

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

**EFEITO DA RADIAÇÃO UV-B NA QUÍMICA  
DEFENSIVA DA MACRÓFITA AQUÁTICA**  
*Nymphoides indica*

**Nathália Peixoto Nocchi Carneiro**

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E  
CONSERVAÇÃO

**EFEITO DA RADIAÇÃO UV-B NA QUÍMICA  
DEFENSIVA DA MACRÓFITA AQUÁTICA**  
*Nymphoides indica*

**Nathália Peixoto Nocchi Carneiro**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Conservação da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

**ORIENTADORA: ANGÉLICA RIBEIRO SOARES**

**CO-ORIENTADOR: HEITOR MONTERIO DUARTE**

Macaé  
Dezembro de 2012

**EFEITO DA RADIAÇÃO UV-B NA QUÍMICA DEFENSIVA DA MACRÓFITA  
AQUÁTICA *Nymphoides indica***

**Nathália Peixoto Nocchi Carneiro**

Orientadora: Angélica Ribeiro Soares  
Co-Orientador: Heitor Monterio Duarte

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

Aprovada por:

---

Angélica Ribeiro Soares - Presidente  
(UFRJ *campus* MACAÉ)

---

Tatiana Ungaretti Paleo Konno  
(UFRJ *campus* MACAÉ)

---

Renato Crespo Pereira  
(IB – UFF)

---

Alessandra Leda Valverde  
(IQ – UFF)

---

José Roberto da Silva  
(UFRJ *campus* MACAÉ)

---

Daniela Bueno Sudatti  
(IB – UFF)

---

Heitor Monteiro Duarte  
(UFRJ *campus* MACAÉ)

Macaé  
Dezembro de 2012

*Dedico este trabalho aos meus preciosos pais  
Lucrécia P. N. Carneiro e Aroldo Carneiro (in memoriam)  
e a minha irmã querida Nayara Peixoto Nocchi Carneiro.*

## **AGRADECIMENTOS**

A minha orientadora Angélica Soares. Obrigada por todos os momentos inesquecíveis que passamos juntas durante todos esses anos (Iniciação Científica e Mestrado), como já falei, quando nos separarmos (acho que será difícil, pelo menos da minha parte) quero divisão parcial dos bens. O que vivemos foi mais que uma relação de orientador-aluno, construímos uma grande amizade, um relacionamento de cumplicidade. Obrigada por tudo que você me ensinou e por acreditar em mim. Se hoje obtive essa conquista, uma das grandes responsáveis foi você. Serei eternamente grata.

Ao meu orientador Heitor Duarte, pela dedicação, disponibilidade e paciência. Obrigada por tudo, você foi essencial na construção, execução e consolidação deste trabalho. Obrigada por me permitir o convívio com essa grande pessoa que você é. Saiba que aprendi demais com você e que te admiro muito.

A CAPES, pela concessão da bolsa que possibilitou minha dedicação exclusiva ao trabalho. As agências de fomento FAPERJ e CNPq, e ao Projeto PELD que possibilitaram toda a execução deste trabalho.

A todos os meus amigos de laboratório ao longo desse tempo, Lílian Bento, Lorena Sigiliano, Fernada Lacerda, Renan Gonçalves, Daniel Simas, Thalia Sampaio, Olinda Cabral, Luana Gonçalves, Eduardo Gamosa, Viviane Souza e Anny Muniz. Obrigada por todos os momentos maravilhosos que vivemos juntos. Foram muitas risadas, aprendizado e piadas internas, com certeza a presença de vocês foi essencial para realização deste trabalho.

A todos os meus amigos de graduação, em especial a Cristiane Terra, Laiz Araújo, Taciana Xavier e Mariana Macedo. Obrigada por todos os momentos maravilhosos, conversas e conselhos que compartilhamos. Obrigada pelo que vocês foram, são e serão na minha vida.

A minha eterna e confidente amiga, Natalia Machado, sempre juntas em todos os momentos, desde o primeiro instante que nos conhecemos. Sintonia total e pra s  
Obrigada por tudo.

A todos os amigos de mestrado, alguns velhos conhecidos, que nesses dois anos ganharam um espaço especial na minha vida, e outros novos que tive o prazer de conhecer e ter no meu convívio diário. Obrigada Evelyn Raposo, Paula Catelani, Hudson Lemos, Daniele Rossi, Gabriela Maia e Carolina Clezar, vocês, assim como cada momento que vivemos, serão eternos. Quero vocês sempre perto de mim.

A cada um da minha grande e amada família, obrigada pela me ajudar na construção desse caminho. Em especial aos meus avós Ana Maria e Edmundo, que são mais que avós, são meus pais. Obrigada por tudo, amo vocês.

A minha irmã, amiga e alma gêmea, Nayara, obrigada por tudo que você representa na minha vida. Sempre juntas em todos os momentos, que estão eternizados na minha memória. Obrigada por tudo. Irmã, eu te amo!

Ao marido, amigo e companheiro, Matheus Maia, meu porto seguro. Obrigada por estar sempre ao meu lado, me apoiando e acreditando em mim. Obrigada por várias vezes, mostrar que eu era capaz, mesmo quando eu não acreditava. Obrigada pelos conselhos e broncas na hora certa. E, principalmente, obrigada por todo amor, carinho e paciência. Amo você!

Aos meus pais, Lucrécia e Aroldo, que amos mais que tudo, obrigada por me fazerem chegar até aqui. Devo tudo isso a vocês. Mãe, você é mãe, pai, amiga, exemplo, você é tudo. Pai, obrigada por tudo que você foi e sempre será. Sei que você estará do meu lado pra sempre, em cada momento. Amo vocês, e não canso de dizer isso! Obrigada por tudo!

## FICHA CATALOGRÁFICA

Carneiro, Nathália Peixoto Nocchi

Efeito da Radiação UV-B na Química Defensiva da Macrófita Aquática *Nymphoides Indica*/Nathália Peixoto Nocchi Carneiro. - Macaé: UFRJ/ Campus Macaé, 2012.

vii, 121.: il.

Orientador: Angélica Ribeiro Soraes; Co-orientador: Heitor Monteiro Duarte  
Dissertação (mestrado) – UFRJ/ Campus Macaé/ Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Conservação, 2012.

Referências Bibliográficas: f. 103-121.

1. Ecologia Química. 2. Eficiência Fotossintética. 3. Antioxidante. 4. Herbivoria. 5. Metabólitos Secundários. I. Soares, Angélica Ribeiro & Duarte, Heitor Monteiro. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Conservação. III. Efeito da Radiação UV-B na Química Defensiva da Macrófita Aquática *Nymphoides Indica*.

## RESUMO

### EFEITO DA RADIAÇÃO UV-B NA QUÍMICA DEFENSIVA DA MACRÓFITA AQUÁTICA *Nymphoides indica*

**Nathália Peixoto Nocchi Carneiro**

Orientador(es): Angélica Ribeiro Soares & Heitor Monterio Duarte

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Conservação, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

Mudanças climáticas nas últimas décadas reduziram a camada de ozônio, aumentando a intensidade do ultra-violeta B (UV-B) que alcança a Terra. O aumento da radiação UV-B pode afetar direta e indiretamente a taxa fotossintética, a produção de metabólitos secundários e as relações de herbivoria, afetando assim a dinâmica e funcionamento dos ecossistemas. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta fotossintética e química da planta aquática *Nymphoides indica* contra o estresse causado por radiação UV-B e sua possível correlação com a herbivoria, bem como caracterizar suas principais substâncias bioativas. Indivíduos foram cultivados em laboratório sob elevada radiação UV-B. A eficiência fotossintética, os perfis químicos dos metabólitos secundários, a resposta antioxidante e as defesas químicas contra herbivoria foram avaliadas em plantas controle (sem radiação UV-B), tratamento (1,93 vezes da radiação UV-B natural) e em indivíduos do Campo (radiação UV-B natural). Os resultados demonstram que o estresse gerado pelo aumento da radiação UV-B não alterou a eficiência fotossintética da planta. Entretanto foram evidenciadas variações estruturais e quantitativas nos perfis químicos tanto dos indivíduos do controle quanto do tratamento. Estas alterações podem ter sido responsáveis pelo aumento de defesas antioxidantes nos indivíduos cultivados com radiação UV-B. Todavia não foram suficientes para alterar as defesas químicas contra a herbivoria em *N. indica*. Na caracterização química sugerem-se seis estruturas de substâncias fenólicas para *N. indica* correlacionadas ao esqueleto do Floroglucinol, Ácido Clorogênico, Quercetina, Ácido Ferrúlico e Miricetina. Sugere-se que os fenólicos foram as principais substâncias atividade antioxidante da espécie, e que as substâncias de defesas químicas contra a herbivoria de *N. indica* estão presentes no extrato bruto em acetato de etila.

Palavras-chave: Ecologia Química; Eficiência Fotossintética; Antioxidante; Herbivoria

Macaé

Dezembro de 2012

## ***ABSTRACT***

### **EFFECT OF UV-B RADIATION IN CHEMICAL DEFENSIVE OF THE FRESHWATER MACROPHYTE *Nymphoides indica***

**Nathália Peixoto Nocchi Carneiro**

Orientador(es): Angélica Ribeiro Soares & Heitor Monterio Duarte

*Abstract* da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Conservação, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

Climate changes over the past decade reduced the ozone layer, increasing the intensity of Ultra-Violet B (UV-B) radiation. Increased UV-B radiation can directly and indirectly affect the photosynthetic rate, secondary metabolite production and herbivory relations relationship, thus affecting the dynamics and functioning of ecosystems. In this context, the aim of this study was to evaluate the photosynthetic and chemical response of the aquatic plant *Nymphoides indica* against stress caused by UV-B radiation and its possible correlation with herbivory and characterize its main bioactive substances. For that, individuals were exposed in laboratory to a strong UV-B dose. The photosynthetic efficiency, the chemical profiles of secondary metabolites, the antioxidant response and chemical defenses against herbivores were evaluated in control plants (without UV-B) treatment (1.93 times the natural UV-B) and plant's natural environment (UV-B natural). The results demonstrate that stress generated enhanced UV-B did not alter the photosynthetic efficiency of the plant. However variations were observed in structural and quantitative chemical profiles between the control and treatment of individuals. These changes may have been responsible for the increase in antioxidant defenses in those cultured with UV-B radiation. But were not enough to change the chemical defenses against herbivory *N.indica*. In the chemical characterization are suggested six of phenolic substances to *N. indica* correlated to Phloroglucinol, Chlorogenic acid, Quercetin, Ferrúlico acid and Myricetin. It is suggested that the phenolic were the major antioxidant substances of the species, and that substances of chemical defenses against herbivores of *N. indica* are present in the crude extract in ethyl acetate.

Key-words: Chemical Ecology; Photosynthetic Efficiency; Antioxidant; Herbivory

Macaé

Dezembro de 2012

LISTA DE FIGURAS .....	i
LISTA DE TABELAS .....	vi
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<i>Nymphoides indica</i> (L.) KUNZE (MENYANTHACEAE) .....	16
<b>2. HIPÓTESE</b> .....	24
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	25
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	26
<b>4.1. CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DE COLETA</b> .....	26
<b>4.2. COLETA DE <i>Nymphoides indica</i></b> .....	30
<b>4.3. CULTIVO COM RADIAÇÃO UV-B</b> .....	31
<b>4.3.1. Medições da Radiação UV-B natural</b> .....	31
<b>4.3.2. Desenho Experimental</b> .....	32
<b>4.4. ANÁLISE DA FOTOSSÍNTESE - Fluorescência da Clorofila a</b> .....	36
<b>4.5. ANÁLISES QUÍMICAS</b> .....	40
<b>4.5.1. Extração dos metabólitos secundários</b> .....	40
<b>4.5.2. Perfil químico dos extratos por Cromatografia Líquida de Alta</b> <b>Eficiência (CLAE-UV-DAD)</b> .....	42
<b>4.6. ANÁLISE ANTIOXIDANTE</b> .....	44
<b>4.7. BIOENSAIOS DE HERBIVORIA</b> .....	48
<b>4.8. CARACTERIZAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE <i>N.</i></b> <b><i>Indica</i></b> .....	52
<b>4.8.1. Extração dos metabólitos secundários de <i>N. indica</i></b> .....	52
<b>4.8.2. Análises cromatográficas dos extratos brutos de <i>N. indica</i></b> .....	53
<b>4.8.2.1. Perfil químico fenólico do extrato em metanol total por</b> <b>CLAE-UV-DAD</b> .....	53

4.8.2.2. <u>Caracterização geral do perfil químico dos extratos brutos por CLAE-UV-DAD</u> .....	56
4.9. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS BRUTOS DE <i>N. Indica</i> .....	57
4.10. BIOENSAIOS DE HERBIVORIA COM OS EXTRATOS BRUTOS DE <i>N. indica</i> .....	57
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	58
5.1. Avaliação da resposta fisiológica na fotossíntese, perfil químico e na produção de defesas químicas contra a herbivoria em <i>N. indica</i> cultivada em contato com radiação UV-B .....	58
5.2. Caracterização química das substâncias bioativas em <i>Nymphoides Indica</i> .....	85
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	101
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	103

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1:</b> Espectro de radiação ultravioleta e absorção pelo ozônio estratosférico.....	1
<b>FIGURA 2:</b> Média mensal do índice de radiação ultravioleta (IUV) nas capitais brasileiras. Destaque para a cidade do Rio de Janeiro. Retirado de Araújo (2011). .....	2
<b>FIGURA 3:</b> Ciclo biossintético dos metabólitos secundários (Retirado de Simões <i>et al.</i> 2011).....	8
<b>FIGURA 4:</b> (A): Imagem de <i>N. indica</i> (B): Prancha de <i>N. indica</i> (< <a href="http://www.ufscar.br/~probio/m_nymphoides.jpg">http://www.ufscar.br/~probio/m_nymphoides.jpg</a> > acessado em 08/11/20012). .....	17
<b>FIGURA 5:</b> Estruturas de metabólitos secundários presentes na família Menyanthaceae e no gênero <i>Menyanthes</i> . (I) aucubina; (II) catalpol; (III) harpagoside; (IV) cumarina; (V) escopoletina; (VI) rutina; (VII) loganina; (VIII) menthiafolina; (IX) foliamenthina; (X) dihydrofoliamenthina; (XI) ésteres monoterpénóides; (XII) ácido clorogênco. ....	21
<b>FIGURA 6:</b> Flavonoides isolados de espécies representativas da família Menyanthaceae. Kaempferol (I); quercetina (II); isorhamnetina (III); 7- <i>o</i> -methylkaempferol (IV); 7- <i>o</i> -methylquercetina (V); 3, 7-di- <i>o</i> -methylquercetina (VI); and 7,3'-di- <i>o</i> -methylquercetina (VII). (Retirado de Bohm <i>et al.</i> 1987). .....	22
<b>FIGURA 7:</b> (A) Mapa de localização do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba. Com destaque para a Lagoa Comprida (Adaptado de Santos <i>et al.</i> 2004). (B) Imagem da Lagoa Comprida. ....	26
<b>FIGURA 8:</b> Dados meteorológicos obtidos para a cidade de Macaé-RJ no período de setembro de 2006 a julho de 2012. (A): Média e desvio da radiação global. (B): Média da temperatura do ar (cinza claro), temperatura máxima (preto) e mínima (cinza escuro). (C): Precipitação acumulada. (Fonte: INMET). ....	28
<b>FIGURA 9:</b> Exsicata de <i>Nymphoides indica</i> , coletada na Lagoa Comprida no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba. ....	31
<b>FIGURA 10:</b> Imagem do LI-1400 utilizados nas medições de radiação UV-B. ...	32

<b>FIGURA 11:</b> (A) Indivíduos de <i>N. indica</i> transplantados individualmente. (B) Indivíduos de <i>N. indica</i> em câmara individual no sistema de aquários. ....	33
<b>FIGURA 12:</b> Imagem do sistema de aquários utilizados no cultivo. ....	34
<b>FIGURA 13:</b> Espectro de UV da lâmpada “Phillips TL/01 Narrowband”. ....	35
<b>FIGURA 14:</b> Imagem dos aquários que não receberam radiação UV-B, sem a lâmpada central (a esquerda). E os aquários que receberam radiação UV-B, com a lâmpada central (a direita). ....	36
<b>FIGURA 15:</b> (A) Aparelho MINI-PAM usado para medidas fotossintéticas. (B) Medições da fluorescência da clorofila <i>a</i> no cultivo de <i>N. indica</i> . ..	37
<b>FIGURA 16:</b> Representação de uma curva de resposta instantânea da Eficiência Quântica Efetiva ( $\Delta F/F_m'$ ) e ETR <sub>s</sub> (Taxa de Transporte de Elétron– do inglês <i>Electron Transport Rate</i> ). Destacando $\Delta F/F_m'$ e ETR a 300 e 1800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz PAR. ....	39
<b>FIGURA 17:</b> Secagem das folhas dos indivíduos de <i>N. indica</i> . ....	40
<b>FIGURA 18:</b> Esquema do sistema de extração por maceração dos metabólitos secundários (Retirado de Lima 2009). ....	41
<b>FIGURA 19:</b> Aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Shimadzu, Modelo LC-20). ....	42
<b>FIGURA 20</b> – Reação de neutralização do radical DPPH por hidrogênio de um antioxidante (LH) – a reação ocorre com a mudança da cor violeta → para amarela. ....	45
<b>FIGURA 21:</b> Imagem do gastrópode <i>Biomphalaria</i> sp. utilizado como herbívoro modelo nos bioensaios ecológicos. ....	48
<b>FIGURA 22:</b> Esquema do bioensaio de herbivoria onde os dois alimentos artificiais (com incorporação do extrato bruto e sem o extrato bruto) são oferecidos simultaneamente ao herbívoro generalista <i>Biomphalaria</i> sp. ....	50
<b>FIGURA 23:</b> Etapas do bioensaio de herbivoria. <b>1:</b> dois alimentos artificiais (com incorporação do extrato bruto e sem o extrato bruto); <b>2:</b> herbívoro em contato com o alimento; <b>3:</b> Replicas do bioensaio; <b>4:</b> Contagem dos quadrados consumidos. ....	51

<b>FIGURA 24:</b> Método de obtenção dos extratos de <i>Nymphoides indica</i> . Onde MeOH = metanol; C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> = hexano; AcOEt = acetato de etila, EBtotal = extrato bruto em metanol total, EBH = extrato bruto em hexano e EBAC = extrato bruto em acetato de etila e EBM = extrato bruto em metanol. ....	53
<b>FIGURA 25:</b> Cromatografia de Alta Eficiência (CLAE-UV-DAD) dos indivíduos (A) do Campo com radiação UV-B natural; (B) cultivados sem radiação UV-B (Controle); (C) do cultivo com radiação UV-B 1,93 vezes maior que a natural (Tratamento). ....	65
<b>FIGURA 26:</b> (A) Estrutura do núcleo fundamental dos flavonoides. (B) Estrutura das principais classes de flavonoides. ....	64
<b>FIGURA 27:</b> Gráfico dos escores dos Componentes Principais 1 e 2 (CP1 e CP2) na Análise dos Componentes Principais dos perfis químicos obtidos por CLAE e lidos em 254nm. Círculos vermelhos representam indivíduos do tratamento (cultivados com radiação UV-B), círculos azuis representam indivíduos do controle (cultivados sem radiação UV-B) e círculos verdes representam indivíduos do campo (radiação UV-B natural). ....	69
<b>FIGURA 28:</b> Medianas, quartis, mínimos e máximos dos escores da PC1 dos indivíduos do tratamento, campo e controle. Letras diferentes denotam diferença significativa entre controle, tratamento e campo (Kruskal-Wallis). $H(2, N=30) = 13,934; p = 0,001$ . ....	70
<b>FIGURA 29:</b> (A) Peso do sinal do cromatograma na variação de CP1 pelo tempo de retenção. (B) Peso do sinal do cromatograma na variação de CP2 pelo tempo de retenção. ....	71
<b>FIGURA 30:</b> Espectro de UV da substância com tempo de retenção em 28,6 responsável pela segregação dos extratos na PCA. (A) Campo; (B) Controle e (C) Tratamento. ....	72
<b>FIGURA 31:</b> Espectro de UV da substância com tempo de retenção em 28,9 responsável pela segregação dos extratos na PCA. (A) Campo; (B) Controle e (C) Tratamento. ....	73
<b>FIGURA 32:</b> Estrutura do flavonol quercetina. ....	74
<b>FIGURA 33:</b> Correlação de Pearson ( $R_{\text{Pearson}} = -0,50; p = 0,037$ ) do EC <sub>50</sub> dos indivíduos do Campo e Tratamento com a intensidade do pico 28,9 (mAU). ....	78

**FIGURA 34:** Média e desvio da cinética de reação dos extratos brutos (A) dos indivíduos de campo com DPPH (radiação UV-B natural, n=10); (B) dos indivíduos controle com DPPH (submetidos a cultivo sem radiação UV-B, n=10); (C) dos indivíduos do tratamento com DPPH (submetidos a cultivo com 1,93 vezes a radiação UV-B natural, n=10) e do (D) BHT com DPPH (n=3). Onde a linha vermelha representa a concentração de 5 µg/mL; a linha verde representa a concentração de 10 µg/mL; a linha azul representa a concentração de 25 µg/mL; a linha rosa representa a concentração de 50 µg/mL; a linha cinza representa a concentração de 125 µg/mL e a linha marrom representa a concentração de 250 µg/mL. 80

**FIGURA 35:** Medianas, Média, desvios padrão, mínimo e máximo do percentual de consumo dos extratos dos indivíduos do campo (UV-Natural, n=10); Controle (Sem UV-B, n=10) e tratamento (1,93 vezes a radiação UV-B natural, n=10) pelo herbívoro *Biomphalaria* sp. Onde box verde representa o alimento sem adição do extrato e box vermelho o alimento com adição do extrato. Separações pontilhadas denotam teste de Wilcoxon para cada grupo. .... 83

**FIGURA 36:** Cromatogramas dos extratos brutos de *N. indica* destacando a presença nos extratos das substâncias sugeridas. (A) Extrato bruto total em metanol. (B) Extrato bruto sequencial metanol. (C) Extrato bruto sequencial em acetato. (D) Extrato bruto sequencial metanol. Com destaque para as substâncias estruturalmente sugeridas seguida do seu espectro de UV. **1:** Floroglucinol; **2:** Ácido Clorogênico; **3:** (-) – Epicatequina; **4:** Quercetina; **5:** Ácido Ferrúlico e **6:** Miricetina. .... 94

**FIGURA 37:** Média e desvio da cinética de reação de (A) EBtotal (extrato bruto em metanol) com DPPH; (B) EBM (extrato bruto em metanol) com DPPH; (C) EBAC (extrato bruto em acetato de etila) com DPPH, (D) BHT com DPPH e (E) EBH (extrato bruto em hexano) com DPPH. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Linha vermelha representa a concentração de 5 µg/mL; a linha verde representa a concentração de 10 µg/mL; a linha azul representa a concentração de 25 µg/mL; a linha rosa representa a concentração de 50µg/mL; a linha cinza representa a concentração de 125 µg/mL e a a linha marrom representa a concentração de 250 µg/mL. .... 97

FIGURA 38: Média, desvios padrão, mínimo e máximo do percentual de consumo dos extratos brutos sequencias em hexano, acetato de etila e metanol (EBH, EBAC e EBM respectivamente) e do extrato bruto total em metanol (EBtotal). Onde o box verde representa o alimento sem adição do extrato (controle) e box vermelho o alimento com adição do extrato (tratamento). Separações pontilhadas denotam teste t pareado individual para cada extrato. .... 99

## LISTA DE TABELAS

---

<b>TABELA I:</b> Classificação dos compostos fenólicos de acordo com o esqueleto básico de carbono e a distribuição no reino vegetal. Onde C6 corresponde ao anel benzênico e CX à cadeia substituinte com X átomos de carbono. (tabela adaptada de Simões et al. 2010) ..	10
<b>TABELA II:</b> Sistema de gradiente otimizado utilizado na análise de CLAE .....	43
<b>Tabela III:</b> Padrões comerciais de compostos fenólicos utilizados na caracterização do perfil químico por CLAE-UV-DAD do extrato bruto em metanol (EBM1) da macrofita aquática <i>Nymphoides indica</i> . .....	54
<b>TABELA IV:</b> Médias e desvios padrão do rendimento quântico do potencial (Fv/Fm) do fotossistema II dos indivíduos do campo (n = 10) e dos indivíduos submetidos ao experimento de cultivo sem radiação UV-B (controle, n=10) e com radiação UV-B (tratamento, n=10). Letras diferentes significam diferença significativa no teste de variância ANOVA. ....	59
<b>TABELA V:</b> Médias e desvios padrão da diferença do rendimento quântico efetivo da fotossíntese ( $\Delta F/F_m'$ ) antes e depois da aplicação da dose de radiação UV-B nos indivíduos submetidos ao experimento de cultivo sem radiação UV-B (controle) e com radiação UV-B (tratamento). Valores positivos representam $\Delta F/F_m'$ maiores antes da aplicação da radiação UV-B e valores negativos representam $\Delta F/F_m'$ maiores após a da aplicação da radiação UV-B. (*) representa valores significativamente diferente de zero (Teste T contra zero). (p) representa diferença significativa entre controle e tratamento (Teste T).....	61
<b>TABELA VI:</b> Médias e desvios padrão do rendimento quântico efetivo ( $\Delta F/F_m'$ ) e da taxa de transporte de elétrons (ETR), obtidos das curvas de resposta à luz instantânea, sob radiação fotossinteticamente ativa de 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (pouca luz) dos indivíduos submetidos ao experimento de cultivo sem radiação UV-B (controle), com radiação UV-B (tratamento) e dos indivíduos em condições naturais (campo). Asteriscos denotam diferença significativa entre controle e tratamento (Teste t de Student). Letras diferentes denotam diferença significativa entre controle, tratamento e campo (One way ANOVA).....	61

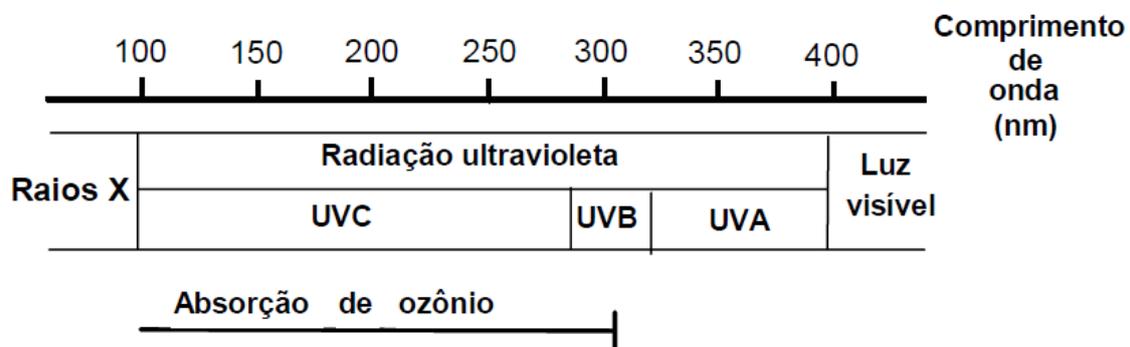
<b>TABELA VII:</b> Médias e desvios padrão do rendimento quântico efetivo ( $\Delta F/F_m'$ ) e da taxa de transporte de elétrons (ETR), obtidos das curvas de resposta à luz instantânea, sob radiação fotossinteticamente ativa de $1800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (muita luz) dos indivíduos submetidos ao experimento de cultivo sem radiação UV-B (controle), com radiação UV-B (tratamento) e dos indivíduos em condições naturais (campo). Asteriscos denotam diferença significativa entre controle e tratamento (Teste <i>t</i> de Student). Letras diferentes denotam diferença significativa entre controle, tratamento e campo ( <i>One way ANOVA</i> ).....	62
<b>TABELA VIII:</b> Mediana, máximo e mínimo de $EC_{50}$ (concentração da amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH) dos extratos brutos dos indivíduos do campo (N=10), controle (N=10) e tratamento (N=10). BHT foi utilizado nos ensaios como controle positivo (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras (Kruskal Wallis).....	77
<b>TABELA IX:</b> Massa e rendimento dos extratos brutos de <i>Nymphoides indica</i> , onde EBH= extrato bruto sequencial em hexano; EBAC= extrato bruto sequencial em acetato de etila; EBM = extrato bruto sequencial em metanol; EBtotal = extrato bruto em metanol.....	85
<b>TABELA X:</b> Padrões comerciais com seus respectivos tempos de retenção em minutos e espectro de UV. A presença e a ausência das substâncias no extrato em metanol (EBtotal) de <i>Nymphoides indica</i> foram representadas por + e -, respectivamente.....	87
<b>TABELA XI:</b> Médias e Erro padrão de $EC_{50}$ (concentração da amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH) dos extratos brutos de <i>Nymphoides indica</i> expressa em g de amostra/g DPPH. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada extrato. EBH= extrato bruto sequencial em hexano; EBAC= extrato bruto sequencial em acetato de etila; EBM = extrato bruto sequencial em metanol; EBtotal = extrato bruto em metanol. BHT foi utilizado como controle positivo no ensaio antioxidante. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no teste post hoc de Tukey. ANOVA: $F = 405,844, p < 0,001$ .....	95



# **INTRODUÇÃO**

# 1. INTRODUÇÃO

A radiação é a principal fonte de energia na maioria dos ecossistemas naturais. A radiação ultravioleta (UV) está compreendida entre o espectro eletromagnético com comprimento de onda que varia de 100 a 400nm. A comissão Internacional de Iluminação classifica a radiação UV em três tipos: UV-C (100 – 280nm), UV-B (280-320nm) e UV-A (320-400nm) (Okuno 1996) (FIGURA 1).



**FIGURA 1:** Espectro de radiação ultravioleta e absorção pelo ozônio estratosférico.

A camada estratosférica de ozônio é o principal agente de absorção de radiação UV-C e UV-B na atmosfera da Terra (Santos *et al.* 2004). O ozônio absorve a radiação a partir da luz solar incidente. Outra propriedade notável do ozônio é que ele protege a superfície da Terra da radiação UV-B prejudiciais devido às suas propriedades espectroscópicas (Godin-Beekmann 2010).

Nas últimas três décadas, devido à redução progressiva de ozônio estratosférico, os índices de UV que atingem a superfície da terra aumentaram (Veteli *et al.* 2007; Zancan *et al.* 2008; Nazari *et al.* 2010). Os grandes responsáveis pelo contínuo esgotamento do ozônio estratosférico são os poluentes atmosféricos antropogenicamente liberados, como os clorofluorcarbonos (CFCs) (Sinha & Häder 2002), substâncias químicas contendo Cloro (Cl) e Bromo (Br), tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>), tricloroetano (TCA), hidroclorofluorcarbonos (HCFCs) e brometo de metila (Short



devido ao reflexo do aumento da população mundial e emissões de gases poluentes, provenientes da agricultura, da combustão de combustíveis fósseis e processos industriais, que são os grandes responsáveis pela alteração da composição química da atmosfera. (Godin-Beekmann & Nair 2012). Essa alteração, conseqüentemente, influencia na incidência de radiação UV-B que atinge a superfície da Terra, gerando um estresse para os ecossistemas afetados.

Dados da Organização Meteorológica Mundial (*World Meteorological Organization* - WMO) provenientes de modelos tridimensionais Química-Clima indicam que o nível de radiação UV-B que atinge a superfície da Terra está perto dos níveis máximos já observados. Estima-se que estes níveis só retornem a valores inferiores aos observados antes da década de 80 entre 2040-2070 (WMO, 2007). Por causa dessas estimativas, existe considerável interesse no estudo dos efeitos UV-B sobre os organismos expostos (Fabón *et al.* 2012).

A radiação UV-B tem efeitos biológicos nocivos. Causando danos que comprometem a morfologia, o crescimento, a fisiologia, a bioquímica e a reprodução dos organismos expostos (Ballaré *et al.* 2001; Bjerke *et al.* 2005; Nazari *et al.* 2010). Fótons de UV podem afetar o citoplasma e as estruturas de membrana. Quando absorvidos pelas bases nitrogenadas, formam fotoprodutos tais como dímeros de pirimidina-ciclonutano, que alteram a estrutura das moléculas de DNA (Pinto *et al.* 1999; Zengling *et al.* 2010) e bloqueiam a transcrição de RNA, alterando a estrutura de proteínas, lipídios e outras moléculas biologicamente relevantes em processos fisiológicos (Santos *et al.* 2012). No entanto, organismos expostos podem desenvolver mecanismos para neutralizar os efeitos danosos da radiação UV. Entre estas estratégias de atenuação, estão os mecanismos de reparo de danos induzidos no DNA por fotorreativação e ações enzimáticas, por exemplo, fotoliase (Sinha & Häder 2002; Blokhina *et al.*; 2003).

Organismos fotossintéticos dependem da radiação solar para processos fisiológicos vitais, sendo assim, estes estão inevitavelmente expostos à radiação UV-B. Entretanto, há evidências de que a depleção de ozônio altera a razão UV-B: UV-A: PAR (do inglês *Photossintetic Active Radiation* - radiação fotossinteticamente ativa), o que pode perturbar as respostas dependentes de luz dos organismos, incluindo a fotossíntese, foto-orientação, fotoinibição e fotoproteção (Hader *et al.* 1998). Devido ao papel central

da fotossíntese no metabolismo e desenvolvimento das plantas, os estudos sobre os efeitos adversos sobre a fotossíntese, no contexto das mudanças ambientais globais, são de extrema importância ecológica (Yin & Struik 2009).

Organismos fotossintetizantes são capazes de usar a energia da luz do Sol para produção de energia química e carboidratos. A radiação utilizada para o processo fotossintético está contida na faixa da luz visível (400 nm – 700 nm), denominada de PAR, correspondendo a 45% - 50%, aproximadamente, do total de radiação solar incidente (Ometto 1981; Casaroli 2007). A radiação PAR é captada por moléculas de clorofilas e carotenoides, localizadas nos fotossistemas e complexos antena associados. A energia captada é direcionada para os dois centros de reação localizados no interior do fotossistema I (PSI – *photosystem* I) e do fotossistema II (PSII – *photosystem* II). Esses fotossistemas oxidam a água e o oxigênio molecular para formar ATP e reduzir o NADP<sup>+</sup> a NADPH. Assim, a energia proveniente do Sol é conservada na forma de ATP e na forma de coenzimas orgânicas (NADPH). Posteriormente, esses substratos são utilizados no ciclo de Calvin & Benson para produzir açúcares e/ou cadeias de carbono utilizadas em outras rotas de biossíntese (Casaroli 2007).

O excesso de radiação UV pode ser considerado como sendo uma entrada excessiva de energia no sistema fotossintético. A radiação é absorvida por muitas biomoléculas contendo sulfidrilas aromáticas e podem assim causar um dano molecular direto, como por exemplo, a ruptura da dupla membrana dos cloroplastos. Essa ruptura pode causar alterações na permeabilidade da membrana; diminuir a atividade da enzima de fixação primária de carbono na fotossíntese, a Ribulose 1,5 bifosfato Carboxilase/Oxigenase (RuBisCO); além da diminuição da taxa de crescimento, de pigmentos fotossintéticos e desempenho fotossintético (Pinto, *et al.* 1999; Hanelt *et al.* 2006, Schmidt *et al.* 2012). A radiação UV-B pode prejudicar ainda a integridade e o funcionamento do complexo antena, além dos processos principais da fotossíntese, incluindo reações fotoquímicas nas membranas dos tilacóides e em vários processos enzimáticos como no ciclo de Calvin e no comportamento de difusão de CO<sub>2</sub> pelos estômatos (Surabhi *et al.* 2009).

Os danos gerados pela radiação UV-B parecem não estar distribuídos uniformemente entre os dois fotossistemas (PSI e PSII). A atividade do PSI não é afetada, ou então, sofre uma leve inibição pelo aumento da radiação UV-B. Esta

influencia principalmente o PSII. O centro de reação do PSII é formado por um complexo de ligação de clorofila, composta por dois polipeptídios (subunidades D1 e D2). Este complexo contém cerca de quatro moléculas de clorofila *a*, duas moléculas de feofitina- $\alpha$ ,  $\beta$ -caroteno e um ou dois átomos de ferro. A radiação UV-B afeta o complexo proteico D1/D2. A radiação atinge a sequência reacional do elétron, vindo da molécula de água, bloqueando PSII, que não suporta mais o fluxo de elétrons normal e acaba dissipando a energia utilizada nos processos fotossintéticos (Bornman 1989).

Entretanto, mecanismos de reparo foram selecionados ao longo da evolução das plantas permitindo respostas adaptativas ao estresse da radiação UV-B sobre a fotossíntese. Os tecidos fotossintéticos são protegidos por meio de mecanismos que reduzem a eficiência de absorção de energia luminosa, aumentando a taxa de dissipação de energia e melhorando a desintoxicação de espécies oxidativas. A redução da absorção da radiação solar pode ser alcançada através de um aumento da pilosidade da folha, das cutículas e ceras ou ainda alterando a inclinação da folha, o espessamento da parede celular e o desenvolvimento do mesófilo foliar. Destacam-se também os mecanismos de fotoproteção que contribuem para a dissipação térmica do excesso de energia, o movimento dos cloroplastos e, mais importante, a síntese de xantofilas, flavonoides e carotenóides do ciclo de pigmentos. Quando o excesso de energia excede a capacidade de dissipação térmica, antioxidantes representam a terceira e última linha de defesa contra os danos gerados pelo estresse da radiação UV-B (Bornman 1989; Camarero *et al.* 2012).

Outro efeito ao aumento da radiação UV-B, nos órgãos fotossintéticos, é a geração de fotoestresse oxidativo, que é induzido pelo desequilíbrio entre a absorção de energia pela clorofila e a sua utilização metabólica, aumentando o nível de espécies reativas de oxigênio (EROS) celulares (Santos *et al.* 2004; Camarero *et al.* 2012; Singh *et al.* 2012). O termo EROS é designado para espécies químicas altamente reativas que incluem os radicais superóxidos ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), radicais hidroxilas ( $\bullet\text{OH}$ ), oxigênio singlete, ozônio, peróxidos lipídicos, óxido nítrico (NO) e os peroxinitritos ( $\text{ONOO}_y$ ). Este último é também classificado como espécie reativa de nitrogênio, formado pela reação do radical ( $\text{NO}\bullet$ ) com o radical superóxido (Hanson *et al.* 2006; Duarte *et al.* 2007; Al-Gubory *et al.* 2010).

EROS são produzidos continuamente como subprodutos da respiração aeróbica por diversas vias metabólicas que apresentam uma alta atividade oxidante ou uma taxa intensa de fluxo de elétrons, como mitocôndrias, peroxissomos e cloroplastos. A fotossíntese é um dos processos metabólicos responsáveis pela formação de EROS (He & Häde, 2002; Gill & Tuteja 2010).

Níveis fisiológicos de EROS desempenham um importante papel para o organismo. Porém a produção e acumulação destes radicais a níveis não fisiológicos podem estar associadas a estresse ambiental, atuando como sinalizadores no reconhecimento e resposta dos fatores de estresse (Ariigoni *et al.* 1992). Em condições de estado estacionário, as moléculas EROS são estabilizadas por vários mecanismos de defesa antioxidante. O equilíbrio entre a produção e a eliminação de EROS pode ser influenciado por vários fatores de estresse bióticos e abióticos como salinidade, seca, metais pesados, temperaturas extremas, deficiência de nutrientes, poluição do ar, herbicidas, ataques de patógenos e radiação UV (Gill & Tuteja 2010). Os fótons altamente energéticos dos raios UV-B são absorvidos por grupos cromóforos de muitas moléculas biologicamente importantes, tais como clorofilas, ficobiliproteínas e quinonas. Estas moléculas podem atuar como fotossensibilizadores para a produção de EROS. Estes distúrbios no equilíbrio levam a um aumento súbito dos níveis de EROS intracelulares, que podem causar danos significativos às estruturas celulares (He & Häder 2002).

O excesso de EROS esta associada com uma série de danos biológicos, podendo danificar proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA e em última instância, pode resultar na morte celular. A capacidade oxidativa do radical  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode estar relacionada diretamente com a atividade de proteínas que apresentam resíduos cisteína desprotonada. Radicais  $\bullet\text{O}_2^-$  oxidam e inativam proteínas de membrana da cadeia respiratória, liberando íons  $\text{Fe}_2^+$  e peróxido de hidrogênio, que pode ainda produzir o radical  $\bullet\text{OH}$ , altamente tóxico e reativo, que afeta a integridade e funcionamento do transporte de membrana (Langebartels *et al.* 2002, Blokhina *et al.* 2003, Santos *et al.* 2012)

Por esses danos gerados pelos radicais livres, organismos desenvolveram mecanismos de defesa antioxidantes integrados e altamente complexos, que lhes permitem lidar com a propagação dos danos oxidativos. Esses mecanismos são

baseados numa rede antioxidante enzimática e não enzimática. Antioxidantes enzimáticos incluem enzimas superóxido dismutase, catalases, redutases e peroxidases. O sistema não-enzimático inclui substâncias redutoras, quelantes ou captadoras de radicais livres, como glutathiona, flavonoides e carotenóides (Ariigoni *et al.* 1992; Gill & Tuteja, 2010; El-Beltagi 2011).

Observa-se que para aclimatar-se à inevitável exposição à radiação UV-B, organismos exibem uma variedade de respostas fisiológicas como mecanismos de proteção ou mecanismos de reparo contra o estresse gerado pelo UV-B. O mecanismo mais comum de proteção contra os danos da radiação é a biossíntese e/ou bioacumulação de substâncias provenientes do metabolismo secundário tais como substâncias fenólicas, flavonoides e carotenóides, conhecidas como metabólitos secundários ou produtos naturais (Sun, *et al.* 2010; Schmidt *et al.* 2012).

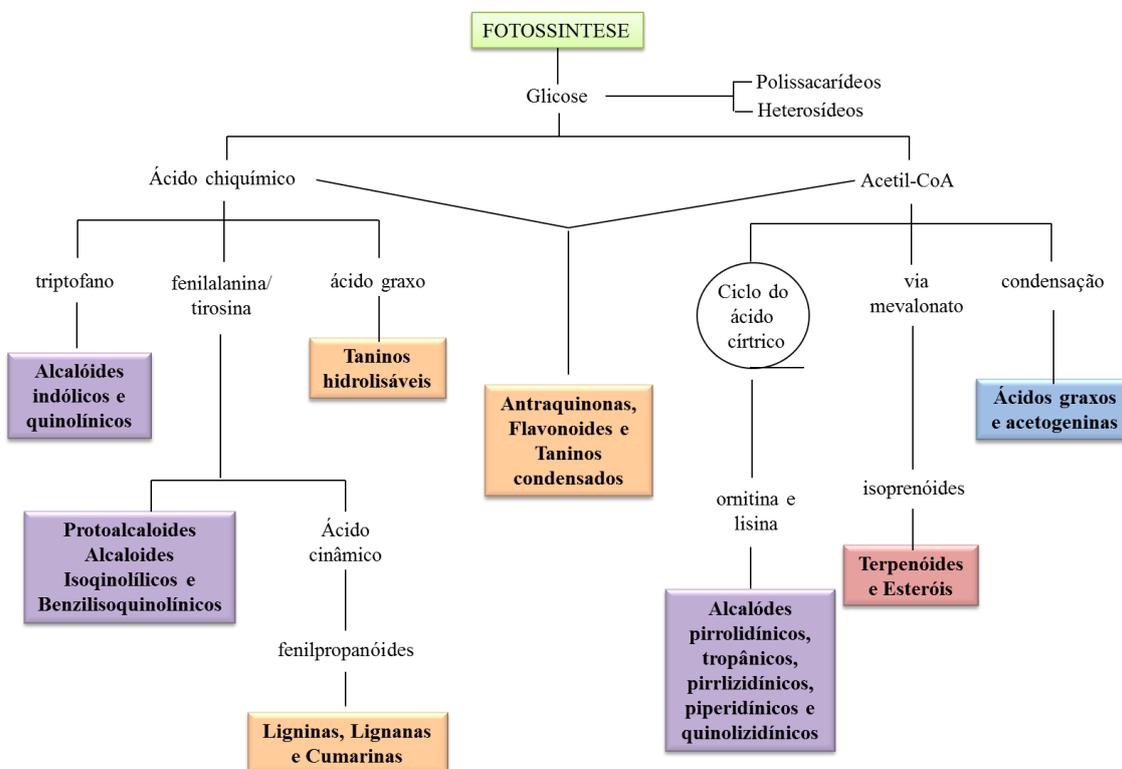
O metabolismo nada mais é do que o conjunto de reações químicas que ocorrem no interior das células. O metabolismo pode ser dividido em primário e secundário. Metabólitos secundários são grupos diversos de substâncias orgânicas com baixo peso molecular, que durante muito tempo foram considerados produtos de excreção metabólica, pois não participam diretamente das atividades vitais comuns a todos os organismos como: respiração, reprodução, crescimento. No entanto, sabe-se que estas moléculas apresentam um importante papel adaptativo nas interações ecológicas entre a planta e o seu ambiente (Bassman 2004).

Em contraste com os metabólitos primários (carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos), os metabólitos secundários são frequentemente acumulados em pequenas quantidades nas plantas, sendo sintetizados em alguns tipos de células especializadas e/ou em determinados estágios de desenvolvimento. Nenhum grupo de planta possui o mesmo perfil de metabólitos secundários, o que faz destas substâncias importantes na classificação taxonômica (Alves 2003).

No entanto, a divisão dos metabólitos entre primários e secundários é inequívoca (Kozłowski & Pallardy 1997). A biossíntese de metabólitos secundários é realizada por rotas metabólicas muito relacionadas com rotas responsáveis pela síntese de metabólitos primários. Essas rotas metabólicas são interconectadas, as rotas que sintetizam metabólitos primários fornecem moléculas que são utilizados como precursores ou

“blocos de construções químicos” nas principais rotas de síntese de metabólitos secundários. Nesse sentido, embora se faça a divisão em metabólitos primário e secundário, o metabolismo deve ser considerado como um todo, com a produção substâncias primárias e secundárias (Simões *et al.* 2010).

Metabólitos secundários podem ser divididos em alguns grandes grupos de acordo com sua rota Biosintética e seu esqueleto carbônico entre eles destacam-se os alcaloides, ácidos graxos, terpenos, esteroide e fenólicos (Dewick, 2002). A FIGURA 3 resume as rotas biossintéticas dos metabólitos secundários.



**FIGURA 3:** Ciclo biossintético dos metabólitos secundários (Retirado de Simões *et al.* 2011).

Devido às suas propriedades farmacológicas, metabólitos secundários vegetais têm sido utilizados há séculos na medicina tradicional (Bourgaud *et al.* 2001). Do ponto de vista econômico, os metabólitos secundários representam para a biodiversidade

vegetal um grande valor de opção, uma vez que os organismos, e até ecossistemas inteiros, podem ser conservados/preservados por seu potencial em gerar benefícios futuros (Marques & Comune 1995). Atualmente, princípios ativos de origem vegetal correspondem a substâncias valiosas para o mercado mundial, pois podem fazer parte da produção de medicamentos, fragrâncias, cosméticos, corantes, inseticidas, produção de tintas e nutracêuticos (Verpoote 2000; Bourgaud *et al.* 2001).

Para os vegetais, essa diversidade química apresenta um papel importante no seu sucesso evolutivo. Propõe-se que a produção destas substâncias aumenta o *fitness* do organismo, agindo como uma alternativa química no mecanismo de defesa. Devido a seu hábito sésil, as plantas são menos capazes de evitar as mudanças locais das condições ambientais e estresses bióticos. Consequentemente podem sintetizar um enorme número de metabólitos secundários importantes para sua sobrevivência, pois os mesmos mediam importantes interações ecológicas com seus ambientes, atuando como defesas químicas contra estresses abióticos e bióticos (Maplestone *et al.* 1992; Iriti & Faoro, 2009).

Entre os metabólitos secundários produzidos, as substâncias fenólicas representam uma grande classe de metabólitos secundários considerados de extrema importância para os aspectos funcionais dos vegetais. Estes incluem papéis estruturais de suporte; propriedades de sinalização, particularmente nas interações entre plantas e seu ambiente; e propriedades que atuam no sabor, odor e coloração de diversos vegetais (Boudet 2007). Uma das suas principais funções está relacionada a estratégias de defesa, contra patógenos, microorganismos, herbivoria (Choi *et al.* 2002; Howell, *et al.* 2003; Bauer *et al.* 2009; Metlen *et al.* 2009), e contra o estresse oxidativo causados por radiação UV (Staaaj *et al.* 2002; Sotka *et al.* 2009).

Os fenólicos incluem uma grande diversidade de estruturas simples conhecidas como ácidos fenólicos e cumarinas e estruturas complexas ou polifenóis, entre eles, taninos hidrolisáveis e não-hidrolisáveis e flavonoides como flavona, flavonol, flavanol, flavanona, isoflavona, antocianina e chalcona. Estas substâncias são derivadas de diversas vias do metabolismo secundário com diferentes propriedades físico-químicas (polaridade, solubilidade, capacidade de formar ligações de hidrogênio, potencial de oxidorredução). Uma característica comum a todas essas estruturas é a presença de pelo menos um anel aromático no qual, ao menos, um hidrogênio é substituído por um grupo

hidroxila (Ryan *et al.* 2002; Boudet 2007; Simões *et al.* 2010). Resumidamente os fenólicos podem ser classificados segundo seu esqueleto principal, conforme apresentado na TABELA I.

**TABELA I:** Classificação dos compostos fenólicos de acordo com o esqueleto básico de carbono e a distribuição no reino vegetal. Onde C6 corresponde ao anel benzênico e CX à cadeia substituinte com X átomos de carbono. (tabela adaptada de Simões *et al.* 2010)

<b>Esqueleto Básico (C6-CX)</b>	<b>Classe de compostos fenólicos</b>	<b>Ocorrência no reino vegetal</b>
C6	fenóis simples, benzoquinonas	distribuição restrita
C6-C1	ácidos fenólicos	amplamente distribuídos
C6-C2	acetofenonas e ácidos fenilacéticos	distribuição restrita
C6-C3	fenilpropanóides: ácido cinâmico e compostos análogos, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas e cromanonas	amplamente distribuídos
C6-C4	Naftoquinonas	distribuição restrita
C6-C1-C6	estilbenos, antraquinonas	distribuição restrita
C6-C2-C6	Xantonas	amplamente distribuído
C6-C3-C6	flavonoides e isoflavonoides	amplamente distribuídos
(C6-C3) <sub>2</sub>	Lignan	distribuição restrita

(C6-C3-C6) <sub>2</sub>	Diflavonoides	amplamente distribuídos
(C6) <sub>n</sub>	melaninas vegetais	amplamente distribuídos
(C6-C3) <sub>n</sub>	Ligninas	amplamente distribuídos
(C6-C1) <sub>n</sub>	taninos hidrossolúveis	amplamente distribuídos
(C6-C3-C6) <sub>n</sub>	taninos condensados	amplamente distribuídos

---

Tais estruturas estão envolvidas em, praticamente, qualquer interação da planta com o ambiente abiótico. Existem evidências de que substâncias fenólicas, como flavonóides, podem reduzir os danos causados pela radiação UV-B, porque podem atuar como filtros solares, reduzindo a penetração dos raios potencialmente danosos (Li *et al.* 1993; Bieza *et al.* 2001, Hidema *et al.* 2001; Reifenrath & Muller 2007; Xu *et al.* 2008), além de atuarem como substância antioxidante, sequestrando radicais livres e EROS (Sinha & Hader 2002).

A compreensão do papel ecológico das substâncias fenólicas, e de todos os metabólitos secundários, tem se tornado uma das principais áreas de pesquisa dentro da ecologia durante as últimas três décadas, fornecendo teorias e modelos importantes na ecologia vegetal, o que buscam explicar e prever padrões de defesas químicas nestes organismos (Bassman 2004).

Uma importante teoria proposta por McKey (1974) e Rhoades (1979) (*apud* Alves 2003), e muito citada nos livros textos de ecologia, é a teoria de defesas químicas constitutivas e induzidas em resposta a fatores de estresse. Esta teoria postula que assim como crescer, defender-se também é importante. Entretanto, a produção de substâncias secundárias que atuam como defesa pode ser um processo muito caro energeticamente para a planta. Isso porque embora a presença de defesas químicas em plantas gere benefícios na presença do agente estressor, a expressão dessas substâncias pode ser custosa para a planta na ausência dos mesmos, implicando em menor alocação das

reservas em crescimento e reprodução (Straus *et al.* 2002; Cronin 2001, Anderson & Agrell 2005; Pohnert 2007).

Desta forma, as defesas constitutivas são produzidas invariavelmente em níveis efetivos, mesmo sem a ação do gerador do estresse. Os organismos alocariam defesas constitutivas em função de maximizar o *fitness* e que estas seriam custosas, particularmente quando “inimigos naturais” não estiverem presentes. Em contraste, as defesas induzidas são produzidas em concentrações ativas somente quando ocorre a percepção de estresse no meio. Estas podem estar relacionadas com o aumento do nível mínimo de defesa já presente (níveis constitutivos) ou podem se iniciar diante de um quadro onde não havia substâncias de defesa presentes. O primeiro benefício da defesa induzida é que através dela, a utilização de recursos metabólicos, ocorre em função de uma pequena probabilidade de estresse. Assim, a defesa propriamente dita e o custo relacionado a sua produção aumentam apenas quando seus benefícios resultam em vantagem para a planta. A grande desvantagem da utilização do sistema de defesa induzida é que existe um período de tempo entre a geração do estresse e a resposta de defesa (Cronin & Hay 1996; Amsler 2001; Alves 2003; Strauss *et al.* 2004; Macaya & Thiel 2008; Gianoli *et al.* 2008; Gutbrodt *et al.* 2011).

Com base nos pressupostos que relatam o custo energético para a produção de defesas químicas, espera-se que os metabólitos secundários produzidos em respostas a um determinado estresse, também atuem, de forma integrada, em outros mecanismos de defesa em plantas (Bednarek 2012). Estes metabólitos respondem de forma integrada a diferentes condições de estresse, revelando um papel multifuncional na ação defensiva (Rao *et al.* 1996; Mackerness *et al.* 1999; Santos *et al.* 1999; Costa *et al.* 2002; Savenstramd *et al.* 2002). Substâncias fenólicas, por exemplo, que foram produzidas como proteção contra radiação UV-B, agindo como substâncias absorventes de radiação e antioxidante, possuem também defesa contra herbivoria ou como substâncias estimuladoras para herbívoros especialistas, respondendo de forma integrada nas interações ecológicas em que são expostas (Barbehenn & Constabel 2011).

Neste contexto de resposta integrada, estudos mostram que plantas respondem ao estresse causado pela radiação UV, alterando as concentrações de metabólitos secundários, e que estas alterações influenciam nas respostas de interações herbívoro-planta (Macaya *et al.* 2005). Ballaré *et al.* (2001) mostraram que plantas com maior

concentração de substâncias que atuam como filtros da radiação solar UV-B foram significativamente mais consumidas que plantas expostas a níveis extremamente baixos de radiação. Outros autores também demonstraram que o aumento da radiação UV-B inibiu o consumo por herbívoros (Rousseau *et al.* 1998; Zaller *et al.* 2004 ). Assim, não há consenso em relação à resposta integrada entre defesas contra radiação UV-B e defesas contra herbivoria.

Interações ecológicas entre herbívoros e plantas são de grande importância nos ecossistemas naturais, pois são fundamentais na distribuição e na abundância de cada espécie, através do tempo e do espaço, influenciando assim na estrutura da comunidade. Herbívoros provocam numerosos efeitos negativos na capacidade reprodutiva, perda progressiva do tecido fotossintético e crescimento das plantas, reduzindo sua habilidade competitiva (Del-Claro & Torezan-Silingard 2011).

Deste modo, ao longo da evolução das plantas, a interação herbívoro-planta levou o desenvolvimento de características para reduzir o estresse gerado pela herbivoria. Entre estas características destacam-se as defesas químicas por metabólitos secundários (Ricklefs 2011). Muitos trabalhos mostram que alguns alcaloides, terpenos e estruturas fenólicas, apresentam toxicidade ou um sabor adstringente a herbívoros. Tais mecanismos reduzem a probabilidade de dano aos tecidos da planta. (Hay & Fenical 1988; Meyer & Paul 1995; Strauss *et al.* 2002; Soares, *et al.* 2003; Parker *et al.* 2006; Lankau *et al.* 2009; Metlen *et al.* 2009; Lankau & Kliebenstein 2009; Konno 2011) .

### **Plantas aquáticas no contexto de estresse pela radiação UV-B**

A literatura atual tem se concentrado principalmente sobre os efeitos UV em ecossistemas terrestres e em ambientes marinhos, particularmente a Antártida, onde o esgotamento do ozônio tem sido mais intenso (Zengling *et al.* 2010). Menos informação existe disponível para os ecossistemas de água doce (Hanelt *et al.* 2006; Nazari *et al.* 2010). Entretanto doses biologicamente efetivas de radiação UV-B penetram na coluna de água e podem afetar consideravelmente os organismos aquáticos, principalmente os organismos fotossintéticos (Germ *et al.* 2002; Sinha & Hader, 2002; Beckmann *et al.* 2012).

Plantas aquáticas são angiospermas, que evoluíram a partir de espécies terrestres e apresentam uma elevada flexibilidade ecológica. Esses organismos podem ser encontrados desde ambientes de brejo até áreas completamente submersas. Estas plantas apresentam um papel importante na estruturação do ecossistema de água doce, pois colonizam extensas áreas e apresentam elevadas taxas de produção primária, servindo de alimento e abrigo para diversos animais, invertebrados ou vertebrados (Palma-Silva 1998; Santamaría, 2002; Bove & Paz 2009)

Ao longo do gradiente de profundidade em lagoas, essas angiospermas exibem diferentes padrões de zoneamento. Estes padrões de ocupação são uma das classificações mais utilizadas para plantas aquáticas, dividindo-as em: emersas; enraizadas com folhas flutuantes; submersas enraizadas; submersas livres e flutuantes (Esteves 1998). Por sua vez, este zoneamento gera uma sensibilidade diferencial à tolerância de PAR e UV (Hanelt *et al.* 2006). A relação entre a profundidade de penetração de UV-B e PAR pode ser usada para inferir os efeitos prejudiciais sobre os organismos aquáticos da radiação UV-B que atinge a zona eutrófica.

Algumas espécies de macrófitas aquáticas, principalmente as emersas e de folhas flutuantes, são, por conseguinte, expostas às condições ambientais muito variáveis, incluindo radiação UV-B. Deste modo é esperada uma enorme plasticidade fenotípica destas espécies como fator chave para a sobrevivência. Por causa destas respostas plásticas e específicas de plantas aquáticas, ambientes de radiação ocasionalmente alta, como lagoas costeiras, oferecem um sistema desafiador para estudar as respostas e aclimações à radiação UV-B elevadas (Germ *et al.* 2002).

Neste contexto, estes organismos desenvolveram inúmeros mecanismos de proteção para assegurar sua sobrevivência nestes ambientes. Hanelt *et al.* (2006) mostraram diferentes efeitos na fotossíntese em macrófitas de água doce cultivadas em valores altos de PAR combinada à alta radiação UV-B. A clorofila e os outros pigmentos fotossintéticos, bem como os metabólitos secundários são responsáveis pela atenuação espectral da radiação UV-B na coluna d'água. É relatado também, que as plantas que crescem em águas rasas mantêm alta a capacidade de produzir substâncias que absorvem radiação UV, assegurando proteção eficaz contra a radiação UV-B (Hi & Häder 2002).

A atividade de herbívoros constitui em outro fator que ocorre concomitantemente com o estresse gerado pela radiação UV-B. Este também altera a distribuição, o desenvolvimento e a abundância de espécies vegetais em ambiente terrestre, corpos d'água doce bem como em ambiente marinho. Dentre diversos mecanismos de defesas contra a herbivoria, destaca-se a atividade dos metabólitos secundários (Hilt 2006; Elger *et al.* 2006).

Metabólitos secundários produzidos por plantas aquáticas podem atuar como um mecanismo de defesa contra herbívoros (Bolser & Hay 1998; Cronin *et al.* 2002, Hilt 2006). Newman *et al.* (1992) demonstraram, pela primeira vez, a produção de defesas químicas na planta aquática *Nasturtium officinale* L., uma espécie de agrião, que produz derivados de isotiocianatos que podem ser liberados no ambiente, inibindo a herbivoria por diferentes invertebrados aquáticos.

Desde então, diversos outros metabólitos, como lignanas, lignóides e alcalóides foram isolados de plantas aquáticas e apresentaram, em experimentos de laboratório, atividade contra diferentes classes de herbívoros (Bolser *et al.* 1998; Kubanek *et al.* 2000; Parker *et al.* 2006).

Diferentes classes químicas de metabólitos secundários já foram isoladas de plantas aquáticas, como por exemplo, substâncias fenólicas (Choudhary *et al.* 2008), flavonóides (Glomski *et al.* 2002), lignanas (Lane & Kubanek, 2006), terpenóides (Cangiano *et al.* 2001), alcalóides e hidroquinonas (Cota *et al.* 2004). Estas substâncias são de extrema importância para a sobrevivência das plantas aquáticas em seus ecossistemas, pois podem apresentar uma resposta integrada na proteção contra os efeitos da radiação UV-B, contra herbívoros e contra o estresse oxidativo, como antioxidantes (Aravind & Prasad 2004; Wang *et al.* 2008).

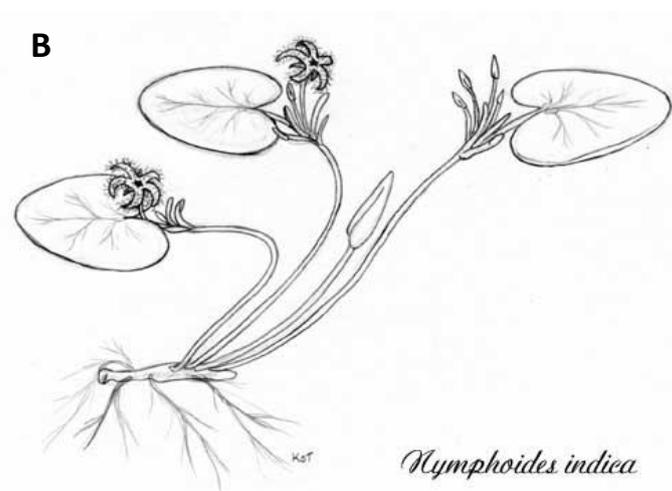
## *Nymphoides indica* (L.) KUNZE

### (MENYANTHACEAE)

As Menyanthaceae são plantas aquáticas de distribuição cosmopolita, incluindo cinco gêneros (*Liparophyllum*, *Menyanthes*, *Neprophyllidium*, *Nymphoides* e *Lillarsia*) e cerca de 40 espécies. Aproximadamente a metade pertence à *Nymphoides* (Souza & Lorenzi 2005).

Nos trópicos ocorre apenas o gênero *Nymphoides* com cerca de 35 espécies (Anderson & Amaral, 2005). Já no Brasil ocorre uma única espécie, *Nymphoides indica*, conhecida popularmente como lagartixa, é uma planta de grande plasticidade (Tsuchiya 1988), com uma ampla distribuição, ocorrendo desde brejos a lagoas do litoral (Albertoni *et al.* 2007). Esta espécie, ainda, é amplamente distribuída no leste da Ásia, África, Austrália e América do Sul e no Japão (Shibayama & Kadono 2003). No Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (RJ) encontra-se nas lagoas: Jurubatiba, Comprida, Carapebus, Paulista, Amarra-boi e Pires, (Bove & Paz 2009).

*N. indica* (FIGURA 4) é uma planta aquática com folhas flutuantes simples de curta duração, apresenta formato arredondado e superfície brilhante. São verdes na face adaxial e acastanhada na face abaxial, possui nervura em ambas as faces. Seus estômatos localizam-se na face superior da folha, em contato com o ar. Apresenta um curto rizoma constituindo a base da planta. Suas raízes são fasciculadas e abundantes (Shibayama & Kadono 2003). Exibe inflorescência axilar, próxima a base da folha ou flores solitárias delicada, lanceoladas e densamente pilosas, com acentuada heterostilia (estilete longo e estames curtos, ou vice-versa, em plantas diferentes), facilitando a polinização cruzada. A maturação das gemas florais ocorre debaixo d'água, pela manhã os brotos são erguidos acima do nível da água ocorrendo a floração. Suas flores têm duração de cerca de 1 dia começando a desaparecer no final da tarde. Após a fecundação o desenvolvimento do fruto ocorre debaixo d'água (Ramberg *et al.* 2006, Tippery *et al.* 2012). As flores de *N. indica* atraem visitantes florais especializados (Van Der Velde 1981), a atividade dos polinizadores ocorrem principalmente no período da manhã (Shibayama & Kadono 2003, Shibayama & Kadono 2007).



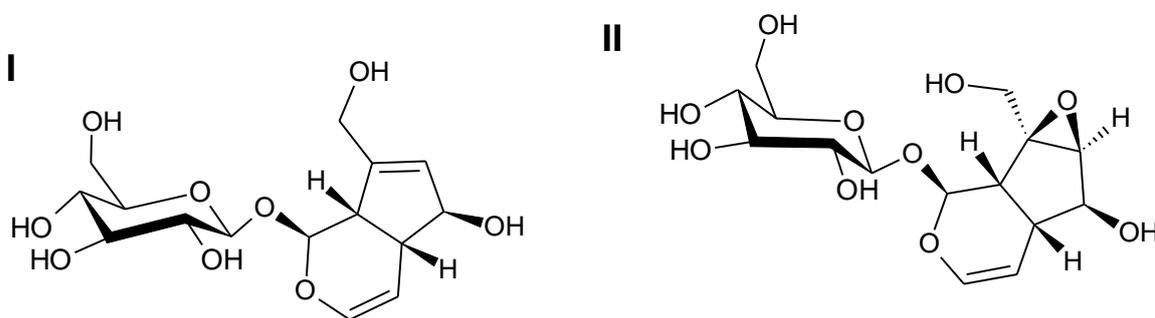
**FIGURA 4:** (A): Imagem de *N. indica* (B): Prancha de *N. indica* (<[http://www.ufscar.br/~probio/m\\_nymphaoides.jpg](http://www.ufscar.br/~probio/m_nymphaoides.jpg)> acessado em 08/11/20012)

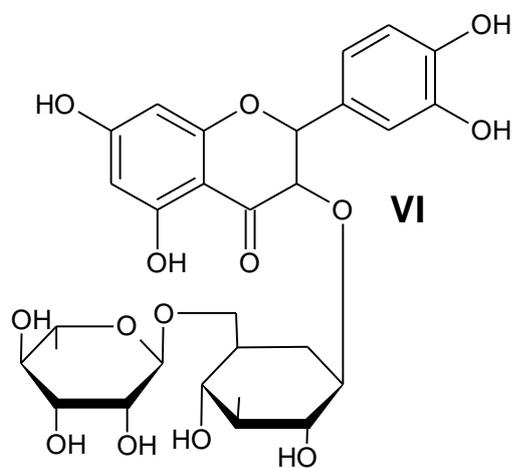
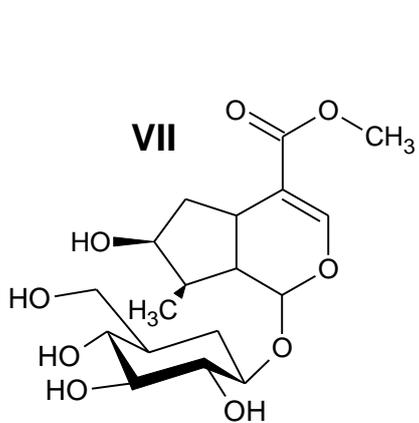
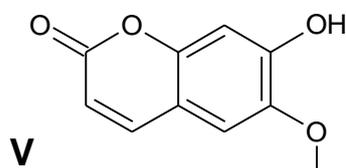
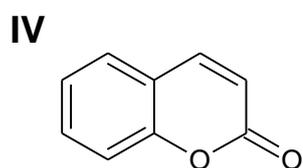
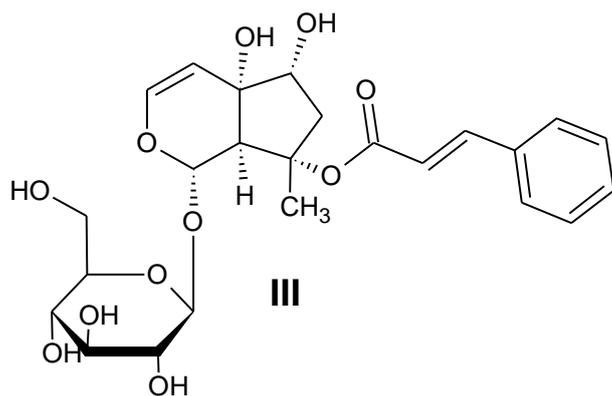
Além da reprodução sexuada, por sementes, esta espécie apresenta uma importante estratégia de reprodução vegetativa por fragmentação clonal (Ramberg *et al.* 2006). Através da reprodução clonal, as macrófitas aquáticas são capazes de se multiplicarem rapidamente, dispersar em novos habitats, competir com outras espécies por espaço e colonizar grandes áreas (Tippery & Les 2008).

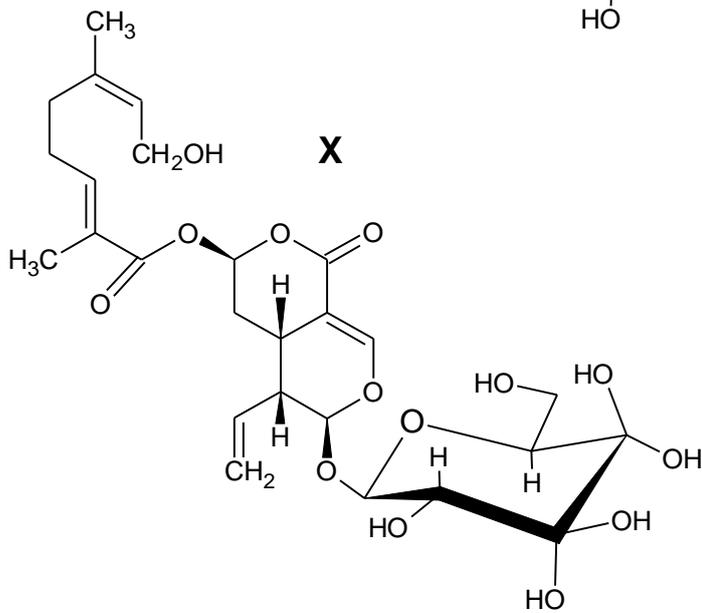
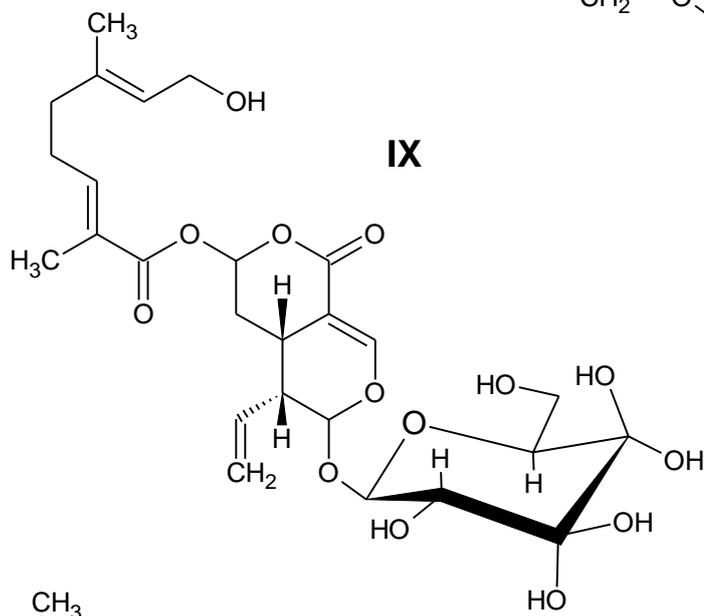
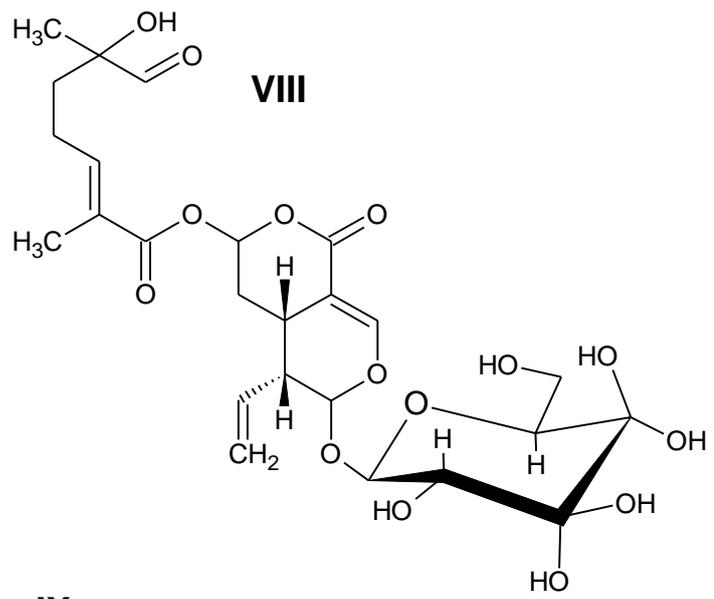
Os espécimes de *N. indica* encontram-se enraizados ao substrato com folhas flutuantes e com partes vegetativas inteiramente submersas. Porém esta espécie é classificada como uma planta anfíbia, pois pode desenvolver pequenas plantas terrestres em sedimentos temporalmente secos (Tsuchiya 1988). *N.indica* é capaz de explorar uma ampla gama de profundidades de água, devido a ajustes morfológicos e fisiológicos na eficiência fotossintética do tecido (Mason & van der Valk 1992).

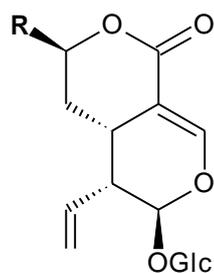
Esta espécie é eventualmente utilizada como ornamental em aquários, mas se adapta melhor quando exposta ao sol em tanques ou em pequenos lagos. Pode se comportar como invasora de culturas de arroz ou se alastrar em canais de irrigação (Jenks *et al.* 2000, Souza & Lorenzi, 2005).

Quanto a produção de metabólitos secundários, Wink (2003), em sua revisão, destaca para a família Menyanthaceae a presença de iridóides glicosilados, como a aucubina (**I**), catalpol (**II**) e a harpagoside (**III**). Já para o gênero *Menyanthes* diferentes tipos de estruturas fenólicas, tais como cumarinas (**IV**), escopoletina (**V**), flavonóis (rutina (**VI**), hiperintensa, trifolioside) foram descritas (Martz, 2009), além dos iridoides como: loganina (**VII**), menthiafolina (**VIII**), foliamenthina (**IX**), dihidrofoliamenthina (**X**); e secoiridoides (Shiobara, *et al.* 1994). Damtoft (1994) isolou e elucidou estruturas derivadas de ésteres monoterpênicos (**XI**) e Petersen, (2009) propôs a presença de ácido clorogênico (**XII**) para o gênero *Menyanthes*.





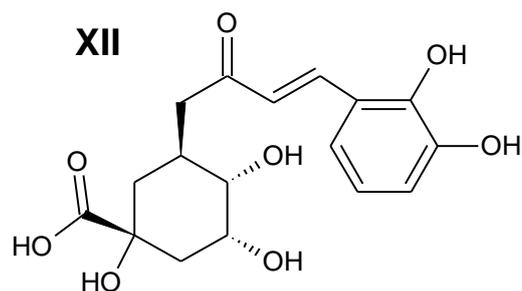




**Xla** R = OH

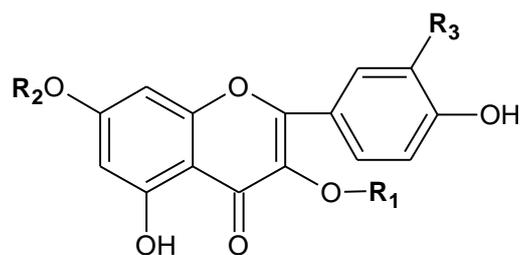
**Xlb** R =  $\alpha$ -OAc

**Xlc** R =  $\beta$ -OAc



**FIGURA 5:** Estruturas de metabólitos secundários presentes na família Menyanthaceae e no gênero *Menyanthes*. **(I)** aucubina; **(II)** catalpol; **(III)** harpagoside; **(IV)** cumarina; **(V)** escopoletina; **(VI)** rutina; **(VII)** loganina; **(VIII)** menthiafolina; **(IX)** foliamenthina; **(X)** dihydrofoliamenthina; **(XI)** ésteres monoterpnoídes; **(XII)** ácido clorogênc.

Por sua vez, Bohm *et al.* (1986) relatam em seu trabalho a química dos flavonóides para os cinco gêneros de Menyanthaceae (FIGURA 6). Dentre as espécies estudadas encontra-se *N. indica*, que apresenta isorhamnetina, 7-*o*-methylquercetina, e 3,7-di-*o*-methylquercetina.



**(I)**  $R_1 = R_2 = R_3 = H$

**(II)**  $R_1 = R_2 = H; R_3 = OH$

**(III)**  $R_1 = R_2 = H; R_3 = OCH_3$

**(IV)**  $R_1 = R_3 = H; R_2 = CH_3$

**(V)**  $R_1 = H; R_2 = CH_3; R_3 = OH$

**(VI)**  $R_1 = R_2 = CH_3; R_3 = OH$

**(VII)**  $R_1 = H; R_2 = CH_3; R_3 = OCH_3$

**FIGURA 6:** Flavonoides isolados de espécies representativas da família Menyanthaceae. Kaempferol **(I)**; quercetina **(II)**; isorhamnetina **(III)**; 7-*o*-methylkaempferol **(IV)**; 7-*o*-methylquercetina **(V)**; 3, 7-di-*o*-methylquercetina **(VI)**; and 7,3'-di-*o*-methylquercetina **(VII)**. (Retirado de Bohm *et al.* 1987).

Propriedades químicas e biológicas da espécie *Menyanthes trifoliata* (Menyanthaceae) têm sido amplamente estudadas. Esta espécie tem sido utilizada para tratar diferentes tipos de doenças inflamatórias, como nefrite e artrite (Tunón 1995). É descrito a utilização desta espécie também no tratamento de dor de cabeça, doenças da vesícula biliar, distúrbios hepáticos e distúrbios do sistema nervoso central (Saric-Kundalic 2011). Suas folhas são utilizadas como purgativos e contra distúrbios gástricos (Ivancheva & Stantcheva 2000), contra doenças infecciosas, além do uso como desinfetante e antisséptico (Gautam 2007).

Manosroi (2012) descreve, para extratos de *N. indica*, a atividade anti-proliferante em linhagens de células cancerígenas. Além disso, os seus extratos aquosos

não apresentaram toxicidade em células humanas normais. O autor destaca em *N. indica* a presença de alcalóides, flavonóides, taninos xantonas, açúcar e resíduos de glicosídeos, que podem ser responsáveis pela atividade anti-proliferativa. Flavonoides apresentam muitas atividades biológicas, incluindo anti-alérgicos, anti-inflamatórios, anti-virais e anti-carcinogênico (Manthey *et al.* 2001).

Alguns trabalhos destacam o uso medicinal tradicional para os metabólitos secundários de *N. indica*. Coe & Anderson (2005) apresentam que as substâncias como alcalóides, glicosídeos, fenóis, saponinas, esteróides, taninos e os óleos voláteis presentes *N. indica* têm sido utilizadas na Nicarágua para o tratamento dos efeitos secundários causados por picadas de cobra. Estes compostos bioativos podem não neutralizar o veneno de serpente em si, mas servem como analgésicos, antieméticos, anti-inflamatórias, imunoestimulantes, anestésicos locais e sedativos. Scarpa (2004), por sua vez, destaca o uso de *N. indica* no tratamento antipirético pelos Criollos do noroeste argentino.

Sendo assim, observa-se que *N. indica* produz metabólitos secundários importantes na medicina tradicional. Todavia, esses metabólitos são produzidos pelos organismos vegetais em função de maximizar seu *fitness*, garantindo sua sobrevivência, agindo como uma alternativa química no mecanismo de defesa e interações ecológicas com o ambiente (Maplestone *et al.* 1992; Bassman 2004; Iriti & Faoro 2009).



# **HIPÓTESE**

## **2. HIPÓTESE**

Existe consenso na literatura de que níveis elevados de radiação UV-B geram efeitos diretos e indiretos em plantas que incluem o estresse oxidativo como resultado da produção de radicais livres. Este por sua vez, desencadeia cascatas de eventos relacionados ao estresse fisiológico e as respostas do vegetal ao mesmo. Neste sentido, processos fotoinibitórios da fotossíntese e respostas na produção qualitativa e quantitativa de metabólitos secundários são descritos na literatura. Além disso, a alteração da herbivoria em resposta ao UV-B, também descrita na literatura, indica que esta radiação afeta a relação do organismo com seu ambiente. Não obstante, metabólitos secundários produzidos em respostas a fatores ambientais possuem importância biotecnológica, com aplicações na área de fármacos. Contudo, o melhor entendimento do funcionamento do organismo em conjunto com suas relações ecológicas requer uma abordagem interdisciplinar. Trabalhos que integram os efeitos da radiação UV-B nos domínios da fisiologia vegetal, da química de seus metabólitos secundários e das relações do organismo com o ambiente são inexistentes na literatura.

Neste contexto, a hipótese trabalhada nesta dissertação segue:

“O estresse oxidativo induzido pelo aumento da radiação UV-B influencia conjuntamente na redução da eficiência fotossintética, nas alterações qualitativas e quantitativas do perfil químico com resultado na química defensiva da macrófita aquática *N. indica*.”



# **OBJETIVOS**

### **3. OBJETIVOS**

---

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a resposta fotossintética e química da planta aquática *Nymphoides indica* contra o estresse oxidativo causado por radiação UV-B e sua possível correlação com a herbivoria.

Objetivos específicos:

**1** - Avaliar em laboratório as respostas fisiológicas (produção de metabólitos secundários e a eficiência fotossintética) em plantas de *N. indica* sujeitas a experimentos de indução de estresse oxidativo causado por UV-B;

**2** – Avaliar a influência da radiação UV-B na atividade antioxidante de *N. indica*;

**3** – Avaliar a influência da radiação UV-B na produção de defesas químicas contra a herbivoria em *N. indica*.

**4** - Identificar as substâncias fenólicas presentes nos extratos brutos metanólicos de *N. indica*;

**5**- Caracterizar as substâncias bioativas presentes nos extratos brutos de *N. indica*;

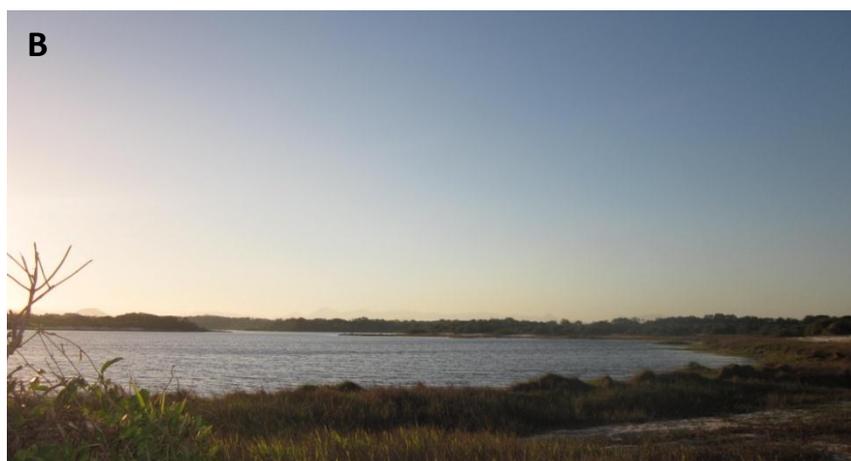


# **MATERIAIS E MÉTODOS**

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DE COLETA

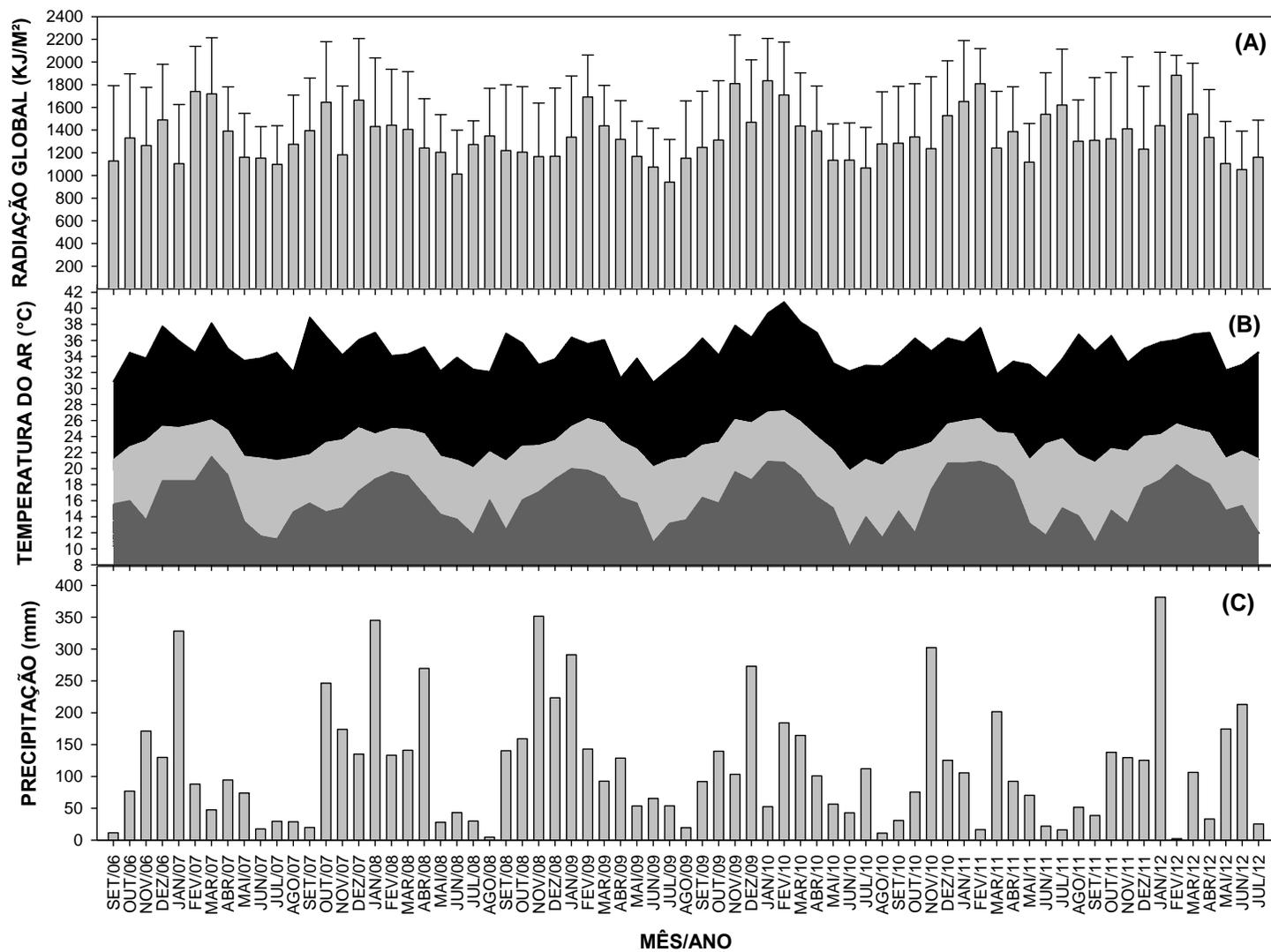
Os indivíduos de *Nymphoides indica* utilizados neste estudo foram provenientes da população que ocorre na Lagoa Comprida ( $22^{\circ} 16' 51.30''$  S  $41^{\circ} 39' 19.80''$  O), localizada no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PNRJ), município de Carapebus, estado do Rio de Janeiro (FIGURA 7A e B).



**FIGURA 7:** (A) Mapa de localização do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba. Com destaque para a Lagoa Comprida (Adaptado de Santos *et al.* 2004). (B) Imagem da Lagoa Comprida.

O PNRJ abrange os municípios de Macaé, Carapebus e Quissamã entre as coordenadas 22° e 22° 23' S e 41° 15' e 41° 45' O. Criado por lei federal em 1998, o parque conta com 14.860 hectares, sendo 44 km de costa, constituindo o único parque nacional protegido na forma de restinga. A área em questão, embora seja regionalmente conhecida como restinga, é, na realidade, um conjunto de mosaicos de ecossistemas diferenciados pela elevada biodiversidade e grande fragilidade ecológica (Araújo *et al.* 1998).

Segundo dados do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), obtidos para a estação meteorológica de Macaé, a radiação global média na região é de 1347 KJ/m<sup>2</sup> com a maior incidência ocorrendo nos meses de verão (FIGURA 8A). A temperatura média anual fica em torno de 22°C com a máxima de 41°C, atingida em fevereiro de 2010 e mínima de 10°C em junho de 2010 (FIGURA 8B). A precipitação alcança 8199 mm, porém a distribuição de chuvas é sazonal, sendo o verão a estação com maior índice pluviométrico, 381 mm em janeiro de 2012. Nos meses mais secos - junho, julho e agosto - o solo apresenta deficiência hídrica e de outubro a janeiro ocorre reposição de água no solo (FIGURA 8C).



**FIGURA 8:** Dados meteorológicos obtidos para a cidade de Macaé-RJ no período de setembro de 2006 a julho de 2012. (A): Média e desvio da radiação global. (B): Média da temperatura do ar (cinza claro), temperatura máxima (preto) e mínima (cinza escuro). (C): Precipitação acumulada. (Fonte: INMET)

A região abriga 18 lagoas costeiras com alto grau de preservação e importância ecológica. Estas lagoas se diferem em sua morfometria e condições físico-químicas, por exemplo, profundidade, pH, salinidade e coloração da água (Penosso *et al.* 1998). Uma das maiores características destes ecossistemas aquáticos são as altíssimas concentrações de carbono dissolvido, que refletem diretamente sobre o balanço de carbono com a atmosfera (Farjalla *et al.*, 2004). Esses fatores abióticos exercem papel fundamental na estruturação, fisiologia e na produção de metabólitos secundários da flora que habita esses ambientes (Esteves 1998).

Pesquisas realizadas nas lagoas costeiras demonstram que estes ecossistemas são considerados locais de elevada biodiversidade aquática, variando desde invertebrados até peixes, além de diversas espécies de plantas aquáticas. Além de oferecerem diversos serviços ambientais, as lagoas costeiras constituem ecossistemas de grande produtividade, podendo estar sob influência de ambientes terrestres, marinhos e de águas doces (Esteves 1998).

Dentre as lagoas costeiras protegidas pelo PNRJ está a Lagoa Comprida. Esta lagoa apresenta água predominantemente doce, pois permanece isolada do mar por uma faixa de aproximadamente 30 m de areia. Sua área é de 0,13 km<sup>2</sup>, sofrendo contração devido ao dessecamento no período de estiagem e expansão pelo aumento da pluviosidade no período chuvoso. Seu perímetro atinge cerca de 4 km (Hollanda-Carvalho *et al.* 2003). É considerada uma lagoa rasa, com profundidade máxima de 2,5 m, sendo vulnerável à ação dinâmica dos ventos e à oscilação dos fatores climáticos (Penosso *et al.* 1998).

A lagoa Comprida pode ser considerada uma lagoa de águas ácidas (pH médio de 4,8), apresentando uma coloração escura, com transparência média de 0,5 metros, devido à elevada concentração de compostos húmicos e fúlvicos (Petrúcio, 1998). Além disso, essa lagoa possui uma elevada concentração de carbono orgânico dissolvido 37,3mg L<sup>-1</sup> (Farjalla, *et al.* 2004).

#### **4.2. COLETA DE *Nymphoides indica***

Espécimes de *N. indica* foram coletados na Lagoa Comprida em maio de 2011 para caracterização dos metabólitos secundários. Para o experimento de indução ao estresse por UV-B outros indivíduos foram coletados em Janeiro de 2012.

Em ambas as coletas os espécimes foram acondicionados individualmente em sacos plásticos contendo água da lagoa, acomodados em caixas térmicas e transportados para o Biotério Aquático do Núcleo em Ecologia e Desenvolvimentos Sócio-ambiental de Macaé (NUPEM/UFRJ, onde foram triados e destinados aos estudos ecológicos e fitoquímicos propostos neste trabalho.

A identificação do material foi realizada pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tatiana Ungaretti Paleo Konno com o auxílio do exemplar já depositado no herbário do NUPEM/UFRJ de número de registro RFA-MAC-812/RFA-38761 (FIGURA 9).



**FIGURA 9:** Exsicata de *Nymphoides indica*, coletada na Lagoa Comprida no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba

### **4.3. CULTIVO SOB RADIAÇÃO UV-B**

#### **4.3.1. Medições da Radiação UV-B natural**

Para a determinação dos parâmetros experimentais, buscou-se estabelecer valores de radiação UV-B capazes de promover estresses fisiológicos. Inicialmente mensurou-se a dose diária de radiação UV-B em dias de verão de céu limpo, sem a presença de nuvens. As medidas foram realizadas nos dias 26 e 28/01/2012 no NUPEM–UFRJ (22° 19' 38.93" S 41° 44' 10.10" O), localizado a cerca de 5 quilômetros do local onde se encontra a população de estudo.

As mensurações da radiação UV-B foram realizadas utilizando o sensor analógico PMA1106 (Firma Solar Light Company, Inc, EUA) acoplado a um *dataloger* LI-1400 (LI-Cor, Inc, EUA) através de um conversor de tensão desenvolvido pela firma “Além Mar Comercial e Industrial S/A” (FIGURA 10). As leituras da radiação UV-B fornecidas em  $\text{mWatt cm}^{-2}$  foram convertidas para  $\text{Joule m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . A dose diária de radiação UV-B foi calculada integrando medidas do curso diurno e expressa em  $\text{KJoules m}^{-2} \text{dia}^{-1}$ . As fórmulas de conversão foram retiradas de <<http://www.apogeeinstruments.com/conversions/watts-ppf.html>> acessado em abril de 2012.



**FIGURA 10:** Imagem do LI-1400 utilizado nas medições de radiação UV-B

#### **4.3.2. Desenho Experimental**

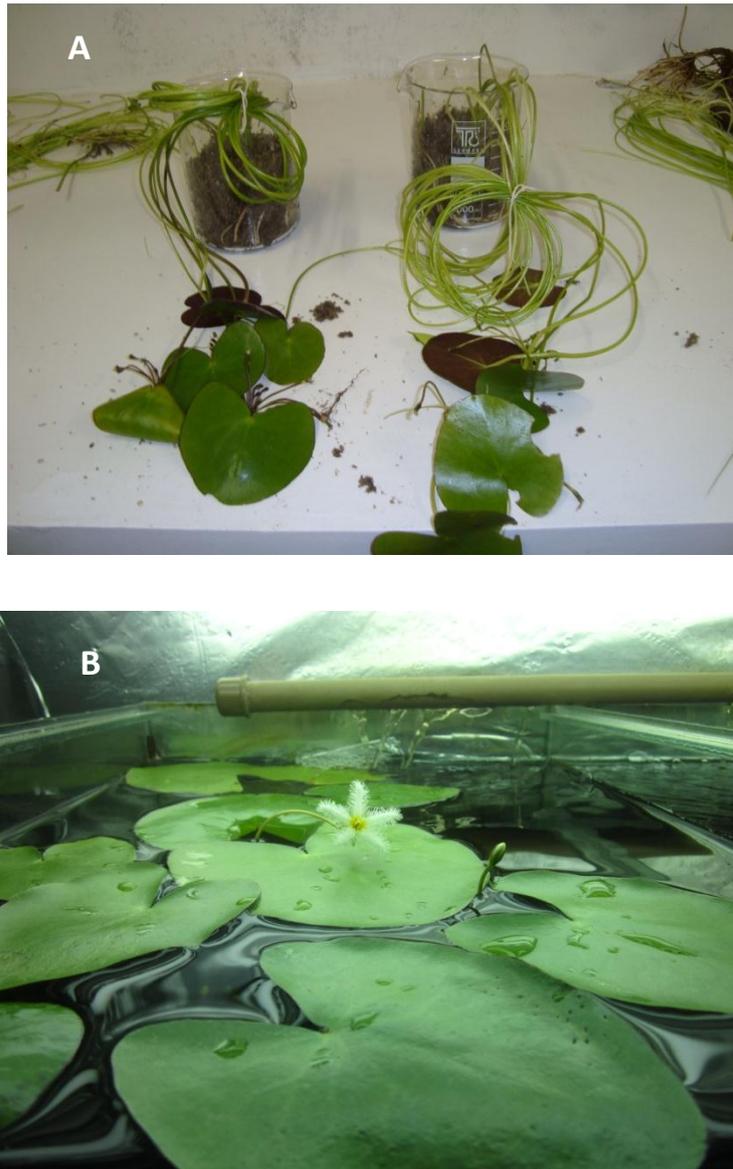
Trinta indivíduos adultos e saudáveis de *N. indica* foram subdivididos em três grupos denominados:

a) Campo (10 indivíduos) – que não foram submetidos ao cultivo, considerado como indivíduos expostos a radiação UV-B natural;

b) Controle (10 indivíduos) – cultivados sem radiação UV-B;

c) Tratamento (10 indivíduos) – cultivados sob radiação UV-B.

Cada indivíduo de *N. indica* do Controle e Tratamento foi transplantado para recipientes de vidro com sedimento da lagoa e acomodados em pares nas câmaras do aquário de cultivo (FIGURA 11 A e B).



**FIGURA 11:** (A) Indivíduos de *N. indica* transplantados individualmente. (B) Dois indivíduos de *N. indica* em câmara individual no sistema de aquários.

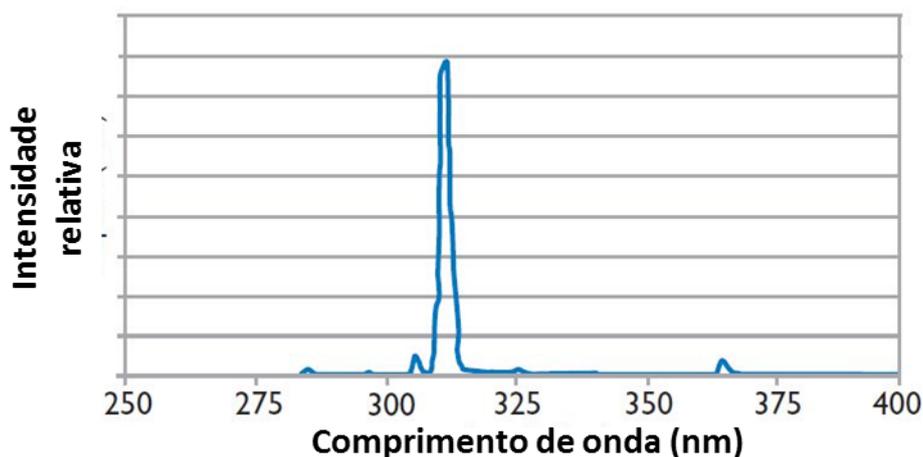
O cultivo foi realizado em um sistema de aquários com 10 câmaras independentes, com aeração, circulação e filtragem de água constante (FIGURA 12). Os aquários foram abastecidos com cerca de 400 litros de água da lagoa Comprida coletada no mesmo dia e local em que foram coletados os indivíduos para o experimento. As variáveis físico-químicas da água como: pH, condutividade e salinidade foram medidas no campo e monitoradas durante todo o cultivo.



**FIGURA 12:** Imagem do sistema de aquários utilizado no cultivo.

O regime de luz estabelecido foi de 12 horas de luz e 12h de escuro, fornecido por lâmpadas fluorescentes (Sylvania, Luz do dia Plus, F HO, 85 Watts). A exposição ao UV-B foi obtida por uso da lâmpada fluorescente modelo Philips Narrowband, TL/01, de 100 Watts que apresenta um espectro estreito dentro da faixa de UV-B com pico em 311nm (FIGURA 13). O regime de 12h:12h de luz:escuro, além do regime

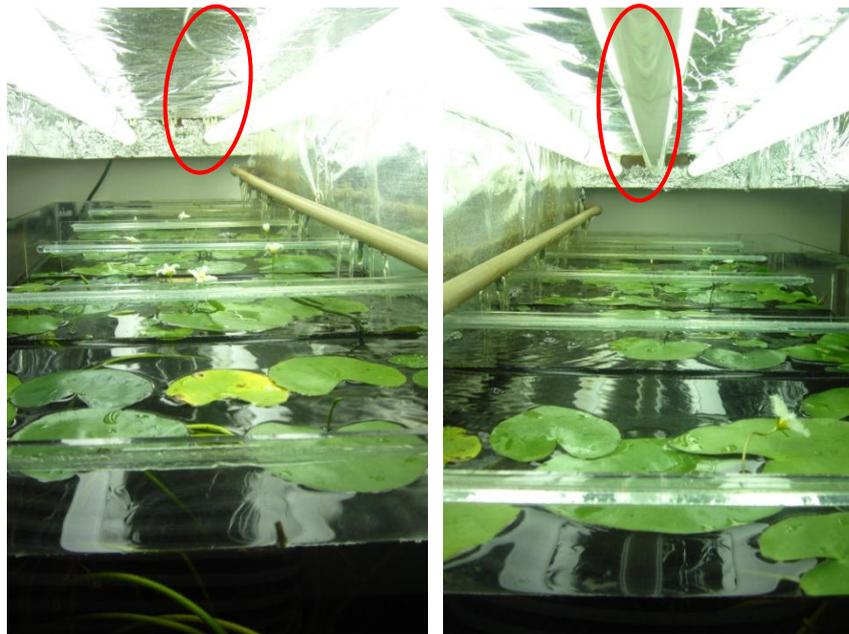
estabelecido de radiação UV-B foi mantido com o auxílio de temporizadores conectados as lâmpadas. Para garantir o ambiente escuro isolado da luz exterior durante o período não iluminado, as luzes do laboratório foram mantidas apagadas e as janelas cobertas com plásticos pretos durante todo o experimento.



**FIGURA 13:** Espectro de UV da lâmpada “Phillips TL/01 Narrowband”

A temperatura ambiente foi mantida em 24 °C através de um sistema de resfriamento utilizando aparelhos de ar condicionado na sala de cultivo.

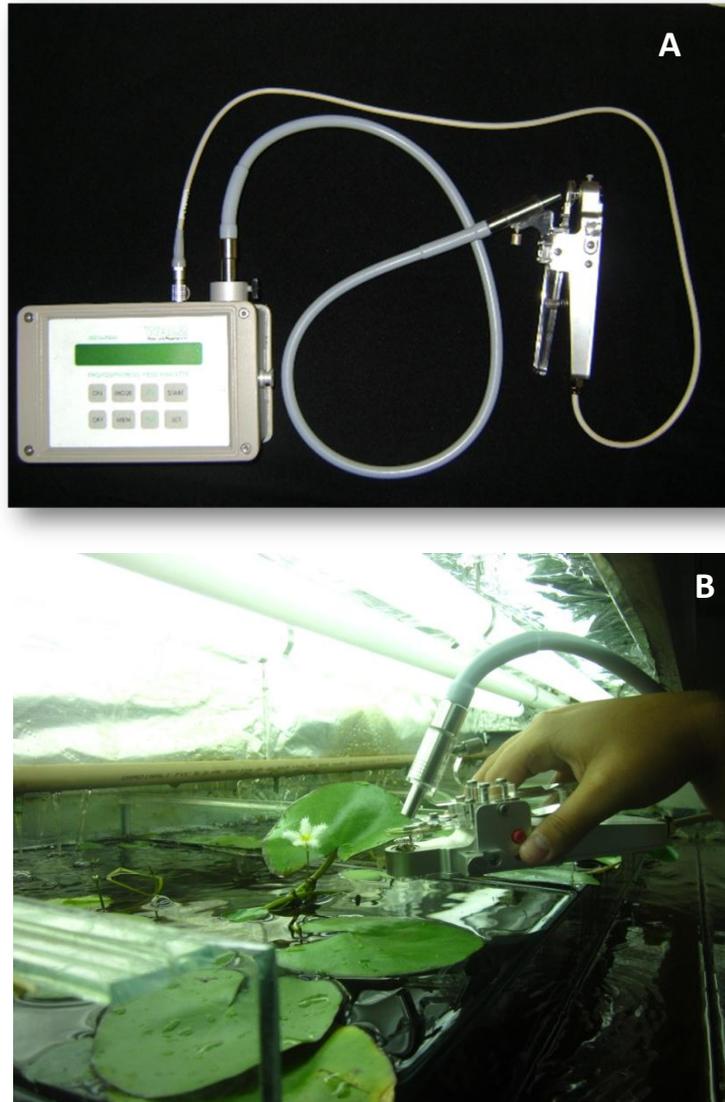
Após o período de cinco dias de aclimação às condições de laboratório, os 10 indivíduos do tratamento foram expostos durante 13 dias a 7 horas diárias de luz UV-B, correspondendo a cerca de 1,93 vezes a dose diária observada no curso diurno em campo (Dose em cultivo:  $626,4 \text{ KJ m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ ; Dose natural em campo:  $324,0 \text{ KJ m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ ). Já os indivíduos do controle foram submetidos a cultivo somente com o regime de 12h de radiação PAR e 12h no escuro (FIGURA 14).



**FIGURA 14:** Imagem dos aquários que não receberam radiação UV-B (Controle), sem a lâmpada central (a esquerda). E os aquários que receberam radiação UV-B (Tratamento), com a lâmpada central (a direita).

#### **4.4. ANÁLISE DA FOTOSSÍNTESE - Fluorescência da Clorofila *a***

Medidas da fluorescência da clorofila *a* dos indivíduos do cultivo (sem radiação UV-B e com 1,93 da Radiação UV-B natural) e do campo (radiação UV-B natural) foram realizadas com o auxílio de um Fluorômetro portátil de Modulação de Amplitude de Pulso – Mini-PAM (Walz GmbH, Alemanha) (FIGURA 15 A e B).



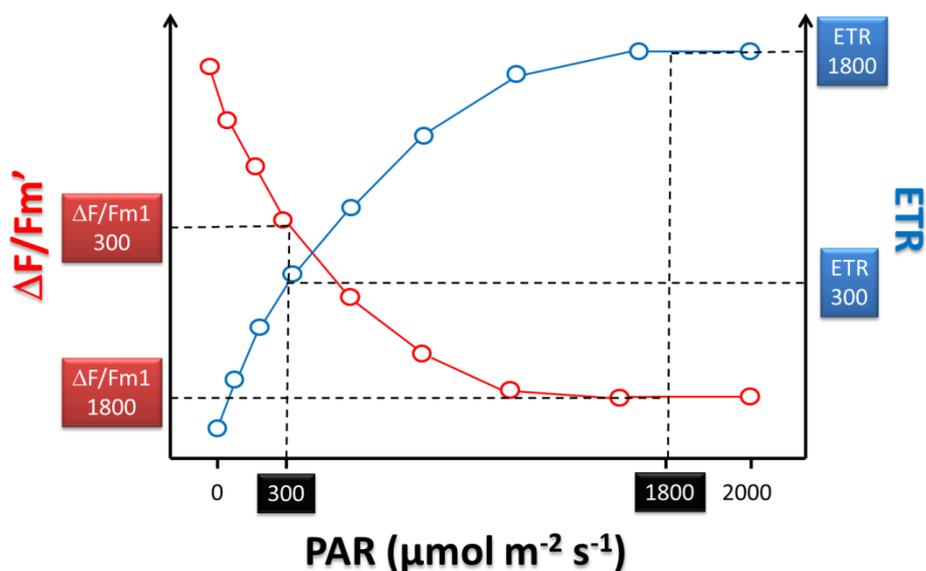
**FIGURA 15:** (A) Aparelho MINI-PAM usado para medidas fotossintéticas. (B) Medições da fluorescência da clorofila *a* no cultivo de *N. indica*.

A fibra óptica do aparelho manteve a distância (1cm) e ângulo constantes pelo suporte foliar do aparelho. Medidas da radiação fotossinteticamente ativa (PAR  $\lambda=400-700\text{nm}$ ) próximo à superfície da folha foram realizadas pelo sensor quântico do clipe foliar calibrado contra um sensor quântico LI-COR 190 (Lincoln, Nebraska, EUA). Medidas da fluorescência máxima ( $F_m$ ) e mínima ( $F_0$ ) realizadas meia hora antes do início do período de claro (11:30 de adaptação ao escuro) foram usadas para calcular a razão entre a fluorescência variável ( $F_v = F_m - F_0$ ) pela máxima ( $F_m$ ) resultando em

valores da eficiência quântica potencial do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ). Valores  $F_v/F_m$  em campo foram obtidos escurecendo a folha por 1h através do uso de cliques de escuro (acessório do Mini-PAM). Valores de  $F_v/F_m < 0,83$  indicam fotoinibição (Björkman & Demmig, 1987) e é resultado da dissipação não fotoquímica da fluorescência da clorofila *a*. Componentes rápidos de dissipação não fotoquímica são devido ao aparecimento de um gradiente eletroquímico de prótons na membrana do tilacóide e são reversíveis em dezenas de minutos. A reversão lenta da dissipação não fotoquímica (de várias horas a dias) é devido a danos nos fotossistemas especialmente nas proteínas D1 e D2 (Thiele *et al.* 1998). Logo, a fotoinibição medida antes do início do período de luz é considerada neste trabalho como possível efeito crônico do estresse gerado pelas condições de UV-B.

Para avaliação do efeito da radiação UV-B no funcionamento do PSII em amostras em período claro, medidas da fluorescência da clorofila foram tomadas antes e imediatamente depois da aplicação de UV-B em duas folhas para cada indivíduo. Para tal a eficiência quântica efetiva do PSII ( $\Delta F/F_m'$ ) foi calculado como  $(F_m' - F)/F_m'$  (Genty, Briantais & Baker, 1989), onde  $F$  corresponde a fluorescência basal em amostras iluminadas e  $F_m'$  corresponde à fluorescência máxima obtida quando um pulso de luz saturante ( $>4000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) de luz de 800 ms ultrapassa os valores de intensidade de luz ambiente (Schreiber & Bilger 1993). A Taxa de Transporte de Elétrons (ETR) foi calculada como  $0,5 \times \Delta F/F_m' \times \text{PAR} \times 0,84$ , onde o fator 0,5 considera que ambos os fotossistemas II e I foram excitados por PAR e que esta excitação é distribuída igualmente entre os fotossistemas. O fator 0,84 considera uma taxa universal de absorção de PAR pelos fotossistemas, conforme a documentação do Mini-PAM.

A capacidade fotossintética intrínseca foi determinada através de curvas de resposta instantânea de  $\Delta F/F_m'$  e ETR à nove níveis crescentes de luz em nove estágios de 30 segundos cada. O PAR inicial é zero e chega a intensidades de cerca  $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , no último estágio. A partir destas curvas pontos cardinais foram tabelados correspondendo ao comportamento de  $\Delta F/F_m'$  e ETR com PAR em 300 e  $1800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (FIGURA 16). Com o intuito de verificar se a radiação UV-B alterou a capacidade fotossintética intrínseca das plantas do experimento, as curvas de luz foram realizadas uma hora após a aplicação de UV-B.



**FIGURA 16:** Representação de uma curva de resposta instantânea da Eficiência Quântica Efetiva ( $\Delta F/Fm'$ ) e ETR s (Taxa de Transporte de Elétron– do inglês *Electron Transport Rate*). Destacando  $\Delta F/Fm'$  e ETR a 300 e 1800  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de luz PAR.

Durante os 13 dias de cultivos, sete dias intercalados foram escolhidos para as medições dos parâmetros da fluorescência da clorofila *a* descritos acima. Em campo medidas de  $F_v/F_m$  foram feitas em dez exemplares de *N. indica*. As curvas de luz foram feitas em cinco plantas do Controle, cinco plantas do Tratamento (uma de cada câmara) e em dez plantas do Campo.

A estrutura dos dados foi representada através do cálculo de médias e desvios padrão para os parâmetros de fluorescência. Os dados referentes à avaliação de fotoinibição do PSII foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) com design para medidas repetidas (Zar 1999). Já a avaliação do efeito direto da aplicação da radiação UV-B na atividade do PSII foi determinada subtraindo-se os valores de  $\Delta F/Fm'$  antes e após a aplicação da dose diária de radiação UV-B. Cada resultado obtido foi inicialmente analisado com Teste-*t* de Student (Zar 1999) contra o valor fixo de zero para avaliar a significância do efeito imediato do UV-B. A diferença entre o grupo sem UV-B (Controle) e o grupo com 1,93 vezes a radiação UV-B natural

(Tratamento) foi também analisada por Teste-*t* de Student para amostras independentes (Zar 1999). Os pontos cardinais provenientes das curvas de luz ( $\Delta F/F_m'$  e ETR) com PAR 300 e 1800  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  foram avaliados pela análise de variância ANOVA. O nível de significância assumido para os teste foi de  $p < 0,05$ .

## 4.5. ANÁLISES QUÍMICAS

### 4.5.1. Extração dos metabólitos secundários

Ao término do cultivo foram separadas as folhas de todos os indivíduos, assim como as folhas dos indivíduos do Campo, para extração dos metabólitos secundários.

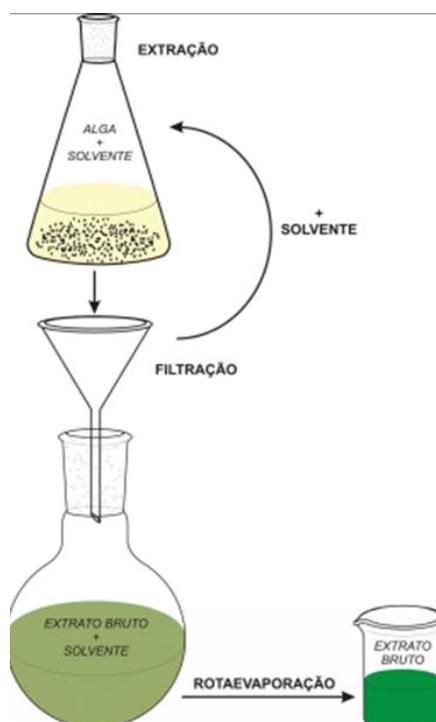
Todas as folhas de cada indivíduo foram secas a temperatura ambiente e protegida da luz (FIGURA 17), a fim de evitar fotólise e termodegradação dos metabólitos (CRONIN *et al.* 1995).



**FIGURA 17:** Secagem das folhas dos indivíduos de *N. indica*.

Em seguida, as folhas de cada individuo foram moídas e submetidas à extração exaustiva por maceração com o solvente orgânico metanol (Tedia grau HPLC), com o auxílio de um banho de ultrassom (Logen *Scientific*, LS-218). Foram realizadas três extrações com intervalos de dois dias cada. O volume de metanol utilizado em cada extração variou de 20 a 40 mL, volume proporcional à biomassa extraída na razão de cerca de 10 mL de solvente / 0,5 g de planta seca. Os extratos foram filtrados em papel filtro e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida, com o auxílio de um rotaevaporador com banho-maria (Buchi, R210, V850, B491, Suíça) a uma temperatura de 40°C (FIGURA 18).

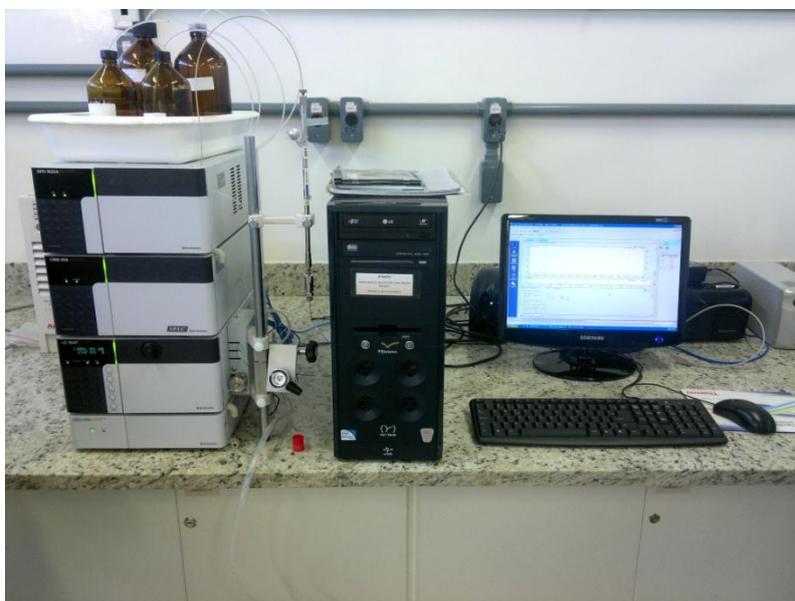
O uso do metanol para a preparação dos extratos seleciona todos os constituintes químicos desde moléculas apolares, de polaridade intermediária e polar, como por exemplo, substâncias terpenoídicas, lactonas, ácidos orgânicos e substâncias fenólicas em geral (Viegas *et al.* 2004).



**FIGURA 18:** Esquema do sistema de extração por maceração dos metabólitos secundários (Retirado de Lima 2009).

#### 4.5.2. Perfil químico dos extratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-UV-DAD)

Os perfis químicos dos extratos dos indivíduos cultivados e de Campo foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Shimadzu, Modelo LC-20) com duas bombas LC20AT, acoplado a um detector por varredura de espectro ao ultravioleta por arranjo de fotodiodos SPD-M20A (UV-DAD) e injetor Rheodyne 7725i com volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$  (FIGURA 19).



**FIGURA 19:** Aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Shimadzu, Modelo LC-20)

Para todos os extratos as condições de análise otimizadas foram: coluna C-18 da Shim-Pack (5m, 4,6 x 250 mm); fase móvel constituída por gradientes não lineares de polaridade de solução de água Mili-Q (Millipore<sup>®</sup>) pH 3 em ácido fosfórico 85% (Tedia HPLC) e metanol (Tedia grau HPLC) variando de 0 a 100% (TABELA II) com fluxo de  $1\text{mL min}^{-1}$ .

**TABELA II:** Sistema de gradiente otimizado utilizado na análise de CLAE

<b>Tempo (min)</b>	<b>Concentração (%) de Água Acidificada (pH 3)</b>	<b>Concentração (%) de Metanol</b>
0	100	0
10	70	30
40	40	60
60	0	100

As amostras de extrato bruto de cada indivíduo foram diluídas em metanol (Tedia grau HPLC,) na concentração de 10 mg/mL (p/v) e filtradas em filtros de Politetrafluoretileno 0,45 µm (Millipore®). As análises por CLAE de cada indivíduo foram realizadas em duplicata.

Para avaliar as semelhanças e diferenças entre os perfis cromatográficos foram aplicadas ferramentas quimiométricas exploratórias. Inicialmente os dados cromatográficos obtidos foram organizados na forma de matrizes bi-dimensionais. O software COWtool (<<http://www2.biocentrum.dtu.dk/mycology/analysis/cow/>>) foi utilizado para o alinhamento de base de cada cromatograma e para corrigir o desvio de tempo de retenção dos picos através do *Correlation Warping Algorithm* (COW), como descrito em Nielsen *et al.* (1998). Para a execução do COW foi utilizado o cromatograma com o maior número de picos. O alinhamento é necessário devido a desvios mínimos de tempos de retenção, originados de pequenas oscilações no sistema cromatográfico que precisam ser removidos para que a análise multivariada se sustente apenas nos tempos de retenção e intensidade relativa das bandas cromatográficas (propriedades inerentes das amostras). A utilização dos dados não alinhados implicaria, por exemplo, na utilização de mais componentes principais do que aquelas realmente necessárias, podendo levar a interpretações equivocadas dos resultados (Stasiak *et al.* 2010).

Uma matriz de dados composta dos dados alinhados de cada cromatograma no comprimento de onda de 254 nm, totalizando 30 linhas (amostras – média das duas injeções para cada amostra) e 5626 variáveis (tempos de leitura, 60 min) foi submetida à Análise de Componentes Principais (PCA – do inglês *Principal Component Analysis*).

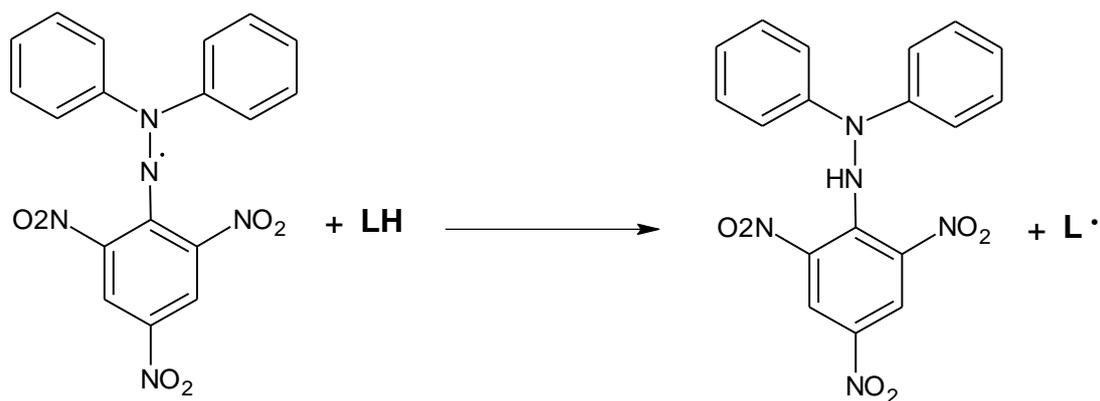
A correlação dos perfis químicos sumarizada foi feita em linguagem R ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)) usando o pacote "ChemometricsWithR" (Wehrens 2012).

Para analisar estatisticamente a separação dos grupos na PCA foi realizada uma análise de variância não paramétrica, Kruskal-Wallis, dos scores da PC1 seguido de uma análise de comparação múltipla dos pares de grupos. O nível de significância assumido foi  $p \leq 0,05$ .

#### 4.6. ANÁLISE ANTIOXIDANTE

A capacidade antioxidante dos extratos brutos dos indivíduos do Campo, Controle e Tratamento foi avaliada utilizando-se o método de redução do radical livre estável DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) gerados *in vitro* proposto por Silva & Paiva. (2012) e Wen *et al.* (2011) com algumas modificações.

Este ensaio baseia-se na redução do radical livre estável DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) gerados *in vitro*, de coloração inicialmente púrpura intensa em solução alcoólica. Nesta reação o DPPH é reduzido (neutralizado), formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, pela doação de hidrogênio ( $H^+$ ) de um antioxidante ou uma espécie radicalar ( $R\bullet$ ) presente nas amostras avaliadas (FIGURA 20). O efeito de descoloração é estequiométrico em relação ao número de elétrons retirados, e é independente de qualquer atividade enzimática. O ensaio resulta no decréscimo da absorvância do sistema reacional, podendo ser monitorada espectrometricamente (Rozema *et al.* 2002; Chandra & Mejjia 2004; Huang *et al.* 2005; Duan *et al.* 2006; Garcez *et al.* 2009).



**FIGURA 20** – Reação de neutralização do radical DPPH por hidrogênio de um antioxidante (LH) – a reação ocorre com a mudança da cor violeta → para amarela.

#### Construção na curva de calibração do DPPH

Foi preparada uma solução do radical DPPH (Sigma Aldrich) 0,3 mM em metanol, o qual foi diluído em soluções com concentrações finais de 30, 60, 120, 150 e 180  $\mu\text{M}$ . Em uma sala escura, foi realizada a leitura de uma alíquota de cada solução de DPPH espectrofotômetro do tipo leitor de ELISA (DV 9.90 BVG GIO.DE VITA) a 492 nm. O metanol foi utilizado como branco para calibrar o aparelho.

#### Leitura das absorbâncias das amostras

Soluções estoques dos extratos (1,0 mg/mL em metanol) foram diluídas de forma a se obtiveram concentrações finais de 250, 125, 50, 25, 10 e 5  $\mu\text{g/mL}$ . Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de solução de DPPH (0,3 mM) a 250  $\mu\text{L}$  da solução de cada extrato nas diferentes concentrações.

Utilizou-se, ainda, 250  $\mu\text{L}$  de metanol e 100  $\mu\text{L}$  da solução de DPPH como controle negativo. Além de 250  $\mu\text{L}$  das diferentes diluições de cada extrato com 100  $\mu\text{L}$  de metanol como branco da mostra. A absorbância das amostras foi monitorada a 492 nm, em intervalos regulares de 5 minutos durante um tempo de reação de 30 minutos,

tempo necessário para obter-se a estabilização da absorvância. A leitura da absorvância final (30 minutos) foi utilizada para calcular a concentração de amostra necessária para reduzir em 50% da concentração inicial de DPPH (EC<sub>50</sub>), expresso como g de amostra / g DPPH. Toda reação do DPPH transcorreu no escuro e à temperatura ambiente.

O BHT (Butilhidroxitolueno) (FIGURA 21) foi utilizado no ensaio como controle positivo, submetido aos mesmos procedimentos mencionados para os extratos. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

#### FIGURA 21: ESTRUTURA DO BHT

##### Determinação do EC<sub>50</sub>

Após as leituras, o valor correspondente à metade da absorvância do controle negativo foi substituído na equação de calibração do DPPH, a fim de encontrar o consumo de DPPH (µM) que correspondesse à redução de 50% da sua concentração inicial. Em seguida, o valor obtido foi convertido em g/L de DPPH através do seguinte fórmula:

$$[\text{DPPH}] \text{ (g/L)} = [\text{DPPH (uM)}] / 1.000.000) \times 394,3 \text{ (peso molecular do DPPH).}$$

Uma segunda equação linear foi obtida por regressão dos pontos no tempo de 30 minutos para cada réplica dos extratos investigada, onde a abscissa representa as diferentes concentrações das soluções de extratos e a ordenada correspondente às absorvâncias. Na amostra de BHT apenas os pontos que estavam dentro da faixa de linearidade (pelo menos 3 pontos) foram utilizados.

Para calcular a atividade antioxidante total, o valor correspondente à metade da absorvância inicial do controle negativo foi então substituído em cada uma das equações, a fim de encontrar a concentração de extrato necessária para reduzir 50% da concentração inicial de DPPH (EC<sub>50</sub>).

O valor de EC<sub>50</sub> encontrado em µg/mL foi dividido por 1000, a fim de se obter o valor em g/L de extrato. O valor obtido foi dividido pelo valor encontrado em g/L de DPPH para obter o resultado final expresso em g de extrato/g DPPH:

$$\text{EC50 (extrato (g) / DPPH (g))} = \frac{\text{EC}_{50} (\text{mg} / \text{mL}) / 1.000}{\text{DPPH (g / L)}}$$

Com a finalidade de avaliar as possíveis variações entre os extratos dos indivíduos do Campo, Controle e Tratamento, os resultados obtidos na Atividade Antioxidante Total (EC<sub>50</sub>) foram analisados pelo teste de variância não paramétrico, Kruskal-Wallis, devido à falta de normalidade e homocedasticidade dos dados. O teste a posteriori Dunn's foi aplicado para identificar em qual par de dados encontra-se a diferença. O valor de  $p \leq 0,05$  foi assumido para identificar diferenças significativas entre as amostras.

#### Avaliação da cinética de reação

O comportamento cinético da reação das amostras com o DPPH foi avaliado por uma curva de dose-resposta em relação à diminuição da porcentagem de DPPH remanescente em função do tempo para cada concentração do extrato. As leituras das absorvâncias, em triplicata, nos intervalos de 5 minutos, foram convertidas em concentração de DPPH remanescente [DPPHrem], usando a equação da curva de calibração do DPPH. A concentração inicial de DPPH, [DPPH<sub>0</sub>], foi obtida a partir da absorvância do controle negativo usando a mesma equação. Estes valores foram então usados para se obter a porcentagem de DPPH remanescente (% DPPHrem) de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ DPPHrem} = ([\text{DPPHrem}] / [\text{DPPH}_0]) \times 100.$$

#### 4.7. BIOENSAIOS DE HERBIVORIA

A investigação da atividade anti-herbivoria dos extratos dos indivíduos do Campo, Controle e Tratamento, procedeu com o bioensaio de ação defensiva dos extratos frente ao herbívoro generalista *Biomphalaria* sp. (FIGURA 21), realizado segundo o método proposto por Bolser *et. al.* (1998) e Cronin *et al.* (2002), com algumas modificações.

*Biomphalaria* sp. foi utilizado como modelo de herbívoro por apresentar hábitos generalistas e pela sua abundancia nas lagoas do PARNA Jurubatiba, inclusive nas lagoas onde estão localizadas as populações de *N. indica* no Parque.



**FIGURA 21:** Imagem do gastrópode *Biomphalaria* sp. utilizado como herbívoro modelo nos bioensaios ecológicos.

Os gastrópodes *Biomphalaria* sp. utilizados nos testes foram coletados na lagoa Carapebus (PNRJ, RJ), por busca ativa nos bancos de macrófitas com auxílio de peneiras. Os espécimes coletados foram acondicionados em caixas térmicas com água da lagoa e aeração. No laboratório, os gastrópodes foram mantidos em aquários com

água da lagoa em devida aeração e alimentados com alface até o início dos experimentos.

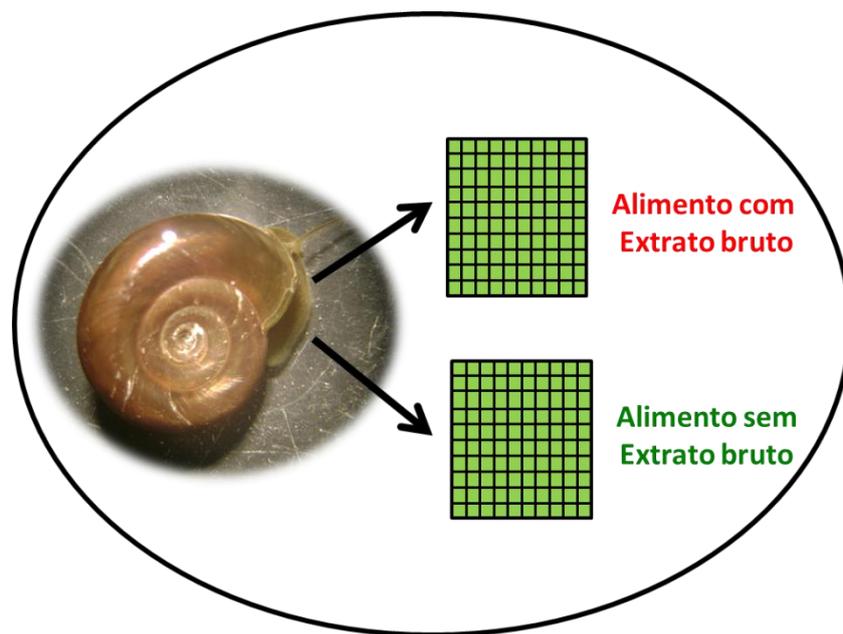
Os experimentos consistiram da avaliação da preferência alimentar do gastrópode realizada com alimentos artificiais preparados com ágar e a mistura do pó de alface:brócolis (1:1) (alimento - sem extrato). E alimentos contendo o pó de alface:brócolis incorporado ao extrato bruto de cada indivíduo analisado (alimento - com extrato), respeitando concentração natural de cada extrato.

Para o preparo dos alimentos artificiais, foi utilizada a seguinte metodologia:

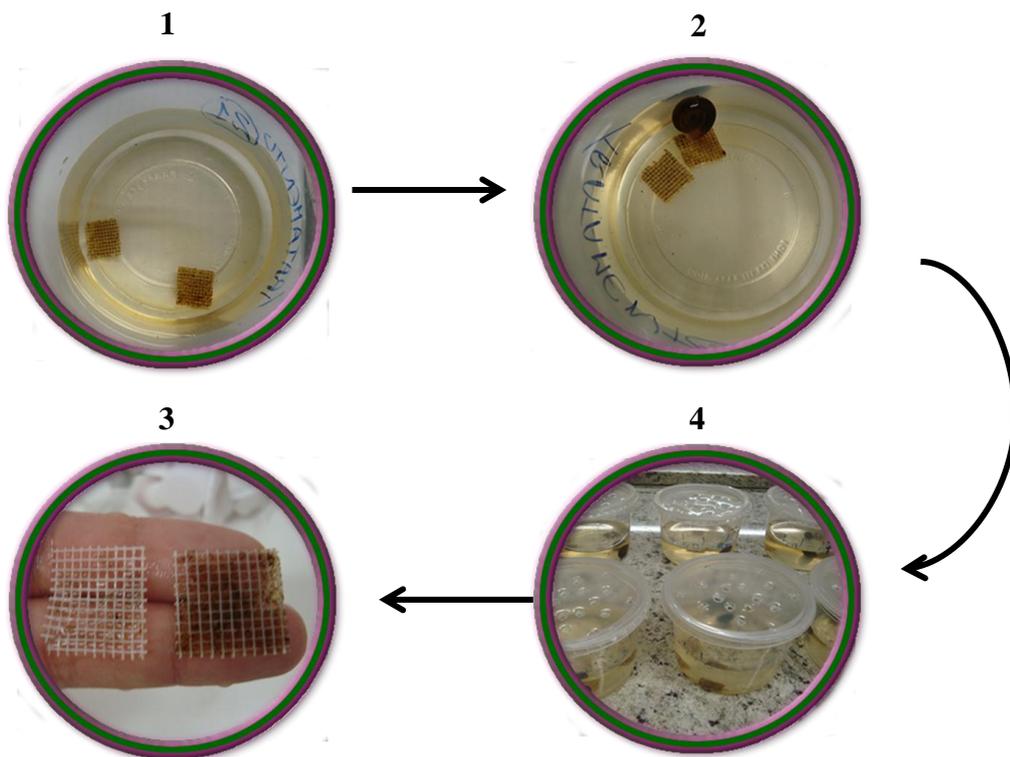
- Alimento com extrato: o extrato bruto de cada indivíduo foi diluído em diclorometano e incorporado a 0,2 g (peso seco) de pó da mistura alface:brócolis. Após a evaporação total do solvente a temperatura ambiente, foi adicionado 2 mL de água destilada a essa mistura. Uma segunda mistura feita com 0,2 g de ágar (Vetec) dissolvida com 10 mL de água destilada foi aquecida em microondas por aproximadamente 20 segundos até a ebulição. Essa segunda mistura foi resfriada até a temperatura de aproximadamente 40°C e então vertida sobre a primeira mistura. O material foi homogeneizado e, logo em seguida despejado sobre uma tela de *nylon* com formato de quadrados regulares de 1 mm. A mistura foi então prensada com o auxílio de uma folha de plástico (PVC) e distribuída sobre a tela com um rodo de pia, a fim de evitar irregularidades de superfície. Alguns segundos depois, os alimentos artificiais tornaram-se firmemente aderidos à tela possibilitando seu corte com tamanhos de 10x10 mm. O aquecimento do ágar + água destilada foi feito separado para evitar a termodegradação do extrato bruto.

- Alimento - sem extrato: O alimento-controle foi preparado seguindo-se os mesmos procedimentos do alimento-tratamento, sem incorporação do extrato. Neste alimento foi adicionado apenas diclorometano de forma que possíveis resíduos do solvente estivessem presentes em ambas condições de experimento.

Os gastrópodes foram acondicionados individualmente em pequenos potes plásticos de 250 mL contendo água da lagoa. Em seguida cada pote recebeu um alimento sem extrato e um alimento com extrato. Os herbívoros permaneceram em contato com os alimentos o tempo suficiente para se observar o consumo significativo de pelo menos metade de um dos dois alimentos oferecidos (FIGURA 22 e 23). Em todos os bioensaios novos espécimes de gastrópodes, já coletados e mantidos no laboratório, foram utilizados.



**FIGURA 22:** Esquema do bioensaio de herbivoria onde os dois alimentos artificiais (com incorporação do extrato bruto e sem o extrato bruto) são oferecidos simultaneamente ao herbívoro generalista *Biomphalaria* sp.



**FIGURA 23:** Etapas do bioensaio de herbivoria. **1:** dois alimentos artificiais (com incorporação do extrato bruto e sem o extrato bruto); **2:** herbívoro em contato com o alimento; **3:** Réplicas do bioensaio; **4:** Contagem dos quadrados consumidos.

Para cada indivíduo de *Nymphoides indica* (Campo, Controle e Tratamento) foi realizado um bioensaio distinto, totalizando 30 experimentos, com réplicas variando de três a nove para cada indivíduo.

A preferência entre os alimentos foi medida através da contagem do número de quadrados na tela consumidos. O tratamento estatístico aplicado aos resultados para avaliar o consumo de cada par de alimentos foi o teste não-paramétrico de Wilcoxon, já que os resultados dos bioensaios não apresentaram uma distribuição normal. As diferenças de consumo foram consideradas significativas quando  $p \leq 0,05$ .

## 4.8. CARACTERIZAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *N. indica*

### 4.8.1. Extração dos metabólitos secundários de *N. indica*

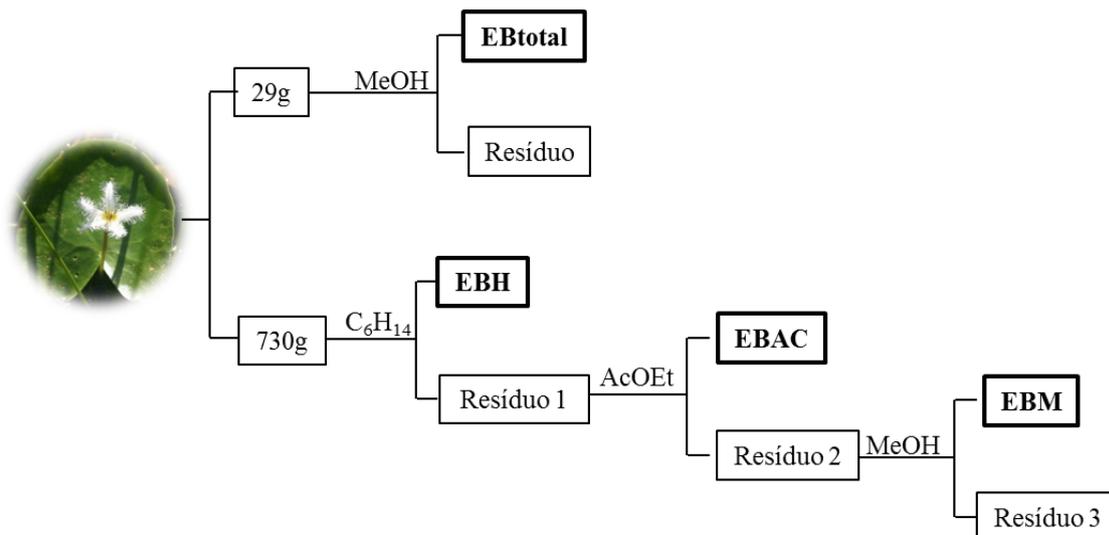
O material proveniente da coleta de maio de 2011 foi seco a sombra e temperatura ambiente. Posteriormente foi moído e subdividido em duas partes para extração.

Uma parte de 29 g foi submetida à exaustiva extração por maceração com o solvente orgânico metanol (Tedia grau HPLC) e o auxílio de um banho de ultrasom. Depois de filtrado, o extrato bruto foi concentrado, sob pressão reduzida, fornecendo o extrato bruto em metanol total (**EBtotal**).

Outra parte do material seco de 713 g foi submetida à extração sequencial exaustiva utilizando três solventes de polaridade crescente: hexano (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH), também com o auxílio de um aparelho de ultrasom. Cada uma destas soluções foram filtradas e concentradas sob pressão reduzida, fornecendo os extratos brutos em hexano (**EBH**), acetato de etila (**EBAC**) e metanol (**EBM**).

A extração sequencial foi realizada a fim de separar, inicialmente, as principais classes de metabólitos secundários pela polaridade.

Um esquema resumido do método de extração é apresentado na FIGURA 24.



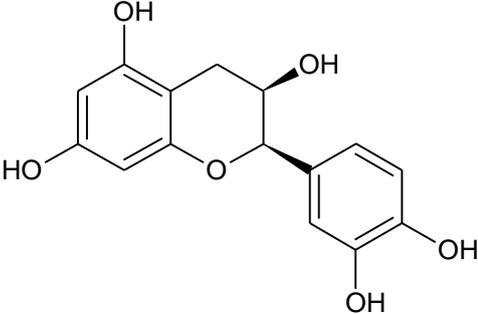
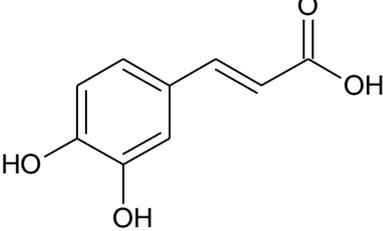
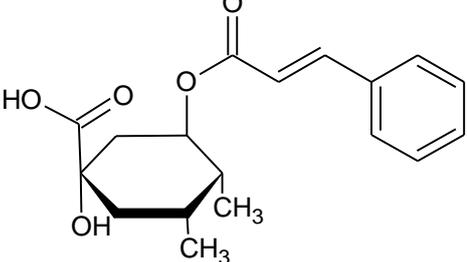
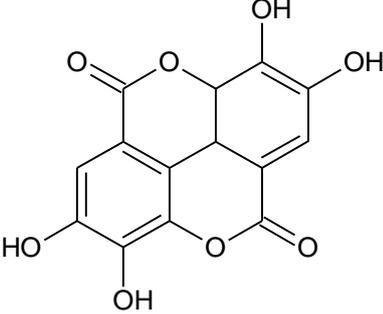
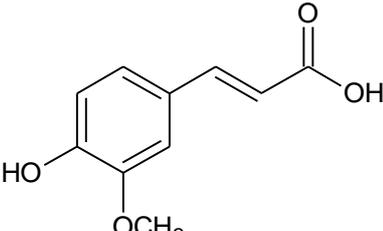
**FIGURA 24:** Método de obtenção dos extratos de *Nymphoides indica*. Onde MeOH = metanol;  $C_6H_{14}$  = hexano; AcOEt = acetato de etila, EBtotal = extrato bruto em metanol total, EBH = extrato bruto em hexano e EBAC = extrato bruto em acetato de etila e EBM = extrato bruto em metanol.

#### 4.8.2. Análises cromatográficas dos extratos brutos de *N. indica*

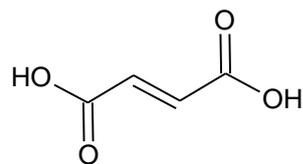
##### 4.8.2.1. Perfil químico fenólico do extrato em metanol total por CLAE-UV-DAD

O perfil químico por CLAE-UV-DAD do extrato **EBtotal** foi utilizado para determinação dos compostos fenólicos presentes em *N. indica*. Para determinação destes compostos, treze padrões comerciais de substâncias fenólicas (Sigma Aldrich) (TABELA III), na concentração de 0,2 mg/mL, foram analisados também por CLAE-UV-DAD, sob as mesmas condições de análise descrita do item 5.2.

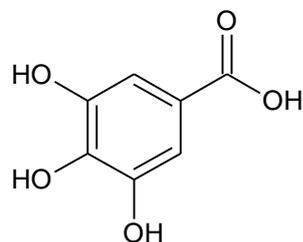
**Tabela III:** Padrões comerciais de substâncias fenólicas utilizados na caracterização do perfil químico por CLAE-UV-DAD do extrato bruto em metanol (EBM1) da macrófita aquática *Nymphoides indica*.

Padrão comercial	Estrutura
(-) Epicatequina	
Ácido Cafeico	
Ácido Clorogênico	
Ácido Elágico	
Ácido Ferrúlico	

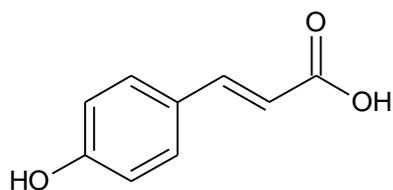
Ácido Fumárico



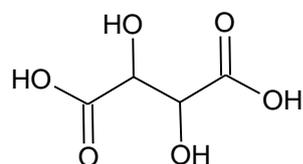
Ácido Gálico



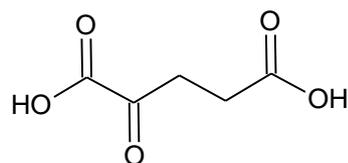
Ácido *p*-cumárico



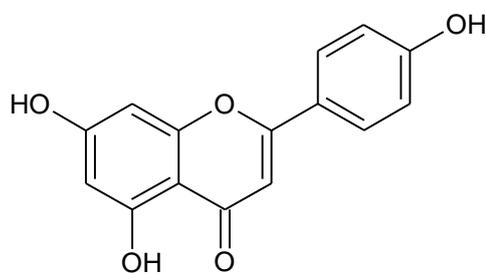
Ácido Tartárico



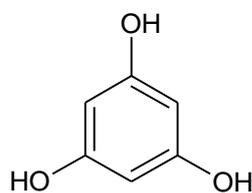
Ácido  $\alpha$ -cetoglutárico



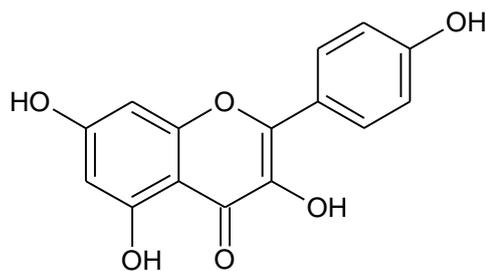
Apigenina



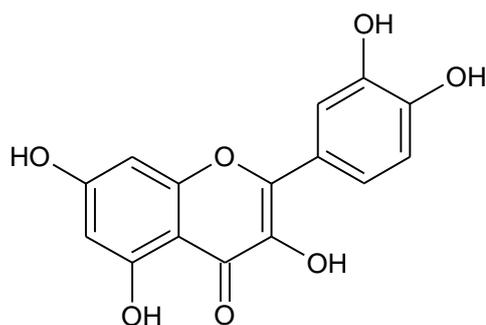
Floroglucinol



Kaempferol



Quercetina



A determinação da presença destas substâncias no EBtotal, inicialmente, foi realizada comparando os tempos de retenção ( $t_R$ ) e os espectros de UV dos padrões frente aos mesmos  $t_R$  e espectro de UV das substâncias presentes no extrato EBtotal. Em seguida, foi realizada a co-injeção de cada padrão isoladamente no extrato. A presença do composto fenólico no extrato foi sugerida observando-se o aumento da altura e da área do pico nas amostras.

#### 4.8.2.2. Caracterização geral do perfil químico dos extratos brutos por CLAE-UV-DAD

O perfil químico dos extratos **EBtotal**, **EBH**, **EBAE** e **EBM** foram avaliados por CLAE-UV-DAD nas mesmas condições de análises já detalhadas no item 5.2. Em seguida, os espectros de UV das principais substâncias de cada extrato foram caracterizados comparando com dados já descritos na literatura.

#### **4.9. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS BRUTOS DE *N. indica***

Para determinação da atividade antioxidante dos extratos brutos de *N. indica* (**EBtotal**, **EBH**, **EBAE** e **EBM**) foi aplicada a mesma metodologia já descrita no tópico 7 de Materiais e Métodos.

Para avaliar as possíveis variações na Atividade Antioxidante Total entre os extratos brutos analisados, os resultados obtidos (EC50) foram analisados pelo teste de variância ANOVA. O teste a posteriori de Tukey foi aplicado para identificar em qual par de dados encontrava-se a diferença. O valor de  $p \leq 0,05$  foi assumido para identificar diferenças significativas entre as amostras.

#### **4.10. BIOENSAIOS DE HERBIVORIA COM OS EXTRATOS BRUTOS DE *N. indica***

A atividade contra herbivoria dos extratos brutos de *N. indica* (**EBtotal**, **EBH**, **EBAE** e **EBM**) foi avaliada seguindo a mesma metodologia já descrita no tópico 4.7 de Materiais e Métodos.

O consumo de cada extrato foi avaliado individualmente em relação ao percentual consumo dos alimentos artificiais (alimento - sem extrato e alimento - com extrato). Como os dados apresentaram distribuição normal a diferença entre os consumos foi avaliada pelo teste t pareado. O valor de  $p \leq 0,05$  foi assumido para identificar diferenças significativas entre o consumo.



# **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A apresentação e discussão dos resultados obtidos nesse trabalho foram organizados em dois subitens e são apresentados abaixo.

### **5.1. Avaliação da resposta fisiológica na fotossíntese, perfil químico e na produção de defesas químicas contra a herbivoria em *N. indica* cultivada sob radiação UV-B**

A análise da fluorescência *in vivo* da clorofila *a* permite medidas não-invasivas de processos fotossintéticos importantes, como a eficiência quântica do fotossistema II (FSII) e taxa aparente de transporte de elétrons. Numerosos estudos de fluorescência têm sido realizados para investigar o impacto de condições ambientais adversas sobre a fotossíntese, e para caracterizar o uso e dissipação de energia luminosa absorvida pelo fotossistema II (Hussner *et al.* 2010). O funcionamento do FSII é um indicador muito importante e sensível para se observar fatores que induzem estresse em plantas (Ball *et al.* 1994).

Quando suas folhas são expostas a mais luz do que pode ser utilizado no processo de fotossíntese, a Eficiência Quântica Potencial do FSII (Fv/Fm) pode ser afetada em uma condição de estresse conhecida como fotoinibição (Barber & Anderson, 1992). Deste modo, para avaliar se o UV-B promoveu a fotoinibição do FSII nos indivíduos expostos a esta radiação, mensurou-se o rendimento quântico potencial (Fv/Fm) do fotossistema II (PSII), onde valores inferiores a 0,83 indicam processos de fotoinibição (Björkman & Demmig, 1987). As plantas em condições naturais de campo apresentaram uma leve fotoinibição, uma vez que o valor médio de Fv/Fm ( $0,78 \pm 0,03$ ) foi menor que 0,83 após a aclimação por 1 hora no escuro. Em cultivo, a aplicação de 1,93 vezes a dose de UV-B natural não produziu nenhum efeito fotoinibitório sobre o FSII, uma vez que valores de Fv/Fm não foram significativamente menores que 0,83 e

nenhuma diferença foi observada entre controle e tratamento (TABELA IV). Além disso, os valores médios maiores que 0,84 indicam que o rendimento quântico potencial foi mantido alto, mesmo na presença do estresse provocado pela radiação UV-B. Este parâmetro é indicativo de que a estrutura do PSII se manteve completamente funcional em cultivo independente da aplicação de UV-B.

**TABELA IV:** Médias e desvios padrão do rendimento quântico do potencial (Fv/Fm) do fotossistema II dos indivíduos do campo (n = 10) e dos indivíduos submetidos ao experimento de cultivo sem radiação UV-B (controle, n=10) e com radiação UV-B (tratamento, n=10). Letras diferentes significam diferença significativa no teste de variância ANOVA.

<b>Dias/ Cultivo</b>	<b>Controle</b>	<b>Tratamento</b>
1° dia	0,84 ± 0,01	0,84 ± 0,01
3° dia	0,85 ± 0,02	0,85 ± 0,01
5° dia	0,84 ± 0,01	0,85 ± 0,01
7° dia	0,87 ± 0,02	0,86 ± 0,02
9° dia	0,85 ± 0,01	0,85 ± 0,02
11° dia	0,85 ± 0,02	0,86 ± 0,01
13° dia	0,86 ± 0,02	0,85 ± 0,04
<b>Média ± DP</b>	<b>0,85 ± 0,01<sup>x</sup></b>	<b>0,85 ± 0,01<sup>x</sup></b>
<b>Campo</b>	<b>0,78 ± 0,03<sup>y</sup></b>	

Enquanto medidas de Fv/Fm e  $\Delta F/Fm'$  refletem a atividade momentânea da fotossíntese, as respostas geradas pelas curvas de dependência de luz refletem a capacidade fotossintética intrínseca das plantas. As curvas instantâneas de resposta a luz foram obtidas pelo aumento da luz PAR, de 0 a cerca de 2000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , em um curto intervalo de tempo, aproximadamente de 4 minutos. Este aumento artificial de luz permite avaliar a capacidade fotossintética de responder às mudanças rápidas de luz, indicando o potencial intrínseco da planta para realizar fotossíntese (Lüttge *et al.* 1998; Duarte *et al.* 2005; Lüttge & Scarano 2007; Ritchie & Bunthawin 2010).

As curvas de resposta instantânea da taxa relativa de transporte de elétrons no fotossistema II (ETR) à luz crescente, não atingiram a saturação sob uma radiação de cerca de  $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , ajustada no programa de curvas de luz do mini-PAM. Isso impossibilitou a determinação da taxa máxima de transporte de elétrons do indivíduo. Por este motivo, pontos cardinais provenientes dos gráficos do Rendimento Quântico Efetivo ( $\Delta F/F_m'$ ) e do ETR plotados contra a radiação fotossinteticamente ativa (PAR), para cada indivíduo foram extraídos de forma a observar o comportamento fotossintético em condição de pouca e muita luz ( $300$  e  $1800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  respectivamente). O  $\Delta F/F_m'$  dos indivíduos do cultivo com radiação UV-B foi reduzido levemente quando medido imediatamente após a aplicação da dose (TABELA V). Todavia, nas curvas de resposta instantânea de  $\Delta F/F_m'$  e ETR à luz crescente, observou-se uma maior eficiência fotossintética intrínseca nos indivíduos de *N. indica* cultivados com radiação UV-B somente em condição de pouca luz (TABELA VI). Esta diferença se manteve na ETR em condições de muita luz. Os indivíduos do campo, que receberam radiação UV-B natural, apresentaram eficiência fotossintética intrínseca maior do que os indivíduos cultivados somente em condição de muita luz, onde valores de  $\Delta F/F_m'$  e ETR foram significativamente maiores (TABELA VII).

**TABELA V:** Médias e desvios padrão da diferença do rendimento quântico efetivo da fotossíntese ( $\Delta F/F_m'$ ) antes e depois da aplicação da dose de radiação UV-B nos indivíduos submetidos ao experimento de cultivo sem radiação UV-B (controle) e com radiação UV-B (tratamento). Valores positivos representam  $\Delta F/F_m'$  maiores antes da aplicação da radiação UV-B e valores negativos representam  $\Delta F/F_m'$  maiores após a aplicação da radiação UV-B. (\*) representa valores significativamente diferente de zero (Teste T contra zero). (p) representa diferença significativa entre controle e tratamento (Teste T).

<b>Dias / Cultivo</b>	<b>Controle</b>	<b>Tratamento</b>	<b>p</b>
1° dia	0,01 ± 0,03	0,01 ± 0,03	1,000
3° dia	0,01 ± 0,02	0,00 ± 0,02	0,055
5° dia	0,00 ± 0,02	0,00 ± 0,03	1,000
7° dia	0,02 ± 0,01*	-0,01 ± 0,05	0,079
9° dia	0,01 ± 0,01*	-0,02 ± 0,02*	0,001
11° dia	0,01 ± 0,02	-0,02 ± 0,03*	0,028
13° dia	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,07	1,000
<b>Média ± DP</b>	<b>0,01 ± 0,01 *</b>	<b>-0,01 ± 0,01</b>	<b>0,003</b>

\* p < 0,05

\*\* p < 0,01

**TABELA VI:** Médias e desvios padrão do rendimento quântico efetivo ( $\Delta F/F_m'$ ) e da taxa de transporte de elétrons (ETR), obtidos das curvas de resposta à luz instantânea, sob radiação fotossinteticamente ativa de 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (pouca luz) dos indivíduos submetidos ao experimento de cultivo sem radiação UV-B (controle), com radiação UV-B (tratamento) e dos indivíduos em condições naturais (campo). Asteriscos denotam diferença significativa entre controle e tratamento (Teste *t* de Student). Letras diferentes denotam diferença significativa entre controle, tratamento e campo (*One way* ANOVA).

<b>Dias / Cultivo</b>	<b><math>\Delta F/F_m'</math></b>		<b>ETR</b>	
	<b>Controle</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Controle</b>	<b>Tratamento</b>
1° dia	0,69 ± 0,02	0,70 ± 0,08	86 ± 2	86 ± 10
3° dia	0,70 ± 0,02	0,72 ± 0,01	88 ± 2	92 ± 3*
5° dia	0,67 ± 0,04	0,73 ± 0,01**	84 ± 5	92 ± 1**
7° dia	0,71 ± 0,02	0,71 ± 0,02	89 ± 3	91 ± 4
9° dia	0,68 ± 0,02	0,71 ± 0,02*	85 ± 3	90 ± 2*
11° dia	0,65 ± 0,03	0,70 ± 0,01**	82 ± 7	87 ± 2
13° dia	0,65 ± 0,05	0,69 ± 0,02	82 ± 7	86 ± 2
<b>Média ± DP</b>	<b>0,68 ± 0,02<sup>x</sup></b>	<b>0,71 ± 0,01*</b>	<b>85 ± 3<sup>x</sup></b>	<b>89 ± 3**<sup>x</sup></b>
<b>Campo (N = 10)</b>	<b>0,70 ± 0,04<sup>x</sup></b>		<b>89 ± 5<sup>x</sup></b>	

\* p < 0,05

\*\* p < 0,01

**TABELA VII:** Médias e desvios padrão do rendimento quântico efetivo ( $\Delta F/F_m'$ ) e da taxa de transporte de elétrons (ETR), obtidos das curvas de resposta à luz instantânea, sob radiação fotossinteticamente ativa de  $1800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (muita luz) dos indivíduos submetidos ao experimento de cultivo sem radiação UV-B (controle), com radiação UV-B (tratamento) e dos indivíduos em condições naturais (campo). Asteriscos denotam diferença significativa entre controle e tratamento (Teste *t* de Student). Letras diferentes denotam diferença significativa entre controle, tratamento e campo (One way ANOVA).

<b>Dia / Cultivo</b>	<b><math>\Delta F/F_m'</math></b>		<b>ETR</b>	
	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento
1° dia	0,30 ± 0,01	0,33 ± 0,04	226 ± 12	244 ± 29
3° dia	0,29 ± 0,02	0,31 ± 0,06	218 ± 18	242 ± 27
5° dia	0,28 ± 0,03	0,32 ± 0,01*	208 ± 17	236 ± 7**
7° dia	0,31 ± 0,04	0,31 ± 0,05	230 ± 28	229 ± 39
9° dia	0,29 ± 0,02	0,31 ± 0,03	209 ± 14	228 ± 26
11° dia	0,25 ± 0,02	0,28 ± 0,02	187 ± 15	207 ± 17
13° dia	0,27 ± 0,03	0,27 ± 0,01	197 ± 25	213 ± 41
<b>Média ± DP</b>	<b>0,28 ± 0,02<sup>x</sup></b>	<b>0,31 ± 0,02<sup>x</sup></b>	<b>211 ± 15<sup>x</sup></b>	<b>228 ± 14<sup>*x</sup></b>
<b>Campo (N = 10)</b>	<b>0,40 ± 0,05<sup>y</sup></b>		<b>331 ± 41<sup>y</sup></b>	

\*  $p < 0,05$

\*\*  $p < 0,01$

Os resultados indicam que a aplicação de UV-B afetou positivamente a capacidade fotossintética intrínseca das plantas em cultivo. Entretanto as plantas de campo possuem claramente maior capacidade fotossintética intrínseca, com valores mais altos de ETR e  $\Delta F/F_m'$  em intensidades de luz mais altas.

Plantas aquáticas com folhas flutuantes são capazes de capturar uma grande proporção da luz solar. Sua capacidade fotossintética é relativamente elevada, podendo ser comparável, ou até maior, que das plantas terrestres, já que dificilmente estas plantas sofrem com deficiência hídrica (Larson 2007). Além do mais, dependendo do estágio de desenvolvimento e/ou condições ambientais adversas, estas plantas aquáticas, como *N. indica*, podem apresentar uma alta plasticidade em sua forma de vida, desenvolvendo pequenas plantas terrestres em sedimentos temporariamente secos (Tsuchiya 1988; Wang *et al.* 2010).

O tempo de recuperação da fotoinibição em plantas aquáticas é particularmente dependente da profundidade onde o indivíduo cresceu e, conseqüentemente, da irradiância solar durante seu crescimento (Hussner *et al.* 2010). Hanelt *et al.* (2006) demonstraram que as plantas aquáticas submersas são mais sensíveis a elevada radiação, sofrendo uma inibição crônica da fotossíntese. Em contraste, as plantas que são normalmente expostas a forte radiação, como as de folha flutuante, mostraram uma fotoinibição mais leve, que, neste caso, deve ser interpretada como foto-aclimação.

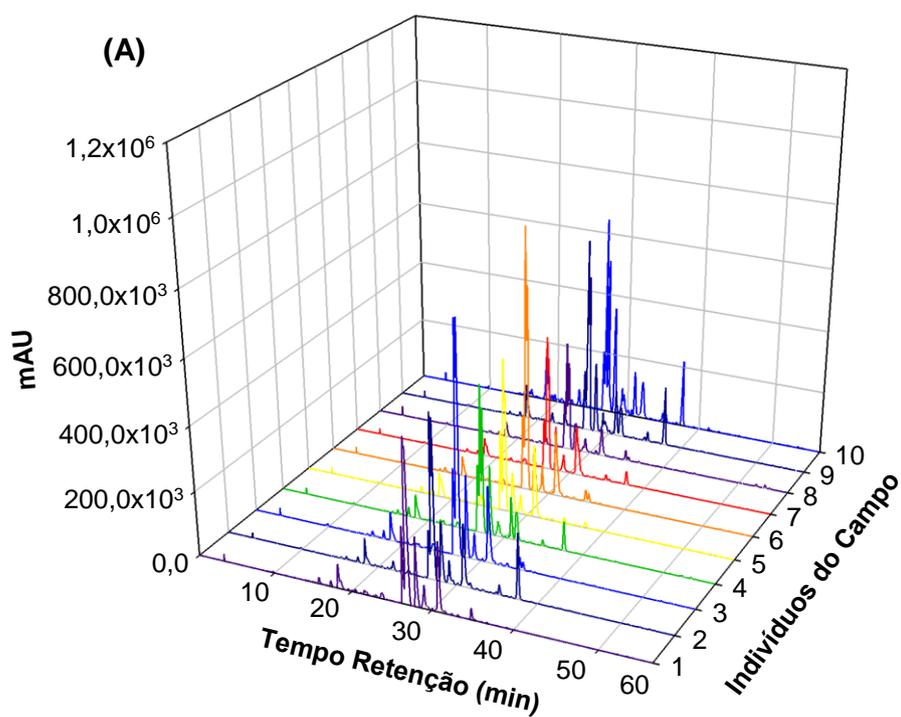
Larkum e Wood 1993 (*apud* Hanelt *et al.* 2006) indicaram que o aumento dos níveis de radiação UV pode causar um efeito semelhante a PAR elevada em todos os tipos de plantas aquáticas. Isto demonstra que o potencial fotossintético de *N. indica* para aclimatar-se ao estresse gerado pela elevação da radiação UV-B em cultivo, sugerindo que esta planta apresenta mecanismos eficientes de tolerância ao estresse garantindo sua sobrevivência em condições elevadas de radiação UV-B.

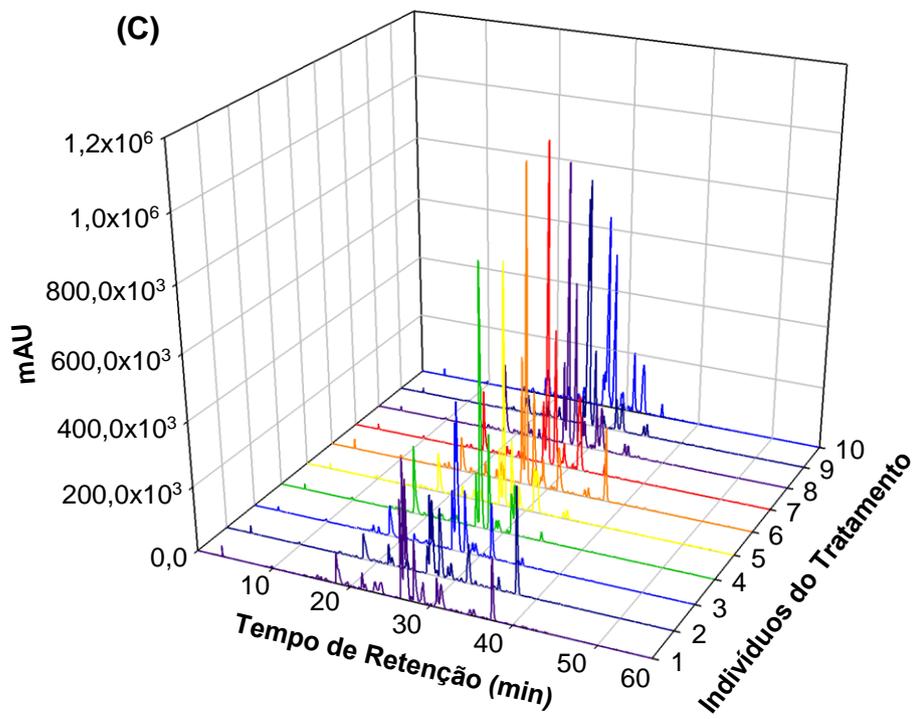
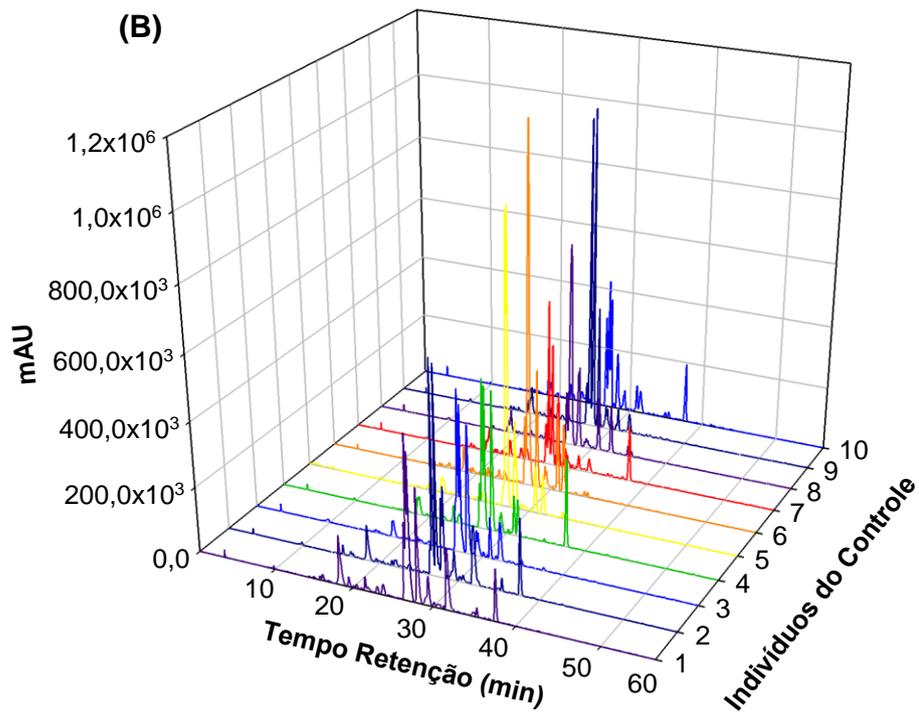
Devido às diferentes flutuações de radiação, as plantas ao longo da sua evolução desenvolveram diferentes mecanismos de defesa contra o estresse causado pelo excesso de radiação (Meiling, *et al.* 2012). Neste contexto, a estase fotossintética encontrada em *N. indica* pode estar associada a tais mecanismos de defesa. Dentre todos os mecanismos possíveis de proteção desenvolvidos pelos vegetais, neste trabalho foram avaliadas as defesas químicas mediadas pelos metabólitos secundários.

Para avaliar a composição dos metabólitos secundários analisou-se o perfil químico dos indivíduos do campo, controle e tratamento utilizando-se Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um detector de arranjo de diodo (CLAE-UV-DAD). CLAE-UV-DAD é uma importante técnica cromatográfica empregada para a separação e detecção de metabólitos secundários em misturas complexas, como os extratos brutos de plantas. Uma análise por CLAE-UV-DAD permite avaliar a complexidade dos perfis químicos e distinguir, através da análise dos espectros de absorção característicos no ultravioleta as principais classes de metabólitos secundários presentes na amostra.

Os resultados dos perfis químicos mostraram uma grande complexidade química em todos os extratos de *N. indica*. Variações qualitativa e quantitativa dos metabólitos foram observadas entre os indivíduos provenientes do campo, controle e tratamento

(FIGURA 25). Os espectros de UV dos metabólitos foram característicos de substâncias fenólicas, com bandas de absorção entre 210-350 nm, sugerindo a presença de flavonoides, uma das classes de produtos naturais descrita para o gênero, como substâncias majoritárias (Bohm *et al.* 1986).



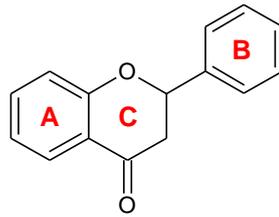


**FIGURA 25:** Cromatografia de Alta Eficiência (CLAE-UV-DAD) dos indivíduos **(A)** do Campo com radiação UV-B natural; **(B)** cultivados sem radiação UV-B (Controle); **(C)** do cultivo com radiação UV-B 1,93 vezes maior que a natural (Tratamento).

Flavonoides representam um dos grupos mais importantes e diversificados de polifenóis de origem vegetal. Esta classe de substância é altamente distribuída em plantas e apresenta uma multiplicidade de funções na interação planta-ambiente (Agati *et al.* 2012).

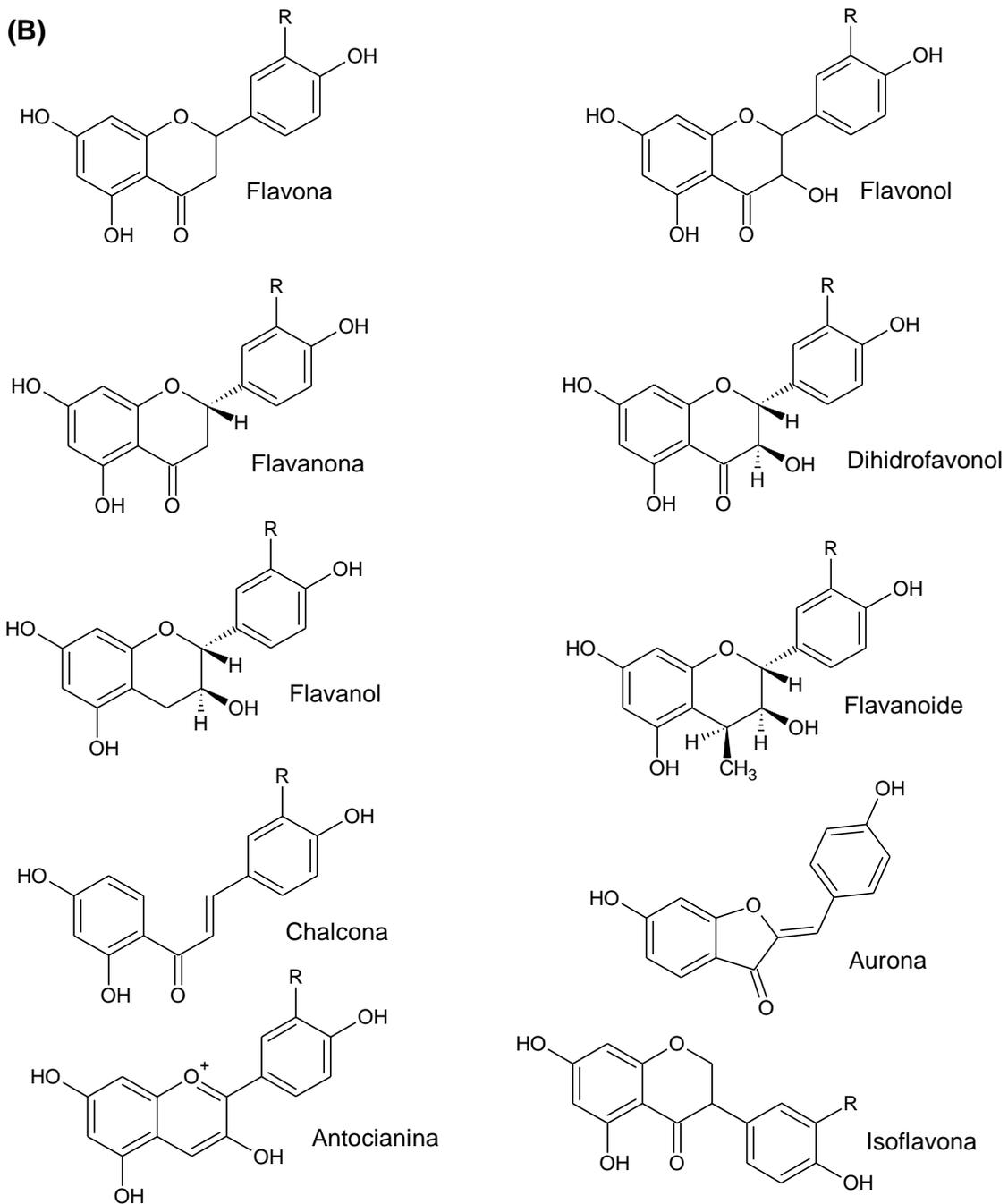
Os flavonoides são formados pela combinação de derivados sintetizados a partir da fenilalanina (via metabólica do ácido chiquímico) e do ácido acético. A estrutura dos flavonoides é caracterizada por um esqueleto contendo um núcleo básico com dois anéis benzênicos, A e B, e um anel pirano C, totalizando 15 átomos de carbono (FIGURA 26 A). Os flavonoides são classificados em dez grupos: flavona, flavonol, flavanona, dihidroflavonol, flavanol, flavanoide, isoflavona, aurona, chalcona e antocianinas (FIGURA 26 B). Estas classes se distinguem pelas modificações no anel C e substituições nos anéis A e B (Graham 1998; Willians *et al.* 2004, Ioannou *et al.* 2012).

(A)



Núcleo fundamental dos flavonoides

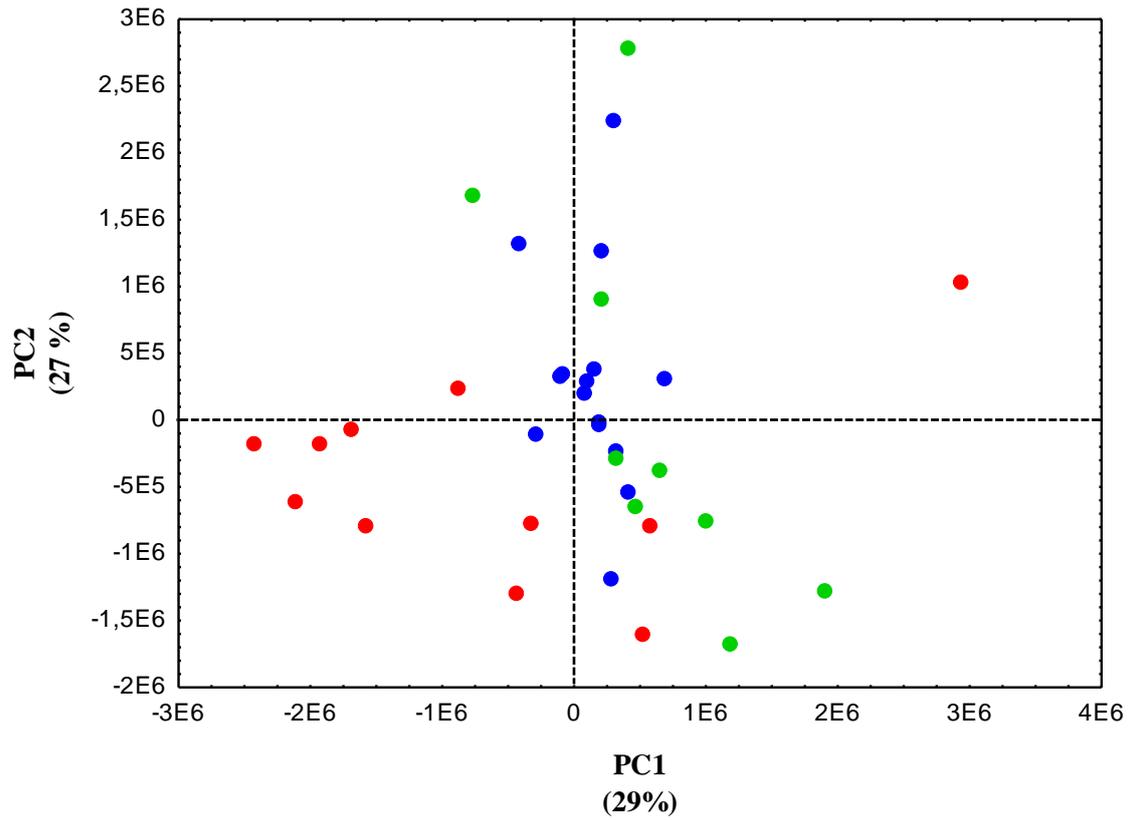
(B)



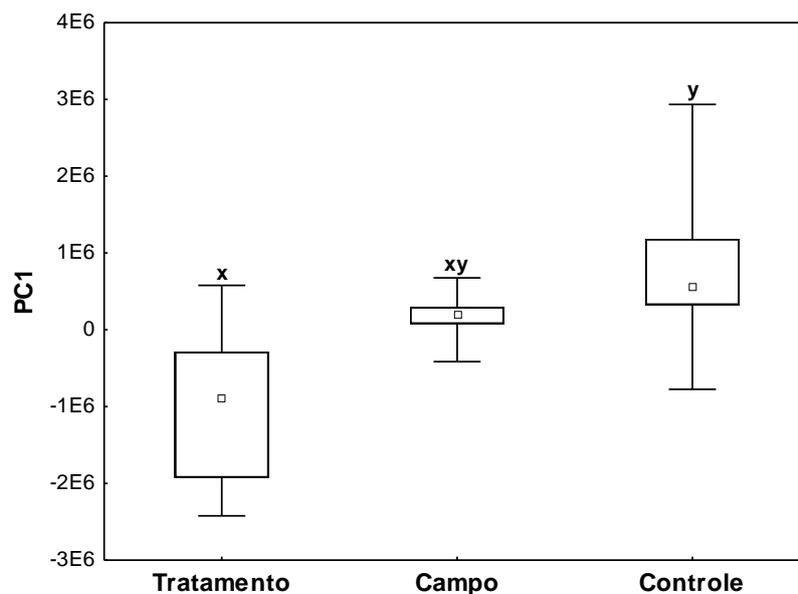
**FIGURA 26:** (A) Estrutura do núcleo fundamental dos flavonoides. (B) Estrutura das principais classes de flavonoides.

Como a visualização de padrões sistemáticos ou tendências com dados de tempo de retenção nos perfis químicos dos indivíduos em CLAE foi difícil, devido a sua alta complexidade, a aplicação de técnicas quimiométricas auxiliou a interpretação dos dados com mais qualidade, possibilitando a classificação e a discriminação entre as amostras (Cheng *et al.* 2010). Neste contexto, foi utilizado a Análise de Componentes Principais (PCA, do termo em inglês *Principal Components Analysis*) que é um método empregado com a intenção de extrair e visualizar semelhanças nestas grandes matrizes de dados. Através da PCA pode-se reduzir a dimensão do conjunto de dados, encontrando combinações lineares das principais variáveis que explicam a maior parte da variabilidade dos dados (Sena *et al.* 2000, Stasiak *et al.* 2010).

A PCA permitiu avaliar o grau de correlação dos perfis químicos das amostras, bem como encontrar as substâncias que mais contribuíram para os agrupamentos. O componente principal 1 (CP1) e o CP2 explicaram juntas 56 % da variabilidade dos dados cromatográficos. Por meio do gráfico dos escores (FIGURA 27) foi possível discriminar, pelos tempos de retenção dos perfis químicos, dois grupamentos de amostras distintos: um formado pelos indivíduos do tratamento, localizado no lado negativo da CP1; e outro pelos indivíduos do controle e campo localizado no lado positivo da CP1. A separação foi significativa entre os dados dos indivíduos do Controle e do Tratamento pelos escores da PC1 ( $H = 13,934$ ;  $p = 0,001$ ) (FIGURA 28).

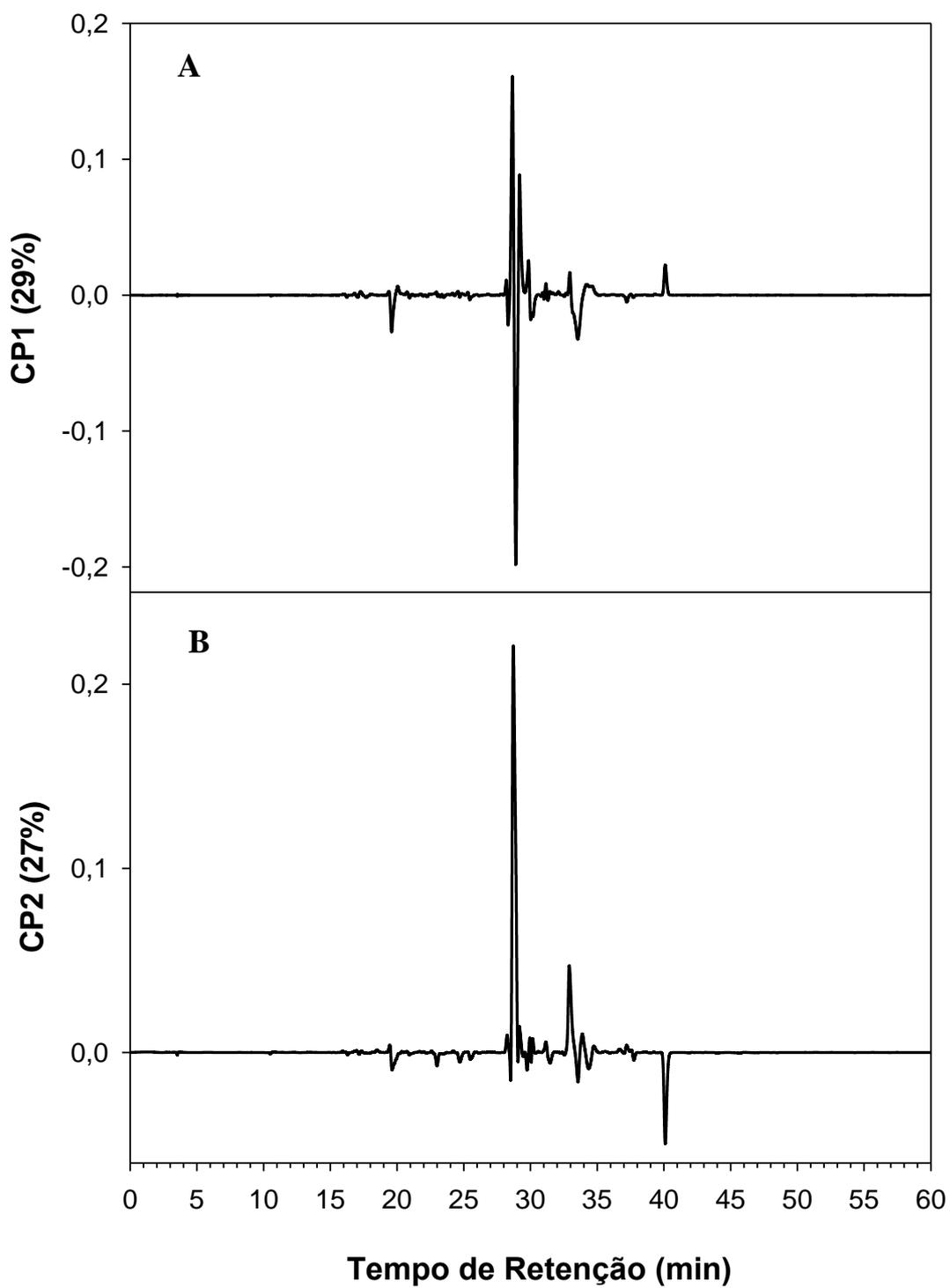


**FIGURA 27:** Gráfico dos escores dos Componentes Principais 1 e 2 (CP1 e CP2) na Análise dos Componentes Principais dos perfis químicos obtidos por CLAE e lidos em 254nm. Círculos vermelhos representam indivíduos do tratamento (cultivados com radiação UV-B), círculos azuis representam indivíduos do controle (cultivados sem radiação UV-B) e círculos verdes representam indivíduos do campo (radiação UV-B natural).



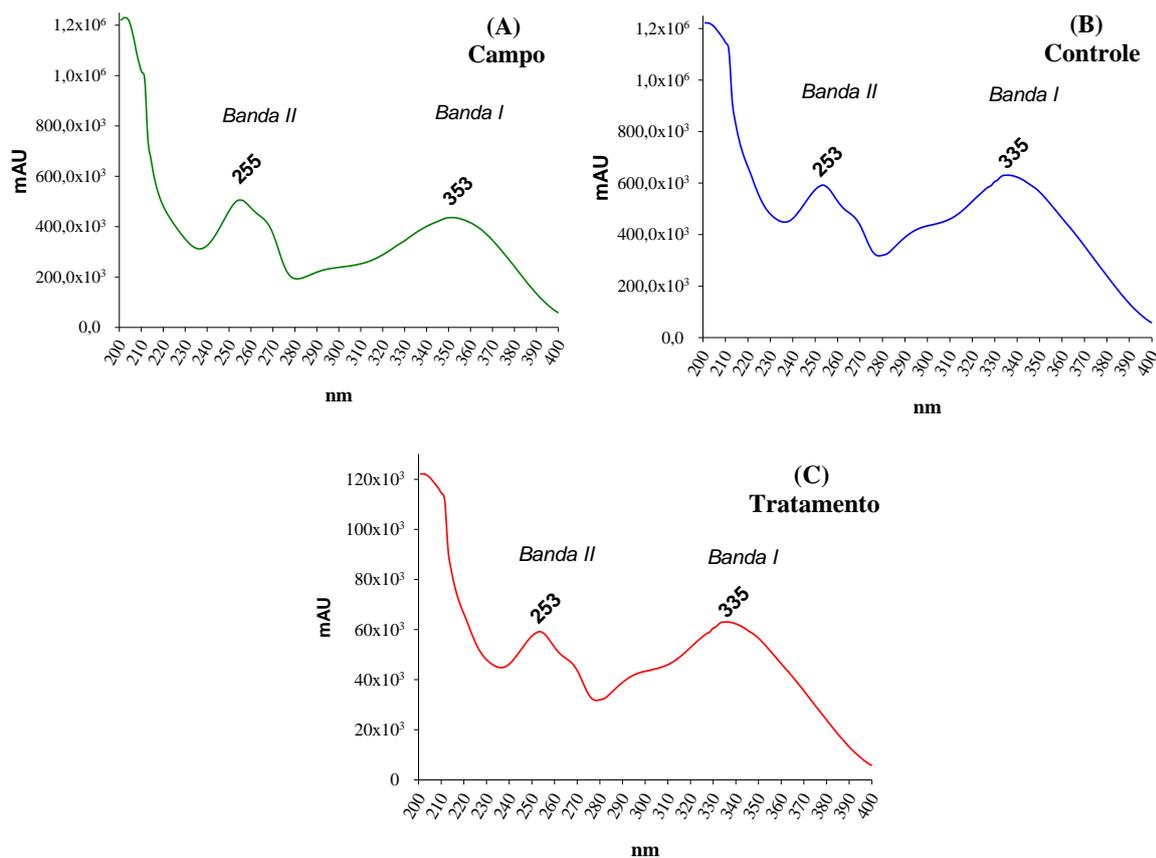
**FIGURA 28:** Medianas, quartis, mínimos e máximos dos escores da PC1 dos indivíduos do tratamento, campo e controle. Letras diferentes denotam diferença significativa entre controle, tratamento e campo (Kruskal-Wallis).  $H(2, N=30) = 13,934$ ;  $p = 0,001$

O gráfico da FIGURA 29 A e B, que ordena o peso (*loadings*) do pico dos cromatogramas na variação de cada componente da PCA pelo tempo de retenção, evidencia quais os compostos mais relevantes para a distribuição das amostras no espaço fatorial dado pelo gráfico dos escores. Neste sentido os metabólitos que eluíram no tempo de retenção em 28,6 e 28,9 minutos foram às substâncias mais importantes na separação dos indivíduos do controle e tratamento.

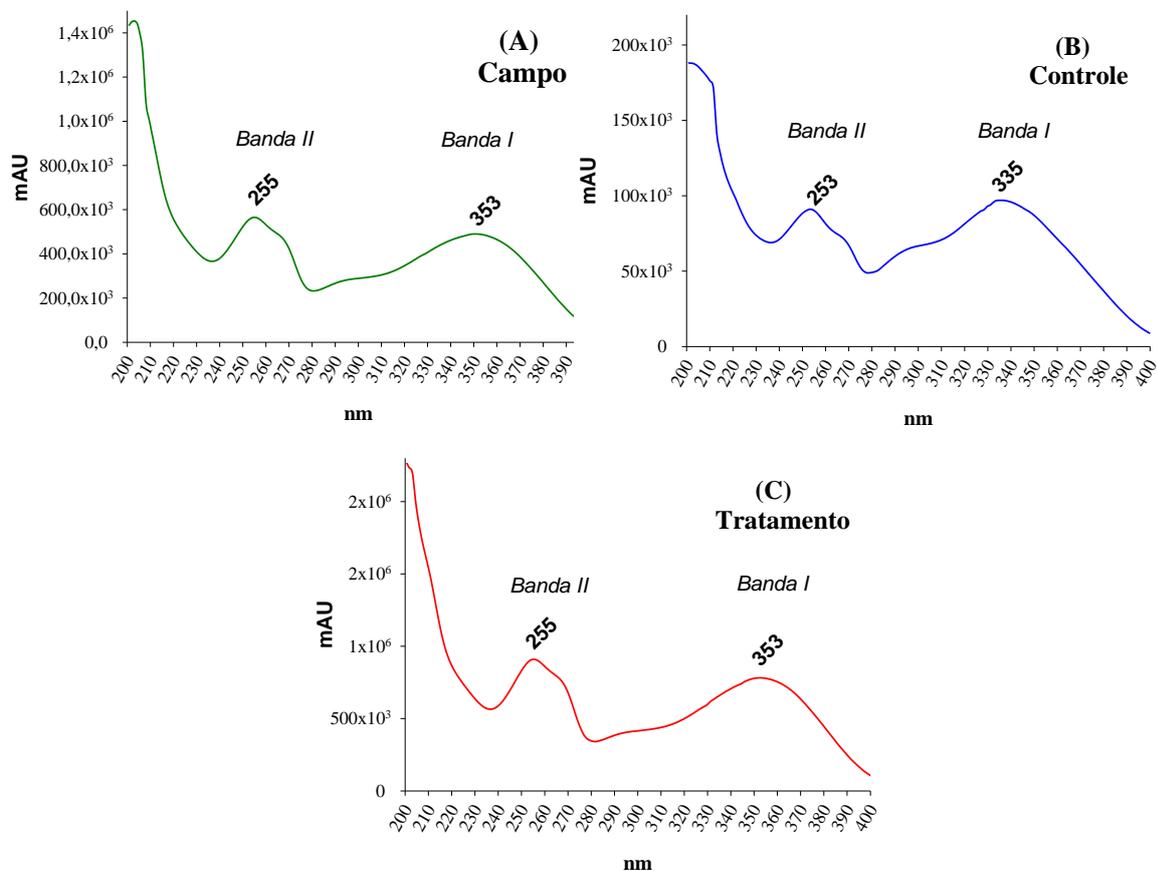


**FIGURA 29:** (A) Peso do sinal do cromatograma na variação de CP1 pelo tempo de retenção. (B) Peso do sinal do cromatograma na variação de CP2 pelo tempo de retenção.

Nas análises realizadas em CLAE-UV-DAD foi possível obter os espectros na região do UV para as substâncias com tempo de retenção em 28,6 e 28,9 minutos (FIGURA 30 e 31, respectivamente). A espectroscopia na região do UV é uma técnica muito utilizada para a identificação estrutural de substâncias fenólicas que possuem espectros de absorção característicos nestes comprimentos de onda.



**FIGURA 30:** Espectro de UV da substância com tempo de retenção em 28,6 responsável pela segregação dos extratos na PCA. (A) Campo; (B) Controle e (C) Tratamento.



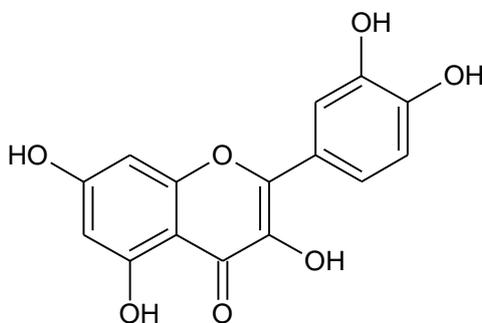
**FIGURA 32:** Espectro de UV da substância com tempo de retenção em 28,9 responsável pela segregação dos extratos na PCA. (A) Campo; (B) Controle e (C) Tratamento.

Na análise dos espectros na região do UV destes metabólitos, notou-se que as condições de cultivo alteraram as características estruturais do metabólito com tempo de retenção em 28,6 quando comparada ao espectro dos indivíduos do Campo. Os dados sugerem a variação do metabólito presente no Campo para um segundo metabólito, estruturalmente correlacionado ao primeiro, produzido nas condições de cultivo, tanto para o controle quanto para o tratamento. Entretanto, esse segundo metabólito encontra-se em maior concentração nos indivíduos do Controle e em concentrações ínfimas nos indivíduos do tratamento (FIGURA 31 A, B e C). Por sua vez, a substância com tempo de retenção em 28,9 teve sua maior concentração obtida para os indivíduos do

Tratamento, seguido dos indivíduos do Campo e nos indivíduos do Controle sua concentração foi ínfima (FIGURA 32 A, B e C). Além disso, observa-se também alterações estruturais nos indivíduos do controle, sugerindo que a produção desta substância esta relacionada a incidência de radiação UV-B.

Os metabólitos com tempo de retenção em 28,6 e 28,9 apresentaram absorções referentes às bandas I e II de flavonoides. Sendo a absorção da banda II em 253 e 266 nm para a substância em 28,6 e absorção em 255 e 266nm para a substância em 28,9. Já a banda I apresentou absorção em 292 e 335 nm e 292 e 353 nm para as substâncias em 28,6 e 28,9 respectivamente. Os flavonoides absorvem na região do ultravioleta e possuem comumente duas bandas de absorção características. A banda II, com máximo de absorção em 240-285 nm resultante do anel A e a banda I, com máximo de absorção em 300-550 nm resultante da absorção do anel B. Flavonas e flavonóis glicosilados são usualmente observados em comprimento de onda em 270nm, 365nm ou 370nm, embora detecções em 280 e 350nm sejam também utilizadas (Huber *et al.* 2008).

Sendo assim, a comparação dos dados obtidos com a literatura (4 bandas no espectro de UV (MeOH): 255, 269, 301 e 370 nm, Markham & Thomas 1970) permitiu sugerir que a substância em 28,9 min seja um flavonol com esqueleto quercetina (FIGURA 32) com substituições no anel B. Não foi possível sugerir uma estrutura para o metabólito 28,6 minutos.



**FIGURA 32:** Estrutura do flavonol quercetina.

Alguns trabalhos têm demonstrado que a exposição à radiação UV-B pode induzir a produção de substâncias fenólicas que atuam como mecanismo de defesa em plantas (Santos *et al.* 2004). Existe uma correlação positiva bem estabelecida entre a intensidade de radiação solar e a produção de compostos fenólicos, tais como flavonóis e antocianinas. Estas substâncias absorvem e/ou dissipam a energia solar, protegendo a planta contra a foto-destruição dos tecidos e reações fisiológicas (Globo-Neto & Lopes 2006).

A capacidade de plantas acumularem compostos absorventes de radiação tem sido correlacionada com a tolerância ao UV-B. Mutantes de *Arabidopsis* tolerantes a níveis de UV-B letais mostraram uma acumulação constitutivamente elevada de flavonoides e outros fenólicos (Santos *et al.* 2004). Estas substâncias podem reduzir a degradação gerada pelo UV-B nos centros de reação do PSII (Ryan *et al.* 2002). O acúmulo destas substâncias ocorre principalmente em tecidos superficiais tais como epiderme, subepiderme, pêlos, cutícula, material epicuticular e em vacúolos do parênquima (Globo-Neto 2006; Zancan *et al.* 2008). A relevância fisiológica dos flavonoides, presumivelmente, difere entre as diferentes espécies de plantas, mas a absorção máxima dessas substâncias a 210-350 nm prediz uma função importante na proteção do tecido da radiação UV, para qualquer espécie, evitando que essa radiação alcance o mesófilo, afetando a fotossíntese (Martens, *et al.* 2010; Klem *et al.* 2012).

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam que o aumento da radiação UV-B alterou o perfil químico de *N. indica*, estimulando uma produção elevada de flavonoides, responsáveis pela proteção contra a foto-degradação. Essas defesas químicas podem ser as principais responsáveis pela elevada eficiência fotossintética de *N. indica*, protegendo seus tecidos fotossintéticos dos danos gerados pelo aumento da radiação UV-B.

O aumento da incidência de radiação UV-B, associada, entre outros fatores, a elevada eficiência fotossintética com alto fluxo de elétrons, propicia a produção de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ERO's). Assim, metabólitos secundários produzidos pelo aumento da radiação UV-B podem estar envolvidos, também, no mecanismo de defesa contra os danos gerados pelos radicais livres, atuando assim como substâncias antioxidantes.

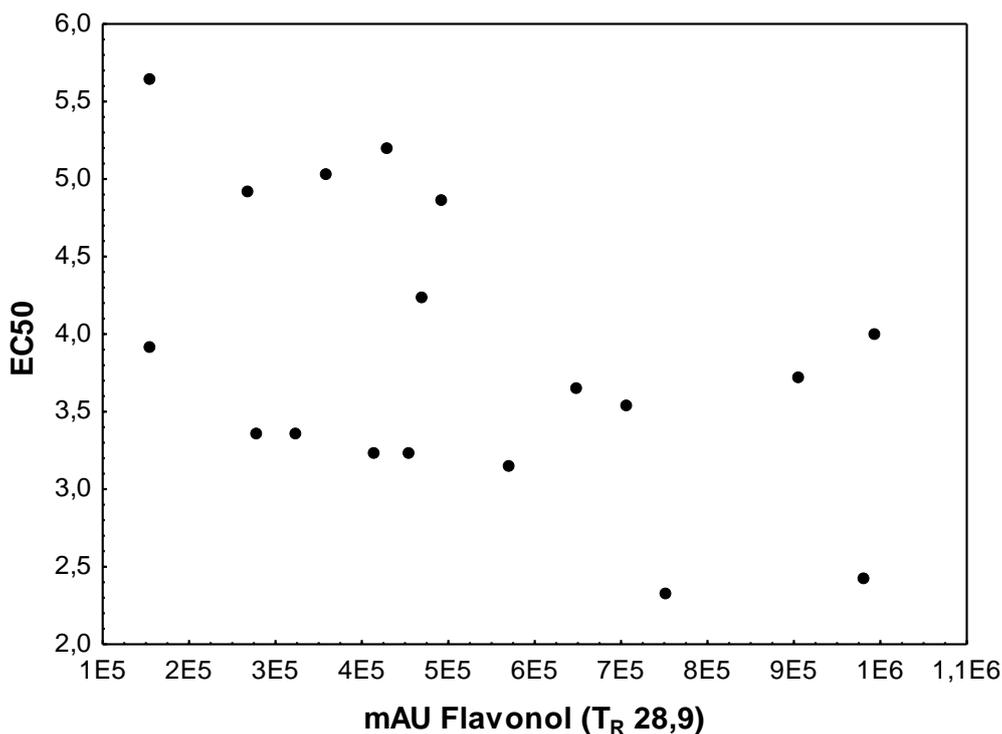
Para a avaliação da atividade antioxidante dos indivíduos do Campo, Controle e Tratamento, foi empregado o método colorimétrico de DPPH. Apesar de não representar condições semelhantes para os processos que ocorrem *in vivo*, este método é largamente utilizado, tanto pela simplicidade e rapidez quanto pela reprodutibilidade. É considerado um ensaio fácil e possibilita analisar um grande número de amostras em curto período de tempo. Seus resultados levam em consideração não apenas a concentração de antioxidantes, mas também o tempo de reação para alcançar o máximo de atividade da substância. Este método é caracterizado por avaliar a capacidade de neutralização do radical livre estável, DPPH, detectando a presença de substâncias com propriedades antioxidantes em todo tipo de amostras, inclusive em extratos vegetais (Brand-William, *et al.* 1995; Moreno 2002; Molyneux 2004).

A TABELA VIII apresenta a atividade antioxidante, através dos valores de EC<sub>50</sub> para os extratos dos indivíduos do Campo (radiação UV-B natural), Controle (sem radiação UV-B) e Tratamento (1,93x a radiação UV-B natural). Baixos valores de EC<sub>50</sub> refletem uma grande capacidade antioxidante da amostra. De acordo com os resultados, observa-se uma alta atividade antioxidante para *N. indica*. Entretanto essa atividade foi maior para os indivíduos do tratamento expostos à alta radiação UV-B. Nenhuma das amostras apresentou atividade maior do que o padrão comercial BHT, uma substância pura, utilizada como antioxidante em escala industrial.

**TABELA VIII:** Mediana, máximo e mínimo de EC<sub>50</sub> (concentração da amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH) dos extratos brutos dos indivíduos do campo (N=10), controle (N=10) e tratamento (N=10). BHT foi utilizado nos ensaios como controle positivo (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras (Kruskal Wallis).

	<b>EC<sub>50</sub></b> (g amostra / g DPPH)	
	Mediana	Mínimo e Máximo
<b>BHT</b>	1,72 <sup>x</sup>	1,68 e 1,74
<b>Tratamento</b>	3,50 <sup>x</sup>	2,33 e 3,99
<b>Controle</b>	4,54 <sup>y</sup>	3,23 e 6,62
<b>Campo</b>	4,02 <sup>y</sup>	3,40 e 6,46

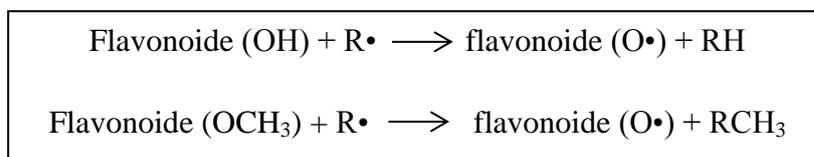
Sugere-se que a elevada atividade antioxidante esteja correlacionada com o aumento da concentração do flavonol correlacionado à quercetina (T<sub>R</sub> 28,9) encontrado nos indivíduos do Campo e do Tratamento. A FIGURA 33 apresenta uma correlação entre o aumento da intensidade de absorção deste metabólito com a diminuição do EC<sub>50</sub> (R<sub>Pearson</sub> = -0,50; p = 0,037).



**FIGURA 34:** Correlação de Pearson ( $R_{\text{Pearson}} = -0,50$ ;  $p = 0,037$ ) do  $EC_{50}$  dos indivíduos do Campo e Tratamento com a intensidade do pico 28,9 (mAU).

Flavonoides são substâncias caracterizadas como antioxidantes naturais e têm recebido considerável atenção devida à sua propriedade neutralizadora de radicais livres. Estas substâncias exibem estruturas químicas conjugadas no anel B ricas em grupos hidroxilas, por exemplo, espécies químicas que permitem a doação de um próton ( $H^+$ ) para o radical livre, interrompendo o mecanismo de oxidação. Nesta reação os derivados fenólicos ficam com um elétron desemparelhado, no entanto, este radical é estabilizado pela ressonância com os anéis benzênicos presentes em sua estrutura. Esse mecanismo de reação protege os tecidos da ação nociva dos radicais livres altamente reativos (Rice-Evans *et al.* 1995; Al-Gubory *et al.* 2010; Silva e Paiva, 2012).

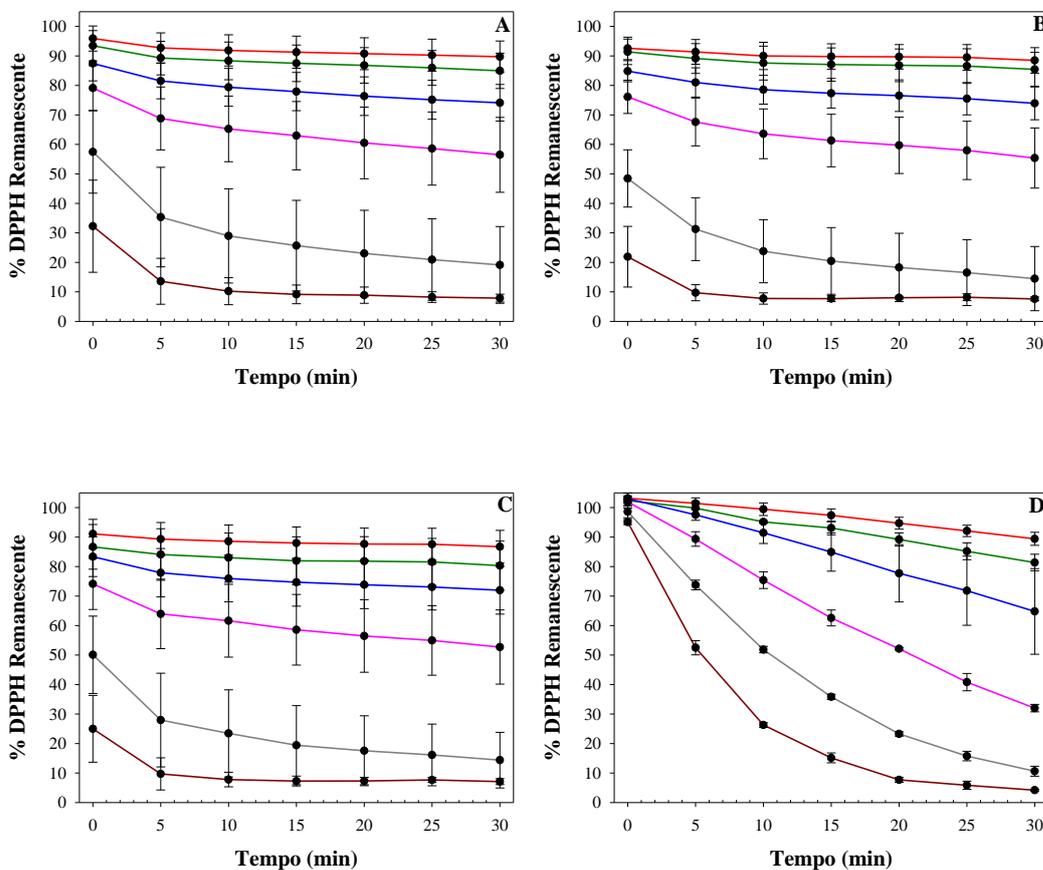
A ação antioxidante dos flavonóides pode ser desempenhada, por exemplo, pelas espécies químicas apresentadas nas equações abaixo:



Onde:  $\cdot$  representa um elétron desemparelhado, e **R** um radical livre.

Utilizando-se o radical DPPH também é possível analisar o comportamento cinético de uma substância numa amostra. Para isso é construído uma curva dose-resposta relativa ao decréscimo da porcentagem de DPPH remanescente (% DPPHrem) no meio reacional, em função do tempo (min). Assim, dependendo da velocidade para a estabilização do DPPH é possível caracterizar se uma amostra tem uma cinética rápida, intermediária ou lenta. Uma cinética rápida traduz-se numa substância que reage rapidamente com o DPPH e atinge o estado estacionário em menos de cinco minutos. As substâncias que apresentam tempos de estabilização entre cinco e trinta minutos possuem uma cinética intermediária, enquanto que os que demoram mais de trinta minutos, possuem uma cinética lenta (Brand-Willians *et al.* 1995).

O comportamento cinético da reação do DPPH com cada extrato e o controle positivo (BHT), é mostrado na FIGURA 34 A, B, C e D. Observou-se que os extratos dos indivíduos do campo, controle e tratamento apresentaram um comportamento semelhante em todas as concentrações analisadas, com um decaimento inicial mais rápido, seguido de um decaimento muito lento. A porcentagem (%) do DPPH remanescente no início da reação manteve-se praticamente constante durante os 30 minutos seguintes de reação. Notou-se também que a concentração de 250  $\mu\text{g/mL}$  foi a mais ativa para todas as amostras analisadas, seguida da concentração de 150  $\mu\text{g/mL}$ . Ambas as amostras atingiram uma porcentagem de DPPH remanescente menor que 50% nos primeiros instantes da reação. Já o BHT (FIGURA 34 D) apresentou um comportamento cinético lento com um decaimento do DPPH remanescente gradual ao longo do tempo, em todas as concentrações analisadas.



**FIGURA 35:** Média e desvio da cinética de reação dos extratos brutos (A) dos indivíduos de campo com DPPH (radiação UV-B natural, n=10); (B) dos indivíduos controle com DPPH (submetidos a cultivo sem radiação UV-B, n=10); (C) dos indivíduos do tratamento com DPPH (submetidos a cultivo com 1,93 vezes a radiação UV-B natural, n=10) e do (D) BHT com DPPH (n=3). Onde a linha vermelha representa a concentração de 5 µg/mL; a linha verde representa a concentração de 10 µg/mL; a linha azul representa a concentração de 25 µg/mL; a linha rosa representa a concentração de 50 µg/mL; a linha cinza representa a concentração de 125 µg/mL e a linha marrom representa a concentração de 250 µg/mL.

Sendo assim, diferente do BHT, que apresenta uma cinética lenta, todos os extratos dos indivíduos do campo, controle e tratamento exibiram uma cinética intermediária, podendo ser considerada rápida para as concentrações mais altas analisadas. Esta diferença está relacionada às características químicas das substâncias presentes nos extratos que permitem a estabilização do radical DPPH.

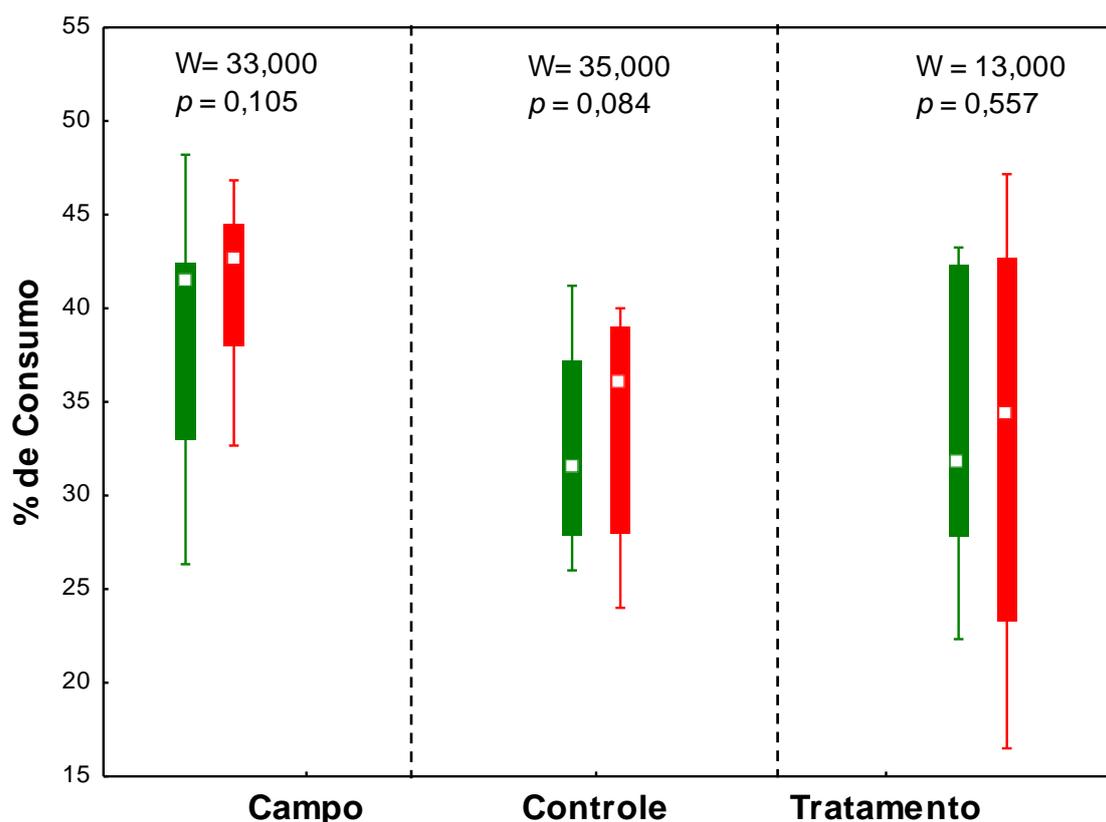
Esta característica de decaimento do %DPPH dos extratos de todos os indivíduos de *N. indica*, indica uma pré-disposição dos organismos em lidar com o estresse oxidativo, uma vez que o ambiente natural da população, uma lagoa costeira no norte do estado do Rio de Janeiro, recebe altas doses de radiação solar durante todo o ano. Além disso, a Lagoa Comprida, local de coleta dos espécimes, possui características físico-químicas peculiares, com elevadas concentrações de substâncias húmicas diluídas na água. Estas substâncias orgânicas produzidas pela decomposição de matéria orgânica de origem terrestre e lixiviadas para as lagoas, são reconhecidamente responsáveis pela produção de ERO's em plantas aquáticas (Timofeyev & Steinberg 2006, Timofeyev, *et al.* 2006, Bedulina *et. al.* 2010 ). Desta forma, é possível sugerir que a população de *N. indica* investigada nesse trabalho produz substâncias antioxidantes constitutivas com a finalidade de se proteger do estresse natural do meio.

Observa-se assim que o estresse gerado pelo aumento da radiação UV-B alterou o perfil químico dos indivíduos submetidos a cultivo, sugerindo que essas alterações químicas foram responsáveis pelo aumento da atividade antioxidante destes indivíduos. É descrito na literatura que o estresse oxidativo promovido pela radiação UV-B desencadeia cascatas de eventos relacionados ao estresse fisiológico e as respostas do vegetal ao mesmo. Destacando-se alterações quantitativas e qualitativas na produção de metabólitos secundários (Sun *et al.* 2010; Ning *et al.* 2012). Essas alterações podem mediar de forma integrada outras relações ecológicas importantes do organismo com seu meio, tendo em vista que os mesmos interagem de forma dinâmica com outros seres vivos e com os fatores físicos que os circundam, como é conceituado um ecossistema (Ricklefs 2011). Acredita-se que essa resposta integrada dos metabólitos a diversas relações ecológicas esteja relacionada ao custo metabólico para sua produção, uma vez que a produção de compostos secundários que atuam como defesa pode ser um processo muito caro energeticamente para a planta (Herman e Mattson 1992; Cronin, 2001, Cipollini, 2000, Izhaki, 2002, Anderson & Agrell, 2005; Pohnert, 2007).

A relação entre planta-herbívoros é um importante fenômeno ecológico capaz de controlar a dinâmica funcional de um ecossistema (Meloni *et al.* 2012). Neste contexto, plantas desenvolveram ao longo de sua evolução mecanismos que reduzem os ataques e os danos causados pelos herbívoros. Assim, defesas químicas são mecanismos eficazes de proteção contra a predação. Muitos estudos confirmam a existência de uma relação entre metabólitos secundários e a herbivoria mostrando que estas substâncias podem diminuir o consumo dos tecidos vegetais, minimizando os danos causados pelos herbívoros (Hay & Fenical 1988; Meyer & Paul 1992; Kubanek *et al.* 2000; Parker & Hay 2007; Kaplan *et al.* 2008; Degenhardt 2009; Barbehenn *et al.* 2011;).

Desta forma, procurou-se avaliar a resposta integrada dos metabólitos secundários produzidos pela indução da radiação UV-B e a atividade destes extratos contra a herbivoria. Assim, os extratos dos indivíduos do Campo, Controle e Tratamento foram analisados em bioensaios de preferência alimentar pelo herbívoro *Biomphalaria* sp.

Na FIGURA 35 pode-se observar a média do consumo (% de quadrados consumidos) dos indivíduos dos grupos analisados: Campo, Controle e Tratamento. Em cada grupo, notou-se que os extratos de *N. indica* não apresentaram defesas químicas contra herbivoria, pois não houve diferenças significativas entre o consumo dos alimentos com extrato e sem extrato.



**FIGURA 35:** Medianas, Média, desvios padrão, mínimo e máximo do percentual de consumo dos extratos dos indivíduos do campo (UV-Natural, n=10); Controle (Sem UV-B, n=10) e tratamento (1,93 vezes a radiação UV-B natural, n=10) pelo herbívoro *Biomphalaria* sp. Onde box verde representa o alimento sem adição do extrato e box vermelho o alimento com adição do extrato. Separações pontilhadas denotam teste de Wilcoxon para cada grupo.

Apesar da existência de trabalhos que evidenciam a resposta integrada do aumento de substâncias químicas induzidas pelo aumento da radiação UV-B e o aumento da resposta contra a herbivoria (Ballaré *et al.* 2001), os resultados deste trabalho evidenciaram que apesar de terem ocorrido alterações no perfil químico de *N. indica* em resposta ao aumento de UV-B, estas não foram suficientes para causar alterações significativas da atividade contra *Biomphalaria* sp.

Cabe ressaltar, que os ensaios ecológicos de herbivoria foram realizados somente com um organismo, o gastrópode *Biomphalaria* sp., evidenciando que contra este herbívoro, *N. indica* não apresentou defesas químicas. Porém, o efeito dessas substâncias contra a herbivoria por outros organismos é desconhecida.

Os resultados apresentados nesse trabalho demonstraram que o estresse oxidativo gerado pelo aumento da radiação UV-B não alterou a eficiência fotossintética de *N. indica*. Entretanto observaram-se alterações tanto quantitativas quanto estruturais nos perfis químicos de *N. indica*. Sugerindo que essas modificações químicas foram induzidas em resposta antioxidantes aos danos gerados pelo aumento da incidência de radiação. Entretanto, essas mudanças nos perfil químico não foram suficientes para influenciar a química defensiva na relação ecológica com o herbívoro *Biomphalaria* sp. com esta espécie de macrófita.

## 5.2. Caracterização química das substâncias bioativas em *Nymphoides indica*

Com o objetivo de se identificar os metabólitos secundários bioativos produzidos por *N. indica* o estudo químico foi conduzido com os diferentes extratos da planta preparados para este fim.

Foram obtidos quatro extratos a partir do material vegetal seco e moído. Uma parte do material vegetal foi extraída com metanol obtendo-se um extrato bruto total (**EBtotal**). A outra parte foi submetida a uma extração sequencial com hexano, acetato de etila e metanol para a separação dos metabólitos de acordo com a polaridade. Três extratos brutos foram obtidos: o extrato em hexano (**EBH**), o extrato em acetato de etila (**EBAC**) e outro em metanol (**EBM**). Na TABELA IX pode-se observar a massa e o rendimento obtido para cada extrato, sendo o extrato bruto total o que apresentou o maior rendimento.

**TABELA IX:** Massa e rendimento dos extratos brutos de *Nymphoides indica*, onde EBH= extrato bruto sequencial em hexano; EBAC= extrato bruto sequencial em acetato de etila; EBM = extrato bruto sequencial em metanol; EBtotal = extrato bruto em metanol.

<b>Extrato</b>	<b>Massa (g)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
EBtotal	9,04	30,48
EBH	11,21	1,57
EBAC	13,88	1,95
EBM	81,77	11,47

Para a identificação dos metabólitos secundários presentes nos extratos investigados nesse trabalho foi realizado um *screening* do perfil fitoquímico, utilizando a técnica de CLAE-UV-DAD. Os perfis químicos de cada extrato e as características químicas das substâncias presentes foram obtidas para as amostras.

Todos os extratos foram analisados nas mesmas condições cromatográficas para facilitar a comparação entre eles. A interpretação dos dados permitiu observar diferenças quantitativas e qualitativas dos metabólitos nos quatro extratos brutos. O extrato em hexano foi o que apresentou a menor complexidade quando comparado aos demais. Já os extratos em metanol foram os que apresentaram maior complexidade química e maior abundância de substâncias (FIGURA 36).

Assim, como demonstrado para os extratos brutos dos indivíduos do cultivo, as substâncias do **EBtotal** apresentaram espectros de UV característicos de substâncias fenólicas. Algumas das substâncias fenólicas comumente encontradas em plantas são vendidas no mercado como padrões com grau analítico para a utilização em metodologias utilizando técnicas cromatográficas. Sendo assim, na tentativa de se identificarem as substâncias fenólicas presentes nos extratos, 13 padrões comerciais foram analisados nas mesmas condições dos extratos (TABELA X). Cinco substâncias estruturalmente correlacionadas com os padrões foram identificadas: Floroglucinol (**1**), Ácido Clorogênico (**2**), (-)- Epicatequina (**3**) Quercetina (**4**) e Ácido Ferrúlico (**5**) (FIGURA 36 A).

Foram observadas pequenas variações entre os tempos de retenção das substâncias puras e das substâncias presentes nos extratos, além de pequenas modificações nos valores dos comprimentos de onda das absorções do espectro de UV de alguns metabólitos. Isso pode ter ocorrido devido às interações destas substâncias com outras substâncias presentes no extrato bruto ou mesmo pequenas modificações estruturais. Entretanto, os padrões dos espectros de absorção possibilitaram a identificação dos esqueletos das substâncias fenólicas presentes nas amostras.

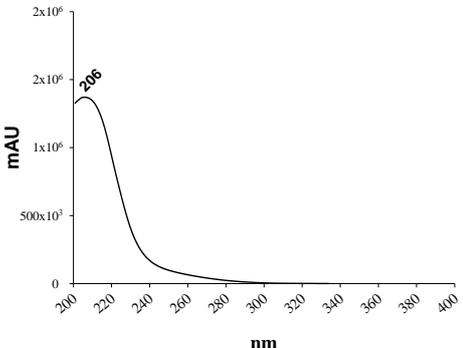
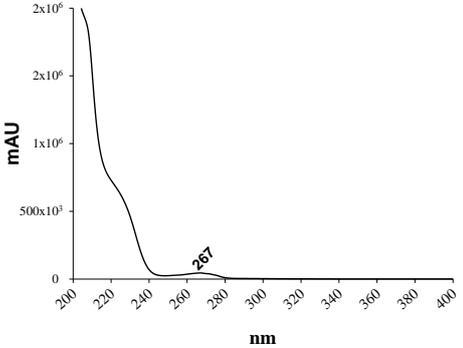
O perfil químico do extrato sequencial em metanol (**EBM**) foi similar ao do **EBtotal**, com a presença de substâncias com correlação estrutural ao Floroglucinol (**1**), Ácido Clorogênico (**2**), Quercetina (**4**) e Ácido Ferrúlico (**5**) (FIGURA 36 B).

O extrato em acetato de etila (**EBAC**) apresentou substâncias com uma faixa de média polaridade a polar. Com a presença de Floroglucinol (**1**) também identificada no extrato **EBtotal** e **EBM**. A fórmula estrutural da substância majoritária na fração, com  $T_R$  36,0 minutos (FIGURA 37 C) foi sugerida de acordo com a comparação dos dados de UV com a literatura (UV  $\lambda_{max}$  (MeOH) : 254, 272, 301 e 374 nm, Marhfam &

Thomas 1970). O metabólito foi sugerido como estruturalmente correlacionado ao flavonol com esqueleto miricetina (FIGURA 36 - 6).

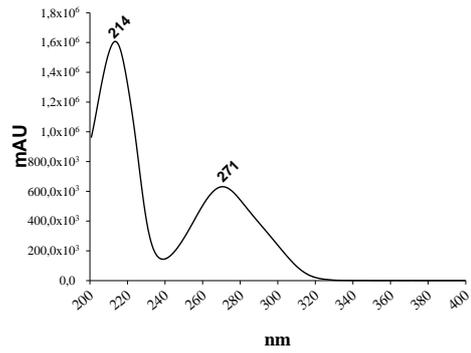
Já o extrato em hexano apresentou o perfil químico mais diferente entre todos os extratos, sendo caracterizado pela presença de substâncias apolares (FIGURA 36 D).

**TABELA X:** Padrões comerciais com seus respectivos tempos de retenção em minutos e espectro de UV. A presença e a ausência das substâncias no extrato em metanol (EBtotal) de *Nymphoides indica* foram representadas por + e –, respectivamente.

Padrão Comercial	Tempo de retenção (min)	Espectro de UV do padrão ( $\lambda$ )	Presença da substância no extrato bruto
Ácido Fumárico	10,33		-
Floroglucinol	11,34		+

Ácido Gálico

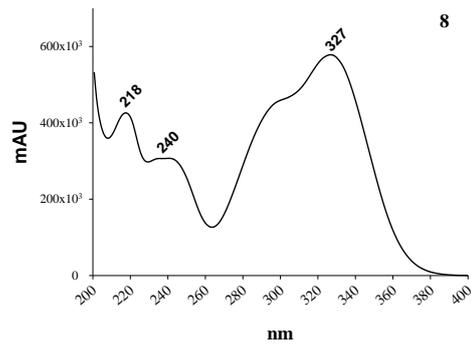
12,86



-

Ácido Clorogênico

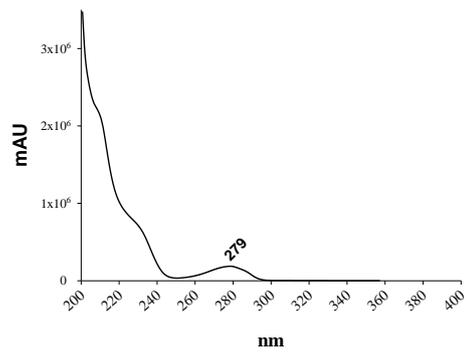
19,22



+

(-) – Epicatequina

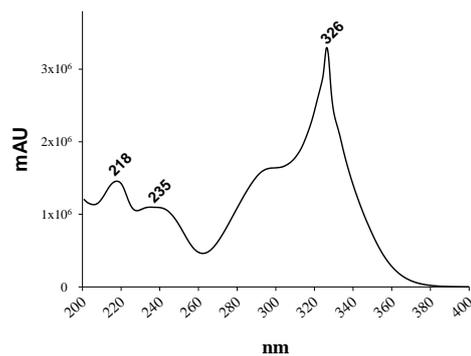
21,29



+

Ácido Cafeico

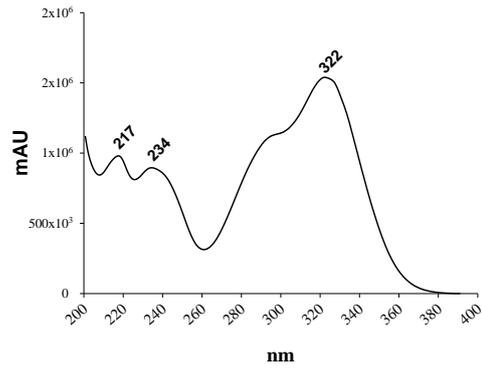
21,89



-

Ácido Ferrúlico

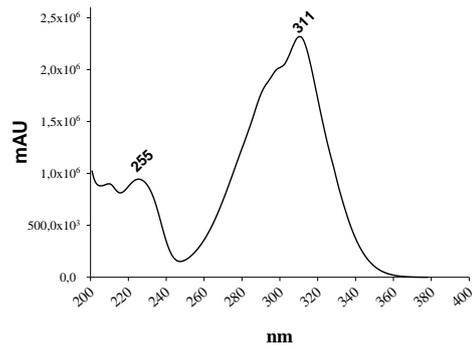
25,59



+

Ácido *p*-cumárico

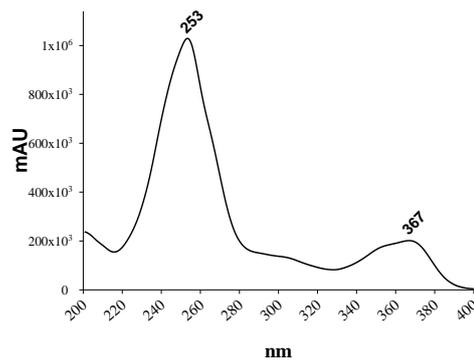
25,95



-

Ácido Elágico

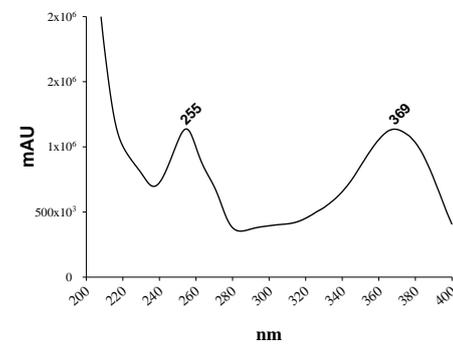
32,26



-

Quercetina

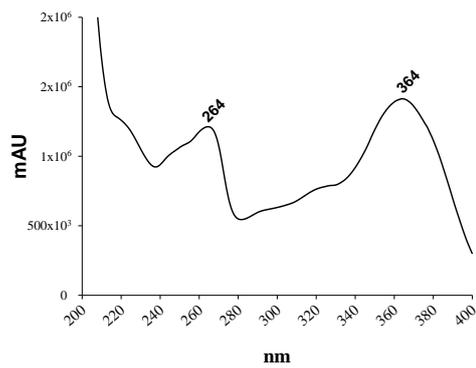
36,19



+

Kaempferol

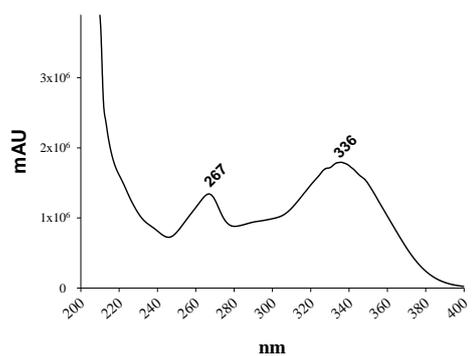
39,27



-

Apigenina

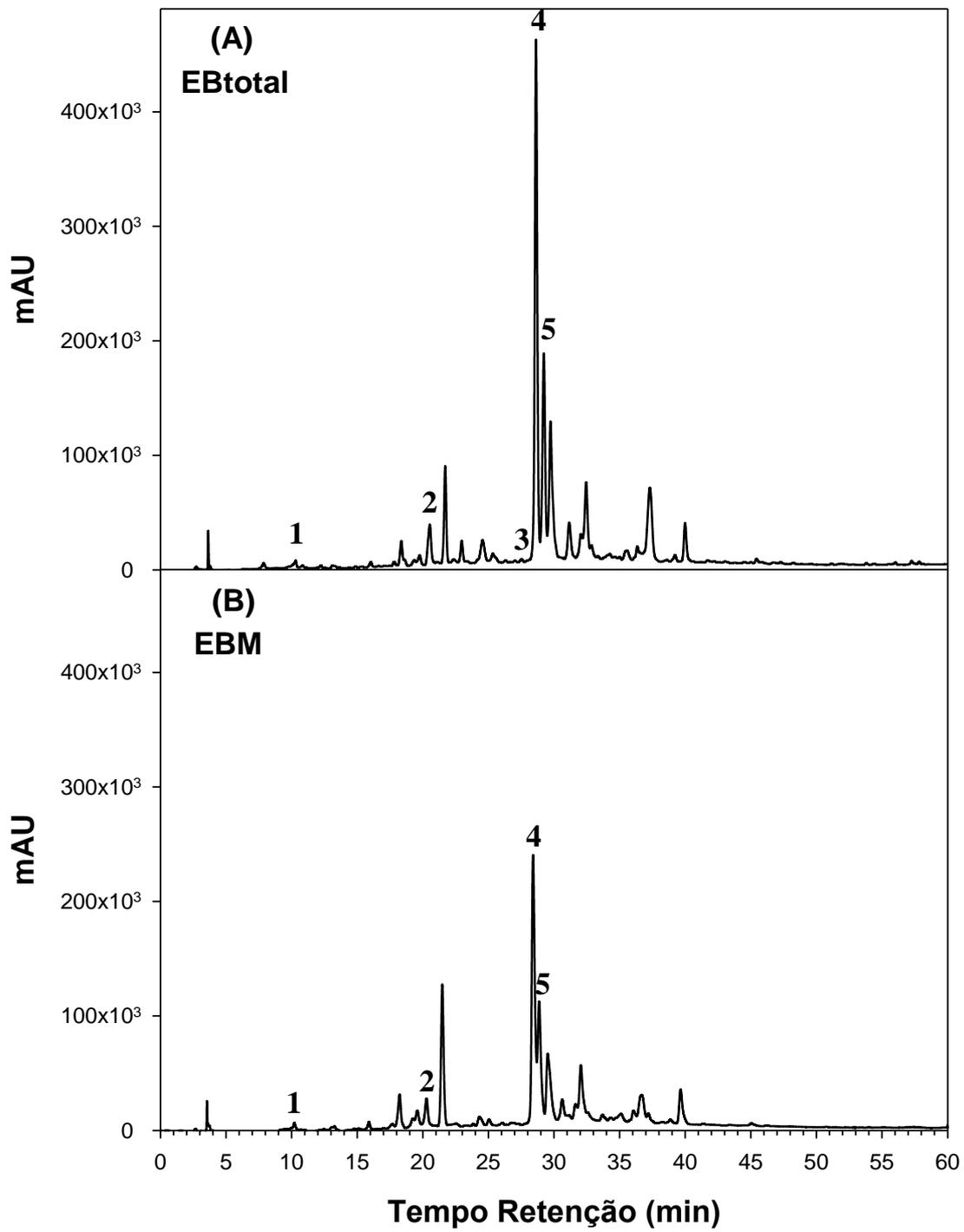
40,00

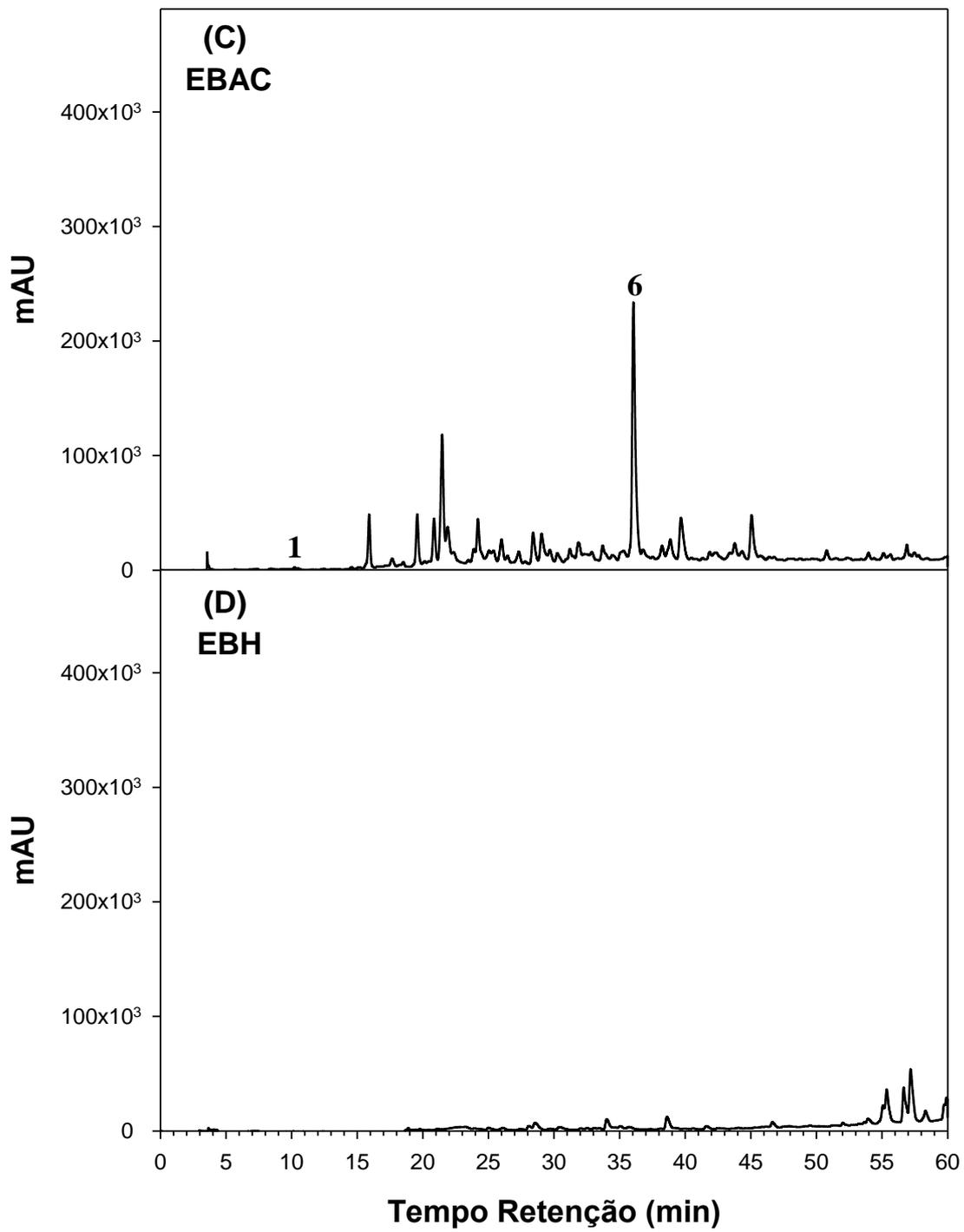


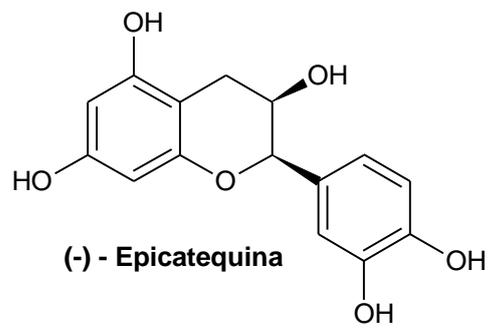
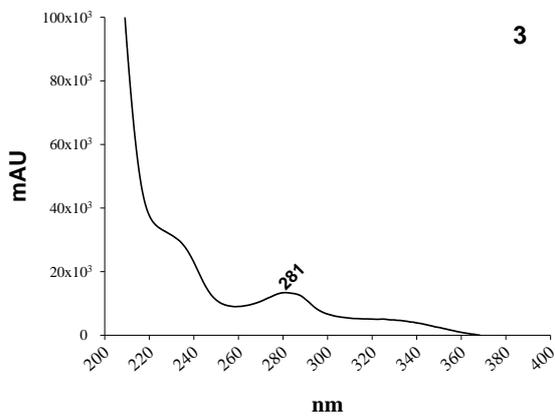
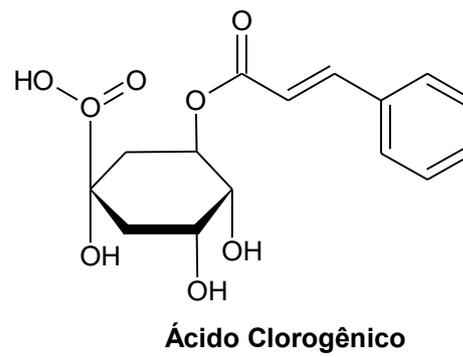
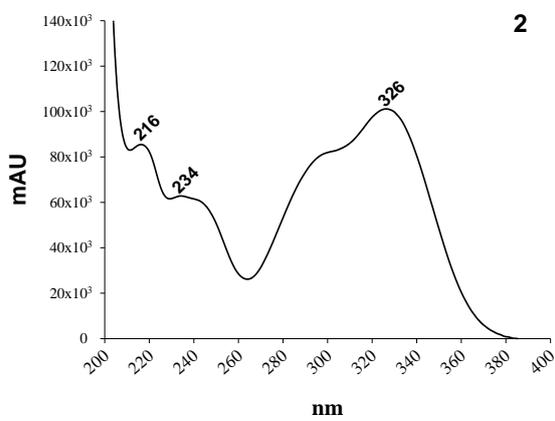
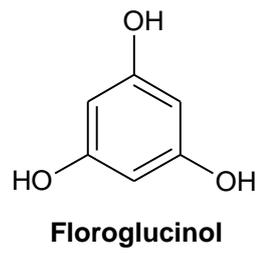
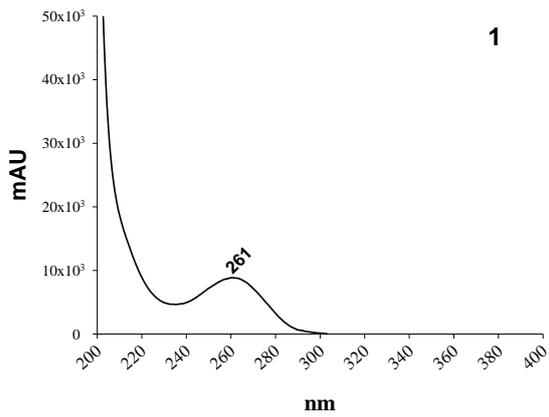
-

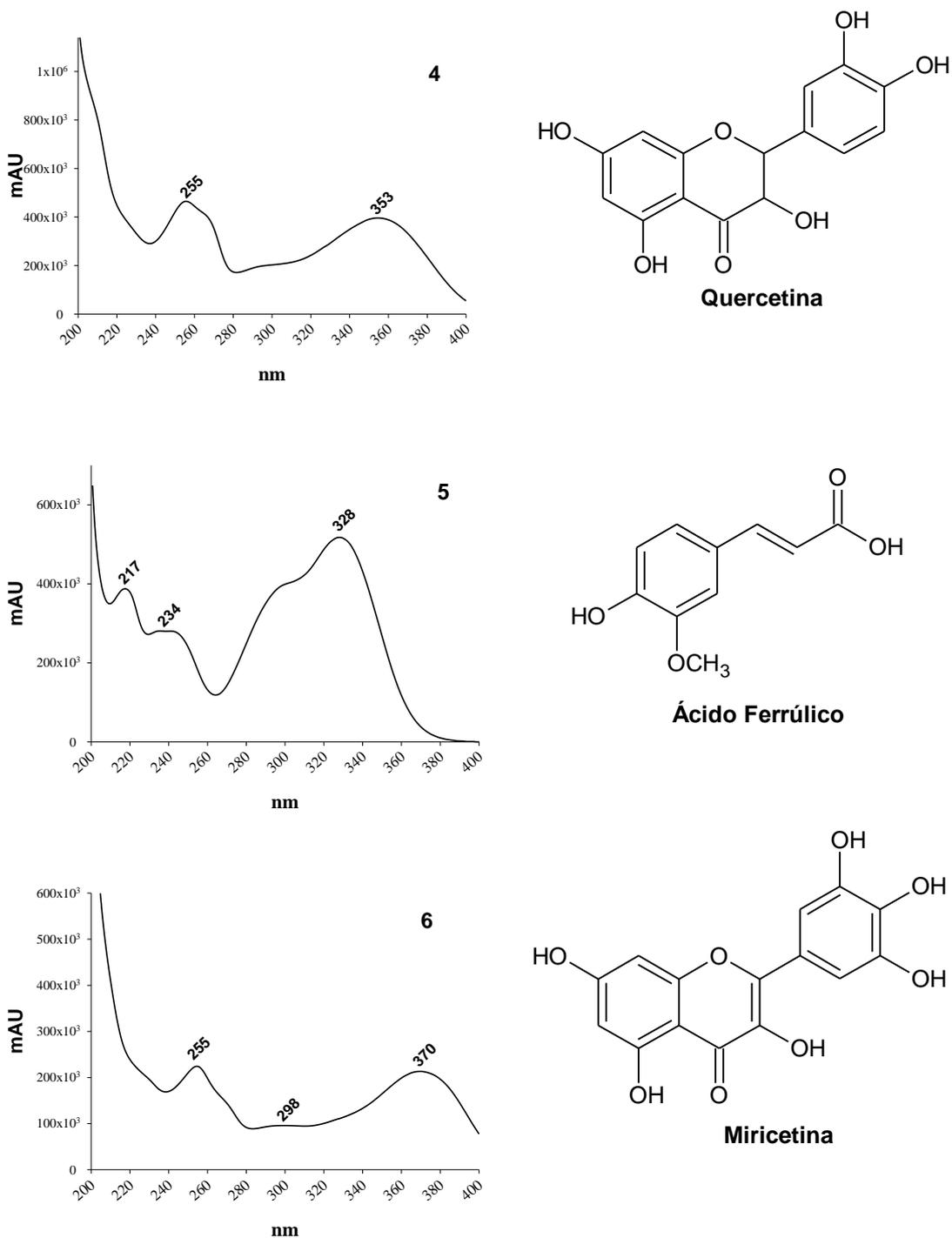
Ácido alfa-  
cetoglutárico

-









**FIGURA 36:** Cromatogramas dos extratos brutos de *N. indica* destacando a presença nos extratos das substâncias sugeridas. (A) Extrato bruto total em metanol. (B) Extrato bruto sequencial metanol. (C) Extrato bruto sequencial em acetato. (D) Extrato bruto sequencial metanol. Com destaque para as substâncias estruturalmente sugeridas seguida do seu espectro de UV. **1:** Floroglucinol; **2:** Ácido Clorogênico; **3:** (-) – Epicatequina; **4:** Quercetina; **5:** Ácido Ferrúlico e **6:** Miricetina

Essas diferenças químicas entre os extratos foram refletida também na atividade antioxidante dos mesmos. A TABELA XI mostra que os valores EC<sub>50</sub> de todos os extratos foram maiores do que o valor encontrado para o BHT (1,51 ± 0,22 g BHT / g DPPH). No entanto, é importante salientar que todas as amostras são misturas complexas e que estas costumam fornecer resultados de atividades inferiores ao de amostras de substâncias puras.

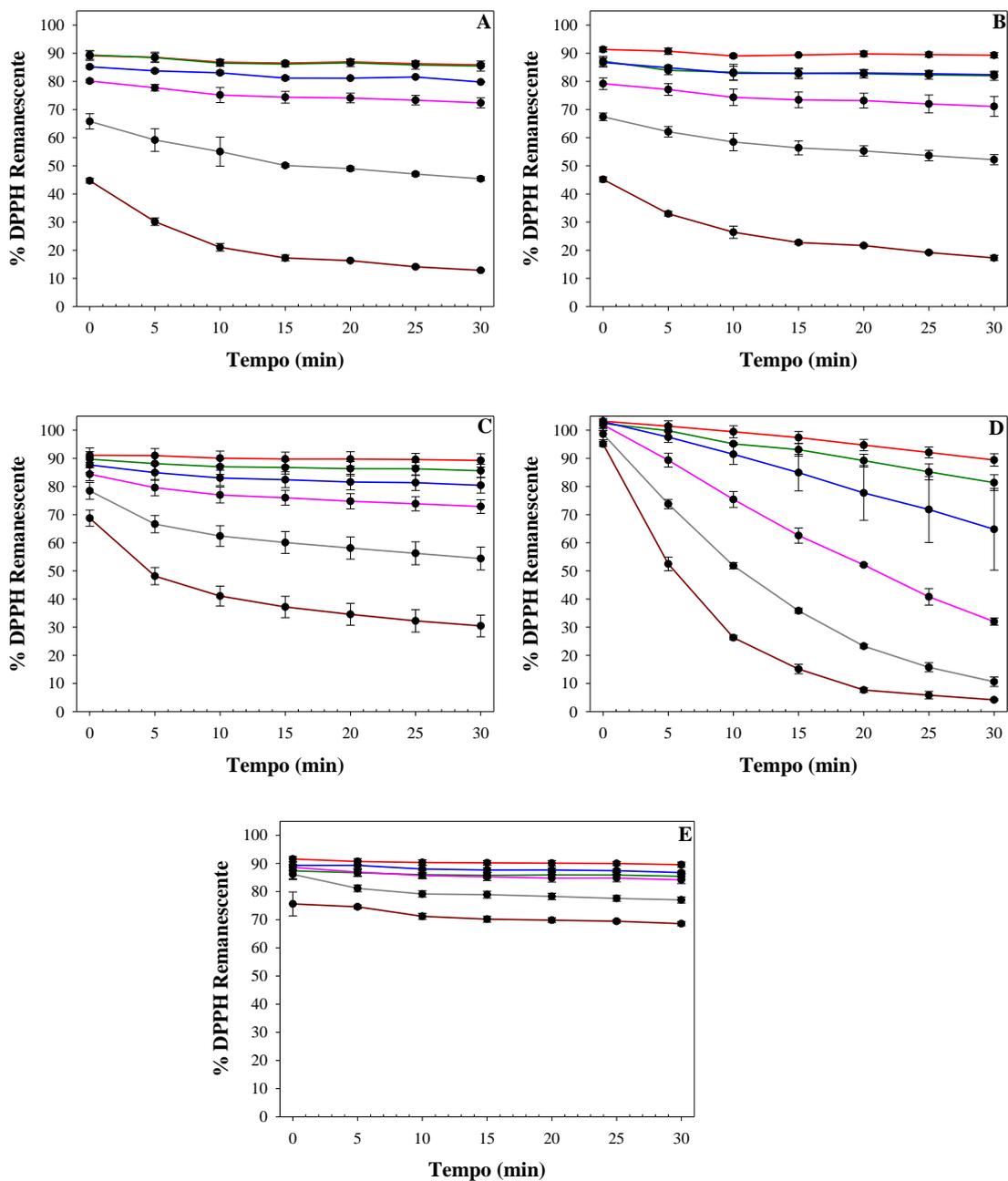
Analisando somente os resultados dos extratos, observou-se que o extrato em hexano não apresentou atividade antioxidante. Já o extrato em metanol (**EBM**) foi o que apresentou a maior atividade dentre todos os extratos testados. Estes resultados evidenciaram que as substâncias fenólicas são responsáveis pela atividade antioxidante, uma vez que extratos ativos (**EBAC**, **EBM**, **EBtotal**), como já descrito, apresentam como maiores constituintes estas substâncias.

**TABELA XI:** Médias e Erro padrão de EC<sub>50</sub> (concentração da amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH) dos extratos brutos de *Nymphoides indica* expressa em g de amostra/g DPPH. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada extrato. EBH= extrato bruto sequencial em hexano; EBAC= extrato bruto sequencial em acetato de etila; EBM = extrato bruto sequencial em metanol; EBtotal = extrato bruto em metanol. BHT foi utilizado como controle positivo no ensaio antioxidante. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05) no teste post hoc de Tukey. ANOVA: F= 405,844, p < 0,001.

<b>EXTRATOS</b>	<b>EC50 (g amostra/ g DPPH)</b>
EBM	6,81 ± 0,09 <sup>x</sup>
EBtotal	7,61 ± 0,13 <sup>y</sup>
EBAC	7,92 ± 0,13 <sup>y</sup>
BHT	1,51 ± 0,22 <sup>z</sup>
EBH	(-)

(-) atividade não detectada

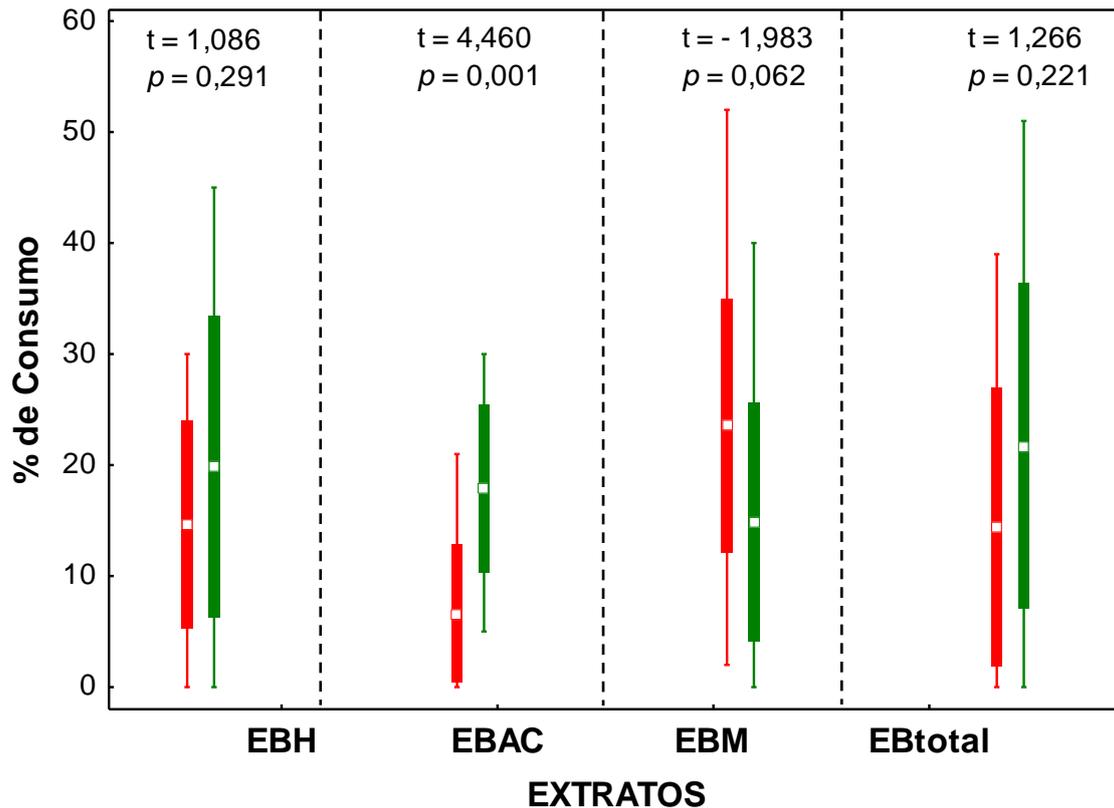
A diferença química dos extratos também foi refletida no comportamento cinético dos extratos, através da curva de dose-resposta relativa ao decréscimo da porcentagem de DPPH remanescente (% DPPHrem) no meio reacional, em função do tempo (min). Observou-se que os extratos mostraram uma resposta quase instantânea para cada concentração testada, pois a % DPPHrem no início da reação manteve-se praticamente constante durante os 30 minutos da reação (FIGURA 37). Entretanto, o EBM foi o que apresentou menores % DPPHrem em todas as concentrações testadas, diferentemente do EBH que não apresentou decaimento do DPPH durante todo o tempo reacional. Esses dados sugerem que as substâncias fenólicas presentes no extrato em metanol são capazes de neutralizar rapidamente e com mais eficácia os radicais livres presentes no meio reacional.



**FIGURA 37** Média e desvio da cinética de reação de (A) EBtotal (extrato bruto em metanol) com DPPH; (B) EBM (extrato bruto em metanol) com DPPH; (C) EBAC (extrato bruto em acetato de etila) com DPPH, (D) BHT com DPPH e (E) EBH (extrato bruto em hexano) com DPPH. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Linha vermelha representa a concentração de 5 µg/mL; a linha verde representa a concentração de 10 µg/mL; a linha azul representa a concentração de 25 µg/mL; a linha rosa representa a concentração de 50µg/mL; a linha cinza representa a concentração de 125 µg/mL e a a linha marrom representa a concentração de 250 µg/mL.

Metabólitos secundários são importantes substâncias que mediam a relação ecológica entre herbívoros e plantas. A caracterização destas moléculas ativas é crucial para o entendimento deste processo ecológico e da dinâmica dos ecossistemas. Desta forma, este trabalho teve como objetivo localizar e caracterizar as substâncias que apresentaram atividade contra a herbivoria em *N. indica*, através de bioensaios ecológicos analisando o consumo preferencial por *Biomphalaria* sp. por alimentos artificiais contendo os extratos brutos e sem o extrato bruto.

A FIGURA 38 apresenta o gráfico do % de consumo para os extratos analisados. Quando analisado o percentual de consumo dos dois alimentos oferecidos simultaneamente ao herbívoro, os alimentos contendo extratos brutos EBH, EBM e EBtotal não foram eficientes como defesa frente ao herbívoro *Biomphalaria* sp. ( $p < 0,05$ , teste de Wilcoxon para amostras pareadas – alimento com extrato e sem extrato). Entretanto, evidencia-se que as substâncias presentes no extrato bruto em acetato (EBAC) são capazes de inibir significativamente a herbivoria ( $p = 0,001$ ).



**FIGURA 38:** Média, desvios padrão, mínimo e máximo do percentual de consumo dos extratos brutos sequencias em hexano, acetato de etila e metanol (EBH, EBAC e EBM respectivamente) e do extrato bruto total em metanol (EBtotal). Onde o box verde representa o alimento sem adição do extrato (controle) e box vermelho o alimento com adição do extrato (tratamento). Separações pontilhadas denotam teste t pareado individual para cada extrato. N=30 para cada extrato.

O extrato total em metanol não apresentou atividade contra a herbivoria, assim como os resultados obtidos para todos os extratos dos indivíduos do cultivo e do campo. Entretanto, quando os extratos das plantas obtidos de forma sequencial foram analisados, o extrato EBAC foi ativo. Estes resultados demonstram que apesar do extrato total não ser ativo, *N. indica* produz substâncias que atuam como defesa contra a herbivoria por *Biomphalaria* sp.. Essas substâncias, presentes provavelmente em baixas concentrações no EBtotal, foram evidenciadas no extrato em acetato. Um processo de extração sequencial permite o fracionamento dos constituintes de uma planta de acordo

com a polaridade, simplificando as misturas obtidas quando comparadas a um extrato em metanol, que tem como principal característica constituintes de todas as faixas de polaridade.

Sendo assim, foi sugerida neste trabalho a presença de 6 esqueletos fenólicos nos extratos de *N. indica*, e variações quantitativas e qualitativas destes e de outros metabólitos nestes extratos. Entretanto é necessário trabalhos mais aprofundados de isolamento e elucidação estrutural para determinação dos metabólitos de *N. indica*.

O fracionamento inicial realizado pela extração sequencial permitiu localizar as principais substâncias bioativas antioxidantes (presentes no EBM) e contra a herbivoria (presentes no EBAC). Sugerindo que os fenólicos antioxidantes presentes nos extratos bruto em metanol não são responsáveis pela química defensiva em *N. indica*.



## **CONCLUSÃO**

## 6. CONCLUSÃO

---

- A eficiência fotossintética de *N. indica* não foi reduzida pelo aumento do nível de radiação de UV-B em aproximadamente duas vezes acima da radiação natural.
- A radiação UV-B induziu alterações nos perfis químicos de *N. indica*. Variações qualitativas e quantitativas foram observadas entre os extratos.
- Alterações de características estruturais de algumas substâncias e a produção elevada de flavonoides foram respostas observadas ao estímulo com UV-B;
- Sugere-se que a proteção contra os danos gerados pela radiação UV-B seja atribuída a presença do flavonol com esqueleto relacionado ao da quecetina;
- O estresse gerado pela radiação UV-B aumentou a atividade antioxidante em *N. indica*;
- A alteração do perfil químico induzida pela radiação UV-B não causou alterações significativas na produção de defesas químicas contra a herbivoria no extrato bruto de *N. indica*;
- Sugere-se a presença de substâncias com estruturas relacionados a Floroglucinol, Ácido Clorogênico, Quercetina e Ácido Ferrúlico;
- A presença de um flavonol com esqueleto relacionado ao da miricetina foi sugerida no extrato em acetato;
- A atividade antioxidante de *N. indica* foi relacionada principalmente às substâncias fenólicas nos extratos;
- As defesas químicas contra a herbivoria de *N. indica* foram atribuídas às substâncias presentes no extrato bruto em acetato de etila.

Sendo assim, diferente dos trabalhos na literatura que descrevem que níveis elevados de radiação UV-B geram danos no fotossistema II e consequentemente diminuem a eficiência fotossintética em plantas, os resultados observados neste trabalho evidenciam que o estresse oxidativo desencadeado pelo aumento da radiação UV-B não reduziu a eficiência fotossintética de *N. indica*. Entretanto, corroborando a hipótese, observa-se que a radiação UV-B foi responsável por variações estruturais e quantitativas na produção de metabólitos secundários nesta espécie. Estas alterações podem ter sido responsáveis pelo aumento da atividade antioxidante observada em indivíduos expostos à elevada radiação UV-B. Todavia, contrariando o que é apresentado na literatura, que mostra que o aumento da radiação influencia na relação de herbivoria, diminuindo ou aumentando o consumo. as respostas químicas ao aumento da radiação UV-B na macrófita aquática *N. indica* não foram suficientes para alterar as respostas de defesas químicas contra a herbivoria.

Em relação a caracterização química das substâncias bioativas, corroborando o que já foi descrito em relação a produção de flavonoides para *N. indica*, sugere-se neste trabalho, a presença de substâncias fenólicas para a espécie, entre elas ácidos fenólicos e flavonoides. Observa-se que estas substâncias fenólicas podem ser as principais substâncias antioxidantes de *N. indica*. Já as substâncias que apresentam defesas químicas contra herbivoria foram encontradas no extrato em acetato de etila. Entretanto é necessário trabalhos mais aprofundados de isolamento e elucidação estrutural para determinação dos metabólitos bioativos de *N. indica*.



# **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## **7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- AGATIA, G.; AZZARELLO, E.; POLLASTRI, Z. & TATTINI, M. 2012. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science*, 196, 67–76.
- ALBERTONI, E.F.; PRELLVITZ, L.J. & PALMA-SILVA, C. 2007. Macroinvertebrate fauna associated with *Pistia stratiotes* and *Nymphoides indica* in subtropical lakes (south Brazil). *Brazilian Journal of Biology*, 67(3), 499-507.
- AL-GUBORY, K. H.; FOWLERB, P. A. & GARRELC, C. 2010. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42, 1634–1650.
- ALVES, M. N. 2003. Alocação de alcalóides tropânicos em *Brugmansia suaveolens* (Solanaceae). Tese apresentada para obtenção do Título de Doutor em Biologia Vegetal. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- AMSLER, C. D. 2001. Induced defenses in macroalgae: the herbivore makes a difference. *Journal of Phycology*, 37, 353-356.
- ANDERSON, L.O. & AMARAL, M.C.E. 2005. Menyanthaceae. In: Wanderley, M.G.L. et al. (eds.). Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo, FAPESP/Rima, São Paulo. 277-278.
- ANDERSON, P. & AGRELL, J. 2005. Within-plant variation in induced defence in developing leaves of cotton plants. *Oecologia*, 144, 427–434.
- ARAÚJO, D.S.D.; SCARANO, F.R.; DE SÁ, C.F.C.; KURTZ, B.C.; ZALUAR, H.L.T.; MONTEZUMA, R.C. M. & OLIVEIRA, R.C. 1998. Comunidades vegetais do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba. In: Ecologia das Lagoas Costeiras do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba e do Município de Macaé (RJ). Esteves, F. A. (Ed). Editora UFRJ. RJ, 39 – 62.
- ARAÚJO, F. O. 2011. Efeitos da radiação UV-B no crescimento, conteúdo pigmentar e fotossíntese de *Gracilaria caudata* (Gracilariales, Rhodophyta). São Paulo: USP. 29 p. Dissertação (Mestrato). Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (Botânica).

- ARAVIND, P. & PRASAD M.N.V. 2004. Zinc protects chloroplasts and associated photochemical functions in cadmium exposed *Ceratophyllum demersum* L., a freshwater macrophyte. *Plant Science*, 166, 1321–1327.
- ARRIGONI, O.; DE GARA, L.; TOMMASI, F. & LISO, R. 1992. Changes in the ascorbate system during seed development of *Vicia faba* L. *Plant Physiology*, 99 (1), 235-238.
- BALL, M.C.; BUTTERWORTH, J.A.; RODEN, J.S.; CHRISTIAN, R. & EGERTON, J. J. G. 1994. Applications of chlorophyll fluorescence to forest ecology. *Australian Journal of Plant Physiology*, 22, 311-319.
- BALLARÉ, C.L.; ROUSSEAU, M.C.; SEARLES, P.S.; ZALLER, J.G.; GIORDANO, C.V; ROBSON, T.M.; CALDWELL, M.M.; SALA, O.E. & SCOPEL, A.L. 2001. Impacts of solar ultraviolet-B radiation on terrestrial ecosystems of Tierra del Fuego (southern Argentina): An overview of recent progress. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 62, 67–77.
- BARBEHENN, R.V. & CONSTABEL, C.P. 2011. Tannins in plant–herbivore interactions. *Phytochemistry*, 72, 1551–1565.
- BASSMAN, J. H. 2004. Ecosystem consequences of enhanced solar ultraviolet radiation: secondary plant metabolites as mediators of multiple trophic interactions in terrestrial plant communities. *Photochemistry and Photobiology*, 79(5), 382–398.
- BAUER, N.; BLASCHKE, U.; BEUTLER, E.; GROSS, E. M.; JENETT-SIEMS, K.; SIEMS, K. & HILT, S. 2009. Seasonal and interannual dynamics of polyphenols in *Myriophyllum verticillatum* and their allelopathic activity on *Anabaena variabilis*. *Aquatic Botany*, 91, 110–116.
- BECKMANN, M.; HOCK, M.; BRUELHEIDE, H. & ERFMEIER, A. 2012: The role of UV-B radiation in the invasion of *Hieracium pilosella* - a comparison of German and New Zealand plants. *Environmental and Experimental Botany*, 75, 173-180.
- BEDNAREK, P. 2012. Chemical warfare or modulators of defence responses – the function of secondary metabolites in plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 15, 407–414.

- BEDULINA, D.S.; ZIMMER, M. & TIMOFEYEV, M. A. 2010. Sub-littoral and supra-littoral amphipods respond differently to acute thermal stress. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 155, 413–418.
- BJERKE, J.W.; GWYNN-JONES, D. & CALLAGHAN, T.V. 2005. Effects of enhanced UV-B radiation in the field on the concentration of phenolics and chlorophyll fluorescence in two boreal and arctic–alpine lichens. *Environmental and Experimental Botany*, 53, 139–149.
- BJORKMAN, O & DEMMIG, B. 1987. Photon Yield of evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at among vascular plants of diverse origins. *Plant*, 170: 489-504.
- BLOKHINA, O.; VIROLAINEN E.; & FAGERSTEDT K. V. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot (Lond)*, 91, 179–194.
- BOHM, B.A.; NICHOLLS, K.W. & ORNDUFF, R. 1986. Flavonoids of the Menyanthaceae: intra- and interfamilial relationships. *American Journal of Botany*, 73(2), 204-213.
- BOLSER, R.C. & HAY, M. E. 1998. A field test of inducible resistance to specialist and generalist herbivores using the water lily *Nuphar luteum*. *Oecologia*, 116, 143 – 153.
- BORNMAN, J.F. 1989. Target sites of UV-B radiation in photosynthesis of higher plants. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B : Biology*, 4, 145 – 158.
- BOUDET, A.L. 2007. Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry*, 68, 2722–2735.
- BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S. & GONTIER, E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161, 839–851.
- BOVE, C.P. & PAZ, J. 2009. Guia de Campo das Plantas Aquáticas do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba. 1ed. Rio de Janeiro: Editora do Museu Nacional. p 176.

- BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28, 25-30.
- CAMARERO, J.J.; OLANO, J.M.; ARROYO ALFARO, S.J.; FERNANDEZ-MARIN, B.; BECERRIL, J.M. & GARCIA-PLAZAOLA, J.I. 2012. Photoprotection mechanisms in *Quercus ilex* under contrasting climatic conditions. *Flora*, 207, 557– 564.
- CANGIANO, T.; DELLAGRECA, M.; FIORENTINO, A; ISIDORI, M.; MÔNACO, P. & ZARRELLI, A. 2001. Lactone diterpenes from the aquatic plant *Potamogeton natans*. *Phytochemistry*, 56 (5), 469-473.
- CASAROLI, D.; FAGAN, E.D.; SIMON, J.; MEDEIROS, S.P.; MANFRON, P.A.; NETO, D.D.; LIER, Q. J.; MÜLLER, L. & MARTIN, T. N. 2007. Radiação solar e aspectos fisiológicos na cultura de soja – uma revisão. *Revista da FZVA, Uruguaiana*, 14 (2), 102-120.
- CHANDRA, S. & MEJIA, E.G. 2004. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3583-3589.
- CHENG, X.M.; ZHAO, T.; YANG, T.; WANG, C.H.; BLIGH, S.W. & WANG Z.T. 2010. HPLC fingerprints combined with principal component analysis, hierarchical cluster analysis and linear discriminant analysis for the classification and differentiation of *Peganum* sp. indigenous to China. *Phytochem Anal*, 21(3), 279-89.
- CHOI, C.; BAREISS, C.; WALENCIAK, O. & GROSS, E. M. 2002. Impact of polyphenols on growth of the aquatic herbivore *Acentria ephemerella*. *Journal of Chemical Ecology*, 28 (11), 2245-2256.
- CHOUDHARY, M.I.; NAHEED, N.; ABBASKHAN, A.; MUSHARRAF, S.G.; SIDDIQUI, H. & RAHMAN, A. 2008. Phenolic and other constituents of fresh water fern *Salvinia molesta*. *Phytochemistry* 69, 1018–1023.
- COE, F.G. & ANDERSON, G.J. 2005. Snakebite ethnopharmacopoeia of eastern Nicaragua. *Journal of Ethnopharmacology*, 96, 303–323.
- COSTA, H.; GALLEGGO, S.M. & TOMARO, M.L. 2002. Effect of UV-B radiation on antioxidant defense system in sunflower cotyledons. *Plant Science*, 162, 939–945.

- COTA, B. B.; OLIVEIRA, A. B.; GUIMARÃES K. G.; MENDONÇA M. P. & SOUZA - FILHO J. D., BRAGA F. C. 2004. Chemistry and antifungal activity of *Xyris* species (Xyridaceae): a new anthraquinone from *Xyris pilosa*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32, 391–397.
- CRONIN, G. 2001. Resource allocation in seaweed and marine invertebrates: Chemical defense patterns in relation to defense theories. In: McClintock, J. B. & Baker, B. J. (eds.) *Marine Chemical Ecology*. CRC Press, Boca Raton, p. 325-353.
- CRONIN, G., HAY, M.E. 1996. Within plant variation in seaweed palatability and chemical defenses: optimal defense theory *versus* the growth differentiation balance hypothesis. *Oecologia*, 105, 361–368.
- CRONIN, G.; LODGE, D.M.; HAY, M.E.; MILLER, M.; HILL, A.M.; HORVATH, T.; BOLSER, R.C.; LINDQUIST, N. & WAHL, M. 2002. Crayfish feeding preferences for freshwater macrophytes: the influence of plant structure and chemistry. *Journal of Crustacean Biology*, 22(4), 708–718.
- DAMTOFT, S.; FRANZYK, H. & JENSEN, S. R. 1994. Fontanesioside and 5-hydroxysecologanol from *Fontanesia phillyreoides* *Phytochemistry*, 33(3), 705-711.
- DEL – CLARO, K. & TOREZAN – SILINGARD, L. M. 2011. *Ecologia das Interações Plantas-Animais: Uma Abordagem Ecológico-Evolutiva*. 1ª ed. Editora: Technical Books Editora, p 333.
- DEWICK, P.M. 2002. *Medicinal Natural Products – A Biosynthetic Approach*. West Sussex: John Wiley & Sons. p 507.
- DUAN, X.J.; ZHANG, W.W.; LI, X.M. & WANG, B.G. 2006. Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. *Food Chemistry*, 95, 37-43.
- DUARTE, H.M.; GEBLER, A.; SCARANO, F.R.; FRANCO, A.C.; MATTOS, A.E.; NAHMB, M.; RENNENBERG, H.; RODRIGUES, P.J.F.P.; ZALUAR, H.L.T.; LÜTTGE, U. Ecophysiology of six selected shrub species in different plant communities at the periphery of the Atlantic Forest of SE-Brazil. *Flora*, 200, 456–476.

- DUARTE, M. C.; LEME, E. E.; DELARMELINA C.; SOARES, A. A.; FIGUEIRA, G. M. & SARTORATTO, A. 2007. Activity of essential oils from brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *Journal of ethnopharmacology*, 111(2),197-120.
- EL-BELTAGI, H. S.; AHMEDA, K. O. & EL-DESOUKY, W. 2011. Effect of low doses  $\gamma$ -irradiation on oxidative stress and secondary metabolites production of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) callus culture. *Radiation Physics and Chemistry*, 80, 968–976.
- ELGER, A.; BARRAT-SEGRETAIN, M. H. & WILLBY N. J. 2006. Seasonal variability in the palatability of freshwater macrophytes: a case study. *Hydrobiologia*, 570, 89–93.
- ESTEVEES, F.A. Fundamentos de Limnologia. 1998. 2ª ed. Editora Interciência. Rio de Janeiro, RJ. p 464.
- FABÓN, G.; MARTÍNEZ-ABAIGAR, J.; TOMÁS, R. & NÚÑEZ-OLIVERA E. 2010. Dynamic response of UV-absorbing compounds, quantum yield and the xanthophyll cycle to diel changes in UV-B and photosynthetic radiations in an aquatic liverwort. *Journal of Plant Physiology*, 169, 20– 26.
- FARJALLA, V. F.; AMADO, A. M.; LAQUE, T.; FARIA, B. M. & ESTEVES, F. A. 2004. O estado da arte e perspectiva do estudo das bactérias planctônicas nas lagoas da restinga de Jurubatiba. In: Pesquisa de longa duração na Restinga de Jurubatiba. Ecologia, História Natural e Conservação. Rocha, C. F. R. D.; Esteves, F. A. Scarano, F. R. (Ed). São Carlos: RiMa, 255 - 272.
- GARCEZ, F.R.; GARCEZ, W.S.; HAMERSKI, L. & MIGUITA, C.H. 2009. Fenilpropanóides e outros constituintes bioativos de *Nectandra megalotamica*. *Quimica Nova*, 32(2), 407-411.
- GAUTAM, R.; SAKLANI, A. & JACHAK, S.M. 2007. Indian medicinal plants as a source of antimycobacterial agents. *Journal of Ethnopharmacology*, 110, 200–234.
- GERM, M.; MAZEJA, Z.; GABERSCIKA, A. & HÄDER, D. -P. The influence of enhanced UV-B radiation on *Batrachium trichophyllum* and *Potamogeton alpinus* — aquatic macrophytes with amphibious character. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 66, 37–46.

- GIANOLI, E.; S. SENDOYA; F. VARGAS; P. MEJÍA; R. JAFFÉ; M. RODRÍGUEZ & A. GUTIÉRREZ. 2008. Patterns of *Azteca* ants defence of *Cecropia* trees in a tropical rainforest: support for optimal defence theory. *Ecological Research*, 23, 905-908.
- GILL, S. S. & TUTEJA, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 909 – 930.
- GLOMSKI L.; A.M.; WOOD, K.V.; NICHOLSON, R.L. & LEMBI, C.A. 2002. The search for exudates from *Eurasian watermilfoil* and *Hydrilla*. *Journal of Aquatic Plant Management*, 40, 17-22.
- GOBBO-NETO, L.& LOPES, N. P. 2006. Plantas Medicinais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários. *Química Nova*, 30 (2), 374-381.
- GODIN-BEEKMANN, S. & NAIR, P. J. 2012. Sensitivity of stratospheric ozone lidar measurements to a change in ozone absorption cross-sections. *Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer*, 113, 1317–1321.
- GODIN-BEEKMANN, S. 2010. Spatial observation of the ozone layer. *Comptes Rendus Geoscience*, 342, 339–348.
- GRAHAM, T.L. 1998. Flavonoid and flavonol glycoside metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 36 (2), 135-144.
- GUTBRODT, B.; MODY, K.; WITTEWER, R. & DORN, S. 2011. Within-plant distribution of induced resistance in apple seedlings: rapid acropetal and delayed basipetal responses. *Planta*, 233, 1199–1207.
- HÄDER, D. –P.; KUMAR, H. D.; SMITH, R. C. & WORREST, R. C. 1998. Effects on aquatic ecosystems. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 46, 53-68.
- HANELT, D. HAWES, I. & RAE, R. 2006. Reduction of UV-B radiation causes an enhancement of photoinhibition in high light stressed aquatic plants from New Zealand lakes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 84, 89–102.
- HANELT, D.; HAWES, I. & RAE, R. 2006. Reduction of UV-B radiation causes an enhancement of photoinhibition in high light stressed aquatic plants from New Zealand lakes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 84, 89–102.

- HANSON, K. M.; GRATTON, E. & BARDEEN, C. J. 2006. Sunscreen enhancement of UV-induced reactive oxygen species in the skin. *Free Radical Biology & Medicine*, 41, 1205–1212.
- HAY, M.E. & FENICAL, W. 1988. Marine plant-herbivore interactions: the ecology of chemical defense. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 19, 111–145.
- HE, Y. Y. & HÄDER, D. –P. 2002. Involvement of reactive oxygen species in the UV-B damage to the cyanobacterium *Anabaena* sp. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 66, 73–80.
- HENRIQUES, R.P.B., ARAUJO, D.S.D. & HAY, J.D. 1986. Descrição e classificação dos tipos de vegetação da restinga de Carapebus, Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Botânica*, 9, 173-189.
- HERMS, D.A. & MATTSON, W.J. 1992. The dilemma of plants: to grow or defend. *The Quarterly Review of Biology*, 6, 283 – 335.
- HILT, S. 2006. Recovery of *Potamogeton pectinatus* L. stands in a shallow eutrophic lake under extreme grazing pressure. *Hydrobiologia*, 570, 95–99.
- HOLLANDA-CARVALHO, P.; SÁNCHEZ-BOTERO, J.I.; CARAMASCHI, E.P. & BOZELLI, R.L. 2003. Temporal variation of community richness in coastal lagoons of the Restinga de Jurubatiba National Park, Rio de Janeiro, Brazil. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 15 (3), 31-40.
- HOWELL, S.N.G., C. CORBEN, P. PYLE, AND D.I. ROGERS. 2003. The first basic problem: A review of molt and plumage homologies. *Condor*, 105, 635–653.
- HUANG, D.; Ou, B. & PRIOR, R.L. 2005. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856
- HUSSNERA, A.; HOELKENA, H.P. & JAHNSB, P. 2010. Low light acclimated submerged freshwater plants show a pronounced sensitivity to increasing irradiances. *Aquatic Botany*, 93, 17–24
- IOANNOU, I.; HAFSA, I.; HAMDI, S.; CHARBONNEL, C. & GHOUL, M. 2012. Review of the effects of food processing and formulation on flavonol and anthocyanin behavior. *Journal of Food Engineering*, 111, 208–217.

- IRITI, M. & FRANCO FAORO, F. 2009. Ozone-induced changes in plant secondary metabolism. *In*: Singh, S.N. (ed.), *Climate Change and Crops, Environmental Science and Engineering*, 245-268.
- IVANCHEVA, S. & STANTCHEVA, B. 2000. Ethnobotanical inventory of medicinal plants in Bulgaria. *Journal of Ethnopharmacology*, 69, 165–172.
- JENKS, M.A.; KANE, M.E.; & MCCONNELL, D.B. 2000. Shoot organogenesis from petiole explants in the aquatic plant *Nymphoides indica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 63: 1–8.
- KLEM, K.; AC, A.; HOLUBA, P.; KOVÁČA, D.; SPUNDAA, V.; ROBSONB, T.M. & URBANA, O. 2012. Interactive effects of PAR and UV radiation on the physiology, morphology and leaf optical properties of two barley varieties. *Environmental and Experimental Botany*, 75, 52– 64.
- KONNO, K. 2011. Plant latex and other exudates as plant defense systems: Roles of various defense chemicals and proteins contained therein. *Phytochemistry*, 72, 1510–1530.
- KOZLOWSKI, T.T.; & PALLARDY, S.G. 1997. Physiology of Woody Plants. *Biologia Plantarum*, 40 (2), 168-168.
- KUBANEK, J.; FENICAL, W.; HAY, M.E.; BROWN, P.J. & LINDQUIST, N. 2000. Two antifeedant lignans from the freshwater macrophyte *Saururus cernuus*. *Phytochemistry*, 54, 281-287.
- LANE, A.L. & KUBANEK, J. 2006. Structure–activity relationship of chemical defenses from the freshwater plant *Micranthemum umbrosum*. *Phytochemistry*, 67, 1224–123.
- LANGEBARTELS, C.; WOHLGEMUTH, H.; KSCHIESCHAN, S.; GRÜN, S. & SANDERMANN, H. 2002. Oxidative burst and cell death in ozone-exposed plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 567–575.
- LANKAU, R. A & KLIEBENSTEIN, D. J. 2009. Competition, herbivory and genetics interact to determine the accumulation and fitness consequences of a defence metabolite. *Journal of Ecology*, 97, 78–88.
- LARSON, D. 2007. Reproduction strategies in introduced *Nymphoides peltata* populations revealed by genetic markers. *Aquatic Botany*, 86, 402–406.
- LIMA, L.M.S. 2009. Variação intra-talo de defesas químicas em espécies da ordem *Bryopsidales* e o Modelo de Defesa Ótima. Dissertação apresentada ao

Programa de Pós-Graduação em Biologia Marinha da Universidade Federal Fluminense como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Biologia Marinha.

- LÜTTGE, U. & SCARANO, F.R. 2007. Synecological comparisons sustained by ecophysiological fingerprinting of intrinsic photosynthetic capacity of plants as assessed by measurements of light response curves. *Revista Brasile. Bot.*, 30(3), 355-364.
- LÜTTGE, U.; HARIDASAN, M.; FERNANDES, G.W.; MATTOS, E.A.; TRIMBORN, P.; FRANCO, A.C.; CALDAS, L. & ZIEGLER, H. 1998. Photosynthesis of mistletoes in relation to their hosts at various sites in tropical Brazil. *Trees*, 12, 167-174.
- MACAYA, E.C., THIEL, M. 2008. In situ tests on inducible defenses in *Dictyota kunthii* and *Macrocystis integrifolia* (Phaeophyceae) from the Chilean coast. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 354, 28–38.
- MACKERNESS, S. A. H., JORDAN, B. R., THOMAS, B. 1999. Reactive oxygen species in the regulation of photosynthetic genes by ultraviolet-B radiation (UV-B: 280–320 nm) in green and etiolated buds of pea (*Pisum sativum* L.). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 48, 180–188.
- MANOSROI, J.; BOONPISUTTINANT, K.; MANOSROI, W. & MANOSROI, A. 2012. Anti-proliferative activities on HeLa cancer cell line of Thai medicinal plant recipes selected from MANOSROI II database. *Journal of Ethnopharmacology*, 142, 422–431.
- MANTHEY, J.A.; GROHMANN, K. & CUTHRIE, K. 2001. Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. *Current Medicinal Chemistry*, 8, 135-153.
- MAPLESTONE, R.A.; STONE, M.J. & WILLIAMS, D.H. 1992. The evolutionary role of secondary metabolites-a review. *Gene*, 115, 151-157.
- MARKHAM, K.R. & THOMAS, M.B. 1970. The systematic identification of flavonoids. Berlin: Springer, p.354
- MARQUES, J. F. & COMUNE, A. E. 1995. A Teoria Neoclássica e a Valoração Ambiental In: Romeiro, A. R.; Reydon, B. P. & Leonardi, M. L. A. (Orgs). Economia do Meio Ambiente: teoria, políticas e a gestão de espaços regionais. Campinas: Unicamp, 21-42.

- MARTENS, S.; PREUß, A. & MATERN, U. 2010. Multifunctional flavonoid dioxygenases: Flavonol and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* L. *Phytochemistry*, 71, 1040–1049.
- MARTZ, F.; TURUNEN, M.; JULKUNEN-TIITTO, R.; LAKKALA, K. & SUTINEN, M-L. 2009. Effect of the temperature and the exclusion of UVB radiation on the phenolics and iridoids in *Menyanthes trifoliata* L. leaves in the subarctic. *Environmental Pollution*, 157, 3471–3478.
- MASON, D. & VAN DER VALK, A.G. 1992. Growth responses of *Nymphaeodes indica* seedlings and vegetative propagules along water depth gradient. *Aquatic Botany*, 42, 339-350.
- MEILING, L.; BO, C.; SHENGHUI, Z. & YUBING, L. 2012. Responses of the flavonoid pathway to UV–B radiation stress and the correlation with the lipid antioxidant characteristics in the desert plant *Caryopteris mongolica*. *Acta Ecologica Sinica*, 32, 150–155.
- MELONI, F.; LOPES, N.P. & VARANDA, E.M. 2012. The relationship between leaf nitrogen, nitrogen metabolites and herbivory in two species of Nyctaginaceae from the Brazilian Cerrado. *Environmental and Experimental Botany*, 75, 268– 276.
- METLEN, K. L., ASCHEHOUG, E. T., CALLAWAY R. M. 2009. Plant behavioural ecology: dynamic plasticity in secondary metabolites. *Plant, Cell & Environment*, 32, 641–653.
- MEYER, K.D. & PAUL, V.J., 1995. Variation in aragonite and secondary metabolite concentrations in the tropical green seaweed *Neomeris annulata*: effects on herbivory by fishes. *Marine Biology*, 122, 537-545.
- MOLYNEUX, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26, 211–219.
- MORENO, C.S. 2002. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8(3), 121–137

- NAZARI, E. M.; AMMAR, D.; BEM, A. F.; LATINI, A.; MÜLLER, Y. M. R. & ALLODI, S. 2010. Effects of environmental and artificial UV-B radiation on freshwater prawn *Macrobrachium olfersi* embryos. *Aquatic Toxicology*, 98, 25-33.
- NEWMAN, R.M.; HANSCOM, Z. & KERFOOT, W.C. 1992. The watercress glucosinolate-myrosinase system: a feeding deterrent to caddisflies, snails and amphipods. *Oecologia*, 92, 1-7.
- NIELSEN, N. P. V.; CARSTENSEN, J. M. & SMEDSGAARD, J. 1998. Aligning of single and multiple wavelength chromatographic profiles for chemometric data analysis correlation optimized warping. *Journal of Chromatography A*, 805, 17-35
- NING, W.; PENG, X.; MA, L.; CUI, L.; LU, X.; WANG, J.; TIAN, J.; LI, X.; WANG, W. & ZHANG, L. 2012. Enhanced secondary metabolites production and antioxidant activity in postharvest *Lonicera japonica* Thunb. in response to UV radiation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 13, 231-243.
- OKUNO, E., NAKAJIMA, T., YOSHIMURA, E. M., HIODO, F., FAUSTO, A. M. F., PAES, W. S., UMISED, N. K. & OTSUBO, E. S. 1996. Radiação ultravioleta solar em São Paulo, Chiba, Calafate e Ilha de Páscoa. RBE. *Caderno de Engenharia Biomédica*, 12, 143-153.
- OMETTO, J. C. 1981. Bioclimatologia vegetal. São Paulo: Agronômica, Ceres 440p.
- PALMA- SILVA, C. 1998. Crescimento e produção de *Typha dominguensis* pers na lagoa Imboassica. In: Esteves, F.A. Ecologia das Lagoas Costeira do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba e do Município de Macaé (RJ). Editora UFRJ, 1998. p. 205-220.
- PARKER, J.D.; COLLINS, D.O.; KUBANEK, J.; SULLARDS, M.C.; BOSTWICK, D. & HAY, M.E. 2006. Chemical defenses promote persistence of the aquatic plant *Micranthemum umbrosum*. *Journal of Chemical Ecology*, 32, 815-833.
- PENOSSO, R. F.; ATTAYDE, J. L. & MUEHE, D. 1998. Morfologia das lagoas Imboassica, Cabiúnas, Comprida e Carapebus: Implicações para seu funcionamento e manejo. In: Ecologia das Lagoas Costeiras do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba e do Município de Macaé (RJ). Esteves, F. A. (Ed). Editora UFRJ. RJ, 91 – 108.
- PETERSEN, M.; ABDULLAH, Y.; BENNER, J.; EBERLE, D.; GEHLEN, K. ;

- HÜCHERIG, S.; JANIÁK, V.; KIM, K.H.; SANDER, M.; WEITZEL, C. & WOLTERS, S. 2009. Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. *Phytochemistry*, 70, 1663-1679.
- PETRICIO, M. M. 1998. Caracterização das Lagoas Imboassica, Cabiúnas, Comprida e Carapebus a partir da temperatura, salinidade, condutividade, alcalinidade, O<sub>2</sub> dissolvido, pH, transparência e material em suspensão. *In: Ecologia das Lagoas Costeiras do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba e do Município de Macaé (RJ)*. Esteves, F. A. (Ed). Editora UFRJ. RJ, 109 – 122.
- PINTO, M. E.; CASATI, P.; HSU, T. P.; KU, M. S. B. & EDWARDS, G. E. 1999. Effects of UV-B radiation on growth, photosynthesis, UV-B-absorbing compounds and NADP-malic enzyme in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under different nitrogen conditions. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 48, 200-209.
- POHNERT, G.; STEINKE, M. & TOLLRIAN, R. 2007. Chemical cues, defence metabolites and the shaping of pelagic interspecific interactions. *Trends in Ecology and Evolution*, 22, 198-204.
- RAMBERG, L.; HANCOCK, P.; LINDHOLM, M.; MEYER, T.; RINGROSE, S.; LIVA, J.; VAN, J. & VANDERPOST, V. 2006. Species diversity of the Okavango Delta, Botswana. *Aquatic Sciences*, 68, 310–337.
- RAO, M. V.; PALIYATH, G. & ORMROD, D. P. 1996. Ultraviolet-B- and ozone induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 110, 125-136.
- RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; BOLWELL, P.G.; BRAMLEY, P.M. & PRIDHAM, J.B. 1995. The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 22, 375-383.
- RICKLEFS, R. E. 2011. A Economia da natureza – Ricklefs. 6ªed. Editora: Guanabara Koogan. p 572.
- RITCHIE, R.J. & BUNTHAWIN, S. 2010. The use of pulse amplitude modulation (PAM) fluorometry to measure photosynthesis in a cam orchid, *Dendrobium* spp. (d. Cv. *Viravuth pink*). *International Journal of Plant Sciences*, 171(6), 575–585. 2010.
- ROUSSEAU, D. M., SITKIN, S. B., BURT, R. S., & CAMERER, C. 1998. Not so different after all: A cross-discipline view of trust. *Academy of Management Review*, 23, 393– 404.

- ROZEMA, J.; BJÖRN, L.O.; BORNMAN, J.F.; GABERŠČIK, A.; HÄDER, D.P.; TROŠT, T.; GERM, M.; KLISCH, M.; GRÖNIGER, A.; SINHA, R.P.; LEBERT, M.; HE, Y.; BUFFONI-HALL, R.; DE BAKKER, N.V.J.; VAN DE STAAIJ, J. and MEJKAMP, B. 2002. The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems-an experimental and functional analysis of the evolution of UV-absorbing compounds. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 66(1), 2-12.
- RYAN, K. G.; SWINNYA, E. E.; MARKHAMA, K. R. & WINEFIELD, C. 2002. Flavonoid gene expression and UV photoprotection in transgenic and mutant *Petunia* leaves. *Phytochemistry*, 59, 23–32.
- SANTAMARÍA, L. 2002. Why are most aquatic plants widely distributed? Dispersal, clonal growth and small-scale heterogeneity in a stressful environment. *Acta Oecologica*, 23, 137–154.
- SANTOS, A. L.; GOMES, N. C. M.; HENRIQUES, I.; ALMEIDA, A.; CORREIA, A. & CUNHA, A. 2012. Contribution of reactive oxygen species to UV-B-induced damage in bacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 117, 40–46.
- SANTOS, F.; FIDALGO, ALMEIDA, J.M.; & SALEMA, R. 2004. Biochemical and Ultrastructural changes in leaves of potato plants grown under supplementary UV-B radiation. *Plant Science*. 167, 925-935.
- SANTOS, I.; ALMEIDA, J. & SALEMA, R. 1999. The influence of UV-B radiation on the superoxide dismutase of maize, potato, sorghum, and wheat leaves, *Canadian Journal of Botany*, 77, 70–76.
- SANTOS, M. G.; SYLVESTRE, L. S.; ARAUJO, D. S. D. 2004. Análise florística das pteridófitas do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro, Brasil. *Acta botanica brasílica*, 8 (2), 272 – 280.
- SARIC-KUNDALIC, B.; DOBES, D.; KLATTE-ASSELMEYER, V. & SAUKEL, J. 2011. Ethnobotanical survey of traditionally used plants in human therapy of east, north and north-east Bosnia and Herzegovina. *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 1051–1076.
- SAVENSTRAND, H.; BROSCHE, M. & STRID, A. 2002. Regulation of gene expression by low levels of ultraviolet-B radiation in *Pisum sativum*: isolation of novel genes by suppression subtractive hybridisation, *Plant and Cell Physiology*, 43, 402–410.

- SCARPA, G.F. Medicinal plants used by the Criollos of Northwestern Argentine Chaco. *Journal of Ethnopharmacology*, 91, 115–135.
- SCHMIDT, É. C., B. PEREIRA, R. W. DOS SANTOS, C. GOUVEIA, G. B. COSTA, G. S. M. FARIA, F. SCHERNER, P. A. HORTA, R. P. MARTINS, A. LATINI, F. RAMLOV, M. MARASCHIN AND Z. L. BOUZON. 2012. Responses of the macroalgae *Hypnea musciformis* after in vitro exposure to UV-B. *Aquatic Botany*, 100, 8-17.
- SCHREIBER, U.; BILGER, W.; & NEUBAUER, C. 1995. Chlorophyll fluorescence as a non-intrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. *In: Schulze E-D, Caldwell MM, eds; Ecophysiology of photosynthesis. Berlin: Springer-Verlag, p. 49-70.*
- SENA, M.M.; POPPI, R.J.; FRIGHETTO, R.S.T & VALARINI, P.J. 2000. Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de solos. *Química Nova*, 23(4).
- SHIBAYAMA, Y. & KADONO, Y. 2003. Floral morph composition and pollen limitation in the seed set of *Nymphoides indica* populations. *Ecological Research*, 18, 725–737.
- SHIBAYAMA, Y. & KADONO, Y. 2007. Reproductive success and genetic structure of populations of the heterostylous aquatic plant *Nymphoides indica* (L.) Kuntze (Menyanthaceae). *Aquatic Botany*, 86, 1–8.
- SHIOBARA, Y.; KATO, K.; UEDA, Y.; TANIUE, K.; SYOHA, Y.; NISHIMOTO, N. & DE OLIVEIRA F. *et al.* 1994. Secoiridoid glucosides from *Chelonanthus chelonoides*. *Phytochemistry*, 37, 1649–1652.
- SILVA, M.C.A. & PAIVA, S.R. 2012. Antioxidant activity and flavonoid content of *Clusia fluminensis* Planch. & Triana. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 84(3), 609-616
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6º ed., Porto Alegre: Editora UFRGS, 2010. 1102p.*

- SINGH, V. P.; SRIVASTAVA, P. K. & PRASAD, S. M. 2012. Differential effect of UV-B radiation on growth, oxidative stress and ascorbate-glutathione cycle in two cyanobacteria under copper toxicity. *Plant Physiology and Biochemistry*. Article in Press, 1-10.
- SINHA, R.P. & HÄDER, D.P. 2002. Life under solar UV radiation in aquatic organisms. *Advances in Space Research*, 30, 1547-1556.
- SOARES, A. R.; TEIXEIRA, V. L.; PEREIRA, R. C. & VILLAÇA, R. 2003. Variation on diterpene production by the Brazilian alga *Styopodium zonale* (Dictyotales, Phaeophyta). *Biochemical Systematic and Ecology*, 31, 1347-1350.
- SOTKA, E.E.; FORBEY, J.; HORN, M.; POORE, A.G.B.; RAUBENHEIMER, D. & WHALEN, K.E. 2009. The emerging role of pharmacology in understanding consumer-prey interactions in marine and freshwater systems. *Integrative And Comparative Biology*, 49, (3) 291 - 313.
- SOUZA, V. & LORENZI, H. 2005. Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa, SP : Instituto Palntarum.
- STAAIJ, J.V, DE BAKKER, N.V.J., OOSTHOEK, A, BROEKMAN, R. VAN BEEM, A. STROETENGA, M., AERTS & R. ROZEMA, J. 2002. Flavonoid concentrations in three grass species and a sedge grown in the field and under controlled environment conditions in response to enhanced UV-B radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 66, 21–29.
- STASIAK, J.; KOBIA, M.; BOBER, L.; & BĄCZEK, T. 2010. Principal Component Analysis of HPLC Retention Data and Molecular Modeling Structural Parameters of Cardiovascular System Drugs in View of Their Pharmacological Activity. *Journal of Atomic and Molecular Sciences*, 11(7), 2681-2698.
- STRAUSS, S. Y.; IRWIN, R. E. & LAMBRIX, V. M. 2004. Optimal defence theory and flower petal colour predict variation in the secondary chemistry of wild radish. *Journal of Ecology*, 92, 132–141.

- STRAUSS, S. Y.; RUDGERS, J. A.; LAU, J. A. & IRWIN, R. E. 2002. Direct and ecological costs of resistance to herbivory. *TRENDS in Ecology & Evolution*, 17 (6), 278-285.
- SUN, M.; GU, X.; FU, H.; ZHANG, L.; CHEN, R.; CUI, L.; ZHENG, L.; ZHANG, D. & TIAN, J. 2010. Change of secondary metabolites in leaves of *Ginkgo biloba* L. in response to UV-B induction. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 672–676.
- SURABHI, G. –K.; K. REDDY, R. K. & SINGH, S. K. 2009. Photosynthesis, fluorescence, shoot biomass and seed weight responses of three cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) cultivars with contrasting sensitivity to UV-B radiation. *Environmental and Experimental Botany*, 66, 160–171.
- THIELE, A., KRAUSE, G.H., WINTER, K., 1998. *In situ* study of photoinhibition of photosynthesis and xanthophyll cycle activity in plants growing in natural gaps of the tropical forest. *Australian Journal of Plant Physiology*, 25, 189-195.
- TIMOFEYEV M.A. & STEINBERG C.E. 2006. Antioxidant response to natural organic matter (NOM) exposure in three Baikalean amphipod species from contrasting habitats. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 145(2), 197-203.
- TIMOFEYEV, M.A.; SHATILINA, Z.M.; KOLESNICHENKO, A.V.; KOLESNICHENKO, V.V. & STEINBERG, C.E.W. 2006. Specific antioxidant reactions to oxidative stress promoted by natural organic matter (NOM) in two amphipod species from Lake Baikal. *Environmental Toxicology*, 21, 104-110.
- TIPPERY, N.P. & LES, D.H. 2008. Phylogenetic analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region in Menyanthaceae using predicted secondary structure. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49, 526–537.
- TIPPERYA, L.P.; LESA, D.H. & JONES, C.S. 2012. Evolution of inflorescence architecture in *Nymphoides* (Menyanthaceae). *Aquatic Botany*, 99, 11– 19.
- TSUCHIYA, T. 1988. Comparative studies on the morphology and leaf life span of floating and emerged leaves of *Nymphoides peltata* (Gmel.) O. Kuntze. *Aquatic Botany*, 29, 381-386.

- TUNÓN, H.; OLAVSDOTTER, C. & BOHLIN, L. 1995. Evaluation of anti-inflammatory activity of some Swedish medicinal plants. Inhibition of prostaglandin biosynthesis and PAF-induced exocytosis. *Journal of Ethnopharmacology*, 48, 61-76.
- VERPOORTE, R., 2000. Pharmacognosy in the new millennium: leadfinding and biotechnology. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 52 (3), 253-262.
- VETELI, T. O.; MATTSON, W. J.; NIEMELÄ, P.; JULKUNEN-TIITTO, R.; KELLOMÄKI, S.; KUOKKANEN, K. & LAVOLA, A. 2007. Do elevated temperature and CO<sub>2</sub> generally have counteracting effects on phenolic phytochemistry of boreal trees? *Journal of Chemical Ecology*, 33, 287–296.
- VIEGAS J.R.; BOLZANI, C. C. & BARREIRO, E. J. 2006. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*, 29 (2), 326 – 337.
- WANG, C.; ZHANG, S.H.; WANG, P.F.; HOUA, J.; LI, W. & ZHANG, H. J. 2008. Metabolic adaptations to ammonia-induced oxidative stress in leaves of the submerged macrophyte *Vallisneria natans* (Lour.) Hara. *Aquatic Toxicology*, 87, 88–98.
- WANG, Q.; YU, D.; XIONG, W.; YU, L. & XIE, D. 2010. Do freshwater plants have adaptive responses to typhoon-impacted regimes? *Aquatic Botany*. 92, 285–288.
- WEHRENS, R. 2012. Chemometrics with R - Multivariate Data Analysis. Natural Sciences and Life Sciences, p 17.
- WEN, K.C.; CHIU, H.H.; FAN, P.C.; CHEN, C.H.; WU, S.M.; CHANG, J.H. & CHIANG, H.M. 2011. Antioxidant Activity of *Ixora parviflora* in a Cell/Cell-Free system and in UV-Exposed human fibroblasts. *Molecules*, 16, 5735-5752.
- WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J. P. E. & RICE-EVANS, C. 2004. Flavonoids: antioxidants or signaling molecules? In: Rice-Evans, c. Serial review: flavonoids and isoflavones (Phytoestrogens): absorption, metabolism, and bioactivity. *Free Radical Biology & Medicine*, 36(7), 838-849.
- WINK, M. 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64, 3–19.
- WMO, 2007. Scientific assessment of ozone depletion: 2006, global ozone research and monitoring project. Technical Report 50. World Meteorological Organization.

- YANG, J. L. 2005. Aluminium resistance requires resistance to acid stress: a case study with spinach that exudes oxalate rapidly when exposed to Al stress. *Journal of Experimental Botany*, 56, (414), 1197–1203.
- YIN, X. & STRUIK, P. C. 2009. C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> photosynthesis models: An overview from the perspective of crop modeling. *Wageningen Journal of Life Sciences*, 57, 27–38.
- ZALLER, J.G.; SEARLES, P. S.; CALDWELL, M. M.; FLINT, S. D.; SCOPEL, A. L. & SALA, O. E. 2004. Growth responses to ultraviolet-B radiation of two *Carex* species dominating a fen in Tierra del Fuego, Argentina. *Basic and Applied Ecology*, 5, 153-162.
- ZANCAN, S.; SUGLIA, I.; LA ROCCA, N.; & GHISI, R. 2008. Effects of UV-B radiation on antioxidant parameters of iron-deficient barley plants. *Environmental and Experimental Botany*, 63, 71-79.
- ZAR, J.H. 1999. Biostatistical analysis. 4<sup>th</sup>ed. New Jersey, Prentice-Hall, Inc., p 663
- ZENGLING, M .A.; WEI, L. I. & KUNSHAN, G.A.O. 2010. Horizontal migration of *Acartia pacifica* Steuer (copepoda) in response to UV-radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 101, 233–237.
- ZENGLING, M.A.; WEI, L.I. & KUNSHAN, G.A.O. 2010. Horizontal migration of *Acartia pacifica* Steuer (copepoda) in response to UV-radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 101, 233–237.