
ESTUDO FITOQUÍMICO, ATIVIDADES QUÍMICA E ANTIOXIDANTE DE CAULE E FOLHAS DE *Clethra scabra Pers.*

PHYTOCHEMICAL STUDY, CHEMICAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF STEM AND LEAVES OF *Clethra scabra Pers.*

Gisele Joslin de Almeida Ferreira Mendes¹; Maria Madalena Gabriel¹; Luciane Dalarmi¹; Idonilton da Conceição Fernandes^{1*}; Vinícius Bednarczuk de Oliveira³; Isadora Dallarmi Miguel² Elisiane Bona Sartor¹, Josiane Gaspari Dias¹, Obdulio Gomes Miguel¹; Deise Prehs Montrucchio¹; Marilis Dallarmi Miguel¹

1 - Universidade Federal do Paraná, Setor de Saúde, Departamento de Farmácia, Grupo de pesquisa em Produtos Naturais, Curitiba, Paraná, Brasil.

2 - Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná, Curitiba, Paraná.

3 - Centro Universitário Internacional-UNINTER, Curitiba, Paraná, Brasil

RESUMO:

Clethra scabra Pers. é uma espécie pertencente à família Clethraceae. É nativa do Estado do Paraná e é encontrada no Brasil desde a Bahia até os estados das regiões Sul e Sudeste, estando presente tanto na Caatinga como na Floresta Atlântica. É conhecida popularmente como carne-de-vaca e caujuja. Objetivou-se neste trabalho a investigação da composição fitoquímica, a avaliação do potencial tóxico, hemolítico, alelopático, antimicrobiano e o estudo da atividade antioxidante. Analisou-se a constituição química por CLAE e RMN, a atividade alelopática sobre sementes de *Lactuca sativa*, a toxicidade sobre *Artemia salina* e por teste de hemólise, a atividade antimicrobiana por CIM e as atividades antioxidantes pelo ensaio de fosfomolibdênio e redução do radical DPPH-. Resultados indicaram através de análise de CLAE e RMN a presença dos flavonóis Quercetina e Rutina. Verificou-se determinada capacidade bioestimulante para *Clethra scabra* através da atividade alelopática, ausência de toxicidade frente a *Artemia salina*, bem como não apresentou efeito citotóxico em glóbulos vermelhos. Apresentou atividade antimicrobiana moderada contra *C. albicans*. Com relação a atividade antioxidante pelos testes utilizados, a FAF apresentou melhor resultado. Os resultados obtidos fazem da espécie *Clethra scabra* um excelente alvo de estudos para aprofundar e comprovar suas atividades biológicas, podendo a atividade antioxidante ser explorada também, pela indústria farmacêutica, cosmecêutico e alimentícia.

Palavras-chave: *Clethra scabra*, Clethraceae, fitoquímica, alelopatia, toxicidade

ABSTRACT:

Clethra scabra Pers. is a species belonging to the Clethraceae family. It is native to the State of Paraná and is found in Brazil from Bahia to the states of the South and Southeast regions, being present in both the Caatinga and the Atlantic Forest. It is commonly known as carne-de-vaca and caujuja. This study aimed to investigate the phytochemical composition, and evaluate the toxic, hemolytic, allelopathic, antimicrobial potential, and antioxidant activity of the species. The chemical constitution was analyzed by HPLC and NMR, the allelopathic activity on *Lactuca sativa* seeds, toxicity on *Artemia salina* and hemolysis test, antimicrobial activity by MIC, and antioxidant activities by the phosphomolybdenum assay and DPPH-radical reduction were evaluated. Results indicated the presence of the flavanol's Quercetin and Rutin through HPLC and NMR analysis. A certain biostimulant capacity for *Clethra scabra*

was verified through allelopathic activity, absence of toxicity against *Artemia salina*, and no cytotoxic effect on red blood cells. It showed moderate antimicrobial activity against *C. albicans*. Regarding antioxidant activity by the tests used, the phosphomolybdenum assay presented the best result. The results obtained make the species *Clethra scabra* an excellent target for studies to deepen and prove its biological activities, with antioxidant activity also potentially exploitable by the pharmaceutical, cosmeceutical, and food industries.

Keywords: *Clethra scabra*, Clethraceae, phytochemistry, allelopathy, toxicity

1. INTRODUÇÃO

Clethra scabra Pers., é uma espécie pertencente à família Clethraceae, são árvores que apresentam caducifolia total durante o final do período seco (SIMÕES et al., 2007), presentes desde a Bahia até todos os estados das regiões Sul e Sudeste, sendo pioneira na formação de florestas e estando entre as 20 espécies de maior incidência nos três estados do Sul (PERDIZ; GIULIETTI; OLIVEIRA, 2015).

O nome *scabra* origina-se do latim: áspero, rugoso, escabro. Popularmente é conhecida como: carne de vaca na região sudeste devido à cor da madeira por parecer com a coloração das carnes bovinas que é avermelhada, e como caujuja na região sul (BIONDI; LEAL, 2009). Cerca de 30% dos medicamentos atualmente disponíveis tem derivação direta ou indireta de produtos naturais, especialmente de plantas (SILVA; FRANCO, 2010). A demanda por novas moléculas bioativas ainda é crescente para suprir a necessidade por tratamento da evolução de diversas patologias (PAULA, 2014). Com isto, estudos fitoquímicos e toxicológicos que envolvam métodos simples, sensíveis, práticos e confiáveis, tornam-se indispensáveis nesta busca, que visa a identificação preliminar de plantas com potencial efeito tóxico, permitindo a redução dos animais utilizados na experimentação (BEDNARCZUK et al., 2010).

Vale ressaltar que muitas substâncias químicas presentes nos vegetais podem levar ao surgimento de efeitos de grande interesse científico, para serem utilizados na medicina popular para o tratamento e diversas doenças. A espécie *Clethra scabra* é uma planta nativa do Paraná e não possui nenhum estudo químico e de suas atividades biológicas. Diante do exposto, objetivou-se neste trabalho a identificação dos compostos químicos presentes na espécie *Clethra scabra*, o estudo do potencial alelopático, a avaliação da toxicidade preliminar e da capacidade antioxidante.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material botânico

As folhas e caule da espécie *Clethra scabra* foram coletadas em março de 2016 no município de Curitiba. A exsicata encontra-se depositada no Museu Botânico Municipal de Curitiba-Pr, sob registro MBM-075916. O material vegetal foi seco em temperatura ambiente e posteriormente reduzido em moinho de facas/martelo.

2.2 Obtenção dos extratos e frações de caule e folhas e separação de compostos

Os solventes e reagentes utilizados apresentaram grau de pureza analítico. O extrato bruto etanólico (EB) foi obtido pela submissão das folhas (secas e estabilizadas) à extração etanólica (etanol 96% por 6 horas) em aparelho de Soxhlet e posterior concentrado até redução a 1/5 de seu volume. O EB foi fracionado em aparelho de Soxhlet modificado (CARVALHO et al., 2009), com solventes em ordem crescente de polaridade, obtendo-se a fração hexano (FH), fração clorofórmio (FC), fração acetato de etila (FA) e fração hidroalcoólicas remanescente (FR).

Após a obtenção das frações hexano e acetato de etila das folhas e caule de *Clethra scabra*, foram realizadas colunas cromatográficas utilizando como fase estacionária sílica gel e fase móvel a mistura de solventes em escala crescente de polaridade.

2.3 Análise dos constituintes dos extratos e frações

Testes convencionais em análise fitoquímica foram realizados para verificar a presença de cumarinas, flavonoides, taninos, antraquinonas, saponinas e alcaloides visando à caracterização de metabólitos secundários (SIMÕES et al., 2007).

Para a verificação do perfil da amostra, foi utilizado cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O frasco 4 do processo de separação e isolamento em coluna de sílica gel da fração acetato de etila da folha (FAF 4) foi diluída em MeOH a uma concentração de 20,00 mg. mL⁻¹ e submetida à análise por CLAE Merck Hitachi – Elite Lachrom, com detector diodo (DAD) em 295 nm, coluna XTerra® RP18 5 µm, 4,6x250 mm, volume de injeção de 20 µL, fluxo 1,00 mL min⁻¹. Como fase móvel foi utilizado gradiente de concentração o sistema H₂O:H₃PO₄ a 0,1% (A) e MeOH (B) na seguinte programação: 1-

45 min, iniciando com 10% de fase B e finalizando em 45 min com 100% de fase B. O MeOH utilizado foi grau HPLC (TEDIA) e a água MilliQ.

2.4 Identificação dos constituintes químicos separados

Para a identificação das substâncias obtidas no processo de separação, utilizou a metodologia de espectroscopia de ressonância magnética nuclear, observando os núcleos de ^1H à 200 MHz em espectrofotômetro Brucker® modelo DPX. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm em relação ao sinal do TMS (tetrametilsilano) em 0 ppm. O solvente utilizado na espectroscopia de RMN de ^1H foi DMSO deuterado. Baseado nos dados espectrais de RMN a identificação de todas as substâncias foi realizada por comparação destes com dados disponíveis na literatura.

2.5 Avaliação do potencial herbicida por meio da atividade alelopática

O ensaio alelopático foi determinado conforme (FERREIRA; AQUILA, 2000), com modificações. Foram utilizados o extrato bruto etanólico e respectivas frações nas concentrações de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ preparadas em metanol, e sementes de *Lactuca sativa*, variedade "Baba de Verão". Para o tratamento controle da germinação e crescimento, foi utilizado água destilada e metanol sob as mesmas condições. Para verificação da germinação, procedeu-se leitura diária por sete dias com a retirada das sementes germinadas. As sementes foram consideradas germinadas quando se tornou visível a protrusão da radícula através do tegumento conforme descrito por (ADEGAS; VOLL; PRETE, 2003). A abertura das caixas gerbox se procedeu em fluxo laminar. Calculou-se o índice de velocidade de germinação segundo (MAGUIRE, 1962), e os dados submetidos ao Teste de Tukey $p < 0,05$ (FERREIRA, 2014). O mesmo procedimento foi adotado para verificar o crescimento das plântulas, e os comprimentos de hipocótilo e radícula foram avaliados após 7 dias de incubação.

2.6 Ensaio de toxicidade preliminar

2.6.1 Avaliação da toxicidade em *Artemia salina*

O ensaio foi realizado de acordo com (MEYER et al., 1982a), com modificações.

Os cistos de *Artemia salina* L. (200mg/400ml) foram incubados em água de mar artificial (38g de sais marinhos em 1.000 mL de água purificada), e mantidos sob aeração e iluminação por 48h. Após a eclosão dos ovos, 10 nauplios de *A. salina* L. foram transferidos para tubos contendo diferentes concentrações das substâncias para avaliação, que foram solubilizados em água de mar artificial. Foi utilizado como controle positivo o sulfato de quinidina nas mesmas concentrações que as amostras, e como controle negativo o metanol, todos nas mesmas condições. Após 24 h, os náuplios vivos e mortos foram contados. Os dados foram analisados através do método estatístico Probitos com 95% de intervalos de confiança, para determinar os valores CL50. As frações foram consideradas tóxicas quando CL50 menor que 1000 µg.mL⁻¹(MEYER et al., 1982a)

2.6.2 Avaliação da toxicidade hemolítica

O ensaio foi realizado segundo (ASLAM et al., 2011). Os eritrócitos de ovinos foram obtidos comercialmente (Newprov) e lavados com soro fisiológico fosfato (PBS). Após, preparou-se uma suspensão a 2% (v/v) de glóbulos vermelhos em PBS. As soluções padrão de 1000 µg.mL⁻¹, foram preparadas em metanol, e sequencialmente, nas concentrações 500 µg.mL⁻¹, 200 µg.mL⁻¹ e 100 µg.mL⁻¹ em PBS. Como padrão negativo foram preparadas amostras de Rutina e BHT (em PBS) e como padrão positivo foi utilizado a Saponina (em água purificada) nas mesmas concentrações que as amostras e o Triton 0,1%. Também foi utilizado como controle negativo o metanol e PBS.

Para cada concentração de amostra, foram colocados 200 µL da suspensão a 2% de glóbulos vermelhos e 200 µL da solução da amostra em tubos Eppendorf. Foram homogeneizadas e incubadas por 30 minutos a 37°C, e após colocados em banho de gelo por 5 minutos, sendo então centrifugados a 3000 rpm por mais 5 minutos. Foram transferidos 100 µL de sobrenadante de cada amostra e misturados em 900 µL de PBS gelado. Destes foram transferidos 200 µL para microplaca de 96 poços. A absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro a 576 nm. A porcentagem de hemólise foi calculada de acordo com a equação:

$$\% \text{ hemólise} = (\text{AbsA} / \text{AbsT}) * 100$$

Onde, Abs A = absorbância da amostra e Abs absorvância do triton

2.7 Avaliação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo, com determinação da concentração inibitória mínima (CIM) ((CLSI), 2015). O intervalo de concentração variou de 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a 8000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Os solventes utilizados foram água purificada, metanol e DMSO.

Foi realizada diluição seriada em caldo *Mueller-Hinton* (CMH) distribuídos em microplacas estéreis de 96 cavidades. Os microrganismos utilizados foram as cepas de referência *American Type Culture Collection* (ATCC): incluíram *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Candida albicans*, preparadas em solução salina fisiológica na concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL, equivalente 0.5 da escala de *McFarland*. Posteriormente, foram diluídas em CMH e utilizadas a uma concentração final de 10⁴ UFC/mL. As microplacas foram incubadas a 35°C por 24h, e realizada a leitura da absorbância das amostras em leitora de ELISA a 625 nm. A CIM foi determinada através da equação:

Cálculo do Percentual de Inibição (PI) utilizando a fórmula: $PI = (mAT \cdot 100 / mAC) - 100$.

Onde, mAT = média das absorbâncias do Teste (Absorbância do Teste – Absorbância do Branco) da reação e mAC = média das absorbâncias do Controle positivo.

2.8 Avaliação das atividades antioxidantes

2.8.1 Formação do Complexo Fosfomolibdênio

A atividade antioxidante por meio do método da redução do complexo fosfomolibdênio foi realizada conforme metodologia descrita por (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999). A amostra e as soluções padrões (Ácido ascórbico, rutina e BHT) foram preparadas na concentração de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em metanol. Destas alíquotas de 0,3 mL foram adicionadas a 3 mL do reativo de fosfomolibdênio (fosfato de sódio tribásico 0,1 M (28 mL), solução de molibdato de amônio tetraidratado 0,03 M (12 mL), ácido sulfúrico 3 M (20 mL) e água qsp. 100 mL). Os tubos foram fechados e levados ao banho à 95°C por 90 min e deixados resfriar em temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram transferidas para microplacas de 96 poços e a leitura das absorbâncias obtidas a 695 nm,

em espectrofotômetro Multiskan FC, *ThermoScientific*®.

A capacidade antioxidante das amostras foi expressa em atividade antioxidante relativa (AAR%), em relação aos padrões, utilizando-se a seguinte equação: $AAR\% = [(Absorbância\ da\ amostra - absorbância\ do\ branco) / (absorbância\ do\ padrão - absorbância\ do\ branco)] \times 100$. A análise estatística dos dados foi realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

2.8.2 Atividade antioxidante pelo sequestro do radical DPPH.

O potencial sequestrante do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) do óleo essencial das partes aéreas de *C. scabra* foi determinado por meio de metodologia adaptada (DOS SANTOS et al., 2007; MENSOR et al., 2001; NASCIMENTO et al., 2011), em 7 concentrações que variaram de 2 µg/mL a 1000 µg/mL. Como controle positivo utilizou-se Rutina e ácido ascórbico.

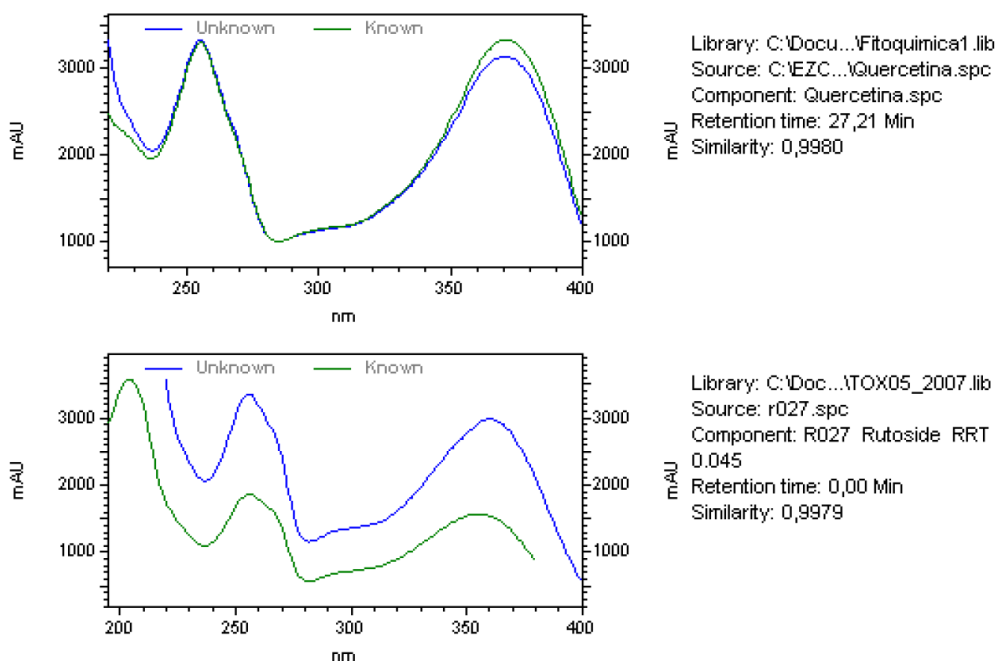
No ensaio foram adicionados 142 µL da amostra e 58 µL da solução de radical DPPH (0,3mM) em microplacas de 96 poços. Como branco utilizou-se amostra e metanol, e para o controle negativo, metanol e radical DPPH. Após 30 min. de incubação as absorbâncias foram lidas a 518 nm em espectrofotômetro Multiskan FC, *ThermoScientific*®. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição conforme a seguinte equação: $\% \text{ de Inibição} = 100 - [(Absorbância\ da\ amostra - absorbância\ do\ branco) / absorbância\ do\ padrão] \times 100$. O cálculo do CE50 foi realizado a partir de uma curva analítica, por meio da equação da reta e a estatística avaliada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS

Estudos fitoquímicos realizados com a espécie indicaram a presença de Leucoantocianidinas, heterosídeos (flavônicos, antocianicos e saponínicos), substâncias iridóides, cumarinas, além de esteróides/triterpenos, e taninos condensados.

Em *Clethra barbinervis* (MURATA et al., 2013) identificaram sete novas saponinas triterpênicas, das quais algumas foram reveladas como inibidores da hialuronidase, representando possível presença de substâncias com potencial para atividades farmacológicas em *Clethra scabra*.

Através da análise de CLAE, foram observados dois picos cromatográficos, ambos representando espectros de ultravioleta similares a espectro de flavonóides, que comparados com os padrões presentes na biblioteca do equipamento, verificou similaridade com padrão quercetina e padrão rutoside, conforme pode ser visualizado na FIGURA 1.

FIGURA 1 - ESPECTRO DE UV DA AMOSTRA FAF 4 *Clethra scabra* Pers.

Pela análise dos espectros de RMN ^1H e por comparação destes com os dados encontrados na literatura por (NAPOLITANO et al., 2012), a mistura de substâncias foram identificadas como sendo os flavonóides Quercetina e Rutina conforme TABELA 1.

TABELA 1 - COMPARAÇÃO DOS DADOS DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN ^1H (200 MHZ EM DMSOD6) DE QUERCETINA E RUTINA COM OS DADOS DA LITERATURA Napolitano et al. (2012) DO FRASCO FAF 4

Posição	RMN de ^1H	Literatura RMN de ^1H (Quercetina)	RMN de ^1H	Literatura RMN de ^1H (Rutina)
6	6.18 (1H, d, J=2,0Hz)	6.18 (1H, d, J=2,0Hz)	6.19 (1H, d, J=2,0Hz)	6.19 (1H, d, J=2,0Hz)
8	6.41 (1H, d, J=2,0Hz)	6.43 (1H, d, J=2,0Hz)	6.41 (1H, d, J=2,0Hz)	6.38 (1H, d, J=2,0Hz)
2	7.67 (1H, d, J=2,1Hz)	7.69 (1H, d, J=2,2Hz)	7.53 (1H, d, J=2,2Hz)	7.53 (1H, d, J=2,1Hz)
5	6.90 (1H, d, J=8,4Hz)	6.92 (1H, d, J=8,5Hz)	6.88 (1H, d, J=8,4Hz)	6.84 (1H, d, J=8,4Hz)
6	7.54 (1H, dd, J= 8,4; 2,1Hz)	7.53 (1H, dd, J= 8,5; 2,1Hz)	7.53 (1H, dd, J= 8,4; 2,1Hz)	7.53 (1H, dd, J= 8,4; 2,1 Hz)
3	9.63 (OH, s)	9.60 (OH, s)	-	-
5	12.50 (OH, s)	12.52 (OH, s)	12.72 (OH, s)	12.60 (OH, s)
7	10.85 (OH, s)	10.78 (OH, s)	10.85 (OH, s)	10.82 (OH, s)
3	9.35 (OH, s)	9.31 (OH, s)	9.63 (OH, s)	9.67 (OH, s)
4	9.41 (OH, s)	9.37 (OH, s)	9.35 (OH, s)	9.18 (OH, s)

d=dubleteo; dd=duplodubleteo; s=singleteo; J=constante de acoplamento

Reporta-se em literatura, o isolamento de quercetina e rutina na espécie *Clethra arborea* Aiton, também do gênero *Clethra*, nativa para a Ilha da Madeira/ Portugal (MARTÍNEZ; GOUVEIA; CASTILHO, 2015). A capacidade de germinação (TABELAS 2 e 3) das sementes de *Lactuca sativa* não foi afetada em nenhuma das concentrações. Tal fato, é explicado devido a germinação ser menos sensível aos metabólitos secundários do que o crescimento das plântulas, podendo estar relacionado a outro parâmetro (FERREIRA; AQUILA, 2000). Também é possível verificar a ausência de influência no índice de velocidade de germinação (IVG) das sementes de *Lactuca sativa*. No entanto, diante do extrato bruto, frações hexano e remanescente do caule evidenciam-se diferenças estatísticas no IVG das sementes de *Lactuca sativa* em comparação ao controle, em que apresentaram menor IVG.

TABELA 2 - ATIVIDADE ALELOPÁTICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE FOLHA DE *Clethra scabra* Pers.

AMOSTRA	µg/mL	Hipocótilo (mm)		Radícula (mm)		%Germinação		IVG	
EBF	25	33,30±6,70	a	40,38±6,71	c	100±0,00	a	4,87±0,25	a
EBF	50	33,53±5,86	a	38,40±8,29	a	100±0,00	a	4,87±0,25	a
EBF	100	38,00±3,78	a	36,55±7,51	a	100±0,00	a	4,50±0,70	a
EBF	200	38,70±7,52	a	32,95±6,77	a	95±0,50	a	4,37±0,62	a
EBF	500	46,73±4,68	e	33,60±5,53	a	100±0,00	a	4,75±0,50	a
FHF	25	35,44±5,44	a	37,78±8,69	a	100±0,00	a	4,87±0,25	a
FHF	50	39,15±4,62	b	39,50±6,12	b	100±0,00	a	4,75±0,28	a
FHF	100	35,22±3,75	a	38,77±4,58	a	90±0,57735	a	4,25±0,64	a
FHF	200	34,89±4,33	c	31,21±8,31	a	100±0,00	a	5,00±0,00	a
FHF	500	38,40±5,51	a	35,50±6,46	a	100±0,00	a	4,00±0,70	a
FCF	25	31,76±5,92	a	34,17±6,93	a	100±0,00	a	4,87±0,25	a
FCF	50	37,62±5,13	a	33,56±6,59	a	90±0,57735	a	4,33±0,23	a
FCF	100	36,65±4,71	a	35,70±4,28	a	95±0,50	a	4,16±1,35	a
FCF	200	38,00±4,85	a	34,15±8,76	a	100±0,00	a	5,00±0,00	a
FCF	500	38,18±3,88	a	30,25±9,11	a	90±0,57735	a	4,00±0,00	a
FAF	25	40,05±4,73	b	36,83±6,43	a	100±0,00	a	4,87±0,25	a
FAF	50	38,52±4,00	a	34,52±3,42	a	100±0,00	a	4,87±0,25	a
FAF	100	38,52±10,10	a	38,38±7,61	a	100±0,00	a	4,20±0,24	a
FAF	200	39,28±7,94	b	35,84±6,22	a	100±0,00	a	4,33±0,23	a
FAF	500	40,68±4,00	c	34,42±5,03	a	100±0,00	a	4,50±0,40	a
FRF	25	37,31±4,35	a	34,84±5,80	a	100±0,00	a	4,87±0,25	a
FRF	50	39,43±6,52	b	38,81±4,41	b	100±0,00	a	4,75±0,28	a
FRF	100	36,95±3,91	a	38,85±5,47	b	100±0,00	a	4,87±0,25	a
FRF	200	38,77±3,87	a	35,38±5,32	a	100±0,00	a	4,58±0,55	a
FRF	500	42,46±8,67	d	33,20±8,22	a	100±0,00	a	4,62±0,47	a
METANOL	-	36,94±9,87	a	34,60±6,09	a	100±0,00	a	4,75±0,28	a
ÁGUA	-	36,38±7,05	a	35,55±9,42	a	100±0,00	a	4,50±0,40	a

Resultados expressos em média aritmética e desvio padrão. Letras minúsculas iguais não representam diferença estatística a nível de significância $p < 0.05$. IVG= Índice de velocidade de germinação. EBF=Extrato Bruto da folha, FHF=Fração Hexano da folha, FCF=Fração Clorofórmio de folha, FAF=Fração Acetato de Etila da folha, FRF=Fração Hidroalcoólicas Residual de folha.

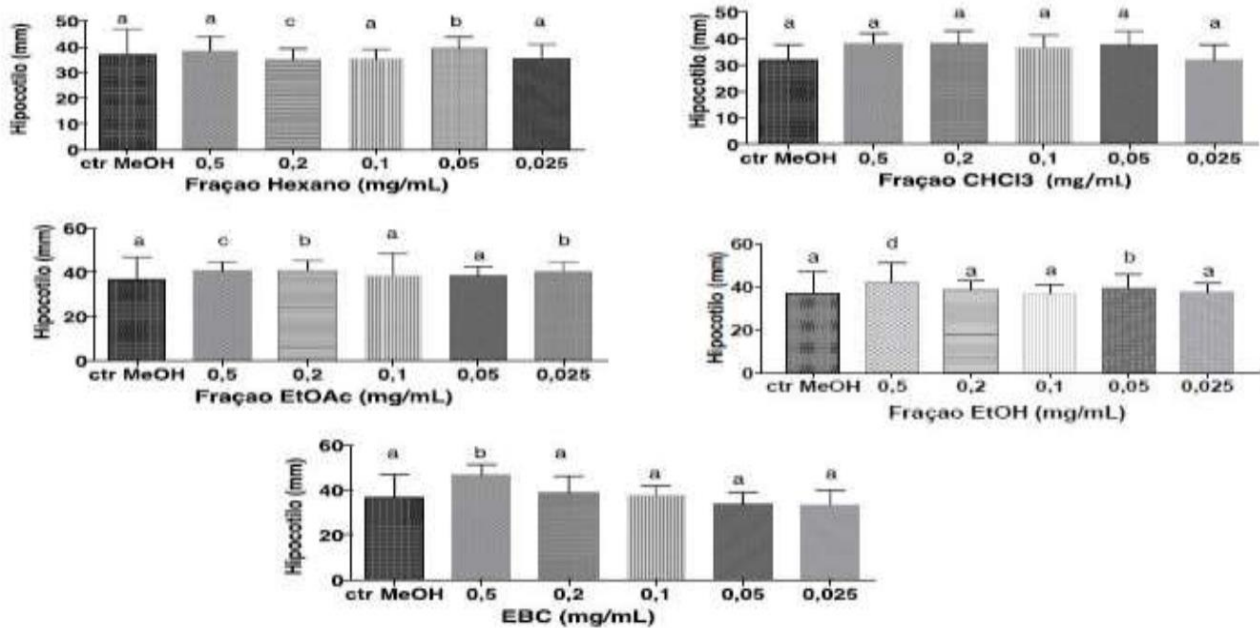
TABELA 3 - ATIVIDADE ALELOPÁTICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE CAULE DE *Clethra scabra* Pers.

AMOSTRA	µg/mL	Hipocótilo (mm)	Radícula (mm)	%Germinação	IVG
EBC	25	40,11±6,04 a	39,36±7,07 a	100±0,00 a	4,75±0,28 c
EBC	50	45,04±13,03 c	48,75±15,1 d	100±0,00 a	4,87±0,25 e
EBC	100	47,57±14,69 d	50,62±10,7 e	100±0,00 a	5,00±0,00 e
EBC	200	51,71±7,74 e	55,33±10,9 f	95±0,50 a	4,16±0,78 a
EBC	500	52,37±4,87 f	57,41±5,53 f	100±0,00 a	4,33±0,70 a
FHC	25	39,89±3,93 a	37,90±5,95 a	100±0,00 a	4,83±0,33 d
FHC	50	36,72±9,76 a	38,67±6,83 a	95±0,50 a	4,62±0,47 b
FHC	100	36,56±9,67 a	43,20±6,83 b	90±0,57 a	5,00±0,00 e
FHC	200	33,33±12,49 a	34,61±10,3 a	100±0,00 a	4,70±0,34 c
FHC	500	34,67±8,77 a	32,81±6,78 a	100±0,00 a	3,00±0,81 a
FCC	25	41,23±4,00 b	43,13±5,84 b	100±0,00 a	3,00±0,57 a
FCC	50	37,22±10,54 a	43,04±8,21 b	100±0,00 a	3,41±0,28 a
FCC	100	35,63±8,96 a	41,85±7,00 a	95±0,50 a	2,91±0,58 a
FCC	200	36,71±7,36 a	37,19±8,73 a	100±0,00 a	3,37±0,85 a
FCC	500	31,52±9,41 a	35,87±4,76 a	90±0,57 a	3,37±0,62 a
FAC	25	37,84±9,86 a	40,37±7,43 a	100±0,00 a	3,87±0,62 a
FAC	50	36,11±9,78 a	44,68±7,63 c	100±0,00 a	4,00±0,57 a
FAC	100	38,77±6,09 a	42,73±6,80 b	100±0,00 a	3,25±0,5 a
FAC	200	39,51±3,53 a	40,10±6,93 a	95±0,50 a	3,62±0,62 a
FAC	500	34,73±4,94 a	40,48±8,91 a	100±0,00 a	3,37±0,75 a
FRC	25	37,44±9,83 a	39,93±6,29 a	95±0,50 a	4,62±0,47 b
FRC	50	37,74±11,29 a	36,12±7,23 a	100±0,00 a	4,5±0,40 b
FRC	100	36,57±5,23 a	36,78±6,12 a	100±0,00 a	4,25±0,86 a
FRC	200	37,03±5,30 a	44,18±7,33 b	100±0,00 a	4,87±0,25 e
FRC	500	38,61±5,89 a	40,85±6,62 a	100±0,00 a	5,00±0,00 e
METANOL	-	29,99±13,38 a	36,11±9,98 a	95±0,50 a	4,08±0,44 a
AGUA	-	29,84±12,77 a	36,15±9,50 a	100±0,00 a	4,415±0,48 a

Resultados expressos em média aritmética e desvio padrão. Letras minúsculas iguais não representam diferença estatística a nível de significância $p < 0.05$. IVG= Índice de velocidade de germinação. EBC=Extrato Bruto de caule, FHC=Fração Hexano de caule, FCC=Fração Clorofórmio de caule, FAC=Fração Acetato de Etila de caule, FRC=Fração Hidroalcoólica Residual de caule.

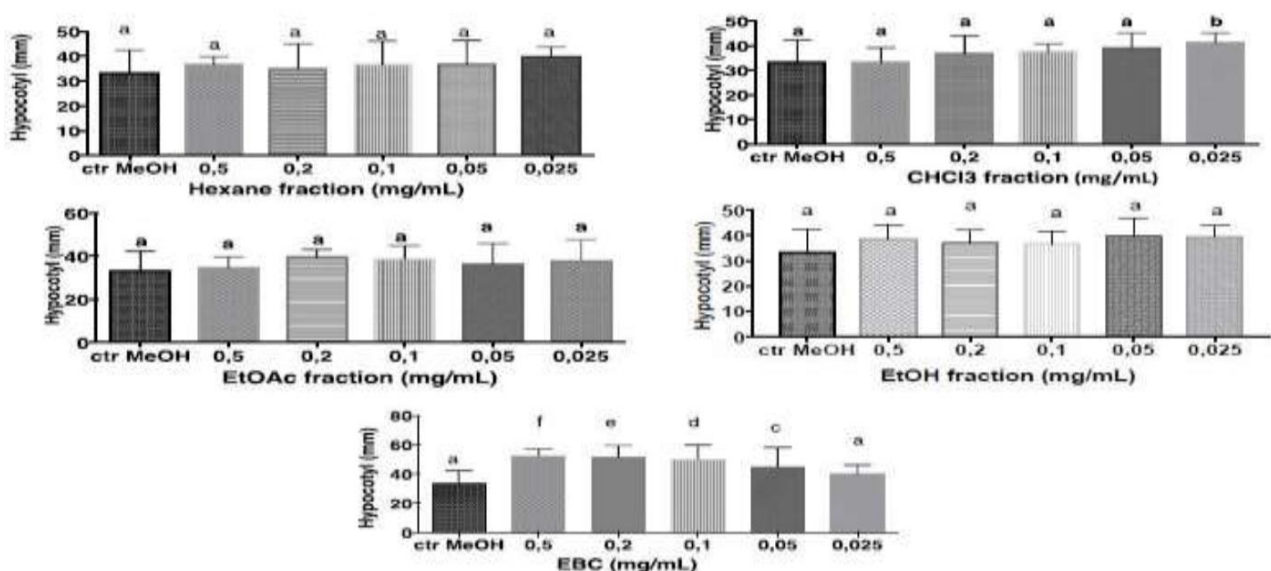
Observou-se estímulo do crescimento (GRÁFICOS 1, 2, 3e 4) do hipocótilo das plântulas de *Lactuca sativa*, submetidas ao extrato bruto, frações acetato de etila e Hidroalcoólica remanescente da folha na concentração de 500 µg/mL. Também foi observado que houve estímulo do crescimento do hipocótilo e da radícula de *Lactuca sativa* para todas as concentrações do extrato bruto do caule, proporcionalmente conforme o aumento da concentração.

GRÁFICO 1. Crescimento do hipocótilo de *L. sativa* (alface) em relação ao extrato e às frações de folhas de *Clethra scabra* pers.



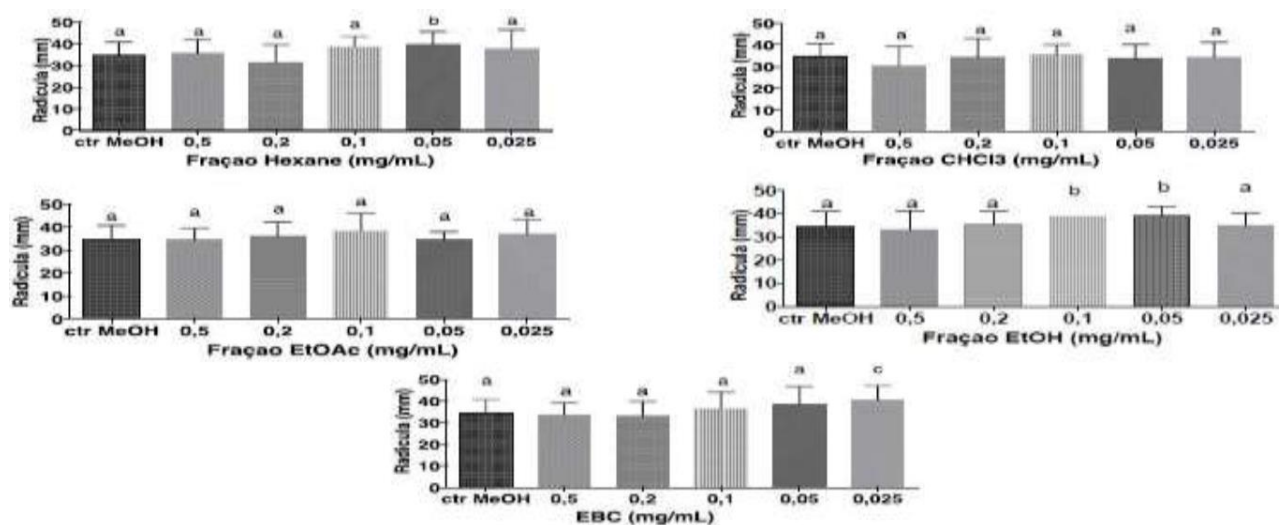
Crescimento do hipocótilo de *Lactuca sativa* (alface) em resposta ao tratamento com diferentes concentrações (mg/mL) das frações de extrato de folhas de *Clethra scabra* Pers. As barras representam a média \pm erro padrão (n=3). As frações testadas incluem Hexano, Acetato de Etila (EtOAc), Clorofórmio (CHCl₃), e Etanol (EtOH), além do extrato bruto (EBC). As letras acima das barras indicam diferenças significativas entre as médias dentro de cada fração.

GRÁFICO 2: Crescimento do hipocótilo de *L. sativa* (alface) em relação ao extrato e às frações do caule de *Clethra scabra* Pers



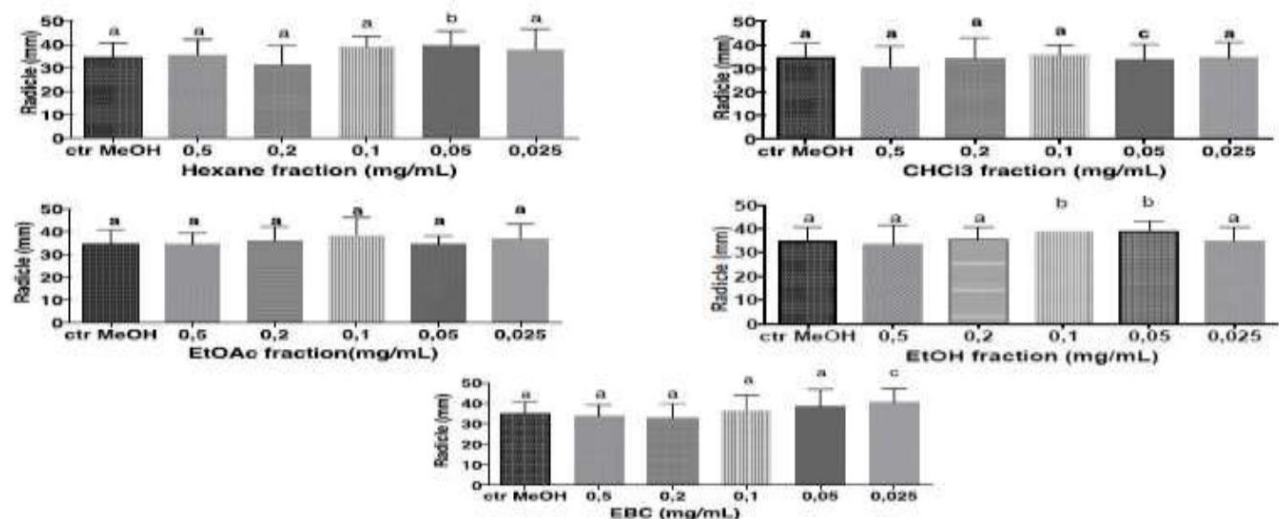
Crescimento do hipocótilo de *Lactuca sativa* (alface) em resposta ao tratamento com diferentes concentrações (mg/mL) das frações de extrato do caule de *Clethra scabra* Pers. As barras representam a média \pm erro padrão (n=3). As frações testadas incluem Hexano, Acetato de Etila (EtOAc), Clorofórmio (CHCl₃), e Etanol (EtOH), além do extrato bruto (EBC).

GRÁFICO 3. Crescimento da radícula de *L. sativa* (alface) face ao extrato e às frações da folha de *Clethra scabra* Pers



Crescimento da radícula de *Lactuca sativa* (alface) em resposta ao tratamento com diferentes concentrações (mg/mL) das frações de extrato das folhas de *Clethra scabra* Pers. As barras representam a média \pm erro padrão (n=3). As frações testadas incluem Hexano, Acetato de Etila (EtOAc), Clorofórmio (CHCl₃), e Etanol (EtOH), além do extrato bruto (EBC). As letras acima das barras indicam diferenças significativas entre as médias dentro de cada fração

GRÁFICOS 4: Crescimento radicular de *L. sativa* (alface) face a extrato e extrato e frações do caule de *Clethra scabra* Pers



Crescimento radicular de *Lactuca sativa* (alface) em resposta ao tratamento com diferentes concentrações (mg/mL) das frações de extrato do caule de *Clethra scabra* Pers. As barras representam a média \pm erro padrão (n=3). As frações testadas incluem Hexano, Acetato de Etila (EtOAc), Clorofórmio (CHCl₃), e Etanol (EtOH), além do extrato bruto (EBC). As letras acima das barras indicam diferenças significativas entre as médias dentro de cada fração.

O estímulo do crescimento das plântulas expostas a extratos e frações indica uma possível ação bioestimulante para *Clethra scabra*.

A presença de triterpenos e flavonoides conforme verificado nos testes fitoquímicos, pode justificar a ação estimulante do crescimento das plântulas de *Lactuca sativa*. O sinergismo causado pode favorecer o desenvolvimento estimulando o crescimento de plantas.

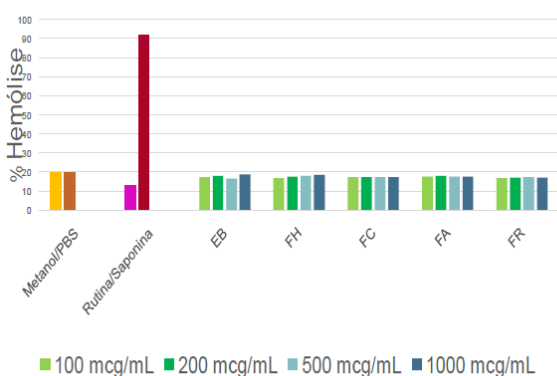
Os bioestimulante são substâncias naturais ou sintéticas, que atuam no processo de divisão e alongamento celular, podendo melhorar a absorção radicular e utilização de nutrientes, atuando no metabolismo das plantas. Seu uso influi no maior crescimento e desenvolvimento das plantas pois favorece a adaptação em ambientes de baixa fertilidade e com restrição de água (SANTOS et al., 2013).

Desta forma, baseado nos dados estatísticos obtidos, verifica-se que os mesmos corroboram quanto ao uso de *Clethra scabra* em reflorestamentos, devido seu potencial para rápido crescimento, e elevada incidência nas diversas áreas na qual é nativa, conforme evidenciado por (MACHADO et al., 2013; RAMOS, 2003; RIBEIRO et al., 2013). Vale ressaltar que em estudo, *Clethra arborea* é considerada invasora na Ilha da Madeira, por seu rápido crescimento e elevada densidade (MARTÍNEZ; GOUVEIA; CASTILHO, 2015).

O ensaio de toxicidade preliminar com *Artemia salina* obteve para todas as amostras testadas valores de CL50 menor que 1000 µg/mL (MEYER et al., 1982b), portanto, nenhuma das amostras testadas apresentaram toxicidade sobre *Artemia salina* (NGUTA et al., 2011).

Não se verificou atividade hemolítica (GRÁFICO 5 e 6) nas amostras testadas de *Clethra scabra*, apresentando valores estatisticamente menores ao controle negativo. O resultado desta análise mostrou que os extratos e frações de *Clethra scabra* não apresentaram efeito citotóxico em glóbulos vermelhos., tanto para caule como para folhas.

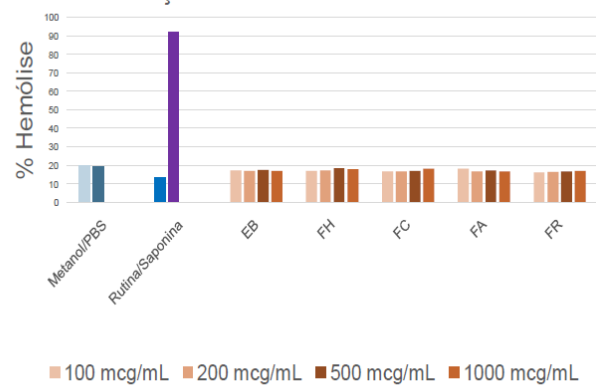
GRÁFICO 5 - Potencial Hemolítico de Extrato e Frações de Folhas de *Clethra scabra* Pers.



Aslam et al. (2011)

ASLAM, F. et al (2011)

GRÁFICO 6 - Potencial Hemolítico de Extrato e Frações de Caule de *Clethra scabra* Pers.



Aslam et al. (2011)

ASLAM, F. et al (2011)

Verificou-se que na presença da rutina, os valores de hemólise foram menores, portanto, pode-se dizer que os extratos, devido à presença de flavonóides como a rutina nos extratos e frações, apresentaram determinada proteção na célula, impedindo o rompimento durante o teste. Efeito este visualizado por (REVUELTA et al., 2006), em que os antioxidantes rutina e quercetina suprimiram as alterações na fluidez da membrana e perdas lipídicas, reduzindo a oxidação da hemoglobina em 30% e perdas de GSH em 60% nos eritrócitos.

Frente aos microrganismos testados, não foi observada atividade antimicrobiana de interesse clínico. A melhor susceptibilidade antimicrobiana foi determinada contra *C. albicans*, evidenciada na FRC, FHF e FRF sendo classificada como moderada, pois as CIM's obtidas encontraram-se acima de 500 µg/mL.

TABELA 04. DISTRIBUIÇÃO DAS CIMS DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE FOLHAS E CAULE DE *Clethra scabra* TESTADAS CONTRA CEPAS DE REFERÊNCIA ATCC.

Microrganismo	Extratos e Frações Caule (µg/mL)					Extratos e Frações Folha (µg/mL)				
	EBC	FHC	FCC	FAC	FRC	EBC	FHC	FCC	FAC	FRC
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1000	-	500	-	1000	-	500	-	-	1000
<i>E. coli</i> ATCC 25922	500	-	500	1000	500	500	500	500	1000	500
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	500	-	500	500	500	500	500	500	1000	500
<i>C. albicans</i> ATCC 40175	500	-	500	-	250	500	250	-	1000	250

CIM: concentração inibitória mínima; EBF=Extrato Bruto da folha, FHF=Fração Hexano da folha, FCF=Fração Clorofórmio de folha, FAF=Fração Acetato de Etila da folha, FRF=Fração Hidroalcoólica Residual de folha, EBC=Extrato Bruto de caule, FHC=Fração Hexano de caule, FCC=Fração Clorofórmio de caule, FAC=Fração Acetato de Etila de caule, FRC=Fração Hidroalcoólica Residual de caule; (\geq): maior ou igual. CIM \leq 100 µg / ml, bom; 100 > CIM \leq 500 µg / ml, moderado; 500 > CIM \leq 1000 µg / ml, fraco; CIM > 1.000 µg / ml, inativo (SANTOS et al., 2008) (HOLETZ et al., 2002).

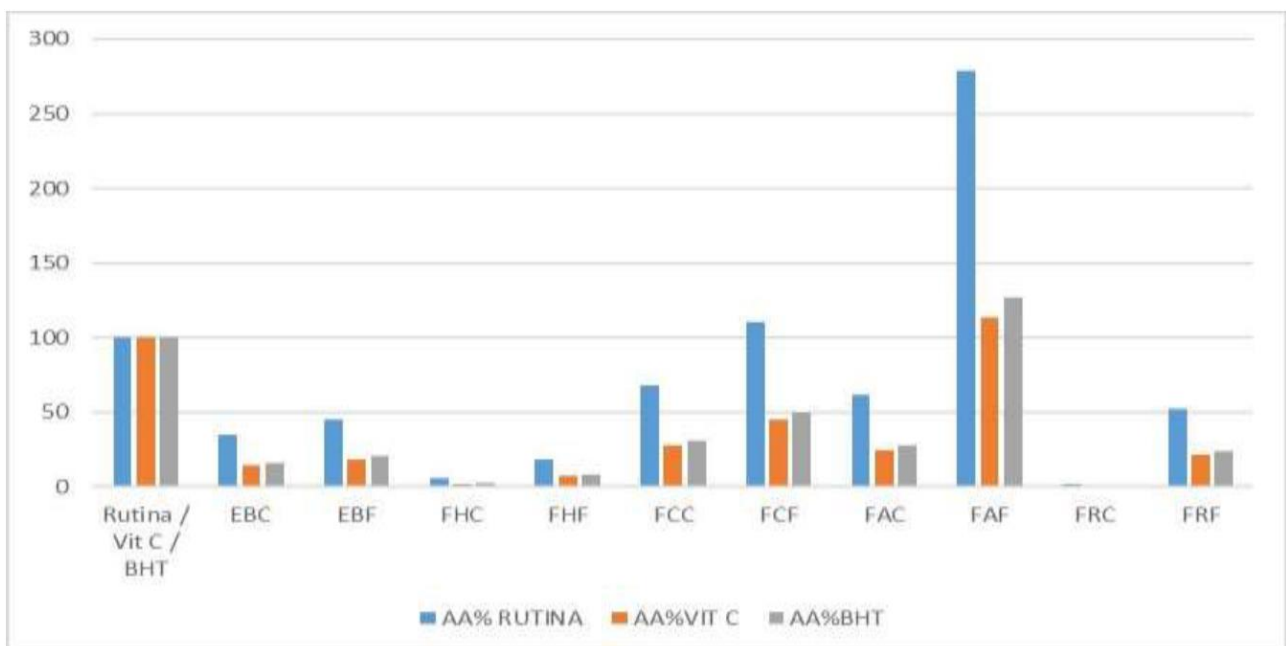
Igarashi et al., (2003), identificou atividade antifúngica in vitro a partir da clethramicina (obtida a partir de caldo de fermentação da raiz de *Clethra barbinervis*), com CIM de 0,5 a 8 µg/mL contra *Candida albicans* e *C. glabrata*.

O teste de fosfomolibdênio avalia a capacidade dos extratos e frações em reduzir o Mo (VI) para o Mo (V), e a partir dos resultados obtidos (GRAFICO 7) do EB e frações de

caule e folha de *Clethra scabra*, utilizando como referência as atividades da rutina, vitamina C e BHT, pode-se observar que para a folha, a FAF apresentou a maior atividade antioxidante, seguida das FCF, FRF, EBF e FHF, respectivamente. Para o caule, a maior atividade antioxidante foi observada na FCC, seguida da FAC, EBC, FHC e FRC, respectivamente.

Nota-se que o EB, FAC e FCC apresentaram satisfatória atividade antioxidante por formação do radical fosfomolibdênio. De acordo com os resultados, todas as amostras testadas apresentaram determinada atividade antioxidante por redução do complexo fosfomolibdênio, ao adquirirem coloração verde característicos confirmados pelas leituras no espectrofotômetro.

GRÁFICO 7 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DE EXTRATO E FRAÇÕES DE *Clethra scabra* Pers.



EBF=Extrato Bruto da folha, FHF=Fração Hexano da folha, FCF=Fração Clorofórmio de folha, FAF=Fração Acetato de Etila da folha, FRF=Fração Hidroalcoólica Residual de folha, EBC=Extrato Bruto de caule, FHC=Fração Hexano de caule, FCC=Fração Clorofórmio de caule, FAC=Fração Acetato de Etila de caule, FRC=Fração Hidroalcoólica Residual de caule.

Destaca-se o resultado obtido com a FAF que foi superior à atividade antioxidante do flavonol rutina utilizado como padrão, e que apresentou a melhor atividade antioxidante. Ainda se observa que para todos os extratos e frações, a melhor atividade antioxidante foi

encontrada em relação a rutina, quando comparado a vitamina C e BHT.

Com a finalidade em avaliar a capacidade dos constituintes do extrato bruto e frações de *Clethra scabra*, em capturar radicais livres (DPPH·), foi feita análise destes, sendo os resultados expressos em concentração efetiva necessária para inibição da oxidação em 50% (TABELA 5).

TABELA 5. RESULTADOS DE CE50 PARA A REDUÇÃO DO DPPH· DE EXTRATOS E FRAÇÕES OBTIDAS DE FOLHAS E CAULE DE *Clethra scabra*

Pers.

AMOSTRA	CI50(µg) ±DP	AMOSTRA	CI50(µg) ±DP
EBF	24,80±0,70b	EBC	36,40±0,23d
FHF	30,52±0,44c	FHC	66,97±0,54e
FCF	23,08±0,27b	FCC	81,84±0,38f
FAF	9,07±0,06a	FAC	28,81±1,31c
FRF	24,41±0,27b	FRC	57,81±1,01e
Vitamina C	6,21±0,02a		
BHT	8,55±0,02a		
Rutina	6,78±0,05a		

Resultados expressos em média aritmética ± desvio padrão. Letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Tukey. EBF=Extrato Bruto da folha, FHF=Fração Hexano da folha, FCF=Fração Clorofórmio de folha, FAF=Fração Acetato de Etila da folha, FRF=Fração Hidroalcoólica Residual de folha, EBC=Extrato Bruto de caule, FHC=Fração Hexano de caule, FCC=Fração Clorofórmio de caule, FAC=Fração Acetato de Etila de caule, FRC=Fração Hidroalcoólica Residual de caule.

Confirmando os dados obtidos através dos métodos de formação do complexo fosfomolibdênio, a FAF foi a que apresentou maior poder de redução do radical DPPH·. Corroborando com os resultados anteriormente obtidos, a MENOR atividade antioxidante a folha foi apresentada pela FHF, e para o caule, foi menor nas FCC, FHC e FRC.

4. DISCUSSÃO

Estudos fitoquímicos conduzidos na espécie indicaram a presença de Leucoantocianidinas, heterosídeos (flavonóides, antocianinas e saponinas), substâncias iridóides, cumarinas, bem como esteróides/triterpenos e taninos condensados.

Em *Clethra barbinervis*, foram identificados sete novos saponinas triterpênicas, algumas das quais revelaram-se inibidores de hialuronidase, representando a possível

presença de substâncias com potencial para atividades farmacológicas em *Clethra scabra*.

A presença de triterpenos e flavonóides, como verificado nos testes fitoquímicos, pode justificar a ação estimulante do crescimento das plântulas de *Lactuca sativa*. O sinergismo causado pode favorecer o desenvolvimento estimulando o crescimento das plantas.

A estimulação do crescimento de plântulas expostas a extratos e frações indica uma possível ação bioestimulante de *Clethra scabra*.

Bioestimulante são substâncias naturais ou sintéticas que atuam no processo de divisão e alongamento celular, podendo melhorar a absorção radicular e o uso de nutrientes, atuando no metabolismo das plantas. Seu uso influencia o maior crescimento e desenvolvimento das plantas, pois favorece a adaptação em ambientes de baixa fertilidade e restrição hídrica.

Assim, com base nos dados estatísticos obtidos, verifica-se que eles corroboram o uso de *Clethra scabra* em reflorestamento, devido ao seu potencial de rápido crescimento e alta incidência em várias áreas onde é nativa.

Vale ressaltar que, em um estudo, *Clethra arborea* é considerada invasora na Ilha da Madeira devido ao seu rápido crescimento e alta densidade.

O teste preliminar de toxicidade com *Artemia salina* obteve para todas as amostras testadas valores de CL50 inferiores a 1000 µg/mL; portanto, nenhuma das amostras testadas mostrou toxicidade sobre *Artemia salina*.

O resultado dessa análise mostrou que os extratos e frações de *Clethra scabra* não apresentaram efeito citotóxico sobre glóbulos vermelhos, tanto do caule quanto das folhas. Verificou-se que na presença de rutina, os valores de hemólise foram menores, podendo-se afirmar que os extratos, devido à presença de flavonóides como a rutina nos extratos e frações, apresentaram alguma proteção à célula, evitando a ruptura durante o teste. Esse efeito foi visualizado em que os antioxidantes rutina e quercetina suprimiram mudanças na fluidez da membrana e perdas de lipídios, reduzindo a oxidação da hemoglobina em 30% e as perdas de GSH em 60% nos eritrócitos.

EB, FAC e FCC mostraram atividade antioxidante satisfatória pela formação do radical fosfomolibdênio. De acordo com os resultados, todas as amostras testadas mostraram alguma atividade antioxidante ao reduzir o complexo de fosfomolibdênio, adquirindo coloração verde característica confirmada por leituras de espectrofotômetro.

5. CONCLUSÃO

Clethra scabra é uma planta nativa no Brasil, rica em metabólitos, de boa adaptabilidade nos biomas desde a Bahia até os estados do sul. Apresentou potencial atividade antioxidante pelo método fosfomolibdênio e redução do radical DPPH.; em sua composição foi identificado a presença de quercetina e rutina, que possuem diversas propriedades farmacológicas já estudadas. Os resultados preliminares demonstraram a não toxicidade dos extratos e frações de folhas e caule de *Clethra scabra*, estimulando a continuidade de seu estudo em busca de possíveis atividades biológicas e constituintes que esta espécie possa apresentar.

Embora os resultados obtidos no teste de hemólise, em comparação ao controle positivo Saponina, indicam não toxicidade das amostras nestes modelos, outros estudos de toxicidade *in vitro* e *in vivo* devem ser realizados. Novos estudos são necessários para avaliar o potencial de *Clethra scabra* como fonte de substâncias com efeito bioestimulante que podem favorecer a expressão do potencial genético de plantas mediante alterações nos processos vitais e estruturais, promovendo o equilíbrio hormonal e estimulando seu desenvolvimento.

6. REFERÊNCIAS

ADEGAS, F. S.; VOLL, E. Imbibition and germination of hairy beggartick seeds (*Bidens pilosa*). *Planta Daninha*, v. 21, p. 21-25, 2003.

ASLAM, F. et al. Antioxidant, haemolytic activities and GC-MS profiling of *Carissa carandas* roots. *International Journal of Phytomedicine*, v. 3, p. 567–578, 2011.

BEDNARCZUK, V. O. et al. Testes *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. *Visão acadêmica*, v. 11, n. 2, 2010.

BIONDI, Daniela; LEAL, Luciana. Avaliação de espécies plantadas experimentalmente na arborização de ruas da cidade de Curitiba–PR. *Revista da Sociedade Brasileira de Arborização Urbana*, v. 4, n. 4, 2009.

CARVALHO, João Luiz de Souza et al. Termoestabilidade de processos extrativos de

Nasturtium officinale R. Br., brassicaceae por sistema Soxhlet modificado. Química Nova, v. 32, p. 1031-1035, 2009.

CLSI, Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard. 10th ed. Wayne, PA, USA: [s.n.]. Disponível em: https://clsi.org/media/1928/m07ed11_sample.pdf. Acesso em: [06/04/2020].

SANTOS, Marcelo Henrique dos et al. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café (*Coffea arabica*). Química Nova, v. 30, p. 604- 610, 2007.

FERREIRA, Alfredo Gui; AQUILA, Maria Estefânia Alaves. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. Revista brasileira de fisiologia vegetal, v. 12, n. 1, p. 175-204, 2000.

FERREIRA, Daniel Furtado. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. Ciência e agrotecnologia, v. 38, p. 109-112, 2014.

IGARASHI, Y. et al. Screening of pollen tube growth inhibitors: identification of clethramycin from a plant-associated actinomycete. Society of america, p. 169, 2003.

MACHADO, Sebastião do Amaral et al. Comparação dos parâmetros fitossociológicos entre três estratos de um fragmento de floresta ombrófila mista. Cerne, v. 19, p. 365- 372, 2013.

MAGUIRE, J. D. Speed of Germination—Aid In Selection And Evaluation for Seedling Emergence And Vigor¹. Crop Science, v. 2, n. 2, p. 176, 20 nov. 1962.

LLORENT-MARTÍNEZ, Eulogio J.; GOUVEIA, Sandra; CASTILHO, Paula C. Analysis of phenolic compounds in leaves from endemic trees from Madeira Island. A contribution to the chemotaxonomy of Laurisilva forest species. Industrial Crops and Products, v. 64, p. 135-151, 2015.

MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. Phytotherapy Research, v. 15, n. 2, p. 127– 130, 2001.

MEYER, B. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. Planta Medica, v. 45, n. 05, p. 31–34, 29 maio 1982a.

MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, v. 45, n. 05, p. 31–34, 1982b.

MURATA, T. et al. Triterpene saponins from *Clethra barbinervis* and their hyaluronidase inhibitory activities. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 134, n. 612, p. 134–143, 2013.

NAPOLITANO, J. G. et al. Complete ¹H NMR spectral analysis of ten chemical markers of *Ginkgo biloba*. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v. 50, p. 569–575, 2012.

NASCIMENTO, J. C. et al. Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonóides totais em extratos de folhas da *Bauhinia variegata* L. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 92, n. 4, p. 327–332, 2011.

NGUTA, J. M. et al. Biological screening of Kenyan medicinal plants using *Artemia salina* L. (*Artemiidae*). *Pharmacologyonline*, v. 2, p. 468–478, 2011.

PAULA, C. da S. Estudo fitoquímico e propriedades biológicas das folhas de *Bauhinia unguolata* L., *Fabaceae*. 2014.

PERDIZ, R. de O.; GIULIETTI, A. M.; OLIVEIRA, R. P. de. *Flora da Bahia: Clethraceae. Sitientibus Série Ciências Biológicas*, v. 15, ISSN 2238-4103, 2015.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, v. 269, n. 2, p. 337–341, 1999.

RAMOS, F. M. Comparação da estrutura da vegetação em interior e borda de um capão de Floresta Ombrófila Mista, Parque Estadual de Vila Velha, Paraná. 2003.

REVUELTA, A. L. et al. Membrane cholesterol contents influence the protective effects of quercetin and rutin in erythrocytes damaged by oxidative stress. *Chemico- Biological Interactions*, v. 161, n. 1, p. 79–91, 15 maio 2006.

RIBEIRO, S. C. et al. Regeneração natural em áreas desmatadas e dominadas por *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn na Serra da Mantiqueira. *CERNE*, v. 19, n. 1, p. 65–76, mar. 2013.

SANTOS, V. M. dos et al. Use of biostimulants on the growth of Zea mays L. plants. Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v. 12, n. 3, p. 307–318, 2013.

SILVA, J. M. da; FRANCO, E. de S. Florística de espécies arbóreo-arbustivas do sub-bosque com potencial fitoterápico em fragmento florestal urbano no município de Camaragibe, Pernambuco, Brasil. Caminhos de Geografia, v. 11, n. 35, p. 179–194, 2010.

SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2007.

***Autor(a) para correspondência:**

Idonilton da Conceição Fernandes

Universidade Federal do Paraná, Setor de Saúde, Departamento de Farmácia, Grupo de pesquisa em Produtos Naturais, Curitiba, Paraná, Brasil.

Email: tonhfernandes@gmail.com

RECEBIDO: 19/07/2024 ACEITE: 21/08/2024