

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS**

ROBERTO RECART DOS SANTOS

**COMPARAÇÃO DE SISTEMAS DE CULTIVO CONVENCIONAL E ORGÂNICO NA
PRODUÇÃO DE CUMARINA EM *Mikania glomerata* Spreng. (Asteraceae) E
AVALIAÇÃO DE GENOTOXICIDADE**

CRICIÚMA, 2018

ROBERTO RECART DOS SANTOS

COMPARAÇÃO DE SISTEMAS DE CULTIVO CONVENCIONAL E ORGÂNICO NA
PRODUÇÃO DE CUMARINA EM *Mikania glomerata* Spreng. (Asteraceae) E AVALIAÇÃO
DE GENOTOXICIDADE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade do Extremo Sul Catarinense para obtenção do Título de Doutor em Ciências Ambientais.

Área de Concentração: Ecologia e gestão de Ambientes Alterados.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Patrícia de Aguiar Amaral.

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Vanessa Moraes de Andrade.

CRICIÚMA, 2018.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

S237c Santos, Roberto Recart dos.

Comparação de sistemas de cultivo convencional e orgânico na produção de cumarina em *Mikania glomerata Spreng.* (Asteraceae) e avaliação de genotoxicidade / Roberto Recart dos Santos. - 2018.

107 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Criciúma, 2018.

Orientação: Patrícia de Aguiar Amaral.

Coorientação: Vanessa Moraes de Andrade.

1. Guaco – Cultivo. 2. Plantas medicinais – Cultivo. 3. Cumarina. 4. Toxicologia genética. 5. Agricultura orgânica. I. Título.

CDD 23. ed. 633.88399



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão
Unidade Acadêmica de Humanidades, Ciências e Educação
Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais

TERMO DE APRESENTAÇÃO DE TESE

Aos trinta dias do mês de agosto de dois mil e dezessete, as quatorze, na Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, após o cumprimento legal de conclusão das disciplinas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, nível de Doutorado, realizaram-se a apresentação e a consequente defesa da Tese intitulada: “**Avaliação de modelos de cultivo convencional e orgânico como indicadores na produção de Cumarina em Mikania glomerata Spreng. (Asteraceae) e genotoxicidade**”, do candidato **ROBERTO RECART DOS SANTOS**. A Banca Examinadora foi composta pelos professores: **Dra. Patrícia de Aguiar Amaral** (Presidente e Orientadora – UNESC), **Dr. Álvaro José Back** (UNESC), **Dr. Eduardo Rico** (UNESC), **Dra. Ingrid Bergman Inchausti de Barros** (Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS) e **Dra. Simone Cristina Baggio Gnoatto** (Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS).

O candidato, após a apresentação, foi arguido pela Banca Examinadora, que assim expressou o resultado final da Tese:

Trabalho aprovado;

Trabalho sujeito a correções, sendo que a aprovação da candidata dependerá do parecer favorável da Banca Examinadora;

Trabalho não aprovado.

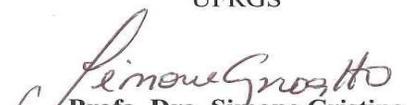
OBSERVAÇÕES:

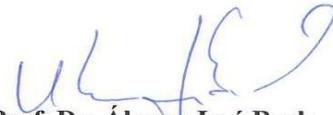
BANCA EXAMINADORA:

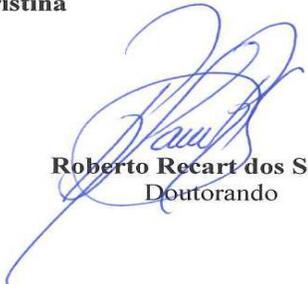

Prof. Dra. Patrícia de Aguiar Amaral
Presidente e Orientadora – UNESC


**Prof. Dra. Ingrid Bergman
Inchausti de Barros**
UFRGS


Prof. Dr. Eduardo Rico
UNESC


**Prof. Dra. Simone Cristina
Baggio Gnoatto**
UFRGS


Prof. Dr. Álvaro José Back
UNESC


Roberto Recart dos Santos
Doutorando

Criciúma/ SC, 30 de agosto de 2017.

Aos meus pais, Deloá e Edmundo, pelo amor, carinho, dedicação e educação, à minha esposa Deise pelo amor e por ter me ajudado a enfrentar as dificuldades com serenidade e otimismo e aos meus filhos, Eduarda, Victor e Luiza, pelo apoio, incentivo e compreensão.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela vida e oportunidades, suporte nas horas difíceis e luz para discernir e ter a consciência das dificuldades ao longo da minha jornada terrena.

Aos meus pais, esposa e filhos por todo amor, torcida e encorajamento.

A Dra. Patrícia de Aguiar Amaral, pela excelente orientação, ensinamentos, confiança e pela importante contribuição no desenvolvimento desta pesquisa.

À Dra. Vanessa Moraes de Andrade, pela coorientação, incentivo e contribuições durante a realização do trabalho.

À Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais - PPGCA, pela concessão da bolsa de estudos e incentivo à capacitação docente.

Aos colegas e professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais - PPGCA por todos os conhecimentos transmitidos e amizade firmada.

Ao LAPLAM - Laboratório de Plantas Medicinais e as acadêmicas de Iniciação Científica Bianca Turra e Kellen Simon, a acadêmica de pós-doutorado Jacqueline Kautz pelo auxílio na realização das análises fitoquímicas.

Ao LABIM - Laboratório de Biologia Celular e Molecular o meu agradecimento carinhoso à Rafaela Leandro, Adriani Paganini Damiani e Thais Vilela.

Ao MULTILAB - Laboratório Multiusuários do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e a Rahisa Scussel, Assistente Técnica, pela condução das análises no CLAE.

Aos funcionários do Horto Florestal da UNESC, em especial ao Biólogo Cristian Daniel Luzietti Pereira, pela colaboração na condução do experimento de campo.

À funcionária da Biblioteca Central Prof. Eurico Back da UNESC, Fabiola Ronchi Gava, pela ajuda na formatação e revisão.

A todos que, de uma forma ou de outra, colaboraram para o encerramento desta etapa importante da minha vida e que, embora não citados aqui, não deixam de ter meu profundo agradecimento.

**"Não sou da altura que me veem, mas sim da altura
que meus olhos podem ver".**

Fernando Pessoa

RESUMO

Mikania glomerata Spreng. – Asteraceae (guaco) é uma planta de reconhecida importância medicinal como produtora de cumarina, com indicação terapêutica validada pela ANVISA como expectorante e para o tratamento de doenças respiratórias. Possui ainda ação broncodilatadora, antimutagênica, antiulcerogênica, entre outras. Sendo a cumarina o metabólito secundário, o marcador químico relacionado à atividade farmacológica desta planta, estudos agrônômicos de plantas medicinais, demonstram que o tipo de cultivo pode interferir no desenvolvimento da planta e, conseqüentemente, na síntese de compostos secundários. Portanto, o presente trabalho avaliou a influência do sistema de cultivo, convencional e orgânico, com vistas a determinar a influência destes na produção de cumarina (1,2-benzopirona) em folhas de *M. glomerata*, bem como avaliar a genotoxicidade desta planta em células sanguíneas humanas. A determinação e quantificação da cumarina foram feitas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de acordo com os critérios descritos pela ANVISA. A avaliação genotóxica foi realizada através de Teste Cometa. Os resultados demonstraram que o sistema de cultivo orgânico apresentou o dobro da concentração de cumarina em relação ao sistema convencional, sendo 100% mais produtivo, mas não diferiu significativamente quanto à produção de matéria seca de folhas colhidas aos 100 dias de cultivo ($p < 0,01$). Quanto à ação genotóxica, o grupo de células exposto por 6 horas ao extrato de *M. glomerata* cultivada de forma convencional mostrou aumento dos níveis de danos ao DNA quando comparado com 2 horas de exposição ao mesmo extrato ($p < 0,05$). Além disso, observou-se que 24 horas de exposição foi capaz de reduzir dano ao DNA quando comparado com 6 horas de exposição ao mesmo extrato ($p < 0,05$) demonstrando a ação reparadora dos danos. Não houve diferença significativa entre o grupo de células expostas ao extrato da planta cultivada através do sistema orgânico nos diferentes tempos de exposição, mas diferiram significativamente do grupo de células expostas ao extrato da planta cultivada através do sistema convencional quando comparados dentro do tempo de 6 horas de exposição.

Palavras-chave: Planta Medicinal. Sistema de Cultivo. CLAE. Cumarina. Genotoxicidade.

ABSTRACT

Mikania glomerata Spreng. - Asteraceae (guaco) is a plant of recognized medicinal importance as a producer of coumarin, with a therapeutic indication validated by ANVISA as an expectorant and for the treatment of respiratory diseases. It also has bronchodilator, antimutagenic, antiulcerogenic action, among others. Since coumarin is the secondary metabolite, the chemical marker related to the pharmacological activity of this plant, agronomic studies of medicinal plants, demonstrate that the type of crop can interfere in the development of the plant and, consequently, in the synthesis of secondary compounds. Therefore, the present work evaluated the influence of the conventional and organic cultivation system, in order to determine their influence on the production of coumarin (1,2-benzopyrone) in leaves of *M. glomerata*, as well as evaluate the genotoxicity of this plant in human blood cells. The determination and quantification of coumarin were done by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) according to the criteria described by ANVISA. The genotoxic evaluation was performed through Comet Test. The results showed that the organic crop system presented double the concentration of coumarin in relation to the conventional system, being 100% more productive, but did not differ significantly in the dry matter yield of leaves harvested at 100 days of cultivation ($p < 0,01$). As for the genotoxic action, the group of cells exposed for 6 hours to the conventionally grown extract of *M. glomerata* showed increased levels of DNA damage when compared to 2 hours of exposure to the same extract ($p < 0,05$). In addition, it was observed that 24 hours of exposure was able to reduce DNA damage when compared to 6 hours of exposure to the same extract ($p < 0,05$) demonstrating the repair action of the damages. There was no significant difference between the group of cells exposed to the extract of the plant grown through the organic system at different exposure times, but they differed significantly from the group of cells exposed to the extract of the cultivated plant through the conventional system when compared within the time of 6 hours exposure.

Keywords: Medicinal Plant. Cultivation System. CLAE. Coumarin. Genotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas da biossíntese da cumarina.	38
Figura 2. Localização do Laboratório de Plantas Mediciniais – LAPLAM no Horto Florestal da UNESC e das áreas de produção de <i>M. glomerata</i> Spreng. (Asteraceae) no sistema convencional e orgânico	45
Figura 3. Sistema de condução das plantas de <i>M. glomerata</i> em espaldeira no Horto Florestal da Unesc, nos sistemas convencional (A) e orgânico (B).	49
Tabela 1. Concentrações (mg) de extrato bruto convencional e orgânico usadas no Teste cometa em células sanguíneas humanas.	58
Figura 4. Fluxograma da produção de folhas e análises dos extratos de <i>M. glomerata</i>	59
Figura 5. Espectro de RMN de ¹ H em CDCl ₃ de cumarina extraída de <i>M. glomerata</i> sob os sistemas de cultivo convencional e orgânico.	61
Figura 6. Ampliação do espectro de RMN de ¹ H em CDCl ₃ de 7.9 à 6.1 ppm da amostra de cumarina extraída de <i>M. glomerata</i> sob os sistemas de cultivo convencional e orgânico.	62
Figura 7. Cumarina 1,2-benzopirona.....	62
Tabela 2. Dados de RMN de ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) de cumarina orgânica e convencional e comparação com dados da literatura.....	63
Figura 8. Expansão de ¹³ C nos espectros de RMN (300 MHz) em CDCl ₃ de cumarina.	64
Tabela 3. Dados de RMN de ¹³ C (CDCl ₃ , 300 MHz) de cumarina orgânica e convencional e comparação com dados da literatura.....	64
Figura 9. Tempo de retenção (Tr) de 6,284 minutos de cumarina (1,2-benzopirona, Sigma).	65
Tabela 4. Curva da concentração (µg/µL) da substância pura de cumarina (1,2-benzopirona: Sigma).....	66
Figura 10. Retra de calibração do padrão de cumarina em diferentes concentrações.	66
Figura 11. Perfil cromatográfico do extrato bruto de <i>M. glomerata</i> (EBMg/Conv.) obtido a partir do cultivo convencional (Amostra Conv18 - 3º triplicata representando o comportamento médio de 17 amostras).	67
Figura 12. Perfil cromatográfico da amostra do cultivo orgânico (EBMg/Org.) Amostra ORG12 - 1º triplicata representando a o comportamento médio de 13 amostras).	68
Tabela 5. Parâmetros de referência para análise básica de fertilidade do solo, segundo a Rede Oficial de Laboratórios de Análise de solos para o solo usado no experimento.....	70
Tabela 6. Parâmetros de referência para análise de micronutrientes, segundo a Rede Oficial de Laboratórios de Análise de solos para o solo usado no experimento.	70
Tabela 7. Valores de referência utilizados como limites máximos de contaminantes admitidos em compostos orgânicos.	72
Figura 13. A produção de matéria seca de folhas de <i>M. glomerata</i> colhidas aos 100 dias não diferiram entre os tratamentos convencional e orgânico.	73
Figura 14. A produção de cumarina de folhas de <i>M. glomerata</i> colhidas aos 100 dias diferiram significativamente (p<0,001) entre os tratamento convencional e orgânico.....	74

Tabela 8. Concentração média de cumarina em g/kg folha de <i>M. glomerata</i> observada nos tratamentos produção convencional e produção orgânica.	74
Tabela 9. Matéria Seca (MS) média em g de folhas de <i>M. glomerata</i> observada nos tratamentos produção convencional e produção orgânica.	74
Figura 15. Percentual (%) de danos ao DNA (Tail Intensity) em função da concentração de cumarina e tempo de exposição (h) do extrato bruto de <i>M. glomerata</i> Spreng.	82
Figura 16. Percentual (%) de danos (Tail Intensity) ao DNA em função do peso de extrato bruto e tempo de exposição (h) do de <i>M. glomerata</i> Spreng.....	82
Figura 17. Percentual (%) de viabilidade celular em função da concentração de cumarina e tempo de exposição (h) do extrato bruto de <i>M. glomerata</i> Spreng.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações (mg) de extrato bruto convencional e orgânico usadas no Teste cometa em células sanguíneas humanas.	58
Tabela 2. Dados de RMN de ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) de cumarina orgânica e convencional e comparação com dados da literatura.	63
Tabela 3. Dados de RMN de ¹³ C (CDCl ₃ , 300 MHz) de cumarina orgânica e convencional e comparação com dados da literatura.	64
Tabela 4. Curva da concentração (µg/µL) da substância pura de cumarina (1,2-benzopirona: Sigma).	66
Tabela 5. Parâmetros de referência para análise básica de fertilidade do solo, segundo a Rede Oficial de Laboratórios de Análise de solos para o solo usado no experimento.	70
Tabela 6. Parâmetros de referência para análise de micronutrientes, segundo a Rede Oficial de Laboratórios de Análise de solos para o solo usado no experimento.	70
Tabela 7. Valores de referência utilizados como limites máximos de contaminantes admitidos em compostos orgânicos.	72
Tabela 8. Concentração média de cumarina em g/kg folha de <i>M. glomerata</i> observada nos tratamentos produção convencional e produção orgânica.	74
Tabela 9. Matéria Seca (MS) média em g de folhas de <i>M. glomerata</i> observada nos tratamentos produção convencional e produção orgânica.	74

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 PERFIL DA AGRICULTURA BRASILEIRA	13
1.1.1 Agricultura convencional	15
1.2 AGRICULTURA SUSTENTÁVEL	17
1.2.1 Agricultura ecológica: diferentes modelos.....	20
1.2.2 Agricultura orgânica e a produção de plantas medicinais.....	23
1.3 USO, CULTIVO E MERCADO DE PLANTAS MEDICINAIS	27
1.3.2 Cultivo de plantas medicinais	29
1.3.3 Mercado de fitoterápicos e de plantas medicinais:.....	30
1.3.4 A indústria de fitoterápicos	31
1.3.5 Produção de <i>M. glomerata</i> Spreng.....	33
1.4 O USO DE <i>M. GLOMERATA</i> SPRENG.....	35
1.4.1 Fitoquímica de <i>M. glomerata</i> Spreng.....	36
1.5 ENSAIOS GENOTÓXICOS	39
1.5.1 Genotoxicidade de <i>M. glomerata</i> Spreng.	41
2 OBJETIVOS	43
2.1 OBJETIVO GERAL	43
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
3 HIPÓTESE A SEREM TESTADAS	44
4 METODOLOGIA	45
4.1 LOCALIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO – HORTO FLORESTAL	45
4.3 PROPAGAÇÃO DE <i>M. GLOMERATA</i> SPRENG.....	46
4.4 COMPONENTES DO SISTEMA DE CULTIVO	46
4.2.1 Substrato de plantio	46
4.2.2 Procedimento de plantio e condução das mudas	48
4.2.3 Tratamento Fitossanitário	49
4.3 DADOS DE RENDIMENTO.	50
4. ANÁLISES QUÍMICAS DO MATERIAL VEGETAL	50
4.5 ANÁLISE FITOQUÍMICA	51

4.5.1 Isolamento e purificação da cumarina (1,2-benzopirona)	51
4.5.2 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	52
4.6 SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA	52
4.7 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DESENVOLVIDA – CLAE	53
4.7.1 Especificidade	53
4.7.2 Linearidade	53
4.7.3 Intervalo	54
4.7.4 Precisão e repetibilidade	54
4.7.5 Exatidão	55
4.7.6 Robustez	55
4.9 AVALIAÇÕES DE GENOTOXICIDADE	56
4.9.1 Teste cometa	57
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	58
5 RESULTADOS	60
5.1 AVALIAÇÃO QUÍMICA	60
5.1.1 Elucidação estrutural de 1,2-benzopirona por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de próton (1H) e carbono (13C) isolado do extrato vegetal de <i>M. glomerata</i> cultivada sob sistema orgânico e convencional (EBMg/Conv)	60
5.1.2 Perfil cromatográfico da cumarina de referência	65
5.1.3 Perfil cromatográfico do extrato hidroalcoólico de <i>M. glomerata</i> submetida ao cultivo convencional	67
5.1.4 Perfil cromatográfico do extrato bruto de <i>M. glomerata</i> submetida ao cultivo orgânico	68
5.1.5 Validação do método analítico	69
5.2 PRODUÇÃO DE MATÉRIA SECA E CUMARINA	69
5.3 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA	77
6 CONCLUSÃO	85
REFERÊNCIAS	86

1 INTRODUÇÃO

1.1 PERFIL DA AGRICULTURA BRASILEIRA

Sujeita à necessidade de suprir a segurança alimentar de um país em desenvolvimento, a agropecuária brasileira recebeu investimentos e subsídios diretos para pesquisa, o que possibilitou grande ampliação do volume produzido ao longo da segunda metade do século passado e ao longo desse processo exibiu tensões não desprezíveis para o próprio setor e seus agentes. Nesse sentido, é importante notar que o Brasil, ao longo de boa parte do século passado, realizou políticas nem sempre favoráveis à agropecuária (FREITAS; MENDONÇA; LOPES, 2014).

Tal período, até meados de 1970, foi marcado por um maciço ingresso de mão de obra qualificada tanto na área de produção vegetal como animal, com profissionais especializados no exterior mediante bolsas de fomento à pesquisa, seja por meio de programas de pós-graduação financiados por empresas estatais e/ou privadas (FREITAS; MENDONÇA; LOPES, 2014).

Nunes-Deser (2007) relata que em associação ao desenvolvimento tecnológico e da mão de obra especializada veio as alterações da política agrícola brasileira que pode ser dividida em quatro fases após o início da chamada “Revolução Verde”. A primeira fase entre 1965–1985, caracterizada pela modernização conservadora da agricultura não alterou muito sua estrutura fundiária do Brasil. A segunda fase entre 1985–1995 foi marcada com o desmonte das políticas agrícolas e liberalização dos mercados. A terceira entre 1995-2002, caracterizada com a retomada da política de crédito com juros controlados, mas com recursos privados e o desenvolvimento de mecanismos privados de escoamento e estoques da produção. A quarta e última fase a contar de 2003 com o fortalecimento da política de crédito e pequena retomada de outros mecanismos, principalmente dos direcionados à agricultura familiar (seguro agrícola, seguro de preços, compras institucionais, assistência técnica, entre outros), que não mostrou-se suficiente para conter o processo de ampliação do poder econômico das grandes empresas inseridas no mercado mundial.

A agricultura brasileira, como na maioria dos países, proporciona rendas inferiores em relação às demais atividades econômicas apesar da política econômica, agrícola e fundiária do setor agrícola e pecuário, é necessário o apoio público através de políticas sociais. Tanto as

políticas econômicas como as sociais garantem melhoria da renda e das condições de vida das pessoas que dependem da atividade agrícola (NUNES-DESER, 2007).

Entre as décadas de 1950 e 1960 a Revolução Verde foi implantada em diversos países do mundo e no Brasil em particular iniciou após 1964 e consolidou-se no início dos anos 70. Essa estratégia de modernização compreendeu o emprego de “novas tecnologias”, entre as quais o emprego de herbicidas, fertilizantes e variedades de plantas com maior resposta à aplicação de fertilizantes, em um primeiro momento nas grandes culturas como arroz, trigo, milho e soja, assim como de modernas máquinas e equipamentos agrícolas. Acompanhando esse processo, veio o estímulo às organizações institucionais centralizadas nos órgãos de pesquisa em cada estado e nelas a concentração de recursos como elemento indissociável desse movimento de difusão do padrão tecnológico produtivista (BONNY, 1994; ZAMBERLAM; FRONCHETI, 2002; FUCK; BONACELLI, 2007) bem como a instalação de instrumentos de políticas públicas, notadamente crédito subsidiado, dirigiram-se para a elevação da produtividade da terra e do trabalho (GONÇALVES, 1999).

Na década de 1970, no auge do período da Revolução Verde, a Embrapa coordenou o Sistema Cooperativo de Pesquisa Agropecuária – SCPA, formando unidades autônomas e descentralizadas, com organizações estaduais de pesquisa agropecuária que trabalhavam associadas às universidades. Neste período foram criados os Programas Nacionais de Pesquisa – PNPs, com repasse dos recursos para os realizadores de projetos de pesquisa e disponibilização de pessoal técnico e administrativo qualificado, bens e equipamentos em comodato e apoio ao desenvolvimento de recursos humanos. Posteriormente, o SCPA foi transformado no Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária – SNPA, pela Lei Agrícola 8.171/1991 (CHIANCA, 2004; FUCK; BONACELLI, 2007).

Ao longo desse processo de transformação tecnológica ocorreram nas regiões Sul e Sudeste, mas principalmente na Região Sul, um aumento das propriedades entre 100 a 1.000 hectares entre 1970 e 1975 e conseqüentemente reduziu-se, no mesmo período, o número e a participação no sistema produtivo das propriedades com menos de 100 hectares (DELGADO, 1979).

As grandes corporações estabeleceram esses novos padrões tecnológicos e subordinaram os produtores agrícolas à sua lógica tecnicista, já os pequenos agricultores passaram a ter cada vez menos chances de competir e sobreviver diante da impossibilidade de adquirir os novos

“pacotes” tecnológicos e de acompanhar um novo tempo que se implantava no sistema produtivo no Brasil (FREDERICO, 2009).

1.1.1 Agricultura convencional

A agricultura consiste em um tipo de atividade desenvolvida pelo homem, que o relaciona com a terra. Segundo Bonilla (1992) a “agricultura moderna” inicia após a II grande guerra mundial e caracteriza-se por ter como referência um modelo que busca o máximo de produção, e maior lucro. Diehl (1984) ressalta que a agricultura é a arte de obter do solo, o máximo de lucro, porém mantendo sempre a sua fertilidade.

Após a década de 70 no Brasil a agricultura passou a depender da indústria química e mecânica fazendo com que a agricultura tradicional fosse substituída por uma agricultura dependente dos insumos químicos e de mecanização. O uso intensivo de insumos industriais, mecanização e redução do custo de manejo, permitiram o aumento na produção agrícola em países menos desenvolvidos (ZAMBERLAM; FRONCHETI, 2002).

Com isso, o período de 1964 a 1979 caracterizou-se pelo aumento de consumo de fertilizantes minerais solúveis em 1.243%, de pesticidas em 421%, de máquinas agrícolas em 389%, enquanto, no mesmo período, o aumento de produtividade agrícola foi de apenas 4,9% considerando a média de 15 culturas mais importantes nesse período (PASCHOAL, 1983; ROEL, 2002).

O último censo Agropecuário brasileiro mostrou que o uso de fertilizantes aumentou considerando o intervalo de 1992 a 2007 passando de 70 kg/ha para 160 Kg/ha e os agrotóxicos passou de 3 Kg/ha no ano 2000 para 3,5 Kg/ha em 2007 (IBGE, 2006).

Este desenvolvimento tecnológico não trouxe mudanças somente aos produtores, mas também ao meio ambiente. “A revolução verde contribuiu para disseminar problemas ambientais, como erosão do solo, desertificação, poluição por agrotóxicos e perda de biodiversidade” (REDCLIF; GOODMAN, 1991 *apud* ALTIERI 2004, p. 19). Os autores relatam ainda que a perda da biodiversidade atingiu áreas de extrema sensibilidade para a manutenção das espécies.

De acordo com Gliessman (2001) a agricultura moderna está em crise, pois embora bem sucedida com relação à produção de alimentos, as técnicas que surgiram com o avanço tecnológico para proporcionar o aumento da produtividade acabam causando um aumento na

degradação dos recursos naturais causando prejuízos, pois estes recursos são essenciais para o sucesso da agricultura.

Camargo, Capobianco e Oliveira (2002) confirmam a insustentabilidade da agricultura brasileira, causada pela degradação das áreas plantadas e o aumento no consumo de agrotóxico.

Agrotóxico é um termo genérico usado para denominar uma grande variedade de produtos químicos utilizados na agricultura, horticultura, reflorestamento e no processamento destes nas indústrias, entre eles estão os herbicidas, os inseticidas, os fungicidas, e outros (MCDUFFIE et al., 2001).

O Brasil ocupa o primeiro lugar no ranking de consumo de agrotóxicos no mundo (CARNEIRO et al., 2012) e o mercado brasileiro em 2010 movimentou aproximadamente U\$ 7,3 bilhões, o que representa 19% do mercado global de agrotóxicos, ultrapassando os Estados Unidos da América e assumindo o posto de maior mercado global de agrotóxicos (ANVISA, 2012).

A incidência de acidentes de trabalho, intoxicações agudas como consequência do uso dos agrotóxicos, está associada a neoplasias, más-formações congênicas e agravos respiratórios correlacionados aos processos produtivos diretamente correlacionados com a produção agrícola e a exposição aos agrotóxicos usados nessas lavouras, com aumento entre 40% e 102% nos últimos dez anos nas diferentes regiões do país, com tendência de 50% acima da incidência anual nos últimos 10 anos (PIGNATI; MACHADO, 2011).

Abreu (1994) ressalta que diante dos impactos causados pela ação humana, surge a necessidade de mudanças capazes de amenizar esses problemas. Camargo, Capobianco e Oliveira (2002) concordam com a necessidade de mudanças na agricultura brasileira, mas salientam que essas mudanças não podem causar a destruição das bases naturais da produção.

Diante destes problemas ambientais surgiram debates para buscar alternativas sustentáveis, proporcionando uma produção ecológica de alimentos e de plantas medicinais, minimizando os impactos ambientais causados pela agricultura convencional, e consequentemente trazendo uma melhoria na qualidade dos alimentos.

Segundo Gliessman (2001) a solução é preservar a produtividade da superfície cultivável. Para isso, é necessário mudar as formas de uso e consumo da terra, para que seja possível beneficiar todos, sendo assim necessária a produção sustentável de alimentos.

O que se requer, então, é uma nova abordagem da agricultura e do desenvolvimento agrícola, que construa sobre aspectos de conservação de recursos da agricultura tradicional local, enquanto ao mesmo tempo, se exploram conhecimento e métodos ecológicos (GLIESSMAN, 2001, p. 53-54).

Para haver uma nova abordagem o desenvolvimento precisa ser capaz de atender as necessidades humanas atuais, mas não comprometer as necessidades das gerações futuras, portanto, necessita-se de um desenvolvimento que não esgote os recursos naturais. Desta forma o desenvolvimento econômico e a conservação ambiental podem e devem ser desenvolvidos juntos (GLIESSMAN, 2001).

A partir do final do século XX as técnicas de produção agrícola mais equilibradas começaram a surgir, mas cabe lembrar de que a agricultura convencional até a atualidade tem um papel importante para a população e que torna-se difícil excluir esse tipo de produção das áreas agrícolas no contexto atual (SANTOS; NASCIMENTO, 2009).

1.2 AGRICULTURA SUSTENTÁVEL

A questão ambiental no Brasil ganha proporções nos discursos e nos estudos a partir da década de 1960 após um período acentuado de crescimento urbano e estende-se até ao final desta década, associada a uma grave crise do petróleo que se prolonga até o início da década de 1970 levando a sociedade a uma reflexão sobre um futuro que parece incerto e questiona a participação do homem no planeta. Neste contexto, político, social e filosófico, a expressão “desenvolvimento sustentável” surge como um termo que demonstra os anseios coletivos tanto quanto a democracia e a liberdade tão questionados nesse período. O conceito de desenvolvimento sustentável começa a configurar-se a partir de estudos da Organização das Nações Unidas sobre as mudanças climáticas, respondendo para a humanidade diante da crise social e ambiental pela qual o mundo passava a partir da segunda metade do século XX (BARBOSA, 2008).

A agricultura, pela forma como o homem a conduz, mostra-se uma atividade com um grande poder de destruição pela degradação em função do mau uso do solo, a poluição pelo uso de agroquímicos e a exploração e devastação dos recursos. Com essa realidade a sociedade vem se mobilizando para a procura de alternativas sustentáveis, com base na consciência ecológica e do desenvolvimento sustentável (BARBOSA, 2008).

O conceito de desenvolvimento sustentável foi firmado na Agenda 21, documento desenvolvido na Conferência “Rio 92”, e incorporado em outras agendas mundiais de desenvolvimento e de direitos humanos, mas o conceito ainda está em construção segundo a maioria dos autores que escrevem sobre o tema, como por exemplo, Acsegrad e Leroy (1999), Veiga, (2005) e Canepa, (2007).

Desta forma o desenvolvimento sustentável caracteriza-se não como um estado fixo de harmonia, mas sim como um processo de mudanças globais, no qual se compatibiliza a exploração de recursos naturais, o gerenciamento de investimento tecnológico e as mudanças institucionais com o presente e o futuro (CANEPA, 2007).

Veiga (2005) afirma que o conceito de desenvolvimento sustentável é uma utopia para o século XXI, mas defende a necessidade de se buscar um novo paradigma científico capaz de substituir os paradigmas do “globalismo”.

Para Barbosa (2008) o desenvolvimento sustentável não deve ser apresentado como um slogan político e considera que as condições ambientais já estão bastante prejudicadas pelo padrão de desenvolvimento e consumo atual, deste modo, o desenvolvimento sustentável pode ser uma resposta aos anseios da sociedade. A sustentabilidade, segundo o autor, consiste em encontrar meios de produção, distribuição e consumo dos recursos existentes de forma mais coesiva, economicamente eficaz e ecologicamente viável, priorizando o desenvolvimento social e humano com capacidade de suporte ambiental, gerando cidades produtoras com atividades que podem ser acessadas por todos é uma forma de valorização do espaço incorporando os elementos naturais e sociais.

Para facilitar a compreensão do conceito de sustentabilidade, Sachs (1993) a divide em cinco classificações: a sustentabilidade ambiental, a sustentabilidade econômica, a sustentabilidade ecológica, a sustentabilidade social e a sustentabilidade política. Essa divisão é contraposta pela visão de Shumacher citado no relatório da Comissão Mundial sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento (CMMAD, 1991) que classifica somente em sustentabilidade ambiental, econômica e pessoal, mas essas duas visões diferem principalmente na definição do termo ambiental, pois Shumacher refere-se ao uso racional dos recursos, enquanto Sachs a capacidade dos ecossistemas diante da agressão humana.

A Comissão Mundial sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento (CMMAD, 1988 e 1991) descreve o desenvolvimento sustentável como a capacidade que a humanidade tem de

atender a necessidade do presente sem comprometer as futuras gerações de atender as próprias necessidades.

A sustentabilidade é uma versão do conceito de produção sustentável, sendo impossível afirmar, que uma determinada prática é sustentável sem levar em consideração questões sociais, principalmente no que se refere ao uso da terra, sua ocupação, suprimento de água, abrigo e serviços sociais, educativos e sanitários, além de administração do crescimento urbano (BARBOSA, 2008). Contudo, é possível demonstrar que uma prática está se afastando da sustentabilidade (CMMAD, 1988 e 1991).

Com base no conhecimento presente Gliessman, (2001, p. 52-53) sugere que a agricultura sustentável, pelo menos:

- a. Teria efeitos negativos mínimos no ambiente e não liberaria substâncias tóxicas ou nocivas na atmosfera, água superficial ou subterrânea;
- b. Preservaria e recomporia a fertilidade, preveniria a erosão e manteria a saúde ecológica do solo;
- c. Usaria a água de maneira que permitisse a recarga de depósitos aquíferos e satisfizesse as necessidades hídricas do ambiente e das pessoas;
- d. Despenderia, principalmente, de recursos de dentro do agro-ecossistema, incluindo comunidades próximas, ao substituir insumos externos por ciclagem de nutrientes e melhor conservação e uma base ampliada de conhecimento ecológico;
- e. Trabalharia para valorizar e conservar a diversidade biológica, tanto em paisagens silvestres quanto em paisagens domésticas, garantiria igualdade de acesso a práticas, conhecimento e tecnologia agrícolas adequadas e possibilitaria o controle local dos recursos agrícolas.

Brandenburg (2002) e Freitas (2002) afirmam que são quatro as correntes de agricultura sustentável e que estas possuem princípios e histórias distintas. A “agricultura biodinâmica” inicia na Alemanha e na Áustria na década de 1920. O conceito de “agricultura natural” aparece na década seguinte no Japão e o termo “agricultura organo-biológica” é citado na Suíça e Áustria. Nas décadas de 1930 a 1940, segundo Darolt (2002), surge a “agricultura orgânica” na Grã-Bretanha e EUA. No entanto, as quatro vertentes mais expressivas da agricultura sustentável não parecem apresentar características contraditórias.

Um movimento socialmente organizado, a agricultura alternativa ou sustentável tem sua origem na década de 70 e surge como um contra movimento, uma via alternativa à política de modernização agrícola da Revolução Verde. Esta, pelo seu caráter excludente, irá provocar uma reação de grupos de agricultores familiares não contemplados pelos benefícios dos subsídios governamentais, provenientes do crédito agrícola, ou de outros serviços prestados por órgãos

públicos destinados a orientar o agricultor, prestar serviços e fomentar infraestrutura de apoio no meio rural (BRANDENBURG, 2002; HESPANHOL, et al., 2008).

A agricultura sustentável representa uma opção de sobrevivência para o agricultor familiar e significa a reconstrução de uma relação socioambiental cuja raiz tem origem na condição camponesa (BRANDENBURG, 2002; SANTOS; NASCIMENTO, 2009).

O surgimento da agricultura sustentável, no Brasil, coincide com o ressurgimento dos movimentos alternativos nos Estados Unidos e Europa. Contudo, nos demais países, a agricultura sustentável não tem o mesmo sentido. Nos Estados Unidos, a agricultura alternativa é entendida como uma agricultura adaptada e inserida num contexto de revalorização da pequena propriedade familiar (SCHUMACHER, 1982; HESPANHOL et al., 2008; SANTOS; NASCIMENTO, 2009).

Embora os modelos europeus inspirem formas alternativas de organização da produção, no Brasil, a agricultura alternativa surge diante de contextos de uma política agrária excludente, motivada por organizações politicamente engajadas e visando à construção de uma sociedade democrática e com a perspectiva de transformação social. Jovens agricultores com formação técnica ou acadêmica dinamizam a agricultura alternativa e atuam no sentido de obter um reconhecimento societário e uma institucionalização do padrão agroecológico de produção (BRANDENBURG, 2002).

1.2.1 Agricultura ecológica: diferentes modelos.

Agricultura ecológica é aquela que abrange um conjunto de sistemas alternativos ao padrão agroindustrial de produção imposto pela modernização da agricultura e atinge desde os sistemas associados à origem do movimento alternativo até os sistemas ressignificados dos movimentos ecológicos recentes e regulamentados pelas políticas agrícolas e desta forma, a agricultura alternativa e a agricultura ecológica compartilham o mesmo significado (BRANDENBURG, 2002; ROEL, 2002; SANTOS; NASCIMENTO, 2009).

Para Bonilla (1992), Campanhola e Valarini (2001) e Hespanhol et al. (2008) a Agricultura Orgânica, Agricultura Biodinâmica, Agricultura Biológica e a Permacultura também estão incluídas como sistemas alternativos de agricultura ecológica sendo que todas essas correntes seguem princípios semelhantes e há ainda o sistema agroecológico, que engloba em suas reflexões as questões sociais.

1.2.1.1 A agroecologia

A agroecologia, termo que surge na América Latina na década de 80, tem como principal destaque atender as necessidades da preservação ambiental e de promoção socioeconômica dos pequenos agricultores (TAMISO, 2005).

É preciso então ter uma proposta de agricultura alternativa que busque a preservação e conservação dos recursos naturais, com menor aquisição de produtos químicos e ajustes tecnológicos apropriados à prática e maior aproveitamento dos processos ecológicos disponíveis no campo (HESPANHOL et al., 2008).

Agroecologia é o conjunto de conceitos, princípios, normas e métodos que possibilitam estudar, avaliar e manejar de forma consciente os sistemas naturais para produção de alimentos, permitindo compreender a natureza dos agroecossistemas e desenvolvendo sistemas com dependência mínima de insumos energéticos externos (GLIESSMAN, 2001).

A agroecologia é defendida como uma nova ciência em construção, como um paradigma, de cujos princípios e bases epistemológicas nascem da convicção de que é possível reorientar o curso alterados dos processos de uso e manejo dos recursos naturais, de forma a ampliar a inclusão social, reduzir os danos ambientais e fortalecer a segurança alimentar e nutricional, com a oferta de alimentos saudáveis para todos os brasileiros. Argumenta-se sobre a necessidade de mudanças no paradigma cartesiano que orientou a pesquisa o ensino e a extensão rural, estabelecendo-se novos procedimentos, metodologias e bases tecnológicas, capazes de contribuir para um processo de transição a estilos de desenvolvimento rural e de agriculturas mais sustentáveis (CAPORAL, 2009, p. 9-10).

Segundo Caporal e Costabeber (2002) e Londres (2011) a agroecologia nos faz lembrar uma agricultura que é menos agressiva ao meio ambiente, que promove a inclusão social e proporciona melhores condições econômicas para os agricultores, por meio da oferta de produtos "limpos", ecológicos, isentos de resíduos químicos, ao contrário dos produtos característicos da Revolução Verde.

“A agroecologia proporciona o conhecimento e a metodologia necessária para desenvolver uma agricultura que é ambientalmente consciente, altamente produtiva e economicamente viável” (GLIESSMAN, 2001, p. 54).

Zamberlam e Froncheti (2002) relatam que mesmo que a palavra agroecologia lembre estilos de agricultura menos agressivos ao meio ambiente, não é pertinente confundir

agroecologia com um tipo de agricultura alternativa, mas sim como uma nova abordagem de onde partem diversas linhas que são as correntes alternativas da agricultura.

O modelo atual de agricultura causa inúmeros problemas ambientais e agravantes à saúde dos agricultores e dos consumidores (LONDRES, 2011).

1.2.1.2 Agricultura orgânica

A agricultura orgânica é um termo utilizado nos principais países do mundo e mencionado nos principais documentos oficiais de organismos internacionais como, ONU - Organização das Nações Unidas, UNCTAD - Conferência das Nações Unidas sobre Comércio e Desenvolvimento, FAO - *Food and Agriculture Organization*, (MAZZOLENI; NOGUEIRA, 2006) é também encontrado na legislação brasileira, desde a Instrução Normativa N° 7, 17/05/1999 (BRASIL, 1999), consolidando-se com a Lei 10.831, de 23/12/2003 (BRASIL, 2003).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA atento ao crescimento de mercado e produção orgânica, bem como a qualidade de vida da população que vive da subsistência da produção agrícola e com o desenfreado uso de produtos químicos na agricultura institui pelo decreto 7.794 em 20 de agosto de 2012 a Política Nacional de Agroecologia e Produção Orgânica – PNAPO tendo como instrumento o Plano Nacional de Agroecologia e Produção Orgânica – PLANAPO que objetiva integrar, articular e adequar políticas, programas e ações indutoras da transição agroecológica e da produção orgânica e de base agroecológica, contribuindo para o desenvolvimento sustentável e a qualidade de vida da população, por meio do uso sustentável dos recursos naturais e da oferta e consumo de alimentos saudáveis (DOS SANTOS; MARÇAL; PINTO, 2015).

Para Bonilla (1992) e para Campanhola e Valarini (2001) convencionou-se chamar de agricultura orgânica todos os sistemas de agricultura alternativa em que a produção de alimentos é feita sem o uso de produtos químicos sintéticos.

As técnicas utilizadas na agricultura orgânica buscam mobilizar de forma equilibrada os recursos disponíveis na propriedade, com base na reciclagem de nutrientes e maximização do uso de insumos orgânicos gerados no local e com isso reduzir o impacto ambiental e a poluição, evitar a mecanização pesada, mas quando necessário preferir tratores leves, aração superficial ou

plantio direto que aumentem a produtividade, minimizar a dependência de recursos externos, aperfeiçoar o balanço energético da produção, produzir alimentos baratos e de alta qualidade biológica, suprir necessidades nacionais internas e gerar excedentes exportáveis (ROEL, 2002).

Segundo Roel (2002) o cultivo orgânico deve introduzir na propriedade uma maior diversidade genética de espécies cultivadas associando o cultivo múltiplo simultâneo ou o cultivo de várias espécies vegetais em rotação de cultura, sendo fundamental a manutenção de áreas de matas nativas ou silvestres preservadas para preservação de refúgios destinados a organismos benéficos.

Freitas (2002) argumenta que a agricultura orgânica pode reduzir custos e ser tão rentável quanto o sistema convencional que adota o uso de químicos sintéticos, mas para que esse desafio possa ser enfrentado, é necessário que as características daqueles que atualmente produzem com base nos princípios da agricultura orgânica sejam compreendidas e desta forma serão decididas se são desejáveis e necessárias políticas públicas que garantam o estímulo para a consolidação deste tipo de agricultura no Brasil.

Os primeiros movimentos sociais organizados que tiveram relação com a agricultura orgânica no Brasil estavam ligados aos produtos hortigranjeiros, frutas, mas principalmente legumes e verduras sendo que esses movimentos começaram no Rio de Janeiro, Brasília, Rio Grande do Sul, São Paulo e Paraná (ASSIS; ROMEIRO, 2007).

Estas observações que cada vez mais estão sendo realizadas permitem concluir que a agricultura com base orgânica é o futuro; embora seja necessária uma maior divulgação e conscientização dos produtores sobre as vantagens na qualidade dos produtos e na preservação das características do meio, e sobre os danos causados à saúde das diversas formas de vida (ASSIS; ROMEIRO, 2007).

1.2.2 Agricultura orgânica e a produção de plantas medicinais

Ming; Ferreira; Gonçalves (2012) relatam que as pesquisas acerca das técnicas de cultivo estão em fases iniciais, apesar de algumas faculdades de Agronomia e órgãos de pesquisas agronômicas estarem realizando diversos ensaios visando a domesticação das plantas medicinais, principalmente daquelas que são obtidas por extrativismo vegetal. Ressaltam que a grande variabilidade genética intraespecífica provocam diferentes resultados que, se por um lado pode

parecer desfavorável, sob o ponto de vista da uniformidade de resultados agronômicos, por outro lado representa alternativas químicas, uma vez que podem ter substâncias químicas diferentes e/ou produzirem concentrações diferentes do mesmo composto químico com potencial de uso para outras necessidades terapêuticas.

A crescente demanda das plantas medicinais, a maior importância social econômica e cultural, fez com que outros setores da sociedade se organizassem em iniciativas de fortalecimento da cadeia produtiva. Anteriormente produtores não mantinham contato com os consumidores e com a indústria, mas passaram a dialogar com mais frequência e por ocasião destas demandas. Ações governamentais passaram a ganhar apoio da cadeia produtiva e vice-versa. ONGs e outras entidades passaram também a ter maior inserção dentro de programas de governo e os órgãos de fomento passaram a financiar projetos sobre plantas medicinais (MING; FERREIRA; GONÇALVES, 2012).

A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que é norteada pelos princípios de melhoria da atenção à saúde, sustentabilidade e desenvolvimento socioeconômico, contempla o fortalecimento da agricultura familiar pela produção e comercialização de plantas medicinais de qualidade (FORINI et al., 2014 tem que citar o plano nacional aqui).

O crescente aumento do mercado de fitoterápicos despertou o interesse pelo estudo e promoveu o aumento das pesquisas no sentido de se obter mais informações sobre as formas de cultivo de plantas medicinais (MAIA et al., 2009).

A Resolução RDC N°10, de 09 de março de 2010 da ANVISA (2010) tornou-se um referencial para as pesquisas agronômicas, as quais visam colaborar com o fornecimento adequado, em quantidade e qualidade de plantas medicinais.

As plantas medicinais e aromáticas como qualquer outra cultura, dependem de suprimento adequado de nutrientes para boas produtividades agrícolas. Neste sentido, a adubação orgânica, pilar da agricultura orgânica, é fonte de nutrientes para as plantas que além de permitir suprimento adequado contribui para a melhoria das qualidades físicas, químicas e biológicas do solo (CORRÊA et al., 2010).

A produção de matéria seca e síntese de princípios ativos nas plantas medicinais dependem de fatores genéticos, climáticos, condições edáficas do solo e dos tratos culturais. A nutrição vegetal destaca-se como um dos fatores que interferem diretamente na composição

química das plantas medicinais, pois tanto a deficiência ou o excesso de nutrientes podem interferir na produção de matéria seca e na produção de princípio ativo (MAPELL et al., 2005).

Rosal et al. (2011) ressaltam que a adubação orgânica das plantas medicinais em um sistema de cultivo orgânico, fornece nutrientes necessários para o desenvolvimento das plantas medicinais e proporciona benefícios na estrutura física, química e biológica do solo.

Sujatha et al. (2011) relatam que a adoção de adubação orgânica de origem animal na produção de plantas medicinais pode ser considerada desde que se utilizem todas as medidas sanitárias, realização de testes microbiológicos, para verificação dos limites dos microrganismos presentes e que conseguiram melhorar as condições do solo após três anos de cultivos sucessivos de plantas medicinais e aromáticas através do monitoramento e do aumento dos três macronutrientes no solo (nitrogênio, fósforo e potássio) bem como do aumento do pH que se traduziu no aumento na produção de plantas aromáticas e medicinais e de outras culturas já existentes.

Segundo Forini et al. (2014) o cultivo orgânico de plantas medicinais pode representar uma alternativa de renda para a agricultura familiar devido ao baixo custo de produção, rendimento relativamente elevado por área e pela possibilidade de oportunizar trabalho planejado e distribuído ao longo do ano. Além disso, também contribui para a conservação do meio ambiente pela utilização de um agrossistema sustentável.

Conforme pode ser observado em Vieira et al. (2002) e Morais (2002), a nutrição de plantas medicinais revela-se importante estudo no porte e no vigor da planta fazendo com que as mesmas também se tornem menos suscetíveis a agentes fitossanitários e sobre esse aspecto os adubos orgânicos exercem efeitos promotores de crescimento das plantas refletindo na produtividade próxima ou superior àquelas obtidas com adubos minerais como também foi observado por Silva et al. (2001) para *Ocimum basilicum* L. (manjeriço) e por Maia et al. (2001) para *Ocimum gratissimum* L. (alfavaca-cravo).

Santos; Pêgo; Martins (2001) relatam que a aplicação de 6 kg.m^{-2} de composto orgânico no cultivo de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) associado a presença de cobertura morta ao solo, acarretou uma maior produção de matéria fresca e um maior número de capítulos. A adubação orgânica com esterco de aves maximizou o rendimento de óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) NE Brown. em relação ao solo não adubado e ao solo com adubação química (SOUZA et al., 2002). Trabalhos desenvolvidos com plantas medicinais, aromáticas e condimentares

mostraram que o uso de fertilizantes orgânicos propiciaram o aumento na biomassa, no teor de princípio ativo e óleo essencial são observados e evidenciados nas pesquisas com *Lippia alba* (MING, 1994), *Ageratum conyzoides* L. (MING, 1998), *Achillea millefolium* L. (SCHEFFER, 1998), *Plantago major* L. (BLANCO, 1998), *Mentha x villosa* Huds. (CRUZ, 1999), *Mentha arvensis* var. *piperascens* Holmes (MATOS, 2000) *Origanum vulgare* L. (CORRÊA et al., 2010), *Plectranthus neochilus* (ROSAL; PINTO; BRANT, 2009), *Ocimum selloi* Benth. (COSTA et al., 2008a), *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (MAIA et al., 2008) e *Ocimum basilicum* L. (BLANK et al., 2008). Corrêa et al. (2010) relatam que a adubação orgânica com esterco bovino e de aves influenciou significativamente a produção de biomassa seca em plantas de *Origanum vulgare* L. bem como no teor e no rendimento de óleo essencial sendo que os maiores teores e rendimentos de óleo essencial foram obtidos com a aplicação 12 kg.m^{-2} de esterco bovino e $4,37 \text{ kg.m}^{-2}$ de esterco de aves.

As condições edáficas do solo podem ser melhoradas com o emprego de fertilizantes orgânicos, mas podem contribuir de forma positiva ou negativa na produção de biomassa e de princípios ativos dependendo da espécie estudada. São exemplos os relatos de Chaves (2002), com *Mentha arvensis* var. *piperascens*, onde o mesmo observou que maiores dosagens de esterco de aves poedeiras ($6,0$ e $8,0 \text{ kg.m}^{-2}$) induziram ao maior crescimento de plantas. No entanto, os teores de óleos essenciais reduziram progressivamente com o aumento das doses em relação ao tratamento sem adubação. Martins et al. (2000), relataram que o estresse nutricional pode acarretar em maior ou menor produção de princípios ativos na planta e que a deficiência do macroelemento fósforo no solo reduz a concentração de cumarinas em *Justicia pectoralis* Jacq. (chambá), com significativa redução na produção de biomassa e consequente diminuição da produção total do princípio ativo e por fim Correa et al. (2010) relatam que estão presentes oito compostos químicos no óleo essencial de *Origanum vulgare* L., sendo o hidrato de trans-sabineno e timol os compostos majoritários. Para a produção de hidrato de trans-sabineno recomenda-se a adubação das plantas com 12 kg.m^{-2} de esterco de gado ou 3 kg.m^{-2} de esterco de aves, enquanto que se o interesse for a produção de timol, deve-se evitar a aplicação de adubos orgânicos.

No entanto, a comercialização de produtos orgânicos apresenta-se em grande medida ainda em fase inicial no Brasil, tendo tido a sua produção aumentada por volta dos anos 1980, quando foi possível observar que houve uma expansão da clientela para os mesmos. Este fato foi

estimulado pela mudança do comportamento do consumidor, com crescimento da consciência de preservação ecológica e a busca por uma alimentação cada vez mais saudável. Entretanto, pesquisas têm apontado que existem inibidores em relação ao aumento de consumo de orgânicos, sendo o preço alto, a pouca variedade, a falta de informação e a dificuldade de acesso a esses produtos, alguns desses fatores (LAGO et al., 2006).

Desta forma, tanto no Brasil como no exterior, a mesma diversidade de motivos é indicada pelas pesquisas. Embora em contextos diferenciados, se tomarmos o fator econômico como categoria que significa maior rentabilidade financeira; o fator saúde como atitude de prevenção de doenças causadas por intoxicação de agroquímicos; e, o fator ético como uma atitude resultante da orientação de um princípio ou uma crença relacionada a práticas de restabelecimento do equilíbrio do sistema natural, é possível afirmar que de modo geral os fatores que explicam as motivações individuais para expansão da agricultura alternativa e ecológica são de ordem econômica, ética e social (BRANDENBURG, 2002).

1.3 USO, CULTIVO E MERCADO DE PLANTAS MEDICINAIS

No Brasil, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que é norteada pelos princípios de melhoria da atenção à saúde, sustentabilidade e desenvolvimento socioeconômico, contempla o fortalecimento da agricultura familiar pela produção e comercialização de plantas medicinais de qualidade (DE FIGUEREDO; GURGE; JUNIOR, 2014).

A utilização de plantas medicinais para fins terapêuticos é anterior ao desenvolvimento da ciência (BALBACH, 1995; CARAVACA, 2000), e o conhecimento do ser humano sobre os efeitos das plantas confundem-se com a sua própria história. Já no início da civilização, o ser humano passou a manejar, adaptar e modificar os recursos naturais para o seu próprio benefício (DI STASI, 1996).

A utilização de plantas medicinais para a recuperação da saúde é uma prática globalizada, resultado do acúmulo de conhecimentos empíricos ao longo do tempo, de diversos grupos étnicos, sobre a ação das plantas medicinais sendo predominantemente usadas por pessoas adultas e idosas, que às utilizam com a crença de que estas não apresentam efeitos adversos (ALEXANDRE; BAGANTINI; SIMÕES, 2008).

A manutenção da saúde sempre foi uma preocupação humana tanto em âmbito coletivo quanto individual. Desde a pré-história o homem utiliza as plantas medicinais na recuperação da saúde melhorando as suas condições de vida. Ao longo dos séculos o acúmulo do conhecimento sobre as plantas foi passado através de sucessivas gerações, fazendo com que as informações a respeito delas chegassem à atualidade (SCHULZ; HÄNSEL; TYLER, 2002; FRANCO; FONTANA, 2005; LORENZI, MATOS, 2008).

Estudos revelam que está nas plantas a promessa da cura de várias doenças sendo que vários profissionais da área da saúde têm trabalhado no combate às enfermidades, através da conscientização quanto ao uso de plantas, na avaliação e isolamento de princípio ativo e na modificação da estrutura química encontrada nos produtos naturais (ROBBENRS; SPEEDIE; TYLER, 1997; OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1998).

Muitos fatores colaboram para o progresso dessas práticas, principalmente econômicos e sociais (MARTINS et al., 2000; BEVILACQUA, 2010). As pessoas procuram tratamentos alternativos, mais naturais, que não apresentem efeitos colaterais (CARAVACA, 2000). Com isso, a importância das plantas medicinais e do seu uso tem sido cada vez maior (GILBERT; FERREIRA; ALVES, 2005).

O relatório da OMS declara que 80% da população mundial faz uso das plantas medicinais, e seus derivados estão entre os principais recursos terapêuticos utilizados pela população brasileira nos seus cuidados básicos de saúde (LUCCA, 2004; RODRIGUES; DE SIMONI, 2010).

O Brasil possui a maior diversidade genética vegetal do mundo contando com mais de 55 mil espécies catalogadas, só na Amazônia são 30 mil, sendo que apenas 1% estudadas quimicamente de um total entre 350 e 550 mil espécies e mais da metade dessas espécies estão nas florestas tropicais, ressaltando a necessidade de mais estudos (SIMÕES et al., 2010).

Mesmo diante de um panorama científico não muito explorado, no que tange as plantas medicinais, muitos efeitos farmacológicos foram validados popularmente e diante deste contexto a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu as diretrizes sobre as Boas Práticas Agrícolas e Coleta de Plantas Medicinais, onde prioriza as práticas produtivas agroecológicas (BPAR, 2003).

Surgindo como uma alternativa de conservação e renda, as plantas medicinais se tornaram mais um recurso passível de exploração e comercialização que, quando realizadas de

forma sustentável, permitem a redução da ação antrópica sobre outros produtos florestais, reduzindo assim os problemas ambientais que se encontram nos ecossistemas (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002). Técnicas de cultivo são importantes recursos, que minimizam os impactos ambientais e custos de produção, favorecendo a conservação das espécies (SANTOS et al., 2012).

Ming (2002) relata que o Guaco (*M. glomerata* Spreng., *Mikania hirsutissima* DC. e *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker), está entre as 24 espécies com alta prioridade no bioma Mata Atlântica para o desenvolvimento de pesquisa sobre sistema reprodutivo, biologia floral, diversidade genética, dinâmica de populações e cadeia produtiva.

Ming; Ferreira; Gonçalves (2012) pesquisaram na base eletrônica de dados CAB Abstract, que contém artigos científicos de plantas ocorrentes na Mata Atlântica, e encontraram 45 artigos produzidos de 1990 a 2011 com *M. glomerata*. Deste total, 33,3% são artigos na área agrônômica, 55,5% para pesquisa com ensaios biológicos e 11,2% em outras áreas de interesse.

1.3.2 Cultivo de plantas medicinais

As espécies medicinais publicadas na resolução da ANVISA (2010) foram separadas em plantas exóticas, plantas da Mata Atlântica e plantas de outros biomas e mostram que 36 espécies são exóticas, 24 são da Mata Atlântica e 6 pertencem a outros biomas brasileiros, evidenciando a necessidade de mais pesquisas que forneçam base para ampliação desta lista.

As pesquisas sobre as técnicas de cultivo de plantas medicinais estão em fases iniciais. Algumas faculdades de Agronomia e órgãos de pesquisas agrônômicas estão realizando pesquisas para a domesticação de espécies (MING, 2012).

Uma das características mais marcantes na pesquisa com plantas medicinais é a grande variabilidade genética intraespecífica que pode provocar diferentes resultados; no entanto, se por um lado essa característica pode parecer desfavorável sob o ponto de vista da uniformização dos resultados agrônômicos, por outro lado pode representar alternativas uma vez que podem ter substâncias químicas diferentes com potencial de novos usos para outras necessidades terapêuticas (MING, 2012).

Historicamente as pesquisas agrônômicas de plantas medicinais tiveram início no ano de 1960, e o ensino dessa área nas faculdades de Agronomia ocorreu na Universidade de Brasília no

começo dos anos 1980 e consolidou-se na década seguinte. Das mais de 60 faculdades agrícolas espalhadas pelo Brasil cerca de 15% possuem esse conteúdo técnico nos seus programas curriculares. Nos Simpósios de Plantas Medicinais do Brasil, a apresentação dos primeiros trabalhos na área estritamente agrônômica ocorreu em São Paulo, em 1988, sendo área consolidada em todos os eventos com a participação de especialistas que contribuem com informações sobre o setor agrônômico das plantas medicinais (MING, 2012).

1.3.3 Mercado de fitoterápicos e de plantas medicinais:

Os fitoterápicos representam uma parcela no mercado do setor de medicamentos e movimenta US\$ 21,7 bilhões/ano no mercado mundial, mas quando se fala em mercado nacional não existem dados oficiais atualizados, embora se estime que movimente cerca de US\$ 160 milhões/ano. A venda de fitoterápicos movimenta anualmente em torno de R\$ 1 bilhão em toda a cadeia produtiva no Brasil com taxa estimada de crescimento de 15% anuais (CARVALHO et al., 2008).

O mercado mundial de plantas medicinais tem um valor aproximado de 60 bilhões de euros ao ano e o valor do mercado mundial de plantas medicinais para a indústria farmacêutica se aproxima dos 32 bilhões de euros ao ano (ALMEIDA et al., 2014).

A importância das plantas medicinais é elevada, pois mais de 25% dos produtos farmacêuticos modernos consumidos no mundo são obtidos direta ou indiretamente de plantas medicinais (CARRERAS; GONZALES, 2011 apud REBOCHO, 2015; NEWMAN; CRAGG, 2012).

Da produção mundial de plantas medicinais 50% destina-se principalmente à indústria farmacêutica e o restante da produção são destinados para cosméticos, perfumaria, alimentos funcionais e suplementos alimentares (BPAR, 2003).

O valor do segmento de plantas aromáticas e medicinais utilizados em produtos farmacêuticos equivale a 33,5 bilhões de euros, os segmentos da perfumaria/cosmética e dos suplementos alimentares estão avaliados em 10 bilhões de euros cada e o segmento dos alimentos funcionais está estimado em 7,5 bilhões de euros (ALMEIDA et al., 2014).

Os maiores importadores de plantas aromáticas e medicinais, em nível mundial, são a China, Estados Unidos da América, Japão, Alemanha e Singapura (REBOCHO, 2015).

O mercado mundial de plantas medicinais apresenta taxas de crescimento anuais entre 10 e 20%, sendo que a estimativa de uso de produtos a base de plantas medicinais alcance 82% da população brasileira. O setor fitoterápico movimenta anualmente R\$ 1 bilhão em toda sua cadeia produtiva e empregam mais de 100 mil pessoas no Brasil (MARCHESI et al., 2004).

O valor médio de importações de plantas medicinais em mais de 114 países analisados ultrapassam três bilhões de dólares, sendo a China o principal importador de plantas aromáticas e medicinais em 2014 com mais de 590 milhões de dólares de importações, correspondendo a 38 mil toneladas (REBOCHO, 2015).

Os principais países exportadores de plantas aromáticas e medicinais são a China, Canadá, Índia, Estados Unidos da América do Norte e Alemanha, sendo que a China é o principal exportador com 44% do mercado mundial, representando um valor de quase 1,5 bilhão de dólares, o que corresponde a 194 mil toneladas (REBOCHO, 2015).

Os valores de exportação e importação da China e demais países asiáticos, deve-se ao fato da grande utilização de plantas medicinais em função da medicina tradicional chinesa e por conta dos subsídios estatal chinês que as utilizam em hospitais e são comumente prescrita pelos médicos (ERGIL; KRAMERNG, 2002).

Em Santa Catarina há demanda para chás (sene, verde, tanchagem, quebra-pedra, camomila, calêndula, hibiscus, anis estrelado, boldo, funcho e endro) e indicativos que apontam para a ampliação do mercado de fitoterápicos e plantas medicinais na perspectiva de o setor público forneça esses produtos no sistema público de saúde (ALTMANN; MIOR; ZOLDAN, 2008).

1.3.4 A indústria de fitoterápicos

A RDC 26/2014 traz vários elementos inovadores quanto à regulamentação dessa classe de medicamentos, como o reconhecimento da importância dos fitoterápicos de uso tradicional, cuja eficácia e segurança já foram comprovadas através do longo tempo de uso e também a necessidade de um registro mais simplificado e ágil (ANVISA, 2014).

Alves (2013) descreve as três razões para o Brasil disputar um mercado tão promissor de fitoterápicos, a sua própria história relacionada ao uso de plantas medicinais pela população, a

grande biodiversidade e a capacidade técnico-científica de seus pesquisadores brasileiros na área da fitoterapia.

Yunes et al. (2001) apontam a falta de uma política definida, permanente e comprometida com o desenvolvimento da indústria farmacêutica, a falta de uma integração de fato entre as várias áreas de conhecimento (química, farmacologia, botânica, bioquímica e tecnologia farmacêutica) envolvidas no processo de produção de fitoderivados e o interesse no lucro rápido e não no desenvolvimento de competitividade em nível internacional como os fatores que precisam ser melhorados para o desenvolvimento da indústria de fitoterápicos no Brasil.

Alves (2013) relata que o desenvolvimento da indústria de fitoterápicos no Brasil e uma ampla distribuição de fitoterápicos no Sistema Único de Saúde (SUS), dependem do desenvolvimento de metodologias adequadas que garantam o controle de qualidade dos medicamentos fitoterápicos como preconiza a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, por meio do Decreto Presidencial Nº 5.813, de 22 de junho de 2006.

Lopes e Nascimento (2017) relatam que na última década ocorreu uma grande evolução na regulamentação das plantas medicinais e fitoterápicos, estimulada pela criação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e a implementação da PNPIC, 2006 (Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares) e da PNPMF, 2007 (Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos).

A garantia do acesso a medicamentos fitoterápicos seguros, eficazes e de qualidade comprovada está assegurado quando a legislação obriga o registro de todos os fitoterápicos industrializados na ANVISA antes de serem comercializados. O registro minimiza a exposição e garante a segurança de uso pela população a produtos passíveis de contaminação, além de padronizar a dose e a forma uso. O registro tem validade de cinco anos, devendo ser renovado por períodos sucessivos, conforme determinado na Lei nº 6.360/76, que dispõe sobre os produtos submetidos ao controle da Vigilância Sanitária (CARVALHO, 2007).

Devido ao pouco incentivo para pesquisa na área, a maioria da matéria-prima do setor ainda é importada da Europa e Ásia. Hoje cerca de 15% da indústria farmacêutica mundial é representado por fitoterápicos, enquanto que no Brasil representa apenas 7%, movimentando US\$ 400 milhões por ano, são mais de 40% dos medicamentos comercializados (LIMA, 2011).

1.3.5 Produção de *M. glomerata* Spreng.

1.3.5.1 Descrição e fitogeografia de *M. glomerata*

Segundo o sistema de classificação para as famílias botânicas *M. glomerata* Sprengel pertence ao Clado Asterídeas, Ordem Asterales e Família Asteraceae, popularmente é conhecida por guaco, guaco-liso, cipó-caatinga, guape e micânia (LORENZI; MATOS 2008; APGIV, 2016).

1.3.5.2. Características botânicas:

Asteraceae é uma família que apresenta inúmeras espécies utilizadas na medicina popular, muitas das quais foram química e farmacologicamente estudadas (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002). *Mikania* Willd. é um dos principais gêneros de Asteraceae pertencente à tribo Eupatorieae. É composto por 430 espécies espalhadas em todas as regiões tropicais e subtropicais quentes dos continentes americano e asiático. No Brasil, cerca de 198 espécies podem ser encontradas de norte a sul, principalmente em São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Rio Grande do Sul (RITTER; MIOTTO, 2005; THE PLANT LIST, 2014).

M. glomerata é uma planta herbácea trepadeira, perene, com caule cilíndrico, ramificado, glabro, sublenhoso e, quando seco, apresenta aspecto estriado no sentido longitudinal. Suas folhas são pecioladas, de cor verde intenso, brilhante na face adaxial e mais claro na abaxial, glabras, opostas, deltóide-cordiformes, oval-lanceoladas, trilobadas, carnosocoriáceas, de ápice acuminado e base arredondada ou subcordiforme, com três a cinco nervuras partindo da base, margem dos lobos lisa ou discretamente denteada. A inflorescência é do tipo panícula terminal, que alcança 30 cm de comprimento, reunindo flores esbranquiçadas e aromáticas em capítulos sésseis e globosos; o fruto é um aquênio, pentangular, piloso ou levemente glabro (LORENZI; MATOS, 2008; SILVA JUNIOR, 2006; GILBERT; FERREIRA; ALVES, 2005).

1.3.5.3. Fitogeografia

M. glomerata ocorre na Argentina, Uruguai e Brasil (BOTSARIS, 1997). Espécie nativa da América do Sul que cresce espontaneamente em matas primárias, capoeiras, capoeirões, orla de matas, terrenos de aluvião, em várzeas sujeitas a inundações e à beira dos rios. No Brasil, ocorre espontaneamente de São Paulo ao Rio Grande do Sul (SILVA JUNIOR, 2006; GILBERT; FERREIRA; ALVES, 2005).

1.3.5.4. Produção de cumarina e as variáveis de produção

O teor de cumarina é um dos componentes que apresenta alterações significativas com relação às variações na intensidade de luz, e quando cultivada em pleno sol apresenta maior produção deste componente (CASTRO et al., 2006; CZELUSNIAK et al., 2012).

Castro et al. (2006) descreve as variações de cumarina nos diferentes órgãos das plantas de *M. glomerata* sendo que os maiores teores deste metabólito são encontradas em folhas jovens (5,20 mg g⁻¹ de matéria seca), seguidos por flores (1,04 mg.g⁻¹ de matéria seca), caules (1,05 mg g⁻¹ de matéria seca) e raízes (0,11mg g⁻¹ de matéria seca).

Nascimento e Favero (2003) afirmam que as adubações realizadas somadas aos constituintes químicos do solo, podem influenciar tanto quantitativa quanto qualitativamente os metabólitos secundários das plantas medicinais.

O uso de fertilizantes orgânicos aumentou a concentração de cumarina em *M. glomerata* quando comparado com o uso de fertilizantes químicos e observaram maior aumento da fitomassa (caules e folhas) com o uso de fertilizantes inorgânicos quando comparado com os de origem orgânica (PEREIRA et al., 1998).

1.3.5.5. Propagação de *M. glomerata*

A estaquia é a técnica de propagação vegetativa mais rápida e mais fácil para execução, sendo muito utilizada nas espécies que apresentam maior facilidade para a formação de raízes adventícias (GARBUIO et al., 2007). A estaquia é uma forma de propagação assexuada ou agâmica das plantas, por meio de seus órgãos vegetativos e permite a manutenção das características genéticas (SCALON; RAMOS; VIEIRA, 2003). Esta técnica apresenta vários benefícios, onde permitem o clone de plantas que estão em produtividade, uniformidade e

qualidade de frutos ou folhas, além disso, adsorvem características agronômicas que são esperadas de forma mais eficiente (HARTMANN; KESTER, 1990). A propagação vegetativa ou assexuada é uma importante ferramenta de manutenção das espécies medicinais (ZULIANI et al., 2012), pois não envolve meiose e fecundação, assim, não ocorre recombinação genética, permitindo a reprodução fiel do genótipo da planta matriz (XAVIER, 2002), com suas respectivas propriedades terapêuticas.

1.4 O USO DE *M. GLOMERATA* SPRENG.

Historicamente a indicação terapêutica popular de *M. glomerata* é vasta e inclui citações como antiespasmódica, antissifilítica, antiasmática, anti-inflamatória, antipirética, antiofídica, artrite, balsâmico, depurativa, excitante, sudorífera, tônica, para picadas de escorpião, reumatismo e nevralgias, eczema pruriginoso, estimulante do apetite, expectorante, no tratamento da gripe e doenças respiratórias em geral, inflamações da garganta, utilizando-se as folhas cozidas para gargarejo (LUCAS, 1942; NEVES; SÁ, 1991; RUPPELT et al., 1991; GALVANI; BARRENECHE, 1994; ALICE et al., 1995; CORTEZ et al., 1999; MATOS, 2000; PEREIRA, OLIVEIRA, LEMOS, 2004; MAIORANO et al., 2005; SOUZA; FELFILI, 2006; VENDRUSCOLO; MENTZ, 2006). Segundo Botsaris (2007) estudos clínicos observacionais demonstraram que *M. glomerata* possui atividade antimalárica.

As espécies de *Mikania* conhecidas como guaco são *M. glomerata* e *M. laevigata* Sch. Bip ex Baker, incluindo *M. hirsutissima* DC. e *M. lanuginosa* DC. sendo estas duas últimas também conhecidas como "cipó-cabeludo". Na medicina tradicional, estas espécies são utilizadas como expectorante, anti-inflamatório, broncodilatador, anti-hemorragico, anti-asmático, analgésico, antimutagênico, tripanocida, antimicrobianos, antifúngicos, antiulcerogênico, relaxante muscular e atividades anti-reumática (MUELLAS-SERRANO et al., 2000; PAUL et al., 2000; PÉREZ-AMADOR et al., 2010; GASPARETTO et al., 2010; CZELUSNIAK et al., 2012; MOURÃO et al., 2014; RIOS et al., 2014).

No entanto, a indicação terapêutica do uso de *M. glomerata* validada pela ANVISA é como expectorante e no tratamento de doenças respiratórias e o que está a disposição no mercado farmacêutico trata-se de fitoterápicos sob os nomes comerciais Blumel Guaco, Guaco Edulito Herbarium, Xarope de Guaco Belfar, Xarope de Guaco Herbarium, Xarope de Guaco Natulab e

Xarope Guaco Melpoejo para 5 empresas a Brainfarma Indústria Química e Farmacêutica S.A., Herbarium Laboratorio Botânico S.A., Belfar Ltda, Natulab Laboratório S.A. e Laboratório Melpoejo,.

M. glomerata (guaco) está oficializada na Farmacopeia Brasileira desde 1929 quando da sua 1ª edição (BRANDÃO et al., 2006). O farmacógeno utilizado é a folha dessa espécie, apesar de grande parte dos produtos comercializados incluírem outras partes aéreas, como caules e até mesmo inflorescências (OLIVEIRA et al., 1985a; 1987). Em virtude das propriedades terapêuticas atribuídas a essa espécie, o xarope e a solução oral de *M. glomerata* foram incluídos no elenco de referência de medicamentos e insumos complementares para a assistência farmacêutica na atenção básica em saúde, conforme anexo II da Portaria No. 3.237 de 24 de dezembro de 2007 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Dessa forma, os medicamentos fitoterápicos a base de *M. glomerata* vem sendo utilizados em larga escala na rede de saúde pública, através da implantação de programas de fitoterapia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; ANVISA, 2008, 2014).

Emitida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 26, de 13 de maio de 2014 considera medicamentos fitoterápicos os obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e eficácia sejam baseadas em evidências clínicas e que sejam caracterizados pela constância de sua qualidade (ANVISA, 2014).

Segundo Brasil (2009), o Sistema Único de Saúde (SUS) utiliza medicamentos fitoterápicos aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e, por isso, são considerados seguros e eficazes para a população. Desde 2008, o SUS fornece para 13 estados (RN, PB, SE, BA, TO, MT, DF, GO, RJ, PR, SC, RO e RS) medicamentos fitoterápicos feitos à base de espinheira santa (*Maytenus ilicifolia*) para gastrites e úlceras e guaco (*M. glomerata*) para tosses e gripes, em diversas apresentações, financiados com recursos da União, Estados e Municípios.

1.4.1 Fitoquímica de *M. glomerata* Spreng.

Quanto à fitoquímica considerando toda a parte aérea de *M. glomerata* como caule, folhas e inflorescências revelaram a presença já identificados de cumarinas, ácido

cinamoilgrandiflórico, ácidos entocaur-16-eno-19-óico e namoilgrandiflórico, estigmast-22-en-3-ol, saponinas, taninos, alcaloides, esteroides, compostos fenólicos, compostos sesquiterpênicos (lactonas de sesquiterpeno) e diterpênicos e concentrações elevadas de várias resinas (principalmente da primarane, labdano e esqueletos caurane), flavonóides, guacosídeo, ácido butiriloxi, caurenóico, lupeol, cineol, borneol, eugenol, estigmasterol e um grande número de glicósidos e esteróis, guacina, óleo essencial em teores de 0,07% e espatulenol nas folhas é de 23,7%, friedelina nos ramos, fenilproponóides - ácido *o*-hidroxi-cinâmico e ácido 2-acil-trans-cinâmico, 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldeído (siringaldeído) (OLIVEIRA et al., 1984; FRANCO, 1996; SANTOS et al., 1996; TESKE; TRENTINI, 1997; VILEGAS et al., 1997a, 1997b; FARIAS et al., 1998; STEENBOCK, 1999; MARTINS et al., 2000; AGUINALDO et al., 2003; FRANCHI et al., 2005; BOLINA; GARCIA; DUARTE, 2009; GASPARETTO et al., 2010, PEREZ-AMADOR et al., 2010; RIOS et al., 2014).

O extrato hidroalcoólico é uma das preparações mais comum e a forma mais comercializada para fins terapêuticos e os ensaios fitoquímicos realizados usando este tipo de extrato identificaram os seguintes compostos: 1-etoxi-1-feniletanol, 2-5-ciclo-hexadieno-1,4-diona, 2,6-bisestigmasterol, 1-octadeceno, 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldeído, fitol, ácido hexanóico, ácido 8,11-octadecadienóico, ácido 9,12,15-octadecatrienóico, ácido 10,13-octadecadienóico, ácido benzoylgrandiflorico, óxido de cariofileno, ácido cinamoilgrandiflórico, ácido cupressênico, hexadecanoato de etilo, acetato de linoleoate, ácido hexadecanóico, ácido isobutiloxigrandiflórico, ácido isopropiloxigrandiflórico, kaurenol, lupeol, ácido octadecanóico, espatulenol e trans-cariofileno (OLIVEIRA et al., 1993; BIAVATTI et al., 2004; SANTOS, 2005; YATSUDA et al., 2005; ALVES et al., 2009; BERTOLUCCI et al., 2009; BOLINA; GARCIA; DUARTE, 2009; MUCENEEKI et al., 2009).

A fração diclorometânica do extrato hidroalcoólico nas folhas contém 11,4% de cumarina segundo Moura et al. (2002) e o extrato bruto pode conter cerca de 8 mg/g de cumarina, segundo Gandeo et al. (2003).

O efeito farmacológico e as atividades terapêuticas do guaco são atribuídas à cumarina (HOULT; PAYÁ, 1996; VLIENTINCK et al., 1998; PEDROSO et al., 2008).

Brandão et al. (2006; 2008); Carvalho et al. (2008) e ANVISA (2014) consideram a cumarina como marcador químico de *M. glomerata* e de acordo com a resolução RE 89, de 16 de março de 2004 atualizada pela instrução normativa nº 2 de 13/05/2014, “Lista de medicamentos

teor de água, cinzas totais e doseamento da 1,2-benzopirona por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Estudos quantitativos, tendo por base extratos hidroalcoólicos, os metabólitos que mais se destacam estão também associadas com os efeitos terapêuticos de *M. glomerata* incluindo a cumarina (1,2-benzopirona) (BIAVATTI et al., 2004; BUENO; BASTOS, 2009), *o*-cumárico (SANTOS, 2005), dihidrocoumarina, seringaldeído e ácido caurenóico (VILEGAS; MARCHI; LANÇAS, 1997a, 1997b; YATSUDA et al., 2005; BERTOLUCCI et al., 2009; MUCENEEKI et al., 2009;).

O estresse ambiental é o fator limitante mais importante para a produtividade e rendimento de cultivos. Uma das mais importantes funções das células das plantas é a sua habilidade em responder às flutuações ambientais. Muitos dos processos deletérios sofridos pelas plantas em condições adversas são mediados por espécies reativas de oxigênio (ERO's) geradas em diferentes compartimentos da célula em vias metabólicas ou em processos fisiológicos normais (MOLDES, 2006).

Os fatores ambientais capazes de produzir tal estresse podem se classificar em abióticos (alta irradiância, seca, hiperoxia, hipoxia, abnóxia, deficiência mineral, baixas e altas temperaturas), bióticos (infestação bacteriana, fúngica ou viral) e xenobióticas (herbicidas, fungicidas, contaminantes atmosféricos e metais pesados origem antropogênica) (CARRILLO; VALLE, 2005).

Portanto, investigou-se em nível biológico, *in vitro* em outro eixo deste estudo, a atividade genotóxica que poderá ocorrer em função da mudança de concentração de metabólitos secundários produzidos por esta espécie em condições de produção em sistema orgânico e convencional de *M. glomerata* com a intenção de verificar se existe uma relação entre o sistema de cultivo e danos ao DNA.

1.5 ENSAIOS GENOTÓXICOS

A genotoxicidade é uma área da genética que estuda os processos de alteração da estrutura físico-química do DNA e a esse processo classificamos como mutagênese. Quaisquer agentes que alteram a sequência do DNA são chamados de genotóxicos. Essa alteração na

sequência de DNA e que leva a uma alteração da função gênica transferível para os descendentes é denominada mutação (SILVA et al., 2003).

As mutações ocorrem tanto em células de linhagem germinativa como em célula somática e em todos os seres vivos, processo fundamental para a evolução e diversidade das espécies, porém quando ocorrem em células de linhagem germinativa, essas podem ser perpetuadas de uma geração à seguinte, sendo responsáveis pelas doenças hereditárias podendo acarretar uma série de problemas como, malformação, câncer, envelhecimento e morte. A probabilidade de uma mutação ser vantajosa pode ser pequena, mas existe (SILVA et. al., 2003).

Uma das técnicas mais utilizadas para detecção de genotoxicidade tem sido o Teste Cometa, devido a sua capacidade de detectar lesões pré-mutagênicas (KAMMANN et al., 2001).

Este teste foi extensivamente utilizado como ferramenta básica em muitas áreas de pesquisa, incluindo biomonitoramento ambiental, genética toxicológica, radiação biológica, processos de reparo de DNA e ecotoxicologia genética (GONTIJO; TICE, 2003).

O Teste Cometa vem sendo proposto para estudos de toxicogenética devido a suas peculiaridades e vantagens quando comparado a outros testes para detecção de substâncias genotóxicas. Ele combina a simplicidade da técnica bioquímica de detecção de quebras no DNA com a utilização de poucas células e corresponde a um ensaio citogenético (BURLINSON et al., 2007). Nesse contexto, pode-se garantir um uso seguro da planta estudada, propondo medidas de controle, prevenção ou até mesmo proibição do uso de substâncias químicas avaliadas, resultando em melhor qualidade de vida e ganhos na conservação ambiental.

O Teste cometa é um método de estudo genotoxicológico sensível que possibilita quantificar quebras de fita de DNA em células individuais expostas a agentes genotóxicos a um baixo custo, com rapidez, com precisão e reprodutibilidade. (OLIVE; O'NEILL, 1995; BELPAEME et al., 1998; ALBERTINI et al., 2000; SILVA et al., 2000; FAIRBAIRN; GONTIJO; TICE, 2003; HARTMANN et al., 2003; PAVÃO et al., 2007).

Qualquer tipo de célula se aplica ao ensaio, basta para isso que haja a presença do núcleo celular e de uma pequena quantidade de células. O desenvolvimento da técnica está relacionado aos trabalhos desenvolvidos por Östling e Johanson (1984) com base na metodologia de eletroforese do DNA em micro-gel e com o aprimoramento da técnica que atribuiu uma maior sensibilidade do uso em solução alcalina desenvolvido por Singh et al. (1988).

1.5.1 Genotoxicidade de *M. glomerata* Spreng.

Dalla-Nora et al. (2010) avaliaram o efeito genotóxico de extratos aquosos por infusão de folhas de *M. glomerata* nas concentrações de 4g.L⁻¹ e 16 g.L⁻¹ sobre o ciclo celular da cebola (*Allium Cepa* L.) e os resultados demonstraram causar danos cromossômicos importantes nas células de cebola em ambas as concentrações testadas.

A capacidade de indução de danos de extratos de *M. glomerata* em DNA foi avaliada também *in vitro*, em células de hepatoma HTC, através do Teste Cometa, nesse estudo usaram-se dois extratos diferentes da planta, um obtido por infusão e outro por maceração em etanol 80% e os resultados demonstraram que doses altas de 100 e 200% acima da dose de ingestão recomendada para infusão apresentaram danos ao DNA muito acentuados e da mesma forma para o macerado em etanol também apresentou genotoxicidade nas doses calculadas em 200 e 400% acima da dose de ingestão recomendada (COSTA et al., 2008).

Diferentes dos resultados citados, um estudo realizado por Moura et al. (2002), avaliou o potencial genotóxico de uma fração em diclorometano obtida de um extrato hidroalcoólico de *M. glomerata* utilizando um procedimento de lise alcalina e mostrou que a fração diclorometano, em todas as concentrações testadas (1, 10 e 90 µg/mL) não apresentou qualquer tipo de dano sobre o DNA.

Barbosa et al. (2012) avaliaram os efeitos preventivos do extrato hidroalcoólico padronizado de *M. glomerata* contra os danos causados pela doxorubicina e outros fármacos antitumorais frente ao teste de micronúcleos em eritrócitos policromáticos, bem como sobre o estresse oxidativo de ratos machos tratados por 30 dias. Eles puderam observar que o extrato hidroalcoólico padronizado de guaco não produziu danos genotóxicos, mas aumentou significativamente a frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados induzida por doxorubicina, indicando uma interação droga-droga, mas que não foi acompanhado de peroxidação lipídica ou redução dos parâmetros indicativos do estresse oxidativo, caracterizando assim que, apesar da presença de cumarina (um antioxidante conhecido) no extrato hidroalcoólico, o consumo do extrato de guaco pode exercer efeitos adversos provavelmente em associação com compostos mutagênicos

Mazzorana et al. (2013) avaliaram *in vivo*, a potencial atividade biológica de *Mikania laevigata* sobre a genotoxicidade induzida pelo Metil Metanossulfonato (MMS) e Ciclofosfamida

(CP) utilizando o Teste Cometa em ratos CF1 machos que receberam por gavagem o extrato de *M. laevigata*. Os resultados mostraram que o tratamento com 200 mg/kg de extrato de *M. laevigata* antes da administração de MMS e da CP, reduziram o índice de danos em 52% e 60% respectivamente, quando comparado ao índice de danos em 24 horas, permitindo concluir que a administração de extrato de *M. laevigata* foi capaz de proteger o DNA contra danos induzidos por agentes alquilantes.

Freitas et al. (2009) investigaram a possível atividade antígenotóxica do extrato de *Mikania laevigata* usando o Teste Cometa em sangue periférico, medula óssea e células hepáticas e o teste de micronúcleo no sangue periférico, após instilação intratraqueal aguda de poeira de carvão em ratos *Wistar* pré-tratados durante 2 semanas com solução salina ou extrato de *M. laevigata* (100 mg/kg). Os resultados mostraram um aumento geral nos valores de dano do DNA em 8 horas para todos os grupos de ratos nos diferentes tratamentos, provavelmente relacionado a procedimentos cirúrgicos, bem como, as células do fígado de ratos tratados com pó de carvão, pré-tratados ou não com extrato de *M. laevigata*, apresentaram aos 14 dias após a exposição, valores de danos estatisticamente mais elevados em comparação com o grupo controle, justificado por ser o fígado o órgão responsável pelo metabolismo de xenobióticos. Por outro lado, os resultados do ensaio de micronúcleos não mostraram diferenças significativas entre os grupos, caracterizando que *M. laevigata* não apresenta atividade antimutagênica para instilação aguda de poeira de carvão.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Comparar a influência de sistemas de cultivo, convencional e orgânico na produção de cumarina (1,2-benzopirona) em folhas de *M. glomerata* Spreng. (Asteraceae) bem como avaliar a genotoxicidade.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se os diferentes sistemas de cultivo empregados influenciam na produção de matéria seca das folhas de *M. glomerata* por planta;
- Determinar as concentrações de cumarina (1,2-benzopirona) via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em folha de *M. glomerata* nos diferentes sistemas de produção;
- Verificar a genotoxicidade de *M. glomerata* em células sanguíneas humana tratados com extratos obtidos de plantas produzidas nos diferentes sistemas de produção.

3 HIPÓTESE A SEREM TESTADAS

Os sistemas de produção, convencional e orgânico, afetam o crescimento das plantas a a ponto de alterar a produção de matéria seca de *M. glomerata* e também podem afetar o metabolismo secundário das folhas de *M. glomerata* verificado pela produção de cumarina que tem relação direta com a atividade terapêutica?

Os sistemas de produção aos quais *M. glomerata* foram submetidos apresentam maior ou menor danos ao DNA (genotoxicidade) avaliado pelo Teste Cometa?

Caso a concentração de cumarina seja significativamente maior em concentração em um dos métodos de cultivo, será que isto poderá influenciar na produção de matéria prima para a formulação de fitoterápico a partir de *M. glomerata*?

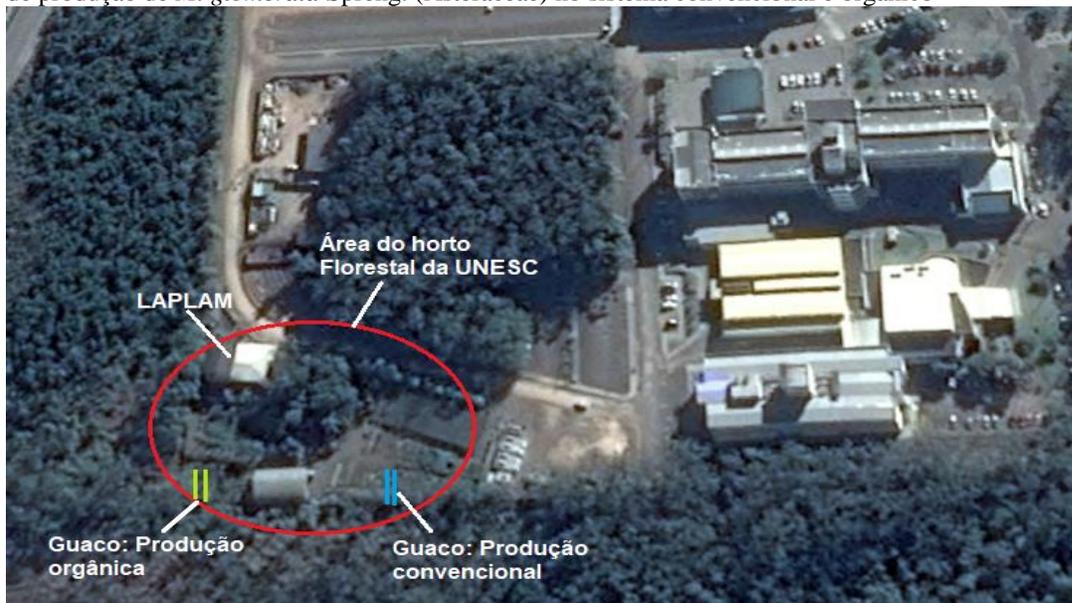
4 METODOLOGIA

4.1 LOCALIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO – HORTO FLORESTAL

A produção do material vegetal foi realizada no Horto Florestal da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), localizada na região sul de Santa Catarina no município de Criciúma, localizado nas coordenadas geográficas, 28° 40' 39" latitude S e 49° 22' 11" longitude W, altitude média de 46 metros (Figura 2) (GEOGRAFOS, 2015).

O clima local segundo a classificação climática de Köppen caracteriza esta região com o predomínio do clima mesotérmico úmido com verão quente (Cfa). A média das temperaturas anuais oscila entre 16 e 18°C, sendo que a média em julho tem sido entre 12 e 14°C e a de janeiro entre 22 e 24°C.

Figura 2. Localização do Laboratório de Plantas Mediciniais – LAPLAM no Horto Florestal da UNESC e das áreas de produção de *M. glomerata* Spreng. (Asteraceae) no sistema convencional e orgânico



Fonte: Do Autor.

4.3 PROPAGAÇÃO DE *M. glomerata* Spreng.

O material vegetal de *M. glomerata* foi submetido aos sistemas orgânico e convencional cultivados no horto florestal da UNESC a partir de mudas clonais obtidas por meio de estâquias de matriz previamente selecionado e identificadas segundo método descrito por Matos (1998).

A identificação da espécie estudada foi realizada pela Prof. Dra. Mara Rejane Ritter da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

As estacas foram coletadas no município de Siderópolis (SC) a partir de ramos de planta matriz adulta e um ramo fértil foi herborizado e incluído no acervo do Herbário Pe. Dr. Raulino Reitz (CRI) da Unesc com o número CRI 10522.

Para a confecção das estacas foram selecionados ramos do tipo semilenhoso e/ou herbáceo de plantas adultas. Após, as mesmas permaneceram em baldes, previamente desinfetados com hipoclorito de sódio, contendo água durante 24 horas para melhor hidratação.

As estacas foram preparadas no laboratório, tendo como referência a presença de quatro a cinco nós, com comprimento de aproximadamente 25 cm e diâmetro variando de 1,5-5 mm em função da consistência. Com uma tesoura de poda e um estilete fez-se um corte reto no ápice e em forma de bisel na base de cada estaca com o propósito de aumentar a área de exposição do câmbio, sendo mantidas duas folhas superiores cortadas ao meio, para reduzir a perda d'água e aumentar a síntese de açúcares pela fotossíntese. Após serem desinfetadas foram acondicionadas em estufa do tipo túnel com sombrite 50%, plástico UBV, irrigação controlada em temperatura ambiente no Horto Florestal da UNESC no substrato de casca de arroz carbonizada. As estacas permaneceram na estufa por um período de 77 dias sendo retiradas juntamente com o substrato aderido as raízes e lavadas em água corrente para preservação da integridade das estacas.

O uso de clones justifica-se para não haver interferência das características genéticas sobre os diferentes sistemas de cultivo as quais nas plantas foram submetidas.

4.4 COMPONENTES DO SISTEMA DE CULTIVO

4.2.1 Substrato de plantio

Utilizou-se substrato com características físicas e químicas determinadas através de análise realizada pelo Laboratório de Análise de Solos da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina – EPAGRI e a identificação do mapeamento de solo regional de origem (EMBRAPA, 2006).

A área de obtenção do solo usado no experimento compreende a Classe dos Argissolos que são constituídos por material mineral, que têm como características diferenciais a presença de horizonte B textural de argila de atividade baixa, ou alta conjugada com saturação por bases baixa ou caráter alítico.

Na região de Criciúma/SC, mais precisamente na área da Unesc, são identificados os solos classificados como Podzólico Vermelho-Amarelo Álico com argila de atividade baixa ou alta, e pequena parte de Terra Roxa Estruturada Distrófica com relevo da região levemente ondulado a plano (EMBRAPA, 2006).

A área de retirada do solo apresentava vegetação em estágio inicial de regeneração natural com espécies herbáceas e subarbustivas. Historicamente a área encontrava-se sem uso a mais de 30 anos e o entorno com reflorestamento de eucaliptos com vegetação secundária inicial de sub-bosque.

O solo foi homogeneizado e recebeu os condicionadores químicos, adubação orgânica, calagem, inseticidas e fungicidas de acordo com as práticas de produção dos sistemas convencional e orgânico com o objetivo de melhorar as características físicas, químicas e microbiológicas do substrato e fitossanitário de *M. glomerata* quando necessários.

Para a produção convencional, cujo plantio ocorreu em 06/11/2014, foram usados 483 kg de solo e em função da análise química para correção da acidez utilizou-se 4 kg de calcário de conchas formado por carbonato de cálcio (CaCO_3), sendo, portanto, um composto inorgânico com características químicas contendo CaO de 49%, MgO 0,05%, soma se óxidos 49,03%, com Poder de Neutralização (PN) de 95% e PRNT de 71,44%. A correção da fertilidade foi aplicado 0,6 kg uréia (N), 5 kg cloreto de potássio (K_2O) e 0,5 kg de Salitre do Chile (N e P) em volume definido segundo a necessidade do fósforo (P). A adubação foi dividida em três etapas, sendo 1/3 aplicado e homogeneizado com a adição do calcário no momento da preparação do substrato, antes de serem colocados nos vasos e as outras duas doses aplicadas aos 30 e 60 dias, em iguais quantidades, após o plantio como adubação de cobertura.

Na preparação da produção orgânica, realizada em 06/11/2014, foram usados 338 kg solo, 50 kg cama de aviário de corte curtida por 120 dias, 13 kg cinzas de casca de arroz e 4 kg calcário de concha com as características químicas descritas acima, sendo que todos os componentes foram homogeneizados no momento da preparação do substrato e antes de serem colocados nos vasos.

4.2.2 Procedimento de plantio e condução das mudas

As mudas de *M. glomerata* foram distribuídas em dois (2) tratamentos, segundo o sistema de cultivo (convencional e orgânico). Cada grupo composto por vinte (20) vasos com capacidade de 15 litros contendo uma (1) planta cada. O cultivo em vasos teve por finalidade a homogeneização do substrato possibilitando que os tratamentos tivessem as mesmas condições químicas e físicas do solo de origem usado.

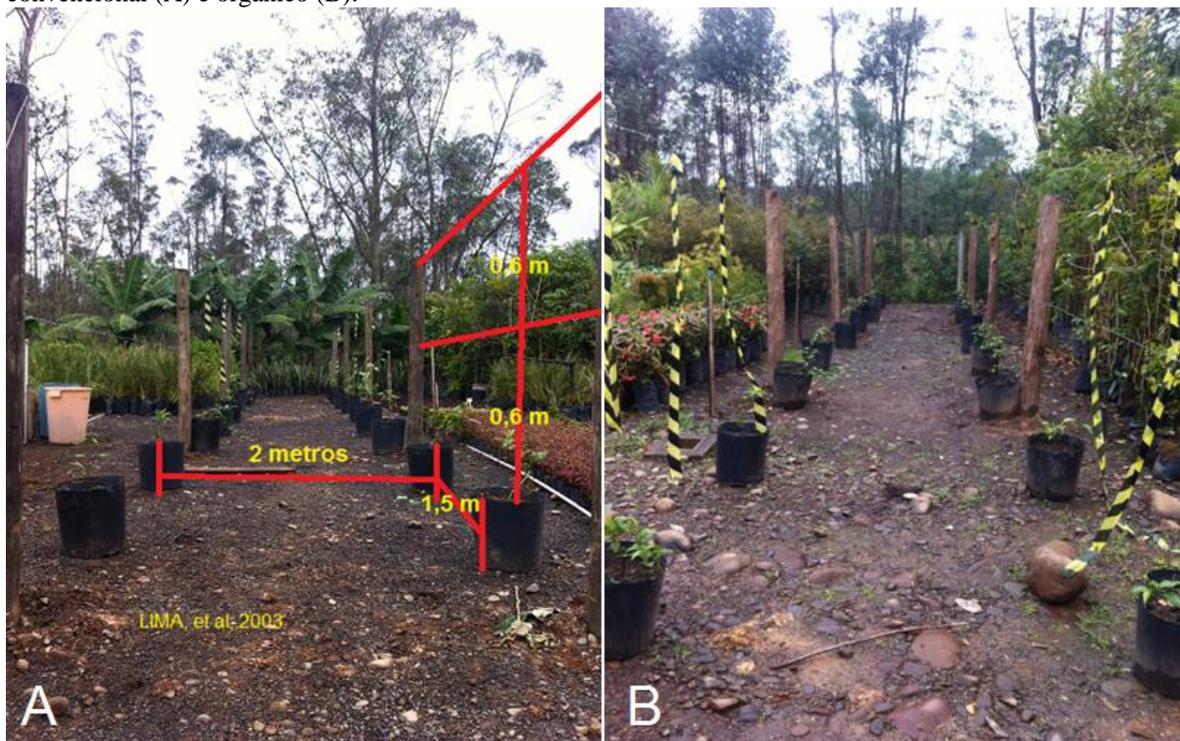
Ao fim do ciclo de crescimento foi realizada aos 100 dias a contar do plantio com a coleta das folhas de cada planta individualmente por tratamento.

As mudas foram conduzidas em sistema de espaldeira, sustentado por mourões de eucalipto com 2,5 m de comprimento e enterrados a 0,50 m de profundidade e as mudas foram sustentadas por dois fios espaçados entre si 0,60 m, sendo o primeiro fio fixado a 0,60 m da altura máxima dos baldes. Os vasos foram dispostos a 1,5 m na linha e as entrelinhas estavam à distância de 2,0 m conforme modelo adaptado de Lima et al. (2003) (Figura 3). A área de produção foi mantida isenta de plantas invasoras por meio de roçadas e/ou capinas.

A irrigação foi realizada ao final da tarde sempre que necessário por sistema de aspersão convencional em malha fixa, com tubulações enterradas e com vários aspersores na linha de diâmetro reduzido, aspergindo uma grande quantidade de pequenas gotas no ar, na forma de uma chuva artificial mantido por um conjunto motobomba de baixa potência.

Os tratamentos, convencional e orgânico foram conduzidos a uma distância aproximada de 70 m e separados com barreiras físicas como tela sombrite, plástico UBV e uma estufa de 7,0 m de largura por 15,0 m de comprimento e 5,0 m de altura bem como barreiras vegetais por mudas de árvores nativas e ornamentais com altura aproximada de 1,5 m impedindo qualquer deriva de agroquímicos usados no sistema convencional.

Figura 3. Sistema de condução das plantas de *M. glomerata* em espaldeira no Horto Florestal da Unesc, nos sistemas convencional (A) e orgânico (B).



Fonte: Do Autor.

4.2.3 Tratamento Fitossanitário

O tratamento fitossanitário da produção convencional foi realizado em função da ocorrência das pragas e contou com a aplicação de fungicida de amplo espectro em dois momentos devido ao surgimento de manchas necróticas fúngicas e a aplicação de inseticida em dois momentos pelo do ataque de pulgões (afídeos) e lagarta.

Para o controle e prevenção realizaram-se duas aplicações de AMISTAR WG um fungicida (anti-esporulante) sistêmico pulverizado na parte aérea das plantas. O ingrediente ativo do fungicida é Azoxystrobin pertencente ao grupo químico estrobilurinas e classe toxicológica IV considerado pouco tóxico cuja formulação é grânulos dispersos em água em dosagem de 12 g/100 litros de água.

Para controle dos afídeos e lagartas se realizou uma aplicação de ENGEO™ PLENO inseticida sistêmico de contato e ingestão pertencente ao grupo químico dos neonicotinóide e piretróide de formulação em Suspensão Concentrada (SC) tendo como Ingrediente Ativo o Tiametoxam em dosagem de 15 mL/100L de água.

A aplicação do fungicida foi realizada aos 30 dias após o plantio e a segunda aplicação 10 dias após e a aplicação única do inseticida ocorreu aos 45 dias após o plantio, tomando-se o cuidado de aplicar nas primeiras horas do dia, em condição de ausência de ventos e com aplicação direcionada exclusivamente à planta e respeitadas as normas de segurança do trabalho com o uso de equipamento proteção individual (EPI).

O tratamento da produção orgânica contou com a aplicação de Calda Bordalesa 1% em dois momentos para o controle de fungos, concomitante à aplicação realizada no tratamento convencional, uma pulverização com calda de fumo de corda para controle de pulgões (afídeos) e lagartas.

A aplicação e controle fitossanitários estão em conformidade com a Lei 10.831 de 23 de dezembro de 2003 em seu artigo 9º que trata dos insumos com uso regulamentado para a agricultura orgânica e no Decreto 6.323 de 27 de dezembro de 2007, que regulamenta a lei de orgânicos (10.831/2003) que aborda da normatização de insumos para a agricultura orgânica, bem como com a Instrução Normativa Nº 46, de 6 de outubro de 2011 que estabelece o Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal e as listas de Substâncias Permitidas para uso nos Sistemas Orgânicos sob a fiscalização do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA.

4.3 DADOS DE RENDIMENTO.

Os dados de rendimento foram considerados pela determinação do peso seco em gramas de folhas da planta coletadas ao completar 100 dias do ciclo de crescimento.

4. ANÁLISES QUÍMICAS DO MATERIAL VEGETAL

As folhas foram colhidas aos 100 e 103 dias a contar da instalação do experimento, cultivados na estação de crescimento primavera/verão de 2014 a 2015, portanto, no período do ano com altas temperaturas e desenvolvidas a pleno sol (CABRAL et al., 2001; CASTRO et al., 2006; CONTINI et al., 2006).

As amostras de folhas de *M. glomerata* foram processadas no Laboratório de Plantas Mediciniais – LaPlam/PPGCA da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC - Criciúma/SC.

A secagem do material vegetal foi realizada em estufa do Herbário Pe. Dr. Raulino Reitz (CRI) da UNESC sob temperatura aproximada de 42°C com variação de mais ou menos 2°C até peso constante (SILVA JUNIOR, 2006).

O teor de cumarina em plantas secas em estufas com circulação forçada de ar e a temperatura constante de 40°C é 30% superior do que de plantas frescas ou secas em temperatura ambiente. A matéria-prima vegetal submetida à secagem artificial a 50°C em condições controladas de umidade e de ventilação diminui ou inibe o crescimento e a multiplicação microbiana, influenciando negativamente na sua proliferação, garantindo estabilidade microbiológica à matéria-prima vegetal (MARTINAZZO et al., 2010; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

As amostras foram reduzidas a pó fino com o auxílio de um moinho de facas e submetidas à maceração utilizando água em ebulição, como descrito por Maiorano et al. (2005), com 50 g de pó de folha para 250 mL de água. Os extratos foram obtidos por maceração aquosa e remaceração em duas etapas de 24 horas. As amostras foram congeladas por 18 horas a -75°C em Ultrafreezer Marca Liotop, Modelo UFR30 e, posteriormente, colocadas em Liofilizador Marca Liotop, Modelo L101 por 30 h até total eliminação do solvente aquoso.

Os extratos foram submetidos à análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para identificação e quantificação de cumarina.

4.5 ANÁLISE FITOQUÍMICA

4.5.1 Isolamento e purificação da cumarina (1,2-benzopirona)

O isolamento da cumarina foi realizado através da purificação do extrato por cromatográfica em coluna (CC). A fase estacionária foi sílica gel (0,063-0,200 mm, Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e hexano e acetato de etila (85:15 v/v) como fase móvel. As frações coletadas foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD). A análise por CCD foi realizada utilizando hexano e acetato de etila (50:50, v/v). 1,2-benzopirona (cumarina) @sigma foi

utilizado como referência. As CCDs foram reveladas com KOH (5%) e observadas por lâmpada ultravioleta a 320 nm. Após purificação prévia através da CC, a fração positiva para cumarina (revelador KOH) foi completamente isolada através da técnica de CCD preparativa utilizando o eluente, hexano e acetato de etila (50:50, v/v).

4.5.2 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O doseamento do marcador químico/princípio ativo, cumarina, foi realizado por CLAE conforme método descrito em literatura (SANTOS, 2005).

As análises foram realizadas em equipamento CLAE SHIMADZU bomba SHIMADZU, com pressão máxima de 4000 psi (281Kgf/cm²), sistema de detecção de arranjo de fotodiodos SHIMADZU UV de 256 – 254 nm e injetor automático SHIMADZU, volume de injeção de 20 µL. A coluna cromatográfica analítica foi C18 Ascentis, 25 cm X 2,1 mm, com tamanho de partícula igual a 5 µm, acoplada a uma pré-coluna também C18, mantida em temperatura ambiente. Os resultados foram processados através do software LCSolution.

4.6 SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA

Para a construção das curvas de calibração para as análises quantitativas utilizou-se cumarina cristalina (1,2-benzopirona - C₉H₆O₂) com pureza ≥ 99% adquirida comercialmente do laboratório Sigma-Aldrich.

As amostras foram preparadas de acordo com metodologia descrita pela Farmacopéia Brasileira (2010), sendo então centrifugadas (10.000 rpm, por 10 min.) e o sobrenadante empregado nas análises (20 µL). As amostras foram preparadas em triplicata, fazendo-se três injeções para cada triplicata. A quantificação da cumarina foi feita utilizando-se a cumarina padrão de referência (BOLINA; GARCIA; DUARTE, 2009).

Para a construção da curva de calibração preparou-se uma solução estoque a 0,5 mg/mL em MeOH e alíquotas desta foram diluídas em H₂O-MeOH (53:47), obtendo-se soluções a 0,5; 0,250; 0,125; 0,062 e 0,031 mg/mL que foram injetadas em triplicata. Calculou-se o teor da cumarina a partir da equação da reta obtida com a curva de calibração. O resultado foi expresso pela média das determinações em gramas de cumarina por 100 g da amostra (BOLINA; GARCIA; DUARTE, 2009).

4.7 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DESENVOLVIDA – CLAE

A validação da metodologia de quantificação de cumarina feito por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi determinada segundo os critérios descritos na resolução – RE nº 899, de maio de 2003, ANVISA, categoria I BRASIL, (2003) que estabelece parâmetros analíticos.

Segundo a ANVISA (2003) o objetivo de uma validação é demonstrar que o método analítico é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos.

Os testes são classificados em quatro (4) categorias, sendo que na presente pesquisa os testes se enquadram na categoria I que se refere à finalidade dos testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas (ANVISA, 2003).

Ensaio necessário para a validação do método analítico, segundo a categoria I é especificidade, linearidade, intervalo, precisão e repetibilidade, exatidão e, por fim, robustez ANVISA (2003).

4.7.1 Especificidade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.

Em métodos cromatográficos, deve-se tomar as precauções necessárias para garantir a pureza dos picos cromatográficos. A utilização de testes de pureza de pico (por exemplo, com auxílio de detector de arranjo de fotodiodos ou espectrometria de massas) são interessantes para demonstrar que o pico cromatográfico é atribuído à um só componente (ANVISA, 2003).

4.7.2 Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.

Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes. Estas concentrações devem seguir os intervalos pré-determinados. Se houver relação linear aparente após exame visual do gráfico, os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação, intersecção com o eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo. Se não houver relação linear, realizar transformação matemática. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser $= 0,99$. Deve-se apresentar as retas obtidas (experimental e a resultante do tratamento matemático) (ANVISA, 2003). A linearidade e intervalo foram apresentadas e discutidas no item 5.1.2 deste trabalho.

4.7.3 Intervalo

O intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método. É estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequadas quando aplicados a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado para verificação se há flutuação no método (ANVISA, 2003).

No presente estudo o ensaio de determinação quantitativa do analito em matérias-primas deve ter alcance de 80% a 120% da concentração teórica do teste.

4.7.4 Precisão e repetibilidade

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis.

Repetibilidade (precisão intra-corrída): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação, sendo verificada por, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três)

concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste (ANVISA, 2003).

O desenvolvimento analítico foi realizado com repetições em triplicata dentro do princípio de repetibilidade dentro da mesma corrida e intracorrída com probabilidade de erro ($p < 0,01$). Constatou-se que mesmo alterando-se as variáveis do processo analítico não houve alteração significativa no tempo de retenção da cumarina 1,2-benzopirona.

4.7.5 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Várias metodologias para a determinação da exatidão estão disponíveis, mas para o presente estudo aplicou-se a metodologia analítica proposta na análise de uma substância de pureza conhecida denominada de padrão de referência (ANVISA, 2003).

A avaliação da exatidão foi realizada por meio do ensaio de recuperação. Este ensaio consistiu na adição do padrão do analito, em três concentrações, pequena, média e alta, em relação aos pontos da curva analítica, em uma matriz similar à da amostra, isenta da substância (analito), ou seja, na mesma matriz do qual o extrato bruto de *M. glomerata* foi ressuspendido, para cada nível de fortificação, as determinações foram realizadas em dez replicatas. Essas faixas de concentração possibilitaram averiguar a eficiência do método, uma vez que a recuperação pode diferir entre altas e baixas concentrações. Assim, a recuperação foi obtida por meio da injeção direta do padrão do analito no sistema cromatográfico em comparação ao resultado das amostras fortificadas com o teste, nas mesmas concentrações, e também submetidas ao método analítico, por meio da razão entre a concentração teórica de analito por concentração experimental do analito, multiplicados por cem (ANVISA, 2003; RIBANI et al., 2004).

4.7.6 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal. Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez.

Constatando-se a susceptibilidade do método às variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento (ANVISA, 2003).

Os fatores que devem ser considerados na determinação da robustez do método analítico aplicado ao experimento são descritos na normativa da ANVISA e discutidos por Ribani et al. (2004). No presente estudo o método foram Cromatografia Líquida e os fatores considerados são a variação do pH da fase móvel, variação na composição da fase móvel com a variação do percentual dos dois solventes (53% metanol e 47% água) de 2% para mais ou para menos de cada um dos solventes, diferentes lotes ou fabricantes de colunas que no caso não foi aplicado no presente estudo, temperatura de 30°C e fluxo da fase móvel 0,3 microlitros/minuto definindo o tempo de retenção em função da pressão da cumarina. Os parâmetros estabelecidos em relação ao método foram estabelecidos e descritos por Bolina; Garcia; Duarte (2009) e Santos (2005).

A robustez foi verificada através da variação da fase móvel em $\pm 2\%$ sobre o volume da cada solvente, ou seja, dos 53% Milli-Q e 47% de metanol para 55% e 45% e 51% e 49% respectivamente. A análise de robustez prevê a variação de temperatura em $\pm 5\text{ }^\circ\text{C}$. Durante o desenvolvimento do método a temperatura foi mantida constante em 30 $^\circ\text{C}$. Para a validação, inicialmente as corridas foram feitas a uma temperatura maior, 35 $^\circ\text{C}$ e, posteriormente com temperatura 25 $^\circ\text{C}$. Por fim a variação do fluxo de injeção foi modificada em $\pm 0,05\text{ mL/min}$ do fluxo inicial de 0,3 mL/min, com corrida a um fluxo de 0,250 mL/min e, posteriormente corrida com fluxo de 0,350 mL/min.

No presente estudo investigou-se *M. glomerata* por se tratar de uma espécie estudada e validada cientificamente, ou seja, com um perfil fitoquímico já descrito, e efeito terapêutico validado para uso humano, o que nos permitiu observar a mudança na produção de metabólito secundário (cumarina) quando a espécie for submetida ao plantio orgânico ou convencional.

4.9 AVALIAÇÕES DE GENOTOXICIDADE

O Teste cometa é um método fácil de avaliação genotóxica onde as células são incluídas em um gel de agarose e dispostas em uma fina camada sobre lâminas histológicas, estas por sua vez, são submetidas a soluções apropriadas para que membrana citoplasmática, núcleo e organelas sejam rompidas (células lisadas) e seus componentes citoplasmáticos e proteínas nucleares extraídos, o material genético é então submetido à eletroforese. Fragmentos de DNA

nuclear migram no sentido anodo e quanto mais intensa a indução de quebras, menores serão os fragmentos e maior a extensão de migração. Sequencialmente as lâminas são colorizadas e levadas ao microscópio óptico para observar-se o DNA de uma célula que se manifesta consistindo de uma cabeça (matriz nuclear) e uma cauda que corresponde aos fragmentos (DNA quebrado) que migraram com uma forma similar a um cometa, daí o nome da técnica, sendo quantificada em células, permitindo avaliar o potencial genotóxico de amostras ou de condições ambientais alteradas. O DNA que não estiver rompido ou quebrado fica armazenado no núcleo, sendo muito grande para migrar. A extensão do DNA que migra está correlacionada com o dano ocorrido (SPEIT; HARTMANN, 1999; TICE et al., 2000; SILVA et al., 2003).

A coloração do material é feita com Syber gold e analisada por fluorescência sendo a intensidade proporcional à quantidade de DNA presente, no entanto, a coloração pode apresentar alguns fatores negativos como a própria ação mutagênica do corante, a necessidade de equipamentos específicos para análise e a curta durabilidade da coloração. Outra forma mais recente é a utilização de prata como agente colorificante como uma boa alternativa para o ensaio devido à alta sensibilidade em comparação ao brometo de etídio inicialmente usado no ensaio (REINHARDT et al., 2000).

4.9.1 Teste cometa

O Teste cometa foi realizado sob condições alcalinas, conforme descrito por Singh et al. (1988), adaptadas por Tice et al. (2000). O sangue humano foi coletado e colocado em microtubos heparinizados.

As células do sangue (alíquotas de 5 μ L) foram embebidas em agarose de baixo ponto de fusão (0,75%, w/v, 95 μ L) e a mistura foi adicionada a uma lâmina de microscópio pré-coberta com agarose de ponto de fusão normal (1%), posteriormente coberto com uma lamínula e levada à geladeira por aproximadamente 5 minutos a 4 °C para solidificação. As lamínulas foram retiradas e as lâminas imersas em tampão de lise (2,5M NaCl, 100mM EDTA e 10mM Tris, pH 10,0-10,5, com adição na hora do uso de 1% de Triton X – 100 e 10% de DMSO) a 4°C por um período mínimo de 1 hora e máximo de 1 semana.

As lâminas foram incubadas em tampão alcalino (300 mM NaOH e 1mM EDTA, pH>13) por 20 minutos para o desenovelamento do DNA, a corrida eletroforética, foi realizada

no mesmo tampão nas seguintes condições: a 25v e 300mA por 15 minutos. Todas estas etapas foram realizadas sob luz indireta fraca amarela. Posteriormente as lâminas foram neutralizadas com 0,4M Tris (pH 7,5) e, ao final, o DNA foi corado com SYBR Gold (*life technologies*) para posterior análise através do software COMET IV, utilizando o parâmetro *Tail intensity* que representa a porcentagem de DNA na cauda.

Foram utilizados controles negativos e positivos para cada teste de eletroforese a fim de assegurar a confiabilidade do procedimento. Todas as lâminas foram codificadas para análise às cegas.

As concentrações de extrato bruto testadas, tanto material convencional quanto domorgânico, variaram nas concentrações conforme apresentado na tabela 1.

Tabela 1. Concentrações (mg) de extrato bruto convencional e orgânico usadas no Teste cometa em células sanguíneas humanas.

Concentração	Extrato bruto convencional		Extrato bruto orgânico	
	Extrato liofilizado	Cumarina	Extrato liofilizado	Cumarina
C1	2	0,143	2	0,2625
C2	4	0,287	4	0,525*
C3	8	0,575	8	1,050

Fonte: Do autor. Dados obtidos pela pesquisa.

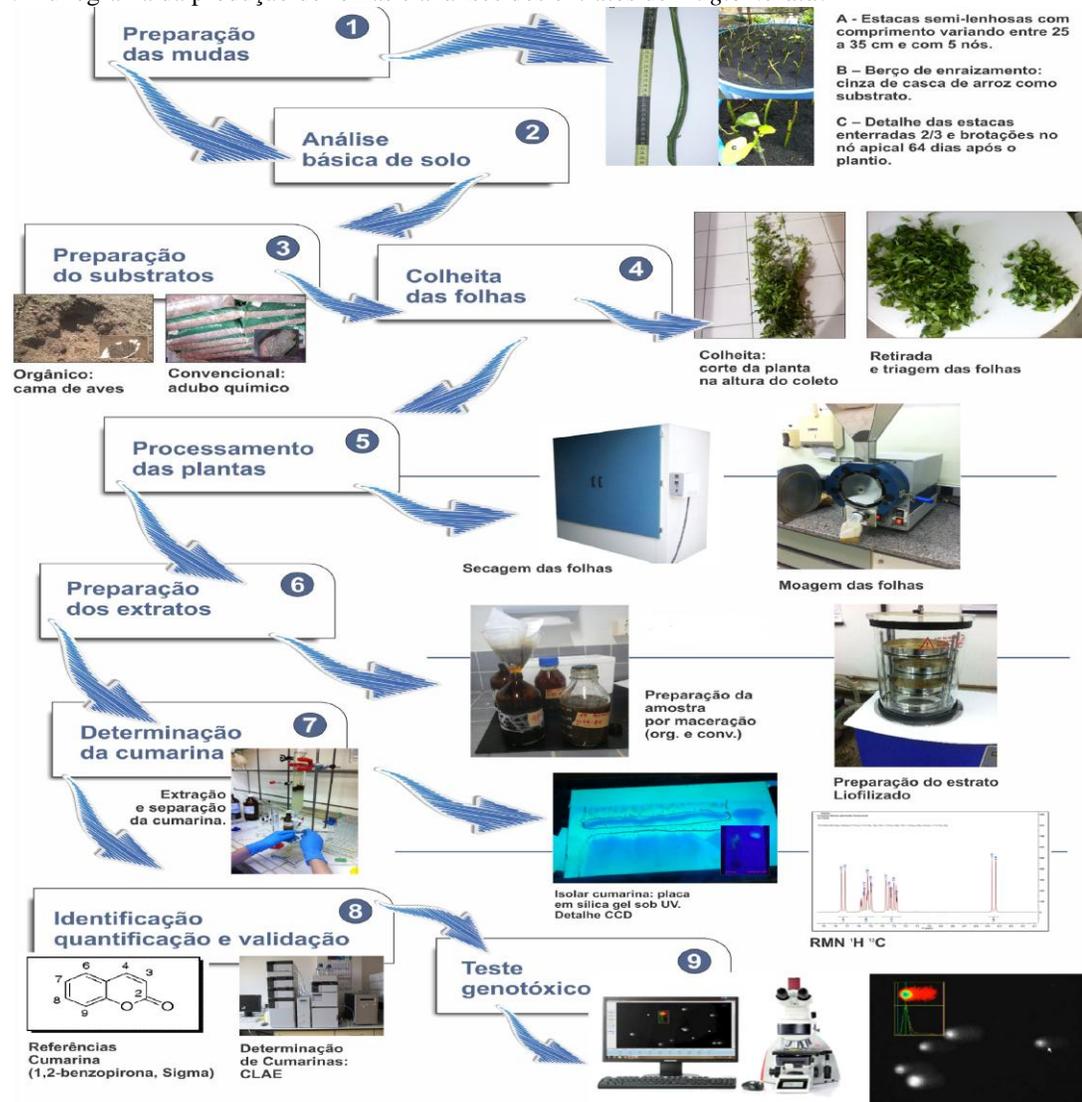
* Valor de referência de ingestão diária baseado na concentração de cumarina (mg) em um fitoterápico de acordo com a resolução RE 89, de 16 de março de 2004 atualizada pela instrução normativa nº 2 de 13/05/2014 da ANVISA.

Foram testados também os extratos, convencional e orgânico considerando a mesma concentração de cumarina e para tal foi usado 7,3 mg do extrato bruto liofilizado convencional e 3,4 mg extrato bruto liofilizado orgânico para ajuste da concentração de cumarina de 0,525 mg (dose mínima diária).

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística das variáveis de crescimento, os dados foram expressos em média e desvio padrão pela análise de variância no tratamento, seguido pelo teste de Tukey. O nível de significância estabelecido para o teste estatístico é de 5% ($\alpha < 0,05$). Utilizou-se o SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 15.0 como pacote estatístico.

Figura 4. Fluxograma da produção de folhas e análises dos extratos de *M. glomerata*.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

5 RESULTADOS

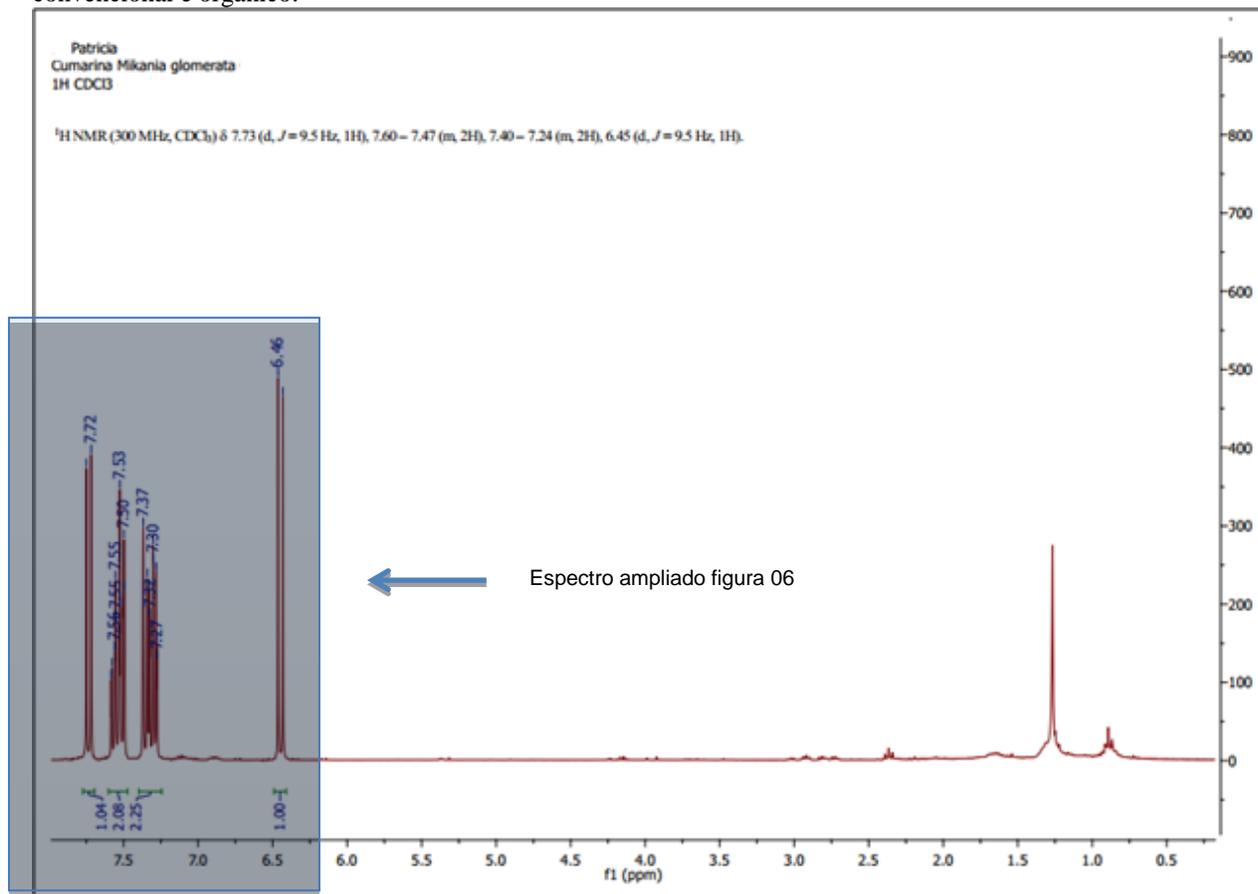
5.1 AVALIAÇÃO QUÍMICA

5.1.1 Elucidação estrutural de 1,2-benzopirona por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de próton (^1H) e carbono (^{13}C) isolado do extrato vegetal de *M. glomerata* cultivada sob sistema orgânico e convencional (EBMg/Conv)

A análise de espectro de RMN ^1H da amostra convencional revela a presença de dois multipletos em δ 7,60-7,49 e δ 7,37-7,28 de quatro hidrogênios aromáticos confirmando a presença de um anel di-substituído, sendo os sinais de hidrogênios de H6, H7, H8 e H9 (Figuras 5 e 6).

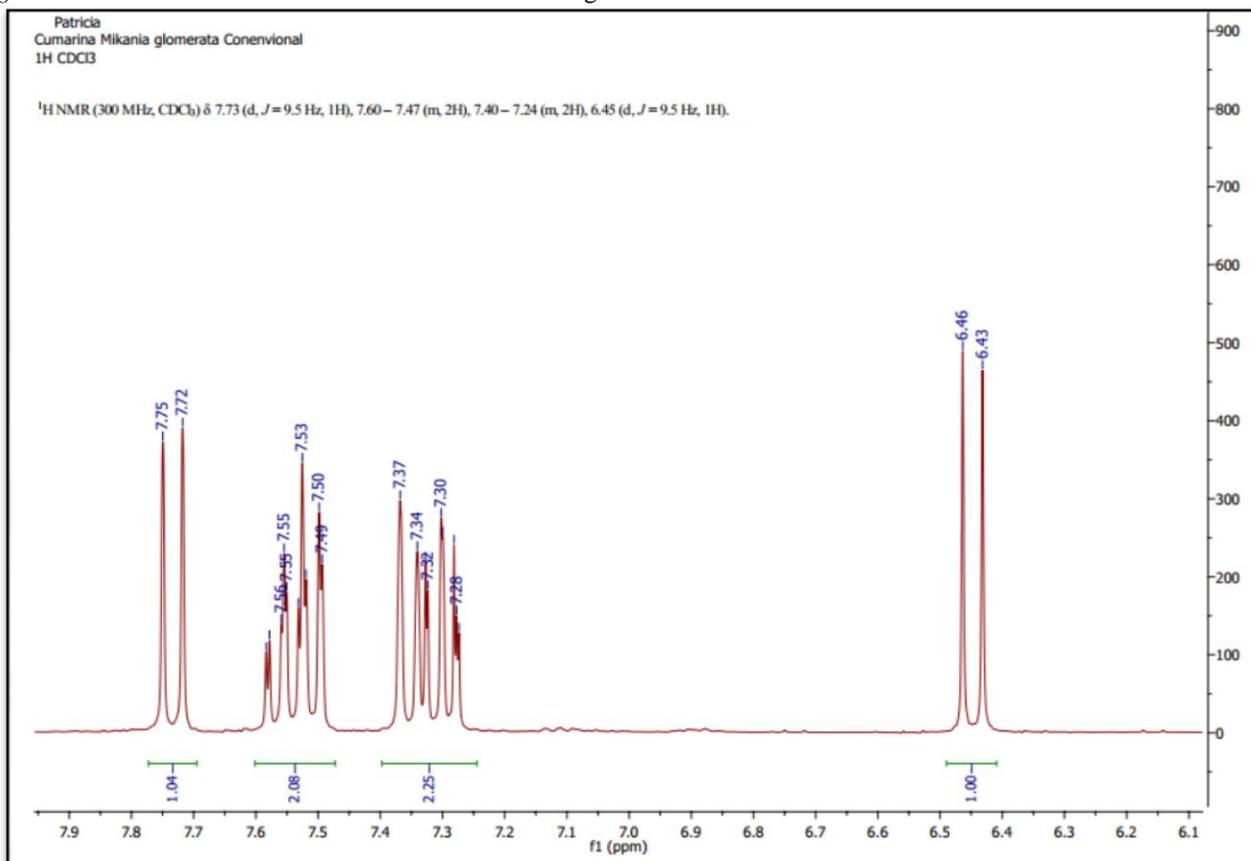
Dados para cumarina na amostra em sistema convencional: ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 7.73 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H, Ar-H), 7.60 (m, 1H, Ar-H), 7.47 (m, 1H, Ar-H), 7.40 (m, 1H, Ar-H), 7.24 (m, 1H, Ar-H), 6.45 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H, Ar-H).

Figura 5. Espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 de cumarina extraída de *M. glomerata* sob os sistemas de cultivo convencional e orgânico.



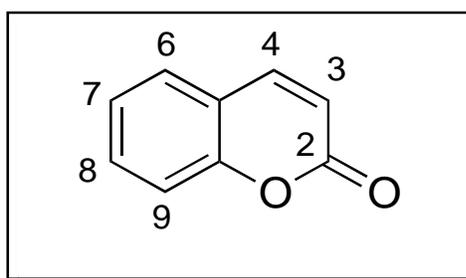
Fonte: Dados obtidos pela pesquisa.

Figura 6. Ampliação do espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 de 7.9 à 6.1 ppm da amostra de cumarina extraída de *M. glomerata* sob os sistemas de cultivo convencional e orgânico.



Fonte: Do Autor. Dados obtidos pela pesquisa.

Figura 7. Cumarina 1,2-benzopirona



Fonte: (KAISER; SANTOS; ABREU, 2013)

Além da presença desses sinais de hidrogênio com δ 7,73 e 6,45, indicando a presença de hidrogênios de carbono insaturado com configuração *cis*, confirmado pelas constantes de acoplamento de $J = 9,5$ e $9,6$ Hz e, devido aos seus deslocamentos químicos de região próxima aromática, conclui-se que trata de uma dupla ligação conjugada ao anel aromático.

A análise de espectro de RMN da amostra de sistema orgânica confirma os mesmos sinais, comprovando tratar-se da mesma molécula de cumarina 1,2-benzopirona. Pode-se observar a presença de quatro átomos de hidrogênio aromáticos (δ 7,60; 7,40; 7,47; 7,24) indicando um anel di-substituído. A presença de dois dupletos (δ 7,24 e 6,45) contendo as constantes de acoplamento de $J = 9,5$ e $9,6$ Hz não deixam dúvidas sobre a estrutura molecular.

Os dados encontrados conferem com os dados obtidos na literatura sobre os deslocamentos químicos da 1,2-benzopirona (Figura 8, Tabela 2) (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007; KAISER; SANTOS; ABREU, 2013).

Os dados de RMN de ^1H da 1,2-benzopirona isolada da planta medicinal *M. glomerata* desenvolvida neste estudo em sistemas de cultivo orgânico e convencional em comparação com os dados da literatura estão apresentados na Tabela 2.

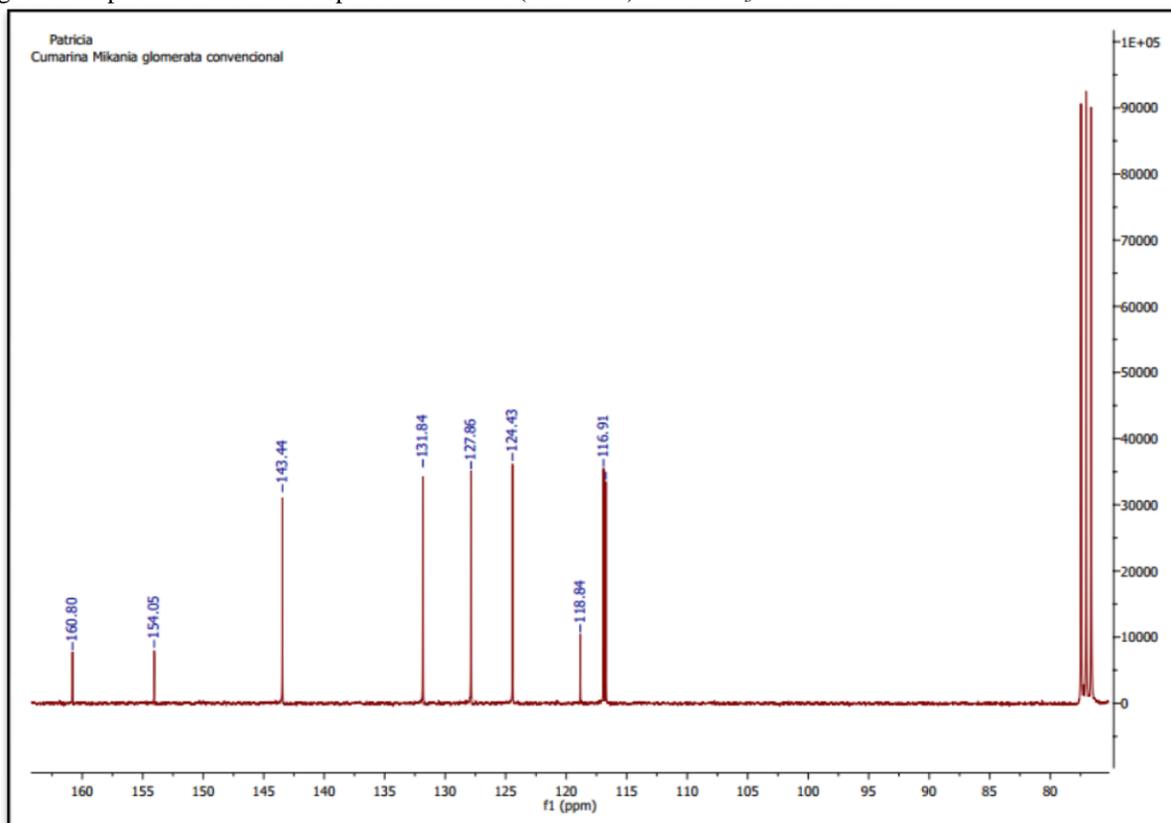
Tabela 2. Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de cumarina orgânica e convencional e comparação com dados da literatura.

1,2-benzopirona isolada de amostra orgânica ^1H δ (ppm)	1,2-benzopirona isolada de amostra convencional ^1H δ (ppm)	Literatura* ^1H δ (ppm);
6.45; d	6.45; d	6.30; d
7.73; d	7.73; d	7.65; d
7.60; m	7.60; m	7.52; m
7.24; m	7.24; m	7.02; m
7.47; m	7.47; m	7.52; m
7.40; m	7.40; m	7.02; m

Fonte: Do Autor. Dados obtidos pela pesquisa. *Fonte: Oliveira et al, 1984.

A análise de espectro de RMN da amostra orgânica e convencional confirma os mesmos sinais, comprovando tratar-se da mesma molécula de cumarina 1,2-benzopirona. Pode-se observar a presença de três carbonos quaternários C2 em δ 160.80; C5 em δ 118.84 e C10 em δ 154.05 os carbonos da dupla ligação C3 e C4 em 143.44 e 131.84 ppm respectivamente e o carbonos do anel aromático em (δ 127.86; 124.43 e 116.91 (C7 e C8) conforme a Tabela 3. Confirmando desta forma a presença de 9 carbonos pertencente a estrutura química isolada 1,2-benzopirona (Figura 7).

Figura 8. Expansão de ^{13}C nos espectros de RMN (300 MHz) em CDCl_3 de cumarina.



Fonte: Do Autor. Dados obtidos pela pesquisa.

Tabela 3. Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 300 MHz) de cumarina orgânica e convencional e comparação com dados da literatura.

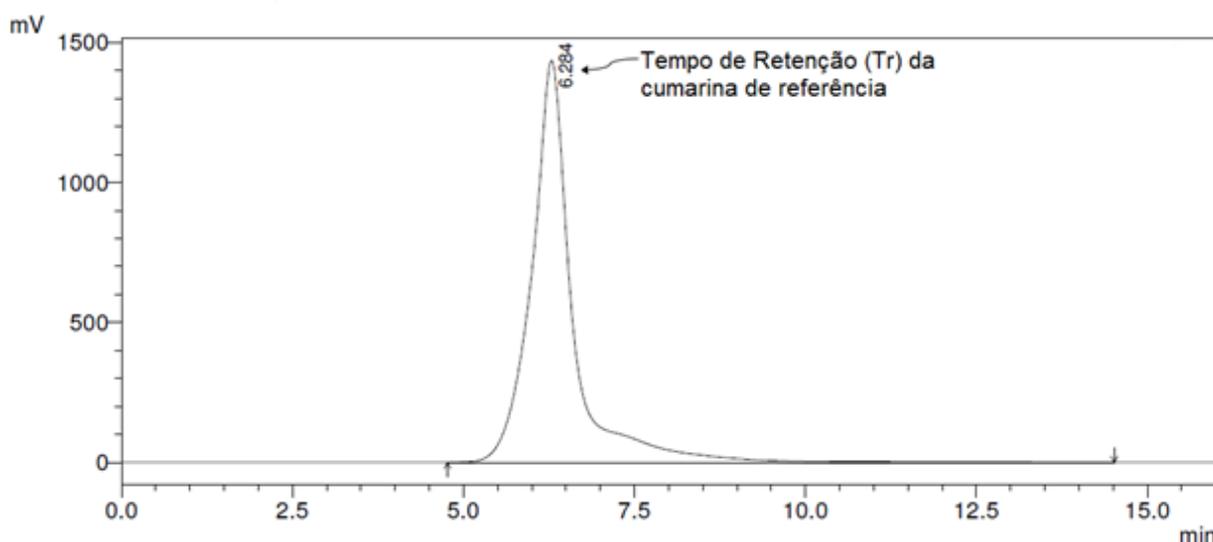
1,2-benzopirona isolada de amostra orgânica ^{13}C δ (ppm)	1,2-benzopirona isolada de amostra convencional ^{13}C δ (ppm)	Literatura* ^{13}C δ (ppm);
160.80	160.80	160.05
154.05	154.05	153.36
143.44	143.44	142.73
131.84	131.84	131.12
127.86	127.86	127.17
124.43	124.43	123.72
118.84	118.84	118.14
116.91	116.91	115.99

Fonte: Do Autor. Dados obtidos pela pesquisa. *Ariza, et. al. (2007).

5.1.2 Perfil cromatográfico da cumarina de referência

A obtenção do perfil cromatográfico de cumarina (1,2-benzopirona, Sigma) foi obtido de sua solubilização em MeOH (5 mg/10 mL) e uma amostra de 20 µL empregada nas análises em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) preparadas em triplicata.

Figura 9. Tempo de retenção (Tr) de 6,284 minutos de cumarina (1,2-benzopirona, Sigma).



Fonte: Do Autor. Dados obtidos pela pesquisa.

A ausência de outros picos, ou seja, ausência de substâncias químicas interferentes, como mostra na figura 9 caracteriza a pureza do padrão e a eficácia do método analítico com segurança de 99% ($Rr^1=0.9999913$ $Rr^2=0.9999825$) como determina a resolução – RE n° 899, de maio de 2003 da ANVISA (2003).

A substância pura cumarina (1,2-benzopirona, Sigma) foi preparada solubilizando a mesma em MeOH (5 mg/10 mL) e posteriormente diluindo-se sucessivamente até a concentração de 10.000 µg de peso teórico de cumarina padrão.

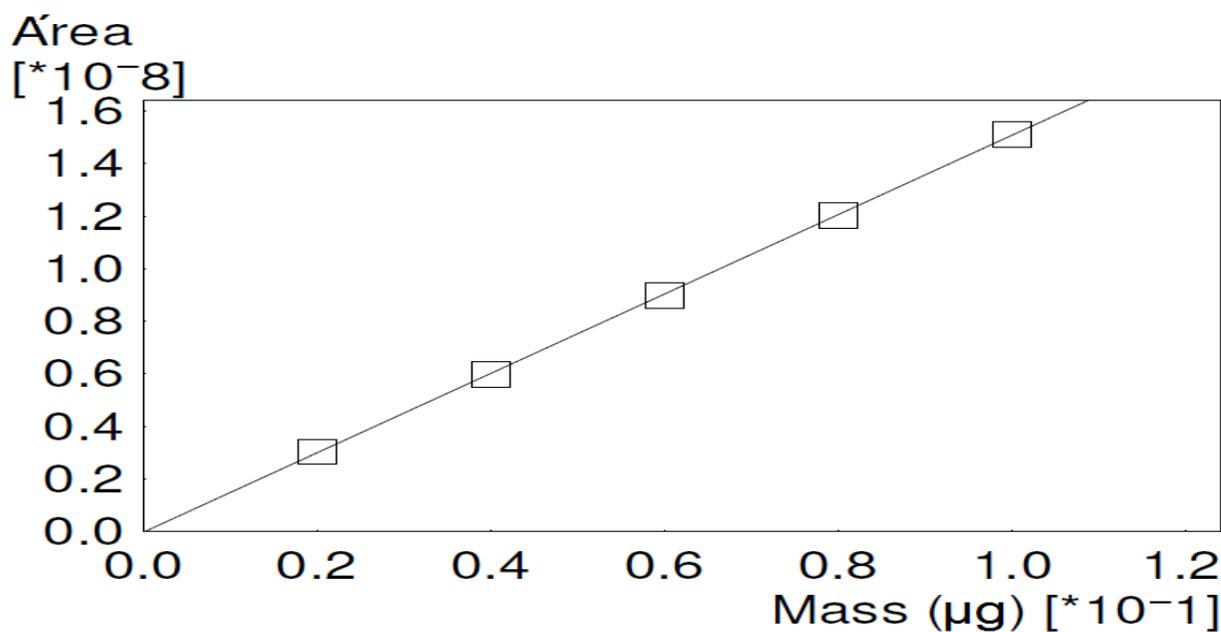
Cada concentração foi analisada em triplicata, gerando dados necessários para a construção do modelo linear, regressão linear (figura 10), e conseqüentemente obtendo-se a média e desvio padrão (Tabela 4).

Tabela 4. Curva da concentração ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) da substância pura de cumarina (1,2-benzopirona: Sigma).

Amostra	Conc. Teórica ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Peso Teórico (μg)	Peso Médio Experimental (μg)	Concentração Média Experimental ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Tempo Médio Retenção (Min.)	Área ($\cdot 10^{-8}$)
Padrão 0	0,5	2.000	2,000	0,1000	6,341500	0,30331079
Padrão 1	0,5	4.000	4,000	0,2000	6,306333	0,59901236
Padrão 2	0,5	6.000	6,003	0,3002	6,293333	0,89983181
Padrão 3	0,5	8.000	8,010	0,4005	6,283667	1,20257853
Padrão 4	0,5	10.000	10,007	0,5004	6,280333	1,51097045

Fonte: Do Autor. Dados obtidos pela pesquisa.

Figura 10. Retas de calibração do padrão de cumarina em diferentes concentrações.



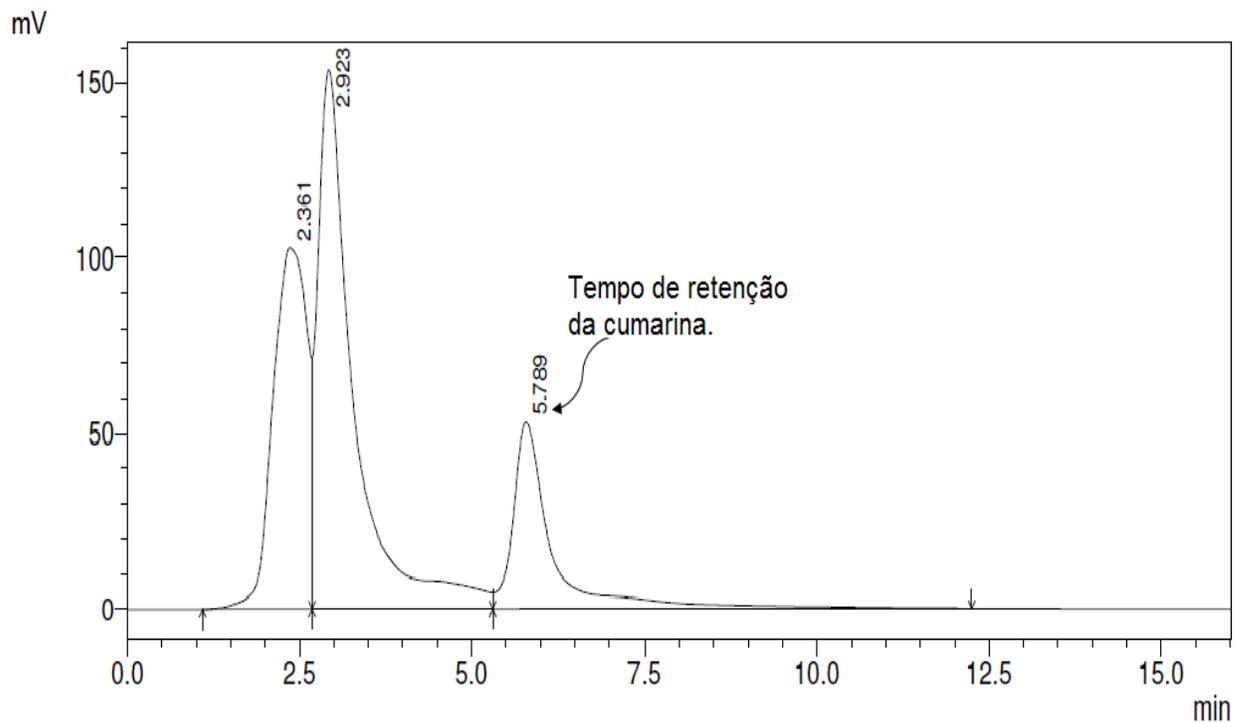
Fonte: Do Autor. Dados obtidos pela pesquisa.

Observa-se uma relação linear cuja função gerada $f(x)=1.50944X - 0,00252486$ entre a concentração e a área obtém-se um alto coeficiente de correlação (R^2) próximo de 1 (um) $R=0.9999408$ (Figura 11).

Linearidade de um método analítico que demonstra a habilidade de se produzir um resultado que seja diretamente proporcional à concentração do analito em amostras em que as faixas de concentração são estabelecidas, portanto, os resultados demonstram a linearidade da curva de calibração dentro dos parâmetros exigidos pela ANVISA (2003) presentes no item 5. 2. 4. deste estudo que descreve “Validação do método analítico”.

5.1.3 Perfil cromatográfico do extrato hidroalcoólico de *M. glomerata* submetida ao cultivo convencional

Figura 11. Perfil cromatográfico do extrato bruto de *M. glomerata* (EBMg/Conv.) obtido a partir do cultivo convencional (Amostra Conv18 - 3° triplicata representando o comportamento médio de 17 amostras).

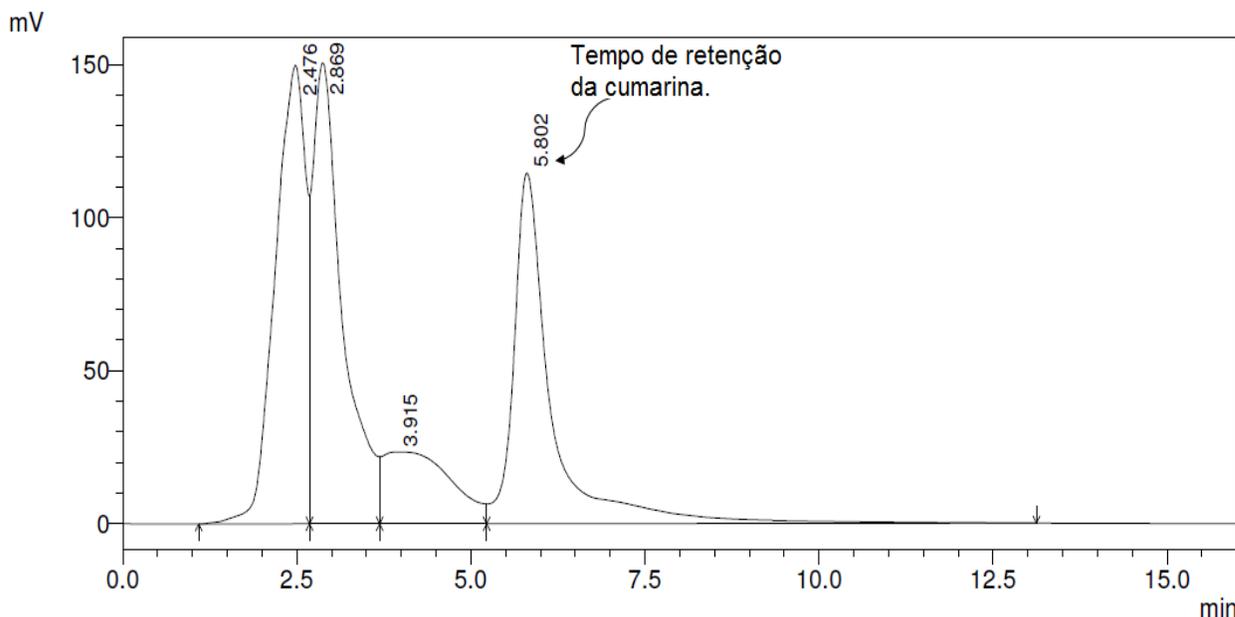


Fonte: Do Autor. Dados obtidos pela pesquisa.

Conforme descrito na metodologia a obtenção do perfil cromatográfico de EBMg/Conv foi obtido através da mesma preparação da amostra padrão empregando nas análises 20 μ L, e foram analisadas também em triplicata (BOLINA; GARCIA; DUARTE, 2009).

5.1.4 Perfil cromatográfico do extrato bruto de *M. glomerata* submetida ao cultivo orgânico

Figura 12. Perfil cromatográfico da amostra do cultivo orgânico (EBMg/Org.) Amostra ORG12 - 1º triplicata representando a o comportamento médio de 13 amostras).



Fonte: Do Autor. Dados obtidos pela pesquisa.

A proximidade de picos dos tempos de retenção (T_r), praticamente os mesmos, tanto para as amostras de plantas submetidas ao cultivo convencional (EBMg/Conv.), para as amostras do cultivo orgânico (EBMg/Org.) com a amostra padrão, pode caracterizar a presença à cumarina 1,2-benzopirona, sendo que a mesma só foi confirmada nas análises em Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de próton (^1H) e carbono (^{13}C).

No perfil cromatográfico das amostras convencional (EBMg/Conv), observa-se a presença de apenas dois picos com tempos de retenção de 2,361 e 2,923 minutos respectivamente (Figura 11), diferente do observado do perfil cromatográfico das amostras das plantas submetidas ao cultivo orgânico (EBMg/Org) onde há a presença de três picos com os tempos de retenção de 2,476; 2,869 e 3,915 minutos respectivamente (Figura 12). Os picos observados não foram identificados.

5.1.5 Validação do método analítico

O desenvolvimento de técnicas na pesquisa de extratos vegetais e de fitoterápicos nos aspectos farmacológicos, toxicológicos e molecular permitiu esclarecer, parcialmente ou na totalidade, os processos para a validação de fármacos (YUNES; PEDROSA; CECHINEL-FILHO, 2001).

De acordo com os parâmetros estabelecidos pela ANVISA (2003) no “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”, RE nº 899 de 29 de maio de 2003 para validação do método de análise de matéria prima vegetal, o método é aceito e confiável uma vez que não apresenta interferência no processo analítico do extrato puro permitindo a comparação com o extrato vegetal analisado. Dessa forma, foram avaliados, de acordo com a legislação para matéria prima vegetal, os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, intervalo, precisão e repetibilidade, exatidão e robustez (ANVISA, 2003; RIBANI et al., 2004).

Após verificarmos por RMN ^1H e ^{13}C que o pico analisado e quantificado como: cumarina 1,2-benzopirona nos extratos de *M. glomerata* (convencional e orgânico) o método foi validado segundo os parâmetros preconizados pela ANVISA (2003).

5.2 PRODUÇÃO DE MATÉRIA SECA E CUMARINA

No presente estudo observou-se melhora das condições químicas do solo com a aplicação da adubação orgânica, adubação química, aplicação de calcário e cinzas. Para tal, foram feitas as análises considerando os parâmetros de referência para análise básica do solo antes do plantio e após a colheita de *M. glomerata*. Os valores dos parâmetros são apresentados nas tabelas 5 e 6.

Tabela 5. Parâmetros de referência para análise básica de fertilidade do solo, segundo a Rede Oficial de Laboratórios de Análise de solos para o solo usado no experimento.

Parâmetros analisados	Antes (sem condicionantes)	Após Cultivo (com condicionantes)	
		Convencional	Orgânico
% de argila	32	22	16
pH em água	4,4 (muito baixo)	5,4 (muito baixo)	6,8 (alto)
Índice SMP	4,5	5,8 (médio)	6,8 (alto)
P (mg/dm ³)	6,0 (muito baixo)	439,2 (muito alto)	370,4 (muito alto)
K (mg/dm ³)	78,0 (baixo)	122 (alto)	204 (muito alto)
M.O.(%)	2,1	2,8	3,9
Al (cmolc/dm ³)	4,3	0,0	0,0
Ca (cmolc/dm ³)	0,6 (muito baixo)	13,9 (alto)	13,1 (alto)
Mg (cmolc/dm ³)	0,4 (baixo)	1,6 (alto)	2,7 (alto)
H + Al (cmolc/dm ³)	24,4	5,4	1,8
CTC pH 7,0 (cmolc/dm ³)	25,6	21,21	18,08
% saturação na CTC: Al	78,19	0,00	0,0
% saturação na CTC: V	4,69	74,55	90,05
Soma de Bases: S	1,20	15,81	16,28
Ca/Mg	1,50	8,69	4,53
Ca/K	3,01	44,55	25,11
Mg/Ca	2,01	5,13	5,10

Fonte: Dados obtidos pela pesquisa.

Tabela 6. Parâmetros de referência para análise de micronutrientes, segundo a Rede Oficial de Laboratórios de Análise de solos para o solo usado no experimento.

Parâmetros analisados	Antes (sem condicionantes)	Após Cultivo (com condicionantes)	
		Convencional	Orgânico
Cu (mg/dm ³)	1,1	1,1 baixo	8,5
Zn (mg/dm ³)	4,4	17,4 alto	46,1
Fe (g/dm ³)	248	154	82
Mn (mg/dm ³)	8,2	7,3 alto	6,7

Fonte: Dados obtidos pela pesquisa.

Variáveis químicas do solo analisadas antes e após o cultivo apresentaram crescimento na disponibilidade de nutrientes, como é o caso de fósforo (P) e potássio (K), dois macronutrientes que passaram de situações limitantes ao crescimento para níveis “alto” ou “muito alto” de disponibilidade, isso representou um aumento aproximado de 7.220,00% para o P no tratamento convencional e 6.066,00% no tratamento orgânico quando comparado com o solo sem condicionantes e para o potássio (K) aumentos de 156,60% e 261,50% respectivamente. Tais valores podem ser explicados não somente pela adubação mineral e orgânica respectivamente,

mas também pelo baixo pH que ao ser corrigido disponibiliza estes nutrientes à fração trocável do solo, ou seja, de indisponível à planta a disponível como fonte de nutrientes.

Cátions importantes como o cálcio (Ca) e o magnésio (Mg), presentes no solo sem condicionantes passaram de níveis considerados “muito baixo” e “baixo”, respectivamente para níveis considerados “altos” tanto no solo com o tratamento convencional como no solo com tratamento orgânico, representando aumentos de 2.216,66% e 2.083,33% na disponibilidade de Ca e de aumentos de 300% e 575% na disponibilidade de Mg respectivamente e este fato pode ser explicado pela elevação do pH e consequente liberação da fase sólida para a fase líquida dos cátions adsorvidos e pela composição química do calcário rico em cálcio (Ca) e o magnésio (Mg) usado para este fim.

O pH baixo é fator prejudicial ao desenvolvimento das plantas, que no solo sem os condicionantes mostrou-se como “muito baixo” e após a aplicação do calcário calcítico (de conchas) no tratamento convencional e do calcário calcítico (de conchas) associado a cinzas de casca de arroz no tratamento orgânico, passaram a valores considerados ideais ao desenvolvimento das plantas.

A matéria orgânica total no solo usado no experimento apresentava valores percentuais “muito baixos” e após a aplicação dos condicionantes em ambos os tratamentos apresentaram valores com acréscimo de 33,33% para o tratamento de cultivo convencional e de 85,70% para o tratamento orgânico, nesse caso esperava-se essa resposta, mas para o tratamento convencional esperava-se valores não tão expressivos no aumento desta variável. A explicação pode estar no acúmulo de raízes que permaneceram no substrato no momento da colheita do guaco e por se tratar de cultivo em vasos, o solo encaminhado para amostra foi coletada da região em contato com muitas raízes.

O Alumínio (Al) que dá o caráter álico ao solo experimental e típico da região é outro fator negativo por participar da acidez potencial e este, se tornou indisponível quando da aplicação do calcário tanto no tratamento convencional quanto orgânico.

O aumento da capacidade de troca de cátions (CTC) é evidenciada em ambos os tratamentos pela correção do pH e está de acordo com o observado na fundamentação teórica. Tais observações também foram relatadas por Cantarella e Bovi, (1995); Bovi; Spiering; Barbosa (1999) e Nascimento et al. (2005). O efeito da adubação orgânica não se restringiu ao fornecimento de nutrientes essenciais ao desenvolvimento das plantas de guaco, mas também

promoveu a melhoria da fertilidade do solo, na estrutura do solo por meio de formação de húmus (coloide agregante) e no conseqüente aumento da CTC e tais observações estão de acordo com o observado por Yamada e Kamata (1989) e Rosal et al. (2011). Estes autores ainda ressaltam um melhor equilíbrio ecológico no solo, melhora no crescimento radicular e conseqüente absorção de nutrientes, variáveis essas que não foram avaliadas no presente estudo.

Sabe-se que a matéria orgânica é uma importante fonte de nutrientes, principalmente nitrogênio, fósforo, enxofre e micronutrientes além de corretivo de elementos tóxicos, através da formação de complexo metal-húmus (KIEHL, 1985; CORREA JÚNIOR; MING; SCHEFFER, 1994; OLIVEIRA FILHO et al. 1987) e isso fica bem evidenciado quando analisamos os resultados obtidos das condições do solo antes e depois da aplicação dos condicionantes que favorecem o desenvolvimento e fisiologia das plantas refletida nos resultados da concentração de cumarinas.

Tabela 7. Valores de referência utilizados como limites máximos de contaminantes admitidos em compostos orgânicos.

Elemento	Limite (mg/kg de matéria seca) ²	Amostra ^{3;4}
Arsênio	20	<1,0
Cádmio	0,7	2,3
Cobre	70	477,3
Níquel	25	5,9
Chumbo	45	2,0
Zinco	200	500,2
Mercúrio	0,4	<0,1
Cromo (total)	70	9,9
Coliformes Termotolerantes (número mais provável por grama de matéria seca - NMP/g de MS)	1.000	1500
Ovos viáveis de helmintos (número por quatro gramas de sólidos totais - n° em 4gST)	1	0,21
<i>Salmonella</i> sp	Ausência	Ausência

Fonte: Dados obtidos pela pesquisa.

¹ A cultura e comercialização dos produtos orgânicos no Brasil foram aprovadas pela Lei 10.831, de 23 de dezembro de 2003. Sua regulamentação, no entanto, ocorreu apenas em 27 de dezembro de 2007 com a publicação do Decreto N° 6.323.

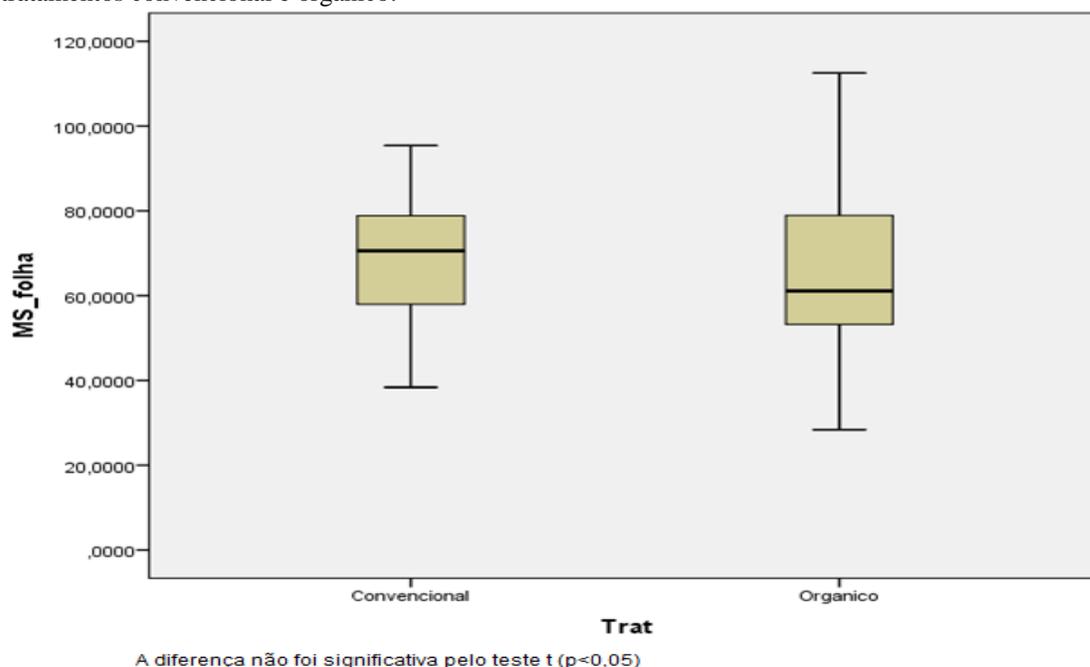
² ANEXO VII da lei

³ Laudo emitido pelo Instituto de Pesquisas Ambientais e Tecnológicas – IPAT Laboratório de Análises de Solos, Corretivos e Fertilizantes N°: 198/2015 e Instituto de Alimentos – IALI Laboratório de Análises Físico-Químicas de Alimentos Relatório N°: 102532 / 2015.

⁴ Métodos Analíticos: Espectroscopia de Emissão ICP-OES e Absorção Atômica - VF

A disponibilização de nutrientes absorvíveis pela planta originada da matéria orgânica só é possível após sua mineralização e para que isso ocorra há de se considerar fatores como a composição da matéria orgânica, temperatura, umidade, aeração, teor dos nutrientes, pH, microrganismos e manejo do solo (POTTKER, TEDESCO, 1979; PARENTONI; FRANCA; BAHIA FILHO, 1988;).

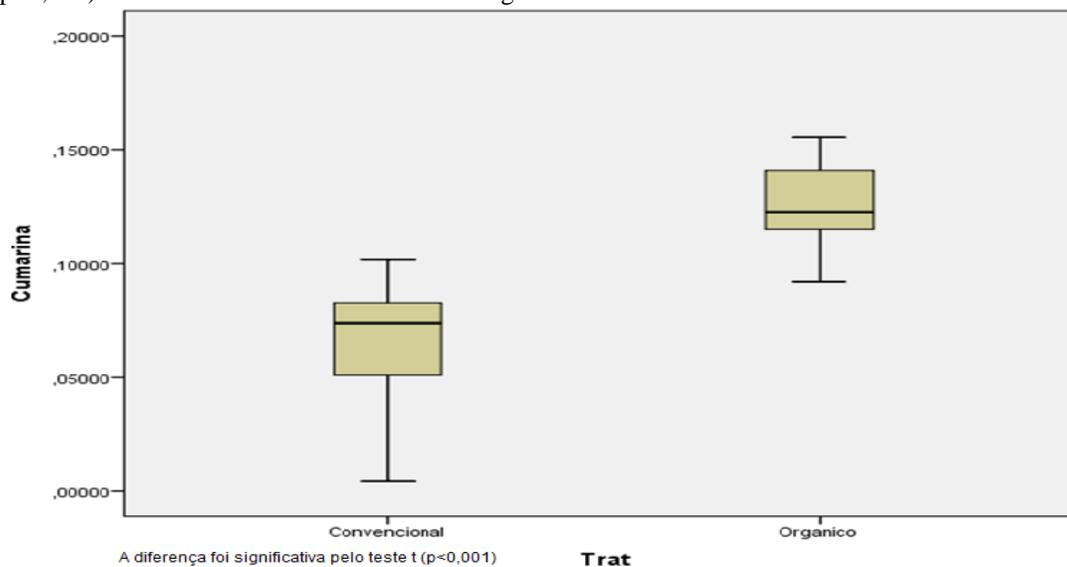
Figura 13. A produção de matéria seca de folhas de *M. glomerata* colhidas aos 100 dias não diferiram entre os tratamentos convencional e orgânico.



Fonte: Dados obtidos pela pesquisa.

O método desenvolvido para análises comparativas dos tratamentos exibiu parâmetros analíticos adequados e validados, conseguindo quantificar o principal composto marcador, a cumarina, encontrado nos dois tratamentos, convencional e orgânico ao qual *M. glomerata* foi cultivada. A avaliação dos sistemas de cultivo com diferentes tipos de adubação mostrou que a adubação orgânica com a cama-e-aviário decomposta é mais interessante no cultivo de *M. glomerata* quando considerarmos a produção média de cumarina. Observa-se na tabela 8 que foi produzindo o dobro deste composto nas plantas cultivadas em sistema de cultivo orgânico quando comparado com o sistema de cultivo convencional, demonstrando que sua utilização no cultivo desta espécie é recomendada, pois além de possuir um custo baixo é um produto orgânico de baixo impacto ambiental fato esse ressaltado por Carollo (2008).

Figura 14. A produção de cumarina de folhas de *M. glomerata* colhidas aos 100 dias diferiram significativamente ($p < 0,001$) entre os tratamento convencional e orgânico.



Fonte: Dados obtidos pela pesquisa.

Tabela 8. Concentração média de cumarina em g/kg folha de *M. glomerata* observada nos tratamentos produção convencional e produção orgânica.

	Trat.	N	Média*	Desvio Padrão	Erro padrão da média
Cumarina g/kg folha	conv.	17	0,0650	0,03441183	0,00834609
	org.	13	0,1258	0,01806777	0,00501110

*A diferença foi significativa pelo teste t ($p < 0,001$) para Igualdade de Médias.

Fonte: Dados obtidos pela pesquisa.

Tabela 9. Matéria Seca (MS) média em g de folhas de *M. glomerata* observada nos tratamentos produção convencional e produção orgânica.

	Trat.	N	Média*	Desvio Padrão	Erro padrão da média
MS_folha	conv.	20	66,5870	19,3317603	4,3227130
	org.	15	66,3223	21,4927785	5,5494115

*A diferença não foi significativa pelo teste t ($p > 0,05$) para Igualdade de Médias.

Fonte: Dados obtidos pela pesquisa.

A adubação química realizada no presente estudo com o guaco (*M. glomerata*) foi benéfica para a variável matéria seca uma vez que não se observou diferença entre as médias no sistema de cultivo convencional e orgânico. Pereira et al. (1996) relatam que a aplicação de nitrogênio mineral, 60 g de sulfato de amônio, 250 g de superfosfato simples e 20 g de cloreto de potássio por planta, resultou no aumento da produção de fitomassa em torno de seis vezes em relação à testemunha sem adubação.

A biossíntese de cumarina, o metabólito secundário marcador em *M. glomerata*, é regulada geneticamente, mas influenciada por fatores ambientais, origem geográfica e a sazonalidade são fatores importantes para a obtenção dos níveis desejados de cumarina em guaco (CASTRO et al., 2006; BERTOLUCCI, et al., 2013; PASSARI, SCARMINIO, BRUNS, 2014). A adubação orgânica é o fator que atuou de forma significativa ($P < 0,05$) no metabolismo influenciando no acúmulo deste composto nas folhas. Ferreira (2003) ressalta essa influência na produção de princípios ativos de *Catharanthus roseus* (L.) G. tanto na quantidade quanto na qualidade dos princípios ativos produzidos por esta espécie.

O aumento da concentração de cumarina está relacionado com o uso do adubo orgânico e está de acordo com o observado por Pereira et al. (1998), mas para a variável “Matéria Seca”, os resultados são divergentes. Em nossos resultados não se observou o aumento significativo de matéria seca em folhas quando comparamos o tratamento orgânico versus convencional, os autores acima citados afirmam que o uso de fertilizante orgânico aumenta a matéria seca em caules mais do que em folhas quando comparado com o uso de fertilizantes inorgânicos.

Os resultados observados sobre a produção de 1,2*H*-benzopirano nas folhas de *M. glomerata* colhidas em janeiro e cultivadas no verão foram determinadas em plantas cultivadas em um ciclo de aproximadamente 100 dias a contar do transplante do viveiro para o local definitivo. Segundo Castro et al. (2003; 2006) e Gasparetto et al. (2010) plantas jovens de até 100 dias de idade produzem duas vezes mais cumarinas que plantas adultas.

Pereira (1997) recomenda que a colheita de *M. glomerata* na região de Ribeirão preto/SP seja feita no mês de janeiro, uma vez que neste período o teor de cumarinas nesta planta é elevado e ao mesmo tempo nesta época há intensa emissão de folhas as quais sintetizam quantidades significativas de cumarina.

Há uma relação entre intensidade de luz e produção de metabólitos secundários, pois todas as substâncias produzidas pelas plantas estão envolvidas com o metabolismo primário da fotossíntese, o que causa conseqüentemente, alterações anatômicas, fisiológicas e químicas. Os componentes químicos associados à ação terapêutica das plantas medicinais são produtos do metabolismo secundários provenientes de compostos desviados da fotossíntese e da respiração, especificamente da glicose e do ciclo de Krebs, relacionados à adaptação ou resposta da planta ao meio o que pode ser interpretado como um mecanismo de defesa contra fatores bióticos e abióticos e o processo de síntese destes compostos bioativos é originado de uma série de

substâncias principalmente relacionado ao grupo dos terpenos, compostos fenólicos e alcaloides (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Terpenos são obtidos através do ácido mevalônico ou pela via do piruvato e 3-fosfoglicerato. Já os compostos fenólicos, são formados pela via do ácido chiquímico e o ácido mevalônico, enquanto que os alcaloides são derivados dos aminoácidos alifáticos e aromáticos via ácido chiquímico tal como a cumarina (ALVES, 2001; CZELUSNIAK, et al. 2012; PÉREZ; NERY, 2014).

O teor de 1,2*H*-benzopirano observado no presente trabalho apresenta resultados significativos com relação aos tratamentos e isso também se deve à intensidade de luz associado à maior produção em pleno sol no qual o presente experimento foi conduzido.

Importantes variações de cumarina são encontradas dependendo do órgão, sendo que em *M. glomerata* os maiores teores deste metabólito são observados em folhas jovens (5,20 mg.g⁻¹ de matéria seca), seguidos por flores (1,04 mg.g⁻¹ de matéria seca), caules (1,05 mg.g⁻¹ de matéria seca) e raízes (0,11 mg.g⁻¹ de matéria seca) em trabalho desenvolvido por Castro et al. (2006). Estes estudos referendam a escolha de determinar a produção de cumarinas somente nas folhas de *M. glomerata* e pelo fato deste ser o principal farmacógeno relatado nas bibliografias pertinentes. Além disso, Castro et al. (2006) ainda ressaltam que as maiores concentrações de cumarina foram observadas em partes superiores da planta, o que indica a relação com o crescimento e processo de desenvolvimento do guaco, período esse quando ocorre maior acúmulo de cumarina.

No presente trabalho a quantidade aplicada de matéria orgânica foi definida em função da necessidade identificada pela análise do solo e estão de acordo com o observado por Favero et al. (2014), que *M. glomerata* Sprengel apresenta maior teor de cumarina em folhas jovens de com a incorporação de 12 t.ha⁻¹ de adubo orgânico (humus) no substrato de cultivo. Os mesmos autores ainda relatam que valores superiores a esta dose acarreta redução desse composto bioativo. Para Kähkönen et al. (1999) a produção de biomassa das folhas de *M. glomerata* cultivadas com adição de adubo orgânico foram superiores à biomassa obtida no tratamento sem qualquer adição de adubos. Já Rebelo et al. (2009) relatam que a adição de adubo orgânico aumenta a produção de biomassa da planta, mas não altera significativamente a produção de cumarina, ácido *o*-cumárico e compostos fenólicos pela *M. glomerata*, chegando a 37% a mais de produção para o tratamento com 76 g de adubação por planta, sugerindo desta forma, a produtividade positiva pela prática agroecológica. Os valores de cumarina e ácido *o*-cumárico são

semelhantes aos encontrados em extratos fluidos de guaco produzido a partir de cultivo convencional em trabalhos realizados por Osório e Martins (2004) e Santos (2005).

As pequenas alterações na produtividade, mesmo que não significativas, e no teor de cumarinas, estão relacionadas ao aporte nutricional fornecido às plantas nos dois sistemas de cultivo do *M. glomerata*. Castro et al. (2003) afirmam que as técnicas de cultivo selecionadas para sistemas de produção de espécies medicinais devem promover o aumento de biomassa sem comprometer o valor terapêutico da planta.

Apesar do rendimento de princípio(s) ativo(s) muitas vezes não acompanhar o de matéria vegetal ou ao contrário, o rendimento de princípio(s) ativo(s) ser superior ao da matéria vegetal, como ocorrido no presente estudo, os nutrientes representam um papel determinante na síntese de compostos bioativos conforme relatos de Furtini Neto e Tokura (2005), Ming (1998). Contudo, a resposta ao estímulo é dependente de fatores genéticos, fisiológicos e fitotécnicos.

5.3 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

As plantas, em função da diversidade química de metabólitos secundários que apresentam podem ser comparadas com um frasco de remédio contendo diversos medicamentos juntos e substâncias químicas que em princípio podem ser consideradas terapêuticas podem em outras circunstâncias causar efeitos indesejados quando são empregadas altas doses (CORRÊA; BATISTA; QUINTAS, 2001).

As cumarinas são compostos de ocorrência natural e amplamente distribuídas no reino vegetal possuindo propriedades farmacológicas importantes como a inibição do estresse oxidativo e a partir destas descobertas já foram sintetizados compostos cumarínicos devido às suas potentes atividades antioxidantes sendo testados seus efeitos em linfócitos humanos tendo como base o teste de cometa e o teste de micronúcleos (MAISTRO et al., 2015).

Os compostos cumarínicos são amplamente utilizados como produtos farmacêuticos e como aditivos para alimentos, perfumes e cosméticos (O'KENNEDY e THORNES, 1998).

A cumarina está presente em grande número de plantas medicinais e componentes de especiarias das quais constituem o princípio ativo que, embora apresentem efeito medicinal, também possuem relevância toxicológica (COHEN, 1979).

O presente estudo avaliou os efeitos do extrato de *M. glomerata* cultivada em diferentes sistemas de produção, convencional e orgânica, sobre parâmetros toxicogênicos em células sanguíneas tratadas com três diferentes concentrações do extrato em diferentes tempos de exposição para verificar a genotoxicidade.

Inicialmente foi observado que 2 horas de exposição ao extrato de *M. glomerata* em diferentes concentrações e formas de cultivo (convencional ou orgânico) não diferiram significativamente, apresentando o mesmo nível de dano que o grupo CN (Figura 1). Por outro lado, após 6 horas de exposição, a maior concentração do extrato da planta cultivada de forma convencional (Conv C3) mostrou que os níveis de danos ao DNA aumentaram significativamente em relação ao grupo controle (CN), ao grupo exposto por 2 horas na mesma concentração (Conv C3) e ao grupo exposto ao mesmo tempo na concentração 1 (Conv C1) do extrato convencional ($p < 0,05$, Figura 1).

Observa-se ainda que o nível de dano ao DNA na concentração ORG C3 (com a maior concentração de cumarina de todos os extratos brutos) apresentou menor dano ao DNA que a concentração convencional C3, mas com diferença significativa somente em relação ao controle negativo. Essa observação pode estar relacionada aos aditivos químicos usados no processo de produção (xenobióticos). Mesmo que não se tenham feito os testes específicos para investigação desta resposta, em função da complexidade de compostos químicos presentes nos agrotóxicos comerciais (FALCK et al., 1999), há relatos científicos que o uso de agrotóxicos aumente o nível de danos ao DNA como os relatados por Koifman e Hatagima (2003).

Todas as formulações dos agrotóxicos são complexas misturas de ingredientes ativos com vários outros componentes, tais como solventes, agentes umidificantes e/ou emulsificantes e aditivos químicos. Além disso, é comum o agricultor misturar diferentes formulações utilizadas em combinações variadas dependendo da praga, da época do ano e do tipo de cultura, tornando a exposição de alto risco, e o biomonitoramento de compostos específicos para a avaliação da exposição muito difícil. Os possíveis efeitos tóxicos de tais exposições complexas ainda são desconhecidos pela ciência e as informações da toxicidade relacionada apenas aos princípios ativos não são suficientes para avaliar o risco dos efeitos adversos dos agrotóxicos à saúde (FALCK et al., 1999).

Scarpato et al. (1996) descrevem que em relação à genotoxicidade, a determinação das alterações citogenéticas nos indivíduos expostos aos agrotóxicos pode ser utilizada como

marcador precoce de efeito biológico, fornecendo um panorama da exposição genotóxica pelos agrotóxicos no ambiente de trabalho. Koifman e Hatagima (2003) relatam que o câncer, por exemplo, é causado por fatores externos e internos e que ambos se inter-relacionam. Os fatores externos se referem às exposições ambientais dos indivíduos enquanto os internos são geneticamente determinados e estão relacionados à capacidade individual de se defender das agressões externas na maioria das vezes. Esses fatores causais podem interagir de várias formas, aumentando a probabilidade de transformações malignas nas células normais.

As cumarinas apresentam ação significativa no tratamento do câncer de próstata, carcinoma de células renais e leucemia, além de eficazes na redução dos efeitos colaterais causados pela radioterapia (FINN et al., 2002; LOPRINZI et al., 1999) assim como outros derivados de cumarina como furanocumarinas, piranocumarinas, isoflavonas, benzopironas também apresentam papel significativo no tratamento de câncer (ROHINI e SRIKUMAR, 2014). De fato, Rohini e Srikumar (2014) observaram que as cumarinas como a warfarina 4-hidroxicumarina indicada para melanoma maligno, as piranocumarinas para o tratamento de carcinoma renal e as piranocumarinas para o câncer de próstata. Além disso, a cumarina e 7-hidroxicumarina são indicadas para o tratamento de leucemia, as benzopironas para o câncer de mama, os psoralenos no tratamento de carcinoma cervical e em distúrbios da pele como micoses, psoríase e vitiligo e a warfarina como anticoagulante, além da atividade fisiológica, bacteriostática e antitumoral aparecem novas aplicações terapêuticas que inclui redução da propagação e prevenção da doença, modulação do crescimento, efeitos antioxidantes e antitumorais.

Koifman e Hatagima (2003) observam que a repetibilidade de tais observações referentes a este modelo de tratamento está documentada de forma marcante no desenvolvimento do câncer em diversos tecidos, que acabou por transformar num modelo a ser seguido, acarretando a necessidade de abordá-lo na análise de qualquer agente cancerígeno potencial, como é o caso dos agrotóxicos.

A exposição aos agrotóxicos é também uma das condições potencialmente associadas ao desenvolvimento do câncer, por sua possível atuação como iniciadores, ou seja, substâncias capazes de alterar o DNA de uma célula e, talvez, originar o tumor e/ou promotores tumorais como substâncias que estimulam a célula alterada a se multiplicar (KOIFMAN; HATAGIMA, 2003).

Em seguida, foram avaliados os efeitos do extrato em 24 horas de exposição. Observou-se aumento significativo de danos ao DNA no grupo controle quando comparado com os grupos controles de 2 e 6 horas ($p < 0,05$). Além disso, a concentração 2 e 3 do extrato da planta cultivada de forma orgânica diminuiu os danos ao DNA quando comparado com o controle negativo no mesmo tempo de exposição ($p < 0,05$, Figura 15).

Estas observações estão relacionadas a uma deterioração natural da estrutura do DNA ao longo do tempo (CN nos diferentes tempos de exposição), mas também se pode observar uma redução significativa no nível de dano ao DNA do extrato Org C2 e Org C3 quando comparado com o CN e este efeito está relacionada à maior concentração de cumarina presente nestes extratos e ao seu potencial reparador de dano.

As alterações de DNA podem levar à mutação na célula somática acarretando prejuízo maior para o próprio indivíduo, pois as mutações podem atingir células em divisão podendo causar mosaicismos, que consiste na presença de dois ou mais cariótipos diferentes, em um mesmo indivíduo ou tecido, devido à existência de duas ou mais linhagens celulares derivadas de um mesmo zigoto, sendo que o grau desse último dependerá do período de desenvolvimento em que as mutações ocorreram (BURNS; BOTTINO, 1991; BORGES-OSÓRIO; ROBINSON, 2001).

Esta constatação do potencial reparador de dano é relatada na bibliografia e um exemplo foi o trabalho desenvolvido por Maistro et al. (2015) onde determinaram os efeitos citotóxicos, mutagênicos e genotóxicos *in vitro* de três concentrações (2, 8 e 32 $\mu\text{g/mL}$) derivadas de cumarina a 6,7-dihidroxicumarina e a 4-methylesculetin, avaliadas nos ensaios cometa e teste de micronúcleos. No teste de Ames, as 5 concentrações testadas foram 62,5, 125, 250, 500 e 750 $\mu\text{g/placa}$, sendo que os grupos de controle positivo usando metil metano-sulfonato (MMS) e negativo usando-se dimetilsulfóxido (DMSO), também foram incluídos na análise para efeito de comparação e os resultados mostraram que 4-methylesculetin induziu maior citotoxicidade em altas concentrações do que 6,7-dihidroxicumarina, sendo que ambos os compostos não foram mutagênicos no teste de Ames e não genotóxicos em linfócitos humanos cultivados.

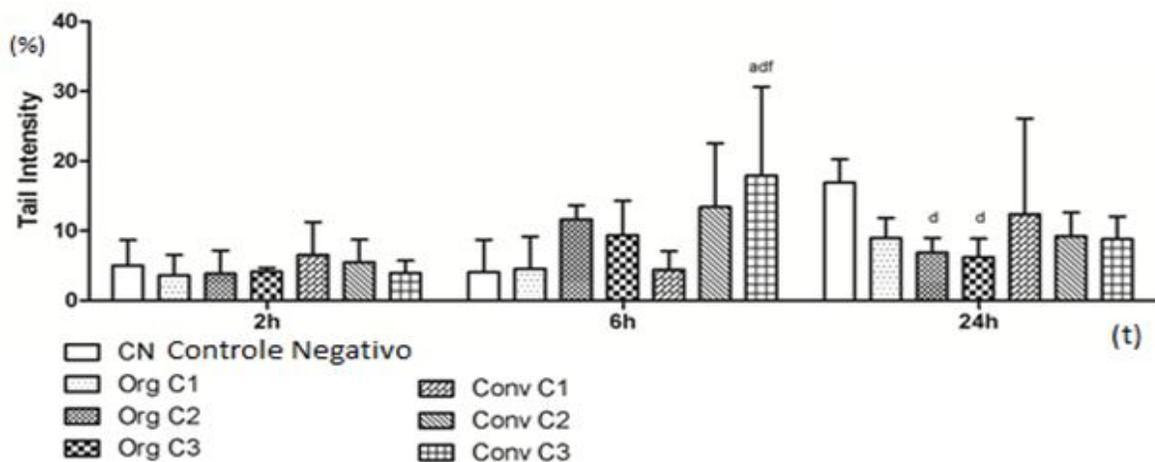
Outro relato que reforça o papel reparador de danos ao DNA pela cumarina é o trabalho de Rezaee et al. (2014) que avaliou os efeitos antígenotóxicos de três cumarinas dietéticas naturais a umbeliferona, herniarina e 7-isopenteniloxi no reparo de dano ao DNA de linfócitos humanos com a ruptura de DNA induzida por H_2O_2 (Peróxido de hidrogênio) medida com base

na porcentagem de DNA na cauda, e os efeitos antigenotóxicos dos compostos testados, sendo os mesmos comparados com o do ácido ascórbico. Além disso, as cumarinas não mostraram qualquer genotoxicidade em nenhuma das concentrações avaliadas. Os tratamentos com umbeliferona, herniarina e 7-isopenteniloxi levou a uma redução significativa na porcentagem de DNA na cauda induzida por peróxido de hidrogênio ($p < 0,001$) em todas as concentrações. Os autores ainda relatam que a estrutura química de 7-isopenteniloxi pode contribuir para a sua melhor propriedade antigenotóxica, em comparação com umbeliferona.

Fedato e Maistro (2014) verificaram o potencial antigenotóxico no DNA induzido por doxorubicina (hidroxildaunorrubicina) de um derivado sintético de cumarina o 4-Methylesculetin. O dano ao DNA foi induzido por doxorubicina no sangue periférico, células do fígado, medula óssea, células cerebrais e testiculares e avaliados em Teste cometa alcalino e indução de micronúcleos em células de medula óssea. Não foram observadas diferenças significativas nos grupos tratados com 4-Methylesculetin, indicando que a cumarina não possui efeitos genotóxicos e citotóxicos. Adicionalmente a cumarina sintética demonstrou efeitos protetores contra o dano do DNA induzido por doxorubicina em todas as doses testadas e em todos os tipos de células analisadas, que variaram de 34,1% a 93,3% no teste de cometas e 54,4% a 65,9% no teste de micronúcleos.

O presente estudo também utilizou o Teste cometa para comparar os níveis de danos ao DNA do grupo exposto ao extrato total liofilizado de *M. glomerata* cultivada de forma convencional e orgânica considerando a mesma concentração de cumarina (0,525 mg) preconizada pela ANVISA. A figura 15 mostra que no grupo exposto por 6 horas ao extrato de *M. glomerata* cultivada de forma convencional houve aumento dos níveis de danos ao DNA quando comparado com 2 horas de exposição ao mesmo extrato ($p < 0,05$). Além disso, observou-se que 24 horas de exposição ao extrato orgânico foi capaz de reduzir dano ao DNA quando comparado com 6 horas de exposição ao mesmo extrato ($p < 0,05$) conforme relatado por Maistro et al. (2015), Rezaee et al. (2014) e Fedato e Maistro (2014).

Figura 15. Percentual (%) de danos ao DNA (Tail Intensity) em função da concentração de cumarina e tempo de exposição (h) do extrato bruto de *M. glomerata* Spreng.



Dados expressos em média \pm desvio padrão.

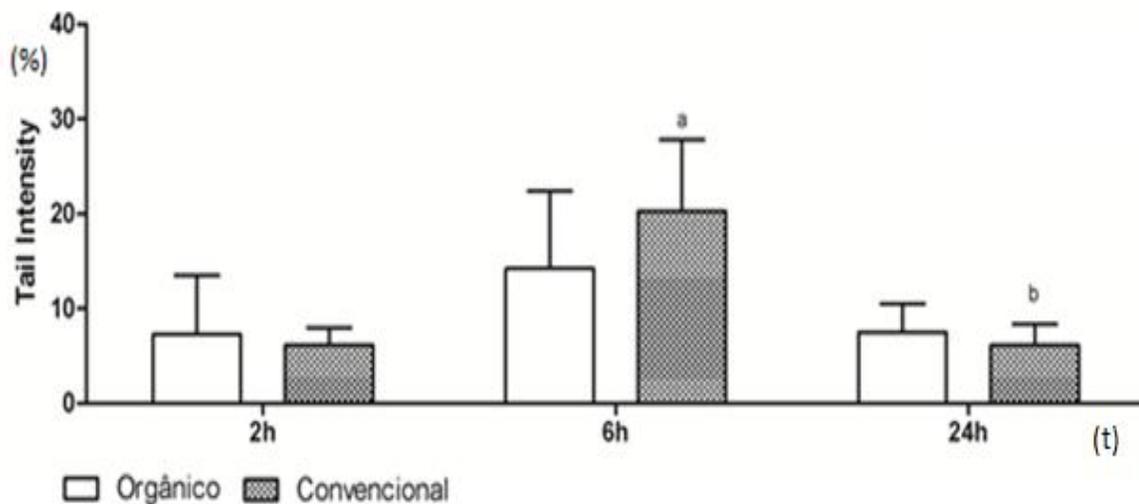
Fonte: Dados obtidos pela pesquisa.

a- $p < 0,05$, quando comparado com a mesma concentração do composto em 2 horas de exposição.

d- $p < 0,05$, quando comparado com o controle negativo no mesmo tempo de exposição;

f- $p < 0,05$, quando comparado com o mesmo extrato na concentração 1 no mesmo tempo de exposição.

Figura 16. Percentual (%) de danos (Tail Intensity) ao DNA em função do peso de extrato bruto e tempo de exposição (h) do de *M. glomerata* Spreng



Dados expressos em média \pm desvio padrão.

Fonte: Dados obtidos pela pesquisa.

a- $p < 0,05$, quando comparado com 2 horas de exposição ao mesmo extrato;

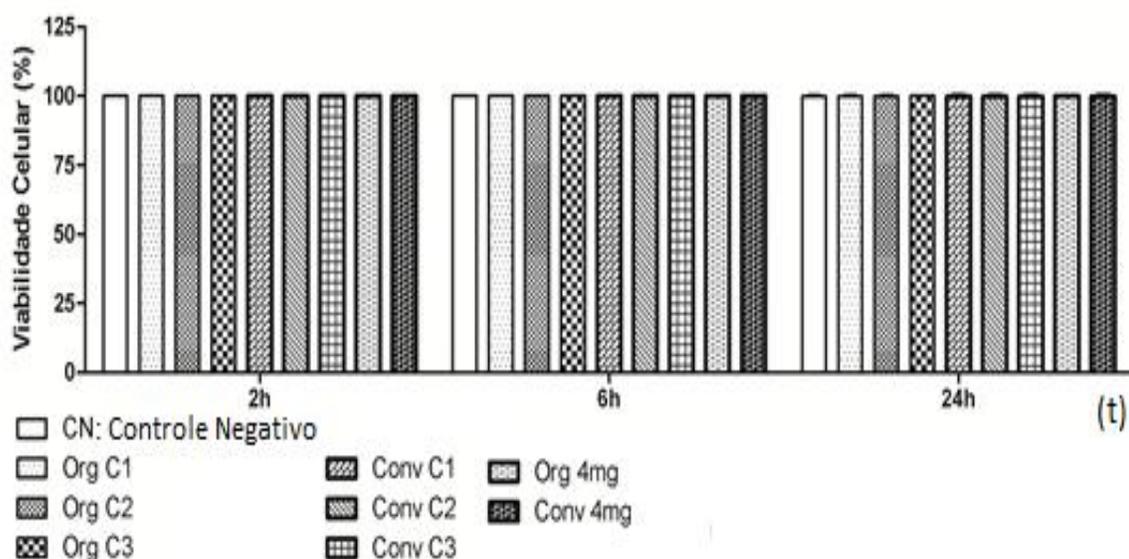
b- $p < 0,05$, quando comparado com 6 horas de exposição ao mesmo extrato;

A figura 17 mostra ainda a viabilidade celular em todos os grupos analisados e, se pode observar que não houve diferença significativa entre os grupos de células sanguíneas expostas às diferentes concentrações e aos diferentes modelos de produção indicando que a metodologia

desenvolvida e aplicada garante a integridade das células sem comprometer os resultados e o papel dos extratos.

Cabe ainda ressaltar que mesmo sendo observado o papel reparador de danos não se descartam os relatos do efeito tóxico da cumarina e este potencial é descrito por Freitas (2006) ao afirmar que o uso excessivo de cumarina possui efeito tóxico sendo desaconselhável o uso para crianças com idade inferior a um ano e mulheres no período gestacional e o uso prolongado pode provocar acidentes hemorrágicos pelo antagonismo à vitamina K.

Figura 17. Percentual (%) de viabilidade celular em função da concentração de cumarina e tempo de exposição (h) do extrato bruto de *M. glomerata* Spreng.



Dados expressos em média \pm desvio padrão.

Fonte: Dados obtidos pela pesquisa.

O uso de agrotóxicos nas últimas décadas aumentou em nível global, o que representa um risco potencial em seres humanos para diversas doenças entre elas o câncer. O esforço científico voltado para a compreensão dos mecanismos toxicológicos envolvidos na associação entre a exposição aos agrotóxicos e o desenvolvimento de câncer, particularmente quanto à plausibilidade biológica desta associação é muito grande (ACQUAVELLA et al., 2003).

As técnicas de pesquisa básica na detecção da genotoxicidade dos agrotóxicos são baseadas no Teste cometa ou no teste de micronúcleos, com o objetivo de avaliar alterações que precedem o desenvolvimento do câncer (GROVER et al., 2003; RAMIREZ; CUENCA, 2001). Concomitantemente a essas técnicas adotaram-se propostas para o controle da exposição aos

agrotóxicos, como medidas voltadas para a prevenção de alguns tumores potencialmente associados à exposição aos agrotóxicos (MCDUFFIE et al., 2002). Entre as medidas de controle, encontra-se a verificação da contaminação de alimentos por substâncias como os agrotóxicos, embora sua associação com o câncer necessite de mais estudos (FATTORE; FANELLI; LA VACCHIA, 2002).

O desenvolvimento de novas técnicas citogenéticas e de biologia molecular nas últimas décadas aumentou a hipótese que associa o processo da carcinogênese à exposição aos agrotóxicos. Tais técnicas possibilitaram o monitoramento dos danos ao DNA (ensaios do cometa e de micronúcleo) e a análise molecular (PCR – Reação em Cadeia da Polimerase) de polimorfismos genéticos envolvidos na metabolização de agentes xenobióticos e reparo do DNA, possibilitando a identificação de diferentes padrões de suscetibilidade frente a exposições aos agrotóxicos (KOIFMAN; HATAGIMA, 2003).

Em estudo para determinar a prevalência de micronúcleos em trabalhadores agrícolas expostos a agrotóxicos, Pacheco e Hackel (2002) observaram uma frequência duas vezes maior de micronúcleo em trabalhadores do município de Passo Fundo - RS com exposição direta aos agrotóxicos do que em populações controle.

Em relação à ingestão de alimentos contaminados com agrotóxicos na dieta humana, supõe-se mesmo contendo baixas doses de resíduos de agrotóxicos causam alteração nuclear frequentemente associada ao desenvolvimento câncer. E a bioacumulação de agrotóxicos persistentes associado ao consumo da carne na cadeia alimentar acarreta riscos, bem como a contaminação de frutas, legumes e verduras no Brasil que também pode acarretar a ingestão de resíduos de agrotóxicos (ARAÚJO; NOGUEIRA; AUGUSTO, 2000; CALDAS; SOUZA, 2000; RICHTER; CHLAMTAC, 2002; ENGEL et al., 2005; SHAKEEL et al., 2010).

6 CONCLUSÃO

De acordo como foi conduzido o estudo conclui-se que gerou a presente tese:

- Os tratamentos convencional e orgânico com os quais *M. glomerata* Spreng. foi conduzida não apresentaram diferença significativa na produção de Matéria seca de folhas colhidas aos 100 dias de cultivo, mas quando comparadas as concentrações de cumarina se observou que o sistema de cultivo orgânico apresentou o dobro da concentração de cumarina sendo significativamente mais produtivo que o sistema convencional;
- As análises em CLAE para determinação e quantificação de cumarina seguiram os parâmetros estabelecidos pela legislação vigentes e comprovam da diferença significativa de concentração deste marcador nos diferentes sistemas de cultivo;
- A cumarina foi isolada por cromatografia em coluna de ambos os cultivos que comprovou o doseamento estava correto para este marcador via CLAE e as análises de espectro de RMN das amostras, orgânica e convencional, confirmam a estrutura química comprovando tratar-se da mesma molécula de cumarina (1,2-benzopirona);
- Quanto à ação genotóxica o grupo de células exposto por 6 horas ao extrato de *M. glomerata* cultivada de forma convencional aumentou os níveis de danos ao DNA quando comparado com 2 horas de exposição ao mesmo extrato. Também observou-se que 24 horas de exposição foi capaz de reduzir dano ao DNA quando comparado com 6 horas de exposição ao mesmo extrato demonstrando a ação reparadora dos danos pela cumarina;
- Não houve diferença significativa entre o grupo de células expostas ao extrato da planta cultivada de forma orgânica nos diferentes tempos de exposição, porém diferiram significativamente do grupo de células expostas ao extrato da planta cultivada de forma convencional quando comparado dentro de 6 horas exposição.
- A cumarina (1,2-benzopirona) não apresentou genotoxicidade nas células sanguíneas, mas evidenciou uma ação reparadora nos danos quando comparado o nível de danos no tempo de exposição de 24h com o tempo de 6 horas de exposição.

REFERÊNCIAS

ABREU, L. S. **Impactos sociais e ambientais na agricultura: uma abordagem histórica de um estudo de caso.** Brasília: EMBRAPA, 1994.

ACQUAVELLA, J. et al. Epidemiologic studies of occupational pesticide exposure and cancer: regulatory risk assessments and biologic plausibility. **Annals of epidemiology**, Netherlands, v. 13, n. 1, p. 1-7, 2003.

ACSELRAD, H. e LEROY, J. P. Novas premissas da sustentabilidade democrática. **Revista Brasileira de Estudos Urbanos e Regionais**, Recife, v.1, 1999.

AGRA, M. F. et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista brasileira de farmacognosia**, São Paulo, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.

AGUINALDO, A. M. et al. Flavonoids from *Mikania cordata*. **Biochemical systematics and ecology**, United Kingdom, v. 31, n. 6, p. 665-668, 2003.

ALEXANDRE, R. F.; BAGANTINI, F.; SIMÕES, C. M. O. Interactions between pharmaceuticals and herbal medicines or *Ginko Ginseng* herbal. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 18, n.2, p. 117-126, 2008.

ALMEIDA, Isabel Duarte de; LEITE; Marco; SILVA, João. Shifting to green economy: hype or hope for entrepreneurs into medicinal and aromatic plants?. **Proceeding of 21st EUROMA– Operations Management in an Innovation Economy**, Estados Unidos, jun. 2014.

ALTMANN, R.; MIOR, L.; ZOLDAN, C. P. **Perspectivas para o sistema agroalimentar e o espaço rural de Santa Catarina em 2015:** percepção de representantes de agroindústrias, cooperativas e organizações sociais. Florianópolis: Epagri, 2008.133p.Disponível em: <http://docweb.epagri.sc.gov.br/website_cepa/publicacoes/sistema_agroalimentar.pdf>. Acesso em: 30 jul. 2017.

ALVES, H. M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de química nova na escola**, v. 3, p. 10-15, 2001.

ALVES, L. F. Laboratório Flora Medicinal: marco no estudo das plantas medicinais brasileiras. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 02, p. 30-40, 2013.

ALVES, M. M. et al. Caracterização química qualitativa de tinturas e extratos secos de plantas medicinais do Cerrado por cromatografia em camada delgada comparativa. **Scientia Plena**, Sergipe, v. 7, n. 12, 2012.

AMOROZO, M. C. M. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do Leverger, MT, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v.16, n.2, p.189-203, 2002.

- ALBERTINI, R. J. et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, Netherlands, v. 463, n. 2, p. 111-172, 2000.
- ALICE, C. B.; et al. **Plantas medicinais de uso popular: atlas farmacognóstico**. Canoas: Ulbra. 1995.
- ALMEIDA, M. Z. DE. **Plantas Mediciniais**. 3. ed. Salvador/BA: EDUFBA, 2011. 221 p.
- ALTIERI, M. **Agroecologia: a dinâmica produtiva da agricultura sustentável**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2004. Disponível em: <http://www.agroeco.org/socla/archivospdf/Agroecologia_-short-port.pdf>. Acesso em: 26 set. 2012
- ALVES, C. F. et al. Anti-inflammatory activity and possible mechanism of extract from *Mikania laevigata* in carrageenan-induced peritonitis. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, United States, v. 61, n. 8, p. 1097-1104, 2009.
- ALVES, L. F. Laboratório Flora Medicinal: marco no estudo das plantas medicinais brasileiras. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 1, n. 02, p. 30-40, 2013.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (BRASIL). **Farmacopéia brasileira**. 5. ed Brasília, DF: Anvisa, 2010. 2 v. Disponível em: <<http://www.bib.unesc.net>>. Acesso em: 10 jul. 2017.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Instrução Normativa Nº 5**, Lista de Registro Simplificado de Fitoterápicos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde, Brasília-DF. 2008.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução - RDC n.10, de 9 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 mar. 2010. Seção 1, p.52-59. Disponível em:<http://www.mp.sp.gov.br/portal/page/portal/cao_consumidor/legislacao/leg_saude/leg_sau_anvs/Resol-Anvisa.pdf>.
- ANVISA -. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução da diretoria colegiada: RDC nº 26**, de 13 de maio de 2014. Ministério da Saúde, Brasília-DF. 2014.
- ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA; UFPR. **Seminário mercado de agrotóxico e regulação**, 2012. ANVISA , Brasília-DF. 2012.
- APG IV (The Angiosperm Phylogeny Group). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, United Kingdom, v. 181, n. 1, p.1–20. maio 2016.
- ARAÚJO, A. C. P.; NOGUEIRA, D. P.; AUGUSTO, L. G. S. Pesticide impact on health: a study of tomato cultivation. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 309-313, 2000.

- ARIZA, S. et al. Efectos farmacológicos sobre el sistema nervioso central inducidos por cumarina, aislada de *Hygrophila tytttha* Leonard. **Vitae**, Medellín, v. 14, n. 2, 2007.
- ASSIS, R. L.; ROMEIRO, A. R. O processo de conversão de sistemas de produção de hortaliças convencionais para orgânicos. **Revista de Administração Pública-RAP**, São Paulo, v. 41, n. 5, 2007.
- BACHA, C. J. C. **Economia e política agrícola no Brasil**. Editora Atlas SA, 2012.
- BALBACH, A. **As plantas curam**. São Paulo: Vida Plena, 1995. 415p.
- BARBOSA, G. S. O desafio do desenvolvimento sustentável. **Revista Visões**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 1, p. 1-11, 2008.
- BARBOSA, L. C. et al. *Micania glomerata* Sprengel (Asteraceae) influences the mutagenicity induced by doxorubicin without altering liver lipid peroxidation or antioxidant levels. **Journal of Toxicology and Environmental Health Part A**, Washington, v. 75, n. 16-17, p. 1102-1109, 2012.
- BELPAEME, K.; COOREMAN, K.; KIRSCH-VOLDERS, M. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Netherlands, v. 415, n. 3, p. 167-184, 1998.
- BERTOLUCCI, S. K. V. et al. Development and validation of an RP-HPLC method for quantification of cinnamic acid derivatives and kaurane-type diterpenes in *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata*. **Planta Médica**, São Paulo, v. 75, n. 3, p. 280-285, 2009.
- Bertolucci, S. K. et al... Seasonal Variation on the Contents of Coumarin and Kaurane-Type Diterpenes in *Mikania laevigata* and *M. glomerata* Leaves under Different Shade Levels. **Chemistry & biodiversity**, United States, v. 10, n. 2, p. 288-295, 2013.
- BEVILACQUA, H. G. C. R. **Planejamento de horta medicinal e comunitária**. São Paulo: Divisão Tec. Esc. Municipal de Jardinagem - Curso de Plantas medicinais, 2010. Disponível em: <<http://www.google.com.br/q=nuplan+plantas+medicinais>>. Acesso em: 30 jul. 2017.
- BIAVATTI, M. W. et al. Coumarin content and physicochemical profile of *Mikania laevigata* extracts. **Zeitschrift für Naturforschung C**, Germany, v. 59, n. 3-4, p. 197-200, 2004.
- BLANCO, M. C. S. G. Biomassa e mucilagem da tanchagem (*Plantago major* L.), em função das adubações orgânica, mineral e mista e da supressão das inflorescências. In: MING, L.C. (Ed.). **Plantas medicinais, aromáticas e condimentares: avanços na pesquisa agrônômica**. Botucatu: UNESP, 1998. v.2, p.139-54.
- BLANK, A. F. et al. Influência da adubação orgânica e mineral no cultivo de manjeriço cv. Genovese. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza – CE, v. 36, n. 2, p. 175-180, 2008.

BOLDRIN, P. K. et al. Estrogenic and mutagenic activities of *Crotalaria pallida* measured by recombinant yeast assay and Ames test. **BMC complementary and alternative medicine**, United Kingdom, v. 13, n. 1, p. 216, 2013.

BOLINA, R. C.; GARCIA, E. F.; DUARTE, M. G. R. Estudo comparativo da composição química das espécies vegetais *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, São Paulo, v. 19, n. 1B, p. 294-298, 2009.

BONILLA, J. A. **Fundamentos da agricultura ecológica sobrevivência e qualidade de vida**. São Paulo: Nobel, 1992.

BONNY, S. Les possibilités d'un modèle de développement durable en agriculture: le cas de la France. **Le Courrier de l'environnement de l'INRA**, França, v. 23, n. 23, p. 5-15, 1994.

BORGES-OSÓRIO, M. R.; ROBINSON, W. M. **Genética Humana**. Artmed. Porto Alegre, 2001.

BOTSARIS, S. L. **As Fórmulas Mágicas das Plantas**. Editora Nova Era. Rio de Janeiro, p 417 – 419. 1997.

BOTSARIS, A. S. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of Flora Medicinal. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, United Kingdom, v. 3, n. 1, p. 13-18, 2007.

BOVI, M. L. A; SPIERING, S. H.; BARBOSA, A. M. M. Densidade radicular de progênies de pupunheira em função de adubação NPK. **Horticultura Brasileira**, Bahia, v. 17, p. 186-193, 1999.

BRANDÃO, M. G. L. et al. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v.16, p. 408-420. 2006.

BRANDÃO, M. G. L. et al.. Other medicinal plants and botanical products from the first edition of the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v.18, p. 127-134. 2008.

BRANDENBURG, A. Movimento agroecológico: trajetória, contradições e perspectivas. **Revista Desenvolvimento e Meio Ambiente**, São Paulo, v. 6, p. 11-28, 2002.

BRASIL. Ministério da saúde RENISUS. **Relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS - Espécies vegetais**. Brasília, fevereiro de 2009. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>> Acessado em: 18 nov 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada RDC 26 de 13 de maio de 2014. **Diário Oficial da União** de 14 de Maio de 2014. Brasília.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N°7. Brasília: **Diário Oficial da União**, Seção 1. p. 11, 19/05/1999.

BRASIL. **Lei 10.831**, de 23 de dezembro de 2003. Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/2003/L10.831.htm>. Acesso em: 30 jul. 2017.

BUENO, P. C. P.; BASTOS, J. K. A validated capillary gas chromatography method for guaco (*Mikania glomerata* S.) quality control and rastreability: from plant biomass to phytomedicines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 19, n. 1B, p. 218-223, 2009.

BURLINSON, B. et al. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Netherlands, v. 627, n. 1, p. 31-35, 2007.

BURNS, G. W.; BOTTINO, P. J. **Genética**, 6. ed. Ed Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1991.

CABRAL, L.M.; et al. Development of a profitable procedure for the extraction of 2-H-1-benzopyran-2-one (coumarin) from *Mikania glomerata*. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, United States, v. 27, p.: 103-106. 2001.

CALDAS, E. D.; SOUZA, L. C. Assessment of the chronic risk for ingestion of pesticide residues in the Brazilian diet. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 34, n. 5, p. 529-537, 2000.

CAMARGO, A.; CAPOBIANCO, J. P. R.; OLIVEIRA, J. A. P. (Org.). **Meio ambiente Brasil: avanços e obstáculos Pós-Rio - 92**. São Paulo: FGV, 2002.

CMMAD – Comissão Mundial sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento. **Nosso futuro comum**. 2 ed. Tradução de Our common future. Rio de Janeiro: Editora da Fundação Getúlio Vargas, 1991.

CAMPANHOLA C.; VALARINI P. J. A agricultura orgânica e seu potencial para o pequeno agricultor. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v.18, n.3, p.69-101, set./dez. 2001.

CANTARELLA, H.; BOVI, M. L. A. Extração e reciclagem de nutrientes em plantas de pupunha. In: **Congresso Brasileiro De Ciência Do Solo**. Viçosa: SBCS, 1995.

CANEPA, C. **Cidades Sustentáveis: o município como lócus da sustentabilidade**. São Paulo: Editora RCS, 2007.

CAPORAL, F. R.; COSTABEBER, J. A.. Agroecologia. Enfoque científico e estratégico. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**. Porto Alegre, v.3, n.2, abr./jun. 2002.

CAPORAL, F. R. (org.). **Agroecologia: uma nova ciência para apoiar a transição a agriculturas mais sustentáveis**. In: COSTABEBER, J. A.; PAULUS, G. Agroecologia: uma ciência do campo da complexidade. Brasília: Paulus, 2009. p. 9-46.

CARAVACA, H. **Plantas que curam**. M&M Editores Ltda – Editora Virtual Books Online (virtualbooks.com.br) 2000. 66 p.

CARLI, R. B. G. **Desenvolvimento de formas farmacêuticas semisólidas contendo ácido caurenóico e avaliação da atividade antiinflamatória in vivo**. 2007. 118f. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas). Universidade do vale do Itajaí, Itajaí – SC, 2007.

CARNEIRO, F. F.; et al. **Dossiê ABRASCO** – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Parte 1 - Agrotóxicos, Segurança Alimentar e Nutricional e Saúde. Rio de Janeiro: ABRASCO, 2012.

CAROLLO, C. A. **Análise fitoquímica e avaliação dos efeitos dos tipos de adubação, da radiação solar e do estresse hídrico, no acúmulo de metabólitos secundários em espécies do gênero 'Mikania'**. 2008, 228f. Tese (Doutorado em Ciências farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, 2008.

CARRERA, R.; GONZÁLEZ, J. Las plantas aromáticas y medicinales: Futuro y potencialidad en Extremadura. La agricultura y la ganadería extremeñas, Universidade de Extremadura, p. 139-152, 2011 Apud REBOCHO, A. M. C. Z. **Produção de plantas medicinais para a indústria farmacêutica**. 2015. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz. Portugal, 2015. Disponível em: <<https://comum.rcaap.pt/bitstream/10400.26/10964/1/Rebocho%2c%20Alexandre%20Manuel%20Cavaca%20Zorreta%20de%20Tavares.pdf>>. Acesso em: 29 jul. 2017.

CARRILLO, N.; VALLE, E. M. El lado oscuro del oxígeno. **Revista de La Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal**, Cordoba, v. 2, n. 2, p. 1-12, mar. 2005.

CARVALHO, A. C. B. et al. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.

CARVALHO, A. C. B. et al. Aspectos da legislação no controle de medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia**, Manaus, v.11, p.26-32, jun. 2007.

CASTRO, E. M. **Alterações anatômicas fisiológicas e fitoquímicas em *Mikania glomerata* Spreng. (guaco) sob diferentes fotoperíodos e níveis de sombreamento**. 2002. 221p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras - MG, 2002.

CASTRO, E. M. et al. Coumarin contents in young *Mikania glomerata* plants (Guaco) under different radiation levels and photoperiod. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 387-92, 2006.

CASTRO, E. V. et al. Crescimento e anatomia foliar de plantas jovens de *Mikania glomerata* Sprengel (guaco) submetidas a diferentes fotoperíodos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras – MG, v. 6, p. 1293-1300, 2003.

- CHAVES, F. C. M. **Produção de biomassa, rendimento e composição de óleo essencial de alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum* L.) em função da adubação orgânica e épocas de corte.** 2002. 153p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Departamento de Fitotecnia. Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.
- CHIANCA, G. K. A parceria entre a Embrapa e as organizações estaduais. **AgroANALYSIS**, v. 24, n. 5, p. 51-52, 2004.
- CMMAD – Comissão Mundial sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento. **Nosso futuro comum.** 2. ed. Tradução de Our common future. 1a ed. 1988. Rio de Janeiro: Editora da Fundação Getúlio Vargas, 1991.
- COHEN, A. J. Critical review of the toxicology of coumarin with special reference to interspecies differences in metabolism and hepatotoxic response and their significance to man. **Food and cosmetics toxicology**, Oxford – Inglaterra, v. 17, n. 3, p. 277-289, 1979.
- CONTINI S. H. T. et al. Differences in secondary metabolites from leaf extracts of *Mikania glomerata* Sprengel obtained by micropropagation and cuttings. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 16, p. 596-598, 2006.
- CÔRREA, A. D.; BATISTA, R. S.; QUINTAS, L. E. M.; **Plantas Medicinais do Cultivo à terapêutica.** 5. ed. Petrópolis, RJ: Vozes, 2001.
- CORREA JÚNIOR, C.; MING, L. C.; SCHEFFER, M. C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas.** 2.ed. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 162 p.
- CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Rio de Janeiro: Ministério de Agricultura, 1984.
- CORREA, R. M. et al. Adubação orgânica na produção de biomassa de plantas, teor e qualidade de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) em cultivo protegido. **Revista Brasileira de plantas Médicas**, Botucatu, v. 12, n. 1, p. 80-89, Mar. 2010
- CORTEZ, L. E. R. et al. Levantamento de plantas medicinais usadas na medicina popular de Umarama, PR. **Arquivos de Ciências da Saúde UNIPAR**, Paraná, v. 3, p. 97-104. 1999.
- COSTA, L. C. B.; et al. Tipos e doses de adubação orgânica no crescimento, no rendimento e na composição química do óleo essencial de elixir paregórico. **Ciência Rural**, Acre, v.38, p. 2173-2180. 2008.
- CRUZ, G. F. **Desenvolvimento de sistema de cultivo para hortelã-rasteira (*Mentha x villosa* Huds.).** 1999, 35f. Dissertação (Mestrado - Área de Concentração em Fitotecnia) - Departamento de Produção Vegetal-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE. 1999.
- CZELUSNIAK, K. E. et al. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Spreng. e *Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, São Paulo, v. 14, p.400-409, 2012.

DALLA-NORA, G. et al. Antiproliferative and genotoxic effects of *Mikania glomerata* (Asteraceae). **Biocell**, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 95-101, 2010.

DAROLT, M. R. **Agricultura Orgânica**: inventando o futuro. Londrina: IAPAR, 2002.

DE FIGUEREDO, C. A.; GURGE, I. G. D.; JUNIOR, G. D. G. A Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios. **Physis-Revista de Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 2, p. 381-400, 2014.

DELGADO G. C. Modelo de desenvolvimento agrícola brasileiro. **Revista de Economia Rural**, Brasília, v. 17, n. 1, p. 107-121, 1979.

DIEHL, R. **Agricultura geral**. Lisboa. Ed. Clássica, 1984. 127p.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais**: arte e ciência um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: UNESP, 1996. 230p.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. Rev. e Ampl, São Paulo: Ed. UNESP, 2002. 604p.

DOS SANTOS, A. M.; MARÇAL, N. A.; PINTO, E. N. F. A produção orgânica garantindo a promoção da saúde dos trabalhadores do campo. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental**, v. 8, n. 1, p. 01-05, 2015.

EMBRAPA-CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE SOLOS (BRASIL). Serviço de Produção de Informação. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2. ed. Brasília, DF: EMBRAPA, 2006. 306 p.

ENGEL, L. S. et al. Pesticide use and breast cancer risk among farmers' wives in the agricultural health study. **American Journal of Epidemiology**, United Kingdom, v. 161, n. 2, p. 121-135, 2005.

ERGIL, K. V.; KRAMER, E. J.; NG, A. T. Chinese herbal medicines. **Western Journal of Medicine**, United Kingdom, v. 176, n. 4, p. 275, 2002.

FAIRBAIRN, D.W.; OLIVE, P.L.; O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research**, Netherlands, v. 339, p. 37-59, 1995.

FALCK, G. C. M. et al. Micronuclei in blood lymphocytes and genetic polymorphism for GSTM1, GSTT1 and NAT2 in pesticide-exposed greenhouse workers. **Mutation Research - Genetic toxicology and environmental Mutagenesis**, Netherlands, v. 441, n. 2, p. 225-237, 1999.

FARIAS, A. T; et al. Análise da composição química do óleo volátil de cinco espécies do gênero *Mikania*. In: Simpósio De Plantas Mediciniais do Brasil, XV.1998. Águas de Lindóia/SP. **Anais...** São Paulo: UNIFESP, 1998, p. 03.195.

FATTORE, E.; FANELLI, R.; LA VECCHIA, C. Persistent organic pollutants in food: public health implications. **Journal of Epidemiology & Community Health**, United Kingdom, v. 56, n. 11, p. 831-832, 2002.

FAVERO, S. et al. **Teor de cumarina em folhas de plantas jovens de guaco em relação a diferentes doses de adubação orgânica em cultivo protegido**. Disponível em: <http://www.abhorticultura.com.br/biblioteca/arquivos/Download/Biblioteca/44_015.pdf>. Acesso em: 8 ago. 2014.

FEDATO, R. P.; MAISTRO, E. L. Absence of genotoxic effects of the coumarin derivative 4-methylesculetin in vivo and its potential chemoprevention against doxorubicin-induced DNA damage. **Journal of Applied Toxicology**, United States, v. 34, n. 1, p. 33-39, 2014.

FERREIRA, M. M. **Crescimento, alocação de biomassa e abordagem fitoquímica de plantas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don em função da adubação orgânica e época de colheita**. 2003. 63 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

FINN, G. J. et al. In vitro cytotoxic potential and mechanism of action of selected coumarins, using human renal cell lines. **Cancer letters**, Netherlands, v. 183, n. 1, p. 61-68, 2002.

FLORES, Mônica; YAMAGUCHI, Mirian Ueda. Teste do micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica. **Saúde e Pesquisa**, Paraná, v. 1, n. 3, p. 337-340, 2009.

FORINI, K. N. et al. Canteiro de ervas medicinais em espiral como metodologia de incentivo à permacultura e sustentabilidade da atividade rural agroecológica. In: Congresso Paranaense de Agroecologia, I. 2014 – Pinhais/PR. **Cadernos de Agroecologia**. 2014, v. 9, n. 1.

FRANCHI, S. M.; et al. New isolated constituents from *Mikania glomerata* Spreng. In: 5th International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2005, Ribeirão Preto. **RBCF. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas (Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences)**, São Paulo, v. 41, p. 339, 2005.

FRANCO, I. J. P.; FONTANA, V. L. **Ervas & plantas: a medicina dos simples**. 10. ed. Rev. Erechim, RS: Vida, 2005. 207p.

FRANCO, L. L. **As sensacionais plantas medicinais, campeãs de poder curativo**. Curitiba: Santa Mônica, 1996, 241p.

FREDERICO, S. **O Novo Tempo do Cerrado: Expansão dos Fronts Agrícolas e Controle do Sistema de Armazenamento de Grãos**. 2009. 273 f. Tese (Doutorado em Geografia Humana). Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.

FREITAS, J. C. de. **Agricultura Sustentável: Uma análise comparativa dos fatores de produção entre Agricultura Orgânica e Agricultura Convencional**. 2002. Dissertação (Mestrado em Economia) - Departamento de Economia. Universidade de Brasília, Brasília.

FREITAS, P. T. **Avaliação dos efeitos da Mikania glomerata sprengel e da mikania laevigata schultz no processo inflamatório induzido pela exposição aguda ao carvão mineral.** Tese (Doutorado em Ciências Ambientais). 2006.48f. Universidade do Extremo Sul Catarinense; Santa Catarina, 2006.

FREITAS, R. E.; MENDONÇA, M. A. A.; LOPES, G. O. **Expansão de área agrícola: perfil e desigualdade entre as mesorregiões brasileiras.** Texto para Discussão, Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA), 2014.

FREITAS, T. P. et al. Genotoxic evaluation of Mikania laevigata extract on DNA damage caused by acute coal dust exposure. **Journal of medicinal food**, Larchmont, v. 12, n. 3, p. 654-660, 2009.

FUCK, M. P.; BONACELLI, M. B. M. A necessidade de reorganização e de fortalecimento institucional do SNPA no Brasil. **Revista de Política Agrícola**, Acre, v. 16, n. 1, p. 88-101, 2007.

FURTINI NETO, A. E.; TOKURA, A. M. **Fertilidade e adubação de plantas medicinais.** Lavras: UFLA, 2000. 85 p.

GANDEO et al. Avaliação da atividade antinociceptiva e antiedematogênica do extrato bruto de *Mikania glomerata* Sprengel (EBMG). In: Jornada Catarinense de plantas medicinais: da raiz a semente, ser humano ambiente, 4., Itajaí, SC. **Caderno de Resumos...** Itajaí: Univali, 2003. p. 141.

GARBUIO, C.; et al. Propagação por estaquia em patchouli com diferentes números de folhas e tipos de estacas. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 8, n. 4, p. 435-438, 2007.

GALVANI, F. R.; BARRENECHE, M. L.. Levantamento das espécies vegetais utilizadas em medicina popular no município de Uruguaiana (RS). **Revista da FZVA**, Rio Grande do Sul, v. 1, n. 1, p. 1-14. 1994.

GASPARETTO, J. C. et al. *Mikania glomerata* Spreng. e *M. laevigata* Sch. Bip. ex Baker, Asteraceae: agronomic, genetic, anatomical, chemical, pharmacological, toxicological studies and its use in herbal therapy programs in Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Bahia, v. 20, n. 4, p. 627-640, 2010.

GEOGRAFOS. Criciúma, SC. **Coordenadas geográficas.** Disponível em: <<http://www.geografos.com.br/cidades-santa-catarina/criciuma.php>>. Acesso em: 25 fev. 2015.

GILBERT, B.; FERREIRA, J. L. P.; ALVES, L. F. **Monografias de plantas medicinais brasileiras e aclimatadas.** Curitiba: ABIFITO, 2005. 250 p.

GLIESSMAN, S. R. **Agroecologia: processos ecológicos em agricultura sustentável.** 2. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2001.

GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. **In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K.** (Org.). *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Ulbra. p. 173-200, 2003.

GONÇALVES, J. S. **Mudar para manter:** pseudomorfose da agricultura brasileira. Secretaria de Agricultura e Abastecimento-Conselho Superior de Pesquisa Agropecuária, 1999.

GROVER, P. et al. Evaluation of genetic damage in workers employed in pesticide production utilizing the Comet assay. **Mutagenesis**, Rio Grande do Sul, v. 18, n. 2, p. 201-205, 2003.

HAYASHI, M. et al. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, United States, v. 35, n. 3, p. 234-252, 2000.

HAYASHI, M. et al. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. **Mutation Research - Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, Netherlands, v. 312, n. 3, p. 293-304, 1994.

HARTMANN, A. et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, Rio Grande do Sul, v. 18, p. 45-51, 2003.

HARTMANN, H. T., KESTER, D. E. **Propagacion de plantas:** principios y praticas. México: Compañia editorial Continental, 1990. 760 p.

HESPANHOL, R. A. et al. Perspectivas da agricultura sustentável no Brasil. Perspectives de l'agriculture durable au Brésil. **Confins. Revue franco-brésilienne de géographie - Revista franco-brasileira de geografia**, França, n. 2, 2008.

HOULT, J. R. S.; PAYÁ, M. Pharmacological and Biochemical Actions of Simple Coumarins: Natural Products with Therapeutic Potential. **General Pharmacology**, Oxford, v. 27, n. 4, p. 713-722. 1996.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICAS. **Censo Agropecuário 2006**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/>> Acesso em: 21 de jul de 2015.

JESUS, C. R. et al. In vitro study of mutagenic potential of *Bidens pilosa* Linné and *Mikania glomerata* Sprengel using the comet and micronucleus assays. **Journal of ethnopharmacology**, Limerick – US, v. 118, n. 1, p. 86-93, 2008.

KÄHKÖNEN, Marja P. et al. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of agricultural and food chemistry**, United States, v. 47, n. 10, p. 3954-3962, 1999.

- KAISER, C. R.; SANTOS, A. R.; ABREU, A. S. Determinação de Cumarina em Extratos de Guaco Comercial: Um Estudo de Caso sobre o Controle de Qualidade de Fitoterápicos. **Revista Fitos**, Paraná, v. 3, n. 01, p. 60-66, 2013.
- KAMMANN, U.; BUNKE, M.; STEINHART, H. A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 498, p. 61-77, 2001.
- KIEHL, E. J. **Fertilizantes orgânicos**. São Paulo: Ceres. 1985. 492p.
- KOIFMAN, S.; HATAGIMA, A. Exposição aos agrotóxicos e câncer ambiental. In. **É veneno ou é remédio**, 2003, p. 75-99.
- LAGO, A. et al. Agricultura familiar de produtos orgânicos: um olhar sob a ótica do marketing. **Revista de Extensão Rural**, Santa Maria – Rio Grande do Sul, v. 13, p. 96-119, 2006.
- LIMA, N. P. et al. Produção de mudas por estaquia de duas espécies de guaco. **Horticultura brasileira**, Amazonas, v. 21, n. 1, p. 106-109, 2003.
- LIMA, S. M. **Inovação, concorrência e crescimento empresarial: teoria e política aplicadas à indústria de fitoterápicos no Brasil**. 2011. 96f. Dissertação (Mestrado em Economia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011. Disponível em: <<http://tede.biblioteca.ufpb.br/bitstream/tede/4972/1/arquivototal.pdf>>. Acesso em: 30 jul. 2017.
- LOPES, K. M. T.; NASCIMENTO, P. R. Cultura Popular e Ciência no Registro de Fitoterápicos. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, São Paulo, v. 10, n. 2, 2017.
- LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011. 190 p.
- LOPRINZI, Charles L. et al. Lack of effect of coumarin in women with lymphedema after treatment for breast cancer. **New England Journal of Medicine**, United States, v. 340, n. 5, p. 346-350, 1999.
- LORENZI, Harry; MATOS, F. J. Abreu. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, 2. ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2008. p 544.
- LUCAS; V. Estudo farmacognóstico do guaco *Mikania glomerata* Sprengel. **Revista da Flora Medicinal**, Minas Gerais, v. 9, p. 101-132. 1942.
- LUCCA, R. A cura ameaçada. **Os Caminhos Da Terra**. São Paulo, Jun. 2004, p. 60-71.
- MALLICK, N.; MOHN, F. H. Reactive oxygen species: response of algae cells. **Journal of Plant Physiology**, Netherlands, v. 157, p.183-193, 2000.
- MAIA, J. T. L. S. et al. Influência do cultivo em consórcio na produção de fitomassa e óleo essencial de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) e hortelã (*Mentha x villosa* Huds.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Amazonas, v.11, n.2, p.137-140, 2009.

MAIA, N. B. et al. Crescimento e qualidade do óleo essencial de alfavaca-cravo em hidroponia. **Horticultura Brasileira**, Amazonas, v. 19, p. 1-4, julho 2001.

MAIA, S. S. et al. Influência da adubação orgânica e mineral no cultivo do bamburral (*Hyptis suaveolens* (L.) Poit.)(Lamiaceae). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Pernambuco, v. 3, n. 4, p. 327-331, 2008.

MAIORANO, V. A. et al. Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. **Journal of Ethnopharmacology**, Netherlands, v. 102, n. 3, p. 364-370, 2005.

MAISTRO, E. L. et al. In vitro assessment of mutagenic and genotoxic effects of coumarin derivatives 6, 7-dihydroxycoumarin and 4-methylesculetin. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, United Kingdom, v. 78, n. 2, p. 109-118, 2015.

MAPELL, N. C. et al. Produção de biomassa e de óleo essencial dos capítulos florais da camomila em função de nitrogênio e fósforo. **Horticultura Brasileira**, Amazonas, v. 23, p. 32-37. 2005.

MARCHESE, J. A. et al. Perfil dos consumidores de plantas medicinais e condimentares do município de Pato Branco (PR). **Horticultura brasileira**, Amazonas, v.22, n. 2, p. 332-335, 2004.

MARTINS, E. R. et al. **Plantas medicinais**. Viçosa, MG: UFV, Impr. Uni., 2000. 220p.

MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais: Guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil**. Fortaleza: Imprensa Universitária - UFC. 2000.

MATOS, F.J.A. **Farmácias vivas**. 3. ed. rev. atual. Fortaleza: EUFC. 1998.

MAVOURNIN, Kathleen H. et al. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, Netherlands, v. 239, n. 1, p. 29-80, 1990.

MAZZOLENI, E. M.; NOGUEIRA, J. M. Agricultura orgânica: características básicas do seu produtor. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, Acre, v. 44, n. 2, p. 263-293, 2006.

MAZZORANA, D. M. et al. Influence of *Mikania laevigata* Extract over the Genotoxicity Induced by Alkylating Agents. **ISRN toxicology**, United States, v. 2013, 2013.

MCDUFFIE, H. H. et al. Non-Hodgkin's lymphoma and specific pesticide exposures in men. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, United states, v. 10, n. 11, p. 1155-1163, 2001.

MCDUFFIE, H. H. et al. Canadian male farm residents, pesticide safety handling practices, exposure to animals and non-Hodgkin's lymphoma (NHL). **American journal of industrial medicine**, United States, v. 42, n. S2, p. 54-61, 2002.

MING, L. C. (Coord.). Mata Atlântica, p. 61-78. In: Vieira, R.F.; et al. (eds.) **Estratégias para conservação e manejo de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas**; resultados da 1ª Reunião Técnica. Brasília, DF (Brazil). 2002. 184 p

MING, L. C. Influência da adubação orgânica na produção de biomassa e teor de óleos essenciais de *Lippia alba*. **Horticultura Brasileira**, Amazonas, v.12, n.1, p.49-52, 1994.

MING, L. C. Adubação orgânica no cultivo de *Lippia Alba* (Mill.) N.E.Br. - Verbenaceae. In: MING, L.C. et al. **Plantas medicinais, aromáticas e condimentares: avanços na pesquisa agrônoma**. Botuatu: UNESP, 1998. p. 165-92.

MING, L. C.; FERREIRA, M. I.; GONCALVES, G. G. Agronomic research of Atlantic Forest medicinal plants regulated by ANVISA. **Revista Brasileira de Plantas Médicas**, São Paulo, v. 14, n. spe, p. 131-137, 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Fitoterapia no SUS e o programa de pesquisas de plantas medicinais da central de medicamentos**. Secretaria da Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Brasília-DF. 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria GM N°. 3.237**, de 24 de dezembro de 2007. Aprova as normas de execução e de financiamento da assistência farmacêutica na atenção básica em saúde. Brasília-DF. 2007.

MOLDES, C. A. **Resposta de enzimas antioxidantes à aplicação do herbicida glifosato em variedades de soja transgênica e não transgênica**. 2006. 92 f. Tese (Doutorado em Ecologia Aplicada) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba. 2006.

MOLLER, P. The alkaline comet assay: Towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. **Basic and clinical pharmacology and toxicology**, Copenhagen, v. 98, p. 336-345, 2006.

MORAIS, L. A. S.; Influência da adubação sobre a produção de biomassa e no teor de óleo essencial do elixir paregórico. **Horticultura Brasileira**, Amazonas, v. 20, n.2, Supl 2. julho, 2002.

MOURA, R. S. et al. Bronchodilator activity of *Mikania glomerata* Sprengel on human bronchi and guinea-pig trachea. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, United States, v. 54, n. 2, p. 249-256, 2002.

MOURÃO, V. B. et al. Anti-hemorrhagic effect of hydro-alcoholic extract of the leaves of *Mikania glomerata* in lesions induced by *Bothrops jararaca* venom in rats. **Acta cirúrgica brasileira**, São Paulo, v. 29, p. 30-37, 2014.

MUELLAS-SERRANO, S. et al. A. *In vitro* screening of American plant extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. **Journal of ethnopharmacology**, Limerick, v. 71, n. 1-2, p. 101-107, jul. 2000.

MUCENEEKI, R. S. et al. A simple and validated LC method for the simultaneous determination of three compounds in Mikania laevigata extracts. **Chromatographia**, Wiesbaden, v. 69, n. 2, p. 219-223, 2009.

NASCIMENTO, C. M. E.; FAVERO, S. **Acumulação de biomassa e óleo essencial de manjerição sob diferentes doses de matéria orgânica em cultivo protegido**. 2003. Disponível em <<http://www.abhorticultura.com.br/biblioteca/arquivos/Download/Biblioteca/pmna5007c.pdf>. 2003>. Acesso em: 13 mar. 2017

NASCIMENTO, J. T. et al. Rendimento de palmito de pupunheira em função da aplicação de esterco bovino e adubação química. **Horticultura Brasileira**, Amazonas, v.23, n.1, p.19-21, 2005.

NEUTZLING, D. M. et al. Consumidor de Alimentos Orgânicos: um Estudo na Feira dos Agricultores Ecologistas (FAE) de Porto Alegre. In: **Congresso SOBER 48**, Campo Grande, MS. 2010.

NEVES, L. J.; SÁ, M. F. A. Contribuição ao estudo das plantas medicinais Mikania glomerata Spreng. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 72, p. 42-47, 1991.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of natural products**, United States, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

NUNES-DESER, S. P. Instrumentos de política agrícola para a agricultura e a agricultura familiar no Brasil. **Conjuntura agrícola**. Vitória, n.159, p. 1-29, jun. 2007

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. São Paulo: Atheneu Ed., 1998. 412 p.

OLIVEIRA FILHO, et al. Morfodiagnose do guaco - Mikania glomerata Sprengel-Compositae. **RBCF: Revista brasileira de ciências farmacêuticas**, São Paulo, v. 7, p. 17-26, 1985.

_____. Morfodiagnose do axófito do guaco: Mikania glomerata Sprengel. **RBCF: Revista brasileira de ciências farmacêuticas**, São Paulo, v. 8, p. 11-24, 1987.

_____. Isolamento e identificação de componentes químicos de Mikania glomerata Sprengel e de Mikania laevigata Schultz Bip. Ex Baker. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 169-183, 1984.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista brasileira de farmacognosia**. São Paulo, SP. Vol. 20, n. 4 (Ago./Set. 2010), p. 641-650, 2010.

OLIVEIRA, F.; SAITO, M. L.; GARCIA, L. O. Caracterização cromatográfica em camada delgada do extrato fluido de guaco - Mikania glomerata sprengel. **Lecta-USF**, São Paulo, v. 11, n. 1, p. 43-55, 1993.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **BPAR - Directrices de la OMS sobre Buenas Prácticas Agrícolas y de Recolección (BPAR) de plantas medicinales**, Ginebra, 2003. 87 p. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s5527s/s5527s.pdf>>. Acesso em: 30 jul. 2017.

OSÓRIO, A. C.; MARTINS, J. L. S. Determination of coumarin in fluid extract and tincture of "guaco" by first derivative spectrophotometry. **RBCF: Revista brasileira de ciências farmacêuticas**, São Paulo, v. 40, n. 4, p. 481-486, 2004.

OSTLING, O.; JOHANSON, Karl J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and biophysical research communications**, United States, v. 123, n. 1, p. 291-298, 1984.

O'KENNEDY, R.; THORNES, R. D. Coumarins: Biology, applications and mode of action. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 64, n. 3, p. 223-224, 1998.

PACHECO, A. O.; HACKEL, C. Chromosome instability induced by agrochemicals among farm workers in Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 6, p. 1675-1683, 2002.

PARENTONI, S. N.; FRANCA, G. E.; BAHIA FILHO, A. F. C. Avaliação dos conceitos de quantidade e intensidade de mineralização de nitrogênio para trinta solos do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 12, n. 3, p. 225-229, 1988.

PASCHOAL, A. O ônus do modelo agrícola industrial. **Revista Brasileira de Tecnologia**, Brasília, v. 14, n. 1, p. 17-27, jan./ fev.1983.

PASSARI, L. M. Z. G; SCARMINIO, I. S; BRUNS, R. E. Experimental design characterizing seasonal variations and solvent effects on the quantities of coumarin and related metabolites from *Mikania laevigata*. Elsevier. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 821, p.89-96, 2014.

PAUL, R. K.; JABBAR, A.; RASHID, M. A. Antiulcer activity of *Mikania cordata*. **Fitoterapia**, Milano, v. 71, n. 6, p. 701-703, 2000.

PAVÃO, P. R. G. et al. Ausência de efeito genotóxico induzido por esteróides anabolizantes em indivíduos fisiculturistas. **Revista brasileira de educação física e esporte**, São Paulo, jan./mar. v. 21, n. 1, p. 5-10, 2007.

PEDROSO, A. P. D. et al. Isolation of syringaldehyde from *Mikania laevigata* medicinal extract and its influence on the fatty acid profile of mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 18, n. 1, p. 63-69, 2008.

PEREIRA, A. M. S. et al. Influence of fertilizer on coumarin content and biomass production in *Mikania glomerata* Sprengel. **Journal of herbs, spices & medicinal plants**, United States, v. 6, n. 1, p. 29-48, 1998.

PEREIRA, A. M. S. **Propagação e co-cultivo de células como fatores predisponentes à produção de cumarina em *Miknia glomerata* Sprengel (guaco)**. 1997. 82p. Tese (doutorado em Agricultura) – Universidade Estadual de São Paulo. Botucatu.1997.

PEREIRA, R. C.; OLIVEIRA, M. T. R.; LEMOS, G. C. S. Plantas utilizadas como medicinais no município de Campos de Goytacazes-RJ. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 14, n. Supl 1, p. 37-40, 2004.

PEREIRA, A. M. S. et al. Efeito da adubação na produção de biomassa de *Mikanea glomerata* (guaco). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14, Florianópolis, 1996. p.33. **Anais...** Florianópolis: UFSC, 1996.

PEREZ-AMADOR, M. C. et al. Estudios fitoquímicos e farmacológicos de *Mikania micrantha* HBK (Asteraceae). **Phyton**, Buenos Aires, v. 79, n. 1, p. 77-80, 2010.

PÉREZ, I.; NERY, M. **Metabolismo secundário**. 2014. Disponível em: <<http://caelum.ucv.ve/bitstream/123456789/7966/1/6.%20METABOLISMO%20SECUNDARIO%20%202013-2014.pdf>>. Acesso em: 23 jul. 2017.

PIGNATI, W. A; MACHADO, J. M. H. O agronegócio e seus impactos na saúde dos trabalhadores e da população do estado de Mato Grosso. In: MINAYO, C. G.; MACHADO, J. M. H.; PENA, P. G. L. (orgs.). **Saúde do trabalhador na sociedade brasileira contemporânea**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2011.

PINHO, R. A. et al. Lung oxidative response after acute coal dust exposure. **Environmental research**, New York, v. 96, n. 3, p. 290-297, 2004.

POTTKER, D.; TEDESCO, M. J. Efeito do tipo e tempo de incubação sobre a mineralização da matéria orgânica e nitrogênio total em solos do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 3, p. 20-24, 1979.

RAMÍREZ, V.; CUENCA, P. Micronuclei frequency in lymphocytes of individuals occupationally exposed to pesticides. **Revista de biología tropical**, Costa Rica, v. 49, n. 1, p. 1-8, 2001.

REBELO, A. M.; et al. Conteúdo de cumarina, ácido o-cumárico e compostos fenólicos totais em *Mikania glomerata* Sprengel cultivada com adubação orgânica. Sociedade Brasileira de Química (SBQ) in: **33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. 2009. Disponível em: <<http://sec.s bq.org.br/cdrom/33ra/resumos/T0404-1.pdf>>. Acesso em: 10 mar 2017.

REBOCHO, A. M. C. Z. **Produção de plantas medicinais para a indústria farmacêutica**. 2015. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz. Portugal, 2015. Disponível em: <<https://comum.rcaap.pt/bitstream/10400.26/10964/1/Rebocho%2c%20Alexandre%20Manuel%20Cavaca%20Zorreta%20de%20Tavares.pdf>>. Acesso em: 29 jul. 2017.

REINHARDT-POULIN, P. et al. The use of silver-stained “comets” to visualize DNA damage and repair in normal and Xeroderma pigmentosum fibroblasts after exposure to simulated solar radiation. **Photochemistry and photobiology**, Oxford, v. 71, n. 4, p. 422-425, 2000.

REZAEI, R. et al. Antigenotoxic activities of the natural dietary coumarins umbelliferone, herniarin and 7-isopentenylxy coumarin on human lymphocytes exposed to oxidative stress. **Drug and chemical toxicology**, New York, v. 37, n. 2, p. 144-148, 2014.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**, v.27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RICHTER, E. D.; CHLAMTAC, N. Ames, pesticides, and cancer revisited. **International journal of occupational and environmental health**, Lodz, v. 8, n. 1, p. 63, 2002.

RÍOS, E. et al. Sesquiterpene lactones from *Mikania micrantha* and *Mikaniacordifolia* and their cytotoxic and anti-inflammatory evaluation. **Fitoterapia**, Milano, v. 94, p. 155-163, 2014.

RITTER, M. R., MIOTTO, S. T. S. Taxonomia de *Mikania* Willd. (Asteraceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Hoehnea**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 309-359, 2005.

ROBBENRS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacobiotechnologia**. São Paulo: Premier, 1997. 372 p.

RODRIGUES, A. G.; DE SIMONI, C. Plantas medicinais no contexto de políticas públicas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 31, n. 255, p. 7-12, mar./abr. 2010.

ROEL, A. R. A agricultura orgânica ou ecológica e a sustentabilidade da agricultura. **Revista Internacional de Desenvolvimento Local**, Barcelona, v. 3, n. 4, p. 57-62, mar. 2002.

ROHINI, K.; SRIKUMAR, P. S. Therapeutic role of coumarins and coumarin-related compounds. **Journal of Thermodynamics & Catalysis**, United States, v. 5, n. 2, p. 1, 2014.

ROSAL, L. F. et al. Produção vegetal e de óleo essencial de boldo pequeno em função de fontes de adubos orgânicos. **Revista Ceres**, Viçosa - MG, v. 58, n. 5, p. 670-678, out. 2011.

ROSAL, L. F.; PINTO, J. E. B. P.; BRANT, R. S. Produção de biomassa e óleo essencial de *Plectranthus neochilus* Schlechter cultivado no campo sob níveis crescentes de adubo orgânico. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, Guarapuava – PR, v. 2, p. 39-44. 2009.

RUPPELT, B. M. et al. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom: I. Analgesic and anti-inflammatory activities. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 86, p. 203-205, 1991.

SACHS, I. **Estratégias de Transição para do século XXI** – Desenvolvimento e Meio Ambiente. São Paulo: Studio Nobel – Fundação para o desenvolvimento administrativo, 1993.

SANTOS, A. B.; NASCIMENTO, F. S. Transformações ocorridas ao longo da evolução da atividade agrícola: algumas considerações. **Centro Científico Conhecer - Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, vol.5, n.8, 2009.

SANTOS, J. C. et al. Produtividade do guaco sob dois sistemas de cultivo. **Horticultura brasileira**, Brasília, v. 30. n. 2. 2012.

SANTOS, E. A. M.; PÊGO, K. P.; MARTINS, E. R. Efeitos da dose de adubo orgânico e de cobertura morta sobre o crescimento e produção de calêndula (*Calendula officinalis* L.) em Montes Claros - MG. **Seminário Mineiro De Plantas Mediciniais**, Minas Gerais, v. 7, p. 7. 2001.

SANTOS, S. C. **Caracterização cromatográfica de extratos medicinais de guaco: Mikania laevigata** Schulyz Bip. ex Baker e *M. glomerata* Sprengel e ação de *M. laevigata* na inflamação alérgica pulmonar. 2005. 93p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí. 2005.

SANTOS, T. C. et al. Estudo da atividade antimicrobiana de *Mikania glomerata* Sprengel. In: Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 14. 1996. Florianópolis, SC. **Resumos...** Florianópolis: UFSC/CEME/FINEP/CNPQ, 1996. p 177

SCALON, S. P. Q.; RAMOS, M. B. M.; VIEIRA, M. C. Auxinas e boro no comprimento da maior raiz e número de estacas enraizadas de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel), alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e carqueja (*Baccharis trimera* Less APDC) em duas épocas de plantio. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, São Paulo, v. 5, n. 2, p. 71-76, 2003.

SCARPATO, R. et al. Cytogenetic monitoring of occupational exposure to pesticides: characterization of GSTM1, GSTT1, and NAT2 genotypes. **Environmental and molecular mutagenesis**, New York, v. 27, n. 4, p. 263-269, 1996.

SCHUMACHER, E. F. O negócio é ser pequeno. **Revista de Administração de Empresas**, São Paulo, v. 22, n. 3, p. 68-69, 1982.

SCHULZ, V.; HÄNSEL, R.; TYLER, V. E. **Fitoterapia racional: um guia de fitoterapia para as ciências da saúde**. São Paulo: Manole, 2002. 386 p.

SCHEFFER, M. C. Influência da adubação orgânica sobre a biomassa, o rendimento e a composição do óleo essencial de *Achillea millefolium* L. - mil-folhas. In: MING, L.C. (Coord.), **Plantas medicinais, aromáticas e condimentares: avanços na pesquisa agronômica**. Botucatu: UNESP, v.1, p.1-22. 1998.

SHAKEEL, M. K. et al. Pesticides and breast cancer risk: a comparison between developed and developing countries. **Asian pacific journal of cancer prevention**, Bagkok, v. 11, n. 1, p. 173-80, 2010.

- SILVA, J. et al. An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. **Genetics and molecular biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 1, p. 241-245, 2000.
- SILVA, JR, A. A. **CD Rom Plantas Medicinais EPAGRI** (EMPRESA de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de SC) PROMED (Projeto de Plantas Medicinais),1997.
- SILVA JUNIOR, A. A. **Essentia herba: plantas bioativas**. Florianópolis: Epagri, v.2, 2006. 633p.
- SILVA, J.; ERDTAMNN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance. 2003.
- SILVA, P. A.; et al. Efeito da adubação mineral e orgânica e do horário de colheita em manjeriço doce. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 19, suplemento CD-ROM, julho 2001.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro, RJ: LTC, 2007. 490 p.
- SIMÕES, C. M. O. **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS, 1998. 172p.
- SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010. p 1102.
- SINGH, N.P. et al. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental cell research**, New York, v. 175, n. 1, p. 184-191. 1988.
- SOUZA, C. D.; FELFILI, J. M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 135-142, 2006.
- SOUZA, L. A. et al. Composição química e rendimento do óleo essencial nas folhas de *Lippia alba* (Mill.) NE BR. Ex Britt & Wilson cultivada sob padrões inorgânicos e orgânicos. In: **WORKSHOP DE PLANTAS MEDICINAIS DE BOTUCATU**. 2002.
- SPEIT, G.; HARTMANN, A. The Comet Assay (Single-Cell Gel Test) – A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. **Methods in molecular biology**, United states, v. 113, p. 203-212, 1999.
- STEENBOCK, W. (Org.). **Buscando a nossa farmacopeia**. Guarapuava: Fundação RURECO, 1999. 56p.
- SUJATHA, S. et al. Impact of intercropping of medicinal and aromatic plants with organic farming approach on resource use efficiency in arecanut (*Areca catechu* L.) plantation in India. **Industrial crops and products**, Netherlands, v. 33, n. 1, p. 78-83, 2011.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed. 2013.

TAMISO, L. G. **Desempenho de cultivares de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sob sistemas orgânicos em cultivo protegido**. Dissertação. Piracicaba – SP.: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 101 f. 2005.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. M. **Herbarium**: compêndio de fitoterapia. 3.ed Curitiba, PR: Herbarium Laboratório Botânico, 1997. 317 p.

THE PLANT LIST, 2014. Version 1.1. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org>>. Acesso em: 15 out. 2016.

TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and molecular mutagenesis**, New York, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

VEIGA, J. E. **Cidades Imaginárias** – o Brasil é menos urbano do que se calcula. Campinas: Editora da Unicamp, 2005.

VENDRUSCOLO, G. S.; MENTZ, L. A. Estudo da concordância das citações de uso e importância das espécies e famílias utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, RS, Brasil. **Acta botânica brasílica**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 367-82, 2006.

VIEIRA, M. C.; et al. Produção de biomassa de *Mentha x villosa* em função de cama-de-aviário e épocas de corte. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, Supl. 2, julho, 2002.

VIGANÓ, J.; SILVA, C. Utilização de plantas medicinais pela população da região urbana de três bairros do Paraná. **Acta Scientiarum Health Science**, Maringá – PR, v.29, n.1, p.51-8, 2007.

VILEGAS, J. H. Y.; MARCHI, E.; LANÇAS, F. M. Determination of Coumarin and Kaurenoic Acid in Mikania glomerata (Guaco) Leaves by Capillary Gas Chromatography. **Phytochemical Analysis**, Chichester, v. 8, n. 2, p. 74-77, 1997a.

VILEGAS, J. H. Y.; MARCHI, E.; LANÇAS, F. M. Extraction of low-polarity compounds (with emphasis on coumarin and kaurenoic acid) from Mikania glomerata (‘guaco’) leaves. **Phytochemical Analysis**, Chichester, v. 8, n. 5, p. 266-270, 1997b.

VLIETINCK, A. J. et al. Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. **Planta medica**, v. 64, n. 02, p. 97-109, 1998.

YATSUDA, R. et al. Effects of Mikania genus plants on growth and cell adherence of mutans streptococci. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 97, n. 2, p. 183-189, 2005.

YAMADA, H.; KAMATA, H. Agricultural technological evaluation of organics farming and gardening I. Effects of organic farming on yields of vegetables and soil physical and chemical properties. **Bulletin of the Agricultural Research Institute of Kanagawa Prefecture**, United states, v.130, p.1-13, 1989.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

ZAMBERLAM, J.; FRONCHETI, A. **Agricultura ecológica**: preservação do pequeno agricultor e do meio ambiente. 2. ed. Rio de Janeiro: Vozes, 2002.

ZULIANI, A. J. B. et al. **Enraizamento de estacas de *Solidago chilensis* Meyen**. Curso de Agronomia (UFMS), Brasil. 2012.

XAVIER, A. **Silvicultura clonal**: princípios e técnicas de propagação vegetativa. Viçosa: UFV. 2002. 64 p.