



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CAMPUS MACAÉ
CURSO DE FARMÁCIA



**Influência da variação geográfica na produção de metabólitos
secundários e na atividade antioxidante de
Typha domingensis Pers. (Typhaceae)**

Luana Gonçalves de Souza

Macaé

2013

LUANA GONÇALVES DE SOUZA

Título: Influência da variação geográfica na produção de metabólitos secundários e na atividade antioxidante de *Typha domingensis* Pers. (Typhaceae)

Monografia apresentada ao curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro como um dos requisitos para obtenção do título de farmacêutico.

Área de concentração: Produtos Naturais de Organismos Aquáticos.

Orientadora: Angélica Ribeiro Soares

Co-Orientadora: Nathália Peixoto
Nocchi Carneiro

Macaé

2013

*Dedico este trabalho à minha família
e a memória do meu avô Biju.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois acredito que com fé tudo é possível.

Aos meus pais, Delma e Willian, por sempre estarem presentes no meu coração por onde quer que eu vá. Por acreditarem em mim e me apoiarem em todas as decisões tomadas. Por serem meu porto seguro sempre. Amo vocês. Amor incondicional.

Ao meu irmão, João Guilherme, pelas brigas e parcerias, você é muito importante pra mim. Vou te amar sempre.

Às minhas primas, meus tios e tias, minha madrinha, meu avô, Zico, minha avó, Elza, pelo incentivo e por tudo que representam na minha vida e em especial a minha avó Terezinha por sempre ser esse general que amo tanto, por ser minha segunda mãe e estar sempre presente na minha jornada. Amo todos vocês!

Ao meu amor, Luis, por sempre me entender e acreditar em mim. Obrigada por me apoiar e compreender a importância desta etapa na minha vida, por sempre estar ao meu lado e por demonstrar o seu amor por mim. Te amo!

À minha orientadora Angélica Soares por ter me aceitado sem me conhecer. Obrigada por todos os conhecimentos e ensinamentos transmitidos e acima de tudo por ter acreditado em mim. Sua orientação foi muito importante para minha formação e me ajudou a amadurecer.

À minha orientadora Nathália Nocchi, pela paciência, dedicação e cumplicidade. Pelas risadas a toda hora e por estar sempre disponível para me ajudar. Obrigada por tudo. Foi muito importante o convívio com você para a minha carreira.

A todos os meus amigos de laboratório ao longo desse período Fernanda, Lílian, Eduardo, Lorena, Daniel, Olinda, Thalia, Renan e Anny. Com vocês tudo fica mais divertido, obrigada pela convivência.

As minhas moceiras preferidas, Kamila, Stephanie, Raquel e Marcela. Vocês foram e são muito importantes para minha vida, sem vocês tudo seria mais difícil.

A todos os amigos de graduação, em especial a Thamiris, ao Thiago, a Rafaela, a Thalitão pela convivência, risadas, piadinhas, companheirismo, com vocês foi mais fácil passar por isso tudo.

A coordenação do curso de Farmácia (UFRJ- campus Macaé), aos funcionários e aos verdadeiros mestres que encontrei na Universidade, por terem sempre demonstrado sua dedicação e amor pela profissão. Obrigada pela transmissão do conhecimento!

À prof^a. Dr^a. Denise Guimarães e à prof^a. Dr^a. Michelle Muzzino, pela gentileza de aceitar meu convite para formar a minha banca.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| Resumo | 8 |
| Abstract | 10 |
| Lista de figuras | 12 |
| Lista de tabelas e quadros | 15 |
| Lista de abreviaturas e siglas | 16 |
| 1- Introdução | 17 |
| 1.1. As plantas e seus metabólitos secundários | 17 |
| 1.1.1. Variação no metabolismo secundário em plantas | 19 |
| 1.2. Plantas no meio aquático | 23 |
| 1.3. O gênero <i>Typha</i> (Typhaceae) | 24 |
| 1.3.1. Fitoquímica | 25 |
| 1.3.2. Atividade biológica | 37 |
| 1.3.3. <i>Typha domingensis</i> Pers. | 40 |
| 2- Objetivos | 42 |
| 2.1. Objetivo Geral | 42 |
| 2.2. Objetivos Específicos | 42 |
| 3- Justificativa | 43 |
| 4- Materiais e métodos | 44 |
| 4.1. Material biológico | 44 |
| 4.2. Preparação dos extratos brutos | 46 |
| 4.3. Análise química preliminar | 47 |

| | |
|---|----|
| 4.4. Fracionamento do extrato bruto | 47 |
| 4.5. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-UV-DAD) | 48 |
| 4.6. Comparação dos perfis químicos obtidos por CLAE-UV-DAD | 50 |
| 4.7. Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antioxidante | 50 |
| 4.8. Análises Estatísticas | 54 |
| 5- Resultados e Discussão | 55 |
| 5.1. Análise dos extratos | 55 |
| 5.2. Análise da atividade antioxidante dos extratos | 63 |
| 5.3. Purificação do extrato bruto | 69 |
| 5.4. Análise da atividade antioxidante das frações | 74 |
| 6- Conclusão | 79 |
| 7- Referências | 80 |

RESUMO

Influência da variação geográfica na produção de metabólitos secundários e na atividade antioxidante de *Typha domingensis* Pers. (Typhaceae)

T. domingensis Pers. é uma macrófita aquática que possui distribuição cosmopolita e tem importante relevância em ecossistemas aquáticos. Flavonóides, polifenóis, ácidos graxos e cumarinas têm sido isolados e caracterizados para o gênero e são substâncias conhecidas por suas características antioxidantes. Diversos fatores ambientais como por exemplo, radiação ultravioleta, índice pluviométrico e temperatura influenciam quantitativa e qualitativamente na produção de metabólitos secundários em uma mesma espécie. O objetivo deste estudo foi identificar os metabólitos secundários de *T. domingensis* e avaliar a influência da variação geográfica na produção dessas substâncias, bem como na capacidade antioxidante das mesmas. Para este estudo extratos metanólicos foram obtidos de quatro populações coletadas em diferentes locais da lagoa Cabiúnas, Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro, Brasil. Os extratos foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-UV-DAD) afim de se determinar o perfil químico de cada extrato, bem como as frações obtidas pelo fracionamento deste. A atividade antioxidante das amostras foram avaliadas utilizando o método de redução do radical livre estável DPPH gerados *in vitro*. As análises por CLAE demonstraram uma elevada complexidade de todos os perfis químicos das amostras. Diferenças qualitativas e quantitativas foram observadas entre todas as populações e frações. Com relação aos testes antioxidantes, foi possível observar variações nos valores de EC_{50} (Concentração de amostra necessária para reduzir 50% da concentração inicial de DPPH) e no comportamento cinético das amostras. O extrato da população coletada no meio da lagoa (POP3) apresentou a maior capacidade antioxidante ($EC_{50}=0,314$ g amostra/g DPPH) enquanto que a população coletada na barra da lagoa (POP1) apresentou a menor capacidade antioxidante ($EC_{50}=0,710$ g amostra/g DPPH). Já com relação as frações obtidas do fracionamento do extrato, a fração butanólica foi a que apresentou a maior capacidade antioxidante ($EC_{50}=0,244$ g amostra/g DPPH) enquanto a fração hexânica a

menor ($EC_{50}=0,484$ g amostra/g DPPH). O comportamento cinético demonstrou que as amostras são consideradas antioxidantes de cinética lenta, ou seja, demoram maior tempo para realizar o sequestro de todos os radicais livres. A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que a alteração na composição química das folhas de *T. domingensis* por fatores abióticos que ao longo da lagoa se diferem afetam diretamente a sua atividade antioxidante.

ABSTRACT

Influence of geographic variation in the production of secondary metabolites and antioxidant activity of *Typha domingensis* Pers. (*Typhaceae*)

T. domingensis Pers. is an aquatic macrophyte that has a cosmopolitan distribution and has important significance in aquatic ecosystems. Flavonoids, polyphenols, fatty acids and coumarins have been isolated and characterized for the genre and are substances known for their antioxidant characteristics. Several environmental factors such as ultraviolet radiation, temperature and rainfall influence quantitative and qualitative production of secondary metabolites in the same species. The aim of this study was to identify the secondary metabolites of *T. domingensis* and evaluate the influence of geographic variation in the production of these substances, as well as the antioxidant capacity of the same. For this study methanol extracts obtained from four populations collected from different locations of the lagoon Cabiúnas Restinga of Jurubatiba National Park, Rio de Janeiro, Brazil. The extracts were analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC-UV-DAD) in order to determine the chemical profile of each extract and the fractions obtained by fractionating this. The antioxidant activity of the samples were evaluated using the method of reducing the stable free radical DPPH generated in vitro. The HPLC analyzes showed a high complexity of any chemical profiles of the samples. Qualitative and quantitative differences were observed among all populations and fractions. With respect to antioxidants tests, we observed variations in the EC₅₀ values (concentration of sample required to reduce 50% of the initial concentration of DPPH) and the kinetic behavior of the samples. The extract of the population collected in the middle of the pond (POP3) showed the highest antioxidant activity (EC₅₀= 0.314 g sample /g DPPH) while the population collected in the sandbar (POP1) had the lowest antioxidant capacity (EC₅₀= 0.710 g sample /g DPPH). In relation fractions obtained from the fractionation of the extract, the butanol fraction showed the most antioxidant capacity (EC₅₀= 0.244 g sample /g DPPH) while the hexane fraction lower (EC₅₀= 0.484 g sample /g DPPH). The kinetic behavior of the samples showed that the antioxidants are considered slow kinetics, in other words, it takes more

time to perform the sequestration of all radicals. From the results obtained it can be concluded that the change in chemical composition leaves of *T. domingensis* by abiotic factors along the lagoon differ directly affect their antioxidant activity.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------|--|----|
| Figura 1 - | Esquema com as principais vias biossintéticas dos metabólitos secundários (Adaptado de Simões <i>et al.</i> , 2010); | 19 |
| Figura 2 - | Principais fatores que alteram a biossíntese de metabólitos secundários em plantas (Goddo-Neto & Lopes, 2007); | 20 |
| Figura 3 - | Tipos de macrófitas encontradas em ambientes aquáticos (Esteves, 1988); | 24 |
| Figura 4 - | <i>Typha domingensis</i> Pers (< http://brq.cma.nsw.gov.au/index.php?page=murri-food-plants > acessado em 25/02/2013); | 41 |
| Figura 5 - | Localização da lagoa de Cabiunas no município de Macaé-RJ (Adaptado de Paiva <i>et al.</i> 2004); | 44 |
| Figura 6 - | Imagem da Lagoa de Cabiunas. 1- População 1 localizada na barrada lagoa; 2- População 2 localizada no braço da lagoa; 3- População 3 localizada do meio da lagoa; 4- População 4 localizada no fundo da lagoa; | 45 |
| Figura 7 - | Equipamento rotaevaporador com banho-maria (Buchi, R210, V850, B491); | 46 |
| Figura 8 - | Esquema da partição líquido-líquido do extrato metanólico da população coletada no mês de dezembro de 2010; | 48 |
| Figura 9 - | Aparelho de CLAE-UV-DAD (Shimatzu, modelo LC-20); | 49 |
| Figura 10 - | Reação do radical DPPH com uma substância doadora de hidrogênio; | 50 |
| Figura 11 - | Microplaca com 96 poços com as amostras após a adição da solução de DPPH; | 51 |

| | |
|---|----|
| Figura 12 - Fórmula estrutural do BHT (David <i>et al.</i> 2010); | 52 |
| Figura 13 - CCD dos extratos brutos em hexano, sendo 1- POP1; 2- POP2; 3- POP3; 4- POP4. Possuindo com fase móvel (A) Hexano 100% e (B) Diclorometano:Acetato de etila (1:1). Revelador: Sulfato Cérico; | 56 |
| Figura 14 - CCD dos extratos brutos em metanol, sendo 1- POP1; 2- POP2; 3- POP3; 4- POP4. Possuindo com fase móvel (A) Acetato de etila 100% e (B) BAW (Butanol:Ácido Acético:Água) 8:1:1. Revelador: Sulfato Cérico; | 57 |
| Figura 15 - Comparação dos perfis cromatográficos dos extratos brutos em metanol de <i>T. domingensis</i> de cada local de coleta; | 58 |
| Figura 16 - Perfis cromatográficos individuais de cada população coletada na lagoa, sendo (A) POP1; (B) POP2; (C) POP3 e (D) POP4; | 59 |
| Figura 17 - Espectro de DAD do extrato bruto da POP1; | 60 |
| Figura 18 - Espectro de DAD do extrato bruto da (A) POP2 e da (B) POP3; | 61 |
| Figura 19 - Espectro de DAD do extrato bruto da POP4; | 62 |
| Figura 20 - Média e desvio da cinética de reação da (A) POP1 e (B) POP2, ensaios realizados em triplicata; | 65 |
| Figura 21 - Média e desvio da cinética de reação da (A) POP3 e (B) POP4, ensaios realizados em triplicata; | 66 |
| Figura 22 - Média e desvio da cinética de reação do BHT, ensaio realizado em triplicata; | 67 |

| | |
|--|----|
| Figura 23 - CCD das frações da partição do extrato bruto em metanol da POP3, sendo 1- EB; 2- FR Hex; 3- FR CH ₂ Cl ₂ ; 4- FR But; 5- FR H ₂ O. Possuindo com fase móvel (A) Acetato de etila 100% (2X) e (B) BAW (Butanol:Ácido Acético:Água) 8:1:1. Revelador: Sulfato Cérico; | 70 |
| Figura 24 - Comparação dos perfis cromatográficos das frações da partição líquido-líquido do EB em metanol da POP3; | 71 |
| Figura 25 - Perfis cromatográficos individuais de cada fração, sendo (A) FR But; (B) FR CH ₂ Cl ₂ e (C) FR Hex; | 72 |
| Figura 26 - Espectro de UV do pico com tempo de retenção 30,88 min; | 73 |
| Figura 27 - Núcleo fundamental dos flavonoides; | 73 |
| Figura 28 - Média e desvio da cinética de reação da FR Hex, ensaio realizado em triplicata; | 75 |
| Figura 29 - Média e desvio da cinética de reação das (A) FR CH ₂ Cl ₂ (B) FR But, ensaios realizados em triplicata; | 76 |
| Figura 30 - Média e desvio da cinética de reação do BHT, ensaio realizado em triplicata. | 77 |

LISTA DE TABELAS E QUADROS

| | | |
|------------|--|----|
| Tabela 1 - | Substâncias já isoladas e descritas na literatura nos últimos anos para o gênero <i>Typha</i> ; | 26 |
| Tabela 2 - | Características ambientais observadas nos locais de coleta; | 45 |
| Tabela 3 - | Sistema de gradiente desenvolvido para <i>T. dominguesis</i> utilizado na análise de CLAE-UV-DAD; | 49 |
| Tabela 4 - | Rendimento dos extratos brutos em metanol; | 55 |
| Tabela 5 - | Rendimento dos extratos brutos em hexano; | 55 |
| Tabela 6 - | Médias \pm Desvio Padrão (n=3) de EC ₅₀ dos extratos brutos de <i>T. domingensis</i> expressa em g de amostra/ g de DPPH. O BHT foi utilizado como controle positivo no ensaio. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras (Turkey); | 63 |
| Tabela 7 - | Rendimento das frações da partição líquido-líquido do extrato bruto da POP3; | 69 |
| Tabela 8 - | Médias \pm Desvio Padrão (n=3) de EC ₅₀ das frações do extrato bruto da POP3 expressa em g de amostra/ g de DPPH. O BHT foi utilizado como controle positivo no ensaio. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras (Turkey). | 74 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|----------------------------------|---|
| BHT - | 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol |
| CC - | Cromatografia em Coluna |
| CCD - | Cromatografia em Camada Delgada |
| CeSO ₄ - | Sulfato Cérico |
| EC ₅₀ - | Concentração Efetiva de 50% da redução do DPPH |
| CLAE-UV-DAD - | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Ultra Violeta e ao detector de arranjo de diodos |
| COD | Carbono Orgânico Dissolvido |
| DPPH - | 2,2-difenil-1-picril-hidrazila |
| EB - | Extrato bruto |
| H ₂ O ₂ - | Peróxido de Hidrogênio |
| H ₂ SO ₄ - | Ácido Sulfúrico |
| MeOH - | Solvente orgânico metanol |
| Min - | Minutos |
| PNRJ - | Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba |
| POP1 - | População 1, coletada no começo da lagoa de Cabiunas |
| POP2 - | População 2, coletada no braço da lagoa de Cabiunas |
| POP3 - | População 3, coletada no meio da lagoa de Cabiunas |
| POP4 - | População 4, coletada no final da lagoa de Cabiunas |
| UV - | Ultravioleta |

1- Introdução

A biodiversidade pode ser definida como a variabilidade de organismos vivos de todas as origens, abrangendo, dentre outros, os ecossistemas terrestres, marinhos e outros ecossistemas aquáticos e os complexos ecológicos de que fazem parte, compreendendo ainda a diversidade dentro de espécies, entre espécies e de ecossistemas (CDB, 2000). A magnitude da biodiversidade brasileira não é conhecida com precisão por causa de sua alta complexidade, porém acredita-se que o Brasil é um dos países com maior biodiversidade no mundo, com mais de 55 mil espécies de plantas catalogadas. Essa enorme biodiversidade deve-se, entre outros fatores, à extensão territorial, latitudinal e aos distintos padrões climáticos do país (Peres *et al.*, 2011).

As oportunidades para identificação de produtos com possível utilização econômica aumentam com a diversidade das espécies. O interesse na diversidade molecular das plantas tem estimulado a busca pelo conhecimento do seu metabolismo secundário, o qual é responsável pela síntese de grande parte das substâncias vegetais com atividade biológica e ecológica. Grupos de substâncias de estruturas complexas como alcalóides, terpenóides e substâncias fenólicas, bem como seus derivados tem sido alvo de investigação a respeito de suas propriedades ecológicas e medicinais. (Vanisree *et al.*, 2004).

1.1- A planta e seu metabolismo

Todos os organismos vivos possuem diversas enzimas que são responsáveis pelo seu metabolismo, na qual corresponde ao conjunto de reações químicas que estão ocorrendo em cada célula constantemente. As substâncias químicas formadas são chamadas de metabólitos. As reações enzimáticas envolvidas podem ser do tipo anabólica, catabólica ou de biotransformação e visam, primariamente, satisfazer as funções vitais da célula. Por serem comuns a todos os organismos vivos e serem essenciais à manutenção da vida, estas substâncias são consideradas integrantes do metabolismo primário (Bassman 2004).

Entretanto, as plantas, os microrganismos e alguns animais possuem capacidade de produzir, transformar e acumular substâncias não diretamente relacionadas à manutenção da sua vida e sim consideradas relacionadas à sua adaptação ao meio. Estas substâncias são consideradas integrantes do metabolismo secundário, cujos produtos garantem a sobrevivência e perpetuação da espécie em seu ecossistema (Alves 2003).

Este conceito de metabolismo secundário foi descrito primeiramente por Kossel (1891), que o definiu como oposto ao metabolismo primário. Porém o conceito mais aceito atualmente é que os metabólitos secundários são substâncias químicas com um papel importante na adaptação dos organismos aos seus ambientes (Harborne, 1988; Aerts *et al.*, 1991). Com isso esses metabólitos secundários contribuem para o aumento da probabilidade de sobrevivência de uma espécie em um ecossistema atuando através de funções como: defesa contra herbívoros e microrganismos, proteção contra raios ultravioleta, atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes (Simões *et al.*, 2010).

Os metabólitos secundários são sintetizados por vários caminhos biossintéticos os quais produzem moléculas dotadas de grande diversidade de esqueletos e grupamentos funcionais (Alves, 2001). A origem de todas essas moléculas pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose. Esta é convertida em moléculas de ácido pirúvico que podem seguir duas vias diferentes: a via do ácido chiquímico e a via do acetil coenzima A (acetil-CoA). Na via do ácido chiquímico são formados alguns dos metabólitos secundários aromáticos (alcaloides indólicos, quinolínicos, isoquinolínicos, ligninas e lignanas, cumarinas e taninos hidrossolúveis). Já na via do acetil-CoA pode-se seguir outras três vias diferentes: a via do ciclo do ácido cítrico onde serão formados os alcaloides pirrolidínicos, tropânicos, pirrolizidínicos, piperidínicos e quinolizidínicos, a via do mevalonato na qual originam os terpenóides e os esteróis, e a via da condensação do acetato que originam os ácidos graxos e as acetogeninas. A combinação de uma unidade do ácido chiquímico e uma ou mais unidades de acetil-CoA poderá resultar na produção de antraquinonas, flavonoides e dos taninos condensados (FIGURA 1) (Simões *et al.*, 2010).

Vale resaltar que os metabólitos secundários podem ser encontrados na forma livre, sendo denominados genericamente de agliconas, ou estar ligados a uma ou mais unidades de açúcar, formando o que se denomina de heterosídeo (Simões *et al.*, 2010).

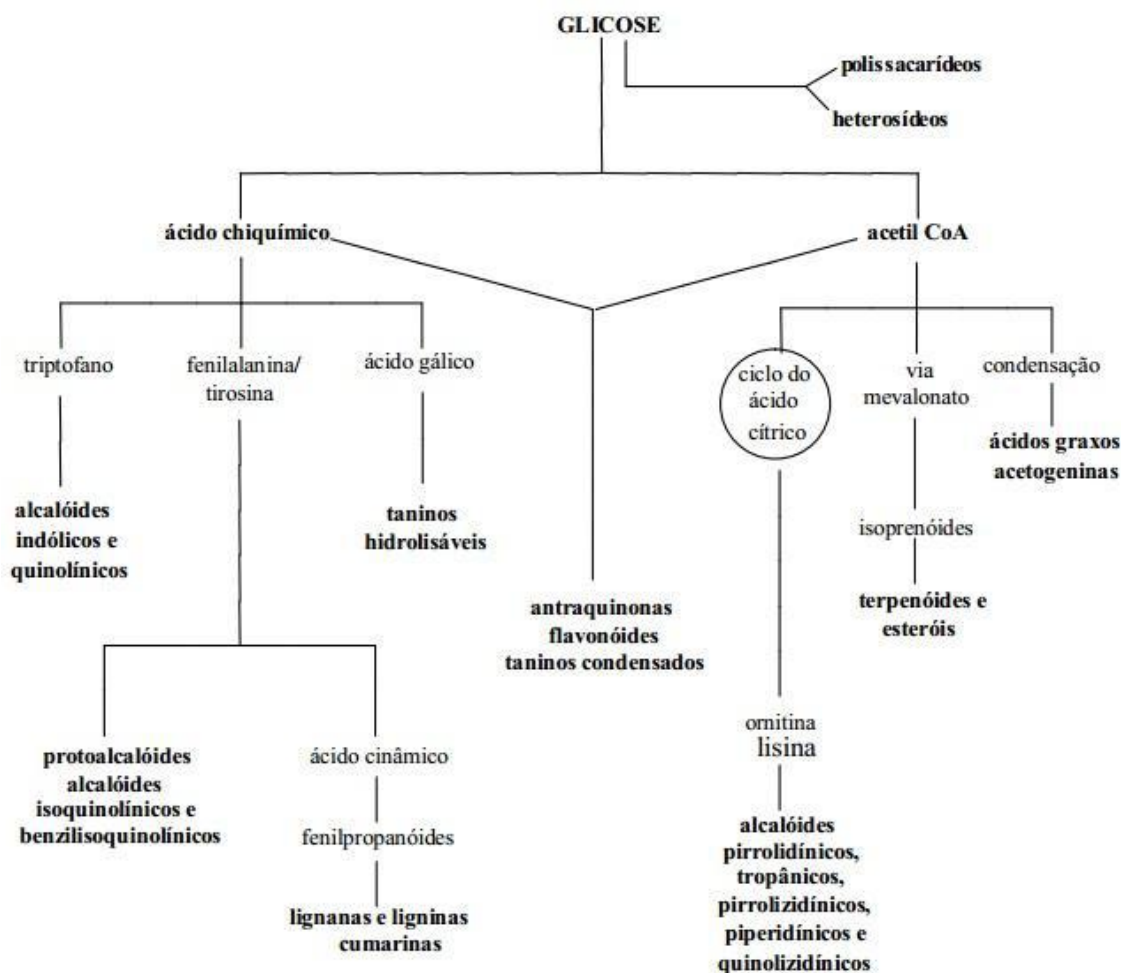


Figura 1 – Esquema com as principais vias biossintéticas dos metabólitos secundários (Adaptado de Simões *et al.*, 2010)

1.1.1- Variação no metabolismo secundário em plantas

Variações temporais e espaciais no conteúdo total, bem como as proporções relativas de metabólitos secundários em plantas ocorrem em diferentes níveis (geográficos, sazonais e diárias; inter- e intraespecífica) e, apesar da existência de um controle genético, a expressão pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos. De fato, os metabólitos secundários representam uma

interface química entre as plantas e o ambiente circundante, portanto, sua síntese é frequentemente afetada por condições ambientais, como irradiação solar, concentração de nutrientes, índice pluviométrico, temperatura, salinidade e pH (FIGURA 2) (Gobbo-Neto & Lopes, 2007).



Figura 2 – Principais fatores que alteram a biossíntese de metabólitos secundários em plantas (Gobbo-Neto & Lopes, 2007).

Problemas ambientais, como por exemplo, o aumento na concentração de CO₂ atmosférico, acompanhado do aumento da temperatura média anual devido à depleção da camada de ozônio e mudanças nos índices de pluviosidade, podem acarretar mudanças na biologia dos organismos afetando diretamente o crescimento e o desenvolvimento das plantas, incluindo a produção de metabólitos secundários (Lavola *et al.*, 2003). Além disso, a variação na concentração de CO₂ afeta as taxas fotossintéticas (Levine *et al.*, 2008) podendo influenciar diretamente na disponibilidade de carbono para a produção de metabólitos secundários.

A seguir serão discutidos alguns dos principais fatores que podem alterar a taxa de produção de metabólitos secundários.

Herbivoria e ataque de patógenos

Os danos causados a plantas por ataque de herbívoros ou patógenos podem influenciar na expressão de metabólitos secundários específicos, na qual está ligada a aceitabilidade desta planta pelo herbívoro ou patógeno (Gobbo-Neto & Lopes, 2007). Muitos destes metabólitos são tóxicos ou repelentes e a produção pode aumentar quando a planta é atacada por estes herbívoros ou patógenos. Além disso, algumas substâncias podem ser liberadas na atmosfera, atraindo parasitas e predadores que matam os herbívoros (Agosta, 1996).

Sabe-se também que o nível de indução pode variar de acordo com o agente causador. De fato, algumas observações têm revelado que os danos causados pela alimentação de insetos podem resultar em uma resposta fisiológica diferenciada, na qual a formação de metabólitos secundários é induzida mais rapidamente, devido a presença de substâncias indutoras na saliva do inseto. (Reymond *et al.*, 2000).

Porém a herbivoria também pode desempenhar um papel importante na estruturação de comunidades em ambientes aquáticos podendo ser responsável pela diminuição da abundância de plantas aquáticas, influenciando na sua dinâmica populacional no ecossistema (Parker *et al.*, 2007).

Sazonalidade, ritmo circadiano e variação intraspecífica

A estação do ano e o horário do dia em que uma planta é coletada é um dos fatores de maior importância, visto que a quantidade e, às vezes, até mesmo a composição dos constituintes ativos não é constante durante o ano e o dia (Gobbo-Neto & Lopes 2007).

O perfil metabólico em plantas também varia de indivíduo para indivíduo dentro de uma mesma espécie (variação intraespecífica). Variações na disponibilidade de recursos necessários para o desenvolvimento das plantas

(água, luz, nutrientes) são vistos como fatores cruciais para este tipo de variação no perfil metabólico (Santos & Blantt, 1998; Cronin, 2006).

Temperatura

Com as mudanças climáticas o mundo vem experimentado nos últimos anos as consequências das degradações ambientais (IPCC 2007; Willis *et al.*, 2009). Dentre as consequências ambientais previstas e/ou confirmadas no cenário global estão: diminuição da camada de ozônio ocasionando o aumento da temperatura terrestre, a redução dos índices pluviométricos nas regiões tropicais, a redução na área das geleiras e glaciares, alteração drástica nos padrões globais de circulação atmosférica e das correntes oceânicas e, conseqüentemente a perda de ecossistemas inteiros pela alteração de ciclos reprodutivos e declínio de populações de animais e de vegetais com capacidade de aclimatação baixa ou ausente (Graham *et al.*, 2006).

Apesar de cada espécie ter se adaptado ao seu habitat, as plantas frequentemente são capazes de existir em uma considerável faixa de temperatura. E esta faixa de temperatura exerce grande influência em seu desenvolvimento, afetando, portanto, a produção de metabólitos secundários (Camarero *et al.*, 2012). Existe uma correlação bem estabelecida entre a intensidade da radiação solar e a produção de substâncias fenólicas, por exemplo. Isso pode ser explicado pela proteção exercida por essas substâncias contra danos oxidativos, induzido pelo aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) celulares (Giasson *et al.*, 2002; Gobbo-Neto & Lopes 2007).

O termo EROs é designado para espécies químicas altamente reativas, como por exemplo: o radical superóxido (O_2^-), o radical hidroxila ($\bullet OH$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Estas substâncias são produzidas em todas as células aeróbicas nas mitocôndrias como um subproduto do metabolismo normal durante a produção de energia (Song, 2004; Matsumoto, 2008; Al-Gubory *et al.*, 2010; Gill & Tuteja, 2010).

Índice pluviométrico

Aspectos fisiológicos como fotossíntese, mobilidade de reservas, crescimento, podem ser alterados pelo estresse hídrico e, conseqüentemente, levar a alterações no metabolismo secundário. Nas plantas aquáticas o estresse hídrico exerce maior influência, pois estas plantas estão em contato direto com a água e necessitam dela para sua sobrevivência (Palma-Silva, 1998; Gobbo-Neto & Lopes, 2007).

Ambientes com altos índices de flutuação no nível da água levam a necessidade de adaptações fisiológicas e químicas das plantas aquáticas (White & Ganf, 1998; Chen *et al.*, 2010).

1.2- Plantas no ambiente aquático

As plantas aquáticas, também conhecidas como macrófitas aquáticas, evoluíram a partir de espécies terrestres. Esses organismos possuem características de plantas terrestres e grande capacidade adaptativa ao ambiente aquático, podendo ser encontrados desde ambientes de brejo até áreas completamente submersas. Naturalmente são organismos primários, servindo de alimento para diversos animais e desempenham um papel importante na troca de nutrientes entre o sedimento e a água (Palma-Silva, 1998).

As macrófitas podem ser classificadas em 5 grupos ecológicos baseado no seu modo de vida no ambiente aquático (FIGURA 3) (Esteves, 1988). Esses tipos são:

- **Macrófitas aquáticas emersas:** são enraizadas no sedimento, mas suas folhas crescem para fora d'água, como por exemplo: *Typha domingensis*;
- **Macrófitas aquáticas com folhas flutuantes:** são enraizadas no sedimento e suas folhas ficam flutuando na superfície d'água como por exemplo: *Nymphoides indica*;
- **Macrófitas submersas enraizadas:** são enraizadas e crescem totalmente debaixo d'água, como por exemplo: *Elodea sp* *Cabomba sp*;

- **Macrófitas aquáticas submersas livres:** permanecem flutuando debaixo d'água e podem se prender a outras macrófitas, como por exemplo: *Utricularia* sp;
- **Macrófitas aquáticas flutuantes:** flutuam livremente na superfície d'água, como por exemplo: *Ecchornia crancepsi*.

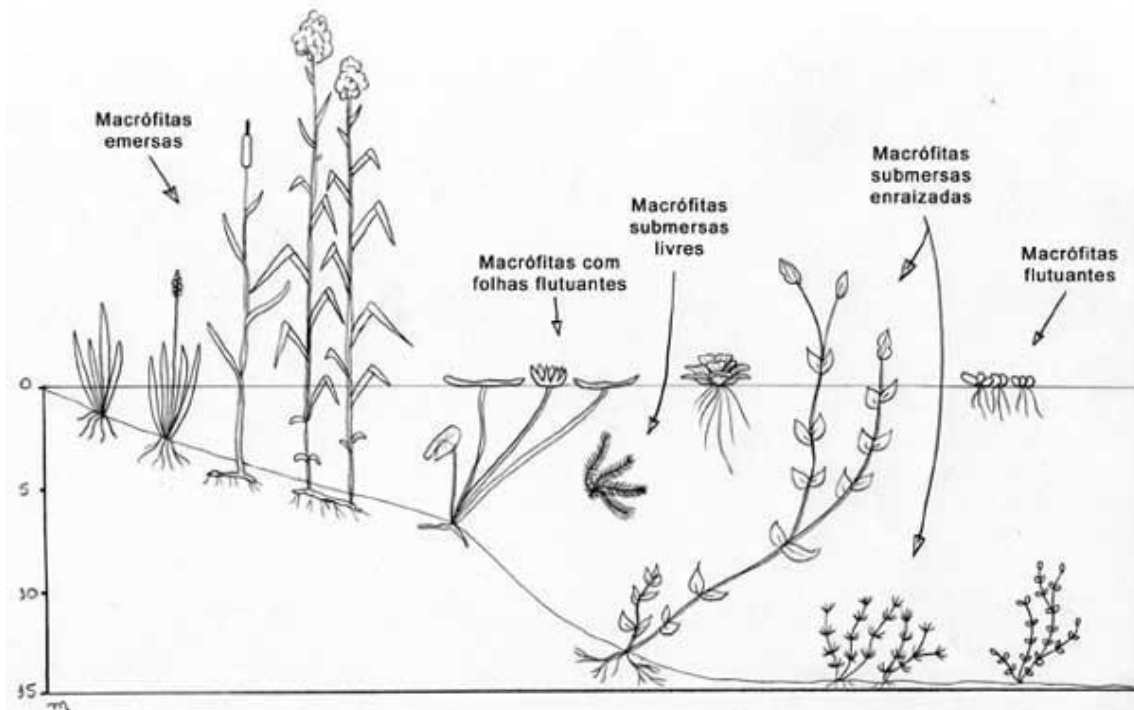


Figura 3 – Tipos de macrófitas encontradas em ambientes aquáticos (Esteves, 1988).

1.3- O gênero *Typha* (Typhaceae)

Plantas aquáticas do gênero *Typha* são frequentemente encontradas perto da água, lagos, lagoas e áreas ribeirinhas de várias regiões do mundo, na América, Europa e Ásia (Mitch, 2000). Este gênero inclui cerca de doze espécies: *T. domingensis*, *T. angustifolia*, *T. latifolia*, *T. laxmannii*, *T. minima*, *T. orientallis*, *T. elephantina*, *T. przewalskii*, *T. changbaiensis*, *T. davidiana*, *T. pallida*, *T. lugdumensis* (Kun & Simpson, 2008), que podem tolerar flutuações no nível da água, condições de redução no solo e salinidade moderada. Dependendo da disponibilidade de nutrientes, estas macrófitas podem ser consideradas invasoras agressivas em zonas inundadas de água doce e salobra (Miao *et al.*, 2000, Miao, 2004, Varghese *et al.* 2009).

Estas plantas mostram importância estrutural e metabólica relevante nos ecossistemas aquáticos (Neue *et al.*, 1997). Também se destacam por sua capacidade de fornecer substrato para as comunidades perifíticas e bacterianas, bem como abrigo para insetos e para postura de ovos de peixes. Além disso, esses organismos têm demonstrado ter uma enorme energia e capacidade de armazenamento de nutrientes (Daoust & Childers, 1998). Essas plantas podem ser utilizadas na minimização de questões atuais, como o sequestro de carbono, fitorremediação de efluentes domésticos e industriais (Esteves *et al.*, 2008), além de serem usadas na alimentação e na medicina popular a muitos anos em diversas culturas, como a cultura chinesa, indiana e a turca (Varghese *et al.* 2009).

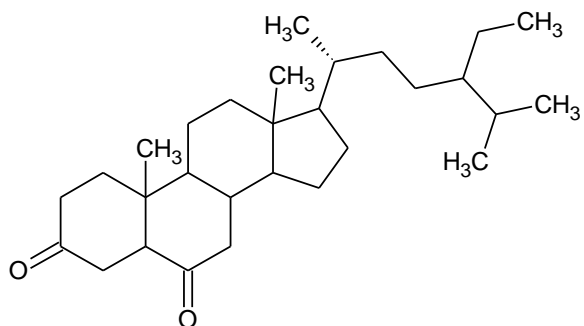
1.3.1- Fitoquímica

Apesar de este gênero ser muito bem distribuído pelo mundo, poucos estudos fitoquímicos foram realizados ao longo dos anos. Uma breve revisão bibliográfica foi realizada nos bancos de dados: Web of Science e Science Direct durante o período de janeiro de 2013 a maio de 2013 e apenas 12 artigos científicos foram encontrados em relação aos estudos de isolamento e identificação de moléculas (TABELA 1).

Para este gênero é possível notar a predominância de substâncias químicas das classes de esteróis (Greca *et al.*,1990, Zhao *et al.*, 1990), substâncias fenólicas, como flavonoides (Nhiem *et al.*, 2010, Shode *et al.*, 2002, Weiwei *et al.*, 2012) e ácidos fenólicos (Gallardo-Willians *et al.*, 2002), além de ácidos graxos (Aliotta *et al.*, 1990, Bin & Yunru 1998) (TABELA 1).

Tabela1: Substâncias já isoladas e descritas na literatura nos últimos anos para o gênero *Typha*.

| Estrutura | Nome | Espécie e parte da planta | Local de coleta | Ref. |
|--|-------------------------------|----------------------------------|-----------------|------------------------|
| | β -sitosterol | Folhas de <i>Typha latifolia</i> | Itália | Greca et al. 1990 a |
| | 7-oxositosterol | Folhas de <i>Typha latifolia</i> | Itália | Greca et al. 1990 a |
| <p data-bbox="459 1507 587 1541">R=H, β-OH</p> | 7 β -hydroxysitosterol | Folhas de <i>Typha latifolia</i> | Itália | Greca et al. 1990 a |
| <p data-bbox="459 1877 587 1910">R=H, α-OH</p> | 7 α -hydroxysitosterol | Folhas de <i>Typha latifolia</i> | Itália | Greca et al. 1990 a |



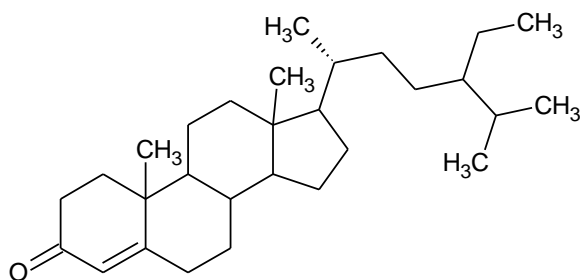
Dione

Folhas de
Typha latifolia

Itália

Greca *et al.*

1990 a



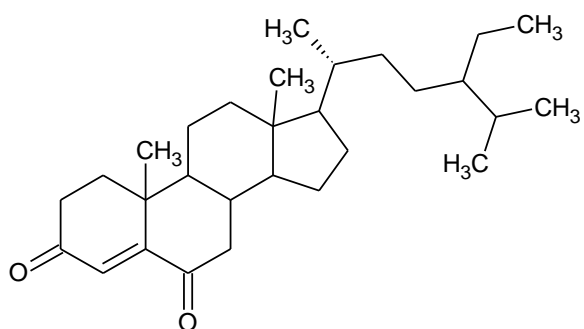
Enone

Folhas de
Typha latifolia

Itália

Greca *et al.*

1990 a



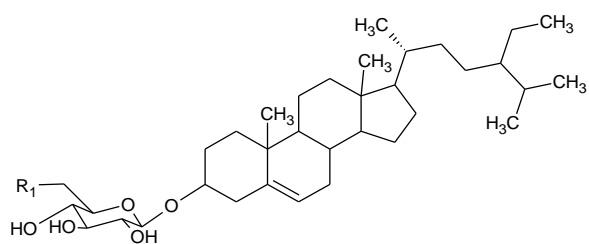
Enedione

Folhas de
Typha latifolia

Itália

Greca *et al.*

1990 a



$R_1 = \text{CH}_2\text{O}$ —octadeca (9Z, 12Z, 15Z) trienoil

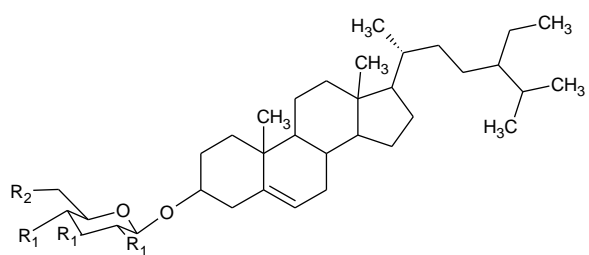
β -sitosterol-3-O[6-
octadeca (9Z,12Z,
15Z) trienoil] β -D-
glicopiranosideo

Folhas de
Typha latifolia

Itália

Greca *et al.*

1990 a



$R_1 = \text{O}-\text{Ac}$
 $R_2 = \text{CH}_2\text{O}$ —octadeca (9Z, 12Z, 15Z) trienoil

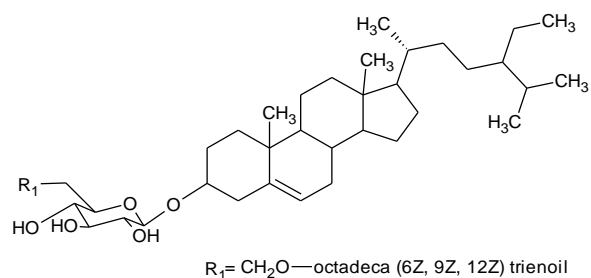
β -sitosterol-3-O[6-
octadeca (9Z,12Z,
15Z) trienoil] β -D-
glicopiranosideo
de metila

Folhas de
Typha latifolia

Itália

Greca *et al.*

1990 a



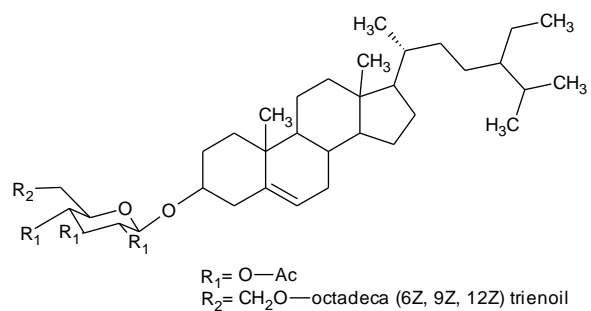
β -sitosterol-3-O(6-octadeca(6Z, 9Z, 12Z) trienoil) β -D-glicopiranosideo

Folhas de *Typha latifolia*

Itália

Greca *et al.*

1990 a



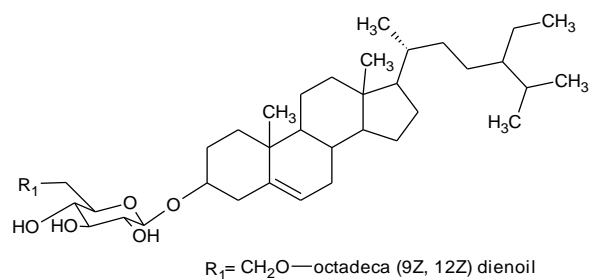
β -sitosterol-3-O(6-octadeca(6Z, 9Z, 12Z) trienoil) β -D-glicopiranosideo de metila

Folhas de *Typha latifolia*

Itália

Greca *et al.*

1990 a



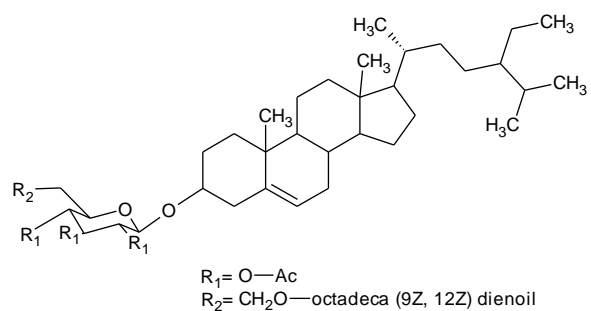
β -sitosterol-3-O(6-octadeca(9Z, 12Z) dienoil) β -D-glicopiranosideo

Folhas de *Typha latifolia*

Itália

Greca *et al.*

1990 a



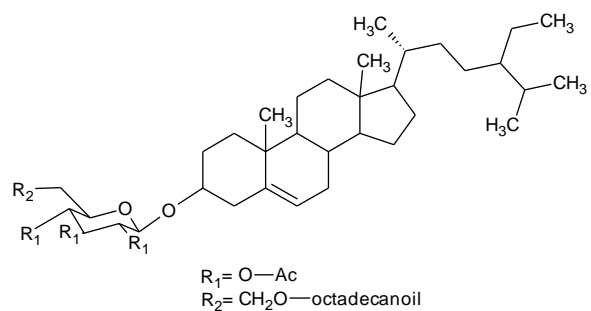
β -sitosterol-3-O(6-octadeca(9Z, 12Z) dienoil) β -D-glicopiranosideo de metila

Folhas de *Typha latifolia*

Itália

Greca *et al.*

1990 a



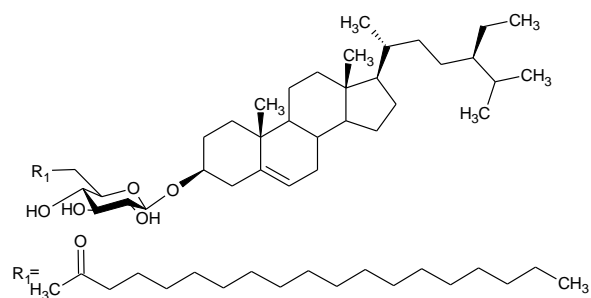
β -sitosterol-3-O(6-octadecanol) β -D-glicopiranosideo de metila

Folhas de *Typha latifolia*

Itália

Greca *et al.*

1990 a

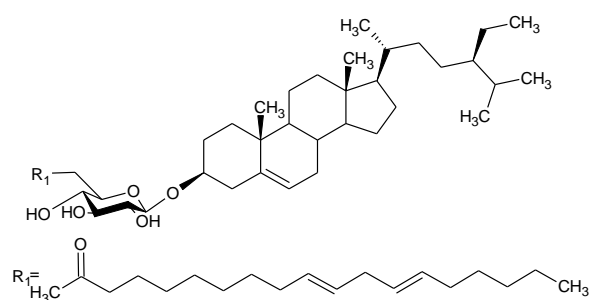


β -sitosterol-3-O
(6-octadecanol) β -
D-glicopiranosideo

Pólen de
Typha
domingensis

Coreia

Greca *et al.*
1990 a
&
Nhiem *et al.* 2010

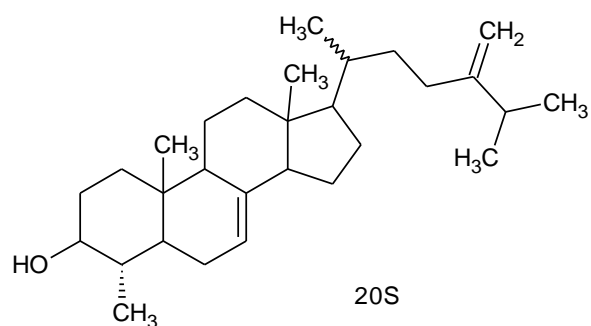


Beta-sitosterol-3-O
(6-octadeca-
9Z,12Z- dienoil)
Beta-D-
glicopiranosida

Pólen de
Typha
domingensis

Coreia

Nhiem *et al.* 2010

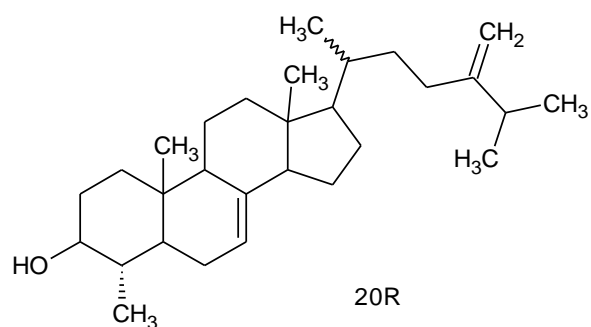


(20S)-4 α -metil-24-
metilenecolest-7-
en-3beta-ol

Pólen de
Typha latifolia

Itália

Greca *et al.*
1990 b



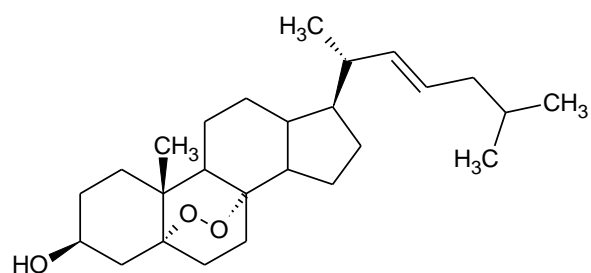
(20R)-4 α -metil-24-
metilenecolest-7-
en-3beta-ol

Pólen de
Typha latifolia

Itália

Greca *et al.*
1990 b

| | | | | |
|---|--|----------------------------------|--------|----------------------------|
| <p>20R, 24S</p> | (20R,24S)-4α-metil-24-dimetilcolest-7-en-3β-ol | Pólen de <i>Typha latifolia</i> | Itália | Greca <i>et al.</i> 1990 b |
| <p>20R, 24R</p> | (20R,24R)-4α-metil-24-dimetilcolest-7-en-3β-ol | Pólen de <i>Typha latifolia</i> | Itália | Greca <i>et al.</i> 1990 b |
| <p>20S, 24S</p> | (20S,24S)-4α-metil-24-dimetilcolest-7-en-3β-ol | Pólen de <i>Typha latifolia</i> | Itália | Greca <i>et al.</i> 1990 b |
| <p>20S, 24R</p> | (20S,24R)-4α-metil-24-dimetilcolest-7-en-3β-ol | Pólen de <i>Typha latifolia</i> | Itália | Greca <i>et al.</i> 1990 b |
| <p>5β,8β-epidioxiergosta-6,22-dien-3-β-ol</p> | 5β,8β-epidioxiergosta-6,22-dien-3-β-ol | Folhas de <i>Typha latifolia</i> | Itália | Greca <i>et al.</i> 1990 c |

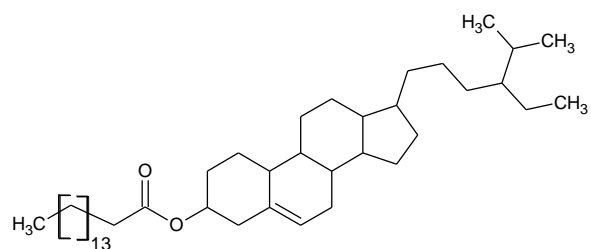


5 α ,8 α -
epidioxiergosta-
6,22-dien-3- β -ol

Folhas de
Typha latifolia

Itália

Greca *et al.*
1990 c

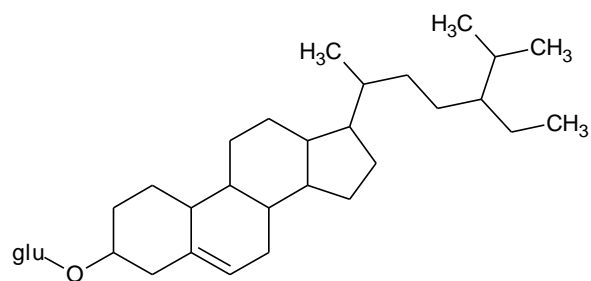


β -sitosterol
palmitato

Pólen de
Typha angustifolia

China

Zhao *et al.* 1990

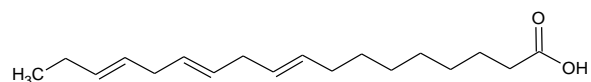


β -sitosterol
glicoside

Pólen de
Typha angustifolia

China

Zhao *et al.* 1990

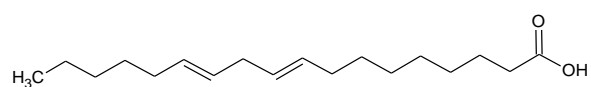


Ácido α -linoleico

Folhas de
Typha latifolia

Itália

Aliotta *et al.* 1990

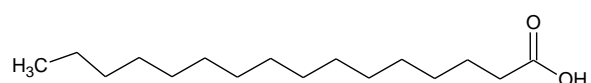


Ácido linoleico

Folhas de
Typha latifolia

Itália

Aliotta *et al.* 1990

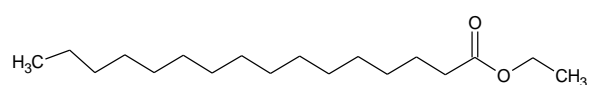


Ácido palmítico

Pólen de
Typha Orientalis

China

Bin &
Yunru
1998

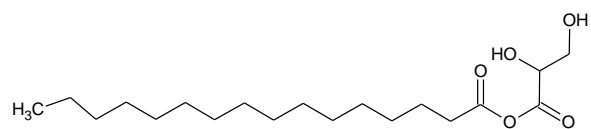


Etil palmitato

Pólen de
Typha Orientalis

China

Bin &
Yunru
1998

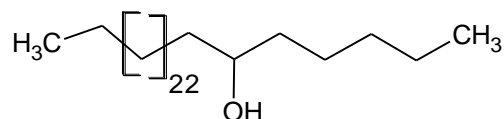


Gliceril palmitato

Pólen de
Typha
Orientalis

China

Bin &
Yunru
1998

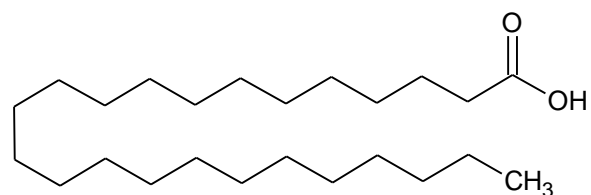


6- hentriacontanol

Pólen de
Typha
Orientalis

China

Bin &
Yunru
1998

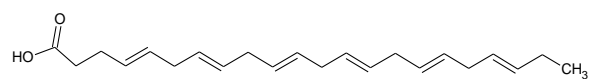


Ácido lignocérico

Pólen de
Typha
Orientalis

China

Bin &
Yunru
1998

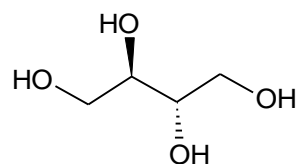


Ácido
docosaheptaenoico

Pólen de
Typha
Orientalis

China

Bin &
Yunru
1998

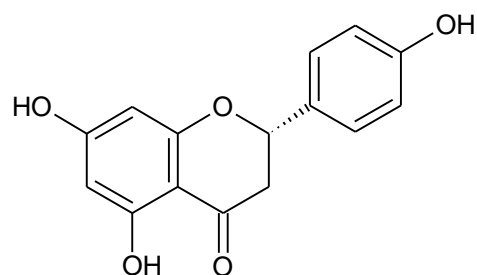


Eritritol
ou
(2R,3S)-butane-
1,2,3,4-tetraol

Pólen de
Typha
Orientalis

China

Bin &
Yunru
1998

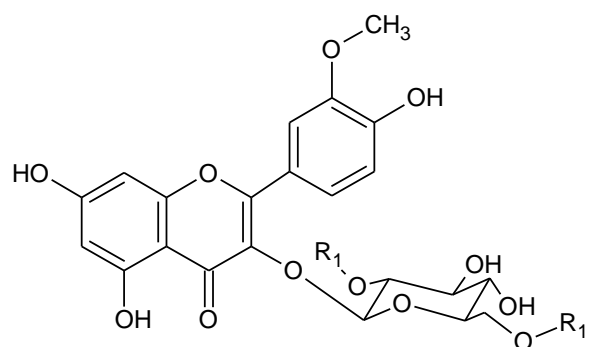


(2S)-Naringenina

Pólen de
Typha
domingensis

Coréia

Nhiem *et*
al. 2010



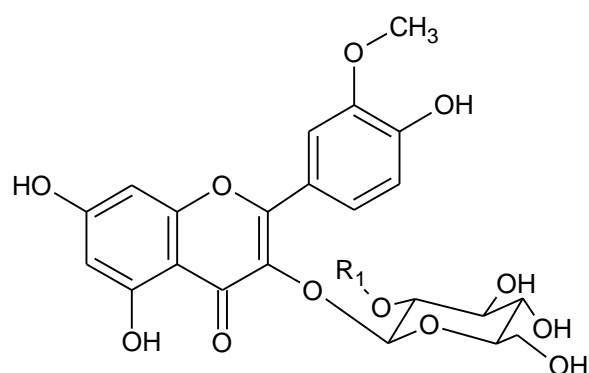
Typhaneosida

Pólen de
Typha
domingensis

Coréia

Nhiem *et al.* 2010

R₁ = Alfa -L-rhamnopiranosil



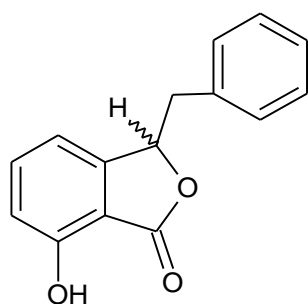
Isorhamnetina 3-
O- (2-O- α -L-
rhamnopyranosil
Beta-D-
glicopiranoside

Pólen de
Typha
angustata

Coréia

Nhiem *et al.* 2010

R₁ = Alfa -L-rhamnopiranosil

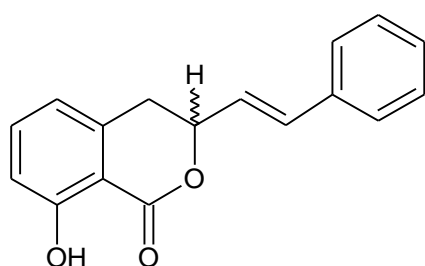


Typhaphthalida ou
7-hidroxi-3-
benzilftalida

Rizoma de
Typha
capensis

África do
sul

Shode *et al.* 2002

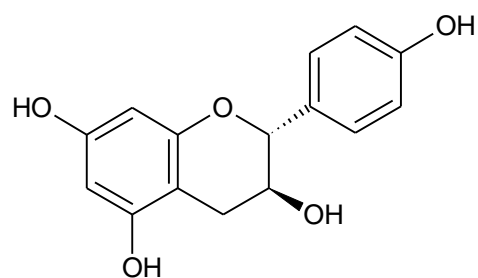


Typharina
Ou 8E-hidroxi-3-
[2-(fenil)etenil]
dihidro-
isocumarina

Rizoma de
Typha
capensis

África do
sul

Shode *et al.* 2002

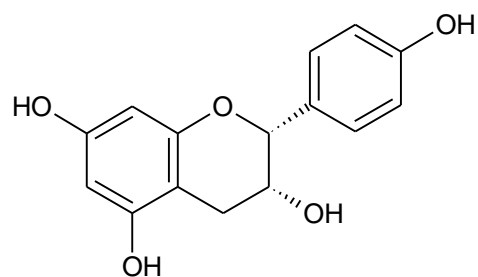


Afzelequina

Rizoma de
Typha
capensis

África do
sul

Shode *et*
al. 2002

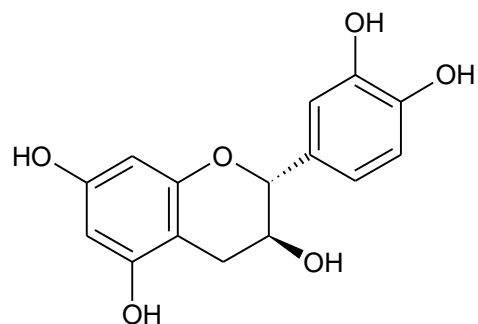


Epiafzelequina

Rizoma de
Typha
capensis

África do
sul

Shode *et*
al. 2002

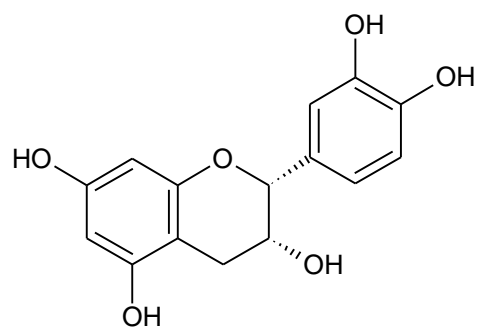


Catequina

Rizoma de
Typha
capensis

África do
sul

Shode *et*
al. 2002

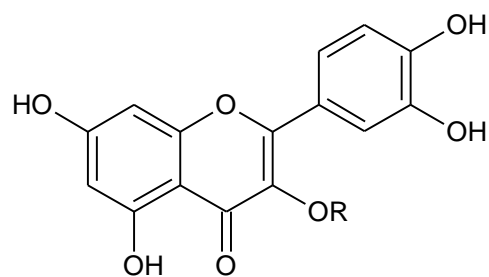


Epicatequina

Rizoma de
Typha
capensis

África do
sul

Shode *et*
al. 2002



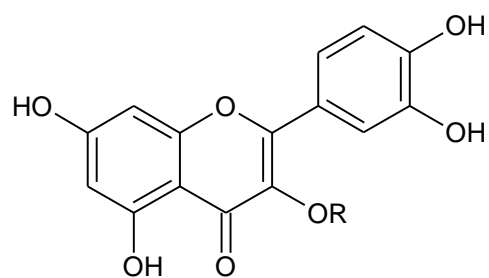
Quercetin-3-O (2^G-
alfa-L-rhamnosil)-
rutosido

Pólen de
Typha
angustifolia

China

Weiwei *et*
al. 2012

R = rha (1-2) glc (6-1) rha



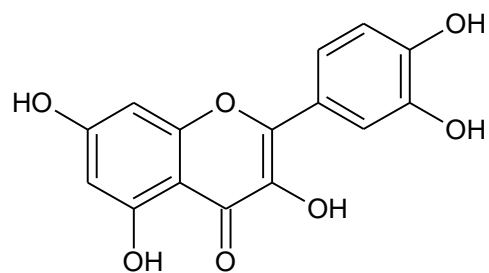
R = glc (2-1) rha

Quercetina-3-O-
neohesperidosida

Pólen de
Typha
angustifolia

China

Zhao *et al.* 1990
&
Weiwei *et al.* 2012

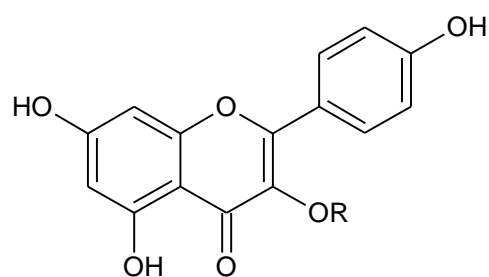


Quercetina

Pólen de
Typha
angustifolia

China

Weiwei *et al.* 2012



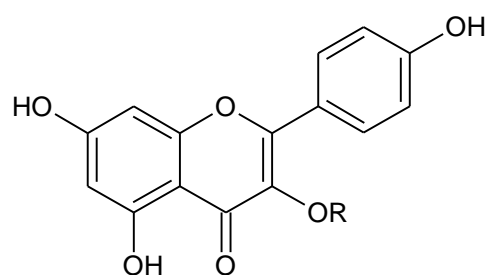
R = rha (1-2) glc (6-1) rha

Kaempferol-3-O-
(2^G-alfa-L-
ramnosil)-
rutinosida

Pólen de
Typha
angustifolia

China

Weiwei *et al.* 2012



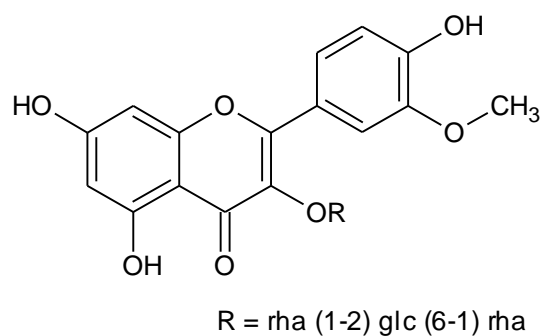
R = glc (2-1) rha

Kaempferol-3-O-
neohesperidosida

Pólen de
Typha
angustifolia

China

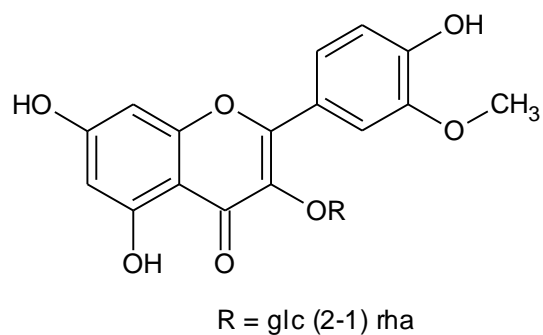
Weiwei *et al.* 2012



Isoramnetina-3-O-(2^G-alfa-L-rhamnosil)-rutinosida

Pólen de *Typha angustifolia*

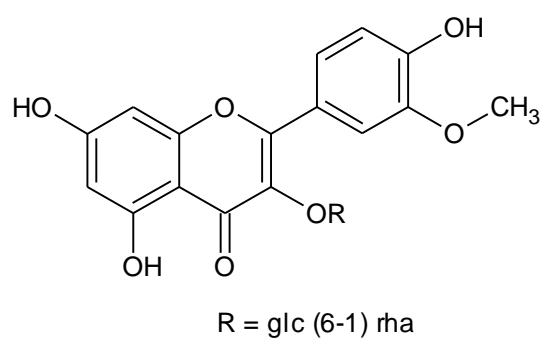
China Weiwei *et al.* 2012



Isoramnetina-3-O-neoheperidosida

Pólen de *Typha angustifolia*

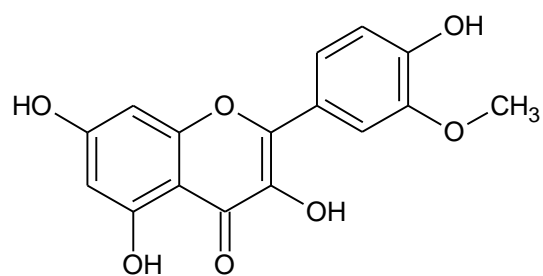
China Zhao *et al.* 1990 & Weiwei *et al.* 2012



Isoramnetina-3-O-rutinosida

Pólen de *Typha angustifolia*

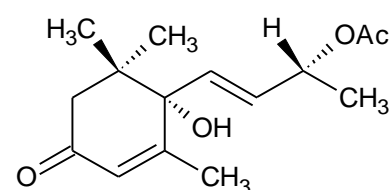
China Weiwei *et al.* 2012



Isoramnetina

Pólen de *Typha angustifolia*

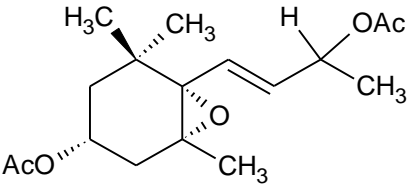
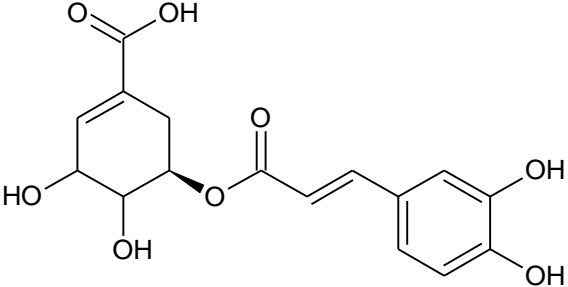
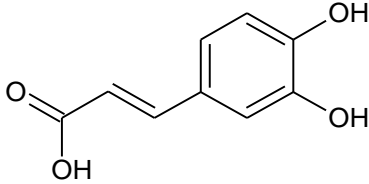
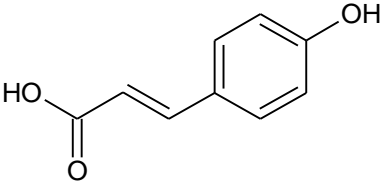
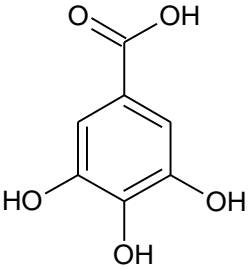
China Weiwei *et al.* 2012



Blumenol A acetato

Folhas de *Typha latifolia*

Itália Greca *et al.* 1990 d

| | | | | |
|---|--|---|----------------|--------------------------------------|
|  | 3-acetoxy-5,6-epoxi-beta-ionol acetato | Folhas de <i>Typha latifolia</i> | Itália | Greca <i>et al.</i> 1990 d |
|  | Ácido 5-O-trans-cafeoilchiquimico | Flor feminina de <i>Typha latifolia</i> | Japão | Ozawa & Imagawa 1988 |
|  | Ácido cafeico | Folhas de <i>Typha domingensis</i> | Estados Unidos | Gallardo-Willians <i>et al.</i> 2002 |
|  | Ácido p-cumárico | Folhas de <i>Typha domingensis</i> | Estados Unidos | Gallardo-Willians <i>et al.</i> 2002 |
|  | Ácido gálico | Folhas de <i>Typha domingensis</i> | Estados Unidos | Gallardo-Willians <i>et al.</i> 2002 |

1.3.2- Atividade biológica

O uso tradicional de plantas medicinais é fundamentado pela pesquisa e identificação dos constituintes químicos alvos. Popularmente as plantas deste gênero são usadas há séculos por diversas culturas, como a Turca (Akkola *et al.* 2011), a Chinesa (Kong *et al.*, 2000; He *et al.*, 2011; Kun & Simpson, 2008) e a Indiana (Katewa *et al.*, 2004; Gauta *et al.*, 2007) para o tratamento de

enfermidades como cicatrização de feridas e úlceras, pedras nos rins, dismenorréia, abscessos, diarreia, entre outras (Gupta *et al.* 2010). Porém a investigação científica começou apenas nos anos 1980 por Gibbs e colaboradores (1983), o pioneiro na investigação das propriedades farmacológicas do gênero *Typha*. Esses autores demonstraram que os polissacarídeos isolados de *Typha augustata* possuem propriedades anticoagulantes por meio da inibição da taxa de liberação de fibrinopeptídeos pela trombina e da agregação retardada de monômeros de fibrina. É possível que a complexação destes últimos com o fibrinogênio pode ter causado uma alteração conformacional na estrutura do fibrinogênio, e assim, ter retardado a ação da trombina sobre o fibrinogênio.

Posteriormente, com base no conhecimento da medicina popular chinesa, Zhao *et al.* (1990) realizaram um estudo para demonstrar cientificamente as propriedades antiaterogênicas (contra a formação da placa de ateroma) do pólen de *Typha angustifolia* L. Quatro substâncias (isorhametin-3-O-rhamnosil-glicosídeo, quercetin-3-O-neohesperidosa, β -sitosterol plamitato e β -sitosterol glicosídeo) que promoveram este efeito de diferentes formas, como por exemplo inibindo a agregação plaquetária, foram identificadas. Já Nhiem e colaboradores (2010) realizaram um estudo para identificar a atividade antiaterogênica por meio da atividade antiproliferativa de células do músculo liso da aorta de ratos. Neste trabalho foram identificadas cinco substâncias, sendo três flavonóides e dois esteroides, no extrato bruto do pólen de *T. angustata*. Os flavonóides foram avaliados quanto aos seus efeitos sobre a viabilidade e proliferação de células musculares lisas da aorta de ratos. Entretanto, somente um flavonóide, o (2S)-naringenina, inibiu significativamente a proliferação de células de uma forma dependente da dose sem citotoxicidade. Esta descoberta sugeriu que a (2S)-naringenina possui efeitos antiproliferativos sobre as células do músculo liso da aorta.

Também, com base na medicina chinesa, Lee & Choi (2012) demonstraram, em estudo, a atividade protetora do extrato do pólen de *T. domingensis* contra radicais livres induzidos pela disfunção de células do tecido ósseo (osteoblastos) e por danos oxidativos.

Akkola e colaboradores (2011), por sua vez, realizaram um estudo demonstrando a capacidade de cicatrização das flores de *T. domingensis*. E seus resultados sugeriram que apenas as flores femininas da inflorescência apresentam a cura de feridas de camundongos e ratos. Este estudo foi realizado com base na medicina popular Turca, na qual se usa o pólen de *Typha domingensis* externamente para queimaduras e cicatrização. O estudo demonstrou também que o extrato metanólico a 5% na base de pomada exerceu a melhor atividade cicatrizante de ferida, os resultados foram obtidos por meio de comparação com a pomada referência Madécassol®. Esses resultados foram contraditórios com os dados da medicina tradicional chinesa, na qual indica que apenas as flores da porção masculina da inflorescência de *Typha* possuem ação cicatrizante para ferimentos externos. Porém ficou demonstrado que a atividade de cicatrização das flores masculinas não foi significativa.

Qin & Sun (2005) demonstraram em seu estudo que o extrato em etanol a 70% das folhas de *T. angustifolia* apresentou atividade imunossupressora, suprimindo tanto a resposta celular quanto a humoral, além disso, o extrato demonstrou baixo potencial tóxico ($LD_{50} = 35,57g/kg$) e nenhum efeito adverso, mesmo em altas concentrações.

Com relação à atividade antiinflamatória, Varpe e colaboradores (2012) realizaram um estudo onde foram testados o extrato aquoso e o extrato em etanol a 70% do pólen de *T. angustifolia* contra inflamações agudas e crônicas. Os resultados obtidos foram significativos para os dois extratos nos dois tipos de inflamação, porém apenas para a inflamação aguda foi obtido alguma inibição dose-dependente, ou seja, a maior dose inibiu mais a inflamação aguda gerada, enquanto que a inflamação crônica teve sua inibição significativa na dose de 125mg/kg.

Já Varghese e colaboradores (2009) verificaram a atividade antimicrobiana do extrato em metanol da folha de *T. angustifolia*. Os resultados obtidos foram considerados significativos, uma vez que inibiu fortemente o crescimento de *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.

Com relação à atividade do extrato aquoso do rizoma de *T. capensis* contra problemas de fertilidade masculina, Henkel e colaboradores (2012) demonstraram em seu estudo que o extrato tem efeitos prejudiciais sobre a motilidade dos espermatozoides, agindo na vitalidade e no potencial de membrana mitocondrial *in vitro* dos mesmos. Estes resultados comprovam o uso errôneo deste extrato na medicina popular, como remédio natural para o tratamento de distúrbio de fertilidade masculina.

Com base nos dados descritos é notável a importância deste gênero na medicina popular, porém ainda são realizados poucos estudos comprovando a sua eficácia clínica.

1.3.3- *Typha domingensis* Pers.

No Brasil, *Typha domingensis* Pers. (FIGURA 4), também conhecida como *Typha angustata* (Kun & Simpson, 2008), é bem distribuída e abundante em áreas alagadas. Pode ser encontrada em quase todos os sistemas aquáticos da região Norte Fluminense, como em lagoas e alagados. Esta planta é classificada como uma macrófita aquática emersa. Possui característica de plantas herbáceas na qual podem variar o tamanho de suas folhas entre 1,10 a 2,50 metros de altura. Suas folhas podem sobrepassar, igualar ou não alcançar a inflorescência que ocorre entre julho e fevereiro (Zocche *et al.*, 2010). Essa planta possui a capacidade de formar densos bancos de plantas (Miao *et al.*, 2004) por causa de sua flexibilidade elevada para a auto fecundação, no entanto, o recrutamento de indivíduos jovens por meio da expansão clonal é mais eficaz, limitado apenas pelas condições ambientais (Miao, 2004). O aumento dos bancos desta espécie depende, principalmente, da disponibilidade de recursos (água, luz e nutrientes) necessários para o seu desenvolvimento no locale do espaço que o ecossistema lhe oferece. A presença de outros tipos de plantas que possam competir pelos recursos e espaço pode prejudicar a consolidação da população no local. (Kuehn *et al.*, 1999).



Figura 4- *Typha domingensis* Pers (<<http://brq.cma.nsw.gov.au/index.php?page=murri-food-plants>> acessado em 25/02/2013).

Alguns trabalhos apresentaram evidências da presença de substâncias biologicamente ativas no tecido de *T. domingensis* (Gallardo et al., 1998). Na TABELA 1, acima, é citada as substâncias já isoladas de *T. domingensis*, como ácidos fenólicos (Gallardo-Willians et al., 2002), flavonóides e esteróis (Nhiem et al., 2010). As substâncias fenólicas são conhecidas pelo seu potencial antioxidante por atuarem como eficientes captadores de EROs, bloqueando o processo oxidativo desencadeado pelos EROs (Scotti et al., 2007).

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que retardam ou previnem significativamente o processo oxidativo ao inibirem a iniciação ou a propagação da reação de oxidação em cadeia, além de previnirem ou repararem danos ocasionados às células pelas EROs (Chanwitheesuk et al., 2005; Lima et al., 2006; Andrade et al., 2006).

2- Objetivos

2.1- Objetivo geral

Determinar o perfil químico e avaliar a capacidade antioxidante dos extratos brutos metanólicos de quatro populações da planta aquática *Typha domingensis* Pers. da lagoa de Cabiúnas, Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PNRJ), Macaé, RJ.

2.2- Objetivos específicos

- I. Determinar o perfil químico através de Cromatografia de Camada Delgada e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos metabólitos secundários presentes nos extratos brutos de quatro populações diferentes de *T. domingensis*.
- II. Identificar se existem possíveis variações na composição dos metabólitos secundários presentes nos extratos brutos das quatro populações;
- III. Avaliar se os metabólitos secundários de *T. domingensis* possuem atividade antioxidante;
- IV. Investigar se as variações geográficas interferem na sua atividade antioxidante.

3- Justificativa

As plantas sintetizam e acumulam uma grande diversidade de metabólitos secundários que estão envolvidos diretamente em diversas interações da planta com o ecossistema. Ao considerar o pressuposto que o ambiente aquático ao longo de uma lagoa pode variar e com isto alterar a síntese e a concentração de substâncias, o presente estudo foi realizado com o objetivo de conhecer o perfil químico da espécie em estudo na região do PNRJ, além de determinar o seu potencial antioxidante, bem como a possível variação das substâncias de acordo com os diferentes locais de coleta.

Este estudo fez parte das atividades realizadas pelo Programa de Educação Tutorial (PET-Águas) e do Programa de Ecologia de Longa Duração (PELD, sítio 5- CNPq/UFRJ), na qual tem como objetivo principal avaliar o histórico da influência das mudanças climáticas globais na diversidade biológica em ecossistemas costeiros. Ambos os projetos veem sendo desenvolvidos por professores da UFRJ- campus Macaé.

4- Materiais e Métodos

4.1. Material biológico

Folhas de *T. domingensis Pers.*(*Typhaceae*), foram coletadas no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PNRJ) que abrange os municípios de Macaé, Carapebus e Quissamã (Araujo *et al.* 1998). A região abriga 18 lagoas costeiras, de diferentes características e para este estudo foi selecionada a lagoa de Cabiunas, localizada no município de Macaé (FIGURA 5). Foram coletadas quatro populações diferentes ao longo da extensão da lagoa (FIGURA 6) no mês de dezembro de 2010. Após a coleta, todo o material foi triado e destinado à preparação dos extratos brutos. A espécie foi identificada pela Prof^a Dr^a Tatiana Konno (NUPEM/UFRJ) e posteriormente depositada na Coleção da UFRJ – RFA 38890.

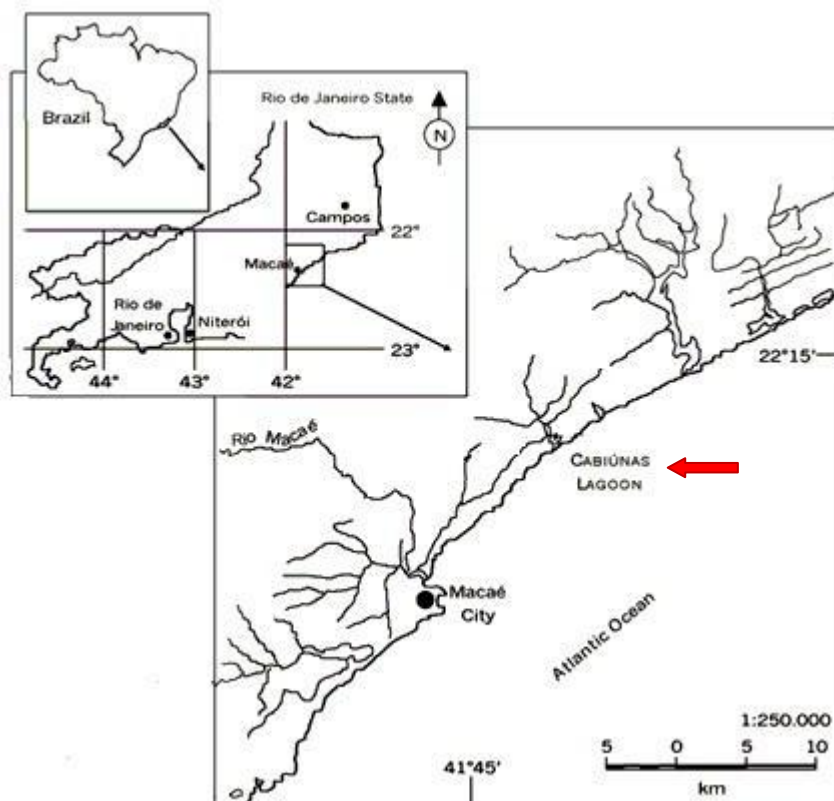


Figura 5 - Localização da lagoa de Cabiunas no município de Macaé-RJ (Adaptado de Paiva *et al.* 2004).



Figura 6 – Imagem da Lagoa de Cabiunas. 1- População 1 localizada na barra da lagoa; 2- População 2 localizada no braço da lagoa; 3- População 3 localizada do meio da lagoa; 4- População 4 localizada no fundo da lagoa.

Cada local de coleta na lagoa apresentou características diversificadas na qual foram observadas no dia da coleta (TABELA 2).

Tabela 2: Características ambientais observadas nos locais de coleta

| Local da coleta | Características do local de coleta |
|------------------------|--|
| Ponto 1 | Plantas coletadas próximas à barra de areia que separa a água doce da lagoa da água do mar |
| Ponto 2 | Local contendo diversas espécies de macrofitas aquáticas |
| Ponto 3 | Local onde se observa somente <i>T. domingensis</i> |
| Ponto 4 | Plantas coletadas muito próximas a margem |

4.2. Preparação dos extratos brutos

Todas as folhas foram secas a temperatura ambiente e protegida da luz para evitar fotólise e termodegradação dos metabólitos (Cronin *et al.* 1995). O material foi triturado com o auxílio de liquidificador de uso doméstico, a fim de aumentar a superfície de contato do solvente e melhorar a eficiência da extração. Em seguida, o material triturado foi pesado e submetido à extração com o solvente sendo adicionado até cobrir o material por 3 vezes com o auxílio de um banho de ultrassom (Logen *Scientific*, LS-218) por 15 minutos. Os extratos foram filtrados com papel de filtro e evaporados sob pressão reduzida com o auxílio do equipamento rotaevaporador com banho-maria (Buchi, R210, V850, B491) com temperatura de 40°C (FIGURA 7).



Figura 7 – Equipamento rotaevaporador com banho-maria (Buchi, R210, V850, B491).

O uso de hexano para preparação dos extratos seleciona somente os constituintes químicos das plantas aquáticas conhecidos como micromoléculas ou metabólitos secundários apolares. Enquanto o uso do metanol para a preparação dos extratos seleciona dentre todos os constituintes químicos aqueles de polaridade intermediária e polar, como por exemplo, substâncias

terpenoídicas, lactonas, ácidos orgânicos e substâncias fenólicas em geral (Viegas *et al.* 2004).

Os valores de rendimento dos extratos brutos (EB) foram calculados de acordo com a equação:

| |
|----------------------------|
| Massa da folha seca – 100% |
| Massa do EB – X % |

4.3. Análise química preliminar

Os extratos foram analisados por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) para a determinação preliminar do perfil químico inicial dos metabólitos presentes. Foram utilizadas cromatoplaças de sílica gel suportadas em alumínio (Merck). As mesmas foram reveladas utilizando inicialmente lâmpadas de UV e posteriormente borrifadas com solução de sulfato cérico (CeSO_4) em ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 2% e posteriormente aquecidas. Esse reagente é considerado um revelador universal, reagindo com diferentes classes de substâncias fornecendo diferentes colorações quando aquecidas.

4.4. Fracionamento do extrato bruto

O extrato bruto em metanol da população 3 foi semipurificado através de uma partição líquido-líquido, sendo o extrato ressuspendido em água destilada e logo após foram adicionados solventes de polaridade crescente (hexano, diclorometano e butanol) para a partição (FIGURA 9). Após a evaporação dos solventes as frações obtidas foram investigadas por CCD e CLAE-UV-DAD.

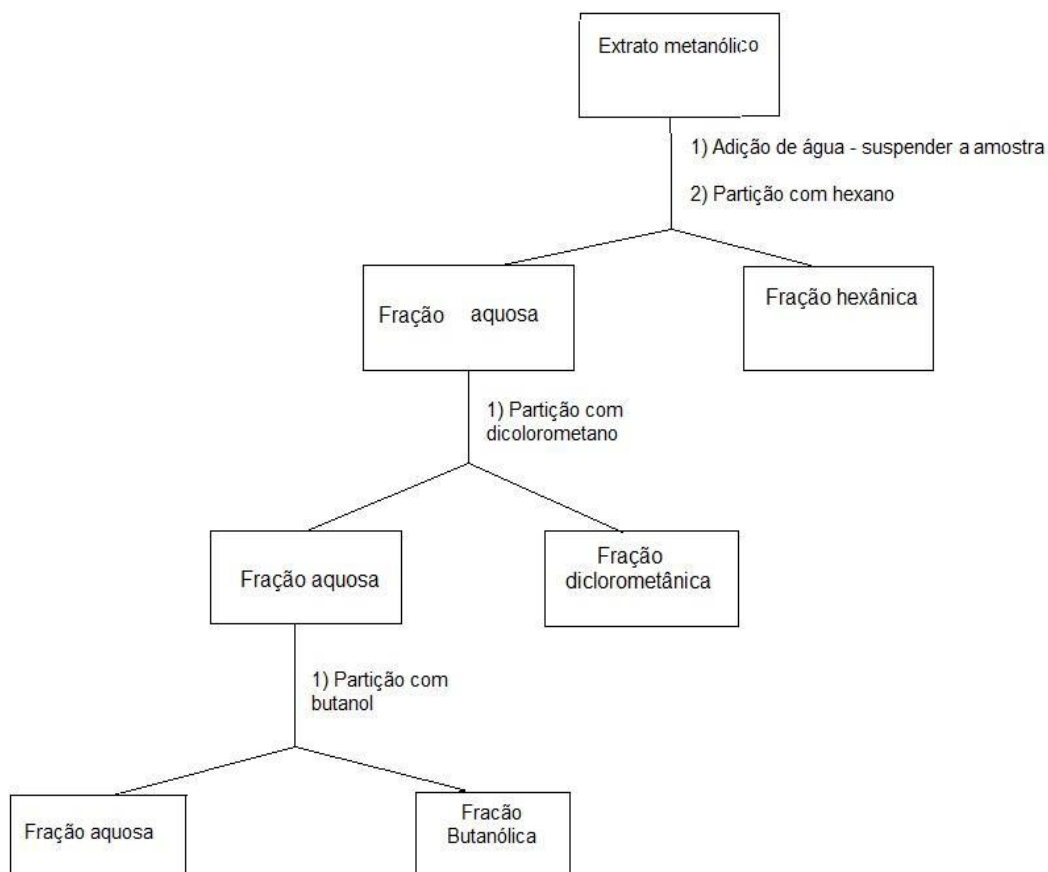


Figura 8- Fluxograma da partição líquido-líquido do extrato metanólico da população coletada no mês de dezembro de 2010.

4.5. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-UV-DAD)

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizada para verificar a complexidade das amostras e quais classes de substâncias estão presentes nestas amostras, de acordo com a absorção de radiação UV-Vis (200-800 nm) dessas substâncias. Esta técnica tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de substâncias, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (Tonhi *et al.* 2002). A análise foi realizada com todos os extratos metanólicos e as frações provenientes da partição líquido-líquido. Para tal utilizou-se um aparelho de CLAE (Simadzu, Modelo LC-20), com duas bombas LC20AT, injetor Rheodyne 7725i com volume de injeção de 20µL e acoplado a um Detector de Arranjo de Diodos (DAD), com varredura de 200-800nm no espectro de UV-Vis (FIGURA 8). A

coluna utilizada para as análises foi de fase reversa C-18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm) e uma pré-coluna (2,5 mm x 3,0 mm) de mesma fase da coluna da Shim-Pack. A fase móvel foi constituída por gradientes não lineares de polaridade de solução de água Mili-Q (Millipore®) pH 3 em ácido fosfórico 85% (Tedia HPLC) e metanol (Tedia grau HPLC) variando de 0 a 100% (TABELA 2) com fluxo de 1 mL/min. As amostras foram dissolvidas em metanol (HPLC, Tedia) na concentração de 10 mg/mL (p/v) e filtradas em filtros de Politetrafluoretileno 0.45 µm (Millipore).



Figura 9 – Aparelho de CLAE-UV-DAD (Shimadzu, modelo LC-20).

Tabela 3: Sistema de gradiente desenvolvido para *T. dominguesis* utilizado na análise de CLAE-UV-DAD.

| Tempo (min) | Concentração (%) de Água Acidificada (pH 3) | Concentração (%) de Metanol |
|-------------|---|-----------------------------|
| 0 | 100 | 0 |
| 10 | 70 | 30 |
| 50 | 30 | 70 |
| 60 | 0 | 100 |
| 70 | 0 | 100 |

4.6. Comparação dos perfis químicos obtidos por CLAE-UV-DAD

Para avaliar as semelhanças e diferenças entre os perfis cromatográficos, foram aplicadas técnicas que organizam os cromatogramas na forma de matrizes bi-dimensionais. O software COWtool (<<http://www2.biocentrum.dtu.dk/mycology/analysis/cow/>>) foi utilizado para o alinhamento de base de cada cromatograma e para corrigir o desvio de tempo de retenção dos picos através de *Correlation Warping Algorithm* (COW), como descrito em Nielsen *et al* (1998). O alinhamento é necessário devido a desvios mínimos de tempos de retenção, originados de pequenas de pequenas oscilações no sistema cromatográfico.

4.7. Avaliação *in vitro* de atividade antioxidante

O ensaio de atividade antioxidante empregado consiste de uma reação colorimétrica na qual se avalia a habilidade que uma substância tem de sequestrar e estabilizar o radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•). A reação ocorre ao se adicionar substâncias antioxidantes (AH) ou espécies radicalares (R•) a uma solução composta pelo radical livre DPPH•, de coloração púrpura que absorve de 492 a 515 nm no UV-vísivel, com isso o DPPH• é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, ocorrendo à diminuição da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância (FIGURA 10) (Rozema *et. al.* 2002; Garcez *et al.* 2009).

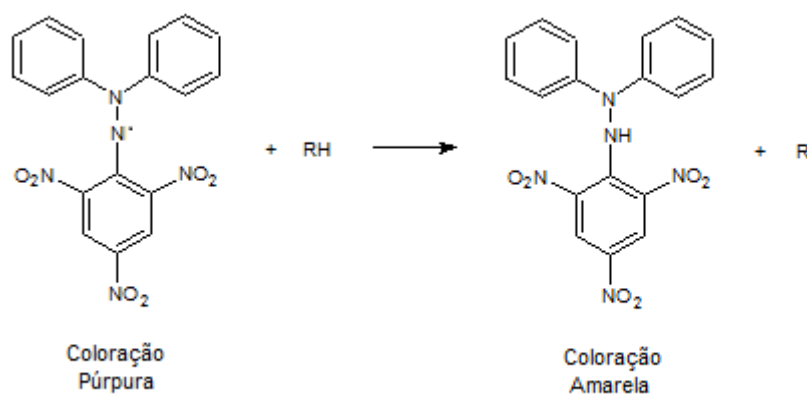


Figura 10 – Reação do radical DPPH com uma substância doadora de hidrogênio.

A avaliação quantitativa da atividade antioxidante foi feita seguindo metodologia descrita na literatura por Silva & Paiva (2012) e Wen *et al.* (2011), com pequenas modificações. Esse teste foi realizado nas amostras de todos os extratos obtidos na coleta, ou seja, quatro populações, e em todas as frações obtidas pela partição líquido-líquido, em microplacas de 96 poços (FIGURA 11).

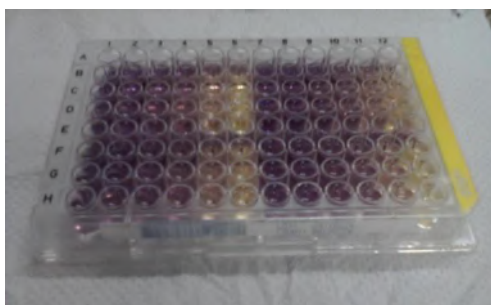


Figura 11 – Microplaca com 96 poços com as amostras após a adição da solução de DPPH.

A curva de calibração foi realizada a partir de uma solução mãe do radical DPPH (Sigma Aldrich) na concentração de 3mM em metanol, que foi diluída para as concentrações de 30 μ M, 60 μ M, 120 μ M, 150 μ M e 180 μ M. A leitura das alíquotas foi realizada em uma sala escura no espectrofotômetro do tipo leitor de ELISA (DV 9.90 BVG GIO DE VITA) a 492 nm, tendo como branco o metanol.

Foi utilizado como padrão o butil-hidroxi-tolueno (BHT) (FIGURA 12). A solução estoque do padrão foi preparada a partir de 1,0 mg dessa substância dissolvida em 1 mL de metanol, sendo esta diluída para as concentrações finais de 250 μ g/ml, 125 μ g/ml, 50 μ g/ml, 25 μ g/ml, 10 μ g/ml e 5 μ g/ml. O mesmo procedimento foi repetido para todos os extratos e frações analisadas.

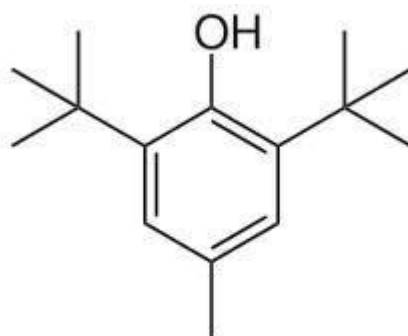


Figura 12 – Fórmula estrutural do BHT (David *et al.* 2010).

Posteriormente, foi preparada uma solução estoque de DPPH em metanol na concentração de 0,3 mM, mantida sob proteção da luz até o momento da análise. Em uma microplaca de 96 poços, as amostras foram preparadas adicionando-se 100µL da solução de DPPH e 250µL das soluções dos extratos diluídos em metanol nas concentrações de 5, 10, 25, 50, 125 e 250 µg/mL. Para controle negativo foi utilizado o metanol, adicionando-se 100µL da solução de DPPH e 250µL de metanol. As medidas foram realizadas em triplicata e as absorvâncias foram monitoradas no comprimento de onda de 492 nm em intervalos de 5 minutos até atingir 30 minutos de análise. A última leitura, ou seja, a leitura realizada após 30 minutos de reação foi utilizada para calcular a concentração de amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH (EC₅₀), expresso como g de amostra/ g de DPPH.

Para se determinar o EC₅₀, primeiramente se fez uma substituição na equação de calibração do DPPH pelo valor correspondente à metade da absorvância do controle negativo, para encontrar o consumo de DPPH (µM) que corresponde à redução de 50% da sua concentração inicial. Em seguida, o valor obtido foi substituído em g/L de DPPH através da seguinte fórmula:

$$[\text{DPPH}] \text{ (g/l)} = ([\text{DPPH (}\mu\text{M)}] / 1.000.000) \times 394,3 \text{ (peso molecular do DPPH)}$$

Uma segunda equação linear foi obtida por regressão dos pontos no tempo 30 minutos para cada réplica dos extratos investigada, onde a abscissa

(eixo x) representa as diferentes concentrações das soluções de extratos e a ordenada (eixo y) correspondente às absorvâncias. Na amostra de BHT apenas os pontos que estavam dentro da faixa de linearidade (pelo menos 3 pontos) foram utilizados.

Para calcular a Atividade Antioxidante total, o valor correspondente à metade da absorvância inicial do controle negativo foi então substituído em cada uma das equações, a fim de encontrar a concentração de extrato necessária para reduzir 50% da concentração inicial de DPPH (EC₅₀).

O valor de EC₅₀ encontrado em µg/ml foi dividido por 1000, a fim de se obter o valor em g/l de extrato. O valor foi obtido pelo valor encontrado em g/l de DPPH para obter o resultado final expresso em g de extrato/g DPPH:

$$\text{EC}_{50} \text{ extrato (g) / DPPH (g)} = \frac{\text{EC}_{50} \text{ (mg/ml) / 1000}}{\text{DPPH (g/l)}}$$

Com relação à cinética de reação foi analisado o comportamento de cada amostra com o DPPH por meio de uma curva de dose-resposta em relação à diminuição da porcentagem de DPPH remanescente em função do tempo para cada concentração do extrato. As leituras das absorvâncias, em triplicata, em intervalos de 5, foram convertidas para concentração de DPPH remanescente [DPPHrem], usando a equação da curva de calibração de DPPH. A concentração inicial de DPPH, [DPPH₀], foi obtida a partir da absorvância do controle negativo usando a mesma equação. Estes valores foram então usados para se obter a porcentagem de DPPH remanescente [% DPPHrem] de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ DPPHrem} = ([\text{DPPHrem}] / [\text{DPPH}_0]) \times 100.$$

4.8. Análises Estatísticas

Os resultados apresentados no estudo da avaliação *in vitro* de atividade antioxidante correspondem à média de três repetições (n=3) ± desvio padrão da média. Foram considerados estatisticamente diferentes os resultados de atividade antioxidante que apresentaram probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade menor que 5% ($P \leq 0,05$) aplicando-se ANOVA, seguido de comparações múltiplas pelo teste de Tukey. Coeficientes de correlação foram determinados entre a curva padrão de DPPH e a concentração eficiente de cada extrato, CE_{50} .

5- Resultados e Discussão

5.1. Análise dos extratos

O rendimento dos extratos brutos de cada população foi expresso em porcentagem (TABELAS 3 e 4).

Tabela 4: Rendimento dos extratos brutos em metanol.

| Local de coleta | Massa da planta seca (g) | Massa do extrato bruto (g) | Rendimento (%) |
|------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|-----------------------|
| Ponto 1 | 8,45 | 3,66 | 43,26 |
| Ponto 2 | 9,00 | 3,67 | 40,68 |
| Ponto 3 | 26,77 | 12,24 | 45,70 |
| Ponto 4 | 34,77 | 6,27 | 18,02 |

Tabela 5: Rendimento dos extratos brutos em hexano.

| Local da coleta na lagoa | Massa da planta seca (g) | Massa do extrato bruto (g) | Rendimento (%) |
|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|-----------------------|
| Ponto 1 | 8,45 | 0,19 | 2,25 |
| Ponto 2 | 9,01 | 0,17 | 1,90 |
| Ponto 3 | 26,77 | 0,50 | 1,88 |
| Ponto 4 | 34,77 | 0,29 | 0,85 |

Os resultados demonstram um rendimento menor em relação a composição dos metabólitos secundários apolares nas folhas de *T. domingensis*. Já o rendimento dos extratos metanólicos foi maior para todas as

amostras investigadas demonstrando uma maior composição de metabólitos secundários polares ou de média polaridade. A população que se localiza no final da lagoa (POP 4) foi a que apresentou a maior diferença de rendimento, sendo menor em relação as outras populações, tanto no extrato bruto em metanol quanto no extrato em hexano.

Uma análise preliminar da composição química foi realizada por CCD dos extratos brutos em hexano (FIGURA 13) e em metanol (FIGURA 14).

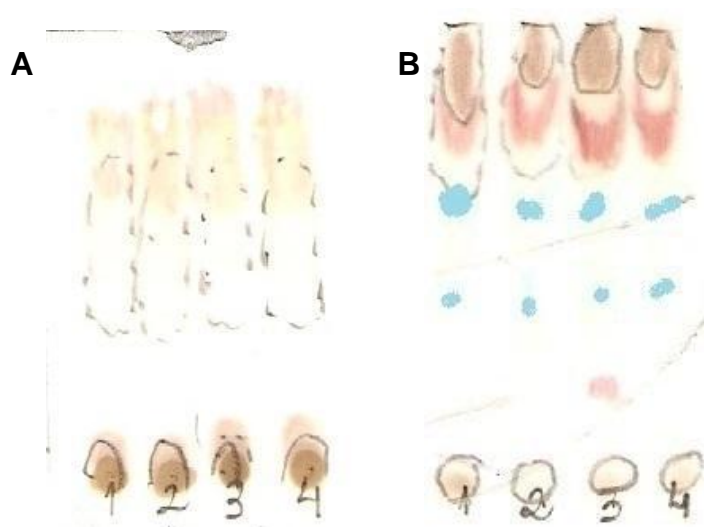


Figura 13: Plaquinha de CCD dos extratos brutos em hexano, sendo 1- POP1; 2- POP2; 3- POP3; 4- POP4. Fase móvel **(A)** Hexano 100% e **(B)** Diclorometano:Acetato de etila (1:1). Revelador: Sulfato Cérico.

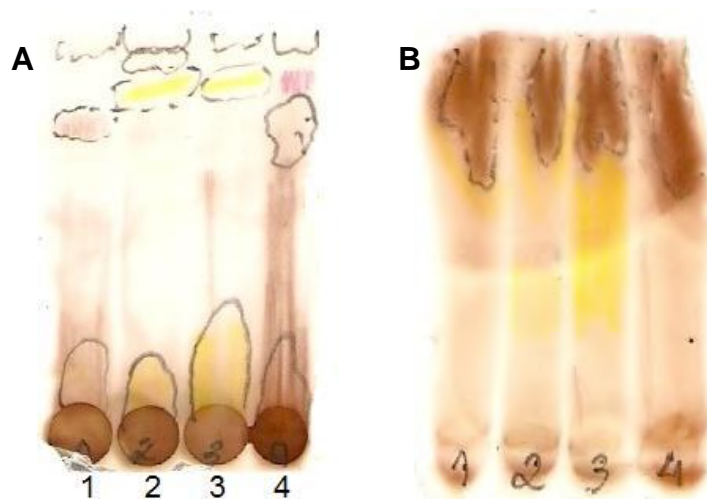


Figura 14: Plaquinha de CCD dos extratos brutos em metanol, sendo 1- POP1; 2- POP2; 3- POP3; 4- POP4. Fase móvel **(A)** Acetato de etila 100% e **(B)** BAW (Butanol:Ácido Acético:Água) 8:1:1. Revelador: Sulfato Cérico.

Nota-se que os extratos brutos em metanol apresentaram diferenças significativas na sua composição, demonstrando que além das diferenças entre os rendimentos também se obteve variações na composição das substâncias presentes no extrato, ou seja, os resultados demonstram que há diferenças qualitativas nos extratos brutos em metanol de diferentes locais de coleta. Já para os extratos brutos em hexano, observou-se uma similaridade muito grande entre os perfis de todas as populações. Têm-se relatos na literatura de variações no perfil metabólico de indivíduo para indivíduo dentro de uma mesma espécie numa mesma população (variações intraespecífica), se destacando algumas classes de metabólitos secundários como: terpenos (Gerhold & Plank, 1970; Curado *et al.*, 2006), substâncias fenólicas (Rolly *et al.*, 1988; Dötterl *et al.*, 2005) e alcalóides (Berkov *et al.*, 2004). Observando o padrão de coloração das placas de CCD, nos extratos brutos metanólicos foi possível observar a presença de bandas com colorações amareladas, com Rf bastante distintos entre as populações (FIGURA 14), sugerindo a presença de substâncias fenólicas tais como flavonoides (Chaves 1997). Já nos extratos brutos hexânicos observam-se bandas azuis, com Rf= 0,57 e 0,43, e bandas vermelhas, com Rf= 0,71 (FIGURA 13B), sugerindo a presença de substâncias de natureza etérea e esteroidais, respectivamente (Chaves 1997).

Posteriormente foram realizadas análises dos extratos brutos metanólicos das quatro populações por CLAE. Os resultados são apresentados nas Figuras 15 e 16 utilizando o comprimento de onda em 254nm. Este comprimento de onda foi escolhido, tendo em vista que foi o que mostrou o maior número de metabólitos por amostra.

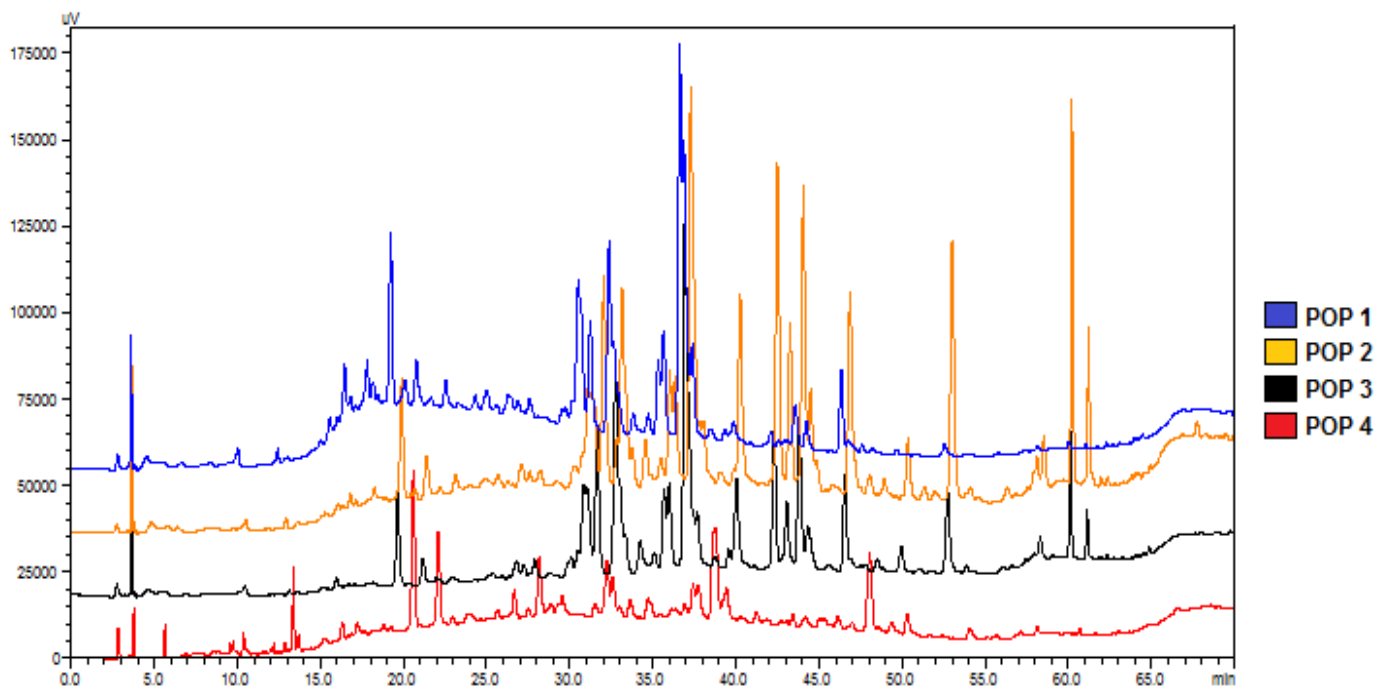


Figura 15: Comparação dos perfis cromatográficos dos extratos brutos em metanol de *T. domingensis* de cada local de coleta.

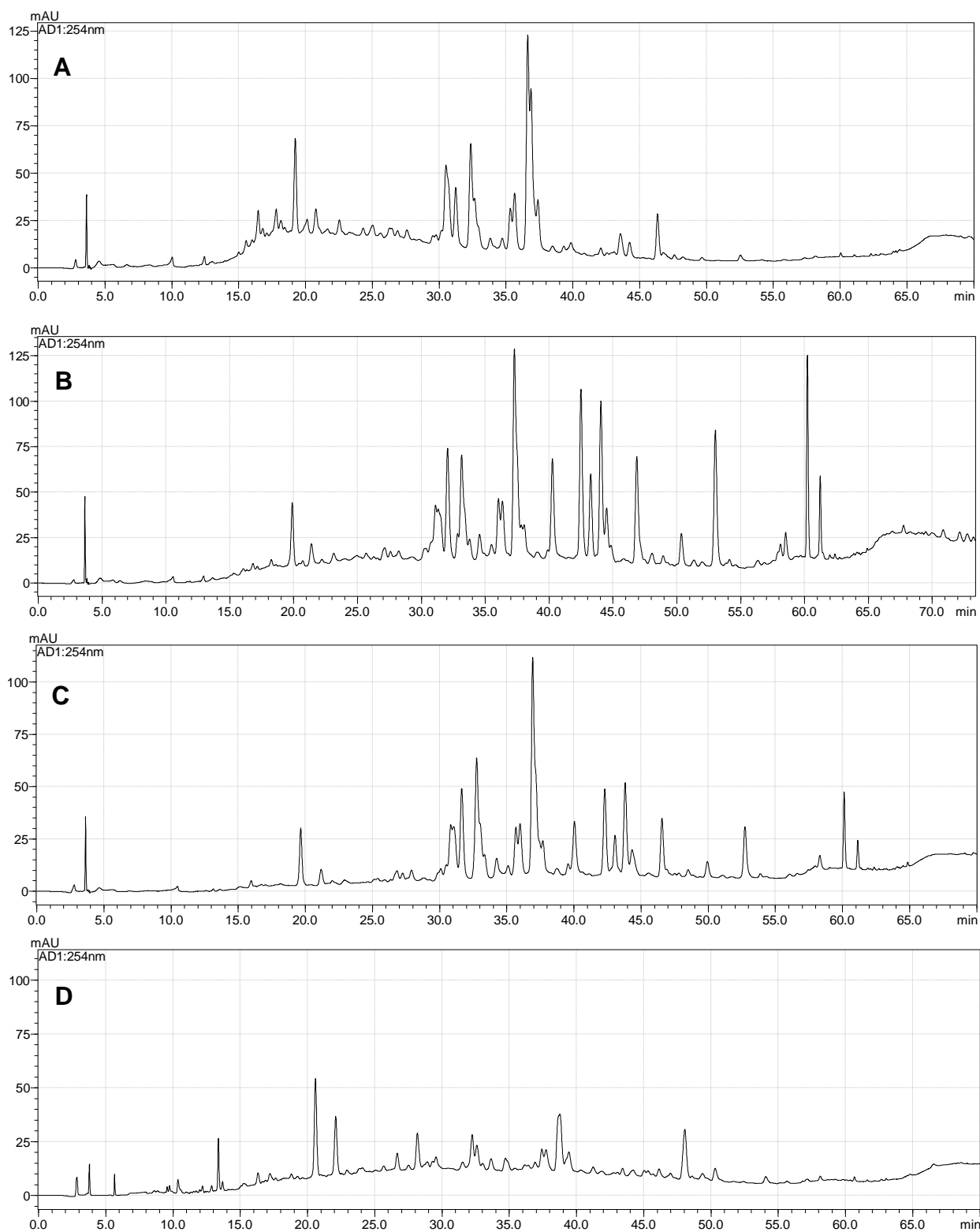


Figura 16: Perfis cromatográficos individuais de cada população coletada na lagoa, sendo **(A)** POP1; **(B)** POP2; **(C)** POP3 e **(D)** POP4.

Os perfis foram avaliados e observa-se que as amostras apresentam alta complexidade além de uma notável diferença entre as populações, como já

observado na análise preliminar por CCD. Essa diferenciação pode estar intimamente ligada ao local de coleta, sugerindo que os fatores ambientais são os responsáveis pelas variações na produção de metabólitos secundários (Berenbaum, 1995). É importante ressaltar que as populações 2 e 3 apresentaram maior abundância de metabólitos, sendo estas localizadas no meio da lagoa, enquanto a população 4 foi a que apresentou menor abundância de metabólitos qualitativamente e quantitativamente.

A partir dos espectros de DAD dos extratos brutos (FIGURAS 17, 18 e 19) foi possível observar distintos padrões de absorção no UV das amostras. Nota-se absorções entre 200 e 400 nm para todas as amostras.

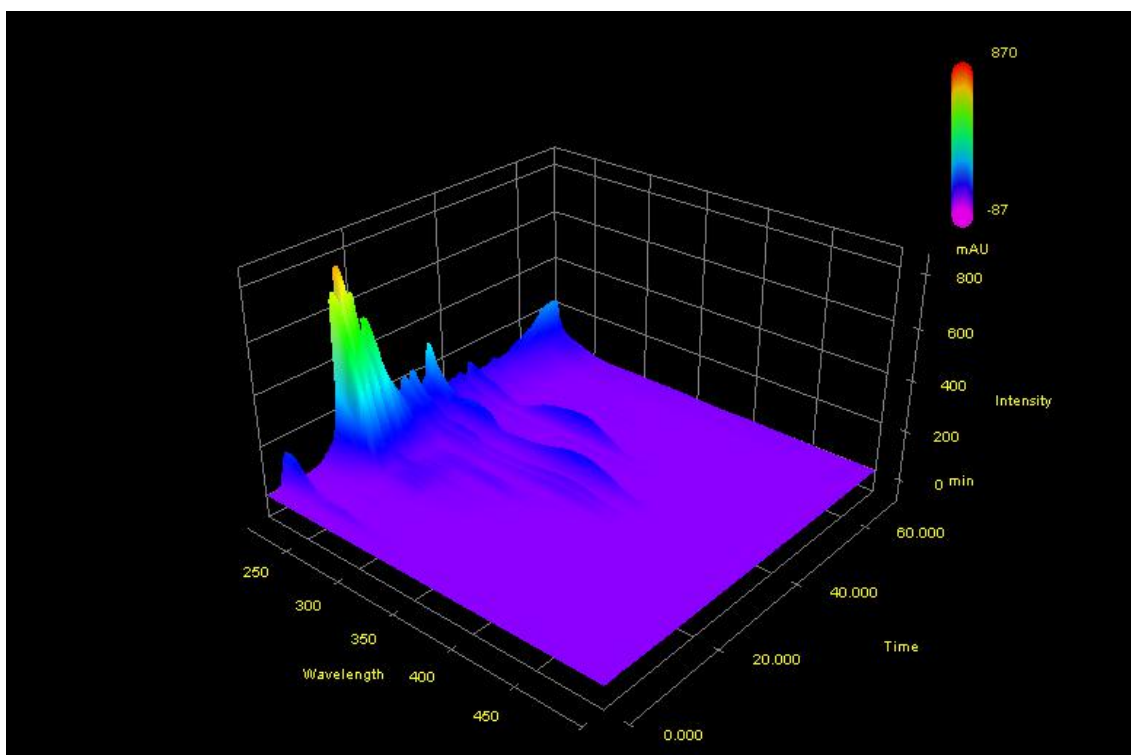


Figura 17: Espectro de DAD do extrato bruto da POP1.

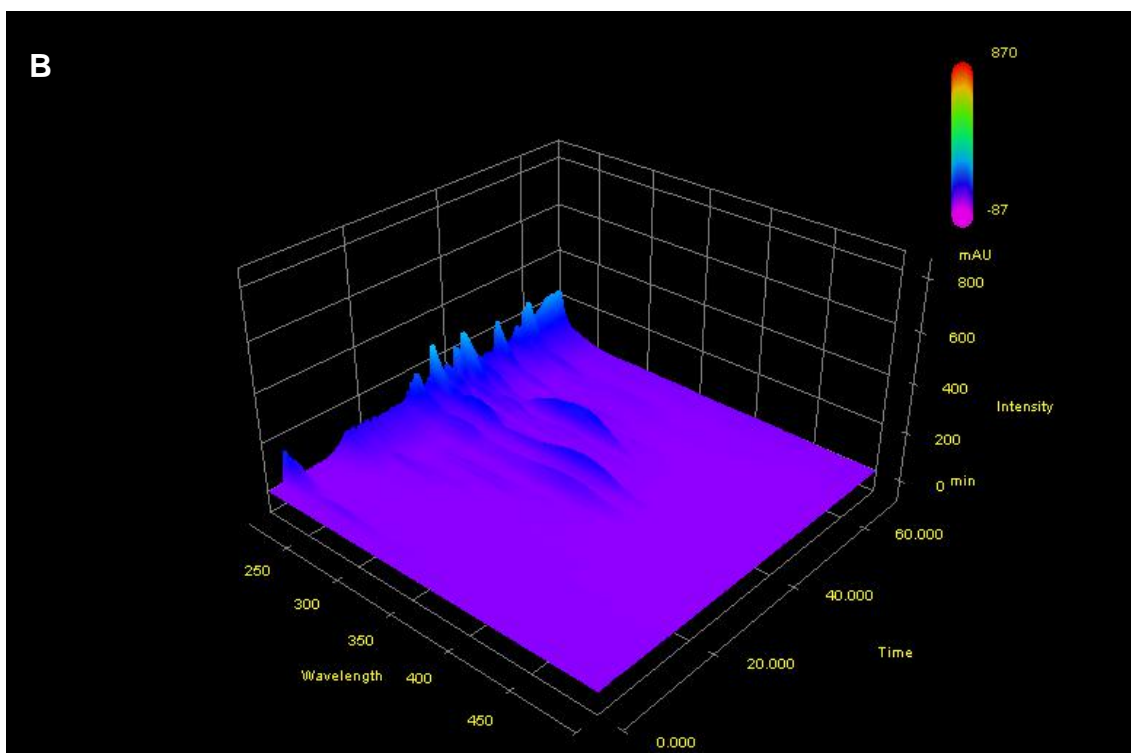
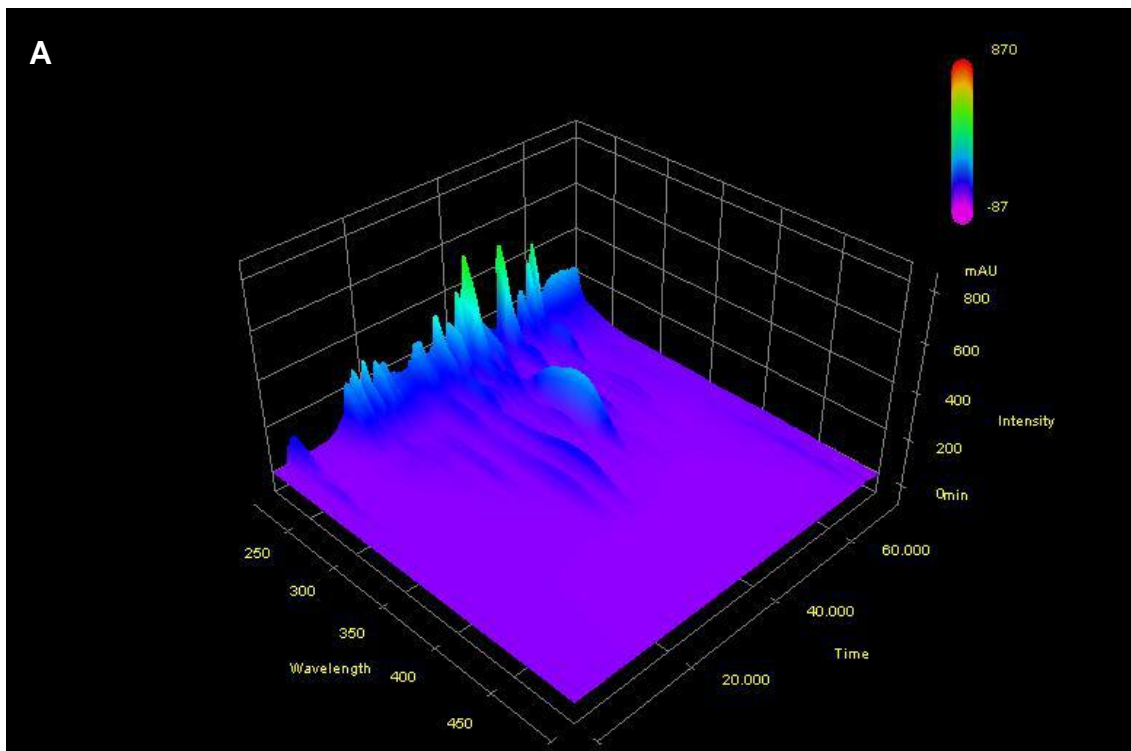


Figura 18: Espectro de DAD do extrato bruto da **(A)** POP2 e da **(B)** POP3.

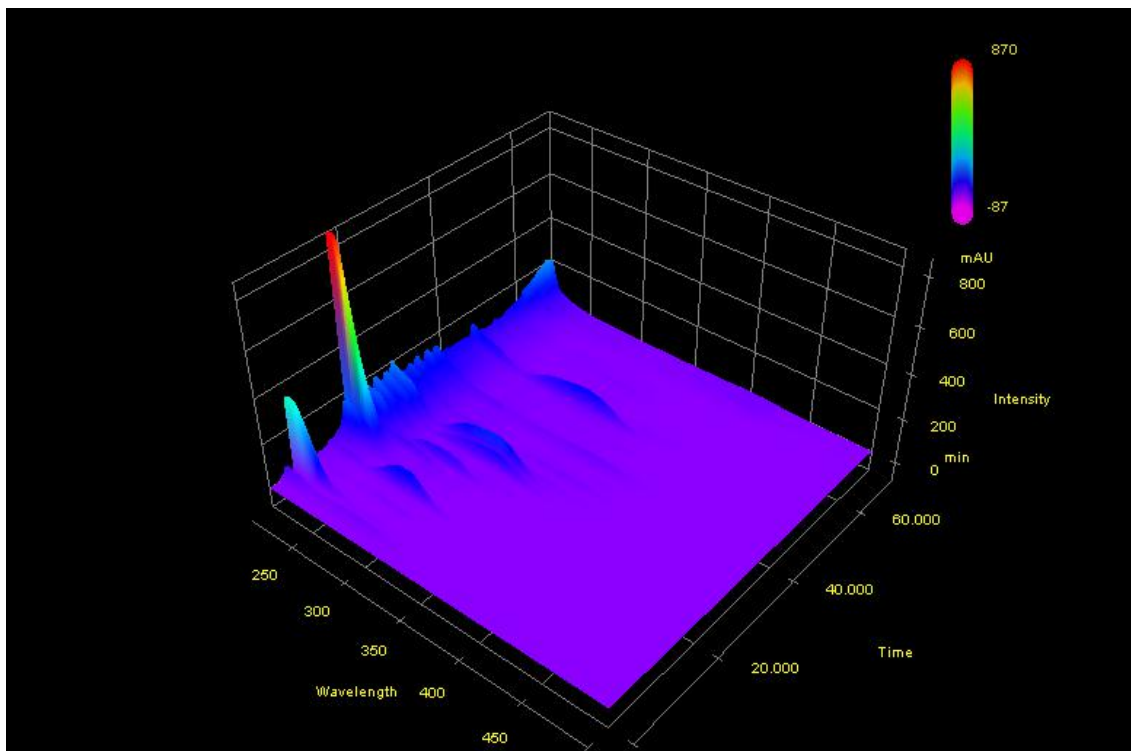


Figura 19: Espectro de DAD do extrato bruto da POP4.

Com estes espectros é possível observar algumas características que certas substâncias possuem, como, por exemplo: as absorções no UV dos flavonoides que são bem características, pois apresentam duas bandas de absorção máxima entre 240-285 nm (Banda I) e 300-550 nm (Banda II) (Simões *et al.*, 2010).

5.2. Análise da atividade antioxidante dos extratos

Para avaliar a atividade antioxidante dos extratos foi utilizado o método colorimétrico de sequestro de radicais livres (DPPH●). Este método baseia-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um radical livre, o DPPH●, que ao se reduzir perde sua coloração púrpura. Desta forma, essa análise avalia o poder redutor do antioxidante. Este teste é muito empregado por causa de sua simplicidade e reprodutividade elevada. A utilização de microplacas de poliestireno com 96 cavidades permite a redução do uso de reagentes e de amostras facilitando a análise de um grande número de amostras em curto espaço de tempo.

Como observado nos perfis químicos, os extratos possuem diferenças significativas em seus constituintes químicos, tanto qualitativas quanto quantitativas, e estas diferenças foram refletidas em suas atividades antioxidantes. A TABELA 5 apresenta os valores de EC₅₀ de todos os extratos, ou seja, a concentração de amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH.

Tabela 6: Médias ± Desvio Padrão (n=3) de EC₅₀ dos extratos brutos de *T. domingensis* expressa em g de amostra/ g de DPPH. O BHT foi utilizado como controle positivo no ensaio. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras (Turkey).

| Extratos | EC₅₀ (g amostra / g DPPH) |
|-----------------|---|
| POP 1 | 0,710 ± 0,012 ^Z |
| POP 2 | 0,441 ± 0,032 ^Y |
| POP 3 | 0,314 ± 0,032 ^X |
| POP 4 | 0,419 ± 0,017 ^Y |
| BHT | 0,165 ± 0,003 ^W |

Como demonstrado na tabela, todos os ensaios apresentaram valores de EC₅₀ inferiores ao do controle positivo, porém é importante ressaltar que o

BHT é um padrão puro enquanto o extrato se trata de uma mistura complexa de substâncias que podem estar interagindo entre si, podendo ou não resultar em uma diminuição da atividade da mesma se comparada com ela purificada.

Quando comparamos somente os resultados dos extratos, observa-se que há diferenças significativas entre algumas amostras e que a POP3 apresentou a maior capacidade de sequestro de radicais livres. Esta capacidade pode estar relacionada a um alto teor de substâncias antioxidantes presentes nesta amostra. A POP1 apresentou uma atividade inferior quando comparado a todas as outras populações, mesmo não sendo o extrato menos complexo quimicamente, isto pode estar relacionada à característica dos metabólitos produzidos pelas plantas do começo da lagoa. Sabe-se que a salinidade da lagoa pode variar de 0,5 a 2,5‰ e são nos locais mais próximos da água do mar que se encontram os mais altos índices de salinidade (Hollanda-Carvalho *et al.*, 2003). O aumento da salinidade pode ter sido influenciado pela diminuição da barreira de areia entre a lagoa e a água do mar devido à elevação do índice pluviométrico da lagoa por causa da época em que as plantas foram coletadas, na época de cheia da lagoa, na qual se estende de novembro a março todos os anos e segundo o Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) o mês de dezembro de 2010 apresentou precipitação de cerca de 136 mm, caracterizado como alto. Com o aumento do índice pluviométrico alterações na concentração de carbono dissolvido (COD) e na condutividade da água que também podem influenciar a variação da produção dos metabólitos secundários com capacidade antioxidante desta planta.

O comportamento cinético dos extratos também foi avaliado através da curva de dose-resposta relativa ao decréscimo da porcentagem de DPPH remanescente (% DPPHrem) no meio reacional em função do tempo (min) (FIGURAS 20, 21 e 22). Podem ocorrer três tipos de comportamento cinético entre compostos com atividade antioxidante: substâncias que reagem rapidamente com o DPPH, chegando ao final da reação em menos de um minuto (cinética rápida); substâncias que finalizam a reação em até 30 minutos (cinética intermediária) e substâncias de cinética lenta que demoram mais de uma hora para completar a reação (cinética lenta) (Brand-williams *et al.*, 1995).

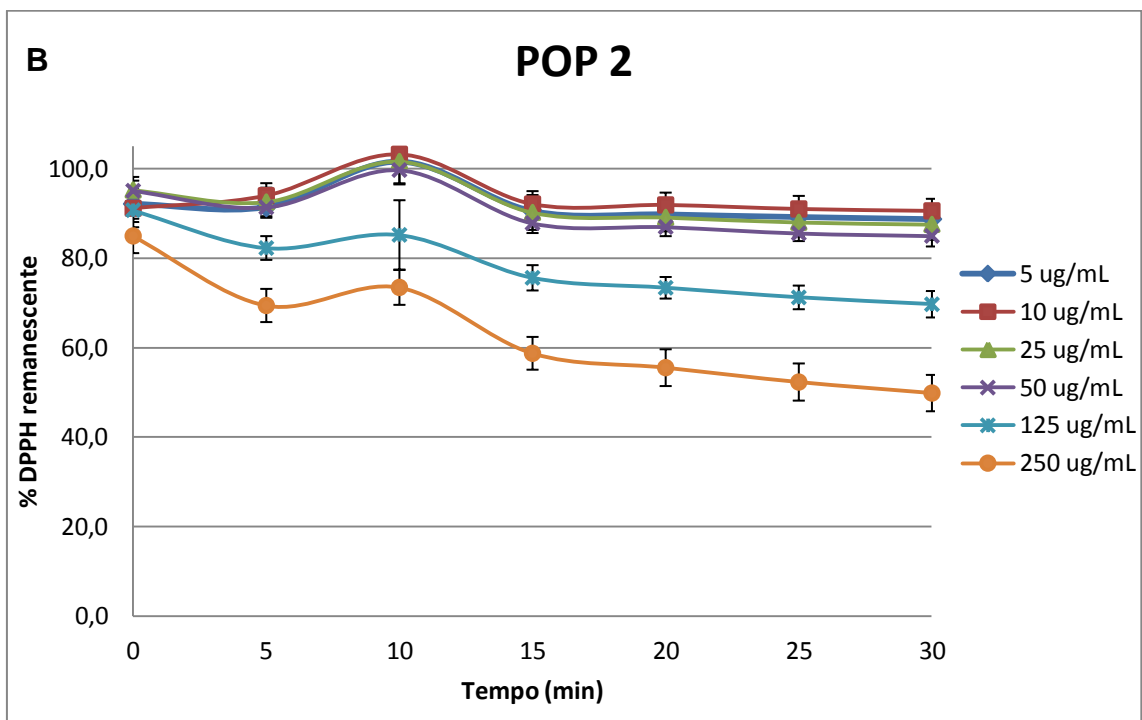
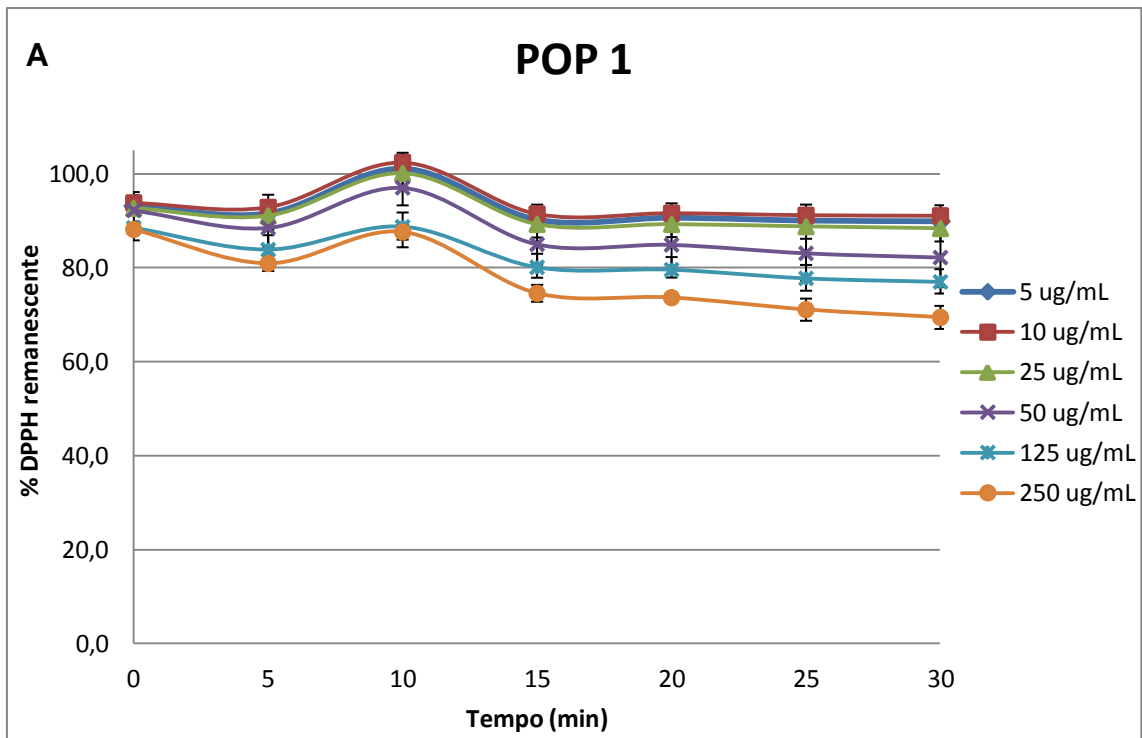


Figura 20: Média e desvio da cinética de reação da (A) POP1 e (B) POP2, ensaios realizados em triplicata.

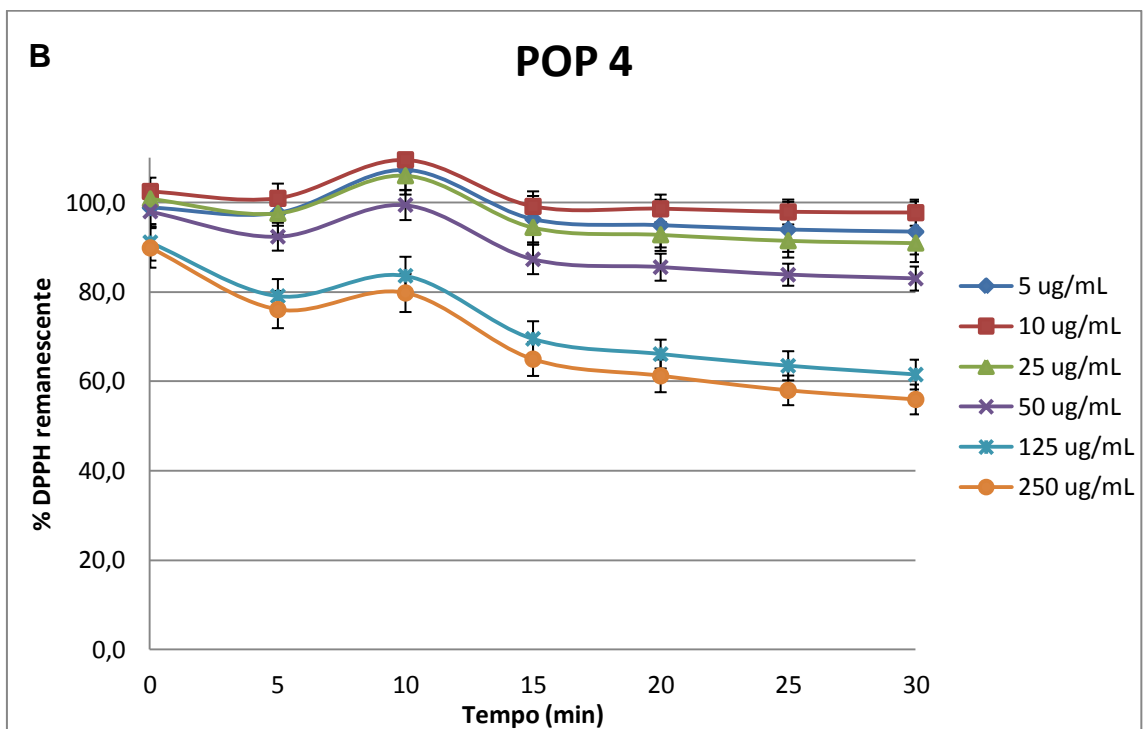
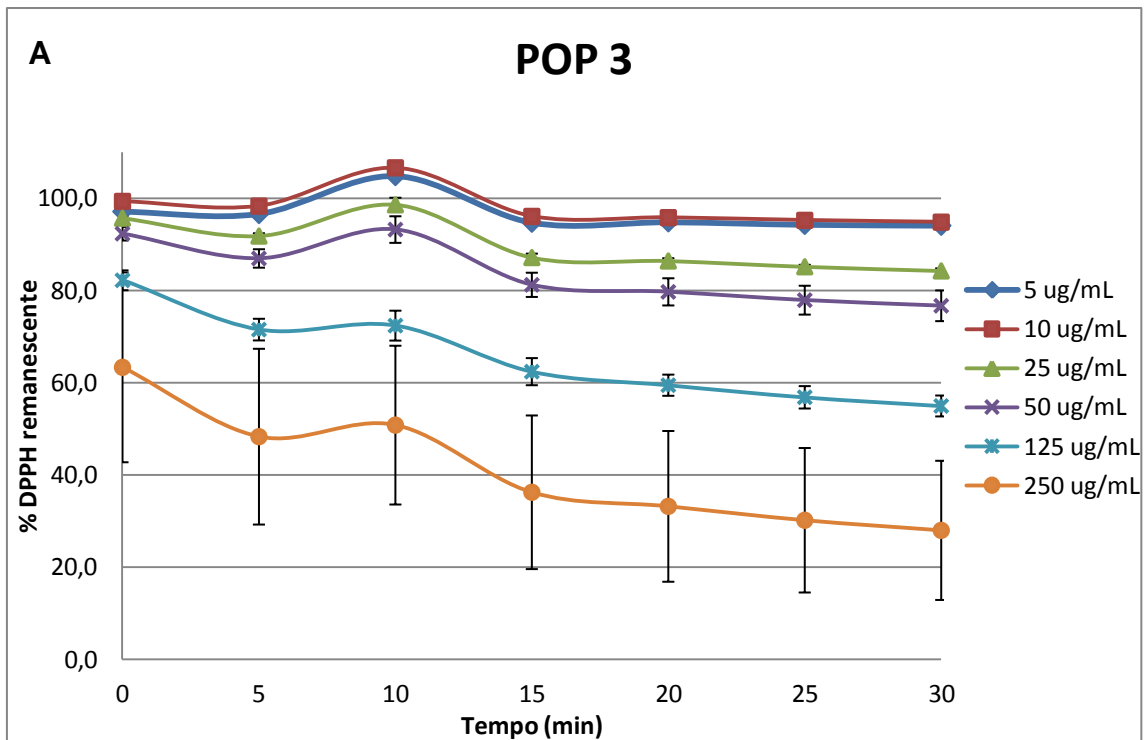


Figura 21: Média e desvio da cinética de reação da (A) POP 3 e (B) POP 4, ensaios realizados em triplicata.

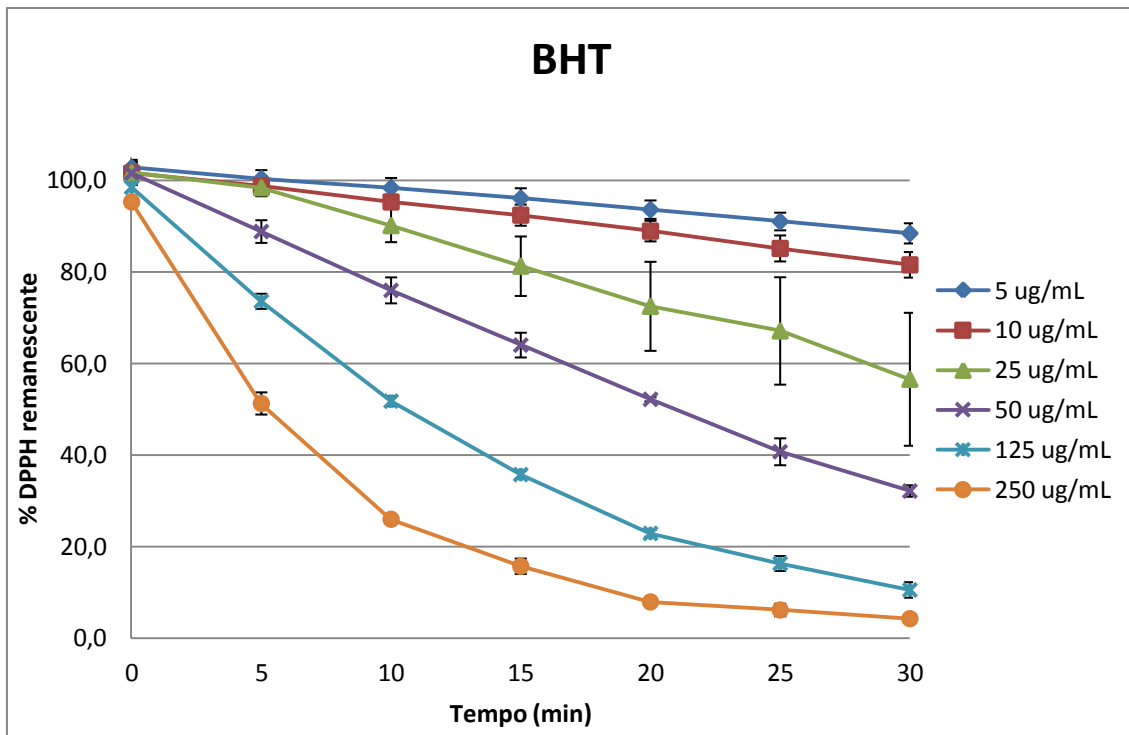


Figura 22: Média e desvio da cinética de reação do BHT, ensaio realizado em triplicata.

O BHT foi utilizado como padrão por apresentar uma cinética lenta, em comparação aos outros antioxidantes conhecidos e usados como padrões (Brand-williams, Cuvelier & Berset, 1995). O comportamento cinético das amostras apresentaram diferenças por causa, principalmente, das diferenças químicas dos extratos, porém deve-se destacar que todas as amostras são classificadas como antioxidantes de cinética lenta, por não conseguirem completar a reação em 30 minutos.

Este ensaio de comportamento cinética das amostras nos dá informações relevantes das características antioxidantes de cada extrato, no caso dos extratos com cinética lenta observamos que mesmo a amostra sendo capaz de realizar o sequestro do radical livre ela leva um tempo maior para completar a reação. Muitos estudos realizam este ensaio antes de realizar o ensaio de EC_{50} , com a finalidade de determinar o tempo de análise, que no caso de amostras com cinética lenta podem chegar à uma hora (Duarte-Almeida *et al.*, 2006; Sousa *et al.*, 2007), porém neste trabalho os dois ensaios foram realizados concomitantemente tendo como tempo de ensaio 30 minutos.

Foi possível observar, nas Figuras 19, 20 e 21, uma atividade antioxidante quase instantânea em todos os extratos, principalmente nas concentrações mais altas. Porém uma característica particular dos extratos brutos foi bastante marcante, na qual nos primeiros cinco minutos há um pequeno declínio da %DPPHrem, depois há um aumento desse percentual no décimo minuto, voltando a cair logo após, no caso, quinze minutos depois do início da reação. Isso pode ser explicado pela característica das substâncias em comum dos extratos, pois foi observado nas quatro populações comportamento semelhante.

O extrato bruto da POP3 foi o que apresentou menores %DPPHrem em todas as concentrações testadas, atingindo 28,0% de DPPH remanescente após 30 minutos de reação na concentração de 250µg/mL. Já o extrato bruto da POP1 foi o que apresentou menor decaimento do DPPH em todas as concentrações testadas. Esses dados sugerem que as diferenças qualitativas e quantitativas presentes nos extratos alteram de forma significativa suas propriedades sequestradoras de radical livre.

5.3. Fracionamento do extrato bruto em metanol

Após a avaliação dos rendimentos, dos perfis químicos e das atividades antioxidantes das populações escolheu-se apenas uma população para o fracionamento. A população 3 foi escolhida por apresentar maior rendimento, alta concentração de substâncias tanto em termos qualitativos como quantitativos, além de possuir maior atividade antioxidante.

Os resultados do fracionamento através de uma partição líquido-líquido e o rendimento das frações são apresentados na TABELA 6.

Tabela 7: Rendimento das frações da partição líquido-líquido do extrato bruto da POP3.

| Fração | Massa utilizada de extrato bruto (g) | Massa da fração (g) | Rendimento (%) |
|------------------------------------|---|----------------------------|-----------------------|
| FR Hex | 3,75 | 0,20 | 5,33 |
| FR CH ₂ Cl ₂ | 3,75 | 0,15 | 4,00 |
| FR But | 3,75 | 2,92 | 77,87 |
| FR H ₂ O | 3,75 | 0,48 | 12,80 |

Os resultados mostram a presença de poucos metabólitos secundários apolares e de média polaridade quando comparados a concentração de metabólitos polares nas folhas de *T. domingensis*, pois como demonstrado na tabela 6, aproximadamente 90% dos constituintes do extrato foram particionados nas frações mais polares, como a fração butanólica e a fração aquosa, enquanto que apenas 10% dos constituintes do extrato migraram para as frações de baixa e média polaridade, como a fração hexânica e a fração diclorometânica.

Foi realizada uma análise preliminar da composição química das frações por CCD (FIGURA 23).

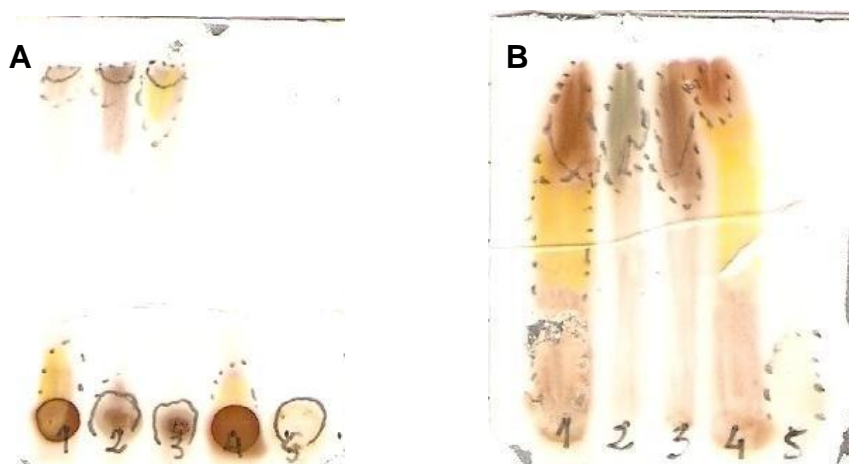


Figura 23: CCD das frações obtidas pela partição do extrato bruto em metanol da POP3, sendo 1- Extrato Bruto; 2- FR Hex; 3- FR CH_2Cl_2 ; 4- FR But; 5- FR H_2O . Fase móvel **(A)** Acetato de etila 100% (2X) e **(B)** BAW (Butanol:Ácido Acético:Água) 8:1:1. Revelador: Sulfato Cérico.

Nota-se a partir dessa análise por CCD a semelhança entre o extrato bruto da POP3 com a fração butanólica, sugerindo que os metabólitos majoritários no extrato possuem características polares, como observado nas análises de CLAE dos extratos (FIGURA 15 E 16) e das frações (FIGURA 24 e 25).

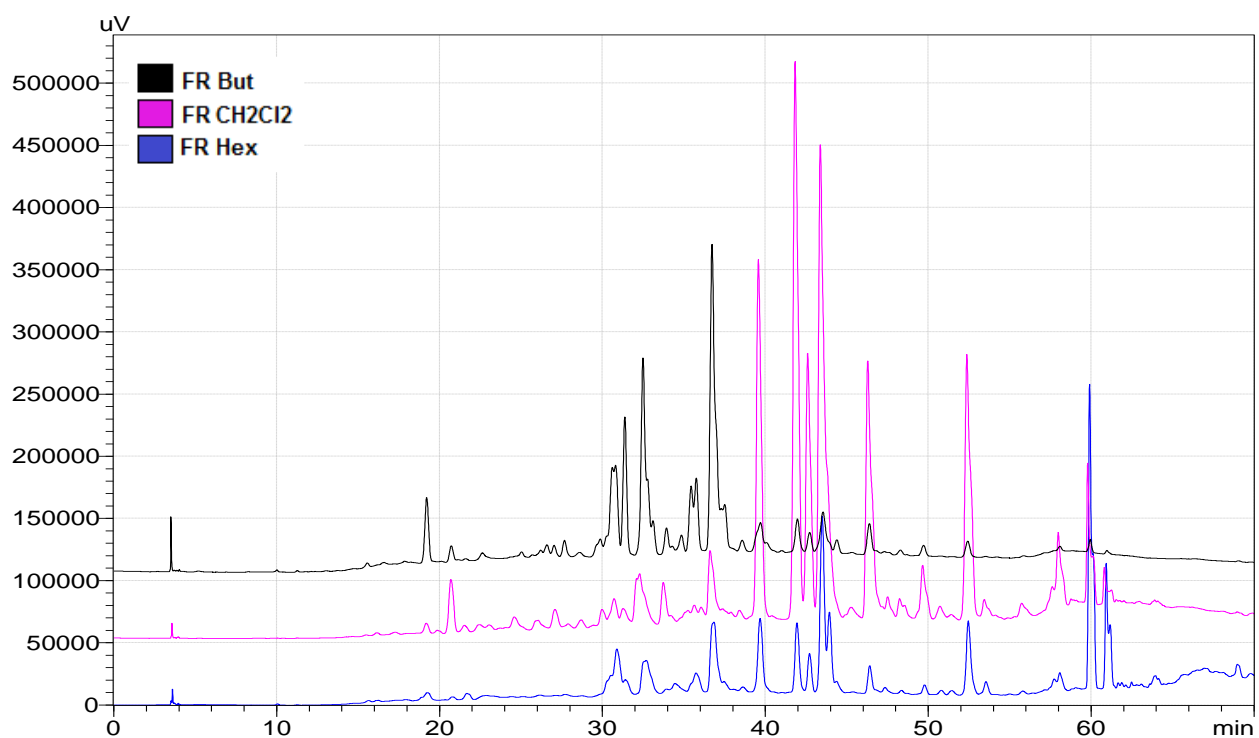


Figura 24: Comparação dos perfis cromatográficos das frações da partição líquido:líquido do EB em metanol da POP3.

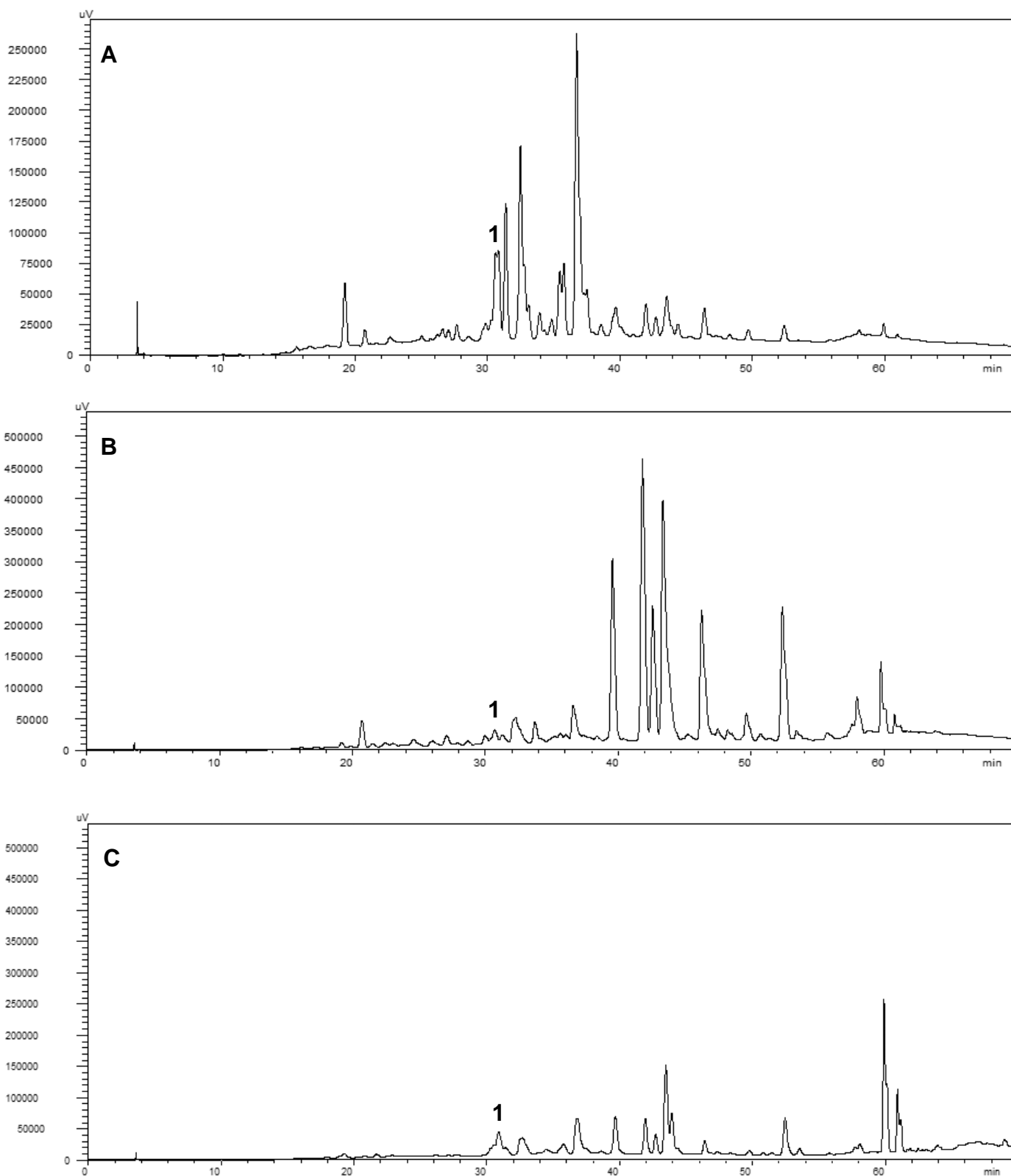


Figura 25: Perfis cromatográficos individuais de cada fração, sendo **(A)** FR But; **(B)** FR CH₂Cl₂ e **(C)** FR Hex. 1- Substância com tempo de retenção 30,88 minutos.

A partir da análise dos perfis químicos foi possível verificar padrões distintos de substâncias, porém algumas substâncias são encontradas nas três frações, entretanto com maior concentração em uma determinada fração, como por exemplo: a substância com tempo de retenção 30,88 minutos (FIGURA 26), ela aparece em maior concentração na FR But e seu espectro de UV demonstra características de ser uma substância que contém o núcleo fundamental de um flavonoide, devido às suas bandas de absorção serem características do anel A (bandas entre 240-285) e do anel B (bandas entre 300-550nm) (FIGURA 27).

Além disso, é importante destacar a alta complexidade de todas as frações, com destaque para as frações FR CH₂Cl₂ e FR But.

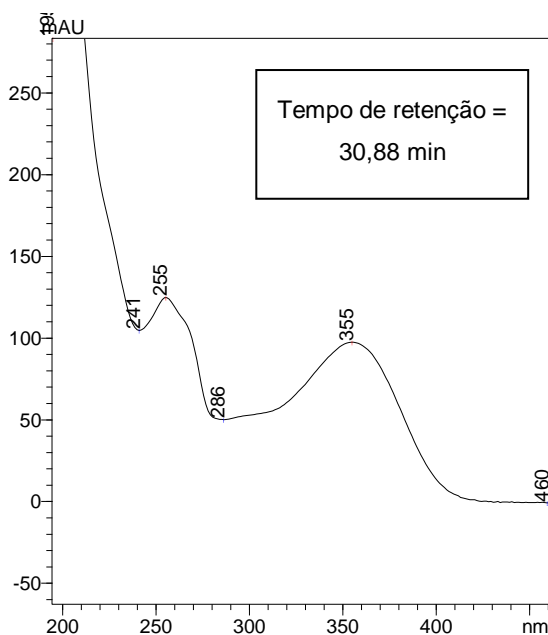


Figura 26: Espectro de UV da substância com tempo de retenção 30,88 min.

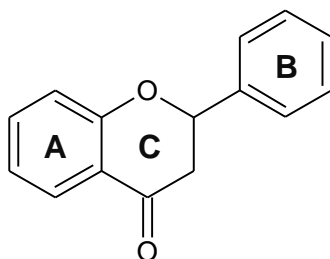


Figura 27: Núcleo fundamental dos flavonoides

5.4. Análise da atividade antioxidante das frações

Para avaliar a atividade antioxidante das frações foi utilizado o mesmo método colorimétrico de sequestro de radicais livres (DPPH●).

Como foram observadas nos perfis químicos das frações, estas apresentam características químicas distintas que, foram refletidas na atividade antioxidante das frações. A TABELA 7 apresenta os valores de EC₅₀ de todas as frações.

Tabela 8: Médias ± Desvio Padrão (n=3) de EC₅₀ das frações do extrato bruto da POP3 expressa em g de amostra/ g de DPPH. O BHT foi utilizado como controle positivo no ensaio. Letras diferentes indicam diferenças significantes entre as amostras (Turkey).

| Extratos | EC₅₀ (g amostra / g DPPH) |
|------------------------------------|---|
| FR Hex | 0,484 ± 0,046 ^Z |
| FR CH ₂ Cl ₂ | 0,318 ± 0,015 ^Y |
| FR But | 0,244 ± 0,020 ^X |
| BHT | 0,165 ± 0,003 ^W |

Como demonstrado na tabela, todos os ensaios também apresentaram uma capacidade antioxidante inferior ao do controle positivo, porém como já comentado acima, é importante ressaltar que o BHT é um padrão purificado enquanto as frações se tratam de uma mistura semi-purificada de substâncias que podem estar interagindo entre si, assim como no extrato bruto, podendo ou não resultar em diminuição da atividade antioxidante da amostra.

Comparando somente os resultados das frações, observa-se que a FR But apresentou maior capacidade de sequestro de radical livre. Esta maior capacidade pode estar relacionada à característica química desta fração em apresentar uma maior porcentagem de substâncias polares com potencial antioxidante, como, por exemplo: flavonoides (Rosa *et al.*, 2010). Enquanto a FR Hex apresentou uma menor capacidade de sequestro, que pode estar

relacionado com a baixa complexidade do extrato somado ao baixo potencial antioxidante das substâncias. O comportamento cinético das frações também foi avaliado. Este comportamento foi determinado através da curva de dose-resposta relativa ao decréscimo da porcentagem de DPPH remanescente (% DPPHrem) no meio reacional, em função do tempo (min) (FIGURAS 28, 29 e 30).

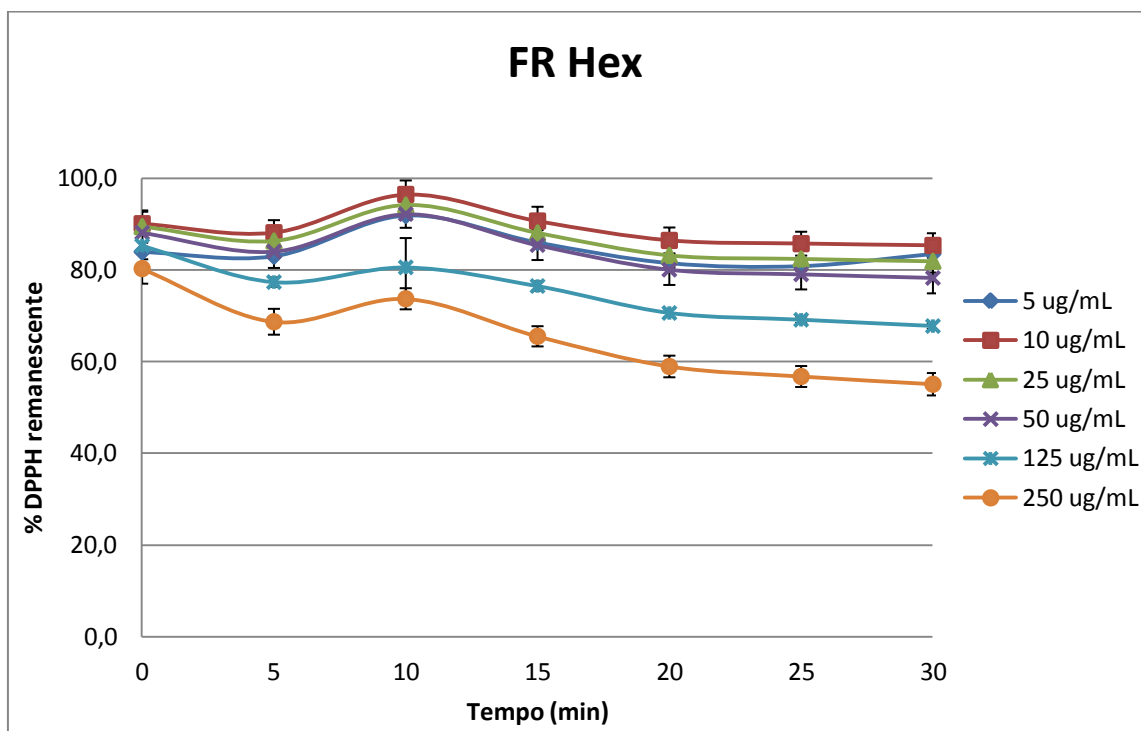


Figura 28: Média e desvio da cinética de reação da FR Hex, ensaio realizado em triplicata.

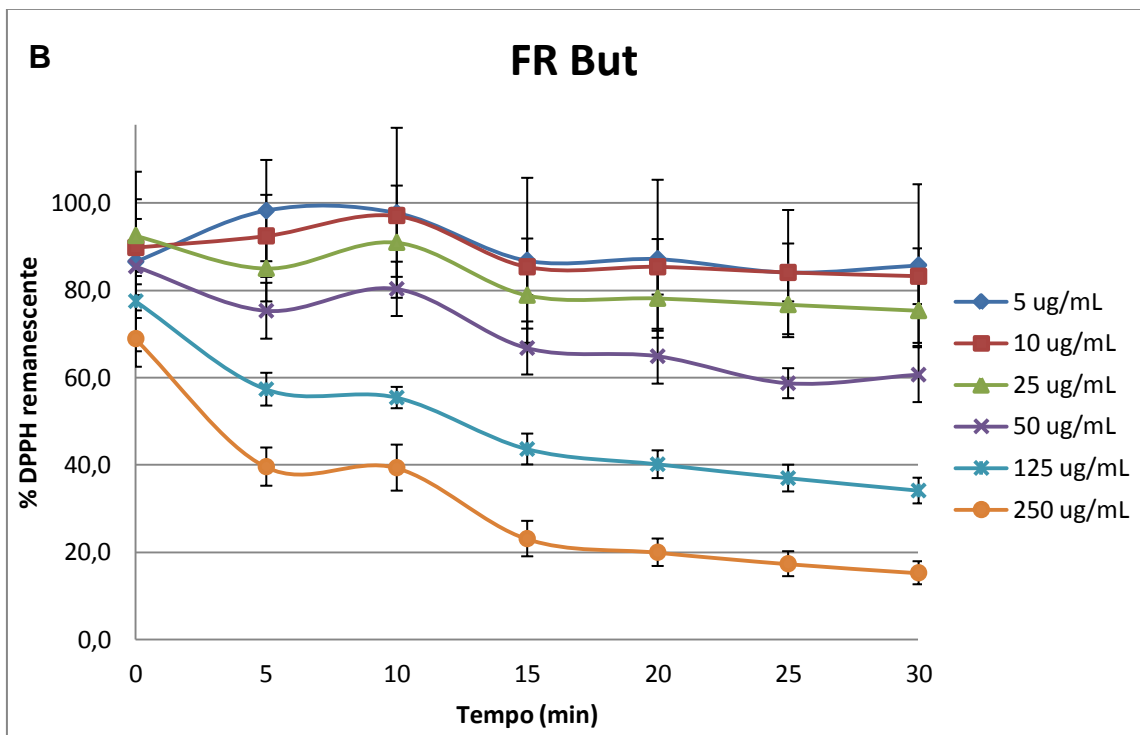
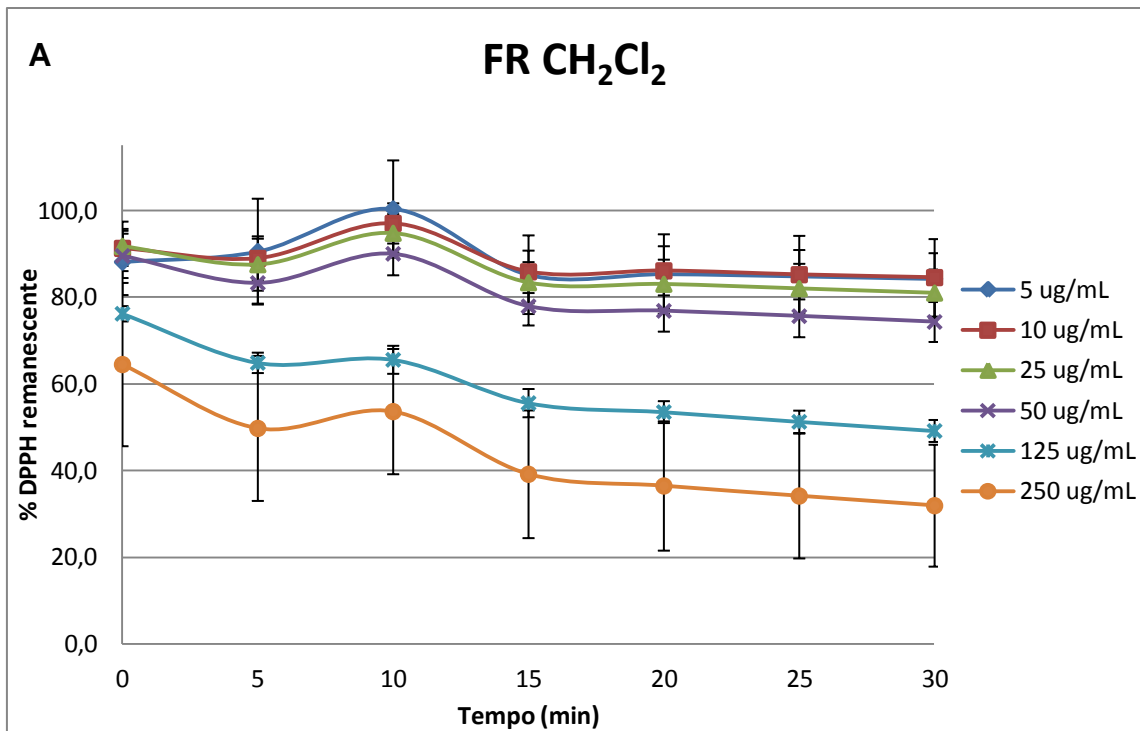


Figura 29: Média e desvio da cinética de reação da (A) FR CH₂Cl₂ e (B) FR But, ensaios realizados em triplicata.

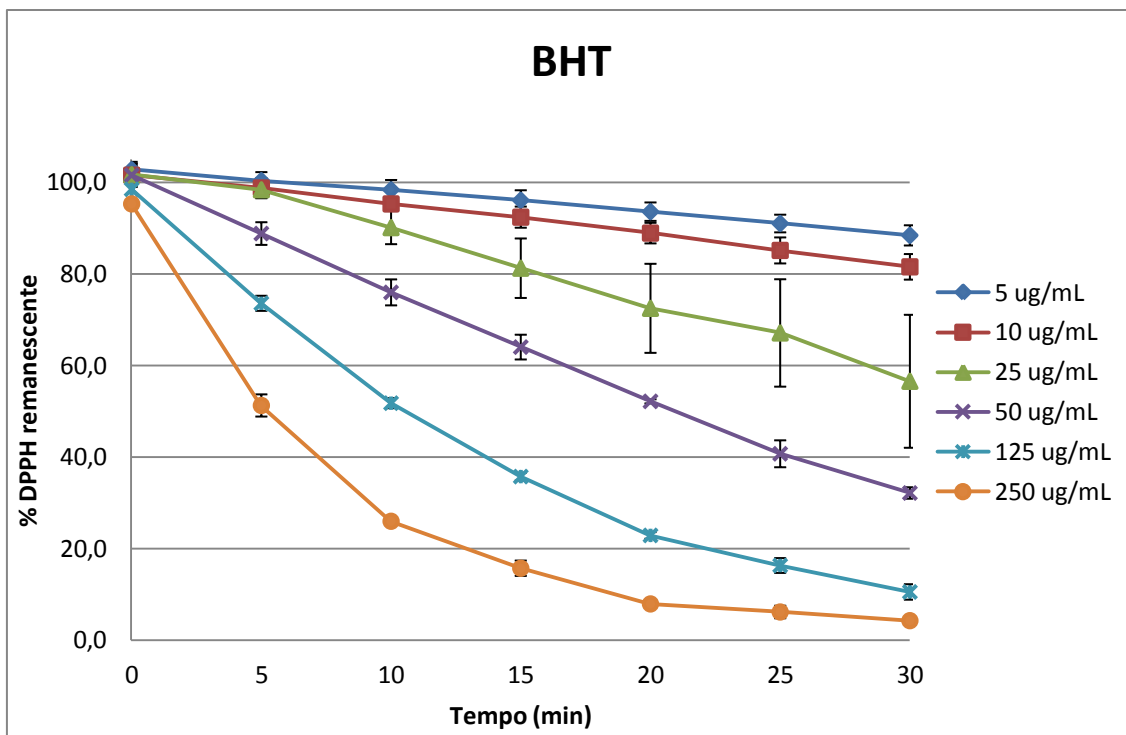


Figura 30: Média e desvio da cinética de reação do BHT, ensaio realizado em triplicata.

O comportamento cinético das frações apresentou as diferenças já esperadas, como foi visto os resultados do EC_{50} de cada fração. Todas as frações apresentaram atividade, porém, assim como os extratos brutos todas as frações foram classificadas como antioxidantes de cinética lenta, ou seja, é necessário maior tempo para que a amostra sequestre o radical livre (Brand-williams, Cuvelier & Berset, 1995).

Observou-se que a fração butanólica, onde se concentrou o maior conteúdo de substâncias polares, incluindo substâncias contendo núcleo flavonoídico, na qual se tem relatos na literatura serem potentes antioxidantes (Rosa *et al.*, 2010), que apresentou menores %DPPHrem em todas as concentrações testadas, atingindo 15,2% de DPPH remanescente após 30 minutos de reação na concentração de 250 μ g/mL. Além disso, assim como foi observado nos extratos brutos, as frações também apresentaram um pequeno declínio da %DPPHrem nos primeiro cinco minutos, depois um aumento desse percentual no décimo minuto, voltando a cair logo após, no caso, quinze minutos depois do início da reação. Este fenômeno ficou caracterizado como

uma particularidade dos extratos desta planta, já que foi observado em todos os ensaios realizados, não podendo ser considerado um erro ocasional.

Com os resultados de cinética enzimática é possível se verificar a eficácia das amostras analisadas e fica claro que os extratos brutos e as frações são pouco eficazes com relação a sua atividade antioxidante.

Todas estas informações sugerem que o extrato bruto metanólico de *T. domingensis* é rico em substâncias polares com características fenólicas do tipo flavonoídicas e possuem atividade antioxidante com cinética lenta. E que apesar das variações nos metabólitos secundários entre os locais de coleta, numa mesma lagoa, todas as populações apresentaram atividade antioxidante.

As perspectivas futuras para este trabalho se baseiam no fracionamento bioguiado para se verificar quais substâncias são responsáveis pela atividade antioxidante desta macrofita aquática e se estas substâncias possuem outras propriedades farmacológicas e ecológicas.

6- Conclusão

- A composição química dos extratos de *T. domingensis* foi diferente para cada local de coleta;
- A POP3 se apresentou mais complexa com relação a abundância de metabólitos e a POP4 a menos complexa;
- Todos os extratos metanólicos de *T. domingensis* apresentaram atividade antioxidante;
- A POP3 apresentou maior atividade antioxidante e a POP1 a menor atividade, de acordo com seus resultados de EC_{50} ;
- As diferenças químicas dos extratos brutos e das frações alteraram o comportamento cinético de sequestro de radicais livres, porém todas as amostras são classificadas como antioxidantes de cinética lenta, ou seja, para que ocorra o sequestro de todos os radicais livres é necessário um tempo maior que 30 minutos;
- Sugere-se a presença de substâncias fenólicas, como flavonoides, entre outros, nos extratos brutos metanólicos e na fração butanólica.
- A produção de metabólitos secundários, incluindo os que possuem características antioxidantes, foi alterada por fatores abióticos relacionados sobretudo com a época da coleta, período de cheia da lagoa, que gerou um considerável aumento no índice pluviométrico da lagoa levando a alterações, principalmente, na salinidade, na concentração de carbono orgânico dissolvido (COD) e na condutividade da água ao longo da lagoa, levando a valores diferenciados dessas características físico-químicas da água nos pontos de coleta.

7- Referências Bibliográficas

- ✓ AERTS, R.J.; SNOEIJER, W.; VAN DER MEIJDEN, E. & VERPOORTE, R. 1991. Allelopathic inhibition of seed germination by *Cinchona* alkaloids? *Phytochemistry*. Vol. 30: 2947-2951.
- ✓ AGOSTA, W. 1996. Bombardier Beetles and Fever Trees: A Close-up Look at Chemical Warfare and Signals in Animals and Plants. Reading, MA: Addison-Wesley.
- ✓ AKKOLA, E. K.; SUNTARA, I.; KELESB, H. & YESILADA, E. 2011. The potential role of female flowers inflorescence of *Typha domingensis* Pers. in wound management. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 133: 1027–1032.
- ✓ AL-GUBORY, K. H.; FOWLERB, P. A. & GARRELC, C. 2010. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. Vol. 42: 1634-1650.
- ✓ ALIOTTA G., DELLA GRECA M., MONACO P., PINTO G, POLLIO A. & PREVITERA L. 1990. "In vitro algal growth inhibition by phytotoxins of *T. latifolia* L.". *Journal of Chemistry Ecology*. Vol. 16(9).
- ✓ ALVES, M. N. 2003. Alocação de alcaloides tropânicos em *Brugmansia suaveolens* (Solanaceae). Tese apresentada para obtenção do Título de Doutor em Biologia Vegetal. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- ✓ ANDRADE, C. A.; COSTA, C. K.; BORA, K.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. & KERBER, V. A. 2006. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. Ex G. Don, Leguminoase-mimosoideae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. Vol. 17 (2): 231-235.
- ✓ BASSMAN, J. H. 2004. Ecosystem consequences of enhanced solar ultraviolet radiation: secondary plant metabolites as mediators of multiple trophic interactions in terrestrial plant communities. *Photochemistry and Photobiology*. Vol. 79 (5): 382-398.
- ✓ BERENBAUM, M. R. 1995. The chemistry of defense: theory and practice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the Unites States of America*. Vol. 92: 2-8.

- ✓ BERKOV, S.; SIDJIMOVA, B.; EVSTATIEVA, L. & POPOV, S. 2004. Intraspecific variability in the alkaloid metabolism of *Galanthus elwesii*. *Phytochemistry*. Vol. 65: 579-586.
- ✓ BIN L. & YUNRU L. 1998. "Study on the Chemical Constituents of the Pollen of *Typha Orientalis*". *Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine*. Nº 2.
- ✓ BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E. & BERSET, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft Und Technologie*. Vol. 28: 25-30.
- ✓ CAMARERO, J. J.; OLANO, J. M.; ALFARO, S. J.; FERNANDEZ-MARIN, B.; BECERRIL, J. M. & GARCIA-PLAZAOLA, J. I. 2012. Photoprotection mechanisms in *Quercus ilex* under contrasting climatic conditions. *Flora*. Vol. 207: 557-564.
- ✓ CDB - Convenção sobre diversidade biológica. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2000
- ✓ CHANWITHEESUK, A.; TEERAWUTGULRAG, A. & RAKARIYATHAM, N. 2005. Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. *Food Chemistry*. Vol. 92: 491-497.
- ✓ CHAVES, M. H. 1997. Análise de extratos de plantas por CCD: uma metodologia aplicada à disciplina "química orgânica". *Química Nova*. Vol. 20(5): 560-562.
- ✓ CHEN, H.; ZAMORANO, M. F. & IVANOFF, D. 2010. Effect of Flooding Depth on Growth, Biomass, Photosynthesis, and Chlorophyll Fluorescence of *Typha domingensis*. *Wetlands*. Vol. 30: 957-965.
- ✓ CRONIN G.; SCHLACHER T.; LODGE D.M. & SISK A E.L. 2006. Intraspecific variation in feeding preference and performance of *Galerucella nymphaeae* (Chrysomelidae:Coleoptera) on Aquatic Macrophytes. *Journal of North American Benthological Society*. Vol. 18 (3): 391-405.
- ✓ CURADO, M. A.; OLIVEIRA, C. B. A.; JESUS, J. G.; SANTOS, S. C.; SERAPHIN, J. C. & FERRI, P. H. 2006. Environmental factors influence on chemical polymorphism of essential oils of *Lychnophora ericoides*. *Phytochemistry*. Vol: 67: 2363-2369.

- ✓ DAOUST, R. J. & CHILDERS, D. L. 1998. Quantifying aboveground biomass and estimating net aboveground primary production for wetland macrophytes using a non-destructive phenometric technique. *Aquatic Botanic*. Vol. 62 (2): 115-133.
- ✓ DÖTTERL, S.; WOLFE, L. M. & JÜRGENS, A. 2005. Qualitative and quantitative analyses of flower scent in *Silene latifolia*. *Phytochemistry*. Vol. 66: 203-213.
- ✓ DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I. & LAJOLO, F. M. 2006 Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH•. *Revista de Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Vol. 26 (2): 446-452.
- ✓ ESTEVES, F. A. 1988. *Fundamentos de Limnologia*. Interciência, FINEP, Rio de Janeiro.
- ✓ ESTEVES, B. S.; ENRICH-PRAST, A. & SUZUKI, M. S. 2008. Allometric relations for *Typha domingensis* natural populations. *Acta Limnology Brazilian*. Vol. 20(4): 305-311.
- ✓ GALLARDO, M.T.; MARTIN, B.B. & MARTIN D.F. 1998. An annotated bibliography of allelopathic properties of cattails, *Typha* spp. *Florida Scientist*. Vol. 61: 52–58.
- ✓ GALLARDO-WILLIAMS M.T., GEIGER C. L., PIDALA J. A. & MARTIN D. F. 2002. "Essential fatty acids and phenolic from extracts and leachates of southern cattail (*Typha domingensis* P.)". *Phytochemistry*. Vol. 59(3): 305-308.
- ✓ GAUTAM, R.; SAKLANI, A. & JACHAK, S. M. 2007. Indian medicinal plants as a source of antimycobacterial agents. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 110: 200-234.
- ✓ GERHOLD, H. & PLANK, G. H. 1970. Monoterpene variations in vapors from white pines and hybrids. *Phytochemistry*. Vol. 9: 1393-1398.
- ✓ GIASSON, B. I.; ISCHIROPOULOS, H.; LEE, V. M. Y. & TROJANOWSKI, J. Q. 2002. The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Free Radical Biology Medical*. Vol. 32: 501-514.

- ✓ GIBBS, A.; GREEN, C. & DOCTOR, V. M. 1983. Isolation and anticoagulant properties of polysaccharides of *Typha augustata* and *Daemonorops* species. *Thrombosis Research*. Vol. 32: 97-108.
- ✓ GILL, S. S. & TUBEJA, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. Vol. 48: 909-930.
- ✓ GOBOO-NETO, L. & LOPES N.L. 2007. Plantas Medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*. Vol. 30 (2); 374-381.
- ✓ GRAHAM, M. C.; VINOGRADOFF, S. I.; CHIPCHASE, A. J.; DUNN, S. M.; BACON, J. R. & HYPERLINK. 2006. Using size fractionation and Pb isotopes to study Pb transport in the waters of an organic-rich upland catchment. *Environmental Science & Technology*. Vol. 40: 1250-1256.
- ✓ GRECA, M. D.; MONACO P. & PREVITERA L. 1990a. "Stigmasterols from *Typha latifolia*". *Journal of Products Naturals*. Vol. 53(6): 1430-1435.
- ✓ GRECA, M. D.; MANGONI L.; MOLINARO A.; MONACO P. & PREVITERA L. 1990b. "(20S)-4alfa-metil-24-metilenecholest-7en-3beta-ol na allelopathic sterol from *Typha latifolia*". *Phytochemistry*. Vol.29(6): 1797-1798.
- ✓ GRECA, M. D.; MANGIONI L.; MOLINARO A.; MONACO P. & PREVITERA L. 1990c. "5β,8β- epidioxyergosta-6,22-dien-3-β-ol from *Typha latifolia*". *Gazzetta Chimica Italiana*. Vol. 120: 391-392.
- ✓ GRECA, M. D.; MONACO P. & PREVITERA L. 1990d. "Carotenoid-like compounds from *Typha latifolia*". *Journal of Natural Products*. Vol. 52(4): 972-974.
- ✓ GUPTA, A.; MISHRA, A. K.; BANSAL, P.; KUMAR, S.; SANND, R.; GUPTA, V.; GOYAL, B. M.; SINGH, A. K. & KUMAR, A. 2010. Antileprotic Potential of Ethnomedicinal Herbs: A Review. *Drug Invent Today*. Vol. 2: 191–3.
- ✓ HARBORNE, J. B. 1988. *Introduction to Ecological Biochemistry*. London: Academic Press.
- ✓ HE, K.; LI, X.; CHEN, X.; YE, X.; HUANG, J.; JIN, Y.; LI, P.; DENG, Y.; JIN, Q.; SHI, Q. & SHU, H. 2011. Evaluation of antidiabetic potential of selected traditional Chinese medicines in STZ-induced diabetic mice. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 137: 1135-1142.

- ✓ HENKEL, R.; FRANSMAN, W.; HIPLER, U.-C.; WIEGAND, C.; SCHREIBER, G.; MENKVELD, R.; WEITZ, F. & FISHER, D. 2012. *Typha capensis* (Rohrb.)N.E.Br. (bulrush) extract scavenges free radicals, inhibits collagenase activity and affects human sperm motility and mitochondrial membrane potential in vitro: a pilot study. *Andrologia*. Vol. 44: 287–294.
- ✓ HOLLANDA-CARVALHO, P. SANCHEZ-BOTERO, J. I. PELLEGRINI-CARAMASCHI, B & BOZELLI, R. L. 2003. Temporal variation of fish community richness in coastal lagoons of the Restinga de Jurubatiba National Park, Rio de Janeiro, Brazil. *Acta Limnologica Brasileira*. Vol: 15 (3): 31-40.
- ✓ INMET – Instituto Nacional de Meteorologia.
- ✓ IPCC – Intergovernmental Panel on Climate Change – 2007.
- ✓ KATEWA, S. S.; CHAUDHARY, B. L. & JAIN, A. 2004. Folk herbal medicines from tribal area of Rajasthan, India. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 92: 41-46.
- ✓ KONG, L. D.; CAI, Y.; HUANG, W. W.; CHENG, H. K. & TAN, R. X. 2000. Inhibition of xanthine oxidase by some Chinese medicinal plants used to treat gout. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 73: 199-207.
- ✓ KOSSEL, A. 1891. Über die chemische Zusammensetzung der zelle. *Archiv für Physiologie*. Pags. 181-186.
- ✓ KUEHN, M. M.; MINOR, J. E. & WHITE, B.N. 1999. An examination of hybridization between the cattail species *Typha latifolia* and *Typha angustifolia* using random amplified polymorphic DNA and chloroplast DNA markers. *Molecular Ecology*. Vol. 8 (12): 1981-1990.
- ✓ KUN, S. & SIMPSON, D. A. *Typhaceae*. In: LI, J. *Flora of China*. Harvard University Herbaria. 2008. Vol. 23: 158-163.
- ✓ LAVOLA, A. APHALO, P. J., LAHTI M., JULKUNEN-TIITTO. R. 2003. Nutrient availability and the effect of increasing UV-B radiation on secondary plant compounds in Scots pine. *Env. Exp. Bot*. Vol. 49, p. 49-60.
- ✓ LEE, Y. S. & CHOI, E. M. 2012. Effect of pollen from *Typha angustata* on hydrogen peroxide induced toxicity in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. Vol. 41: 171–177.
- ✓ LEVINE, L.H., KASAHARA, H., KOPKA, J., ERBAN, A., FEHRL, I., KAPLAN, F., ZHAO, W., LITTELL, R. C., GUY, C., WHEELER, R., SAGER, J.,

MILLS, A., LEVINE, H.G. 2008. Physiologic and metabolic responses of wheat seedlings to elevated and super-elevated carbon dioxide. *Adv. Space Res.* Vol. 42, p. 1917–1928.

✓ LIMA, A. R.; BARBOSA, V. C.; SANTOS FILHO, P. R. & GOUVÊA, C. M. C. P. 2006. Avaliação in vitro da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* Vol. 16: 531-536.

✓ MATSUMOTO, R. L. T. 2008. Atividade antioxidante do chá mate (*Ilex paraguariensis*). Dissertação apresentada para obtenção do Título de Mestre em Saúde Pública. Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo.

✓ MIAO, S. L. 2004 Rhizome growth and nutrient resorption: mechanisms underlying the replacement of two clonal species in Florida Everglades. *Aquatic Botanic.* Vol. 78 (1): 55-66.

✓ MIAO, S. L.; NEWMAN, S. & SKLAR, F. H. 2000. Effects of habitat nutrients and seed sources on growth and expansion of *Typha domingensis*. *Aquatic Botanic.* Vol. 68 (4): 297-311.

✓ MITCH, L. M. 2000. Common Cattail, *Typha latifolia* L. *Weed Technology.* Vol. 14 (2): 446 -450.

✓ NEUE, H. U.; GAUNT, J. L.; WANG, Z. P.; BECKER-HEIDMANN, P. & QUIJANO, C. 1997. Carbon in tropical wetlands. *Geoderma.* Vol. 79 (1-4): 163-185.

✓ NHIEM, N.X.; KIEM, P. V.; MINH, C. V.; LEE, J.J.; KU, J. H.; MYUNG, C. S. & KIM, Y. H. “A potencial inhibitor of rat aortic vascular smooth muscle cell proliferation from pollen of *Typha angustata*”. *Archives Pharmacal Research.* Vol. 33(12): 1937-1942.

✓ OZAWA, T. AND IMAGAWA, H. 1988. “Polyphenolic compounds from female flowers of *Typha latifolia* L.”. *Agricultural Biological Chemistry.* Vol. 52(2): 595-597.

✓ PALMA-SILVA, C. 1998. Crescimento e produção de *Typha domingensis* Pers na lagoa Imboassica. In: Esteves, F. A. Ecologia das Lagoas Costeira do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba e do Município de Macaé (RJ). Editora UFRJ, 1998. p. 205-220.

✓ PARKER, J. D.; CAUDILL, C. C. & HAY, M. E. 2007. Beaver herbivory on aquatic plants. *Oecologia.* Vol. 151: 616-625.

- ✓ PERES, M. B.; VERCILLO, U. E. & DIAS, B. F. S. 2011. Avaliação do Estado de Conservação da Fauna Brasileira e a Lista de Espécies Ameaçadas: o que significa, qual sua importância, como fazer? *Biodiversidade Brasileira*. Ano I (1): 45-48.
- ✓ QIN, F. & SUN, H. X. 2005. Immunosuppressive activity of Pollen *Typhae* ethanol extract on the immune responses in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 102: 424–429.
- ✓ REYMOND, P.; WEBER, H.; DAMOND, M. & FARMER, E. E. 2000. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in arabidopsis. *The Plant Cell*. Vol.12 (5): 707-719.
- ✓ ROLLY, B.; JAY, M. & BAJON, T. 1988. Flavonoid patterns in the *Koeleria cristata* species complex. *Phytochemistry*. Vol. 27: 2857-2661.
- ✓ ROSA, E. A.; SILVA, B. C.; SILVA, F. M.; TANAKA, C. M. A.; PERALTA, R. M.; OLIVEIRA, C. M. A.; KATO, L.; FERREIRA, H. D. & SILVA, C. C. 2010. Flavonoides e atividade antioxidante em *Palicourea rígida* Kunth, Rubiaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. Vol. 20 (4): 484-488.
- ✓ SANTOS, M. D. & BLATT, C. T. T. 1998. Teor de flavonoides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers. de mata e de cerrado. *Revista Brasileira de Botânica*. Vol. 21 (2): 135-140.
- ✓ SCOTTI, L.; SCOTTI, A. T.; CARDOSO, C.; PAULETTI, P.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S.; VELASCO, M. V. R.; MENEZES, C. M. S. & FERREIRA, E. I. 2007. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. Vol. 43 (2): 153-166.
- ✓ SHODE, F. O.; MAHOMED, A. S. & ROGERS, C. B. 2002. “Typhaphthalide and typharin, 2 phenolic compounds from *Typha capensis*”. *Phytochemistry*. Vol. 61: 955-957.
- ✓ SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. & PETROVICK, P. R. 2010. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6ª ed., Porto Alegre: Editora UFRGS. 1102p.
- ✓ SONG, O. 2004. Oxidative stress: a theoretical model or biological reality? *Cell R Biology*. Vol. 327: 649-662.

- ✓ SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S. & CHAVES, M. H. 2007. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*. Vol. 30 (2): 351-355.
- ✓ TONHI, E.; COLLINS, K. E.; JARDIM, I. C. S. F. & COLLINS, C. H. 2002. Fases estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. *Química Nova*. Vol. 25 (4): 616-623.
- ✓ VANISREE, M.; LEE, C.-Y.; LO, S.-F.; NALAWADE, S. M.; LIN, C. Y. & TSAY, H.-S. 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. Vol. 45: 1-22.
- ✓ VARGHESE, A.; GAVANIA, U.; ABRAHAM, S.; PARAMBI, D. G. & SATHIANARAYANAN, J. A. 2009. Phytochemical screening and antimicrobial investigation of *Typha angustifolia* Linn. *International Journal of Chemical Science*. Vol. 7: 1905–1910.
- ✓ VARPE, S. S.; JUVEKAR, A. R.; BIDIKAR, M. P. & JUVEKAR, P. R. 2012. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Typha angustifolia* pollen grains extracts in experimental animals. *Indian Journal of Pharmacology*. Vol. 44(6): 788–791.
- ✓ WEIWEI, T.; NIANYUN, Y.; DUAN, J.; WU, D.; GUO, J.; TANG, Y.; QIAN, D. & ZHU, Z. 2012. Simultaneous determination of eleven major flavonoids in the pollen of *Typha angustifolia* by HPLC-PDA-MS. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. Vol. 2(6): 602-609.
- ✓ WILLIS, K. J. & BHAGWAT, S. A. 2009. Biodiversity and Climate Change. *Science*. Vol. 326: 806-807.
- ✓ WHITE, S. D. & GANF, G. G. 1998. The influence of convective flow on rhizome length in *Typha domingensis* over a water depth gradient. *Aquatic Botany*. Vol. 62: 57-70.

✓ ZHAO, J.; ZHANG, C. Y.; XU, D. M.; HUANG, G. Q.; XU, Y. L. & WANG, Z. Y. 1990. The antiatherogenic effects of components isolated from pollen *Typhae*. *Thrombosis Research*. Vol. 57: 957–966.