

**Universidade Federal do Espírito Santo
Centro Universitário Norte do Espírito Santo
Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Tropical**

**Estudo da Influência de Fatores Ambientais na
Composição Química e Atividades Biológicas de
Xylopia sericea St. Hill.**

Flávia Moreira de Macedo Martins

Dissertação de Mestrado em Biodiversidade Tropical (Ecologia)

**São Mateus
Fevereiro de 2012**

Flávia Moreira de Macedo Martins

**Estudo da Influência de Fatores Ambientais na
Composição Química e Atividades Biológicas de
Xylopia sericea St. Hill.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical para a obtenção do título de Mestre em Biodiversidade Tropical, na área de concentração Ecologia.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Claudia Masrouah Jamal
Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Barreto da Silva

**São Mateus
Fevereiro de 2012**

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

M386e Martins, Flávia Moreira de Macedo, 1981-
Estudo da influência de fatores ambientais na composição química e atividades biológicas de *Xylopiia sericea* St. Hill / Flávia Moreira de Macedo Martins. – 2012.
88 f. : il.

Orientadora: Claudia Masrouah Jamal.
Coorientador: Marcelo Barreto da Silva.
Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Tropical) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Universitário
Norte do Espírito Santo.

1. Metabolismo secundário. 2. Fatores hereditários e ambientais. 3. Química vegetal. I. Jamal, Claudia Masrouah. II. Silva, Marcelo Barreto da. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro Universitário Norte do Espírito Santo. III. Título.


CDU: 502


**Estudo da influência de fatores ambientais na
composição química e atividades biológicas de
Xylopiá sericea St. Hill**


Flávia Moreira de Macedo Martins


Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical, para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade Tropical.

Aprovada: 28/02/2012.


Prof. Dr. Marcelo Barreto Silva
Universidade Federal do Espírito Santo


Prof.ª. Dr.ª. Maria do Carmo Pimentel
Batitucci
Universidade Federal do Espírito Santo


Prof.ª. Dr.ª. Beatriz Gonçalves Brasileiro
Instituto Federal do Espírito Santo


Prof.ª. Dr.ª. Cláudia Masrouah Jamal
Universidade Federal do Espírito Santo
(Orientadora)

DEDICATÓRIA

Em especial à minha filha
Melissa, que mesmo antes
de nascer, inspirou-me
força e perseverança para
conclusão deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu esposo, Gustavo, pela força e companheirismo compartilhado durante os difíceis caminhos que percorri para conclusão deste trabalho.

À Professora Dra. Claudia Masrouah Jamal, minha orientadora, pela oportunidade, pelo apoio e, acima de tudo, pela compreensão durante toda a realização deste projeto.

Ao Professor Dr. Marcelo Barreto da Silva, pela co-orientação prestada e destreza no atendimento dos vários pedidos solicitados.

À Profa. Dr. Damaris Silveira, professora da Universidade de Brasília – UnB, pela contribuição na análise química dos extratos.

À Profa. Dra. Maria do Carmo Pimentel Batitucci, professora da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, pelo auxílio e parceria no ensaio alelopático.

Ao Dr. Alexandre Sylvio Vieira da Costa, professor da Universidade Vale do Rio Doce – Univale, pelo auxílio e pelo conhecimento transmitido.

Aos membros do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical da Universidade Federal do Espírito Santo, por proporcionarem mais esta vitória em minha vida profissional.

Aos meus colegas de Mestrado pela fiel amizade construída.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 ÁREAS DE ESTUDO.....	34
4.1.1 Área “A” – Campus da UFES/CEUNES	34
4.1.2 Área “B” – Parque de Estadual de Itaúnas.....	34
4.2 AMOSTRAGEM DO MATERIAL VEGETAL	35
4.3 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	35
4.4 AMOSTRAGEM DO SOLO.....	35
4.5 AVALIAÇÃO DE FATORES AMBIENTAIS.....	36
4.5.1 Análise química do solo.....	36
4.5.2 Caracterização das fases de desenvolvimento das plantas.....	36
4.6 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	36
4.7 RENDIMENTO DOS EXTRATOS	38
4.8 TRIAGEM FARMACOGNÓSTICA A PARTIR DOS EXTRATOS OBTIDOS.....	38
4.8.1 Determinação de Flavonoide	38
4.8.1.1 Reação de Cianidina	38
4.8.1.2 Reação de $AlCl_3$	38
4.8.2 Determinação de Cumarinas	38
4.8.3 Determinação de Alcaloides	39
4.8.4 Determinação de Saponinas	39
4.8.5 Determinação de Esteroides e Triterpenos	39
4.8.6 Determinação de Heterosídeos antraquinônicos.....	39
4.8.7 Determinação de Naftoquinonas.....	40
4.8.8 Determinação de Tanino	40
4.8.8.1 Reação de Polifenóis.....	40

4.9	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE ACETATO DE ETILA	40
4.10	EXTRAÇÃO SELETIVA PARA ALCALOIDES	40
4.10.1	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	41
4.11	ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	41
4.11.1	Testes de toxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	41
4.11.2	Avaliação da atividade antifúngica contra fungos fitopatológicos	42
4.11.2.1	Avaliação da atividade antifúngica frente à <i>C. musae</i>	42
4.11.2.2	Avaliação da atividade antifúngica frente à <i>C. gloeosporioides</i>	43
4.11.3	Avaliação da atividade antifúngica frente à <i>Candida albicans</i>	43
4.11.4	Avaliação de atividade alelopática frente à semente de <i>Allium cepa</i>	43
4.11.5	Avaliação da atividade antimicrobiana frente à <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	44
5	RESULTADO E DISCUSSÃO.....	45
5.1	CARACTERIZAÇÃO DAS FASES DE DESENVOLVIMENTO DAS PLANTAS	45
5.2	QUALIDADE NUTRICIONAL DO SOLO	45
5.3	RENDIMENTO DOS EXTRATOS	46
5.3.1	Extrato etanólico	46
5.3.2	Extrato de acetato de etila	47
5.3.3	Extrato alcaloídico	48
5.4	CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA.....	48
5.5	TRIAGEM FARMACOGNÓSTICA	49
5.6	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	51
5.7	ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE <i>X. SERICEA</i> E A INFLUÊNCIA DO AMBIENTE.....	53
5.7.1	Atividade citotóxica	54
5.7.1.1	Citotoxicidade de <i>X. sericea</i> frente à <i>A. salina</i>	54
5.7.1.2	Estudo da Influência dos Fatores Ambientais na Atividade Citotóxica de <i>X. sericea</i>	55
5.7.2	Avaliação da atividade antifúngica frente à <i>C. musae</i>	56
5.7.2.1	Estudo da influência dos fatores ambiental na atividade antifúngica de <i>X. sericea</i> frente à <i>C. musae</i>	59
5.7.3	Avaliação da atividade antifúngica frente à <i>C. gloeosporioides</i>	60
5.8	ESTUDO DA INFLUÊNCIA DOS FATORES AMBIENTAIS NA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE <i>X. SERICEA</i> FRENTE À <i>C. GLOEOSPORIOIDES</i>	62

5.8.1	Avaliação de atividade antifúngica de <i>X. sericea</i> frente à <i>C. albicans</i>	64
5.8.2	Avaliação de atividade alelopática frente à <i>A. cepa</i>	64
5.8.2.1	Médias do IVG, porcentagem de germinação e teste de primeira contagem das sementes de <i>A. cepa</i>	64
5.8.2.2	Estudo da influência dos fatores ambiental na atividade alelopática de <i>X. sericea</i> frente à sementes de <i>A. cepa</i>	66
5.8.3	Avaliação da atividade antimicrobiana frente à <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	68
5.8.3.1	Teste microbiológico frente à <i>E. coli</i>	68
5.8.3.2	Teste microbiológico frente à <i>S. aureus</i>	68
5.8.3.3	Estudo da influência dos fatores ambiental na atividade antimicrobiana de <i>X. sericea</i> frente à <i>S. aureus</i>	69
6	CONCLUSÃO	71
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
8	ANEXOS	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Codificação dos extratos etanólicos obtidos a partir das folhas de <i>X. sericea</i> coletadas nas estações seca e chuvosa e nas áreas A e B.	37
Tabela 2. Codificação dos extratos etanólico, acetato de etila e alcaloídicos obtidos a partir das cinco plantas escolhidas, aleatoriamente, nas estações seca e chuvosa e nas áreas A e B.	37
Tabela 3. Condições cromatográficas para análise dos extratos etanólicos de <i>X. sericea</i>	41
Tabela 4. Codificação dos tratamentos do teste alelopático.	44
Tabela 5. Resultados da análise química do solo da área A e B.....	46
Tabela 6. Média do Rendimento (%) dos extratos etanólicos da área B obtidos nas estações seca e chuvosa.	47
Tabela 7. Média do Rendimento (%) dos extratos etanólicos da área A obtidos nas estações seca e chuvosa.	47
Tabela 8. Rendimento (%) dos extratos de acetato de etila das áreas A e B obtido nas diferentes estações amostradas.	47
Tabela 9. Rendimento (%) dos extratos Alcaloídicos das áreas A e B obtido nas diferentes estações amostradas.....	48
Tabela 10. Tipos de classes de metabólitos secundários encontrados nos extratos etanólicos de <i>X. sericea</i> obtidos na área A durante a estação seca.	49
Tabela 11. Tipos de classes de metabólitos secundários encontrados nos extratos etanólicos de <i>X. sericea</i> obtidos na área A durante a estação chuvosa.....	50
Tabela 12. Tipos de classes de metabólitos secundários encontrados nos extratos etanólico de <i>X. sericea</i> obtidos na área B durante a estação seca.	50
Tabela 13. Tipos de classes de metabólitos secundários encontrados nos extratos etanólicos de <i>X. sericea</i> obtidos na área B durante a estação chuvosa.	51
Tabela 14. Avaliação da citotoxicidade dos extratos etanólicos de <i>X. sericea</i> frente à <i>Artemia salina</i> (DL ₅₀).....	54
Tabela 15. Estudo de interação dos fatores área x estação do ano no percentual de morte de <i>A. salina</i>	56
Tabela 16. Estudo de interação dos fatores concentração x área no percentual de morte de <i>A. salina</i>	56
Tabela 17. Estudo da interação dos fatores área x extrato na atividade antifúngica frente à <i>C. musae</i>	60

Tabela 18. Estudo da interação dos fatores extrato x estação do ano na atividade antifúngica frente à <i>C. gloeosporioides</i>	63
Tabela 19. Estudo da interação dos fatores área x concentração no efeito alelopático dos extratos etanólicos seco frente ao comprimento da raiz de <i>A. cepa</i>	67
Tabela 20. Estudo da interação dos fatores Estação do ano x Concentração no efeito alelopático dos extratos etanólicos seco frente à <i>A. cepa</i>	68
Tabela 21. Médias do halo de inibição (cm) do teste antimicrobiano dos extratos de <i>X. sericea</i> e dos antibióticos Vancomicina e Cloranfenicol.....	69
Tabela 22. Estudo da interação da área de coleta x estação do ano na atividade antibiótica dos extratos etanólicos frente <i>S. aureus</i>	70

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. <i>X. sericea</i> fotografada na área do campus UFES/CEUNES.	27
Figura 2. Frutos e ramos de <i>X. sericea</i>	27
Figura 3. Compostos químicos isolados a partir de óleo essencial de <i>X. sericea</i>	28
Figura 4. Substâncias identificadas nos extratos analisados.	51
Figura 5. Espectros no UV das substâncias identificadas através de CLAE.....	51
Figura 6. Cromatograma do extrato etanólico da amostra 5 – área B.	52
Figura 7. Cromatograma do extrato etanólico da amostra 5 – área A.....	52
Figura 8. Cromatograma do extrato etanólico da amostra 1 – área A.....	53
Figura 9. Percentual de morte de <i>A. salina</i> frente aos extratos etanólico das diferentes áreas e estações do ano.	55
Figura 10. Médias do percentual de inibição dos extratos etanólicos obtidos das plantas da área A durante as estações seca e chuvosa.	57
Figura 11. Médias do percentual de inibição dos extratos etanólicos obtidos das plantas da área B durante as estações seca e chuvosa.	58
Figura 12. Médias do diâmetro do halo de crescimento de <i>C. musae</i> tratados com extratos de acetato de etila.	58
Figura 13. Médias do diâmetro do halo de crescimento de <i>C. musae</i> tratados com extratos alcaloídicos.	59
Figura 14. Avaliação do potencial antifúngico dos extratos etanólicos e acetato de etila obtidos nas diferentes áreas e estação do ano frente à <i>C. musae</i>	60
Figura 15. Médias do diâmetro do halo de crescimento de <i>C. gloeosporioides</i> tratados com extratos etanólicos.	61
Figura 16. Médias do diâmetro do halo de crescimento de <i>C. gloeosporioides</i> tratados com extratos de acetato de etila.....	62
Figura 17. Avaliação do potencial antifúngico dos extratos etanólicos e acetato de etila obtidos nas diferentes áreas e estação do ano frente à <i>C. gloeosporioides</i>	63
Figura 18. Médias do índice de velocidade de germinação das sementes de <i>A. cepa</i> tratadas com extrato de <i>X. sericea</i>	65
Figura 19. Porcentagem de germinação das sementes de <i>A. cepa</i> tratadas com extrato de <i>X. sericea</i>	65

Figura 20. Teste de primeira contagem das sementes de <i>A. cepa</i> tratadas com extrato de <i>X. sericea</i>	66
Figura 21. Atividade alelopática dos extratos etanólicos obtidos nas diferentes áreas, estação do ano e concentração, no comprimento da raiz de <i>A. cepa</i>	67
Figura 22. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos obtidos nas diferentes áreas, estação do ano, frente à <i>S. aureus</i>	69

LISTA DE SIGLAS

APP: Área de Preservação Permanente

ATCC: American Type Culture Collection

BDA: Batata Dextrose Ágar

BOD: Biochemical Oxygen Demand

CAP: Circunferência na Altura do Peito

CCD: Cromatografia de Camada Delgada

CEUNES: Centro Universitário Norte do Espírito Santo

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CN: Controle Negativo

CPT: Camptotecina

DL₅₀: Dose Letal

DMSO: Dimetilsulfóxido

EMBRAPA: Empresa Brasileira de pesquisa Agropecuária

ES: Espírito Santo

EXIM: Export-Import Bank

FeCl₃: Cloreto de Ferro (III)

G: Germinação

G: Porcentagem de germinação

H₂SO₄: Ácido sulfúrico

HPLC: High-Performance Liquid Chromatography

IEMA: Instituto Estadual do Meio Ambiente

IVG: Índice de velocidade de Germinação

KOH: Hidróxido de potássio

LC₅₀: Concentração Letal

LDL: Lipoproteína de Baixa Densidade

M.O.: Matéria Orgânica

m: Saturação de Alumínio

NH₄OH: Hidróxido de amônia

PCA: Plate Count Ágar

pH: Potencial Hidrogeniônico

UFES: Universidade Federal do Espírito Santo

UTM: Universal Transversal de Mercator

UV: Ultravioleta

v: Saturação de Base

RESUMO

Os metabólitos secundários das plantas podem sofrer alterações qualitativas e quantitativas dependendo dos estímulos ambientais presentes. Dentre os estímulos ambientais ressaltam-se as interações bióticas: planta/micro-organismos, planta/insetos, planta/planta, idade e estágio de desenvolvimento e ritmo circadiano; e os fatores abióticos: luminosidade, temperatura, pluviosidade e estado nutricional, sazonalidade, disponibilidade de água, radiação UV, composição atmosférica e altitude. O presente trabalho estuda a influência das fases de desenvolvimento da planta, da sazonalidade, da disponibilidade de nutriente e água no solo nas atividades antimicrobiana, antifúngica, citotóxica e alopatia dos extratos vegetais obtidos a partir de *Xylopia sericea* St. Hil. A amostragem de partes aéreas da planta foi realizada nas estações seca e chuvosa e em duas áreas, uma localizada no Campus do Ceunes/UFES (A), no Município de São Mateus/ES e a outra, no Parque Estadual de Itaúnas (B), no município de Conceição da Barra. A qualidade nutricional do solo, pH e teor de matéria orgânica foram avaliados nas diferentes áreas amostradas. Além disso, medidas da altura e da circunferência na altura do peito das plantas foram estabelecidas para caracterizar as fases de desenvolvimento das mesmas. Os extratos das partes aéreas de *X. sericea* foram obtidos por maceração em etanol. Os extratos etanólicos foram caracterizados quimicamente e submetidos aos testes de citotoxicidade, antifúngico, antibacteriano e de alelopatia. Os resultados revelaram influência dos fatores ambientais relativos às diferentes áreas e às diferentes estações nas atividades biológicas testadas. Os extratos de *X. sericea* apresentaram atividades antifúngica, antibacteriana, e alelopática. Ademais, na triagem farmacognóstica dos extratos foram detectados alcaloides, flavonoides, saponinas, triterpenos, esteroides, taninos, cumarinas e naftoquinonas. Através das análises utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência foi possível identificar os flavonoides quercetina, rutina e hesperidina.

ABSTRACT

The secondary metabolites of plants may suffer qualitative and quantitative changes depending on the environmental stimuli present. Among the environmental stimuli, special notice is given to the following biotic interactions: plant/micro-organisms, plant/insect, plant/plant, age and stage of development and circadian rhythm, and abiotic factors: light, temperature, rainfall and nutritional status, seasonality, water availability, UV radiation, atmospheric composition and altitude. This paper study of the influence of plant development, seasonality, availability of nutrient and soil water in the antimicrobial, antifungal, cytotoxic and allopathic plant extracts obtained from *Xylopia sericea* St. Hill. A sample of the aerial parts of the plant was carried out in different seasons (dry and rain) and in different habitats, an area characterized as natural (Parque Estadual de Itaúnas) and another as degraded (Campus Ceunes/UFES), in the Municipality of São Mateus/ES. The nutritional quality of soil pH and organic matter content were assessed in the different areas sampled. Moreover, measurements of the height and circumference (measured at a chest's height) of the plants were made to estimate the stage of their development. The extracts of the aerial parts of *X. sericea* were obtained by maceration in ethanol. Ethanol extracts were chemically characterized and tested for cytotoxicity, antifungal, antibacterial and allelopathy. The results revealed the influence of environmental factors, relating to the different areas and different seasons, in the biological activities tested. The extracts of *X. sericea* showed antifungal, antibacterial and allelopathy activities. Furthermore, the screening of the extracts were detected to have present in them pharmacognostic alkaloids, flavonoids, saponins, triterpenes, steroids, tannins, coumarins and naphthoquinones. Chemical analysis using High Performance Liquid Chromatography was possible to identify the flavonoids quercetin, rutin and hesperidin.

1 INTRODUÇÃO

Muitos estudos com plantas têm objetivado a prospecção de princípios ativos para as indústrias farmacêutica, cosmética e agrícola devido às promissoras comercializações de seus produtos. Atualmente, a fitoterapia é reconhecida, pela Organização Mundial de Saúde, como alternativa importante e viável, principalmente, para as populações de países em desenvolvimento devido aos baixos custos de seus produtos.

No Brasil, apenas 2% das espécies catalogadas possuem uso medicinal comprovado cientificamente. Neste contexto, estudos com as plantas nativas devem ser priorizados, uma vez que o Brasil possui a maior diversidade de espécies vegetais do mundo, mas pouco se conhece dos seus respectivos potenciais bioativos.

É conhecido que os metabólitos secundários das plantas, responsáveis pelas bioatividades, podem sofrer alterações qualitativas e quantitativas dependendo dos estímulos ambientais. Desta maneira, intensidade luminosa, temperatura, pluviosidade, disponibilidade de nutrientes do solo, estágio de desenvolvimento das plantas, interações existentes entre as plantas e entre os animais podem influenciar nas rotas metabólicas das plantas provocando diferentes redirecionamentos de síntese dos compostos. Contudo, poucos estudos relatam a influência destes fatores na síntese dos constituintes em plantas de ambiente natural. A maioria dos trabalhos referentes ao conhecimento destas interações é realizada em espécies comercialmente importantes. Além disso, é importante ressaltar que todas as espécies vegetais apresentam um comportamento diferenciado frente aos estímulos ambientais, sendo, portanto necessário considerar as condições ambientais ideais para obtenção de máxima produção dos compostos de interesse.

Dentre os fatores que mais influenciam a síntese de metabólitos secundários, o presente estudo se reportou apenas às fases de desenvolvimento da planta, à composição nutricional do solo, à sazonalidade, e indiretamente, à disponibilidade de água no solo. Uma ampla avaliação seria inviável devido à complexidade das correlações existente entre os diversos fatores ambientais e sua influência em conjunto no metabolismo secundário.

A espécie *X. sericea* foi selecionada para o presente estudo por apresentar grande potencialidade no que concerne à síntese de constituintes químicos e devido os poucos estudos que relatam as suas respectivas bioatividades. A maioria dos estudos relacionados com a composição química de *X. sericea* se restringem apenas aos compostos voláteis. Com

relação às potencialidades bioativas de *X. sericea* alguns poucos estudos apontam atividade acaricida, bacteriostática e fungistática e alelopática. Sendo assim, este trabalho contribui de forma significativa com o conhecimento científico de uma espécie nativa que possui ampla distribuição geográfica. Desta maneira, tal conhecimento permite que a biodiversidade brasileira seja cada vez mais reconhecida no âmbito da fitoterapia. Além disso, que valores sejam agregados à espécie em questão, o que justifica, muitas vezes, sua conservação e até mesmo, a conservação de áreas circunvizinhas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência de fatores ambientais na composição química e nas atividades antimicrobiana, antifúngica, citotóxica e alelopática dos extratos vegetais obtidos a partir de *X. sericea* em diferentes habitats e épocas do ano (estação seca e chuvosa).

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar quimicamente os extratos vegetais obtidos nas estações seca e chuvosa e duas áreas de amostragem.
- Determinar a possível atividade antimicrobiana, citotóxica e alelopática dos extratos de *X. sericea*.
- Correlacionar os fatores ambientais monitorados com as atividades biológicas de *X. sericea*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

As plantas são uma importante fonte de substâncias biologicamente ativas, ou seja, apresentam constituintes químicos que exercem atividades sobre o metabolismo de outros organismos (Sandes e Di Blase, 2000). Tais constituintes podem ser classificados em metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários são frequentemente citados como compostos diretamente ligados à sobrevivência da planta, tais como: proteínas, lipídeos, RNA, DNA, aminoácidos e açúcares (Kerbaudy, 2004); enquanto os metabólitos secundários têm sua importância relacionada à sobrevivência e propagação das plantas, seja pela defesa da planta contra herbívoros, patógenos ou competidores; como proteção à radiação solar; ou ainda como fator de contribuição para a dispersão de pólen e sementes (Raven, Evert e Eichhorn et al., 2001). Muitas vezes, as substâncias sintetizadas em um ou vários órgãos da planta podem expressar potencialidades terapêuticas, ou seja, atuarem como fitoterápicos (Oliveira; Akisue, 2003).

As plantas medicinais são amplamente utilizadas pela população para o tratamento de diversas enfermidades. Segundo dados descritos na literatura, o emprego terapêutico de plantas pelo homem ocorreu a partir de aproximadamente 50.000 anos atrás. Dessa forma, a utilização de plantas medicinais se revela tão antiga quanto à própria existência da civilização humana (Martins et al., 1995). Contemporaneamente, as plantas medicinais são utilizadas de forma expressiva pela população. A Organização Mundial de Saúde estima que, pelo menos 80% da população mundial já empregou algum tipo de planta para fins fitoterápicos (Eloff, 1998).

Em termos econômicos, o uso de plantas com o propósito medicinal tem se mostrado bastante promissor. Segundo uma estimativa realizada pelo Banco EXIM, o mercado internacional de plantas medicinais comercializa aproximadamente U\$ 60 bilhões por ano. Entretanto, o crescimento do mercado de fitoterápicos apresenta índices de apenas 7%. Desse modo, estudos com o intuito de prospecção de recursos naturais aplicáveis ao tratamento de diversas doenças são veementemente subsidiados (Siani, 2003).

Na agricultura, o uso de produtos químicos para o controle de doenças em plantas tem sido motivo de preocupação, uma vez que os inúmeros compostos presentes nas formulações dos defensivos agrícolas causam prejuízos ao consumidor e ao ambiente, uma vez que promovem a seleção de micro-organismos resistentes e a redução de inimigos naturais (Barbosa et al.,

2011 apud Thomazini, 2006). Desta maneira, substâncias de origem natural que ofereçam baixo impacto ambiental são fundamentais em programas integrados de controle de insetos (Viegas, 2003).

A produção de produtos biologicamente ativos a partir de constituintes de origem vegetal é habitualmente empregada pela indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética. A concepção de determinado princípio ativo se correlaciona assim, com a necessidade da prospecção de compostos naturais diversos. Neste contexto, o Brasil apresenta relevante expressão mundial, pois é comumente apontado como o país de maior diversidade vegetal do mundo. Para se ter uma ideia, de um total de 250.000 a 500.000 espécies de plantas estimadas mundialmente (Borris, 1996), o Brasil possui aproximadamente 60.000 espécies de plantas, o que corresponde a cerca de 20% da flora mundial conhecida (Sant' Ana; Assad, 2002). Tal biodiversidade em parte é explicada pela grande variedade de condições climáticas presente no país.

No que concerne à região do estado do Espírito Santo, sua fitofisionomia se caracteriza principalmente pela presença de elementos dos domínios da Mata Atlântica, sendo composta pelos ecossistemas associados, como a Floresta Ombrófila Densa, Mista e aberta; Floresta Estacional Decidual e Semidecidual; Mangues; Restinga; Campos de Altitudes; Brejos Interioranos; Encraves Florestais do Nordeste; ilhas costeiras e oceânicas (CONAMA, 1993). Por se tratar de um “Hotspot” de biodiversidade e apresentar características fisionômicas e florísticas bastante peculiares, o norte do Espírito Santo abarca relevante importância para a prospecção de constituintes biologicamente ativos de origem natural.

Neste contexto, as plantas do gênero *Xylopia* se destacam na busca de síntese de novos compostos bioativos devido aos inúmeros compostos secundários presentes e suas respectivas bioatividades (Pimenta et al., 2009). O gênero *Xylopia* é um dos 33 gêneros da família Annonaceae existentes no Brasil (Lorenzi, 2002) que se destaca por representar 150 espécies amplamente distribuídas em diversas partes do mundo (Brummitt, 1992).

Vários estudos têm identificado os constituintes químicos das espécies do gênero *Xylopia*. Dentre eles destacam-se os alcaloides (Hocqeeuiller e Cavh, 1981; Jossang, Ebeuf e Cave, 1991; Martins, Alvarenga e Roque, 1995; Nishiyama et al., 2004; Nishiyama et al., 2006; Silva et al., 2009; Puvanendran et al., 2010), diterpenos (Martins, Alvarenga e Roque, 1995; Melo et al., 2001; Andrade et al., 2004; Tavares et al., 2006; Moreira, Roque e Lago, 2006) e

sesquiterpenos (Moreira, Roque e Lago, 2005; Moreira et al., 2007). Extratos de *Xylopi* *aethiopica* apresentaram altos níveis de compostos fenólicos totais (Esekhiagbe, Agatemor, Agatemor, 2009). Desta maneira, devido à grande diversidade de constituintes químicos, várias propriedades medicinais têm sido atribuídas ao gênero *Xylopi* (Pontes, Oliveira e Câmara, 2007) como atividades analgésicas (Nishiyama et al., 2010), antimicrobiana (Tatsadjieua et al., 2003; Fleischer et al., 2008; Konning e Agyare, 2004; Asekun e Adeniyi, 2004; Esekhiagbe, Agatemor, Agatemor, 2009); Moreira et al., 2003), antioxidante (Puvanendran et al., 2010), citotóxica (Tavares, 2006; Suffredini et al., 2007; Asekun e Adeniyi, 2004; Osorio et al 2007), anti-inflamatória (Ezekwesili et al., 2010), antiprotozoário (Osorio et al., 2007) e antiplasmolítica (Mesquita et al., 2007). Além disso, alguns estudos apontam o potencial acaricida (Pontes, Oliveira e Câmara, 2007) e inseticida (Asawalam, Emosairue e Hassanali, 2008; Omotoso, 2008; Habiba et al., 2010) de espécies do gênero *Xylopi*.

Os metabólitos secundários proporcionam, essencialmente, uma interface química entre a planta e o ambiente. Assim, conforme a natureza e a magnitude do estímulo ambiental, uma espécie vegetal poderá sintetizar diferentes compostos devido ao redirecionamento de rotas metabólicas. Dentre os estímulos ambientais associados a alterações quali-quantitativas de metabólitos secundários, ressaltam-se as interações bióticas: planta/micro-organismos, planta/insetos, planta/planta, idade e estágio de desenvolvimento e ritmo circadiano; e os fatores abióticos: luminosidade, temperatura, pluviosidade e estado nutricional, sazonalidade, disponibilidade de água, radiação ultravioleta, composição atmosférica e altitude (Morais, 2009; Gobbo-Neto e Lopes, 2007). Apesar da existência de um controle genético, as variações temporais e espaciais no conteúdo e nas proporções relativas de metabólitos secundários em plantas podem sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos. Alguns estudos em plantas de espécies comercialmente importantes relatam a influência destes fatores na produção de metabólitos secundários, porém, o conhecimento relativo a tais interações é bastante obscuro para plantas de ambiente natural (Gobbo-Neto e Lopes, 2007).

Dentre os diversos fatores que influenciam a síntese de metabólitos secundários, a sazonalidade é um dos mais expressivos com relação às variações na quantidade e natureza dos constituintes ativos das plantas. São relatadas variações sazonais no conteúdo de praticamente todas as classes de metabólitos secundários (Gobbo-Neto e Lopes, 2007). Em estudos realizados com *Salvia officinalis*, a composição química do seu óleo essencial foi

diferente nas estações da primavera e verão (Putievsky, 1986). Ao avaliar quimicamente as folhas de *Daucus carota* durante as quatro estações do ano, os resultados mostraram que as concentrações de flavonoides foram mais elevadas durante a primavera (Brooks e Feeny, 2004). O percentual de glicosídeos primários em folhas de *Digitalis obscura* apresentou variações durante o ano. A menor produção do constituinte foi registrada em maio, seguido por uma rápida acumulação de cardenólídeo no verão, uma fase de diminuição no outono e uma fase estacionária no inverno (Roca-Pérez et al., 2004). Estudos realizados em folhas de *Betula pubescens* L. mostraram conteúdos de elagitaninos significativamente diferentes ao longo do ano (Salminen et al., 2001). Uma população de *Leontodon hispidus* L. mostrou variação sazonal de ácidos fenólicos e de lactonas sesquiterpênicas nas folhas e nos rizomas, respectivamente (Zidorn e Stuppner, 2001).

Em consequência das alterações no conteúdo metabólico em virtude de variações sazonais, as atividades biológicas das plantas, muitas vezes, também são afetadas positiva ou negativamente. O rendimento do extrato metanólico de raízes frescas de Ginseng colhidas no inverno foi duas vezes maior que de raízes coletadas no verão. Este aumento é principalmente, devido ao aumento de sacarose nas raízes no inverno. Por outro lado, a atividade biológica das saponinas do tipo demmarane aumentou no verão. Estes resultados indicam que as raízes devem ser colhidas no verão para a produção de extratos de Ginseng de alta qualidade (Kim et al., 1981). O potencial antimicrobiano e os teores de flavonoides e quinonas dos extratos etanólico e clorofórmico das folhas de *Aloe arborescens* Mill. produzidos em diferentes estações foram avaliados. Apesar de todos os extratos apresentarem ação sobre os micro-organismos testados, variações na concentração inibitória mínima foram observadas nos mesmos extratos de diferentes épocas do ano. Além disso, os teores de quinonas das folhas foram maiores nos períodos mais quentes da coleta (verão e outono), enquanto os teores de flavonoides foram semelhantes nos quatro períodos de coleta (Cardoso, et al., 2010).

Outro fator que acarreta alterações fisiológicas nas plantas, tais como fotossíntese, comportamento estomatal, mobilização de reservas, expansão foliar e crescimento e em consequência, a síntese de metabólitos é o estresse hídrico. Alguns estudos relatam o estresse hídrico como fator de aumento e/ou diminuição na produção de metabólitos secundários (Gobbo-Neto e Lopes, 2007). O teor de saponina em extrato aquoso de frutos de *Phytolacca dodecandra* foi alterado durante as estações seca e chuvosa. Maior teor de saponinas foi encontrado em frutos colhidos durante a estação seca e pouco antes do início da estação

chuvosa (Ndamba, Lemmich e Molgaard, 1994). Em estudos com *Plectranthus amboinicus* (Lour. Spreng, o rendimento de óleo essencial das partes aéreas apresentou correlação positiva com a precipitação (Carneiro et al., 2010). Em *Catharanthus roseus* a formação de alcaloides indólicos foi monitorada sob condições de seca. Os resultados mostraram uma diminuição do rendimento de alcaloide frente ao estresse hídrico (Frischknecht, Battig e Baumann, 1987). Os efeitos de períodos de estresse hídrico sobre o peso seco e o teor de amida e ácido fenólico foram monitorados em raízes de *Echinacea purpurea* (L.) Moench. Uma maior concentração de ácido chicórico e maiores rendimentos das raízes foram evidenciadas em plantas submetidas a breves períodos de seca e o peso seco das raízes. O teor de amida não foi influenciado pelo estresse hídrico, apenas pela idade da planta (Gray et al., 2003). A composição química de plantas de tomate apresentou alteração frente ao estresse hídrico. Os resultados mostraram que polifenol oxidase, rutina e ácido clorogênico aumentaram frente à seca crescente (English-Loeb et al., 2007).

Um dos fatores relevantes que podem influenciar, diretamente, não somente o metabolismo primário, bem como a síntese de metabólitos secundários em plantas é o fator nutricional (Gobbo-Neto e Lopes, 2007). Para o desenvolvimento e manutenção das funções vitais das plantas, são conhecidos dezessete elementos essenciais. São eles, os macronutrientes: nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre; os micronutrientes: boro, cloro, cobre, cobalto, ferro, manganês, molibdênio, zinco e, o carbono, o oxigênio e o hidrogênio, provenientes do ar e da água (Morais, 2009). A escassez ou o excesso de nutrientes disponível para as plantas podem acarretar em maior ou menor produção de princípios ativos nas plantas (Martins et al., 1995).

A relação entre nutrientes e metabólitos, de certo modo, não é totalmente previsível, tendências podem ser reconhecidas, mas não é possível estabelecer regras sólidas e estáveis (Gobbo-Neto e Lopes, 2007). Por exemplo, o teor de alcaloides nas folhas de *Tabernaemontana pachysiphon* foi investigado em três níveis de fornecimento de nutrientes. O aumento da oferta de nutrientes teve um efeito positivo sobre teor de alcaloides (Höft, Verpoorte e Beck, 1996). Segundo (Morais, 2009), o déficit de nitrogênio pode provocar redução no teor de alcaloides totais em *Lobellia inflata* e aumento nos teores de morfina e atropina em *Papaver somniferum* e *Atropa belladonna*, respectivamente. Estudos com *Phyllanthus niruri* L também mostraram uma correlação positiva entre nitrogênio e concentração de alcaloides (Becker et al., 2000). A deficiência de fósforo no solo reduziu a concentração de cumarinas em *Justicia pectoralis* var *stenophylla*, com uma significativa

redução na produção de biomassa e, conseqüentemente, diminuição da produção total do princípio ativo (Martins et al., 1995). Todavia, o fósforo contribuiu para o aumento da concentração de atropina, assim como do teor de óleos essenciais em *Coriandrum sativum* e *Foeniculum vulgare*, respectivamente (Morais, 2009).

A influência de micronutrientes na produção de metabólitos secundários em plantas foi pouco estudada. Em estudo com *Digitalis grandiflora* foi mostrado que o fornecimento de manganês e molibdênio, através do borrifamento das folhas com soluções de sais destes elementos aumentou em mais de duas vezes no conteúdo de heterosídeos cardioativos (Gobbo-Neto e Lopes, 2007). A hipótese de balanço de carbono e nutrientes estabelece uma relação entre a disponibilidade de nitrogênio, carbono e luz, com a síntese de metabólitos secundários em plantas (Bryant, Chapin e Klein, 1983). Várias previsões relacionadas com a hipótese de balanço de carbono e nutrientes foram examinadas. Em folhas de *Dennstaedtia punctilobula*, o nitrogênio do solo não foi correlacionado com fenóis totais, porém, nitrogênio nas folhas foi o fator mais importante na determinação dos níveis de compostos fenólicos. Os resultados mostram que nenhum fator ambiental influenciou a disponibilidade de nitrogênio nas folhas indicando que a integração das plantas combinada com a disponibilidade dos múltiplos recursos determina o balanço de carbono-nitrogênio nos tecidos vegetais e, conseqüentemente, os níveis de defesa química (Dustin, 1992).

As proporções relativas dos princípios ativos, bem como, a quantidade total dos compostos metabólitos podem ser influenciados também pela idade e o desenvolvimento da planta (Morais, 2009). Em *Tanacetum parthenium*, o percentual de partenolídeo foi maior no estágio inicial de desenvolvimento. Porém, no período de floração, o rendimento de partenolídeo aumentou de cerca de 10 mg para 20 mg devido o aumento do número de flores e folhas presentes nas plantas (Hendriks et al., 1997). Em outro estudo com *Lippia alba*, o período de floração e crescimento vegetativo também foram determinantes no rendimento e composição de óleos essenciais (Tavares, et al., 2005). Concentração de camptotecina (CPT) em *Camptotheca acuminata* foi relacionada com idade de suas folhas. Maiores concentrações de CPT foram encontradas nas folhas mais novas que em folhas mais velhas. Ao longo da estação de crescimento, houve um declínio de 11% ao mês na concentração CPT (Carpenter, et al., 1998). O conteúdo de lactonas sesquiterpênicas em plântulas de *Arnica montana* foram analisados tanto quantitativamente como qualitativamente. As plantas jovens acumularam, principalmente, derivados de helenalina. Após seis semanas do início da formação das folhas, o conteúdo de helenalina diminuiu drasticamente chegando a quase zero, enquanto que o de

diidrohelenalina aumentou na mesma proporção permanecendo constante por um longo período (Schmidt, Bomme e Alfermann, 1998). Em estudo com *Papaver somniferum* maior acúmulo de alcaloides em tecidos da raiz foi observado no 30º dia após a germinação onde a morfina e narcotolina atingiram concentrações de 313µg/g e 490µg/g, respectivamente (Williams e Ellis, 1989). A quantidade dos componentes metabólitos de *Gentiana lutea* variou conforme o estágio de desenvolvimento das plantas. Na fase de floração, as folhas foram ricas em C-glicosídeos, enquanto que O-glicosídeos foram acumulados antes da floração (Menkovic, Savikin-Fodulovic e Savin, 2000).

A espécie *X. sericea* (Figura 1) utilizada neste estudo com o intuito de avaliar a influência dos fatores ambientais na composição química e nas respectivas bioatividades é uma planta arbórea, conhecida popularmente como pimenteira, pindaíba, embireira e pimenta-do-sertão, dentre outros (Lorenzi, 2002). Sua ocorrência abrange o Distrito Federal, os Estados da Bahia, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, incluindo o estado de Tocantins (Maas et al., 2001). No Espírito Santo, a *X. sericea* é comumente encontrada na Mata de Tabuleiro, na restinga e entre seus ecótonos (Leite, Lopes e Pereira, 2007; Lobão, Araujo e Kurtz, 2005). Caracteriza-se por apresentar fruto apocárpico ou pseudo-sincárpico. Flor axilar, caulinar ou em ramo flageliforme. Carpídios deiscentes. Estaminódios presentes. Botão estreitamente piramidal. Anteras septadas transversalmente. Carpídios elipsoides Flores axilares. Lâminas foliares 7-10,5 x 1-2 cm, estreitamente elípticas, glabras na face adaxial, densamente cobertas por tricomas adpressos na face abaxial (Lobão, Araujo e Kurtz, 2005) (Figura 2).



Figura 1. *X. sericea* fotografada na área do campus UFES/CEUNES.



Figura 2. Frutos e ramos de *X. sericea* (Fonte: Encyclopedia of Life).

Economicamente, a *X. sericea* se destaca devido ao uso das cascas da madeira na indústria caseira de cordoaria. As sementes aromáticas e carminativas são usadas como condimento, substituindo a pimenta do reino. A espécie pode ser usada em paisagismo devido ao porte e beleza da árvore, bem como em plantios de áreas degradadas por ser tratar de uma planta adaptada a terrenos secos, de baixa fertilidade e produtoras de frutos comestíveis para pássaros (Lorenzi, 2002). Na medicina popular, a infusão dos frutos de *X. sericea* é utilizada no tratamento de perturbações gástricas (Corrêa, 1987).

A maioria dos estudos relacionados com a composição química de *X. sericea* se restringem apenas aos compostos voláteis. A Figura 3 apresenta tais compostos isolados em *X. sericea*. (Craveiro e Alencar, 1986; Takahash, Vieira e Boaventura, 2001).

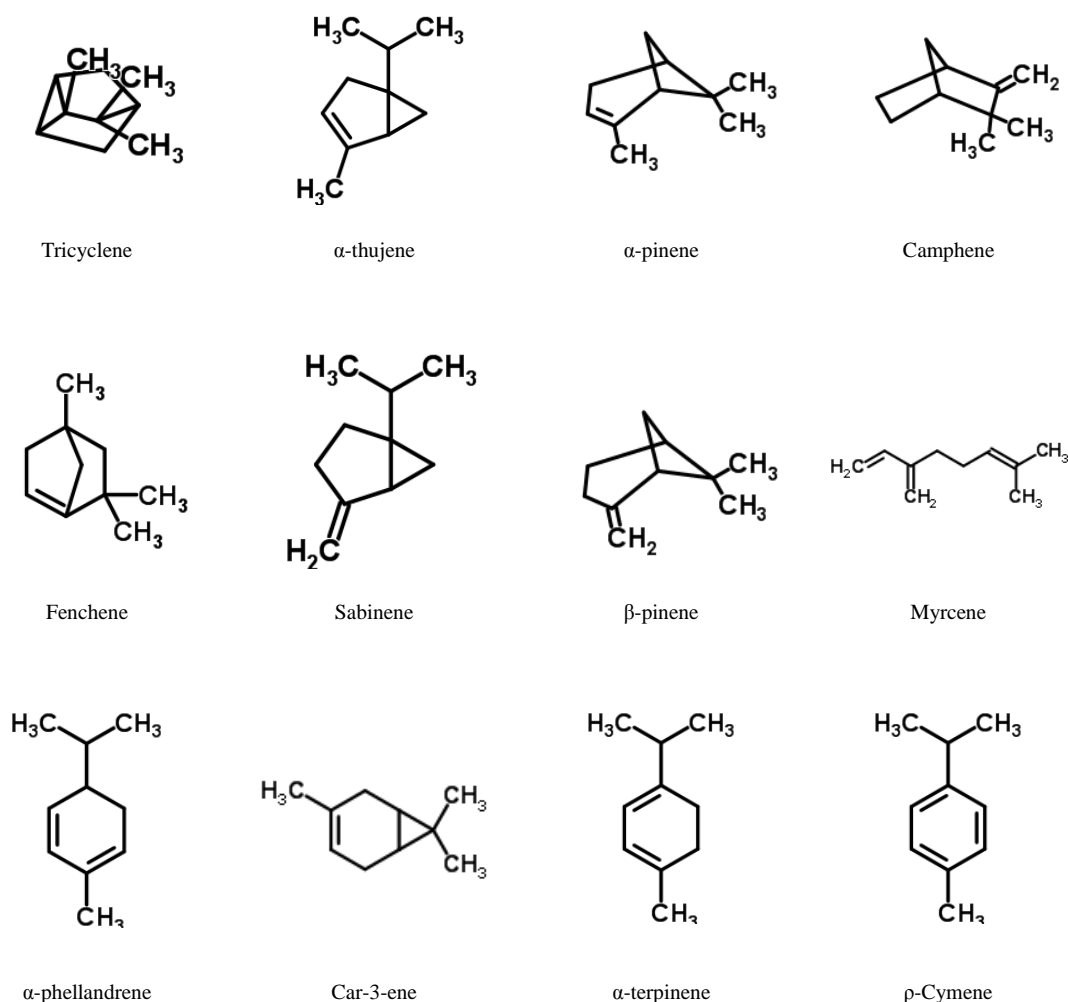
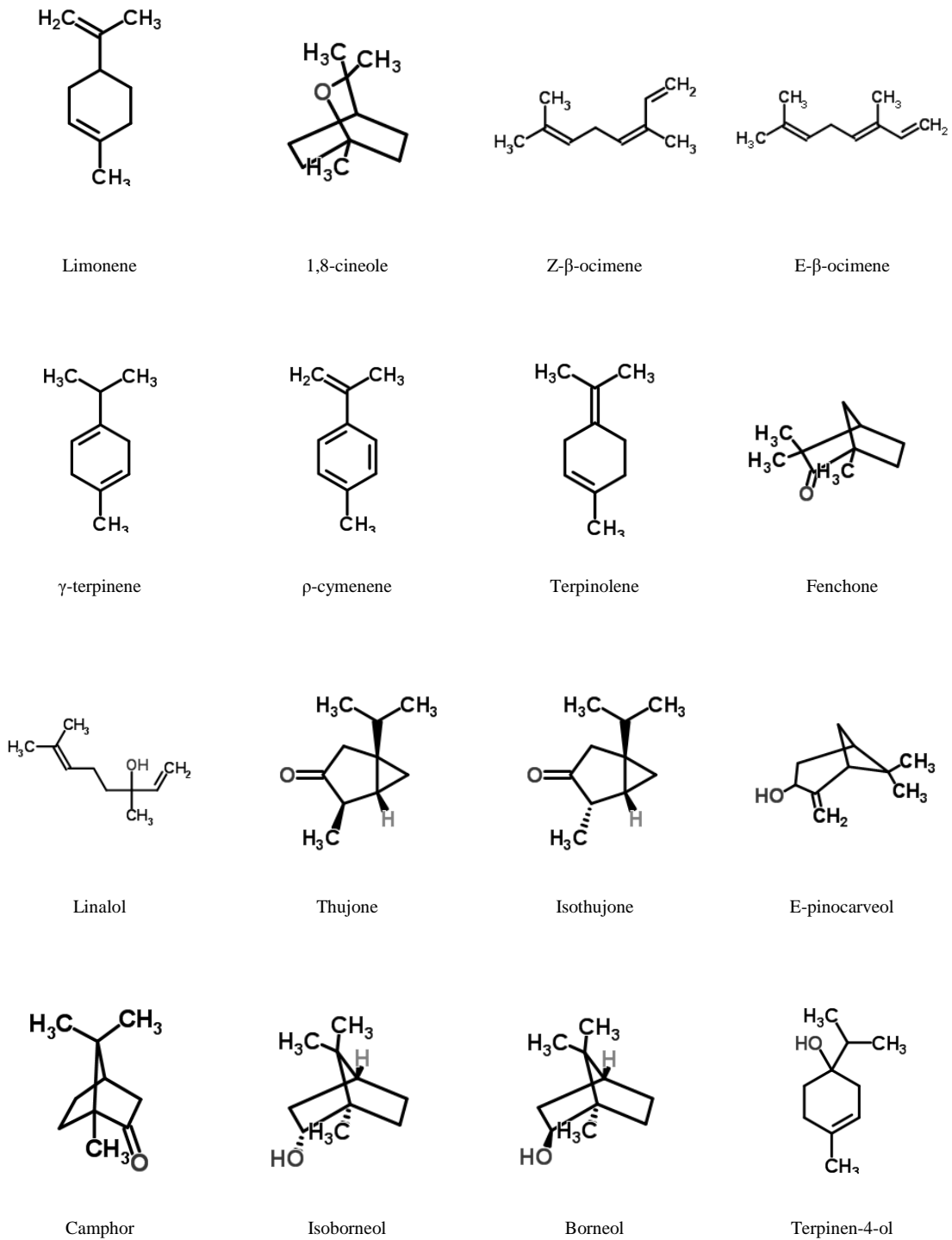
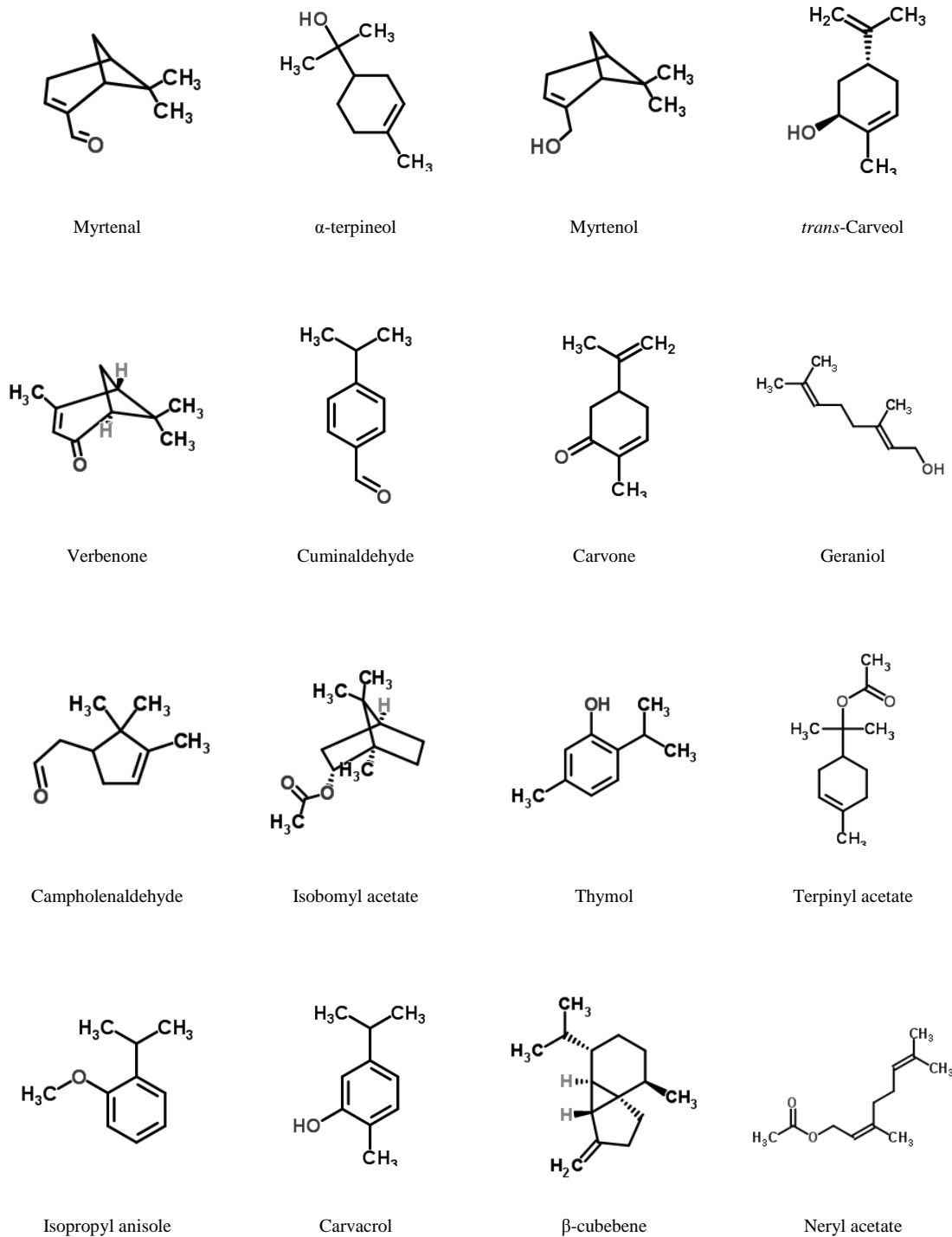


Figura 3. Compostos químicos isolados a partir de óleo essencial de *X. sericea*.

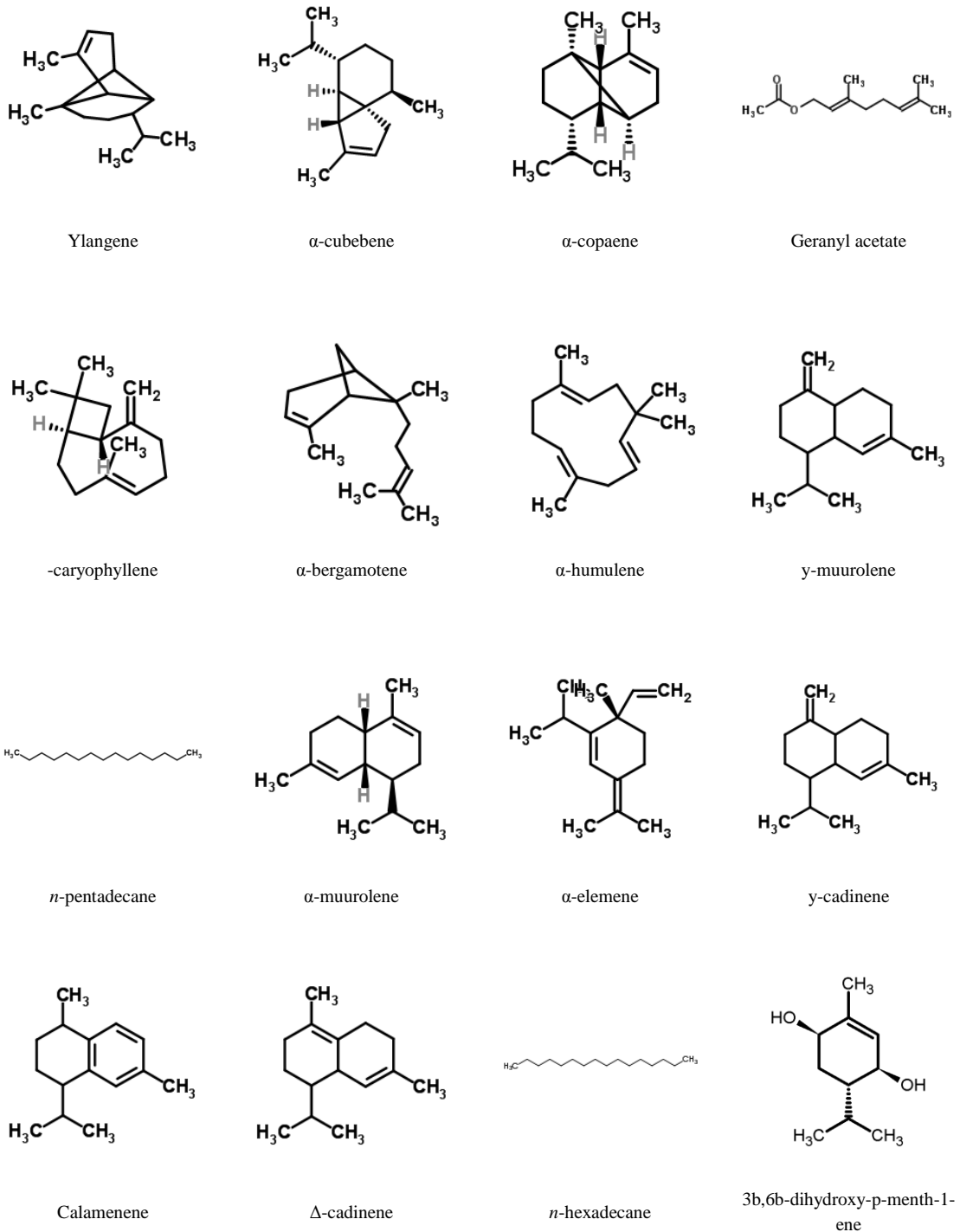
(continuação)

**Figura 3.** Compostos químicos isolados a partir de óleo essencial de *X. sericea*.

(continuação)

**Figura 3.** Compostos químicos isolados a partir de óleo essencial de *X. sericea*..

(continuação)

**Figura 3.** Compostos químicos isolados a partir de óleo essencial de *X. sericea*.

(continuação)

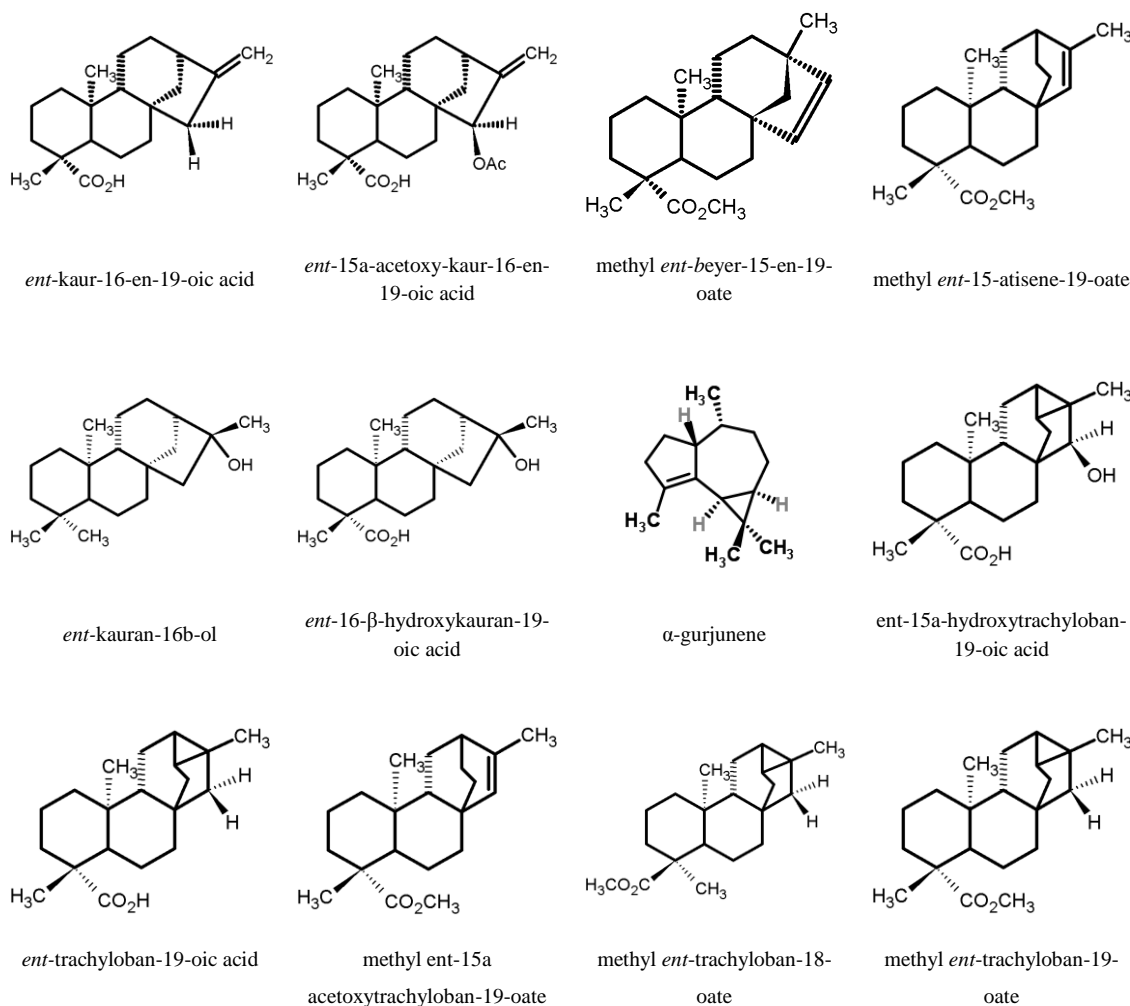


Figura 3. Compostos químicos isolados a partir de óleo essencial de *X. sericea*.

O primeiro relato químico dos óleos essenciais da espécie *X. sericea* identificou 88,57% da composição total do óleo, juntamente com 9,83% de moléculas identificadas apenas por fórmulas moleculares e 1,60% não identificado. Entre os compostos identificados por fórmulas moleculares, apenas dois foram alcoóis sesquiterpenos em concentrações relativamente elevadas (4,45 e 2,61%) (Craveiro e Alencar, 1986). Em outro estudo, um monoterpeno foi isolado das sementes de *X. sericea* juntamente com quatro kauranos, um beyereno, um atiseno e quatro diterpenóides traquilobânicos, incluindo um éster (Takahash, Vieira e Boaventura, 2001). Ao avaliar a composição química do óleo essencial da casca da raiz *X. sericea*, os resultados mostraram que os maiores constituintes foram p-cimeno (22,8%) e α -gurjuneno (13,8%) (Fournier et al., 1994). A análise dos óleos hidrolisados das raízes, tronco, folhas e frutos de *X. sericea* permitiu a identificação de 39 constituintes diferente, sendo nas raízes 38,4% de monoterpenos, 13,7% de diterpenos e 46,8% de sesquiterpenos; no

troco, 68,6% de monoterpenos e 27,4% de sesquiterpenos; nas folhas 24,0% de monoterpenos e 57,9% de sesquiterpenos; e frutas 74,8% de monoterpenos e 20,8% de sesquiterpenos (Alencar e Silveira, 1996). Estudos avaliando a composição dos óleos essenciais de frutos e folhas de *X. sericea* apresentaram como constituintes majoritários monoterpenos e sesquiterpenos, sendo que 57,43% de cubenol e 26,09% de α -epi-muurolol foram os principais compostos encontrados nas folhas, enquanto 45,59% de β -pineno e 17,18% α -pineno foram os componentes principais dos frutos (Pontes, Oliveira e Câmara, 2007).

Com relação às potencialidades bioativas de *X. sericea* alguns poucos estudos apontam atividade acaricida (Pontes, Oliveira e Câmara, 2007), bacteriostática e fungistática (Fournier et al., 1994) e alelopática (Borges et al., 1987). Atividade acaricida dos óleos essenciais de folhas e frutos de *X. sericea* foram testados frente ao ácaro *Tetranychus urticae* Koch. O óleo das folhas foi mais ativo que os frutos mostrando um valor de LC₅₀ de 4,08 mL/L por um período de 72 h (Pontes, Oliveira e Câmara, 2007). Em estudo com os constituintes majoritários do óleo essencial da casca da raiz de *X. sericea* apontaram moderadas atividades bacteriostática e fungistática (Fournier et al., 1994). O extrato fenólico das sementes de *X. sericea* foi observado quanto à sua influência na inibição de semente de alface. Os resultados mostraram que as sementes de alface germinadas, tanto em água como em solução de ácido giberélico por três dias, paralisaram o crescimento do hipocótilo logo após o contato com o extrato fenólico de *X. sericea* (Borges et al., 1987).

Como pode ser observado, os compostos fenólicos, na espécie *X. sericea*, são ainda pouco conhecidos. No entanto, a literatura mostra que ações biológicas são relacionadas aos compostos fenólicos, principalmente, quando se trata dos flavonoides. Assim, estudos com o objetivo de verificar tanto a composição química, bem como suas potencialidades bioativas em *X. sericea* são fundamentais para o conhecimento das propriedades terapêuticas da espécie.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Áreas de Estudo

As partes aéreas de *X. sericea* foram coletadas em duas áreas distintas, denominadas “A” e “B”, sendo a área “A” localizada no *Campus* da CEUNES/ UFES (24 K 409141 7935248 UTM) e a área “B” no Parque de Itaúnas (24 K 424856 7965387 UTM).

4.1.1 Área “A” – Campus da UFES/CEUNES

A área denominada “A” se refere à Área de Preservação Permanente (APP) do *campus* da CEUNES/UFES, município de São Mateus/ES. Esta área foi selecionada em função da notória pressão antrópica a qual foi recentemente submetida, sendo caracterizada pela presença predominante de espécimes da família das gramíneas, constituindo-se assim como área característica de pastagem. Ademais, destaca-se que parte da área “A” foi constituída pela presença de fragmento florestal de mata ciliar, sendo evidenciada a fitofisionomia de Mata de Tabuleiro (Leite, Lopes e Pereira, 2007), entremeada por diversas espécies invasoras (e.g. *Eucalyptus* sp.). O clima de São Mateus é caracterizado por seco subúmido. A temperatura média anual varia entre 25°C a 30°C, no verão e 19°C a 21°C, no inverno. O índice de precipitação pluviométrica anual varia entre 1400 e 1500 mm, sendo as chuvas mais fortes nos meses de outubro a abril perfazendo aproximadamente 75% da precipitação total anual. A topografia da região é plana, predominando o latossolo vermelho amarelo distrófico, com fertilidade de média à baixa.

4.1.2 Área “B” – Parque de Estadual de Itaúnas

A área denominada “B” foi selecionada no âmbito do Parque Estadual de Itaúnas, distrito de Itaúnas, zona rural do Município de Conceição da Barra, na microrregião do Litoral Norte do Espírito Santo. Para a coleta do material vegetal, o projeto foi amparado legalmente com a autorização do Instituto Estadual do Meio Ambiente (IEMA).

O Parque Estadual de Itaúnas, segundo o disposto no Decreto no 4.967-E, de 08 de novembro de 1991 possui 3.150 hectares de extensão. A fitofisionomia do Parque apresenta ambientes de mata de tabuleiro, restinga, dunas, estuarinos de mangues. Há uma rica diversidade de espécie tanto da fauna como da flora. Foram registradas mais de 414 diferentes espécies vegetais, 43 de mamíferos, 183 de aves, 32 de répteis, 29 de anfíbios e 101 de peixes (Plano de manejo do Parque Estadual de Itaúnas, 2004).

O clima da região caracteriza-se por quente e úmido, tipo Am de Köppen. A temperatura média anual é de aproximadamente 23,8°C variando de 27,1°C a 20,4°C. A precipitação média anual é cerca de 1.408 mm (Plano de manejo do Parque Estadual de Itaúnas, 2004).

4.2 Amostragem do material vegetal

Em cada área foram marcadas 10 plantas para amostragem ao acaso. As plantas de cada área foram devidamente identificadas com etiquetas numeradas de 1 a 10. A amostragem foi realizada nos meses de setembro/2010 e janeiro/2011, tendo como características marcantes um período seco e um chuvoso, respectivamente. O material vegetal foi composto pelas partes aéreas das plantas, as quais foram colhidas aleatoriamente. Parte do material vegetal foi utilizada para confecção de exsicata que foi depositada no Herbário da UFES com número de tombo 23002.

4.3 Preparação das amostras

As folhas de *X. sericea* foram separadas do matéria vegetal coletado e, posteriormente, submetidas à dessecação por aproximadamente sete dias em temperatura ambiente. Após a dessecação, o material vegetal seco foi pulverizado em moinho de facas tipo Willey. O material pulverizado foi acondicionado separadamente e mantido sob refrigeração em geladeira à 10° C.

4.4 Amostragem do solo

A metodologia de amostragem do solo foi baseada em Malavolta e colaboradores, 1997. Para a determinação da área de amostragem considerou-se as áreas próximas às plantas de *X. sericea*. Antes da coleta do solo, a área foi ligeiramente limpa na superfície, afastando-se apenas os detritos não decompostos como palha, pedaços de pau, dentre outros. Em cada ponto foi coletado com o auxílio de amostrador tipo sonda e marreta, solo em duas profundidades: 0 a 20 cm e 20 a 40 cm, totalizando cerca de 300 gramas de amostras. As amostras foram devidamente homogeneizadas em baldes e acondicionadas em sacos plásticos etiquetados.

4.5 Avaliação de fatores ambientais

4.5.1 Análise química do solo

As amostras de solo foram enviadas ao Laboratório de Solos do CEUNES/UFES para avaliação da qualidade nutricional do solo, pH e teor de matéria orgânica. Desta maneira, foram analisados os macronutrientes e micronutrientes do solo. O fósforo, o potássio, o sódio, o ferro, o manganês, o zinco e o cobre foram quantificados através do método de extração MEHLICH 1 ($\text{HCl } 0,05 \text{ mol L}^{-1} + \text{H}_2\text{SO}_4 \text{ } 0,0125 \text{ mol L}^{-1}$). O cálcio, o magnésio e o alumínio, através do método de extração $\text{KCl } 1 \text{ Mol/L}$. O H^+Al , através do método de titulação com NaOH . O pH em H_2O (1:2,5) e a matéria orgânica foram analisados baseado na metodologia estabelecida pela EMBRAPA (EMBRAPA, 1999).

4.5.2 Caracterização das fases de desenvolvimento das plantas

As 10 plantas de cada área foram mensuradas quanto à altura e a circunferência na altura do peito (CAP). A altura das plantas foi estimada através de marcações previamente convencionadas no podão e a CAP foi medida com fita métrica.

4.6 Obtenção dos extratos

Para a obtenção dos extratos etanólicos foram utilizados 300 mL de álcool etílico à 95-99% em 50 gramas do material pulverizado oriundo das folhas das dez cada planta amostrada nas diferentes áreas e estações. O processo de maceração passiva perdurou por 15 dias consecutivos, sendo que a cada cinco dias, o sobrenadante foi filtrado e o extrato foi novamente embebido em etanol. O solvente foi eliminado sob vácuo, através de evaporador rotatório à temperatura de 85°C . Os extratos brutos obtidos foram conservados em baixa temperatura (-10°C). Para cada área de coleta e para as diferentes estações do ano, os extratos etanólicos foram codificados conforme a Tabela 1.

Para obtenção de um único extrato etanólico e de acetato de etila foram separadas cinco plantas, escolhida aleatoriamente, de cada área (A e B) e época do ano (seca e chuvosa). Para o processo de maceração, conforme descrito acima, porcentagens iguais das cinco plantas foram misturadas em um único recipiente. Além disso, a partir deste extrato etanólico foi realizado uma extração seletiva para alcaloide obtendo-se um extrato alcaloídico. A tabela 2 codifica os extratos etanólico, acetato de etila e alcaloídico obtidos nas diferentes estações e áreas.

Tabela 1. Codificação dos extratos etanólicos obtidos a partir das folhas de *X. sericea* coletadas nas estações seca e chuvosa e nas áreas A e B.

Área	Plantas	Estação seca	Estação Chuvosa
A	1	AS ₁	ACh ₁
	2	AS ₂	ACh ₂
	3	AS ₃	ACh ₃
	4	AS ₄	ACh ₄
	5	AS ₅	ACh ₅
	6	AS ₆	ACh ₆
	7	AS ₇	ACh ₇
	8	AS ₈	ACh ₈
	9	AS ₉	ACh ₉
	10	AS ₁₀	ACh ₁₀
B	1	BS ₁	BCh ₁
	2	BS ₂	BCh ₂
	3	BS ₃	BCh ₃
	4	BS ₄	BCh ₄
	5	BS ₅	BCh ₅
	6	BS ₆	BCh ₆
	7	BS ₇	BCh ₇
	8	BS ₈	BCh ₈
	9	BS ₉	BCh ₉
	10	BS ₁₀	BCh ₁₀

Tabela 2. Codificação dos extratos etanólico, acetato de etila e alcaloídicos obtidos a partir das cinco plantas escolhidas, aleatoriamente, nas estações seca e chuvosa e nas áreas A e B.

Tipo de extratos	Área	Estação	Código
Etanólico	A	Chuvosa	ET ₁
		Seca	ET ₂
	B	Chuvosa	ET ₃
		Seca	ET ₄
Acetato de etila	A	Chuvosa	AC ₁
		Seca	AC ₂
	B	Chuvosa	AC ₃
		Chuvosa	AC ₄
Alcaloídico	A	Seca	AL ₁
		Chuvosa	AL ₂
	B	Seca	AL ₃
		Chuvosa	AL ₄

Todos os extratos etanólicos descritos na Tabela 1 foram monitorados por cromatografia de camada delgada utilizando solventes de diferentes polaridades e reveladores específicos para detecção dos tipos classes de metabólitos secundários.

4.7 Rendimento dos Extratos

Para a determinação da quantidade de extrato obtido (extrato total), para cada planta, foi utilizada a equação $TEA (\%) = \frac{M_f}{M_i} \times 100$. Onde TEA = teor do extrato total (%); M_i = massa inicial da amostra (g), M_f = massa final do extrato seco (g).

4.8 Triagem farmacognóstica a partir dos extratos obtidos

Os extratos etanólicos obtidos das plantas descritas na Tabela 1 foram submetidos à triagem farmacognóstica segundo Costa (1982; 1986) para detectar os tipos de substâncias presentes nas espécies em estudo e, a partir daí, analisar as atividades biológicas relacionadas. Para cada tipo de metabólito há reações específicas que indicam sua presença a partir de alteração ou formação de cor, espuma, fluorescência ou precipitado. Nesses testes foi avaliado a presença de flavonoides, triterpenos, esteroides, naftoquinonas, saponinas, heterosídeos antracênicos, taninos e alcaloides segundo metodologias descritas abaixo.

4.8.1 Determinação de Flavonoide

4.8.1.1 Reação de Cianidina

Uma pequena porção dos extratos etanólicos foi diluída e colocada em tubos de ensaios distintos. Em 1 mL de extrato etanólico diluído foi acrescentado 1 mL de HCl concentrado e fragmentos de zinco em pó. Observaram-se os resultados após a finalização da reação.

4.8.1.2 Reação de $AlCl_3$

Em cápsula de porcelana foi adicionado 1 mL de extrato diluído e gotas de $AlCl_3$ à 2% em etanol. As cápsulas foram aquecidas em bico de Bunsen até completa evaporação do extrato. Posteriormente, a coloração das cápsulas foi observada em luz ultravioleta. O procedimento descrito acima foi realizado separadamente com todos os extratos obtidos.

4.8.2 Determinação de Cumarinas

Aplicou-se, separadamente, uma gota de cada um dos extratos etanólicos diluído em um pedaço de papel filtro. Após a secagem, o papel foi exposto sob luz ultravioleta para observação de manchas fluorescentes. Posteriormente, encima de cada uma das gotas anteriormente aplicadas foi adicionada uma gota de KOH à 10%. Após a secagem, o papel foi novamente levado à luz ultravioleta para observação.

4.8.3 Determinação de Alcaloides

Em tubos de ensaios separados foi colocado 1 mL do extrato etanólico diluído e adicionado 1 mL de HCl. Posteriormente, acrescentaram-se gotas de reagente Dragendorff a fim de observar a formação de precipitado laranja. O procedimento descrito acima foi realizado separadamente com todos os extratos obtidos.

4.8.4 Determinação de Saponinas

Diluiu-se 20 mL do extrato etanólico previamente diluído em 15 mL de água destilada. A fim de deixar os extratos com pH neutro foi adicionado 1 mL de solução de carbonato de sódio saturada. A mistura foi aquecida até à ebulição. Após o resfriamento, filtrou-se a mistura com algodão separando cerca de 2 mL do filtrado numa proveta com tampa. Completou o volume com água destilada para 100 mL e agitou fortemente a proveta vedada com o dedo polegar durante 50 segundos. Após o repouso, observou-se o aparecimento de espuma persistente com mais de 1 cm de altura.

4.8.5 Determinação de Esteroides e Triterpenos

Pequena porção dos extratos etanólicos foram lavados em clorofórmio, separadamente, de modo a obter 3 mL da solução clorofórmica filtrada de cada extrato. Em tubos de ensaios, adicionou ao filtrado, 2 mL de anidrido acético. Agitaram-se suavemente os tubos e posteriormente, adicionou-se 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Após a finalização da reação a coloração da mistura foi observada.

4.8.6 Determinação de Heterosídeos antraquinônicos

Em béqueres separados colocou-se 1 mL de cada um dos extratos descritos na Tabela 1 diluídos com 20 mL de solução aquosa de H₂SO₄ 10%. A mistura foi aquecida até a ebulição. A seguir, a mistura foi filtrada com algodão. O filtrado foi agitado em funil de separação com 7 mL de éter etílico. As camadas, aquosa e orgânica, foram separadas em tubos de ensaio. Adicionou-se, lentamente, no fundo de cada tubo 2 mL de solução aquosa de KOH 0,5 M. Após a finalização da reação foi observada a coloração das misturas.

4.8.7 Determinação de Naftoquinonas

Em tubos de ensaios colocou-se, separadamente, 3 mL dos extratos etanólicos diluídos em clorofórmio. Foi adicionado 2 mL de solução de NH_4OH . Os tubos foram agitados vigorosamente deixando separar em duas fases distintas. Observou-se a coloração da camada aquosa. O procedimento descrito acima foi realizado separadamente com todos os extratos obtidos.

4.8.8 Determinação de Tanino

4.8.8.1 Reação de Polifenóis

Colocou-se em tubos de ensaios, distintos, 2 mL de cada um dos extratos etanólicos previamente diluídos e se acrescentaram 3 gotas de FeCl_3 2% do kit Quibasa. Após o final da reação a coloração da mistura foi observada.

4.9 Obtenção dos extratos de Acetato de Etila

O material vegetal pulverizado oriundo das cinco plantas escolhidas, aleatoriamente, nas diferentes áreas e estações foi submetido à extração por maceração com acetato de etila. O solvente foi eliminado sob vácuo, obtendo-se os extratos AC_1 , AC_2 , AC_3 e AC_4 (Tabela 2).

4.10 Extração seletiva para Alcaloides

Os extratos etanólicos ET_1 , ET_2 , ET_3 e ET_4 (Tabela 2) foram submetidos à extração seletiva de alcaloides conforme Simões (Simões, 2003). Foram pesados 1,0 g destes extratos e, posteriormente, adicionou-se 10 ml de solução H_2SO_4 1,5%. O valor do pH aferido foi aproximadamente 2. A solução foi agitada através de agitador magnético por uma hora. Após decantação, o sobrenadante foi filtrado. Para basificar o filtrado adicionou-se, aproximadamente, 1 mL de NH_4OH até atingir pH entre 7 e 8. A solução foi colocada em funil de separação para lavagem com clorofórmio. O procedimento foi executado por três vezes sendo utilizados 20 mL de clorofórmio em cada lavagem. Assim, fase orgânica foi separada da fase aquosa. O clorofórmio foi evaporado em rota vapor e os extratos alcaloídicos (AL_1 , AL_2 , AL_3 e AL_4) foram vertidos em placas previamente pesadas para estimar os respectivos rendimentos.

4.10.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O objetivo do trabalho utilizando CLAE foi determinar o perfil cromatográfico dos extratos etanólicos descritos na Tabela 1, bem como, identificação dos componentes presentes nas amostras. Após um estudo através de CCD utilizando sílica gel e diversos sistemas de solventes e reveladores, concluiu-se que a maioria das substâncias presentes nos extratos se referia a flavonoides. O trabalho experimental constituiu em encontrar uma metodologia de análise dos padrões de flavonoides e dos extratos obtidos, adequação das condições e verificação da reprodutibilidade dos resultados.

Para avaliação química dos extratos etanólicos brutos foram preparadas amostras dissolvidas para a concentração de 1,0 mg/mL, em solvente grau HPLC e posteriormente filtradas em microfiltro Millipore Millex-HV 0,45 µm. A análise em HPLC foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência marca HP (Hewlett Packard), série 1090, equipado, bomba injetora automática e detector do tipo “UV-diodo array”. Para a separação dos compostos foi utilizada coluna cromatográfica de fase reversa RP-18 (5µm) LiChroCART, com dimensões de 125 x 4 mm, Merck.

A identificação dos flavonoides presentes nas amostras foi realizada através da comparação de tempos de retenção de padrões analíticos. A separação dos constituintes presentes nas amostras foi efetuada utilizando-se um gradiente de eluição de água deionizada em sistema Milli-Q (Solvente A) e acetonitrila (Solvente B), conforme apresentado na Tabela 3. O fluxo da fase móvel foi mantido constante em 1 mL/min.

Tabela 3. Condições cromatográficas para análise dos extratos etanólicos de *X. sericea*.

Tempo (min)	Bomba A (Água)	Bomba B (Acetonitrila)
0	95%	5%
10	95%	5%
20	50%	50%
30	20%	80%
35	95%	5%

4.11 Ensaios biológicos

4.11.1 Testes de toxicidade frente à *Artemia salina*

O teste de letalidade das larvas de *A. salina* foi realizado de acordo com o método de Meyer (Meyer et al., 1982). Os ovos encistados de *A. salina* foram incubados em água marinha

artificial. A cultura foi mantida a 28°C, sob luz e aeração constantes. Para a realização do teste, as amostras dos extratos etanólicos ET₁, ET₂, ET₃ e ET₄ (Tabela 2) foram dissolvidas em 0,2 mL de DMSO e completadas a solução com 20 mL de água marinha artificial. Dessa solução foram preparadas diluições seriadas, em triplicata. Larvas em estágio metanauplii (10 unidades) foram adicionadas a cada tubo contendo as diluições e as culturas foram incubadas por 24 horas. Controles contendo DMSO (dimetilsulfóxido) e K₂Cr₂O₇ (dicromato de potássio) + DMSO foram incluídos no teste (controles negativo e positivo, respectivamente), pois sabidamente são tóxicos para a *A. salina*. Os valores de DL₅₀ foram determinados em µg/mL, utilizando o programa PROBITOS.

4.11.2 Avaliação da atividade antifúngica contra fungos fitopatológicos

A atividade antifúngica de *X. sericea* foi testada frente ao fungo *Colletotrichum musae* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Os fungos foram coletados diretamente do material doente e identificados no laboratório de fitopatologia do CEUNES/UFES.

4.11.2.1 Avaliação da atividade antifúngica frente à *C. musae*

Para o teste antifúngico frente *C. musae*, foram pesados 30mg dos extratos etanólicos descritos na Tabela 1 e dissolvidos, separadamente, em 150 µL de DMSO. Posteriormente, tal solução foi adicionada em 30 mL de meio batata dextrose ágar (BDA) fundente e vertido em placas de Petri, obtendo-se a concentração final de 1000 ppm de cada extrato. Após a solidificação do meio, discos de micélio com diâmetro de 0,6 cm, provenientes de cultura de *C. musae*, foram colocados no centro das placas. As placas com os discos permaneceram em câmara de desenvolvimento biológico (BOD) à 28°C, por 72 horas e em seguida procedeu-se a medição do crescimento radial das colônias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e com três repetições. Para testemunha foi utilizado o grupo controle contendo apenas o fungo de interesse. Os resultados foram avaliados por meio do teste de Tukey ($p \geq 0,05$). Os extratos de acetato de etila AC1, AC2, AC3 e AC4 (Tabela 2) foram testados frente à *C. musae* conforme método descrito acima. Ademais, os extratos Alcaloídicos AL1, AL2, AL3 e AL4 (Tabela 2) também foram avaliados quanto à atividade antifúngica frente ao fungo *C. musae*. Para isso, as amostras foram testadas nas concentrações de 200 ppm, 533,3 ppm, 400 ppm e 233,3 ppm, respectivamente.

4.11.2.2 Avaliação da atividade antifúngica frente à *C. gloeosporioides*

Para o teste antifúngico frente *C. gloeosporioides*, os extratos etanólicos ET₁, ET₂, ET₃ e ET₄ (Tabela 2) e os extratos acetato de etila AL₁, AL₂, AL₃ e AL₄ (Tabela 2) foram testados nas mesmas condições metodológicas descrita para o teste com *C. musae*.

4.11.3 Avaliação da antifúngica frente à *Candida albicans*

A atividade antifúngica dos extratos etanólicos ET₁, ET₂, ET₃ e ET₄ (Tabela 2) e os extratos de acetato de etila AC₁, AC₂, AC₃ e AC₄ (Tabela 2) foi testada através da técnica de difusão em disco, utilizando-se os meios de cultura ágar Sabouraud e ágar Mueller-Hinton. O inóculo de *C. albicans* foi preparado através da realização de suspensão de células da levedura com 48 horas de incubação. A padronização do inóculo foi feita pelo acerto da transmitância 85 a 90% em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 530 nm. 100 µL do inóculo foram semeados na superfície de cada placa com os meios de culturas citados, espalhando com o auxílio de um swab estéril até que toda a superfície da placa tenha sido homogeneamente recoberta com o inóculo. Com o auxílio de uma pinça previamente flambada, os discos de papel filtro com uma distância aproximada de 4 cm um do outro foram delicadamente dispostos na placa. Em cada disco foi então aplicado com 8 µL de cada extrato vegetal, incluindo um controle positivo (droga azólica, fluconazol na concentração de 64 µg/mL, considerada CIM (Concentração Inibitória Mínima) suficiente para inibir cepas de *C. albicans* sensíveis a esta droga. Foi também incluída a aplicação de álcool etílico, como controle negativo, por ser o solvente utilizado no preparo de alguns extratos. As placas foram incubadas e após 24 horas em estufa a 37°C e, posteriormente, foram realizadas as leituras do halo de inibição com auxílio de paquímetro. A realização do teste de difusão em disco para os extratos foi feita após o preparo de 5 (cinco) diluições de cada extrato que foram diluídos nas 1:100 (A), 1:200 (B), 1:1000 (C), 1:5000 (D) e 1:10000 (E).

4.11.4 Avaliação de atividade alelopática frente à semente de *Allium cepa*

A atividade alelopática do extrato fenólico de *X. sericea* já é reconhecida, em literatura, frente à sementes de alface. Portanto, este estudo realizou teste alelopático com os extratos etanólicos ET₁, ET₂, ET₃ e ET₄ (Tabela 2) de *X. sericea*, a fim de avaliar a atividade alelopática dos mesmos frente à sementes de *A. cepa*, cultivar Baia Periforme (cebola). Para isso, foram realizados quatro tratamentos com diferentes concentrações: 0,6 mg/mL, 0,3 mg/mL, 0,1mg/mL e água destilada como controle negativo (CN). As sementes de cebola

foram acondicionadas em placas de Petri forradas com papel filtro e embebidas diretamente em extrato vegetal nas diferentes concentrações e em água destilada. As placas foram mantidas em temperatura ambiente e umidificadas com as respectivas soluções dos extratos vegetais, sempre que necessário. O número de sementes germinadas foi contado a partir do primeiro dia da implantação do experimento até o décimo segundo dia, sempre no mesmo horário. O teste de primeira contagem foi realizado no sexto dia após o início do experimento (Souza, 2005). Ao final do décimo segundo dia as sementes que, visivelmente, apresentaram a protusão da radícula através do tegumento (Adegas, Voll, e Prete, 2003; Alves et al., 2004) foram medidas através de régua graduada em mm, com o objetivo de verificar o efeito alelopático dos extratos sobre o crescimento da raiz. O índice de velocidade da germinação (IVG) foi calculado segundo a fórmula de Maguire (Maguire, 1962). Para o cálculo da porcentagem de germinação (G) utilizou-se a fórmula de acordo com Labouriau e Valadares (1976). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com duas repetições de 50 sementes cada. A comparação entre as médias foi feita utilizando o teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para facilitar a leitura dos tratamentos nas análises estatísticas os extratos foram codificados conforme a Tabela 4.

Tabela 4. Codificação dos tratamentos do teste alelopático.

Extrato	Concentração mg/ml	Código
ET ₁	0,6	ET _{1,6}
ET ₁	0,3	ET _{1,3}
ET ₁	0,1	ET _{1,1}
ET ₂	0,6	ET _{2,6}
ET ₂	0,3	ET _{2,3}
ET ₂	0,1	ET _{2,1}
ET ₃	0,6	ET _{3,6}
ET ₃	0,3	ET _{3,3}
ET ₃	0,1	ET _{3,1}
ET ₄	0,6	ET _{4,6}
ET ₄	0,3	ET _{3,3}
ET ₄	0,1	ET _{3,1}
Controle	0,0	C

4.11.5 Avaliação da atividade antimicrobiana frente à *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

O potencial antimicrobiano dos extratos etanólicos ET1, ET2, ET3 e ET4 (Tabela 2) e acetato de etila AC1, AC2, AC3 e AC4 (Tabela 2) de *X. sericea* foi testado frente às bactérias *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 25923. O teste foi preparado com 0,2 mg dos extratos

dissolvidos em 200 μ L de DMSO. As cepas foram repicadas em meio Plate Count Agar (PCA) e incubadas à 35°C por 24 horas antes do teste. Para o preparo do inóculo, as culturas jovens de cada bactéria foram suspensas em solução salina estéril. Alíquotas de 0,2 mL de cada suspensão foram adicionadas em placa de Petri contendo 20 mL de Agar Mueller Hinton solidificado. Com alça de Drigalski suspensão foi delicadamente uniformizada por toda a placa. Discos de papel estéreis embebidos com os extratos foram inseridos no meio de cultura. As placas foram mantidas à temperatura de 35°C por 24 horas para o crescimento das cepas. O teste foi realizado em triplicatas. Após o período de incubação, as placas foram retiradas da estufa e os halos de inibição foram medidos, quando presentes. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas. Para o controle negativo utilizou-se DMSO e para o controle positivo foram utilizados os antibióticos comerciais, Cloranfenicol e Vancomicina.

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização das fases de desenvolvimento das plantas

A altura média das plantas da área B foi de $5,6 \pm 2,8$ m e da área A de $7,8 \pm 1,6$. A circunferência na altura do peito das plantas da área A foi de $21,0 \pm 10,3$ e da área B de $27,0 \pm 15,0$. As análises de influência do estágio de desenvolvimento das plantas nas atividades de *X. sericea* não apresentaram resultados estatísticos significativos.

5.2 Qualidade nutricional do solo

O pH das duas áreas amostradas apresentou-se bastante ácido, uma vez que o índice ideal varia entre 6,0 e 6,5 (tabela 5). Além disso, como o teor de matéria orgânica (M.O.) foi baixo nas duas áreas e, conseqüentemente, o efeito tampão não pode ser efetivo, a área B está sob maior estresse de acidez que a área A. Quando o solo é muito ácido, o alumínio que está preso nos minerais da argila dissolve-se no solo como partículas tóxicas e eletricamente carregadas. Desta maneira, a saturação do alumínio (m) foi maior na área B, o que indica maior toxicidade para as plantas desta área. O teor de potássio (K), fósforo (P), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) foram baixos nas duas áreas. Com relação à concentração de sódio (Na) nas áreas amostradas, é notório que a área B, por estar mais próximo do litoral apresentou maiores valores que a área A, o que promove maior estresse salino sob as mesmas. A saturação de base (V), ou seja, a capacidade de retenção de nutrientes de carga positiva no solo foi maior na área A. Como a taxa de absorção de um nutriente pela planta depende dos cátions dissolvidos na solução do solo pode-se inferir que as plantas da área B estão sob maior

estresse de nutrientes que as da área A. Os demais nutrientes analisados não apresentaram diferenças significativas nas duas áreas.

Tabela 5. Resultados da análise química do solo da área A e B.

Análise	Unidade	A		B	
		Profundidade		Profundidade	
		0-20	20-40	0-20	20-40
pH	-	5,0±0,40	5,1±0,40	4,5±0,4	4,5±0,2
K	mg/dm ³	25,0±10,5	9,1±2,8	24,0±9,4	12,0±4,1
P	mg/dm ³	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0
Ca	cmolc/dm ³	0,4±0,3	0,3±0,2	0,3±0,2	0,1±0,1
Mg	cmolc/dm ³	0,4±0,1	0,2±0,1	0,3±0,2	0,2±0,1
Al	cmolc/dm ³	0,6±0,5	0,4±0,3	0,7±0,4	0,7±0,2
H ⁺ Al	cmolc/dm ³	2,9±0,7	2,6±0,7	5,7±1,9	5,0±1,23
M.O	dag/dm ³	1,7±0,5	1,6±0,6	1,9±0,4	1,7±0,4
s	cmolc/dm ³	0,9±0,3	0,6±0,2	0,8±0,4	0,4±0,2
t	cmolc/dm ³	1,3±0,1	0,9±0,1	1,4±0,2	1,1±0,2
T	cmolc/dm ³	3,8±0,5	3,2±0,5	6,4±1,8	5,4±1,1
V	%	24,9±0,5	18,0±10,0	12,6±7,4	8,2±3,7
m	%	30,2±18,3	42,6±25,7	49,6±24,2	63,6±12,8
Na	mg/dm ³	3,7±4,2	3,7±4,2	12,0±4,1	11,1±5,3
S	mg/dm ³	5,3±3,1	9,2±8,6	10,2±2,4	7,5±1,9
Fe	mg/dm ³	21,4±8,6	28,2±10,8	25,7±14,2	23,0±13,8
Mn	mg/dm ³	2,7±2,9	1,6±1,6	0,7±1,97	0,1±0,0
Zn	mg/dm ³	0,3±0,3	0,2±0,1	0,2±0,1	0,4±0,3
Cu	mg/dm ³	0,2±0,2	0,2±0,2	0,1±0,05	0,1±0,1

*s = soma de bases; V= saturação de base; t = capacidade de troca de cátions efetiva; T concentração pH 7,0; m= saturação de alumínio.

5.3 RENDIMENTO DOS EXTRATOS

5.3.1 Extrato etanólico

Os resultados da média do rendimento dos extratos etanólicos obtidos na área B, durante as duas estações do ano estão expostos na Tabela 6. Nota-se que o rendimento dos extratos na estação chuvosa foi maior que na estação seca.

Tabela 6. Média do Rendimento (%) dos extratos etanólicos da área B obtidos nas estações seca e chuvosa.

Estação	Média do Rendimento (%)
Seca	7,46 ± 1,68
Chuvosa	10,81 ± 2,58

A Tabela 7 apresenta a média do rendimento (%) dos extratos obtidos na área A, durante as duas estações do ano. Nota-se que o rendimento dos extratos na estação chuvosa foi maior que na estação seca.

Tabela 7. Média do Rendimento (%) dos extratos etanólicos da área A obtidos nas estações seca e chuvosa.

Estação	Média do Rendimento (%)
Seca	9,10 ± 2,14
Chuvosa	14,51 ± 1,44

5.3.2 Extrato de acetato de etila

O rendimento (%) dos extratos de acetato de etila AC₁, AC₂, AC₃ e AC₄ obtidos na área A e B, durante as duas estações do ano são apresentados na Tabela 8. Observa-se que os extratos da área A apresentaram maior rendimento (%) na estação chuvosa (4,74%) e os extratos da área B, na estação chuvosa (3,43%). Desta maneira, verifica-se que os fatores ambientais relacionados com as diferentes áreas atuaram sinergicamente com as diferentes estações do ano, influenciando o rendimento dos extratos de acetato de etila. Considerando que o estresse hídrico pode atuar tanto aumentando como diminuindo a produção de vários tipos de metabólitos secundários (Gobbo-Neto e Lopes, 2007), um estudo para avaliar os fatores bióticos e abióticos das áreas é necessário para melhor compreensão das interações sinérgicas.

Tabela 8. Rendimento (%) dos extratos de acetato de etila das áreas A e B obtido nas diferentes estações amostradas.

Área	Estação	Rendimento (%)
A	Seca	4,74
	Chuvosa	1,71
B	Seca	3,04
	Chuvosa	3,43

5.3.3 Extrato Alcaloídico

A Tabela 9 apresenta o rendimento (%) dos extratos alcaloídicos AL₁, AL₂, AL₃, AL₄ obtidos na área A e B, durante as duas estações do ano. Os extratos da área A apresentaram maior rendimento na estação chuvosa (1,60%) e os extratos da área B, na estação seca (3,43%).

Tabela 9. Rendimento (%) dos extratos Alcaloídicos das áreas A e B obtido nas diferentes estações amostradas.

Área	Estação	Rendimento (%)
A	Seca	0,30
	Chuvosa	1,60
B	Seca	1,20
	Chuvosa	0,70

5.4 CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA

A partir da elaboração e revelação das placas cromatográficas de camada delgada verificou-se que as plantas das duas áreas amostradas (A e B) são quimicamente diferentes. Essa observação foi evidenciada pelo aparecimento de fluorescência amarelada sob luz ultravioleta em regiões distintas das placas após a revelação com reagentes específicos para a classe de flavonoides (Havsteen, 2002; Martínez-Flórez et al., 2002). Além disso, nas placas eluídas com a presença de substâncias padrões, foi possível identificar a hesperidina e a quercetina tanto na área A como na área B.

Os flavonoides são compostos fenólicos sintetizados pelos vegetais a partir da fenilalanina, têm se destacado dentre as substâncias atualmente estudadas em virtude de sua diversidade de ações terapêuticas, como efeitos antimicrobiano, antiviral, antiulcerogênico, antineoplásico, antioxidante, anti-hepatotóxico, anti-hipertensivo, hipolipidêmico, anti-inflamatório, antiplaquetário. Ademais, os flavonoides são utilizados no tratamento de sintomas da menopausa (Machado et al., 2008), doenças cardíacas coronárias (Pace-Asciak et al., 1996), aterosclerose (Martínez-Flórez et al., 2002) e câncer (Jang e Udeani, 1997). Com relação à quercetina destacam as propriedades de potencial antioxidante, anticarcinogênico e efeitos protetores aos sistemas renais, cardiovascular e hepático (Behling et al, 2004). Já a hesperidina está comumente relacionada com a capacidade de reduzir o colesterol e as triglicérides do plasma, inibe a taxa de oxidação da LDL (Kurowska et al, 2000). Neste contexto, os extratos de *X. sericea* possivelmente apresentam diversas potencialidades terapêuticas referentes aos compostos da classe de flavonoides.

Tabela 13. Tipos de classes de metabólitos secundários encontrados nos extratos etanólicos de *X. sericea* obtidos na área B durante a estação chuvosa.

CLASSES DE COMPOSTOS	EXTRATOS									
	BCh ₁	BCh ₂	BCh ₃	BCh ₄	BCh ₅	BCh ₆	BCh ₇	BCh ₈	BCh ₉	BCh ₁₀
Alcaloides	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Flavonoides	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saponinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Triterpenos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esteroides	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Taninos										
<i>Pirocatéquicos</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cumarinas										
<i>Simples</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Heterosídeos										
Antracênicos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Naftoquinonas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

5.6 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A partir da comparação dos tempos de retenção e espectros no UV dos padrões e amostras dos extratos foi possível identificar a rutina, hesperidina e quercetina. (Figuras 4 e 5).

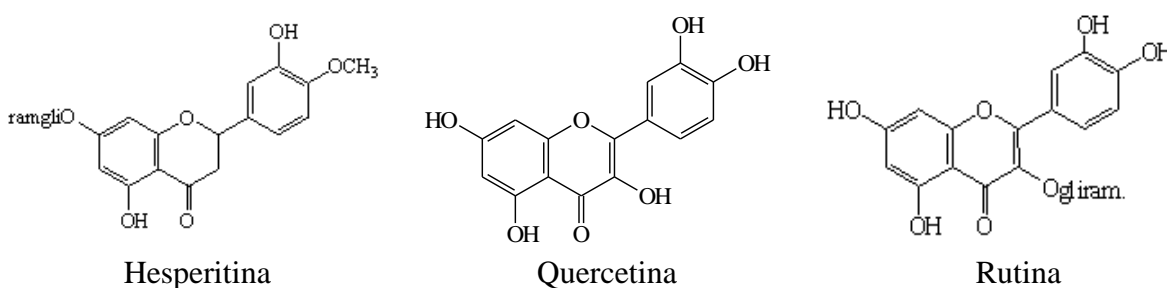


Figura 4. Substâncias identificadas nos extratos analisados.

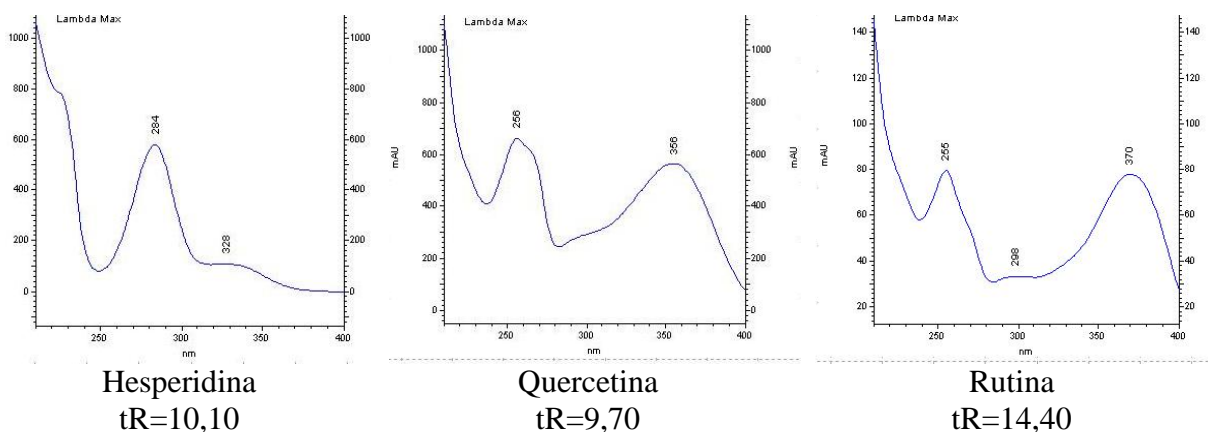
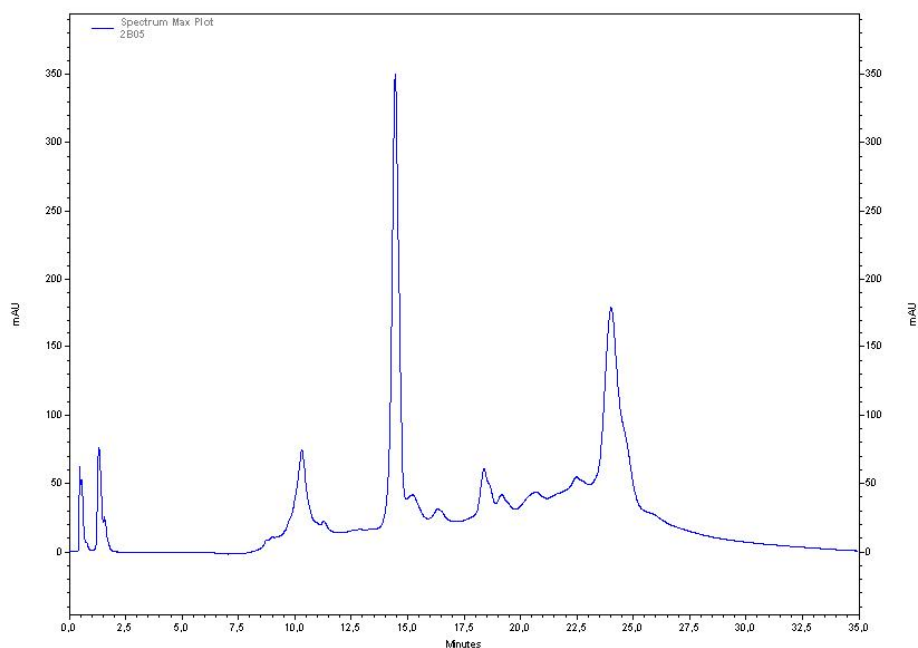


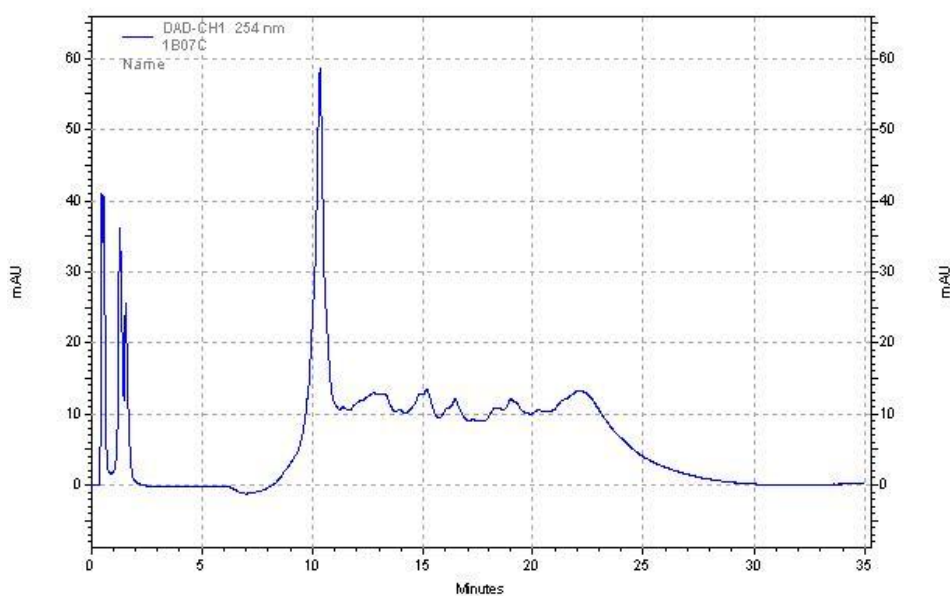
Figura 5. Espectros no UV das substâncias identificadas através de CLAE.

Foram observadas diferenças em relação ao perfil cromatográfico entre as plantas da área A e B como pode ser observado nas Figuras 6, 7 e 8. Desta forma, pode-se inferir que as diferentes condições na composição química do solo encontradas nas áreas de amostragem podem ser responsáveis pelas alterações no perfil químico das amostras analisadas.



* O sinal em 14,5 min. corresponde a quercetina e 10,20 min. corresponde a hesperidina.

Figura 6. Cromatograma do extrato etanólico da amostra 5 – área B.



* o sinal em 10,3 min. corresponde a hesperidina.

Figura 7. Cromatograma do extrato etanólico da amostra 5 – área A

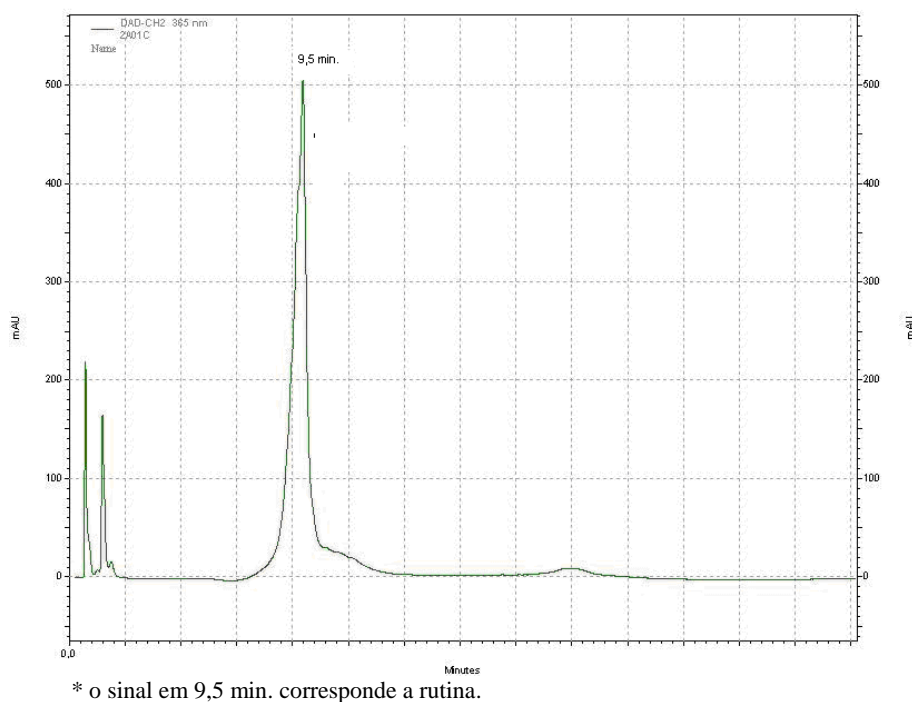


Figura 8. Cromatograma do extrato etanólico da amostra 1 – área A

5.7 Atividades biológicas de *X. sericea* e a influência do ambiente

Os resultados apresentados a seguir abordam os testes relacionados às atividades antimicrobiana, antifúngica, citotóxica e alelopática de *X. sericea* e à influência do ambiente nessas atividades. De uma maneira geral, as diferentes condições ambientais encontradas nas áreas amostradas (A e B) e as diferentes estações do ano (seca e chuvosa) de alguma forma, influenciaram as atividades biológicas de *X. sericea*. Os resultados revelaram que os extratos de *X. sericea* da área B possuíam maior efeito sobre as bioatividades testadas, exceto para o potencial citotóxico. Desta maneira, considerando que em áreas menos fragmentadas são encontradas maior riqueza e abundância de espécies e conseqüentemente, maiores interações das plantas com micro-organismos, inseto e outras plantas ocorrem nestas áreas, o metabolismo secundário das plantas do Parque de Itaúnas pode ter sido potencializado devido às ações sinérgicas provocadas por tais relações ecológicas (Einhellig, 1999). Ademais, como o resultado da análise química do solo das áreas amostradas apresentou maior estresse químico na B, é possível inferir que isto pode ter provocado fortes alterações na qualidade e/ou quantidade dos compostos metabólitos de *X. sericea* aumentando o potencial bioativo das plantas da área B. Contudo, estudos mais aprofundados sobre os índices de riquezas e abundância, bem como das relações ecológicas são necessários para compreensão das complexas interações bióticas e abióticas existentes nas áreas amostradas.

Reportando-se à influência da sazonalidade no potencial bioativo de *X. sericea*, foi possível atentar que os resultados somente foram estatisticamente significativos quando a estação seca atuou aumentando as atividades antimicrobianas, citotóxica e antifúngica frente à *C. gloeosporioides*. Assim, os resultados corroboram com estudos onde o estresse hídrico atua potencializando o rendimento de vários compostos secundários, e conseqüentemente, poderia aumentar as respectivas atividades biológicas. Um exemplo é um estudo com *Phytolacca dodecandra* onde o teor de saponina dos extratos aquoso dos frutos foi maior durante a estação seca. (Ndamba, Lemmich e Molgaard, 1994). Entretanto, em raízes de Ginseng, apesar de maiores teores de compostos secundários serem encontrados na estação seca, a atividade biológica relacionada à saponina foi maior na estação chuvosa (Kim et al., 1981). Tal resultado contradiz o que foi evidenciado nos extratos de *X. sericea*. Assim, torna-se evidente que são necessários estudos de aprofundamento que correlacionam o teor dos compostos secundários com atividades biológicas existentes.

5.7.1 Atividade citotóxica

5.7.1.1 Citotoxicidade de *X. sericea* frente à *A. salina*

Os resultados indicam que os extratos etanólicos não apresentaram toxicidade frente à *A. salina*, com DL₅₀ > 1000 ppm (Tabela 14). Assim, a utilização da *X. sericea* é considerada segura, uma vez que a mesma pode ser bem tolerada frente ao sistema biológico.

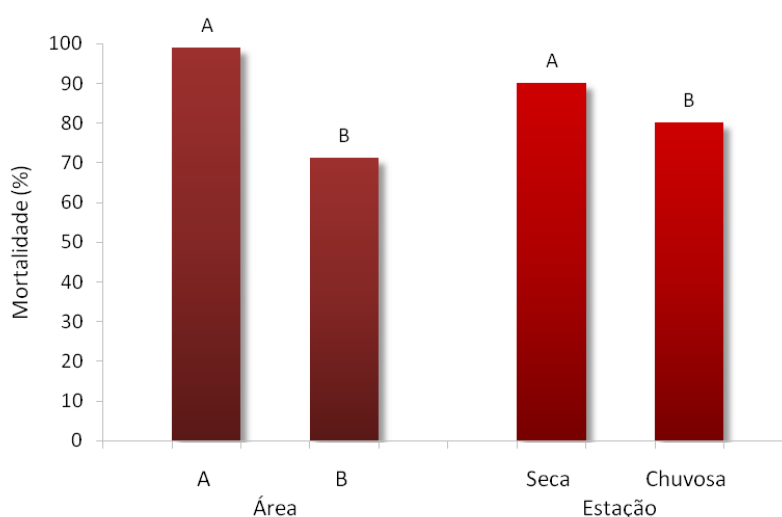
O uso inadequado de plantas medicinais pode acarretar tanto uma ação terapêutica ou tóxica (Gomes et al, 2001). Portanto, devido à preocupação com a saúde humana, estudos científicos têm atentado para se realizar testes toxicológicos com o objetivo de verificar e/ou prever a citotoxicidade de substâncias nos sistemas biológicos (Forbes e Forbes, 1994). Dentre os ensaios de citotoxicidade, o teste frente à *A. salina* é o mais comumente utilizados (Meyer et al., 1982).

Tabela 14. Avaliação da citotoxicidade dos extratos etanólicos de *X. sericea* frente à *Artemia salina* (DL₅₀).

Extrato	DL ₅₀ ppm
Dicromato de potássio	110
ET ₁	>1000
ET ₂	>1000
ET ₃	>1000
ET ₄	>1000

5.7.1.2 Estudo da Influência dos Fatores Ambientais na Atividade Citotóxica de *X. sericea*

Apesar da ausência de citotoxicidade de *X. sericea*, os resultados obtidos na análise estatística da interação dos fatores ambientais na atividade citotóxica da planta mostraram que houve uma influência significativa das diferentes áreas e estação do ano no seu potencial citotóxico. A partir da Figura 9, observa-se que o efeito citotóxico dos extratos da área A foi maior que da área B. Ademais, a atividade citotóxica dos extratos etanólicos foi maior na estação seca que na chuvosa. Tal resultado indica que o estresse hídrico apresentou uma correlação positiva com a atividade citotóxica de *X. sericea*. Assim, podemos inferir que o estresse hídrico provocou um aumento na síntese de metabólito secundário relacionado com a atividade de citotoxicidade.



* Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 9. Percentual de morte de *A. salina* frente aos extratos etanólicos das diferentes áreas e estações do ano.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 15, a área B apresentou diferenças significativas nas diferentes estações do ano quando. Ademais, considerando as duas estações, os dados mostram que diferenças significativas também ocorrerem nas duas áreas amostradas.

Tabela 15. Estudo de interação dos fatores área x estação do ano no percentual de morte de *A. salina*.

Estação	Área		Média
	A	B	
Seca	100,00 Aa	80,20 Ab	90,10 A
Chuvosa	97,98 Aa	62,52 Bb	80,25 B
Média	98,99 a	71,36 b	

* Médias seguidas pelas mesmas letras maiúscula na coluna e pela mesma letra minúscula na linha não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A partir dos dados expostos na Tabela 16 observa-se que somente a área B apresentou diferenças estatísticas com relação à atividade citotóxica na menor concentração testada. Além disso, em todas as concentrações a atividade citotóxica foi estatisticamente diferente nas áreas amostradas.

Tabela 16. Estudo de interação dos fatores concentração x área no percentual de morte de *A. salina*.

Concentração (mg/mL)	Área		Média
	A	B	
250	96,97 Aa	49,54 Bb	73,26 B
500	100,00 Aa	80,76 Ab	90,38 A
1000	100,00 Aa	83,78 Ab	91,89 A
Média	98,99 a	71,36 b	

* Médias seguidas pelas mesmas letras maiúscula na coluna e pela mesma letra minúscula na linha não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

5.7.2 Avaliação da atividade antifúngica frente à *C. musae*

Os resultados do teste antifúngico indicaram que os extratos etanólicos, acetato de etila e alcaloídico de *X. sericea* inibiram o crescimento do fungo *C. musae* em todos os tratamentos testados. O *C. musae* é um fungo patógeno comum de frutos de banana (*Musa* spp.) que causa a antracnose com ampla distribuição geográfica onde a bananeira é cultivada (Wardlaw, 1972). A antracnose é uma das mais importantes doenças causadas em frutas devido aos diversos problemas causados nas pós-colheitas (Kimati, 2005). Tais doenças provocam perdas quantitativas e qualitativas nas colheitas em consequência da deterioração, descolorações, manchas e produção de odores desagradáveis provocados pela colonização de frutas por fungos (Chitarra e Chitarra, 1990). Desta forma, o uso de extratos vegetais de *X. sericea* pode ser efetivo no controle do fitopatógeno causador da antracnose minimizando assim, os prejuízos causados na comercialização. Além disso, devido aos preocupantes efeitos de resistência do patógeno frente aos defensivos agrícolas e a alta toxicidade dos mesmos no

meio ambiente, os extratos de *X. sericea* podem ser uma importante alternativa para a agricultura.

A Figura 10 mostra que para os extratos etanólicos obtidos durante a estação seca, na área A, o percentual de inibição dos extratos etanólicos variou entre 19,05% e 42,86%. Nota-se que o maior potencial antifúngico em relação à testemunha foi referente à planta 6, durante a estação seca. Em relação os extratos obtidos na estação chuvosa, na área A, o percentual de inibição variou entre 11,80% e 42,70%, sendo que o maior potencial antifúngico em relação à testemunha foi encontrado na planta 6.

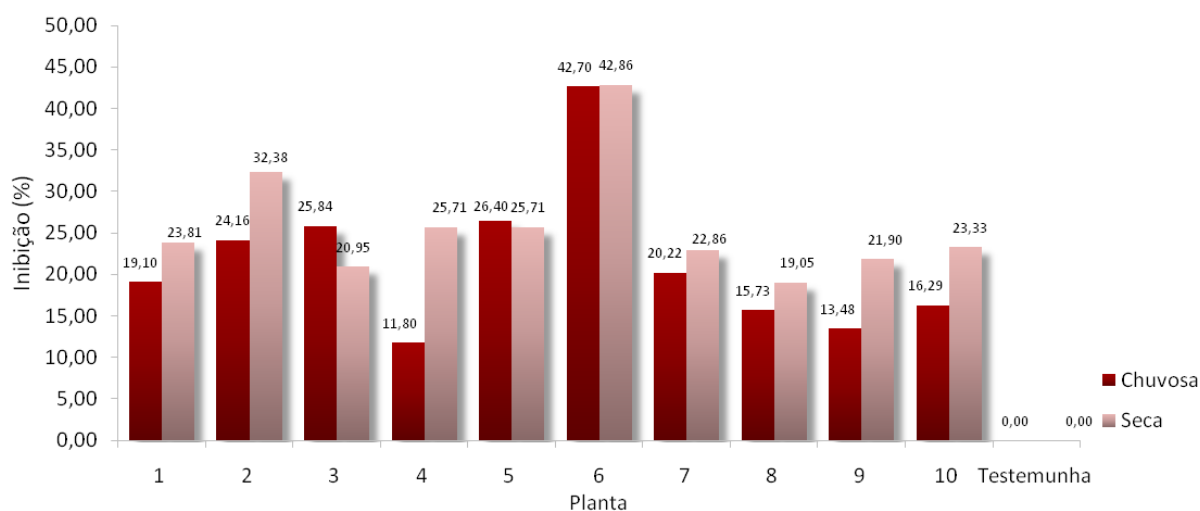


Figura 10. Médias do percentual de inibição dos extratos etanólicos obtidos das plantas da área A durante as estações seca e chuvosa.

Para os extratos da área B coletados no período seco, o percentual de inibição dos extratos etanólicos variou entre 13,81% e 57,14%. (Figura 11). O maior potencial de ação em relação à testemunha foi referente à planta 5. Já o percentual de inibição dos extratos etanólicos da área B, coletados na estação chuvosa, variou entre 3,37% e 55,06%. O maior potencial de ação em relação à testemunha foi referente à planta 5.

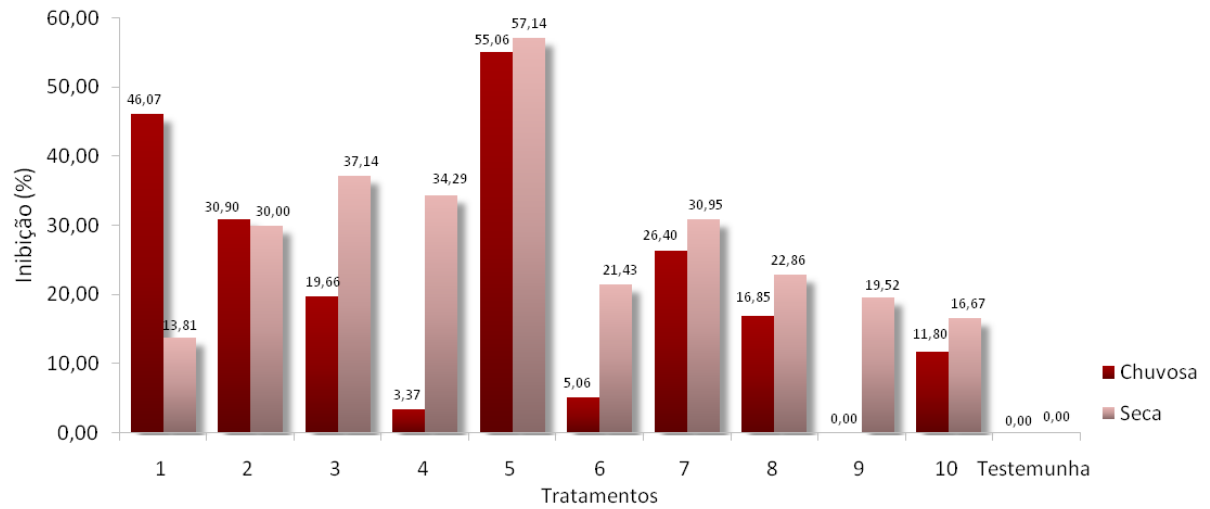


Figura 11. Médias do percentual de inibição dos extratos etanólicos obtidos das plantas da área B durante as estações seca e chuvosa.

A Figura 12 apresenta o diâmetro do halo de crescimento dos extratos de acetato de etila (tabela 2). Observa-se que o diâmetro do halo de crescimento variou entre 2,13 e 3,77 cm. O maior potencial de inibição (60,25%) em relação à testemunha foi obtido na área B, durante a estação chuvosa.

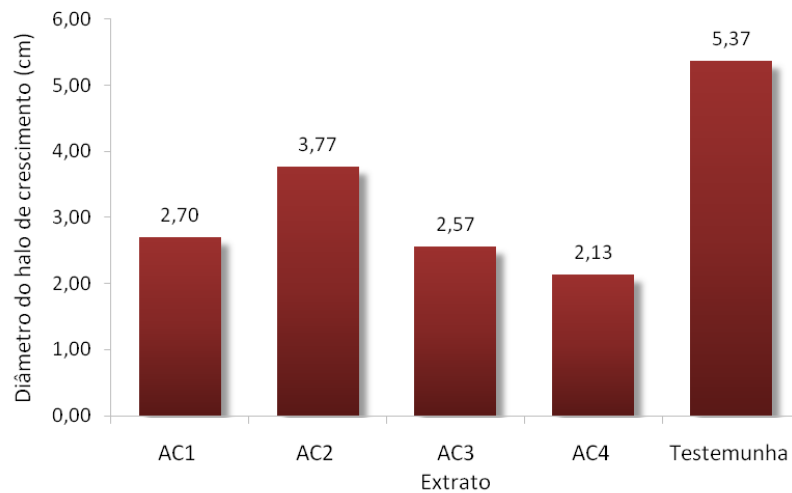


Figura 12. Médias do diâmetro do halo de crescimento de *C. musae* tratados com extratos de acetato de etila.

Para os extratos alcaloídicos descritos na Tabela 2, o diâmetro do halo de inibição variou entre 3,30 e 4,33 cm (Figura 13). O maior potencial de inibição (37,89%) em relação à testemunha foi obtido no da área B durante a estação seca.

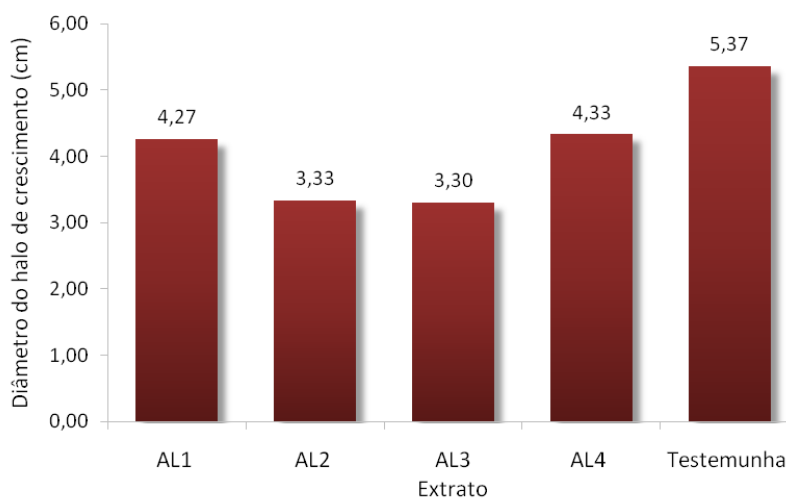
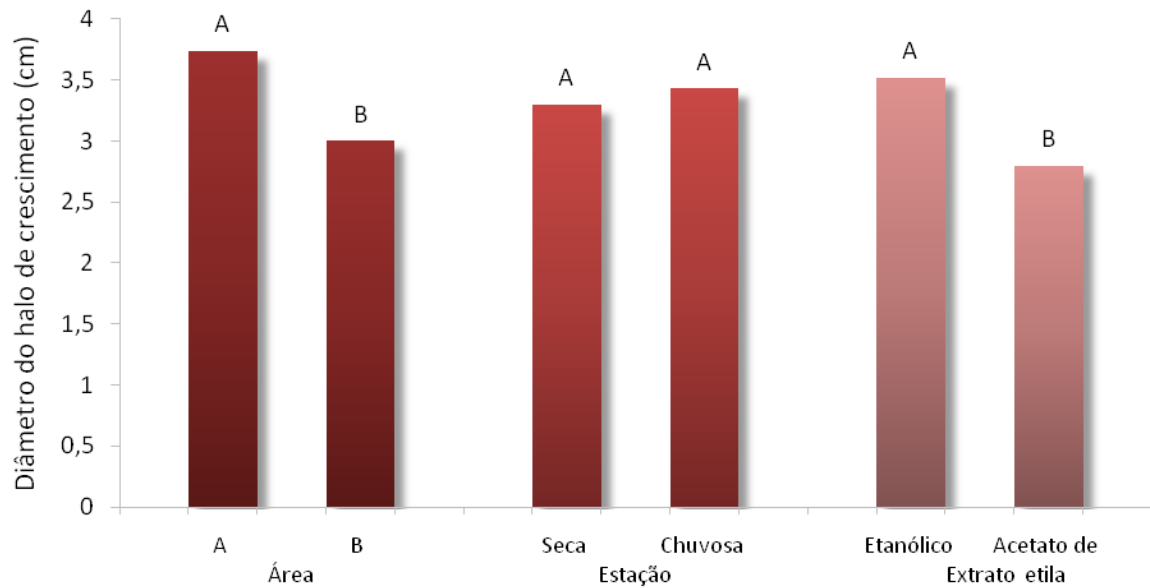


Figura 13. Médias do diâmetro do halo de crescimento de *C. musae* tratados com extratos alcaloídicos.

5.7.2.1 Estudo da influência dos fatores ambiental na atividade antifúngica de *X. sericea* frente à *C. musae*

A Figura 14 mostra, claramente, que o potencial antifúngico de *X. sericea* foi maior nos extratos de acetato de etila, uma vez que o diâmetro do halo de crescimento do fungo testado apresentou-se menor neste tipo de extrato. Além disso, observa-se que os extratos obtidos na área B foram mais ativos que da área A e que as diferentes estações do ano não influenciaram na atividade antifúngica.



* Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Figura 14. Avaliação do potencial antifúngico dos extratos etanólicos e acetato de etila obtidos nas diferentes áreas e estação do ano frente à *C. musae*.

Analisando os dados da Tabela 17 observa-se que somente na área A os resultados apresentaram diferenças estatísticas nos extratos testados. Além disso, nota-se que os extratos se comportaram diferentemente nas áreas amostradas.

Tabela 17. Estudo da interação dos fatores área x extrato na atividade antifúngica frente à *C. musae*.

Extrato	Área		Média
	A	B	
Acetato de Etila	3,23 Ba	2,35 Bb	2,80 B
Etanólico	4,20 Aa	2,83 Bb	3,51 A
Média	3,74 a	3,00 b	

* Médias seguidas pelas mesmas letras maiúscula na coluna e pela mesma letra minúscula na linha não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

5.7.3 Avaliação da atividade antifúngica frente à *C. gloeosporioides*

Os resultados do teste antifúngico frente à *C. gloeosporioides* apresentaram que os extratos etanólicos e acetato de etila de *X. sericea* inibiram o crescimento do fungo em todos os tratamentos testados. Desta forma, o uso de extratos vegetais de *X. sericea* pode ser efetivo no controle de *C. gloeosporioides*, fungo responsável por provocar manchas e podridões nas polpas de várias espécies de frutas na pós-colheita impedindo a comercialização das mesmas. (Prusky, Dickman e Freeman, 2000).

Os dados referentes às médias do halo de crescimento de *C. gloeosporioides*, tratados com o extrato etanólico, obtidos nas áreas de amostragem e nas diferentes estações do ano estão expostos na Figura 15. O diâmetro do halo de crescimento variou entre 5,07cm e 5,87cm. Observa-se que o maior potencial antifúngico (28,97%) em relação à testemunha foi encontrado na B durante a estação seca (Tabela 1).

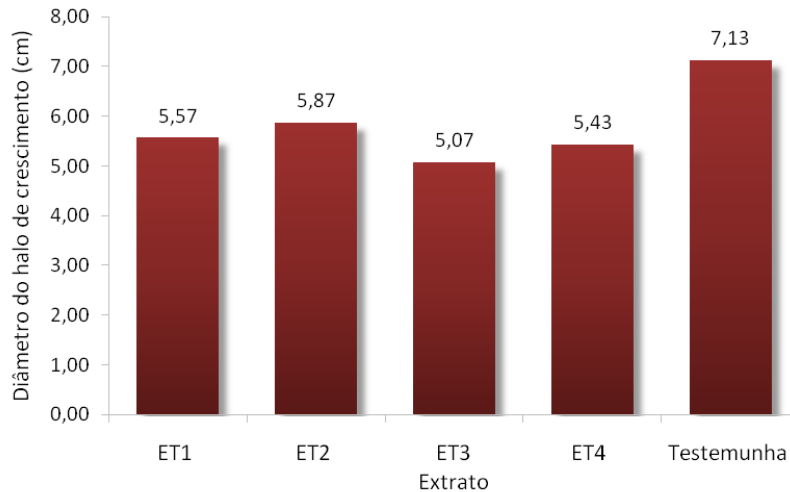


Figura 15. Médias do diâmetro do halo de crescimento de *C. gloeosporioides* tratados com extratos etanólicos.

A Figura 16 indica que o diâmetro do halo de crescimento de *C. gloeosporioides* tratados com extrato de acetato de etila variou entre 5,03 cm e 6,47 cm sendo que o maior potencial antifúngico (29,41%) foi o referente aos extratos obtidos na área B durante a estação seca (Tabela 1).

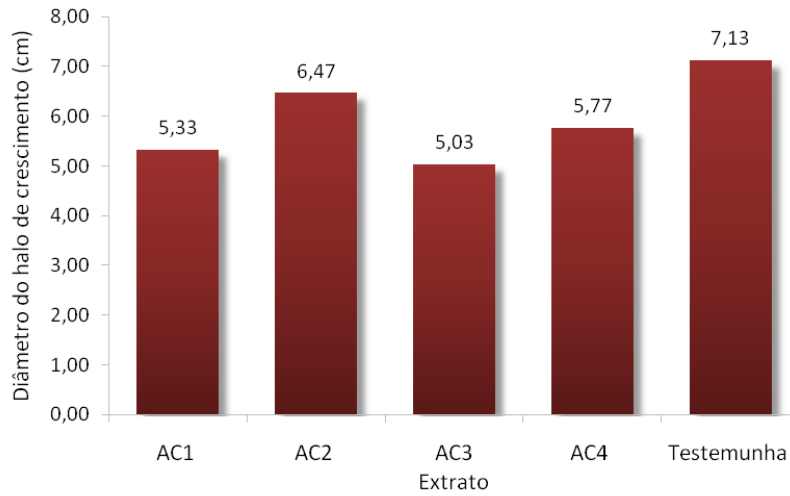
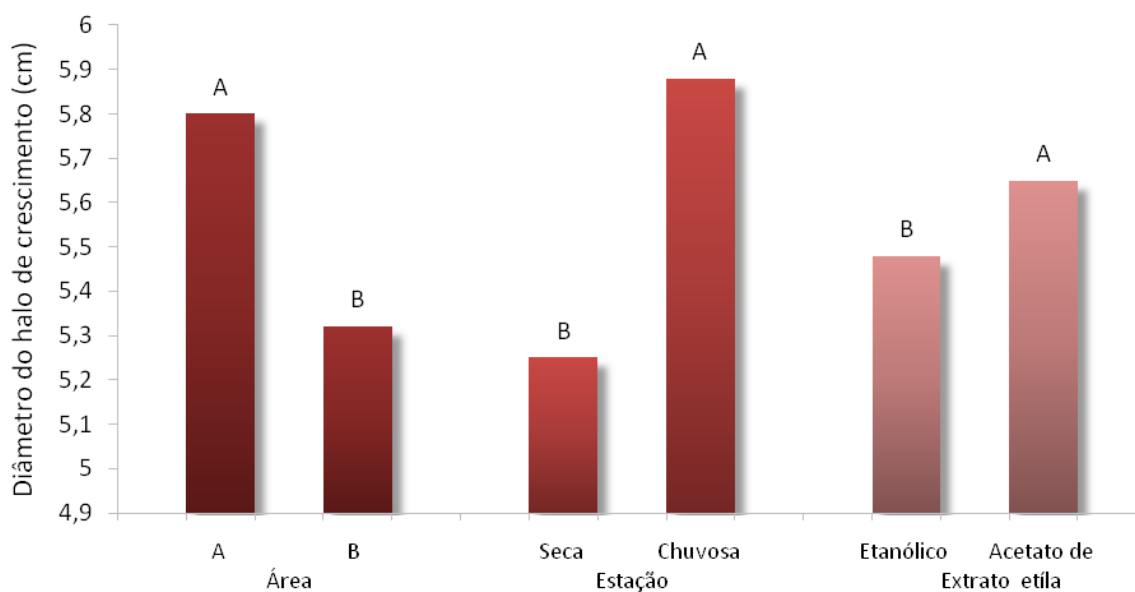


Figura 16. Médias do diâmetro do halo de crescimento de *C. gloeosporioides* tratados com extratos de acetato de etila.

5.8 Estudo da influência dos fatores ambientais na atividade antifúngica de *X. sericea* frente à *C. gloeosporioides*

A Figura 17 apresenta o extrato etanólico como o mais ativo com relação à atividade antifúngica. Sendo assim, verifica-se que para o fungo *C. gloeosporioides*, o extrato etanólico com diversas classes de metabólitos secundários foi mais efetivo do que o extrato acetato de etila. Ademais, os extratos da área B e na estação seca obtiveram um maior potencial antifúngico. Desta maneira, verifica-se que o estresse hídrico possivelmente aumentou a síntese de metabólitos secundários responsáveis pela atividade antifúngica em *C. gloeosporioides*.



* Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Figura 17. Avaliação do potencial antifúngico dos extratos etanólicos e acetato de etila obtidos nas diferentes áreas e estação do ano frente à *C. gloeosporioides*.

Os resultados da Tabela 18 apontam que durante a estação chuvosa os extratos etanólicos foram o mais ativo. Já na estação seca, os extratos que apresentara maior potencial antifúngico foi o acetato de etila. Desta maneira, verifica-se que o estresse hídrico provocado pela estação seca potencializou a ação dos metabólitos secundários referentes à atividade antifúngica dos extratos de acetato de etila tornando-os mais eficientes que os extratos etanólicos. Considerando que compostos fenólicos possuem maior afinidade com o solvente acetato de etila, possivelmente, os metabólitos secundários responsáveis pela atividade antifúngica dos extratos de *X. sericea* são referentes aos compostos da classe dos flavonoides que foram os compostos majoritários encontrados nos extratos.

Tabela 18. Estudo da interação dos fatores extrato x estação do ano na atividade antifúngica frente à *C. gloeosporioides*.

Extrato	Área		Média
	A	B	
Acetato de etila	5,18 Bb	6,11 Aa	5,65 A
Etanólico	5,31 Ab	5,65 Ba	5,48 B
Média	5,25 b	5,88 a	

* Médias seguidas pelas mesmas letras maiúscula na coluna e pela mesma letra minúscula na linha não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

5.8.1 Avaliação de atividade antifúngica de *X. sericea* frente à *C. albicans*

Os resultados do teste antifúngico dos extratos etanólicos e acetato de etila de *X. sericea* revelaram que a planta testada não possui ação frente à *C. albicans*, uma vez que não foi possível observar halo de inibição durante o ensaio.

5.8.2 Avaliação de atividade alelopática frente à *A. cepa*

A alelopatia se refere a qualquer efeito direto ou indireto, danoso ou benéfico que uma planta e até mesmo micro-organismos, exerce sobre outra planta pela produção de substâncias liberadas no ambiente (Rice, 1994). A ação alelopática pode afetar toda a fisiologia da planta, bem como a composição e a quantidade de enzimas específicas que funcionam como catalisadores durante o metabolismo, influenciando nos estádios de desenvolvimento e crescimento, e estes estádios podem estar associados a outros fatores como estresses abióticos, salinidade do solo, umidade e temperatura (Ferreira e Áquila, 2000). Os resultados do teste alelopático dos extratos de *X. sericea* frente à *A. cepa* corroboraram com a hipótese de Ferreira e Áquila, uma vez que a velocidade de germinação, porcentagem de germinação e o teste de primeira contagem das sementes de cebola tratadas com o extrato etanólico de *X. sericea* não foram afetadas pelas diferentes concentrações (Figuras 18, 19 e 20). Contudo, foi possível observar uma redução do crescimento normal da raiz, com o aumento das concentrações (Figura 21).

5.8.2.1 Médias do IVG, porcentagem de germinação e teste de primeira contagem das sementes de *A. cepa*.

A partir do cálculo do índice de Velocidade de Germinação (IVG), observou-se que a média de IVG dos extratos testados (Figura 18) variou entre 27,40 a 41,33, tendo o grupo controle a média igual a 37,09.

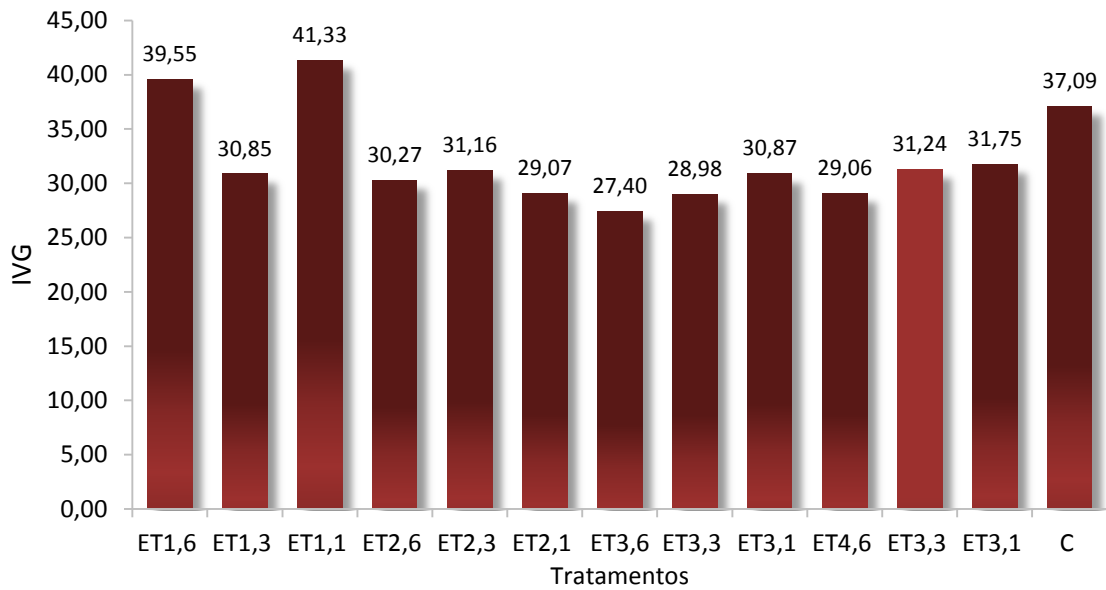


Figura 18. Médias do índice de velocidade de germinação das sementes de *A. cepa* tratadas com extrato de *X. sericea*.

A porcentagem de germinação das sementes de cebola tratadas com extratos de *X. sericea* variou entre 52% a 81% (Figura 19), tendo o grupo controle 77% das sementes germinadas.

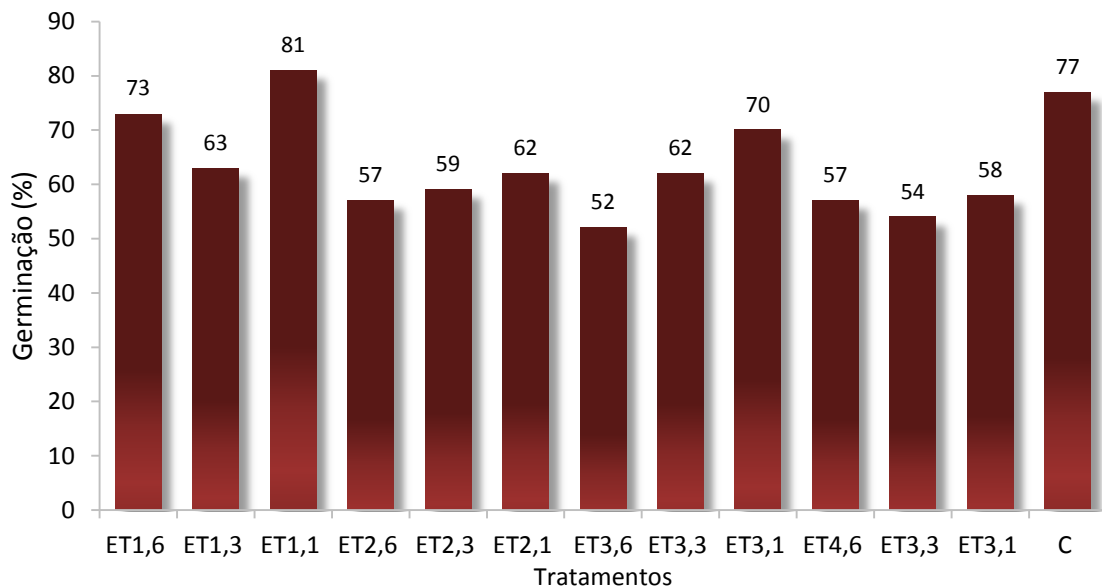


Figura 19. Porcentagem de germinação das sementes de *A. cepa* tratadas com extrato de *X. sericea*.

Os resultados do teste de primeira contagem variaram entre 37,5% a 45% (Figura 20), tendo o grupo controle média igual a 45%.

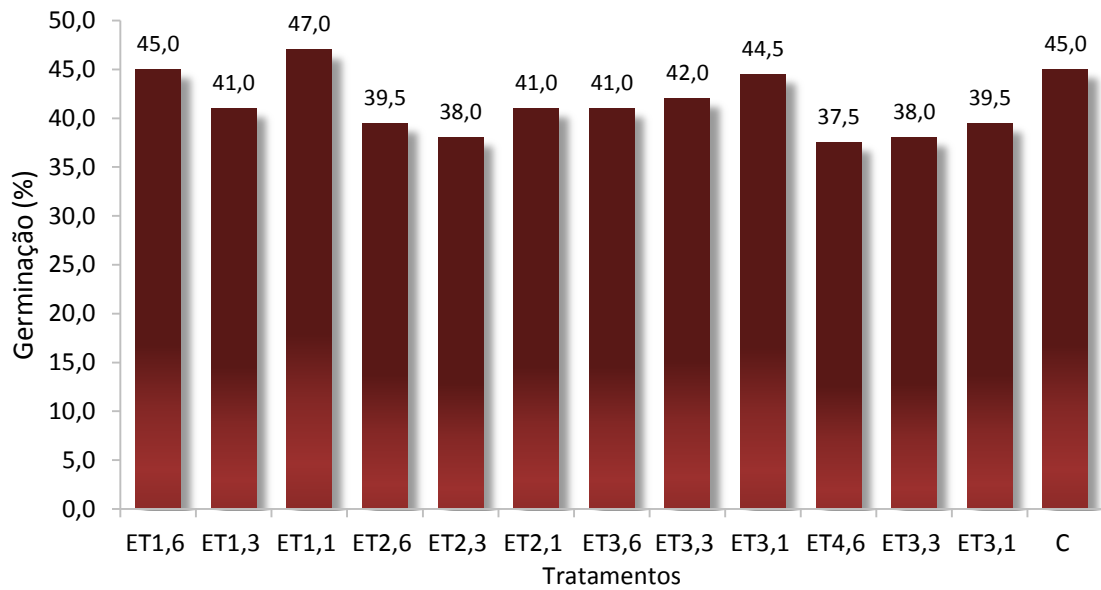
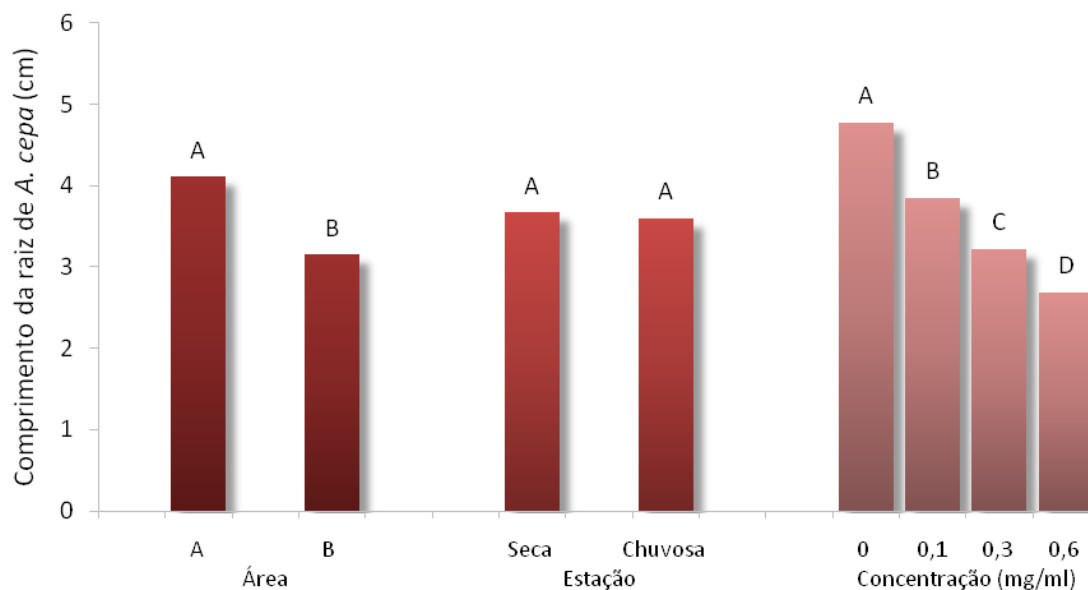


Figura 20. Teste de primeira contagem das sementes de *A. cepa* tratadas com extrato de *X. sericea*.

5.8.2.2 Estudo da influência dos fatores ambiental na atividade alelopática de *X. sericea* frente à sementes de *A. cepa*

Os resultados apresentados na Figura 15 indicam que os extratos da área B atuaram inibindo o comprimento da raiz da cebola mais fortemente que os extratos da área A. Assim, os resultados validam a afirmação de que a alelopatia envolve interação entre estresses abióticos e bióticos, que muitas vezes, potencializam suas ações devido às relações sinérgicas (Einhellig, 1999). Com relação às estações do ano, a atividade alelopática dos extratos não sofreu nenhuma alteração significativa. Além disso, nota-se que todas as concentrações testadas obtiveram efeito alelopático diferentes, sendo que houve um decréscimo do efeito alelopático da concentração 0,6 mg/mL para o controle.



* Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Figura 21. Atividade alelopática dos extratos etanólicos obtidos nas diferentes áreas, estação do ano e concentração, no comprimento da raiz de *A. cepa*.

Na Tabela 19, nota-se que na área A, a maior concentração foi a que obteve maior efeito alelopático com relação ao comprimento da raiz da cebola. Além disso, a concentração de 0,1 mg/mL apresentou resultados estatísticos semelhante ao controle. Já na área natural o efeito alelopático aumentou conforme as concentrações aumentaram.

Tabela 19. Estudo da interação dos fatores área x concentração no efeito alelopático dos extratos etanólicos seco frente ao comprimento da raiz de *A. cepa*.

Concentração (mg/ml)	Área		Média
	A	B	
0,0	4,78 Aa	4,78 Aa	4,78 A
0,1	4,39 Aa	3,32 Bb	3,85 B
0,3	3,95 Ba	2,49 Cb	3,22 C
0,6	3,33 Ca	2,03 Db	2,68 D
Média	4,11 a	3,15 b	

* Médias seguidas pelas mesmas letras maiúscula na coluna e pela mesma letra minúscula na linha não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Os dados da Tabela 20 mostram que durante a estação seca, os maiores efeitos alelopáticos com relação ao comprimento da raiz de cebola foram observados nas concentrações de 0,3 e 0,6 mg/mL. Na estação chuvosa, o efeito alelopático sob o comprimento da raiz de cebola foi igual nas concentrações de 0,1 e 0,3 mg/ml, sendo que o maior efeito foi obtido na

concentração 0,6 mg/mL. As concentrações 0,3 e 0,6 mg/mL apresentaram diferenças estatísticas nas diferentes estações do ano.

Tabela 20. Estudo da interação dos fatores Estação do ano x Concentração no efeito alelopático dos extratos etanólicos seco frente à *A. cepa*.

Concentração (mg/ml)	Estação	
	Seca	Chuvosa
0,0	4,78 Aa	4,78 Aa
0,1	4,00 Ba	3,71 Ba
0,3	2,97 Cb	3,47 Ba
0,6	2,90 Ca	2,46 Cb

* Médias seguidas pelas mesmas letras maiúscula na coluna e pela mesma letra minúscula na linha não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

5.8.3 Avaliação da atividade antimicrobiana frente à *S. aureus* e *E. coli*

5.8.3.1 Teste microbiológico frente à *E. coli*

Os resultados do teste microbiológico dos extratos etanólicos e acetato de etila de *X. sericea* revelaram que a planta testada não possui ação frente à *E. coli*, uma vez que não foi possível observar halo de inibição durante o ensaio.

5.8.3.2 Teste microbiológico frente à *S. aureus*

Os extratos etanólicos e acetato de etila de *X. sericea* apresentaram potencialidade antimicrobiana frente *S. aureus*. Quando se comparou a atividade antimicrobiana dos extratos com potencial de ação dos antibióticos comerciais, os resultados apresentaram que, os extratos etanólicos possuíram 37,92% de redução da ação antimicrobiana em relação à Vancomicina e 44,06% de redução da ação antimicrobiana em relação ao Cloranfenicol. Já os extratos acetato de etila, a redução do potencial antimicrobiano foi de 59,92% para Vancomicina e 63,88%, para cloranfenicol. (Tabela 21). Desta maneira, a espécie *X. sericea* pode ser considerada uma alternativa importante para busca de novas moléculas com propriedades antimicrobiana que possam auxiliar no tratamento de terapêutico.

O *S. aureus* é conhecida por ocasionar doenças que vão desde uma infecção simples, como espinhas e furúnculos, até as mais graves, como pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico, septicemia, entre outras (Santos et al., 2007). A alta capacidade de adaptação e resistência de *S. aureus* frente a antibióticos, tornou-se uma das maiores preocupações no quadro das infecções hospitalares e comunitárias (Santos et al, 2007). Assim, a busca por novas substâncias antimicrobianas a partir de fontes naturais são de fundamental

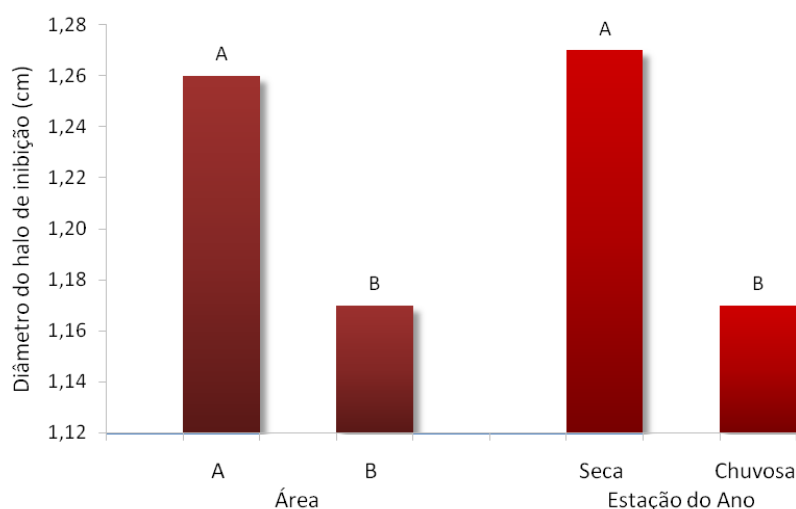
importância, uma vez que nenhuma nova classe de antibiótico foi descoberta nos últimos anos, apesar das intensas pesquisas das indústrias farmacêuticas (Duarte, 2006).

Tabela 21. Médias do halo de inibição (cm) do teste antimicrobiano dos extratos de *X. sericea* e dos antibióticos Vancomicina e Cloranfenicol.

Tratamento	Média do halo de inibição (cm)
Vancomicina	2,37
Cloranfenicol	2,63
Extrato etanólico	1,47
Extrato acetato de etila	0,95

5.8.3.3 Estudo da influência dos fatores ambiental na atividade antimicrobiana de *X. sericea* frente à *S. aureus*

Os resultados das análises referentes ao estudo da influência dos fatores ambientais na atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos de *X. sericea* (Figura 22) mostraram que a atividade antimicrobiana foi na área B e na estação seca. O estresse hídrico atuou como forte fator de estimulação de síntese de metabólitos secundários referente à bioatividade frente à *S. aureus*. Além disso, as fortes interações bióticas e abióticas presentes na área B podem ter sido os responsáveis pelo aumento da atividade.



* Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 22. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos obtidos nas diferentes áreas, estação do ano, frente à *S. aureus*.

A Tabela 22 indica que diferenças estatísticas foram encontradas na área A durante as diferentes estações. Já na área B, a atividade antimicrobiana não foi alterada pelas diferentes

estações do ano. Além disso, somente na estação chuvosa ocorreram diferenças estatísticas quanto ao efeito antimicrobiano, quando comparadas as áreas de coleta.

Tabela 22. Estudo da interação da área de coleta x estação do ano na atividade antibiótica dos extratos etanólicos frente *S. aureus*.

Concentração (mg/ml)	Área		Média
	A	B	
Seca	1,26 Aa	1,27 Aa	1,27 A
Chuvosa	1,09 Bb	1,25 Aa	1,17 B
Média	1,17 b	1,26 a	

* Médias seguidas pelas mesmas letras maiúscula na coluna e pela mesma letra minúscula na linha não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

6 CONCLUSÃO

O estudo da influência dos fatores ambientais nas atividades antimicrobiana, antifúngica, citotóxica e alopatíca de *X. sericea* revelou que as plantas da área B apresentaram maiores potencialidades bioativas do que as plantas da área A. Em áreas menos impactadas, como o caso do Parque Estadual de Itaúnas (área B), a riqueza e abundância de espécies são predominantes e relação à área fragmentada do *Campus* do Ceúnes (A). Assim, as relações ecológicas da planta/planta e animal/planta são muito mais expressivas na área B. Isto explica o aumento das potencialidades bioativas dos extratos de *X. sericea* obtidos a partir das plantas desta área. Ademais, o maior estresse químico/nutricional sofrido pelas plantas na área B pode ter influenciado positivamente na síntese de compostos de defesa das plantas, e consequentemente, aumentado os seus potenciais bioativos. Com relação à sazonalidade e disponibilidade de água no solo, o processo de interferência no metabolismo secundário de *X. sericea* se mostrou efetivo durante a estação seca. Portanto, de forma indireta, a hipótese do estresse hídrico pode ser confirmada no presente estudo.

Os extratos de *X. sericea* apresentaram potencialidades em relação às atividades antimicrobiana, antifúngica e alelopática. Assim, conclui-se que a espécie estudada possui ampla aplicação nas indústrias farmacêutica e agrônômica, podendo atuar no tratamento de doenças tanto em plantas como em seres humanos. Além disso, os extratos testados não apresentaram atividade citotóxica frente à *A. salina*, apresentando DL₅₀>1000 ppm, o que comprova a segurança de utilização desta espécie. Contudo, fazem-se necessários estudos com intuito de investigar o comportamento dos extratos de *X. sericea* frente aos sistemas biológicos de outros animais. Através dos ensaios realizados neste trabalho, constatou-se a presença de alcaloides, flavonoides, saponinas, triterpenos, esteroides, taninos, cumarinas e naftoquinonas. Foram identificados nos extratos etanólicos de *X. sericea*, através de CLAE, os flavonoides: quercetina, rutina e hesperidina.

Os resultados apresentados neste trabalho possibilitou o aumento do conhecimento científico sobre a espécie *X. sericea* estimulando o interesse de novos estudos que permitam uma investigação mais profunda a respeito das potencialidade biológicas e químicas da espécie. Além disso, ao fornecer informações relevantes à cerca da presença de metabólitos secundários que possam levar ao isolamento de princípios ativos importantes na produção de novos fitoterápicos, o presente estudo contribuiu de forma significativa para a valorização da espécie *X. sericea*, uma das espécies da flora brasileira, a qual ainda é bastante desconhecida.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEGAS, F. S; VOLL, E; PRETE, C. E. C. Embebição e germinação de sementes de picão preto (*Bidens pilosa*). **Planta Daninha**, Viçosa, v.21, n.1, p.21-25, 2003.
- ALENCAR, J. W; SILVEIRA, E.R. Volatile constituents of *Xylopiya sericea* St. Hill **Journal of essential oil research**, v.8, n.1, p. 75-78, 1996.
- ALVES, M. da C. S. et al. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.11, p.1083-1086, 2004.
- ANDRADE, N. C. et al. Diterpenes and volatile constituents from the leaves of *Xylopiya cayennensis* Maas . **Biochemical Systematics and Ecology**, v.32, n.11, p.1055-1058, 2004.
- ASAWALAM, E. F; EMOSAIRUE, S. O; HASSANALI, A. Contribution of different constituents to the toxicity of the essential oil constituents of *Vernonia amygdalina* (Compositae) and *Xylopiya aetiopica* (Annonaceae) on maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). **African Journal of Biotechnology**, v.7, n.16, p.2957-2962, 2008.
- ASEKUN, O. T; ADENIYI, B. A. Antimicrobial and cytotoxic activities of the fruit essential oil of *Xylopiya aethiopica* from Nigeria. **Fitoterapia**, v.75, n.3, p.368-370, 2004.
- BARBOSA, F. S. et al. Insecticide effects of *Ruta graveolens*, *Copaifera langsdorffii* and *Chenopodium ambrosioides* against pests and natural enemies in commercial tomato plantation *Acta Scientiarum*. **Agronomy**, Maringá, v.33, n.1, p. 37-43, 2011.
- BECKER, L. et al. Crescimento e produção de alcaloides totais de quebra-pedra em função da calagem e da adubação nitrogenada. **Hortic. bras.**, v.18, n.2, 2000.
- BEHLING, E. et al. Flavonoid quercetin: general aspects and biological actions. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v.15, n.3, p.285-292, 2004.
- BORGES, E. E. L. et al. Avaliação de substância inibidora em sementes de pimenteira (*Xylopiya sericea* St. Hill.). **Revista Brasileira de Sementes**, v.9, n.3, p.87-90,1987.
- BORRIS, R. P. Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. **Journal of Ethnopharmacology**, v.51, p.29-38, 1996.
- BROOKS, J. S; FEENY, P. Seasonal variation in *Daucus carota* leaf-surface and leaf-tissue chemical profiles. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.32, n.9, p.769-782, 2004.
- BRUMMITT, R. K. **Vascular Plant: Families and Genera**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1992.
- BRYANT, J. P; CHAPIN, S; KLEIN, D. R. "Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory". **Oikos**, v.40, n.3, p. 357-368, 1983.
- CARDOSO, F. L. et al. Análise sazonal do potencial antimicrobiano e teores de flavonoides e quinonas de extratos foliares de *Aloe arborescens* Mill., Xanthorrhoeaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.20, n.1, p.35-40, 2010.

CARNEIRO, F. B. et al. Variação da quantidade de β -cariofileno em óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng., Lamiaceae, sob diferentes condições de cultivo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.4, p.600-606, 2010.

CARPENTER, Z. I. S. B. et al. Variations in the secondary metabolite camptothecin in relation to tissue age and season in *Camptotheca acuminata*. **Tree Physiology**, v.18, p.265-270, 1998.

CHITARRA, M. I. F., CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de Frutos e Hortaliças: Fisiologia e Manuseio**. Lavras: ESAL/FAEPE, 1990.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Decreto Federal nº750, de 10 de fevereiro de 1993**. Dispõe sobre o corte, a exploração e a supressão de vegetação primária ou nos estágios avançado e médio de regeneração da Mata Atlântica, e dá outras providências. Brasília, 1993.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**, Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, vol. 5, 1987.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. Lisboa: Fundação Calouste Grilbenkian, 1982.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. Lisboa: Fundação Calouste Grilbenkian, 1986.

CRAVEIRO, A. A. J; ALENCAR, W. Essential oil of *Xylopiya sericea*: A comparative analysis. **Journal of Natural Products**, v.49, n.6, p.1146-1148, 1986.

DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. Construindo a História dos produtos Naturais, **Multiciência**, v.7, p.1-16, 2006.

DUSTIN, C. D; COOPER-DRIVER, G. A; Changes in phenolic production in the hay-scented fern (*Dennstaedtia punctilobula*) in relation to resource availability. **Biochem. Syst. Ecol.**, v.20, n.2, p.99-106, 1992.

EINHELLIG, F. A. An integrated view of allelochemicals amid multiple stresses. In inderjit; DAKSHINI, K. M. M. e FOY, C. L. (Eds.) **Principles and practices in plant ecology**. Boca Raton, CRC Press, v.1. p.479-494, 1999.

ELOFF, J. N. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? **Journal of Ethnopharmacology**, v.60, n.1, p.1-8, 1998.

EMBRAPA. **Manual de análise do solo**. Rio de Janeiro: Centro Nacional de Pesquisa do Solo, 2ª Ed., 1999.

Encyclopedia of Life. Disponível em: <<http://eol.org/pages/1054966/overview>>. Acesso em: 25 nov. 2011.

ENGLISH-LOEB, G; STOUT, M. J; DUFFEY, S. S. Drought Stress in Tomatoes: Changes in Plant Chemistry and Potential Nonlinear Consequences for Insect Herbivores. **Oikos**. v.79, n.3, 1997.

ESEKHIAGBE, M; AGATEMOR, M. M. U; AGATEMOR, C. Phenolic Content and Antimicrobial Potentials of *Xylopi aethiopica* And *Myristica argentea*. **Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, v.28, n.2, p.159-162, 2009.

EZEKWESILI, C. N. et al. Investigation of the chemical composition and biological activity of *Xylopi aethiopica* Dunal (Annonaceae). **African Journal of Biotechnology**, v.9 n.43, p.7352-7356, 2010.

FERREIRA, A. G., ÁQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, p.175-204, 2000.

FLEISCHER, T. C. et al. Antimicrobial activity of essential oils of *Xylopi aethiopica*. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v.5, n.4, p.391-393, 2008.

FOURNIER, G. et al. Volatile constituents of *Xylopi frutescens*, *X. pynaertii* and *X. sericea*: Chemical and biological study. **Phytotherapy Research**, v.8, n.3, p.166-169, 1994.

FRISCHKNECHT, P. M; BATTIG, M; BAUMANN, T. W. Effect of drought and wounding stress on indole alkaloid formation in *Catharanthus roseus*. **Phytochemistry**, v.26, n.3, p.707-710, 1987.

GOBBO-NETO, L; LOPES, N. P. Plantas Medicinais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários. **Química Nova**, v.30, n.2, p.374-381, 2007.

GOMES, E. C. M. et al. Plantas Medicinais com características tóxicas usadas pela população de Morretes,PR. **Revista Visão Acadêmica**, Curitiba, v.2, n.2, p.77-80, 2001.

GRAY, D. E. et al. Acute Drought Stress and Plant Age Effects on Alkamide and Phenolic Acid Content in Purple Coneflower Roots. **Planta Med.**, v.69, n.1, p.50-55, 2003.

HABIBA, K., et al. Persistent effect of a preparation of essential oil from *Xylopi aethiopica* against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera, Bruchidae). **African Journal of Agricultural Research**, v.5, n.14, p.1881-1888, 2010.

HAVSTEEN, B. N. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacol. Therapeut.**, v.96, p.67-202, 2002.

HENDRIKS, H. et al. The Content of Parthenolide and its Yield per Plant During the Growth of *Tanacetum parthenium*. **Planta Med.**, v.63, n.4, 1997.

HOCQEEUILLER, R.; CAVH, A. Alcaloides des Annonacees. Alcaloides de *Xylopi buxifolia* et de *Xylopi danguyella*. **Journal of Natural Products**, v.44, n.5, p.551-556, 1981.

HÖFT, M; VERPOORTE, R; BECK, E; Growth and alkaloid contents in leaves of *Tabernaemontana pachysiphon* Stapf (Apocynaceae) as influenced by light intensity, water and nutrient supply. **Oecologia**, v.107, p.160-169, 1996.

JOSSANG, A; EBEUF, M; CAVE, A. Alcaloides des Annonacees. Lxxxxvi, dehydroxylopine et dehydrocorytenchine, nouveaux alcaloides isoquinoleiques isolés de *Xylopi vieillardii*. **Journal of Natural Products**, v.54, n.2, p.466-472, 1991.

- KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- KIM, S. K. et al. Seasonal Variation of Saponins, Sucrose and Monosaccharides in Cultivated Ginseng Roots. **Planta Med.**, v.42, n.6, p.181-186, 1981.
- KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**, São Paulo: Agrônômica Ceres, v.2, 4ª Ed., 2005.
- KONNING, G. H; AGYARE, C; ENNISON, B. Antimicrobial activity of some medicinal plants from Ghana. **Fitoterapia**, v.75, n.1, p.65-67, 2004.
- KUROWSKA, et al. HDL-cholesterol raising effect of orange juice in subjects with hypercholesterolemia. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.72, p.1095-1100, 2000.
- LABOURIAU, L. G; VALADARES, M. E. B. On the germination of seeds *Calotropis procera*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.48, n.2, p.174-186, 1976.
- LEITE, V. R; LOPES, T. S; PEREIRA, O. J. Florística do ecótono floresta de Restinga e Mata Atlântica de Tabuleiro no município de Serra (ES). **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, supl.2, p.483-485, 2007.
- LOBÃO, A. Q; ARAUJO, D. S. D; KURTZ, B. C. Annonaceae das Restingas do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v.56, n.87, p.85-96, 2005.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**, Nova Odessa: Instituto Plantarum, v.1, 4ª.Ed., 2002.
- MAAS, P. J. et al. Annonaceae from Central-eastern Brazil. **Rodriguésia**, v.52, n.80, p.65-98, 2001.
- MACHADO, H. et al. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v.27, n.1/2, p.33-39, 2008.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, n.1, p.176-177, 1962.
- MALAVOLTA, E; VITTI, G. C; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: POTAFOS, 2ª Ed., 1997.
- MARTÍNEZ-FLÓREZ, S. et al. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. **Nutr. Hosp.**, v17, n6, p.271-27, 2002.
- MARTINS, D; ALVARENGA, M. A; ROQUE, N. F. Diterpenes and alkaloids from Brazilian *Xylopia* species. **Química Nova**, v.18, n.1, P.14-16, 1995.
- MARTINS, E. R. et al. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV Imprensa universitária, 22p., 1995.
- MELO, A. C. et al. HPLC quantitation of kaurane diterpenes in *Xylopia* species, **Fitoterapia**, v.72, n.1, p.40-45, 2001.

- MENKOVIC, N; SAVIKIN-FODULOVIC; K; SAVIN, K. Chemical Composition and Seasonal Variations in the Amount of Secondary Compounds in *Gentiana lutea* Leaves and Flowers. **Planta Med.**, v.66, n.2, p.178-180, 2000.
- MESQUITA, M. L. et. al. In vitro antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, n.1, p.165-170, 2007.
- MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, v.45, n.1, p.31-34, 1982.
- MORAIS L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v.27, p.4050-4063, 2009.
- MOREIRA, I. C. et al. Antifungal Aromadendrane Sesquiterpenoids from the Leaves of *Xylopia brasiliensis*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.14, n.5, p.828-831, 2003.
- MOREIRA, I. C; LAGO, J. H. G; ROQUE, N. F. Sesquiterpenes, diterpenes, steroids and alkaloid from branches of *Xylopia brasiliensis* Spreng (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**. v.33, n.9, p.948-951, 2005.
- MOREIRA, I. C; ROQUE, N. F; LAGO, J. H. G. Diterpene adducts from branches of *Xylopia emarginata*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.34, p.833-837, 2006.
- MOREIRA, I.C. et al. Sesquiterpenos e hidrocarbonetos dos frutos de *Xylopia emarginata*. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.17, n.1, p.55-58, 2007.
- NDAMBA, J; LEMMICH, E; MOLGAARD, P. Investigation of the diurnal, ontogenetic and seasonal variation in the molluscicidal saponin content of *Phytolacca dodecandra* aqueous berry extracts. **Phytochemistry**, v.35, n.95, 1994.
- NISHIYAMA, Y. et al. Antinociceptive effects of the extracts of *Xylopia parviflora* bark and its alkaloidal components in experimental animals. **J Nat Med**, v.64, p.9–15, 2010.
- NISHIYAMA, Y. et al. Quaternary Isoquinoline Alkaloids From *Xylopia Parviflora*. **Phytochemistry**, v.65 p.939–944, 2004.
- NISHIYAMA, Y. et al. Secondary and tertiary isoquinoline alkaloids from *Xylopia parviflora*. **Phytochemistry**, v.67, p.2671–2675, 2006.
- OLIVEIRA, F; AKISUE, G. **Fundamentos em Farmacobotânica**. São Paulo: Atheneu, 2003.
- OMOTOSO, O.T. Efficacy of extracts of some aromatic medicinal plants on cowpea bruchid, *Callosobruchus maculatus* in storage. **Bulletin of Insectology**, v.61, n.1, p.21-24, 2008.
- OSORIO, E. et al. Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p.630-635, 2007.
- PACE-ASCIAK, C.R. et al. Wines and grape juices as modulators of platelet aggregation in healthy human subjects. **Clinica Chimica Acta** v.246, n.1-2, p.163-82, 1996.

Parque de Itaúnas. **Plano de manejo do Parque Estadual de Itaúnas – meio biótico.** Disponível em: <<http://www.meioambiente.es.gov.br/default.asp?pagina=16707>>. Acesso em: 23 nov. 2011.

Parque de Itaúnas. **Plano de manejo do Parque Estadual de Itaúnas – meio físico.** Disponível em: <<http://www.meioambiente.es.gov.br/default.asp?pagina=16707>>. Acesso em: 23 nov. 2011.

PIMENTA, L. P. S. et al. N-trans- e N-cis-feruloiltiramina isoladas da madeira de *Xylopia benthamii* R.E. Fries. **Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**, 32^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009.

PONTES, W. J. T; OLIVEIRA, J. C. S; CÂMARA, C. A. G. Atividade acaricida dos Óleos Essências de Folhas e Frutos de *Xylopia sericea* sobre o ácaro rajado (*Tetranychus urticae* KOCH). **Química Nova**, v.30, n.4, p.838-841, 2007.

PRUSKY, D; FREEMAN, S; DICKMAN, M.B. (eds.) **Colletotrichum: Host Specificity, Pathology, and Host-pathogen Interaction.** St. Paul: APS Press, 2000.

PUTIEVSKY, E; RAVID, U; DUDAI, N. The influence of season and harvest frequency on essential oil and herbal yields from a pure clone of sage (*Salvia officinalis* L.), grown under cultivated conditions. **Journal of Natural Products**, v.29, p.326-329, 1986.

PUVANENDRAN, S. et al. Alkaloids from *Xylopia parvifolia* and *Xylopia nigricans* (Annonaceae). **J.Natn.Sci.Foundation Sri Lanka**, v.38, n.1, p.75-76, 2010.

RAVEN, P. H; EVERT, R. F; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RICE, E.L. **Allelopathy.** Orlando: Academic Press., 2^a Ed., 1994.

ROCA-PÉREZ, L. et al. Seasonal cardenolide production and Dop5βr gene expression in natural populations of *Digitalis obscura*. **Phytochemistry**, v.65, 2004.

SALMINEN, J. P. et al. Seasonal variation in the content of hydrolysable tannins in leaves of *Betula pubescens*. **Phytochemistry**, v.57, n.1, p.15-22, 2001.

SANDES, A. R; BLASI, G. Biodiversidade e Diversidade Química e Genética. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.13, p.28-32, 2000.

SANT' ANA, P. J; ASSAD, A. L. O Contexto Brasileiro para a Bioprospecção. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 29, p. 32-37, 2002.

SANTOS, A. L. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**,v.43, n.6, p.413-423, 2007.

SCHMIDT, T. J; BOMME, U; ALFERMANN, A. W; Sesquiterpene lactone content in leaves of in vitro and field cultivated *Arnica Montana*, **Planta Med.**, v.64, n.8, p. 769, 1998.

SIANI, A. C. Desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos: plataforma metodológica. Rio de Janeiro: Scriptorio, p.97, 2003.

- SILVA, M. S. et al. Alcaloides e outros Constituintes de *Xylopi Langsdorffiana* (Annonaceae). **Quim. Nova**, v.32, n.6, p.1566-1570, 2009.
- SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Florianópolis: UFRGS/Editora da UFSC, 5ª Ed., 2003.
- SOUZA, S. A. M. **Bioteste na avaliação da fitotoxicidade de extratos aquosos de plantas medicinais nativas do Rio Grande do Sul**. Pelotas, RS: Instituto de Biologia, 2005. Originalmente apresentada como monografia, Universidade Federal de Pelotas, 2005.
- SUFFREDINI, I. B. et al. *In vitro* cytotoxic activity of Brazilian plant extracts against human lung, colon and CNS solid cancers and leukemia. **Fitoterapia**, v.78, p.223-226, 2007.
- TAKAHASHI, J. A.; VIEIRA, H. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Mono and Diterpenes from Seeds of *Xylopi sericea*. **Quim. Nova**, v.24, n.5, p.616-618, 2001.
- TATSADJIEUA, L. N.; NGANGA, J. J. E.; NGASSOUMA, M. B.; ETOAB, F. X. Antibacterial and antifungal activity of *Xylopi aethiopica*, *Monodora myristica*, *Zanthoxylum xanthoxyloides* and *Zanthoxylum leprieurii* from Cameroon, **Fitoterapia** v.74, p.469-472, 2003.
- TAVARES, E. S. et al. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.(Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15: p.1-5, 2005.
- TAVARES, J. F. et al. ent-Trachylobane Diterpenoids from *Xylopi langsdorffiana*. **J. Nat. Prod.**, v.69, p.960-962, 2006.
- THOMAZINI, A. P. B. W.; VENDRAMIM, J. D.; LOPES, M. T. R. Extratos aquosos de *Trichilia pallida* e a traça-do-tomateiro. **Scientia Agricola**, v.57, n.1, p.13-17, 2006.
- VIEGAS, J. C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v.26, n.3, p.390-400, 2003.
- WARDLAW, C. W. Diseases of the banana and of the Manila hemp plant. MacMillan and company. 1972
- WILLIAMS, R. D.; ELLIS, B. E. Age and tissue distribution of alkaloids in *Papaver somniferum*. **Phytochemistry**, v.28, 1989.
- ZIDORN, C.; STUPPNER, H. Evaluation of chemosystematic characters in the genus *Leontodon* (Asteraceae). **Taxon**, v.50, n.1, p.115, 2001.

8 ANEXOS

ANEXO A



GOVERNO DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO
Secretaria do Meio Ambiente e Recursos Hídricos
Instituto Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos - IEMA

AUTORIZAÇÃO DE PESQUISA EM UNIDADES DE CONSERVAÇÃO

Cariacica, 26 de agosto de 2010.

À: Cláudia M. Jamal.

Assunto: Autorização de pesquisa.

Em atenção ao protocolo nº 2184/10, referente à solicitação para autorização da pesquisa intitulada "Influência dos fatores bióticos e abióticos na atividade antifúngica e citotóxica de *Xylopiá sericea* St. Hill" no Parque Estadual de Itaúnas, informamos que a mesma foi autorizada até dezembro de 2011, com as seguintes recomendações:

- i. As coletas deverão ser agendadas com antecedência mínima de quinze dias e acompanhadas por funcionários das Unidades de Conservação;
- ii. Não será permitida abertura de picadas ou novas trilhas.

O prazo de entrega do Relatório Parcial é 31 de março de 2011.

O prazo de entrega do Relatório Final é 31 de dezembro de 2011.

Relembramos que de acordo com o Artigo 19 do Decreto N°4.225-N, o pesquisador que não enviar o relatório final dentro do prazo estipulado, e sem apresentação de justificativa plausível, terá seus pedidos posteriores de pesquisa indeferidos.

Ressaltamos ainda que as coletas deverão ser sempre acompanhadas de funcionário do parque. Para tal, as visitas de campo e reservas de alojamento deverão ser agendadas antecipadamente através do telefone (27) 37625196 ou pelo email pei@iema.es.gov.br.

Atenciosamente,

Schirley Costalonga
AMARH - Coordenadora GT de Pesquisas
IEMA

Schirley A. Costalonga Moreira
AMARH
Matr.: 3004945



ANEXO B

QUADROS DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DAS ANÁLISES ESTATÍSTICAS

1. Teste citotóxico frente *Artemia salina*

Análises simples

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	17.	68581.5147	4034.2067	54.25 **
RESÍDUO	36.	2677.0665	74.3630	
TOTAL	53.	71258.5811		

DESVIO PADRÃO = 8.6234 ERRO PADRÃO DA MÉDIA = 4.9787
MÉDIA GERAL = 72.0652 COEFICIENTE DE VARIAÇÃO = 11.97

Estudo de Interação dos fatores Área x Coleta x Concentração

FATOR A = LOCAL FATOR B = COLETA FATOR C =DOSE

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

CAUSA DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
FATOR A	1	6868.8181	6868.8181	67.1180 **
FATOR B	1	872.9070	872.9070	8.5295 **
FATOR C	2	2571.0882	1285.5441	12.5616 **
FATOR AXB	1	551.5452	551.5452	5.3894 *
FATOR AXC	2	1777.7534	888.8767	8.6856 **
FATOR BXC	2	86.5229	43.2614	.4227 NS
FATOR AXBXC	2	16.7117	8.3558	.0816 NS
(TRATAMENTOS)	11	12745.3464	1158.6679	
RESÍDUO	24	2456.1471	102.3395	

MÉDIA GERAL DO ENSAIO = 85.1769
DESVIO PADRÃO = 10.1163
COEFICIENTE DE VARIAÇÃO = 11.8768

2. Teste microbiológico frente *Staphylococcus aureus*

Estudo de Interação Área x Coleta

FATOR A = LOCAL FATOR B = COLETA FATOR C =DOSE

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

CAUSA DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
FATOR A	1	.2341	.2341	10.1408 **
FATOR B	1	.2901	.2901	12.5668 **
FATOR C	9	.1391	.0155	.6695 NS
FATOR AXB	1	.1541	.1541	6.6751 *
FATOR AXC	9	.7351	.0817	3.5383 **
FATOR BXC	9	.5058	.0562	2.4344 *
FATOR AXBXC	9	.5751	.0639	2.7682 **
(TRATAMENTOS)	39	2.6332	.0675	
RESÍDUO	80	1.8467	.0231	

MÉDIA GERAL DO ENSAIO = 1.2158
 DESVIO PADRÃO = .1519
 COEFICIENTE DE VARIAÇÃO = 12.4961

Estudo de interação área A x planta

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

CAUSA DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
FATOR A	1	.0042	.0042	.1524 NS
FATOR B	9	.2282	.0254	.9275 NS
FATOR AXB	9	.5508	.0612	2.2392 *
(TRATAMENTOS)	19	.7832	.0412	
RESÍDUO	40	1.0933	.0273	

MÉDIA GERAL DO ENSAIO = 1.2650
 DESVIO PADRÃO = .1653
 COEFICIENTE DE VARIAÇÃO = 13.0694

Estudo de interação área B x coleta

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

CAUSA DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
FATOR A	1	.3840	.3840	20.3894 **
FATOR B	9	.4167	.0463	2.4582 *
FATOR AXB	9	.7593	.0844	4.4798 **
(TRATAMENTOS)	19	1.5600	.0821	
RESÍDUO	40	.7533	.0188	

MÉDIA GERAL DO ENSAIO = 1.1667
 DESVIO PADRÃO = .1372
 COEFICIENTE DE VARIAÇÃO = 11.7630

Análises de comparação de todas as plantas com os antibióticos Vancomicina e Cloranfenicol

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

CAUSA DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	41.	12.1633	.2967	12.59 **
RESÍDUO	84.	1.9800	.0236	
TOTAL	125.	14.1433		

DESVIO PADRÃO = .1535 ERRO PADRÃO DA MÉDIA = .0886
 MÉDIA GERAL = 1.2770 COEFICIENTE DE VARIAÇÃO = 12.02

3. Teste antibiótico dos extratos etanólicos e acetato de etila frente *Staphylococcus aureus*

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

CAUSA DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
FATOR A	1	.5400	.5400	4.3490 NS
FATOR B	1	.1350	.1350	1.0872 NS
FATOR C	1	.1350	.1350	1.0872 NS
FATOR AXB	1	.1350	.1350	1.0872 NS
FATOR AXC	1	.2817	.2817	2.2685 NS
FATOR BXC	1	.1667	.1667	1.3423 NS
FATOR AXBXC	1	.5400	.5400	4.3490 NS
(TRATAMENTOS)	7	1.9333	.2762	
RESÍDUO	16	1.9867	.1242	

MÉDIA GERAL DO ENSAIO = .1000
 DESVIO PADRÃO = .3524
 COEFICIENTE DE VARIAÇÃO = 32.0339

4. Teste antifúngico frente *C. musae*

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

CAUSA DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
FATOR A	2	6.5772	3.2886	11.6297 **
FATOR B	1	4.9878	4.9878	17.6385 **
FATOR C	1	.1600	.1600	.5658 NS
FATOR AXB	2	2.9572	1.4786	5.2289 *
FATOR AXC	2	.1517	.0758	.2682 NS
FATOR BXC	1	.0178	.0178	.0629 NS
FATOR AXBXC	2	4.9739	2.4869	8.7947 **
(TRATAMENTOS)	11	19.8256	1.8023	
RESÍDUO	24	6.7867	.2828	

MÉDIA GERAL DO ENSAIO = 3.3722
 DESVIO PADRÃO = .5318
 COEFICIENTE DE VARIAÇÃO = 15.7691

5. Teste antifúngico frente *C. gloesporioide*

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

CAUSA DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
FATOR A	1	.1667	.1667	17.3913 **
FATOR B	1	1.4017	1.4017	146.2609 **
FATOR C	1	2.4067	2.4067	251.1304 **
FATOR AXB	1	.0017	.0017	.1739 NS
FATOR AXC	1	.5400	.5400	56.3478 **
FATOR BXC	1	.0417	.0417	4.3478 NS
FATOR AXBXC	1	.0817	.0817	8.5217 **
(TRATAMENTOS)	7	4.6400	.6629	
RESÍDUO	16	.1533	.0096	

MÉDIA GERAL DO ENSAIO = 5.5667
 DESVIO PADRÃO = .0979
 COEFICIENTE DE VARIAÇÃO = 1.7586

6. Teste alelopático

Comparação das médias do comprimento da raiz nas áreas A e B x controle

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIAÇÃO	G.L.	G.L.R.	F_Crit	F	P
TRATAMENTO	6	720	2.8202	25.7167	<0,001***

SIGNIFICÂNCIA: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Comparação das médias do comprimento da raiz nas áreas A e B

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIAÇÃO	G.L.	G.L.R.	F_Crit	F	P
TRATAMENTO	5	720	3.0256	25.8617	<0,001***

SIGNIFICÂNCIA: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Teste de primeira contagem

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIAÇÃO	G.L.	G.L.R.	F_Crit	F	P
TRATAMENTO	12	13	2.6737	1.0705	0.45

SIGNIFICÂNCIA: 0 **** 0.001 ** 0.01 * 0.05 . 0.1 ' ' 1

Índice de Velocidade de Germinação

C. VARIAÇÃO	G.L.	G.L.R.	F_Crit	F	P
TRATAMENTO	12	13	0.3085	0.9767	>0.050.

SIGNIFICÂNCIA: 0 **** 0.001 ** 0.01 * 0.05 . 0.1 ' ' 1

7. Análise química do solo

Alumínio (Al)

Profundidade 0-20

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr(>F)
ÁREA	1	0.324	0.3240	1.491	0.23
RESÍDUO	38	8.256	0.2173		

SIGNIFICÂNCIA: 0 **** 0.001 ** 0.01 * 0.05 . 0.1 ' ' 1

Profundidade 20-40

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr(>F)
ÁREA	1	1.024	1.0240	18.18	0.000128 ***
RESÍDUO	38	2.140	0.0563		

SIGNIFICÂNCIA: 0 **** 0.001 ** 0.01 * 0.05 . 0.1 ' ' 1

H⁺Al

Profundidade 0-20

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr(>F)
ÁREA	1	73.98	73.98	35.8	6e-07 ***
RESÍDUO	38	78.53	2.07		

SIGNIFICÂNCIA: 0 **** 0.001 ** 0.01 * 0.05 . 0.1 ' ' 1

Profundidade 20-40

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr(>F)
ÁREA	1	54.76	54.76	54.8	7.06e-09 ***
RESÍDUO	38	37.97	1.00		

SIGNIFICÂNCIA: 0 **** 0.001 ** 0.01 * 0.05 . 0.1 ' ' 1

Matéria Orgânica

Profundidade 0-20

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr(>F)
ÁREA	1	0.225	0.2250	0.799	0.377
RESÍDUO	38	10.706	0.2817		

SIGNIFICÂNCIA: 0 **** 0.001 ** 0.01 * 0.05 . 0.1 ' 1

Profundidade 20-40

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr(>F)
ÁREA	1	0.121	0.121	0.543	0.466
RESÍDUO	38	8.474	0.223		

SIGNIFICÂNCIA: 0 **** 0.001 ** 0.01 * 0.05 . 0.1 ' 1

Ferro (Fe)

Profundidade 0-20

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr(>F)
ÁREA	1	160	160	1.168	0.287
RESÍDUO	38	5204	137		

SIGNIFICÂNCIA: 0 **** 0.001 ** 0.01 * 0.05 . 0.1 ' 1

Profundidade 20-40

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr(>F)
ÁREA	1	292	291.6	1.93	0.173
RESÍDUO	38	5741	151.1		

SIGNIFICÂNCIA: 0 **** 0.001 ** 0.01 * 0.05 . 0.1 ' 1

Manganês (Mn)

Profundidade 0-20

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr(>F)
ÁREA	1	35.34	35.34	5.888	0.0201 *
RESÍDUO	38	228.12	6.00		

SIGNIFICÂNCIA: 0 **** 0.001 ** 0.01 * 0.05 . 0.1 ' 1

Profundidade 20-40

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr(>F)
ÁREA	1	19.32	19.321	15.93	0.00029 ***
RESÍDUO	38	46.10	1.213		

SIGNIFICÂNCIA: 0 **** 0.001 ** 0.01 * 0.05 . 0.1 ' 1

Zinco (Zn)

Profundidade 0-20

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr(>F)
ÁREA	1	0.169	0.16900	2.587	0.116
RESÍDUO	38	2.482	0.06532		

SIGNIFICÂNCIA: 0 **** 0.001 ** 0.01 * 0.05 . 0.1 ' 1

Profundidade 20-40

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr(>F)
ÁREA	1	0.001	0.00100	0.066	0.799
RESÍDUO	38	0.578	0.01521		

SIGNIFICÂNCIA: 0 **** 0.001 ** 0.01 * 0.05 . 0.1 ' 1

Concentração de Cobre (Cu)

Profundidade 0-20

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr(>F)
ÁREA	1	0.036	0.03600	2.073	0.158
RESÍDUO	38	0.660	0.01737		

SIGNIFICÂNCIA: 0 **** 0.001 ** 0.01 * 0.05 . 0.1 ' 1

Profundidade 20-40

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr(>F)
ÁREA	1	0.009	0.00900	0.316	0.577
RESÍDUO	38	1.082	0.02847		

SIGNIFICÂNCIA: 0 **** 0.001 ** 0.01 * 0.05 . 0.1 ' 1

Enxofre (S)

Profundidade 0-20

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr(>F)
ÁREA	1	233.3	233.3	30.29	2.73e-06 ***
RESÍDUO	38	292.7	7.7		

SIGNIFICÂNCIA: 0 **** 0.001 ** 0.01 * 0.05 . 0.1 ' 1

Profundidade 20-40

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr(>F)
ÁREA	1	21	21.02	0.572	0.454
RESÍDUO	38	1397	36.77		

SIGNIFICÂNCIA: 0 **** 0.001 ** 0.01 * 0.05 . 0.1 ' 1

Capacidade de troca de cátions efetiva (t)

Profundidade 0-20

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr(>F)
ÁREA	1	0.4	0.4000	12.67	0.00102 **
RESÍDUO	38	1.2	0.0316		

SIGNIFICÂNCIA: 0 **** 0.001 *** 0.01 * 0.05 . 0.1 ' 1

Profundidade 20-40

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr(>F)
ÁREA	1	0.484	0.4840	19.73	7.45e-05 ***
RESÍDUO	38	0.932	0.0245		

SIGNIFICÂNCIA: 0 **** 0.001 *** 0.01 * 0.05 . 0.1 ' 1

pH

Profundidade 0-20

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr(>F)
ÁREA	1	2.500	2.5000	15.62	0.000326 ***
RESÍDUO	38	6.084	0.1601		

SIGNIFICÂNCIA: 0 **** 0.001 *** 0.01 * 0.05 . 0.1 ' 1

Profundidade 20-40

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr(>F)
ÁREA	1	2.601	2.6010	23.21	2.34e-05 ***
RESÍDUO	38	4.258	0.1121		

SIGNIFICÂNCIA: 0 **** 0.001 *** 0.01 * 0.05 . 0.1 ' 1

Sódio (Na)

Profundidade 0-20

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr(>F)
ÁREA	1	688.9	688.9	39.65	2.23e-07 ***
RESÍDUO	38	660.2	17.4		

SIGNIFICÂNCIA: 0 **** 0.001 *** 0.01 * 0.05 . 0.1 ' 1

Profundidade 20-40

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr(>F)
ÁREA	1	547.6	547.6	23.7	2e-05 ***
RESÍDUO	38	878.0	23.1		

SIGNIFICÂNCIA: 0 **** 0.001 *** 0.01 * 0.05 . 0.1 ' 1

Cálcio (Ca)

Profundidade 0-20

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr(>F)
ÁREA	1	0.144	0.14400	2.606	0.115
RESÍDUO	38	2.100	0.05526		

SIGNIFICÂNCIA: 0 **** 0.001 ** 0.01 * 0.05 . 0.1 ' 1

Profundidade 20-40

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr(>F)
ÁREA	1	0.196	0.19600	8.867	0.00503 **
RESÍDUO	38	0.840	0.02211		

SIGNIFICÂNCIA: 0 **** 0.001 ** 0.01 * 0.05 . 0.1 ' 1

Magnésio (Mg)

Profundidade 0-20

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr(>F)
ÁREA	1	0.049	0.04900	2.444	0.126
RESÍDUO	38	0.762	0.02005		

SIGNIFICÂNCIA: 0 **** 0.001 ** 0.01 * 0.05 . 0.1 ' 1

Profundidade 20-40

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr(>F)
ÁREA	1	0.009	0.009000	1.629	0.21
RESÍDUO	38	0.210	0.005526		

SIGNIFICÂNCIA: 0 **** 0.001 ** 0.01 * 0.05 . 0.1 ' 1

Potássio (K)

Profundidade 0-20

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr(>F)
ÁREA	1	84.1	84.10	6.861	0.0126 *
RESÍDUO	38	465.8	12.26		

SIGNIFICÂNCIA: 0 **** 0.001 ** 0.01 * 0.05 . 0.1 ' 1

Profundidade 20-40

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr(>F)
ÁREA	1	10	10.00	0.101	0.753
RESÍDUO	38	3780	99.47		

SIGNIFICÂNCIA: 0 **** 0.001 ** 0.01 * 0.05 . 0.1 ' 1

Concentração de pH (T)

Profundidade 0-20

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr(>F)
ÁREA	1	65.03	65.03	35.29	6.88e-07 ***
RESÍDUO	38	70.03	1.84		

SIGNIFICÂNCIA: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Profundidade 20-40

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr(>F)
ÁREA	1	50.18	50.18	62.34	1.56e-09 ***
RESÍDUO	38	30.58	0.80		

SIGNIFICÂNCIA: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Saturação de base (V)

Profundidade 0-20

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr(>F)
ÁREA	1	1518	1517.8	16.26	0.000257 ***
RESÍDUO	38	3547	93.3		

SIGNIFICÂNCIA: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Profundidade 20-40

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr(>F)
ÁREA	1	964.3	964.3	16.84	0.000208 ***
RESÍDUO	38	2176.5	57.3		

SIGNIFICÂNCIA: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1