

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

Propriedades bioativas e composição fenólica de Lotus spp.

Ricardo Antunes Flores

Passo Fundo

2018

Ricardo Antunes Flores

Propriedades bioativas e composição fenólica de Lotus spp.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, como requisito parcial para obtenção de título de Doutor em Agronomia.

Orientadora: Simone Meredith Scheffer Basso
Coorientadora: Charise Dallazem Bertol

Passo Fundo

2018

CIP – Catalogação na Publicação

F634p Flores, Ricardo Antunes
Propriedades bioativas e composição fenólica de Lotus
spp. / Ricardo Antunes Flores. – 2018.
92 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Simone Meredith Scheffer Basso.
Coorientadora: : Charise Dallazem Bertol.
Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de
Passo Fundo, 2018.

1. Lotus. 2. Fenóis. 3. Compostos bioativos das plantas.
I. Basso, Simone Meredith Scheffer, orientadora. II. Bertol,
Charise Dallazem, coorientadora. III. Título.

CDU: 633.3

ATA DE DEFESA DE TESE



A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a tese

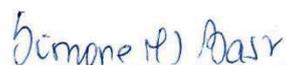
Propriedades bioativas e composição fenólica de *Lotus* spp.

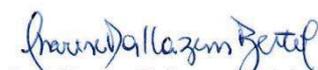
Elaborada por

Ricardo Antunes Flores

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
"Doutor em Agronomia – Área de Produção e Proteção de Plantas"

Aprovada em: 11/05/2018
Pela Comissão Examinadora


Dra. Simone Meredith Scheffer Basso
Presidente da Comissão Examinadora
Orientadora


Dra. Charise Dallazem Bertol
Universidade de Passo Fundo
Coorientadora


Dr. Luiz Carlos Kreutz
Universidade de Passo Fundo


Dra. Angela Maria Moro
Faculdade Especializada na Área de Saúde
do Rio Grande do Sul


Dra. Fabiana Tonial
Universidade de Passo Fundo


Dr. Edson Campanhola Bortoluzzi
Coordenador PPGAgro


Dr. Hélio Carlos Rocha
Diretor da Faculdade de Agronomia e Medicina
Veterinária, Universidade de Passo Fundo

DEDICATÓRIA

Dedico em especial àqueles que sempre me incentivaram de forma incessante, que sempre fizeram o melhor por mim, que sempre foram amáveis e meu motivo de inspiração: à minha amada família (Paula Wiethölter, uma esposa dedicada e amorosa, ao Fernando e o Bernardo, meu filhos queridos, luzes da minha vida, meus amores incondicionais).

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar a Deus, que me agraciou com uma maravilhosa família, motivação de todos os dias, luz de esperança e paz.

À minha esposa Paula, por todo o seu amor, pela sua dedicação e incentivo ao meu trabalho e aos meus estudos.

Aos meus filhos, Fernando e Bernardo. Ver o rosto deles todos os dias faz de mim a pessoa mais realizada do mundo, não temo nenhuma dificuldade, pois acredito em um mundo melhor, sei que posso esperar por um futuro promissor, vem deles a minha motivação de vida.

Ao meu pai, Ari Flores (*in memoriam*), que sempre me apoiou, nunca demonstrou fraquezas para criar seus filhos. A ele, meu eterno agradecimento, pois me ensinou tudo o que se precisa saber para viver. À minha mãe, Mirian, pela sua dedicação, por abrir mão de sua profissão e dedicar-se aos filhos.

À minha orientadora, professora Dra. Simone Meredith Scheffer Basso, exemplo de profissional competente, minha referência acadêmica.

À professora Dra. Charise Dallazem Bertol, pela sua dedicação, pela sua competência e persistência em me co-orientar por todo o período desta pós-graduação.

Às professoras Dra. Fabiana Tonial e Dra. Maria Tereza Fredrich, pelo auxílio e por todos os ensinamentos.

Ao professor Dr. Luiz Carlos Kreutz, por fazer parte de minha formação e pelas orientações em meu trabalho.

Ao Prof. Sérgio Benvegnu, pela orientação técnica de parte de minha pesquisa.

A Faculdade Especializada na Área da Saúde (FASURGS), pelo apoio em meus estudos e pelo empréstimo do Laboratório Multidisciplinar para a realização do ensaio de bioatividade.

Ao meu sogro, Dr. Sírio Wietholter, por me auxiliar a tomar conta das plantas, com todo o seu conhecimento e experiência na área de ciência do solo. Sem dúvidas, as suas contribuições e ensinamentos foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. À minha sogra, Araci (*in memoriam*), que mesmo adoentada, sempre me motivou a buscar soluções para as dificuldades da vida.

Aos meus irmãos e suas esposas, aos meus cunhados e a todos os meus sobrinhos, agradeço por todo o apoio e carinho.

Aos meus colegas do PPGAgro e às estagiárias Aline Camilotti Gaio e Angélica Wagner da Costado, do curso de Farmácia da UPF, que sempre foram dedicadas e competentes em suas atividades.

À UPF e à Capes, pela concessão da taxa escolar.

EPIGRAFE

“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro” (Albert Einstein).

“A educação tem raízes amargas, mas os seus frutos são doces” (Aristóteles).

RESUMO

Lotus spp. são leguminosas forrageiras que se destacam mundialmente pelo seu valor nutritivo, versatilidade de uso, tolerância à acidez do solo e, principalmente, por não provocarem timpanismo. Essa característica deve-se à presença de taninos condensados (proantocianidinas), que impedem a formação de espuma no rúmen. No entanto, os cornichões, como são denominadas as espécies desse gênero, sintetizam outros metabólitos secundários além dos taninos, como ácidos fenólicos e flavonoides, cujas propriedades bioativas poderiam ser exploradas nos programas de melhoramento genético e na indústria farmacêutica. Este trabalho teve como objetivo avaliar há variabilidade em *Lotus* spp. quanto à composição fitoquímica e propriedades bioativas. Para isso, foram testadas as cultivares UFRGS (Brasil) e São Gabriel (Brasil), de *Lotus corniculatus* L., e as cultivares Maku (Nova Zelândia) e Serrano (Brasil) de *Lotus uliginosus* Schkuhr., em quatro experimentos. No Experimento I foram validados, por cromatografia líquida de alta eficiência, dois monômeros de prodelfinidinas (galocatequina e epigalocatequina), obedecendo aos parâmetros de linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez. O Experimento II objetivou verificar se a concentração dos monômeros de proantocianidinas (catequina, epicatequina, galocatequina e epigatocatequina), de ácidos fenólicos e do flavonoide 'rutina' variava de acordo com o genótipo e o estágio fenológico em que era colhido o material vegetal (estádio vegetativo; estágio reprodutivo). No Experimento III foi avaliada a atividade antimicrobiana de extratos fracionados de *Lotus* spp. frente à *Enterococcus faecalis*, *Escherchia coli*, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans* e *Penicilium* sp, pelos testes de disco-difusão e microdiluição. No Experimento IV avaliou-se o efeito de extratos fracionados, em sete concentrações, para investigar sua toxicidade, sobre a viabilidade celular em uma linhagem de células de rim bovino (MDBK). Os resultados mostraram que a concentração de catequina e epicatequina foi maior na cv. UFRGS apresentou os melhores níveis nos dois estádio fenológicos, assim como a cv. Serrano, que apresentou a melhor relação galocatequina e epigalocatequina. Em relação a concentração dos monômeros de ácidos fenólicos, a cv. São Gabriel apresentou os maiores níveis nos dois estádios fenológicos avaliados. Para o flavonoide rutina, a cv. Maku apresentou 0,161 g/kg de matéria seca no estádios vegetativo e, no estádio de florescimento, a cv. São Gabriel apresentou 1,3 g/kg matéria seca. Em relação ao teste antibacteriano, todas as frações de extratos apresentaram inibição, mas a cv. UFRGS foi a mais bioativa para *E. faecalis*, enquanto que para *E. coli*, a cultivar Serrano apresentou os melhores níveis de inibição de crescimento bacteriano. Em relação a atividade antifúngica, os extratos bruto, acetato de etila e aquoso da cv. São Gabriel apresentaram os melhores níveis de inibição de crescimento para a *C. albicans*, enquanto que a cv. Maku se destacou no extrato hexano e a cultivar Serrano no extrato diclorometano. Em relação ao teste de viabilidade celular, a cv. São Gabriel apresentou concentração

citotóxica nas frações hexano, diclorometano e butanol, enquanto que os extratos da fração acetato de etila de todas as cultivares não apresentou nenhuma ação tóxica as células MDBK. Sendo assim, conclui-se que as cultivares do gênero *Lotus* spp. avaliadas apresentaram diferenças intraespecíficas para todos os critérios avaliados.

Palavras-chave: 1. Citotoxicidade. 2. Compostos fenólicos. 3. *Lotus corniculatus*. 4. *Lotus uliginosus*. 5. Viabilidade celular.

ABSTRACT

Lotus spp. represents an important kind among the leguminous pastures in the south of Brazil. Among its characteristics, the presence of diverse secondary metabolites stands out, such as tannins, phenolic acids and flavonoids, which may be responsible for many benefits to the animal and human organisms, representing an important product for the genetic improvement and, consequently, for the pharmaceutical industry. Seeking to pursue this theme, this work had the overall goal of evaluating if there is an intra and interspecific variability in *Lotus* spp. related to the phytochemical composition and bioactive properties. In order to achieve that, four cultivars of the *Lotus* kind were selected, with two of them being of the *Lotus corniculatus* L. species (UFRGS and São Gabriel) and two of them of the *Lotus uliginosus* Schkuhr. species (Maku and Serrano). For the execution of the research, four experiments were carried out, with Experiment 1 evaluating two tannin monomers in CLAE (gallocatechin and epigallocatechin) in which the evaluated parameters were the ones of linearity, detection limit, quantification limit, precision, accuracy, and robustness. Experiment 2 aimed to quantify the concentration of tannin monomers, phenolic acids and a flavonoid in the four cultivars mentioned before, in two phenological stages. Experiment 3 evaluated the antimicrobial (antibacterial and antifungal) of six fractioned extracts, obtained in the cultivars mentioned before, which were tested for *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans* and *Penicilium* sp. through the tests of disk-diffusion and microdilution. Experiment 4 evaluated the cellular viability, using five extracts and seven concentrations, before the cellular lineage of the bovine kidney (MDBK). The results showed that, regarding the catechin and epicatechin concentration, the cv. UFRGS presented the best levels on both phenological stages, as well as cv. Serrano, which presented the best gallocatechin and epigallocatechin relationship. Regarding the concentration of the phenolic acid monomers, cv. São Gabriel presented the highest levels within the two phenological stages assessed. For the rutin flavonoid, cv. Maku presented 0,161 g/kg of dry mass in the vegetative stage and, in the flowering state, cv. São Gabriel presented 1,3 g/kg of dry mass. Regarding the antibacterial test, all extract fractions presented inhibition, but the cv. UFRGS was the most bioactive for *E. faecalis*, while for the *E. coli*, the Serrano cultivar presented the best levels of inhibition of bacterial growth. Regarding the antifungal activity, the raw extracts, the ethyl and aqueous acetate of cv. São Gabriel presented the best levels of growth inhibition for the *C. albicans*, while cv. Maku stood out in the hexane extract and the Serrano cultivar in the dichloromethane extract. Regarding the cellular viability test, cv. São Gabriel presented cytotoxic concentration in the hexane, dichloromethane and butanol fractions, while the extracts of the ethyl acetate fraction of all cultivars did not present any toxic action to the MDBK cells. Therefore, it was concluded that the cultivars of the *Lotus* spp. type evaluated presented intraspecific differences for all assessed criteria.

Key words: 1. Cytotoxicity. 2. Phenolic Compounds. 3. *Lotus corniculatus*. 4. *Lotus uliginosus*. 5. Cellular viability.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1	<i>Importância do gênero Lotus L.</i>	17
2.2	<i>Compostos fenólicos</i>	19
2.2.1	Taninos	21
2.2.2	Ácidos fenólicos	213
2.2.3	Flavonoides	234
2.3	Propriedades terapêuticas e bioativas de Lotus spp.	26
3	MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1	<i>Local e período</i>	29
3.2	<i>Cultivares de Lotus spp.</i>	29
3.3	<i>Cultivo das plantas e obtenção do material vegetal</i>	30
3.4	<i>Experimento 1 - Validação de métodos analíticos por CLAE para determinação de prodelfinidinas em Lotus spp.</i>	302
3.4.1	Cromatografia líquida de alta eficiência	322
3.4.2	Validação do método	322
3.5	<i>Experimento 2 - Determinação de compostos fenólicos em extratos metanólicos de Lotus spp.</i>	35
3.5.1	Extratos	35
3.6	<i>Experimento 3 - Bioatividade de extratos fracionados de Lotus spp.</i>	37
3.6.1	Material vegetal	37
3.6.2	Tratamentos	377
3.6.3	Obtenção dos extratos	377
3.6.4	Atividade antimicrobiana de extratos fracionados de Lotus spp.	38
3.7	<i>Experimento 4 - Atividade citotóxica de extratos fracionados de Lotus spp.</i>	402
3.7.1	Local e período	422
3.7.2	Extratos de Lotus spp.	42
3.7.3	Teste de viabilidade celular de extratos fracionados de Lotus spp.	44

3.7.4	Análise estatística	45
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1	<i>Validação dos métodos analíticos por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de prodelfinidinas</i>	46
4.2	<i>Composição fenólica de extratos metanólicos de cultivares de Lotus spp. colhidas em distintos estádios fenológicos</i>	469
4.3	<i>Atividade antimicrobiana de extratos fracionados de Lotus spp.</i>	57
4.3.1	Ação antibacteriana	57
4.3.2	Atividade antifúngica	658
4.4	<i>Experimento 4 – Teste de viabilidade celular de extratos fracionados de Lotus spp.</i>	68
5	CONCLUSÃO	79
	REFERÊNCIAS	80

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Lotus* L. engloba importantes leguminosas temperadas cultivadas mundialmente como plantas forrageiras, das quais se destacam o cornichão (*L. corniculatus* L.) e o cornichão-dos-banhados (*L. uliginosus* Schkuhr; *L. pedunculatus* Cav.). Com origem na região do Mediterrâneo e Europa, elas apresentam excelente adaptação às regiões temperadas da América do Sul, onde são utilizadas como melhoradas de pastagens naturais.

A sua importância como pastagem se deve ao seu potencial nutritivo, uma vez que os cornichões são ricos em proteína, além do seu valor biológico como melhoradoras da fertilidade do solo, já que são plantas fixadoras de nitrogênio. No entanto, uma das principais qualidades dessas leguminosas é que elas não causam timpanismo. Essa característica decorre das espécies de *Lotus* L. possuírem taninos condensados (proantocianidinas), que, ao se complexarem com as proteínas, inibem a formação de espuma no rúmen.

Os cornichões têm sido objeto de pesquisas relativas à biossíntese de compostos fenólicos e ao seu valor fitoterápico. Essas substâncias são responsáveis por diversos benefícios ao organismo animal e humano, representando um produto importante para o melhoramento genético e, conseqüentemente, para a indústria farmacêutica. Os compostos fenólicos têm propriedades antimicrobianas, antiulcerogênicas, citotóxicas, antineoplásicas, antioxidantes, antihepatotóxicas, antihipertensivas, hipolipidêmicas, antiinflamatórias e antiplaquetárias. Por esses fatores, existe um grande interesse da indústria farmacêutica na produção de medicamentos e suplementos alimentares.

Considerando que as informações sobre as cultivares brasileiras de *L. corniculatus* (cv. São Gabriel e cv. UFRGS) e de *L. uliginosus* (cv. Serrano) são, ainda, restritas quanto ao perfil fenólico e à bioatividade frente aos microorganismos, este trabalho foi planejado

para responder a seguinte pergunta: há efeito genotípico em *Lotus* spp. quanto à concentração fenólica e bioatividade de extratos elaborados com a parte aérea das plantas?

A hipótese que norteou este estudo foi a de que se há efeito genotípico em *Lotus* spp. quanto à concentração de compostos fenólicos e à bioatividade de extratos elaborados com a parte aérea das plantas, pelo menos um genótipo se distingue dos demais quanto ao teor de ácidos fenólicos, de flavonoides e/ou proantocianidinas, bem como em relação à atividade antimicrobiana e citotóxica, quando comparado com outros três genótipos de *Lotus* spp.

Nessa perspectiva, objetivou-se avaliar-se duas cultivares de *L. corniculatus* e duas cultivares de *L. uliginosus* quanto à composição fenólica e às propriedades bioativas. Para isso foram desenvolvidas atividades de pesquisa com intuito de: a) validar um método de determinação de galocatequina e epigalocatequina por cromatografia líquida de alta eficiência; b) verificar se existe diferença entre as cultivares São Gabriel (*L. corniculatus*), UFRGS (*L. corniculatus*), Maku (*L. uliginosus*) e Serrano (*L. uliginosus*) quanto à concentração de compostos fenólicos em extratos metanólicos elaborados com material vegetal colhido em plantas de distintos estádios fenológicos; c) testar se o genótipo altera a atividade antimicrobiana e a citotoxicidade de frações dos extratos elaborados com a parte aérea das cultivares.

Os resultados do estudo podem subsidiar pesquisas farmacêuticas visando a fabricação de medicamentos fitoterápicos de uso veterinário ou formulações para controle de patógenos na agricultura, bem como para os programas de melhoramento genético de *Lotus* spp. Os genótipos que tiveram características químicas e bioativas desejáveis poderão ser usados para cruzamentos, além de poderem ter seu valor agregado, visto que na escolha das plantas para compor as pastagens pode ser usado como um dos critérios a atividade antimicrobiana da cultivar e a concentração fenólica.

A estrutura deste documento se configura da seguinte forma: a primeira secção é composta por esta introdução; na segunda secção é apresentada a revisão da literatura, abordando a importância do gênero Lotus, os metabólitos secundários e sua relação com as propriedades terapêuticas e bioativas; na terceira secção, apresentam-se os materiais e métodos; na quarta, são apresentados os resultados e discussão e, por fim, são feitas as conclusões.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Importância do gênero *Lotus* L.

O gênero *Lotus* L. possui dois centros de origem principais, a região Mediterrânea, que se estende aos desertos africanos e áreas temperadas da Ásia, e a região Oeste da América do Norte (DAVYT; IZAGUIRRE, 1997). Suas espécies, popularmente denominadas ‘cornichões’, tem duração anual ou perene, exibem diversidade de formas e adaptam-se a vários ambientes, com exceção de regiões frias do Ártico e áreas de várzeas tropicais da Ásia, centro e sul da América (ARAMBARRI, 1999). Apesar das espécies anuais apresentarem um enorme potencial em relação à tolerância ao alumínio, manganês e cloretos de sódio, a única espécie anual utilizada mundialmente é o cornichão-anual (*L. subbiflorus* Lag.), representado pela cv. El Rincón (BLUMENTHAL; MCGRAW, 1999).

As principais espécies de *Lotus* spp. quanto à produção de forragem são *L. corniculatus*, *L. glaber* Mill., *L. subbiflorus* e *L. uliginosus* (KIRKBRIDE, 1999). São, também, aquelas que se destacam pela adaptação à moderada acidez do solo (BLUMENTHAL; MCGRAW, 1999). Martins (2009) aponta que essas quatro espécies crescem em condições naturais ou em pastagens cultivadas e a sua distribuição varia de acordo com as condições locais de solo e clima.

O cornichão (*L. corniculatus*) é a principal espécie do gênero a considerar pelo volume de publicações e cultivares desenvolvidas mundialmente. É usada para formação de pastagens perenes em regiões de clima temperado (BALL; HOVELAND; LACEFIELD, 2007) e possui valor nutritivo semelhante ao da alfafa (*Medicago sativa* L.), com a vantagem de ser menos exigente em relação à fertilidade e não provocar

timpanismo. É uma planta perene que pode persistir na pastagem por meio da sobrevivência da planta-mãe e por ressemeadura natural. A durabilidade depende do vigor e da sanidade da coroa, que se localiza entre a raiz e o caule, delimitada pelo nó cotiledonar (MARQUES-ORTIZ; JOHNSON; BARNES, 1996). No Brasil, a história dessa leguminosa iniciou a partir de 1955, na Estação Experimental de São Gabriel, no Rio Grande do Sul, onde foi desenvolvida a cv. São Gabriel (PAIM, 1988).

Já, para locais úmidos, a espécie mais adaptada é *L. uliginosus*, aqui denominada cornichão-dos-banhados. Na literatura inglesa é referida como ‘big-trefoil’, ‘greater bird's-foot-trefoil’ ou ‘marsh bird's-foot trefoil’. No Brasil, seu cultivo teve início na década de 80, com a introdução de uma cultivar desenvolvida na Nova Zelândia, a cv. Maku. Apesar da boa qualidade de forragem e das características de adaptação a solos pobres e pouco drenados, essa cultivar apresenta algumas limitações, como o lento estabelecimento, a baixa produção de sementes e de difícil colheita, o que restringiu seu uso (PAIM; RIBOLDI, 1991). Para resolver o problema da pouca formação de sementes devido ao esparso florescimento que exibia nas condições subtropicais do Brasil, a Epagri desenvolveu a cv. Serrano, a partir da cv. Maku. Esse material foi registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento pela denominação ‘SCS313 Serrano’.

Na Austrália, o interesse por *Lotus* spp. aumentou com o reconhecimento de suas características, como não provocar timpanismo, aumentar a absorção de aminoácidos no rúmen, ser resistente a insetos, possuir habilidade de superar as produções de trevo-branco (*Trifolium repens* L.) em solos com pH inferior a 5,2, tolerar solos alagados e ser eficiente na absorção de fósforo (HARRIS; BLUMENTHAL; SCOOT, 1993). As espécies de *Lotus* L. apresentam uma série de vantagens que podem permitir o seu sucesso na região do Conesul, tais como boa produção de forragem em relação a outras leguminosas, crescimento sob baixa disponibilidade de fósforo e melhor adaptabilidade a solos ácidos (RISSO; CARAMBULA, 1998).

Os cornichões são leguminosas ricas em taninos condensados ou proantocianidinas. Esses compostos fazem parte do metabolismo secundário dessa

espécie, são polímeros de flavonoides considerados importantes, por possuírem muitas atividades biológicas (DIXON; XIE; SHARMA, 2005). No metabolismo animal, as proantocianidinas promovem aumento da absorção de aminoácidos, como a metionina e a cisteína, aumento da taxa de ovulação, ganho de peso e produção de leite (WAGHORN; McNABB, 2003). Os taninos condensados são um dos principais compostos fenólicos em *Lotus* spp. e sua concentração pode alcançar até 300 g/kg de matéria seca (WAGHORN, 2007). Esses compostos reduzem o conteúdo de proteína não degradada no rúmen (MARTINS, 2009), regulam o consumo das plantas pelos animais, permitindo maior persistência das espécies na pastagem.

2.2 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são originados do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução (NACZK; SHAHIDI, 2004). Esse grupo de compostos é importante na proteção das plantas contra os raios ultravioleta, insetos, fungos, vírus e bactérias. Há, ainda, o reconhecido efeito alelopático, atribuído à ação desses compostos sobre outras plantas (PERES, 2004). O conteúdo fenólico presente nos diversos órgãos vegetais pode ser influenciado por fatores como a maturação, a espécie vegetal, as práticas de cultivo, as condições de colheita e o processo de armazenamento (SOARES et al., 2008).

Quimicamente, os compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Possuem estrutura variável e com isso, são multifuncionais. Existem cerca de cinco mil fenóis, dentre eles, destacam-se os flavonóides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis. Os compostos fenólicos de maior ocorrência natural apresentam-se conjugados com mono e polissacarídeos, através de um ou mais dos grupos fenólicos, e podem também ocorrer como derivados funcionais, como ésteres e metil ésteres (LEE; UMANO; SHIBAMOTO, 2005).

Ribéreau-Gayon (1968) propôs uma classificação para os compostos fenólicos em três categorias: os pouco distribuídos na natureza, os polímeros e os largamente distribuídos na natureza. Na categoria dos compostos fenólicos pouco distribuídos na natureza estão os fenóis simples, o pirocatecol, a hidroquinona e o resorcinol. Pertencem

ainda a essa família os aldeídos derivados dos ácidos benzóicos, que são constituintes dos óleos essenciais, como a vanilina (SOARES, 2002).

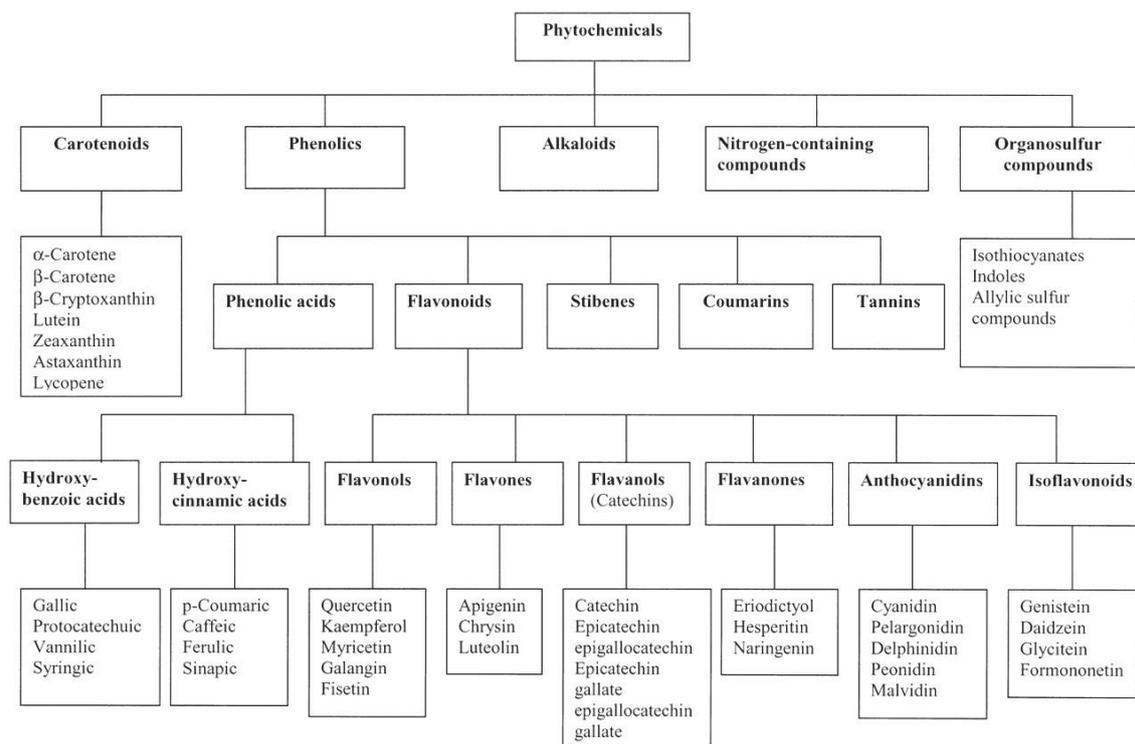
Os polímeros são compostos fenólicos que não se apresentam na forma livre nos tecidos vegetais, englobando os taninos e as ligninas (ANGELO; JORGE, 2007). Já, na família dos compostos largamente distribuídos na natureza, estão aqueles encontrados em todo reino vegetal, porém que podem estar localizados em uma só planta (KING; YOUNG, 1999). Nesse grupo estão os flavonóides (antocianinas, flavonóis e seus derivados), ácidos fenólicos (ácidos benzóico, cinâmico e seus derivados) e cumarinas.

Os polifenóis compreendem o maior grupo de compostos bioativos dos vegetais, sendo subdivididos em classes de acordo com a estrutura química de cada substância. Os principais são: a) ácidos fenólicos, como por exemplo, o ácido clorogênico, presente no café (*Coffea* spp.); b) cumarinas, como as furanocumarinas presentes no aipo; c) ligninas, como as lignanas da linhaça; e d) flavonoides, presentes principalmente em frutas, hortaliças e chás (FALLER; FIALHO, 2009).

A diversidade estrutural dos compostos fenólicos deve-se à grande variedade de combinações que acontecem na natureza, resultando nos compostos chamados de polifenóis. As combinações fenólicas podem ser categorizadas em várias classes e, dentre os compostos fenólicos destacam-se os flavonoides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis como os mais comuns antioxidantes fenólicos de fonte natural (KING; YOUNG, 1999).

Os polifenóis são classificados em quatro classes em função do número de anéis de fenol que contém e dos elementos estruturais que ligam esses anéis (SOARES et al., 2008): 1) ácidos fenólicos com subclasses, derivados de ácidos hidroxibenzoicos, como ácido gálico e ácido hidroxicinâmico; 2) flavonoides, os quais incluem flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas e flavonóis; 3) estilbenos, cujo representante mais conhecido é o resveratrol; 4) taninos, que são divididos em dois grupos: galotaninos, elagitaninos ou taninos hidrolisáveis (Figura 1).

Figura 1 - Classificação dos principais fitoquímicos alimentares



Fonte: Liu (2004).

2.2.1 Taninos

Os taninos fazem parte dos produtos naturais fenólicos que, por sua vez, possuem o maior peso molecular dentre os compostos fenólicos (de 500 a 3000 Daltons). Esses compostos tem capacidade de formar complexos insolúveis em água com proteínas, gelatinas e alcaloides. Em quantidades e em condições normais nas plantas, os taninos não são tóxicos (ACUÑA; CONCHA; FIGUEROA, 2008). Salminen e Karonem (2011) alertam, contudo, que os taninos que tem habilidade de complexar e precipitar proteínas em meio aquoso representam exceções e podem ser tóxicos. Os taninos podem ser divididos de acordo com sua estrutura química e propriedades em dois grupos: taninos hidrolisados e taninos condensados (COSTA et al., 2008).

Os taninos hidrolisáveis são ésteres do ácido gálico e elágico glicosilados, com origem no ácido chiquímico, em que os grupos hidroxila do açúcar são esterificados com os ácidos fenólicos (MONTEIRO; ALBUQUERQUE; AMORIN, 2005). São constituídos por uma parte polialcoólica e por uma parte fenólica, ligados por uma ligação éster. Esses compostos podem ser degradados por hidrólise química ou enzimática nas várias unidades estruturais que os compõem (PIÑEDO, 2008) e, de acordo com o produto de hidrólise, originam os galotaninos, que produzem ácido gálico, e os elagitaninos, que produzem ácido elágico (GALVEZ; RIEDL; CONNER, 1997). Tais substâncias podem ser classificadas quanto a sua parte fenólica em taninos gálicos (galotaninos), em que a parte fenólica é o ácido gálico, e em taninos elágicos (elagitaninos), em que a parte fenólica, além do ácido gálico, é o ácido hexahidroxi-difênico, que após a hidrólise origina o ácido elágico (SANTOS; MELLO, 2007).

Os taninos condensados são oligômeros e polímeros formados pela ligação de dois ou mais monômeros de flavan-3-ol (catequina). São denominados, também, de proantocianidinas, devido à produção de pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas, tais como cianidina e delphinidina (ZUANAZZI, 2010). A propriedade química mais importante dessa classe de taninos é a habilidade de formar complexos com macromoléculas tais como proteínas e carboidratos, sendo esse, inclusive, o aspecto mais determinante dos efeitos nutricionais e toxicológicos em pequenos ruminantes (OTERO; HIDALGO, 2004). Esses taninos são, por sua vez, classificados de acordo com a presença de OH na posição C-3 do anel B (R3), em prodelfinidina, ou na ausência de OH, em procianidina. Os monômeros de procianidinas são a catequina e a epicatequina e os monômeros de prodelfinidina são a galocatequina e a epigalocatequina (BRUNET; HOSTE, 2006).

Dentre os principais efeitos biológicos dos taninos condensados está a capacidade de ligar-se a parede celular das bactérias presentes no rúmen animal, causando a degradação e inibição do seu crescimento ou de sua atividade enzimática. Além disso, podem se complexar com as proteínas provindas da alimentação, diminuindo a viabilidade dos microrganismos em degradá-las e, com isso, o animal ganha peso mais

rapidamente (WAGHORN, 2007). Os taninos condensados apresentam efeitos biológicos e farmacológicos que incluem atividades antibacterianas e antivirais, efeitos antioxidantes e antiinflamatórios, além de propriedades antimutagênicas e antitumorais (BRUYNE, 1999). Nos animais, os taninos condensados são substâncias importantes que promovem o aumento da absorção de aminoácidos, como a metionina e a cisteína, aumento na taxa de ovulação, ganho de peso e aumento na produção de leite (WAGHORN; McNABB, 2003). Em relação ao efeito antiinflamatório, os taninos condensados são capazes de inibir a óxido-nítrico-sintase-induzida (iNOS), a ciclooxigenase-2 (COX-2), a liberação da proteína C reativa (PCR), e o fator nuclear kappa B (NF-kB) de células hepáticas (GARCÍA-MENDIAVILLA et al., 2007).

2.2.2 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos caracterizam-se por apresentarem em sua estrutura química um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula (SOARES et al., 2008). A estrutura química desse grupo químico consiste de dois grupos, que são derivados do ácido hidroxibenzóico e do ácido hidroxicinâmico. Os ácidos hidroxibenzóicos incluem os ácidos gálico, p-hidroxibenzóico, protocatecuico, vanílico e siríngico, que têm estrutura comum, (C6-C1). Os ácidos hidroxicinâmicos são compostos aromáticos com três carbonos que formam uma cadeia lateral (C6-C3), como os ácidos caféico, ferúlico, p-cumárico e sináptico, sendo os mais comuns (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

Esses ácidos podem apresentar várias atividades biológicas, tais como propriedades antioxidantes, antiinflamatórias, anticarcinogênicas, antibacterianas e antifúngicas (CHOI et al., 2007). Nas plantas, essas substâncias se acumulam em vários órgãos e não apresentam uma distribuição homogênea nos tecidos vegetais. A maior parte dos ácidos fenólicos encontra-se associada a componentes estruturais, enquanto que alguns se encontram na forma de flavonoides e uma minoria como ácidos livres (ZADERNOWSKI; NACZK; NESTEROWICZ, 2005). Os estádios de maturação das plantas influenciam na concentração desses ácidos, podendo estar associado aos

componentes estruturais, como a lignina, aos polissacarídeos ou a ambos os elementos simultaneamente (SUN; SUN; ZHANG, 2001).

2.2.3 Flavonoides

Os flavonoides são compostos largamente distribuídos no reino vegetal e encontram-se presentes em todas as partes da planta na forma de glicosídeos ou agliconas e são comuns em dietas animais e humanas. Os flavonoides, principalmente as antocianinas e os flavonóis, ocorrem quase que exclusivamente em plantas superiores, atraindo polinizadores e disseminadores de sementes. Além da pigmentação ou da coloração em frutas, flores, sementes e folhas, eles apresentam importantes atividades biológicas, agindo na sinalização entre plantas e micróbios, na defesa como agentes antimicrobianos e na proteção à radiação ultravioleta (SILVA et al., 2015; WINKEL-SHIRLEY, 2002). Dessa forma, a pesquisa com flavonoides é motivada por duas questões principais que são a diversidade estrutural muito ampla e o grande espectro de atividades biológicas atribuídas a substâncias pertencentes a esse grupo.

Os compostos polifenólicos são biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides e do acetato, precursores de vários grupos de substâncias como aminoácidos alifáticos, terpenóides, ácidos graxos, dentre outros (DORNAS et al., 2007). Eles participam de importantes funções no crescimento, desenvolvimento e na defesa dos vegetais contra o ataque de patógenos. Estima-se que mais de oito mil flavonoides já foram identificados. São compostos de baixo peso molecular, consistindo em 15 átomos de carbono, organizados na configuração C6–C3–C6. A estrutura química consiste em dois anéis aromáticos, unidos por três carbonos, formando um anel heterocíclico (MERKEN; BEECHER, 2000; TAPAS; SAKARKAR; KAKDER, 2008; SANDHAR et al., 2011).

Variações no anel heterocíclico (anel C) resultam em importantes classes de flavonóides, como flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis (ou catequinas), isoflavonas e antocianidinas. Já, as substituições dos anéis aromáticos (A e B) originam diferentes

compostos dentro de cada classe de flavonoides, garantindo a grande diversidade estrutural encontrada nos flavonoides. Essas variações ocorrem devido a pequenas modificações químicas na estrutura básica, tais como hidroxilação, metilação, acilação, glicosilação, hidrogenação, malonilações e sulfatações (MACHADO et al., 2008).

Os principais representantes dos flavonoides são: a) catequinas, epicatequinas, luteoforol, procianidinas e theaflavinas; b) flavonas, encontradas quase que exclusivamente em frutas cítricas, sendo a hesperidina e a naringerina seus principais representantes; c) flavonóis: presentes exclusivamente em frutas e folhas, sendo representados pelas quercetinas, rutinas, micertinas e camferóis; d) isoflavonóides, que em alguns casos são chamados de isoflavonas, encontrados nas leguminosas, particularmente na soja [*Glycine max* (L.) Merrill], e representados principalmente pela daidzeína e genisteína (LAZARY, 2010).

Peterson et al. (2003) apontam que os flavonoides apresentam uma série de propriedades farmacológicas que lhes permitem favorecer a saúde humana. As principais classes desses compostos são as antocianinas e as flavonas, encontradas em frutas, chás, lúpulo, nozes e água de coco. Por essa razão, eles vêm despertando um grande interesse visando a comercialização, de acordo com as suas propriedades medicinais. Estudos epidemiológicos mostraram, por exemplo, que dietas ricas nesses compostos estão associadas ao baixo risco de doenças cardiovasculares e algumas formas de câncer (YOCHUM et al., 1999; KNEKT et al., 1996). Entretanto, Silva et al. (2015) afirmam que os estudos avaliando as ações medicinais desses compostos em humanos são escassos, e os que estão relatados na literatura científica são tidos como inconclusivos por muitos especialistas, em função das análises epidemiológicas não terem confirmado a correlação entre o consumo de flavonoides e a melhora da saúde.

As propriedades relacionadas à saúde humana e animal exercidas pelos flavonoides são baseadas principalmente na sua atividade antioxidante, atuando como sequestradores de radicais livres e quelantes de metais nocivos capazes de catalisar a peroxidação de lipídeos (PRIOR; CAO, 2000). Conforme Kim et al. (2004), os

flavonóides apresentam propriedades antiinflamatórias, antitumorais, antimicrobianas, imunomodulatórias e antitrombóticas. Heijnen et al. (2002) demonstraram que a quercetina possui um excelente potencial antioxidante *in vitro*, sendo o flavonoide com o maior poder sequestrador de espécies reativas de oxigênio. Contudo, Silva et al. (2015) alertam que as ações realizadas na planta, bem como o seu potencial medicinal, dependem amplamente do sinergismo entre a estrutura química dos flavonoides e as estruturas químicas de outras classes de compostos, como os terpenos. Ainda não está claro o mecanismo entre a atividade medicinal e a sua estrutura química, mas sabe-se que há diferenças individuais dentro de cada classe desses compostos, que, por sua vez, dependem do estágio fenológico da planta.

2.3 Propriedades terapêuticas e bioativas de *Lotus* spp.

Muitas plantas desempenham um papel crucial na manutenção da vida animal e humana. Durante a evolução humana muitas interações com outros organismos foram estabelecidas com consequências para ambos, de diversas maneiras. As plantas desenvolveram mecanismos bioquímicos para se defender de antagonistas biológicos que atuam como seus inimigos naturais. Esse princípio tem levado os cientistas a procurar compostos bioativos produzidos pelas plantas contra os agentes patogênicos (YOSHIHARA; MINHO; YAMAMURA, 2013).

O uso de plantas contendo compostos bioativos para o controle de helmintos no trato gastrointestinal, seja como opções fitoterápicas ou nutracêuticas, tem sido uma área de pesquisa em crescimento nos últimos anos (SANDOVAL-CASTRO et al., 2012). Nesse sentido, Makkar, Francis e Becker (2007) apontam que o uso de plantas ricas em taninos condensados pode ser indicado como uma alternativa no controle de helmintos em ovinos, por exemplo, reduzindo o uso de produtos químicos, assim como os custos de produção. As espécies de *Lotus* spp. poderiam ser incorporadas na alimentação de ovinos para reduzir a dependência das drogas anti-helmínticas, uma vez que há relatos de que reduzem a carga parasitária (MARLEY et al., 2003; NIEZEN et al., 1998). Extratos de taninos condensados de serradela (*Onobrychis viciifolia* Scop.), cornichão-dos-banhados e cornichão foram testados *in vitro* contra helmintoses provocadas por *Cooperia*

oncophora e *Ostertagia ostertagi*, e ambos mostraram-se eficientes no controle dos vermes (NOVOBILSKY et al., 2011).

Os nematódeos gastrointestinais do abomaso e do intestino delgado representa problema importante na saúde animal. Além disso, o desenvolvimento de resistências anti-helmínticas sido relatado em cabras, ovelhas e gado. Essa é uma razão crucial para encontrar alternativas para drogas químicas. Em estudos *in vitro*, foi demonstrado que os taninos condensados pode reduzir a eclosão dos ovos, a motilidade larval e o desprendimento de larvas infectantes (GIRARDI et al. (2014). Em estudos *in vivo*, os taninos condensados reduziram a quantidade de ovos presentes nas fezes reduzindo o número de vermes adultos no abomaso e no intestino delgado e diminuindo a fertilidade de fêmeas (HOSTE et al., 2006). Shepley et al. (2015) demonstraram que o uso de cornichão reduziu a contagem de ovos fecais de parasitas em novilhas leiteiras sem impacto prejudicial sobre o crescimento dos animais.

Dalmarco et al. (2010) observaram elevada atividade antibacteriana da cv. São Gabriel. Conforme os autores a atividade observada poderia ser atribuída aos compostos bioativos isolados do tipo kaempferitrina e ácido oleanólico que mostraram importantes atividades antibacteriana. Os resultados validam o uso da planta em medicina veterinária e mostra que a kaempferitrina é um dos principais compostos responsáveis pelo efeito antibacteriano. Sendo assim, as espécies de *Lotus* spp. despertam interesse como plantas forrageiras, já havendo relato de sua atividade antioxidante e antiproliferativa (TROUILLAS et al., 2003), atribuída aos taninos condensados (DIXON; XIE; SHARMA, 2005). Reynaud e Lussignol (2005) identificaram em folhas e flores de cornichão flavonoides, como kaempferol e quercetina, o que reforça sua importância como planta bioativa. Girardi et al. (2014) reforçam que as propriedades biológicas do cornichão têm sido atribuída principalmente à presença de taninos condensados, flavonóides e glicosídeos fenólicos.

O cornichão foi utilizado em pesquisas etnomedicinais para problemas da musculatura esquelética, doenças genitais e sexuais, picadas de cobra, dor abdominal e

estômago, e como um sedativo e diurético (ALAMGEER et al., 2013). Efeitos anticancerígenos foi empregado a uma lectina específica de galactose. Foram observadas atividades antiproliferativas e anti-locomção para células cancerosas leucêmicas humanas (THP-1), células do cancro do pulmão (HOP62) e carcinoma colorretal metastático (HCT116), e também característica para indução de apoptose em células THP-1 (RAFIQ et al., 2013). Segundo Waller et al. (2001), algumas cultivares de *Lotus* spp. podem ser tóxicas na presença de enzimas que degradam os glicosídeos cianogênicos, dando origem ao ácido cianídrico, este conhecimento é essencial para a seleção de cultivares não tóxicas a serem cultivadas como forragem ou utilizados para outras finalidades.

O problema da resistência de microrganismos é crescente e a perspectiva futura do uso de drogas, incerta. Por este motivo, torna-se imperativo adotar medidas para enfrentar o problema, entre elas a do controle no uso de medicamentos, a do desenvolvimento de pesquisas para uma melhor compreensão dos mecanismos genéticos da resistência microbiana e a da continuação dos estudos acerca de novas drogas, sejam elas sintéticas ou naturais (NASCIMENTO et al., 2000). Durante as últimas décadas novas doenças infecciosas surgiram e algumas infecções têm reemergido. Neste sentido, há a perspectiva de que novos agentes infecciosos apareçam e causem sérias ameaças no século XXI. Além disso, a eficácia dos agentes antimicrobianos disponíveis atualmente está diminuindo rapidamente com o aumento da resistência, causada principalmente pela utilização indiscriminada dos antimicrobianos (SILVEIRA et al., 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado mediante a condução de quatro experimentos, a fim de verificar a composição fenólica e a bioatividade de extratos elaborados com material vegetal de cultivares de *Lotus* spp.

Experimento 1 - Validação de métodos analíticos por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de prodelphinidinas em cultivares de *Lotus* spp.

Experimento 2 - Determinação de compostos fenólicos em cultivares de *Lotus* spp.

Experimento 3 - Atividade antimicrobiana de extratos fracionados de cultivares de *Lotus* spp.

Experimento 4 - Citotoxicidade dos extratos fracionados de cultivares de *Lotus* spp.

3.1 Local e período

Os experimentos foram realizados de abril de 2015 a outubro de 2017, na Universidade de Passo Fundo.

3.2 Cultivares de *Lotus* spp.

Foram testadas duas cultivares de *L. corniculatus* (UFRGS e São Gabriel) e duas cultivares de *L. uliginosus* (Maku e Serrano). A cv. UFRGS foi desenvolvida pelo Prof. Dr. Miguel Dall’Agnol, na instituição de mesmo nome. A cv. São Gabriel foi desenvolvida na década de 50 na Estação Experimental de São Gabriel, Rio Grande do Sul. A cv. Maku é da Nova Zelândia e a cv. Serrano foi desenvolvida na Estação Experimental da Epagri, em Lages, Santa Catarina.

3.3 Cultivo das plantas e obtenção do material vegetal

As plantas foram cultivadas em vasos de polietileno e mantidas em ambiente aberto (Figura 2). Os vasos foram preenchidos com 90 kg de solo, que apresentou os atributos: pH em H₂O: 5,5; índice SMP: 6,0; P: 38,5 mg/dm³; K: 398 mg/dm³; Al: 1.6 mmolc/dm³; Ca: 59,8 mmolc/dm³; H+Al: 43,6 mmolc/dm³; CTC: 138,1 mmolc/dm³; saturação por bases: 68,4%; saturação por Al: 1,7%; saturação por potássio: 7,4%. A análise para argila, matéria orgânica e magnésio mostraram os seguintes resultados: 420 g/dm³, 35 g/dm³ e 24,5 mmolc/dm³. As análises foram realizadas pelo Laboratório de Solos da Embrapa Trigo, de acordo com metodologia de Tedesco et al. (1995).

Figura 2 - Cultivo de *Lotus* spp. para obtenção de material vegetal para elaboração de extratos. Passo Fundo, 2015



Fonte: Dados do autor.

Após a semeadura, em 02/04/2015, as plantas foram mantidas ao ar livre, sem restrição hídrica. A irrigação foi efetuada sempre que necessário, com auxílio de regador, até o ponto de escorrimento. Para obter material vegetal suficiente para elaboração dos extratos, as plantas foram submetidas a cortes periódicos, uma vez que os cornichões aqui testados são perenes e após os cortes emitem nova brotação. Assim, para a obtenção de extratos a partir de plantas em estágio vegetativo, isto é, somente com caules e folhas,

foram feitos quatro cortes. Já, ao entrarem em florescimento, que determina o estágio reprodutivo das plantas, foi feito somente um corte. Os cortes foram feitos com tesoura, a 5 cm da base das plantas, nas seguintes datas: a) no estágio vegetativo: 28/08, 29/09, 30/10 e 28/11/2015; b) estágio reprodutivo: 12/01/2016.

Nas amostras do estágio reprodutivo foi realizada a separação botânica de uma subamostra por unidade experimental a fim de determinar a proporção de folhas+caules (F+C) e flores+frutos (FL+FR). Após esse procedimento, as amostras foram pesadas e levadas à estufa de aeração forçada, a 30 °C, por 72 horas. Após esse período, as amostras foram pesadas novamente a fim de se obter o valor total de material colhido durante o período de cultivo (Tabela 1). Em seguida foi feita a moagem em moinho tipo Willie. O material triturado foi armazenado em ambiente sem umidade e sem incidência de luz, para minimizar a degradação química.

Tabela 1 - Quantidade de material vegetal, em gramas de massa seca em cada unidade experimental, obtida nos estádios vegetativo e reprodutivo de cultivares de *Lotus spp.* Passo Fundo, 2016

Cultivar	Estádio vegetativo							
	Amostra I		Amostra II		Amostra III		Amostra IV	
UFRGS	576		542		538		486	
São Gabriel	479		495		491		494	
Maku	302		328		335		318	
Serrano	352		354		346		313	
Cultivar	Estádio reprodutivo							
	Amostra I		Amostra II		Amostra III		Amostra IV	
	F+C	FI+FR ¹	F+C	FI+FR ¹	F+C	FI+FR ¹	F+C	FI+FR ¹
UFRGS	451	43,6	502	51,2	421	46,3	477	50,4
São Gabriel	389	42,8	361	39,7	491	54,1	547	61,1
Maku	513	56,4	367	62,3	602	66,2	597	65,6
Serrano	479	52,7	541	59,5	566	62,2	617	67,8

Fonte: Dados do autor.

Nota: Amostras referem-se ao material obtido em cada unidade experimental. (1) Proporção de flores+frutos na média das amostras colhidas no estágio reprodutivo: UFRGS: 10,3%; São Gabriel: 11%; Maku: 11,7%; Serrano: 11%.

3.4 Experimento 1 - Validação de métodos analíticos por CLAE para determinação de prodelfinidinas em *Lotus spp.*

Para essa etapa foram utilizadas SQR (substâncias químicas de referência) (-) - galocatequina (GC) (Sigma Aldrich LOTE BCBH1066V) e (-)-epigalocatequina (EGC) (Sigma Aldrich LOTE 011M1241V), principais representantes das prodelfinidinas, para a validação do método.

3.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência

As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido (LC) Flexar Perkin Elmer, contendo bomba binária com gerenciamento de solventes e desgaseificador, com injetor automático Auto Sampler Flexar LC (volume de injeção foi de 20 μ L), e com detector PDA, ajustado em 225 nm. Para fase estacionária, foi utilizada uma coluna Browle C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m). Para a fase móvel, foi utilizado 10% de acetonitrila (grau HPLC) e 90% de água ultrapura (obtida em sistema Direct-Q da Millipore®) pH 3,4 ajustado com ácido fosfórico. O fluxo de fase móvel foi de 1 mL/min. As injeções foram feitas de modo isocrático e a validação do método foi feita de acordo com os parâmetros exigidos pela legislação vigente (BRASIL, 2017; ICH, 2005; INMETRO, 2011). As soluções foram filtradas em membranas de porosidade 0,45 μ m (Millipore) antes de serem injetadas no sistema.

3.4.2 Validação do método

Para a validação do método foram avaliados os parâmetros de linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão, exatidão e robustez (BRASIL, 2017; ICH, 2005; INMETRO, 2011).

Linearidade

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2017). A linearidade foi determinada a partir da construção de três curvas analíticas contendo cinco concentrações cada, as quais variavam de 50-150,0 µg/mL, preparadas pela diluição de quantidades apropriadas de solução mãe. As curvas analíticas foram obtidas pela plotagem das áreas dos picos contra as respectivas concentrações.

Os resultados foram submetidos à análise de variância e o modelo de regressão foi avaliado pelo coeficiente de correlação, falta de ajuste e análise de resíduos. Os resíduos foram examinados para verificar a normalidade (teste de Anderson-Darling, Shapiro-Wilk e Ryan-Joiner), autocorrelação (teste de Durbin-Watson) e homocedasticidade (igualdade ou homogeneidade de variância) (teste de Cochran).

Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. A determinação do LD e do LQ foram realizadas de acordo com as equações 1 e 2.

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC} \quad (1)$$

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC} \quad (2)$$

Em que DP_a é o desvio padrão do intercepto e o IC é a inclinação da curva de calibração média (BRASIL, 2017; ICH, 2005).

Precisão e exatidão

A precisão e exatidão foram determinadas por injeção de soluções das SQRs em diferentes concentrações (50 a 150 µg/mL). Cada concentração foi injetada no sistema em triplicata. A repetibilidade (precisão intradia) foi avaliada durante o mesmo dia, nas mesmas condições experimentais. O mesmo procedimento foi utilizado para a precisão intermediária ou intermédia. A precisão foi avaliada pelo desvio padrão relativo (DPR) e a exatidão foi mensurada pelo percentual de recuperação (WOOD, 1999; BRASIL, 2017; ICH, 2005).

Robustez

A robustez foi avaliada empregando delineamento de Plackett-Burman, usando três fatores em três níveis (-1, 0 e +1). Os parâmetros investigados foram pH, fluxo e concentração da fase móvel. Cada elemento é constituído por um nível alto e outro baixo (Tabela 2). O delineamento fatorial foi submetido à aleatorização no *software* Minitab, resultando em nove testes (Tabela 3).

Tabela 2 - Fatores e níveis avaliados na robustez do método de cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de prodelfinidinas. Passo Fundo, 2017

Fatores	Níveis de robustez		
	Baixo	Ótimo	Alto
Fluxo (mL/min)	0,9	1,0	1,1
Concentração de acetonitrila (%)	89	90	9,1
pH	3,2	3,4	3,6

Tabela 3 - Combinações geradas pelo software Minitab[®], utilizando o delineamento de Plackett Burman variando os fatores propostos (fluxo, concentração de acetonitrila e pH) para determinação de prodelfinidinas. Passo Fundo, 2017

Experimento	Fatores		
	Fluxo (mL/min)	Concentração de acetonitrila (%)	pH
1	1,0	90	3,4
2	1,0	90	3,4
3	0,9	91	3,2
4	1,1	91	3,2
5	1,1	89	3,2
6	0,9	89	3,2
7	0,9	91	3,6
8	1,1	89	3,6
9	1,1	91	3,6

3.5 Experimento 2 - Determinação de compostos fenólicos em extratos metanólicos de *Lotus* spp.

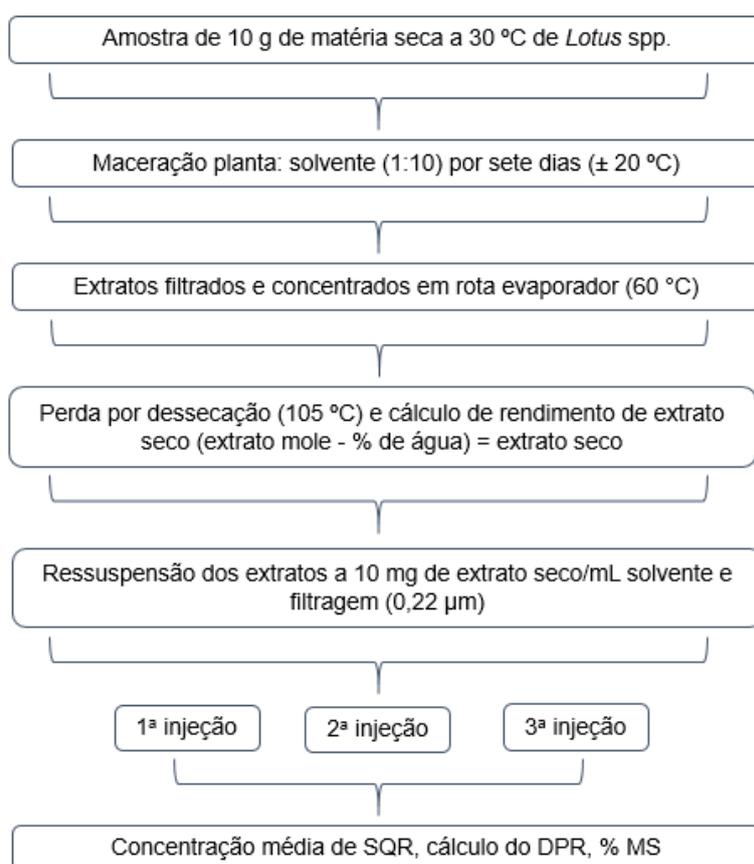
3.5.1 Extratos

Nesse ensaio foram avaliadas as concentrações de procianidinas (catequina, epicatequina), ácidos fenólicos e flavonoides (rutina) de extratos elaborados com a parte aérea das cultivares de *Lotus* spp. colhidas em dois estádios fenológicos (vegetativo e reprodutivo). Dessa forma, foram testados oito extratos, decorrentes da combinação fatorial 4 (cultivar) x 2 (estádio fenológico). Para cada combinação cultivar/estádio fenológico foi reunido o material obtido nas quatro repetições, a fim de obter-se quantidade suficiente para obtenção dos extratos. O material vegetal foi seco em estufa de ar forçado a 40 °C e submetido à extração com metanol 50% na proporção 1:10 (planta:solvente), em temperatura ambiente (± 20 °C) por sete dias (Figura 3).

Após o período de maceração os extratos foram filtrados e concentrados em evaporador rotatório sob pressão reduzida a uma temperatura não superior a 60 °C até a obtenção de extratos moles. Os extratos concentrados foram pesados para o cálculo de rendimento de extrato seco por matéria seca de planta. Foi feita a perda por dessecação

em balança de infravermelho para a retirada de substâncias voláteis e água residual. A partir dos valores obtidos na perda por dessecação, calculou-se o percentual de extrato seco (QUEIROZ; MORAIS; NASCIMENTO, 2002). A partir desse valor, foi calculada a concentração de extrato mole necessária para o preparo de uma solução de 10 µg/mL de extrato seco ressuscitado em metanol. Após ressuspensão os extratos foram filtrados em filtro para seringa com membrana poliestersulfônica (PES) com tamanho de poro de 0,22 µm (Figura 3).

Figura 3 - Fluxograma do procedimento experimental para análise de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência em *Lotus* spp. Passo Fundo, 2015



Fonte: Adaptado de Chini (2013, p. 74).

Após a leitura por CLAE, os dados foram transformados em percentual de matéria seca e submetidos à Anova. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro.

3.6 Experimento 3 - Bioatividade de extratos fracionados de *Lotus* spp.

3.6.1 Material vegetal

Para avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos fracionados das quatro cultivares de *Lotus* spp. foi utilizado o material colhido no estágio vegetativo.

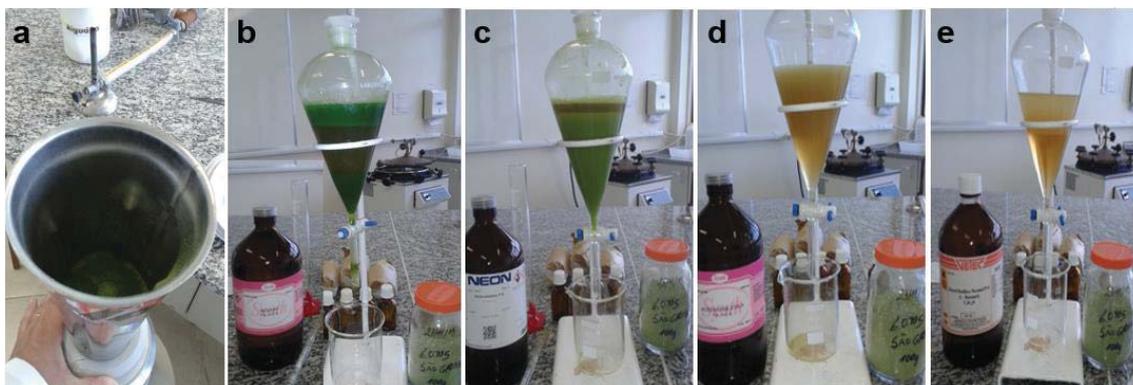
3.6.2 Tratamentos

Foi testada a bioatividade de 72 extratos fracionados decorrentes da combinação do tipo de fração (hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol, aquoso e bruto), cultivar (São Gabriel, UFRGS, Maku e Serrano) e concentração (1; 10 e 100 mg/mL).

3.6.3 Obtenção dos extratos

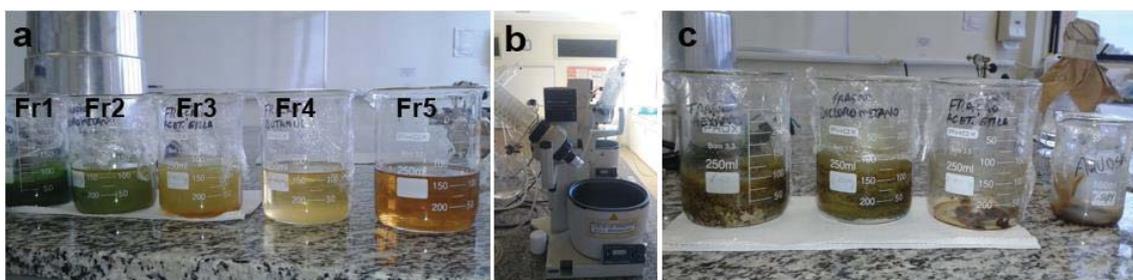
O material vegetal foi submetido ao processo de turboextração em um liquidificador industrial de alta rotação por 15 minutos. Para extração, foram utilizados 40 g de material vegetal e 400 mL de água destilada (Figuras 4 e 5). Após o período da turboextração, os extratos foram filtrados com papel filtro. O filtrado passou para um funil de separação de 500 mL, onde foram acrescentados 100 mL de solventes de polaridade crescente (hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol e água). Para a obtenção do extrato bruto, foram macerados, por sete dias, 40 g do material vegetal em 100 mL de água destilada. Após esse período as frações passaram por um evaporador rotatório sob pressão reduzida em temperatura não superior a 60 °C para evaporação dos solventes e a obtenção de extratos moles, os quais foram acondicionados a 4 °C em geladeira até a data da análise.

Figura 4 - Turbo extração e separação das frações de extratos de cultivares de *Lotus* spp. Passo Fundo, 2015



Nota: (a) turbo extração; (b) separação com uso de hexano; (c) separação com uso de diclorometano; (d) separação com uso de acetato de etila; (e) separação com uso de butanol.

Figura 5 - Preparo dos extratos fracionados de cultivares de *Lotus* spp. Passo Fundo, 2015



Nota: (a) extratos fracionados (Fr1: fração hexano; Fr2: fração diclorometano; Fr3: fração acetato de etila; Fr4: fração butanol; Fr5: fração aquosa); (b) evaporador rotatório; (c) extratos fracionados secos.

3.6.4 Atividade antimicrobiana de extratos fracionados de *Lotus* spp.

Os ensaios foram realizados no Laboratório Multidisciplinar da Faculdade Especializada na Área da Saúde (FASURGS) e no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Passo Fundo (UPF).

Os extratos fracionados foram testados quanto à atividade sobre bactérias *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 35218) e *Streptococcus mutans* (ATCC 25175). E sobre os fungos: *Candida albicans* (ATCC 10231) e um isolado

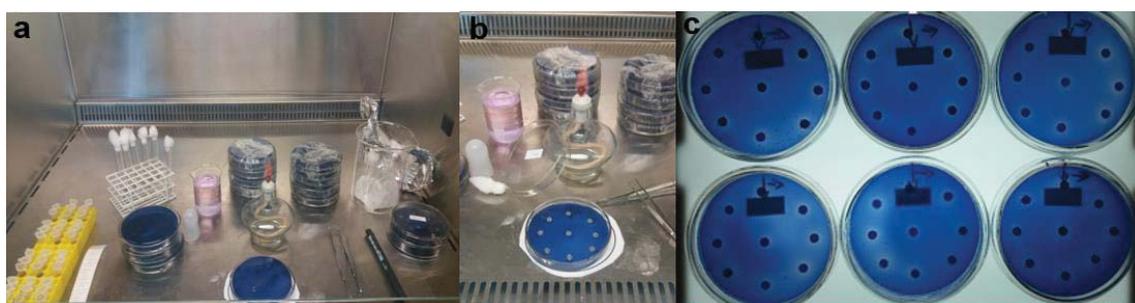
de *Penicillium* sp. As cepas foram adquiridas do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital São Vicente de Paulo, Passo Fundo, 2017. O isolado fúngico pertence à micoteca do Laboratório de Genética de Microrganismos da Universidade Federal do Paraná (LabGeM) sob o registro LGMF698.

Teste da atividade antibacteriana dos extratos

A avaliação do potencial antibacteriano dos extratos fracionados foi testada pelo método de disco difusão. Como controles positivos foram utilizados: vancomicina (30 µg/mL) e ceftriaxona (30 µg/mL). Os ensaios foram realizados em triplicata.

Para a determinação da atividade antibacteriana, os inóculos dos microrganismos foram preparados em tubos contendo de 4 a 5 mL de solução fisiológica para obter turvação equivalente ao do padrão 0,5 da escala de Mac Farland, aproximadamente 10^8 UFC/mL. No ensaio de disco-difusão, com auxílio de um *swab* estéril o inóculo foi semeado uniformemente em placa de ágar Mitis salivarius de modo a preencher toda a superfície do meio. Em seguida, discos de papel filtro adsorvidos com o extrato a ser avaliado foram aplicados na superfície do ágar obedecendo um tempo de no máximo 15 minutos após a inoculação (Figura 6).

Figura 6 - Ensaio de disco-difusão para avaliação da atividade antibacteriana de extratos fracionados de cultivares de *Lotus* spp. Passo Fundo, 2017



Notas: (a) organização dos materiais em câmara de fluxo laminar, (b) placa de Petri com os discos impregnados com extrato sobre o ágar Mitis salivarius; (c) placas prontas para incubação em estufa.

Para o preparo dos discos, recortes de papel filtro de 4 mm de diâmetro esterilizados em autoclave foram impregnados com 5 mg do extrato a ser avaliado. As placas contendo o microrganismo e os discos foram incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas em temperatura de 35 ± 2 °C. Após a incubação, a presença de halo de inibição do crescimento bacteriano ao redor do disco foi indicativa de atividade biológica do extrato. A ausência do halo de inibição foi considerada como inatividade.

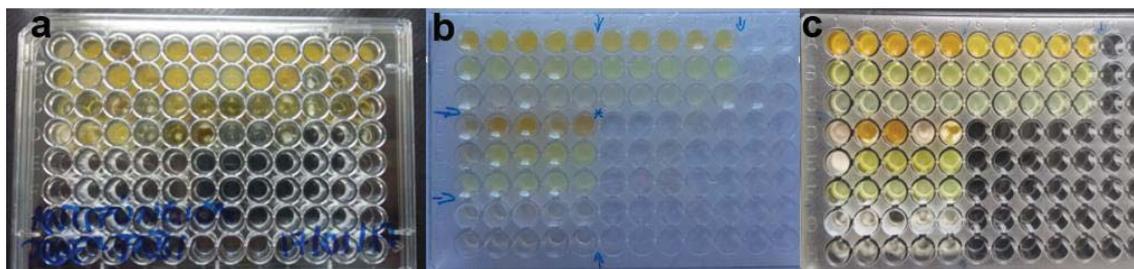
Teste da atividade antifúngica

A avaliação do potencial antifúngico dos extratos fracionados (hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol, aquoso e bruto) foi testada pelos métodos de microdiluição e de disco-difusão. Os controles positivos utilizados foram cetoconazol 50,0 µg/mL. Para o ensaio de microdiluição também foram preparados: controle do crescimento fúngico (125 µL do caldo + 25 µL da suspensão do microrganismo) e controle da esterilidade do meio (150 µL do caldo). O diluente dimetilsulfóxido (DMSO) 1% foi usado como controle negativo. O ensaio foi realizado em quintuplicata.

O método de microdiluição em caldo foi baseado no Manual M27-A2 do NCCLS (2002). Para isso, em cada poço de uma placa de microdiluição com 96 cavidades foram adicionados: 125 µL de caldo Sabouraud-dextrose, 15 µL do extrato a ser avaliado e 10 µL da suspensão de inóculo (Figura 7). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica 48 h em temperatura de 35 ± 2 °C.

Diluições sucessivas foram realizadas para a avaliação do extrato ou fração nas seguintes concentrações: 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6; 7,8 e 3,9 µg/mL. Previamente ao teste, os fungos foram cultivados em ágar Sabouraud dextrose 48 h/30-35 °C. Após a ativação, padronizou-se o inóculo, que consistiu na preparação de uma suspensão fúngica em salina, com turvação similar ao tubo 0,5 da Escala Mac Farland (1×10^6 UFC/mL) para a levedura. O inóculo de *Penicillium* sp. foi padronizado em 10^4 conídios/mL de solução fisiológica após contagem em Câmara de Neubauer.

Figura 7 - Avaliação do potencial antifúngico dos extratos fracionados de cultivares de *Lotus* spp. pelo método de microdiluição. Passo Fundo, 2017



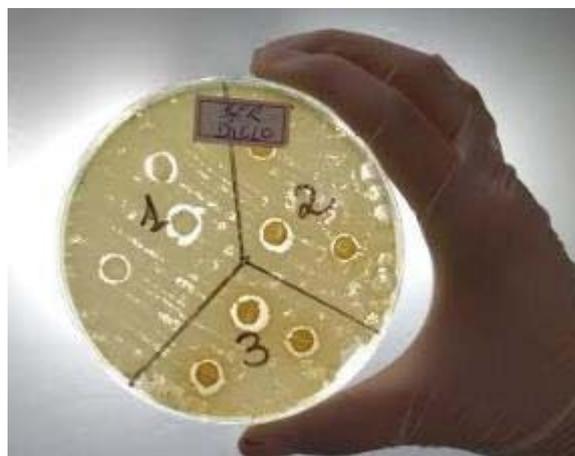
Nota: (a) ensaio de microdiluição contra *Candida albicans*, presença de turvação na maioria dos poços; (b) ensaio de microdiluição contra *Penicilium* sp. 24 horas após o teste, turvação inicial em alguns poços; (c) ensaio de microdiluição contra *Penicilium* sp. após 48 horas do teste, poços com crescimento fúngico inibido.

Após o período de incubação a turvação do caldo foi considerada indicativa de multiplicação do microrganismo, conseqüentemente ausência de atividade antimicrobiana. Os poços que não apresentaram turbidez após a incubação foram considerados como presença de atividade antifúngica.

Para a realização do ensaio de disco-difusão o inóculo do fungo *C. albicans* foi preparado em um tubo contendo 4 a 5 mL de solução fisiológica para obter turvação equivalente ao do padrão 0,5 de Mac Farland, aproximadamente 10^6 UFC/mL. Com auxílio de um *swab* estéril o inóculo foi semeado uniformemente em placas de ágar Sabouraud Dextrose de modo a preencher toda a superfície do meio. Em seguida, discos de papel filtro adsorvidos com o extrato a ser avaliado foram aplicados na superfície do ágar obedecendo a um tempo de no máximo 15 minutos após a inoculação.

Para o preparo dos discos, recortes de papel filtro de 4 mm de diâmetro esterilizados em autoclave foram impregnados com 5 μ L do extrato a ser avaliado. As placas contendo o microrganismo e os discos foram incubadas em estufa bacteriológica por 48 h em temperatura de 35 ± 2 °C. Após a incubação, a presença de halo de inibição do crescimento fúngico ao redor do disco foi indicativa de atividade biológica do extrato (Figura 8). A ausência do halo de inibição foi considerada como inatividade do extrato avaliado.

Figura 8 - Ensaio de disco-difusão de frações acetato de etila obtido com material vegetal da cv. São Gabriel (*Lotus corniculatus*) contra *Candida albicans*. Passo Fundo, 2017



Os dados dos dois ensaios (atividade antibacteriana e antifúngica) foram submetidos à análise da variância em modelo bifatorial (cultivar de *Lotus* spp. x concentração do extrato) seguido de comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. A Anova foi realizada individualmente por extrato (Tabela 4).

Tabela 4 - Modelo do quadro de análise de variância usado para teste da atividade antimicrobiana de extratos fracionados de *Lotus* spp. Passo Fundo, 2017

Fontes de variação	Graus de liberdade
Cultivar de <i>Lotus</i> spp.	3
Concentração do extrato fracionado	2
Cultivar x Concentração	6
Erro	24
Total	35

3.7 Experimento 4 - Atividade citotóxica de extratos fracionados de *Lotus* spp.

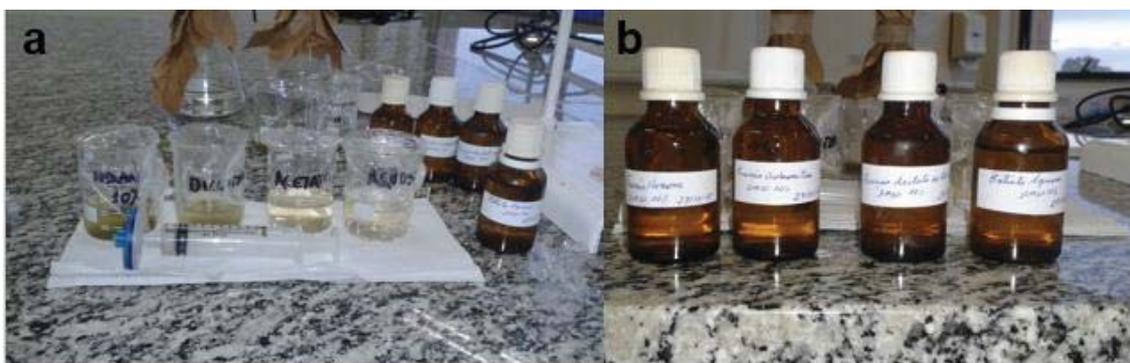
3.7.1 Local e período

O ensaio foi realizado no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Avançada da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo.

3.7.2 Extratos de *Lotus* spp.

Foram avaliados quanto à citotoxicidade 140 extratos fracionados (frações: hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol e aquoso) elaborados com o material vegetal colhido no estágio vegetativo de quatro cultivares de *Lotus* spp. (item 3.3) em sete concentrações decrescentes (10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312 e 0,156 mg/mL). Para isso, o material vegetal foi ressuspensionado em água destilada contendo 1% de dimetilsulfóxido (DMSO) para se obter uma solução-mãe com concentração final de 50 mg/mL de DMSO em 20 mg/mL de RPMI (meio líquido de cultura de células). Em seguida, os extratos foram filtrados em filtro de seringa estéril de 0,22 µm (Figura 9).

Figura 9 - Extratos de cultivares de *Lotus* spp. Passo Fundo, 2015



Nota: (a) ressuspensão do extrato seco; (b) extratos filtrados em membrana com 0.22 µm.

Células-alvo

As células utilizadas para o teste foram de rim bovino MDBK (ATCC, CCL-22), cultivadas em meio essencial mínimo ou RPMI (MEM; Invitrogen Brasil LTDA, São Paulo, SP, Brasil) e suplementadas com 5% de soro equino (SE) ou soro fetal bovino (SFB; Cultilab Materiais para Cultura de Células Ltda, Campinas, SP, Brasil). Respectivamente, 100 U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina (Nutricell nutrientes celulares LTDA, Campinas, SP, Brasil) foram utilizadas para amplificação e quantificação das placas para o teste de citotoxicidade.

3.7.3 Teste de viabilidade celular de extratos fracionados de *Lotus* spp.

A atividade *in vitro* dos extratos fracionados foram testadas em células de cultivo, para investigar toxicidade dessas substâncias em células MDBK, determinando-se a concentração citotóxica para 50% das células (CC₅₀), como controle positivo, foi utilizado nos últimos poços da placa uma solução de 1% de DMSO em água destilada.

A ação citotóxica dos 140 extratos fracionados, foi investigada através do ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) foi utilizado para testar a toxicidade dos extratos para as células de cultivo. Células MDBK (1,6 x 10⁵ células/cavidade de placas de poliestireno com 96 cavidades) foram incubadas por 24 h a 37 °C em estufa de CO₂ a 5% com diluições seriadas dos extratos, em quadruplicata, e submetidas ao teste de MTT adaptado de Garré et al. (2007). Após 24 h de incubação com o extrato, removeu-se o sobrenadante e adicionou-se 50µL de MTT (1µg/mL em MEM) por cavidade, e as células foram incubadas (MDBK por 2 h) a 37 °C em estufa de CO₂ a 5%. A placa de 96 cavidades foi submetida a um leitor de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) comprimento de onda de 550 nm.

Os valores de absorbância correspondentes à leitura da placa após a incubação com MTT nos comprimentos de onda estabelecido foram respectivamente subtraídos. Com os módulos dos valores resultantes confeccionou-se um gráfico de viabilidade celular X concentração da substância teste, valendo-se do programa Excel. A partir dos dados da regressão linear extraiu-se o valor de IC₅₀ correspondente adotando-se valor de R²=0,90. A viabilidade celular foi calculada para cada concentração de extrato testada pela seguinte fórmula: células viáveis (%) = média (extrato) x 100/média (controles).

3.7.4 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância, com comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de significância. A ANOVA foi realizada individualmente, por extrato (Tabela 5).

Tabela 5 - Modelo do quadro de análise de variância usado para teste da citotoxicidade de extratos fracionados de *Lotus* spp.

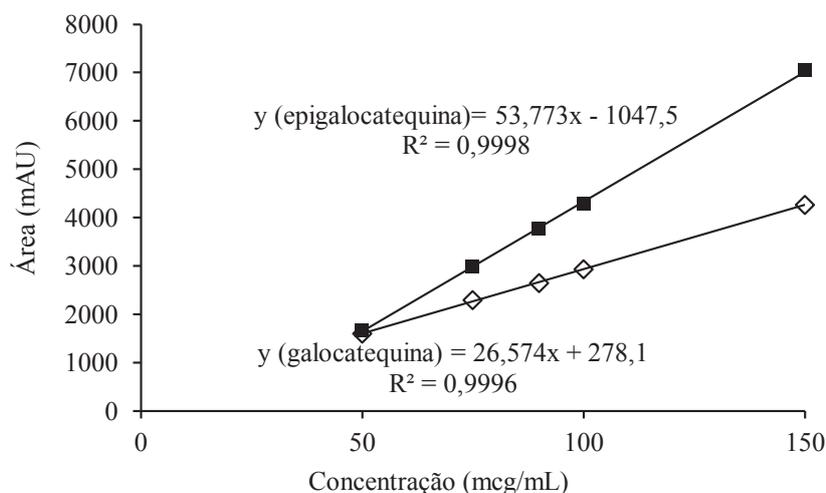
Fontes de variação	Graus de liberdade
Cultivar de <i>Lotus</i> spp.	3
Concentração do extrato fracionado	6
Cultivar x Concentração	18
Erro	84
Total	111

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Validação dos métodos analíticos por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de prodelfinidinas

O método foi considerado linear no intervalo testado de 50 a 150 $\mu\text{g/mL}$ para ambas SQR. O valor do R^2 foi maior que 0,99 para as duas substâncias, galocatequina e epigalocatequina (Figura 10). Os resíduos mostraram-se normalmente distribuídos. Foi observada ausência de autocorrelação e homocedasticidade dos dados, ou seja, sem valores discrepantes (Tabela 6). O LD foi de 0,77 $\mu\text{g/mL}$ e de 2,34 $\mu\text{g/mL}$ para galocatequina (GAL) e epigalocatequina (EPG), respectivamente. O LQ foi de 0,45 $\mu\text{g/mL}$ e de 1,37 $\mu\text{g/mL}$ para a GAL e EPG, respectivamente, demonstrando a alta sensibilidade do método.

Figura 10 - Curva de calibração média (n=3) das substâncias galocatequina e epigalocatequina. Passo Fundo, 2017



Fonte: Dados do autor.

Tabela 6 - Resultado da análise estatística das curvas de calibração para o parâmetro de linearidade para galocatequina e epigalocatequina. Passo Fundo, 2017

Parâmetro	Teste estatístico	Galocatequina	Epigalocatequina
Regressão (ANOVA)	p- valor ^a	1,836 E-23*	8,411 E-25*
Falta de ajuste (ANOVA)	p- valor ^a	1,930 E-06*	1,857 E-05*
Autocorrelação (Durbin- Watson)	p- valor ^a	0,0109*	0,01135*
Homoscedasticidade	Cochran	0,398	0,498
Teste de normalidade	Anderson Darling		
	p- valor ^b	0,47*	0,15*
	Shapiro- Wilk		
	p-valor ^b	0,65*	0,13*
	Kolmogoronov-Smirnov		
	p-valor ^b	0,26*	0,13*
	Ryan- Joiner		
	p-valor ^b	0,58*	0,19*

Notas: * Significância estatística; valor crítico para o teste de Cochran (5; 3): 0,6838 ($\alpha = 5\%$).

(a) $p < 0,05$;

(b) $p > 0,05$.

Para a precisão e exatidão, os valores de DPR foram menores que 5% em todas as concentrações analisadas e os percentuais de recuperação ficaram próximos a 100%, demonstrando a precisão e exatidão do método (Quadro 1). Dessa forma, os métodos empregados apresentaram-se precisos e exatos e desvio padrão relativo apresentou valores dentro do critério de aceitação de até 5% (ICH, 2005).

Quadro 1 - Estudos de precisão das substâncias químicas de referência (SQR), galocatequina e epigalocatequina em soluções-padrão. Passo Fundo, 2017

SQR	Nível (µg/mL)	Recuperação (%) ± DPR (Precisão Intradia)			Recuperação (%) ± DPR (Precisão Interdia)
		Dia 1	Dia 2	Dia 3	
Galocatequina	50	99,64 ± 0,56	99,86 ± 0,88	99,76 ± 1,06	99,75 ± 0,11
	100	99,09 ± 0,12	100,03 ± 0,68	100,09 ± 0,41	100,00 ± 0,09
	150	100,11 ± 0,05	100,35 ± 0,28	99,81 ± 0,38	100,09 ± 0,27
Média Intradia ± DPR (%)	...	99,61 ± 0,24	100,08 ± 0,61	99,89 ± 0,62	...
Epigalocatequina	50	100,90 ± 0,27	100,83 ± 1,01	100,57 ± 0,65	100,77 ± 0,17
	100	99,12 ± 0,06	98,84 ± 0,36	98,98 ± 0,25	98,98 ± 0,14
	150	100,32 ± 0,21	100,44 ± 0,21	100,23 ± 0,26	100,33 ± 0,11
Média Intradia ± DPR %	...	100,11 ± 0,18	100,04 ± 0,53	99,93 ± 0,37	...

Fonte: Dados do autor.

Nota: D.P.R – Desvio padrão relativo

... Dado numérico não disponível

O resultado da robustez do método empregado, mostrado pelo diagrama de Pareto (Figuras 11 e 12), revelou a magnitude e a importância de cada efeito. O gráfico mostra nas barras o valor absoluto dos efeitos e desenha uma linha vertical que representa o t-valor crítico ($\alpha= 5\%$). Os fatores estudados (pH, fluxo e concentração de acetonitrila) não apresentaram efeito significativo sobre a quantificação das SQR, demonstrando que o método foi robusto para ambas as substâncias avaliadas.

Figura 11 - Robustez do método para determinação de galocatequina. Passo Fundo, 2017

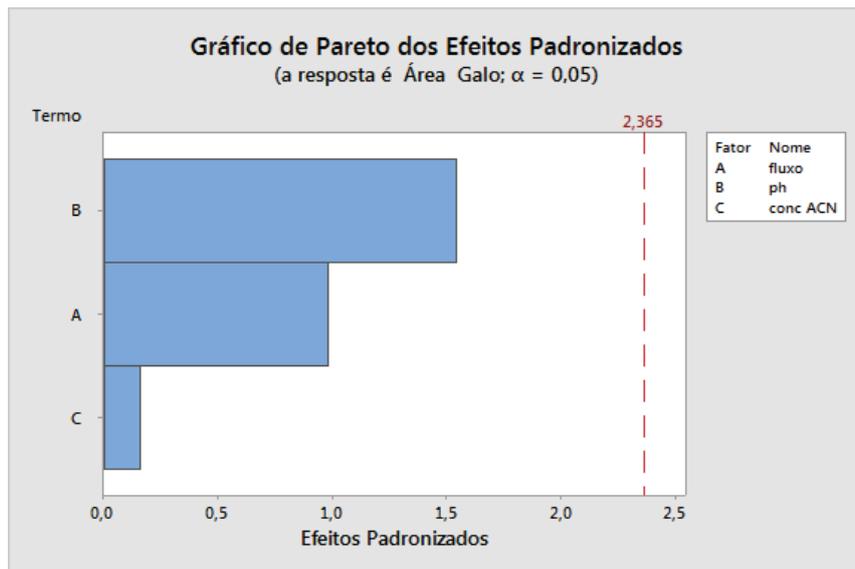
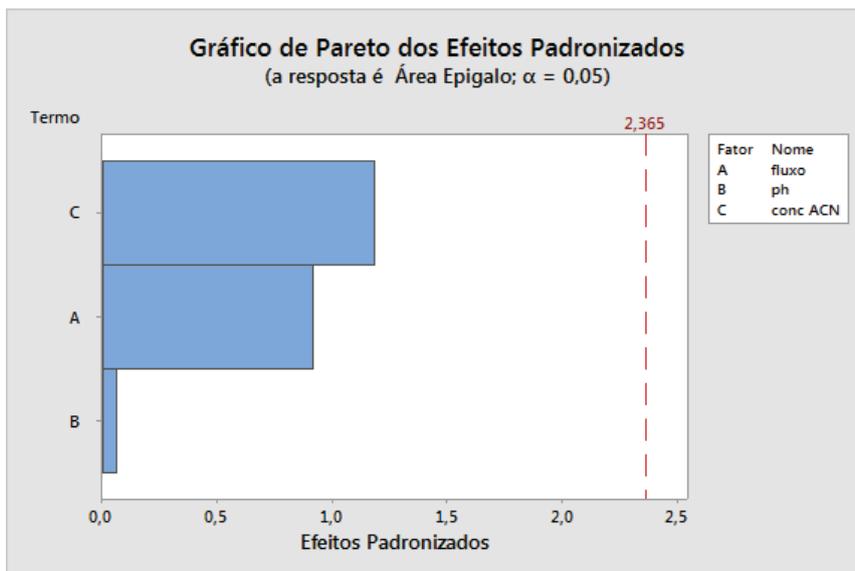


Figura 12 - Robustez do método para determinação de epigalocatequina. Passo Fundo, 2017



O método é robusto quando se mantém inalterado diante de pequenas variações controladas de alguns parâmetros (BRASIL, 2017). A robustez de um método cromatográfico é avaliada pela variação de parâmetros como a concentração do conteúdo de solvente orgânico na fase móvel em $\pm 2\%$, o pH da fase móvel em 0,1 unidade de pH ou a temperatura da coluna em $\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se essas mudanças estiverem dentro dos limites de exatidão, precisão e seletividade aceitáveis, então o método possui robustez e tais variações podem ser incorporadas ao procedimento sem prejuízos aos resultados. O teste aqui testado atendeu os critérios de robustez, sendo que a diferença foi apenas o solvente, que, neste estudo, foi acetonitrila.

A qualidade é indicativa da confiança que se pode esperar do método durante o seu uso cotidiano (SAITO, 2007). Com os resultados da validação aqui realizados, ficam assegurados os resultados dos próximos trabalhos que utilizarem a quantificação por CLAE para GAL e EPG pelo equipamento usado. O método foi validado para ambas SQR e se mostrou linear no intervalo testado de 50 a 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$, exato, preciso e robusto, adequado para a quantificação dessas prodelphinidinas em extratos de *Lotus* spp.

4.2 Composição fenólica de extratos metanólicos de cultivares de *Lotus* spp. colhidas em distintos estádios fenológicos

A concentração de compostos fenólicos foi estimada em equivalente de galocatequina, epigalocatequina, catequina, epicatequina, ácido caféico, ácido ferúlico, ácido p-cumárico, ácido vanílico e rutina de extratos elaborados com a parte aérea das plantas colhidas em dois estádios fenológicos. Foram testadas duas cultivares de *L. corniculatus* (São Gabriel e UFRGS) e duas cultivares de *L. uliginosus* (Maku e Serrano), colhidas no estágio vegetativo e, posteriormente, quando floresceram (estádio reprodutivo).

A concentração de ácidos fenólicos nos extratos foi afetada pela interação genótipo x estágio fenológico (Tabela 7). No ácido caféico, somente a cv. UFRGS mostrou maior quantidade desse composto fenólico no extrato elaborado com material colhido no estágio vegetativo, ao passo que para os demais o material oriundo de plantas

florescidas (estádio reprodutivo) exibiram maiores concentrações. A cv. São Gabriel mostrou a maior quantidade de ácido cafeico, superando a cv. UFRGS, que é da mesma espécie, em mais de dez vezes, e cerca de três vezes as duas cultivares de *L. uliginosus*. Já, quanto ao ácido ferúlico, observou-se maior concentração nos extratos de plantas colhidas em estágio vegetativo. Nos dois estádios fenológicos, as cultivares de *L. corniculatus* superaram as cultivares de *L. uliginosus* quanto à quantidade desse composto.

Tabela 7 - Concentração (1) de ácidos fenólicos em extratos metanólicos elaborados com a parte aérea de cultivares de *Lotus* spp. colhidas em distintos estádios fenológicos. Passo Fundo, 2017

Estádio fenológico	Cultivar ²			
	UFRGS	São Gabriel	Maku	Serrano
	Ácido cafeico			
Vegetativo	0,022 bC	0,348 aA	0,101 aB	0,106 aB
Reprodutivo	0,191 aA	0,150 bA	0,041 bB	0,016 bB
	Ácido ferúlico			
Vegetativo	0,246 aB	0,343 aA	0,102 aC	0,129 aC
Reprodutivo	0,137 bA	0,139 bA	0,048 bB	0,000 bC
	Ácido p-cumárico			
Vegetativo	0,156 aA	0,161 aA	0,060 aB	0,099 aB
Reprodutivo	0,134 aA	0,158 aA	0,074 aB	0,000 bC
	Ácido vanílico			
Vegetativo	0,095 aB	0,149 aA	0,066 bD	0,083 aC
Reprodutivo	0,067 bB	0,084 bA	0,072 aB	0,019 bC

Nota: Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste Tukey ($p > 0,05$).

(1) Em g/kg de massa seca.

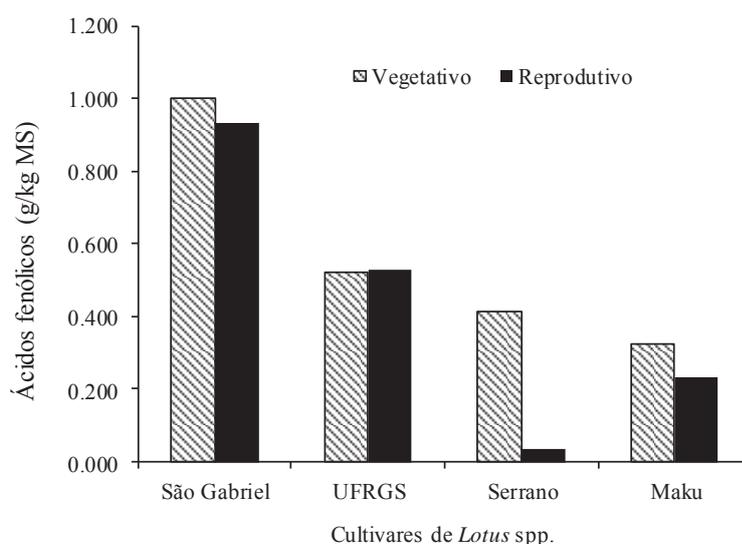
(2) *L. corniculatus*: UFRGS e São Gabriel; *L. uliginosus*: Maku e Serrano.

A concentração do ácido p-cumárico não variou entre os estádios fenológicos, salvo para a cv. Serrano, cujo extrato no estágio reprodutivo não mostrou qualquer traço desse composto. Tal como foi verificado nos ácidos ferúlico e cafeico, evidenciou-se variabilidade interespecífica para a quantidade de ácido p-cumárico, com superioridade para as cultivares de *L. corniculatus*. O ácido vanílico foi observado em maior quantidade na cv. São Gabriel e, nessa cultivar, o extrato com material oriundo de plantas em estágio

vegetativo exibiu a maior concentração. A cv. Serrano mostrou as menores quantidades desse composto.

No total dos ácidos fenólicos aqui quantificados, *L. corniculatus* foi a espécie com a maior quantidade desses compostos, em especial, a cv. São Gabriel com a maior concentração nos estádios vegetativos e maior concentração de ácidos fenólicos pesquisados. Essa cultivar teve, aproximadamente, o dobro em relação à cv. UFRGS, da mesma espécie (Figura 13). As cultivares de *L. uliginosus* mostraram similaridade entre si, exceto para os extratos elaborados com material colhido no estágio reprodutivo, em que a cv. Maku superou a cv. Serrano na concentração de ácidos fenólicos.

Figura 13 - Concentração de ácidos fenólicos (1) de cultivares de *L. corniculatus* e *L. uliginosus* em extratos metanólicos elaborados com a parte aérea de cultivares de *Lotus* spp. colhidas em distintos estádios fenológicos. Passo Fundo, 2017



Fonte: Dados do autor.

Nota: *Lotus corniculatus*: cvs. São Gabriel e UFRGS; *L. uliginosus*: cvs. Serrano e Maku.

(1) Em g/kg de massa seca.

A concentração de rutina variou entre cultivares de *Lotus* spp., mas o efeito variou de acordo com o estágio fenológico (Tabela 8), evidenciando interação dos fatores

testados. Nas cultivares de *L. corniculatus* observou-se maior quantidade de rutina em extratos elaborados com material vegetal colhido no estágio reprodutivo, independentemente da cultivar ($p>0,05$). Por outro lado, em *L. uliginosus*, as cultivares exibiram comportamento oposto: a cv. Maku mostrou maior concentração de rutina no estágio reprodutivo e o oposto foi verificado na cv. Serrano.

Tabela 8 - Concentração (1) de rutina em extratos metanólicos elaborados com a parte aérea de cultivares de *Lotus* spp. colhidas em distintos estádios fenológicos. Passo Fundo, 2017

Estádio fenológico	Cultivar ²			
	UFRGS	São Gabriel	Maku	Serrano
Vegetativo	0,012 bA	0,030 bA	0,161 aB	0,296 aA
Reprodutivo	1,352 aA	1,376 aA	0,335 bA	0,027 bB

Nota: Médias seguidas de mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey ($p>0,05$).

(1) Em g/kg de massa seca.

(2) (2) *L. corniculatus*: UFRGS e São Gabriel; *L. uliginosus*: Maku e Serrano.

Chini (2013) verificou que a concentração de rutina variou de 0,1 a 3,1 g/kg de MS na cv. Serrano e UFRGS, respectivamente, e, a concentração de quercetina variou de 0,0 a 1,0 g/kg de MS na cv. Serrano e UFRGS, respectivamente. Girardi et al. (2014) também verificaram diferença entre genótipos de *Lotus* spp. quanto à rutina, em que a cv. São Gabriel mostrou 0,29% p/p, em relação a concentração de rutina em *L. tenuis* (cv. Larrañaga) que apresentou 0,88% p/p.

A concentração de epicatequina nos extratos teve efeito conjunto dos fatores avaliados (genótipo x estágio fenológico) (Tabela 9). A concentração epicatequina, na cv. UFRGS, mostrou a maior quantidade desse composto fenólico no extrato elaborado com material colhido no estágio vegetativo, destacando-se também no estágio reprodutivo. Da mesma forma, mas com valores menores quantificados, as cvs. São Gabriel, Maku e Serrano apresentaram concentrações maiores no estágio vegetativo em comparação ao reprodutivo. Considerando a variabilidade genotípica em cada estágio, a cv. UFRGS apresentou a maior quantidade de epicatequina, superando a cv. São Gabriel, da mesma espécie, em mais de duas vezes, e cerca de três a seis vezes nas cultivares de *L. uliginosus*.

Quanto à epigalocatequina, observou-se maior concentração nos extratos de plantas em estágio vegetativo. Em ambos os estádios fenológicos, a cv. São Gabriel de *L. corniculatus* e a cv. Serrano de *L. uliginosus* apresentaram as maiores quantidade desse composto (Tabela 9). A concentração de taninos condensados em leguminosas é variável de acordo a alguns fatores, que podem ser: genéticos, edáficos ou fenológicos (ESCARAY et al., 2007). Conforme Chini et al. (2013), o conhecimento da interrelação destes fatores é de fundamental importância para o manejo do cultivo destas espécies, como as do gênero *Lotus*, pois possibilitará melhorar a concentração de taninos e, conseqüentemente, o potencial forrageiro. O aumento no teor de compostos fenólicos pode estar associado à estratégia biossintética para formação de monómeros durante o período da primavera.

Tabela 9 - Concentração (1) de epicatequina e epigalocatequina em extratos metanólicos elaborados com a parte aérea de cultivares de *Lotus* spp. colhidas em distintos estádios fenológicos. Passo Fundo, 2017

Estádio fenológico	Cultivar			
	UFRGS	São Gabriel	Maku	Serrano
	Epicatequina			
Vegetativo	1,340 aA	0,491 aB	0,373 aC	0,211 aD
Reprodutivo	0,770 bA	0,351 bB	0,187 bC	0,028 bD
	Epigalocatequina			
Vegetativo	0,013 aB	0,022 bA	0,016 aB	0,022 aA
Reprodutivo	0,014 aB	0,017 aAB	0,000 bC	0,018 bA

Notas: Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste Tukey ($p > 0,05$).

(1) Em g/kg de massa seca.

Assim como a alteração de fotoperíodos durante as diferentes estações do ano pode interferir na produção dos metabólitos secundários dos vegetais como uma estratégia de defesa da planta, principalmente os compostos fenólicos que são agentes de defesa contra vários tipos de estresse causados por patógenos ou condições ambientais adversas (TREUTTER, 2001). Veber et al. (2015) observaram em folhas de jambolão (*Syzygium cumini*) maiores teores de compostos fenólicos quando comparadas aos cinco diferentes estágios de maturação do fruto e flores em relação aos métodos de extração

empregados, destacando o extrato hidroetanólico 50% (v/v). A capacidade antirradical livre dos melhores resultados obtidos para compostos fenólicos revelaram diferenças nas fontes de compostos bioativos presentes nas folhas e (frutos + flores).

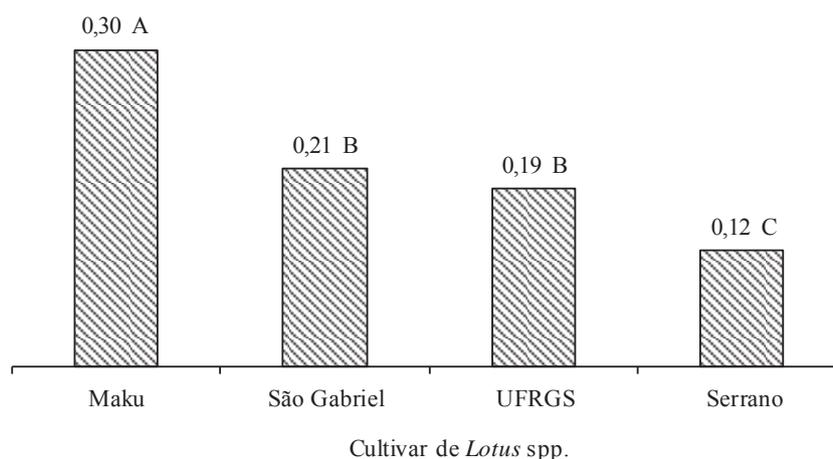
Quanto à catequina, não houve efeito do estágio fenológico. No entanto, as cultivares mostraram diferença quanto à concentração desse monômero (Figura 14). As duas cultivares de *L. uliginosus* apresentaram comportamento oposto, já que a cv. Maku teve a maior concentração de catequina e a cv. Serrano exibiu a menor concentração desse composto. As duas cultivares de *L. corniculatus* não variaram entre si e mostraram quantidades intermediárias de catequina. Chini et al. (2016) observaram em experimentos de tolerância a acidez, que a cv. São Gabriel apresentou a menor variação no teor de procianidina quando cultivado em solo com Al. O contrário foi observado para a UFRGS, que mostrou o dobro desse polifenol em solo com Al em relação ao cultivado em solo sem Al. Janke et al. (2010) demonstraram em estudos anteriores que a cv. UFRGS tem mais tolerância ao Al do que outras cvs. de cornichão (Draco e São Gabriel), os achados deste estudo indicam possível associação entre tolerância à acidez e produção de procianidinas nesta espécie. Essa relação nos conteúdos de catequina e epicatequina poderiam ser usados como marcadores químicos para a tolerância ao Al.

A galocatequina apresentou variação somente entre os estádios fenológicos, sem ser afetado pelo genótipo. No estágio vegetativo obteve-se 60% a mais desse composto em relação ao observado no estágio vegetativo (Figura 15).

Nas quatro cultivares avaliadas observou-se que as procianidinas (catequina e epicatequina) foram preponderantes sobre as prodelfinidinas. Isso foi mais evidente na cv. Serrano, que apresentou entre 60 e 90% a mais de procianidinas em relação às prodelfinidinas. Nas cvs. UFRGS, São Gabriel e Maku a proporção entre esses grupos foram similares. Em relação à proporção de procianidinas e prodelfinidinas, o estágio vegetativo produziu 90% para 10% e no estágio reprodutivo foi de 86% para 14% (Figura 16). Os resultados não condizem com o que é apontado na literatura quanto à proporção de procianidinas (PC) e prodelfinidinas (PD) em *Lotus uliginosus*. De acordo com

Meagher et al. (2004), essa espécie possui maior proporção de PD em relação à PC, que foi estimada em 19:81 e de 84:16 em *L. corniculatus*. Sivakumaran et al. (2006) evidenciaram a mesmo, ou seja, há predominância de prodelfinidina em *L. uliginosus* e de procianidina em *L. corniculatus*.

Figura 14 - Concentração de catequina (1) de extratos metanólicos elaborados com a parte aérea de cultivares de *Lotus corniculatus* e *L. uliginosus* Passo Fundo, 2017



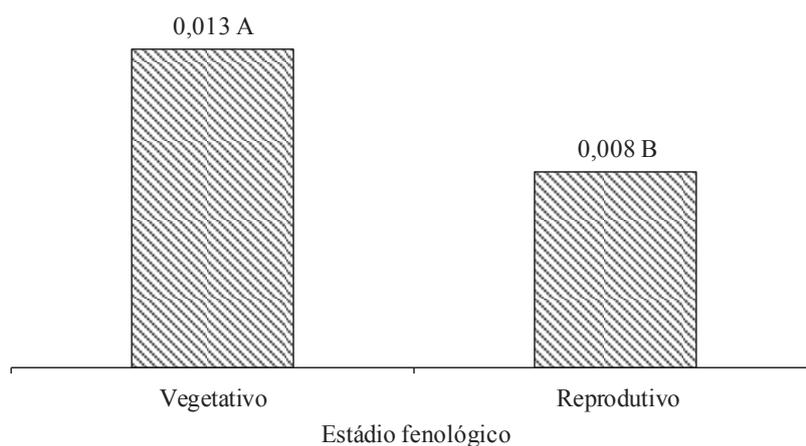
Nota: Letras diferentes sobre as colunas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as cultivares pelo teste de Tukey.

(1) Em g/kg de massa seca na média dos estádios fenológicos (vegetativo e reprodutivo)

Waghorn, Shelton e McNabb (1994) evidenciaram que o consumo de espécies de plantas com altos teores de taninos condensados, acima 50 g/kg de MS, reduz de forma significativa o consumo voluntário, enquanto que concentrações baixas a moderadas podem melhorar a utilização digestiva dos alimentos. Nos resultados da presente pesquisa, os valores de taninos condensados, expressos em procianidina e prodelfinidina, mostraram-se inferiores a 50 g/kg de MS. Conforme Barry e McNabb (1999), existe efeito negativo do consumo de *L. pedunculatus* com teor de TC > 50 g/kg de MS sobre o consumo voluntário de ovelhas, o que não foi percebido quando os mesmos animais consumiram o cornichão, que possui apenas 34-44 g TC/kg de MS. Segundo Escaray et al. (2007), os cornichões apresentam entre 1-5 μg de taninos condensados/g de matéria seca. Para Schofield, Mbugua e Pell (2001), existe uma diferença marcante entre os

valores absolutos reportados na literatura sobre o conteúdo de taninos condensados nas espécies de *Lotus* spp. Isso se deve provavelmente a existência de muitas metodologias para a quantificação desses compostos fenólicos.

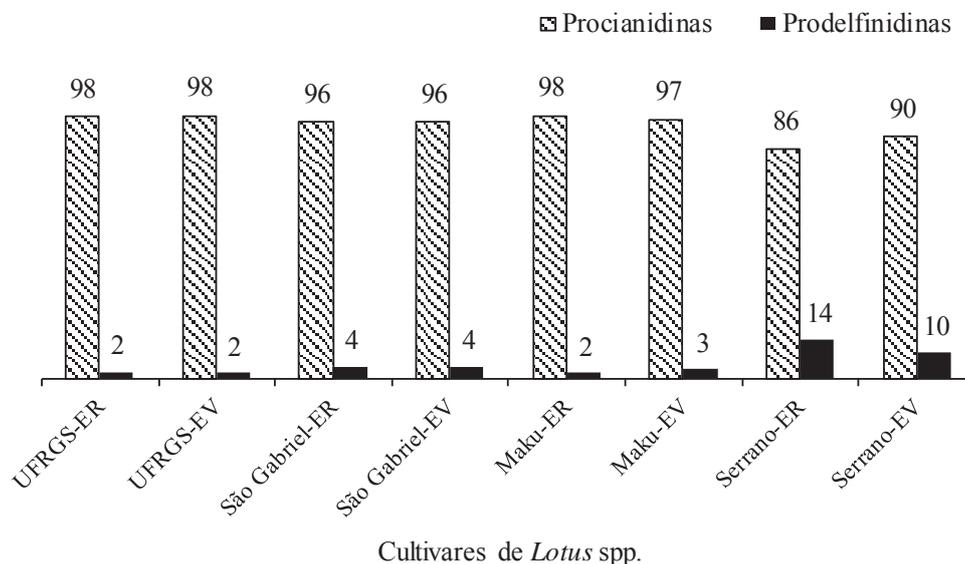
Figura 15 - Concentração de galocatequina (1) de extratos metanólicos elaborados com a parte aérea de cultivares de *Lotus* spp. colhidas em distintos estádios fenológicos. Passo Fundo, 2017



Nota: (1) Em g/kg de massa seca, na média das cultivares de *Lotus* spp.

Chini et al. (2016) observaram que em solo com maior acidez, a cv. UFRGS destacou-se pelo maior teor de taninos condensados e que a cv. Serrano teve menor teor desses metabólitos. No presente estudo foi observado os mesmos resultados quanto a concentração de taninos condensados, a cv. UFRGS apresentou maior concentração e a cv. Serrano a menor. Girardi et al. (2014) observaram em todos os extratos de *Lotus* spp. a presença de catequina e epicatequina. No seu estudo, a concentração de catequina foram de 0,23% (cv. Serrano), e 0,58% (cv. São Gabriel). As concentrações de epicatequina foram 0,59% (cv. Serrano), e 2,54% (cv. São Gabriel).

Figura 16 - Proporção de procianidinas e prodelfinidinas (1) em extratos metanólicos elaborados com a parte aérea de cultivares de *Lotus* spp. colhidas nos estádios vegetativo (EV) e reprodutivo (ER). Passo Fundo, 2017



Nota: (1) Procianidinas: Σ catequina e epicatequina; prodelfinidinas: Σ galocatequina e epigalocatequina quantificadas em g/kg de massa seca.

4.3 Atividade antimicrobiana de extratos fracionados de *Lotus* spp.

4.3.1 Atividade antibacteriana

Para determinar a atividade antimicrobiana dos extratos de *Lotus* spp. foram realizados ensaios de disco-difusão em ágar e de micro diluição em caldo. Uma variedade de métodos pode ser empregada para medir a atividade *in vitro* de agentes antimicrobianos contra microrganismos (VANDEN BERGHE; VLIENTINCK, 1991). Cada método é baseado em um princípio distinto e os resultados obtidos podem ser influenciados pelo método escolhido, pelos microrganismos utilizados no teste e pelo grau de solubilidade de cada extrato. Existem várias metodologias para a avaliação da atividade antimicrobiana, para detecção da atividade contra bactérias e contra fungos. São

conhecidos por ensaios bioautográficos, e podem ser por difusão e/ou de diluição (RIOS; RECIO; VILLAR, 1988).

O teste de suscetibilidade a antimicrobianos por disco-difusão representa um dos métodos de maior importância clínica realizados pelos laboratórios de microbiologia em todo o mundo (SEJAS et al., 2003), pois é prático e de fácil execução e realizado para bactérias de crescimento rápido. O preparo emprega reagentes relativamente econômicos, não há necessidade de equipamentos especiais, além de apresentar grande flexibilidade na escolha do número e tipo de antimicrobianos a serem testados. Algumas cepas de bactérias são mais exigentes nutricionalmente, o requer suplementação dos meios de cultura para que seja realizado (JORGENSEN; TURNIDGE; WASHINGTON, 1999).

O método de disco-difusão desenvolvido por Bauer et al. (1966) é um dos métodos mais utilizados nos laboratórios de microbiologia no Brasil. Ele é baseado na difusão através do ágar de um antimicrobiano impregnado em um disco de papel-filtro. A difusão do antimicrobiano no meio de cultivo leva à formação de um halo de inibição do crescimento bacteriano (JORGENSEN; TURNIDGE; WASHINGTON, 1999).

a) Disco-difusão de extratos vegetais de *Lotus spp.*

Os extratos brutos das cultivares UFRGS, São Gabriel, Maku e Serrano foram testados como antibacteriano para cepa *E. faecalis*. A cv. UFRGS apresentou as maiores médias de diâmetro de halos em todas as concentrações testadas (Tabela 10). A cv. São Gabriel apresentou halo de inibição nas concentrações de 100 e 10 mg/mL, a cv. Maku em 100 e 10 mg/mL e Serrano somente na concentração de 100 mg/mL. Contra *E. coli* o cv. Serrano apresentou média de halo de 0,93 cm nas concentrações de 100 e 1 µg/mL, sendo diferente estatisticamente pelo teste de médias na concentração de 10 mg/mL, com média de 0,80 cm de halo.

As cvs. São Gabriel, Serrano e Maku não apresentaram diferenças significativas entre as médias na concentração de 100 mg/mL. A cv. Serrano diferiu estatisticamente da cv. Maku na concentração de 1 mg/mL. A cv. UFRGS não teve ação inibitória no

crescimento de *E. coli* em nenhuma das concentrações testadas. A ação do extrato bruto é uma novidade, uma vez que não existe nenhum relato de testes antimicrobianos para esse tipo de extrato.

Tabela 10 – Valor médio dos diâmetros dos halos de inibição (1) de crescimento microbiano, submetidos a técnica de disco-difusão de extratos bruto de cultivares *Lotus* spp. em distintas concentrações. Passo Fundo, 2017

Cultivar	Concentração (mg/mL)		
	1	10	100
<i>Enterococcus faecalis</i>			
UFRGS	0,93 aB	1,13 aA	1,23 aA
São Gabriel	0,00 cB	0,73 bA	0,73 bA
Maku	0,00 bC	0,40 cB	0,70 bA
Serrano	0,00 cB	0,00 dB	0,70 bA
<i>Escherichia coli</i>			
UFRGS	0,00 cA	0,00 cA	0,00 bA
São Gabriel	0,00 cC	0,80 aB	0,93 aA
Maku	0,70 bB	0,66 bB	0,86 aA
Serrano	0,93 aA	0,80 aB	0,93 aA

Notas: Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey ($p>0,05$).

(1) Em centímetros.

Os extratos brutos das cvs. São Gabriel e Serrano apresentaram atividade contra *C. albicans*. A cv. Serrano apresentou atividade em todas as concentrações avaliadas e a cv. São Gabriel, nas concentrações de 100 e 10 mg/mL. Na concentração de 10 µg/mL a cv. Serrano apresentou atividade biológica estatisticamente superior à cv. São Gabriel (Tabela 10).

A fração hexano do extrato de *Lotus* spp. das cvs. UFRGS, São Gabriel e Serrano inibiram significativamente o crescimento de *Enterococcus faecalis* em todas as concentrações avaliadas. O extrato da cv. Maku não apresentou atividade contra o microrganismo. Entretanto, os extratos das cvs. São Gabriel e Serrano apresentaram atividade contra *E. coli* em todas as concentrações avaliadas, sendo que a cv. São Gabriel apresentou os maiores halos de inibição, porém não houve interação significativa. As demais cvs. UFRGS e Maku não inibiram o crescimento da cepa de *E. coli* (Tabela 11).

Diferente deste trabalho, mas com objetivos semelhantes, Koelzer et al. (2009) analisaram e isolaram da fração de hexano da cv. São Gabriel, um terpenoide (metabolito secundários), identificado como ácido oleanólico, que mostrou atividade antibacteriana moderada contra três bactérias gram-positivas (*E. faecium*, *E. faecalis* e *Streptococcus pneumoniae*). Horiuchi et al. (2007) apontaram em seus experimentos uma importante atividade antibacteriana desse composto contra as mesmas cepas bacterianas testadas por sua equipe. Marthanda Murthy et al. (2005) estudaram a atividade antibacteriana de terpenoides e justificaram a atividade pela capacidade em perturbar as membranas das bactérias. As possíveis ações inibitórias quanto as cepas bacterianas observadas neste estudo podem ser justificadas, em parte, pela ação desses produtos.

Koelzer et al. (2009) também isolaram da fração de hexano o composto β -sitosterol, um esteroide que não mostrou atividade antibacteriana significativa. Porém, Nazif (2002) relatou atividade inibitória para o mesmo composto. Os extratos da fração hexano das cvs. UFRGS, São Gabriel e Serrano apresentaram valores médios de halos de inibição contra *E. faecalis*. Possivelmente, justificando tal efeito pelo autor anterior que comprovou atividade antibacteriana em *E. coli*.

A fração hexano da cv. Maku inibiu o crescimento de *C. albicans* em todas as concentrações avaliadas, diferindo significativamente dos demais genótipos nas concentrações de 1 e 10 mg/mL. A mesma fração, a cv. Serrano também inibiu o crescimento de *C. albicans* nas concentrações de 10 e 100 mg/mL (Tabela 11).

A fração diclorometano dos extratos de UFRGS, São Gabriel e Serrano inibiu o desenvolvimento do *E. faecalis*, mas a cv. Maku não apresentou efeito em nenhuma das concentrações testadas. As cvs. UFRGS e São Gabriel tiveram médias de inibição de *E. faecalis* muito semelhantes. A cv. Serrano apresentou inibição somente na concentração de 100 mg/mL com 0,63 cm, e a cv Maku não apresentou halo inibitório. (Tabela 12).

Contra *E. coli*, a fração diclorometano da cultivar Serrano obteve a maior média de halo de inibição 1,03 cm, sendo significativamente semelhante a cv. São Gabriel (0,86

cm), mas diferindo estatisticamente da cultivar UFRGS (0,73 cm) na concentração de 100 mg/mL. Para a concentração de 10 mg/mL a cv. Serrano apresentou a maior média (0,93 cm), diferindo estatisticamente das demais. Na concentração de 1 mg/mL as cvs. Serrano e São Gabriel não diferiram entre si pelo teste de médias.

Tabela 11 - Valor médio dos diâmetros dos halos de inibição (1) de crescimento microbiano, submetidos a técnica de disco-difusão de extratos hexano de cultivares *Lotus* spp. em distintas concentrações. Passo Fundo, 2017

Cultivar	Concentração (mg/mL)		
	1	10	100
<i>Enterococcus faecalis</i>			
UFRGS	0,67 aC	1,00 aB	1,26 aA
São Gabriel	0,63 aA	0,70 bA	0,76 cA
Maku	0,00 bA	0,00 cA	0,00 dA
Serrano	0,63 aB	0,66 bB	0,96 bA
<i>Escherichia coli</i>			
UFRGS	0,00 aA	0,00 aA	0,00 aA
São Gabriel	0,00 aA	0,00 aA	0,00 aA
Maku	0,00 aA	0,00 aA	0,00 aA
Serrano	0,00 aA	0,00 aA	0,00 aA

Nota: Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey ($p > 0,05$).

(1) Em centímetros.

Moriwaki et al. (2017) destacaram que os resultados verificados apontam a importância dos três solventes, água, etanol e diclorometano na extração dos compostos fenólicos de folhas. Devido a sua polaridade, o maior teor de polifenóis totais foi extraído com etanol e diclorometano em iguais proporções.

A fração acetato de etila de todas as cultivares inibiu o crescimento de *E. faecalis*. O maior halo de inibição ocorreu na cv. Maku, com 1,53 cm de halo na concentração de 1 mg/mL. Nessa concentração somente a cv. UFRGS não apresentou halo. A mesma fração também teve atividade contra *E. coli*. As cvs. UFRGS e Maku não apresentaram halo de inibição na concentração de 1 mg/mL, porém, nessa concentração, a cv. Serrano diferiu estatisticamente da cv. São Gabriel (Tabela 13).

Todas as cultivares, nas concentrações de 100 e 10 mg/mL da fração acetato de etila, inibiram a *E. coli*, sendo que as cultivares São Gabriel e Maku apresentaram as

maiores médias (0,86 e 0,83 cm) (Tabela 13). Koelzer et al. (2009) relatou que na fração acetato de etila de extratos da cultivar São Gabriel foi observada atividade bacteriostática (MIC = 800 µg/mL) contra as bactérias Gram-positivas *Bacillus cereus* e *E. faecalis* e contra a bactéria Gram-negativa *Acinetobacter calcoaceticus*. O presente estudo demonstrou que as frações hexano e acetato de etila apresentaram melhores atividades antibacterianas do que das demais frações estudadas. A fração acetato de etila do extrato da cultivar São Gabriel apresenta um flavonoide com atividade antibacteriana (KOELZER et al., 2009).

Tabela 12 – Valor médio dos diâmetros dos halos de inibição (1) de crescimento microbiano, submetidos a técnica de disco-difusão de extratos diclorometano de cultivares *Lotus* spp. em distintas concentrações. Passo Fundo, 2017

Cultivar	Concentração (mg/mL)		
	1	10	100
<i>Enterococcus faecalis</i>			
UFRGS	0,70 aB	0,76 bAB	0,90 aA
São Gabriel	0,73 aB	0,96 aA	0,90 aA
Maku	0,00 bA	0,00 cA	0,00 cA
Serrano	0,00 bB	0,00 cB	0,63 bA
<i>Escherichia coli</i>			
UFRGS	0,00 bB	0,73 bA	0,73 bA
São Gabriel	0,66 aB	0,73 bAB	0,86 abA
Maku	0,00 bA	0,00 cA	0,00 cA
Serrano	0,73 aB	0,93 aA	1,03 aA

Nota: Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey ($p > 0,05$).

(1) Em centímetros.

Dalmarco (2009) também relatou atividade antibacteriana da canferitrina com valores de CIM e CBM semelhantes ao do antibiótico de referência (gentamicina). Abdel-Ghani et al. (2001) também demonstraram atividade antibacteriana da canferitrina contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. Ombui e Nduhiu (2005) destacaram a atividade antibacteriana da canferitrina frente a bactéria *Bacillus cereus* e Reynaud e Lussignol (2005) demonstraram a presença de flavonoides em partes aéreas de *Lotus japonicus* e em outras variedades de *Lotus*. Os flavonoides possuem a capacidade de causar danos ao DNA em bactérias, podem se complexar à parede celular bacteriana

inibindo a divisão celular e inibir a atividade da GTPase (URGAONKAR; SHAW, 2007). Sandhar et al. (2011) afirmaram que os flavonoides mais lipofílicos podem atuar rompendo membranas microbianas.

Tabela 13 – Valor médio dos diâmetros dos halos de inibição (1) de crescimento microbiano, submetidos a técnica de disco-difusão de extratos acetato de etila de cultivares *Lotus* spp. em distintas concentrações. Passo Fundo, 2017

Cultivar	Concentração (mg/mL)		
	1	10	100
<i>Enterococcus faecalis</i>			
UFRGS	0,00 bB	0,60 aA	0,73 aA
São Gabriel	0,83 bB	0,96 abAB	1,13 aA
Maku	1,53 aA	0,70 bB	0,76 bB
Serrano	0,93 aA	1,06 aA	1,03 aA
<i>Escherichia coli</i>			
UFRGS	0,00 cB	0,63 bA	0,70 bA
São Gabriel	0,63 bB	0,73 aB	0,86 aA
Maku	0,00 cC	0,60 bB	0,83 aA
Serrano	0,73 aA	0,63 bA	0,70 bA

Nota: Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey ($p > 0,05$).

(1) Em centímetros.

Os maiores halos de inibição formados pela fração butanol contra *E. faecalis* foram das cvs. Serrano e UFRGS. Na concentração de 100 mg/mL, UFRGS e São Gabriel obtiveram as maiores médias, não distinguindo estatisticamente. A cv. Serrano apresentou a maior média de halo na concentração de 100 mg/mL. Para o teste da fração butanol contra *E. coli* houve inibição por todos as cultivares. A maior média do halo foi da cv. Serrano, porém sem diferir de Maku e UFRGS, mas diferiu da cv. São Gabriel na concentração de 100 mg/mL (Tabela 14).

A fração aquosa dos extratos de todas as cultivares apresentaram halos de inibição contra *E. faecalis* e *E. coli* (Tabela 15). A cv. UFRGS apresentou a maior média entre as cultivares, diferindo significativamente da cv. São Gabriel na concentração de 100 mg/mL contra *E. faecalis*. Na concentração de 10 mg/mL, ocorreu atividade de todos as cultivares contra *E. faecalis* e pelo teste de médias não houve diferenças significativas

entre as cultivares. Contra *E. faecalis*, na concentração de 1 mg/mL, foram observadas diferenças significativas para a atividade das cvs. São Gabriel e UFRGS em relação à cv. Serrano. A cv. Maku não apresentou halo de inibição nessa concentração.

Tabela 14 - Valor médio dos diâmetros dos halos de inibição (1) de crescimento microbiano, submetidos a técnica de disco-difusão de extratos butanólicos de cultivares *Lotus* spp. em distintas concentrações. Passo Fundo, 2017

Cultivar	Concentração (mg/mL)		
	1	10	100
<i>Enterococcus faecalis</i>			
UFRGS	0,90 aA	1,13 aA	1,10 bA
São Gabriel	0,83 aAB	0,63 bB	1,06 bA
Maku	0,00 bA	0,00 cA	0,00 cA
Serrano	0,63 aB	0,63 bB	1,56 aA
<i>Escherichia coli</i>			
UFRGS	0,83 aA	0,76 aA	0,80 abA
São Gabriel	0,00 bB	0,70 aA	0,70 bA
Maku	0,66 aB	0,70 aAB	0,86 abA
Serrano	0,80 aA	0,76 aA	0,93 aA

Nota: Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey ($p > 0,05$).

(1) Em centímetros.

Na mesma linha de pesquisa, Koelzer et al. (2009) testou a atividade antibacteriana do extrato bruto e das frações aquosas e butanólicas da cv. São Gabriel. A atividade dos extratos foi considerada inativa para os microrganismos testados até 1000 mg/mL. Por outro lado, a fração hexano demonstrou uma atividade antibacteriana moderada para a bactéria gram positiva *Bacillus cereus*, um fraco efeito antibacteriano em *E. faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* e as bactérias gram-negativas *Acinetobacter calcoaceticus* e *Providencia alcalifaciens*.

A cv. São Gabriel foi a mais ativa em relação a atividade antimicrobiana nos testes, pois apresentou inibição para todas as bactérias avaliadas. A bactéria *E. faecalis* foi o microrganismo mais sensível aos tratamentos e a todos os extratos testados. A fração acetato de etila foi a fração mais ativa, atuando como antimicrobiano, causando inibição de crescimento para todos os microrganismos testados. Quanto a concentrado dos

extratos, a inibição sempre foi maior quanto maior foi a concentração do extrato (100 mg/mL: 10 mg/mL: 1 mg/mL). Diante desses resultados, o fracionamento com solventes orgânicos de polaridade decrescente foi importantes para o teste.

Tabela 15 - Valor médio dos diâmetros dos halos de inibição (1) de crescimento microbiano, submetidos a técnica de disco-difusão de extratos aquosos de cultivares *Lotus* spp. em distintas concentrações. Passo Fundo, 2017

Cultivar	Concentração (mg/mL)		
	1	10	100
<i>Enterococcus faecalis</i>			
UFRGS	0,60 aB	1,06 aA	1,10 aA
São Gabriel	0,70 aA	0,80 aA	0,70 bA
Maku	0,00 bB	0,86 aA	1,03 abA
Serrano	0,10 bB	0,76 aA	0,76 abA
<i>Escherichia coli</i>			
UFRGS	0,80 aB	0,96 aA	1,00 aA
São Gabriel	0,86 aB	0,93 aAB	1,06 aA
Maku	0,60 bB	0,83 aA	0,93 aA
Serrano	0,86 aA	0,83 aA	0,93 aA

Nota: Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey ($p>0,05$).

(1) Em centímetros.

4.3.2 Atividade antifúngica

Os extratos brutos das cvs. São Gabriel e Serrano apresentaram atividade contra *C. albicans*. A cv. Serrano apresentou atividade em todas as concentrações avaliadas e a cv. São Gabriel, nas concentrações de 100 e 10 mg/mL. Na concentração de 10 mg/mL a cv. Serrano apresentou atividade biológica estatisticamente superior à cv. São Gabriel (Tabela 16).

A fração hexano da cv. Maku inibiu o crescimento de *C. albicans* em todas as concentrações avaliadas, diferindo significativamente dos demais genótipos nas concentrações de 1 e 10 mg/mL. A mesma fração, a cv. Serrano também inibiu o crescimento de *C. albicans* nas concentrações de 10 e 100 mg/mL (Tabela 16).

Tabela 16 - Valor médio dos diâmetros dos halos de inibição (1) de crescimento do fungo *C. albicans*, submetidos a técnica de disco-difusão de dois extratos de cultivares *Lotus* spp. em distintas concentrações. Passo Fundo, 2017

Cultivar	Concentração (mg/mL)		
	1	10	100
Extratos bruto			
UFRGS	0,00 bA	0,00 cA	0,00 bA
São Gabriel	0,00 bB	0,96 aA	1,10 aA
Maku	0,00 bA	0,00 cA	0,00 bA
Serrano	0,76 aA	0,83 bA	0,83 aA
Extratos hexano			
UFRGS	0,00 bA	0,00 cA	0,00 bA
São Gabriel	0,00 bA	0,00 cA	0,00 bA
Maku	0,73 aB	0,93 aA	0,83 aAB
Serrano	0,00 bB	0,76 bA	0,76 aA
Extratos diclorometano			
UFRGS	0,00 bA	0,00 bA	0,00 bA
São Gabriel	0,00 bA	0,00 bA	0,00 bA
Maku	0,00 bA	0,00 bA	0,00 bA
Serrano	1,00 aB	0,93 aB	1,10 aA
Extratos acetato de etila			
UFRGS	0,00 bA	0,00 bA	0,00 cA
São Gabriel	0,63 aB	0,70 aAB	0,80 abA
Maku	0,00 bB	0,66 aA	0,70 bA
Serrano	0,66 aB	0,73 aB	0,90 aA
Extratos butanólico			
UFRGS	0,83 aA	0,76 aA	0,80 abA
São Gabriel	0,00 bB	0,70 aA	0,70 bA
Maku	0,66 aB	0,70 aAB	0,86 abA
Serrano	0,80 aA	0,76 aA	0,93 aA
Extratos aquoso			
UFRGS	0,00 bB	0,70 aA	0,73 bA
São Gabriel	0,63 aC	0,76 aB	1,03 aA
Maku	0,00 bA	0,00 bA	0,00 cA
Serrano	0,00 bA	0,00 bA	0,00 cA

Nota: Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey ($p > 0,05$).

(1) Em centímetros.

A fração diclorometano dos cvs. UFRGS, São Gabriel e Maku não houve inibição do crescimento de *C. albicans*. Para essa fração, a cv. Serrano apresentou inibição do microrganismo com médias que não diferiram significativamente (Tabela 16). A fração acetato de etila de São Gabriel, Serrano e Maku inibiram *C. albicans* em diferentes concentrações, em que as cultivares Serrano e São Gabriel apresentaram as maiores

médias (0,90 e 0,80 cm) (Tabela 16). Somente a cv. Serrano inibiu *C. albicans* com a fração butanol do extrato (Tabela 16).

Para a fração aquosa do extrato a inibição do crescimento do fungo *C. albicans* foi observada somente nas cultivares UFRGS e São Gabriel. Os maiores halos foram de 1,03, 0,76 e 0,63 cm nas concentrações de 100, 10 e 1 mg/mL na cultivar São Gabriel. Em comparação com a cultivar UFRGS, a cultivar São Gabriel apresentou diferenças entre as médias nas concentrações de 100 e 1 mg/mL, porém na concentração de 10 mg/mL não apresentaram médias estatisticamente diferentes (Tabela 16).

No teste para o fungo filamentosso *Penicillium* sp. os extratos da fração de hexano das cvs. de *L. corniculatus* (UFRGS e São Gabriel) e *L. uliginosus* (Maku) inibiram completamente a germinação de conídios de *Penicillium* a uma concentração de 100 mg/mL. O extrato da cv. Serrano (*L. uliginosus*), não apresentou nenhum efeito para o fungo filamentosso.

Girardi et al. (2014), avaliaram a atividade antifúngica de extratos do *Lotus* spp. observando ação contra os fungos filamentosos *Alternaria* sp. e *Fusarium* sp. submetidos a tratamento com 100 µL/mL de extratos das cultivares Serrano e São Gabriel. No mesmo trabalho, os extratos das cultivares Larrañaga e São Gabriel inibiram o crescimento do micélio em pelo menos um dos fungos testados, indicando a importância de avaliar diferentes espécies e cultivares.

Azhar et al. (2004) descreveram a atividade antifúngica de extratos de *Lotus garcinii* contra *Aspergillus niger*, *Alternaria solani*, *Penicillium funiculosium*, *Microsporium canis* e *Pleuroetus oustreatus*. Em outro aspecto, Girardi et al. (2014) analisaram o perfil fitoquímico dos extratos de *Lotus* spp. e foi revelada a presença de cumarinas, flavonoides e taninos, compostos diretamente relacionados à atividade antifúngica. Este trabalho serve de embasamento teórico para destacar a importância da extração vegetal por solventes de polaridades decrescente, cada composto químico terá afinidade com o seu semelhante. Dessa forma os trabalhos na área da farmacognosia,

possuem uma grande importância e uma certa versatilidade na escolha de qual produto utilizar para a extração desejada.

4.4 Experimento 4 – Teste de viabilidade celular de extratos fracionados de *Lotus spp.*

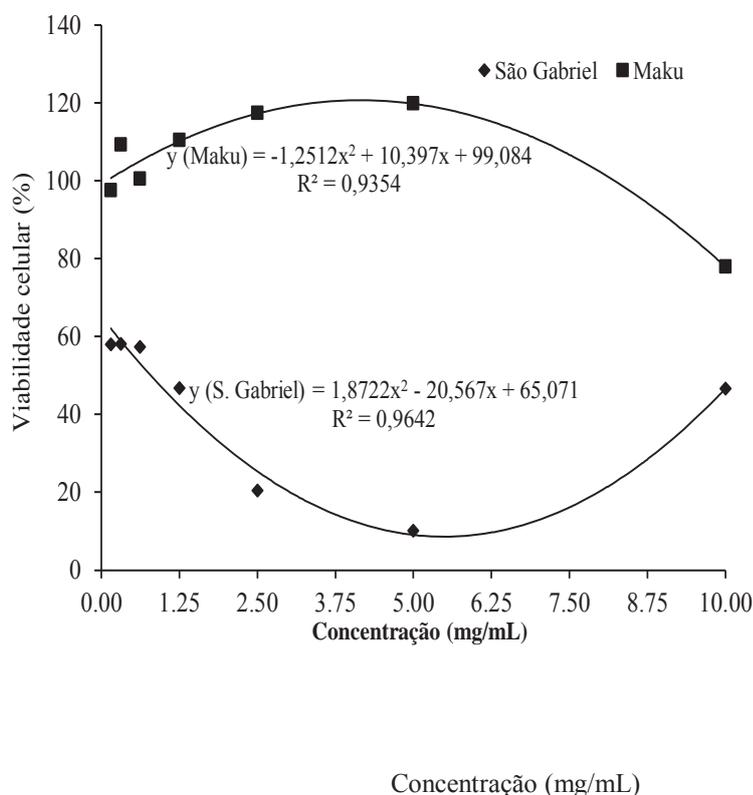
Os testes de citotoxicidade são essenciais para as fases iniciais de desenvolvimento de drogas antivirais, uma vez que definem a concentração a ser utilizada em etapas posteriores de avaliação. Além disso, evitam danos celulares e asseguram a seletividade dos vírus *in vitro* (EISENBRAND et al., 2002). Análise de citotoxicidade pelo método do MTT, que se baseia na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT), permite definir facilmente a citotoxicidade (BERRIDGE et al., 1996). Esse método é um dos indicadores colorimétricos de viabilidade celular mais utilizados, sendo capaz de avaliar a função celular mitocondrial de acordo com a redução enzimática do sal de tetrazólio pelas desidrogenases mitocondriais nas células viáveis (MOSMANN, 1983).

Neste experimento, houve efeito interativo dos fatores testados (cultivar x concentração do extrato) para as frações hexano, diclorometano e butanol, bem como para o extrato aquoso. Assim, o efeito da regressão da citotoxicidade em função da concentração variou conforme a cultivar. De acordo com o percentual de inibição do crescimento celular os extratos foram classificados em: a) sem atividade: 1 a 20% de inibição do crescimento celular observado; b) com pouca atividade: inibições de crescimento celular variando de 20 a 50%; c) com atividade moderada: inibição de crescimento celular variando de 50 a 70%; e d) com muita atividade: inibição de crescimento variando de 70 a 100%.

Para a fração hexano, a regressão foi significativa apenas para as cultivares Maku e São Gabriel, ao passo que para a fração diclorometano, esse resultado foi verificado para esses genótipos e, também, para a cv. UFRGS (Figura 17). O extrato da fração hexano da cv. São Gabriel apresentou efeito inibitório em todas as concentrações. A atividade celular foi moderada nas concentrações de 0,15; 0,31 e 0,62 mg/mL, na

concentração de 2,50 mg/mL houve pouca atividade celular, em 5,00 mg/mL a foi considerado sem atividade celular, indicando ser tóxica nessas concentrações. Já, a cv. Maku apresentou muita atividade celular, pois o percentual de inibição do crescimento foi superior a 70% nas sete concentrações testadas.

Figura 17 - Viabilidade celular de células de rim bovino MDBK (ATCC, CCL-22) em função após 24h de exposição a diferentes concentrações do extrato da fração hexano de folhas+caules de cultivares de *Lotus* spp. (1) Passo Fundo, 2017



(1) *L. corniculatus*: cv. São Gabriel; *L. uliginosus*: cv. Maku.

Na fração diclorometano, o teste de viabilidade celular não demonstrou efeito citotóxico para as células de rim bovino em nenhuma das concentrações testadas para as cvs. UFRGS, Maku e Serrano que apresentaram muita atividade celular (Figura 18). A cv. São Gabriel apresentou atividade celular moderada na concentração de 0,15 mg/mL

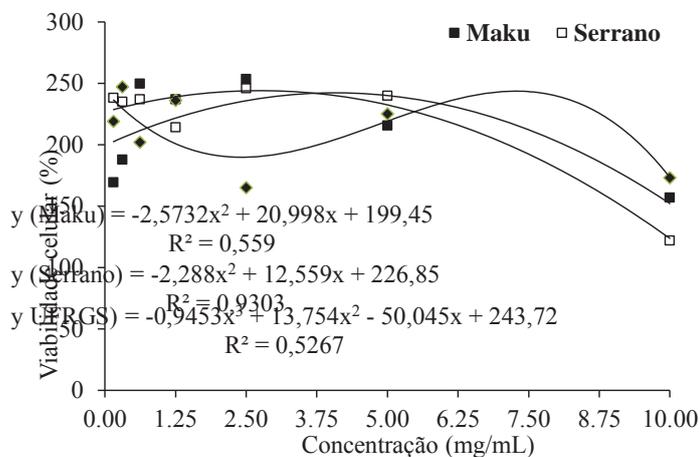
(54,60%) e sem atividade na concentração de 10 mg/mL (14,90%), indicando ser muito tóxica nessa concentração (Tabela 17).

Para a fração butanol de extratos de *Lotus* spp. houve efeito inibitório celular em todos os genótipos (Tabela 19). Os efeitos mais fortes quanto a viabilidade celular foram observados nas cvs. Serrano e São Gabriel em todas as concentrações (Tabela 17), principalmente das menores para as maiores concentrações (0,15 a 10 mg/mL). A cv. Maku apresentou sem atividade e com pouca atividade celular nas concentrações de 10 e 5 mg/mL (10,65 e 33,86%). Já, a cv. UFRGS apresentou pouca atividade celular na concentração de 5 mg/mL (Figura 19), as demais concentrações apresentaram muita atividade celular.

A fração aquosa dos extratos de *Lotus* spp. demonstraram muita atividade celular frente as células de rim bovino, com exceção das cvs. Maku e Serrano (Figura 20). A cv. Maku apresentou se sem atividade celular na concentração de 10 mg/mL, demonstrando ser citotóxica. A cv. Serrano, na mesma concentração, apresentou pouca atividade celular. A Figura 21 apresenta a análise de regressão linear simples da interação das sete concentrações (mg/mL) dentro das cultivares Maku, Serrano, São Gabriel e UFRGS. O teste apresentou significância quanto aos parâmetros analisados nas cultivares (Tabela 17).

A fração de acetato de etila das cultivares de *Lotus* spp. foram testadas, porém não houve diferença significativa com a concentração. A cv. São Gabriel apresentou a maior média (119%) de células viáveis, diferindo das cultivares Maku, UFRGS e Serrano. A cv. Serrano apresentou a menor média (93%) de viabilidade celular, sendo diferente dos demais genótipos pela análise de média no teste Tukey (Figura 21). Esses resultados indicam que os extratos da fração acetato de etila não apresentam citotoxicidade frente a essa linhagem de célula de rim bovino (MDBK) (Tabela 17). As concentrações 2,5 e 0,61 mg/mL apresentaram 108 e 96% de viabilidade celular pela média das cultivares (Figura 22).

Figura 18 - Viabilidade celular de células de rim bovino MDBK (ATCC, CCL-22) após 24h de exposição a diferentes concentrações do extrato da fração diclorometano de folhas+caules de cultivares de *Lotus* spp. (1). Passo Fundo, 2017



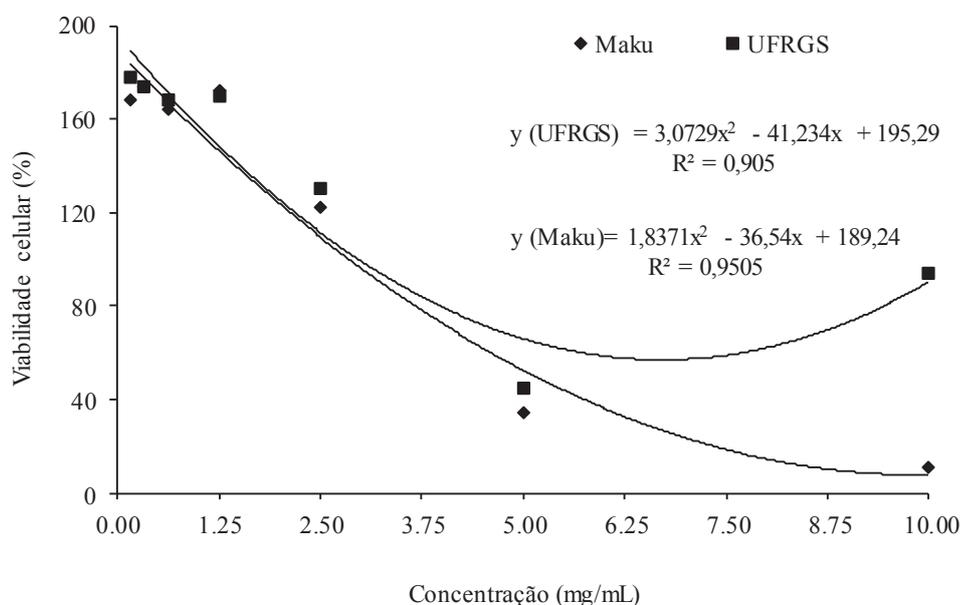
(1) *L. corniculatus*: cv. UFRGS; *L. uliginosus*: cv. Maku e cv. Serrano.

No presente estudo foi observado o aumento da linhagem celular testada (células MDBK). Na fração diclorometano ficou nítida a proliferação das células de rim bovino nos extratos das cultivares UFRGS, Maku e Serrano. A cv. São Gabriel inibiu o crescimento nas concentrações de 10; 5; 2,5; 1,25; 0,62 e 0,31 mg/mL abaixo de 50% de viabilidade celular, exceto na concentração 0,15 mg/mL que ficou acima de 50% de viabilidade celular (Tabela 17).

A técnica mais utilizado para avaliar a toxicidade é a viabilidade celular, que pode ser evidenciada com auxílio de corantes vitais como o MTT e o vermelho neutro, solúvel em água e que passa através da membrana celular, concentrando-se nos lisossomos, fixando-se por ligações eletrostáticas hidrofóbicas em sítios aniônicos na matriz lisossomal. Muitas substâncias danificam as membranas resultando no decréscimo de captura e ligação do vermelho neutro. Portanto, é possível distinguir entre células vivas e

danificadas ou mortas, pela medida de intensidade de cor da cultura celular (CIAPETTI et al., 1996).

Figura 19 - Viabilidade celular de células de rim bovino MDBK (ATCC, CCL-22) após 24h de exposição a diferentes concentrações do extrato da fração butanol de folhas+caules de cultivares de *Lotus* spp. (1). Passo Fundo, 2017



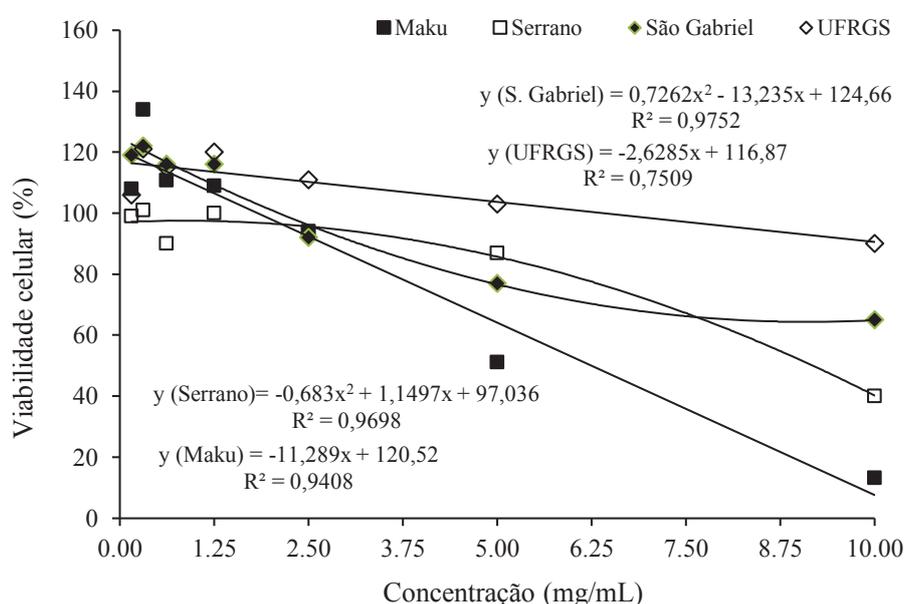
(1) *L. corniculatus*: cv. UFRGS; *L. uliginosus*: cv. Maku.

O teste de citotoxicidade pelo MTT é um método confiável, que se reproduz fácil e rapidamente em laboratório. É um ensaio colorimétrico para a avaliação de proliferação celular ou citotoxicidade. A reação ocorre em um sítio específico das mitocôndrias de células viáveis, sob ação das enzimas desidrogenases mitocondriais que degradam o anel tetrazólio do MTT, produzindo cristais insolúveis de formazinha (MOSSMAN, 1983).

A literatura não traz informações de testes de citotoxicidade e viabilidade celular com o uso de extratos vegetais de *Lotus* spp. A estratégia para discussão foi a de usar informações na literatura de atividades citotóxicas e de viabilidade celular de plantas em geral. Nesse sentido, Schulz et al. (2005) trabalharam a ação citotóxica do extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens*. Tal espécie foi investigada por meio do ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium ou MTT. Esse ensaio visou quantificar as células renais viáveis capazes de metabolizar o MTT a um composto denominado formazan e,

assim, obter informações sobre a citotoxicidade. A atividade citotóxica foi comparada com a nisina comercial (Nisaplin), utilizada comercialmente na conservação de alimentos. O extrato bruto apresentou uma atividade hemolítica de 1,87% e 99,94% numa concentração de 1 e 100 µg de proteína, respectivamente. Em contrapartida, a nisina apresentou uma atividade hemolítica de 3,16% e 8,85% na concentração de 1 e 100 µg de proteínas respectivamente.

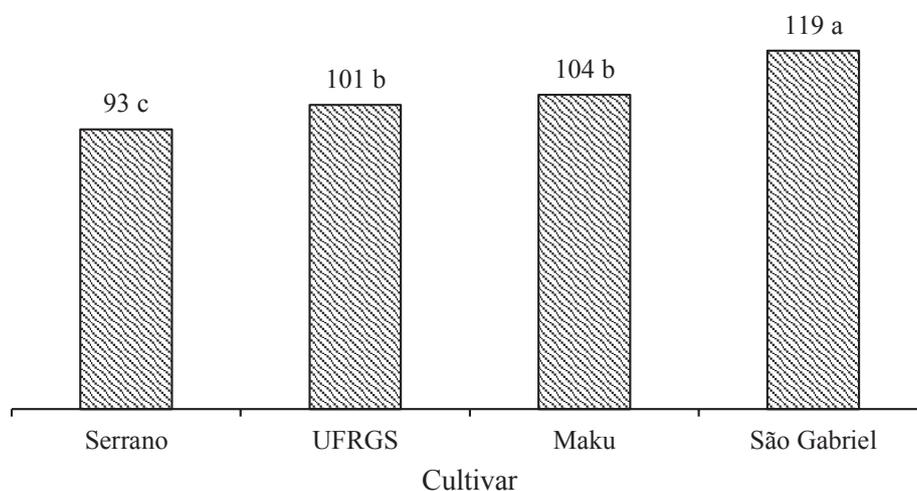
Figura 20 - Viabilidade celular de células de rim bovino MDBK (ATCC, CCL-22) após 24h de exposição a diferentes concentrações do extrato aquoso de cultivares de folhas+caules de *Lotus* spp. (1). Passo Fundo, 2017



(1) *L. corniculatus*: cv. UFRGS e cv. São Gabriel; *L. uliginosus*: cv. Maku e cv. Serrano.

Gonçalves et al. (2009) analisaram a ação de cinco extratos brutos vegetais: extrato bruto da baleeira [*Cordia curassavica* (Jacq.) Adem & Schult], chapéu-de-couro (*Sagittaria montevidensis* Cham. et Schlecht.), folha-da-fortuna (*Bryophyllum pinnatum*, Kurz), sete-sangrias (*Cuphea carthagenensis* [Jacq.] Macbride) e erva-de-formigueiro (*Chenopodium album* L.) em sete linhagens celulares. O extrato bruto mais tóxico foi da erva-de-formigueiro, o extrato de chapéu-de-couro foi medianamente tóxico e os demais foram os menos tóxicos.

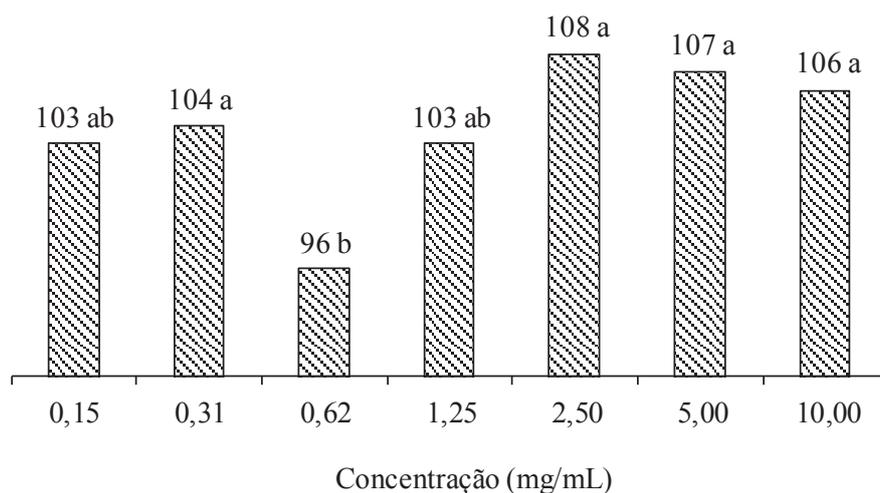
Figura 21 - Viabilidade celular de células de rim bovino MDBK (ATCC, CCL-22) após 24h de exposição à fração acetato de etila de extratos de folhas+caules de cultivares de *Lotus* spp. (1) na média de concentração (2). Passo Fundo, 2017



(1) *L. corniculatus*: cv. UFRGS e cv. São Gabriel; *L. uliginosus*: cv. Maku e cv. Serrano.

(2) Concentrações testadas: 0,15; 0,31; 0,62; 1,25; 2,50; 5,00; 10,00 mg/mL.

Figura 22 - Viabilidade celular de células de rim bovino MDBK (ATCC, CCL-22) após 24h de exposição a concentrações crescentes (1) da fração acetato de etila de extratos de folhas+caules de cultivares de *Lotus* spp., na média de cultivar (2). Passo Fundo, 2017



(1) Concentrações testadas: 0,15; 0,31; 0,62; 1,25; 2,50; 5,00; 10,00 µg/mL.

(2) *L. corniculatus*: cv. UFRGS e cv. São Gabriel; *L. uliginosus*: cv. Maku e cv. Serrano.

Tabela 17 – Viabilidade celular (1) de células de rim bovino MDBK (ATCC, CCL-22) submetidas a cinco extratos de cultivares de *Lotus* spp. e sete concentrações distintas, Passo Fundo, 2017

Cultivares	Concentração (mg/mL)						
	0,15	0,31	0,62	1,25	2,5	5	10
Fração hexano							
UFRGS	112,00 a	101,80 a	87,02 a	108,87 a	99,01 a	101,71 a	94,86 a
São Gabriel	57,94 b	58,04 b	57,33 b	46,80 b	20,44 b	10,08 b	46,58 b
Maku	97,53 a	109,23 a	100,52 a	110,40 a	117,46 a	119,90 a	77,90 a
Serrano	97,98 a	93,70 a	81,24 a	97,06 a	101,04 a	99,66 a	93,16 a
Fração diclorometano							
UFRGS	219,48 ab	246,70 a	202,63 a	235,77 a	164,71 b	224,60 a	173,25 a
São Gabriel	54,60 c	35,36 b	35,83 b	39,80 b	41,56 c	44,27 b	14,90 b
Maku	169,24 b	187,97 a	249,72 a	236,94 a	253,45 a	215,46 a	156,78 a
Serrano	238,22 a	235,48 a	237,53 a	213,83 a	245,91 a	240,23 a	122,08 a
Fração butanol							
UFRGS	177,66 a	173,92 a	167,66 a	170,08 a	130,31 a	45,43 a	93,65 a
São Gabriel	13,47 b	19,10 b	22,33 b	29,13 b	28,18 b	34,91 a	48,90 b
Maku	167,87 a	173,80 a	163,56 a	172,25 a	122,06 a	33,86 a	10,65 c
Serrano	14,31 b	17,11 b	18,24 b	23,54 b	24,47 b	27,80 a	41,86 bc
Extrato aquoso							
UFRGS	106,83 bc	121,30 b	114,73 a	119,72 a	111,00 a	103,31 a	90,10 a
São Gabriel	118,55 a	122,46 b	116,06 a	115,85 ab	91,78 b	76,64 c	65,31 b
Maku	108,01 b	134,25 a	110,68 a	108,85 bc	93,80 b	51,21 d	13,17 d
Serrano	98,64 c	101,34 c	89,88 b	100,37 c	93,72 b	86,92 b	39,92 c

(1) Nota: Médias seguidas de mesma letra, minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste Tukey ($p > 0,05$).

Gomes (2008) avaliou a citotoxicidade *in vitro* de produtos naturais (terpenos, iridóides e derivados fenólicos) em linhagens celulares de adenocarcinoma murino de mama (LM3) e de pulmão (LP07), buscando uma possível correlação entre estrutura molecular e atividade antitumoral. A ordem de citotoxicidade na linhagem LM3 foi tingenona, pristimerina, plumericina, cromeno, paclitaxel, escandenina, acetato de bauerenila, ácido p-cumárico, ácido clorogênico. Na linhagem LP07, a exceção é a

inversão de posição entre os ácidos clorogênico e p-cumárico e escandenina e paclitaxel. Pristimerina, tingenona, plumericina e o cromenoforam mais ativos que o controle positivo, taxol. A autora observou que a atividade mutagênica das moléculas mais promissoras (pristimerina, tingenona e plumericina) que foram avaliadas *in vitro* na presença e ausência de ativação metabólica, não demonstraram mutagenicidade da linhagem celular.

Pereira (2011) avaliou o efeito antiinflamatório de extratos da cv. São Gabriel e observou que o extrato bruto hidroalcoólico, as suas frações (hexano, acetato de etila, butanol e água) e os compostos isolados inibiram significativamente os leucócitos, a exsudação, a atividade das enzimas MPO (Mieloperoxidase) e ADA (adenosina-deaminase), assim como as concentrações de NOx e IL-17A. Essa ação faz com que o organismo não desenvolva os fatores inflamatórios naturais, bloqueando a atividade de causar danos ao tecido sanguíneo. O contrário foi observado no presente trabalho no teste de viabilidade celular, quando os extratos fracionados (hexano, diclorometano e butanol) da cv. São Gabriel apresentou efeito citotóxico na linhagem celular MDBK.

Carvalho, Oliveira e Valério (2012) avaliaram o efeito tóxico do extrato bruto da aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão.) em ensaio de toxicidade *in vitro* da atividade hemolítica sobre sangue de carneiros. O extrato bruto apresentou atividade hemolítica *in vitro* nas concentrações de 50 a 1,56 mg/ml e a ausência da atividade hemolítica em eritrócitos sugeriu que a citotoxicidade do extrato não esteve relacionada a danos de membrana, podendo essa atividade estar relacionada a outro mecanismo de ação como por exemplo, a apoptose.

Dewick (2002) destacou que a ação tóxica de alguns metabólitos secundários já está evidenciada pela literatura. Os alcaloides, mesmo em pequenas quantidades, são substâncias naturalmente tóxicas. Monteiro, Albuquerque e Amorin (2005) descreveram a habilidade dos taninos, principais constituintes químicos da aroeira-do-sertão, de interagir com proteínas e outras macromoléculas que lhe conferem atividades tóxicas e aglutinantes.

Hsiung e Kadir (2011) observaram, em cultura de células Vero, linhagem celular de rim do macaco-verde-africano (*Cercopithecus aethiops*), a citotoxicidade da fração acetato-etílica do extrato natural de leéia (*Leea indica* (Burm. f.) Merr.). A concentração mais elevada foi semelhante ao grupo controle (100% viável), uma vez que foram testados as concentrações de 10, 40, 60, 80, 100, 150 e 200 mg/mL. Esses resultados são semelhantes ao presente estudo, pois os extratos da fração acetato de etila não apresentam citotoxicidade frente a essa linhagem de célula de rim bovino (MDBK) e como consequência da ação ocorreu aumento celular ou proliferação das células MDBK

Oliveira et al. (2010) realizaram um estudo com diversas concentrações de extrato etanólico de romãzeiro (*Punica granatum* L.). Os autores observaram que o percentual de células sobreviventes em todos os grupos tratados esteve acima de 50%, variando entre 65 a 107%. Verificou-se que no grupo tratado com 6,25 mg/mL houve indução a proliferação celular, aumentando em porcentagem sua viabilidade em comparação ao grupo controle. A indução à proliferação celular foi observada em um estudo sobre a viabilidade celular e efeitos antiinflamatórios do extrato aquoso de (*Scutellaria baicalensis* Georgi), que nas concentrações crescentes de 25, 50, 100 e 200 mg/mL mostrou indução a divisão celular, uma vez que, esses grupos apresentaram-se com maior concentração de células em comparação ao grupo controle (YOON et al., 2009).

No presente estudo foi observado o aumento da linhagem celular testada (células MDBK) nos extratos da fração hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol e aquoso. Na fração diclorometano houve a maior proliferação das células de rim bovino submetidas aos extratos das cultivares UFRGS, Maku e Serrano. A cv. São Gabriel inibiu o crescimento nas concentrações de 10; 5; 2,5; 1,25; 0,62 e 0,31 mg/mL abaixo de 50% de viabilidade celular, exceto na concentração 0,15 mg/mL que ficou acima de 50% de viabilidade celular.

Esses resultados indicam que a maioria dos extratos testados não possuem atividades citotóxicas muito forte, pelo contrário foram ativadoras da proliferação das células testadas. Os resultados são importantes para o conhecimento em farmacoterapia,

mesmo sendo preliminares para vários testes na área, são dados fundamentais para futuros ensaios e com potencial fitoterápico muito promissores.

5 CONCLUSÃO

As cultivares avaliadas nesse estudo apresentam diferenças intraespecíficas para todos os critérios avaliados, indicando que apesar de pertencerem a mesma espécie apresentam características morfo-fisiológicas distintas, principalmente referente ao seu metabolismo secundário. Quando comparada à variabilidade das espécies de *Lotus* spp., fica notória a diferença entre as mesmas. Seus caracteres diferem em diversos níveis de expressão, em especial o perfil fitoquímico (metabolismo secundário) das plantas e à atividade biotiva frente aos microrganismos testados.

Em relação aos compostos químicos, as concentrações de compostos fenólicos variam entre cultivares da mesma espécie e entre as espécies, considerando também a influência do estágio fenológico das plantas, indicando que o estágio fenológico imprime influência na síntese dos mais diversos metabólitos secundários.

No que se refere à citotoxicidade celular dos extratos fracionados de *Lotus* spp., a cv. São Gabriel apontou efeito citotóxico das frações hexano, diclorometano e acetato de etila, indicando que a mesma causa danos em células animais e não pode ser utilizada num possível tratamento fitoterápico. Entretanto, as demais cultivares não apresentaram potencial citotóxico para as mesmas células, sendo necessários mais testes para tal finalidade.

Os testes de atividade antimicrobiana com os extratos fracionados das cultivares de *Lotus* spp. foram promissores, pois observou-se inibição bacteriana e fúngica. Tais resultados indicam que as cultivares do gênero *Lotus* L. testadas frente a esses microrganismos possuem características fitoterapêuticas importantes, sendo necessários mais testes para tais finalidades.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-GHANI, A. E.; HAFEZ, S. S.; ABDEL-AZIZ, E. M.; EL-SHAZLY, A. M. Phytochemical and biological studies of *L. corniculatus* cv. Ternuifolius L. growing Egypt. Alex. **Journal Pharmaceutical Science**, v. 15, n. 2, p. 103-108, 2001.
- ACUÑA, H.; CONCHA, A.; FIGUEROA, M. Condensed tannin concentrations of three *Lotus* species grown in different environments. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 68, n. 1, p. 31-41, 2008.
- ALAMGEER, A. T.; RASHID, M.; MALIK, M. N. H.; MUSHTAQ, M. N.; KHAN, J.; QAYYUM, R.; KHAN, A. Q.; MUHAMMAD, N. Ethnomedicinal survey of plants of valley Alladand Dehri, Tehsil Batkhela, district Malakand, Pakistan. **International Journal of Basic Medical Sciences and Pharmacy**. v. 3, p. 2049–4963, 2013.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- ARAMBARRI, A. M. Illustrated catalogue of *Lotus* L. seeds (Fabaceae). In: BEUSELINCK, P. R. **Trefoil: The science and technology of Lotus**. Madison: American Society of Agronomy, 1999. p. 21–41.
- AZHAR, I.; MAZHAR, F.; AHMAD, S. W.; USMANGHANI, K.; GILL, M. A. Antifungal screening of *Lotus garcinii* D. C. **Pakistan Journal of Pharmacology**, v. 21, p. 7-10, 2004.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.
- BALL, D. M.; HOVELAND, C. S.; LACEFIELD, G. D. **Southern forages**. 4. ed. Lawrenceville: International Plant Nutrition Institute (IPNI), 2007.
- BARRY, T. N.; MCNABB, W. C. The implications of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. **British Journal of Nutrition**, v. 81, n. 4, p. 263-272, 1999.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 2413-2415, 1966.

BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S.; McCOY, K. D.; WANG, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. **Biochemica**, Berlin, v. 4, p. 14-19, 1996.

BLUMENTHAL, M. J.; MCGRAW, R. L. *Lotus* adaptation, use and management. In: BEUSELINCK, P. R. (Ed.). **Trefoil: the science and technology of Lotus**. Madison: American Society of Agronomy, 1999. p. 97-120.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 166 de 24/07/2017. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 4 ago. 2017. Seção 1, p. 26-31.

BRUNET, S.; HOSTE, H. Monomers of condensed tannins affect the larval exsheathment of parasitic nematodes of ruminants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 20, p. 7481-7487, 2006.

BRUYNE, T. Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, n. 4, p. 445-459, 1999.

CARVALHO, M. S.; OLIVEIRA, D. A.; VALÉRIO, H. M. Estudo da atividade citotóxica de *Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão. **Revista Eletrônica de Biologia**, v. 5, n. 3, p. 1-7, 2012.

CHINI, S. O. **Taninos e flavonoides em Lotus spp.** 2013. 134f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2013.

CHINI, S. O.; SCHEFFER-BASSO, S. M.; ESCOSTEGUY, P. A. V.; BERTOL, C. D.; SOBOTTKA, A. M. O pH do solo e sua relação com a concentração de taninos condensados em *Lotus* spp. Em: Congresso Brasileiro de Ciências do Solo, 34., 2013, Florianópolis. Anais do 34th Congresso Brasileiro de Ciencia do Solo, 2013, p. 1-4.

CHINI, S. O.; ESCOSTEGUY, P. A. V.; SCHEFFER-BASSO, S. M.; SOBOTTKA, A. M.; BERTOL, C. D.; DALL'AGNOL, M. Procyanidins in *Lotus* L. genotypes grown in soil with different saturations of aluminum. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 37, n. 1, p. 85-94, 2016

CHOI, S. W.; LEE, S. K.; KIM, E. O.; OH, J. H.; YOON, K. S.; PARRIS, N.; HICKS, K. B.; MOREAU, R. A.; J. Antioxidant and antimelanogenic activities of polyamine conjugates from corn bran and related hydroxycinnamic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 10, p. 3920-3925, 2007.

CIAPETTI, G.; GRANCHI, D.; VERRI, E.; SAVARINO, L.; CAVEDAGNA, D.; PIZZOFERRATO, A. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Biomaterials**, v. 17, n. 3, p. 1259-1264, 1996.

COSTA, C. T. C.; BEVILAQUA, C. M. L.; MORAIS, S. M.; VIEIRA, L. S. Taninos e sua utilização em pequenos ruminantes. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, v. 10, n. 4, p. 108-116, 2008.

DALMARCO, J. B. **Lotus corniculatus L. cv. São Gabriel**: análise fitoquímica e atividade biológica. 2009. 92f. Dissertação (Mestrado em Química) – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

DALMARCO, J. B.; DALMARCO, E. M.; KOELZER, J.; PIZZOLATTI, M. G.; FRODE, T. S. Isolation and identification of bioactive compounds responsible for the anti-bacterial efficacy of *Lotus corniculatus* var. São Gabriel. **International Journal of Green Pharmacy**, v. 4, p. 108-114, 2010.

DAVYT, M.; IZAGUIRRE, P. *Lotus* Linnaeus. In: IZAGUIRRE, P.; BEYHAUT, R. (Ed.). **Legumes in Uruguay and neighboring regions**. Montevideo: Hemisferio Sur, 1997. p. 314-327.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products**: A biosynthetic approach. 2. ed. Nova Jersey: John Wiley & Sons Ltda, 2002.

DIXON, R. A.; XIE, D.; SHARMA, S. B. Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoids research? **New Phytologist**, v. 165, n. 1, p. 9-28, 2005.

DORNAS, W. C.; OLIVEIRA, T. T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R. G.; SANTOS, A. F.; NAGEM, T. J. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 3, p. 241- 249, 2007.

EISENBRAND, G.; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BALLS, M.; BLAAUBOER, B. J.; BOOBIS, A.; CARERE, A.; KEVEKORDES, S.; LHUGUENOT, J. C.; PIETERS, R.; KLEINER, J. Methods of *in vitro* toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 2-3, p. 193-236, 2002.

ESCARAY, F. J.; PESQUEIRA, J.; DAMIANI, F.; PAOLOCCI, F.; SORLI, P. C.; RUIZ, O. A. Taninos condensados en especies de *Lotus* en condiciones de estrés salino. **Lotus Newsletter**, v. 37, n. 2, p. 81-83, 2007.

ESCARAY, F.; ESTRELLA, J.; PESQUEIRA, J.; PIECKENSTAIN, F.; DAMIANI, F.; PAOLOCCI, F.; RUIZ, O. R. Taninos condensados em leguminosas del género *Lotus*. **Lotus Newsletter**, Montevideo, 37:34-35, 2007.

ESCARAY, F. J.; MENÉNDEZ, A.; GÁRRIS, A.; PIECKENSTAIN, F. L.; ESTRELLA, M. J.; CASTAGNO, L. N.; CARRASCO, P.; SANJUÁN, J.; RUIZ, O. A. Ecological and agronomic importance of the plant genus *Lotus*: its application in grassland sustainability and the amelioration of constrained and contaminated soils. **Plant Science**, v. 182, p. 121-133, 2012.

FALLER, A. L. K.; FIALHO, E. Disponibilidade de polifenóis em frutas e hortaliças consumidas no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 43, n. 2, p. 211-218, 2009.

GALVEZ, J. M. G.; RIEDL, B.; CONNER, A. H. Analytical studies on tara tannins. **Holzforschung**, v. 51, n. 3, p. 235-43, 1997.

GARCÍA-MEDIAVILLA, V.; CRESPO, I.; COLLADO, P. S.; ESTELLER, A.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; TUÑÓN, M. J.; GONZÁLEZ-GALLEGO J. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 557, n. 2-3, p. 221-229, 2007.

GARRÉ, B.; VAN DER MEULEN, K.; NUGENT, J.; NEYTSD, J.; CROUBELSB, S.; DE BACKERBAND, P.; NAUWYNCK, H. *In vitro* susceptibility of six isolates of equine herpesvirus 1 to acyclovir, ganciclovir, cidofovir, adefovir, PMEDAP and foscarnet. **Veterinary Microbiology**, v. 122, p. 43-51, 2007.

GIRARDI, F. A.; TONIAL, F.; CHINI, S. O.; SOBOTTKA, A. M.; SCHEFFER-BASSO, S. M.; BERTOL, C. D. Phytochemical profile and antimicrobial properties of *Lotus* spp. (Fabaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 3, p. 1-8, 2014.

GOMES, J. P. M. **Pesquisa de atividade antitumoral e mutagênica *in vitro* de produtos naturais**. 2008. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

GONÇALVES, A. R.; WIEST, J. M.; ROEHE, P. M.; CARVALHO, H. H. Citotoxicidade de plantas com indicativo etnográfico para a desinfecção de água. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 3, p. 305-309, 2009.

HARRIS, C. A.; BLUMENTHAL, M. J.; SCOOT, J. M. Survey of use and management of *Lotus pedunculatus* cv. Grasslands Maku in eastern Australia. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 33, n. 1, p. 41-47, 1993.

HEIJNEN, C. G.; HAENEN, G. R.; OOSTVEEN, R. M.; STALPERS, E. M.; BAST, A. Protection of flavonoids against lipid peroxidation: the structure activity relationship revisited. **Free Radical Research**, v. 36, n. 5, p. 575-581, 2002.

HORIUCHI, K.; SHIOTA, S.; HATANO, T.; YOSHIDA, T.; KURODA, T.; TSUCHIYA, T. Antimicrobial activity of oleanolic acid from *Salvia officinalis* and related compounds on vancomycin-resistant enterococci (VRE). **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 6, p. 1147-1149, 2007.

HOSTE, H., JACKSON, F., ATHANASIADOU, S., THAMSBORG, S.M., HOSKIN, S.O. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. **Trends in Parasitology** v. 22, p. 253-261, 2006.

HSIUNG, W. Y.; KADIR, H. A. *Leea indica* ethyl acetate fraction induces growth-inhibitory effect in various cancer cell lines and apoptosis in Ca Ski human cervical epidermoid carcinoma cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1-13, 2011.

ICH - INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUERIMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN. **Q2 (R1)-Validation of Analytical procedures: text and methodology**. Londres, 2005.

INMETRO - INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos**. DOQ-CGCRE-008 Revisão 04. Jun. 2011.

JANKE, A.; DALL'AGNOL, M.; SANTOS, A. M.; BISSANI, C. A. Seleção de populações de *Lotus corniculatus* L. com maior tolerância ao alumínio em solução nutritiva. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 39, n. 11, p. 2366-2370, 2010

JORGENSEN, J. H.; TURNIDGE, J. D.; WASHINGTON, J. A. Antimicrobial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. In: MURRAY, R. P. **Manual of Clinical Microbiology**. 7. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1999, p. 1526-1543.

KIM, H. P.; SON, K. H., CHANG, H. W.; KANG, S. S. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 96, n. 3, p. 229-245, 2004.

KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 50, n. 2, p. 231-218, 1999.

KIRKBRIDE, J. H. *Lotus* systematics and distribution. In: BEUSELINCK, P. R. (Ed.). **Trefoil: The science and technology of Lotus**. Madison: American Society of Agronomy, 1999. p. 1-20.

KNEKT, P.; JARVINEN, R.; REUNANEN, A.; MAATELA, J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. **British Medical Association**, v. 312, n. 7029, p. 478-481, 1996.

KOELZER, J.; PEREIRA, D. A.; DALMARCO, J. B. PIZOLATTI, M.; PEREIRA, D.; FRÖDE, T. S. Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Lotus corniculatus*. **Food Chemistry Reading**, v. 117, n. 3, p. 444-450, 2009.

LAZARY, V. M. D. **Efeitos do consumo do isoflavona na prevenção do câncer de mama**. 2010. 20 f. Monografia (Curso de Educação e Promoção da Saúde) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

LEE, S. J.; UMANO, K.; SHIBAMOTO, T.; LEE, K. G. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 131-137, 2005.

LIU, R. H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 12, p. 3479S–3485, 2004.

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. D. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 27, n. 1-2, p. 33-39, 2008.

MAKKAR, H. P. S.; FRANCIS, G.; BECKER, K. Bioactivity of phytochemicals in some lesser-known plants and their effects and potential applications in livestock and aquaculture production systems. **Animal**, v. 1, n. 9, p. 1371-1391, 2007.

MARLEY, C. L.; COOK, R.; KEATINGE, R.; BARRET, J.; LAMPKIN, N. H. The effect of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) and chicory (*Cichorium intybus*) on parasite intensities and performance of lambs naturally infected with helminth parasites. **Veterinary Parasitology**, v. 112, n. 1-2, p. 147-155, 2003.

MARQUES-ORTIZ, J. J.; JOHNSON, L. D.; BARNES, D. K. Crown morphology relationship among alfalfa plant introductions and cultivars. **Crop Science**, v. 36, n. 3, p. 766-770, 1996.

MARTHANDA MURTHY, M.; SUBRAMANYAM, M.; HIMA BINDU, M.; ANNAPURNA, J. Antimicrobial activity of clerodane diterpenoids from *Polyalthia longifolia* seeds. **Fitoterapia**, v. 76, n. 3-4, p. 336-339, 2005.

MARTINS, A. S. **Melhoramento genético de *Lotus corniculatus* visando tolerância à toxidez por alumínio**. 2009. 193f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande Sul, Porto Alegre, 2009.

- MEAGHER, L. P.; LANE, G.; SIVAKUMARAN, S.; TAVENDALE, M. H.; FRASER, K. Characterization of condensed tannins from Lotus species by thiolytic degradation and electrospray mass spectrometry. **Animal Feed Science and Technology**, v. 11, n. 1, p. 151-163, 2004.
- MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 577-599, 2000.
- MILLER, P. R.; EHLKE, N. J. Inheritance of condensed tannins in birdsfoot trefoil. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 77, n. 4, p. 587-593, 1997.
- MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P. de; E. L.; AMORIM, E. L. C. de. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p.892-896, 2005.
- MORIWAKI, S.; KANDA, F.; HAYASHI, M.; YAMASHITA, D.; SAKAI, Y.; NISHIGORI, C. Xeroderma pigmentosum clinical practice guidelines. **Journal of Dermatology**, v. 4, n. 10, p. 1-10, 2017.
- MOSSMANN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, 2004.
- NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J; FREITAS, P. C; SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 247-256, 2000.
- NAZIF, N. M. Phytoconstituents of *Zizyphus spina-christi* L. fruits and their antimicrobial activity. **Food Chemistry**, v. 76, p. 77-81, 2002.
- NIEZEN, J. H.; ROBERTSON, H. A.; WAGHORN, G. C.; CHARLESTON, W. A. Production, faecal egg counts and worm burdens of ewe lambs which grazed six contrasting forages. **Veterinary Parasitology**, v. 80, n. 1, p. 15-27, 1998.
- NOVOBILSKY, ' A., MUELLER-HARVEY, I., THAMSBORG, S.M. Condensed tannins act against cattle nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 182, 213-220, 2011.
- OLIVEIRA, L. P.; PINHEIRO, R. C.; VIEIRA, M. S.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F.; VALADARES, M. C. Atividade citotóxica e antiangiogênica de *Punica granatum* L., Punicaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 201-207, 2010.

OMBUI, J. N.; NDUHIU, J. G. Prevalence of enterotoxigenic *Bacillus cereus* and its enterotoxins in milk and milk products in and around Nairobi. **East African Medical Journal**, v. 6, n. 82, p. 280-284, 2005.

OTERO, M. J.; HIDALGO, L. G. Taninos condensados en especies forrajeras de clima templado: efectos sobre la productividad de ruminantes afectados por parasitosis gastrointestinales (una revisión). **Livestock Research for Rural Development**, v. 16, n. 2, p. 1-9, 2004.

PAIM, N. R. Research on *Lotus* spp. in Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Lotus Newsletter**, v. 19, p. 37-43, 1988.

PAIM, N. R.; RIBOLDI, J. Comparação entre espécies e cultivares do gênero *Lotus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, n. 10, p. 1699-1704, 1991.

PEREIRA, D. A. **Estudo farmacológico do extrato bruto, frações e compostos isolados da *Lotus corniculatus* var. São Gabriel utilizando-se o modelo da pleurisia em camundongos**. 2011. 87f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

PERES, L. E. P. **Metabolismo secundário**. São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004.

PETERSON, J.; LAGIOU, P.; SAMOLI, E.; KATSOUYANNI, K.; VECCHIA, C. L.; DWYER, J.; TRICHOPOULOS, D. Flavonoid intake and breast cancer risk: a case control study in Greece. **British Journal of Cancer**, v. 89, n. 7, p. 1255-1259, 2003.

PIÑEDO, L. A. Taninos condensados em espécies forrajeras y sus efectos em la productividad animal. **Revista Nutritime**, v. 5, n. 3, p. 584-591, 2008.

PRIOR, R. L.; CAO, G. Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables: diet and health implication. **HortScience**, v. 35, n. 4, p. 588-592, 2000.

QUEIROZ, C. R. A. D. A.; MORAIS, S. A. L. D.; NASCIMENTO, E. A. D. Characterization of aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*) wood tannins. **Revista Árvore**, v. 26, n. 4, p. 493-497, 2002.

RAFIQ, S.; MAJEED, R.; QAZI, A. K.; GANAI, B. A.; WANI, I.; RAKHSHANDA, S.; QURISHI, Y.; SHARMA, P. R.; HAMID, A.; MASOOD, A.; HAMID, R. Isolation and antiproliferative activity of *Lotus corniculatus* lectin towards human tumour cell lines. **Phytomedicine**, v. 21, pg. 30-38, 2013.

REYNAUD, J.; LUSSIGNOL, M. The flavonoids of *Lotus corniculatus*. **Lotus Newsletter**, v. 35, n. 1, p. 75-82, 2005.

RIBÉREAU-GAYON P. **Les composés phénoliques des végétaux**. Paris: Dunod, 1968.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 23, n. 2-3, p. 127-149, 1988.

RISSO, D. F.; CARÁMBULA, M. **Lotus El Rincón – Producción y utilización de los mejoramientos**. Montevideo: INIA, 1998.

SANDOVAL-CASTROA, C.A. TORRES-ACOSTA, J.F.J. HOSTE, H. SALEMD, A.Z.M. CHAN-PÉREZ, J.I. Using plant bioactive materials to control gastrointestinal tract helminths in livestock. **Animal Feed Science and Technology**. v. 176, p. 192–201, 2012.

SAITO, S. T. **Estudo químico e avaliação da atividade antioxidante de chá-verde brasileiro (*Camellia sinensis* var. *Assamica*) Cultivar IAC-259**. 2007. 126f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

SALMINEN, J. P.; KARONEN, M. Chemical ecology of tannins and other phenolics: we need a change in approach. **Functional Ecology**, v. 25, n. 2, p. 325–338, 2011.

SANDHAR, H. K.; KUMAR, B.; PRASHER, S.; TIWARI, P.; SALHAN, M.; SHARMA, P. A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. **Internationale Pharmaceutica Scientia**, v. 1, n. 1, p. 25-41, 2011.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK. P. R. (Orgs). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2010. p. 615-656.

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, n. 1-2, p. 21-40, 2001.

SCHULZ, H.; HARDER, V.; IBALD-MULLI, A.; KHANDOGA, A.; KOENIG, W.; KROMBACH, F.; RADYKEWICZ, R.; STAMPFL, A.; THORAND, B.; PETERS, A. Cardiovascular effects of fine and ultrafine particles. **Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery**, v. 18, n. 1, p. 1-24, 2005.

SEJAS, L. M.; SILBERT, S.; REIS, A. O.; SADER, H. S. Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 1, p. 27-35, 2003.

SILVA, R. L.; MARTINS, L. V.; MEIRELES, M. S. D.; FERREIRA, P. M. P.; PERON, A. P. Flavonóides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. **Acta Toxicológica Argentina**, v. 23, n. 1, p. 36-43, 2015.

SILVEIRA, G.P.; NOME, F.; GESSER, J.C.; SÁ, M.M.; TERÉNZI, H. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 844- 855, 2006.

SIVAKUMARAN, S.; RUMBALL, W.; LANE, G. A.; FRASER, K.; FOO, L. Y.; YU, M.; MEAGHER, L. P. Variation of proanthocyanidins in *Lotus* species. **Journal of Chemical Ecology**, v. 32, n. 8, p. 1797–1816, 2006.

SHEPLEY, E. VASSEUR, E. BERGERON, R. VILLENEUVE, A. LACHANCE, S. Short Communication: Birdsfoot trefoil as a preventative treatment for gastrointestinal nematodes in pastured dairy heifers. **Canadian Journal of Animal Science**. v. 95, p. 533-537, 2015.

SOARES, M.; WELTER, L.; KUSKOSK, E. M.; GONZAGA, L.; FEET, R. Compostos fenólicos e antioxidante da casca de uvas Niágara e Isabel. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 1, p. 59-64, 2008.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SUN, R.; SUN, X.; ZHANG, S. Quantitative determination of hydroxycinnamic acids in wheat, rice, rye, and barley straws, maize stems, oil palm frond fiber, and fast-growing poplar wood. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 29, n. 11, p. 5122-5129, 2001.

TAPAS, A. R.; SAKARKAR, D. M.; KAKDE, R. B. Flavonoids as nutraceuticals: a review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 3, p. 1089-1099, 2008.

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H. E.; VOLKWEISS, S. J. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. 2 ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995.

TREUTTER, D. Biosynthesis of phenolic compounds and its regulation in apple. **Plant Growth Regul**, v. 34, p. 71-89, 2001.

TROUILLAS, P.; CALLISTE, C.; ALLAIS, D.; SIMON, A.; MARFAK, A.; DELAGE, C.; DUROUX, J. Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. **Food Chemistry**, v. 80, n. 3, p. 399-407, 2003.

URGAONKAR, S.; SHAW, J. T. Synthesis of kaempferitrin. **Journal of Organic Chemistry**, v. 12, n. 72, p. 4582-4585, 2007.

VANDEN BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J. **Methods in plant niochemistry: screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants.** London: Academic Press, 1991.

VEBER, J.; PETRINI, L.A.; ANDRADE, L.B.; SIVIERO, J. Determinação dos compostos fenólicos e da capacidade antioxidante de extratos aquosos e etanólicos de Jambolão (*Syzygium cumini* L). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Campinas, v.17, n.2, p.267-273, 2015.

WAGHORN, G. C.; SHELTON, I. D.; McNABB, W. C. Effects of condensed tannins in *Lotus pedunculatus* on its nutritive value for sheep. 1. Nonnitrogenous aspects. **Journal of Agricultural Science**, v. 123, n. 1, p. 99-107, 1994.

WAGHORN, G. C. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production – Progress and challenges. **Animal Feed and Science Tecnology**, v. 147, n. 1-3, p. 116-139, 2007.

WAGHORN, G. C.; McNABB, W. C. Consequences of plant phenolic compounds for productivity and health of ruminants. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 62, n. 2, p. 383-392, 2003.

WALLER, P. J.; BERNES, G.; THAMSBORG, S. M.; SUKURA, A.; RICHTER, S. H.; INGEBRIGTSEN, K.; HOGLUND, J. Plants as de-worming agents of livestock in the Nordic countries: Historical perspective, popular beliefs and prospects for the future. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 42, p. 31–44, 2001.

WINKEL-SHIRLEY, B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, n. 3, p. 218-223, 2002.

WOOD, R. How to validate analytical methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, p. 624-632, 1999.

YOCHUM, L.; KUSHI, L. H.; MEYER, K.; FOLSOM, A. R. Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. **American Journal of Epidemiology**, v. 149, n. 10, p. 943-949, 1999.

YOON, S. B.; LEE, Y. J.; PARK, S. K.; KIM, H. C.; KO, S. G.; CHOI, H. Y.; OH, M. S.; PARK, W. Anti-inflammatory effects of *Scutellaria baicalensis* water extract on LPS-activated RAW264.7 macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 125, p. 286-290, 2009.

YOSHIHARA, E.; MINHO, A. P.; YAMAMURA, M. H. Efeito anti-helmíntico de taninos condensados em nematódeos gastrintestinais de ovinos (*Ovis aries*). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 6, p. 3935-3950, 2013.

ZADERNOWSKI, R.; NACZK, M.; NESTEROWICZ, J. J. Phenolic acid profiles in some small berries. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 2118-2124, 2005.

ZUANAZZI, J. A. S. Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Orgs). **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2010. p.499-526.



PPGAgro

Programa de Pós-Graduação em Agronomia

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - FAMV