

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC  
UNIDADE ACADÊMICA DE HUMANIDADES, CIÊNCIAS E  
EDUCAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
AMBIENTAIS  
MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS**

**INFLUÊNCIA DE FATORES AMBIENTAIS NA PRODUÇÃO DE  
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Calea pinnatifida* (R. Br.)  
Less. (ASTERACEAE)**

**FRANCIELY VANESSA COSTA**

**CRICIÚMA  
2017**



**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC  
UNIDADE ACADÊMICA DE HUMANIDADES, CIÊNCIAS E  
EDUCAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
AMBIENTAIS  
MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS**

**FRANCIELY VANESSA COSTA**

**INFLUÊNCIA DE FATORES AMBIENTAIS NA PRODUÇÃO DE  
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Calea pinnatifida* (R. Br.)  
Less. (ASTERACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia de Aguiar Amaral  
Coorientadoras: Profa. Dra. Vanilde Citadini-Zanette  
Profa. Dra. Françoise Lohézic-Le Dévéhat

**CRICIÚMA  
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

C837i Costa, Franciely Vanessa.

Influência de fatores ambientais na produção de metabólitos secundários de *Calea pinnatifida* (R.Br.) Less. (Asteraceae) / Franciely Vanessa Costa ; orientadora: Patricia de Aguiar Amaral ; coorientadoras: Vanilde Citadini-Zanette, Françoise Lohézic-Le Dévehat – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2017.

128 p : il. ; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Criciúma, SC, 2017.

1. *Calea pinnatifida* (R. Br.) Less.. 2. Plantas medicinais. 3. Metabólitos secundários – Prudução. 4. Quebra-tudo. 5. Cipó-cruz. 6. Extratos vegetais. I. Título.

CDD. 22ª ed. 615.53



**Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC**  
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão  
Unidade Acadêmica de Humanidades, Ciências e Educação  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais**

---

### **PARECER**

Os membros da Banca Examinadora homologada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO apresentada pela candidata **FRANCIELY VANESSA COSTA** sob o título: “**Influência de fatores ambientais na produção de metabólitos secundários de *Calea pinnatifida* (R. Br.) Less. (ASTERACEAE)**”, para obtenção do grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS** no Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC. Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Dissertação.

Criciúma/SC, 22 de fevereiro de 2017.

**Prof. Dra. Maique Weber Biavatti**  
Primeiro Examinador

**Prof. Dr. Jairo José Zocche**  
Segundo Examinador

**Prof. Dra. Patrícia de Aguiar Amaral**  
Presidente da Banca e Orientadora



Aos meus pais, Juarez e Marisa,  
por não medirem esforços na  
minha educação e formação.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que guia todos os meus passos e me encaminha para os propósitos de minha vida.

Agradeço aos meus pais, que sempre me incentivaram e me deram todo apoio que precisei em toda minha formação escolar e acadêmica. Sou o que sou hoje graças a eles.

À minha orientadora, Profa. Dra. Patrícia de Aguiar Amaral, por ter acreditado no meu potencial e por ter me oferecido oportunidades imensuráveis.

À minha coorientadora Profa. Dra. Vanilde Citadini-Zanette, por toda sua dedicação e conhecimento.

À minha supervisora de estágio na França, Profa. Dra. Françoise Le Devehat por toda sua paciência, orientação durante os 30 dias de estágio e apoio à realização dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Jairo José Zocche, pelos conhecimentos e apoio à realização da saída de campo na serra da Rocinha.

Ao Prof. Dr. Álvaro José Back, por auxiliar na elaboração dos dados estatísticos.

Aos meus amigos, Altamir Rocha Antunes e Robson Siqueira Patrício, ambos mestrandos do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da UNESC, por me ajudarem nos trabalhos de campo.

Aos amigos do LAPLAM, que me ajudaram no laboratório por seus conhecimentos e práticas laboratoriais.

Aos diretores da UFSC-Araranguá, em especial Samira Belettini Borges, que me possibilitaram o afastamento parcial para cursar o mestrado.

À amiga e parceira de trabalho, Profa. Dra. Patrícia Haas, que me incentivou a iniciar o mestrado e sempre me ajudou em assuntos relacionados à UFSC-Araranguá.

À Marília Segabinazzi, amiga que me traz inspiração e que mesmo distante, nossa conexão continua.

Aos amigos e familiares, que me incentivaram e tiveram compreensão pelas minhas ausências.

À UNESC, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e aos professores pelos ensinamentos e contribuições.

À CAPES, pela bolsa de estudo.



“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o mistério passará pela vida sem ver nada.”

Albert Einstein



## RESUMO

*Calea* L. é um gênero pertencente à família Asteraceae, tribo Heliantheae Cass., subtribo Melampodiinae Less., que contém aproximadamente 125 espécies, muitas delas encontradas no Brasil. Vários compostos químicos já foram isolados de espécies deste gênero e alguns destes compostos apresentam atividades biológicas. Destaca-se a ocorrência de lactonas sesquiterpênicas em várias espécies. As atividades biológicas relatadas para este gênero são: leishmanicida, tripanocida, antitumoral, anti-hipertensiva, antifúngica, anti-inflamatória, entre outras. *Calea pinnatifida* (R. Br.) Less., conhecida popularmente como “quebra-tudo”, “cipó-cruz” e “aruca”, é uma planta utilizada na medicina popular para problemas digestivos, amebíase e giardíase. Alguns compostos já foram isolados de *C. pinnatifida* como cromenos, poliactilenos e lactonas sesquiterpênicas. Tendo em vista a importância da espécie e seu uso na medicina popular, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência dos fatores ambientais na produção de metabólitos secundários desta espécie. Para tanto, as folhas de *C. pinnatifida* foram coletadas em duas altitudes diferentes, a 25 m e 800 m e em duas estações do ano, verão e inverno. Para avaliação do perfil cromatográfico, foram realizadas cromatografias em camada delgada e em camada delgada de alta eficiência. Foi realizada a análise do solo para ambas altitudes na coleta de fevereiro/2016. O perfil cromatográfico da coleta do verão apresentou variações qualitativas como presença e ausência de compostos químicos e variações em suas concentrações, comparando as duas altitudes. O perfil cromatográfico da coleta do inverno apresentou variações qualitativas como ausência e presença de compostos químicos em ambas altitudes e quantitativas determinadas estatisticamente. A análise do solo apresentou variações significativas nos macronutrientes fósforo, potássio e magnésio e nos micronutrientes cobre, zinco, ferro e manganês. Portanto, pode-se concluir que fatores como altitude, nutrientes do solo, temperatura e radiação solar influenciam o perfil de metabólitos secundários de *C. pinnatifida*.

**Palavras-chave:** perfil metabólico; altitude; nutrientes do solo; CCDAE; planta medicinal.



## ABSTRACT

*Calea* L. is a genus belonging to the Asteraceae family, Heliantheae Cass. tribe, Melampodiinae Less. subtribe, which contains approximately 125 species, many of them found in Brazil. Several chemical compounds have already been isolated from species of this genus and some of these compounds have biological activities. It is worth mentioning the occurrence of sesquiterpene lactones in several species. The biological activities reported for this genus are: leishmanicide, trypanocidal, antitumoral, antihypertensive, antifungal, anti-inflammatory, among others. *Calea pinnatifida* (R. Br.) Less., Commonly known as "quebra-tudo", "cipó-cruz" and "aruca", is a plant used in folk medicine for digestive problems, amebiasis and giardiasis. Some compounds have already been isolated from *C. pinnatifida* as chromenes, polyacetylenes and sesquiterpene lactones. Considering the importance of the species and its use in folk medicine, this study aimed to evaluate the influence of environmental factors on the production of secondary metabolites of this species. For this, the leaves of *C. pinnatifida* were collected at two different altitudes, at 25 m and 800 m and at two seasons, summer and winter. To evaluate the chromatographic profile, thin layer and high efficiency thin layer chromatography were performed. Soil analysis was performed for both altitudes in the february / 2016 harvest. The chromatographic profile of the summer collection showed qualitative variations such as presence and absence of chemical compounds and variations in their concentrations, comparing the two altitudes. The chromatographic profile of the winter collection showed qualitative variations such as absence and presence of chemical compounds in both altitudes and quantitatively determined statistically. Soil analysis showed significant variations in the macronutrients phosphorus, potassium and magnesium and in the micronutrients copper, zinc, iron and manganese. Therefore, it can be concluded that factors such as altitude, soil nutrients, temperature and solar radiation influence the profile of secondary metabolites of *C. pinnatifida*.

**Key-words:** Metabolic profile; altitude; Soil nutrients; HPTLC; medicinal plant.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Detalhe das folhas (a) e de um ramo fértil (b) de <i>C. pinnatifida</i> .....	30
Figura 2 - Cromenos de <i>C. pinnatifida</i> que apresentam atividade .....	31
Figura 3 - Nova lactona sesquiterpênica isolada de <i>C. pinnatifida</i> . .....	32
Figura 4 - Germacranolídeo Arucanolídeo.....	33
Figura 5 - Calealactona C.....	33
Figura 6 - Localização dos pontos de coleta de <i>C. pinnatifida</i> a 25 m e 800 m de altitude no estado de Santa Catarina.....	46
Figura 7 - Esquema da Extração e Particionamento de <i>C. pinnatifida</i> no verão.....	47
Figura 8 - Esquema da Extração e Particionamento de <i>C. pinnatifida</i> no inverno.....	48
Figura 9 - Esquema da Extração e Particionamento de <i>C.pinnatifida</i> no inverno, fração acetato de etila direta.....	48
Figura 10 - Estruturas químicas dos padrões utilizados. ....	51
Figura 11 - Cromatografia em Tolueno/Acetato de Etila (9:1) das frações obtidas de <i>C. pinnatifida</i> .....	56
Figura 12 - Cromatografia em Ciclohexano/Acetona (85:15) das frações obtidas de <i>C. pinnatifida</i> . ....	57
Figura 13 - Leitura em câmara UV no sistema Tolueno-Acetato de Etila 9:1 – 254 nm.....	58
Figura 14 - Leitura em câmara UV no sistema Tolueno-Acetato de Etila 9:1 – 365 nm.....	58
Figura 15 - Leitura em Câmara UV no sistema Clorofórmio-Acetato de Etila 75:25 - 254 nm.....	59
Figura 16 - Leitura em Câmara UV no sistema Clorofórmio-Acetato de Etila 75:25 - 365 nm.....	59
Figura 17 - Cromatograma 10 µl das amostras e referências – Clorofórmio-Acetato de Etila 75:25 + Anisaldeído Sulfúrico.....	61
Figura 18 - Cromatograma 25 µl das amostras e referências – Clorofórmio-Acetato de Etila 75:25 + Anisaldeído Sulfúrico.....	61
Figura 19 - Cromatograma 50 µl das amostras e referências – Clorofórmio-Acetato de Etila 75:25 + Anisaldeído Sulfúrico.....	62
Figura 20 - Densitograma CHCl <sub>3</sub> -AcOEt 75:25 - 230 nm. ....	63
Figura 21 - Densitograma fração hexano 25 m. ....	64
Figura 22 - Densitograma fração hexano 800 m. ....	64
Figura 23 - Densitograma fração diclorometano 25 m.....	66
Figura 24 - Densitograma fração diclorometano 800 m.....	66

Figura 25 - Placa cromatográfica da fração diclorometano no sistema clorofórmio-acetato de etila 75:25 revelada com anisaldeído sulfúrico - 10 µl. ....	68
Figura 26 - Placa cromatográfica da fração diclorometano no sistema clorofórmio-acetato de etila 75:25 revelada com anisaldeído sulfúrico - 25 µl e 50 µl. ....	68
Figura 27 - Densitograma fração acetato de etila 25 m. ....	69
Figura 28 - Densitograma fração acetato de etila 800 m. ....	70
Figura 29 - Leitura em Câmara UV - Clorofórmio-Acetato de Etila 75:25 - 254 nm. ....	71
Figura 30 - Leitura em Câmara UV - Clorofórmio-Acetato de Etila 75:25 - 365 nm. ....	72
Figura 31 - Cromatograma 30 µl das amostras e referências – Clorofórmio-Acetato de Etila 75:25 + Anisaldeído Sulfúrico. ....	72
Figura 32 - Densitograma do extrato bruto a 25 m. ....	73
Figura 33 - Densitograma do extrato bruto a 800 m. ....	74
Figura 34 - Densitograma da fração hexano a 25 m. ....	74
Figura 35 - Densitograma da fração hexano a 800 m. ....	75
Figura 36 - Densitograma da fração diclorometano a 25 m. ....	75
Figura 37 - Densitograma da fração diclorometano a 800 m. ....	76
Figura 38 - Densitograma da fração acetato de etila a 25 m. ....	76
Figura 39 - Densitograma da fração acetato de etila a 800 m. ....	77
Figura 40 - Compostos encontrados em cada extrato ou fração a 25 metros. ....	78
Figura 41 - Compostos encontrados em cada extrato ou fração a 800 metros. ....	79
Figura 42 - Compostos encontrados em cada extrato ou fração. ....	80
Figura 43 - Variações dos picos estatisticamente significativos do extrato bruto. ....	81
Figura 44 - Variações dos picos estatisticamente significativos da fração hexano. ....	82
Figura 45 - Variações dos picos estatisticamente significativos da fração diclorometano. ....	83
Figura 46 - Variações dos picos estatisticamente significativos da fração acetato de etila. ....	84

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Compostos isolados de espécies do gênero <i>Calea</i> que apresentam atividade biológica. ....	36
Tabela 2 - Moléculas que apresentam atividade biológica e respectivas espécies do gênero <i>Calea</i> . ....	38
Tabela 3 - Rendimentos dos extratos das folhas de <i>C.pinnatifida</i> . ....	55
Tabela 4 - Análise estatística dos parâmetros do solo. ....	55
Tabela 5 - Identificação qualitativa dos extratos de <i>C. pinnatifida</i> . ....	60
Tabela 6 - Área dos picos nas respectivas altitudes fração hexano. ....	65
Tabela 7 - Área dos picos nas respectivas altitudes fração DCM. ....	67
Tabela 8 - Área dos picos nas respectivas altitudes fração acetato de etila. ....	70
Tabela 9 - Valores de p para picos presentes nas duas altitudes do Extrato Bruto. ....	81
Tabela 10 - Valores de p para os picos presentes nas duas altitudes da fração hexano. ....	82
Tabela 11 - Valores de p para os picos presentes nas duas altitudes da fração diclorometano. ....	83
Tabela 12 - Valores de p para os picos presentes nas duas altitudes da fração acetato de etila. ....	84



## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas  
CCD – Cromatografia em Camada Delgada  
EPAGRI - Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina  
FOD – Floresta Ombrófila Densa  
CCDAE – Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência  
CCDAE-UV – Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência - Ultravioleta  
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
PNPIC – Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares  
PNPMF – Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos  
SBCS – Sociedade Brasileira de Ciência do Solo  
SUS – Sistema Único de Saúde  
UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense



# Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>23</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>25</b>
2.1 PLANTAS MEDICINAIS .....	25
2.2 METABOLISMO SECUNDÁRIO E A INFLUÊNCIA DOS FATORES AMBIENTAIS NA SUA PRODUÇÃO .....	26
2.3 GÊNERO <i>Calea</i> L.....	29
2.4 <i>Calea pinnatifida</i> (R. Br.) Less. ....	29
<b>2.4.1 Descrição botânica</b> .....	<b>29</b>
<b>2.4.2 Compostos isolados</b> .....	<b>30</b>
<b>2.4.3 Atividades biológicas</b> .....	<b>31</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>44</b>
3.1 Objetivo geral.....	44
3.2 Objetivos específicos.....	44
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>45</b>
4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL .....	45
4.2 EXTRAÇÃO .....	47
4.3 ANÁLISE DO SOLO.....	49
4.4 ANÁLISE DOS COMPONENTES QUÍMICOS.....	49
<b>4.4.1 Cromatografia em Camada Delgada</b> .....	<b>49</b>
<b>4.4.2 Análise por CCDAE-UV (Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência-Ultravioleta)</b> .....	<b>50</b>
4.4.2.1 Depósitos dos extratos sobre a placa de sílica.....	50
4.4.2.2 Escolha dos sistemas de solventes para a migração .....	51
4.4.2.3 Escolha dos sistemas de revelação de placas CCD .....	52
4.4.2.4 Leitura das placas .....	53
4.4.2.5 Análise estatística .....	54
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>55</b>
5.1 EXTRATOS BRUTOS E PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO .....	55
5.2 ANÁLISE DO SOLO.....	55
5.3 ANÁLISE DOS COMPONENTES QUÍMICOS.....	56
<b>5.3.1 Cromatografia em Camada Delgada</b> .....	<b>56</b>
<b>5.3.2 Análise por CCDAE -UV</b> .....	<b>57</b>
5.3.2.1 Análise da coleta do verão.....	57
5.3.2.2 Análise da coleta do inverno .....	71
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>85</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	<b>93</b>
<b>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS</b> .....	<b>94</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>96</b>

<b>ANEXO(S) .....</b>	<b>112</b>
<b>ANEXO A – Laudos de Análise de Solo.....</b>	<b>113</b>
<b>ANEXO B – Dados da determinação da Umidade do Solo .....</b>	<b>118</b>
<b>ANEXO C – Dados do <i>software Wincats</i> da coleta do inverno para construção dos histogramas .....</b>	<b>120</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas com potencial medicinal é uma das formas mais antigas de prática medicinal utilizada pela humanidade. Mesmo com o avanço da medicina alopática, a partir da segunda metade do século XX, não é toda a população que consegue ter acesso aos centros hospitalares e unidades de saúde para obtenção de medicamentos. As dificuldades de acesso aos medicamentos associados à tradição da utilização de plantas medicinais são motivos que contribuem para o uso destas plantas pelas populações em países em desenvolvimento (VEIGA Jr; PINTO, MACIEL, 2005; BRASIL, 2012).

O Brasil possui uma das floras mais ricas do mundo (quase 19% da flora mundial), com mais de 56.000 espécies (GIULIETTI et al., 2005). Segundo esses autores, muitos estudiosos europeus estiveram no Brasil do século XVII ao final do século XIX para estudar as paisagens e a flora brasileira, comprovando que o interesse sobre a flora do Brasil já vem desde aquela época.

No entanto, estima-se que 90% da biodiversidade brasileira e do Planeta sejam desconhecidas (BRASIL, 2013). A ampliação do conhecimento científico associado a conhecimentos tradicionais permitem a conservação e utilização sustentável dos componentes da biodiversidade, por meio da produção de fármacos, cosméticos, alimentos, além de manter os serviços ecossistêmicos (BRASIL, 2013).

Por ser um país com enorme biodiversidade e grande potencial para produção de medicamentos fitoterápicos, no início deste século já se falava que era necessária a criação de um programa duradouro pelo governo federal para permitir o uso racional da biodiversidade visando a produção de medicamentos (CALIXTO, 2003). A Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos (PNPMF) foi aprovada pelo decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006 (BRASIL, 2006b). Este decreto instituiu um grupo de trabalho para elaborar o Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. No mesmo ano foi aprovada a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) ao Sistema Único de Saúde incluindo a medicina tradicional chinesa, homeopatia, plantas medicinais e fitoterapia (BRASIL, 2006a).

Em 2009 o Ministério da Saúde publicou a Relação Nacional de Plantas de Interesse ao SUS (RENISUS), indicando 71 espécies vegetais que apresentam estudos na literatura especializada. A Portaria 886 de 20 de abril de 2010 oficializou também as Farmácias Vivas, com normas para o cultivo e as oficinas farmacêuticas e *“muitos desses marcos legais contemplam diretrizes que destacam a importância da*

valorização do conhecimento tradicional e o respeito às práticas culturais de cura e manutenção da saúde” (ALMEIDA, 2016).

Em Santa Catarina, a diversidade de espécies é rica; porém várias ameaças vêm contribuindo para a destruição desse patrimônio natural. A exploração de madeira, agricultura e pecuária, queimadas, plantação de *Pinus* spp. e *Eucalyptus* spp., caça, expansão urbana, mineração, entre outros, tem contribuído para a perda da biodiversidade catarinense (SEVEGNANI; SCHROEDER, 2013).

Os remanescentes florestais ainda abrigam diversidade de espécies e alguns estudos atuais vêm sendo pautados na etnobotânica, que se ocupa dos estudos e conceitos desenvolvidos por comunidades sobre o mundo vegetal. Engloba o conhecimento que um grupo social possui em relação à classificação e utilização das plantas (MACIEL et al., 2002; VÁSQUEZ, MENDONÇA, NODA, 2014).

Estudos etnobotânicos têm evoluído nos últimos anos e têm proporcionado a descoberta de produtos naturais bioativos. A etnobotânica está relacionada com a etnofarmacologia, reconhecida como um dos caminhos para a descoberta de novas drogas, que trata da exploração de agentes biologicamente ativos do ponto de vista terapêutico, tradicionalmente empregados por determinado grupo étnico. Algumas abordagens têm sido apresentadas na literatura para seleção de espécies vegetais, sendo que a etnofarmacologia pode direcionar em menor tempo a descoberta de novas substâncias com maior probabilidade curativa e/ou preventiva (MACIEL et al., 2002; KADIR et al., 2012; RODRIGUES et al., 2012).

O ambiente em que as plantas medicinais se desenvolvem pode contribuir para o seu melhor desenvolvimento e concentração de seus princípios ativos (SALERNO; SILVA JUNIOR; AGOSTINI, 2011). Fatores ambientais, como altitude, umidade relativa do ar, tipo de solo, disponibilidade de água e de nutrientes, irão caracterizar o meio apropriado para cada espécie, influenciando no desenvolvimento e na produção de princípios ativos das plantas (BIANCHINI, 2011).

A escolha da espécie para o presente estudo, *Calea pinnatifida* (R.Br.) Less., teve como base o uso popular desta planta como medicinal. *C. pinnatifida*, conhecida como “quebra-tudo”, “cipó-cruz” ou “aruca”, é utilizada na medicina popular para o tratamento de dor no estômago, giardíase e amebíase (LIMA et al., 2015a).

Diante destas informações de uso popular de *C. pinnatifida*, a realização de pesquisas científicas faz-se necessária, com o intuito de aprofundar os conhecimentos relacionados ao ambiente em que a espécie se desenvolve e a concentração de seus metabólitos secundários.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 PLANTAS MEDICINAIS

Existem alguns registros históricos sobre a utilização de plantas medicinais. Dentre estes registros, o manuscrito Egípcio “Ebers Papyrus” (1.500 a.C.), contém 811 prescrições e 700 drogas. O primeiro texto Chinês sobre plantas medicinais (500 a.C.) relata nomes, doses e indicações de uso de plantas para tratamento de doenças. Algumas dessas plantas ainda são utilizadas, como *Panax* spp., *Ephedra* spp., *Cassia* spp. e *Rheum palmatum* L., inclusive como fontes para indústrias farmacêuticas (DUARTE, 2006).

A utilização de plantas medicinais significa para algumas comunidades e grupos étnicos o único recurso terapêutico acessível. Seu uso é antigo e em regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, seu uso é amplamente difundido (MACIEL et al., 2002; VEIGA JUNIOR, PINTO, MACIEL, 2005; SILVA, FERNANDES JUNIOR, 2010).

Existe uma cultura errônea de que tudo que é natural não faz mal à saúde e isto também inclui plantas medicinais. Apesar de ser um recurso natural e acessível à maioria das populações, plantas medicinais também têm efeitos colaterais e até tóxicos se forem utilizados de forma indiscriminada. Por isso, a necessidade de estudos multidisciplinares, envolvendo diversos aspectos: botânico, químico, farmacológico e socioantropológico que podem enriquecer os conhecimentos sobre os efeitos terapêuticos da flora mundial (MACIEL et al., 2002; VEIGA JUNIOR, PINTO, MACIEL 2005; FIGUEIREDO et al., 2014; ALMEIDA, 2016).

As políticas públicas brasileiras estão tornando a disponibilidade de plantas medicinais e fitoterápicos mais acessíveis no Sistema Único de Saúde (SUS). As duas políticas promulgadas em 2006 (PNPIC e PNPMF) vieram tornar o cenário um pouco diferente do modelo tradicional. Muitos serviços de saúde passaram a oferecer este tipo de tratamento paralelo ao número de profissionais que passaram a oferecer esta alternativa de cuidado. Porém, existe ainda certo preconceito e falta de conhecimento por parte dos gestores e profissionais de saúde em relação à implementação de práticas integrativas e complementares. E, além disso, a execução das políticas tem que estar contemplada no orçamento do SUS (FIGUEIREDO et al., 2014).

Desde a criação do SUS, houve aumento de publicações científicas sobre ações/programas de fitoterapia desenvolvidos na atenção primária à saúde. Segundo Antônio et al. (2014), foram publicados 53 artigos, no período de 1988 a 2013. Destes 13 estudos sobre ações com plantas medicinais na atenção primária à saúde, 24 estudos sobre programas municipais e estaduais de fitoterapia no sistema único de saúde e na atenção primária à saúde e 16 estudos sobre aceitação de uso de plantas medicinais, por parte dos profissionais de saúde, nos serviços de atenção primária à saúde. Essas publicações demonstram que desde a criação do SUS e a implementação de políticas públicas, as práticas envolvendo plantas medicinais e fitoterapia vem crescendo ao longo dos anos. Esse crescimento foi estimulado por movimentos populares, diretrizes de várias conferências nacionais de saúde e recomendações da Organização Mundial da Saúde.

Não se pode esquecer que a PNPMF não envolve apenas o acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos, mas também o uso sustentável da biodiversidade. O Brasil, detentor de grande patrimônio genético e diversidade cultural, tem potencial para desenvolver um modelo de desenvolvimento próprio e soberano na área de saúde e uso de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos. É necessário implementar a política de forma efetiva conservando sua rica biodiversidade (BRASIL, 2006b).

O crescimento nos últimos 10 anos e da inclusão de 12 medicamentos fitoterápicos na RENAME (BRASIL, 2015), mostram que as ações ainda são insuficientes. Deve haver ações conjuntas entre profissionais de saúde, usuários e gestores de forma a promover este tipo de tratamento no SUS e beneficiar a todos os envolvidos (FIGUEIREDO et al., 2014).

Nesse sentido, a contribuição da comunidade científica é essencial para avanços no estudo de plantas medicinais e auxílio na implementação das políticas públicas em nosso país.

## 2.2 METABOLISMO SECUNDÁRIO E A INFLUÊNCIA DOS FATORES AMBIENTAIS NA SUA PRODUÇÃO

O metabolismo é um conjunto de reações químicas que ocorrem nas células dos seres vivos para sintetizar substâncias complexas a partir de outras mais simples. As plantas, além de possuírem um metabolismo primário, possuem um metabolismo secundário que as permitem

produzir e acumular compostos de natureza química diversa. Os compostos derivados deste metabolismo são denominados de metabólitos secundários e apresentam funções ecológicas e atividades biológicas variadas (GARCÍA; CARRIL, 2009).

Estudos com metabólitos secundários têm aumentado nos últimos anos. Estes compostos tem função ambiental na planta, mas também representa um importante recurso para ativos farmacêuticos (BOURGAUD et al., 2001). Apesar do progresso da química sintética, plantas ainda continuam como importante recurso de compostos farmacêuticos e outros compostos economicamente importantes (FOWLER, 2006).

Em relação a fatores ambientais, fatores bióticos e abióticos podem influenciar o perfil de metabólitos secundários de uma planta. Os fatores que podem influenciar são os seguintes: sazonalidade, índice pluviométrico, radiação ultravioleta, composição atmosférica, ritmo circadiano, temperatura, composição do solo, idade da planta, herbivoria e ataque de patógenos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Existem poucos estudos que avaliam a influência da altitude na produção de metabólitos secundários. Há uma correlação positiva entre o conteúdo total de flavonoides e a altitude. A correlação pode ser explicada pelo aumento da radiação ultravioleta em altitudes maiores e os flavonoides oferecem proteção à planta (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Foi relatada significativa correlação positiva entre a altitude do local de coleta de espécies do gênero *Leontodon* e o conteúdo total de flavonoides. Porém, o conteúdo de ácidos fenólicos não mostrou variação altitudinal significativa (ZIDORN; STUPPNER, 2001).

O perfil de metabólitos secundários de *Arnica montana* (Asteraceae) foi avaliado em nove diferentes altitudes, cultivadas experimentalmente. Neste estudo, o conteúdo total de lactonas sesquiterpênicas e flavonóides não foi correlacionado positivamente com a altitude. Contudo, a presença de hidroxilas livres no anel B do esqueleto flavonoídico, confere um aumento do teor de flavonoides com aumento da altitude. E, por fim, os níveis de derivados de ácido cafeico também foram positivamente correlacionados com aumento da altitude (SPITALER et al., 2006).

Foi realizada a avaliação da variação altitudinal na produção de metabólitos secundários de *Matricaria chamomilla* (Asteraceae). Nove altitudes experimentais foram avaliadas, entre 590 e 2.230 m. Foram avaliados o conteúdo de flavonoides e ácidos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência. Houve uma correlação positiva

e estatisticamente significativa entre o conteúdo destes compostos e a altitude (GANZERA et al., 2008).

A temperatura também é um fator que exerce influência sobre a produção de metabólitos secundários. Mas, como está relacionada também a outros fatores como altitude e sazonalidade, não existem muitos estudos sobre sua influência de modo isolado (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Em estudos com as folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), houve aumento considerável de escopolina e ácido clorogênico após submissão a baixas temperaturas (KOEPE et al., 1970)

Radiação ultravioleta é um importante fator que muitas vezes estimula a produção de metabólitos secundários, principalmente o UV-B (FOWLER, 2006). Existe uma correlação positiva entre a intensidade de radiação solar e o aumento da produção de compostos fenólicos como flavonoides, taninos e antocianinas. A intensidade da luz também influencia outras classes de metabólitos secundários como terpenoides e alcaloides (GOBBO-NETO, LOPES, 2007).

São conhecidos os elementos essenciais para o desenvolvimento da planta que são carbono, oxigênio e hidrogênio provenientes do ar e da água e os nutrientes como nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre (macronutrientes), boro, cloro, cobre, cobalto, ferro, manganês, molibdênio e zinco (micronutrientes). Todos os nutrientes provêm do solo com exceção do nitrogênio que passa pelo processo de fixação (DE MORAIS, 2009).

Em relação aos nutrientes do solo, verifica-se que em plantas que passam por um estresse nutricional, geralmente ocorre maior produção de metabólitos secundários, com exceção do nitrogênio e enxofre, em que ocorre diminuição dos metabólitos secundários contendo esses elementos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

A estação do ano que a planta é coletada é um fator fundamental na produção de metabólitos secundários. A quantidade e a natureza dos constituintes ativos não são constantes durante o ano. Várias classes de metabólitos secundários apresentam variações sazonais como óleos essenciais, lactonas sesquiterpênicas, flavonoides, cumarinas, saponinas, alcaloides, taninos e ácidos fenólicos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Foi relatada variação sazonal no conteúdo de hipericina e pseudo-hipericinade uma espécie bastante conhecida, *Hypericum perforatum* (erva-de-São-João). As concentrações hipericina/pseudo-hipericina aumentam de 100 ppm no inverno para mais de 3000 ppm no verão (SOUTHWELL; BOURKE, 2001).

## 2.3 GÊNERO *Calea* L.

A família Asteraceae compreende cerca de 1.600 gêneros e 23.000 espécies em todo o mundo, ocorrendo principalmente em regiões subtropicais e tropicais (FERNANDES; RITTER, 2009). *Calea* L. é um gênero da família Asteraceae, pertencente à tribo Heliantheae Cass., subtribo Melampodiinae Less. (NASCIMENTO et al., 2002), contendo aproximadamente 125 espécies, muitas delas registradas no Brasil (ROQUE; CARVALHO, 2011).

*Calea*, de acordo com dados da literatura, possui algumas atividades biológicas relatadas, como: leishmanicida (NASCIMENTO et al., 2007; LIMA et al., 2015a); acaricida (RIBEIRO et al., 2011); tripanocida (NASCIMENTO et al., 2004b); anti-inflamatória (VENEGAS-FLORES et al., 2002; GÓMEZ; GIL, 2011); citotóxica (OHGUCHI et al., 2009); antimicrobiana (NASCIMENTO et al., 2002; CARVALHO et al., 2014); antifúngica (FLACH et al., 2002); antidiarreica e antinociceptiva (SALAGA et al., 2015; RODRIGUES-TORRES et al., 2016); antiobesidade (MATSUURA et al., 2005).

## 2.4 *Calea pinnatifida* (R. Br.) Less.

### 2.4.1 Descrição botânica

*C. pinnatifida* é um arbusto escandente, 1,0-5,0 m de altura, ramificado desde a base. Apresenta caule hexagonal, esverdeado e folhoso até o ápice. As folhas são opostas, lanceoladas ou deltoides, com ápice longamente acuminado e bordos crenado-serreados, serreado ou inteiro (Figura 1a). As inflorescências são do tipo capítulo, solitários e axilares, reunidos no ápice dos ramos, com pedúnculos de 0,6-3,0 cm de comprimento (Figura 1b) (MONDIN, 2004).

*C. pinnatifida* é nativa do Brasil, distribuída pelas regiões Centro-Oeste (Distrito Federal), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) e Sul (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina). Ocorre em domínios fitogeográficos do Cerrado, Mata atlântica e Pampa (**FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO**, 2016). Também encontrada no Paraguai, Argentina e Uruguai (MONDIN, 2004).

Figura 1 - Detalhe das folhas (a) e de um ramo fértil (b) de *C. pinnatifida*



Foto: Altamir Antunes, novembro/2015.

#### 2.4.2 Compostos isolados

Alguns compostos já foram isolados das partes aéreas e folhas da *C. pinnatifida* como ácido 4-glicosiloxibenzoico, ácido anísico, tetradeca-4*E*, 6*E*, 12*E*-trien-8,10-diin-1-ol e arucanolídeo (FERREIRA et al. 1980).

Em estudos mais recentes foram isolados cromenos: 6-Acetil-7-hidroxi-2,2-dimetilcromeno, 6-Acetil-7-metoxi-2,2 dimetilcromeno, 6-(1-Hidroxietil)-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno e 6-(1-Etoxietil)-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno (LIMA et al., 2015a).

Em outros estudos, frações diclorometano e acetato de etila do extrato etanólico das folhas de *C. pinnatifida* levaram ao isolamento e caracterização de oito compostos, sendo um deles novo na espécie. São eles: etil cafeato, vanilina, 12-hidroxi-encecalina, fitol, ácido 3,4-di-*O*-cafeoilquinico, ácido 3,5-di-*O*-cafeoilquinico, ácido 4,5-di-*O*-cafeoilquinico e uma nova lactona sesquiterpênica da espécie, 11,13-dihidroxi-calaxina (LIMA et al., 2016).

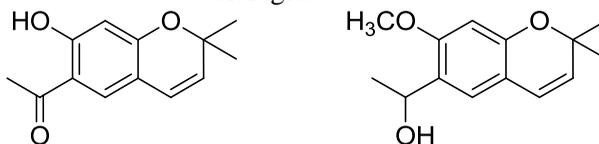
Dois lactonas sesquiterpênicas foram isoladas, uma já conhecida da espécie, o arucanolídeo, e outra já conhecida no gênero, a calealactona *C*. Suas estruturas foram estabelecidas através de análises espectroscópicas (SARTORELLI et al., 2016).

### 2.4.3 Atividades biológicas

Algumas atividades biológicas foram testadas experimentalmente como atividade leishmanicida (LIMA et al., 2015), tripanocida (LIMA et al., 2016) e atividade antitumoral (MARCHETTI et al., 2012).

Quatro cromenos isolados foram avaliados quanto sua atividade leishmanicida: 6-Acetil-7-hidroxi-2,2-dimetilcromeno, 6-Acetil-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno, 6-(1-Hidroxi-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno e 6-(1-Etoxi-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno. Dois compostos apresentaram atividade leishmanicida: 6-Acetil-7-hidroxi-2,2-dimetilcromeno conhecido também como eupatoriocromeno e 6-(1-Hidroxi-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno também conhecido como encecalinol (LIMA et al., 2015a). Suas estruturas estão representadas na figura 2.

Figura 2 - Cromenos de *C. pinnatifida* que apresentam atividade biológica.

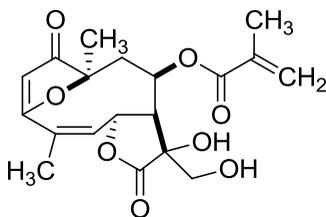


Eupatoriocromeno

Encecalinol

Um novo furanoheliangolídeo foi isolado das folhas de *C. pinnatifida*. Trata-se de um composto novo na espécie denominado: 11,13-dihidroxi-calaxina (LIMA et al., 2016). Sua estrutura química está representada na figura 3.

Figura 3 - Nova lactona sesquiterpênica isolada de *C. pinnatifida*.



11,13-dihidroxi-calaxina

Este composto apresentou notável atividade leishmanicida e tripanocida contra formas amastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi*, inibindo 81,81% e 94,30% do crescimento, respectivamente (LIMA et al., 2016).

Atividade leishmanicida também foi relatada para duas lactonas sesquiterpênicas isoladas da espécie: o arucanolídeo e a calelactona C (Figuras 4 e 5). Para estes dois compostos, foi relatada atividade leishmanicida. Estes compostos exibiram potente atividade contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* com  $EC_{50}$  de 1,7 e 4,6  $\mu\text{g/mL}$  para arucanolídeo e calealactona C, respectivamente (SARTORELLI et al., 2016).

Atividade antitumoral também já foi relatada para a espécie. Partes aéreas de *C. pinnatifida* foram extraídas com diclorometano, obtendo-se o extrato bruto de diclorometano. A atividade antitumoral foi avaliada *in vivo* e *in vitro*. Porém, não foram isolados compostos químicos e foi feita somente avaliação do extrato bruto. Desta forma, concluiu-se que o extrato apresentou efeito antitumoral, mas as substâncias envolvidas neste efeito não foram esclarecidas. Todavia, acredita-se que germanocranolídeos podem estar relacionados a esta atividade (MARCHETTI et al., 2012). O mesmo autor avaliou a atividade do arucanolídeo, que é um germacranolídeo, composto envolvido na atividade antiproliferativa de nove tumores em ensaios bioguiados. Germacranolídeos são frequentemente descritos como compostos antiproliferativos com indução de apoptose (MARCHETTI et al., 2010). A estrutura do arucanolídeo está representada na figura 4.

Figura 4 - Germacranolídeo Arucanolídeo

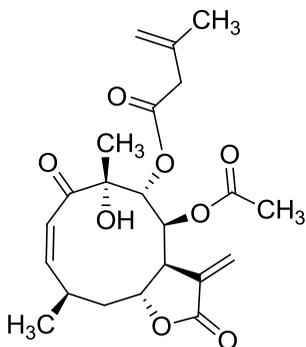
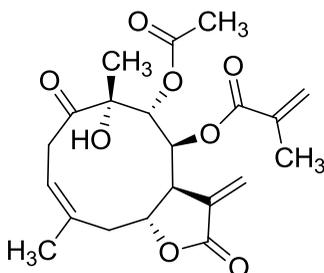


Figura 5 - Calealactona C



Lactonas sesquiterpênicas isoladas de *Calea urticifolia*, incluindo germacranolídeos, foram avaliadas na melanogênese em células de melanoma B16 em ratos. Foram isoladas cinco lactonas sesquiterpênicas das folhas de *C. urticifolia*: calealactona B, arucanolídeo, 2,3-epoxijuanislamina, 2,3-epoxicalcalactona A e calealactona A. Todos os compostos demonstraram efeito inibitório na melanogênese em células de melanoma B16, especialmente 2,3-epoxijuanislamina (OHGUCHI et al., 2009).

As lactonas sesquiterpênicas são um grande grupo de metabólitos secundários frequentemente presentes na família Asteraceae (MERFORT, 2011; CHADWICK et al., 2013). A classificação, de acordo com seu esqueleto carbocíclico, pode ser feita em quatro grupos

principais: germacranolídeos, eudesmanolídeos, guaianolídeos e pseudoguaianolídeos (PICMAN, 1986). As lactonas sesquiterpênicas apresentam uma diversidade de atividades biológicas, tais como antimicrobiana, citotóxica, anti-inflamatória, antibacteriana, antitumoral, antiviral, antifúngica, além de efeitos no sistema nervoso e cardiovascular (RUIZ-REYES; SUAREZ, 2015). Existem medicamentos já consagrados na conduta médica que são lactonas sesquiterpênicas como é o caso da artemisinina, extraída da *Artemisia annua*, que é utilizada como antimalárica. O interesse pela importância medicinal da artemisinina como antimalárica estimulou novas pesquisas na busca de outros constituintes de *A. annua* e de outras espécies do mesmo gênero (FOWLER, 2006; BRAZ FILHO, 2010).

Algumas lactonas sesquiterpênicas do grupo germacranolídeos da *Calea urticifolia* foram avaliadas quanto a uma possível atividade anti-obesidade. Os efeitos destes germacranolídeos isolados foram avaliados na diferenciação de adipócitos 3T3-L1. Os germacranolídeos inibiram a adipogênese na concentração de 1,25-5  $\mu\text{M}$ . Porém, não houve atividade inibitória contra a proliferação celular. O resultado indica que estes germacranolídeos são inibidores específicos da diferenciação de pré-adipócitos. Com este resultado, é possível que este grupo possa ter um efeito anti-obesidade (MATSUURA et al., 2005).

Existe certo interesse na pesquisa de atividade biológica de germacranolídeos. Este mesmo grupo foi avaliado na *Calea zacatechichi*. Foram isolados seis germacranolídeos: calealactone D, calealactona C, caleína D, caleína A, calealactona E e 8 $\beta$ -angeloxi-9 $\alpha$ -acetiloxicaliculatolide. Estes compostos foram avaliados quanto as suas atividades antiprotozoária e antimicrobiana. Todos os compostos apresentaram atividade leishmanicida, sendo que calealactona C e caleína D apresentaram valores IC<sub>50</sub> melhores que a pentamidina que é o controle positivo. Caleína D, caleína A e calealactona E apresentaram atividade antiplasmódica significativa. E calealactona C apresentou atividade antibacteriana contra *Mycobacterium intracellulare* (WU et al., 2011).

Germacranolídeos foram encontrados em *C. reticulata* (BOHLMANN et al., 1982b), *C. villosa* (BOHLMANN et al., 1982e), *C. ternifolia* (LEE et al., 1982b), *C. harleyi* (BOHLMANN et al., 1984), *C. berteriana* (OBER et al., 1985a), *C. jamaicensis* (OBER et al., 1986b), *C. leptcephala* (OBER et al., 1986a), além da *C. pinnatifida* (FERREIRA et al., 1980), *C. urticifolia* (OHGUCHI et al., 2009) e *C. zacatechichi* (WU et al., 2011).

Outros grupos também foram encontrados no gênero *Calea*. Furanoheliangolídeos foram encontrados em *C. angusta* (BOHLMANN et al., 1982d), *C. hymenolepis* (BOHLMANN et al., 1982c), *C. hispida* (BOHLMANN et al., 1982f), *C. ternifolia* (FISCHER et al., 1984), *C. rupicola* (SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 1986), *C. leptcephala* (OBER et al., 1986a), *C. crocinervosa* (ORTEGA et al., 1989).

Guaianolídeos foram encontrados em *C. subcordata* (OBER et al., 1984c), *C. solidaginea* (OBER et al., 1985b), *C. leptcephala* (OBER et al., 1986a), *C. jamaicensis* (OBER et al., 1986b).

Heliangolídeos foram encontrados em *C. pilosa* e *C. morri* (BOHLMANN et al., 1981a), *C. oxylepis* (BOHLMANN et al., 1982a), *C. rotundifolia* (BOHLMANN et al., 1981b), *C. villosa* (BOHLMANN et al., 1982e), *C. ternifolia* (LEE et al., 1982a), *C. lantanoides* (VICHNEWSKI et al., 1982), *C. trichomata* (OBER et al., 1984a), *C. berteriana* (OBER et al., 1985a), *C. jamaicensis* (OBER et al., 1986b), *C. megacephala* (OBER et al., 1987c).

Eudesmanolídeos foram encontrados em *C. rotundifolia* (BOHLMANN et al., 1981b), *C. reticulata* (BOHLMANN et al., 1982b), *C. trichomata* (OBER et al., 1984a; OBER et al., 1984b), *C. subcordata* (OBER et al., 1984d; OBER et al., 1987a), *C. septuplinervia* (OBER; FISCHER, 1987b), *C. crocinervosa* (ORTEGA et al., 1989).

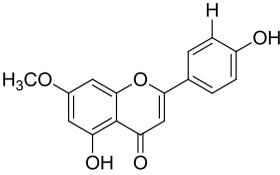
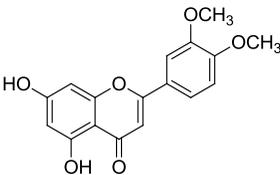
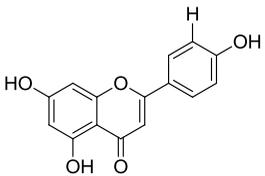
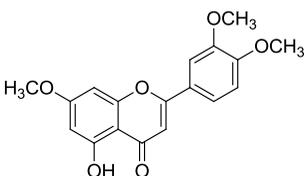
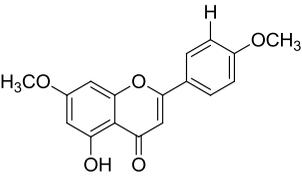
As próximas tabelas relacionam os compostos isolados do gênero *Calea* que apresentam atividades biológicas, bem como as estruturas e classes destes compostos (Tabela 1 e 2).

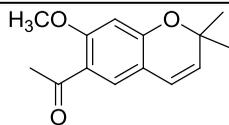
Tabela 1 - Compostos isolados de espécies do gênero *Calea* que apresentam atividade biológica.

<b>Espécie</b>	<b>Compostos químicos isolados</b>	<b>Número identificador</b>	<b>Referência</b>
<i>Calea pinnatifida</i>	Arucanolídeo	C1	Ferreira et al. (1980) Lima et al. (2015a) Sartorelli et al. (2016)
	6-Acetil-7-methoxi-2,2-dimetilcromeno	C2	
	6-(1-Hidroxietil)-7-metoxi-2,2-dimetilcromeno	C3	
	Calealactona C	C4	
<i>Calea platyleps</i>	Caleprunina B	C5	Nascimento et al. (2004a)
	Euparona	C6	
<i>Calea prunifolia</i>	1-(2-Hidroxi-5-(1-metoxietil)fenil)-3-metilbut-2-en-1-ona	C7	Gomez and Gil (2011)
	Quercetina-3-O-rutinosídeo	C8	Puebla et al. (2011)
	Ácido 3,5-Di-O-E-cafeoilquinico	C9	
<i>Calea serrata</i>	Precoceno II	C10	Ribeiro et al. (2011)
<i>Calea uniflora</i>	2-Senecioil-4-(hidroxietil)-fenol	C11	Nascimento et al. (2004b)
	2-Senecioil-4-(angeloiloxietil)-fenol	C12	
	2-senecioil-4-(metoxietil)-fenol	C13	
	2-senecioil-4-(pentadecanoiloxietil)-fenol	C14	
	Uniflorol-A	C15	Nascimento et al. (2007)
	Uniflorol-B	C16	
	Cafeato de Etila	C17	Lima et al. (2015b)
Buteína	C18		
Orobol	C19		

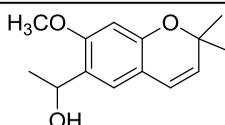
<i>Calea urticifolia</i>	Juanislamina 2,3-epoxy-juanislamina	<i>C20</i> <i>C21</i>	Castillo et al. (1981) Ohguchi et al. (2009)
	Calealactona A	<i>C22</i>	Yamada et al. (2004) Ohguchi et al. (2009)
	Calealactona B	<i>C23</i>	
	Calealactona C 2,3-epoxy-calealactona A	<i>C4</i> <i>C24</i>	
<i>Calea zacatechichi</i>	4',5-Dihidroxi-7-metoxiflavona	<i>C25</i>	Kohler et al. (2002)
	5,7-Dihidroxi-3',4'-dimetoxiflavona	<i>C26</i>	
	4',5,7-Trihidroxiflavona	<i>C27</i>	
	5-Hidroxi-3',4',7-trimetoxiflavona	<i>C28</i>	
	5-Hidroxi-4',7-dimetoxiflavona	<i>C29</i>	

Tabela 2 - Moléculas que apresentam atividade biológica e respectivas espécies do gênero *Calea*.

<b>Atividade Antiplasmódica</b>	
<b>Flavonoides</b>	
 <p>C25</p>	 <p>C 26</p>
 <p>C 27</p>	 <p>C 28</p>
 <p>C 29</p>	
<i>*Calea zacatechichi</i>	
<b>Atividade Leishmanicida</b>	
<b>Cromenos</b>	



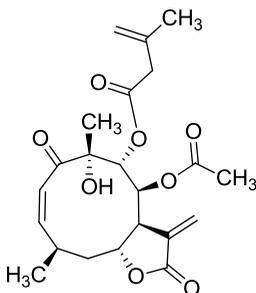
C2



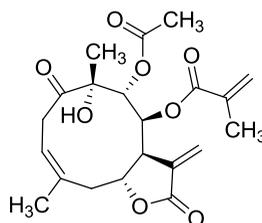
C3

*\*Calea pinnatifida*

### Lactonas Sesquiterpênicas



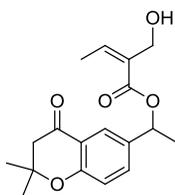
C1



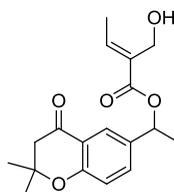
C4

*\*Calea pinnatifida*

### Cromanonas



C15

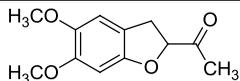


C16

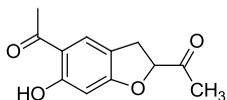
*\*Calea uniflora*

### Atividade Antimicrobiana

### Benzofuranos



C5

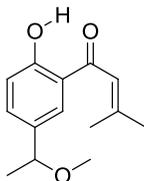


C6

*\*Calea platyleps*

**Atividade Anti-inflamatória**

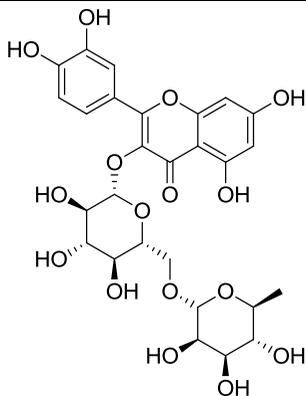
**Derivado da *p*-hidroxiacetofenona**



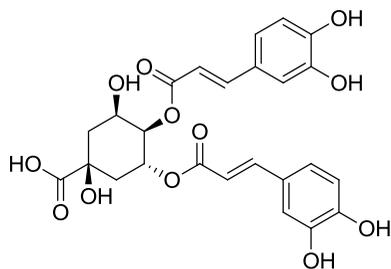
C7

*\*Calea prunifolia*

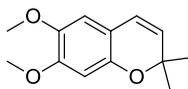
**Atividade Vasodilatadora**



C8

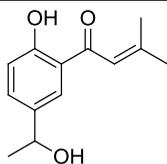


C9

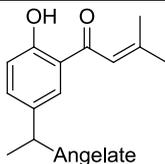
\**Calea prunifolia***Atividade Acaricida****Cromeno**

C10

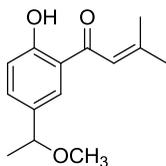
\**Calea serrata***Atividade Tripanocida****Derivados da *p*-hidroxiacetofenona**



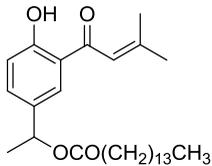
C11



C12



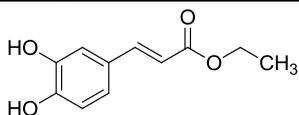
C13



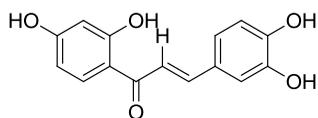
C14

*\*Calea uniflora*

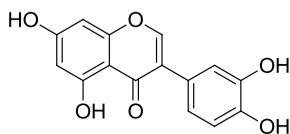
### Compostos fenólicos



C17



C18

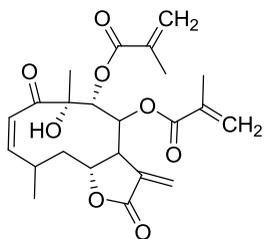


C19

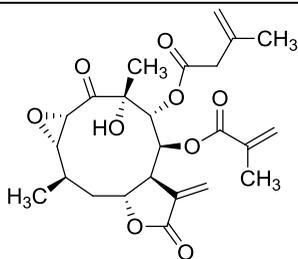
*\*Calea uniflora*

### Atividade citotóxica

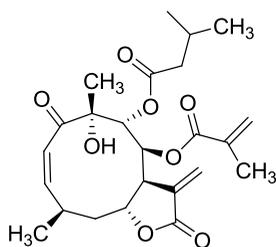
### Lactonas Sesquiterpênicas



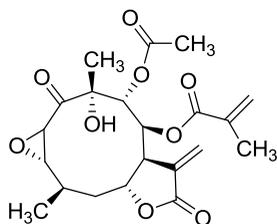
C20



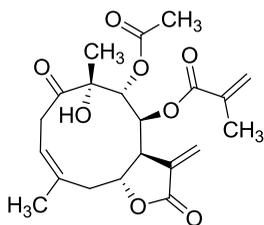
C21



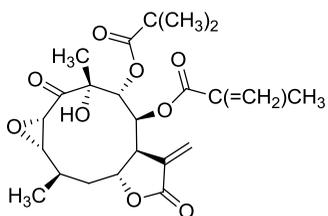
C22



C23



C4



C24

\**Calea urticifolia*

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar a influência de fatores ambientais na produção de metabólitos secundários dos extratos de *Calea pinnatifida* (R.Br.) Less. coletada em diferentes altitudes na Floresta Ombrófila Densa, em duas estações do ano.

#### 3.2 Objetivos específicos

Coletar e analisar amostras de solo nas duas altitudes onde a planta se desenvolve;

Determinar o perfil dos metabólitos secundários dos extratos de *C. pinnatifida* em espécimes coletadas nas duas altitudes, nas estações de verão e inverno;

Realizar cromatografia em camada delgada de alta eficiência e a leitura das placas de sílica em espectrofotodensitômetro CAMAG.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

A coleta das folhas de *C. pinnatifida* ocorreu nos meses de fevereiro e agosto de 2016, correspondendo às estações de verão e inverno no hemisfério sul, respectivamente. O material vegetal foi coletado em dois pontos correspondentes a duas altitudes diferentes: na Floresta Ombrófila Densa (FOD) formação das Terras Baixas com altitude entre de 0 a 30 m e FOD formação Altomontana com altitude acima de 800 m (IBGE, 2012).

O local de cada coleta foi registrado com GPS com suas respectivas altitudes e coordenadas geográficas e o material vegetal coletado foi levado ao Herbário Pe. Dr. Raulino Reitz (CRI) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) para identificação botânica, herborização e registro (CRI 11964).

Uma das coletas foi realizada próximo à BR-101, em propriedade privada de uma empresa, entre os municípios de Içara e Criciúma (28°47'32.8"S 49°20'13.6"W, altitude 25 m). A outra coleta ocorreu na Serra da Rocinha, que liga o município de Timbé do Sul – SC a São José dos Ausentes – RS ( 28°48'34.0"S 49°56'10.9"W, altitude 800 m). Os pontos de coleta estão demonstrados na Figura 6.



## 4.2 EXTRAÇÃO

De cada material vegetal coletado nas diferentes altitudes no verão, foi realizado a secagem em estufa a 50-60°C, e, posteriormente foi realizado a extração pela técnica de maceração com álcool 96% na proporção 1:10 (p/v). Para a extração, as folhas foram reduzidas ao menor tamanho possível de partícula e permaneceram por 15 dias em maceração. Em seguida o macerado foi filtrado e o solvente evaporado no rotaevaporador. Desta forma, obteve-se o extrato etanólico (LIMA et al., 2015a).

Após a obtenção do extrato etanólico, este foi submetido a processo de partição líquido-líquido, com solventes de polaridades crescentes, sendo estes: ciclohexano, diclorometano e acetato de etila, de forma sequencial (Figuras 7 e 8), visando a uma semipurificação das substâncias através das propriedades físico-químicas dos compostos (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). O mesmo procedimento foi realizado para coleta de inverno com uma extração a mais com acetato de etila de forma não sequencial (Figura 9).

Após o fracionamento líquido-líquido, foram realizadas cromatografias em camada delgada dos extratos e das frações.

Figura 7 - Esquema da Extração e Particionamento de *C. pinnatifida* no verão.

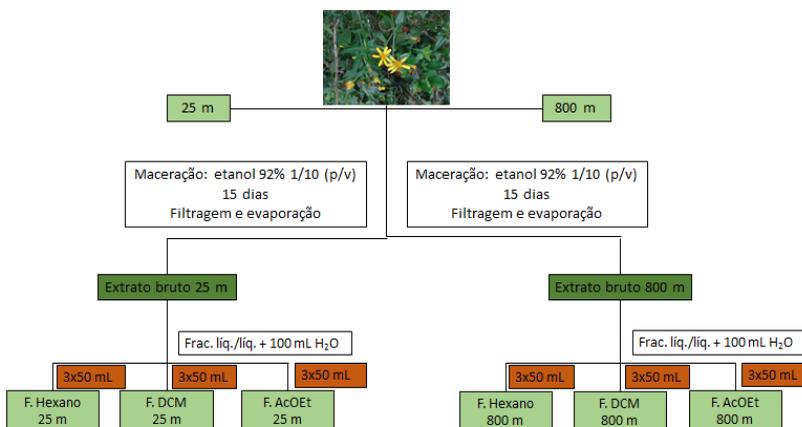


Figura 8 - Esquema da Extração e Particionamento de *C. pinnatifida* no inverno.

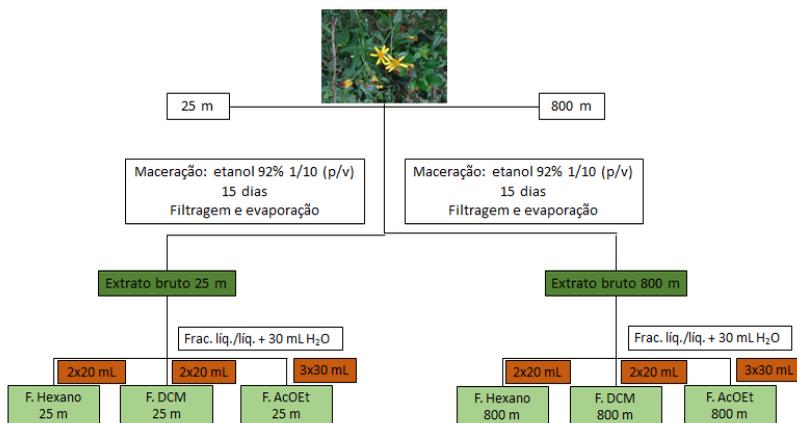
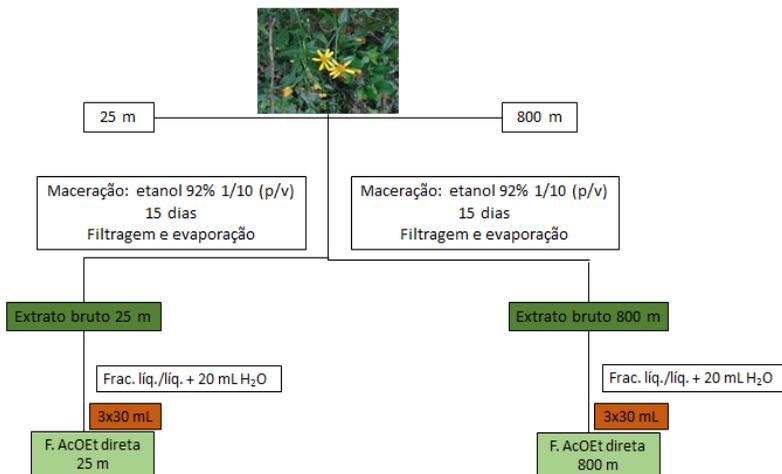


Figura 9 - Esquema da Extração e Particionamento de *C. pinnatifida* no inverno, fração acetato de etila direta.



### 4.3 ANÁLISE DO SOLO

A coleta do solo seguiu os procedimentos preconizados pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI). A coleta do solo foi realizada no verão, no mesmo dia da coleta de *C. pinnatifida*. O solo foi coletado em quinze pontos próximos do local onde a planta naturalmente se desenvolve nas duas altitudes de estudo. Após coleta da amostra nos quinze pontos, o solo foi homogeneizado e seco à sombra, totalizando 500 g de solo. Este procedimento foi realizado três vezes totalizando três amostras de 500 g cada para cada altitude. Posteriormente, as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Análises Químicas do Solo da EPAGRI para análise dos aspectos básicos do solo (pH, fósforo, potássio, alumínio, cálcio, manganês e matéria orgânica) e avaliação dos micronutrientes (cobalto, ferro, zinco e manganês).

Também foi verificado o teor de umidade do solo. Para isso, foi pesado o solo fresco e o solo seco (secagem em estufa até peso constante) para cada altitude e, posteriormente, calculado o percentual de umidade. Foram analisadas oito amostras de solo para cada altitude com a finalidade de determinar o teor de umidade do solo.

Foi realizado o teste *t Student* para verificar a variação na concentração dos macronutrientes, micronutrientes e umidade no solo de cada local de coleta.

### 4.4 ANÁLISE DOS COMPONENTES QUÍMICOS

#### 4.4.1 Cromatografia em Camada Delgada

Na pesquisa foi realizada a cromatografia em camada delgada (CCD) dos extratos e frações obtidos de *C. pinnatifida*. Três sistemas de solventes foram escolhidos: tolueno/acetato de etila (9:1), cicloexano/acetona (85:15) e cicloexano (10:0). Os extratos foram solubilizados em acetato de etila e foram preparados 10 mL de cada sistema de solvente para posterior eluição. A cromatografia em camada delgada apresentou resultados que nortearam trabalhos realizados posteriormente na Université de Rennes1, *Laboratoire de Produits Naturels, Synthèse et Chimie Médicinale* (PNSCM), França. Este ensaio

serviu para escolher o sistema de solventes que separasse o maior número de compostos que pudessem ser visualizados em placa cromatográfica.

#### 4.4.2 Análise por CCDAE-UV (Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência-Ultravioleta)

Ao todo foram feitas 32 placas cromatográficas de sílica (10 cm X 20 cm), devido a escolha de seis sistemas de solventes e cinco tipos de reveladores, e duas placas adicionais com o sistema de solvente clorofórmio/acetato de etila 75/25 reveladas com anisaldeído sulfúrico. A escolha de sistema de solventes foi baseada nas diferentes polaridades. Hexano/acetona 9:1 e hexano/acetona 8:2 foram usados para separar compostos apolares; clorofórmio/acetato de etila 75:25 e clorofórmio/acetato de etila 70:30 para compostos polares e apolares; tolueno/acetato de etila 9:1 e Acetato de Etila/Ácido Fórmico/Ácido Acético/Água 100/11/11/27 para compostos mais polares. O motivo da escolha destes sistemas de solventes foi para conseguir separar o maior número de compostos possíveis de *C. pinnatifida*. A escolha do sistema de solventes foi baseada nas CCD realizadas no Brasil e em estudo realizado com a espécie (CARVALHO, 2016).

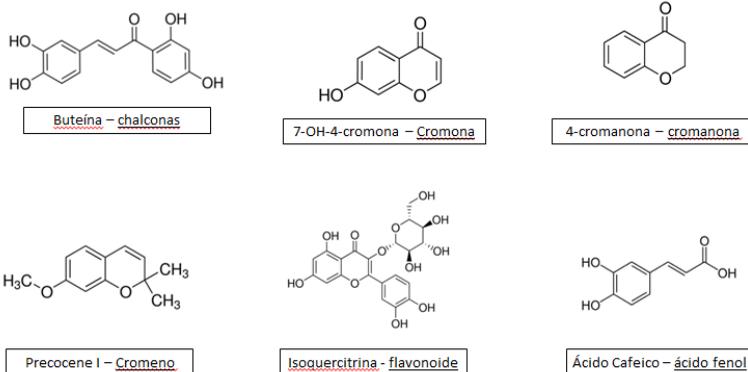
Todas as placas cromatográficas foram observadas em câmara UV nos comprimentos de onda 254 nm e 365 nm.

##### 4.4.2.1 Depósitos dos extratos sobre a placa de sílica

O depositador CAMAG permite realizar depósitos precisos sobre placas de sílica, a fim de realizar uma CCDAE. Assim, a aplicação da amostra é feita de forma automatizada. A escolha do volume a depositar foi de 10 µL por cada amostra na concentração de 0,5 mg/mL para a coleta de fevereiro de 2016. Para a coleta de agosto de 2016, o volume depositado para as amostras foi de 30 µL e a concentração da amostra foi de 1mg/mL. As soluções foram colocadas em um pequeno frasco e encaixadas num suporte. Foi utilizada uma placa de alumínio com sílica gel 60 F<sub>254</sub> 20x10 cm da Merck. Além das amostras a serem analisadas, também foram depositadas sobre as placas seis padrões de referência para posterior comparação com os extratos obtidos da planta. São eles:

buteína, isoquercitrina, precocene I, 7-OH-cromona, 4-cromanona e ácido cafeico. Suas estruturas químicas estão representadas na Figura 10. A escolha dos padrões de referência foi realizada de forma a contemplar diferentes famílias de compostos. A execução do aparelho foi controlada por um *software* denominado *WinCats*.

Figura 10 - Estruturas químicas dos padrões utilizados.



#### 4.4.2.2 Escolha dos sistemas de solventes para a migração

Seis sistemas de solventes diferentes foram selecionados para realizar a migração:

- A: Hexano/acetona (9/1)
- B: Hexano/acetona (8/2)
- C: Clorofórmio/Acetato de Etila (75/25)
- D: Clorofórmio/Acetato de Etila (70/30)
- E: Acetato de Etila/Ácido Fórmico/Ácido Acético/Água (100/11/11/27)
- F: Tolueno/Acetato de Etila (9/1)

A escolha permitiu contemplar solventes de polaridades crescentes, sendo o solvente “A” mais apolar e o solvente “F” muito polar.

#### 4.4.2.3 Escolha dos sistemas de revelação de placas CCD

Vários reativos foram selecionados a fim de revelar placas e diferenciar famílias de compostos:

A: Anisaldeído sulfúrico: 0,5 mL de anisaldeído em 10 mL de ácido acético, adiciona-se 85 mL de metanol e em seguida 5 mL de  $H_2SO_4$ . Pulverização e aquecimento a 120 °C. Os compostos que se tornam evidentes são esteroides, saponinas, terpenos e iridoides. As cores das bandas em luz visível variam de marrom a rosa, azul ou violeta (WAGNER, BLADT, 1996).

B: Reativo de *Dragendorff*: A – 17 g de subnitrito de bismuto, 200 g de ácido tartárico e 800 mL de  $H_2SO_4$ ; B – 160 g de KI em 400 mL de água destilada. Misturar A e B. Pulverização apenas. Os alcaloides se tornam evidentes com este reativo. Em luz visível, tornam-se laranja, vermelho a bordô. O reativo de *Dragendorff* foi escolhido para detecção de alcaloides. Na presença destes compostos em solução, dá-se a formação de precipitados alaranjados, cuja cor varia de acordo com o tipo de composto (amarelo a vermelho-acastanhado). Esta técnica também se aplica à cromatografia em camada delgada com a diferença de o reativo ser pulverizado e a presença de alcaloides ser revelada por uma mancha alaranjada.

C: Reativo de Neu: 1 g de ácido amino-2-etil-difenilborico em 100 mL de metanol. Pulverização e aquecimento a 105 °C. Os flavonoides se tornam evidentes. Em luz visível: amarelo, laranja. Em UV 365 nm: amarelo fluorescente ou laranja. O reativo de Neu foi utilizado para identificar flavonoides. A presença de flavonoides é observada em câmara de UV (365 nm) após revelação, no qual manchas de fluorescência alaranjada (as vezes vermelha), amarela ou verde representam a presença de flavonoides (MARKHAM, 1982; HARBORNE, 1998).

D: Timol sulfúrico: 1 g de timol em 100 mL de etanol/ $H_2SO_4$  (9/1). Pulverização e aquecimento a 105 °C. Os compostos revelados são açúcares e compostos glicosilados. Em luz visível: rosa, vermelho-violeta a laranja e castanho claro.

E: Vanilina sulfúrica: 2 g de vanilina em Etanol/  $H_2SO_4$  (98/2). Pulverização e aquecimento à 105 °C. Os compostos visualizados são álcoois superiores, cetonas, fenóis, esteroides, terpenos, limonoides e compostos carbonilados. Possui uma vasta gama de cores em luz visível. A vanilina sulfúrica foi utilizada como reativo revelador de

componentes de óleos essenciais (terpenoides e fenilpropanoides) (WAGNER, BLADT, 1996).

Para a coleta de verão, foram utilizados todos os sistemas de solventes e todos os reveladores, com análise de uma amostra para todas as frações. Para a coleta do inverno, foi utilizado apenas o melhor sistema de solventes (clorofórmio/acetato de etila 75:25) e o revelador anisaldeído sulfúrico. As análises da coleta de inverno foram realizadas em quadruplicata, gerando dados através do *software Wincats*, para a análise estatística. As placas cromatográficas, que foram migradas no sistema clorofórmio/acetato de etila 75/25 e reveladas em anisaldeído sulfúrico na coleta do verão, foram repetidas com quantidade de amostras e padrões de referências diferentes, 25 µl e 50 µl, além da quantidade usual de 10 µl. Isso porque ocorreu uma banda na altitude de 800 m nas frações diclorometano e acetato de etila que não ocorreu na altitude de 25 m. O aumento das quantidades de amostras teve por finalidade intensificar a cor das bandas nas frações diclorometano e acetato de etila e observar se haveria o aparecimento de banda semelhante na fração cicloexano.

#### 4.4.2.4 Leitura das placas

A visualização da migração dos compostos presentes no extrato foi realizado em um espectrofotodensitômetro TLC Scanner 3 CAMAG em seis diferentes comprimentos de onda (200, 230, 260, 290, 320 e 350 nm). Obtiveram-se cromatogramas em 3D que correspondem aos compostos presentes na placa de sílica e visíveis para os seis comprimentos de onda. As placas também foram observadas em câmara UV nos comprimentos de onda 254 nm e 365 nm. A leitura em câmara UV foi fotografada. Todas as placas migradas nos seis sistemas de solventes foram escaneadas no espectrofotodensitômetro e dados foram gerados no *software Wincats*. O *software* gera cromatogramas tridimensionais com *R<sub>f</sub>s* (fatores de retenção) representados no eixo X e área total dos picos representando o eixo Y. Como são seis comprimentos de onda diferentes, foram gerados 30 cromatogramas diferentes. Para análises dos dados, foi escolhido o sistema de solventes que apresentou o maior número de picos em determinado comprimento de onda com 10 µl de quantidade de amostra. O sistema de solventes escolhido foi clorofórmio/acetato de etila 75:25 no comprimento de onda 230 nm.

#### 4.4.2.5 Análise estatística

Para as amostras das duas altitudes realizadas em quadruplicata da coleta de inverno, foi realizada análise estatística: teste *t Student* no *software* SPSS. O nível de significância foi considerado  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 EXTRATOS BRUTOS E PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

Os rendimentos dos extratos brutos de *C. pinnatifida* são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Rendimentos dos extratos das folhas de *C.pinnatifida*.

Altitude/Estação	Material Vegetal Seco (g)	Extrato bruto (g)	Rendimento (%)
25 m/verão	86	10,3	12,0
800 m/verão	65	6,9	10,6
25 m/inverno	26	2,2	8,5
800 m/inverno	24	1,8	7,5

### 5.2 ANÁLISE DO SOLO

Os resultados da análise dos solos encontram-se nos laudos fornecidos pela EPAGRI (ANEXO A) e os dados de umidade no ANEXO B. A tabela 4 demonstra os principais parâmetros de análise do solo bem como suas análises estatísticas.

Tabela 4 - Análise estatística dos parâmetros do solo.

Parâmetros	Locais de coleta		Teste <i>t</i> (0,05)
	25 m	800 m	
% argila (m/v)	32,3 ± 1,53	18,3 ± 0,58	0,000*
pH-Água 1:1	4,5 ± 0,06	5,2 ± 0,20	0,004*
P (mg/dm <sup>3</sup> )	3,9 ± 0,98	12,1 ± 2,31	0,005*
K (mg/dm <sup>3</sup> )	146,7 ± 4,16	537,3 ± 16,17	0,000*
M. O. (%)	2,2 ± 0,06	4,4 ± 0,26	0,000*
Al (cmolc/dm <sup>3</sup> )	1,9 ± 0,26	0,7 ± 0,75	0,060
Ca (cmolc/dm <sup>3</sup> )	3,1 ± 0,17	7,5 ± 2,06	0,064
Mg (cmolc/dm <sup>3</sup> )	2,2 ± 0,17	3,1 ± 0,51	0,041*
Cu (mg/dm <sup>3</sup> )	0,8 ± 0,06	2,3 ± 0,12	0,000*

Zn (mg/dm <sup>3</sup> )	2,2 ± 0,10	5,7 ± 1,72	0,025*
Fe (mg/dm <sup>3</sup> )	209 ± 14,18	33,3 ± 5,51	0,000*
Mn (mg/dm <sup>3</sup> )	81 ± 13,16	54,1 ± 9,70	0,046*
Umidade	17,61 ± 1,27	30,54 ± 4,01	0,000*

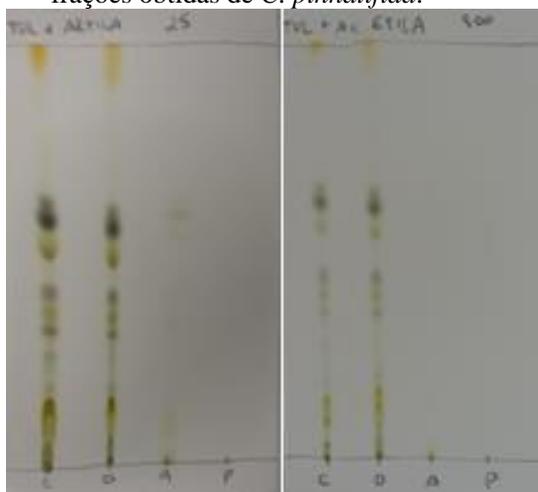
\*p<0,05

### 5.3 ANÁLISE DOS COMPONENTES QUÍMICOS

#### 5.3.1 Cromatografia em Camada Delgada

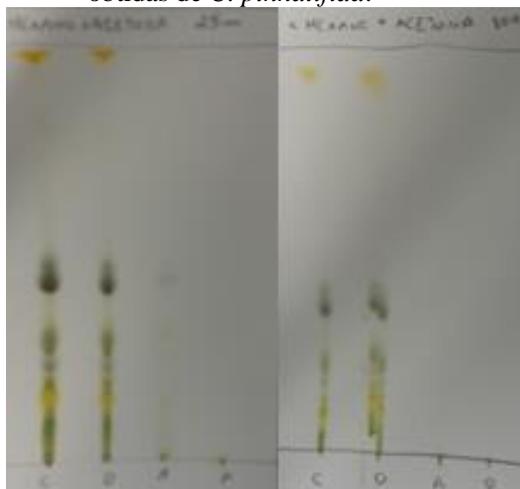
Os melhores sistemas de solventes foram tolueno/acetato de etila (9:1) e cicloexano/acetona (85:15) que estão demonstrados nas figuras 11 e 12.

Figura 11 - Cromatografia em Tolueno/Acetato de Etila (9:1) das frações obtidas de *C. pinnatifida*.



Legenda: C:cicloexano, D:Diclorometano, A: Acetato de Etila,  
P: Padrão, 25 m e 800 m.

Figura 12 - Cromatografia em Ciclohexano/Acetona (85:15) das frações obtidas de *C. pinnatifida*.



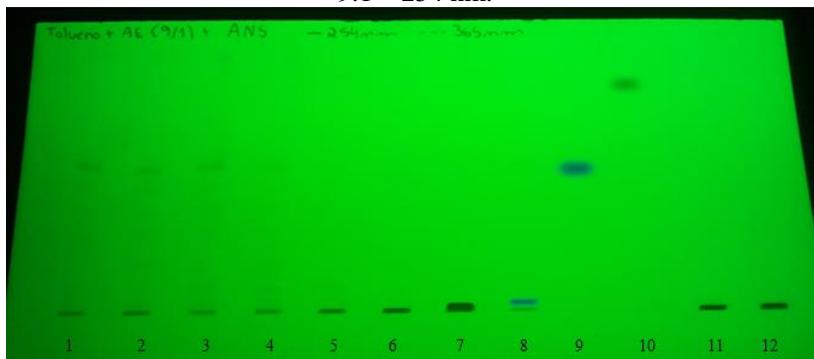
Legenda: C:ciclohexano, D:Diclorometano, A: Acetato de Etila,  
P: Padrão, 25 m e 800 m.

### 5.3.2 Análise por CCDAE -UV

#### 5.3.2.1 Análise da coleta do verão

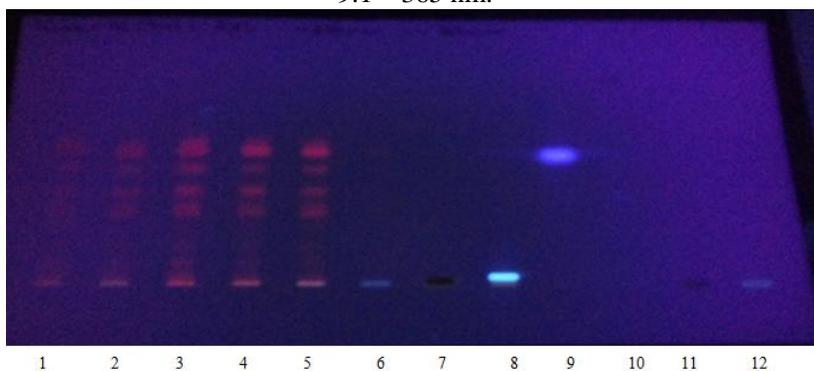
O sistema de solventes tolueno-acetato de etila 9:1 foi o que apresentou uma melhor visualização de bandas, sendo que no comprimento de onda de 365 nm foi melhor do que no comprimento de onda 254 nm (Figuras 13 e 14).

Figura 13 - Leitura em câmara UV no sistema Tolueno-Acetato de Etila 9:1 – 254 nm.



Legenda: Frações: 1-hexano 25 m, 2-hexano 800 m, 3-diclorometano 25 m, 4-diclorometano 800 m, 5-acetato de etila 25 m, 6-acetato de etila 800 m; Referências: 7-buteína, 8-7-OH-4-cromona, 9-4-cromanona, 10-precocene I, 11-isoquercitrina, 12-ácido cafeico.

Figura 14 - Leitura em câmara UV no sistema Tolueno-Acetato de Etila 9:1 – 365 nm.

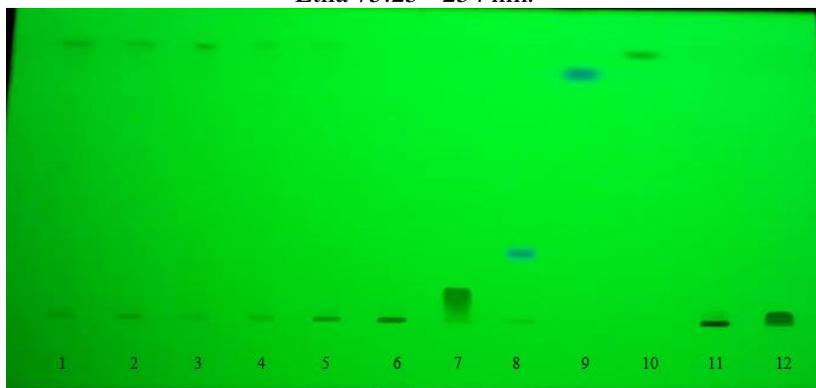


Legenda: Frações: 1-hexano 25 m, 2-hexano 800 m, 3-diclorometano 25 m, 4-diclorometano 800 m, 5-acetato de etila 25 m, 6-acetato de etila 800 m; Referências: 7-buteína, 8-7-OH-4-cromona, 9-4-cromanona, 10-precocene I, 11-isoquercitrina, 12-ácido cafeico.

Pode-se observar que o sistema de solventes que melhor apresentou leitura no *software Wincats* foi clorofórmio/acetato de etila

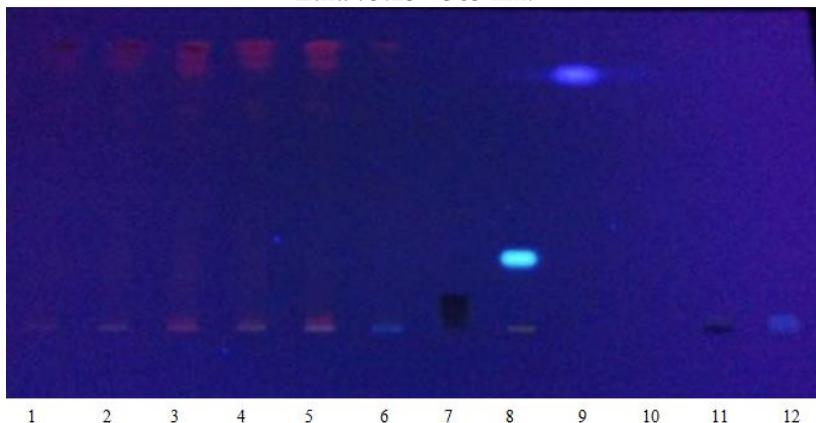
75:25. Assim, apresentam-se as placas cromatográficas nestas condições observadas em câmara UV nos comprimentos de onda 254 nm e 365 nm (Figuras 15 e 16).

Figura 15 - Leitura em Câmara UV no sistema Clorofórmio-Acetato de Etila 75:25 - 254 nm.



Legenda: Frações: 1-hexano 25 m, 2-hexano 800 m, 3-diclorometano 25 m, 4-diclorometano 800 m, 5-acetato de etila 25 m, 6-acetato de etila 800 m; Referências: 7-buteína, 8-7-OH-4-cromona, 9-4-cromanona, 10-precocene I, 11-isoquercitrina, 12-ácido cafeico.

Figura 16 - Leitura em Câmara UV no sistema Clorofórmio-Acetato de Etila 75:25 - 365 nm.



Legenda: Frações: 1-hexano 25 m, 2-hexano 800 m, 3-diclorometano 25 m, 4-diclorometano 800 m, 5-acetato de etila 25 m, 6-acetato de etila 800 m; Referências: 7-buteína, 8-7-OH-4-cromona, 9-4-cromanona, 10-precocene I, 11-isoquercitrina, 12-ácido cafeico.

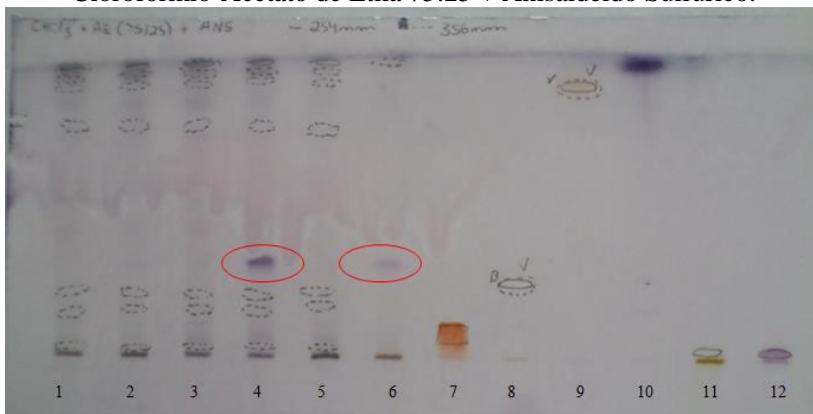
Na tabela 5 são apresentados os resultados dos testes com os diferentes reativos.

Tabela 5 - Identificação qualitativa dos extratos de *C. pinnatifida*.

<b>Metabólitos secundários</b>	<b>Testes</b>	<b>Cores</b>	<b>Resultados</b>
Alcaloides	Dragendorff	alaranjado	-
Flavonoides	Neu	Fluorescência alaranjada, amarela ou verde	-
Terpenoides Fenilpropanoides Fenóis Álcoois Óleos essenciais	Vanilina sulfúrica	Amarelo-marrom Azul	-
Açúcares	Timol sulfúrico	Rosa	-
Esteroides Terpenos Saponinas	Anisaldeído sulfúrico	Violeta Azul Vermelho Cinza Verde	+

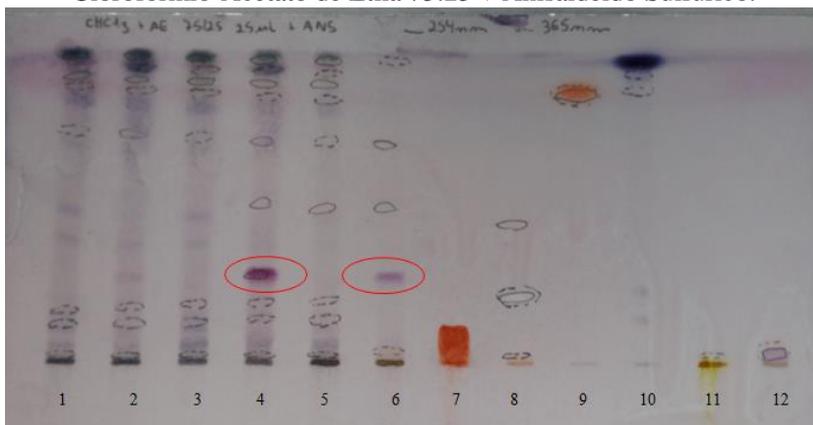
As Figuras 17, 18 e 19 representam a placa cromatográfica no sistema clorofórmio-acetato de etila 75:25 e reativo de revelação anisaldeído sulfúrico. Houve o aparecimento de uma banda nas frações diclorometano e aceto de etila apenas na altitude de 800 m. O aumento da quantidade de amostras e referências (25 µl e 50 µl) confirmou a presença das bandas com maior intensidade de cor, inclusive com aparecimento de banda na fração hexano a 800 m na quantidade de 50 µl.

Figura 17 - Cromatograma 10  $\mu$ l das amostras e referências – Clorofórmio-Acetato de Etila 75:25 + Anisaldeído Sulfúrico.



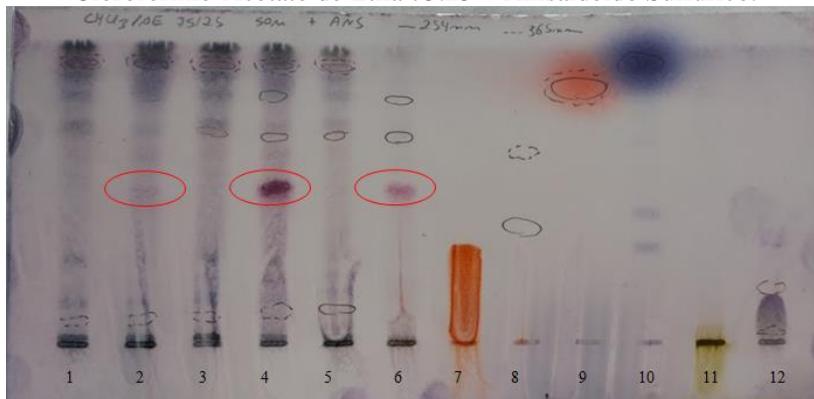
Legenda: Frações: 1-hexano 25 m, 2-hexano 800 m, 3-diclorometano 25 m, 4-diclorometano 800 m, 5-acetato de etila 25 m, 6-acetato de etila 800 m; Referências: 7-buteína, 8-7-OH-4-cromona, 9-4-cromanona, 10-precocene I, 11-isoquercitrina, 12-ácido cafeico.

Figura 18 - Cromatograma 25  $\mu$ l das amostras e referências – Clorofórmio-Acetato de Etila 75:25 + Anisaldeído Sulfúrico.



Legenda: Frações: 1-hexano 25 m, 2-hexano 800 m, 3-diclorometano 25 m, 4-diclorometano 800 m, 5-acetato de etila 25 m, 6-acetato de etila 800 m; Referências: 7-buteína, 8-7-OH-4-cromona, 9-4-cromanona, 10-precocene I, 11-isoquercitrina, 12-ácido cafeico.

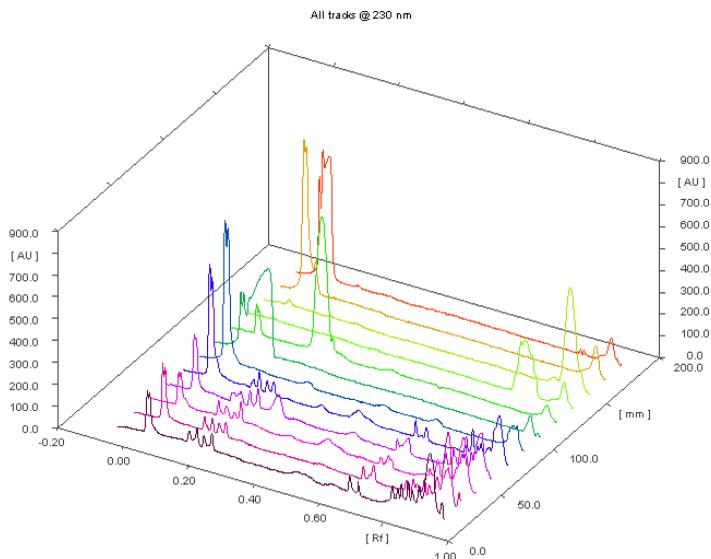
Figura 19 - Cromatograma 50 µl das amostras e referências – Clorofórmio-Acetato de Etila 75:25 + Anisaldeído Sulfúrico.



Legenda: Frações: 1-hexano 25 m, 2-hexano 800 m, 3-diclorometano 25 m, 4-diclorometano 800 m, 5-acetato de etila 25 m, 6-acetato de etila 800 m; Referências: 7-buteína, 8-7-OH-4-cromona, 9-4-cromanona, 10-precocene I, 11-isoquercitrina, 12-ácido cafeico.

A Figura 20 representa o cromatograma com todas as amostras e padrões no sistema de solventes clorofórmio-acetato de etila 75:25 no comprimento de onda 230 nm.

Figura 20 - Densitograma  $\text{CHCl}_3$ -AcOEt 75:25 - 230 nm.



De baixo para cima: track1: cicloexano 25 m; track 2: cicloexano 800 m, track 3: diclorometano 25 m; track 4: diclorometano 800 m; track 5: acetato de etila 25 m; track 6: acetato de etila 800 m; track 7: buteína, track 8: 7-OH-cromanona; track 9: 4-cromanona; track 10: precocene I; track 11: isoquercetrina; track 12: ácido cafeico.

Fonte: *Wincats software*

O sistema de solventes clorofórmio/acetato de etila 75:25 apresentou o maior número de picos no densitograma. O *software* calcula as áreas de cada pico e respectivos *Rfs* para cada amostra. Os densitogramas assim como as tabelas com *Rfs* e cálculos de área dos picos das frações hexano, diclorometano e acetato de etila estão representados nas Figuras 21, 22, 23, 24, 27 e 38. As tabelas 6, 7 e 8 representam os intervalos de *Rfs* nos respectivos picos nas duas altitudes.

Figura 21 - Densitograma fração hexano 25 m.

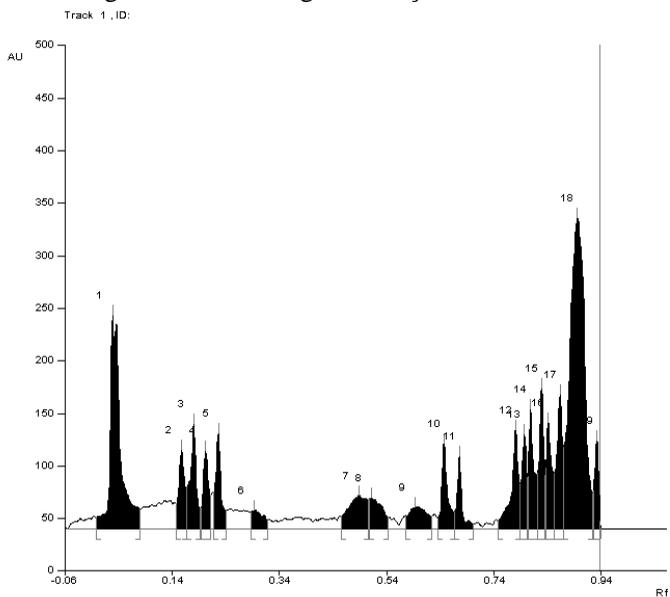


Figura 22 - Densitograma fração hexano 800 m.

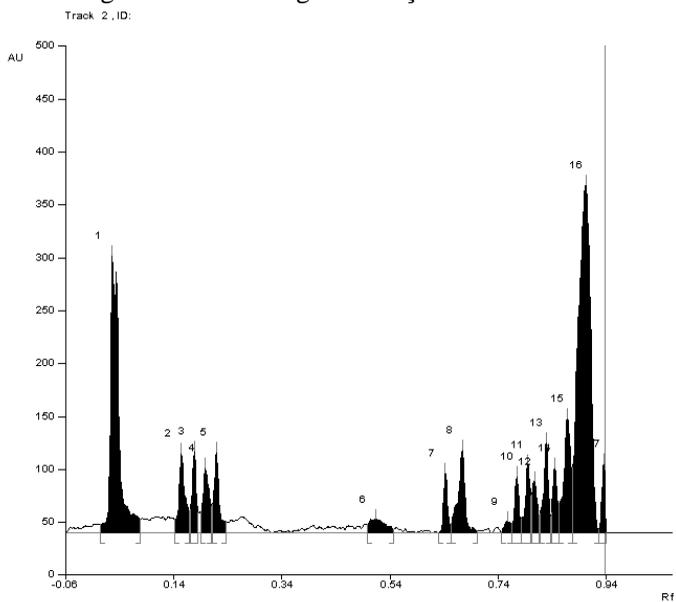


Tabela 6 - Área dos picos nas respectivas altitudes fração hexano.

<b>Picos</b>	<b>Rfs</b>	<b>Área 25 m</b>	<b>Área 800 m</b>
Pico 1	0,00 – 0,07	4970	5089
Pico 2	0,14 - 0,16	893	989
Pico 3	0,17 - 0,19	1211	881
Pico 4	0,19 - 0,21	852	897
Pico 5	0,21 - 0,24	1211	926
Pico 6	0,25 – 0,29	310	0
Pico 7	0,40 – 0,49	1115	0
Pico 8	0,64 - 0,66	857	519
Pico 9	0,66 - 0,69	680	1609
Pico 10	0,77 - 0,79	811	764
Pico 11	0,79 - 0,80	900	851
Pico 12	0,80 - 0,82	1295	829
Pico 13	0,82 - 0,83	1354	956
Pico 14	0,83 - 0,85	1227	1255
Pico 15	0,85 - 0,87	1738	1990
Pico 16	0,87 - 0,90	4712	3403
Pico 17	0,90 - 0,92	2147	2383
Pico 18	0,92 - 0,94	229	117

Fonte: *Software Wincats*

Figura 23 - Densitograma fração diclorometano 25 m.

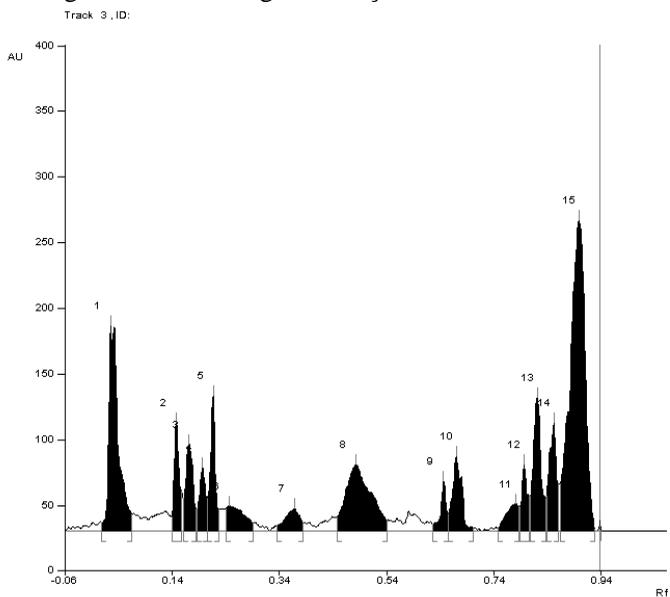


Figura 24 - Densitograma fração diclorometano 800 m.

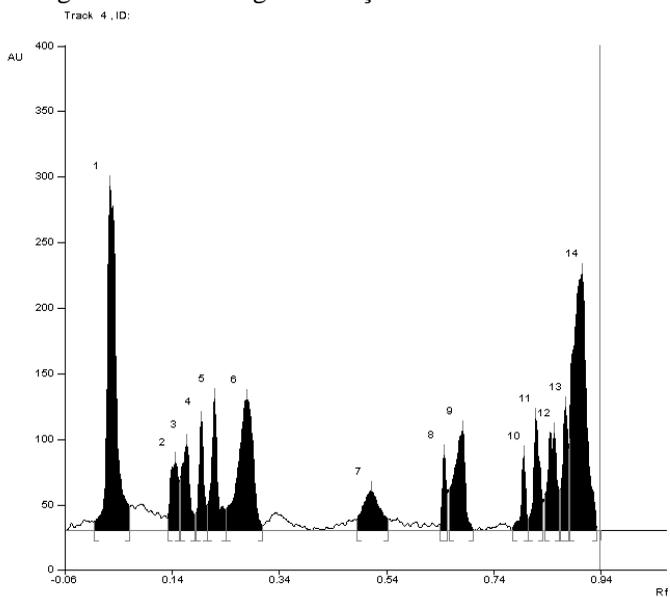


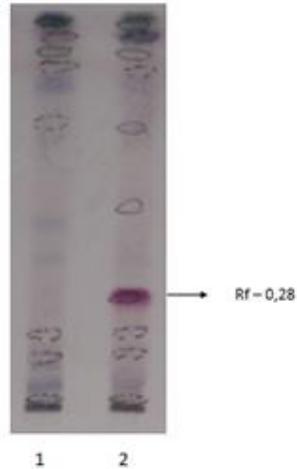
Tabela 7 - Área dos picos nas respectivas altitudes fração DCM.

Picos	Rf	Área 25 m	Área 800 m
Pico 1	0,00 – 0,06	6133	7103
Pico 2	0,14 - 0,16	1173	1022
Pico 3	0,16 - 0,18	924	987
Pico 4	0,18 - 0,20	721	992
Pico 5	0,20 - 0,23	1218	1344
Pico 6	0,23 - 0,28	418	1260
Pico 7	0,34 – 0,38	405	0
Pico 8	0,47 - 0,55	1430	860
Pico 9	0,64 - 0,65	355	656
Pico 10	0,65 - 0,69	1275	2499
Pico 11	0,75 - 0,80	869	798
Pico 12	0,80 - 0,83	2291	1560
Pico 13	0,83 - 0,86	1742	2039
Pico 14	0,86 - 0,90	5157	4288
Pico 15	0,90 - 0,91	1103	1117

Fonte: *Software Wincats*

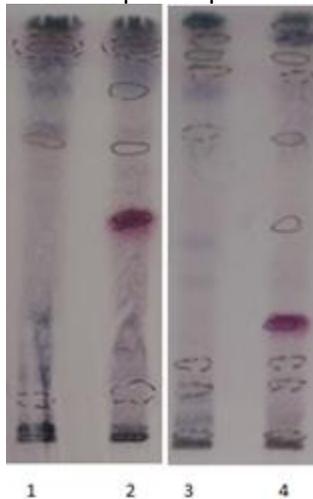
A placa cromatográfica, que foi revelada com anisaldeído sulfúrico, apresentou uma banda mais intensa na altitude de 800 m e não houve presença desta banda na altitude de 25 m. É possível observar esta banda na placa (Figura 25) com *Rf* igual a 0,28. Para confirmar que esta banda aparece somente na altitude de 800 m, foi realizada duas novas placas cromatográficas com quantidade diferente de amostras depositadas, 25 µl e 50 µl. Esse procedimento confirmou a presença da banda apenas na altitude de 800 m (Figura 26). É provável que este composto seja o pico número 6 representado no cromatograma fração diclorometano.

Figura 25 - Placa cromatográfica da fração diclorometano no sistema clorofórmio-acetato de etila 75:25 revelada com anisaldeído sulfúrico - 10  $\mu$ l.



1- Diclorometano 25 m; 2- diclorometano 800 m

Figura 26 - Placa cromatográfica da fração diclorometano no sistema clorofórmio-acetato de etila 75:25 revelada com anisaldeído sulfúrico - 25  $\mu$ l e 50  $\mu$ l.



- 1- Diclorometano 25 m – 25 µl; 2- Diclorometano 800 m – 25 µl; Diclorometano 25 m – 50 µl; Diclorometano 800 m – 50 µl.

Figura 27 - Densitograma fração acetato de etila 25 m.

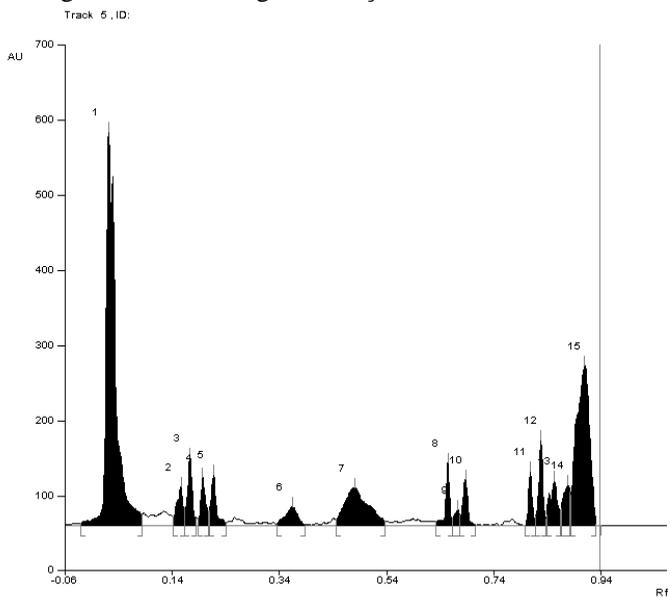


Figura 28 - Densitograma fração acetato de etila 800 m.

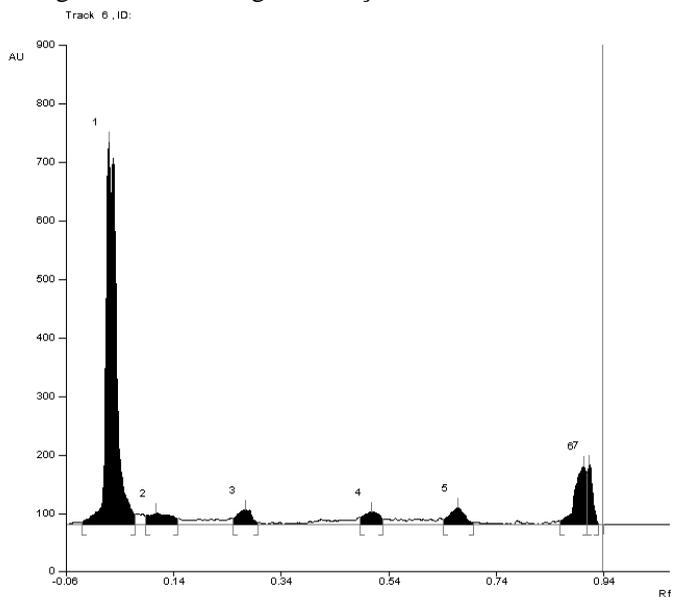


Tabela 8 - Área dos picos nas respectivas altitudes fração acetato de etila.

Picos	Rfs	Área 25 m	Área 800 m
Pico 1	0,00 – 0,06	5923	6215
Pico 2	0,14 - 0,16	650	188
Pico 3	0,16 - 0,18	992	0
Pico 4	0,18 - 0,21	877	0
Pico 5	0,21 - 0,24	954	0
Pico 6	0,44 - 0,52	767	911
pico 7	0,64 - 0,66	790	621
Pico 8	0,66 - 0,68	253	0
Pico 9	0,68 - 0,70	880	0
Pico 10	0,78 - 0,81	985	0
Pico 11	0,81 - 0,84	1861	0
Pico 12	0,84 - 0,86	1462	446
Pico 13	0,86 - 0,88	1512	0

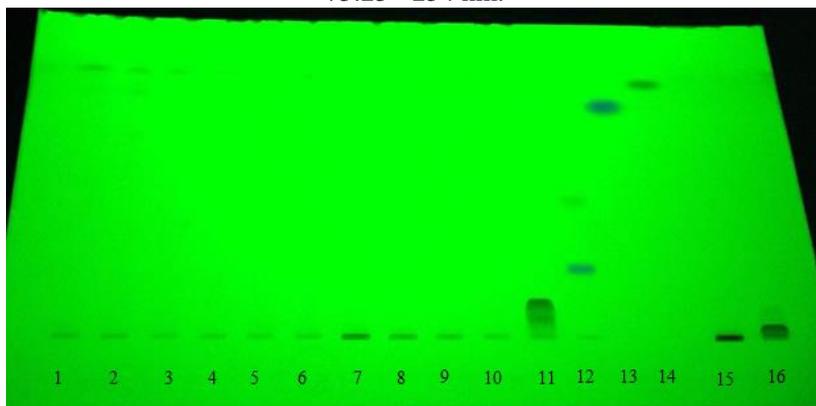
Pico 14	0,88 - 0,91	3342	0
Pico 15	0,91 - 0,93	1407	1179

Fonte: *Software Wincats*

### 5.3.2.2 Análise da coleta do inverno

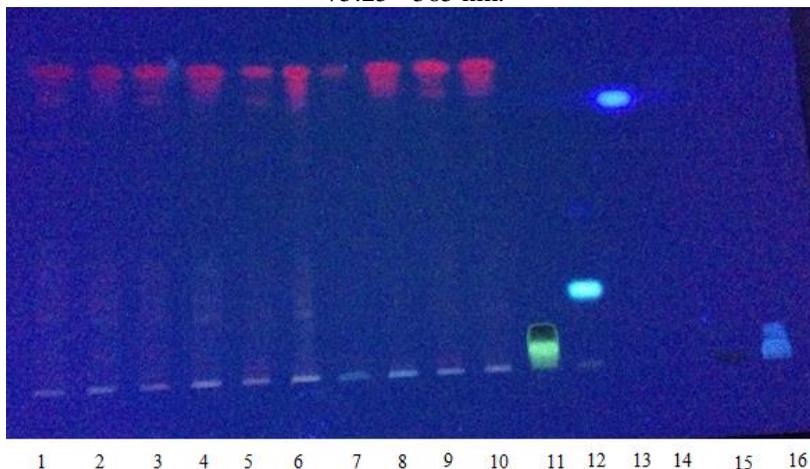
As Figuras 29 e 30 representam os cromatogramas no sistema de solventes clorofórmio-acetato de etila 75:25 reveladas em câmara UV nos comprimentos de onda 254 e 365 nm. A Figura 31 representa a placa revelada com anisaldeído sulfúrico no mesmo sistema de solventes.

Figura 29 - Leitura em Câmara UV - Clorofórmio-Acetato de Etila 75:25 - 254 nm.



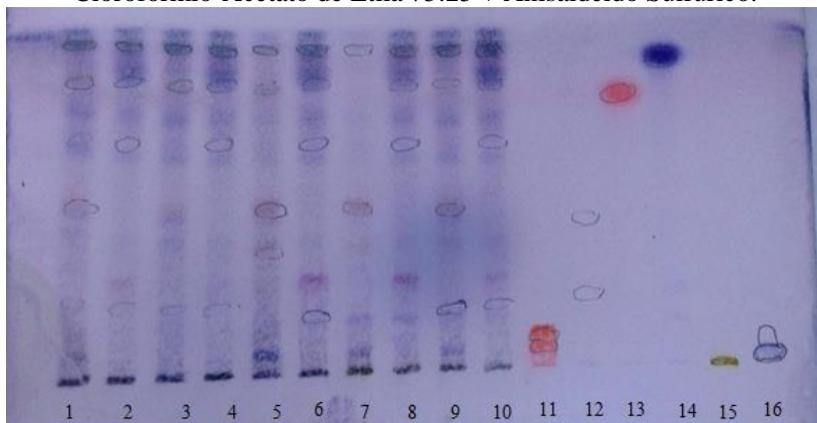
Legenda: Frações: 1-extrato bruto 25 m, 2-extrato bruto 800 m, 3- hexano 25 m, 4-hexano 800 m, 5-diclorometano 25 m, 6-diclorometano 800 m, 7-acetato de etila 25 m, 8-acetato de etila 800 m, 9-acetato de etila não sequencial 25 m, 10-acetato de etila não sequencial 800 m; Referências: 11-buteína, 12-7-OH-4-cromona, 13-4-cromanona, 14-precocene I, 15-isoquercitrina, 16-ácido cafeico.

Figura 30 - Leitura em Câmara UV - Clorofórmio-Acetato de Etila 75:25 - 365 nm.



Legenda: Frações: 1-extrato bruto 25 m, 2-extrato bruto 800 m, 3-hexano 25 m, 4-hexano 800 m, 5-diclorometano 25 m, 6-diclorometano 800 m, 7-acetato de etila 25 m, 8-acetato de etila 800 m, 9-acetato de etila não sequencial 25 m, 10-acetato de etila não sequencial 800 m; Referências: 11-buteína, 12-7-OH-4-cromona, 13-4-cromanona, 14-precocene I, 15-isoquercitrina, 16-ácido cafeico.

Figura 31 - Cromatograma 30 µl das amostras e referências – Clorofórmio-Acetato de Etila 75:25 + Anisaldeído Sulfúrico.



Legenda: Frações: 1-extrato bruto 25 m, 2-extrato bruto 800 m, 3-hexano 25 m, 4-hexano 800 m, 5-diclorometano 25 m, 6-diclorometano 800 m, 7-acetato de etila 25 m, 8-acetato de etila 800 m, 9-acetato de etila não sequencial 25 m, 10-acetato de etila não sequencial 800 m; Referências: 11-buteína, 12-7-OH-4-cromona, 13-4-cromanona, 14-precocene I, 15-isoquercitrina, 16-ácido cafeico.

A seguir, serão demonstrados os densitogramas do extrato bruto e frações a 254 nm nas duas altitudes.

Figura 32 - Densitograma do extrato bruto a 25 m.

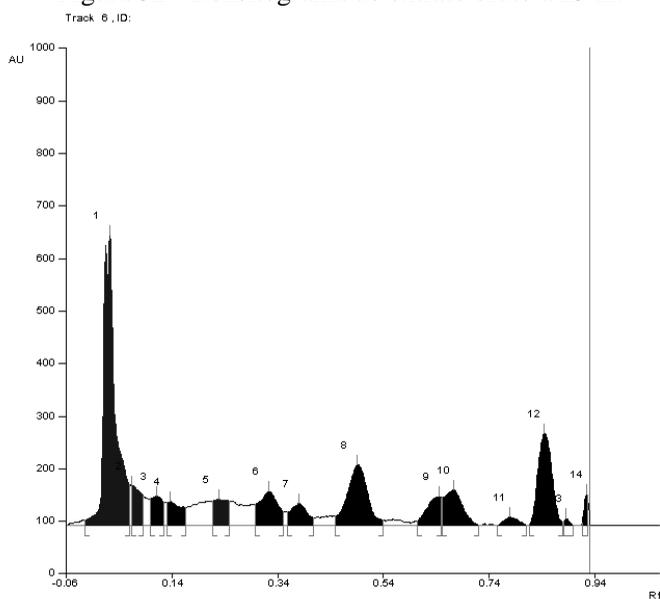


Figura 33 - Densitograma do extrato bruto a 800 m.

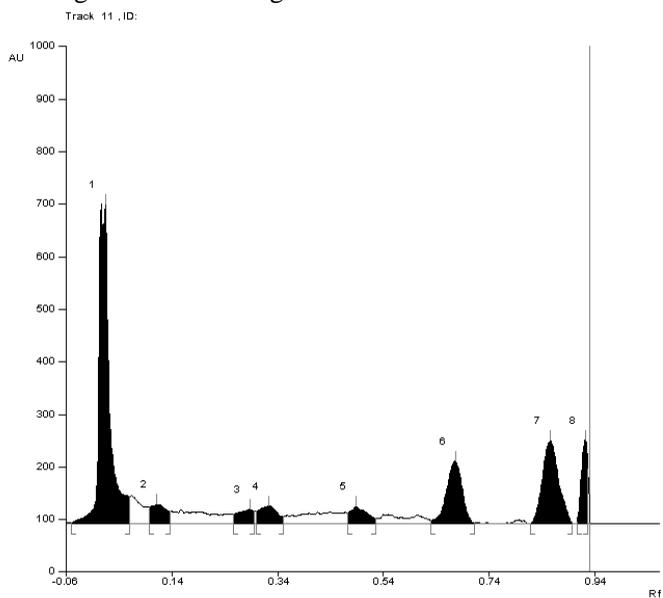


Figura 34 - Densitograma da fração hexano a 25 m.

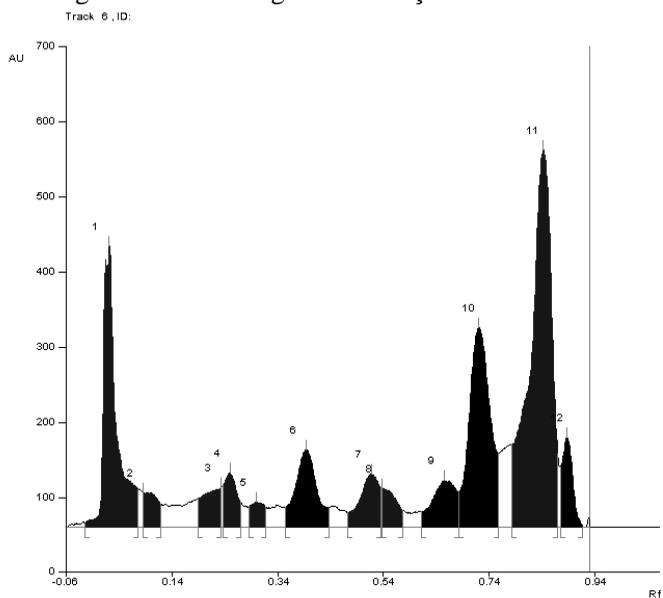


Figura 35 - Densitograma da fração hexano a 800 m.

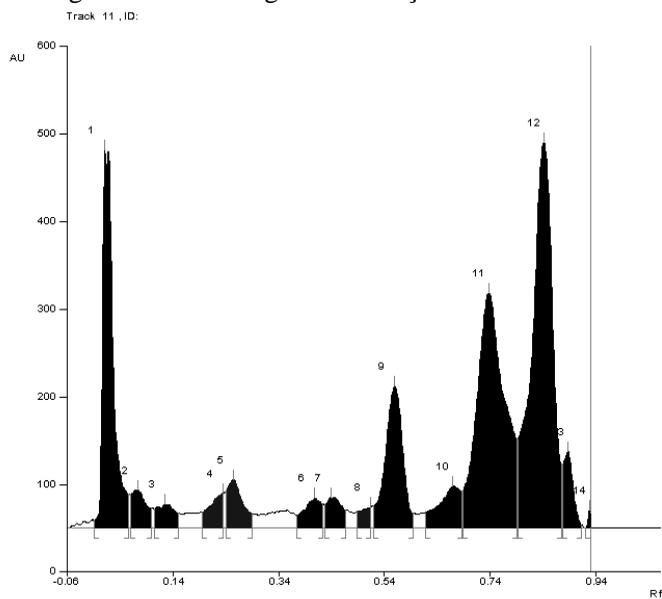


Figura 36 - Densitograma da fração diclorometano a 25 m.

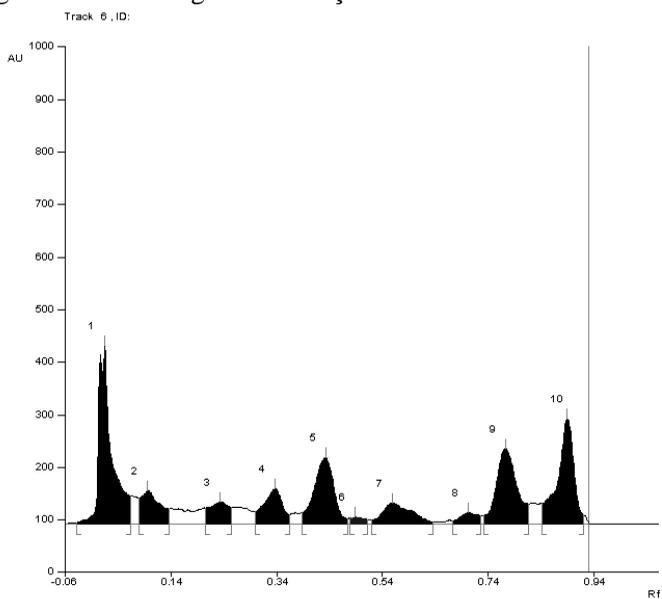


Figura 37 - Densitograma da fração diclorometano a 800 m.

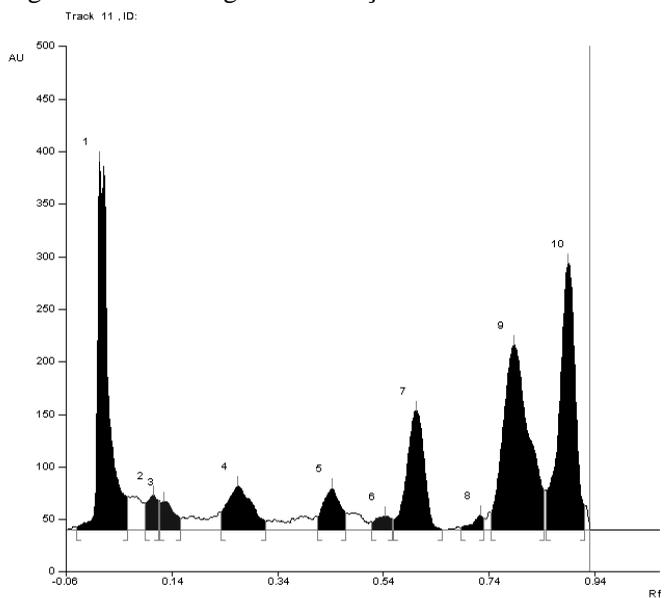


Figura 38 - Densitograma da fração acetato de etila a 25 m.

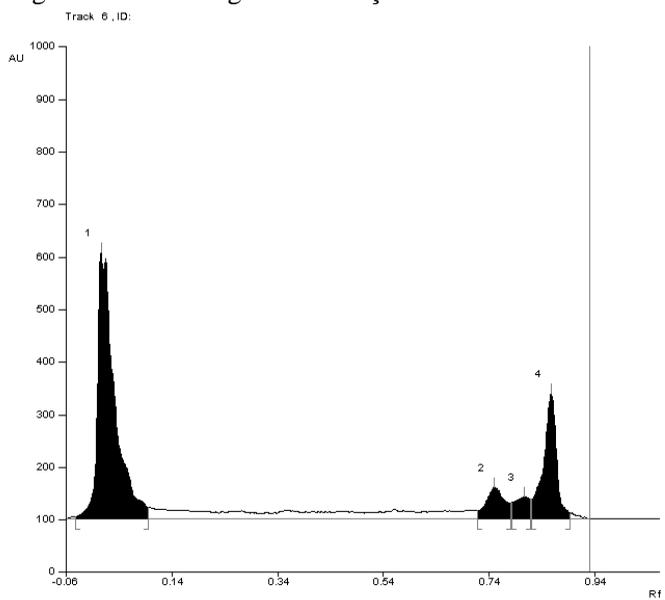
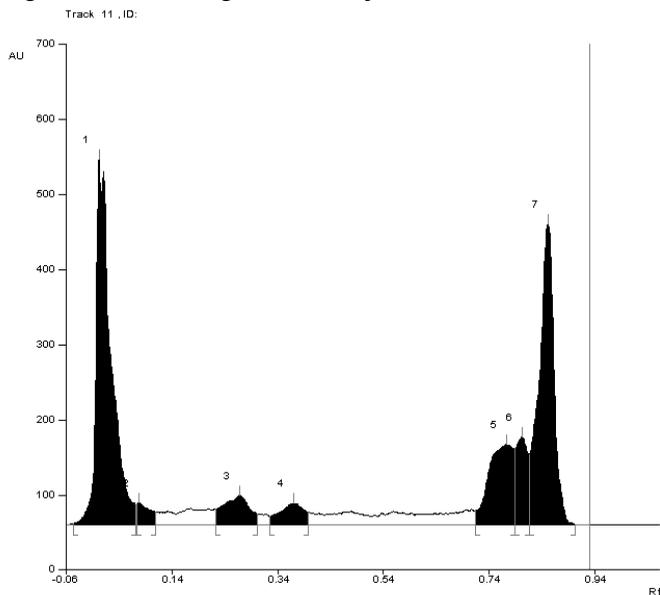


Figura 39 - Densitograma da fração acetato de etila a 800 m.



As análises da coleta do inverno foram realizadas em quadruplicata e desta forma foi calculada a média e o desvio padrão das áreas correspondentes aos picos presentes. Os dados foram retirados do *software Wincats* no comprimento de onda 254 nm. Os dados completos estão apresentados no Anexo C. Os gráficos gerados a partir destes dados estão representados nas Figuras 40, 41 e 42.

Figura 40 - Compostos encontrados em cada extrato ou fração a 25 metros.

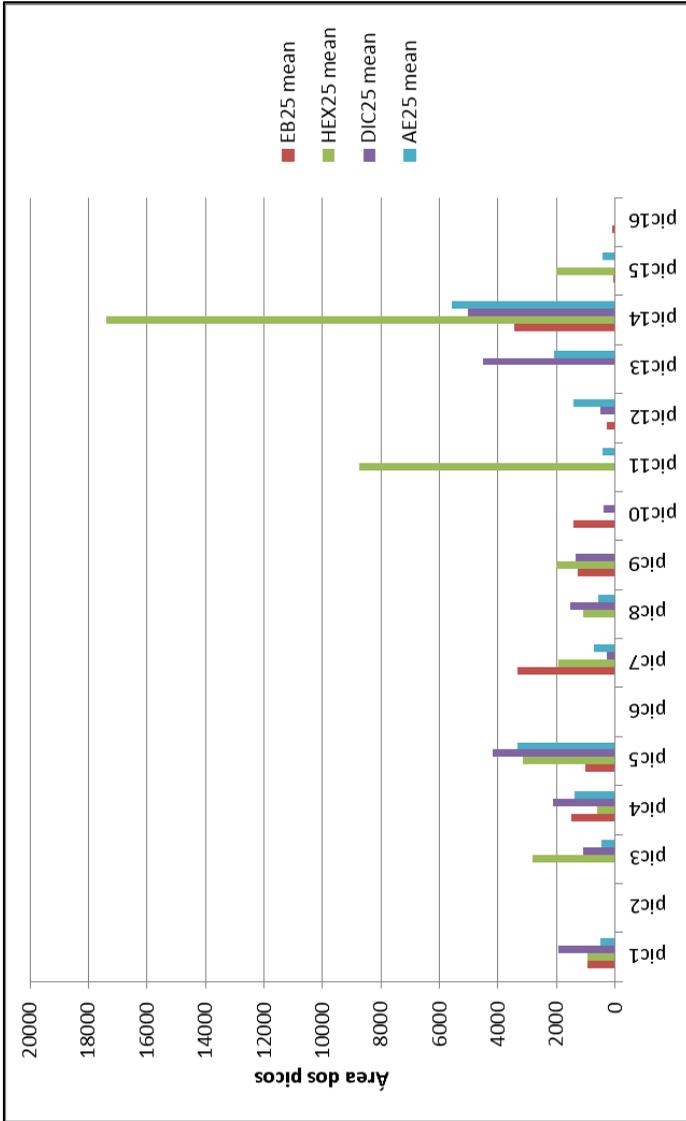
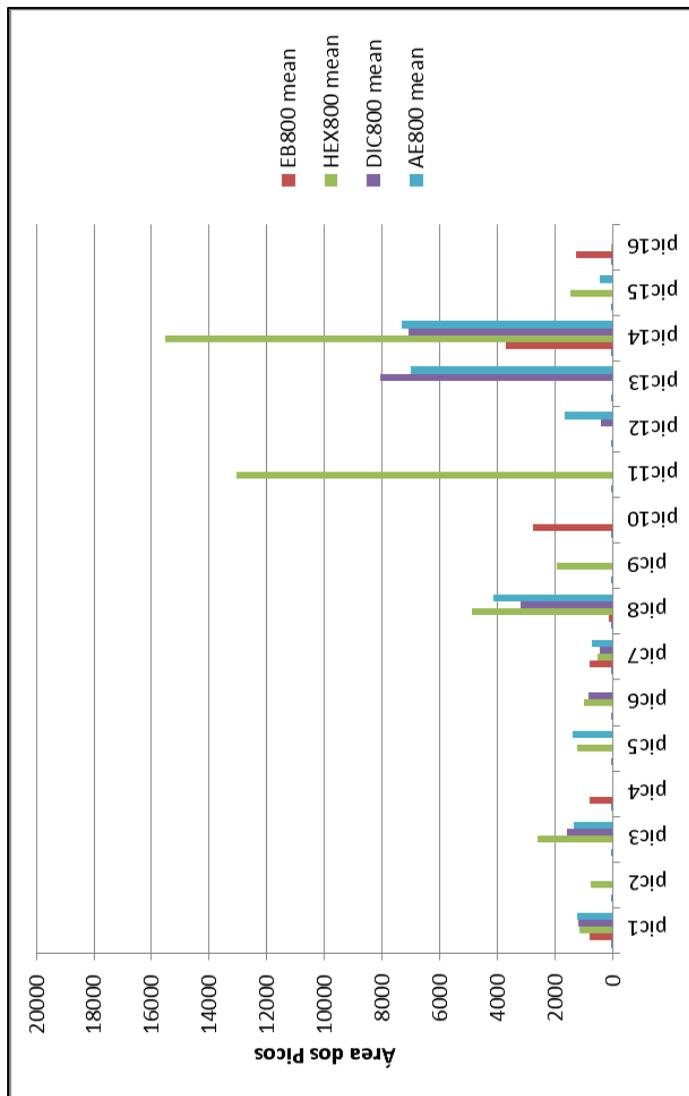


Figura 41 - Compostos encontrados em cada extrato ou fração a 800 metros.



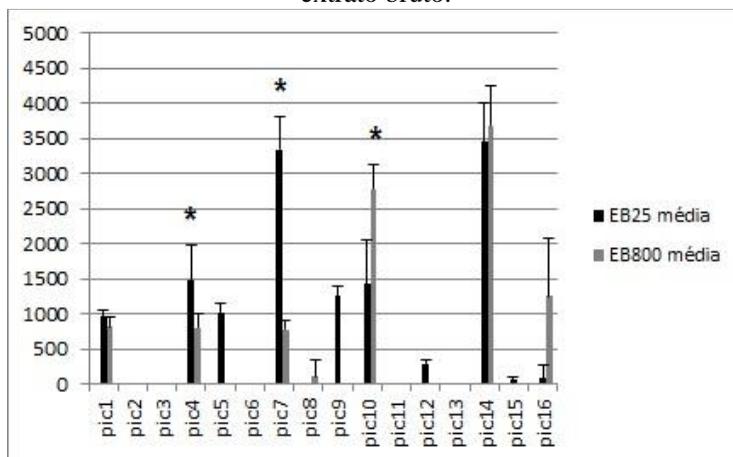


Os dados estatísticos das análises estão representados nas próximas tabelas e figuras. As tabelas 9 a 12 e as figuras 43 a 46 representam o teste *t Student*.

Tabela 9 - Valores de p para picos presentes nas duas altitudes do Extrato Bruto.

Picos	Valor de p
Pico 1	0,138
Pico 4	0,045*
Pico 7	0,000*
Pico 10	0,010*
Pico 14	0,578
Pico 16	0,063

Figura 43 - Variações dos picos estatisticamente significativos do extrato bruto.

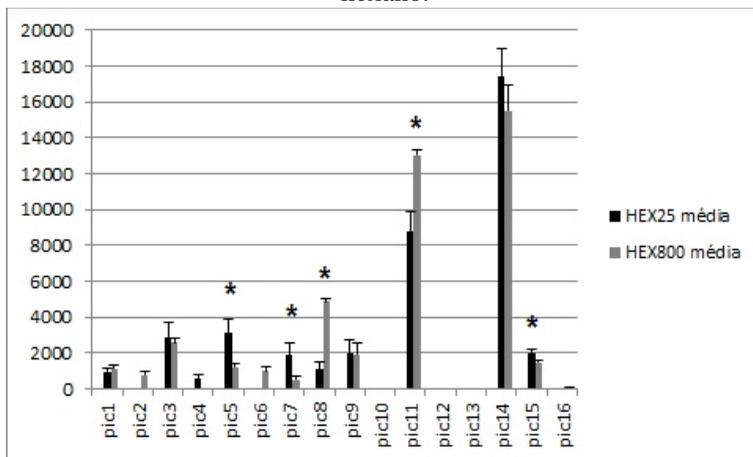


Legenda: EB – extrato bruto, \*estatisticamente significativos.

Tabela 10 - Valores de p para os picos presentes nas duas altitudes da fração hexano.

Picos	Valor de p
Pico 1	0,250
Pico 3	0,610
Pico 5	0,010*
Pico 7	0,017*
Pico 8	0,000*
Pico 9	0,887
Pico 11	0,003*
Pico14	0,126
Pico 15	0,008*

Figura 44 - Variações dos picos estatisticamente significativos da fração hexano.

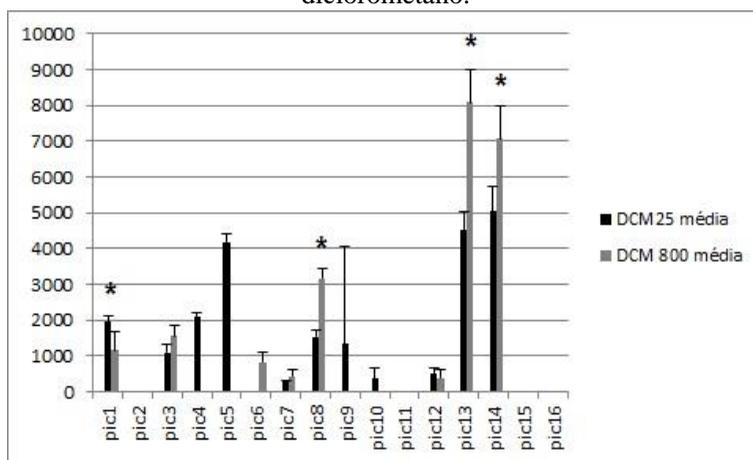


Legenda: HEX – hexano, \*estatisticamente significativo.

Tabela 11 - Valores de p para os picos presentes nas duas altitudes da fração diclorometano.

Picos	Valor de p
Pico 1	0,051*
Pico 3	0,056
Pico7	0,208
Pico 8	0,000*
Pico 12	0,461
Pico 13	0,001*
Pico 14	0,012*

Figura 45 - Variações dos picos estatisticamente significativos da fração diclorometano.

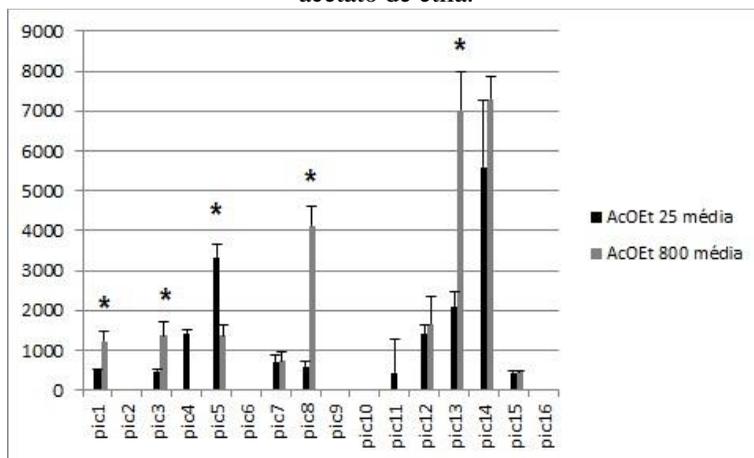


Legenda: DCM – diclorometano, \*estatisticamente significativo.

Tabela 12 - Valores de p para os picos presentes nas duas altitudes da fração acetato de etila.

Picos	Valor de p
Pico 1	0,001*
Pico 3	0,003*
Pico 5	0,000*
Pico 7	0,890
Pico 8	0,000*
Pico 12	0,520
Pico 13	0,001*
Pico 14	0,129
Pico 15	0,736

Figura 46 - Variações dos picos estatisticamente significativos da fração acetato de etila.



Legenda: AcOEt – acetato de etila, \*estatisticamente significativo.

## 6 DISCUSSÃO

Fatores ambientais como sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes e altitude podem influenciar o perfil de metabólitos secundários de uma planta (GOBBO-NETO; LOPES 2007). No caso da espécie estudada, fatores que podem influenciar as diferenças no perfil são a temperatura e radiação solar relacionada com a altitude e nutrientes.

A temperatura do ar é, dentre os elementos climáticos, o que promove maiores efeitos diretos e significativos sobre muitos processos fisiológicos que ocorrem em plantas e animais (MEDEIROS et al., 2005). No entanto, existem poucos estudos sobre sua influência isolada na produção de metabólitos secundários devido ao fato de estar associada a outros fatores, como altitude e sazonalidade (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

O clima de Santa Catarina é subtropical úmido. As temperaturas médias variam de acordo com o local: são mais baixas nas regiões serranas e mais elevadas no litoral, no sudeste e no oeste catarinense (SANTA CATARINA, 2013).

As áreas estudadas apresentam variações de temperatura, considerando a geografia e alterações climáticas decorrentes das variações de altitude. A Serra da Rocinha apresenta temperaturas muito baixas no inverno, com ocorrência de geadas. A área litorânea apresenta temperaturas mais amenas no inverno e temperaturas extremamente elevadas no verão.

Em relação à análise do solo, alguns fatores foram analisados como pH, porcentagem de argila, macronutrientes e micronutrientes. Segundo a interpretação dos resultados fornecida pelo laudo da EPAGRI (Anexo A), os solos apresentaram pH muito baixo (em torno de 4,5) e baixo (em torno de 5,2) nas altitudes de 25 m e 800 m, respectivamente.

Porém, esses resultados são condizentes com estudo realizado por Barreto e colaboradores (2006), que um remanescente de Mata Atlântica apresentou pH de solo igual a 4,5, tendo como justificativa que os solos sob mata geralmente apresentam menores valores de pH, uma vez que a mineralização da matéria orgânica e ácidos liberados pelas raízes das plantas contribuem para aumentar a acidez do solo. *C. pinatifida* foi coletada em seu habitat natural, e a vegetação está adaptada a este pH. Caso a espécie for cultivada para fornecimento de matéria-prima visando a produção de um fitoterápico, aconselha-se um solo com pH variando de 6,0 a 6,5 (AZEVEDO; MOURA, 2010).

O solo na altitude de 25 m apresentou um teor médio de 2,2% de matéria orgânica, enquanto que na altitude de 800 m apresentou um teor médio de 4,4%. A maior altitude apresentou o dobro de matéria orgânica. Para a menor altitude, o teor é considerado baixo e para maior altitude é considerado médio. O teor de matéria orgânica no solo é usado como indicador da disponibilidade de nitrogênio (SBCS, 2004). Solos com maior concentração de nitrogênio podem influenciar a produção de compostos nitrogenados.

Em se tratando de macronutrientes na análise de solo, existe uma diferença na concentração de fósforo, potássio, alumínio e cálcio. A concentração de fósforo foi cerca de duas vezes maior na altitude de 800 m quando comparada com a altitude de 25 m. Alumínio e cálcio também apresentaram concentrações maiores na altitude de 800 m. Em relação ao potássio, a concentração na altitude de 800 m foi maior, apresentando cerca de três vezes mais que a concentração de potássio na altitude de 25 m. Desta forma, a relação cálcio/potássio e magnésio/potássio também apresentaram diferenças nas duas altitudes.

Segundo a interpretação do laudo de análise da EPAGRI (ANEXO A), as concentrações de potássio e magnésio na altitude de 25 m foram consideradas altas. Na altitude de 800 m a concentração de potássio foi considerada muito alta e a concentração magnésio foi considerada alta (SBCS, 2004).

O magnésio apresentou concentração média de 2,2 cmolc/dm<sup>3</sup> na altitude de 25 m e 3,1 cmolc/dm<sup>3</sup> na altitude de 800 m. Valores acima de 1 cmolc/dm<sup>3</sup> são considerados altos para este macronutriente. O magnésio tem algumas funções nas plantas e está envolvido em alguns processos metabólicos e reações como fosforilação, fotossíntese e síntese proteica. A deficiência de magnésio traz prejuízos no crescimento e na produção da planta. Uma importante enzima Mg-ativada é a ribulose-1,5-bifosfato carboxilase, enzima chave no processo de fotossíntese (CAKMAK; YAZICI, 2010).

O potássio apresentou concentração média de 147 mg/dm<sup>3</sup> na altitude de 25 m e 537 mg/dm<sup>3</sup> na altitude de 800 m. Concentrações alta e muito alta nas duas altitudes, respectivamente (SBCS, 2004). O potássio, ao contrário do nitrogênio e fósforo, não forma compostos orgânicos nas plantas. Sua função principal parece estar ligada ao metabolismo, possuindo outras funções como síntese proteica, decomposição de carboidratos para fornecimento de energia e melhora da tolerância ao frio (LOPES, 1998; COSTA, 2014).

O cálcio teve uma concentração média de 3,1 cmolc/dm<sup>3</sup> na altitude de 25 m e 7,5 cmolc/dm<sup>3</sup> na altitude de 800 m. Concentrações

média e alta nas duas altitudes, respectivamente (SBCS, 2004). O cálcio estimula o desenvolvimento de raízes e folhas, forma compostos das paredes celulares e ativa vários sistemas enzimáticos nas plantas (LOPES, 1998; COSTA, 2014).

O teor de fósforo apresentou-se muito baixo com concentração média de  $3,9 \text{ mg/dm}^3$  na altitude de 25 m e médio com concentração de  $12,1 \text{ mg/dm}^3$  na altitude de 800 m (SBCS, 2004). O fósforo atua na fotossíntese, respiração, armazenamento e transferência de energia, divisão celular e crescimentos das células. É considerado um nutriente primário, assim como o potássio e nitrogênio (LOPES, 1998).

Houve também diferenças entre os micronutrientes analisados nas duas altitudes. O cobre e o zinco foram cerca de duas a três vezes maior na altitude de 800 m comparado com a altitude de 25 m. Em contrapartida, os micronutrientes ferro e zinco se apresentaram numa concentração menor na altitude de 800 m, com concentração de ferro de cinco a sete vezes menor que na altitude de 25 m e manganês com concentrações um pouco menores que na altitude de 25 m.

A concentração de cobre apresentou uma concentração média de  $0,8 \text{ mg/dm}^3$  na altitude de 25 m, enquanto que na altitude de 800 m apresentou uma concentração média de  $2,3 \text{ mg/dm}^3$ . Segundo a SBCS (Sociedade Brasileira de Ciência do Solo) (2004), concentrações acima de  $0,4 \text{ mg/dm}^3$  são consideradas altas para este micronutriente. O cobre é necessário para a formação de clorofila nas plantas, catalisa vários processos no metabolismo vegetal e promove diversas reações, apesar de não fazer parte dos produtos formados por essas reações. Grandes quantidades de cobre podem ser tóxicas para as plantas. O excesso diminui a atividade do ferro e causa sintomas de deficiência deste micronutriente no vegetal (LOPES, 1998).

A concentração média de zinco na altitude de 25 m foi de  $2,2 \text{ mg/dm}^3$ , enquanto que na altitude de 800 m a concentração média foi de  $5,7 \text{ mg/dm}^3$ . Concentrações acima de  $0,5 \text{ mg/dm}^3$  são consideradas altas (SBCS, 2004). O zinco auxilia na síntese de substâncias que atuam no crescimento e nos sistemas enzimáticos, ativa certas reações metabólicas e é necessário para produção de clorofila e formação de carboidratos. Solos argilosos, em geral, contêm mais zinco que solos arenosos, porém o teor de zinco total do solo não indica o quanto deste micronutriente esta disponível para as plantas (LOPES, 1998).

A concentração média de ferro na altitude de 25 m foi de  $209 \text{ mg/dm}^3$ , enquanto que apresentou uma concentração média de  $33 \text{ mg/dm}^3$  na altitude de 800 m. Concentrações acima de  $5 \text{ g/dm}^3$  são

consideradas altas e segundo o manual, não há interpretação com concentração baixa ou média (SBCS, 2004). Portanto, as concentrações de ferro estão dentro da normalidade, com teor de ferro maior na altitude de 25 m. O ferro é um catalisador que auxilia na formação de clorofila, age como um carregador de oxigênio e auxilia na formação de sistemas respiratórios envolvendo enzimas. Sua deficiência pode ser evidenciada pelo amarelamento das folhas conhecido como clorose (LOPES, 1998).

O manganês apresentou concentrações médias de  $81 \text{ mg/dm}^3$  na altitude de 25 m e  $54 \text{ mg/dm}^3$  na altitude de 800 m. Concentrações acima de  $5 \text{ mg/dm}^3$  são consideradas altas para este micronutriente (SBCS, 2004). O manganês atua como parte do sistema enzimático nas plantas, ativa reações metabólicas importantes e tem ação direta na fotossíntese, na síntese de clorofila.

Em resumo, a concentração de macronutrientes apresentou-se elevada para ambas altitudes, com exceção do fósforo que teve um teor baixo na altitude de 25 m e teor médio na altitude de 800 m. Os macronutrientes fósforo, potássio e magnésio apresentaram diferenças estatisticamente significativas, com concentração mais elevada na altitude de 800 m. O teor de micronutrientes apresentou-se também de forma elevada (com exceção do ferro) em ambas altitudes, com concentração mais elevada na altitude de 800 m. Todos os micronutrientes apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Sugere-se que o solo nas duas altitudes seja rico em nutrientes, porém altas concentrações podem ser prejudiciais às plantas já que estes elementos estão disponíveis para absorção. No entanto, não se observou nenhuma característica morfológica anormal.

A umidade do solo também se apresentou de forma diferente nas duas altitudes, com uma maior retenção hídrica na altitude de 800 m. Essa diferença foi estatisticamente significativa. O estresse hídrico pode influenciar a concentração de metabólitos secundários e há relatos de que pode haver um aumento na produção de glicosídeos cianogênicos, alguns terpenoides, antocianinas e alcaloides (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). No estudo não se pode falar que houve um estresse hídrico, mas que uma umidade mais alta pode influenciar o perfil de metabólitos secundários.

A temperatura, como um elemento constituinte do clima, é influenciada por diversos fatores, dentre eles a variação de altitude. (MEDEIROS et al., 2005). A temperatura do ar normalmente decresce com a elevação da altitude numa proporção de, aproximadamente,  $1^\circ\text{C}/100 \text{ m}$ . Esta taxa de perda de calor ocorre, pois uma massa de ar seco em ascensão está sujeita a pressões atmosféricas cada vez menores,

expandindo seu volume e diminuindo a temperatura, isto é, transformando energia térmica em energia potencial. No entanto, como o gradiente térmico depende da saturação do ar, na média, o decréscimo da temperatura do ar com a altitude em geral se situa em torno de 1 °C a cada 180 m (DURY, 1972). Desta forma, sabe-se que irá haver uma diferença de temperatura entre uma altitude de 25 m e uma altitude de 800 m.

A coleta de *C. pinnatifida* ocorreu em pontos bem diferentes climaticamente. Uma coleta a 25 m na região litorânea e outra coleta a 800 m na região serrana onde, nesta última, as temperaturas podem ficar negativas durante o inverno com ocorrências de geadas.

O estresse metabólico causado por geadas pode ter influências significantes nos níveis de metabólitos secundários. Estudos com *Artemisia annua* verificaram que o conteúdo de artemisinina, uma lactona sesquiterpênica, aumentou consideravelmente após estresse metabólico causado por geada (WALLAART et al., 2000). Na análise cromatográfica das frações de *C. pinnatifida* reveladas com anisaldeído sulfúrico, verificou-se a ocorrência de uma banda de coloração violeta apenas na altitude de 800 m, tanto no inverno quanto no verão. Pode ser provável que seja um metabólito secundário da classe dos terpenos e pelo fato de a família Asteraceae ser rica em lactonas sesquiterpênicas, é possível que seja um composto desta família encontrado na altitude de 800 m.

A radiação solar é outro fator que pode influenciar na produção de metabólitos secundários, como compostos fenólicos, flavonoides, taninos e antocianinas. Outras classes de metabólitos secundários também podem ser influenciadas pela intensidade de luz como terpenoides e alcaloides (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

A partir dos resultados de análise do perfil de metabolismo secundário de *C. pinnatifida*, sugere-se que houve diferenças entre as duas altitudes em decorrência de um conjunto de fatores climáticos e ambientais como altitude, temperatura, radiação solar e nutrientes do solo. No entanto, uma análise para determinação de compostos seria necessária para verificar qual(is) fator(es) seria(m) responsável(is) pelas diferenças no perfil.

A técnica utilizada para determinar o perfil do metabolismo secundário de *C. pinnatifida* foi CCDAE. Esta cromatografia já está sendo utilizada em monografias de plantas medicinais de algumas farmacopeias, como as farmacopeias americana, europeia e chinesa. A utilização desta técnica por estas farmacopeias demonstra sua importância como ferramenta analítica de plantas medicinais e como um

parâmetro para controle de qualidade (NICOLETTI, 2011). A qualidade de plantas medicinais pode ser definida em termos de conteúdo de compostos bioativos. CCDAE é uma poderosa ferramenta que pode ser empregada na determinação destes compostos em plantas (NICOLETTI, 2011; SHIVATARE et al., 2013; MOHAMED et al., 2014). Alguns estudos tratam desses perfis em plantas utilizando a técnica por CCDAE de espécies geralmente com interesse no seu potencial medicinal (SUNITA; ABHISHEK, 2008; CHOTANI et al., 2012; GUNALAN et al., 2012; HARIPRASAD; RAMAKRISHNAN, 2012; PATIL et al., 2013; MOHAMED et al., 2014; KARTHIKA; PAULSAMY, 2015).

O perfil de metabólitos secundários é denominado *fingerprint*, e é um autêntico marcador da complexidade biológica. Em sentido literal da palavra, é a impressão digital da espécie, que pode demonstrar seus vários compostos químicos (NICOLETTI, 2011). Segundo este mesmo autor, CCDAE pode ser utilizado para pesquisas de adulteração no sentido de que um produto disponível no mercado apresente composição diferente do rótulo; pesquisas de substituição em que uma espécie é substituída por outra e pesquisas por comparação em que extratos da mesma espécie são comparados quanto ao seu perfil metabólico. A figura 20 representa o *fingerprint* das frações de *C. pinnatifida* e padrões de referência. Existe similaridade de perfil entre as frações, comprovando que se trata da mesma espécie. Porém, também há diferenças no perfil cromatográfico das espécies de altitudes diferentes, ressaltando que espécies de altitudes diferentes podem apresentar metabólitos secundários diferentes.

A escolha da metodologia CCDAE deve-se ao fato que esta apresenta algumas vantagens em relação a cromatografia em camada delgada. É possível realizar análise de várias amostras e padrões de referência simultaneamente em um tempo de análise reduzido. E a principal vantagem deste método é o escaneamento dos cromatogramas, que não é possível na cromatografia em camada delgada, gerando dados como *Rfs* em *software* específico. (REICH; SCHIBLI, 2007; ANDOLA; PUROHIT, 2010; NICOLETTI, 2011; RAM et al., 2011; SHIVATARE et al., 2013).

Em relação a fase móvel, comumente chamada de sistema de solventes, seleciona-se por processo de tentativa e erro com base na própria experiência do analista, em dados da literatura e propriedades químicas dos analitos. Fases móveis com mais de 3 ou 4 componentes devem ser evitadas, pois a separação dos compostos pode ser prejudicada (SHINDE et al., 2011). Foi o que aconteceu com o sistema de solventes Acetato de Etila/Ácido Fórmico/Ácido Acético/Água

(100/11/11/27). Não houve boa separação dos compostos com este sistema de solventes.

Em relação à análise dos perfis cromatográficos, o densitograma da fração hexânica 25 m (verão) apresentou 19 picos, enquanto que o densitograma da fração hexânica 800 m (verão) apresentou 17 picos. A numeração é determinada pelo *software* e representa o número de picos sendo que as numerações não se equivalem entre os dois cromatogramas. Observando os dois densitogramas (Figuras 21 e 22), percebe-se que o primeiro densitograma tem 2 picos a mais e que existe visivelmente um pico na fração hexano 25 m (pico 6), que não aparece no densitograma fração hexano 800 m. Os picos 2, 3, 4 e 5 se equivalem nos dois densitogramas e parece se tratar dos mesmos compostos. Porém, existe diferença de área nesses picos como demonstrado Tabela 7, principalmente no pico 3, em que a área da fração hexano 800 m é bem menor que a área da fração hexano 25 m. Há dois picos no primeiro densitograma (picos 7 e 8) que parecem se equivaler ao pico 6 do segundo cromatograma. O pico 9 do primeiro densitograma parece ser um composto diferente e que não aparece no segundo cromatograma.

O densitograma da fração diclorometânica 25 m (verão) apresentou 15 picos enquanto que o densitograma da fração diclorometânica 800 m (verão) apresentou 14 picos (Figuras 23 e 24). Os picos 1, 2, 3, 4 e 5 de ambos os densitogramas apresentaram o mesmo perfil e podem ser os mesmos compostos em ambas altitudes. O pico 6 na altitude de 25 m é bem menor que o pico 6 na altitude de 800 m. O pico 7 na altitude de 25 m não possui um pico equivalente na altitude de 800 m. Já o pico 8 na fração 25 m equivalente ao pico 7 na fração 800 m possuem áreas bem distintas.

O densitograma da fração de acetato de etila 800 m (verão) apresentou vários picos ausentes em comparação com a fração acetato de etila 25 m (verão). Isto ocorreu provavelmente por falha técnica. Todas as frações solubilizadas em etanol apresentaram a cor verde, com exceção da fração acetato de etila 800 m que apresentou cor levemente amarronzada. Desta forma, não foi possível concluir algo nesta fração.

De forma a obter dados para a fração acetato de etila, realizou-se nova coleta de *C.pinnatifida* no mês de agosto de 2016. Por isso, nesta coleta obteve-se 2 frações acetato de etila: uma obtida pela forma sequencial (cicloexano, diclorometano e acetato de etila), e outra não sequencial com partição direta com acetato de etila, para diminuir a possibilidade de erro. Analisando os densitogramas obtidos da coleta de inverno (Figuras 32 a 39), observam-se semelhanças e diferenças em

cada extrato e frações nas duas altitudes. Estas diferenças foram analisadas estatisticamente.

As figuras 40 e 41 representam todos os picos encontrados em cada extrato bruto e frações e suas respectivas áreas da coleta de inverno, nas duas altitudes. Os picos 1, 7 e 14 foram encontrados em todos os extratos e frações. O pico 2 foi encontrado apenas na fração hexano 800 m, o que se sugere que este composto seja produzido apenas nesta altitude. Este composto apresentou um intervalo de *Rf* de 0,13 a 0,16. O pico 6 foi encontrado apenas na fração hexano 800 m e diclorometano 800 m, sugerindo que esse composto seja encontrado apenas na altitude de 800 m. O *Rf* para ambas as frações apresentou um intervalo de 0,42 a 0,47.

Analisando a Figura 42, obteve-se 16 picos diferentes, considerando os extratos brutos e frações. O extrato bruto a 25 m apresentou 9 picos e o extrato bruto a 800 m apresentou 7 picos. Os picos 5, 9 e 12 aparecem no extrato bruto a 25 m e não no extrato bruto a 800 m. O pico 8 aparece no extrato bruto a 800 m mas não no extrato bruto a 25 m. Em relação à fração hexano, a altitude de 25 m apresentou 10 picos enquanto que a altitude de 800 m apresentou 11 picos. A fração hexano 800 m apresentou o pico 2 e o pico 6 e não apresentou o pico 4, comparando com a fração hexano 25 m. A fração diclorometano 25 m apresentou 11 picos enquanto que a fração diclorometano 800 m apresentou 8 picos. Os picos 4, 5, 9 e 10 não apareceram na fração diclorometano 800 m enquanto que o pico 6 não apareceu na fração diclorometano 25 m. A fração acetato de etila 25 m apresentou 11 picos enquanto que a fração acetato de etila 800 m apresentou 9 picos. A fração acetato de etila 800 m não apresentou os picos 4 e 11 em comparação com a fração acetato de etila 25 m.

No extrato bruto, 3 picos presentes nas duas altitudes apresentaram resultado estatisticamente significativo no teste *t Student* com  $p < 0,05$ . São eles: pico 4, pico 7 e pico 12 conforme demonstrado na Tabela 9 e Figura 43. Os picos 5, 9, 12 e 15 apareceram apenas na altitude de 25 m enquanto que o pico 8 na altitude de 800 m.

Na fração hexânica, os picos 5, 7, 8, 11 e 15 apresentaram diferenças estatisticamente significativas como demonstrado na Tabela 10 e Figura 44. O pico 2 apareceu apenas na fração hexânica a 800 m. O pico 4 apareceu somente a 25 m e o pico 6 apareceu somente na altitude de 800 m.

Na fração diclorometânica, os picos 1, 8, 13 e 14 apresentaram diferenças estatisticamente significativas (Tabela 11 e Figura 45). O

pico 6 apareceu apenas na altitude de 800 m, e os picos 4, 5, 9 e 10 apenas na altitude de 25 m.

Na fração acetato de etila, os picos 1, 3, 5, 8 e 13 apresentaram diferenças estatisticamente significativas (Tabela 12 e Figura 46). O pico 4 e 11 apareceram apenas a 25 m.

Vale ressaltar que dois compostos apareceram apenas na altitude de 800 m, identificados pelos picos 2 e 6, na coleta do inverno.

Apesar de a coleta ter ocorrido em duas estações do ano diferentes, não foi possível fazer uma análise sazonal, já que condições experimentais foram diferentes. A quantidade de amostra maior depositada sobre a placa assim como maior concentração de amostra referente à coleta de inverno, influencia o perfil dos densitogramas.

Desta forma, analisando conjuntamente os resultados obtidos, sugere-se que há variação qualitativa na coleta de verão e variação qualitativa e quantitativa na coleta de inverno. Esta variação pode ser decorrente de fatores como a altitude, temperatura, nutrientes do solo e radiação solar. Não se pode especificar qual(is) fator(es) está(ão) influenciando o perfil, pois é necessário saber com exatidão a qual família pertence os compostos. Contudo, supõe-se que a altitude de 800 m contenha fatores favoráveis que podem influenciar o perfil e produção de novos compostos.

## 7 CONCLUSÃO

As análises dos perfis cromatográficos de *Calea pinnatifida* permitiram constatar que existem diferenças na produção de metabólitos secundários em cada estação e em cada altitude. A coleta do verão exibiu um perfil diferente nas duas altitudes, observando o perfil das frações. A visualização dos densitogramas permite fazer esta constatação. A coleta de inverno também apresentou diferenças em seus perfis cromatográficos, que podem ser observadas estatisticamente. Essas diferenças podem ser decorrentes de um conjunto de fatores ambientais como altitude, temperatura, nutrientes do solo e radiação solar. Para determinação de qual(is) fator(es), é necessário estabelecer quais compostos sofreram variação e este não foi objetivo do trabalho. Em relação às diferenças sazonais, não foi possível uma conclusão já que condições experimentais foram diferentes.

Dois compostos químicos, referentes aos picos 2 e 6 da análise do inverno, apareceram apenas na altitude de 800 m. Estes compostos

podem servir como parâmetros para controle de qualidade ou como marcadores químicos de espécies de altitudes maiores.

O solo onde *C. pinnatifida* se desenvolve apresentou altas concentrações de macro e micronutrientes nas duas altitudes. Comparando as altitudes, os macronutrientes fósforo, potássio e magnésio apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Estes macronutrientes apresentaram-se de forma mais elevada na altitude de 800 m. Em relação aos micronutrientes, todos apresentaram diferenças significativas, com cobre e zinco apresentando-se de forma mais elevada na altitude de 800 m e ferro e manganês de forma mais elevada na altitude de 25 m.

É a primeira vez que se realiza *fingerprint* utilizando CCDAE como metodologia para esta espécie. Esta documentação é importante para investigações futuras e poderá servir como um parâmetro de controle de qualidade.

A metodologia empregada permitiu fotodocumentação com a captura de imagens dos cromatogramas e escaneamento destes pelo Espectrofotodensitômetro TLC Scannes 3 CAMAG acoplado ao *software Wincats*, gerando dados como *Rfs* e densitogramas.

Considerando a importância de *C. pinnatifida* e dados ainda não conclusivos, é necessário ampliar estudos etnobotânicos, químicos, farmacológicos e toxicológicos para esta espécie. Estes estudos são fundamentais para ampliar os conhecimentos sobre a planta e garantir seu uso seguro e eficaz, além de contribuir para a manutenção da biodiversidade e sua exploração sustentável, já que se trata de uma espécie nativa.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Considerando que o gênero *Calea* possui grande riqueza específica e algumas das espécies com atividades biológicas relacionadas, sentiu-se a necessidade de escrever um artigo de revisão sobre o gênero, abordando compostos químicos isolados e atividades biológicas relacionadas.

Em relação ao perfil de *C. pinnatifida*, dois compostos (pico 2 e pico 6) apareceram apenas na altitude de 800 m. A pesquisa continuou, porém não em tempo hábil para apresentar resultados nesta dissertação, já que os ensaios estão sendo realizados na França com apoio da Universidade de Rennes1. Esses dois compostos foram isolados e se

encontram em análises espectrométricas para que suas estruturas possam ser determinadas e identificadas.

A partir dos estudos realizados para a presente dissertação e de ensaios complementares realizados na França, espera-se submeter o segundo artigo do grupo de pesquisa abordando especificamente *C. pinnatifida*.

Algumas perspectivas são possíveis para a continuidade deste estudo, como ensaios farmacológicos e toxicológicos *in vivo* e *in vitro* de diferentes extratos preparados a partir de diferentes altitudes.

Este trabalho me possibilitou novos desafios e experiências. Realizar estágio em um país de renome científico e histórico foi desafiador, tanto do ponto de vista profissional quanto pessoal.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M. Z. de . **Plantas medicinais**. 4 ed. Salvador: EDUFBA, 2016. 213p.

ANDOLA, H.C.; PUROHIT, V.K. High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC): A Modern Analytical tool for Biological Analysis. **Nature and Science**, v. 8, n. 10, p. 58-61, 2010.

ANTONIO, G.D.; TESSER, C.D.; MORETTI-PIRES, R.O. Fitoterapia na atenção primária à saúde. **Revista de Saúde Pública**, v.48, n.3, p. 541-553, 2014.

AZEVEDO, C.D.; MOURA, M.A. **Cultivo de Plantas Medicinais**. Niterói, RJ, 19 p., 2010.

BARRETO, A.C.; LIMA, F.H.S.; FREIRE, M.B.G.S.; ARAÚJO, Q.R.DE; FREIRE, F.J. Características químicas e físicas de um solo sob floresta, sistema agroflorestal e pastagem no sul da Bahia. **Revista Caatinga**, v.19, n.4, p. 415-425, 2006.

BIANCHINI, R. F. Processamento de plantas medicinais. **Caderno Técnico-Didático**, Associação Catarinense de Plantas Medicinais (ACPM), v. 1, p. 47-54, out. 2011.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Portaria nº 971 de 03 de Maio de 2006**. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 04 de Maio de 2006a.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Decreto nº 5813 de 22 de Junho de 2006**. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos

e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 23 de Junho de 2006b.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Práticas Integrativas e Complementares: plantas medicinais e fitoterapia na atenção básica**. 156p. Brasília, DF, 2012.

BRASIL, Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. **Biodiversidade e conhecimentos tradicionais associados: Implementação da legislação de acesso e repartição de benefícios no Brasil**. 356p. Brasília, DF, 2013.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais — Rename 2014**, 9ed., Brasília: Ministério da Saúde; 2015.

BOHLMANN, F.; FRITZ, U.; KING, R.M.; ROBINSON, H. Fourteen heliangolides from *Calea* species. **Phytochemistry**, v.20, n.4, p. 743-749, 1981a.

BOHLMANN, F.; GUPTA, R.K.; JAKUPOVIC, J.; KING, R.M.; ROBINSON, H. (1981b). Eudesmanolides and heliangolides from *Calea rotundifolia*. **Phytochemistry**, v.20, n.7, p. 1635-1637, 1981b.

BOHLMANN, F.; BAPUJI, M.; KING, R.M.; ROBINSON, H. New heliangolides from *Calea oxylepis*. **Phytochemistry**, v.21, n.5, p. 1164-1166, 1982a.

BOHLMANN, F.; BORTHAKUR, N.; KING, R.M.; ROBINSON, H. Germacrane and eudesmane derivatives from *Calea reticulata*. **Phytochemistry**, v.21, n.7, p. 1793-1794, 1982b.

BOHLMANN, F.; MATHUR, R.; JAKUPOVIC, J.; GUPTA, R.K.; KING, R.M.; ROBINSON, H. Furanoheliangolides and others

compounds from *Calea hymenolepis*. **Phytochemistry**. v.21, n.8, p. 2045-2048, 1982c.

BOHLMANN, F.; GUPTA, R.K.; KING, R.M.; ROBINSON, H. Two furanoheliangolides from *Calea angusta*. **Phytochemistry**. v.21, n.8, p. 2117-2118, 1982d.

BOHLMANN, F.; GUPTA, R.K.; KING RM, ROBINSON H (1982e). Three furanoheliangolides from *Calea villosa*. **Phytochemistry**. v.21, n.10, p. 2593-2595, 1982e.

BOHLMANN, F.; GUPTA, R.K.; JAKUPOVIC, J.; KING, R.M.; ROBINSON, H. Furanoheliangolides and farnesol derivatives from *Calea hispida*. **Phytochemistry**. v.21, p.12, p. 2899-2903, 1982f.

BOHLMANN, F.; MOHAMMADI, D.; MOHAMMADI, P.S.; JAKUPOVIC, J.; KING, R.M.; ROBINSON, H. Germacranolides related to chaplatriin from *Calea Harleyi*. **Phytochemistry**. v.23, n.5, p. 1095-1097, 1984.

BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, n.161,p. 839–851, 2001.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.

CAKMAK, I.; YAZICI, A. M. Magnésio: um elemento esquecido na produção agrícola. **International Plant Nutrition Institute: informações agrônômicas**, n.132, 2010.

CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v.55, n.3, p. 37-39, 2003.

CARVALHO C.C.; TURATTI I.C.; LOPES N.P.; SALVADOR M.J.; NASCIMENTO A.M. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from Brazilian plants *Acanthospermum australe*, *Calea fruticosa* and *Mikania glauca*. **African Journal Pharmacy and Pharmacology**, v. 8, n.14, p. 392-398, 2014.

CARVALHO, T.C.L. Estudo fitoquímico e de bioatividade de *Calea pinnatifida* (R. Br.) Less. e *Calea uniflora* Less. (Asteraceae). Tese, Doutorado em Farmácia, UFSC, 2016.

CASTILLO, J.B.; FERRERO, M.T.M.; LUIS, F.R.; BUENO, P.V. Salvadorian compositae. II. Juanislamin and 2,3-epoxy-juanislamin, two new sesquiterpenic lactones from *Calea urticifolia*. **Journal of Natural Products**, v.44, n.3, p. 348-350, 1981.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v.21, n.1, p. 99-105, 1998.

CHADWICK, M.; TREWIN, H.; GAWTHROP, F.; WAGSTAFF, C. Sesquiterpenoids lactones: benefits to plants and people. **International Journal of Molecular Sciences**, v.14, n.6, p. 12780-12805, 2013.

CHIARADIA, M.C.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. O Estado da Arte da Cromatografia associada à Espectrometria de Massas acoplada à Espectrometria de Massas na Análise de Compostos Tóxicos em Alimentos. **Química Nova**, v.31, n.3, p. 623-636, 2008.

CHOTANI, D.L.; PATEL, M.B.; MISHRA, S.H. HPTLC Fingerprint Profile and Isolation of Marker Compound of *Ruellia tuberosa*. **Chromatography Research International**, v.2012, p. 1-6, 2012.

COSTA, A.R. **Nutrição mineral em plantas vasculares**. Escolas de Ciência e Tecnologia. Universidade de Évora, 147p., 2014.

DE MORAIS, L.A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v.27, n.2, p. 4050-4063, 2009.

DUARTE, M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista MultiCiência**, n.7, p. 1-16, 2006.

DURY, G. H. High temperature extremes in Austrália. Anais. Annals of the Association of American Geographers. v.62, n.3, p.,388–400, 1972.

EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina). **Informações técnicas análise solo**, 2013. Disponível em: <[http://www.epagri.sc.gov.br/?page\\_id=1088](http://www.epagri.sc.gov.br/?page_id=1088)> . Acesso em: dezembro 2015.

FERNANDES, A.C.; RITTER, M.R. A família Asteraceae no Morro Santana, Porto Alegre. Rio Grande do Sul, Brasil. **Brazilian Journal of Biosciences**, v.7, n.4, p.395-439, 2009.

FERREIRA, Z.S.; ROQUE, N.F.; GOTTLIEB, O.R.; OLIVEIRA, F.; GOTTLIEB, H.E. Structural Clarification of Germacranolides from *Calea* species. **Phytochemistry**, v.19, p. 1481–1484, 1980.

FIGUEIREDO, C.A.; GURGEL, I.G.D.; GURGEL JR, GD.A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios. **Revista de Saúde Coletiva**, v.24, n. 2, p. 381-400, 2014.

FISCHER, N.H.; LEE, I.Y.; FRONCZEK, F.R. Three new furanone-type heliangolides from *Calea ternifolia* and the molecular structure of

8 $\beta$ -angeloyloxy-9 $\alpha$ -hydroxycalculatolide. **Journal of Natural Products**, v.47, n.3, p. 419-425, 1984.

FLACH A.; GREGEL B.; SIMIONATTO E.; DA SILVA U.F.; ZANATTA N.; MOREL A.F.; LINARES C.E.B.; ALVES S.H. Chemical Analysis and Antifungal Activity of the Essential Oil of *Calea clematidea*. **Planta Medica**, v. 68, n.9, p. 836-838, 2002.

**FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB103756>>. Acesso em: 08 Nov. 2016

FOWLER, M.W. Plants, medicines and man. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n.86, p. 1797–1804, 2006.

GANZERA, M.; GUGGENBERGER, M.; STUPPNER, H.; ZIDORN, C. Altitudinal Variation of Secondary Metabolites Profiles in Flowering Heads of *Matricaria chamomilla* cv. BONA. **Planta Medica**, n.74, p. 53–457, 2008.

GARCÍA, A. A.; CARRIL, E. P. Metabolismo Secundário de Plantas. **Reduca Biología Serie Fisiología Vegetal**, v.2, n.3, p. 119-145, 2009.

GIULIETTI, A.M.; HARLEY, R.M.; QUEIROZ, L.P.; WANDERLEY, M.G.L.; BERG, C.V. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, v.1, n.1, p. 52-61, 2005.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas Medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n.2, p. 374-381, 2007.

GÓMEZ M.; GIL J.F. Topical anti-inflammatory activity of *Calea prunifolia* HBK (Asteraceae) in the TPA model of mouse ear inflammation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.22, n.12, p. 2391-2395, 2011.

GUNALAN, G.; SARASWATHY, A.; VIJAYALAKSHMI, K. HPTLC fingerprint profile of *Bauhinia variegata* Linn. leaves. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v.2, p. S21-S25, 2012.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis**. 3rd. ed. London: Chapman and Hill, 1998. 302 p.

HARIPRASAD, P.; RAMAKRISHNAN, N. Chromatographic finger print analysis of *Rumex vesicarius* L. by HPTLC technique. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.2, n.1, p.S57-S63, 2012.

IBGE. **Manual técnico da vegetação brasileira**. Rio de Janeiro: Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão, 2. ed, , 2012, 271 p.

KADIR, M.F.; SAYEED, M.S.B.; MIA, M.M.K. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used by indigenous and tribal people in Rangamati, Bangladesh, **Journal of Ethnopharmacology**, v.144, n.3, p.27-637, 2012.

KARTHIKA, K.; PAULSAMY, S. TLC and HPTLC fingerprints of various secondary metabolites in the stem of the traditional medicinal climber, *Solena amplexicaulis*. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.77, n.1, p.11-116, 2015.

KOEPPE, D. E., ROHRBAUGH, L. M., RICE, E. L. AND WENDER, S. H. The Effect of Age and Chilling Temperature on the Concentration

of Scopolin and Caffeoylequinic Acids in Tobacco. **Physiologia Plantarum**, v.23, n.2, p. 258–266, 1970.

KÖHLER, I.; JENETT-SIEMS, K.; SIEMS, K.; HERNÁNDEZ, A.; IBARRA, R.A.; BERENDSOHN, W.G.; BIENZLE, U.; EICH, E. In vitro antiplasmodial investigation of medicinal plants from El Salvador. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v.57, n.3-4, p. 277-281, 2002.

LEE, I.Y.; OLIVER, E.J.; URBATSCH, L.E.; FISCHER, N.H. Two sesquiterpene lactones of *Calea ternifolia* var. *calyculata*. **Phytochemistry**, v.21, n.9, p. 2313-2316, 1982a.

LEE, I.Y.; FRONCZEK, F.R.; MALCOLM, A.; FISCHER, N.H. New germacranolides from *Calea ternifolia* and the molecular structure of 9 $\alpha$ -hydroxy-11,13-dihydro-11 $\alpha$ ,13 epoxyatripliciolide-8 $\beta$ -O-[2-methylacrylate]. **Journal of Natural Products**, v.45, n.3, p. 311-316, 1982b.

LIMA, T.C.; SANTOS, A.D.C.; COSTA, D.T.M.; SOUZA, R.J.; BARISON, A.; STEINDEL, M.; BIAVATTI, M.W. Chromenes from leaves of *Calea pinnatifida* and evaluation of their leishmanicidal activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n.1, p.7-10, 2015a.

LIMA, T.C.; SOUZA R.J.; SANTOS, A.D.C.; MORAES, M.H.; BIONDO N.E.; BARISON, A.; STEINDEL, M.; BIAVATTI, M.W. Evaluation of leishmanicidal and trypanocidal activities of phenolic compounds from *Calea uniflora* Less. **Natural Product Research**, v.30, n.5, p. 1-7, 2015b.

LIMA, T.C.; SOUZA, R.J.; MORAES, M.H.; STEINDEL, M.; BIAVATTI, M.W. A new furanoheliangolide sesquiterpene lactone from *Calea pinnatifida* (R.Br.) Less. (Asteraceae) and Evaluation of its trypanocidal and leishmanicidal activities. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.28, n.2, p. 1-9, 2016.

LOPES, A.S. **Manual Internacional de Fertilidade do Solo**. Tradução e Adaptação. 2ed. Piracicaba: Potafos, 177p., 1998.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA Jr, V.F; GRYNBERG, N.; ECHEVARRIA, A. Plantas Medicinais: A Necessidade de Estudos Multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, n.3, p. 429-438, 2002.

MALDANER, L.; JARDIM, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v.32, n.1, p. 214-222, 2009.

MARCHETTI, G.M.; SILVA, K.; RUIZ, A.; SOUZA, I.; TINTI, S.; CARVALHO, J.; FOGGIO, M. In Vitro and In Vivo Antiproliferative Activity Of Arucanolide Isolated From *Calea Pinnatifida*. **Planta Medica**, n.76, p. 164, 2010.

MARCHETTI, G.M.; SILVA, K.A.; SANTOS, A.N.; SOUZA, I.M.O.; TINTI, S.V.; FIGUEIRA, G.M.; FOGGIO, M.A.; CARVALHO, J.E. The anticancer activity of dichloromethane crude extract obtained from *Calea pinnatifida*. **Journal of Experimental Pharmacology**, n.4, p. 157 – 162, 2012.

MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification**. London: Academic Press, 1982.

MATSUURA N.; YAMADA M.; SUZUKI H.; HASEGAWA N.; KUROSAKA C.; UBUKATA M.; TANAKA T.; IINUMA M. Inhibition of preadipocyte differentiation by germacranolides from *Calea urticifolia* in 3T3-L1 cells. **Bioscience, biotechnology and biochemistry**, v.69, n.12, p. 2470-2472, 2005.

MEDEIROS, S.S.; CECILIO, R.A.; MELO JÚNIOR, J.C.F.; SILVA JUNIOR, J.L.C. Estimativa e espacialização das temperaturas do ar mínimas e máximas na região nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 9, p. 247 – 255, 2005.

MERFORT, I. Perspectives on Sesquiterpene Lactones in Inflammation and Cancer. **Current Drug Targets**, v.12, p. 1560-1573, 2011.

MOHAMMED, M.S.; ALAJMI, M. F.; ALAM,P.; KHALID, H. S.; MAHMOUD, A. M.; AHMED, W. J. Chromatographic finger print analysis of anti-inflammatory active extract fractions of aerial parts of *Tribulus terrestris* by HPTLC technique. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.4, n.3, p. 203-208, 2014.

MONDIN, C.A. **Levantamento da Tribo Heliantheae Cass.(Asteraceae), sensu stricto**, no Rio Grande do Sul, Brasil. Tese, UFRGS, 2004.

NASCIMENTO A.M.; SOUSA E SILVA F.; OLIVEIRA D.C.R . Constituents of *Calea platylepis* Sch. Bip.ex Baker. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 993-996, 2002.

NASCIMENTO, A.M.; SALVADOR, M.J.; CANDIDO, R.C.; ITO, I.Y.; OLIVEIRA, D.C.R. Antimicrobial activity of extracts and some compounds from *Calea platylepis*. **Fitoterapia** v.75, n.5, p. 514-519, 2004a.

NASCIMENTO, A.M.; SALVADOR, M.J.; CANDIDO, R.C.; ALBUQUERQUE, S.; OLIVEIRA, D.C.R. Trypanocidal and antifungal activities of p-hydroxyacetophenone derivatives from *Calea uniflora* (Heliantheae, Asteraceae). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n.5, p. 663-669, 2004b.

NASCIMENTO A.M.; COSTA F.C.; THIEMANN O.H.; RODRIGUES DE OLIVEIRA D.C. Chromanones with leishmanicidal activity from *Calea uniflora*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 62, p. 353-356, 2007.

NICOLETTI, M. HPTLC fingerprint: a modern approach for the analytical determination of Botanicals. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.21, n.5, p. 818-823, 2011.

OBER, A.G.; QUIJANO, L.; FISCHER, N.H. Eudesmanolides, trichomatolides B-E, and a heliangolide from *Calea Trichomata*. **Phytochemistry**. v.23, n.7, p. 1439-1443, 1984a.

OBER, A.G.; QUIJANO, L.; URBATSCH, L.E.; FISCHER, N.H. Eudesmanolides from *Calea trichomata*. **Phytochemistry**. v.23, n.4, p. 910-912, 1984b.

OBER, A.G.; QUIJANO, L.; URBATSCH, L.E.; FISCHER, N.H. Guaianolides from *Calea subcordata*. **Phytochemistry**, v.23, n.6, p. 1289-1292, 1984c.

OBER, A.G.; FRONCZEK, F.R.; FISCHER, N.H. The molecular structure of a new eudesmanolide, subcordatolide B, from *Calea subcordata*. **Journal of Natural Products**, v.47, n.4, p. 626-629, 1984d.

OBER, A.G.; URBATSCH, L.E.; FISCHER, N.H. Germacranolides, Calbertolides A, B and C, from *Calea berteriana*. **Phytochemistry**, v.24, n.8, p. 1743-1745, 1985a.

OBER, A.G.; URBATSCH, L.E.; FISCHER, N.H. Two guaianolides from *Calea solidaginea*. **Phytochemistry**. v.24, n.11, p. 2728-2730, 1985b.

OBER, A.G.; URBATSCH, L.E.; FISCHER, H. Sesquiterpene lactones from *Calea leptoccephala*. **Phytochemistry**, v.25, n.2, p. 467-470, 1986a.

OBER, A.G.; FISCHER, N.H.; PARODI, F. Jamaicolides A-D, four sesquiterpene lactones from *Calea jamaicensis*. **Phytochemistry**, v.25, n.4, p. 877-881, 1986b.

OBER, A.G.; FRONCZEK, F.R.; FISCHER, N.H. Two New Sesquiterpene Lactones from *Calea subcordata* and the Molecular Structure and Absolute Configuration of Subcordatolide D. **Journal of Natural Products**, v.50, n.4, p. 604-611, 1987a.

OBER, A.G.; FISCHER, N.H. Sesquiterpene lactones from *Calea septuplinervia*. **Phytochemistry**, v.26, n.3, p. 848-849, 1987b.

OBER, A.G.; URBATSCH, L.E.; FISCHER, N.H. Sesquiterpene lactones from *Calea megacephala*. **Phytochemistry**, v.26, n.4, p. 1204-1206, 1987c.

OHGUCHI K.; ITO M.; YOKOYAMA K.; IINUMA M.; ITOH T.; NOZAWA Y.; AKAO Y. Effects Of Sesquiterpene Lactones On Melanogenesis In Mouse B16 Melanoma Cells. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n.2, p. 308-310, 2009.

PATIL, A.G.; KOLI, S.P.; PATIL, D.A. Pharmacognostical standardization and HPTLC fingerprint of *Averrhoa bilimbi* (L.) fruits. **Journal of Pharmacy Research**, v.6, n.1, p. 145-150, 2013.

PICMAN, A. K. Biological Activities of Sesquiterpene Lactones. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.14, n.3, p. 255-281, 1986.

PUEBLA, P.; ARANGUREN, N.; RINCÓN, J.; ROJAS, M.; GUERRERO, M.; SAN, F.A. Polar Compounds Isolated the leaves of *Calea prunifolia* H.B.K. and their Anti-Adrenergic Related Vasodilator Activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.22, n.12, p. 2281-2285, 2011.

RAM, M; ABDIN, M.Z.; KHAN, M.A.; JHA, P. HPTLC Fingerprint Analysis: A Quality Control for Authentication of Herbal Phytochemicals. In: SRIVASTAVA, M. High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC). 1 ed., p. 105-116, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011.

REICH, E.; SCHIBLI, A. **High-performance thin-layer chromatography for the analysis of medicinal plants**. Thieme, 264 p., 2007.

RIBEIRO V.L.S.; SANTOS J.C.; MARTINS J.R.; SCHRIPEMA J.; SIQUEIRA I.R.; VON P.G.L.; APEL M.A. Acaricidal Properties Of The Essential Oil And Precocene Ii Obtained From *Calea serrata* (Asteraceae) On The Cattle Tick *Rhipicephalus (Boophilus) Microplus* (acari: ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v.179, p. 195-198, 2011.

RODRIGUES, M.T.; ALVES, T.L.C.; SOARES, G.L.G.; RITTER, M.R. Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.139, n.1, p. 155-163, 2012.

RODRIGUES-TORRES, V.N.; MACHADO, J.D.; RAMOS, L.S.; PAGHAN, R.; KAUTZ, J.; ROUAUD, I.; SAUVAGER, A.; TOMASI, S.; LOHÉZIC-LE DÉVÉHAT, F.; DALBÓ, S.; AMARAL, P.A. Phytochemical investigation, antinociceptive activity and cytotoxicity of crude extracts of *Calea uniflora* Less. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.10, n.39, p. 695-704, 2016.

ROQUE N.; CARVALHO V.C. Estudos taxonômicos do gênero *Calea* (Asteraceae, Neurolaeneae). **Rodriguésia**, v.62, p. 547–561, 2011.

RUIZ-REYES, E.; SUAREZ, M. Lactonas sesquiterpénicas. Diversidad estructural y sus actividades biológicas. **CENIC Ciencias Biológicas**, v.46, n.1, p. 9-24, 2015.

SALAGA M.; KOWALCZUK A.; ZIELINSKA M.; BLAZEWICZ A.; FICHNA J. *Calea zacatechichi* dichloromethane extract exhibits antidiarrheal and antinociceptive effects in mouse models mimicking irritable bowel syndrome. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v.388, n.10, p. 1069-77, 2015.

SALERNO, A. R.; SILVA JUNIOR, A. A.; AGOSTINI, I. Manejo de Plantas Medicinais. **Caderno Técnico-Didático**, Associação Catarinense de Plantas Medicinais (ACPM), v.1, p. 24-46, out. 2011.

SANTA CATARINA. Governo do Estado de Santa Catarina. Secretaria de Estado do Desenvolvimento Econômico Sustentável. **Santa Catarina em Números**. Florianópolis, 2013.

SARTORELLI, P.; YOSHINAGA, M.L.; FERREIRA, M.J.P.; LAGO, J.H.G.; PASSERO, L.F.D. evaluation of in vitro activity and ultrastructural changes in *Leishmania amazonensis* caused by sesquiterpene lactones from *Calea pinnatifida* (Asteraceae). **Planta Medica**, v.82 (S 01), 2016.

SBCS (Sociedade Brasileira de Ciência do Solo). **Manual de adubação e de calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 10. ed., Porto Alegre, 2004.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; BOEKER, R.; JAKUPOVIC, J.; BOHLMANN, F. A myrtenylfuroheliangolide from *Calea rupicola*. **Phytochemistry**.v.25, n.7, p. 1753-1754, 1986.

SHINDE, D.B.; CHAVAN, M.J.; WAKTE, P.S. HPTLC in Herbal Drug Quantification. In: SRIVASTAVA, M. **High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC)**. 1 ed., p. 117-138, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011.

SHIVATARE, R.S.; NAGORE, D.H.; NIPANIKAR, S.U. 'HPTLC' an important tool in standardization of herbal medical product: A review. **Journal of Scientific and Innovative Research**, v.2, n.6, p. 1086-1096, 2013.

SEVEGNANI, L.; SCHROEDER, E. **Biodiversidade Catarinense: características, potencialidades, ameaças**. Blumenau: Edifurb, 2013.

SILVA, N.C.C.; FERNANDES JUNIOR, A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 16, n. 3, p. 402-413, 2010.

SOUTHWELL, I.A.; BOURKE, C.A. Seasonal Variation In Hypericin Content Of *Hypericum perforatum* L. (St. John's Wort). **Phytochemistry**, v.56, n.5, p. 437-441, 2001.

SPITALER, R.; SCHLORHAUFER, D.; ELLMERER, E.P.; MERFORT, I.; BORTENSCHLAGER, S.; STUPPNER, H.; ZIDORN, C. Altitudinal variation of secondary metabolites profiles in flowering heads of *Arnica montana* cv. ARBO. **Phytochemistry**, v. 67, p. 409-417, 2006.

SUNITA, S.; ABHISHEK, S. A comparative of phytochemical fingerprint of *Asteracantha longifolia* Nees. using HPTLC. **Asian Journal of Plants Sciences**, v. 7, n.6, p. 611-614, 2008.

VÁSQUEZ, S.P.F.; MENDONÇA, M.S.; NODA, S.N. Etnobotânica de plantas medicinais em comunidades ribeirinhas do Município de Manacapuru, Amazonas, Brasil. *Acta Amazônica*, v.44, n.4, p. 457-472, 2014.

VEIGA Jr, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas Medicinais: Cura Segura? **Química Nova**, v.28, n.3, p. 519-528, 2005.

VENEGAS-FLORES H.; SEGURA-COBOS D.; VÁSQUEZ-CRUZ B. Antiinflammatory Activity of the Aqueous Extract of *Calea zacatechichi*. **Proceedings of the Western Pharmacology Society** v.45, p. 110-111, 2002.

VICHNEWSKI, W.; GOULART, E.G.; HERZ, W. A heliangolide from *Calea lantanoides*. **Phytochemistry**, v.21, n.2, p. 464-465, 1982.

WAGNER, H., BLADT, S. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**. 2. Ed. Berlin: Springer. 384p.

WALLAART, T.E.; PRAS, N.; BEEKMAN, A.C.; QUAX, W.J. Seasonal Variation Of Artemisinin And its Biosynthetic Precursors In Plants Of *Artemisia annua* Of Different Geographical Origin: Proof For The Existence Of Chemotypes. **Planta Medica**, v. 66, n.1, p. 57-62, 2000.

WU, H.; FRONCZEK, F.R.; BURANDT Jr., C.L.; ZJAWIONY, J.K. Antileishmanial Germacranolides from *Calea zacatechichi*. **Planta Medica**, n.77, p. 749-753, 2011.

YAMADA, M.; MATSUURA, N.; SUZUKI, H.; KUROSAKA, C.; HASEGAWA, N.; UBUKATA, M.; TANAKA, T.; IINUMA, M. Germacranolides from *Calea urticifolia*. **Phytochemistry** v.65, n.23, p. 3107-3111, 2004.

ZIDORN, C., STUPPNER, H. Evaluation of chemosystematic characters in the genus *Leontodon*. **Taxon**, v. 50, p. 115-133, 2001.

**ANEXO(S)**

**ANEXO A – LAUDOS DE ANÁLISE DE SOLO**

**Laboratório de Análise de Solos**  
 Integrante da Rede Oficial de Laboratórios de Análise de Solos  
 e de Tecido Vegetal dos Estados do RS e SC - Rolrs

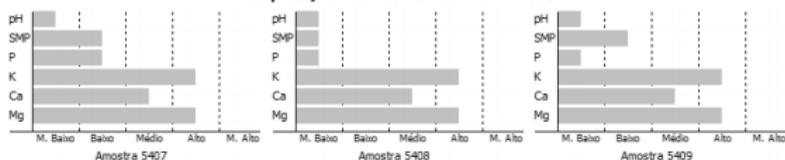
**Relatório de Análise de Solo**

Produtor...: Fundação Educacional de Criciúma - 83.661.074/0001-04    N° do Relatório: 47535  
 Localidade...: AVENIDA Universitária 1105 Bairro Universitário, CEP: 89806-    Data Entrada: 12/04/2016  
 Município...: CRICIÚMA/SC    Data Emissão: 11/05/2016  
 Remetente...: GR. Criciúma    Análise.....: Particular  
 Município...: CRICIÚMA/SC    Cópias.....: 3  
 Matrícula...:

N° da Amostra	Ref.	Área (ha)	Mat.Org.	% Argila mlv	pH-Água 1:1	Índice SMP	P mg/dm³	K mg/dm³	M.O. %	Al cmolc/d	Ca cmolc/d	Mg cmolc/dm
5407	01 - Içara	--		32	4,5	5,3	5,0	148,0	2,2	1,7	3,2	2,3
5408	02 - Içara	--		34	4,4	5,0	3,6	150,0	2,2	1,8	2,9	2,0
5409	03 - Içara/Calera	--		31	4,5	5,2	3,1	142,0	2,3	2,2	3,2	2,3

N° da Amostra	Ref.	Mat.Org.	H + Al cmolc/dm³	CTC pH7,0 cmolc/dm³	% Saturação na CTC		Soma Bases			Relações		
					Al	V	S	Ca/Mg	Ca/K	Mg/K		
5407	01 - Içara		10,0	15,88	22,08	37,02	5,88	1,39	8,45	6,08		
5408	02 - Içara		13,7	18,98	25,75	27,84	5,28	1,45	7,56	5,21		
5409	03 - Içara/Calera		10,7	16,56	27,18	35,41	5,86	1,39	8,81	6,33		

**Interpretação dos Resultados das Análises**




Cristiano Mora  
 QUIMICO CRQ XIII 13100823  
 Responsável Técnico

Sele digital de fiscalização de laudo  
 38871FD-AB89-4E18-9A07-6704B3905EA  
 Confira os dados do laudo em:  
<http://soloait.epagri.sc.gov.br/>



Governo do Estado de Santa Catarina  
Secretaria de Estado da Agricultura e da Pesca  
Epagri Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina



### Laboratório de Análise de Solos

Integrante da Rede Oficial de Laboratórios de Análise de Solos  
e de Tecido Vegetal dos Estados do RS e SC - Rolas

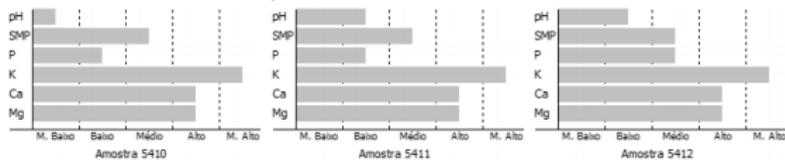
#### Relatório de Análise de Solo

Produtor... Fundação Educacional de Criciúma - 83.661.074/0001-04 N° do Relatório: 47535  
Localidade... AVENIDA Universitária 1105 Bairro Universitário, CEP: 88806- Data Entrada: 12/04/2016  
Município... CRICIÚMA/SC Data Emissão: 11/05/2016  
Remetente... GR.Criciúma Análise..... Particular  
Município... CRICIÚMA/SC Cópias..... 3  
Matricula... :

N° da Amostra	Ref.	Área (ha)	Mat.Org.	% Argila m/v	pH-Água 1:1	Índice SMP	P mg/dm³	K mg/dm³	M.O. %	Al cmol/d	Ca cmol/d	Mg cmol/d
5410	04 - lbe sul	--		18	5,0	5,5	10,9	540,0	4,5	0,6	6,1	3,0
5411	05 - lbe sul	--		18	5,2	5,7	10,7	520,0	4,6	1,5	6,6	2,7
5412	06 - lbe sul/calea	--		19	5,4	6,0	14,8	552,0	4,1	0,0	9,9	3,7

N° da Amostra	Ref.	Mat.Org.	H + Al cmol/dm³	CTC pH7,0 cmol/dm³	% Saturação na CTC		Soma Bases		Relações		
					Al	V	S	Ca/Mg	Ca/K	Mg/K	
5410	04 - lbe sul		7,6	18,08	5,77	57,97	10,48	2,03	4,42	2,17	
5411	05 - lbe sul		6,2	16,83	12,21	63,16	10,63	2,44	4,96	2,03	
5412	06 - lbe sul/calea		4,6	19,61	0,00	76,55	15,01	2,68	7,01	2,62	

#### Interpretação dos Resultados das Análises



Cristiano Mora  
QUÍMICO CRQ XIII 13100823  
Responsável Técnico

Selo digital de fiscalização de laudo  
38871FD-AB89-4E18-9A07-6704B3D05E8A  
Confira os dados do laudo em:  
<http://solosit.epagri.sc.gov.br/>



Governo do Estado de Santa Catarina  
 Secretaria de Estado da Agricultura e da Pesca  
 Epagri Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina

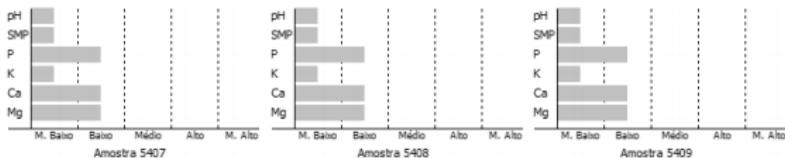
**Laboratório de Análise de Solos**  
 Integrante da Rede Oficial de Laboratórios de Análise de Solos  
 e de Tecido Vegetal dos Estado do RS e SC - Rotas

**Micronutrientes (CuZnFeMn)**

Produtor...: Fundação Educacional de Criciúma - 83.661.074/0001-04 N° do Relatório: 47535  
 Localidade...: AVENIDA Universitária 1105 Bairro Universitário, CEP: 88806- Data Entrada: 12/04/2016  
 Município...: CRICIÚMA/SC Data Emissão: 20/09/2016  
 Remetente...: GR. Criciúma Análise...: Particular  
 Município...: CRICIÚMA/SC Cópias...: 4  
 Matrícula...:

N° da Amostra	Ref.	Área (ha)	Mat.Org.	Cu mg/dm <sup>3</sup>	Zn mg/dm <sup>3</sup>	Fe mg/dm <sup>3</sup>	Mn mg/dm <sup>3</sup>
5407	01 - Içara	--		0,8	2,3	198	68,2
5408	02 - Içara	--		0,8	2,2	225	80,4
5409	03 - Içara/Calais	--		0,9	2,1	204	94,5

**Interpretação dos Resultados das Análises**



Todos os elementos foram determinado a partir do extrato Me-1.

Cristiano Mora  
 QUÍMICO CRQ XIII 13100823  
 Responsável Técnico

Selo digital de fiscalização de laudo  
 C74DE8D8-5642-487F-BC1C-521AAC0B7D5  
 Confira os dados do laudo em:  
<http://solosit.epagri.sc.gov.br/>

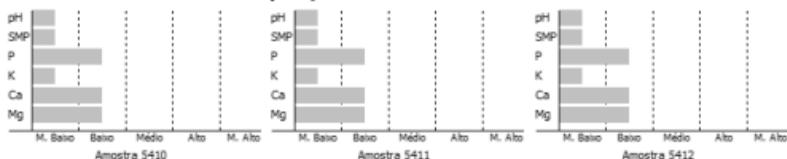
**Laboratório de Análise de Solos**  
Integrante da Rede Oficial de Laboratórios de Análise de Solos  
e de Tecido Vegetal dos Estados do RS e SC - Rolos

**Micronutrientes (CuZnFeMn)**

Produtor...: Fundação Educacional de Criciúma - 83.661.074/0001-04 N° do Relatório: 47535  
Localidade...: AVENIDA Universitária 1105 Bairro Universitário, CEP: 88806- Data Entrada: 12/04/2016  
Município...: CRICIÚMA/SC Data Emissão: 20/09/2016  
Remetente...: GR. Criciúma Análise.....: Particular  
Município...: CRICIÚMA/SC Cópias.....: 4  
Matrícula...:

N° da Amostra	Ref.	Área (ha)	Mat.Org.	Cu mg/dm³	Zn mg/dm³	Fe mg/dm³	Mn mg/dm³
5410	04 - lbe sul	--		2,2	8,0	36	58,1
5411	05 - lbe sul	--		2,2	7,2	37	61,1
5412	06 - lbe su#calea	--		2,4	3,8	27	43,0

**Interpretação dos Resultados das Análises**



Todos os elementos foram determinado a partir do extrato Me-1.



Cristiano Mora  
QUÍMICO CRQ XIII 13100823  
Responsável Técnico

Selo digital de finalização de Laudo  
51c8e3a2-5e78-4244-9b73-544c60a594c  
Confira os dados do laudo em:  
<http://solosit.epagri.sc.gov.br/>

**ANEXO B – DADOS DA DETERMINAÇÃO DA UMIDADE DO SOLO**

### Umidade do solo na altitude de 25 m.

Amostras	Peso úmido (g)	Peso seco (g)	Umidade (%)
1	100,063	82,326	17,726
2	100,154	83,018	17,110
3	100,067	80,936	19,118
4	100,146	84,446	15,677
5	100,190*	81,066*	-----
6	100,124	81,195	18,906
7	100,018*	79,739*	-----
8	100,170	82,981	17,160
<b>Média</b>	<b>100,121</b>	<b>82,484</b>	<b>17,616</b>

\*Os valores mínimo e máximo foram desprezados no cálculo da média.

### Umidade do solo na altitude de 800 m.

Amostras	Peso úmido (g)	Peso seco (g)	Umidade (%)
1	100,220*	69,945*	-----
2	100,024	67,691	32,325
3	100,112	69,594	30,484
4	100,010	67,790	32,217
5	100,083	67,537	32,519
6	100,011	66,878	33,129
7	100,131	77,554	22,547
8	100,003*	68,589*	-----
<b>Média</b>	<b>100,062</b>	<b>69,507</b>	<b>30,537</b>

\*Os valores mínimo e máximo foram desprezados no cálculo da média.

**ANEXO C – DADOS DO *SOFTWARE* WINCATS DA COLETA  
DO INVERNO PARA CONSTRUÇÃO DOS HISTOGRAMAS**

**Rfs de 0,10 – 0,35**

<b>Rf</b>	<b>0,10-0,12</b>	<b>0,13-0,16</b>	<b>0,18-0,29</b>	<b>0,30-0,35</b>
<b>Média</b>	<b>0,1</b>	<b>0,14</b>	<b>0,25</b>	<b>0,33</b>
<b>Extrato</b>	<b>pic1</b>	<b>pic2</b>	<b>pic3</b>	<b>pic4</b>
EB25	1005	0	0	1317
EB25	862	0	0	1583
EB25	886	0	0	914
EB25	1082	0	0	2117
<b>Média</b>	<b>958,75</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1482,75</b>
<b>DP</b>	<b>103,25</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>504,40</b>
EB800	773	0	0	677
EB800	759	0	0	719
EB800	1012	0	0	1086
EB800	709	0	0	728
<b>Média</b>	<b>813,25</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>802,5</b>
<b>DP</b>	<b>135,32</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>190,30</b>
HEX25	830	0	2333	420
HEX25	717	0	2046	426
HEX25	1153	0	3048	739
HEX25	1130	0	3924	799
<b>Média</b>	<b>957,5</b>	<b>0</b>	<b>2837,75</b>	<b>596</b>
<b>DP</b>	<b>217,62</b>	<b>0,00</b>	<b>837,81</b>	<b>201,27</b>
HEX800	1281	880	2626	0
HEX800	1331	872	2837	0
HEX800	1143	849	2718	0
HEX800	853	476	2226	0
<b>Média</b>	<b>1152</b>	<b>769,25</b>	<b>2601,75</b>	<b>0</b>
<b>DP</b>	<b>214,60</b>	<b>195,94</b>	<b>264,97</b>	<b>0,00</b>
DIC25	1736	0	1003	2099
DIC25	1886	0	912	2001
DIC25	2011	0	1017	2121

DIC25	2173	0	1464	2219
<b>Média</b>	<b>1951,5</b>	<b>0</b>	<b>1099</b>	<b>2110</b>
<b>DP</b>	<b>185,59</b>	<b>0,00</b>	<b>247,75</b>	<b>89,45</b>
DIC800	1708	0	1392	0
DIC800	871	0	1225	0
DIC800	607	0	1793	0
DIC800	1503	0	1862	0
<b>Média</b>	<b>1172,25</b>	<b>0</b>	<b>1568</b>	<b>0</b>
<b>DP</b>	<b>518,55</b>	<b>0,00</b>	<b>308,59</b>	<b>0,00</b>
AE25	462	0	437	1282
AE25	511	0	503	1522
AE25	480	0	394	1306
AE25	510	0	515	1472
<b>Média</b>	<b>490,75</b>	<b>0</b>	<b>462,25</b>	<b>1395,5</b>
<b>DP</b>	<b>23,96</b>	<b>0,00</b>	<b>56,98</b>	<b>119,37</b>
AE800	1564	0	1861	0
AE800	1197	0	1401	0
AE800	1120	0	1083	0
AE800	983	0	1100	0
<b>Média</b>	<b>1216</b>	<b>0</b>	<b>1361,25</b>	<b>0</b>
<b>DP</b>	<b>248,31</b>	<b>0,00</b>	<b>363,78</b>	<b>0,00</b>

Legenda: Rf: fator de retenção; pic:pico; EB: extrato bruto; HEX: hexano; DIC: diclorometano; AE: acetato de etila; DP: desvio padrão.

**Rfs de 0,35 – 0,56**

<b>Rf</b>	<b>0,35-0,41</b>	<b>0,42-0,47</b>	<b>0,45-0,53</b>	<b>0,53-0,56</b>
<b>Média</b>	<b>0,39</b>	<b>0,44</b>	<b>0,5</b>	<b>0,55</b>
<b>Extrato</b>	<b>pic5</b>	<b>pic6</b>	<b>pic7</b>	<b>pic8</b>
EB25	857	0	3234	0
EB25	971	0	2945	0
EB25	1041	0	3143	0
EB25	1193	0	4023	0
<b>Média</b>	<b>1015,5</b>	<b>0</b>	<b>3336,25</b>	<b>0</b>
<b>DP</b>	<b>140,55</b>	<b>0,00</b>	<b>473,46</b>	<b>0,00</b>
EB800	0	0	781	0
EB800	0	0	746	449
EB800	0	0	955	0
EB800	0	0	649	0
<b>Média</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>782,75</b>	<b>112,25</b>
<b>DP</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>127,69</b>	<b>224,50</b>
HEX25	2574	0	1277	752
HEX25	2493	0	1471	623
HEX25	3646	0	2516	1602
HEX25	3882	0	2447	1332
<b>Média</b>	<b>3148,75</b>	<b>0</b>	<b>1927,75</b>	<b>1077,25</b>
<b>DP</b>	<b>717,70</b>	<b>0,00</b>	<b>644,92</b>	<b>466,33</b>
HEX800	1088	1297	502	4976
HEX800	1263	971	837	4949
HEX800	1024	965	438	4899
HEX800	1473	714	308	4712
<b>Média</b>	<b>1212</b>	<b>986,75</b>	<b>521,25</b>	<b>4884</b>
<b>DP</b>	<b>201,20</b>	<b>239,00</b>	<b>225,44</b>	<b>119,02</b>
DIC25	4045	0	288	1415
DIC25	3984	0	214	1507
DIC25	4357	0	289	1462

DIC25	4378	0	310	1802
<b>Média</b>	<b>4191</b>	<b>0</b>	<b>275,25</b>	<b>1546,5</b>
<b>DP</b>	<b>205,50</b>	<b>0,00</b>	<b>42,07</b>	<b>174,43</b>
DIC800	0	818	746	3113
DIC800	0	508	266	2814
DIC800	0	1173	357	3376
DIC800	0	861	350	3416
<b>Média</b>	<b>0</b>	<b>840</b>	<b>429,75</b>	<b>3179,75</b>
<b>DP</b>	<b>0,00</b>	<b>272,05</b>	<b>214,85</b>	<b>278,42</b>
AE25	2917	0	530	650
AE25	3429	0	880	597
AE25	3190	0	660	403
AE25	3742	0	781	710
<b>Média</b>	<b>3319,5</b>	<b>0</b>	<b>712,75</b>	<b>590</b>
<b>DP</b>	<b>350,84</b>	<b>0,00</b>	<b>151,45</b>	<b>132,94</b>
AE800	1733	0	1084	4793
AE800	1264	0	589	3705
AE800	1340	0	652	4079
AE800	1146	0	607	3903
<b>Média</b>	<b>1370,75</b>	<b>0</b>	<b>733</b>	<b>4120</b>
<b>DP</b>	<b>254,35</b>	<b>0,00</b>	<b>235,50</b>	<b>473,96</b>

Legenda: Rf: fator de retenção; pic:pico; EB: extrato bruto; HEX: hexano; DIC: diclorometano; AE: acetato de etila; DP: desvio padrão.

**Rfs de 0,60 – 0,79**

<b>Rf</b>	<b>0,60-0,65</b>	<b>0,65-0,71</b>	<b>0,69-0,79</b>	<b>0,75-0,79</b>
Média	<b>0,64</b>	<b>0,67</b>	<b>0,73</b>	<b>0,77</b>
<b>Extrato</b>	<b>pic9</b>	<b>pic10</b>	<b>pic11</b>	<b>pic12</b>
EB25	1072	1404	0	229
EB25	1250	1517	0	276
EB25	1335	601	0	303
EB25	1376	2158	0	373
<b>Média</b>	<b>1258,25</b>	<b>1420</b>	<b>0</b>	<b>295,25</b>
<b>DP</b>	<b>134,80</b>	<b>639,03</b>	<b>0,00</b>	<b>60,18</b>
EB800	0	2672	0	0
EB800	0	2393	0	0
EB800	0	3243	0	0
EB800	0	2799	0	0
<b>Média</b>	<b>0</b>	<b>2776,75</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>DP</b>	<b>0,00</b>	<b>354,08</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
HEX25	1222	0	7708	0
HEX25	1478	0	7861	0
HEX25	2711	0	9709	0
HEX25	2596	0	9759	0
<b>Média</b>	<b>2001,75</b>	<b>0</b>	<b>8759,25</b>	<b>0</b>
<b>DP</b>	<b>761,25</b>	<b>0,00</b>	<b>1127,46</b>	<b>0,00</b>
HEX800	2576	0	12832	0
HEX800	2123	0	12834	0
HEX800	1874	0	12959	0
HEX800	1146	0	13514	0
<b>Média</b>	<b>1929,75</b>	<b>0</b>	<b>13034,75</b>	<b>0</b>
<b>DP</b>	<b>597,87</b>	<b>0,00</b>	<b>324,98</b>	<b>0,00</b>
DIC25	0	330	0	330
DIC25	0	498	0	499
DIC25	5395	0	0	510

DIC25	0	688	0	688
<b>Média</b>	<b>1348,75</b>	<b>379</b>	<b>0</b>	<b>506,75</b>
<b>DP</b>	<b>2697,50</b>	<b>291,94</b>	<b>0,00</b>	<b>146,24</b>
DIC800	0	0	0	746
DIC800	0	0	0	342
DIC800	0	0	0	262
DIC800	0	0	0	239
<b>Média</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>397,25</b>
<b>DP</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>236,65</b>
AE25	0	0	1697	1650
AE25	0	0	0	1331
AE25	0	0	0	1159
AE25	0	0	0	1515
<b>Média</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>424,25</b>	<b>1413,75</b>
<b>DP</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>848,50</b>	<b>214,33</b>
AE800	0	0	0	2681
AE800	0	0	0	1474
AE800	0	0	0	1197
AE800	0	0	0	1291
<b>Média</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1660,75</b>
<b>DP</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>689,82</b>

Legenda: Rf: fator de retenção; pic:pico; EB: extrato bruto; HEX: hexano; DIC: diclorometano; AE: acetato de etila; DP: desvio padrão.

**Rfs de 0,74 – 0,92**

<b>Rf</b>	<b>0,74-0,84</b>	<b>0,78-0,87</b>	<b>0,88-0,90</b>	<b>0,91-0,92</b>
média	<b>0,8</b>	<b>0,85</b>	<b>0,89</b>	<b>0,92</b>
<b>Extrato</b>	<b>pic13</b>	<b>pic14</b>	<b>PIC15</b>	<b>PIC16</b>
EB25	0	3391	51	0
EB25	0	3239	40	0
EB25	0	2927	42	0
EB25	0	4251	114	347
<b>Média</b>	<b>0</b>	<b>3452</b>	<b>61,75</b>	<b>86,75</b>
<b>DP</b>	<b>0,00</b>	<b>566,60</b>	<b>35,16</b>	<b>173,50</b>
EB800	0	3252	0	524
EB800	0	3283	0	596
EB800	0	4454	0	1703
EB800	0	3756	0	2182
<b>Média</b>	<b>0</b>	<b>3686,25</b>	<b>0</b>	<b>1251,25</b>
<b>DP</b>	<b>0,00</b>	<b>561,39</b>	<b>0,00</b>	<b>822,32</b>
HEX25	0	15302	1644	0
HEX25	0	17014	2107	0
HEX25	0	18727	2092	0
HEX25	0	18517	2155	0
<b>Média</b>	<b>0</b>	<b>17390</b>	<b>1999,5</b>	<b>0</b>
<b>DP</b>	<b>0,00</b>	<b>1587,33</b>	<b>238,52</b>	<b>0,00</b>
HEX800	0	14288	1445	0
HEX800	0	14657	1325	137
HEX800	0	15799	1475	78
HEX800	0	17350	1639	0
<b>Média</b>	<b>0</b>	<b>15523,5</b>	<b>1471</b>	<b>53,75</b>
<b>DP</b>	<b>0,00</b>	<b>1377,11</b>	<b>129,40</b>	<b>66,58</b>
DIC25	3924	3999	0	0
DIC25	4298	5176	0	0
DIC25	4682	5304	0	0

DIC25	5149	5664	0	0
<b>Média</b>	<b>4513,25</b>	<b>5035,75</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>DP</b>	<b>524,79</b>	<b>721,38</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
DIC800	8283	7212	0	0
DIC800	6979	6013	0	0
DIC800	7826	6868	0	0
DIC800	9212	8180	0	0
<b>Média</b>	<b>8075</b>	<b>7068,25</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>DP</b>	<b>930,82</b>	<b>896,35</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
AE25	2202	6665	444	0
AE25	2539	4660	460	0
AE25	1881	3751	388	0
AE25	1661	7291	438	0
<b>Média</b>	<b>2070,75</b>	<b>5591,75</b>	<b>432,5</b>	<b>0</b>
<b>DP</b>	<b>383,14</b>	<b>1662,91</b>	<b>31,09</b>	<b>0,00</b>
AE800	7512	7494	500	0
AE800	6471	6554	401	0
AE800	8107	7817	403	0
AE800	5979	7357	467	0
<b>Média</b>	<b>7017,25</b>	<b>7305,5</b>	<b>442,75</b>	<b>0</b>
<b>DP</b>	<b>967,59</b>	<b>536,83</b>	<b>48,95</b>	<b>0,00</b>

Legenda: Rf: fator de retenção; pic:pico; EB: extrato bruto; HEX: hexano; DIC: diclorometano; AE: acetato de etila; DP: desvio padrão.