

FITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE FLORES DE *Jacaranda micrantha* (Bignoniaceae)

PHYTOTOXICITY AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *Jacaranda micrantha* (Bignoniaceae) FLOWERS

William Broch Hildebrandt¹, Beatriz Cristina Konopatzki Hirota^{1*}, Cristiane Bezerra da Silva¹, Josiane de Fátima Gaspari Dias¹, Cristina Mayumi Sasaki Miyazaki², Obdulio Gomes Miguel², Marilis Dallarmi Miguel¹.

¹Departamento de Farmácia, Laboratório de Farmacotécnica, Universidade Federal do Paraná, *Autor para correspondência: beatriz_konopatzki@hotmail.com

²Departamento de Farmácia, Laboratório de Fitoquímica, Universidade Federal do Paraná, Paraná, Curitiba, Brasil.

RESUMO

Foi estudado o efeito fitotóxico, tóxico e antioxidante de frações semipurificadas das flores de *Jacaranda micrantha* (Bignoniaceae). Na avaliação da atividade fitotóxica, foram realizados bioensaios de germinação e crescimento com a espécie-alvo *Lactuca sativa*. Para o ensaio de toxicidade preliminar utilizou- se o microcrustáceo *Artemia salina*, e para o teste de atividade antioxidante o método do complexo fosfomolibdênico. A fração clorofórmica apresentou atividade antioxidante de 30% em relação à vitamina C e 61% em relação à rutina. Os extratos utilizados não apresentaram toxicidade frente a *Artemia salina*, a inibição no crescimento do hipocótilo e da radícula de *Lactuca sativa* pela fração hexânica e fração remanescente evidencia que estas apresentam potencial para serem utilizadas como modelo de herbicidas, uma vez que não causam toxicidade em organismos vivos.

Pávras-chave: aleloquímicos, Bignoniaceae, espécies reativas de oxigênio, toxicidade.

ABSTRACT

This study highlights the phytotoxic, toxic and antioxidant study of *Jacaranda micrantha* (Bignoniaceae) flowers semi-purified fractions. Germination and growth bioassays with *Lactuca sativa* species for phytotoxic activity evaluation were performed. *Artemia salina* micro crustaceans were used for the preliminary toxicity test and as antioxidant activity test the Phosphomolibdenic complex method was applied. The Chloroform fraction presented a 30% antioxidant activity in relation to vitamin C and 61% in relation to rutin. The extracts used did not show toxicity to the brine shrimp and the hypocotyl and radicle growth inhibition by hexanic and remaining fractions pointed that this show potential to be used as herbicides models, as it does not show toxicity to living organisms.

Keywords: allelochemicals, Bignoniaceae, oxygen reactive species, toxicity

1. INTRODUÇÃO

Durante os últimos 30 anos, grandes esforços têm sido dedicados à descoberta de novos aleloquímicos com potencial aplicação no manejo de plantas daninhas. Os herbicidas desenvolvidos de compostos químicos naturais apresentam importantes vantagens sobre os herbicidas sintéticos usados na agricultura, pois apresentam novos mecanismos de ação, alta biodegradabilidade e baixo impacto no ambiente (MACIAS *et al.* 2006).

Os estudos de alelopatia têm avaliado a ação de diversos extratos e princípios ativos, extraídos de material vegetal sobre o controle de plantas daninhas (MACIAS *et al.* 2000a). O uso de substâncias com poder alelopático pode ter uma importância estratégica pela sua atuação seletiva e pelo baixo poder residual (RIZVI *et al.* 1999).

Os agrotóxicos ao permanecerem no ambiente ou atingirem o meio aquático, oferecem riscos para espécies animais por sua toxicidade, além da possibilidade de acumulação ao longo da cadeia alimentar. Assim, na pesquisa sobre novos herbicidas são necessários estudos de ecotoxicidade. Para estimar os efeitos deletérios de agrotóxicos sobre o ambiente, frequentemente são utilizados testes de toxicidade aguda. Os peixes e invertebrados aquáticos são sensíveis às variações de parâmetros ambientais e por isso são utilizados como modelos para testes de poluentes (BARBIERI, 2004). Dentre os testes utilizados podemos destacar o ensaio de letalidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* Leach, que é utilizado para o tanto para o monitoramento de efluentes, como para a determinação da toxicidade aguda.

O gênero *Jacaranda* possui cerca de 50 espécies, todas neotropicais, sendo a maioria de predominância nos cerrados, com 22 espécies, sendo elas de hábito arbóreo ou arbustivo (POTT e POTT, 1994; FARIAS e PROENÇA, 2003; LORENZI, 2002; SOUZA e LORENZI, 2005). Várias substâncias de interesse farmacêutico já foram reportadas para o gênero, destacando- se os triterpenos, flavonóides, uma quinona denominada jacaranona, com potencial anticarcinogênico (GACHET e SCHÜHLY, 2009).

Jacaranda micrantha Juss (Bignoniaceae), é conhecida popularmente por caroba, caroba do mato ou caroba branca, apresenta característica arbórea, é nativa de cerrado mas se estende até o Paraná e Rio Grande do Sul. Esta espécie, por sua raridade, está em via de extinção. Isso ocorre geralmente devido sua grande utilidade para a indústria e nas construções em geral (LORENZI 2002). Estudos quanto a composição química e as atividades biológicas, ainda não foram reportadas para as flores desta espécie, sendo que o estabelecimento desta em ambientes de estratificação onde há pouca luminosidade, mostrando-se tolerantes a sombra, além da formação de populações monoespecíficas desta espécie (JARENKOW e WAECHTER, 2001) a torna interessante para estudos de atividade alelopática.

Recentemente, o uso de conservantes naturais tem se tornado mais popular se comparado com antioxidantes sintéticos. Estudos reportam que extratos de plantas apresentaram reconhecida atividade antioxidante em alimentos (AHN, 2007). Existem leis rigorosas quanto ao uso de conservantes em alimentos, as quais permitem somente o uso de antioxidantes naturais (PRIETO, PINEDA e AGUILAR 1999). Deste modo, a investigação da atividade antioxidante de espécies vegetais assume grande importância.

O objetivo deste trabalho foi investigar a atividade fitotóxica, antioxidante e avaliar de forma preliminar a toxicidade de extratos das flores de Jacaranda micrantha (Bignoniaceae).

2. METODOLOGIA

As flores de Jacaranda micrantha secas e trituradas foram submetidas à extração alcoólica e particionamento em aparelho Sohxlet com solventes de polaridade crescente, hexano, clorofórmio e acetato de etila resultando nas frações hexano (FH), clorofórmio (FCL), acetato de etila (FAE) e remanescente (FR). Após o fracionamento as frações foram concentradas, e foi calculado o seu rendimento.

As frações foram submetidas ao ensaio de formação do complexo fosfomolibdênico segundo a metodologia de Pietro et al. (1999). Os resultados foram comparados em relação à atividade antioxidante da rutina e vitamina C.

O ensaio de toxicidade foi realizado frente ao microcrustáceo *Artemia salina* (MEYER et al., 1982 com modificações), sendo as frações utilizados em triplicata, com sete concentrações (10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 μ g/mL), sendo utilizados 25 náupilos para cada tratamento. Os náupilos foram incubados por 24 horas, decorrido este período de contato os sobreviventes foram contados. Os dados foram analisados pelo método Probitos (FINNEY, 1962) e expressos como CL_{50} (concentração letal média) e percentual de mortalidade. São consideradas tóxicas as sustâncias quando a CL_{50} foi menor que 1000 ppm. Resultados com 100% de mortalidade significam elevada toxicidade e de 0% sem toxicidade.

Para os bioensaios de atividade fitotóxica, as frações foram avaliadas sobre a germinação e crescimento de alface (*Lactuca sativa L. cv. Grand rapids*) onde a solução-estoque na concentração de 1.000 mg L⁻¹ foi preparada a partir da massa calculada para cada fração, as quais foram dissolvidas em DMSO (Dimetilsulfóxido) a 0,1% (DAYAN et al., 2000), sendo as concentrações de 500 e 250 mg L⁻¹ preparadas por diluição. As soluções foram tamponadas com solução de MES (Ácido 2-morfolinoetanosulfônico) 10 mM, e o pH foi ajustado para 6,0 (MACIAS et al., 2000b) com solução de KOH 0,1 N. Como controle, procedimento similar foi utilizado, porém com ausência das frações. Para os bioensaios de germinação, as placas de Petri

contendo papel filtro receberam 5,0 mL da solução dos tratamentos (MACIAS *et al.*, 2000b). Em seguida, semeou-se 50 diásporos da espécie-alvo (alface), distribuídos aleatoriamente, com quatro repetições para cada solução (BRASIL, 2009). As placas de Petri foram levadas a uma câmara de germinação (BOD), com condições de luz (160 W), umidade relativa ($\pm 80\%$) e temperatura constante, adequadas a cada espécie-alvo. A contagem para avaliar a germinação foi realizada diariamente tendo como critério a protrusão radicular com no mínimo 2,0 mm de comprimento (BRASIL, 2009). O experimento foi considerado concluído quando a germinação foi nula por três dias consecutivos.

Para os bioensaios de crescimento, primeiramente as sementes foram pré-germinadas em placas de Petri umedecidas com água destilada. Após a germinação, foram selecionadas 80 plântulas (quatro repetições de 20), para cada tratamento, as quais foram transferidas para placas de Petri contendo as soluções tratamento, utilizando-se procedimento similar ao descrito nos bioensaios de germinação (MACIAS *et al.*, 2000b). A leitura dos parâmetros avaliados foi realizada após quatro dias da incubação. Para a avaliação do crescimento foi realizada a medida do alongamento da raiz e do hipocôtilo/coleóptilo (dez plântulas por placa) utilizando-se papel milimetrado.

Os dados foram submetidos a análise de variância e quando os efeitos dos tratamentos foram significativos, em relação a testemunha, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott e Tukey (DIAS, 2009). Todos os resultados foram analisados considerando o nível de significância $\alpha = 5\%$.

3. RESULTADOS

Com relação a atividade antioxidante frente ao fosfomolibdênio, foi verificado que a fração clorofórmio apresentou 61,19% de potencial antioxidante em relação à rutina e 29,05% em relação à vitamina C, demonstrando um potencial moderado desta fração como antioxidante.

Nos resultados observados frente aos náupilos de *Artemia salina*, foi verificado que todas as frações apresentaram CL_{50} maior que 1000 μ g/mL, resultados que indicam que as amostras não são tóxicas e portanto podem ser utilizadas em testes biológicos - como atividade herbicida - uma vez que o teste demonstrou que o mesmo não causa mortalidade nesta espécie, e que sua futura utilização pode evitar problemas de contaminação no ambiente.

A análise do efeito fitotóxico dos extratos de flores de *Jacaranda micrantha* indicou que as frações não afetaram na velocidade de germinação e porcentagem final de germinação. Entretanto, observou-se que as frações clorofórmio, acetato de etila e remanescente inibiram de forma significativa o crescimento do hipocôtilo de sementes de *Lactuca sativa* em todas as concentrações testadas (Figura 1). O maior efeito

inibitório foi verificado na fração hexano, sendo observado inibição de 33% no crescimento do hipocótilo na concentração de 1000 mg.L^{-1} . Não foi observada relação entre aumento de concentração e intensificação de atividade. Todos as frações inibiram de maneira significativa o crescimento da radícula nas concentrações de 250 mg.L^{-1} . A fração hexano apresentou o resultado mais expressivo, inibindo em 65% o crescimento da radícula na concentração de 1000 mg.L^{-1} (Figura 2).

Comparando-se os efeitos sob o crescimento do hipocótilo e da radícula, observa-se que os efeitos fitotóxicos foram mais evidentes no crescimento da raiz do que nas partes aéreas (hipocótilo). Estes efeitos podem ter se concentrado nas radículas visto que a concentração de fitotoxinas nos tecidos radiculares é favorecida pelo contato físico da raiz com o papel de filtro (SILVA *et al.* 2010).

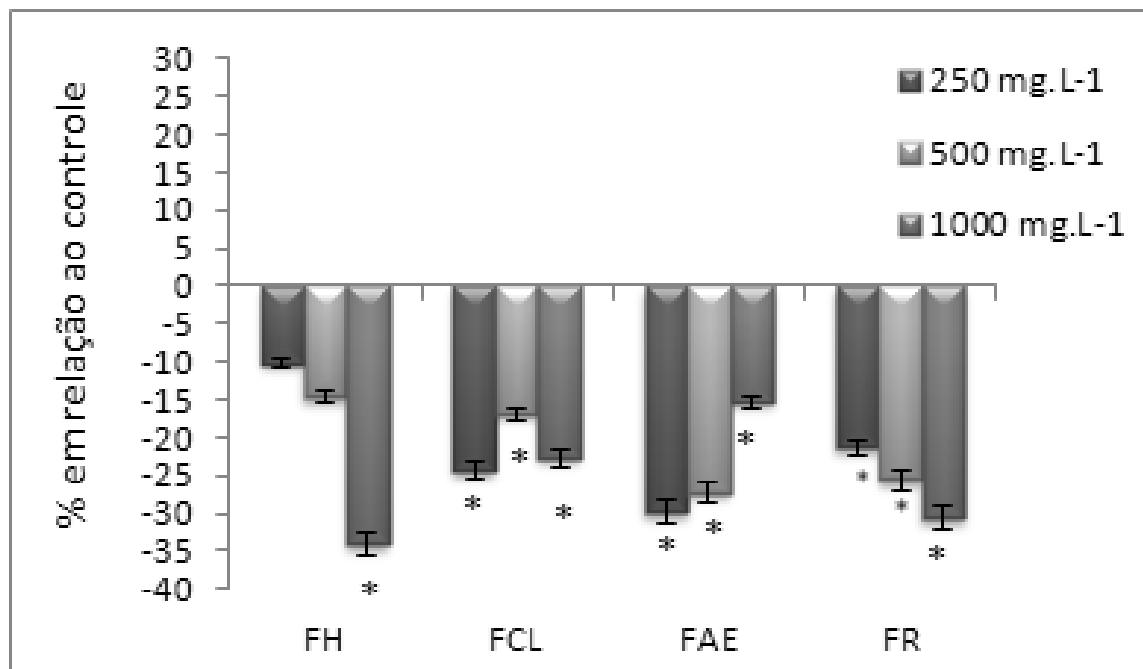


FIGURA 1 – PORCENTAGENS DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO

FH – fração hexano; FCL – fração clorofórmio; FAE – fração acetato de etila; FR – fração remanescente.

*A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey.

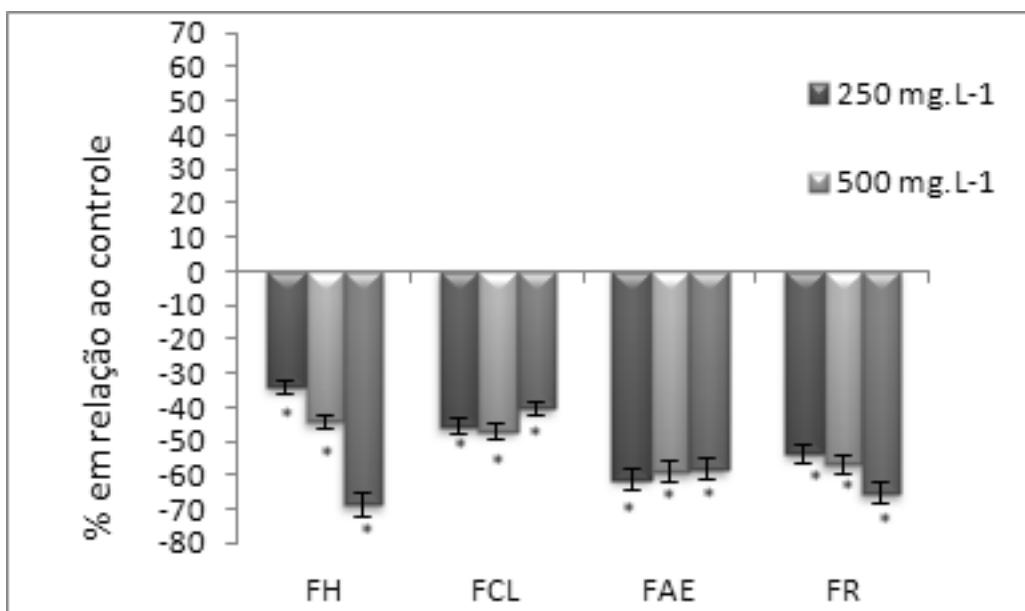


FIGURA 2 – PORCENTAGENS DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DA RADÍCULA

FH – fração hexano; FCL – fração clorofórmio; FAE – fração acetato de etila; FR – fração remanescente.

*A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey.

3. DISCUSSÃO

As flores de *Jacaranda micrantha* constituem material abundante e seu uso não implica em comprometimento da continuidade da espécie. O desenvolvimento de extratos e frações de espécies vegetais, os quais possam ser utilizados para os mais variados fins de acordo com suas propriedades biológicas, de maneira a não gerar a utilização predatória de espécies vegetais constitui um objetivo para a pesquisa de produtos naturais.

O uso da fração clorofórmio de flores de *Jacaranda micrantha* para isolamento e identificação de moléculas antioxidantes é indicado. O modelo experimental empregado avalia a capacidade antioxidante de compostos hidrofílicos e lipofílicos, o que aumenta as possibilidades de isolamento de antioxidantes com ambas características.

Os resultados obtidos frente a *Artemia salina* evidenciam que a fração hexano e remanescente são seguras do ponto de vista ecológico, fator importante na pesquisa de um herbicida natural, uma vez que não causaram mortalidade nos náupilos utilizados como bioindicadores. Os testes de toxicidade são elaborados com o objetivo de avaliar ou prever os efeitos de substâncias tóxicas nos sistemas biológicos e averiguar a toxicidade relativa das substâncias que são preponderantes na avaliação do ambiente (BAROSA *et al.*, 2003).

A avaliação de toxicidade geral é considerada fundamental como bioensaio preliminar no estudo de substâncias com propriedades biológicas. *Artemia salina* é utilizada em testes de toxicidade aguda devido à sua capacidade para formar cistos dormentes, sua praticidade de manuseio e cultivo, por ser um método rápido e barato, além de ser um bioindicador capaz em uma avaliação toxicológica pré-clínica (BAROSA et al., 2003).

A fitotoxicidade evidenciada pelas frações hexano e remanescente demonstram um potencial uso destas para o desenvolvimento de novos herbicidas. O uso das flores evita o uso de outras partes morfológicas como as cascas e folhas, tornando possível o uso sustentável da espécie. Analisando-se os resultados de crescimento, verifica-se que os maiores efeitos fitotóxicos destas frações se manifestaram na inibição do crescimento da raiz. Russel (1977) afirma que a área superficial da raiz é o parâmetro mais relevante para avaliação na absorção de nutrientes.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados e nas condições em que foram realizados os experimentos, conclui-se que a baixa toxicidade e as propriedades fitotóxicas constatadas neste trabalho permitem a indicação das flores de *Jacanranda micrantha* para estudos mais complexos, como ensaios *in vivo* e testes em campo.

6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Fundação Araucária, CAPES, PIBIQ/CNPq e Universidade Federal do Paraná pelo apoio financeiro.

7. REFERÊNCIAS

BARBIERI, E. Emprego de *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes) e *Artemia salina* (Crustacea) para determinar a toxicidade aguda da água de produção de petróleo em Sergipe, Brasil. **Biologia Geral e Experimental**, v.5, p. 26-29, 2004.

BAROSA, J.; FERREIRA, A., FONSECA, B., SOUZA, I. Teste de toxicidade de cobre para *Artemia salina* – **Poluição e ecotoxicologia marinha**, Nov. 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para a Análise de Sementes**, SNDA/DNDU/CLU, Brasília, 2009

DAYAN, F.E.; ROMAGNI, J.G.; DUKE, S.O. Investigating the mode of action of natural phytotoxins. **Journal of Chemical Ecology**, v.26, n.9, p.2079-2093, 2000.

DIAS, J.F.G.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D. 2009. Composition of essential oil and allelopathic activity of aromatic water of *Aster lanceolatus* Willd. (Asteraceae). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 3, p. 469-474, 2009.

FARIAS, R.; PROENÇA, C. *Jacaranda decurrens* subs. *symmetrifoliolata* Farias & Proença (Bignoniaceae), novo táxon para o bioma cerrado. **BRADEA- Boletim do Herbarium Bradeanum**, n. 11, p. 5-9, 2003.

FINNEY, D.J. **Probit Analysis**. Cambridge, Cambridge University Press, 1962.

GACHET, M.S.; SCHÜHLY, W. Jacaranda - an ethnopharmacological and phytochemical review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, p. 14-27, 2009.

JARENKOW, J. A.; WAECHTER, J.L. Composição, estrutura e relações florísticas do componente arbóreo de uma floresta estacional no Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, p. 263-272, 2001.

AHN, J.; GRÜN, I. U.; MUSTAPHA, A. Effects of plant extracts on microbial growth, color change, and lipid oxidation in cooked beef. **Food Microbiology**, v. 24, p. 7-14, 2007.

LORENZI, M. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2002.

MALHEIROS, A.; PERES, M. T. L. P. Alelopatia: interações químicas entre espécies. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 503-523.

MACIAS, F.A.; GALINDO, J.C.G.; CASTELLANO, D., VELASCO, R.F. Sesquiterpene lactones with potencial use as natural herbicides models Guaianolides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 5288-5296, 2000a.

MACIAS, F.A.; CASTELLANO, D.; MOLINILLO, J.M.G. Search for a standart

phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 48, n. 6, p. 2512-2521, 2000b.

MACIAS, F.A.; FERNANDEZ, A.; VARELA, R.M.; MOLINILLO, J.M.G.; TORRES, A., ALVES, P.L.C.A. Sesquiterpene Lactones as Allelochemicals. **Journal of Natural Products**, v.69, p. 795-800, 2006.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **Planta Médica**, v.45, p. 31-34, 1982.

MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. São Paulo: Robe. Editorial, 1999. p.11-17.

MIGUEL, O.G. **Ensaio sistemático de análise em fitoquímica**. Apostila da disciplina de fitoquímica do curso de farmácia da UFPR, Curitiba, 2003.

MOREIRA, E. A. Marcha sistemática de análise em fitoquímica. **Tribuna farmacêutica**. v. 47, n. 1, p. 1-19, 1979.

PERES, W.; TUÑÓN, M.J.; COLLADO, P.S.; HERRMANN, S.; MARRONI, N.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. The flavonoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction. **Journal of Hepatology**, v.33, n.5, p. 742-750, 2000.

POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do pantanal**. Corumbá, EMBRAPA- SPI, 1994

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, p. 337-341, 1999.

RIZVI, S.J.H.; TAHIR, M.; KOHLI, R.K.; ANSARI, A. Allelopathic interactions in agroforestry systems. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 18, p: 773-796, 1999.

RUSSEL, R.S. **Plant Root Systems: Their function and interaction with the soil**. European plant biology. MC Graw-Hill Book Company (UK) Limited: London, 1977.

SILVA, C.B.; CÂNDIDO, A.C.S.; SIMIONATTO, E.; FACCENDA, O.; SCALON, S.P.Q.; PERES, M.T.L.P. Atividade alelopática, antioxidante e teor de fenóis totais de *Hydrocotyle bonariensis* Lam. (Araliaceae). **Acta Scientiarum. Technology**, v. 32, n.4, p. 413-420, 2010.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação

das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005.