**Tabela 1:** Resultado da análise química dos solos coletados nos campos de cultivo de *Coriandrum sativum* utilizadas neste estudo. (Fonte: Laboratório FULLIN)

Parâmetro analisado	Campo Coentro Organico Vegetativo	Campo Coentro Químico Vegetativo	Campo Coentro Orgânico Floração	Campo Coentro Químico Floração	Valor referência (FULLIN) Classificação Média
Fósforo-Mehlich mg/dm <sup>3</sup>	104	60	73	150	30 a 60
Potássio mg/dm <sup>3</sup>	440	190	280	440	80 a 200
Cálcio cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>	7,0	4,0	4,0	8,8	1,5 a 4,0
Magnésio cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>	1,7	0,6	0,6	0,8	0,6 a 1,0
Alumínio cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>	0,1	0,1	0,1	0,5	0,4 a 1,0
H+Al cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>	4,2	5,2	5,0	6,8	2,6 a 5,0
Matéria Orgânica (MO)dag/dm <sup>3</sup>	3,7	4,1	3,7	3,5	1,6 a 3,0
pH em água	5,6	5,6	5,6	5,0	Acidez Elevada ≤ 5,0

Nos campos de cultivo de coentro adubado quimicamente, tanto no estágio vegetativo quanto no estágio de floração, foram obtidos os valores mais elevados quanto aos nutrientes analisados. O maior índice de matéria orgânica, por outro lado, foi obtido no cultivo com adubação orgânica durante o estágio vegetativo, seguido pelo estágio de floração na mesma condição. Diferentemente do presente estudo, Pires e colaboradores (2003), observaram baixos teores de P, K, Ca, Zn e Cu e baixo pH ao avaliarem as principais unidades de solo do Espírito Santo, porém a análise não envolveu tipos de adubação.

O tipo e a disponibilidade de nutrientes no solo são fatores que podem interferir na produção de metabólitos secundários, tais como flavonoides, cumarinas e taninos (GOBBO-NETO & LOPES, 2007),

## 5.2 Prospecção Fitoquímica

Os resultados da prospecção fitoquímica do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. sativum* indicaram a presença de flavonoides, cumarinas e esteróides para todos os tratamentos (Tabela 2).

**Tabela 2.** Análise fitoquímica preliminar do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. sativum* submetidas à adubação química e orgânica.

Grupos Químicos	Tratamentos			
	CQ1	CO1	CQ2	CO2
Tanino	-	-	-	-
Cumarina	+	+	+	+
Saponina	-	-	-	-
Alcaloide	-	-	-	-
Esteróide	+	+	+	+
Triterpeno	-	-	-	-
Flavonoide	+	+	+	+
Naftoquinona	-	-	-	-

CQ1 - Coentro Químico Vegetativo; CO1 - Coentro Orgânico Vegetativo; CQ2 - Coentro Químico Floração; CO2 - Coentro Orgânico floração.

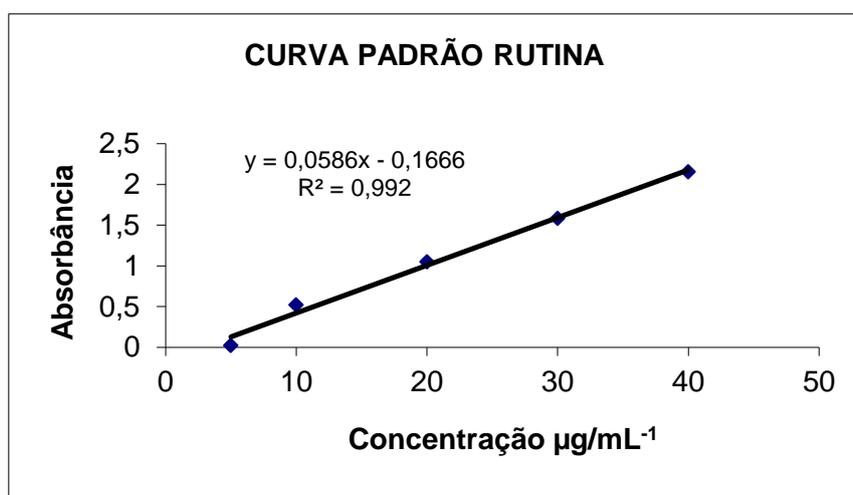
Estudos apontam que a produção dos metabólitos secundários, tais como flavonoides, cumarinas e taninos, pode ser influenciada pelo meio, principalmente em situações de falta ou excesso de algum fator de produção (FERRO, 2006; GOBBO-NETO & LOPES, 2007), porém no presente estudo, por meio da análise fitoquímica preliminar, não foram observadas diferenças na composição de *C. Sativum*, sob as diferentes condições de adubação aplicadas. Situação similar foi observada por Wong e Kitts (2006), em estudo

com hastes de coentro, no qual verificaram a presença de flavonoides e cumarinas, como predominantes em todos os tratamentos testados, sob diferentes regimes de irrigação. Também corroborando os resultados aqui expostos, Costa e colaboradores (2008), em estudos com *Cymbopogon citratus* (capim limão) submetida à adubação química e orgânica, observou que apesar de as plantas apresentarem produção diferenciada de biomassa, não tiveram o teor de seu óleo essencial alterado.

Por outro lado, Armijos (2014) relata, por meio de testes qualitativos e quantitativos, a presença de alguns compostos não observados em nosso estudo, tais como os taninos e pequenas concentrações de alcaloides (abaixo de  $1\mu\text{g.g}^{-1}$ ), para duas cultivares de *C. sativum* quando cultivadas em diferentes tipos de solo. Tais resultados podem ser justificados pelo fato de esses compostos se encontrarem em baixas concentrações na planta aqui avaliada e, por isso a fitoquímica preliminar não viabilizou a detecção de tais substâncias ou ainda, porque a condição testada não permitiu a produção das mesmas.

### 5.3 Quantificação de flavonoides

Os valores de absorbância das amostras do extrato EBH de *C. sativum* foram comparados com a curva de calibração de rutina  $0,5\text{ mg.mL}^{-1}$  (Figura 6).



**Figura 6:** Curva padrão construída com rutina ( $0,5\text{ mg.mL}^{-1}$ ) a  $420\text{ nm}$ .

Os resultados expostos na Tabela 3 demonstram que as concentrações de flavonoides dos extratos de coentro avaliados foram maiores naqueles produzidos a partir das plantas em estágio vegetativo, independentemente do tipo de adubação utilizada. E em relação à adubação, o maior valor de teor de flavonoide foi o observado para a condição de adubação orgânica. Para o estágio de desenvolvimento de floração, na condição de adubação orgânica foi observada a menor concentração de flavonoides ( $8,258 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), porém o coentro na condição de adubação química, para este mesmo estágio, apresentou uma diferença menor que  $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

**Tabela 3.** Concentração de flavonoides nos EBH de *C. sativum*

Tratamentos	Concentração de flavonoides ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Concentração percentual de flavonoides
<b>Extrato etanólico de coentro</b>		
Químico Vegetativo	9,828	6,14263
Orgânico Vegetativo	11,808	7,37984
Químico Floração;	8,344	5,21473
Orgânico Floração	8,258	5,16141

A partir das análises de solo, verificou-se que a adubação orgânica apresentou menor aporte em praticamente todos os nutrientes (Tabela 1, ANEXO A), sendo neste tratamento, observada a maior produção de flavonoides. Bortolo e colaboradores (2009) sugerem que condições de diminuição da disponibilidade de recursos pode promover o redirecionamento do carbono fixado da produção de metabólitos primários para a produção de metabólitos secundários como os flavonoides e outros compostos fenólicos, resultados que corroboram os do presente estudo.

Estudos realizados em outras espécies de plantas com fins medicinais como pimentas, visando correlacionar a influência dos nutrientes sobre a produção de metabólitos secundários mostram uma correlação positiva com a proporção carbono/nutrientes, ou seja, em solos pobres em nutrientes, paralelamente à menor taxa de crescimento, geralmente se verifica maior produção de metabólitos secundários, particularmente derivados fenólicos como flavonoides (GOBBO-NETO E LOPES, 2007).

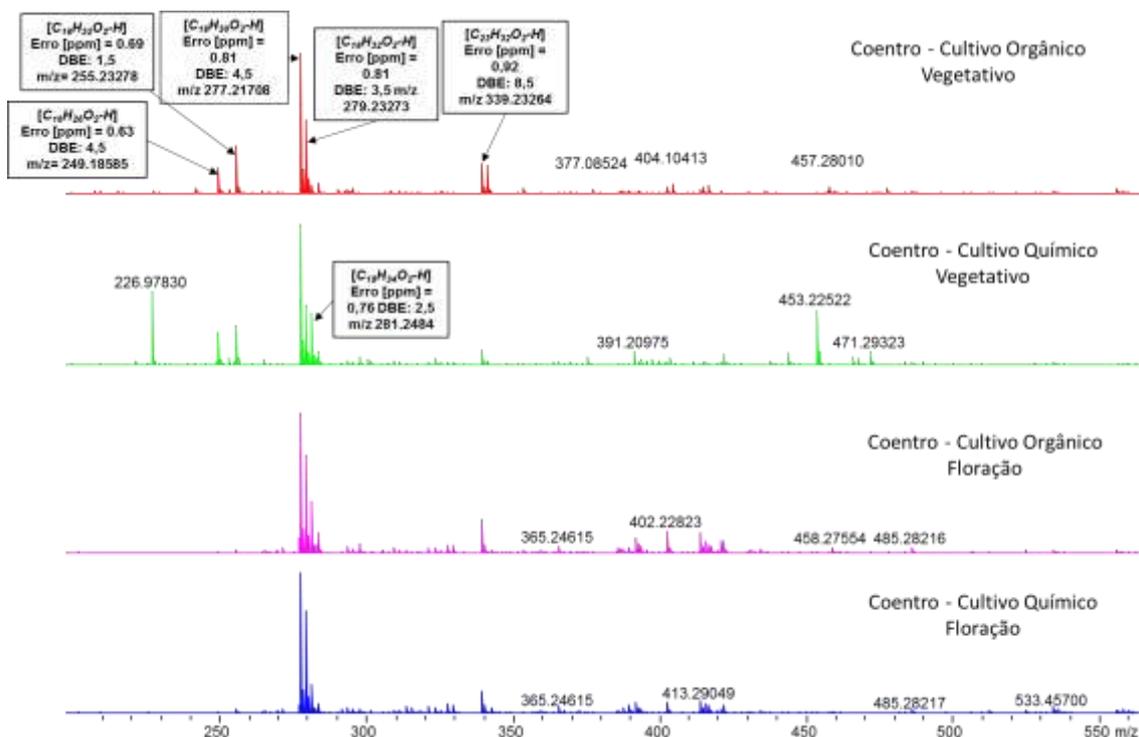
## 5.4 Espectrometria de Massas

A figura 7 apresenta os espectros de massas no modo ESI(-)FT-ICR MS dos extratos hidroalcoólicos de *C. sativum*, que foi cultivado sob adubação química e orgânica em diferentes estádios de desenvolvimento (vegetativo e floração). O resultado comum em todos os espectros de massas obtidos foram os sinais de  $m/z$  de 277,21708 e 339,23264.

Através do processamento dos espectros pelo o *software Data Analysis*, o sinal  $m/z$  de 277,21708 possui uma fórmula molecular  $C_{18}H_{30}O_2$  (erro de 0,81 ppm, DBE de 4 e  $m/z$  teórico de 277, 21730) e o sinal de  $m/z$  339,23264 forneceu a fórmula molecular  $C_{23}H_{32}O_2$ , (erro de 0,92 ppm, DBE de 8 e com  $m/z$  teórico de 339,23295), sem no entanto haver uma conclusão sobre quais são os compostos específicos. Os perfis dos espectros de massas entre os extratos do coentro no cultivo orgânico e químico, no estágio de floração mostram-se semelhantes quanto aos sinais majoritários e alguns minoritários visíveis, o que indica que há similaridade de componentes entre eles. Nascimento (2014) trabalhando com amostras de *Cannabis sativa* (maconha) apreendidas pela Polícia Civil do Estado do Espírito Santo, também identificou, por ESI( $\pm$ )-FT-ICR MS, sinais similares entre as amostras, permitindo a elaboração de um perfil químico.

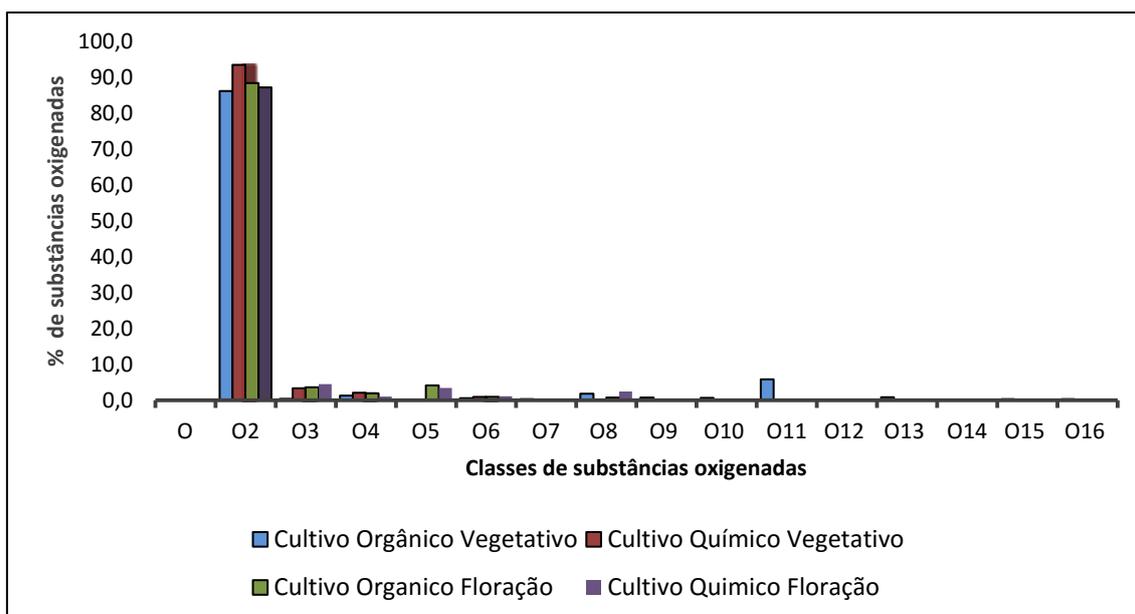
Com relação ao estágio vegetativo, os sinais de  $m/z$  249,18585 e 255,23278 foram detectados nos extratos, tanto para o tratamento da planta com adubação química quanto orgânica. O processamento dos espectros demonstrou que o sinal  $m/z$  de 249,18585 possui uma fórmula molecular  $C_{16}H_{26}O_2$  (erro de 0,63 ppm, DBE de 4 e  $m/z$  teórico 249,18600) e o sinal 255,23278 tem fórmula molecular  $C_{16}H_{32}O_2$  (erro de 0,81 ppm, DBE de 4 e  $m/z$  teórico 255,23295). O extrato do coentro cultivado nas condições de adubação química apresentou mais dois sinais visíveis distintos daquele cultivado com adubação orgânica. Fasciotti e colaboradores (2015) estudaram perfis químicos de *Swietenia macrophylla* (mogno brasileiro) e *Khaya ivorensis* (mogno africano) e também detectaram sinais distintos entre as espécies, destacando a

importância desta técnica para a comparação de amostras de interesse. Oliveira e colaboradores (2016) por sua vez, estudando quatro estádios de maturação da manga Ubá mostraram as variações no conteúdo de ácidos, açúcares e compostos fenólicos orgânicos por meio da técnica de ESI (-) FT-ICR MS.



**Figura 7-** Espectros de massas no modo ESI(-)FT-ICR MS dos extratos hidroalcoolicos do coentro submetido a adubação química e adubação orgânica em diferentes estádios de crescimento

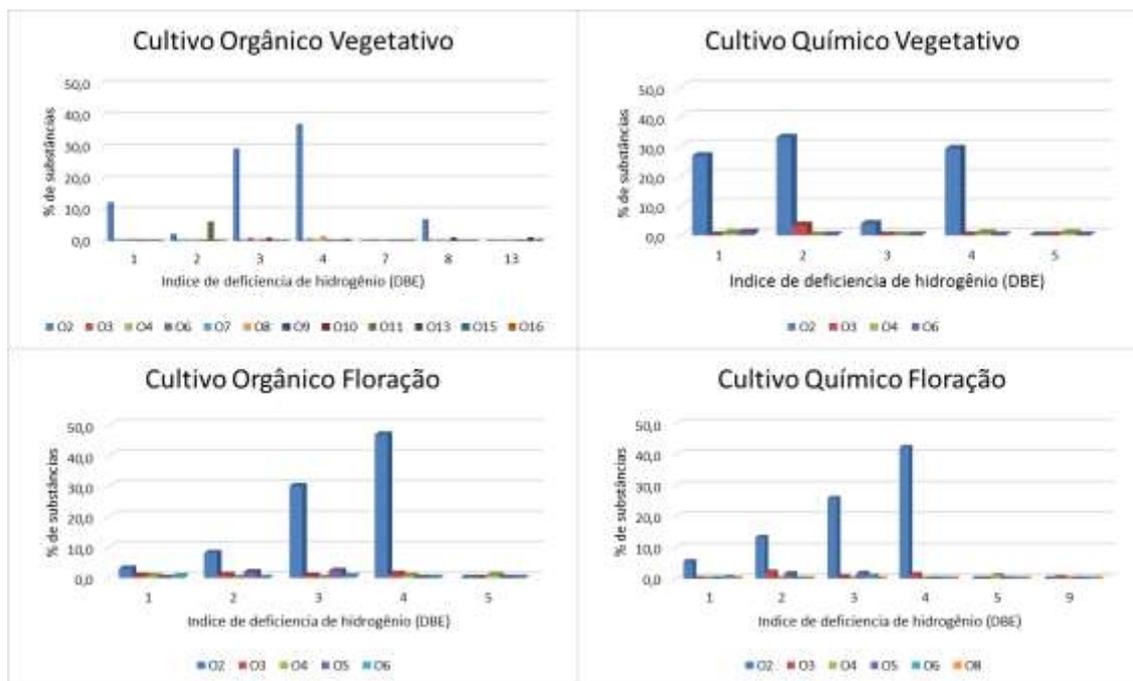
Uma característica importante em substâncias orgânicas de origem natural é a presença de heteroátomos, principalmente de Oxigênio ( $O_x$ ). Esse elemento pode conferir às moléculas orgânicas propriedades antioxidantes, polaridade, solubilidade dentre outras. A porcentagem relativa de  $O_x$  pode ser organizada de acordo com sua quantidade nas moléculas (Ferreira et al, 2011). Na figura 8 está representado, de forma hierárquica ( $O_1$  a  $O_{16}$ ), o perfil de distribuição de substâncias oxigenadas nos extratos hidroalcoólicos de coentro.



**Figura 8.** Perfil de distribuição de substâncias oxigenadas nos extratos hidroalcoólicos de *C. sativum*.

O índice de deficiência de hidrogênio (DBE) de uma molécula orgânica indica a presença de ligações duplas e/ou triplas, assim como sistemas cíclicos na sua estrutura. A figura 9 demonstra a porcentagem de distribuição do DBE nas moléculas encontradas no extrato hidroalcoólico de *C. sativum* e uma relação com a presença de moléculas oxigenadas. As espécies químicas com dois oxigênios apresentam DBE preferencialmente igual a 3, indicando que podem ser substâncias com ligações duplas e a presença de carbonila na sua estrutura. O DBE igual a 4 está relacionado ao anel aromático ligado a hidroxilas, o que é sugestivo de compostos fenólicos.

O extrato que diferiu dos demais quanto ao índice de deficiência de hidrogênio foi o do cultivo químico na fase vegetativa, pois possui DBE igual a 1 para compostos com 2 oxigênios na sua estrutura (Figura 8 e 9). Isso pode ser um indicativo da presença de ácido carboxílico.



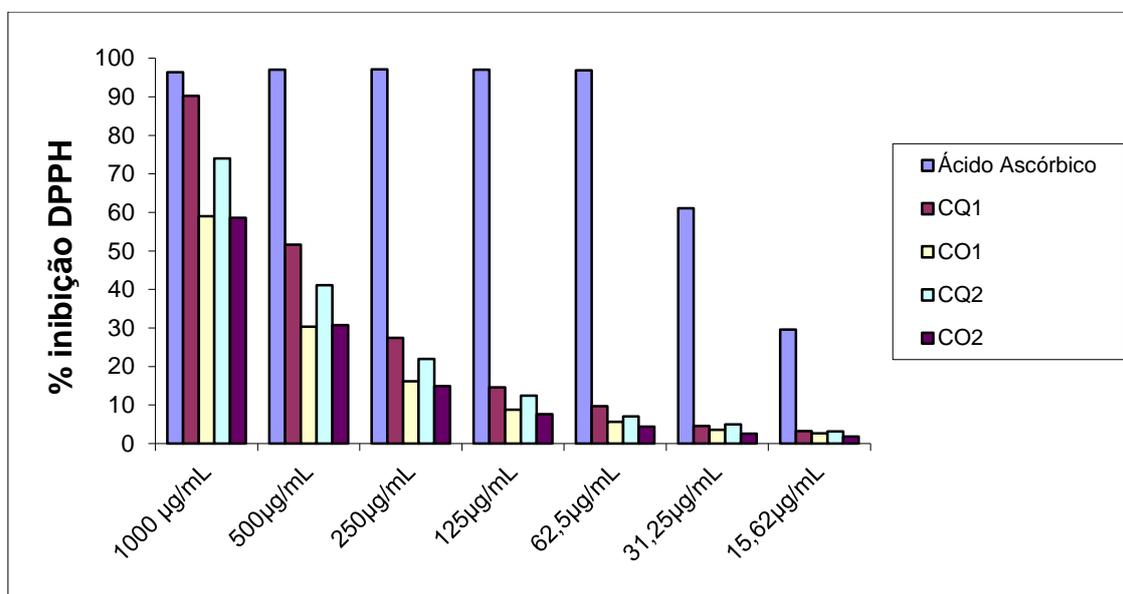
**Figura 9.** Correlação do Índice de Deficiência de Hidrogênio com as substâncias orgânicas oxigenadas nos extratos hidroalcoolicos do Coentro.

A presença de fenol e ligações duplas em moléculas orgânicas lhes dão propriedades biológicas diversas, sendo uma delas a característica antioxidante, estabilizando radicais livres formados nas células (PASSOS, 2013).

## 5.5 Ensaio Antioxidante

No presente estudo, as maiores porcentagens de inibição do radical DPPH foram obtidas para o coentro cultivado com adubação química, tanto no estágio vegetativo quanto no de floração, sendo que o extrato de *C. sativum* no estágio vegetativo e adubação química foi aquele que apresentou melhor capacidade antioxidante, chegando a atingir 90% de inibição do radical DPPH na concentração de  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Figura 10), com tendência à redução da capacidade antioxidante à medida que houve a redução da concentração do extrato. Quando considerada uma mesma condição de adubação, observou-se que a melhor capacidade antioxidante sempre foi obtida pelos extratos do estágio vegetativo.

Melo e colaboradores (2008) estudando 15 plantas diferentes do cerrado, afirmam que substâncias que apresentem resultados de atividade antioxidante superiores a 60% demonstram importante atuação no combate aos radicais livres, auxiliando na prevenção de doenças ateroscleróticas.



**Figura 10.** Gráfico do teste antioxidante DPPH para os Extratos hidroalcoólicos de *C. sativum*. CQ1 - Coentro Químico Vegetativo; CO1 - Coentro Orgânico Vegetativo; CQ2 - Coentro Químico Floração; CO2 - Coentro Orgânico floração.

Extratos aquosos e etéricos de *C. sativum* possuem capacidade antioxidante contra a oxidação lipídica (Melo et al, 2003), sendo esta ação atribuída aos seus compostos fenólicos e carotenoides (POKORNY, 1991).

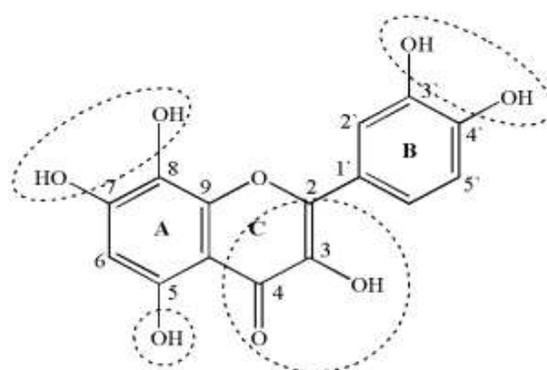
Os compostos fenólicos em plantas constituem uma importante classe de metabolitos secundários com potencial bioativo atribuído à atividade antioxidante e antibacteriana (WONG & KITTS 2006; KAUR et al 2009). Tais compostos são sugeridos como propulsores da ação antioxidante observada nos extratos de *C. Sativum* aqui testados.

Dentro deste grupo encontram-se os flavonoides, que comumente são sugeridos como responsáveis pela ação antioxidante de diversos extratos vegetais (AHERNE & O'BRIEN, 2002; KAUR et al, 2009). Entretanto, em nosso estudo tal relação direta não foi verificada, uma vez que a maior eliminação do radical DPPH observada (coentro químico vegetativo) não estava diretamente

relacionada àquele extrato detentor do maior conteúdo total de flavonoides (coentro orgânico vegetativo).

Wong e Kitts (2006) trabalhando com extratos metanólico e aquoso de folha e haste de *C. sativum*, também encontraram resultados semelhantes aos aqui apresentados, onde o extrato metanólico de haste obteve maior concentração de flavonoides, porém apresentou menor capacidade de inibição do radical hidrofóbico DPPH, quando comparado ao extrato aquoso de haste, no qual a concentração de fenólicos detectada foi menor. Esse fato pode ser justificado devido a estrutura química dos flavonoides encontrados em cada situação.

A atividade antioxidante de compostos fenólicos é atribuída às suas propriedades redutoras e estrutura química. A presença de um grupo catecol, formado por um anel benzênico ligado a duas hidroxilas, é relatada como importante para tal atividade antioxidante (HEIM, 2002; SANTOS, 2010). A estrutura comum de um flavonoide apresenta três anéis aromáticos A, B e C (Figura 11). Os anéis A e B contêm duas hidroxilas nas posições 7 e 8 e nas posições 3 e 4, respectivamente. Sendo o terceiro anel (C) composto por uma dupla ligação C2=C3 conjugada com a função cetona, responsável pelo deslocamento de elétrons do anel B e de duplas ligações com as hidroxilas nas posições 3 e 5, o que também confere atividade antioxidante ao flavonoide (HEIM et al., 2002; MICHALAK, 2006). Flavonoides que tenham a perda de grupos hidroxílicos apresentam atividade antioxidante reduzida (ARORA et al., 1999).



**Figura 11.** Estrutura do flavonoide com os grupos de maior relevância para captar os radicais livres. (Fonte: BARROS, 2012)

*Coriandrum sativum* (coentro) e *Petroselinum crispum* (salsa) também são relatados por Wong e Kitts (2006), como responsáveis por atividades antioxidantes, sendo a dieta suplementar com folhas de salsa capaz de aumentar a capacidade antioxidante no plasma de ratos e levar à diminuição do estresse oxidativo, em humanos. Mendes (2015) e colaboradores, trabalhando com misturas condimentares para formação de temperos, também relataram que coentro e a salsa possuem boa atividade antioxidante, em combinação com outros condimentos como alho e cebola, por meio do teste DPPH, com valores ultrapassando os 70% de inibição desse radical. Nesse mesmo estudo, os autores ainda verificaram que o coentro obteve performance antioxidante superior à salsa.

Um extrato que apresente uma boa ação antioxidante pode ajudar na performance das enzimas envolvidas no reparo de danos causados por substâncias, como a ciclofosfamida, uma vez que esta última forma aductos de DNA e seu reparo envolve a excisão de bases, por enzimas que podem ter a sua atividade melhorada em um ambiente com menor grau de oxidação.

## **5.6 Ensaio de Antimutagenicidade**

### **5.6.1 Tratamento Simultâneo**

Os melhores resultados antioxidantes foram encontrados para o EBH na condição vegetativa e, considerando que um bom antioxidante pode atuar como um bom agente antimutagênico, prosseguiu-se com os testes de antimutagenicidade e citotoxicidade com essas amostras.

O número dos eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMNs) e a relação entre eritrócitos policromáticos (EPC) e normocromáticos (ENC) observados no tratamento simultâneo foram organizados nas tabelas 4 e 5.

Sob as condições de tratamento simultâneo, com o extrato de coentro vegetativo orgânico não houve redução significativa da frequência de EPCMNs induzidos pela ciclofosfamida, quando comparado ao grupo controle positivo (Tabela 4). Com relação à citotoxicidade, a dose de 100 mg.Kg<sup>-1</sup> mostrou maior

efeito protetivo, porém quando comparada às demais doses estudadas não apresentou diferença significativa.

**Tabela 4:** Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMNs) e relação entre os eritrócitos policromáticos e normocromáticos (EPC/(EPC+ENC)) de camundongos durante tratamento simultâneo com extrato hidroalcoólico de *C. sativum*, cultivado sob adubação orgânica, estágio vegetativo.

Tratamento	EPCMNs	Redução (%)	(EPC/(EPC+ENC))
50 mg.kg <sup>-1</sup>	37.3333 b	21,53	0,2862 ab
100 mg.kg <sup>-1</sup>	31.9167 b	35,31	0,3358 b
200 mg.kg <sup>-1</sup>	30.9583 b	37,75	0,2233 ab
CP (ciclofosfamida)	45.7917 b	-	0,1354 a
CN (solução salina)	6.5000 a	-	0,5441 c

CP: controle positivo; CN: controle negativo. As diferentes letras nas colunas 2 e 4 indicam que os tratamentos foram estatisticamente diferentes. Teste Kruskal-Walis (P < 0,05).

Semelhante resultado foi encontrado para a condição de adubação química, quanto ao número EPCMNs e, com a redução dos valores da relação (EPC/(EPC+ENC)) sendo maior para a dose de 100 mg.kg<sup>-1</sup> (Tabela 5).

**Tabela 5:** Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMNs) e relação entre os eritrócitos policromáticos e normocromáticos (EPC/(EPC+ENC)) de camundongos durante tratamento simultâneo com extrato hidroalcoólico de *C. sativum* cultivado sob adubação química, estágio vegetativo.

Tratamento	EPCMNs	Redução (%)	(EPC/(EPC+ENC))
50 mg.kg <sup>-1</sup>	29.7500 b	43,29	0,2691 ab
100 mg.kg <sup>-1</sup>	32.6250 b	36,28	0,3325 b
200 mg.kg <sup>-1</sup>	36.1250 b	27,74	0,2467 ab
CP (ciclofosfamida)	47.5000 b	-	0,1325 a
CN (solução salina)	6.5000 a	-	0,5442 c

CP: controle positivo; CN: controle negativo. As diferentes letras nas colunas 2 e 4 indicam que os tratamentos foram estatisticamente diferentes. Teste Kruskal-Walis (P < 0,05).

Apesar de ser observada uma redução na presença de micronúcleos, essa proteção não foi suficiente para neutralizar completamente ou mesmo combater a inibição ou atraso na progressão do ciclo celular, em presença da

ciclofosfamida, que é um potente agente antineoplásico usado para o tratamento de tumores, mas com alta capacidade mutagênica quando utilizada em sistemas *in vivo*, tendo o aumento da frequência de micronúcleos, como uma de suas características (ANTUNES & ARAÚJO, 2000; EDELWEISS et al., 1995).

Quando as condições de adubação foram comparadas entre si, por meio do teste estatístico Mann Whitney, para a verificação pareada dos tratamentos orgânico e químico, não foi encontrada diferença estatística entre eles. O fator adubação, portanto, parece não interferir de forma significativa nos efeitos quimioprotetores dos extratos de *C. sativum*, testados no presente estudo, assim como foi observado com relação à composição química dos mesmos. Sousa (2013) também não encontrou diferenças quanto ao teor de flavonoides e óleo essencial de caules de *Baccharis genistelloides* (carqueja) submetidos a diferentes tipos de adubação orgânica, concluindo que os mesmos não influenciaram significativamente em sua composição. Palácio e colaboradores (2007) com o objetivo de avaliar a influência de fontes e doses de nitrogênio na produção de biomassa e teor de óleo essencial de *Baccharis trimera* (Less) em diferentes épocas de colheita, também não encontraram diferenças quanto ao rendimento da matéria seca e quanto ao teor de óleo essencial nas diferentes épocas de colheita. Simili e colaboradores (2008) trabalhando com *Sorghum bicolor* (sorgo cv. AG 2501C) verificaram que a composição química não alterou significativamente com as adubações nitrogenadas e potássicas, em razão da alta fertilidade do solo e da baixa precipitação pluviométrica, em função do solo e da época do experimento.

### 5.6.2 Pré-Tratamento

Sob as condições de pré-tratamento, o melhor efeito antimutagênico observado, para o extrato de coentro químico, foi o da dose de 100 mg.kg<sup>-1</sup>, com uma redução da frequência EPCMNs alcançando níveis comparados aos do controle negativo. Quanto à citotoxicidade, constatou-se que nenhuma das doses, testadas do extrato de *C. sativum* cultivado com adubo químico, diferiu estatisticamente do controle positivo. A maior dose (200 mg.kg<sup>-1</sup>) foi a que

mostrou maior redução dos níveis de citotoxicidade impostos pela ciclofosfamida, não diferindo estatisticamente das demais (Tabela 6).

**Tabela 6.** Ocorrência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMNs) e relação entre os eritrócitos policromáticos e normocromáticos (EPC/(EPC+ENC)) de camundongos tratados durante 7 dias com *Coriandrum sativum* adubado quimicamente, estágio vegetativo.

Tratamento	EPCMNs	Redução (%)	EPC/(EPC+ENC)
50 mg.kg <sup>-1</sup>	30.2917 b	44,98	0,2317 a
100 mg.kg <sup>-1</sup>	25.5417 ab	55,90	0,2867 a
200 mg.kg <sup>-1</sup>	38.5417 bc	25,86	0,3275 a
CP (ciclofosfamida)	51.6250 c	-	0,1367 a
CN (solução salina)	6.5000 a	-	0,5425 b

CP: controle positivo; CN: controle negativo. As diferentes letras nas colunas 2 e 4 indicam que os tratamentos foram estatisticamente diferentes. Teste Kruskal-Wallis (P < 0,05).

Para o coentro adubado organicamente, observou-se comportamento semelhante ao do extrato de coentro adubado quimicamente. Neste último, as duas menores doses apresentaram melhor potencial antimutagênico, uma vez que houve redução do número de EPCMNs, quando comparado ao controle positivo. Apesar de não significativo, houve uma tendência ao decréscimo da citotoxicidade, com o aumento da dose (Tabela 7).

**Tabela 7.** Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMNs) e relação entre os eritrócitos policromáticos e normocromáticos (EPC/(EPC+ENC)) de camundongos tratados durante 7 dias com extrato hidroalcoólico de *C. sativum* adubado organicamente, estágio vegetativo..

Tratamento	EPCMNs	Redução (%)	(EPC/(EPC+ENC))
50 mg.kg <sup>-1</sup>	26.9167 b	52,00	0,2700 ab
100 mg.kg <sup>-1</sup>	29.5417 b	44,79	0,2862 b
200 mg.kg <sup>-1</sup>	39.8750 bc	22,77	0,3417 bc
CP (ciclofosfamida)	49.6667 c	-	0,0858 a
CN (solução salina)	6.5000 a	-	0,5412 c

CP: controle positivo; CN: controle negativo. As diferentes letras nas colunas 2 e 4 indicam que os tratamentos foram estatisticamente diferentes. Teste Kruskal-Wallis (P < 0,05).

Considerando uma análise global dos ensaios de antimutagenicidade, foi observada maior redução de EPCMNs na condição de pré-tratamento em relação ao tratamento simultâneo, porém, mesmo o extrato tendo sido administrado durante sete dias, este tempo não foi suficiente para exibir efeitos estatisticamente diferentes entre as doses. Uma sugestão é que o extrato de *C. sativum*, por meio da sua atividade antioxidante, ao entrar na célula, propicie um ambiente estável, o que acaba contribuindo para a redução de danos ao material genético, que é refletido na redução do número de micronúcleos nos camundongos tratados com o mutágeno ciclofosfamida.

Cortés e colaboradores (2004), também verificaram uma ação antimutagênica do extrato aquoso de folhas de *C. sativum*, em até 80%, sobre danos induzidos por aminas aromáticas em hepatócitos *in vitro*, por meio do teste de reversão de Ames, demonstrando assim que o coentro pode atuar como quimiprotetor, mesmo frente a outros mutágenos.

Durante os tratamentos quimioterápicos é observada depleção de antioxidantes celulares aumentando a produção de EROs. Assim, a presença de compostos fenólicos com capacidade antioxidante pode aumentar a eficiência da quimioterapia pela redução da citotoxicidade atuando não somente com suas propriedades antioxidantes, como também pela inibição da DNA-topoisomerase ou tirosina sintase (CONKLIN, 2000).

Apesar de alguns estudos sugerirem que uma dieta rica em compostos fenólicos exibe propriedades pró-oxidantes e citotóxicas, sob certas condições (SUMMERS & FELTON, 1994; YAMANAKA et al., 1997; SUGIHARA et al., 1999), por outro lado, outros estudos sugerem que compostos fenólicos também apresentam efeitos biológicos positivos em dietas, estando nesses casos relacionados com a atividade anti-carcinogênica, anti-microbiana e anti-inflamatória (HERRERO; IBANEZ; CIFUENTES, 2005) sendo indicados para o tratamento e prevenção do câncer, doenças cardiovasculares e inflamatórias *in natura* (KULDVEE et al., 2003). Considerando que doenças crônicas tais como câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas são associadas com a exposição diária aos mutágenos, um condimento que atue como um potencial antimutagênico, além de temperar a comida, constitui-se como um potente agente na prevenção destas doenças.

O conteúdo destes compostos fenólicos nos vegetais pode ser influenciado pelo tipo de adubação, seja quantitativamente ou qualitativamente, como relatado em estudo com Erva-Mate, em que foi verificado um aumento nos níveis de substâncias fenólicas decorrente do aumento da concentração de alumínio, em cultivo hidropônico (BENEDETTI, et al, 2012). Entretanto, em *Cymbopogon citratus* (capim limão) submetido às adubações química e orgânica não se observou nenhuma alteração no teor de compostos fenólicos (COSTA et al, 2008). Para a *Achyrocline satureioides* (marcela), observou-se que os teores dos princípios ativos contido nas inflorescências das plantas submetidas a diferentes fontes de adubação foram bastante próximos da testemunha sem adubação (LEITE et al, 2009).

A partir dos resultados aqui apresentados é possível inferir que todos os tratamentos, seja na condição de ensaio simultâneo ou de pré-tratamento, apresentaram redução de micronúcleos quando comparados ao grupo controle positivo (Ciclofosfamida), sendo que não foi verificada alterações nas composições de acordo com o fator adubação.

## 6 CONCLUSÕES

- ✓ Não houve diferença na composição dos extratos, pela fitoquímica preliminar, sendo que na análise por espectrofotometria de massas, foi observado que o extrato de coentro vegetativo químico diferiu em apenas dois picos moleculares dos demais.
- ✓ A análise fitoquímica preliminar indicou a presença de cumarinas, flavonoides e esteroides em todos os extratos obtidos;
- ✓ O extrato de coentro vegetativo com adubação orgânica apresentou os maiores teores de flavonoides quando comparado aos demais extratos estudados
- ✓ Os resultados de DBE (igual a 4) e presença predominante de 2 oxigênios apontam para os compostos fenólicos como principais compostos que podem ser sugeridos pela atividade antioxidante dos extratos.
- ✓ O coentro no estágio vegetativo apresentou melhor atividade antioxidante em comparação ao coentro no estágio de floração.
- ✓ Quanto à condição de adubação, o extrato de coentro adubado quimicamente mostrou melhor performance antioxidante quando comparado aos demais.
- ✓ Quanto ao ensaio de micronúcleo, todos os tratamentos, seja na condição de ensaio simultâneo ou de pré-tratamento, apresentaram redução de micronúcleos quando comparados ao grupo controle positivo (Ciclofosfamida). Esta observação sugere o consumo de *C. sativum* como potente alimento na prevenção de danos ao material genético
- ✓ A adubação não influenciou diretamente no poder antimutagênico do extrato hidroalcolico de coentro, uma vez que tanto o coentro cultivado organicamente quanto o coentro cultivado quimicamente mostraram comportamentos semelhantes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, B.H. Conventional and modern propagation techniques in *Piper nigrum*. **Journal of Medicinal Plants Research**. v.4, p.7-12, 2010.

AHERNE, S.A.; O'BRIEN, N.M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and, metabolism. **Nutrition Journal**. New York: v. 18, p. 75-81, 2002.

AHMED, J; SHIVHARE, US; SINGH, P. Colour kinetics and rheology of coriander leaf puree and Storage characteristics of paste. **Food Chemistry**. V. 84, p. 605-611, 2003.

AIRC - AMERICAN INSTITUTE OF CANCER RESEARCH. Disponível em <<http://airc.org/>>. Acesso em 18 de dezembro de 2014.

ALMEIDA, J. R. G. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CABRAL, A. G. S.; AGRA, M. DE F.; DA CUNHA, E. V. L.; DA SILVA, M. S.; DO NASCIMENTO, S. C.; BRAZ-FILHO, R. Newborn HLA-DR,DQ genotype screening: age- and ethnicity-specific type 1 diabetes risk estimates. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. V. 6, p.136-144, 2005.

ALONSO, J. Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos. 1a. ed. Rosário: Corpus, 1350p. 2004.

AMES, BN; GOLD, LS. The Causes and Prevention of Cancer: Gaining Perspective. **Environmental Health Perspectives**. v.105, p.865-873, 1997

ANILAKUMAR, KR; NAGARAJ, NS; SANTHANAM, K. Effect of coriander seeds on hexachlorocyclohexane induced lipid peroxidation in rat liver. **Nutrition Research**. v. 21, p. 1455-1462, 2001.

ANTUNES, LMG; ARAÚJO, MCP. Mutagenicidade e antimutade e antimutagenicidade dos principais corantes para alimentos. **Revista Nutrição, Campinas**. v 13, p.81-88, 2000

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopeia Brasileira, volume 1. 5ª Ed. Brasília, 2010.

ARORA, A.; NAIR, M. G.; STRASBURG, G.M.; Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. **Free Radical Biol Med**, v 24 p. 1355-63, 1998.

ARMIJOS, FRY. Evaluación del contenido de alcaloides, taninos, flavonoides y aceites esenciales de dos variedades de culantro (*Coriandrum sativum* L.) cultivadas en dos tipos de suelos. Dissertação (Mestrado) da Universidad Académica de Ciencias Químicas y de la salud- bioquímica y farmacia. 128p, 2014.

BACH, JF; STROM, TB. Ed. The Mode of Action of Immunossuppressive Agents, 2ªed., Elsevier Amsterdam, 1986.

BARBOSA, CC; SILVA, FD; SANTOS, AM; VAZ,MRF; NÓBREGA, FFF. Aspectos gerais e propriedades farmacológicas do gênero erythroxyllum. **Revista saúde e ciência**. v. 3, p. 207 a 216, 2014.

BARROS, MCTC. Preparação de novos derivados flavonóides com potencial atividade biológica. Dissertação do Mestrado em Química Farmacêutica Industrial. Universidade de Coimbra, 2012.

BENEDETTI, EL. Tolerância da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) ao alumínio. Tese programa de pós-graduação em solos e nutrição de plantas da Universidade Federal de Viçosa, MG. 82p, 2012

BIASII, LA; MACHADOII, EM; KOWALSKI, APJ; SIGNORII, D; ALVESII, MA; LIMAI, FI; DESCHAMPSI, C; CÔCCOIII, LC; SCHEERIII, AP. Adubação orgânica na produção, rendimento e composição do óleo essencial da alfavaca quimiotipo eugenol. **Revista Brasileira de Horticultura** v.27, p. 35-39, 2009.

**Bioorganic & Medicinal Chemistry**. V. 17, P. 3229-56 2009.

BIRCH, A.E. et al. Antioxidant properties of evening primrose seed extracts **Jornal Agricultural Food Chemistry**. v.49, p. 4502-4507, 2001.

BORTOLO, DPG; MARQUES, PAA; PACHECO, AC. Teor e rendimento de flavonóides em calêndula (*Calendula officinalis* L.) cultivada com diferentes

lâminas de irrigação. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.11, p.435-441, 2009.

BRAGAGNOLO, N; DANIELSEN, B; SKIBSTED, LH. Rosemary as antioxidant in pressure processed chicken during subsequent cooking as evaluated by electron spin resonance spectroscopy. **Innovative Food Science Emerging Technologies, Amsterdam**, v. 8, p. 24-29, 2007.

BRASIL. 2006. Ministério da saúde. Portaria nº 648, de 28 de março de 2006. Aprova a política nacional de atenção básica, estabelecendo a revisão de diretrizes e normas para a organização da atenção básica para o programa saúde da família (psf) e o programa agentes comunitários de saúde (pacs). *Diário oficial da união [da república federativa do Brasil]* Brasília, seção 1, n. 61, 2006, p. 71.

BURNS, J; GARDNER, PT; MATTHEWS, D; DUTHIE, GG; LEAN, J; CROZIER, A. Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.49, p. 5797-5808, 2001.

CAMEJO-RODRIGUES, J. S., ASCENSÃO, L., BONE, T. M. À. E VALLÉS, J. An ethnobotanical study of medicinal and aromatic plants in the Natural Park of Serra de S.Mamede (Portugal). **Journal Of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 199-209, 2003.

CARVALHO, M. G.; VELANDIA, J. R.; DE OLIVEIRA, M. C. C.; ECHEVARRIA, A.; BRAZ-FILHO, R.; GRYNBERG, N. Recent Progress in Medicinal Plants. **Phytochemistry & Pharmacology**. V 78, p. 431-441, 2002.

CERVATO, C.; CARABELLI, M.; GERVASIO, S.; CITTERA, A.; CAZZOLA, R.; CESTARO, B. Antioxidant properties of oregano [*Origanum vulgare*] leaf extracts. **Journal of Food Biochemistry**, v.24, p.453-65, 2000.

CHAVES, FCM. Produção de biomassa, rendimento e composição de óleo essencial de alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum* L.) em função da adubação orgânica e épocas de corte. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,

Faculdade de Ciências Agrônômicas, 144p, 2002. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/103304>>

CHITHRA, V; LEELAMMA, S. *Coriandrum sativum* – effect on lipid metabolism in 1, 2-dimethyl hydrazine induced colon cancer. **Jornal Ethnopharmacology**. V.71, p. 457–463, 2000.

CHOY, W. N. Regulatory genetic toxicology tests. **Genetic toxicology and cancer risk assessment**. (Choy, W. N.ed.), New York: Marcel Dekker, p. 93-113, 2001.

CONKLIN, K. A. Dietary antioxidants during cancer chemotherapy: impact on chemotherapeutic effectiveness and development of side effects. **Nutrition and Cancer**, v 37, p 1-18, 2000.

CORTÉS-ESLAVA, J; GÓMEZ-ARROYO, S; VILLALOBOS-PIETRINI,R; ESPINOSA-AGUIRRE, J . Antimutagenicity of coriander (*Coriandrum sativum*) juice on the mutagenesis produced by plant metabolites of aromatic amines. **Revista Toxicology Letters**. Volume 153, p. 283–292, 2004.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste-Gulbenkian, 1982.

COSTA, H.B.; SOUZA, L.M.; SOPRANI, L.C.; OLIVEIRA, B.G.; OGAWA, E.M.; KORRES, A.M.N.; VENTURA, J.A. Monitoring the physicochemical degradation of coconut water using ESI-FT-ICR MS. **Food Chemistry**, V. 174, P. 139-146. 2015.

COSTA, S. M. O.; LEMOS, T. L. G.; PESSOA, O. D. L.; PESSOA, C.; MONTENEGRO, R. C.; BRAZ-FILHO, R.. Chemical Constituents from *Lippia sidoides* and Cytotoxic Activity. **Jornal of Natural Products**. V.64 p. 792–795. 2001.

COSTA, LCB; ROSAL, LF; PINTO, JEBP; BERTOLUCCI, SKV. Efeito da adubação química e orgânica na produção de biomassa e óleo essencial em capim-limão [*Cymbopogon citratus*]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.10, p.16-20, 2008.

CRAGG, GM; BOYD, MR; KHANNA, R; MAYS,TD; MAZAN, KD; NEWMAN, DJ; SAUSVILLE, EA. A International collaboration in drug Discovery and developmente: the NC1 experience. Pure and Apllied Chemistry. V.71, p. 1619-1633, 1999 *apud* Carollo, CA. Análise fitoquímica e avaliação dos efeitos dos tipos de adubação, da radiação solar e do estresse hídrico, no acúmulo de metabólitos secundários em espécies do gênero *Mikania*. Tese de Doutorado Faculdade de Ciencias farmacêuticas. Ribeirão Preto, P.228. 2008.

DELAQUIS, PJ; STANICH, K; GIRARD, B; MAZZA, G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **International Journal of Food Microbiology**. V. 74, p. 101–109, 2002.

DELARMELINA, JM; BATITUCCI, MCPE; GONÇALVES, JLO. Efeitos citotóxico, genotóxico e mutagênico da tintura de *Matricaria chamomilla* L. *in vivo*. **Revista Cubana de Plantas Medicinai**s v 17, 2012

DESTEFANI, C.A.; MOTTA, L.C.; VANINI, G.; SOUZA, L.M.; FILHO, J.F.A; MACRINO, C.J.; SILVA, E.M.; GRECO, S.J.; ENDRINGER, D.C.; ROMÃO, W. Europium–organic complex as luminescent marker for the visual identification of gunshot residue and characterization by electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry. **Microchem. J.** v 116, p. 216-224, 2014.

DINIZ, MER. Uso da técnica de espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) para o estudo do mecanismo de reações orgânicas e avaliação do perfil de fragmentação de bis-hidroxiiminas aromáticas. Dissertação de Mestrado, Belo Horizonte, 2011.

DOLL, R.; PETTO, R.; The Causes of Cancer: Quantitative Estimates of Avoidable Risks of Cancer in the United States Today. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 66, p. 1192-1308, 1981.

DUARTE, MCT. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista MultiCiência**, 2006.

DUARTE-ALMEIDA, JM; SANTOS, RJ, GENOVESE, MI; LAJOLO, FM. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido

linoléico e método de seqüestro de radicais dpsh. **Food Science and Technology**. v. 26, p. 446-452, 2006.

DZUBAK, P.; HAJDUCH, M.; VYDRA, D.; HUSTOVA, A.; KVASNICA, M.; BIEDERMANN, D.; MARKOVA, L.; URBAN, M.; SARCK. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. **Natural Product Reports**. V. 23, p. 394-411, 2006.

EBADOLLAHI, A. Plant Essential Oils from Apiaceae Family as Alternatives to Conventional Insecticides.- *Ecologia balkanica*, 2013.

EDELWEISS, MI; SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G. Clastogenic effect of cisplatin on Wistar rat bone marrow cells. **Brazilian Journal Of Medical and Biological Research**. v.28, p.679-683, 1995.

EMBRAPA-CNPS. Documentos ; 3. Manual de métodos de análises químicas para avaliação da fertilidade do solo / Silva FC et al. Rio de Janeiro : EMBRAPACNPS, 56p, 1998.

FASCIOTTI, M; ALBERICI, RM; CABRAL, EC; CUNHA, VS; SILVA, RM; DAROD A, RJ; EBERLIN, MN. Wood chemotaxonomy *via* ESI-MS profiles of phytochemical markers: the challenging case of African *versus* Brazilian mahogany woods, **Analytical Methods**, v. 7, p.8576-8583, 2015.

FERREIRA, A.L.A. CORREA, C.R., FREIRE, C.M., MOREIRA, P.L., BERCHIERIRONCHI, C.B., REIS, R.A., et al. Síndrome metabólica: atualização de critérios diagnósticos e impacto do estresse oxidativo na patogênese. **Revista Sociedade Brasileira Clínica Médica**. v.9, p.54-61, 2011.

FERREYRA, R.M.; VINÃ, S.Z.; MUGRIDGE, A.; CHAVES, A.R. Growth and ripening season effects on antioxidant capacity of strawberry cultivar Selva. **Scientia Horticulturae**. v.112, p.27-32, 2007.

FERRO, D. Fitoterapia: conceitos clínicos. Editora Atheneu. São Paulo, 473 p, 2006.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo Manual de Olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Ed.Viçosa, 402 p, 2000.

FLORA, S.; FERGUSON, L.R. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. **Mutation Research**. v. 591, p. 8-15, 2005

FORMAGIO, ASN.; KASSUYA,CAL.; NETO, FF.; VOLOBUFF, CRF.; IRIGUCHI, EKK; VIEIRA, MC.; FOGLIO, MA. The flavonoid content and antiproliferative, hypoglycaemic, anti-inflammatory and free radical scavenging activities of *Annona dioica* St. Hill. **Biomed Central**. V 13, 2013.

FRANCY – GUILFORD. J; PEZZUTO, J.M. Mechanisms of cancer chemopreventive agents: a perspective. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.74, p. 1644-1650, 2008.

GOBBO-NETO, L; LOPES, NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**. V 30, p. 374-381, 2007.

GOBBO-NETO, L; LOPES, NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**. V. 30, 2007

GONTIJO, D.C.\*; FIETTO, L.C.; LEITE, J.P.V. Avaliação fitoquímica e atividade antioxidante, antimutagênica e toxicológica do extrato aquoso das folhas de *Ocimum gratissimum* L. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**. v.16, p. 874-880, 2014

GOUVEA, D. R. et al. Seasonal variation of the major secondary metabolites present in the extract of *Eremanthus mattogrossensis* Less (Asteraceae: *Vernonieae*) leaves. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, p. 2139-2145, 2012.

GRANGEIRO, LC; NEGREIROS, MZ; SANTOS, AP; COSTA, LM; SILVA, ARC; LUCENA, RM. Crescimento e produtividade de coentro e rabanete em função da época de estabelecimento do consórcio. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 32, p. 55-60, 2008

GRAY, AM; FLATT, PR. Insulin-secreting activity of the traditional antidiabetic plant *Viscum album* (mistletoe). **Jornal Endocrinology**. v. 160, p.409-14, 1999.

GUYTON, KZ; KYLE, AD; COGLIANO, VJ; EASTMOND, AD; JACKSON, M; KESHAVA, N; SANDY, MS; ZHANG, L; WATERS, MD; SMITH, MT. Improving prediction of chemical carcinogenicity by considering multiple mechanisms and applying toxicogenomic approaches. **Mutation Research**. V. 681,p. 230-240, 2008.

HADARUGA NG; HADARUGA DI; LUPEA AX; PAUNESCU V, TC. Bioactive nanoparticles - 7. Essential oil from *Apiaceae* and *Pinaceae* family plants/beta-cyclodextrin supramolecular system. **Revista de Chimie** v.56, p. 876-882, 2005

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology and Therapeutics**. v. 96, p. 67-202, 2002.

HAYASHI, M; SOFUNI, T; ISHIDATE, M. An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test. **Mutation Research**. v. 120, p.241-247, 1983.

HEIM, E., K.; TAGLIAFERRO, R., A., BOBILYA, J., D.; Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships". **Journal of Nutritional Biochemistry**. V 13, p 572-584, 2002.

HERRERO , M; IBÁÑEZ, E; CIFUENTES, A. Analysis of natural antioxidants by capillary electromigration methods. *Journal of Separation Science*. V. 28, P. 883–897, 2005

HOFFMANN, I; GERLING, D; KYIOGWOM, UB; MANÉ-BIEL-FELDT, A. Farmers management strategies to maintain soil fertility in a remote area in northwest Nigeria, Agriculture. **Ecosystems and Environment**, v. 86, p. 263-275, 2001.

HOWES MJ,; PERRY, NS; HOUGHTON, PJ. Plants with traditional uses and activities, relevant to the management of Alzheimer's disease and other cognitive disorders. **Phytother Research**. v.17, p.1-18, 2003.

HU, C.-Q.; CHEM, K.; SHI, Q.; KILKUSKIE, R. E.; CHENG, Y.-C.; LEE, K.- H.; Anti-AIDS agents, 10. Acacetin-7-O-beta-D-galactopyranoside, an anti-HIV

principle from *Chrysanthemum morifolium* and a structure-activity correlation with some related flavonoids. **Journal of Natural Products**. V. 57 p. 42-51 1994.

ITO M, MURAKAMI K, YOSHINO M. Antioxidant action of eugenol compounds: role of metal ion in the inhibition of lipid peroxidation. **Food Chemistry Toxicology**. V. 43, p. 461-466, 2005.

JORGE, AO; JORGE, AD. Hepatotoxicity associated with the ingestion of *Centella asiatica*. **Revista Española de Enfermedades Digestivas**. v. 97, p. 115-24, 2005.

KAUR, K.; JAIN, M.; KAUR, T.; JAIN, R.; BIOORG. Antimalarials from nature.

KIMURA, Y; SUMIYOSHI, M; SAKANAKA, M. *In vitro* and *In vivo* Antiproliferative Effect of a Combination of Ultraviolet-A and Alkoxy Furocoumarins Isolated from Umbelliferae Medicinal Plants, in Melanoma Cells. **Photochemistry Photobiology**. v. 89, p. 1216-25, 2013

KLUMPP, A; Ansel, W; Fomin, A; Schnirring, S; Pickl, C. Influence of climatic condition the mutations in pollen mother cells of *Tradescantia* clone 4430 and implications for the Trad-MCN bioassay protocol. **Hereditas**. v. 141, p. 142-148, 2004.

KRISHNA, G., HAYASHI, M., *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research**. V 455, p. 155–166, 2000.

KUMAR, V.; MAHAJAN, A.; CHIBALE, K.; BIOORG. Synthetic medicinal chemistry of selected antimalarial natural products. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. V. 17 p. 2220-36, 2009.

LEE, K H; HAYASHI, N; OKANO, M; HIAL, IH; WU, RY; MCPHAIL, AT; Antitumor agentes . Lasiodiplodin, a potente antileukemic macrolide from *Euphorbia splendens*. **Phytochemistry**. V 21, p. 1119-1121, 1982.

LEITE, C.M.B. et al. Avaliação de flavonoides e atividade antioxidante em *Achyrocline satureioides* cultivadas com adição de cama-de-frango e

fósforo. In: In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, v. 32. Fortaleza, Brasil, 2009.

LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. 1.Ed. São Paulo: Atheneu, 344p, 2008.

LIMA, MA; TEIXEIRA, LN; SOUSA, PB; SILVA, MJM; CARVALHO, LFM. Determinação de fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante da pimenta dedo-de-moça (*Capsicum baccatum* var. *pedulum*) comercializada na cidade de imperatriz –MA.VII CONNEP do Norte Nordeste, 2012

LIMA, MEP; CARNEIRO, ME; NASCIMENTO, AE; GRANGEIRO, TB; HOLANDA, M L; AMORIM, RCN; BENEVIDES, NMB. Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria cornea* and its effects on the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Food and Chemical Toxicology**. v 53, p. 6414-6419, 2005

LUIZA, EB. Tolerância da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) ao alumínio.

MACEDO, A.F.; OSHIWA, M.; GUARIDO, C.F. **Ocorrência do uso de plantas medicinais por moradores de um bairro do município de Marília-SP**. São Paulo-SP, 2007.

MACEDO, JM; SOUZA, LGP; VALENZUELA, VCT; OLIVEIRA, AB; CASTILHO, RO; JÁCOME, RLRP. Variação sazonal nos teores de flavonoides, taninos e atividade antioxidante de *Davilla rugosa* Poir. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, V. 34, 2013

MACGREGGOR, JT; CASCIANO, D; MULLER, L. Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. . **Mutation Research**, v.455, p. 3-20, 2000.

MADSEN, H. L., & BERTELSEN, G.. Spices as antioxidants. **Trends in Food Science and Technology**, 6, 271–277, 1995.

MAIA, S.S.S. Propagação, adubação orgânica e níveis de radiação nas características anatômicas e composição de óleo essencial em *Hyptis*

*suaveolens* (L.) Poit. (*Lamiaceae*). Tese (Doutorado - Área de concentração em Fitotecnia) - Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras. 105 p, 2006.

MAIA, S.S.S.; PINTO, J.E.B.P.; SILVA, F.N.; OLIVEIRA, C. de. Influência da adubação orgânica e mineral no cultivo do bamburral (*Hyptis suaveolens* (L.) Poit.) (*Lamiaceae*), Revista Brasileira de Ciências Agrária, v. 3, n. 4, p. 327-331, 2008.

MAGALHÃES, ACN. Análise quantitativa de crescimento. In: FERRI, MG. Fisiologia vegetal. 1.ed. São Paulo, EDUSP, p. 331-350, 1986.

MALAVOLTA, E; VITTI, GC; OLIVEIRA, SA. Avaliação do estado nutricional das plantas, princípios e aplicações. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa do Potássio e do Fósforo, 319p, 1997.

MANOHARAN, K.; BANERJEE, M. R.  $\beta$ -Carotene reduces sister chromatid exchange induced by chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture. **Cell Biology International Reports**. v. 9, p. 783-789, 1985.

MARCUSSI, F. Capacidade antioxidante e compostos bioativos em hortaliças analisadas em dois períodos de cultivo Araraquara. Dissertação de Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, SP, 2015.

MARTINS, AB.; CARVALHO, L.; SANTOS-BUELGA, A; FERNANDES, C.; ISABEL P.; BARREIRO, F.; FERREIRA, ICFR. - Extratos fenólicos de flores de *Rubus ulmifolius* Schott: caracterização química, microencapsulação e incorporação em iogurtes para benefícios antioxidantes. In Encontro de Jovens Investigadores do Instituto Politécnico de Bragança, 2013.

MARTINS, ER; CASTRO, DM; CASTELLANI, DC; DIAS, JE. Plantas medicinais. Viçosa: UFV: Imprensa universitária, 220p.1995.

MARTINS, MBG.; MARCONI, AP.; CAVALHEIRO, AJ.; RODRIGUES, SD. Caracterização anatômica e química da folha e do sistema radicular de *Hydrocotyle umbellata* (*Apiaceae*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.18, p. 2008.

MATIOLLI, LS. Avaliação da citotoxicidade e atividade antioxidante de plantas condimentares. Dissertação (mestrado) em Biociências. FCLAS- Universidade Estadual Paulista, SP 115p 2014.

MELO RA; MENEZES D; RESENDE LV; WANDERLEY JÚNIOR LJG; MELO PCT; SANTOS VF. Caracterização morfológica de genótipos de coentro. **Horticultura Brasileira**. V. 27, p. 371-376, 2009.

MELO RA; MENEZES D; RESENDE LV; WANDERLEY JÚNIOR LJG; MELO PCT; SANTOS VF. 2009. Caracterização morfológica de genótipos de coentro. **Horticultura Brasileira**, v. 2, p. 371-376, 2009.  
FASOYIRO, SB; ADEGOKE, GO; OBATOLU, VA. ASHAYE O<sup>1</sup> AND AROYEUN S.O. The antioxidant property of Aframomum danelli spice in oils. **The Journal of Food Technology in Africa**, V. 6, P. 135-137, 2001.

MELO, EA; MACIEL, MIS; LIMA, VLAG; NASCIMENTO, RJ. Capacidade antioxidante de frutas **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. vol.44, 2008

MENDES, GM; RODRIGUES-DAS-DORES, RG; CAMPIDELI, LC. Avaliação do teor de antioxidantes, flavonoides e compostos fenólicos em preparações condimentares. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. V.17 p. 297-304, 2015.

MOON, J; SHIBAMOTO, T. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry (ACS Publications)**, v.57, p.1655-1666, 2009.

MORSE, MA; STONER GD. Cancer chemoprevention: principles and prospects. **Carcinogenesis**., v.14, p.1737-1746, 1993.

MICHALAK, A.: Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress. **Polish Journal of Environmental Studies**. v. 15, p. 523-530, 2006.

NASCIMENTO, I.R.; COSTA, H.B.; SOUZA, L.M.; SOPRANI, L.C.; MERLO, B.B.; ROMÃO, W. Qualitative analysis of designer drugs by paper spray

ionisation mass spectrometry (PSI-MS). **Food Analytical Methods**. V 1, p. 1873- 1880. 2015,

NASCIMENTO, IR. Identificação Química em Nível Molecular de Amostras de Maconha por ESI-FT-ICR MS. Dissertação de mestrado. Universidade federal do espírito santo centro de ciências exatas programa de pós-graduação em química. 2014.

NASCIMENTO, W. M.; PEREIRA, R. S. Coentro: a hortaliça de mil e uma utilidades. **Horticultura Brasileira**. v. 23, 2005.

NEWALL, CA; ANDERSON, LA; PHILLIPSON, JD. Fitoterapia. Plantas medicinais. Guia para profissional da saúde, São Paulo: Premier, 296 p, 2002.

NOIPA, T. et al. New approach for evaluation of the antioxidant capacity based on scavenging DPPH free radical in micelle systems. **Food Research International**, v. 44, p. 798-806, 2011.

NOVAIS, H. M., SANTOS, I., MENDES, S. E PINTO-GOMES, C. Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrábida Natural Park. **Journal of Ethnopharmacology**, v 93, p. 183-195, 2004.

OLIVEIRA, BG; COSTA, HB; VENTURA, JÁ; KONDRATYUK, TP; BARROSO, MÊS. Chemical profile of mango (*Mangifera indica* L.) using electrospray ionisation mass spectrometry (ESI-MS). **Food Chemistry**. v. 204, p. 37–45, 2016.

PALÁCIO, CPAM; BIASI, LA ; NAKASHIMA, T; SERRAT, BM. Biomassa e óleo essencial de carqueja (*Baccharis trimera* (Less) DC.) sob influência de fontes e doses de nitrogênio **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s. v.9, n.3, p.58-63, 2007.

PASSOS, TS. Efeitos Quimioprotetivos do Flavonóide Hesperidina Contra Mutagenicidade Induzida Por Cisplatina em Medula Óssea de Camundongos. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia-UFES, Vitória, ES. 62p, 2015.

PATHAK, NL; KASTURE, SB; BHATT, BM; RATHOD, JD. Phytopharmacological Properties of *Coriander sativum* as a Potential Medicinal Tree: An Overview, 2011.

PINTO, CMF; PINTO, CLO; DONZELES, SML. *Pimenta capsicum*: propriedades químicas, nutricionais, farmacológicas e medicinais e seu potencial para o agronegócio. **Revista brasileira de agropecuaria sustentável**. v.3, p , 2013

PIRES, F.R.; CATEN, A.; MARTINS, A.G.; ESPOSTI, M.D.D. Levantamento da fertilidade nas principais unidades de mapeamento do Espírito Santo. **Revista Ciência Agronômica**, Ceará, v.34, n.2, p.115-23, 2003.

POKORNY, J. Natural antioxidants for food use. **Trends in Food Science and Technology**, v. 9, p. 223-227, 1991.

PORTO, FRC.; SILVA, JC. Etnobotânica, uso Medicinal Da Pimenta Malagueta (*Capsicum Frutescens* L.) pelos Horticultores e Consumidores da Horta Comunitária da Vila Poty, Teresina, Piauí, Brasil. **Revista FSA (Faculdade Santo Agostinho)**. V.9, p. 139-157, 2013.

PRAKASH, V. Leafy Spices. **CRC Press**, p: 31-32, 1990.

RABELLO-GAY, M.N. et al. The effects of age, sex and diet on the clastogenic action of cyclophosphamide in mouse bone marrow. **Mutation Research**. v. 3, p. 181-188, 1985.

RAHIMI, R. E ARDEKANI, S. R. M. Medicinal properties of *Foeniculum vulgare* Mill. in traditional Irian Medicine and Moderne Phytotherapy. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, v.19, p. 73-79, 2013.

RAMADAN, MF; MOERSEL, JT. Screening of the antiradical action of vegetable oils. **Journal of Food Composition and Analysis**. V. 19, p. 838-842, 2006.

RAZAVI SM, NAZEMIYEH H, HAJIBOLAND R, KUMARASAMY Y, DELAZAR A, NAHAR L, SARKER SD. Coumarins from the aerial parts of *Prangos uloptera* (Apiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia** v.18, p. 1-5, 2008.

RIBEIRO CVC, KAPLAN MAC. Tendências evolutivas de famílias produtoras de cumarinas em angiospermae. **Química Nova** v.25, p. 533-538, 2002

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K (Org). Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. **Mutagênese Ambiental**. 1 ed. Canoas: Ulbra. p. 173-200, 2003.

RICE-EVANS, CA; MILLER, NJ; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**. V. 20; p. 933-956, 1996.

ROCHA, D. D.; MILITÃO, G. C. G.; VERAS, M. L.; PESSOA, O. D. L.; SILVEIRA, E. R.; ALVES, A. P. N. N.; DE MORAES, M. O.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V. elective cytotoxicity of withaphysalins in myeloid leukemia cell lines versus peripheral blood mononuclear cells. **Life Sciences**. V. 79, p. 692–1701, 2006.

ROMAGNOLO, D. F.; SELMIN, O.I. Flavonoids and Cancer Prevention: A Review of the Evidence. **Journal of Nutrition in Gerontology and Geriatrics**, v.31, p.206-238, 2012.

RUSAK, G; KUSTRAK, D.; MALES, Z.; PLESE, N. The determination of the content of polyphenols in the aerial parts of the species *Centaurea rupestris* L. and *C. fritschii* Hayek (Asteraceae). **Acta Pharmaceutica**, v. 43, p. 121-125, 1993.

SALEEM, A; SINKKONEN, J; KAˆHKOˆNEN, M; KLIKA, KD; PIHLAJA, K. The structural and conformational analysis of chebulinic acid and 2,4-chebuloyl-b-D-glucopyranose isolated from the fruit of *Terminalia chebula* Retz.: Antioxidant activities of *T. chebula* compounds. **European Journal of Organic Chemistry**. 2002

SALGADO, J. M. **Guia dos Funcionais: Dieta Alimentar para Manter a Saúde e Evitar Doenças**. Rio de Janeiro: Ediouro, 192p. 2009,

SANTOS, PRD.; MORAIS, AA; BRAZ-FILHO, R; Editorial. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. V. 14, p. 343-344, 2003.

SANTOS, RA. et al. Genotoxic effect of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) extract on human lymphocytes treated *in vitro*. **The journal of cell biology**. v.32, p. 195-200, 2008.

SANTOS, EOL. Mecanismo de ação dos flavonoides no metabolism oxidative e na fagocitose de neutrófilos humanos desencadeados por receptors Fc gama e CR. Dissertação de Mestrado. Rio Preto, 2010.

SARMENTO, RA.; SILVA, FM.; SBRUZZI, G.; **Schaan, BD.; Almeida, JC.** Micronutrientes antioxidantes e risco cardiovascular em pacientes com diabetes: uma revisão sistemática. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. V 101, p 240-248, 2013

SASAKI, Y. F., KAWAGUCHI, S., KAMAYA, A., OHSHITA, M., KABASAWA, K., IWAMA, K., TANIGUCHI, K., & TSUDA, S. The comet assay with 8 mouse organs: Results with 39 currently used food additives. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 519, p.103–119, 2002.

SAYYAH M, VALIZADEH J, KAMALINEJAD M. Anticonvulsant activity of the leaf essential oil of *Laurus nobilis*, against pentylenetetrazole-and maximal electroshock-induced seizures. **Phytomedicine**. v 9, p. 212-216, 2002.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**. v. 31, p. 9-15, 1975.

SELLAPPAN, S.; AKOH, C.C.; KREWER, G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.50, p. 2432-2438, 2002.

SHAHIDI, F. Natural Antioxidants: An Overview “in” Natural Antioxidants Chemistry, Health Effects, and Applications. AOCS Press: Champaign, Illinois, p. 1-11. 1996.

SHARMA, R.N.; ISRAEL, S. Effect of date of sowing and level of nitrogen and phosphorus on growth and seed yield of coriander (*Coriandrum sativum* L.). **Indian Journal of Agronomy**. v. 36, p. 180 -184, 1991.

SILVA, T. M. S.; CÂMARA, C. A.; AGRA, M. DE F.; DE CARVALHO, M. G.; FRANA, M. T.; BRANDOLINE, S. S. P. B.; PASCHOAL, L. DA S.; BRAZ-FILHO, R. Molluscicidal activity of *Solanum* species of the Northeast of Brazil on *Biomphalaria glabrata*. **Fitoterapia** v. 77, p.449-452. 2006.

SILVA, JCB; KAMADA, T; FERREIRA, FPS; SIMON, GA .Efeito da adubação no teor de flavonoides totais e caracteres agronômicos do mentrasto. **UniRV Online: Revista Científica Eletrônica Interdisciplinar da Universidade de Rio Verde**. V. 1, p. 62 a 67, 2015.

SIMÕES CMO & SPITZER, V. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. p.394-412, 2000.

SIMILI, FF; REIS, RA , FURLAN, BN;PAZ, CCP;LIMA, MLP; BELLINGIERI, PA. Resposta do híbrido de sorgo-sudão à adubação nitrogenada e potássica: composição química e digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 32, p. 474-480, 2008

SIMÕES, CMO; SCHENKEL, EP; GOSMAN, G; MELLO, JCP; MENTZ, LA; PETROVICK, PR, **Farmacognosia: da planta a medicamento**. Florianópolis: Editora da UFSC, 1102p, 2007.

SLUIS, A.A.; DEKKER, M.; JAGER, A.; JONGEN, WMF. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.49, p. 3606-3613, 2001.

SOUSA, LA. *Baccharis genistelloides* subsp. *crispa*: caracterização, implantação de banco de germoplasma e resposta à adubação orgânica. Dissertações defendidas no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, 2013.

SOUZA, CAS; CORREA, FLO; MENDONCA, V; CARVALHO, JG. Crescimento de mudas de gravioleira (*Annona muricata* L.) em substrato com superfosfato simples e vermicomposto. **Revista Brasileira de Fruticultura** (*online*), v. 25, p. 453-456, 2003.

SPARG, SG; LIGHT, ME.; van Studen, J.; Biological activities and distribution of plant saponins. **Jornal Ethnopharmacology**. V. 94, p. 219-243, 2004.

SPORN, M.B; Dunlop, NM; Newton, DL. Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). **Fed. Proceed.**, v.35, p.1332-1338, 1976.

SREELATHA, S; PADMA, PR; UMADEVI, M. Protective effects of *Coriandrum sativum* extracts on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. **Food and Chemical Toxicology**. v. 47, p. 702-708, 2009.

STONER, G.D; MORSE, M.A; KELLOFF, G.J. Perspectives in cancer chemoprevention. **Environmental Health Perspectives**. v. 105, p.945-954, 1997.

STRUCK, RF. Cancer Chemoterapeutic Agents; American Chemical Society: Washington, DC. p. 114, 1995.

SUGIHARA, N., ARAKAWA, T., OHNISHI, M., FURUNO, K. Anti and pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loades with alpha-linolenic acid. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 27, p. 1313-1323, 1999

SUMMERS, C.B., FELTON, G.W. Prooxidant effects of phenolic acids on the generalist herbivore *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: *Noctuidae*): potential mode of action for phenolic compounds in plant anti-herbivore chemistry. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 24, p. 943-953, 1994.

SURH, Y.J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. **Nature Reviews Cancer.**, v.10, p.768–780, 2003.

TAIZ, L; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013

TANABE, H.; YOSHIDA, M.; TOMITA, N. Comparasion of the antioxidant activities of 22 commonly used herbs and spices on the lipid oxidation of pork meat. **Animal Science Journal**, v. 73, p. 389-393, 2002.

TEICHER, BA; SOTOMAYOR, EA. Em *Cancer Chemotherapeutic Agents*; Foye, W. O., ed.; Americam Chemical Society: Washington, D.C., 1994.

Tese (Doutorado) - Universidade federal de Viçosa, MG. 72p, 2012.

TINOCO, MT; MARTINS, MR; CRUZ-MORAIS, J. Atividade antimicrobiana do óleo essencial do *Foeniculum vulgare* Miller. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 94, p. 448-454, 2007

TRUEBA, IP; MARTÍNEZ SÁNCHEZ, G. Revisiones Los Flavonoides como Antioxidantes Naturales. **Acta Farmaceutica Bonaerense** v.20, p. 297-306, 2001.

USDA National Nutrient Database Food and Nutrition Research Briefs. Agricultural Research Service. Disponível em:www.ars.usda.gov

VEBERIC, R.; COLARIC, M.; STAMPAR, F. Phenolic acids and flavonoids of fig fruit (*Ficus carica* L.) in the northern Mediterranean region. **Food Chemistry**. v.106, p.153-157, 2008.

KULDVEE, R; VAHER, M; KOEL, M; KALJURAND, M .Heteroconjugation-based capillary electrophoretic separation of phenolic compounds in acetonitrile and propylene carbonate. **Electrophoresis**. v.24 p. 1627-1634, 2003.

VELIOGLU, Y.S. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.4113-4117, 1998.

VERPOORTE, R. Pharmacognosy in the new millennium: leadfinding and biotechnology. **Jornal of Pharmacy and Pharmacology**. V. 52, p. 253-262, 2000.

VIEIRA, N. C.; ESPINDOLA, L. S.; SANTANA, J. M.; VERAS, M. L.; PESSOA, O. D. L.; PINHEIRO, S. M.; DE ARAÚJO, R. M.; LIMA, M. A. S.; SILVEIRA, E. R. Trypanocidal activity of a new pterocarpan and other secondary metabolites of plants from Northeastern Brazil flora. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. V.16, p. 1676–1682, 2008.

VINSON, J.A.; SU, X.; ZUBIK, L.; BOSE, P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. **Jornal Agricultural Food Chemistry**. v.49, p. 5315-5321, 2001.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2. ed. New York: Springer - Verlag Berlin Heidelberg, 384 p 1996..

WANG, C; JURK, D; MADDICK, M; NELSON, G; MARTIN-RUIZ, C; VON ZGLINICKI, T. DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. **Aging Cell Journal**. v.8, p.311-323, 2009.

WANGENSTEEN, H; SAMUELSEN, AB; MALTERUD, KE: Antioxidant activity in extracts from coriander. **Food Chemistry**. v. 88, p. 293-297, 2004

WATERS, M. D. et al. Antimutagenic profiles for some model compounds. **Mutation Research**. v. 238, p. 57-85, 1990.

WATTENBERG. L,W. An Overview of Chemoprevention: current status and future prospects. **Experimental Biology and Medicine**. v.216, p.133-141, 1997.

WICHTL, M; BISSET, NG . *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals*. Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers. 1994

WILHEM FILHO, D.; SILVA, E. L.; BOVERIS, A. Flavonóides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas. In:

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Plantas Mediciniais: sob a óptica da Química Medicinal Moderna. Chapecó: Argos, p 317- 334, 2001.

WONG, YYY; KITTS, DD. Studies on the dual antioxidante and antibacterial properties of parsley (*Petroselinum crispum*) and cilantro (*Coriandrum sativum*) extracts. **Food Chemistry**. V 97, p. 505-515, 2006.

YAMANAKA, N; ODA, O; NAGAO, S. Prooxidant activity of caffeic acid, dietary non-flavonoid phenolic acid, on Cu +2 induced low density lipoprotein oxidation. **FEBS Letters**, v. 405, p. 186-190, 1997.

YAO, L.H, JIANG, YM; SHI, J; TOMAS-BARBERAN, FA. Flavonoids in Food and their health benefits. **Plant Foods for Human Nutrition**. v.59, p.113-122, 2004.

YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A.A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. **Jornal Agricultural Food Chemistry**. v.49, p. 4083-4089, 2001.

ZHENG, W.; WANG, S.Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.49, p. 5165-5170, 2001.

# ANEXO A

## Análise Química dos Solos

### FULLIN - LABORATÓRIO DE ANÁLISE AGRONÔMICA E AMBIENTAL LTDA

Av. Samuel Batista Cruz, 1099 - Centro  
CEP: 29900-100 Linhares - ES CNPJ: 03.190.861/0001-78  
Telefax: (27) 3371-3460/3289 - E-mail: atendimento@fullin.com.br

### ANÁLISE QUÍMICA DE SOLOS

<b>CLIENTE:</b> Patrícia Carara dos Santos	<b>CULTURA:</b>
<b>ENDEREÇO:</b> Cond. Vista de Manguinhos Bloco B Ap 602	<b>TELEFONE:</b>
<b>MUNICÍPIO:</b> Vitória-ES	<b>FAX:</b>
<b>PROPRIEDADE:</b>	<b>DATA ENTRADA:</b> 16/12/2015

PARÂMETRO ANALISADO	UNID.	RESULTADO DA ANÁLISE				
		AQV	QDAV	AOBV	AOV	AOQ
		12150919	12150920	12150921	12150922	12150923
Fósforo Mehlich 1/	mg/dm <sup>3</sup>	104	75	60	73	150
Fósforo Remanescente 2/	mg/L	-	-	-	-	-
Fósforo Resina	mg/dm <sup>3</sup>	-	-	-	-	-
Potássio (K) 1/	mg/dm <sup>3</sup>	440	470	190	260	440
Enxofre (S) 3/	mg/dm <sup>3</sup>	21	14	8	17	263
Cálcio (Ca) 4/	cmol c/dm <sup>3</sup>	7,0	5,9	4,0	4,0	8,8
Magnésio (Mg) 4/	cmol c/dm <sup>3</sup>	1,7	2,2	0,6	0,6	0,8
Alumínio (Al) 4/	cmol c/dm <sup>3</sup>	0,1	0,0	0,1	0,1	0,5
H+Al 5/	cmol c/dm <sup>3</sup>	4,2	2,8	5,2	5,0	6,8
pH em H <sub>2</sub> O 6/	-	5,6	6,1	5,6	5,6	5,0
pH em CaCl <sub>2</sub> 7/	-	-	-	-	-	-
pH SMP 5/	-	-	-	-	-	-
Matéria Orgânica 8/	dag/kg	3,7	3,9	4,1	3,7	3,5
Ferro (Fe) 1/	mg/dm <sup>3</sup>	159	245	231	131	113
Zinco (Zn) 1/	mg/dm <sup>3</sup>	15,2	7,4	3,8	6,5	14,0
Cobre (Cu) 1/	mg/dm <sup>3</sup>	4,6	1,8	1,1	0,9	0,8
Manganês (Mn) 1/	mg/dm <sup>3</sup>	56	44	29	21	30
Boro (B) 9/	mg/dm <sup>3</sup>	0,51	0,32	0,29	0,63	0,93
Sódio (Na) 1/	mg/dm <sup>3</sup>	170,0	160,0	90,0	97,0	130,0
Cloro (Cl) 10/	mg/dm <sup>3</sup>	-	-	-	-	-
Relação Ca/Mg	-	4,1	2,7	6,7	6,7	11,0
Relação Ca/K	-	6,2	4,9	8,2	6,0	7,8
Relação Mg/K	-	1,5	1,8	1,2	0,9	0,7
Sat. Ca na CTC (T)	%	49,9	48,7	38,9	39,0	50,2
Sat. Mg na CTC (T)	%	12,1	18,2	5,8	5,8	4,6
Sat. K na CTC (T)	%	8,0	10,0	4,7	6,5	6,4
Índice saturação Na	%	5,2	5,7	3,8	4,1	3,1
Soma de Bases (SB)	cmol c/dm <sup>3</sup>	10,6	10,0	5,5	5,7	11,3
CTC efetiva (t)	cmol c/dm <sup>3</sup>	10,7	10,0	5,6	5,8	11,8
CTC a pH 7,0 (T)	cmol c/dm <sup>3</sup>	14,8	12,8	10,7	10,7	18,1
Sat. Alumínio (m)	%	1	0	2	2	4
Saturação de bases	%	71,6	78,1	51,3	53,2	62,4

1/ Extração: HCl 0,05 mol/L + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,025 mol/L

2/ P na solução de equilíbrio, obtido com CaCl<sub>2</sub> 10mm/L

3/ Extração: Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 0,01 mol/L

4/ Extração: KCl 1mol/L

5/ Solução Tampão SMP

6/ pH em H<sub>2</sub>O 1:2,5

7/ pH em CaCl<sub>2</sub> 0,01 mol/L

8/ Oxidação: Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 2H<sub>2</sub>O + 4 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 mol/L

9/ Extração: BaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 0,125%

10/ Extração: H<sub>2</sub>O 1:5

- Análise não solicitada

**Atenção: para verificar os níveis de referência de alguns dos resultados acima, consulte a página em anexo**

**Mensagem ao Cliente FULLIN:**

Linhares-ES, 23/12/2015

- A análise depende da qualidade da amostragem;

- A alteração indevida deste documento estará sujeita à ação judicial;

- A FULLIN é uma empresa CERTIFICADA, conforme Norma 9001:2008.

**Eli Antônio Fullin**  
Eng. Agrônomo CREA: 3706 D/ES  
MSc. Solos e Nutrição de Plantas

AQV – Químico Vegetativo; AOBV - Orgânico vegetativo; AQF-Químico Floração; AOV - Orgânico Floração; COAV – Parâmetro.

## APÊNDICE A

Certificado de aprovação emitido pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA/UFES).



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



# CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Análise fitoquímica e avaliação das atividades antioxidante, antimutagênica e citotóxica do extrato hidroalcoólico de *Coriandrum sativum* L", protocolo nº.19/2015, sob a responsabilidade de Maria do Carmo Pimentel Batitucci que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata(exceto o homem), para fins de pesquisa científica(ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal(CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS(CEUA) DO(A) Centro de Ciências da Saúde- Maruípe-Vitória-ES em reunião de 07/08/2015.

Vigência do Projeto	Início: Agosto/2015 Término: abril/2016
Espécie/Linhagem	Camundongos Swiss
Nº de Animais	Experimento Piloto:0 Protocolo Experimental:156 Total:156
Peso/Idade	Peso: não especificou Idade: 6-8 semanas
Sexo	Macho
Origem	Mamíferos

Vitória (ES), 07 de agosto 2015.

  
Presidente do  
Comitê de Ética no Uso de Animais  
CEUA/UFES