**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**

**Análise fitoquímica dos princípios ativos, filantina, hipofilantina e nirantina da
quebra-pedra (*Phyllanthus amarus* Schumach & Thonn), sob condições de
déficit hídrico**

Juliana Rolim Salomé

**Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre
em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica
de Plantas**

**Piracicaba
2007**

Juliana Rolim Salomé
Engenheiro Agrônomo

Análise fitoquímica dos princípios ativos, filantina, hipofilantina e nirantina da quebra-pedra (*Phyllanthus amarus* Schumach & Thonn), sob condições de déficit hídrico

Orientador:

Prof. Dr. RICARDO FERRAZ OLIVEIRA

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas

Piracicaba

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Salomé, Juliana Rolim

Análise fitoquímica dos princípios ativos, filantina, hipofilantina e nirantina da quebra-pedra (*Phyllanthus amarus* Schumach & Thonn), sob condições de déficit hídrico / Juliana Rolim Salomé. - - Piracicaba, 2007.
93 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
Bibliografia.

1. Anatomia vegetal 2. Balanço hídrico 3. Bioquímica vegetal 4. Botânica
(Classificação) 5. Euphorbiaceae 6. Plantas medicinais I. Título

CDD 633.88395

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

AGRADEÇO

A DEUS pela minha vida e por me colocar entre pessoas tão maravilhosas

Aos meus pais, Érica e Emílio

Ao meu irmão, Felipe

Aos meus avós, Fernando (in memorium) e Aparecida, Eurico e Vera

E ao amor de minha vida, Fábio

Ofereço

Por ensinarem os verdadeiros valores da vida e por estarem presentes em todos os momentos,
contribuindo, incentivando e lutando junto em cada fase de minha vida.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Aos Pais e irmão pelo carinho e paciência

Ao noivo pela compreensão, paciência, ajuda e carinho.

Ao Prof. Dr. Ricardo Ferraz Oliveira pela amizade, compreensão, paciência nos momentos de dificuldades e pelos ensinamentos que enriqueceram os meus conhecimentos.

A CAPES pelo apoio financeiro (bolsa de auxílio a pesquisa).

A Prof. Dra. Vera Lúcia Rehder e à técnica Adriana da Silva Santos do CPQBA, pela colaboração, disponibilidade, ensinamentos e apoio ao meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Keigo Minami do Depto. de Produção Vegetal da ESALQ, pela amizade, ajuda e paciência nos piores momentos.

Ao Prof. Dr. Décio Barbin e Prof. Dra. Sônia de Stefano Piedade do Departamento de Ciências Exatas da ESALQ pela amizade e ajuda nas análises estatísticas do experimento.

Aos amigos do laboratório de Fisiologia do Estresse da ESALQ, Luana H. Salinete, Rafael Vivian, Lúcio Flávio, Jales T. Chaves, Evandro B. Fagan, Rodrigo, Eva Ap. Pereira e Cláudia pela troca de conhecimentos científicos e de vida, pela ajuda e por todos os momentos compartilhados durante a época do mestrado.

A Maria Solizete Granziol Silva pelo apoio, carinho e amizade.

Aos integrantes do grupo de estudos de plantas medicinais, Tiago, Paula e Matheus, pela ajuda e troca de conhecimentos.

Aos funcionários Vanderlei, “Pequeno”, Tirolês, Gilmar, que contribuíram para o andamento perfeito do experimento.

Aos pesquisadores Ilio Montanari Júnior e Pedro Melillo de Magalhães do CPQBA, pelo apoio e ajuda.

A Flávia Regina Capaldi pela ajuda inesperada e amizade.

A minha diretora Raffaella Rosseto e Alceu da Veiga Filho da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócio – APTA, que possibilitaram o término de minha dissertação.

Enfim, a todos que tornaram possível a conclusão desse projeto.

MEU MUITO OBRIGADA !

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 Descrição botânica da <i>Phyllanthus amarus</i>	18
2.2 Descrição anatômica da <i>Phyllanthus amarus</i>	21
2.3 Déficit hídrico.....	23
2.3.1 Estresse oxidativo.....	27
2.4 Metabolismo secundário.....	29
2.4.1 Origem	31
2.4.2 Compostos fenólicos.....	31
2.4.3 Biossíntese dos compostos fenólicos.....	32
2.4.4 Biossíntese das lignanas.....	35
2.4.4.1 Distribuição dos lignóides.....	38
2.4.4.2 Biossíntese dos lignóides.....	38
2.5 Propriedades terapêuticas da <i>Phyllanthus</i>	39
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
3.1 Caracterização do experimento.....	45
3.2 Tratamentos.....	47
3.3 Determinações bioquímicas.....	48
3.4 Análise estatística.....	53
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
5 CONCLUSÕES.....	71
REFERÊNCIAS.....	73
ANEXO.....	82

RESUMO

Estudo dos princípios ativos, filantina, hipofilantina e nirantina da quebra-pedra (*Phyllanthus amarus* Schumach & Thonn), sob condições de estresse hídrico

Phyllanthus amarus, planta amplamente utilizada no tratamento de diversas doenças, em especial para hepatite B, apresenta em sua constituição lignanas de interesse farmacológico, destacando-se a filantina e hipofilantina. Com relação à atividade anticancerígena, a nirantina se destaca como potencial efeito citostático e citocida. Distintas condições ambientais podem afetar a constituição química da planta e interferir nos teores destas substâncias. O presente trabalho teve por objetivo estudar a influência do déficit hídrico sobre a produção de filantina, hipofilantina e nirantina em dois acessos de *Phyllanthus amarus*, cultivados em vasos em casa de vegetação, no município de Piracicaba-SP. Foram realizados 5 tratamentos: capacidade de campo, 3 dias sem irrigação, 6 dias sem irrigação, 9 dias sem irrigação e 12 dias sem irrigação, avaliando-se a altura das plantas, a degradação lipídica, o teor de umidade do solo e determinação do teor dos princípios ativos por CGMS, nos vários tratamentos. Os resultados indicaram que com o déficit hídrico houve diminuição da altura das plantas tanto para o acesso 7 quanto para o acesso 14. A diminuição na disponibilidade de água (umidade com base em peso) passou de 100% na capacidade de campo, para 2% aos 12 dias causando redução na altura de 22% para o acesso 14 e de 1,3% para o acesso 7. Para o teste de peroxidação lipídica, obteve-se respostas significativas nas plantas a partir do terceiro dia do déficit hídrico, sendo mais moderado entre 3 e 6 dias e mais severo a partir do nono dia. Observou-se para os teores das lignanas testadas sob condições de deficiência hídrica, que o acesso 14 apresentou aumento de 140% para filantina e 118% para nirantina e 40% para a hipofilantina. Já para o acesso 7, estes aumentos foram menos significativos e se pronunciaram em condições de déficit hídrico moderado.

Palavras-chave: Quebra-pedra; *Phyllanthus amarus*; Déficit hídrico; Lignanas; Filantina; Hipofilantina; Nirantina.

ABSTRACT

Study of the principles active, phyllanthin, hypophyllanthin and niranthin the break-rock (*Phyllanthus amarus* Schumach & Thonn), under conditions of drought

Phyllanthus amarus, widely used plant in the treatment of diverse illnesses, in special for hepatitis B, presents in its constitution lignans of pharmacologic interest, being distinguished phyllanthin and hypophyllanthin. With relation to the anticarcinogenic activity, the niranthin if detaches as potential to stop and to decrease the effect. Distinct ambient conditions can affect the chemical constitution of the plant and intervene with texts of these substances. The present work had for objective to study the influence of the drought on the phyllanthin production, hypophyllanthin and niranthin in two accesses of *Phyllanthus amarus*, cultivated in pots in a greenhouse, in the city of Piracicaba-SP. Five treatments had been carried through: capacity of field, 3 days without irrigation, 6 days without irrigation, 9 days without irrigation and 12 days without irrigation, evaluating itself it height of the plants, the lipidic degradation, the text of humidity of the ground and determination of the text of the active principles for GCSM, in the some treatments. The results had indicated that with the drought it in such a way had reduction of the height of the plants for access 7 how much for access 14. The reduction in the water availability (humidity on the basis of weight) passed of 100% in the field capacity, for 2% to the 12 days causing reduction in the height of 22% for access 14 and 1,3% for access 7. For the test of lipidic peroxidation, one got significant answers in the plants from the third day of the hídrico deficit, being more moderate between 3 and 6 days and more severe from the nineth day. It was observed for texts of the lignans tested under conditions of drought that access 14 presented increase of 140% for phyllanthin and 118% for niranthin and 40% for the hypophyllanthin. Already for access 7, these increases had been less significant and if they had pronounced in conditions of moderate drought.

Keywords: Quebra-pedra; *Phyllanthus amarus*; Drought; Lignans; Phyllantin; Hipophyllantin; Niranthin

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	(A) epiderme superior com foco em um estômato da folha de <i>Phyllanthus amarus</i> , (B) epiderme inferior também com a presença de estômatos da folha de <i>Phyllanthus amarus</i>	21
Figura 2 –	(A) Secção transversal do ramo de <i>Phyllanthus amarus</i> , em menor aumento, (B) Secção transversal do ramo de <i>Phyllanthus amarus</i> em maior aumento.....	21
Figura 3 –	Corte transversal da haste de <i>Phyllanthus amarus</i> , mostrando os loroplastos, os cristais e os grãos de amido.....	22
Figura 4 –	Corte transversal da raiz de <i>Phyllanthus amarus</i> com algumas células contendo tanino e outras amido.....	23
Figura 5 -	Biossíntese do metabolismo primário (em rosa) e secundário (em azul) Fonte: Elaborada pela autora a partir de dados (CASTRO et al., 2005; TAIZ e ZEIGER, 2004).....	34
Figura 6 -	Biossíntese de compostos fenólicos e lignanas. Fonte: Elaborada pela autora a partir de dados de (CASTRO et al., 2005; TAIZ e ZEIGER, 2004.....	34
Figura 7 –	Estrutura molecular das lignanas filantina, nirantina, fletetralina, hipofilantina e nirtetralina	37
Figura 8 -	Derivação biossintética de vários grupos de lignóides (BARBOSA FILHO, 1999).....	39
Figura 9 –	Vista das plantas de <i>Phyllanthus amarus</i> após 20 dias do transplante e aplicação do adubo de cobertura.....	46
Figura 10 –	Vista das plantas de <i>Phyllanthus amarus</i> com enraizamento completo na célula, prontas para o transplante para o vaso.....	46

Figura 11 -	Procedimento para preparo do extrato metanólico para análise por cromatografia gasosa e acoplada a o espectrofotômetro de massa (CGMS).....	50
Figura 12 -	Procedimento de preparo das curvas analíticas para análise por CGMS.....	51
Figura 13 -	Tempo necessário para a obtenção das temperaturas desejadas para o método.....	52
Figura 14 –	Peroxidação lipídica em planta de <i>Phyllanthus amarus</i> , cultivadas sob condições de déficit hídrico.....	54
Figura 15 –	Variação da altura (em cm) das plantas em relação aos dias de déficit hídrico dos acessos 7 e 14 de <i>Phyllanthus amarus</i> , durante os tratamentos de déficit hídrico.....	58
Figura 16 –	Plantas de <i>Phyllanthus amarus</i> , acessos 7 e 14, na capacidade de campo, respectivamente.....	59
Figura 17 –	Plantas de <i>Phyllanthus amarus</i> com 3 dias sem irrigação, acessos 7 e 14, respectivamente.....	59
Figura 18 –	Plantas de <i>Phyllanthus amarus</i> com 6 dias sem irrigação, acessos 7 e 14, respectivamente.....	60
Figura 19 –	Plantas de <i>Phyllanthus amarus</i> com 9 dias sem irrigação, acessos 7 e 14, respectivamente.....	60
Figura 20 –	Plantas de <i>Phyllanthus amarus</i> com 12 dias sem irrigação, acessos 7 e 14, respectivamente	61
Figura 21 -	Cromatograma da mistura de padrões de filantina (53,2 µg/mL), hipofilantina (40,0 µg/mL) e nirantina (57,6 µg/mL) obtido por CGMS.....	62
Figura 22 -	Cromatograma do extrato metanólico de <i>Phyllanthus amarus</i> acesso 7 obtido por CGMS.....	62

Figura 23 -	Cromatograma do extrato metanólico de <i>Phyllanthus amarus</i> acesso 14 obtido por CGMS.....	63
Figura 24 –	Comportamento do teor médio de filantina para acessos 7 e 14.....	64
Figura 25 –	Comportamento do teor médio de hipofilantina nos acessos 7 e 14.....	65
Figura 26 –	Comportamento do teor médio de nirantina para os acessos 7 e 14.....	66
Figura 27 –	Massa seca média das folhas de <i>Phyllanthus amarus</i> cultivadas sob diferentes tratamentos de déficit hídrico.....	67
Figura 28 –	Visão geral das rotas de ativação e de coordenação das respostas de defesa da planta (BUCHANAN et al, 2001).....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Incidência de hepatite B em casos confirmados por Unidades da Federação (UF).....	41
Tabela 2 –	Incidência de câncer de pulmão em casos confirmados por Unidades da Federação.....	43
Tabela 3 –	Incidência de câncer de próstata em casos confirmados por Unidades da Federação.....	44
Tabela 4 –	Especificações do método PhyllanthusQuant1-SIM.m.....	51
Tabela 5 –	Resultado da análise de variância para as variáveis altura, filantina, hipofilantina, nirantina.....	55
Tabela 6 -	Valores das quantidades dos princípios ativos, para 1 quilo de matéria seca de folhas de <i>Phyllanthus amarus</i> em função dos valores dos teores médios obtidos no experimento.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA - Ácido abscísico

ATP - Adenosina tri-fosfato

CPQBA - Centro de Pluridisciplinas de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas

C7860 e – Linhagem de célula de câncer de cólon

EAO's - Espécies ativas de oxigênio

EH - Extrato hexânico

FRL - Fração rica em lignanas

CGMS - Cromatografia gasosa e acoplada a o espectrofotômetro de massa

HIV - vírus da imunodeficiência adquirida

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

MCF7 – Linhagem de célula de câncer de mama

MDA – Malonaldeído

mRNA - Ácido ribonucléico mensageiro

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NCI. 460 – Linhagem de célula de câncer pulmonar

NCIADR – Linhagem de célula de câncer de mama

O₂ - Oxigênio

¹O₂ - Oxigênio singlet

O₂⁻ - Íons superóxidos

OH – radicais hidroxil

OMS - Organização Mundial de Saúde

PAL - Fenilalanina amônio liase

OVCAR – Câncer ovário

PC03 – Linhagem de célula de câncer próstata

SIM - Sistema de Informações sobre Mortalidade

TBA - Ácido tiobarbitúrico

TCA – Ácido tricloroacético

UF – Unidades da federação

UACC 62 – Linhagem de célula de câncer de melanoma

1 INTRODUÇÃO

O emprego da flora medicinal se perde na história do homem. Desde os tempos antigos as plantas vêm sendo utilizadas nas sociedades humanas com propósitos terapêuticos, sendo que suas propriedades tóxicas ou curativas foram descobertas pelo homem principalmente enquanto este buscava por alimento (MARASCHIN & VERPOORTE, 1999). A fitoterapia era conhecida e praticada pelas civilizações antigas. O hábito de recorrer à cura pelo uso de plantas medicinais persiste, e a importância dessa forma alternativa ou complementar aos medicamentos essenciais para a população é inestimável (SOUZA-BRITO E SOUZA-BRITO, 1993).

Um grande número de medicamentos atualmente utilizado veio diretamente do uso popular ou tem precedentes nas práticas tradicionais que tiveram atividade medicinal confirmada. (UNANDER et al., 1995). A importância dos produtos naturais na formulação dos medicamentos pode ser vista quando se considera que, mesmo nos países industrializados, 45% dos produtos farmacêuticos provêm de produtos naturais. Cerca de um quarto das prescrições médicas nos Estados Unidos, em 1973, continha um ou mais ingredientes ativos de origem vegetal, o que representa, para as indústrias farmacêuticas norte-americanas, vendas anuais de oito bilhões de dólares, e cerca de 80% das pessoas utilizam plantas para curar suas enfermidades (PIRES e GRIPP, 1988).

Estima-se que o número de espécies vegetais superiores que foram descritas varia de 250.000 a 500.000; cerca de 5% têm sido estudadas fitoquimicamente e uma porcentagem menor, avaliada sob os aspectos biológicos. No Brasil, com 30% das florestas tropicais do planeta, existem entre 40 mil e 200 mil espécies vegetais, das quais em torno de 10 mil são medicinais (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998).

Atualmente, apenas 119 substâncias derivadas de plantas usadas para fins medicinais são obtidas de cerca de 90 espécies. Desses 119 compostos químicos, 74% têm o mesmo uso ou uso parecido com o das plantas na medicina popular (CASTRO e FERREIRA, 2001).

O uso de plantas medicinais pela população mundial tem sido muito significativo nos últimos tempos. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que cerca de 80% da população mundial fez uso de algum tipo de erva na busca de alívio de alguma sintomatologia dolorosa ou desagradável. Desse total, pelo menos 30% deu-se por indicação médica. A utilização de plantas medicinais, prática tradicional ainda existente entre os povos de todo o mundo, tem inclusive recebido incentivos da própria OMS. São muitos os fatores que vêm colaborando no

desenvolvimento de práticas de saúde que incluam plantas medicinais, principalmente econômicos e sociais.

Em 1991, a OMS reforçou a importante contribuição da medicina tradicional na prestação de assistência social, especialmente às populações que têm pouco acesso aos sistemas de saúde (BRASIL, 2006).

É reconhecida a importância das plantas e seus derivados, no desenvolvimento de modernas drogas terapêuticas (CALIXTO, 1997). As plantas medicinais são importantes para a pesquisa farmacológica e o desenvolvimento de drogas, não somente quando seus constituintes são usados diretamente como agentes terapêuticos, mas também como matérias-primas para a síntese, ou modelos para compostos farmacologicamente ativos (WHO, 2003). Estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos atualmente disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, assim subdivididos: 25% de plantas, 12% de microorganismos e 3% de animais (CALIXTO, 2001). Das 252 drogas consideradas básicas e essenciais pela OMS, 11% são originárias de plantas e um número significativo são drogas sintéticas de precursores naturais (RATES, 2001). Além disso, nas últimas décadas, o interesse populacional pelas terapias naturais tem aumentado significativamente nos países industrializados e acha-se em expansão o uso de plantas medicinais e fitoterápicos (WHO, 2003).

No Brasil, estima-se que 25% dos US\$ 8 bilhões do faturamento da indústria farmacêutica, no ano de 1996, foram originados de medicamentos derivados de plantas (GUERRA et al., 2001). Considera-se também que as vendas neste setor crescem 10% ao ano, (KNAPP, 2001). Estados Unidos e Alemanha estão entre os maiores consumidores dos produtos naturais brasileiros, entre 1994 e 1998, importaram, respectivamente, 1.521 e 1.466 toneladas de plantas que seguem para esses países sob rótulo genérico de “material vegetal do Brasil”, de acordo com Ibama (REUTERS, 2002).

Embora o nosso país possua a maior diversidade vegetal do mundo, com cerca de 60.000 espécies vegetais superiores catalogadas (PRANCE, 1977), apenas 8% foram estudadas para pesquisas de compostos biotivos e 1.100 espécies foram avaliadas em suas propriedades medicinais (GUERRA et al., 2001).

As plantas são uma fonte de substâncias químicas usadas em larga escala na indústria farmacêutica, sendo que muitos destes compostos com propriedades medicinais são metabólitos secundários (NEILL et al., 1994). Nas plantas do gênero *Phyllanthus* (Euphorbiaceae) verificou-se

uma significativa variedade destes metabólitos e o seu potencial de aplicação no tratamento de patologias complexas. Várias espécies do gênero *Phyllanthus*, conhecidas como “quebra-pedra”, têm sido amplamente utilizadas na medicina popular e são objeto de crescente interesse farmacológico e bioquímico.

Estudos farmacológicos pré-clínicos, bem como alguns ensaios clínicos, demonstraram que os extratos de várias espécies de plantas do gênero *Phyllanthus* apresentaram ações anti-virais, especialmente em relação ao vírus da hepatite B (SHEAD et al., 1992). Além disso, têm sido relatadas ações hepatoprotetoras dos princípios ativos das plantas desse gênero (SINGH et al., 1989), como a filantina, nirantina e a hipofilantina (SYAMASUNDAR et al., 1985). Com base na medicina popular, a espécie do gênero *Phyllanthus* mais utilizada para o tratamento da icterícia (cor amarela da pele e do branco dos olhos causada pelo excesso de bilirrubina no sangue) e hepatite é o *Phyllanthus amarus* (ASHA et al., 2004).

Assim, os extratos de *Phyllanthus amarus* apresentaram importantes efeitos farmacológicos tanto nos estudos realizados *in vitro* como *in vivo* contra doenças que acometem o fígado (hepatites), no tratamento da dor, da inflamação, estados alérgicos e do câncer, e contra o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) (LEVY et al., 2004).

Estudos realizados no Centro de Pluridisciplinas de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) com o objetivo de avaliar a atividade antiproliferativa “in vitro” do extrato hexânico (EH), da fração rica em lignanas (FRL) e das lignanas: filantina, nirantina, hipofilantina, filtetralina e nirtetralina obtidas de *Phyllanthus amarus* demonstraram que a nirantina apresentou atividade seletiva e concentração dependente para linhagens de células de mama e pulmão, com efeito citostático para maioria das linhagens testadas (REHDER et al., 2003)

Baseado na importância da quantificação do princípio ativo para o *Phyllanthus amarus* O CPQBA também realizou uma pesquisa onde estudou-se 6 diferentes acessos da planta em função de seus rendimentos quanto aos teores das lignanas: Filtetralina, Hipofilantina, Filantina, Nirtetralina e Nirantina. O acesso 7 destacou-se por apresentar os menores teores de nirantina e de filantina, 0,41% e 0,16%, enquanto o acesso 14 apresentou maior teor de nirantina, 0,76% e de filantina, 0,71%. No acesso 14 encontrou-se os menores teores de hipofilantina, 0,07% (média=0,15%) e de nirtetralina 0,13% (média=0,25%).

Buscando otimizar ainda mais a produção de certas lignanas na planta, o presente trabalho verificou o efeito do déficit hídrico nos acessos 7 e 14 para a otimização ou não, da produção da filantina, hipofilantina e nirantina.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Descrição botânica da *Phyllanthus amarus*

A família Euphorbiaceae a que pertence a *Phyllanthus amarus*, possui cerca de 317 gêneros e 8.000 espécies, agrupadas em 49 tribos e 5 subfamílias (WEBSTER, 1994), as Euphorbiaceae são predominantemente tropicais e subtropicais e constitui uma das maiores famílias dentre as dicotiledôneas. O gênero *Phyllanthus*, com cerca de 750 espécies, é o maior e o mais diversificado gênero desta família.

O nome *Phyllanthus* vem do grego *phyllon* (folha) e *anthos* (flor), em referência às flores produzidas em ramos que se assemelham às folhas compostas. A maior parte do gênero é de origem paleotropical, com cerca de 200 espécies distribuídas pelas Américas, principalmente Brasil e Caribe. Cerca de onze espécies atingem latitudes temperadas, mas não são encontradas na Europa e na costa pacífica do continente americano (WEBSTER, 1967). No Brasil, as espécies mais conhecidas e chamadas popularmente de quebra-pedra, arrebenta-pedra ou erva-pombinha são as *Phyllanthus niruri* L., *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn e *Phyllanthus tenellus* Roxb. Müll. Arg., reconhecidas popularmente por suas propriedades diuréticas, antiinflamatória, analgésica, antimicrobiana, antitumoral; são utilizadas na forma de infusão das folhas, caules e raízes. Recentes pesquisas descobriram em várias espécies do gênero uma atividade anti-viral, com possíveis aplicações no tratamento da Hepatite-B e câncer (LORENZI & MATOS, 2002).

A caracterização da espécie consiste em:

Reino: Plantae

Divisão: Angiosperma

Classe: Dicotiledônea

Ordem: Tubiflorae

Família: Euphorbiaceae

Gênero: *Phyllanthus*

Espécie: *amarus* Schum. & Thonn

Botanicamente o gênero *Phyllanthus* é constituído de ervas, arbustos ou árvores monóicos ou mais raramente, dióicos. Folhas simples, inteiras, alternas, estipuladas, às vezes presentes apenas nas plantas jovens, então os ramos modificados em cladódios; pecíolos menores que as lâminas. Inflorescências cimosas, axilares, paucifloras, às vezes reduzidas a uma única flor; flores estaminadas monoclamídeas, sépalas 4-6; disco nectarífero usualmente segmentado; estames (2)-

3-5(-15); filetes livres ou unidos; anteras livres ou unidas, rimosas, rimas horizontais a verticais; grãos de pólen prolatos a esféricos, colporados a porados; flores pistiladas monoclamídeas, sépalas 4-6; disco nectarífero inteiro, frequentemente pateliforme a cupuliforme, raramente segmentado; ovário 3-locular; óvulos 2 por lóculo; estiletes 3, livres ou unidos na base, geralmente divididos. Fruto cápsula septicida, separando-se na maturidade em mericarpos, raramente baga ou drupa; sementes geralmente 2 por lóculo, angulosas, triangulares em seção transversal (TORRES et al., 2003).

O gênero *Phyllanthus* se trata de um gênero bastante complexo, cuja identificação das espécies é por vezes difícil e confusa. Como se trata de uma planta com fins medicinais quaisquer equívocos na identificação poderão comprometer seriamente os resultados de trabalhos e também por ser freqüentemente coletadas e utilizadas pela população leiga, é importante reconhecer caracteres que permitam distinguir as espécies.

Frequentemente há confusão na identificação das espécies, assim cabe ressaltar, devido a pesquisa, as principais diferenças entre o *Phyllanthus amarus* e o *Phyllanthus niruri*, espécies constantemente confundidas.

A *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn., consiste de uma erva, 30-40 cm de altura, glabra, com ramificação filantóide, ramos cilíndricos a levemente achatados, não modificados em cladódios. Estípulas oval-lanceoladas a lanceoladas, acuminadas, 2 mm comprimento. Folhas subsésseis, membranáceas, oblongas, 8-10x3-4 mm, ápice arredondado, base obtusa, margem inteira, pecíolo com 1 mm de comprimento. Flores em címulas bissexuais, com uma flor pistilada e uma flor estaminada; brácteas lanceoladas, acuminadas; flores estaminadas ca. 2 mm comprimento, pedicelo ca. 1 mm comprimento, sépalas 5, obovadas a elípticas, acuminadas, obtusas, inteiras, translúcidas nas margens, esverdeadas; disco com 5 glândulas pateliformes; estames 2, raramente 3, filetes totalmente unidos, tecas convergentes, rimas horizontais a oblíquas; flores pistiladas ca. 2 mm comprimento; pedicelo ca. 1,5mm comprimento, chegando a 2 mm no fruto; sépalas 5, oboval-oblongas, apiculadas a agudas, côncavas, inteiras, translúcidas nas margens, esverdeadas. Disco anular com 5 apículos; ovário globoso, verde; estiletes levemente 2-partidos, patentes. Fruto cápsula, ca. 3 mm comprimento. Sementes ca. 1 mm comprimento, castanho-claras, estriadas. A *Phyllanthus amarus* não é facilmente distinguível das outras espécies, porém as inflorescências bissexuais com duas flores e os estames completamente unidos, identificam a espécie (TORRES et al., 2003).

A espécie *Phyllanthus niruri* é uma erva com aproximadamente 30 cm altura, glabra, com ramificação filantóide, ramos cilíndricos a levemente achatados não modificados em cladódios. Estípulas linear-lanceoladas, 2-3 mm comprimento, longamente acuminadas. Folhas membranáceas, subsésseis, oblongas a elípticas, 8-13 x 3-4 mm, ápice arredondado, base cordada, assimétrica, margem inteira; pecíolo 0,5 -1 mm comprimento. Flores em cúmulas unissexuais, as estaminadas proximais com 3-7 flores, as pistiladas distais com uma única flor; brácteas linear-lanceoladas, ca. 1-1,8 mm comprimento; flores estaminadas ca. 2 mm comprimento., pedicelo ca. 1 mm comprimento., sépalas 5, largamente obovais, côncavas, inteiras, verde-claras; disco com 5 glândulas cuneadas, papilosas; estames 3, filetes livres a totalmente unidos; teças convergentes, rimas horizontais a oblíquas; flores pistiladas ca. 2,5 mm comprimento, pedicelo 3-4 mm comprimento, sépalas 5, largamente obovais a elípticas, inteiras, verde-claras, disco anular, ovário globoso, verde; estiletes livres, 2- partidos, eretos, capitados. Fruto cápsula, ca. 2mm comprimento. Sementes 1,5 mm comprimento, castanho escuras, verruculosas. A p. niruri é espécie ruderal, encontrada florida e com frutos durante todo o ano (MAGALHÃES, 2000).

O *Phyllanthus niruri* diferenciam-se pelas folhas assimétricas, inflorescências unissexuais e estiletes capitados e *Phyllanthus amarus* por possuir folhas simétricas, inflorescências bissexuais e estiletes agudos.

2.2 Descrição anatômica da *Phyllanthus amarus*

Anatomicamente podemos descrever a planta *Phyllanthus amarus* (BAGCHI, 1992; SAYYADA, K et al., 2006):

As folhas possuem paredes epidérmicas onduladas, estômatos distribuídos principalmente na epiderme abaxial (superfície inferior da folha). A epiderme superior tem cutícula fina. Os estômatos são seguidos por cavidades respiratórias. Há uma única camada de células paliçádicas, que ocupa quase a metade do espaço entre as duas epidermes. Abaixo das células paliçádicas há pilhas de células coletoras, cada qual ocorrem numa relação de 3 ou 4 células paliçádicas. Um número reduzido de elementos vasculares são vistos abaixo das células de coletoras. Na Figura 1 estão apresentadas as epidermes superiores e inferiores das folhas de *Phyllanthus amarus*.

Figura 1 – (A) epiderme superior com foco em um estômato da folha de *Phyllanthus amarus*,
(B) epiderme inferior também com a presença de estômatos da folha de *Phyllanthus amarus*

Os ramos são arredondados na seção transversal, córtex com 6-8 células adensadas, a maioria das células contêm cloroplastos e poucos cristais. Após 3-4 fileiras, há uma fileira de células que contêm os grãos de amido, seguidas por 2-3 camadas de células de fibra que são interrompidas pelo parênquima cortical. O floema é constituído por 5 a 7 células espessas, os vasos de xilema possui 8-33 μ m de diâmetro, e com células da medula com cloroplastos. A Figura 2 mostra o corte transversal do ramo, tanto em menor quanto em maior aumento.

Figura 2 – (A) Secção transversal do ramo de *Phyllanthus amarus*, em menor aumento, (B) Secção transversal do ramo de *Phyllanthus amarus* em maior aumento

A haste possui células epidérmicas e com algumas células corticais contendo tanino, córtex com aproximadamente 15 células adensadas, algumas contêm cristais oxalato de cálcio, o córtex interno contêm grupos de 7 -10 células grossas interrompidas em intervalos regulares pelas células parenquitamentosas, no outro lado destas, há células parenquitamentosas que contêm grãos de amido. O floema contém de 7 a 10 células espessas, com paredes finas, sem conteúdo . Os vasos de xilema possuem de 16 -54 milímetros no diâmetro, as células da medula podem

conter alguns cristais. A Figura 3 detalha o corte transversal da haste da planta de *Phyllanthus amarus*, ressaltando os cloroplastos, os cristais e os grãos de amido.

Figura 3 – Corte transversal da haste de *Phyllanthus amarus*, mostrando os cloroplastos, os cristais e os grãos de amido

A raiz possui de 6 a 8 células de cortiça adensadas contendo tanino; o córtex possui de 10 a 15 células adensadas, algumas contendo tanino algumas amido, conforme pode ser visto na Figura 4. Floema possuindo de 4 a 6 células. Vasos de xilema com diâmetro de 12 a 53 mm de diâmetro.

Figura 4 – Corte transversal da raiz de *Phyllanthus amarus* com algumas células contendo tanino e outras amido

2.3 Déficit hídrico

As plantas são utilizadas enormemente pela indústria no preparo de um amplo espectro de derivados como extratos, até produtos isolados, puros, onde se tem o uso direto destes princípios ou o uso para síntese de outros produtos. A utilização de plantas na medicina tradicional quanto pela indústria é crescente, assim há necessidade de padronização de qualidade de todos os derivados naturais (puros, extratos e plantas) de forma a assegurar a continuidade das propriedades farmacológicas e/ou organolépticas.

BALBAA (1983) enfatiza que é aconselhável, em vários casos, o cultivo das plantas medicinais para a melhoria da qualidade da droga. Esta melhoria pode ser resultante do cultivo de espécies advindo do melhor manejo das condições de solo, práticas agrícolas, controle de fungos e insetos, melhores condições de colheita e pós-colheita ou de variedades ou híbridos que possuam as características desejadas.

Determinadas espécies medicinais apresentam diferentes recomendações terapêuticas pelo saber popular influenciada pelo seu local de ocorrência (MARTINS et al., 1994). Essas variações podem ocorrer ao longo de diferentes eixos temporais e espaciais, tanto genéticos quanto ecológicos (pressões de variação em clima, solo, parasitas, predadores, patógenos, competidores)

e fisiológicos (estágio de desenvolvimento, ritmo estacional, alocação de energia, estágio reprodutivo)(BROW JÚNIOR, 1988).

OLIVEIRA (1997) enfatiza que a adaptação às mais diversas condições ambientais apresenta desafios evolutivos incomuns, e as plantas que ocorrem ao longo de um gradiente ambiental variam também quanto à sua constituição genética e atividade fisiológica, condicionadas pelo processo de seleção natural; embora pertencendo à mesma espécie, podem responder de modo muito diferente a dado grau de tensão ambiental.

Em manjerição (*Ocimum* spp.) foi verificado ser a influência ambiental significativa no aspecto quantitativo da produção dos constituintes químicos, tornando necessária a avaliação dos efeitos fitoterápicos de acordo com o ambiente de desenvolvimento da planta (KAMADA,1999).

Segundo NAVARRO et al (1989), a espécie de *Satureja obovata* apresenta variações quantitativas e qualitativas no óleo essencial, na fração fenólica e nas atividades antimicrobiana e espasmolítica quando coletadas em locais distintos.

JOHANSSON et al. (1997) encontrou variações no conteúdo e na composição do óleo de sementes de muitas espécies de acordo com as condições climáticas do local de crescimento e localização geográfica.

Os efeitos do ambiente podem ser divididos em bióticos e abióticos, considerando que a planta está interagindo constantemente com o ambiente recebendo influência e interferindo no meio ao mesmo tempo (CASTELLANI, 1997).

Os fatores bióticos estão relacionados com as interações planta-microrganismo, planta-planta e planta herbívoro. Os fatores abióticos relacionam-se às pressões de variações climáticas e edáficas (latitude, altitude, temperatura, luminosidade, disponibilidade de água, nutrição, manejo cultura). Neste trabalho iremos discutir a disponibilidade de água.

A água é de importância decisiva no crescimento da planta, uma vez que é meio transportador de substâncias solúveis, além de intermediar vários processos bioquímicos. A eficiência de absorção de água do solo pela planta depende das condições climáticas onde ela está crescendo, da capacidade de água do solo e das exigências de água pela planta durante os diferentes estágios de desenvolvimento (FRANS, 1983).

Em condições de baixa disponibilidade de água no solo, vários processos metabólicos nas plantas podem ser influenciados, como o fechamento estomático, o declínio na taxa de

crescimento, o acúmulo de solutos, antioxidantes e a expressão de genes específicos de estresse (SILVA e CASALI, 2000).

Poucos são os trabalhos referentes ao efeito do estresse hídrico em plantas medicinais principalmente em relação aos produtos do metabolismo secundário. O efeito sobre tais produtos parece variar bastante com o tipo, a intensidade e a duração do estresse, podendo aumentar ou diminuir o princípio ativo visado (ANDRADE e CASALI 1999). A respeito do comportamento das plantas medicinais e aromáticas quando há disponibilidade limitada de umidade, pouco se sabe (GOSSELIN, 1996).

TONGMA e colaboradores (2001), demonstraram que extratos de *Thitonia diversifolia* cultivadas e solos com diferentes níveis de umidade, apresentaram variação na atividade alelopática para arroz (*Oryza sativa*), esta foi maior quanto menor o nível de umidade do solo com cultivo da *Thitonia diversifolia*, comprovando assim, que em condições de estresse hídrico ocorre maior acúmulo de compostos alelopáticos.

BAHER et al., 2002, demonstraram que em *Satureja hortensis* constituintes do óleo essencial, tiveram comportamentos distintos em condições de estresse hídrico. O carvacrol teve seu teor aumentado em condições de estresse hídrico moderado, enquanto o teor de γ -terpineno diminuiu em condições de estresse hídrico moderado e severo.

A deficiência hídrica pode influenciar a composição química do óleo essencial de algumas espécies. Em *Cymbopogon nardus* há aumento significativo de geraniol e a diminuição de citral em condições de estresse hídrico moderado, já em *Cymbopogon pendulus* há aumento do citral. As mesmas plantas conduzidas por um período maior em condições de estresse hídrico moderado podem apresentar resultados distintos, como no caso do *Cymbopogon nardus* que apresentou diminuição do geraniol (SINGH-SANGWAN et al., 1994).

O déficit hídrico pode afetar vários mecanismos fisiológicos nas plantas. Um deles é o seu efeito sobre a fotossíntese que tornou-se conhecido em 1885 onde acreditava-se que fatores da inibição da atividade dos cloroplastos poderiam ser causados apenas por mudanças nos pigmentos cloroplastídicos, verificando-se tempos depois que a clorofila é de fato altamente sensível a baixos potenciais hídricos (NAUTIYAL et al., 1996).

O estresse hídrico pode afetar igualmente a condutância estomática e a taxa de assimilação fotossintética. Segundo o experimento de REGINA e CARBONNEAU (1997) que demonstrou as trocas gasosas de folhas submetidas a regime hídrico em condições controladas,

observou que as plantas de todos os cultivares tiveram a condutância e a taxa de assimilação fotossintética reduzida em relação aos valores obtidos pelas plantas-controle.

REGINA e CARBONNEAU (1997) também dosaram nos cultivares a concentração de ácido abscísico (ABA), devido a sua reconhecida importância como substância reguladora do funcionamento dos estômatos nas situações de estresse hídrico. O acúmulo de ABA nas células-guarda induz ao fechamento progressivo dos estômatos, reduzindo assim as perdas de água por transpiração e permitindo as plantas suportarem as situações de deficiência hídrica.

O ABA está normalmente acumulado nos cloroplastos do mesófilo das folhas, principal local de síntese, em condições de estresse hídrico migra para as células da epiderme. Essa migração provoca o acúmulo do íon de potássio nas células-guarda, como forma de manter a pressão osmótica elevada. Recentemente, vários trabalhos têm demonstrado que o ABA atua também como emissor de sinais radiculares, transmitindo à parte aérea as primeiras evidências de falta de água captadas pelas raízes das plantas. Esses sinais, emitidos por meio do aumento da concentração de ABA nos vasos do xilema, permitem às plantas responderem às mudanças das condições de extração da água do solo, e encontram-se estreitamente relacionados com a redução da abertura dos estômatos e da atividade fotossintética das folhas de plantas não irrigadas.

O trabalho de REGINA e CARBONNEAU (1997) mostrou que os teores do ABA das folhas aumentaram sistematicamente com o tratamento de estresse hídrico.

Em experimento realizado por SOKOLOV (1959) e EVENARI (1960) com Solanáceas (*Datura*, *Atropa*), houve aumento do teor de alcalóides, em plantas mantidas sob estresse hídrico (CORREA JÚNIOR et al., 1994).

O estresse hídrico também pode promover aumento na biossíntese de compostos fenólicos e formação de lignina em *Digitalis* (MATERN e GRIMMIG, 1994).

Efeitos do estresse hídrico sobre o crescimento vegetativo da planta, é mais uma interação a ser considerada, pois o conteúdo de água interfere no crescimento da maioria dos vegetais, fato este demonstrado em estudo realizado por CARVALHO et al., 2003, onde os efeitos dos níveis hídricos do substrato sobre o crescimento das plantas foram estimados por meio de determinações periódicas da altura e da matéria fresca da parte aérea das plantas de *Tanacetum parthenium*. Resultados mostraram que a redução do nível hídrico do substrato causou decréscimo de 16 % da altura e de 23 % no acúmulo de massa fresca da parte aérea das plantas estudadas.

Embora sejam conhecidos os efeitos gerais da seca no crescimento das plantas, os efeitos primários do déficit hídrico em níveis bioquímicos e moleculares ainda não são bem entendidos (YAMAGUCHI-SHINOZAKI e SHINOZAKI, 2005). O déficit hídrico é percebido pela planta a partir de uma complexa via de respostas, começando com a percepção do estresse, o qual desencadeia uma cascata de eventos moleculares, sendo finalizada em vários níveis de respostas fisiológicas, metabólicas e de desenvolvimento (BRAY, 1993). Uma mudança no potencial osmótico, através da membrana plasmática, pode ser a maior causa de respostas ao estresse hídrico em nível molecular (BRAY, 1993). Também, alterações na conformação da membrana celular provocam mudanças em canais de transporte ativados por pressão, modifica a conformação ou a justaposição de proteínas sensoriais embebidas nas membranas celulares, e altera a continuidade entre a parede e a membrana celular (SHINOZAKI e YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000). A percepção do déficit hídrico celular precisa ser traduzida em compostos bioquímicos e metabólitos, gerando uma conseqüente resposta fisiológica ao estresse (INGRAM e BARTELS, 1996).

2.3.1 Estresse oxidativo

A formação de espécies ativas de oxigênio (EAO's) tem sido relatada por vários autores como produto do estresse biótico e abiótico (FOYER e NOCTOR, 2000). O oxigênio atômico é o elemento mais abundante na superfície da terra; o oxigênio molecular na atmosfera e na água é requerido para suportar todas as formas de vida aeróbicas (GILBERT, 1981). A reserva presente de oxigênio na terra foi sendo construída como resultado da fotossíntese, um processo que libera oxigênio a partir da água (PRICE et al., 1989). Ele é mantido praticamente constante pela respiração, no qual o oxigênio (O_2) é usado como acceptor final de elétrons (ELSTNER, 1987). Também, os átomos de oxigênio são “fixados” em várias moléculas orgânicas através de uma variedade de enzimas e processos não enzimáticos (GILBERT, 1981). Organismos aeróbicos devem, entretanto, adequar-se aos efeitos adversos do O_2 . Em altas concentrações na atmosfera, o O_2 pode inibir ou inativar certas enzimas e também competir com a fixação fotossintética do CO_2 pela ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase, aumentando o custo energético da fotossíntese (MORAN et al., 1994).

Para o oxigênio se tornar quimicamente reativo, ele deve ser ativado fisicamente ou quimicamente. A ativação física ocorre principalmente pela transferência da energia de excitação

de um pigmento foto-ativado, tal como uma molécula de clorofila excitada. Esta energia é altamente difusível e capaz de reagir com moléculas orgânicas, causando danos nas membranas do aparelho fotossintético (NOCTOR e FOYER, 1998).

A ativação química pode ser gerada a partir de uma desestabilização nas camadas de elétrons do O_2 , formando o 1O_2 (oxigênio singleto) ou de uma adição sequencial de elétrons ao O_2 , formando os íons superóxidos (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxil (OH), os quais são altamente reativos (McKERSIE e LESHEM, 1994). As EAO's colidem com as moléculas orgânicas, extraíndo um elétron desta. Desta forma, faz com que este radical se propague numa reação em cadeia (McKERSIE et al., 2000).

As diferentes formas de espécies reativas descritas acima causam uma variedade de danos nas células vegetais como: inibição de enzimas sensíveis; degradação da clorofila ou “bleaching”; peroxidação lipídica; radicais livres, H_2O_2 e oxigênio singleto atacam prontamente ácidos graxos insaturados, produzindo hidroperóxidos de lipídeos, em presença de metal catalisador, e radicais alkoxil e peroxil que desencadeiam uma série de reações nas membranas, mudando e desfazendo estruturas lipídicas e alterando a integridade e organização das membranas (YU, 1994);

Durante o déficit hídrico, as plantas apresentam alteração no transporte de elétrons mediado pelos radicais superóxido formados (O_2^-) que competem com o NADP para redução no fotossistema I (REDDY et al., 2004). Como consequência, pode ocorrer a perda e redução das proteínas D1 e D2 do fotossistema II (REDDY et al., 2004). A diminuição da assimilação de CO_2 , redução das atividades dos fotossistemas e alteração no sistema de transporte de elétrons, aceleram a geração de EAO's, via cloroplasto (ASADA, 1999).

As EAO's têm a capacidade de inativar enzimas e danificar estruturas e componentes celulares importantes (ASADA, 1999). As enzimas do ciclo de Calvin-Benson, enzimas que contêm Fe^{+2} , e as proteínas D1 e D2, são as mais afetadas pelas EAO's (REDDY et al., 2004). Várias enzimas parecem estar envolvidas no mecanismo de proteção as EAO's, como as catalases, superóxido dismutase, peroxidases, glutatona. Além destas, outras moléculas podem participar do sistema antioxidante das plantas como os flavonóides, alcalóides, ácido ascórbico e carotenóides (REDDY et al., 2004).

2.4 Metabolismo Secundário

Dá-se o nome de metabolismo ao conjunto de reações químicas que continuamente estão ocorrendo em cada célula. A presença de enzimas específicas garante a direção a essas reações, estabelecendo o que se denomina de rotas metabólicas. Os compostos químicos formados, degradados, ou simplesmente transformados, são chamados de metabólitos e as reações enzimáticas envolvidas, respectivamente são designadas como anabólicas, catabólicas ou de biotransformação (BARBOSA,1994).

Essas reações visam, primariamente, ao aproveitamento de nutrientes para satisfazer as exigências fundamentais da célula: energia (ATP), poder redutor (NADPH) e biossíntese das substâncias essenciais à sua sobrevivência (macromoléculas celulares), (SANTOS, 2004).

No caso das células vegetais, o metabolismo costuma ser dividido em primário e secundário.

Entende-se por metabolismo primário o conjunto de processos metabólicos que desempenham uma função essencial no vegetal, tais como a fotossíntese, a respiração e o transporte de solutos. Os compostos envolvidos no metabolismo primário possuem uma distribuição universal, pois são necessários para todas as plantas.

Segundo MARTINS et al.,1994, os metabólitos secundários são a expressão da individualidade química dos indivíduos e diferem de espécie para espécie, qualitativa e quantitativamente, sendo produzidos geralmente em pequenas quantidades. Como consequência prática esses compostos podem ser utilizados em estudos taxonômicos (quimiosistemática) (STREET,1972).

A biossíntese de metabólitos secundários é realizada por rotas metabólicas específicas do organismo, ocorrendo estreita relação entre essas rotas e aquelas responsáveis pela síntese de metabólitos primários. Essas rotas metabólicas são interconectadas, e as rotas que sintetizam metabólitos primários fornecem moléculas que são utilizadas como precursores nas principais rotas de síntese de metabólitos secundários. Nesse sentido, embora se faça a divisão em metabolismo primário e secundário, o metabolismo deve ser considerado como um todo, na produção destes compostos (MANN,1987).

A produção de metabólitos secundários não deve ser entendida como produção de material de refugo, ou de excreção como se pensava antigamente, até meados do século XX. Apenas recentemente compreendeu-se que os metabólitos secundários são resultados da especialização

célular e que suas manifestações durante certas fases do desenvolvimento do organismo se devem à expressão diferencial dos genes (GOTTLIEB et al., 1996).

As funções que os metabólitos secundários desempenham não são todas conhecidas. No entanto, essa situação é presumivelmente temporária, já que os avanços científicos na área têm esclarecido muitas funções desses compostos. Por ter uma distribuição restrita variando de espécie para espécies, é possível que alguns desses compostos não sejam essenciais aos organismos que os produzem, mas em geral devem ter algum significado biológico, presumindo-se que possuam alguma função específica (GROS et al., 1985).

Os caminhos do metabolismo secundário são respostas genética dos organismos e que talvez sejam ativados durante determinado estágio de crescimento e desenvolvimento, ou durante períodos de estresse causado por limitação nutricional ou ataque de microorganismos e insetos (MANN, 1987). Embora o metabolismo secundário nem sempre seja necessário para que uma planta complete seu ciclo de vida, ele desempenha papel importante na interação das plantas com o meio ambiente segundo fatores bióticos ou abióticos.

2.4.1 Origem

A origem de todos metabólitos secundários pode ser resumida pelo processo sintético primário, a fotossíntese, por meio do qual as plantas verdes utilizam a energia solar para produção de compostos orgânicos. Um grupo pequeno dos metabólitos primários serve como precursores para síntese desses compostos em reações catalisadas enzimaticamente (JENSEN, 1985).

Há três grandes grupos de metabólitos secundários: terpenos (obtidos a partir do ácido mevalônico, no citoplasma, ou do piruvato e 3-fosfoglicerato, no cloroplasto), compostos fenólicos (derivados de ácido chiquímico ou ácido mevalônico) e alcalóides (derivados de aminoácidos aromáticos, triptofano e tirosina, os quais são derivados do ácido chiquímico, e também de aminoácidos alifáticos, ornitina e lisina), (CASTRO et al., 2005)

Muitos dos compostos secundários são de importância comercial tanto na área farmacêutica quanto nas áreas alimentar, agrônômica, perfumaria, entre outras. Embora muitos metabólitos primários também sejam de interesse em algumas das áreas citadas, o grande número e diversidade dos metabólitos secundários vegetais têm despertado o interesse de pesquisadores de vários campos da ciência que vêem neles uma fonte particularmente promissora de novas moléculas potencialmente úteis ao homem (VERPOORTE & MARASCHIN, 2001).

A composição química das espécies vegetais ainda está longe de ser descrita em sua totalidade. Um arsenal de constituintes naturais ainda não foi quimicamente estudado e grande quantidade de compostos, já isolados e com estrutura química determinada, ainda não tem a atividade biológica determinada, seja em relação às suas funções na própria espécie, seja quanto suas potencialidades de uso, especialmente o uso de interesse terapêutico.

Dentro do gênero *Phyllanthus*, diferentes classes metabólicas foram encontrados, e, entre estes, as lignanas, os alcalóides e os taninos foram os mais abundantes. Dentre as lignanas, substância a qual será o foco deste trabalho, as que tiveram maior representatividade foram a filantina, hipofilantina, nirantina, filtetralina, hinoquinina e isolintetralina (CALIXTO et al., 1998).

2.4.2 Compostos fenólicos

As lignanas são compostos fenólicos que pertencem a uma classe de compostos que inclui uma grande variedade de estruturas, simples e complexas, as quais possuem pelo menos um anel aromático no qual ao menos há uma substituição de um hidrogênio por uma hidroxila. Estes compostos estão amplamente distribuídos no reino vegetal e nos microorganismos, fazendo também parte do metabolismo animal. Contudo os animais são incapazes de sintetizar o anel aromático, e os compostos fenólicos produzidos pelos mesmos, em pequenas quantidades, utilizam o anel benzênico presentes nas substâncias de sua dieta alimentar. Os vegetais e microorganismos conseguem sintetizar o anel benzênico e, a partir dele os compostos fenólicos (CARVALHO et al., 2004).

Dentre os compostos fenólicos pertencentes ao metabolismo secundário dos vegetais, são encontradas estruturas muito variadas, variando em aproximadamente 10.000 compostos (TAIZ & ZIGER, 2004), como: pigmentos de frutos e folhas, derivados da cumarina, ácidos fenólicos. Essa classe abrange também as ligninas e taninos, polímeros com importantes funções nos vegetais (CARVALHO et al., 2004).

Compostos fenólicos pertencem a um grupo de substâncias presentes em nosso dia-a-dia. Estes são atrativos para nós e também para outros animais, os quais são atraídos para polinização ou dispersão de sementes. Além disso, os compostos fenólicos protegem as plantas contra os raios UV, insetos, fungos, vírus e bactérias, outras plantas por alelopatia (STRACK, 1997).

2.4.3 Biossíntese dos compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são biossintetizados por meio de diferentes rotas, razão pela qual constituem um grupo bastante heterogêneo do ponto de vista metabólico (TAIZ & ZIGER, 2004). Esses compostos são sintetizados pela via do ácido chiquímico a partir de carboidratos, ou pela via do acetato-polimalato (ácido malônico) que inicia com acetil-coenzima A e malonil-coenzima A (SIMÕES et al., 1999).

O ácido chiquímico é formado pela condensação de dois metabólitos da via da glicose, ou seja, o fosfoenlpiruvato e a eritrose-4-fosfato. O passo seguinte é a formação do ácido corísmico através da junção do ácido chiquímico a uma molécula de fosfoenlpiruvato. O ácido corísmico por sua vez forma os aminoácidos aromáticos (triptofano, fenilalanina e tirosina) que são precursores de vários alcalóides. Um dos primeiros grupos de compostos fenólicos a ser formado são os fenilpropanóides, os quais são precursores da lignina e costumam ser voláteis (DEWICK, 1995).

A via do ácido chiquímico é presente em plantas, fungos e bactérias, mas não em animais. Por isso, os aminoácidos triptofano e fenilalanina são considerados essenciais; já como a tirosina pode ser formada a partir da fenilalanina, ela não é considerada essencial na dieta humana.

A principal enzima da via do ácido chiquímico é a fenilalanina amônio liase (PAL). Ela está situada em um ponto de ramificação entre os metabolismos primário e secundário, de forma que a reação que ela catalisa é uma etapa reguladora importante na formação de muitos compostos fenólicos (TAIZ & ZIGER, 2004). Essa enzima retira uma amônia da fenilalanina formando o ácido cinâmico.

A atividade da PAL é aumentada por fatores ambientais, tais como baixos níveis de nutrientes, luz (efeito do fitocromo) e infecção de fungos. O ponto de controle parece estar no início da transcrição. A invasão de fungos, por exemplo, desencadeia a transcrição do RNA mensageiro que codifica a PAL, aumentando a quantidade de PAL na planta, o que, então, estimula a síntese de compostos fenólicos (TAIZ, 2004).

Abaixo na Figuras 5 e Figura 6, estão ilustradas as rotas de síntese dos compostos fenólicos, finalizando nos compostos específicos do trabalho que são as lignanas.

Figura 5 - Biossíntese do metabolismo primário (em rosa) e secundário (em azul)

Fonte: Elaborada pela autora a partir de dados (CASTRO et al., 2005; TAIZ e ZEIGER, 2004)

Figura 6 - Biossíntese de compostos fenólicos e lignanas

Fonte: Elaborada pela autora a partir de dados de (CASTRO et al., 2005; TAIZ e ZEIGER, 2004)

2.4.4 Biossíntese das Lignanás

Segundo o modelo acima (Figura 6) o ácido cinâmico é transformado em ácido p-cumárico pela enzima CA4H. O ácido p-cumárico originará o álcool p-cumarílico, o ácido ferúlico, precursor do álcool coniferílico, e o ácido sinápico, precursor do álcool sinapílico. Estes álcoois são os precursores das lignanas derivadas dos molignóis, assim como da lignina (LEWIS & DAVIN, 1998).

Estes álcoois precursores serão acoplados por dimerização, que é controlado pela proteína dirigente que faz a ligação 8-8' entre duas unidades fenilpropano. Esta proteína não tem capacidade oxidativa, mas possui sítios que ligam os monômeros guiando o acoplamento. Esta proteína foi pela primeira vez isolada na planta *Forsythia intermédia* que produz uma lignana dimérica formada a partir de duas moléculas do álcool t-coniferílico. Ela acopla compostos fenólicos simples, gerando o esqueleto básico das moléculas das lignanas. A descoberta desta proteína explica sua especificidade de acoplamento dos monômeros, sendo que após este ocorrerão outras transformações bioquímicas, como reduções, desmetilações, oxidações, entre outros, que determinarão a estrutura final da molécula. Como a proteína dirigente controla a síntese de lignina e das lignanas, estas substâncias são produzidas e acumuladas nos mesmos tecidos, a lignina para dar rigidez e as lignanas para proteger a planta contra os microorganismos (LEWIS et al., 1998).

Dentre os compostos secundários provenientes direta ou indiretamente do caminho do Chiquimato, destaca-se os fenilpropanóides. Estes compreendem uma grande classe com diversas funções biológicas, cuja presença em determinadas espécies e tecidos tem sido induzida por vários estresses bióticos e abióticos (DIXON & PAIVA, 1995) e segundo HERMANN & WAVER (1995), todos os fenilpropanóides são derivados do ácido cinâmico; as lignanas, substâncias buscadas neste trabalho, constitui um grupo de compostos fenilpropanóides, encontrados em diversas partes da planta, incluindo caules, rizomas, raízes, sementes, óleos e resinas exsudadas, flores, folhas e cascas, e as suas quantidades variam de acordo com os tecidos e as espécies (LEWIS et al., 1998).

As lignanas possuem distribuição universal nas espécies lenhosas e compreendem uma grande quantidade de compostos cujas atividades biológicas vêm sendo verificadas como antioxidativas, antitumoral, anticâncer, sendo já relatadas na faixa de 36 lignanas naturais com essa atividade. O consumo de muitos alimentos ricos em lignanas tem reduzido os riscos de

desenvolver vários tipos de câncer, e vários mecanismos têm sido sugeridos para explicar essa ação protetora. Entre os compostos com atividade biológica já comprovada destacam-se os ácidos cafeíco e ferúlico, o safrol, anetol, eugenol, honoquinol, magnolol, conferol (WARD, 1997).

As lignanas são micromoléculas mais simples, designada genericamente como pertencente a um dos grupos dos lignóides. O grupo de lignóide caracteriza uma micromolécula cujo esqueleto é formado exclusivamente pelo grupo fenilpropânico (C6-C3)_n.

As lignanas são dímeros formados através do acoplamento oxidativo de álcoois cinâmílicos entre si ou destes com ácidos cinâmicos. Este termo foi criado em 1942 por Harworth (BARBOSA FILHO, 1999).

Mais de 500 lignóides estão relatados na literatura. Desse total, 90% pertence ao grupo das lignanas e neolignanas e pelo menos quarenta esqueletos carbônicos diferentes são conhecidos. Tipos estruturais podem ser encontrados nos trabalhos de GOTTLIEB (1982) e GOTTLIEB e YOSHIDA (1984).

As classes desses lignóides podem ser denominados da seguinte forma, segundo seu esqueleto carbônico: diarilbutano ou quando apresentam um grupo lactona, diarilbutanolido, ariltetralina, dibenzociclooctano, tetrahidrofurano e furofurano, benzofurano, futoenona, diidrodieugenol, diarilciclobutano, ariloxiarilpropano, benzodioxano e biciclooctano (BARBOSA FILHO, 1999).

Das cinco lignanas presentes na *Phyllanthus amarus*, a filantina e a nirantina, pertencem à classe das diarilbutanas, enquanto que a ariltetralina, hipofilantina e nirtetralina pertencem à classe das ariltetralinas (SATYANARAYANA & VENKASTERWALU, 1991). A estrutura de cada molécula pode ser observada na Figura 7.

Diarilbutanas

Filantina

Nirantina

Ariltetralinas

Filtetralina

Hipofilantina

Nirtetralina

Figura 7 – Estrutura molecular das lignanas filantina, nirantina, filtetralina, hipofilantina e nirtetralina

2.4.4.1 Distribuição dos lignóides

Os lignóides estão amplamente distribuídos no reino vegetal e foram detectado em 75 famílias, estando mais presente em angiospermas e em poucas gimnospermas (BARBOSA FILHO,1999). As plantas lenhosas são mais ricas em lignanas, já nos arbustos predominam as neolignanas. Segundo este mesmo autor já foram isoladas aproximadamente 700 lignóides, dos quais 390 lignanas, 270 neolignanas e 50 outros tipos. Em 1978, as lignanas foram citadas em 46 famílias, 87 gêneros e 146 espécies (LEWIS et al., 1990). O elevado número de lignanas e neolignanas no reino vegetal, direciona ao indício de que as propriedades biológicas dessas substâncias sejam essenciais ao desenvolvimento do próprio vegetal e ao controle deste sobre outros vegetais e animais. Por isso faz-se aproveitamento direto destas substâncias pelo homem, uma vez que auxilia servindo de modelo para síntese de fármacos.

2.4.4.2 Biossíntese dos lignóides

A síntese de um lignóide envolve o metabolismo primário e secundário e segundo a hipótese proposta por BIRCH (1963), o caminho biossintético dos arilpropanóides, precursores primários dos lignóides, desenvolve-se a partir da fenilalanina ou da tirosina, pela via redutora que forma os ácidos cinâmicos, aldeídos cinâmicos e álcoois cinamílicos, (BARBOSA FILHO,1999). Generalizando, a partir da fenilalanina, inicia-se a via fenilpropanóide, que originará os compostos fenólicos e, entre estes, as lignanas e os precursores (LEWIS et al., 1998), conforme pode ser observado na Figura 8.

Figura 8 - Derivação biossintética de vários grupos de lignóides (BARBOSA FILHO, 1999)

Quatro são os monômeros que estão envolvidos no acoplamento oxidativo da biossíntese dos lignóides: ácido cinâmico, álcool cinamílico, propenilfenóis e alilfenóis. A biogênese dos lignóides, principalmente das lignanas e neolignanas, que formam a maioria das substâncias conhecidas, pode ser explicada pelo acoplamento oxidativo entre unidades monoméricas radicalares. Esses radicais podem apresentar várias estruturas canônicas de ressonância, dependendo do acoplamento desses radicais nas diferentes posições possíveis, origina-se o lignóides de determinado tipo estrutural.

O acoplamento oxidativo entre esses radicais seguido da adição de um ou dois íons hidretos, adição de íon hidreto mais hidroxila inter ou intramolecular e ciclização e aromatização, conduzem a vários tipos de neolignanas e lignanas.

2.5 Propriedades Terapêuticas da *Phyllanthus amarus*

As plantas do gênero *Phyllanthus* são tradicionalmente utilizadas para tratar, diabetes, herpes, gonorréia, disenteria, icterícia, asma, infecções brônquicas e genitourinárias, assim como afecções renais, incluindo os problemas relacionados a cálculos renais e/ou biliares (CALIXTO et al., 1998). Extratos de *Phyllanthus* spp. tem sido relatados com efeito farmacológicos como antibacteriano (MACRAE et al., 1984), antihiperglicêmico (MOSHI et al., 1997), antihepatotóxico (THABREW AND HUGHES, 1996) e anti vírus da hepatite B (LEE et al.,

1996). Em função de seu grande uso popular, estas plantas vêm sendo estudadas cientificamente em vários países, principalmente na Índia (SRIPANIDKULCHAI, et al., 2002). Uma atenção particular tem sido dada ao subgênero *Phyllanthus*, cujas espécies têm sido investigadas através de estudos fitoquímicos, farmacológicos pré-clínicos e clínicos, permitindo assim comprovar, pelo menos em parte, seus efeitos atribuídos pela medicina popular (UNANDER et al., 1995;)

Estudos farmacológicos pré-clínicos, bem como raros ensaios clínicos, demonstraram que os extratos de várias espécies de plantas do gênero *Phyllanthus* apresentaram ações anti-virais, especialmente em relação ao vírus da hepatite B (SHEAD et al., 1992). Além disso, têm sido relatadas ações hepatoprotetoras dos princípios ativos das plantas desse gênero (SATYANARAYAN et al., 1988), como a filantina e a hipofilantina (SYAMASUNDAR et al., 1985).

Estudos clínicos realizados com *Phyllanthus niruri* relatam que este possui efeito uricosúrico e eleva a filtração glomerular, o que sugere sua utilização com efeito lítico e/ou preventivo na formação de cálculos renais, mas também sua possível utilização em pacientes hiperruricêmicos e naqueles com insuficiência renal (MAGALHÃES, 2000). Estudos realizados em animais demonstraram que o extrato aquoso de *Phyllanthus niruri* foi capaz de prevenir o crescimento de cálculos de oxalato de cálcio implantados na bexiga urinária de ratos (BARROS et al., 2003).

Com base na medicina popular, a espécie do gênero *Phyllanthus* mais utilizada para o tratamento da icterícia e hepatite é o *Phyllanthus amarus* (ASHA et al., 2004). Assim, os extratos de *Phyllanthus amarus* apresentaram importantes efeitos farmacológicos tanto nos estudos realizados *in vitro* como *in vivo* contra doenças que acometem o fígado (hepatites), no tratamento da dor, da inflamação, estados alérgicos e do câncer, e contra o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) (NOTKA et al., 2003; LEVY et al., 2004).

Experimentos realizados por MEHROTRA & KULSHRESHTHA (1991), comprovaram em nível celular no tratamento de pacientes agudos e crônicos com hepatitis B, o uso benéfico do extrato aquoso de *Phyllanthus amarus* na concentração de 1mg/mL em uma única dose. O rompimento da atividade da polimerase do vírus da hepatitis B, da transcrição do mRNA e da replicação, reafirma o papel do *Phyllanthus amarus* como um agente antiviral.

A eficácia em ensaios clínicos, evidenciada por JAYARAM (1997), demonstraram que pacientes com hepatite B tratados com *Phyllanthus amarus* tiveram maior percentual de recuperação (86,9%), que aqueles tratado com a droga convencional (50%), além da resposta mais rápida.

É importante ressaltar a importância destes estudos para o Brasil. Estatísticas do Ministério da Saúde, apontam crescimento de 51% de 2000 a 2004, nos casos confirmados de Hepatite B, conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 1 – Incidência de hepatite B em casos confirmados por Unidades da Federação (UF)

UF	2004	2003	2002	2001	2000
Rondônia	316	229	189	202	179
Acre	158	170	252	218	230
Amazonas	243	142	211	99	91
Roraima	47	33	62	21	54
Pará	138	128	94	60	84
Amapá	96	43	21		55
Tocantins	120	110	38	88	252
Maranhão	233	156	157	156	44
Piauí	20	13	21	16	29
Ceará	132	96	143	96	73
Rio Grande do Norte	14	2	16	15	48
Paraíba	252	72	63	23	20
Pernambuco	318	221	133	196	267
Alagoas	201	117	117	40	24
Sergipe	58	40	30	5	34
Bahia	290	322	296	361	269
Minas Gerais	612	441	158	232	299
Espírito Santo	587	650	185	224	319
Rio de Janeiro	1851	1548	1032	1243	1667
São Paulo	3034	1943	623	597	555
Paraná	1415	1356	591	834	1243
Santa Catarina	1077	1003	864	864	1167
Rio Grande do Sul	1208	949	710	930	1068
Mato Grosso do Sul	344	255	200	192	172
Mato Grosso	233	205	164	114	158
Goiás	464	409	298	392	445
Distrito Federal	121	136	39	90	108
Total	13582	10789	6707	7308	8954

Fonte: Dados compilados pela própria autora, segundo dados do Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informações sobre Mortalidade – SIM, 2007.

Também em uma outra experimentação clínica conduzida em nove pacientes hipertensos (quatro deles que sofrem do Diabetes Mellitus) foram tratados com uma preparação da planta inteira do *Phyllanthus amarus* por 10 dias. As observações indicaram *Phyllanthus amarus* como uma droga potencial hipertensiva diurética e hipoglicemiante para o ser humano. O açúcar do sangue foi reduzido significativamente nos pacientes tratados. Em outros pacientes com grau de açúcar no sangue moderado e severo seus níveis de açúcar reduziram significativamente, administrando a dose de 1 mg três vezes por dia por um período de 3 meses (SRIVIDYA et al., 1995).

Lignanas como filantina, hipofilantina entre outras, presentes nesta planta mostraram possuir atividade significativa contra o câncer (RAJESHKUMAR, 2002). Experimentos foram realizados no CPQBA com ensaios de atividade antiproliferativa in vitro do EHPa com extrato hexânico de *Phyllanthus amarus*, fração enriquecida em lignanas e lignanas isoladas em sete linhagens de células tumorais. Os ensaios foram realizados na Divisão de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA/UNICAMP sob a coordenação do Dr. João Ernesto de Carvalho, projeto FAPESP processo 02/03498.5.

As linhagens avaliadas foram: melanoma – UACC62; mama – MCF7; pulmão –NCI 460; ovário – OVCAR; próstata – PC03; cólon-C786.0 e mama resistente – NCI.ADR.

Foi analisado concentração-atividade da fração (rica em lignanas) sobre as linhagens celulares em diferentes concentrações, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração de extrato utilizado. O resultado demonstrou que a fração possui atividade concentração dependente, linhagem seletivo e com efeito citostático (OVCAR) e citocida na concentração de 250µg/mL (todas as linhagens menos para MCF-7).

Na análise da concentração-atividade da hipofilantina isolada sobre as linhagens celulares em diferentes concentrações, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração de extrato utilizado. A curva demonstrou que a hipofilantina não possui atividade concentração dependente para NCADR, com efeito citostático para todas as linhagens menos para NCI460 e C786, apresenta efeito citocida na concentração de 50µg/mL e efeito seletivo para UACC62, apenas para UACC62.

Para a análise da concentração-atividade da filantina isolada sobre as linhagens celulares em diferentes concentrações, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração de amostra, o resultado demonstrou que a filantina possui atividade concentração

dependente para UACC-62 e NCI460, apresentando efeito citostático para as todas linhagens e citocida em concentrações acima de 25µg/mL para UACC62.

Já para a curva concentração-atividade da nirantina isolada sobre as linhagens celulares em diferentes concentrações, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração de extrato utilizado. O resultado apresentou que a nirantina possui atividade concentração dependente para UACC62 (células de melanoma) e com efeito citostático para as demais linhagens.

Dados do Ministério da Saúde mostram a evolução da incidência dos diversos tipos de câncer na população brasileira. Pela Tabela 2, os casos de câncer pulmonar evoluiu de 2000 a 2004, 19%.

Tabela 2 – Incidência de câncer de pulmão em casos confirmados por Unidades da Federação

UF	2004	2003	2002	2001	2000
Rondônia	95	78	69	82	68
Acre	30	23	24	14	18
Amazonas	181	167	167	161	159
Roraima	19	12	9	12	11
Pará	214	267	193	274	187
Amapá	33	29	25	26	13
Tocantins	61	58	50	44	30
Maranhão	158	156	115	131	95
Piauí	114	124	131	92	91
Ceará	478	483	436	398	358
Rio Grande do Norte	214	166	145	114	93
Paraíba	106	100	119	95	89
Pernambuco	544	459	443	431	453
Alagoas	126	113	99	86	57
Sergipe	130	85	90	100	78
Bahia	515	501	473	458	401
Minas Gerais	1412	1353	1307	1230	1199
Espírito Santo	323	284	289	247	236
Rio de Janeiro	2368	2133	2183	2033	2135
São Paulo	4717	4663	4400	4303	4204
Paraná	1202	1139	1101	1072	1025
Santa Catarina	881	738	685	711	686
Rio Grande do Sul	2483	2400	2251	2192	2255
Mato Grosso do Sul	253	230	166	179	144
Mato Grosso	195	180	155	156	140
Goiás	465	371	382	385	348
Distrito Federal	175	143	146	171	144
Total	17492	16455	15653	15197	14717

Fonte: Dados compilados pela própria autora, segundo dados do Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informações sobre Mortalidade – SIM, 2007.

Já a incidência de câncer da próstata, para o mesmo período aumentou em 28%, conforme pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3 – Incidência de câncer de próstata em casos confirmados por Unidades da Federação

UF	2004	2003	2002	2001	2000
Rondônia	53	57	36	41	40
Acre	13	7	12	18	14
Amazonas	60	70	74	58	70
Roraima	13	15	7	9	9
Pará	143	121	93	93	89
Amapá	16	7	8	10	12
Tocantins	41	62	42	28	26
Maranhão	81	71	73	77	50
Piauí	112	97	100	98	81
Ceará	370	365	341	353	306
Rio Grande do Norte	132	124	96	92	73
Paraíba	124	98	81	63	41
Pernambuco	484	420	383	294	346
Alagoas	83	76	60	47	64
Sergipe	106	70	74	48	54
Bahia	508	473	480	374	405
Minas Gerais	1009	1027	821	730	724
Espírito Santo	218	159	166	147	129
Rio de Janeiro	1153	1079	1048	1053	921
São Paulo	2430	2293	2258	2214	2059
Paraná	687	650	588	595	519
Santa Catarina	337	267	278	279	237
Rio Grande do Sul	825	791	760	792	750
Mato Grosso do Sul	152	152	105	107	111
Mato Grosso	118	117	99	119	102
Goiás	238	221	222	213	175
Distrito Federal	84	88	84	81	83
Total	9590	8977	8389	8033	7490

Fonte: Dados compilados pela própria autora, segundo dados do Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informações sobre Mortalidade – SIM, 2007.

Diante da significância dos problemas de saúde, bem como da capacidade da planta *Phyllanthus amarus* em tratar estas enfermidades com substâncias advindas do metabolismo secundário, este estudo visa verificar a produção de lignanas (filantina, hipofilantina e nirantina) em condições de estresse hídrico.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Caracterização do experimento

O ensaio foi conduzido no Departamento de Fisiologia Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba-SP. A espécie utilizada foi *Phyllanthus amarus*, acessos 7 e 14, decorrente de pesquisa anterior conduzida no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP) em Paulínia que estudou 6 diferentes acessos os quais apresentaram potencial em função de seus rendimentos. O acesso 7 foi selecionado por apresentar destacou-se por apresentar os menores teores de nirantina e de filantina, 0,41% e 0,16%, enquanto o acesso 14 maior teor de nirantina, 0,76% e de filantina, 0,71%.

Uma exsicata das plantas estão depositadas no Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da Unicamp, sob número VEC 127.411, identificada pelo Professor Grady L. Webster (University of Califórnia Davis, USA).

As plantas foram obtidas a partir de sementes de exemplares que se encontram na Divisão de Agrotecnologia do CPQBA. A semeadura foi realizada no dia 17/08/2006 em bandejas de isopor com 180 células por bandeja, contendo substrato comercial plant max da eucatex e vermiculita fina, sendo colocadas aproximadamente 3 sementes por célula. As bandejas com as plantas permaneceram em viveiro com sombrite 50% .

As plantas começaram a germinar a partir dos 14 dias. Após os 42 dias da semeadura, começou-se a aplicar o fertilizante solúvel em água de Peters (20,20,20) 1g/l água em aplicações semanais.

Aos 64 dias após a semeadura, quando as plantas atingiram 4 cm, sua raiz já estava bem estruturada na célula, houve o desbaste e o transplantes destas para bandejas de 72 células, com 100 mL cada uma, totalizando por badejas 7,2 L, contendo o mesmo substrato e o adubo 8-28-16 incorporado a ele na proporção de 14 g/ bandeja, parando com a solução de Peters.

Após 20 dias do transplante aplicou-se o mesmo adubo (14g de 8-28-16/ bandeja) em cobertura, Figura 14. Após enraizamento completo da célula Figura 15, dia 22/11/2006, houve o transplante para os vasos de número 3 e 1/2, contendo solo Latossolo Vermelho-Amarelo Distrófico típico, 25% de argila, 4% de silte e 71% de areia, sendo estes colocados em estufa.

Figura 9 – Vista das plantas de *Phyllanthus amarus* após 20 dias do transplante e aplicação do adubo de cobertura

Figura 10 – Vista das plantas de *Phyllanthus amarus* com enraizamento completo na célula, prontas para o transplante para o vaso

As plantas receberam 6 regas por aspersão diárias, por 4 minutos , cada uma fornecendo 37mL, totalizando ao final do dia 222 mL.

Três dias antes de receberem os tratamentos, todos os vasos foram irrigados diariamente até o ponto em que, devido à drenagem, começava a sair água em excesso dos vasos.

As temperaturas mínimas e máximas atingidas nos meses de Agosto de 2006 a Janeiro de 2007 foram: Agosto 11,9°C / 29,4°C; Setembro 13,5°C / 28,3°C; Outubro 17°C / 29,6°C; Novembro 17,8°C / 30,4°C; Dezembro 19,8°C / 30,1°C; Janeiro 20,1°C / 29,3°C. As medidas obtidas foram medido pelo posto meteorológico da própria ESALQ e suas coordenadas são: latitude de 22 42' 30" sul, Longitude de 47 38' 00" oeste, altitude de 546 metros.

3.2 Tratamentos

Os tratamentos constituíram-se da combinação de 5 teores de água no solo; capacidade de campo, 3 dias sem irrigação, 6 dias sem irrigação, 9 dias sem irrigação, 12 dias sem irrigação.

A capacidade de campo foi determinada previamente, por meio de curva de retenção de umidade a partir do solo seco, peneirado e homogeneizado em laboratório, segundo técnicas de rotina do Laboratório de Física do Solo da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. As amostras de solo foram retiradas com o auxílio de um trado, colocadas em latas de alumínio herméticamente fechadas até pesagem em balança analítica com aproximação decimal, onde foram obtidas as massas de solo úmido. Após as amostras foram colocadas em estufa de ventilação forçada à 105°C por 72 horas, para serem pesadas novamente onde foram obtidas as massas secas de solo. Através da relação em LIBARDI (1995), foram obtidas as umidade do solo em porcentagem (U%):

$$U\% = \frac{M_u - M_s}{M_s - T} \times 100$$

onde, M_u é a massa de solo úmido, em gramas; M_s é a massa de solo seco em gramas e T é a tara de lata de alumínio em gramas.

As épocas de amostragem ou colheita foram; respectivamente nos dias 19/01/2007, 22/01/2007, 25/01/2007, 28/01/2007, 31/01/2007. As colheitas foram feitas manualmente, cortando-se o caule rente ao solo dos vasos com tesoura de poda, sempre entre 8 e 9 horas. As plantas logo que colhidas foram medidas e sofreram desfolha, tendo sua parte aérea separada da do caule e pesada. As plantas logo que pesadas foram colocadas em sacos tipo Kraft, previamente identificadas e levadas para secagem por um período de 48 horas a uma temperatura de 40°C, em estufa com renovação e circulação de ar MA 037 Marconi. Posteriormente, foram utilizadas na determinação dos teores de filantina, hipofilantina e nirantina; e da análise do estresse hídrico.

3.3 Determinações bioquímicas

Os efeitos dos níveis de água do solo sobre o crescimento das plantas foram estimados por meio de determinações periódicas da altura, massa das partes aéreas e do caule.

A massa fresca foi determinada, por meio de balança analítica, a partir de plantas coletadas manualmente, obtidas pelo corte do caule rente ao solo. A primeira colheita foi realizada 60 dias após o transplante, e as colheitas seguintes foram de 3 em 3 dias sem a irrigação.

A análise do estresse das plantas foi feita através da mensuração da peroxidação de lipídeos. A peroxidação de lipídios foi mensurada a partir da quantidade de malonaldeído (MDA) do extrato de folhas, através de reação específica deste, com o ácido tiobarbitúrico (TBA). O método utilizado foi descrito inicialmente por HEATH e PACKER (1968) e adaptado por PEIXOTO et al.,(1999). Para a determinação, foi reservado 300g de tecido seco, macerados em almofariz de porcelana, na presença de nitrogênio líquido, adicionados 5 mL da solução de TCA a 0,1% em água (w/v) contendo 20% de polivinilpirrolidona, em seguida, a mistura foi macerada continuamente por 2 minutos. Após a homogeneização, 1,4 mL da mistura foram transferidos para tubo ependorf e centrifugados a 10.000g por 5min.

Foram adicionados 2 mL de TCA 20% contendo 0,5% de TBA em 0,5mL do sobrenadante e a mistura foi mantida a 95°C por 30min em bloco aquecedor (Thermoblock – Biômetra). Após ser retirada do bloco, a amostra sofreu resfriamento rápido em banho de gelo. Resfriada as amostras, 1,4mL destas foram transferidos para ependorf para centrifugação a 10.000 x g por 10 min, com o objetivo de clarificar a amostra e retirar impurezas. As leituras foram realizadas em espectrofômetro nas absorbâncias de 535 nm e 600 nm, respectivamente. A segunda leitura foi subtraída da primeira para obtenção da leitura específica e a quantidade do complexo MDA-TBA

formado foi calculado através do coeficiente de extinção molar de $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (HEATH e PACKER, 1968). As determinações das concentrações de MDA são realizadas através da fórmula:

$$C = \text{ABS}(535-600)/E$$

Onde: E = coeficiente de extinção = $155 \mu\text{M}/\text{cm}$.

Os resultados são expressos em $\mu\text{M MDA}/\text{g ms}$.

Os ensaios fitoquímicos foram desenvolvidos na Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas - CPQBA/UNICAMP, sob a orientação da Dra. Vera L. G. Rehder.

A extração das lignanas: filantina, hipofilantina e nirantina foi feita, a partir de amostras de 200 mg da planta seca e moída acondicionadas para a extração em tubo de centrífuga com 10 mL de metanol em Dispersor (tipo Polytron-Ultra Turrax 175, rotação 3 = 16000 rotações/min) durante 1 min.

O extrato foi centrifugado por 6 minutos em centrífuga (Centrífuga microprocessada 5500 D Cientec) com rotação de 3000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico de 25 mL. Foi realizada a reextração do resíduo da planta com mais 5,0 mL de metanol e o material centrifugado novamente. Transferido o sobrenadante para o mesmo balão, completou-se o volume com metanol. Foram retirados aproximadamente 6 mL da solução que foi filtrada em millex, e reservada para injeção e análise. As etapas da determinação química, pode ser observado na Figura 11.

Figura 11 - Procedimento para preparo do extrato metanólico para análise por cromatografia gasosa e acoplada a o espectrofotômetro de massa (CGMS)

Para o preparo dos padrões foi pesado analiticamente 10 mg de cada padrão de lignana (filantina, hipofilantina e nirantina) em um balão volumétrico (bv) de 25 mL seguido de diluição com metanol (concentração aproximada da solução estoque: 400 ($\mu\text{g/mL}$). Preparou-se a mistura dos padrões diluindo as soluções estoques para obtenção das curvas analíticas. O esquema do procedimento de preparo das curvas analíticas pode ser visto na Figura 12.

Figura 12 - Procedimento de preparo das curvas analíticas para análise por CGMS

Para a dosagem de filantina, hipofilantina e nirantina em *Phyllanthus amarus*, utilizou-se da Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CGMS).

O sistema cromatográfico foi composto por um cromatógrafo a gás HP-6890 equipado com injetor automático HP-7683 e uma coluna capilar HP-5MS (30 mt x 0,25 mm x 0,25 μm), acoplado a um detector seletivo de massas HP-5975. A temperatura utilizada para o injetor foi de

280°C, para a coluna 180°C, 5°C/min., 220°C, 10°C/min., 260°C, 3°C/min., 300°C (4,7 min) e para o detector 300°C. A Figura 13 mostra o tempo necessário para a obtenção das temperaturas desejadas para o método.

Figura 13 - Tempo necessário para a obtenção das temperaturas desejadas para o método

O volume injetado foi de 2,0 μL , a vazão do gás de arraste (He) foi de 1,0 mL/min, o split foi de 20 mL/min (razão de split: 20:1) e o solvente utilizado de diluição de amostras e padrões foi o metanol.

Para a quantificação das lignanas adotou-se o método: PhyllanthusQuant1-SIM.m, proposto pela pesquisadora Vera Rehder, com as seguintes especificações, Tabela 4:

Tabela 4 – Especificações do método PhyllanthusQuant1-SIM.m

t_R (min)	Analito	Íon de Quantificação	Íon de confirmação	Janelas (min)	Íons monitorados	Massa molar das lignanas
17,822	Filantina	151	203 e 418	3,0	151, 203 e 418	418
19,896	Hipofilantina	151	45, 353 e 430	18,5	45, 151, 166, 353, 430 e 432	430
19,992	Nirantina	166	151 e 432			432

3.4 Análise estatística

De acordo com o experimento implantado, no qual utilizou-se dois acessos da planta *Phyllanthus amarus*, acessos 7 e 14, em 5 tratamentos de déficit hídrico, capacidade de campo, 3 dias sem irrigação, 6 dias sem irrigação, 9 dias sem irrigação e 12 dias sem irrigação; os dados obtidos foram analisados estatisticamente pela análise de variância feita pelo programa SAS. O experimento foi inteiramente casualizado. Os dados encontram-se no Anexo 1.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O interesse na espécie de *Phyllanthus amarus* se deve a planta apresentar importantes efeitos farmacológicos tanto nos estudos realizados *in vitro* como *in vivo* contra doenças que acometem o fígado (hepatites), no tratamento da dor, da inflamação, estados alérgicos e do câncer, e contra o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV). Assim estudos relacionados a otimização de sua ação medicinal são de grande importância. Com a demanda crescente por plantas medicinais de qualidade, torna-se cada dia mais importante o manejo correto da cultura. Na produção de plantas medicinais, há diversos aspectos intrínsecos, ambientais e técnicos que influenciam na produção de metabólitos pela planta. Entre as condições ambientais desfavoráveis às plantas, a deficiência hídrica destaca-se como fator adverso ao crescimento e a produção vegetal, afetando vários processos bioquímicos e fisiológicos. A Figura 14 mostra a degradação de lipídeos da planta de *Phyllanthus amarus*, característica relevante em plantas que sofreram alterações em sua fisiologia devido a deficiência hídrica. Nota-se que houve peroxidação lipídica significativa nas plantas a partir do terceiro dia do déficit hídrico, sendo mais moderado entre 3 e 6 dias e mais severo a partir do nono dia. Quanto maior foi a deficiência hídrica maior foi a peroxidação lipídica nas plantas, assim o teste utilizado foi um bom indicador do déficit hídrico.

Figura 14 – Peroxidação lipídica em planta de *Phyllanthus amarus*, cultivadas sob condições de déficit hídrico

O resultado estatístico para a análise de variância entre os acessos, para as variáveis filantina, hipofilantina e nirantina e altura encontra-se descritos na Tabela 5.

Tabela 5 – Resultado da análise de variância para as variáveis altura, filantina, hipofilantina, nirantina

Causa de variação	altura		filantina		hipofilantina		nirantina	
	GI	QM	GI	QM	GI	QM	GI	QM
Acessos	1	105,63 ^{ns}	1	6,9095*	1	0,6392*	1	0,0197 ^{ns}
Entre medidas dentro de acessos 14	4	125,92	4	0,6179	4	0,0037	4	0,1566
Regressão linear	1	315*	1	2,4629*	1	0,0079 ^{ns}	1	0,5911*
Regressão quadrática	1	3,14 ^{ns}	1	0,0065 ^{ns}	1	0,0018 ^{ns}	1	0,0148 ^{ns}
Regressão cúbica	1	8,33 ^{ns}	1	0 ^{ns}	1	0,005 ^{ns}	1	0,0103 ^{ns}
Regressão 4º grau	1	177,21*	1	0,0023 ^{ns}	1	0,001 ^{ns}	1	0,0103 ^{ns}
Entre medidas dentro de acessos 7	4	51,83	4	0,0066	4	0,009	4	0,0156
Regressão linear	1	11,03 ^{ns}	1	0 ^{ns}	1	0,0028 ^{ns}	1	0,0225 ^{ns}
Regressão quadrática	1	7,14 ^{ns}	1	0,023 ^{ns}	1	0,0051 ^{ns}	1	0,0288 ^{ns}
Regressão cúbica	1	21,75 ^{ns}	1	0,0009 ^{ns}	1	0,009 ^{ns}	1	0,0001 ^{ns}
Regressão 4º grau	1	167,4*	1	0,0019 ^{ns}	1	0,027*	1	0,011 ^{ns}
Resíduo	30	33,74	70	0,066	70	0,0039	70	0,0229

* indica significância a 5% de probabilidade e ^{ns} indica valores não significativos. GL representa graus de liberdade e QM quadrado médio.

Para a altura verifica-se pelo resultado da análise de variância, que não houve significância para os acessos do experimento. No caso de regressões houve significância em nível de 5% de probabilidade para regressão linear e para regressão de quarto grau, no caso de medidas dentro do acesso 14. Logo a equação de regressão deve ser a de quarto grau, cuja expressão é:

$$Y = -56,6875 + 196,5260x - 118,6797x^2 + 28,2239x^3 - 2,3203x^4$$

Para medidas dentro do acesso 7, houve significância em nível de 5% de probabilidade, para a regressão de quarto grau e a equação é:

$$Y = -62,25 + 199,7604x - 117,6823x^2 + 27,6771x^3 - 2,2552x^4$$

Para o teor de filantina verifica-se pelo resultado da análise, que houve significância para acessos. No caso de regressões houve significância em nível de 5% de probabilidade para regressão linear dentro do acesso 14. Logo a regressão linear tem a expressão:

$$Y = 0,5787 + 0,0584x$$

Para medidas dentro do acesso 7, não houve significância.

Para o teor de hipofilantina verifica-se que houve significância, em nível de 5% para os acessos. No caso de regressões não houve significância para o acesso 14.

Já para o acesso 7 no caso de regressões, houve significância em nível de 5% de probabilidade para regressão de quarto grau. Logo a equação de regressão deve ser:

$$Y = 0,3052 + 0,0537x - 0,0152x^2 + 0,0017x^3 - 0,00006 x^4$$

Para o teor de nirantina, verifica-se que não houve significância para os acessos. No caso de regressão do acesso 14, houve significância em nível de 5% de probabilidade para a regressão linear, cuja equação é:

$$Y = 0,2784 + 0,0286x$$

Para medidas dentro do acesso 7, não houve significância.

O déficit hídrico freqüentemente tem conseqüências, significantes nas concentrações de metabólitos secundários em plantas, e há relatos de que estas condições geralmente levam a um aumento na produção de vários tipos de metabólitos secundários, como glicosídeos, alcalóides, terpenóides. Com relação metabólitos fenólicos, os estudos realizados (literatura) apresentam resultados conflitantes e parece não ser possível estabelecer uma correlação clara entre sua concentração e falta de água.

Fixando-se o nível de água inicial para as plantas (capacidade de campo), verificou-se que houve diminuição da altura das plantas conforme o aumento do déficit hídrico, tanto para o acesso

7 quanto para o acesso 14. Neste ponto, a diminuição na disponibilidade de água na terra (umidade com base em peso) passou de 100% de umidade na terra na capacidade de campo, para 9% de umidade aos 6 dias, 4% aos 9 dias e 2% aos 12 dias; causando para o período de 12 dias redução na altura de 22% para o acesso 14 e de 1,3% para o acesso 7. A água, além de ser necessária ao crescimento das células, é um elemento essencial para a manutenção da turgescência. A importância da manutenção do turgor nas células é permitir a continuidade dos processos de crescimento vegetal, expansão, divisão celular e fotossíntese. O crescimento na maioria das plantas resulta do aumento no conteúdo de água dos tecidos. A água é absorvida por osmose. Quando a água entra origina uma pressão de turgor, esta sendo positiva é importante por distender as paredes celulares. Com o déficit hídrico as células da planta contraem-se e as paredes afrouxam, devido a menor pressão de turgor e o crescimento cessa.

A taxa de crescimento é descrita em TAIZ e ZEIGER, 2004, é função do turgor, limiar de amolecimento e extensibilidade. Ou seja, em condições de deficiência hídrica, há um decréscimo do turgor e da extensibilidade da parede e aumento do limiar de amolecimento.

A diferença de altura entre os acessos 7 e 14 pode estar ligada a adaptabilidade e tolerância ao estresse hídrico, comportamento intrínseco de cada espécie vegetal. Fisiologicamente, tolerância pode ser associada ao potencial da planta em crescer com o estresse e completar seu ciclo de vida. Por outro lado, algumas plantas apresentam estratégia adaptativa quando restringem seu crescimento com o estresse, enquanto a deficiência de água permitir e também podem diminuir seu crescimento ao longo do tempo de sobrevivência em condições de seca. Provavelmente o experimento indica que o acesso 14 possui maior adaptação a falta de água. O comportamento da altura das plantas nos diferentes tratamentos, pode ser observado na Figura 15.

Figura 15 – Variação da altura (em cm) das plantas em relação aos dias de déficit hídrico dos acessos 7 e 14 de *Phyllanthus amarus*, durante os tratamentos de déficit hídrico

O déficit hídrico também teve efeito sobre a produção de clorofila na planta, apesar de não ter sido medido essa variável, visualmente podemos notar a destruição dos pigmentos fotossintéticos. Segundo (REY et al., 1997), sob condições moderadas de estresse hídrico há redução na assimilação fotossintética de CO_2 devido ao aumento da resistência à difusão de CO_2 , em consequência de fechamento estomático. A deficiência hídrica severa, por outro lado, favorece a formação de espécies reativas de oxigênio, que danificam as plantas oxidando pigmentos fotossintéticos, lipídeos de membrana, proteínas e ácidos nucleicos. Decréscimos nos teores de clorofila ou proteína podem, portanto, ser sintoma característico de estresse oxidativo, e tem sido verificado em plantas cultivadas sob condições de deficiência de água. Nas Figuras 16, 17, 18, 19, 20 observa-se a perda dos pigmentos fotossintéticos durante os diferentes tratamentos aplicados.

Figura 16 – Plantas de *Phyllanthus amarus*, acessos 7 e 14, na capacidade de campo, respectivamente

Figura 17 – Plantas de *Phyllanthus amarus* com 3 dias sem irrigação, acessos 7 e 14, respectivamente

Figura 18 – Plantas de *Phyllanthus amarus* com 6 dias sem irrigação, acessos 7 e 14, respectivamente

Figura 19 – Plantas de *Phyllanthus amarus* com 9 dias sem irrigação, acessos 7 e 14, respectivamente

Figura 20 – Plantas de *Phyllanthus amarus* com 12 dias sem irrigação, acessos 7 e 14, respectivamente

A determinação dos teores das lignanas foi realizada por CGMS, *PhyllanthusQuant1-SIM.m* monitorando a presença de fragmentos (íons de confirmação e de quantificação) específicos para cada substância (Tabela 4). Nas figuras (Figura 21, Figura 22, Figura 23), estão apresentados os exemplos dos seguintes cromatogramas: mistura dos padrões das lignanas, extrato metanólico de *Phyllanthus amarus* acesso 7 e extrato metanólico do acesso 14, respectivamente.

Figura 21 - Cromatograma da mistura de padrões de filantina (53,2 µg/mL), hipofilantina (40,0 µg/mL) e nirantina (57,6 µg/mL) obtido por CGMS

Figura 22 - Cromatograma do extrato metanólico de *Phyllanthus amarus* acesso 7 obtido por CGMS

Abundance

Figura 23 - Cromatograma do extrato metanólico de *Phyllanthus amarus* acesso 14 obtido por CGMS

A partir dos dados gerados pela análise cromatográfica (Anexo 1), pode-se determinar pelo método estatístico adotado, a influência do déficit hídrico sob os teores de filantina, hipofilantina e nirantina. Nas plantas de *Phyllanthus amarus*- acesso 14, crescidas sob condições de deficiência hídrica, verificou-se que o teor de filantina aumentou para os vários níveis de deficiência hídrica. Comparando o teor de filantina inicial na capacidade campo, com o seu teor final aos 12 dias, houve um aumento de 140 %. Com relação ao acesso 7 e teor desta substância aumentou em 20% entre os 3 e 9 dias de déficit hídrico, diminuindo para 4% aos 12 dias. Estatisticamente os dados para o acesso 7 não foram significativos e podem ser observados na Figura 24.

Figura 24 – Comportamento do teor médio de filantina para acessos 7 e 14

O teor de hipofilantina para o acesso 14 aumentou 40% da capacidade de campo para os 12 dias de deficiência hídrica. Entretanto da capacidade de campo aos 9 dias sem água esse teor aumentou 86%, mas estatisticamente este resultado não foi significativo. É importante ressaltar que o nível inicial da hipofilantina no acesso 14 é bem menor que a do acesso 7. Por outro lado, para o acesso 7, o comportamento foi variável finalizando com um decréscimo do teor de hipofilantina (13%) aos 12 dias de déficit hídrico (comparando com a quantidade inicial na capacidade de campo). Os dados estão apresentados na Figura 25.

Figura 25 – Comportamento do teor médio de hipofilantina nos acessos 7 e 14

Finalmente o teor médio de nirantina para o acesso 14 apresentou um acréscimo de 118% com o aumento de deficiência hídrica até os 12 dias. Já para o acesso 7, observou-se um aumento de 14% em relação as condições de capacidade de campo aos 3 dias com o déficit hídrico. E ao final dos 12 dias, o teor desta substância diminuiu na ordem de 16 %, não apresentando diferenças estatísticas significativas, Figura 26.

Figura 26 – Comportamento do teor médio de nirantina para os acessos 7 e 14

Podemos identificar na escala de deficiência hídrica apresentada pelo trabalho, que entre 3 e 6 dias o estresse hídrico foi mais moderado, podendo ser designado de ponto de murcha temporário e entre os 9 e 12 dias, onde o déficit hídrico é mais severo, como ponto de murcha permanente da planta.

De forma geral foi o acesso 14 que apresentou aumentos significativos em seus teores médios de filantina, e nirantina com o aumento do déficit hídrico.

Comparando estes resultados obtidos com a produção de massa seca das folhas das plantas, a qual pode ser observada na Figura 27, nota-se que o maior decréscimo foi obtido para o acesso 14.

Figura 27 – Massa seca média das folhas de *Phyllanthus amarus* cultivadas sob diferentes tratamentos de déficit hídrico

Comparando estes resultados com os obtidos para os teores médios de filantina, hipofilantina e nirantina, podemos reafirmar as conclusões, salientando que apesar da produção da massa seca das folhas diminuir, os teores médios dos princípios ativos analisados aumentaram. Na Tabela 6 estão apresentados os valores das quantidades dos princípios ativos, para 1 quilo de matéria seca de folhas de *Phyllanthus amarus* em função dos valores dos teores médios obtidos no experimento, conforme observados nas Figuras 24, 25, 26.

Tabela 6 - Valores das quantidades dos princípios ativos, para 1 quilo de matéria seca de folhas de *Phyllanthus amarus* em função dos valores dos teores médios obtidos no experimento

Dias com déficit hídrico	Filantina (g)		Hipofilantina (g)		Nirantina (g)	
	Acesso 7	Acesso 14	Acesso 7	Acesso 14	Acesso 7	Acesso 14
CC	3,05	5,28	2,55	0,61	4,15	2,71
3	3,70	7,54	2,94	0,62	4,72	3,36
6	3,60	9,57	2,32	0,86	4,24	4,99
9	3,58	11,04	2,96	1,13	4,34	5,53
12	3,17	12,68	2,24	0,85	3,50	5,92

Diante dos resultados obtidos para a produção de filantina, hipofilantina e nirantina em acessos 7 e 14 de *Phyllanthus amarus* cultivadas sob condições de deficiência hídrica e dados obtidos na literatura, pode-se explicar o significativo aumento dos teores destas substâncias, principalmente para o acesso 14, pelo fato de que as lignanas são compostos fenólicos de plantas e enquadram-se em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas. Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro*. A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou seqüestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias. Embora as evidências sejam claras sobre a ação *in vitro* dos fenóis e polifenóis com espécies reativas de oxigênio.

Assim, quando há aumento do déficit hídrico e da oxidação lipídica da membrana, provavelmente, a planta por sinais químicos tenta impedir a degradação de lipídeos produzindo substâncias antioxidantes, fenóis. Sendo as lignanas um tipo de fenol, elas podem ter alguma contribuição na defesa contra os radicais livre, podendo então ser explicado este aumento dos teores destas substâncias com o aumento da deficiência hídrica. Estudos necessitariam ser realizados a fim da comprovação desta hipótese.

Outra explicação também pode ser dada através do mecanismo de defesa da planta e lignificação da parede celular. A lignina é um polímero fenólico com subunidades aromáticas de álcool, sintetizadas também a partir de fenilalaninas. Estas são secretadas para a parede, onde são oxidadas no local apropriado pelas enzimas peroxidases e lacase.

A lignina acrescenta uma resistência mecânica significativa às paredes celulares e reduz a sua suscetibilidade ao ataque de patógenos. Um estudo feito com *Tagetes erecta* sob condições de estresse hídrico demonstrou que há aumento na atividade da peroxidase e este aumento deveu-se ao envolvimento na biossíntese de fenóis. O aumento da atividade da peroxidase acelerou a biossíntese de certos compostos fenólicos. O aumento do conteúdo fenólico foi liderado pela lignina a qual lignificou as células e reduziu a perda de água protegendo a planta contra estresse hídrico (KURUP, 1994). Da mesma forma a rota das lignanas deve ser acionada como um mecanismo de defesa, conforme também podemos observar na Figura 28, abaixo. Tanto o patógeno quanto o estresse hídrico podem causar danos a membrana podendo peroxidá-la e consequentemente acionar, conforme a ilustração a rota de produção dos compostos fenólicos (lignanas). Pouco ainda se sabe sobre a interligação dos mais vários tipos de estresse com a produção de certos compostos oriundos do metabolismo secundário, assim estudos multidisciplinares necessitam ser desenvolvidos de forma a acompanhar todo o desenvolvimento da planta, desde sua produção à análise fitoquímica, garantindo um maior entendimento de suas rotas metabólicas e a influências das condições ambientais sobre estas.

Figura 28 – Visão geral das rotas de ativação e de coordenação das respostas de defesa da planta (BUCHANAN et al, 2001)

Com relação ao comportamento diferenciado entre os acessos, pode-se inferir que provavelmente o acesso 14 obteve maiores aumentos nos teores dos princípios ativos testados por talvez ser (como não se sabe a origem dos acessos) de região semi-árida, onde as condições de deficiência hídrica já estão mais presentes, e os genes específicos já existentes se manifestam nestas condições, induzindo maior produção de certos compostos. Para o acesso 7, a produção não foi tão expressiva, porque este acesso pode ser de uma região onde a deficiência hídrica é mais moderada e a planta acabou por não possuir estes genes específicos, que resultariam em aumento de lignanas em condições de deficiência hídrica.

5 CONCLUSÕES

A utilização de plantas medicinais está em franca ascensão. No entanto enfrenta uma série de dificuldades, entre elas, baixa qualidade dos produtos disponíveis no mercado, manuseio incorreto, falta de conhecimento sobre o cultivo e pós-colheita, entre outros.

Com este experimento pode-se concluir que: 1) houve peroxidação lipídica significativa nas plantas a partir do terceiro dia do déficit hídrico, sendo mais moderado entre 3 e 6 dias e mais severo a partir do nono dia. Quanto maior foi a deficiência hídrica maior foi a peroxidação lipídica nas plantas, assim o teste utilizado foi um bom indicador do déficit hídrico; 2) houve diminuição da altura das plantas conforme o aumento do déficit hídrico, tanto para o acesso 7 quanto para o acesso 14. A diminuição na disponibilidade de água na terra (umidade com base em peso) passou de 100% na capacidade de campo, para 2% aos 12 dias causando redução na altura de 22% para o acesso 14 e de 1,3% para o acesso 7; 3) Nas plantas do acesso 14, crescidas sob condições de deficiência hídrica, verificou-se que o teor de filantina aumentou para os vários níveis de deficiência hídrica. Comparando o teor de filantina inicial na capacidade campo, com o seu teor final aos 12 dias, houve um aumento de 140 %. Com relação ao acesso 7 e teor desta substância aumentou em 20% entre os 3 e 9 dias de déficit hídrico, diminuindo para 4% aos 12 dias. Estatisticamente os dados para o acesso 7 não foram significativos; 4) o teor de hipofilantina para o acesso 14 aumentou 40% da capacidade de campo para os 12 dias de deficiência hídrica. Entretanto da capacidade de campo aos 9 dias sem água esse teor aumentou 86%, mas estatisticamente este resultado não foi significativo. É importante ressaltar que o nível inicial da hipofilantina no acesso 14 é bem menor que a do acesso 7. Por outro lado, para o acesso 7, o comportamento foi variável finalizando com um decréscimo do teor de hipofilantina (13%) em condições de déficit hídrico severo; 5) o teor médio de nirantina para o acesso 14 apresentou um acréscimo de 118% com o aumento de deficiência hídrica até os 12 dias. Já para o acesso 7, observou-se um aumento de 14% em relação as condições de capacidade de campo aos 3 dias com o déficit hídrico. E ao final dos 12 dias, o teor desta substância diminuiu na ordem de 16 %, não apresentando diferenças estatísticas significativas; 6) o maior decréscimo de matéria seca média das folhas foi do acesso 14.

O aumento do princípio ativo aqui conseguido para a *Phyllanthus amarus* é importante, pois demonstra para o produtor, que tem-se que conhecer as necessidades da planta para melhor cultivá-la visando a otimização de sua produção. Apesar de ainda as empresas não

pagarem por quantidade de princípio ativo, o produtor detentor deste tipo de informação aqui gerado, pode economizar em seu sistema produtivo, com a minimização da irrigação.

Em nível de mercado, uma planta com maior quantidade de princípio ativo, geraria para a indústria uma maior lucratividade, pois dispendiria ao seu custo de extração uma maior quantidade do princípio visado.

REFERÊNCIAS

- AMAT, A.G; VAJIA, M.E.; RODRIGUEZ, M.E.; SANCHEZ, F. Estudio Farmacobotánico y Farmacognóstico de *Phyllanthus niruri* L. y *Phyllanthus tenellus* Roxb. (Euphorbiaceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, Buenos Aires, v.10, n.3, p.161-9, 1991.
- ANDRADE, F.M.C.; CASALI, V.W.D. **Plantas medicinais e aromáticas**: relação com o ambiente, colheita e metabolismo secundário. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999, 139p.
- ASHA, V.V.; AKHILA S.; WILLS, P.J.; SUBRAMONIAM, A. Further studies on the antihepatotoxic activity of *Phyllanthus maderaspatensis* Linn. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.92, n.1, p.67-70, 2004.
- ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto v.50, p.601-639, 1999.
- BAGCHI, G.D.; SRIVASTAVA, G.N.; SINGH, S.C. Distinguishing features of medicinal herbaceous species of *Phyllanthus* occurring in Lucknow District (U.P) India, **Indian Journal of Medical Research**, Ansari Nagar, v.76, p.124-130, 1982.
- BAHER, Z.F.; MIRZA, M.; GHORBANLI, M.; REZALI, M.B. The influence of water stress on plant height, herbal and essential oil yield and composition in *Satureja hortensis* L. **Flavour and Fragrance Journal**, Inglaterra, v.17, p. 275-277, 2002.
- BALBAA, S.I. Satisfying the requirements of medicinal plant cultivation. **Acta Horticulturae**, Hamburg, v.1, n.132, p.75-84, 1983.
- BARBOSA, FILHO, J.M. Lignanais, neolignanais e seus análogos. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento., Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade, 1999. p.557-575.
- BARBOSA, T.M.L. Metabolismo secundário das plantas superiores e a alelopatia. Viçosa, MG: UFV, Departamento de Fitotecnia, 1994. 30p.
- BIRCH, A.J. Biosynthetic pathways. In: SWAIN, T. **Chemical plant taxonomy**. London: Academic, 1963. 143p.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60p. (Série B. Textos Básicos de Saúde).
- BRAY, E.A. Molecular responses to water deficit. **Plant Physiology**, Rockville, v.103, p.1035-1040, 1993.

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

BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry & molecular biology of plants**, 2001. 1367p.

CALIXTO, J.B.; SANTOS, A.R.; CECHINEL FILHO, V. A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. **Medicinal Research Reviews**, v.18, p.225-258, 1998.

CALIXTO, J.B. **Fitofármacos no Brasil**: Agora ou nunca! Ciência hoje, São Paulo, v.21, n.1.234, p.26-30, 1997.

CALIXTO, J.B.; SCHEIDT, C.; OTUKI, M.; SANTOS, A.R. Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs. **Expert Opinion Emerging Drugs**, Londres, v.2, p. 261-279, 2001.

CARVALHO, J.C.T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento, Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS; UFSC, 2004. p.520-535.

CARVALHO, L.M.; CASALI, V.W.D.; SOUZA, M.A.; CECON, P.R. Disponibilidade de água no solo e crescimento de artemísia. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.21, n.4, p 726-730, outubro, 2003.

CASTRO, H.G.; FERREIRA, F.A. A dialética do conhecimento no uso das plantas medicinais. Revista Brasileira de Plantas Medicinais- **Brazilian Journal of Medicinal Plants**, Botucatu, v.3, n.2, p.19-21, 2001.

CASTRO, P.R.; KLUGE, R.A.; PERES, L.E.P. **Manual de fisiologia vegetal**: teoria e prática. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2005. 640 p.

CATELLANI, D.C. **Crescimento, anatomia e produção de ácido erúico em *Tropaeolum majus* L.** 1997. 108p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1997.

CORRÊA JUNIOR, C. **Influência das adubações orgânicas e químicas na produção de camomila (*Chamomila recutita* (L) Rouschert e de seu óleo essencial**. 1994. 97 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal)-Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 1994.

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

DEWICK, P.M. The biosynthesis of shikimate metabolites. **Natural Product Report**, Nottingham, v.12, n.6, p.578-607, 1995.

DIXON, R.A & PAIVA, N.L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell**, Rockville, v.7, p.1085-1097, 1995.

ELSTNER, E.F. Metabolism of activated oxygen species. In: DAVIES, D.D, **Biochemistry of Plants**, London: Academic Press, 1987. v.11, p.11253-11315.

FRANZ, C. Nutrient and water management of medicinal and aromatic plants. **Acta Horticulturae**, Hamburg, v.132, p.203-215, 1983.

GILBERT, D.L.; SAUNDERS, S.J.; BARBEZAT, G.O.; WITHMAN, W. **Oxygen and living processes**, interdisciplinary approach. Springer New York, 1981. p.401.

GOSSELIN, A. Transpiration essential oil gland, epicuticular wax and morphology of *Thymus vulgaris* are influenced by light intensity and water supply. **Journal Horticultural Science**, v. 71, n. 1, p. 123-134, 1996.

GOTTLIEB, O.R. Gottlieb, O. R. Neolignans. In: HERZ W.; GRISEBACH, H.; KIRBI, G. W. **Progress in chemistry of Organic natural products**, Springer Verlag, Viena, v.35, p.1-72, 1978.

GOTTLIEB. O.R.; YOSHIDA, M. Lignóides, com atenção especial à química das neolignanas. **Química Nova**, São Paulo, v.7, p. 250-273, 1984.

GOTTLIEB, O.R.; KAPLAN, M.A.C.; BORIN, M.R. DE M.B, **Biodiversidade, um enfoque químico-biológico**. Rio de Janeiro:UFRJ, 1996. p.267.

GROS, E.G.; POMILIO, A.B.; SELDES, A.M.; BURTON, G. **Introduction al estudio de los productos naturales**. Washington: The General secretariat of the organization of American States, 1985. 196p.

GUERRA, P.M.; NODARI, O.R. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS; UFSC, 2004. p.15.

HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, California, v.1, n.125, p.185-188, 1968.

HERRMANN, K.M.; WEAVER, L.M. The shikimate pathway. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.50, p. 473-503, 1999.

INGRAM, J.; BARTELS, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.47, p.377-403, 1996.

JAYARAM, S. Efficacy of *Phyllanthus amarus* treatments in acute viral hepatitis A, B and non A Non B an open clinical trial. **Indian journal of virology**, Hissar, v.13, n.1, p.59-64, 1997.

JENSEN, R.A. The shikimate pathway: link between carbohydrate metabolism and secondary metabolism. **Physiologia Plantarum**, Edinburgh, v.66, p.164-168, 1985.

JOHANSSON, A.K.; KUUSISTO, P.H.; LAAKSO, P.H.; DEROME, K.K.; SEPPONEN, J.; KATAJISTO, J.K.; KALLIO, H.P. Geographical variations in seed oils from *Rubus chamaemorus* and *Empetrum nigrum*. **Phytochemistry**, Netherlands, v.44, n.8, p. 1421-1427, 1997.

KAMADA, T. **Plasticidade fenotípica da morfologia e do óleo essencial em acessos de manjerição (*Ocimum ssp*)**, 1998. 59p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1998.

KNAPP, L. Fitoterapia abre novos campos de pesquisa. *Gazeta Mercantil*, São Paulo, Caderno 1, p.6, 18 set. 2001.

KURUP, S.S.; NALWADI, U.G.; BASARKAR, P.W. Phenolic biosynthesis in relation to moisture stress in marigold (*Tagetes erecta* L). **Acta Horticulturae**, Weihenstephan, n.381, p. 488-493, 1994.

LEE, C.D.; OTT, M.; THYAGARAJAN, S.P.; SHAFRITZ, D.A.; BURK, R.D.; GUPTA, S. *Phyllanthus amarus* down-regulates hepatitis B vírus mRNA transcription and replication. **European Journal of Clinical Investigation**, Austria, v.26, n.12, p. 1069-1076, 1996.

LEVY, C.; SEEFF, L.D.; LINDOR, K.D. Use of herbal supplements for chronic liver disease. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, New York, v.2, n.11, p.947-56, 2004.

LEWIS, N.G.; DAVIN, L.B. The biochemical control of monolignosl coupling and structure during Lignin and Lignan biosynthesis. **ACS Symposium Series**, Washington, DC, n.697, p. 334-361, 1998.

LEWIS, N.G.; UMENZAWA, T.; DAVIN, L.B. Formation of lignans- Secoisolariciresinol and Matairesinol with Forsythia intermedia cell-free extracts. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v.266, n.16, p. 10210-10216, 1991

LEWIS, N.G.; DAVIN, L.B.; SARKAMEN, S. Lignin and Lignan biosynthesis: Distinctions and reconciliations. **ACS Symposium Series**, Washington, DC, n.697, p.1-27, 1998.

LIBARDI, P.L. **Dinâmica de água no solo**. Piracicaba, Edição do autor, 1992.497 p.

LORENZI, H. E.; MATOS, F.J. DE A. **Plantas medicinais no Brasil**: Nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512 p.

MacRAE, W.D.; TOWERS, G.H.N. Biological activities of lignans. **Phytochemistry**, Netherlands, v.23, n.6, p.1207-1220, 1984.

MAGALHÃES, P.M. Agrotecnologia para cultivo da espinheira santa. In: MAGALHÃES, P.M. **Monografias de cultivo em plantas medicinais**. Campinas: UNICAMP, 1998. 306 p.

MAGALHÃES, P.M. Agrotecnología para el cultivo de quebra-pedra o erva-pombinha. p.333-340. In: Martinez, J.V.A.; Bernal, H.Y.; Cáceres, A. **Fundamentos de Agrotecnología de cultivo de plantas medicinales iberoamericanas**. CAB-CYTED, Bogota, 2000. p. 333-340.

MANN, J. Secondary metabolism. Second edition. New York: Oxford University, 1987. 374 p.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. **Plantas medicinais**. Viçosa, MG:Universidade Federal de Viçosa, 1994. 220 p.

MARASCHI, M.; VERPOORTE, R. Engenharia do metabolismo secundário. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v.23, p. 24-28, 1999.

MATERN, U.; GRIMMIG, B. Natural phenols as stress metabolites. **Acta Horticulturae**, Weihenstephan, n.381, p.448-462, 1994.

McKERSIE, B.D.; LESHEM, Y.Y. **Stress and stress coping in cultivated plants**, Boston: Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1994. p.260.

McKERSIE, B.D.; MURNAGHAN, J.; JONES, K.S.; BOWLEY, S.R. Iron-superoxide dismutase expression in transgenic alfalfa increases winter survival without a detectable increase in photosynthetic oxidative stress tolerance. **Plant Physiology**, Rockville, v.122, p.1427-1438, 2000.

MEHROTRA, R.; RAWAT, S.; KULSHRESHTHA, D.K. In vitro effect of *Phyllanthus amarus* on Hepatitis B virus, **Indian Journal of Medical Research**, Ansari Nagar, v.93, p.71-73, 1991.

MORAN, J.F.; BECANA, M.; ITURBE-ORMAETXE, I.; FRECHILLA, S.; KLUCAS, R.V.; APARICIO-TEJO, P. Drought induces oxidative stress in pea plants. **Planta**, Heidelberg, v.194, p.346-352, 1994.

MOSHLM, M.J.; UISO, F.C. MAHUNNAH, R.L. A study of effect of *Phyllanthus amarus* extract on blood glucose in rabbits, **International Journal of Pharmacognosy**, Netherlands, v.35, n.3, p. 167-173, 1997.

NAUTIYAL, S.; NEGI, D.S.; KUMAR, S. Effect of water stress and antitranspirants on the chlorophyll contents of the leaves of *Pongamia pinnata* (L.) Pierre. **The Indian Forester**, Dehra Dun, v.122, n. 11, p.1018-1022, 1996.

NAVARRO, C.; ZARZUELO, A.; JIMENEZ, J.; DUARTE, J. Composition and pharmacological activity of the essential oil of *Satureja obovata* collected in four different localities. **Fitoterapia**, Barcelona, v.60, n.3, p.277-281, 1989.

OLIVEIRA, J.E.Z. **Variabilidade isozimática e do teor de óleo essencial em acessos de *Bidens pilosa* L.** 1997. 72p. Dissertação (Mestrado em genética e melhoramento)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1997.

NOCTOR, G.; FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.49, p.249-279, 1998.

NOTKA, F.; MEIER, G.R.; WAGNER, F. Inhibition of wild-type human immunodeficiency virus and reverse transcriptase inhibitor-resistant variants by *Phyllanthus amarus*. **Antiviral Research**, Netherlands, v.58, n.2, p.175-86, 2003.

PEIXOTO, P.H.P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANNA, R.; MOSQUIM, P.R.; MOREIRA, M.A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 11, n. 3, p. 137-143, 1999

PIRES, M.J.P.; GRIPP, A. Conservação de recursos genéticos de plantas medicinais em banco ativo de germoplasma. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 18, n.1/2, p. 61-73, 1988.

PRANCE, G. T. Floristic inventory of tropics: where do we stand? **Annals of the Missouri Botanical Garden**, St. Louis, v.64, p. 559-684, 1977.

RAJESHKUMAR, N.V.; JOY, K.L.; KUTTAN, G.; RAMSEWAK, R.S.; FAIR, M.G.; KUTTAN R. Antitumour and anticarcinogenic activity of *Phyllanthus amarus* extract. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.81, n.1, p.17-22, 2002.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**. Oxford, v.39, p.603-13, 2001.

REGINA, M.A.; CARBONNEAU, A. Trocas gasosas em *Vitis vinifera* sob regime de estresse hídrico. III Ácido abscísico e comportamento varietal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.32, n.6, p. 579-584, 1997.

REUTERS. Brasil terá primeiro banco de plantas medicinais. Folhas on line, Brasil, 2002. Disponível em: <http://www.uol.com.br/folha/reuters/ult112u12329.shl>. Acesso em: 13 maio 2005.

REHDER, V.L.G.; MELO, L.V.; KOHN, L.K.; CARVALHO, J.E.; ANTONIO, M.A.; SILVESTRE, A.; SANTOS, A.S. Atividade antiproliferativa de lignanas isoladas de *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, maio, 2003.

REY, P.; PRUVOT, G.; GILLET, B.; PELTIER, G. Molecular characterization of two chloroplastic proteins induced by water deficit in *Solanum tuberosum* L. plants: involvement in the response to oxidative stress. In: SMALLWOOD, M.F.; CALVERT, C.M.; BOWLES, D.J. **Plant responses to environmental stress**. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 1999. p.145-152.

SAYYADA, K.; VARTIKA, R.; AJAY, K.S.R.; MEHROTRA, S. Comparative pharmacognostic studies of three *Phyllanthus* species. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.104, n.1/2, p. 79-86, 2006.

SANGWAN, N.S.; FAROOQI, A.H.A.; SANGWAN, R.S. Effect of drought stress on growth and essential oil metabolism in lemongrasses. **New Phytologist**, Cambridge, v.128, p. 173-179, 1994.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS; UFSC, 2004. p. 403 – 435.

SATYANARAYANA, P.; VENATESWARLU, S. Isolation, structure and synthesis of new diarylbutane lignans from *Phyllanthus niruri*: Synthesis of 5'-desmethoxy niranthin and an antitumour extractive. **Tetrahedron**, Oxford, v.47, n. 42, p.8931-8940, 1991.

SATYANARAYAN, P.; SUBRAHMAYAN, P.; VISWANATHAN, K.N.; WARD, R.S. New seco and hydroxy-lignans from *Phyllanthus niruri*. **Journal of Natural Products**, Chicago, n.51, p.44-9, 1988.

SILVA, F.; CASALI, V.W.D. **Plantas medicinais e aromáticas: Pós -colheita e óleos essenciais**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2000. 135p.

SIMÕES, M.O.S.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROICK, P.R. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: **Farmacognosia: a planta ao medicamento**. Ed. Universidade, Porto Alegre/Florianópolis, p 323-354, 1999.

SINGH, B.; AGRAWAL, P.K.; THAKUR, R.S. A New Lignan and a new neolignan from *Phyllanthus niruri*. **Journal of Natural Products**, Chicago, n.52, p.48-51, 1989.

SINGH-SANGWAN, N.; FAROOQ, A.H.A.; SANGMAN, R.S. Effect of drought stress on growth and essential oil metabolism in lemongrasses. **New Phytologist**, Cambridge, v.28, p. 173-179, 1994.

SHEAD, A.; VICKERY, K.; PAJKOS, A.; MEDHURST, R.; FREIMAN, J.; DIXON, R.; COSSART, Y. Effects of *Phyllanthus* plant extracts on duck hepatitis B virus *in vitro* and *in vivo*. **Antiviral Research**, Netherlands, n.18, p.127-38, 1992.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular responses to dehydration and low temperature: difference and cross-talk between two stress signaling pathways. **Current Opinion in Plant Biology**, New York, v.3, p.217-223, 2000.

SOUZA, B.A.R.M.; SOUZA, B.A. A Forty years of brazilian medical plant research. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.39, p. 53-57, 1993.

SRIPANIDKULCHAI, B.; TATTAWASART, U.; LAUPATARAKASEM, P.; VINITKETKUMNEUN, U.; SRIPANIDKULCHA, K.; FURIHATA, C.; MATSUSHIMA, T. Antimutagenic and anticarcinogenic effects of *Phyllanthus amarus*. **Phytomedicine**, Jena, n.9, p. 26-32, 2002.

SRIVIDYA, N.; PERIWAL, S. Diuretic, hypotensive and hypoglycaemic effect of *Phyllanthus amarus*, **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v.33, n.1, p.861-864, 1995.

STREET, H.E.; COCKBURN, W. Plant Metabolism. New York: Pergamon Press, 1972. 321p.

STRACK, D. Phenolic metabolism. In: DEY, P.M.; HARBORNE, J.B. **Plant Biochemistry**. San Diego, Academic Press, 1997. p.387-416.

SYAMASUNDAR, K.V.; SINGH, B.; THAKUR, R.S.; HUSAIN, A.; KISO, Y.; HIKINO, H. Series on liver-protective drugs. Antihepatotoxic principles of *Phyllanthus niruri* herbs. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.14, n.1, p.41-4, 1985.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. Massachusetts: Sinauer Associates, 2004. 792p.

TONGMA, S.; KOBAYASHI, K.; USUI, K. Allelopathic activity of Mexican sunflower (*Tithonia diversifolia* (Hemsl) A.Gray) in soil under natural field conditions and different moisture conditions. **Weed Biology and Management**, Australia, v.1, p.115-119, 2001.

TORRES, D.S.C.; CORDEIRO, I.; GIULIETTI, A.M. O gênero *Phyllanthus* L. (Euphorbiaceae) na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v.17, n. 2, p. 265-278, 2003.

UNANDER, D.W.; WEBSTER, G.L.; BLUMBERG, B.S. Usage and bioassays in *Phyllanthus* (Euphorbiaceae). IV. Clustering of antiviral uses and other effects. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, n. 45, p.1-18, 1995.

UNANDER, D. W.; BRYAN, H. H.; LANCE, C. J.; MC MILLAN JR, R. T. Factors affecting germination and seed Establishment of *Phyllanthus amarus* (Euphorbiaceae). **Economic Botany**, Califórnia, v. 49, n.1, p.49-55, 1995.

VERPOORTE, R.; MARASCHIN, M. Engenharia do Metabolismo de Plantas Medicinais. In: R.A.YUNES E J.C. CALIXTO, **Plantas medicinais sob a Ótica da Química**. Universidade do Oeste de Santa Catarina: Argos Editora, 2001. 408 p.

WARD, R.S. Lignans, neolignans and related compounds. **Journal of Natural Products**, Chicago, v. 14, n.1, p.4443-4474, 1997.

WEBSTER, G.L. The genera of the Euphorbiaceae in the Southeastern United States. **Journal of the Arnold Arboretum**, Cambridge, v.48, n.3, p. 303-361, 1967.

WEBSTER, G.L. Systematics of the Euphorbiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, St. Louis, v.81, p.1-144, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants, Geneva, v.1, p.133, 2003.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. **Trends in Plant Science**, Londres, v.10, p. 88-94, 2005.

YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, Palo Alto, v.74, p.139-162, 1994.

ANEXO

ANEXO A - Dados do experimento, referente aos teores médios de filantina, hipofilantina e nirantina nos acessos 7 e 14 de *Phyllanthus amarus*

Acesso 14- 19/01/2006 - 0 dias

Amostra	Massa (mg)	Área	Concentração (µg/mL)	Concentração (mg/mL)	Teor (% m/m)	Teor médio (% m/m)	Analito
1-21 A	207,7	2196214	50,48	1,262	0,628	0,499	Filantina
1-21 B	203,4	1304955	29,99	0,75	0,37		
1-21 A	207,7	225774	12,44	0,311	0,155	0,151	Hipofilantina
1-21 B	203,4	216175	11,92	0,298	0,147		
1-21 A	207,7	744587	18,28	0,457	0,228	0,223	Nirantina
1-21 B	203,4	716619	17,61	0,44	0,217		
1-35 A	200,9	1160557	26,67	0,667	0,321	0,324	Filantina
1-35 B	202,4	1157074	26,59	0,665	0,327		
1-35 A	200,9	53049	3,09	0,077	0,037	0,037	Hipofilantina
1-35 B	202,4	51311	2,99	0,075	0,037		
1-35 A	200,9	638323	15,72	0,393	0,189	0,19	Nirantina
1-35 B	202,4	628826	15,49	0,387	0,19		
2-28 A	203,2	2052718	47,18	1,18	0,581	0,561	Filantina
2-28 B	202,4	1905001	43,79	1,095	0,541		
2-28 A	203,2	215412	11,88	0,297	0,146	0,139	Hipofilantina
2-28 B	202,4	194442	10,75	0,269	0,133		
2-28 A	203,2	1598815	38,92	0,973	0,479	0,463	Nirantina
2-28 B	202,4	1488153	36,25	0,906	0,448		
2-26 A	201	2001600	46,01	1,15	0,572	0,537	Filantina
2-26 B	204	1780389	40,92	1,023	0,501		
2-26 A	201	74249	4,23	0,106	0,053	0,049	Hipofilantina
2-26 B	204	63459	3,65	0,091	0,045		
2-26 A	201	958610	23,45	0,586	0,292	0,274	Nirantina
2-26 B	204	852923	20,9	0,523	0,256		
3-22 A	200,8	1142666	26,26	0,656	0,327	0,325	Filantina
3-22 B	204,3	1149232	26,41	0,66	0,323		
3-22 A	200,8	68503	3,92	0,098	0,049	0,048	Hipofilantina
3-22 B	204,3	65804	3,78	0,094	0,046		
3-22 A	200,8	740652	18,19	0,455	0,226	0,224	Nirantina
3-22 B	204,3	735042	18,05	0,451	0,221		
3-31 A	202	1482722	34,08	0,852	0,422	0,463	Filantina
3-31 B	200,4	1758466	40,42	1,01	0,504		
3-31 A	202	31997	1,95	0,049	0,024	0,026	Hipofilantina
3-31 B	200,4	37937	2,27	0,057	0,028		
3-31 A	202	620300	15,28	0,382	0,189	0,204	Nirantina
3-31 B	200,4	715761	17,59	0,44	0,219		
4-33 A	203,4	1677541	38,56	0,964	0,474	0,5	Filantina
4-33 B	201,8	1850944	42,54	1,064	0,527		
4-33 A	203,4	12639	0,9	0,022	0,011	0,012	Hipofilantina
4-33 B	201,8	14102	0,98	0,024	0,012		
4-33 A	203,4	698507	17,17	0,429	0,211	0,222	Nirantina
4-33 B	201,8	763287	18,74	0,468	0,232		

4-40 A	202	3764812	86,55	2,164	1,071	1,013	Filantina
4-40 B	200,9	3336643	76,71	1,918	0,955		
4-40 A	202	36032	2,16	0,054	0,027	0,025	Hipofilantina
4-40 B	200,9	31499	1,92	0,048	0,024		
4-40 A	202	1301122	31,73	0,793	0,393	0,368	Nirantina
4-40 B	200,9	1131729	27,64	0,691	0,344		

Acesso 7 - 19/01/2006 - capacidade de campo

Amostra	Massa (mg)	Área	Concentração (µg/mL)	Concentração (mg/mL)	Teor (% m/m)	Teor médio (% m/m)	Analito
1-13 A	201,4	584949	13,43	0,336	0,167	0,163	Filantina
1-13 B	205,1	571681	13,13	0,328	0,16		
1-13 A	201,4	225774	12,44	0,311	0,154	0,15	Hipofilantina
1-13 B	205,1	216175	11,92	0,298	0,145		
1-13 A	201,4	744587	18,28	0,457	0,227	0,221	Nirantina
1-13 B	205,1	716619	17,61	0,44	0,215		
1-16 A	202,1	1302662	32,42	0,81	0,401	0,37	Filantina
1-16 B	201,3	1093414	27,24	0,681	0,338		
1-16 A	202,1	398989	25,35	0,634	0,314	0,307	Hipofilantina
1-16 B	201,3	380820	24,2	0,605	0,301		
1-16 A	202,1	1414520	37,75	0,944	0,467	0,428	Nirantina
1-16 B	201,3	1170568	31,29	0,782	0,389		
2-2 A	202,2	730949	18,26	0,456	0,226	0,236	Filantina
2-2 B	201,4	795552	19,86	0,496	0,246		
2-2 A	202,2	353854	22,5	0,562	0,278	0,301	Hipofilantina
2-2 B	201,4	409389	26,01	0,65	0,323		
2-2 A	202,2	1041542	27,88	0,697	0,345	0,365	Nirantina
2-2 B	201,4	1162856	31,09	0,777	0,386		
2-20 A	200,6	1307729	32,55	0,814	0,406	0,401	Filantina
2-20 B	202,9	1292681	32,17	0,804	0,396		
2-20 A	200,6	261709	16,67	0,417	0,208	0,204	Hipofilantina
2-20 B	202,9	254490	16,21	0,405	0,2		
2-20 A	200,6	1814077	48,32	1,208	0,602	0,593	Nirantina
2-20 B	202,9	1777604	47,35	1,184	0,583		
3-3 A	204,1	786688	19,64	0,491	0,241	0,226	Filantina
3-3 B	200,9	682171	17,05	0,426	0,212		
3-3 A	204,1	314256	19,99	0,5	0,245	0,238	Hipofilantina
3-3 B	200,9	290579	18,5	0,462	0,23		
3-3 A	204,1	1125707	30,11	0,753	0,369	0,352	Nirantina
3-3 B	200,9	1004311	26,89	0,672	0,335		
3-22 A	202,7	1468057	36,52	0,913	0,45	0,463	Filantina
3-22 B	201,7	1543401	38,38	0,96	0,476		
3-22 A	202,7	350411	22,28	0,557	0,275	0,283	Hipofilantina
3-22 B	201,7	370121	23,53	0,588	0,292		
3-22 A	202,7	1615640	43,07	1,077	0,531	0,547	Nirantina
3-22 B	201,7	1701769	45,35	1,134	0,562		
4-7 A	201,6	1100455	27,41	0,685	0,34	0,29	Filantina
4-7 B	202,2	781064	19,5	0,487	0,241		

4-7 A	201,6	411149	26,12	0,653	0,324	0,277	Hipofilantina
4-7 B	202,2	291061	18,53	0,463	0,229		
4-7 A	201,6	1422546	37,96	0,949	0,471	0,404	Nirantina
4-7 B	202,2	1016717	27,22	0,681	0,337		
4-26 A	200,4	1019175	25,4	0,635	0,317	0,293	Filantina
4-26 B	201,8	869643	21,69	0,542	0,269		
4-26 A	200,4	378464	24,06	0,601	0,3	0,28	Hipofilantina
4-26 B	201,8	330470	21,02	0,525	0,26		
4-26 A	200,4	1313545	35,08	0,877	0,438	0,408	Nirantina
4-26 B	201,8	1139328	30,47	0,762	0,377		

Acesso 7 - 22/01/2006 - 3 dias

Amostra	Massa (mg)	Área	Concentração (µg/mL)	Concentração (mg/mL)	Teor (% m/m)	Teor médio (% m/m)	Analito
1-18 A	202,6	1003071	25	0,625	0,308	0,302	Filantina
1-18 B	202,3	957464	23,87	0,597	0,295		
1-18 A	202,6	435480	27,66	0,692	0,341	0,337	Hipofilantina
1-18 B	202,3	424096	26,94	0,674	0,333		
1-18 A	202,6	1470777	39,24	0,981	0,484	0,482	Nirantina
1-18 B	202,3	1455316	38,83	0,971	0,48		
1-24 A	204,7	2605328	64,69	1,617	0,79	0,823	Filantina
1-24 B	204,7	2821872	70,06	1,751	0,856		
1-24 A	204,7	312178	19,86	0,497	0,243	0,251	Hipofilantina
1-24 B	204,7	333434	21,21	0,53	0,259		
1-24 A	204,7	2399373	63,81	1,595	0,779	0,812	Nirantina
1-24 B	204,7	2604733	69,24	1,731	0,846		
2-19 A	203,8	836360	20,87	0,522	0,256	0,249	Filantina
2-19 B	201,1	777244	19,4	0,485	0,241		
2-19 A	203,8	394518	25,07	0,627	0,308	0,307	Hipofilantina
2-19 B	201,1	387897	24,65	0,616	0,306		
2-19 A	203,8	1254780	33,52	0,838	0,411	0,407	Nirantina
2-19 B	201,1	1214496	32,46	0,811	0,403		
2-35 A	201,8	858479	21,42	0,535	0,265	0,262	Filantina
2-35 B	203	844031	21,06	0,526	0,259		
2-35 A	201,8	424286	26,95	0,674	0,334	0,326	Hipofilantina
2-35 B	203	406671	25,84	0,646	0,318		
2-35 A	201,8	1273270	34,01	0,85	0,421	0,412	Nirantina
2-35 B	203	1225127	32,74	0,818	0,403		
3-6 A	202,6	963851	24,03	0,601	0,296	0,291	Filantina
3-6 B	204,1	935426	23,32	0,583	0,286		
3-6 A	202,6	351320	22,34	0,558	0,276	0,273	Hipofilantina
3-6 B	204,1	347221	22,08	0,552	0,27		
3-6 A	202,6	1030292	27,58	0,69	0,34	0,332	Nirantina
3-6 B	204,1	984600	26,37	0,659	0,323		
3-33 A	205,5	972075	24,23	0,606	0,295	0,295	Filantina
3-33 B	204,4	967174	24,11	0,603	0,295		
3-33 A	205,5	415059	26,37	0,659	0,321	0,323	Hipofilantina
3-33 B	204,4	418290	26,58	0,664	0,325		

3-33 A	205,5	1288002	34,4	0,86	0,418	0,419	Nirantina
3-33 B	204,4	1285579	34,34	0,858	0,42		
4-17 A	200,9	1596272	39,69	0,992	0,494	0,463	Filantina
4-17 B	201,5	1401051	34,86	0,871	0,432		
4-17 A	200,9	230554	14,7	0,367	0,183	0,168	Hipofilantina
4-17 B	201,5	194361	12,41	0,31	0,154		
4-17 A	200,9	1552437	41,4	1,035	0,515	0,485	Nirantina
4-17 B	201,5	1373013	36,65	0,916	0,455		
4-30 A	203,2	896011	22,34	0,559	0,275	0,272	Filantina
4-30 B	202,7	876744	21,87	0,547	0,27		
4-30 A	203,2	463724	29,45	0,736	0,362	0,366	Hipofilantina
4-30 B	202,7	471773	29,96	0,749	0,369		
4-30 A	203,2	1302796	34,79	0,87	0,428	0,427	Nirantina
4-30 B	202,7	1291497	34,49	0,862	0,425		

Acesso 14 - 22/01/2006 - 3 dias

Amostra	Massa (mg)	Área	Concentração (µg/mL)	Concentração (mg/mL)	Teor (% m/m)	Teor médio (% m/m)	Analito
1-7 A	201,2	1305243	32,48	0,812	0,404	0,476	Filantina
1-7 B	204,1	1799218	44,72	1,118	0,548		
1-7 A	201,2	91518	5,9	0,148	0,073	0,081	Hipofilantina
1-7 B	204,1	111506	7,17	0,179	0,088		
1-7 A	201,2	577115	15,59	0,39	0,194	0,22	Nirantina
1-7 B	204,1	745038	20,03	0,501	0,245		
1-34 A	205,8	1792113	44,55	1,114	0,541	0,524	Filantina
1-34 B	203,5	1659363	41,26	1,031	0,507		
1-34 A	205,8	119443	7,67	0,192	0,093	0,089	Hipofilantina
1-34 B	203,5	107483	6,91	0,173	0,085		
1-34 A	205,8	783464	21,05	0,526	0,256	0,245	Nirantina
1-34 B	203,5	706128	19,01	0,475	0,233		
2-20 A	203,9	2993630	74,31	1,858	0,911	0,914	Filantina
2-20 B	201,4	2975575	73,87	1,847	0,917		
2-20 A	203,9	41605	2,74	0,069	0,034	0,033	Hipofilantina
2-20 B	201,4	38965	2,58	0,064	0,032		
2-20 A	203,9	1194592	31,93	0,798	0,391	0,396	Nirantina
2-20 B	201,4	1209313	32,32	0,808	0,401		
2-24 A	200,3	4207477	104,39	2,61	1,303	1,182	Filantina
2-24 B	203,8	3483085	86,44	2,161	1,06		
2-24 A	200,3	37406	2,48	0,062	0,031	0,03	Hipofilantina
2-24 B	203,8	34956	2,32	0,058	0,028		
2-24 A	200,3	1485200	39,62	0,99	0,494	0,445	Nirantina
2-24 B	203,8	1204388	32,19	0,805	0,395		
3-13 A	203,2	1617714	40,23	1,006	0,495	0,49	Filantina
3-13 B	202	1573874	39,14	0,978	0,484		
3-13 A	203,2	60886	3,96	0,099	0,049	0,051	Hipofilantina
3-13 B	202	65321	4,24	0,106	0,053		
3-13 A	203,2	678516	18,27	0,457	0,225	0,256	Nirantina
3-13 B	202	862791	23,15	0,579	0,287		

3-19 A	200,2	3045369	75,6	1,89	0,944	0,944	Filantina
3-19 B	202,6	3082786	76,52	1,913	0,944		
3-19 A	200,2	184824	11,8	0,295	0,147	0,148	Hipofilantina
3-19 B	202,6	188315	12,03	0,301	0,148		
3-19 A	200,2	1531470	40,84	1,021	0,51	0,514	Nirantina
3-19 B	202,6	1574372	41,98	1,049	0,518		
4-14 A	200,2	1732077	43,06	1,076	0,538	0,58	Filantina
4-14 B	204,8	2051485	50,97	1,274	0,622		
4-14 A	200,2	42839	2,82	0,071	0,035	0,034	Hipofilantina
4-14 B	204,8	39937	2,64	0,066	0,032		
4-14 A	200,2	665150	17,92	0,448	0,224	0,241	Nirantina
4-14 B	204,8	784188	21,07	0,527	0,257		
4-25 A	203,7	3043190	75,54	1,889	0,927	0,923	Filantina
4-25 B	203,8	3018415	74,93	1,873	0,919		
4-25 A	203,7	32545	2,17	0,054	0,027	0,027	Hipofilantina
4-25 B	203,8	32734	2,18	0,055	0,027		
4-25 A	203,7	1117547	29,89	0,747	0,367	0,371	Nirantina
4-25 B	203,8	1146699	30,66	0,767	0,376		

Acesso 7 - 25/01/2006 - 6 dias

Amostra	Massa	Área	Concentração	Concentração	Teor	Teor	Analito
	(mg)		(µg/mL)	(mg/mL)	(% m/m)	(% m/m)	
1-11 A	201,1	675069	16,87	0,422	0,21	0,2	Filantina
1-11 B	201,2	612855	15,33	0,383	0,19		
1-11 A	201,1	253265	16,13	0,403	0,201	0,193	Hipofilantina
1-11 B	201,2	234953	14,98	0,374	0,186		
1-11 A	201,1	856155	22,97	0,574	0,286	0,28	Nirantina
1-11 B	201,2	821990	22,07	0,552	0,274		
1-29 A	204,3	920571	22,95	0,574	0,281	0,292	Filantina
1-29 B	203,9	988926	24,65	0,616	0,302		
1-29 A	204,3	345285	21,96	0,549	0,269	0,285	Hipofilantina
1-29 B	203,9	387758	24,64	0,616	0,302		
1-29 A	204,3	1149294	30,73	0,768	0,376	0,396	Nirantina
1-29 B	203,9	1270441	33,94	0,848	0,416		
2-5 A	203,2	2690713	66,81	1,67	0,822	0,863	Filantina
2-5 B	203,4	2962068	73,53	1,838	0,904		
2-5 A	203,2	267057	17,01	0,425	0,209	0,219	Hipofilantina
2-5 B	203,4	293360	18,67	0,467	0,229		
2-5 A	203,2	2373622	63,12	1,578	0,777	0,816	Nirantina
2-5 B	203,4	2620268	69,65	1,741	0,856		
2-39 A	203,7	865850	21,6	0,54	0,265	0,278	Filantina
2-39 B	200,8	940365	23,44	0,586	0,292		
2-39 A	203,7	320695	20,4	0,51	0,25	0,257	Hipofilantina
2-39 B	200,8	332976	21,18	0,529	0,264		
2-39 A	203,7	1182180	31,6	0,79	0,388	0,406	Nirantina
2-39 B	200,8	1276730	34,1	0,853	0,425		
3-12 A	201,8	765643	19,12	0,478	0,237	0,23	Filantina
3-12 B	200,8	719504	17,97	0,449	0,224		

3-12 A	201,8	348304	22,15	0,554	0,274	0,27	Hipofilantina
3-12 B	200,8	335980	21,37	0,534	0,266		
3-12 A	201,8	1166327	31,18	0,78	0,386	0,376	Nirantina
3-12 B	200,8	1097740	29,37	0,734	0,366		
3-32 A	201	720620	18	0,45	0,224	0,23	Filantina
3-32 B	204,6	777356	19,41	0,485	0,237		
3-32 A	201	325339	20,69	0,517	0,257	0,268	Hipofilantina
3-32 B	204,6	359481	22,85	0,571	0,279		
3-32 A	201	1064313	28,48	0,712	0,354	0,365	Nirantina
3-32 B	204,6	1151287	30,78	0,77	0,376		
4-23 A	202	1817523	45,18	1,129	0,559	0,562	Filantina
4-23 B	202,4	1838395	45,69	1,142	0,564		
4-23 A	202	154118	9,86	0,247	0,122	0,122	Hipofilantina
4-23 B	202,4	154016	9,86	0,246	0,122		
4-23 A	202	1039047	27,81	0,695	0,344	0,34	Nirantina
4-23 B	202,4	1018230	27,26	0,682	0,337		
4-40 A	201,4	680546	17,01	0,425	0,211	0,224	Filantina
4-40 B	202,7	771936	19,27	0,482	0,238		
4-40 A	201,4	287927	18,33	0,458	0,228	0,242	Hipofilantina
4-40 B	202,7	326120	20,74	0,519	0,256		
4-40 A	201,4	1173083	31,36	0,784	0,389	0,416	Nirantina
4-40 B	202,7	1343335	35,86	0,897	0,442		

Acesso 14 - 25/01/2006 - 6 dias

Amostra	Massa (mg)	Área	Concentração (µg/mL)	Concentração (mg/mL)	Teor (% m/m)	Teor médio (% m/m)	Analito
1-16 A	201,8	4991722	123,82	3,095	1,534	1,543	Filantina
1-16 B	200,9	5030381	124,77	3,119	1,553		
1-16 A	201,8	47569	3,12	0,078	0,039	0,038	Hipofilantina
1-16 B	200,9	46900	3,08	0,077	0,038		
1-16 A	201,8	1772554	47,22	1,181	0,585	0,591	Nirantina
1-16 B	200,9	1802606	48,02	1,2	0,598		
1-23 A	201,6	1818645	45,2	1,13	0,561	0,597	Filantina
1-23 B	201	2051487	50,97	1,274	0,634		
1-23 A	201,6	60228	3,92	0,098	0,049	0,053	Hipofilantina
1-23 B	201	70507	4,57	0,114	0,057		
1-23 A	201,6	1074187	28,74	0,719	0,356	0,382	Nirantina
1-23 B	201	1227751	32,81	0,82	0,408		
2-8 A	201,4	4467613	110,83	2,771	1,376	1,298	Filantina
2-8 B	201,6	3963667	98,35	2,459	1,22		
2-8 A	201,4	45495	2,99	0,075	0,037	0,034	Hipofilantina
2-8 B	201,6	36447	2,42	0,06	0,03		
2-8 A	201,4	1609561	42,91	1,073	0,533	0,513	Nirantina
2-8 B	201,6	1493436	39,84	0,996	0,494		
2-9 A	202,6	3821236	94,82	2,37	1,17	1,192	Filantina
2-9 B	203,3	3977357	98,69	2,467	1,214		
2-9 A	202,6	36469	2,42	0,06	0,03	0,031	Hipofilantina
2-9 B	203,3	38980	2,58	0,064	0,032		

2-9 A	202,6	1281220	34,22	0,856	0,422	0,438	Nirantina
2-9 B	203,3	1383724	36,93	0,923	0,454		
3-4 A	203,8	2795140	69,4	1,735	0,851	0,891	Filantina
3-4 B	201	3016971	74,89	1,872	0,931		
3-4 A	203,8	300644	19,13	0,478	0,235	0,249	Hipofilantina
3-4 B	201	332517	21,15	0,529	0,263		
3-4 A	203,8	3003813	79,8	1,995	0,979	1,024	Nirantina
3-4 B	201	3236070	85,94	2,149	1,069		
3-6 A	200,2	1361298	33,87	0,847	0,423	0,453	Filantina
3-6 B	203,1	1575756	39,19	0,98	0,482		
3-6 A	200,2	119727	7,69	0,192	0,096	0,102	Hipofilantina
3-6 B	203,1	137436	8,81	0,22	0,108		
3-6 A	200,2	856584	22,99	0,575	0,287	0,305	Nirantina
3-6 B	203,1	980167	26,26	0,656	0,323		
4-15 A	204,8	3685530	91,46	2,286	1,116	1,155	Filantina
4-15 B	203,3	3912363	97,08	2,427	1,194		
4-15 A	204,8	107223	6,89	0,172	0,084	0,086	Hipofilantina
4-15 B	203,3	111002	7,13	0,178	0,088		
4-15 A	204,8	1056235	28,27	0,707	0,345	0,352	Nirantina
4-15 B	203,3	1089366	29,15	0,729	0,358		
4-27 A	202,9	1866377	46,39	1,16	0,572	0,529	Filantina
4-27 B	200,9	1575188	39,17	0,979	0,487		
4-27 A	202,9	134106	8,6	0,215	0,106	0,098	Hipofilantina
4-27 B	200,9	111754	7,18	0,18	0,089		
4-27 A	202,9	1267617	33,86	0,847	0,417	0,388	Nirantina
4-27 B	200,9	1075516	28,78	0,719	0,358		

Acesso 7 - 28/01/2006 - 9 dias

Amostra	Massa (mg)	Área	Concentração (µg/mL)	Concentração (mg/mL)	Teor (% m/m)	Teor médio (% m/m)	Analito
1-14 A	204,6	1654603	33,89	0,847	0,414	0,43	Filantina
1-14 B	204,7	1784040	36,46	0,911	0,445		
1-14 A	204,6	483629	26,01	0,65	0,318	0,336	Hipofilantina
1-14 B	204,7	540474	28,97	0,724	0,354		
1-14 A	204,6	1692880	35,99	0,9	0,44	0,461	Nirantina
1-14 B	204,7	1865441	39,5	0,987	0,482		
1-27 A	203,2	1167385	24,21	0,605	0,298	0,295	Filantina
1-27 B	203	1145191	23,77	0,594	0,293		
1-27 A	203,2	507335	27,25	0,681	0,335	0,333	Hipofilantina
1-27 B	203	499566	26,84	0,671	0,331		
1-27 A	203,2	1633443	34,77	0,869	0,428	0,426	Nirantina
1-27 B	203	1614192	34,38	0,86	0,423		
2-1 A	202,7	2316907	47,04	1,176	0,58	0,608	Filantina
2-1 B	201,4	2530524	51,28	1,282	0,637		
2-1 A	202,7	519415	27,88	0,697	0,344	0,363	Hipofilantina
2-1 B	201,4	576460	30,84	0,771	0,383		
2-1 A	202,7	2044103	43,14	1,078	0,532	0,57	Nirantina
2-1 B	201,4	2329722	48,96	1,224	0,608		

2-34 A	202,5	1258356	26,02	0,65	0,321	0,312	Filantina
2-34 B	204	1189218	24,64	0,616	0,302		
2-34 A	202,5	524622	28,15	0,704	0,347	0,341	Hipofilantina
2-34 B	204	507821	27,27	0,682	0,334		
2-34 A	202,5	1559504	33,27	0,832	0,411	0,404	Nirantina
2-34 B	204	1520446	32,47	0,812	0,398		
3-4 A	203	1654945	33,89	0,847	0,417	0,388	Filantina
3-4 B	202,6	1415211	29,13	0,728	0,359		
3-4 A	203	474088	25,52	0,638	0,314	0,282	Hipofilantina
3-4 B	202,6	371681	20,19	0,505	0,249		
3-4 A	203	2000050	42,24	1,056	0,52	0,479	Nirantina
3-4 B	202,6	1669121	35,5	0,888	0,438		
3-28 A	202,3	1342819	27,69	0,692	0,342	0,32	Filantina
3-28 B	201,3	1155323	23,97	0,599	0,298		
3-28 A	202,3	444412	23,97	0,599	0,296	0,279	Hipofilantina
3-28 B	201,3	389554	21,12	0,528	0,262		
3-28 A	202,3	1674630	35,61	0,89	0,44	0,414	Nirantina
3-28 B	201,3	1461173	31,27	0,782	0,388		
4-15 A	202,7	1193534	24,73	0,618	0,305	0,276	Filantina
4-15 B	203,1	960038	20,09	0,502	0,247		
4-15 A	202,7	339350	18,51	0,463	0,228	0,21	Hipofilantina
4-15 B	203,1	283223	15,59	0,39	0,192		
4-15 A	202,7	1550812	33,09	0,827	0,408	0,376	Nirantina
4-15 B	203,1	1295175	27,88	0,697	0,343		
4-38 A	201,7	957955	20,05	0,501	0,249	0,235	Filantina
4-38 B	200,1	842302	17,75	0,444	0,222		
4-38 A	201,7	351028	19,12	0,478	0,237	0,222	Hipofilantina
4-38 B	200,1	302533	16,59	0,415	0,207		
4-38 A	201,7	1342388	28,85	0,721	0,358	0,338	Nirantina
4-38 B	200,1	1174023	25,42	0,635	0,318		

Acesso 7 - 31/01/2006 - 12 dias

Amostra	Massa	Área	Concentração	Concentração	Teor	Teor	Analito
	(mg)		(µg/mL)	(mg/mL)	(% m/m)	(% m/m)	
1-25 A	202,9	1132725	23,52	0,588	0,293	0,275	Filantina
1-25 B	204,2	993042	20,75	0,519	0,258		
1-25 A	202,9	316463	17,32	0,433	0,215	0,209	Hipofilantina
1-25 B	204,2	297513	16,33	0,408	0,203		
1-25 A	202,9	1214083	26,23	0,656	0,326	0,315	Nirantina
1-25 B	204,2	1123250	24,38	0,61	0,304		
1-37 A	201	976706	20,42	0,511	0,252	0,242	Filantina
1-37 B	200,8	908142	19,06	0,477	0,233		
1-37 A	201	295883	16,25	0,406	0,2	0,197	Hipofilantina
1-37 B	200,8	288773	15,88	0,397	0,194		
1-37 A	201	1215980	26,27	0,657	0,324	0,316	Nirantina
1-37 B	200,8	1164576	25,22	0,631	0,309		
2-10 A	202,3	2409687	48,88	1,222	0,604	0,568	Filantina
2-10 B	204,5	2138231	43,49	1,087	0,532		

2-10 A	202,3	364692	19,83	0,496	0,245	0,232	Hipofilantina
2-10 B	204,5	327733	17,9	0,448	0,219		
2-10 A	202,3	2160968	45,52	1,138	0,563	0,536	Nirantina
2-10 B	204,5	1968944	41,61	1,04	0,509		
2-31 A	201,4	790674	16,73	0,418	0,208	0,185	Filantina
2-31 B	203,1	609688	13,13	0,328	0,162		
2-31 A	201,4	319222	17,46	0,437	0,217	0,195	Hipofilantina
2-31 B	203,1	252831	14,01	0,35	0,172		
2-31 A	201,4	1223730	26,43	0,661	0,328	0,293	Nirantina
2-31 B	203,1	952552	20,91	0,523	0,257		
3-9 A	204,2	1314872	27,14	0,678	0,332	0,335	Filantina
3-9 B	201,2	1313085	27,1	0,678	0,337		
3-9 A	204,2	356549	19,4	0,485	0,238	0,238	Hipofilantina
3-9 B	201,2	351833	19,16	0,479	0,238		
3-9 A	204,2	1435330	30,74	0,768	0,376	0,378	Nirantina
3-9 B	201,2	1427387	30,58	0,764	0,38		
3-21 A	201,2	940438	19,7	0,493	0,245	0,212	Filantina
3-21 B	204,1	688055	14,69	0,367	0,18		
3-21 A	201,2	369851	20,1	0,502	0,25	0,216	Hipofilantina
3-21 B	204,1	269714	14,89	0,372	0,182		
3-21 A	201,2	1297033	27,92	0,698	0,347	0,304	Nirantina
3-21 B	204,1	975011	21,36	0,534	0,262		
4-8 A	202,4	1267384	26,2	0,655	0,324	0,347	Filantina
4-8 B	203,1	1464139	30,1	0,753	0,371		
4-8 A	202,4	375952	20,41	0,51	0,252	0,271	Hipofilantina
4-8 B	203,1	436469	23,56	0,589	0,29		
4-8 A	202,4	1088057	23,67	0,592	0,292	0,313	Nirantina
4-8 B	203,1	1254993	27,07	0,677	0,333		
4-36 A	202,8	1429108	29,41	0,735	0,363	0,369	Filantina
4-36 B	203	1482749	30,47	0,762	0,375		
4-36 A	202,8	348655	18,99	0,475	0,234	0,237	Hipofilantina
4-36 B	203	358588	19,51	0,488	0,24		
4-36 A	202,8	1277693	27,53	0,688	0,339	0,345	Nirantina
4-36 B	203	1321201	28,42	0,71	0,35		

Acesso 14 - 28/01/2006 - 9 dias

Amostra	Massa	Área	Concentração	Concentração	Teor	Teor	Analito
	(mg)		(µg/mL)	(mg/mL)	(% m/m)	(% m/m)	
1-32 A	203,5	2136539	43,46	1,086	0,534	0,54	Filantina
1-32 B	200,6	2154950	43,82	1,096	0,546		
1-32 A	203,5	166298	9,51	0,238	0,117	0,117	Hipofilantina
1-32 B	200,6	164235	9,4	0,235	0,117		
1-32 A	203,5	2023970	42,73	1,068	0,525	0,528	Nirantina
1-32 B	200,6	2018736	42,62	1,066	0,531		
1-39 A	202,4	3054691	61,69	1,542	0,762	0,713	Filantina
1-39 B	202,1	2649802	53,65	1,341	0,664		
1-39 A	202,4	113964	6,78	0,17	0,084	0,078	Hipofilantina
1-39 B	202,1	95096	5,8	0,145	0,072		

1-39 A	202,4	1850698	39,2	0,98	0,484	0,451	Nirantina
1-39 B	202,1	1581534	33,72	0,843	0,417		
2-5 A	201	6322302	126,59	3,165	1,575	1,484	Filantina
2-5 B	203,2	5649547	113,23	2,831	1,393		
2-5 A	201	100299	6,07	0,152	0,076	0,072	Hipofilantina
2-5 B	203,2	91586	5,62	0,14	0,069		
2-5 A	201	3220542	67,1	1,677	0,835	0,792	Nirantina
2-5 B	203,2	2920288	60,98	1,525	0,75		
2-12 A	202,7	6664461	133,39	3,335	1,645	1,723	Filantina
2-12 B	204	7347976	146,96	3,674	1,801		
2-12 A	202,7	54709	3,7	0,093	0,046	0,046	Hipofilantina
2-12 B	204	57488	3,85	0,096	0,047		
2-12 A	202,7	2144299	45,18	1,129	0,557	0,59	Nirantina
2-12 B	204	2423652	50,87	1,272	0,623		
3-17 A	200,4	6104581	122,27	3,057	1,525	1,409	Filantina
3-17 B	200,7	5177247	103,85	2,596	1,294		
3-17 A	200,4	53082	3,62	0,09	0,045	0,043	Hipofilantina
3-17 B	200,7	45227	3,21	0,08	0,04		
3-17 A	200,4	2068876	43,64	1,091	0,544	0,5	Nirantina
3-17 B	200,7	1722211	36,58	0,915	0,456		
3-18 A	203,2	3446241	69,47	1,737	0,855	0,856	Filantina
3-18 B	204,7	3479539	70,13	1,753	0,857		
3-18 A	203,2	247705	13,74	0,344	0,169	0,17	Hipofilantina
3-18 B	204,7	252556	13,99	0,35	0,171		
3-18 A	203,2	2130087	44,89	1,122	0,552	0,553	Nirantina
3-18 B	204,7	2150147	45,3	1,132	0,553		
4-11 A	200,9	2780234	56,24	1,406	0,7	0,677	Filantina
4-11 B	200,8	2596060	52,58	1,315	0,655		
4-11 A	200,9	251901	13,96	0,349	0,174	0,169	Hipofilantina
4-11 B	200,8	236955	13,18	0,33	0,164		
4-11 A	200,9	1868426	39,56	0,989	0,492	0,483	Nirantina
4-11 B	200,8	1795350	38,07	0,952	0,474		
4-38 A	200,4	5923243	118,67	2,967	1,48	1,43	Filantina
4-38 B	202,3	5571765	111,69	2,792	1,38		
4-38 A	200,4	325054	17,77	0,444	0,222	0,212	Hipofilantina
4-38 B	202,3	298036	16,36	0,409	0,202		
4-38 A	200,4	2092232	44,12	1,103	0,55	0,53	Nirantina
4-38 B	202,3	1948589	41,19	1,03	0,509		

Acesso 14 - 31/01/2006 - 12 dias

Amostra	Massa	Área	Concentração	Concentração	Teor	Teor	Analito
	(mg)		(µg/mL)	(mg/mL)	(% m/m)	(% m/m)	
1-3 A	201,4	4954943	99,44	2,486	1,234	1,253	Filantina
1-3 B	202	5121351	102,74	2,569	1,272		
1-3 A	201,4	516457	27,72	0,693	0,344	0,351	Hipofilantina
1-3 B	202	539844	28,94	0,723	0,358		
1-3 A	201,4	4766108	98,58	2,464	1,224	1,246	Nirantina
1-3 B	202	4961425	102,56	2,564	1,269		

1-36 A	203,1	3216304	64,9	1,623	0,799	0,789	Filantina
1-36 B	202,9	3129098	63,17	1,579	0,778		
1-36 A	203,1	115184	6,85	0,171	0,084	0,082	Hipofilantina
1-36 B	202,9	108682	6,51	0,163	0,08		
1-36 A	203,1	1679851	35,72	0,893	0,44	0,432	Nirantina
1-36 B	202,9	1620552	34,51	0,863	0,425		
2-2 A	204,5	5094195	102,2	2,555	1,249	1,209	Filantina
2-2 B	202,9	4724309	94,85	2,371	1,169		
2-2 A	204,5	44734	3,18	0,08	0,039	0,039	Hipofilantina
2-2 B	202,9	45259	3,21	0,08	0,04		
2-2 A	204,5	2003724	42,32	1,058	0,517	0,493	Nirantina
2-2 B	202,9	1793379	38,03	0,951	0,469		
2-30 A	203	6049441	121,17	3,029	1,492	1,518	Filantina
2-30 B	201,9	6224343	124,65	3,116	1,543		
2-30 A	203	53894	3,66	0,091	0,045	0,045	Hipofilantina
2-30 B	201,9	53290	3,63	0,091	0,045		
2-30 A	203	2076696	43,8	1,095	0,539	0,543	Nirantina
2-30 B	201,9	2094096	44,16	1,104	0,547		
3-1 A	203,6	5726101	114,75	2,869	1,409	1,38	Filantina
3-1 B	203,5	5488714	110,04	2,751	1,352		
3-1 A	203,6	49216	3,42	0,085	0,042	0,042	Hipofilantina
3-1 B	203,5	48354	3,37	0,084	0,041		
3-1 A	203,6	2045436	43,17	1,079	0,53	0,518	Nirantina
3-1 B	203,5	1950522	41,23	1,031	0,507		
3-37 A	201,9	6137716	122,93	3,073	1,522	1,554	Filantina
3-37 B	203,5	6447458	129,08	3,227	1,586		
3-37 A	201,9	47558	3,33	0,083	0,041	0,042	Hipofilantina
3-37 B	203,5	49362	3,42	0,086	0,042		
3-37 A	201,9	2060504	43,47	1,087	0,538	0,547	Nirantina
3-37 B	203,5	2150537	45,31	1,133	0,557		
4-10 A	201,4	4206898	84,58	2,114	1,05	1,117	Filantina
4-10 B	203	4793367	96,23	2,406	1,185		
4-10 A	201,4	43846	3,14	0,078	0,039	0,04	Hipofilantina
4-10 B	203	48393	3,37	0,084	0,042		
4-10 A	201,4	1750189	37,15	0,929	0,461	0,495	Nirantina
4-10 B	203	2033803	42,93	1,073	0,529		
4-29 A	204,8	5426865	108,81	2,72	1,328	1,321	Filantina
4-29 B	202,7	5309752	106,48	2,662	1,313		
4-29 A	204,8	43871	3,14	0,078	0,038	0,038	Hipofilantina
4-29 B	202,7	43060	3,1	0,077	0,038		
4-29 A	204,8	1816561	38,5	0,963	0,47	0,463	Nirantina
4-29 B	202,7	1741516	36,98	0,924	0,456		