

CRISTIANE APARECIDA DE FARIA

**EFEITO DA SAZONALIDADE E CLASSE DIAMÉTRICA SOBRE O TEOR DE
RUTINA EM *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J. F. Macbr. (FABACEAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Camilo Amaro de Carvalho

Coorientadores: Silvia Almeida Cardoso
Haroldo Nogueira de Paiva
Luciana Moreira Lima
Marcelo Barcellos da Rosa

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

F224e
2021 Faria, Cristiane Aparecida de, 1994-
Efeito da sazonalidade e classe diamétrica sobre o teor de
rutina em *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J. F. Macbr.
(FABACEAE) / Cristiane Aparecida de Faria. – Viçosa, MG,
2021.

1 dissertação eletrônica (48 f.): il.

Inclui anexo.

Orientador: Camilo Amaro de Carvalho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Medicina e Enfermagem, 2021.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2021.183>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Plantas medicinais. 2. *Piptadenia gonoacantha*.
3. Flavonoides. 4. Rutina. I. Carvalho, Camilo Amaro de, 1981-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Medicina e
Enfermagem. Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde. III. Título.

CDD 22. ed. 615.321

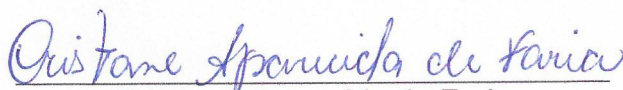
CRISTIANE APARECIDA DE FARIA

**EFEITO DA SAZONALIDADE E CLASSE DIAMÉTRICA SOBRE O TEOR DE
RUTINA EM *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J. F. Macbr. (FABACEAE)**

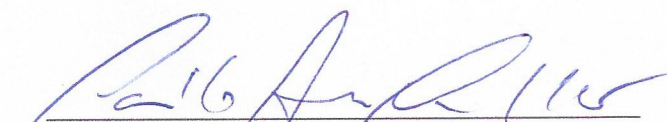
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 30 de julho de 2021.

Assentimento:



Cristiane Aparecida de Faria
Autora



Camilo Amaro de Carvalho
Orientador

*Dedico à minha família e todos que
contribuíram em minha formação.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, razão de toda vida e existência, por ter me conduzido e sustentado até aqui.

Aos meus pais, Pio e Emilia, e aos meus irmãos, Cleiton e Márcia, por sempre me guiarem e apoiarem, sendo minha base e fortaleza para que alcance meus sonhos e objetivos.

Ao meu namorado Diogo por todo incentivo e compreensão em todas etapas de minha vida, inclusive esta, tentando tornar minha caminhada mais leve e me apoiando incondicionalmente.

E de forma geral aos meus familiares, amigos e todos àqueles que me querem bem, meu muito obrigado! Ter com quem compartilhar as alegrias e angústias é o que nos motiva e dá forças para trilhar nossos caminhos.

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde pela oportunidade e acolhimento. Aos professores e demais funcionários que contribuíram em minha formação. E de forma especial ao meu orientador Prof. Dr. Camilo Amaro de Carvalho, por toda dedicação e paciência durante este processo, me orientando com tamanho cuidado e humildade. E aos meus coorientadores Prof. Dr. Marcelo Barcellos da Rosa, Prof. Dr. Haroldo Nogueira de Paiva, Prof^a. Dr^a. Luciana Moreira Lima e Prof^a. Dr^a. Silvia Almeida Cardoso por todas as contribuições.

E aos meus colegas de turma de mestrado, que de forma tão especial caminharam comigo até aqui, levarei tantas recordações!

Minha eterna gratidão!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte, não temeria mal algum, porque Tu estás comigo”.

(Salmos 23:4)

RESUMO

FARIA, Cristiane Aparecida de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2021. **Efeito da sazonalidade e classe diamétrica sobre o teor de rutina em *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J. F. Macbr. (FABACEAE).** Orientador: Camilo Amaro de Carvalho. Coorientadores: Silvia Almeida Cardoso, Haroldo Nogueira de Paiva, Luciana Moreira Lima e Marcelo Barcellos da Rosa.

As variações nos constituintes ativos das plantas devem ser consideradas durante a produção de fitoterápicos, justificando a necessidade de um controle de qualidade da coleta do material vegetal utilizado pelas indústrias. A *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J. F. Macbr. (FABACEAE) é uma espécie arbórea com propriedades biológicas promissoras, sendo alvo de estudos que apontam atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e antibacteriana de seus extratos. Este trabalho tem por objetivo a otimização da colheita de material vegetal para produção de extratos de *Piptadenia gonoacantha* com base na concentração de rutina. Após a coleta e processamento das folhas foi realizado o preparo dos extratos e do padrão de Rutina e, em seguida as leituras em espectrofotômetro a 420 nm. A concentração de rutina equivalente dos extratos foi obtida a partir da equação de regressão linear, dada pela curva padrão de rutina. Os dados obtidos foram analisados através do GraphPad Software Inc., versão 6.01. As maiores concentrações de rutina foram encontradas no verão ($117,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$), sendo encontrados os menores índices durante o inverno ($24,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$). No outono e primavera as concentrações médias tiveram valores estatisticamente iguais (com média de $93,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $94,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente). Os teores de rutina se mantiveram constantes para todas as classes diamétricas durante o verão e aumentaram com o aumento do diâmetro do tronco para as demais estações. Como conclusão, observamos que a época da colheita, bem como a dimensão do tronco influenciaram os teores de rutina em *Piptadenia gonoacantha*.

Palavras-chave: Planta medicinal. Pau Jacaré. Flavonoide. Rutina.

ABSTRACT

FARIA, Cristiane Aparecida de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2021. **Effect of seasonality and diametric class on rutin content in *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J. F. Macbr. (FABACEAE)**. Advisor: Camilo Amaro de Carvalho. Co-advisors: Silvia Almeida Cardoso, Haroldo Nogueira de Paiva, Luciana Moreira Lima and Marcelo Barcellos da Rosa.

Variations in the active constituents of plants should be considered during the production of herbal medicines, justifying the need for a quality control of the collection of plant material used by industries. The *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J.F. Macbr. (FABACEAE) is a tree species with promising biological properties, being the target of studies that indicate anti-inflammatory, antinociceptive and antibacterial activity of its extracts. This work aims to optimize the harvesting plant material and production of extracts of *Piptadenia gonoacantha* based on the concentration of rutin. After collection and processing of the leaves, the extracts and rutin pattern were prepared and then the spectrophotometer readings at 420 nm were performed. The equivalent rutin concentration of the extracts was obtained from the linear regression equation, given by the rutin pattern curve. The data obtained were analyzed through GraphPad Software Inc., version 6.01. The highest rutin concentrations were found in the summer (117,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), and the lowest indices were found during the winter (24,3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). In autumn and spring the mean concentrations had statistically equal values (with an average of 93,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 94,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively). Rutin contents remained constant for all diametric classes during the summer and increased with the increase of trunk diameter for the other seasons. In conclusion, we observed that the harvest time as well as the trunk size influenced the rutin contents in *Piptadenia gonoacantha*.

Keywords: Medicinal plant. Alligator Stick. Flavonoid. Rutin. Herbal therapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Estrutura química da rutina. Fonte: Pedriali, 2005. 15
- Figura 2 – Curva de calibração construída com padrão rutina a 420 nm. (Fonte: Análise GraphPad® por Faria, 2021). 24
- Figura 3 – Concentração de rutina em folhas e folíolos de *Piptadenia gonoacantha* por época do ano. A análise estatística foi realizada pelo teste análise de variância (ANOVA) seguido por múltiplas comparações e confiabilidade a 5% de probabilidade, onde letras distintas evidenciam diferença estatística entre os grupos analisados (Fonte: Análise GraphPad® por Faria, 2021). 25
- Figura 4 – Correlação entre a concentração de rutina e as classes diamétricas de árvores de *Piptadenia gonoacantha*, onde classe 1 = 5 a 10 cm de dap, classe 2 = 10 a 15 cm de dap, classe 3 = 15 a 20 cm de dap, classe 4 = 20 a 25 cm de dap e classe 5 > 25 cm de dap (Fonte: Análise GraphPad® por Faria, 2021). 26
- Figura 5 – Relação entre o equivalente rutina ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) por época do ano e as classes diamétricas de árvores de *Piptadenia gonoacantha*, onde classe 1 = 5 a 10 cm de dap, classe 2 = 10 a 15 cm de dap, classe 3 = 15 a 20 cm de dap, classe 4 = 20 a 25 cm de dap e classe 5 > 25 cm de dap. *Letras distintas evidenciam diferença estatística entre os grupos analisados (Fonte: Análise GraphPad® por Faria, 2021). 27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração equivalente de rutina nas amostras obtidas das folhas e folíolos de *Piptadenia gonoacantha*, por classe diamétrica e época do ano.24

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CENTEV: Centro Tecnológico de Viçosa

CPTEC: Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos

Dap: Diâmetro à Altura do Peito

P. gonoacantha: *Piptadenia gonoacantha*

UFV: Universidade Federal de Viçosa

UVI: Índice de Radiação Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

.® - Marca registrada

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	13
2 INTRODUÇÃO GERAL	14
3 OBJETIVO.....	17
3.1. Objetivo geral.....	17
3.2. Objetivos específicos	17
4 METODOLOGIA.....	18
4.1. Acesso ao material vegetal.....	18
4.2. Preparo dos extratos.....	18
4.3. Quantificação de rutina	19
4.4. Análise estatística	19
5 PRODUTOS FINAIS	20
5.1 Artigo Científico	20
5.2 Produto técnico	34
6 CONCLUSÕES	45
7 REFERÊNCIAS.....	46
ANEXO A - Comprovante de submissão à revista científica.....	48

1 APRESENTAÇÃO

A presente dissertação foi elaborada de acordo com as normas estabelecidas pela Pró Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal de Viçosa – UFV. O corpo do trabalho compreende uma introdução, objetivos gerais e específicos, metodologia, um artigo científico, um produto técnico e uma conclusão. O artigo intitulado “Efeito da sazonalidade e classe diamétrica sobre o teor de rutina em *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J. F. Macbr. (FABACEAE)” foi formatado de acordo com as normas da Revista Brazilian Journal of Medical and Biological Research (Qualis B2 – MEDICINA I), para a qual o artigo foi submetido. O produto técnico intitulado “Padronização da colheita em função da concentração de rutina nas folhas de *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J. F. Macbr. (FABACEAE)” teve como objetivo padronizar a colheita de material vegetal de *P. gonoacantha* com base na concentração de rutina.

2 INTRODUÇÃO GERAL

De acordo com a ANVISA as plantas medicinais correspondem a espécies vegetais, cultivadas ou não, utilizadas com propósitos terapêuticos (ANVISA, 2018). No Brasil se encontra grande biodiversidade destas espécies, havendo um crescente interesse pela utilização de plantas medicinais e fitoterápicos (FERREIRA et al., 2019). O emprego das plantas pela medicina popular se dá desde a antiguidade de forma empírica (BADKE et al., 2019). Todavia, atualmente muitas plantas têm sido alvo de pesquisas devido seu potencial para desenvolvimento de formulações medicamentosas (TINTINO et al., 2012).

Dentre as milhares de espécies que compõem a flora Brasileira está a *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J. F. Macbr. (FABACEAE), uma espécie arbórea nativa da Mata Atlântica no sul e sudeste do Brasil, na idade adulta pode atingir até 30 m de altura e 90 cm de dap (diâmetro da altura do peito – 1,30 m do solo). É popularmente conhecida como “pau jacaré”, “jacaré”, “casco de jacaré” dentre outros nomes vulgares (CARVALHO et al., 2010). Estudos apontam que extratos hidroalcoólicos preparados com as folhas da espécie apresentaram atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e antibacteriana, além da presença de compostos flavônicos, indicando uma promissora atividade biológica e perspectivas de sua aplicabilidade para o desenvolvimento de um novo fitoterápico (CARVALHO, 2012; CARVALHO et al., 2014).

A ação terapêutica das plantas se deve aos seus metabólitos secundários, produtos naturais que atuam no sistema de defesa da planta contra ataques patogênicos e estresses ambientais (GOBBO-NETO e LOPES, 2007; LI et al., 2020). A biossíntese e o acúmulo destes compostos podem sofrer variações relacionadas a características do ambiente, como época da colheita e condições de luz, radiação, temperatura, água e fertilidade do solo, salinidade, além de fatores intrínsecos à planta, como idade e estágio de desenvolvimento, idade da folha etc. (BERNAL et al., 2013; YANG et al., 2018).

Dentre os diversos metabólitos secundários produzidos pelas plantas destacam-se os flavonoides, que estão entre os grupos mais abundantes e difundidos (PATIL e MASAND, 2018). Estes compostos fenólicos são substâncias naturais largamente distribuídas na natureza em espécies vegetais, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução, auxiliando em diversos mecanismos de defesa das

plantas e em diversos processos oxidativos, sendo frequentemente investigados como fatores sensíveis ao estresse (BOUDERIAS et al., 2020). Diversos estudos com flavonoides apontam para uma ampla gama de propriedades promotoras da saúde (VERRI et al., 2012). Estudos realizados por Carvalho (2012), identificaram a presença de flavonoides nas folhas de *P. gonoacantha*.

A rutina é um flavonoide encontrado em muitas plantas, frutas e vegetais, e que apresenta uma ampla gama de atividades biológicas, como ação antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, vasodilatadora e citoprotetora, além do potencial para prevenir ou tratar patologias associadas ao diabetes (ARAUJO, 2012; GHORBANI, 2017). Diversas metodologias de pesquisa destacam significativa atividade antioxidante da rutina, que neutraliza ou sequestra radicais livres, exercendo importante capacidade de proteção tecidual (MACÊDO et al., 2017).

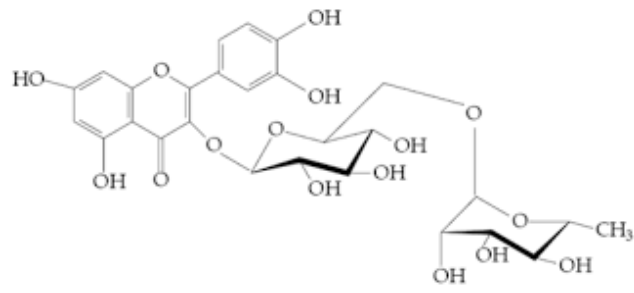


Figura 1 – Estrutura química da rutina. Fonte: Pedriali, 2005.

Estudos apontam os benefícios farmacológicos da rutina para o tratamento de várias doenças crônicas como, câncer, diabetes, hipertensão e hipercolesterolemia, havendo um aumento nos pedidos de patente de formulações contendo este composto, em diferentes formas de dosagem, isoladamente ou em combinação com outros ingredientes ativos (GULLÓN et al., 2017).

O aumento na fabricação de produtos naturais para fins medicinais tem sido crescente, e as variações qualitativas e quantitativas nos compostos bioativos das matérias-primas vegetais utilizadas pelas indústrias tem sido alvo de estudos (SZYMBORSKA-SANDHU et al., 2020). Eventos adversos relacionados à medicamentos fitoterápicos podem ser atribuídos à má qualidade das matérias-primas, o que poderia ser evitado adotando-se um controle de qualidade durante a

coleta de material vegetal e no processo de fabricação das formulações (ZHANG et al., 2012; HEINRICH, 2015).

Assim como para as plantas, a composição química dos fitoterápicos tende a ser complexa e variável. Portanto, se faz necessário alcançar uma compreensão mais precisa acerca do aprimoramento do cultivo de plantas medicinais, além da otimização de métodos de colheita do material vegetal utilizado na fabricação de formulações.

Diante desta realidade, esta pesquisa parte do interesse de investigar os níveis de rutina, utilizando-a como um marcador biológico para a presença de constituintes ativos em extratos hidroalcoólicos obtidos a partir das folhas e folíolos da *P. gonoacantha*. Tendo em vista as possíveis variações na concentração de rutina em relação à estação climática e dimensão do tronco das árvores. E com isto, otimizar os processos de extração e purificação de compostos fenólicos utilizados para fabricação de formulações dermocosméticas, e/ou medicamentosas.

3 OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

Quantificar os teores de rutina em extratos de folhas e folíolos da *P. gonoacantha* colhidas durante as quatro estações climáticas em árvores de diferentes classes diamétricas.

3.2. Objetivos específicos

Correlacionar os níveis de rutina em diferentes estações climáticas e classes diamétricas;

Otimização dos processos de colheita de material vegetal e produção de extratos de *P. gonoacantha* com base na concentração de rutina.

4 METODOLOGIA

4.1. Acesso ao material vegetal

O fragmento florestal onde foi coletado o material vegetal do estudo possui 44,11 ha e está situado no Centro Tecnológico de Viçosa – MG (CENTEV), com coordenadas geográficas 42° 51' W e 20° 42' S (Torres et al., 2013) e altitude média de 721 m (Souza et al., 2014).

O material vegetal é composto por folhas e folíolos de Pau Jacaré (*P. gonoacantha*) e o acesso foi realizado em três árvores por classe de dap (“Diámetro à Altura do Peito”), sendo elas: classe 1 (5 a 10 cm), classe 2 (10 a 15 cm), classe 3 (15 a 20 cm), classe 4 (20 a 25 cm) e classe 5 (> 25 cm). Os indivíduos da espécie foram identificados e demarcados e a coleta aconteceu durante as quatro estações climáticas: primavera, verão, outono e inverno. O material vegetal coletado foi identificado e a exsiccata foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Viçosa (UFV) sob o número 35530.

Após a coleta, as folhas e folíolos foram secos em estufa de ar circulante a 60°C por 3 dias e triturados em moinho de facas.

4.2. Preparo dos extratos

A utilização do etanol 80% (v/v) como solvente foi selecionada por este extrato apresentar valores elevados de absorvância dos constituintes ativos desta espécie (Carvalho et al., 2014).

Para o preparo dos extratos foi utilizado o pó das folhas e folíolos de *P. gonoacantha* na relação de 1:5 (25 g pó: 125 mL de solução etanol/água 80% v/v com 0,3% ácido cítrico), que resultou na concentração de 20% de extrato seco (m/v). Em seguida, o extrato foi submetido ao processo de maceração por 48 horas à temperatura ambiente. Após este período, foi realizada a filtração em filtro de papel, onde o filtrado recolhido foi armazenado na temperatura de 2-8°C em frasco âmbar protegido da luz. O resíduo retido (torta) no filtro foi novamente levado a extração por maceração por mais 2 vezes com a mesma solução extratora. Ao final do processo, os filtrados foram reunidos em frasco âmbar e ao abrigo da luz para ser realizado o processo de retirada do solvente. A rotaevaporação foi realizada em evaporador

rotativo (BUCHI®) a temperatura de 60°C com o auxílio de bomba de vácuo (PRISMATEC®). Por fim, as amostras foram devidamente identificadas e armazenadas em geladeira a 2-8°C em frasco âmbar protegido da luz.

4.3. Quantificação de rutina

O padrão (Rutina) foi preparado em balão volumétrico de 100,0 mL com solução metanólica de cloreto de alumínio a 5%. A cada balão foram acrescentados 0,6 mL de ácido acético glacial, 10,0 mL da solução metanólica de piridina 20% e 2,5 mL do reagente cloreto de alumínio em metanol 50,0 mg.L⁻¹, completando-se o volume com água destilada. Esta solução foi diluída em reagente cloreto de alumínio a 5% em metanol. Após 30 minutos em temperatura ambiente, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 420 nm, utilizando-se a solução de metanol em cloreto de alumínio 5% como solução-branco (PEIXOTO SOBRINHO et al., 2008).

Aos extratos, foram adicionados a mesma solução metanólica em cloreto de alumínio empregada para a construção da curva com o padrão de rutina. Após 30 minutos em temperatura ambiente foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 420 nm em cubetas de quartzo.

A concentração de rutina equivalente dos extratos foi obtida a partir da equação de regressão linear, dada pela curva padrão de rutina.

4.4. Análise estatística

Os dados foram analisados em um sistema de análise estatística GraphPad Prism Software Inc., San Diego, CA, EUA versão 6.01. Diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos, foram calculadas por meio da análise de variância (ANOVA) seguida por múltiplas comparações. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

Os valores obtidos foram multiplicados por mil para facilitar a interpretação dos resultados.

5 PRODUTOS FINAIS

5.1 Artigo Científico

EFEITO DA SAZONALIDADE E CLASSE DIAMÉTRICA SOBRE O TEOR DE RUTINA EM *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J. F. Macbr. (FABACEAE)

CA Faria¹, MB Favaro², MB Rosa³, MOF Amaro⁴, LM Lima⁵, HN Lima⁶, CA Carvalho⁷

¹Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Medicina e Enfermagem. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Viçosa, MG, Brasil

² Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Engenharia Florestal. Viçosa, MG, Brasil

³ Universidade Federal de Santa Maria. Departamento de Química. Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

⁴ Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Medicina e Enfermagem. Viçosa, MG, Brasil

⁵ Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Medicina e Enfermagem. Viçosa, MG, Brasil

⁶ Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Engenharia Florestal. Viçosa, MG, Brasil

⁷ Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Medicina e Enfermagem. Viçosa, MG, Brasil

Autor para Correspondência: ¹Cristiane Aparecida de Faria, Rua Otávio Ferreira de Andrade, nº20, Centro, Vieiras - Minas Gerais / Brasil, CEP 36.895-000, (32) 9 9820-1664, e-mail: cristiane_faria@outlook.com.

RESUMO

Compreender como os constituintes ativos das plantas medicinais podem sofrer variações em seu conteúdo e concentração tem a contribuir com a otimização da colheita do material vegetal utilizado na produção de formulações medicamentosas. Por isto, este trabalho se destina a quantificar os teores de rutina, utilizada como um marcador biológico, em extratos de folhas e folíolos da *P. gonoacantha* colhidas durante as quatro estações climáticas em árvores de diferentes classes diamétricas. Após a coleta e processamento das folhas foi realizado o preparo dos extratos e do padrão de Rutina e, em seguida as leituras em espectrofotômetro a 420 nm. A concentração de rutina equivalente dos extratos foi obtida a partir da equação de regressão linear, dada pela curva padrão de rutina. Os dados obtidos foram analisados através do GraphPad Software Inc., versão 6.01. Os teores médios de rutina foram maiores no verão, sendo a média igual a 117,4 µg.mL⁻¹, enquanto que os menores índices foram encontrados durante o inverno obtendo uma concentração média de 24,3 µg.mL⁻¹ para esta estação (p<0,05). No outono e primavera as concentrações médias tiveram valores

estatisticamente iguais ($p > 0,05$), com média de $93,4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $94,1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. Para as estações primavera, outono e inverno, o teor de rutina aumentou com o aumento do diâmetro do tronco, não havendo diferença estatística entre as classes diamétricas durante o verão. Portanto, a época da colheita, bem como a dimensão do tronco exerceram influência sobre os teores de rutina em *Piptadenia gonoacantha*.

Palavras-chaves: Planta medicinal; Pau Jacaré; metabólito secundário

INTRODUÇÃO

O estudo das plantas medicinais pode desempenhar um papel fundamental na exploração e descoberta de seus recursos naturais. Sua ação terapêutica se deve aos metabólitos secundários produzidos, cujos teores e produção podem sofrer variações na quantidade ou mesmo na natureza dos constituintes ativos a depender de características do ambiente, como a época do ano em que é coletado o material vegetal, assim como o estágio de desenvolvimento da planta (1,2). A sazonalidade, por sua vez, possui relação às variações que ocorrem em decorrência das diferentes estações climáticas do ano, e exerce influência sobre o conteúdo destes metabólitos secundários (3).

A *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J. F. Macbr. (FABACEAE) é uma espécie arbórea, da família Fabaceae, comum nativa da Mata Atlântica no sul e sudeste do Brasil, popularmente conhecida como “pau jacaré”, e comumente utilizada para o tratamento de distúrbios inflamatórios (4). Estudos prévios com a espécie *P. gonoacantha*, demonstraram atividade anti-inflamatória, antinociceptiva, cicatrizante e antibacteriana, bem como a presença de compostos flavônicos, indicando potencial para o desenvolvimento de formulações medicamentosas (5-8).

Os flavonoides são compostos fenólicos amplamente conhecidos e estudados em razão de seus efeitos benéficos à saúde, sendo documentados, até o momento, mais de 8.000 flavonoides diferentes, estando entre os grupos de metabólitos secundários mais abundantes e difundidos, onde a maioria deles se faz presente nas células ou superfícies de vários órgãos do tecido vegetal (9). Dentre eles destaca-se a rutina que é extensamente encontrada na natureza, inclusive em quantidade considerável nas folhas da espécie *P. gonoacantha* (10,11).

Muitos estudos relataram o efeito fisiológico e as propriedades farmacológicas da rutina, que tem se mostrado eficaz na redução do risco de doenças crônicas, com efeito protetor comprovado. Pesquisas apontam para diversos benefícios, como efeito antineoplásico, ação antidiabética e neuroprotetora, redução dos níveis de colesterol e benefícios sobre doenças cardiovasculares e hipertensão, além da melhoria da capacidade

de visão e audição. Devido à sua funcionalidade significativa, a incorporação da rutina em formulações medicamentosas provavelmente será uma prática promissora (12).

Tendências atuais para o processo de extração têm se concentrado na extração sustentável de fontes naturais e de forma otimizada. A fim de contribuir para um melhor conhecimento da espécie, este trabalho se destina a quantificar os teores de rutina em extratos das folhas e folíolos da espécie *P. gonoacantha* coletadas em árvores com diferentes classes diamétricas colhidas durante as quatro estações climáticas do ano.

MATERIAL E MÉTODOS

Acesso ao material vegetal

O fragmento florestal onde foi coletado o material vegetal do estudo possui 44,11 ha e está situado no Centro Tecnológico de Viçosa – MG (CENTEV), com coordenadas geográficas 42° 51' W e 20° 42' S (13) e altitude média de 721 m (14).

O material vegetal é composto por folhas e folíolos de Pau Jacaré (*P. gonoacantha*) e o acesso foi realizado em três árvores por classe de dap (“Diâmetro à Altura do Peito”), sendo elas: classe 1 (5 a 10 cm), classe 2 (10 a 15 cm), classe 3 (15 a 20 cm), classe 4 (20 a 25 cm) e classe 5 (> 25 cm). Os indivíduos da espécie foram identificados e demarcados e a coleta aconteceu durante as quatro estações climáticas: primavera, verão, outono e inverno. O material vegetal coletado foi identificado e a exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Viçosa (UFV) sob o número 35530.

Após a coleta, as folhas e folíolos foram secos em estufa de ar circulante a 60°C por 3 dias e triturados em moinho de facas.

Preparo dos extratos

A utilização do etanol 80% (v/v) como solvente foi selecionada por este extrato apresentar valores elevados de absorvância dos constituintes ativos desta espécie (15).

Para o preparo dos extratos foi utilizado o pó das folhas e folíolos de *P. gonoacantha* na relação de 1:5 (25 g pó: 125 mL de solução etanol/água 80% v/v com 0,3% ácido cítrico), que resultou na concentração de 20% de extrato seco (m/v). Em seguida, o extrato foi submetido ao processo de maceração por 48 horas à temperatura ambiente. Após este período, foi realizada a filtração em filtro de papel, onde o filtrado recolhido foi armazenado na temperatura de 2-8°C em frasco âmbar protegido da luz. O resíduo retido (torta) no filtro foi novamente levado a extração por maceração por mais 2 vezes com a mesma solução extratora. Ao final do processo, os filtrados foram reunidos em frasco âmbar e ao abrigo da luz para ser realizado o processo de retirada do solvente. A rotaevaporação foi realizada em evaporador rotativo (BUCHI®) a temperatura de 60°C com o auxílio de bomba de vácuo

(PRISMATEC®). Por fim, as amostras foram devidamente identificadas e armazenadas em geladeira a 2-8°C em frasco âmbar protegido da luz (6).

Quantificação de rutina

O padrão (Rutina) foi preparado em balão volumétrico de 100,0 mL com solução metanólica de cloreto de alumínio a 5%. A cada balão foram acrescentados 0,6 mL de ácido acético glacial, 10,0 mL da solução metanólica de piridina 20% e 2,5 mL do reagente cloreto de alumínio em metanol 50,0 mg.L⁻¹, completando-se o volume com água destilada. Esta solução foi diluída em reagente cloreto de alumínio a 5% em metanol. Após 30 minutos em temperatura ambiente, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 420 nm, utilizando-se a solução de metanol em cloreto de alumínio 5% como solução-branco (16).

Aos extratos, foram adicionados a mesma solução metanólica em cloreto de alumínio empregada para a construção da curva com o padrão de rutina. Após 30 minutos em temperatura ambiente foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 420 nm em cubetas de quartzo.

A concentração de rutina equivalente dos extratos foi obtida a partir da equação de regressão linear, dada pela curva padrão de rutina.

Análise estatística

Os dados foram analisados em um sistema de análise estatística GraphPad Prism Software Inc., San Diego, CA, EUA versão 6.01 (17). Diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos, foram calculadas por meio da análise de variância (ANOVA) seguida por múltiplas comparações. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

Os valores obtidos foram multiplicados por mil para facilitar a interpretação dos resultados.

RESULTADOS

Uma curva de calibração com o padrão de rutina foi construída e avaliada por espectrofotometria, onde apresentou linearidade à 420 nm para as concentrações estudadas (62,5 - 7,81 µg.mL⁻¹). A equação da regressão linear obtida através da curva de calibração, foi $y = 24,725x + 0,0284$, em que y corresponde à absorbância (nm) e x à concentração (µg.mL⁻¹) em equivalentes de Rutina (Figura 2).

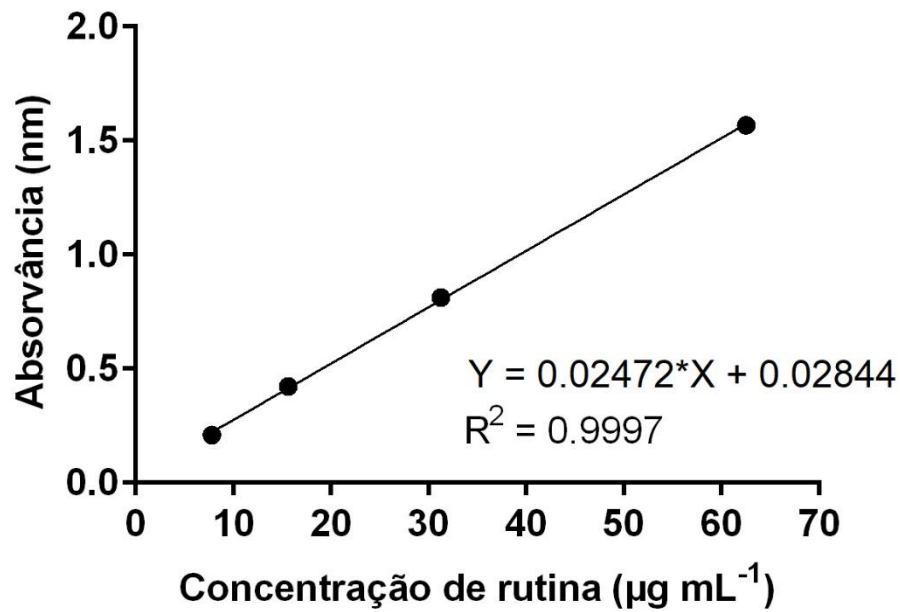


Figura 2 – Curva de calibração construída com padrão rutina a 420 nm. (Fonte: Análise GraphPad® por Faria, 2021).

A partir da equação obtida, foi possível calcular o equivalente de rutina das amostras, sendo os resultados apresentados a seguir (Tabela 1).

Tabela 1 – Concentração equivalente de rutina nas amostras obtidas das folhas e folíolos de *Piptadenia gonoacantha*, por classe diamétrica e época do ano.

Árvore (concentração de rutina em µg.mL ⁻¹)				
Época	Classe de DAP	1	2	3
Primavera	1	83,2	90,5	86,4
	2	80,9	93	86,95
	3	104,4	101,8	103,1
	4	92,8	94,8	93,8
	5	97,9	102,4	100,15
Verão	1	118,9	108,4	120,8
	2	118,4	103,5	120,9
	3	121,8	120,9	112,8
	4	118,8	119	118,7
	5	119,7	119,6	118,9

Outono	1	81,9	77,2	85,8
	2	85,8	70,1	79,1
	3	93,3	79,1	113,4
	4	104,9	104,7	90
	5	119,5	111,1	104,5
Inverno	1	16,6	24,5	16,9
	2	17,6	22,1	18,1
	3	38,1	33,8	20,8
	4	30,4	27,2	23,6
	5	17,4	31	26,3

(Fonte: Microsoft® Word por Faria, 2021).

As maiores concentrações de rutina foram encontradas no verão, sendo a média igual a $117,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($p < 0,05$). No outono e primavera as concentrações médias tiveram valores estatisticamente iguais ($p > 0,05$), sendo $93,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $94,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. O teor de rutina durante o inverno apresentou-se 79,3% menor quando comparado ao verão, sendo a concentração média de $24,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para esta estação (Figura 3).

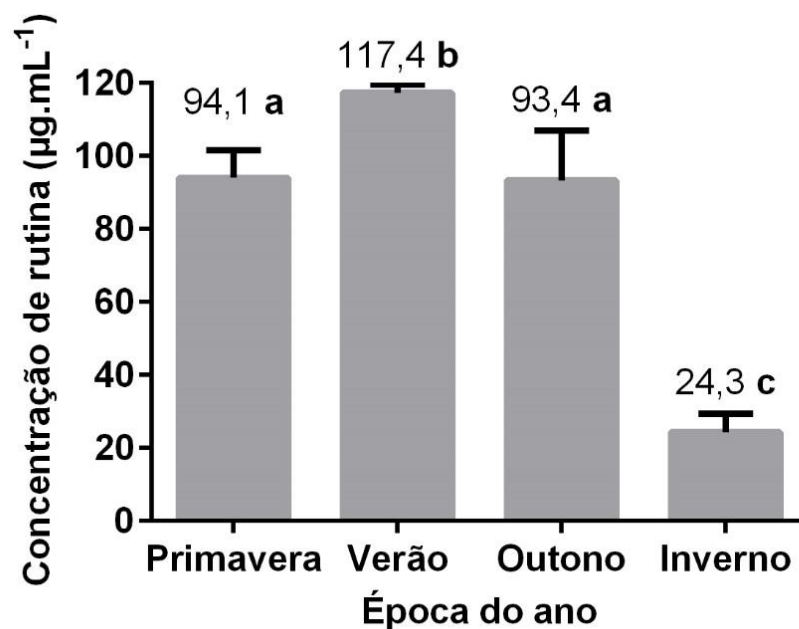


Figura 3 – Concentração de rutina em folhas e folíolos de *Piptadenia gonoacantha* por época do ano. A análise estatística foi realizada pelo teste análise de variância (ANOVA) seguido por múltiplas comparações e confiabilidade a 5% de probabilidade, onde letras distintas evidenciam diferença estatística entre os grupos analisados (Fonte: Análise GraphPad® por Faria, 2021).

O diâmetro das árvores também demonstrou ser um fator que exerce influência sobre o teor de rutina extraído das folhas e folíolos (Figura 4). Por meio dos dados pode-se inferir uma correlação positiva entre diâmetro da planta e concentração de rutina.

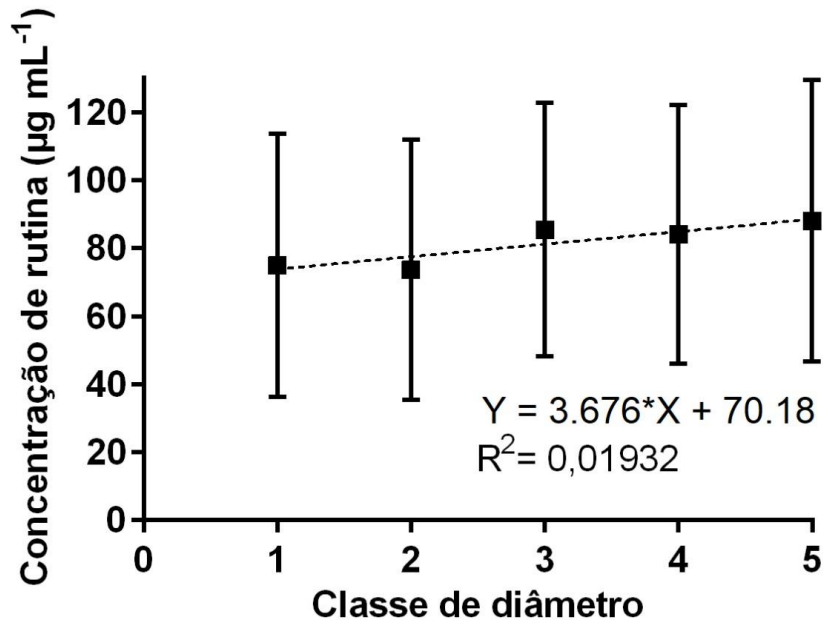


Figura 4 – Correlação entre a concentração de rutina e as classes diamétricas de árvores de *Piptadenia gonoacantha*, onde classe 1 = 5 a 10 cm de dap, classe 2 = 10 a 15 cm de dap, classe 3 = 15 a 20 cm de dap, classe 4 = 20 a 25 cm de dap e classe 5 > 25 cm de dap (Fonte: Análise GraphPad® por Faria, 2021).

Os teores médios de rutina encontrados em cada classe foram: classe 1 ($75,9 \mu\text{g mL}^{-1}$), classe 2 ($74,7 \mu\text{g mL}^{-1}$), classe 3 ($87 \mu\text{g mL}^{-1}$), classe 4 ($84,9 \mu\text{g mL}^{-1}$) e classe 5 ($89 \mu\text{g mL}^{-1}$). Havendo uma maior concentração de rutina nas árvores com DAP acima de 25 cm, seguido de árvores com DAP entre 15 à 20 cm e 20 à 25 cm respectivamente.

Ao comparar a classe diamétrica e época do ano nesse estudo (Figura 5), foi observado que para inverno, outono e primavera, houve uma tendência de aumento nos teores médios de rutina à medida em que se aumenta a classe diamétrica. Já no verão, os teores médios de rutina permaneceram estatisticamente iguais para todas as classes de diâmetro. As classes 1, 2, 4 e 5 as concentrações de rutina foram maiores no verão ($p < 0,05$), em seguida encontram-se as estações primavera e outono, com valores estatisticamente iguais ($p > 0,05$). Para a classe 3 não houve diferença significativa na concentração de rutina entre as estações verão, primavera e outono ($p > 0,05$). Para todas as classes diamétricas, as menores concentrações foram encontradas durante o inverno ($p < 0,05$), com valores significativamente inferiores.

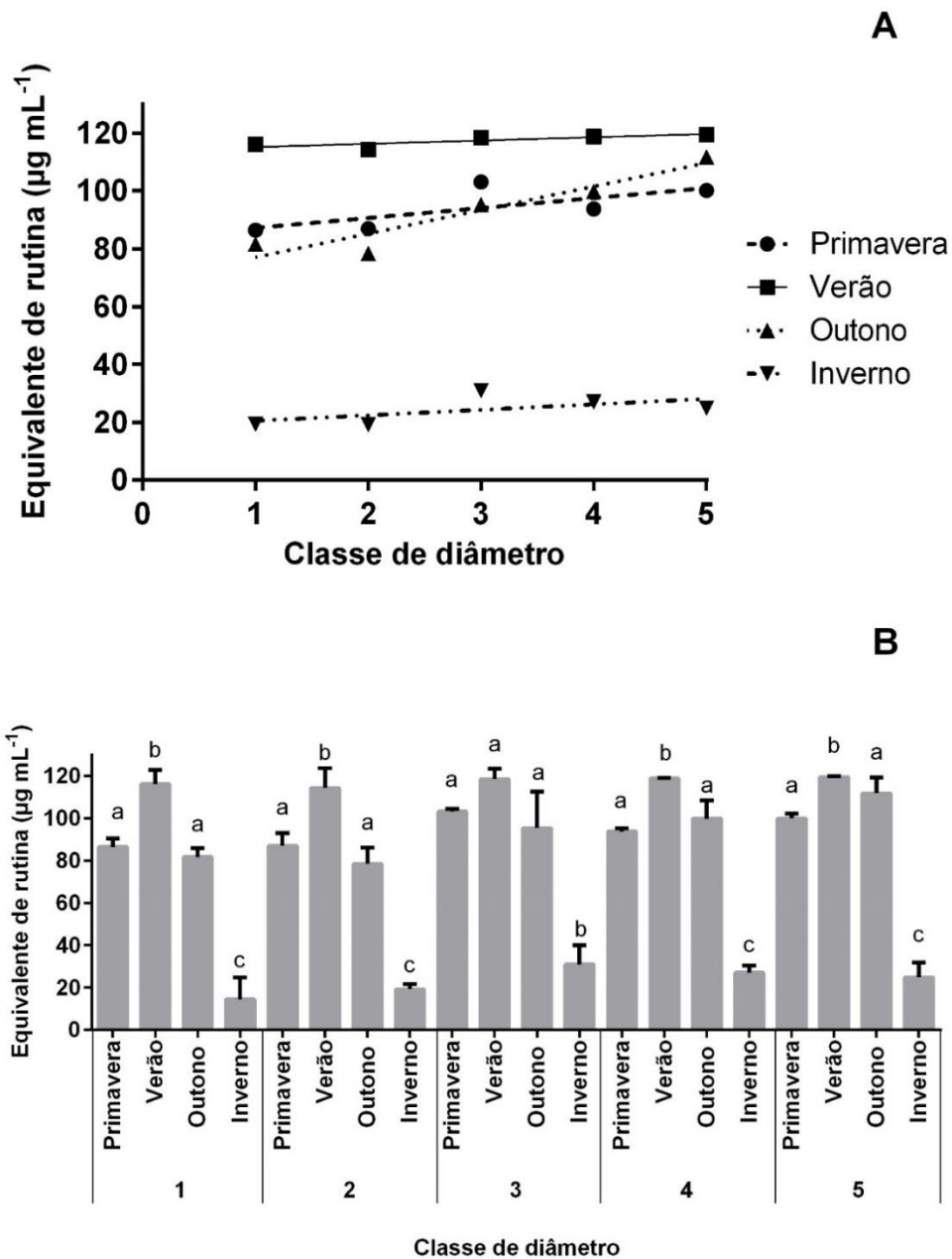


Figura 5 – Relação entre o equivalente rutina ($\mu\text{g mL}^{-1}$) por época do ano e as classes diamétricas de árvores de *Piptadenia gonoacantha*, onde classe 1 = 5 a 10 cm de dap, classe 2 = 10 a 15 cm de dap, classe 3 = 15 a 20 cm de dap, classe 4 = 20 a 25 cm de dap e classe 5 > 25 cm de dap. *Letras distintas evidenciam diferença estatística entre os grupos analisados (Fonte: Análise GraphPad® por Faria, 2021).

DISCUSSÃO

Nesta pesquisa, as maiores concentrações de rutina foram encontradas durante o período do verão. Esta estação é caracterizada pelo aumento da temperatura do ar e

mudanças rápidas nas condições diárias do tempo, com chuvas de curta duração e forte intensidade (18).

Evidências apontam que a qualidade de compostos fenólicos dos tecidos vegetais pode ser afetada por muitos fatores, como genótipo, ambiente, estágio de crescimento da planta, época de colheita, condições de processo e armazenamento e método de análise (19,20). Corroborando com estes dados, um estudo demonstra que sob a influência de fatores ambientais, processos fisiológicos celulares e de desenvolvimento das plantas são afetados, produzindo metabólitos secundários que desempenham uma variedade de papéis em resposta a estas mudanças (21). A sazonalidade é relatada como um fator contribuinte para a produção de metabólitos secundários (22).

As regiões centrais do Brasil (inclui o Sudeste do Brasil) são caracterizadas por 6 meses de estação chuvosa que vão de outubro a março, e 6 meses de chuvas escassas entre abril e setembro (23). Assim, para a região de coleta das amostras, as estações do verão e primavera apresentam maior disponibilidade hídrica quando comparadas ao outono e inverno.

Pesquisas apontam um maior teor de compostos fenólicos e flavonoides durante o período chuvoso em relação ao período de seca (24), corroborando com nossos achados, tendo em vista que os maiores índices de precipitações na região acontecem no verão, onde se apresentaram os teores de rutina mais elevados. Neste mesmo sentido, em estudo com a espécie *Hypericum perforatum* L., se observa um aumento significativo na concentração de flavonoides em condições de maior disponibilidade hídrica (25).

Um estudo demonstrou que a produção destes compostos pode estar relacionada com a variabilidade climática no decorrer de um ano, sugerindo que pode existir alteração na composição de metabólitos produzidos por uma planta, tendo em vista o período em que é realizada a coleta do material vegetal, sendo que à medida que a temperatura aumenta, a presença de flavonoides nas folhas tende a aumentar (3), indo de encontro aos nossos achados. Todavia ao contrário dos nossos resultados, foi observado uma menor disponibilidade de flavonoides nas folhas das plantas, na presença de índices pluviométricos mais elevados.

Amostras de *Mentha spicata* L, *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. e *Aloysia citriodora* Palàu revelaram uma maior concentração de ácidos fenólicos totais e flavonoides quando a colheita foi realizada utilizando-se as folhas apicais da planta e coletadas nos meses mais quentes de verão, não havendo diferenças significativas para amostras de *Thymus x citriodorus* L (26). Dados que vão de encontro aos achados desta pesquisa, onde também foi possível observar variações quanto aos níveis de rutina em relação à época do ano, com concentrações mais elevadas durante o verão.

A idade ontogenética, bem como a data de colheita foram relatadas como fatores que exercem influência sobre os níveis de compostos fenólicos isolados analisados, com níveis

elevados durante o início do verão, independentemente da posição da folha. Havendo concentrações particularmente elevadas para alguns compostos nas folhas apicais no início do verão (19). A produção de compostos derivados do metabolismo secundário de *Cistus ladanifer* L. e também se mostrou dependente da estação, sendo o verão o período em que a secreção foi significativamente maior. A quantidade destes compostos dentro da planta e ao longo do ano apresentou variabilidade alta, mostrando teores mais elevados em folhas jovens durante o verão, quando comparado a folhas maduras durante o inverno (27).

Em condições de elevada radiação solar, as plantas tendem a aumentar a produção de substâncias antioxidantes, como os compostos fenólicos e flavonoides, que agem como protetores contra a incidência de raios ultravioleta (28). Durante o verão, em uma extensa faixa que cobre todo o Sudeste, Centro-Oeste e grande parte do Sul e Nordeste (regiões do Brasil), devido ao ângulo de inclinação da Terra em seu movimento ao redor do sol, o Índice de Radiação Ultravioleta (UVI) atinge níveis mais elevados, tendo em vista que a radiação solar sofre menos atenuação por componentes atmosféricos (29). Isto sugere, portanto, que este fator também possa ter influenciado nos teores mais elevados de rutina nas folhas e folíolos de *P. gonoacantha* coletados durante o verão em relação ao inverno, onde foram encontrados os menores índices nas amostras.

Em estudo dos teores de compostos bioativos com atividade anti-radicalar nas folhas da *Moringa oleifera* Lam. também se notou um aumento em condições de elevação da radiação solar, temperatura média, radiação ultravioleta e precipitação, sugerindo que tais condições estressam as plantas, que tendem a desenvolver um sistema de defesa antioxidante (30).

O crescimento da árvore pode ser definido como o aumento nas dimensões de uma árvore individual ao longo do tempo. O incremento do diâmetro tende a atingir o pico no início até a meia-idade de uma árvore e, em seguida, declina gradualmente com o tamanho e a idade (31). Ao aplicar o método de análise de anéis de árvores para avaliar a dinâmica de crescimento de *P. gonoacantha* foi demonstrado que a taxa de crescimento radial não é constante, mas flutua ao longo da vida da planta, e além disso difere amplamente entre os indivíduos (32). Todavia, de modo geral, podemos inferir que o aumento do diâmetro de uma árvore está relacionado à sua idade. Assim, árvores com maior diâmetro tendem a ter mais idade quando comparadas às árvores com diâmetro menor, e vice-versa.

Em estudo com arbustos de diferentes idades (dois, três e seis anos) simultaneamente com a época de floração, encontrou-se maior atividade antioxidante, bem como maior quantidade de compostos fenólicos totais e o conteúdo total de flavonoides pertencentes à flor de seis anos de idade (33). A composição de óleos essenciais também apresenta variação em decorrência da idade da planta no momento da colheita (34). Resultados semelhantes

foram observados nesta pesquisa, onde os teores de rutina estiveram mais elevados em árvores com diâmetro maior, que indica uma idade mais avançada da planta.

Diferentes tendências de acumulação também podem ser notadas em *Salix pyrolifolia* Ledeb devido aos processos de desenvolvimento e envelhecimento e das diferentes fases da ontogenia. Os flavonoides tendem a predominar nos botões vegetativos, havendo uma concentração significativamente mais baixa nos botões de árvores jovens com 1 ano de idade do que nos botões das árvores mais velhas (35). Achados que vão de encontro a esta pesquisa, onde se observa menores índices de rutina em árvores com menor diâmetro e, provavelmente, mais jovens.

Todavia, resultados divergentes aos achados deste estudo também podem ser encontrados, evidenciando a complexidade e variabilidade quanto a concentração de constituintes ativos nas plantas. A concentração de flavonoides em *Melittis melissophyllum* L., pôde ser detectada nas suas maiores quantidades nas espécies de 2 anos de idade quando comparado a plantas de 3 e 4 anos, o que pode estar relacionado à biologia de desenvolvimento da planta (36).

De modo geral, a época da coleta do material vegetal, bem como o diâmetro do tronco das árvores se mostraram fatores com influência sobre a concentração de rutina na espécie *P. gonoacantha*, tendo em vista as variações deste constituinte nas amostras coletadas. Os teores médios de rutina foram maiores no verão, não havendo diferença estatística entre as classes diamétricas para esta estação, e os menores índices foram encontrados durante o inverno. Para as estações primavera, outono e inverno, o teor de rutina aumentou linearmente com o aumento do diâmetro do tronco.

Considerando a rutina um marcador biológico, a estação climática em que é realizada a colheita, bem como o diâmetro da altura do peito podem ser, portanto, parâmetros utilizados para otimizar a colheita do material vegetal a ser utilizado para produção de extratos de *P. gonoacantha*, em relação à composição desejada de compostos bioativos para uma finalidade específica.

Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte da dissertação de mestrado profissional de Cristiane Aparecida de Faria pela Universidade Federal de Viçosa – UFV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jamshidi-Kia F, Lorigooini Z, Amini-Khoei H. Medicinal plants: Past history and future perspective. *Jour Herb Pharm* 2018, 7: 1 -7, doi: 10.15171/jhp.2018.01.

2. Li Y, Kong D, Fu Y, Michael RS, Wu H. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Phys Bioche* 2020; 148: 80-89, doi: 10.1016/j.plaphy.2020.01.006.
3. Martins DHN. Avaliação da sazonalidade de compostos fenólicos e atividade antioxidante de folhas de *Erythroxylum daphnites* [Dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília; 2015.
4. Carvalho CA, Santana GS, Amaro OFM, Franco AJ, Pinto R, Zatti RA, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract of leaves of *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) Macbr. in experimental animal models. *Ciê e Nat* 2014; 36: 775–781, doi: 10.5902/2179460X13555.
5. Carvalho PER. Pau-Jacaré - *Piptadenia gonoacantha*. *Cir Téc Embrap*. 2004 dez; 91:12.
6. Ribeiro CGP. Validação de formulações JACBIO® a base de extratos de *Piptadenia gonoacantha* (Pau Jacaré) com atividade cicatrizante [Dissertação]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2018.
7. Carvalho CA. Caracterização Botânica, Fitoquímica e avaliação da atividade biológica de extratos de *Piptadenia gonoacantha* (mart.) J.f. macbr (fabaceae) [Dissertação]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2012.
8. Franco AF, Pereira CG, Silva KV, Almeida GFG, Amaro MOF, Caldeira EAC, et al. Antimicrobial activity of dermocosmetic formulations based on *Piptadenia gonoacantha*. *Ciê. e Nat* 2021; 43: 31, doi: 10.5902/2179460X43704.
9. Mutha RE, Tatiya AU, Surana SJ. Flavonoids as natural phenolic compounds and their role in therapeutics: an overview. *Futur J Pharm Sci* 2021; 7: 25, doi: 10.1186/s43094-020-00161-8.
10. Araújo, MEMB. Avaliação da atividade antioxidante e antiproliferativa da rutina e seus produtos obtidos por hidrólise enzimática [Dissertação]. Bragança Paulista: Universidade São Francisco; 2012.
11. Macêdo ISV, Cunha KG, Alves ATV, Martins RM, Simões MOS. Atividade antioxidante da rutina: uma revisão. *BioFarm* 2017; 3: 19, ISSN 1983-4209.
12. Chua LS. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. *J Ethnopharmacol* 2013; 150: 805-817. doi: 10.1016 / j.jep.2013.10.036
13. Torres CMME, Jacovine LAG; Soares CPB, Oliveira Neto SN; Santos RD, Castro Neto F. Quantificação de biomassa e estocagem de carbono em uma floresta estacional semidecidual, no Parque Tecnológico de Viçosa, MG. *Rev Árvore* 2013; 37: .647-655. doi.org/10.1590/S0100-67622013000400008
14. Souza LFT, Fernandes Filho EI, Faria MM. Compartimentação geomorfológica e mapeamento digital de solos no município de Viçosa–MG. *Revista Geonorte*. 2014; 5: 110 - 114.
15. CARVALHO, Camilo Amaro et al. Aspectos químicos e atividade antibacteriana de *Piptadenia gonoacantha* (FABACEAE). *Ciência e Natura* 2014; 36: 731-744, doi: 10.5902/2179460X13456.
16. Peixoto Sobrinho TJS, Silva CHTP, Nascimento JE, Monteiro JM, Albuquerque UP, Amorim ELC. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos

- flavonóides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. *Rev Bras Cienc Farm* 2008; 44: 683-689, doi: 10.1590/S1516-93322008000400015
17. GraphPad Prism Software Inc. Versão 6.01. [Programa de computador] San Diego: GraphPad Prism Software Inc. 2012.
18. Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos/ Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (CPTEC/INPE). Estações do ano. <http://clima1.cptec.inpe.br/estacoes/pt>. Acessado em 17 de março de 2021.
19. Vagiri M, Conner S, Stewart D, Andersson SC, Verrall S, Johansson E, Rumpunen K. Phenolic compounds in blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) leaves relative to leaf position and harvest date. *Food Chem* 2015; 172:135-42, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.09.041.
20. Bujor OC, Ginies C, Popa VI, Dufour C. Phenolic compounds and antioxidant activity of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) leaf, stem and fruit at different harvest periods. *Food Chem* 2018; 252: 356-365, doi: 10.1016/j.foodchem.2018.01.052.
21. Isah T. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Biol Res* 2019; 52: 25, doi: 10.1186/s40659-019-0246-3.
22. Gobbo-Neto L, Lopes NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quím Nova* 2006; 30: 374-381, doi: 10.1590/S0100-40422007000200026.
23. Rao VB, Franchito SH, Santo CME, Gan MA. An update on the rainfall characteristics of Brazil: Seasonal variations and trends in 1979-2011. *Inter J Clim* 2015; 36: 291-302, doi: 10.1002/joc.4345.
24. Zanella DFP. Potencial inseticida de *Azadirachta indica* e *Trichilia pallida* (Meliaceae) sobre *Aedes aegypti* (L.) (Dip.: Culicidae): Quantificação e perfil químico de metabólitos secundários [Tese]. Campo Grande: Universidade Católica Dom Bosco; 2017.
25. Gray DE, Pallardy SG, Garrett HE, Rottinghaus GE. Effect of acute drought stress and time of harvest on phytochemistry and dry weight of St. John's wort leaves and flowers. *Planta Med* 2003; 69: 1024-1030, doi: 10.1055/s-2003-45150.
26. Rita ÍAO. Influência da época de colheita e estado fenológico na composição fenólica e propriedades bioativas de infusões de tomilho-limão, hortelã-vulgar, limonete e erva-príncipe [Dissertação]. Bragança: Universidade de Salamanca; 2017.
27. Masa CV, Díaz TS, Gallego JCA, Lobón NC. Quantitative variation of flavonoids and diterpenes in leaves and stems of *Cistus ladanifer* L. at different ages. *Molecules* 2016; 21: 275-289, doi: 10.3390/molecules21030275.
28. Taiz L, Zeiger E. Fisiologia vegetal. Porto Alegre: Artmed; 2004.
29. Corrêa MP. Solar ultraviolet radiation: properties, characteristics and amounts observed in Brazil and South America. *A Bras Dermatol* 2015; 90: 297-313, doi: 10.1590/abd1806-4841.20154089.
30. Vázquez-León LA, Páramo-Calderón DE, Robles-Olvera VJ, Valdés-Rodríguez OA, Pérez-Vázquez A, García-Alvarado MA, et al. Variation in bioactive compounds and antiradical activity of *Moringa oleifera* leaves: influence of climatic factors, tree age, and soil parameters. *Eur Food Res Technol* 2017; 243: 1593–1608. doi: 10.1007/s00217-017-2868-4.

31. Bowman DMJS, Brienen JWR, Gloor E, Phillips LO, Prior LD. Detecting trends in tree growth: not so simple. *Tre in Plan Sci* 2013; 18: 11-17, doi: 10.1016/j.tplants.2012.08.005.
32. Brandes AFN, Albuquerque RP, Moraes LFD, Barros CF. Annual tree rings in *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J.F.Macbr. in a restoration experiment in the Atlantic Forest: potential for dendroecological research. *Acta Bot Bras* 2016; 30: 383-388, doi: 10.1590/0102-33062016abb0101.
33. Moradi H, Ghavam M, Tavili A. Study of antioxidant activity and some herbal compounds of *Dracocephalum kotschy* Boiss. in different ages of growth. *Biotechnol Rep (Amst)*; 25: 8, doi: 10.1016/j.btre.2019.e00408.
34. Farias JP. Influência da idade da planta da composição química e atividades biológicas do óleo essencial de erva-baleeira (*Varronia curassavica* Jacq.) [Dissertação]. Parnaíba: Universidade Federal do Piauí, UFPI; 2018.
35. Lavola A, Maukonen M, Julkunen-Tiitto R. Variability in the composition of phenolic compounds in winter-dormant *Salix pyrolifolia* in relation to plant part and age. *Phytochemistry* 2018; 153: 102-110, doi: 10.1016/j.phytochem.2018.05.021.
36. Szymborska-Sandhu I, Przybył JL, Kosakowska O, Bączek K, Węglarz Z. Chemical Diversity of bastard balm (*Melittis melisophyllum* L.) as affected by plant development. *Molecules* 2020; 25: 2421-32, doi: 10.3390/molecules25102421.

5.2 Produto técnico



“Recomendações para a colheita das folhas de *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J. F. Macbr. (Pau Jacaré)”

Apresentação

Esta cartilha foi elaborada com finalidade de orientar indústrias e outras áreas afins, que busquem no Pau Jacaré, matéria prima para desenvolvimento de produtos e/ou insumos, como por exemplo formulações dermocosméticas, e/ ou medicamentosas. Nela constam informações sobre condições ideais de colheita do material vegetal, como época do ano e dimensão do tronco, visando obter maior concentração de constituintes ativos, com base na concentração de rutina, utilizada como marcador biológico, em árvores da espécie *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J. F. Macbr, na região do Sudeste de Minas Gerais.

Para minimizar variações qualitativas e quantitativas nos compostos bioativos extraídos de espécies vegetais, é extremamente importante desenvolver tecnologias de cultivo ou de manejo sustentável visando o fornecimento de material vegetal de qualidade. Nosso objetivo é repassar estas tecnologias e contribuir para a otimização nos processos de padronização e de produção, e, conseqüentemente, de um produto final com melhores resultados terapêuticos tendo-se em vista a qualidade fitoquímica do material vegetal utilizado.



Introdução

Piptadenia gonoacantha (Mart.) J. F. Macbr. é popularmente conhecida como pau-jacaré, casco-de-jacaré, jacarezeiro, entre outros, é uma espécie arbórea da família Fabaceae nativa do Brasil.

O Pau jacaré é uma árvore pioneira, de fácil adaptação, crescimento rápido, que se dissemina com facilidade, sendo frequentemente utilizada em áreas de reflorestamento e fornecimento de madeira. Todavia, a espécie tem sido alvo de estudos que apontam atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e antibacteriana, que aliados a formulações dermocosméticas, tem se demonstrado um ótimo cicatrizante. Os extratos são ricos em compostos flavônicos, indicando uma promissora atividade biológica que pode alcançar os interesses da indústria farmacêutica e cosmética.

A ação terapêutica das plantas medicinais é atribuída aos metabólitos secundários produzidos frente aos processos bióticos e abióticos. Sabe-se que os metabólitos secundários, e, portanto as propriedades terapêuticas e condimentares, podem ser alteradas devido a diversos fatores como o método de secagem e tratamento pós-colheita do material colhido, época do ano e local de cultivo, refletindo o efeito do meio ambiente sobre a produção dos fármacos. A produção de metabólitos secundários pode variar de acordo com a idade das plantas, o estado reprodutivo, as estações do ano ou horas do dia. O conhecimento do habitat original da planta (as condições edafoclimáticas nas quais se desenvolve bem), da parte da planta utilizada e da época de colheita é de grande importância para o bom desempenho das atividades medicinais.

Dentre os metabólitos secundários, tem-se a rutina, um flavonoide encontrado em várias espécies vegetais, inclusive nas folhas do Pau jacaré. A rutina foi utilizada como marcador químico nas folhas e pecíolos desta espécie, pois pesquisas mostram a atividade antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral, vasodilatadora e citoprotetora deste flavonóide.

Assim, descrevemos o momento ideal para a colheita das folhas de pau jacaré, com base na concentração de rutina, visando uma maior concentração deste constituinte ativo, e conseqüentemente para elaboração de formulações com maior potencial terapêutico, além da otimização dos processos de colheita e produção.

Classificação Taxonômica da espécie ***Piptadenia gonoacantha***

Divisão: Magnoliophyta (Angiospermae)

Classe: Magnoliopsida (Dicotyledonae)

Ordem: Fabales

Família: Fabaceae (Leguminosae)

Sub-família: Mimosoidea

Gênero: *Piptadenia*

Espécie: *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J. F. Macbr.

Variedade: *gonoacantha*

Descrição da *Piptadenia gonoacantha*

A árvore semicaducifólia de médio a grande porte, podendo atingir até 30 m de altura e 90 cm de DAP (diâmetro da altura do peito, 1,30 m do solo) na idade adulta.

Possui copa irregular e tronco reto ou tortuoso. As cristas características por toda extensão dos galhos e do tronco, quando novo, se assemelham a um couro de jacaré, o que lhe confere nomes populares como por exemplo "Pau Jacaré".

Suas flores possuem coloração amarelada e bege, são pequenas e podem ser encontradas reunidas ou solitárias. As folhas são paripinadas e o pecíolo canaliculado com glândula verruciforme. Seu fruto, do tipo vagem tem cerca de 4 a 10 sementes.

Padronização da colheita

Colheita orientada pela época do ano

As variações sazonais exercem influência sobre o conteúdo dos metabólitos secundários, assim é muito importante verificar a época ideal de colheita, visando padronizar um período que promova maior concentração dos compostos bioativos de interesse terapêutico.



As folhas do Pau Jacaré apresentam os maiores teores de rutina no verão ($117,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$), seguida pela primavera ($94,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e outono ($93,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$), com níveis semelhantes. Durante o inverno, a concentração de rutina cai drasticamente, não sendo recomendada a colheita nesta estação do ano.

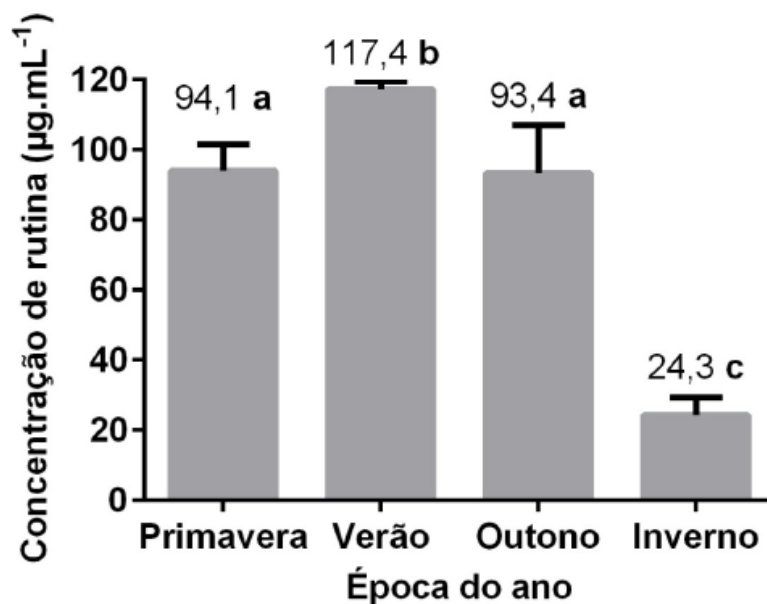
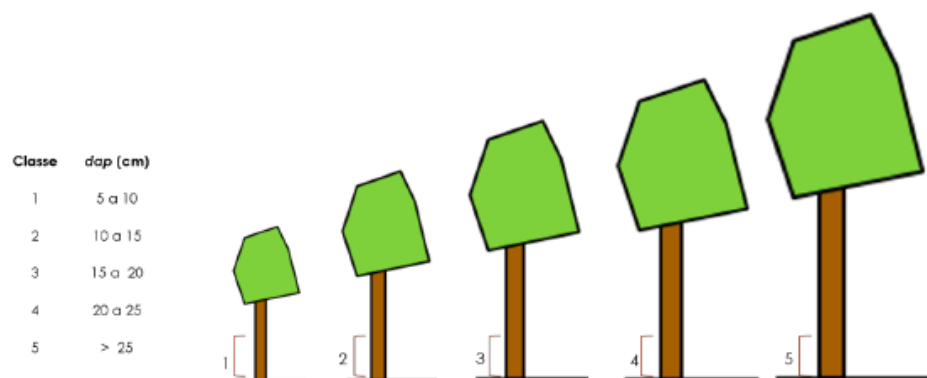


Figura 1 – Concentração de rutina em folhas de *Piptadenia gonoacantha* por época do ano.

Colheita orientada pela dimensão do tronco

O estágio de desenvolvimento da planta também é um fator que pode influenciar o teor de metabólitos secundários. Ao analisarmos o crescimento de uma espécie arbórea, é possível observar incremento do diâmetro. Assim, dimensões diâmetro do tronco pode ser um dos parâmetros adotados para determinar o momento ideal da colheita, visando obter maiores teores de constituintes ativos de interesse.

Utilizando um protocolo de colheita tendo como base a classificação das árvores pelo Diâmetro à Altura do Peito (DAP), podemos classificá-las em: classe 1 (5 a 10 cm), classe 2 (10 a 15 cm), classe 3 (15 a 20 cm), classe 4 (20 a 25 cm) e classe 5 (> 25 cm).



As maiores concentrações de Rutina podem ser encontradas em árvores com DAP acima de 25 cm. Recomendamos assim, a preconização de colheita de material vegetal em árvores com maior diâmetro do tronco

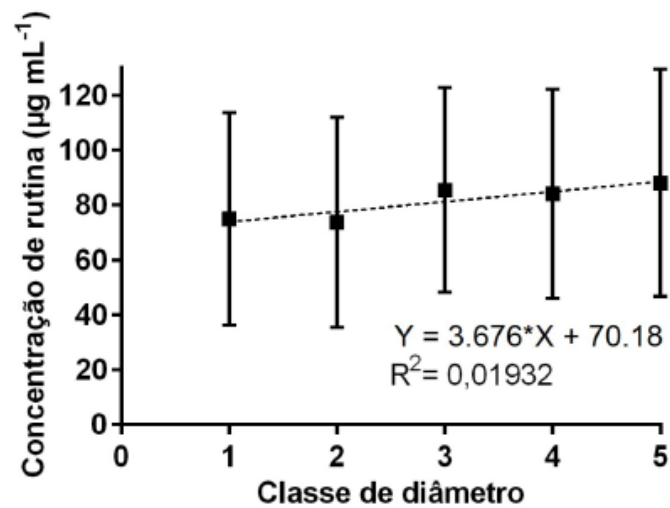


Figura 2 – Correlação entre a concentração de rutina e as classes diamétricas de árvores de *Piptadenia gonoacantha*, onde classe 1 = 5 a 10 cm de dap, classe 2 = 10 a 15 cm de dap, classe 3 = 15 a 20 cm de dap, classe 4 = 20 a 25 cm de dap e classe 5 > 25 cm de dap

Observamos que durante o inverno, o outono e a primavera, a concentração de Rutina tendeu a aumentar em árvores com maiores diâmetros à altura do peito. Enquanto que no verão, o teor de rutina tendeu a se manter constante em todas as classes diamétricas.

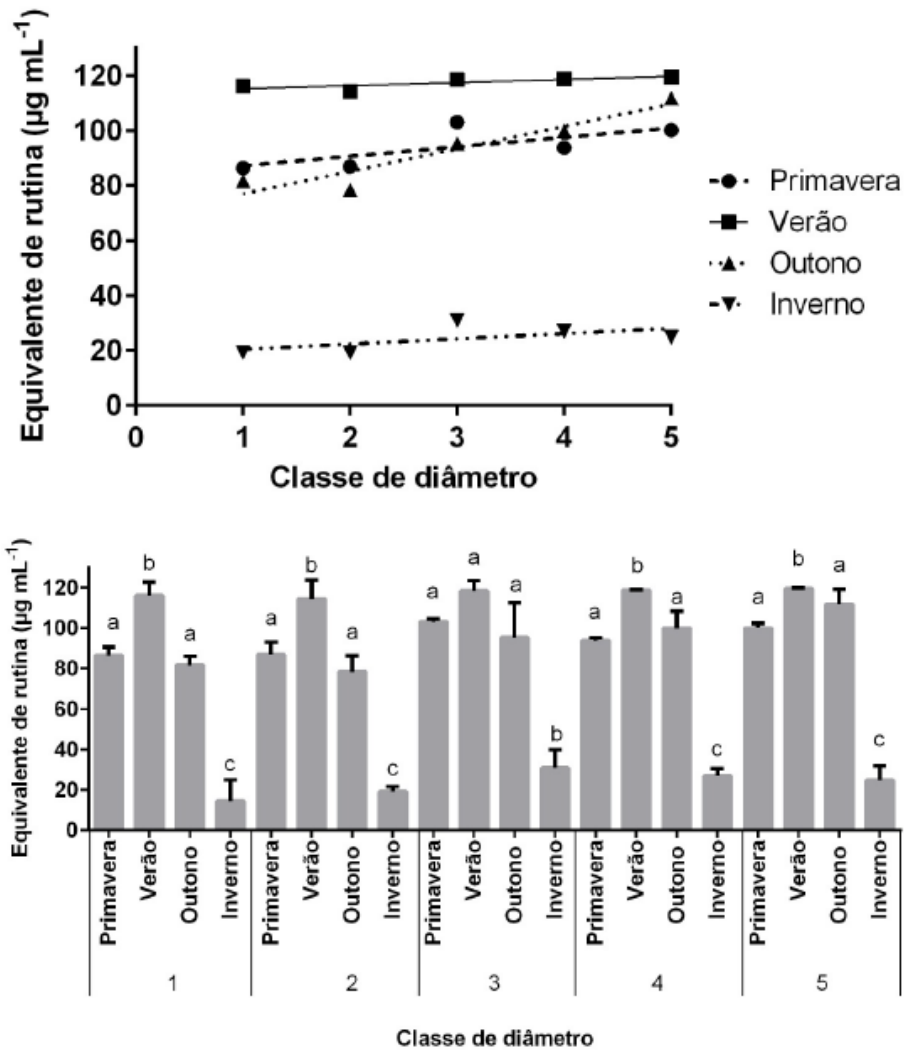


Figura 3 – Nova legenda Relação entre o equivalente rutina ($\mu\text{g mL}^{-1}$) por época do ano e as classes diamétricas de árvores de *Piptadenia gonoacantha*, onde classe 1 = 5 a 10 cm de dap, classe 2 = 10 a 15 cm de dap, classe 3 = 15 a 20 cm de dap, classe 4 = 20 a 25 cm de dap e classe 5 > 25 cm de dap.
*Letras distintas evidenciam diferença estatística entre os grupos analisados



É importante ressaltar que estas informações tiveram origem de estudos realizados na cidade de Viçosa, MG. Outras regiões com condições edafoclimáticas diferentes podem apresentar resultados distintos, e assim são necessárias novas avaliações para determinar as recomendações para outras regiões.

Em conclusão, destacamos que é extremamente importante desenvolver tecnologias de cultivo ou de colheita e manejo sustentável visando o fornecimento de material vegetal de qualidade para desenvolvimento de fitoterápicos, a fim de contribuir para a sua eficácia terapêutica.

Literatura consultada

BROWN JÚNIOR, K. S. Engenharia ecológica: Novas perspectivas de seleção e manejo de plantas medicinais. *Acta Amazonica*, v.18, n.1-2, p.291-303, 1988.

Carvalho CA, Santana GS, Amaro OFM, Franco AJ, Pinto R, Zatti RA, et al. Antinociceptive and Anti-inflammatory Effects of Hydroalcoholic Extract of Leaves of *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) Macbr. in Experimental Animal Models. *Ciê e Nat.* 2014; 36 (II): 775–781. DOI:10.5902/2179460X13555.

Carvalho CA. Caracterização Botânica, Fitoquímica e avaliação da Atividade biológica de extratos de *Piptadenia gonoacantha* (mart.) J.f. macbr (fabaceae). [Dissertação]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2012.

Carvalho PER. Pau-Jacaré - *Piptadenia gonoacantha*. *Cir Téc Embrap.* 2004 dez; 91:12.

COURT, W. A.; ROY, R. C.; POCS, R. Effect of harvest date on the yield and quality of the essential oil of peppermint. *Canadian Journal Plant Science*, v.73, p.815-824, 1993.

CORREA JÚNIOR, C.; MING, L. C.; SCHEFFER, M. C. 1991. Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas. Curitiba: EMATER-PR, 1991, 151p.

REFLORA, Flora do Brasil. 2020. Disponível em: http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/BemVindoConsultaPublicaConsultar.do?invalidatePageControlCounter=24&idsFilhosAlgas=%5B2%5D&idsFilhosFungos=%5B1%2C10%2C11%5D&lingua=&grupo=5&familia=null&genero=Piptadenia&especie=&autor=&nomeVernaculo=&nomeCompleto=&formaVida=null&substrato=null&ocorreBrasil=QUALQUER&ocorrencia=O CORRE&endemismo= TODOS&origem= TODOS®iao=QUALQUER&estado=QUALQUER&ilhaOceanica=32767&domFitogeograficos=QUALQUER&bacia=QUALQUER&vegetacao= TODOS&mostrarAte= SUB ESP_ VAR&opcoesBusca= TODOS_ OS_ NOMES&loginUsuario= Visitante&senhaUsuario=&contexto= consulta-publica

Esta cartilha foi produzida como um dos resultados da pesquisa de Mestrado em Ciências da Saúde, realizado por Cristiane Aparecida de Faria, no período de 2019 a 2021.



Departamento de Enfermagem e Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Material produzido por:

Cristiane Aparecida de Faria
Mestranda em Ciências da Saúde

Coautores

Camilo Amaro de Carvalho
Marcelo Barcellos da Rosa
Haroldo Nogueira de Paiva
Luciana Moreira Lima
Sílvia Almeida Cardoso
Maira Christina Marques Fonseca

Projeto Gráfico e Diagramação

Pedro Duarte



6 CONCLUSÕES

As concentrações de rutina extraídas das folhas e pecíolos secos de *P. gonoacantha* foram maiores no verão, não havendo diferença estatística entre as classes diamétricas para esta estação. Estes períodos são mais favoráveis à colheita de material vegetal.

Para as estações primavera, outono e inverno, o teor de rutina aumentou linearmente com o aumento do diâmetro do tronco, sugerindo que para estas estações, a colheita do material vegetal em árvores com maiores dimensões de tronco seja mais favorável.

O inverno apresentou os menores índices de concentração de rutina, não sendo recomendada a colheita nesta estação do ano.

A padronização da melhor época do ano e classe diamétrica das árvores durante a colheita torna-se essencial para se obter as concentrações ideais dos seus constituintes ativos. Os resultados encontrados neste estudo irão contribuir para a otimização dos processos de produção de produtos e/ou insumos, como por exemplo formulações dermocosméticas e/ou medicamentosas por indústrias que visarem a *P. gonoacantha* como matéria prima para suas formulações. Portanto, seguindo esta metodologia, empresas farmacêuticas poderão obter melhores resultados com sua terapia ao alcançar um produto final com melhores resultados terapêuticos tendo-se em vista a qualidade fitoquímica do material vegetal utilizado.

7 REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Formulário de Fitoterápicos: Farmacopeia Brasileira. Brasília, 10 de mai 2018. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/formulario-fitoterapico>>. Acesso em: 03 dez. 2019.

BADKE, Marcio et al. Panorama brasileiro dos serviços de plantas medicinais e fitoterápicos. **Revista de Enfermagem da UFSM**. Rio Grande do Sul (Santa Maria), v. 9, e. 64, p. 1-19, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.5902/2179769233655>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

BERNAL, M et al. Altitudinal and seasonal changes of phenolic compounds in *Buxus sempervirens* leaves and cuticles. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 70, p. 471-482, set 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.06.012>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

BOUDERIAS, Sakina et al. Age- and season-dependent pattern of flavonol glycosides in Cabernet Sauvignon grapevine leaves. **Scientific Reports**. v. 10, n. 14241 (2021), 28 ago. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-020-70706-7>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

CARVALHO, Camilo Amaro et al. Aspectos químicos e atividade antibacteriana de *Piptadenia gonoacantha* (FABACEAE). **Ciência e Natura**, v. 36, p. 731-744, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.5902/2179460X13456>> Acesso em: 01 out. 2021

CARVALHO, M. G.; CARDOZOI, M. A. R.; CATUNDA JUNIOR, F. E. A.; CARVALHO, A. G. Chemical constituents of *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J.F. Macbr (pau jacaré). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. Rio de Janeiro. v.82, n.3, pp. 561-567, 2010.

FERREIRA, Eberto Tibúrcio et al. A utilização de plantas medicinais e fitoterápicos: uma revisão integrativa sobre a atuação do enfermeiro. **Braz. J. Hea. Rev.** Paraná (Curitiba), v. 2, n. 3, p. 1511-1523, may./jun. 2019. Disponível em: <<https://www.brazilianjournals.com/index.php/BJHR/article/view/1383/1260>> Acesso em: 26 jun. 2021.

GHORBANI, Ahmad. Mechanisms of antidiabetic effects of flavonoid rutin. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. Iran (Mashhad), v. 96, p. 305-312, dez. 2017. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.001>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

GULLÓN, B et al. Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability. **Trends in Food Science & Technology**. V. 67, p. 220-235, sep. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.07.008>> Acesso em: 01 out. 2021.

HEINRICH, M. Quality and safety of herbal medical products: regulation and the need for quality assurance along the value chains. **Br J Clin Pharmacol**. Reino Unido

(Londres), v. 80(1), p. 62-66, jan. 2015. <Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4500325/pdf/bcp00800062.pdf>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

PATIL V, M; MASAND N. Anticancer potential of flavonoids: chemistry, biological activities, and future perspectives. **Studies in Natural Products Chemistry**. India (Uttar Pradesh), v. 59, p. 401–430. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64179-3.00012-8>>. Acesso em: 26 jun 2021.

PEDRIALI, C. A., Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes. 2005. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

TINTINO, S. R. et al. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana e moduladora dos extratos etanólico e hexânico de bulbo de *Costus arabicus*. **Biosci. J.** Uberlândia, v. 29, n. 3, p. 732-738, Mai/Jun 2013. Disponível em: <<http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/14564/12544>>. Acesso em: 26 jun 2021.

VERRI W, A et al. Flavonoids as anti-inflammatory and analgesic drugs: mechanisms of action and perspectives in the development of pharmaceutical forms. **Studies in Natural Products Chemistry**. v. 36, p. 297–330, mai 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53836-9.00026-8>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

YANG L et al. Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors. **Molecules**. China (Ningbo), v. 23(4), n. 762, mar 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/molecules23040762>>. Acesso em: 26 jun 2021.

ZHANG, Junhua, et al. Quality of herbal medicines: Challenges and solutions. **Complementary Therapies in Medicine**. China (Tianjin) v. 20 (1-2), p. 100-106, fev/abr 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ctim.2011.09.004>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

ANEXO A - Comprovante de submissão à revista científica

11758 - Submission of New Paper to BJMBR



Journal Office <onbehalfof@manuscriptcentral.com

>



Dom, 18/07/2021 21:05

Para: Você

Cc: Você

18-Jul-2021

Dear Dr. Faria,

Your manuscript entitled "EFEITO DA SAZONALIDADE E CLASSE DIAMÉTRICA SOBRE O TEOR DE RUTINA EM <i>Piptadenia gonoacantha </i> (Mart.) J. F. Macbr. (FABACEAE)" will be sent to the editor of the Brazilian Journal.

You may check on the status of this manuscript by selecting the "Author Center" link under the following URL:

<https://mc04.manuscriptcentral.com/bjmb-br-scielo>

(Press/Click on the above link to be automatically sent to the web page.)

Thank you for submitting your paper to the Brazilian Journal of Medical and Biological Research.

Sincerely,

Journal Office
Brazilian Journal of Medical and Biological Research