



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**LUIZA NASCIMENTO BRAGA**

**ESTUDO DA VARIAÇÃO METABOLÔMICA DE ESPÉCIES DE *Phyllanthus* spp  
SUBMETIDAS A DÉFICIT HÍDRICO**

**FORTALEZA**

**2018**

LUIZA NASCIMENTO BRAGA

ESTUDO DA VARIAÇÃO METABOLÔMICA DE ESPÉCIES DE *Phyllanthus* spp  
SUBMETIDAS A DÉFICIT HÍDRICO

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Agronomia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do Título de Bacharel em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Renato Innecco.

Coorientador: Prof. Dr. Guilherme J. Zocolo.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

B794e Braga, Luiza Nascimento.

Estudo da variação metabólica de espécies de *Phyllanthus* spp submetidas a déficit hídrico / Luiza Nascimento Braga. – 2018.

49 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Agronomia, Fortaleza, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Renato Innecco .

Coorientação: Prof. Dr. Guilherme Julião Zocolo.

1. Quebra-pedra. 2. Fisiologia Vegetal. 3. Déficit hídrico. I. Título.

CDD 630

---

LUIZA NASCIMENTO BRAGA

ESTUDO DA VARIAÇÃO METABOLÔMICA DE ESPÉCIES DE *Phyllanthus* Spp  
SUBMETIDAS A DÉFICIT HÍDRICO

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Agronomia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do Título de Bacharel em Agronomia.

Aprovada em: 22/09/2018.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Renato Innecco (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Pesquisador Dr. Guilherme Julião Zocolo  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)

---

Dra. Aurilene Araújo Vasconcelos  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

M.<sup>a</sup> Vanessa Cláudia Vasconcelos Segundo  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus amados pais, Rubemar e Cláudia.

Às minhas queridas irmãs e irmão.

## AGRADECIMENTOS

Nesta fase tão especial de minha vida não posso deixar de agradecer a Deus por toda sabedoria, coragem e ânimo que me ofereceu para ter alcançado essa meta.

À minha família e amigos, porque foram eles que me incentivaram e inspiraram na caminhada acadêmica e ajudaram a superar todas as dificuldades.

À Universidade quero deixar uma palavra de gratidão por todas as condições de aprendizagem que me proporcionou.

Aos professores por todo conhecimento que me foi compartilhado, com paciência e dedicação. Foram eles que me deram recursos e ferramentas para evoluir um pouco mais todos os dias. Especialmente ao Prof. Dr. Renato Inneco, pela orientação.

À Embrapa Agroindústria Tropical, pela possibilidade que me apresentou e todo conhecimento que me foi confiado, durante meu estágio.

Ao Pesquisador Dr. Guilherme Zocolo, pela oportunidade que me ofereceu, pela paciência ao instruir e pelos preciosos ensinamentos e orientações.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Renato Innecco, Dr. Guilherme Julião Zocolo, Dra. Aurilene Araújo Vasconcelos e Dra. Vanessa Cláudia Vasconcelos Segundo, pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos colegas da turma de graduação, pelas reflexões, críticas e sugestões.

“... e as folhas da árvore são  
para a cura das nações.”

Apocalipse 22:2

## RESUMO

Conhecido por suas aplicações farmacológicas, o gênero *Phyllanthus* é amplamente distribuído em regiões tropicais e subtropicais do mundo. Este como a maioria dos vegetais pode ter seu desenvolvimento restringido pelo déficit hídrico. As espécies *Phyllanthus amarus* e *Phyllanthus niruri* foram submetidos a variados períodos de déficit hídrico (0, 3, 5, 7 e 10 dias), e, posteriormente, a parte aérea foram coletadas e avaliadas quanto a parâmetros fisiológicos e bioquímicos. Para identificar marcadores de estresse oxidativo e mecanismos de defesa em resposta ao déficit hídrico. Resultados mostram que *P. amarus* tem alto nível endógeno de variáveis do metabolismo oxidativo / antioxidante, e *P. niruri* apresenta as mudanças mais significativas nessas variáveis quando comparado ao controle e plantas estressadas. Para ambas as espécies de *Phyllanthus*, o estresse hídrico induz níveis mais altos de ácidos orgânicos tais como ácidos málico, succínico e cítrico, e aminoácidos tais como prolina, GABA, alanina e valina. Além disso, as plantas de *P. niruri* respondem com maiores teores de glicose e corilagina. Portanto, considerando as alterações metabólicas avaliadas, *P. amarus* é mais adaptada ao estresse hídrico, enquanto *P. niruri* apresenta uma estratégia de aclimação que aumenta os níveis de corilagina induzida pelo estresse hídrico de curto prazo.

**Palavras-chave:** Quebra-pedra. Fisiologia Vegetal. Déficit hídrico.

## ABSTRACT

Known for its pharmacological applications, the genus *Phyllanthus* is widely distributed in tropical and subtropical regions of the world. This like most vegetables can have its development restricted by water deficit. The species *Phyllanthus amarus* and *Phyllanthus niruri* were submitted to various periods of water deficit (0, 3, 5, 7 and 10 days), and later the aerial part were collected and evaluated for physiological and biochemical parameters. To identify markers of oxidative stress and defense mechanisms in response to water deficit. Results show that *P. amarus* has a high endogenous level of oxidative / antioxidant metabolism variables, and *P. niruri* presents the most significant changes in these variables when compared to control and stress plants. For both *Phyllanthus* species, water stress induces higher levels of organic acids such as malic, succinic and citric acids, and amino acids such as proline, GABA, alanine and valine. In addition, *P. niruri* plants respond with higher levels of glucose and corilagin. Therefore, considering the metabolic changes evaluated, *P. amarus* is more adapted to water stress, while *P. niruri* presents an acclimatization strategy that increases corilagine levels induced by short-term water stress.

**Keywords:** Stone break. Plant Physiology. Water deficit.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Phyllanthus amarus</i> Schumach. & Thonn. a) ramo florífero; b) estípula; c) folha face abaxial; d) flor estaminada; e) flor pistilada e f) fruto .....	17
Figura 2	<i>Phyllanthus niruri</i> L. a) ramo florífero; b-c) variação morfológica da estípula; d) folha face abaxial; e-f) variação morfológica da flor estaminada; g) flor pistilada; h) fruto .....	18
Figura 3	Espectro de RMN 1H de <i>Phyllanthus amarus</i> e <i>Phyllanthus niruri</i> , em condições normais (controle) .....	29
Figura 4	Dendrograma obtido por AAH de <i>P. amarus</i> e <i>P. niruri</i> analisados por RMN de 1H .....	30
Figura 5	A) PC1 vs. PC2 para <i>P. amarus</i> e <i>P. niruri</i> submetidos a diferentes condições de estresse hídrico e B) carregamentos plotados em linhas (topo, carregamento para PC1 e carregamentos de botton para PC2).....	31
Figura 6	A) Sistema de coordenadas de PC1 e PC2 e B) carregamentos plotados em linhas para região aromática das amostras de <i>Phyllanthus</i> : <i>P. amarus</i> em triângulos pretos; e <i>P. niruri</i> em círculos cinza.....	33
Figura 7	Via metabólica da planta com os metabolitos relacionados ao estresse quantificados por qNMR.....	34
Figura 8	A) umidade do solo (% de peso) e B) índice de desidratação (%) de <i>P. amarus</i> e <i>P. niruri</i> .....	37
Figura 9	A) ACP para <i>P. amarus</i> em diferentes períodos de estresse hídrico, B) carregamentos do eixo PC1 plotados na linha, C) carregamentos do eixo PC2 plotados na linha, D) cromatograma para destacar as variáveis (tempos de retenção) responsáveis pela separação.....	38
Figura 10	A) ACP para <i>P. niruri</i> em diferentes períodos de estresse hídrico, B) carregamentos de eixos PC1 plotados em linha; C) cromatograma para destacar as variáveis (tempos de retenção) responsáveis pela separação.....	39
Figura 11	ACP para <i>P. amarus</i> (PA) e <i>P. niruri</i> (PN) com déficit hídrico .....	41

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	14
<b>2.1</b>	<b>Relevância das plantas medicinais</b> .....	14
<b>2.2</b>	<b>Descrição botânica de <i>Phyllanthus</i></b> .....	15
<b>2.3</b>	<b>Propriedades terapêuticas de <i>Phyllanthus</i></b> .....	18
<b>2.4</b>	<b>Déficit hídrico</b> .....	21
2.4.1	Estresse oxidativo.....	21
<b>2.5</b>	<b>Metabolismo secundário</b> .....	21
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23
<b>3.1</b>	<b>Preparação do experimento</b> .....	23
<b>3.2</b>	<b>Espectroscopia de RMN e identificação molecular</b> .....	23
3.2.1	Análise química e quantitativa dos dados de RMN.....	24
3.2.2	Estimativa da variação da matéria orgânica total aromática.....	25
<b>3.3</b>	<b>Preparação da amostra e análise UPLC-QTOF-MS</b> .....	25
3.3.1	Análise quimiométrica dos dados UPLC-MS.....	26
<b>3.4</b>	<b>Variáveis fisiológicas: estresse oxidativo e constituintes do metabolismo antioxidante</b> .....	27
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	29
<b>4.1</b>	<b>RMN de <sup>1</sup>H e análise quimiométrica</b> .....	29
<b>4.2</b>	<b>UPLC-MS acoplado à análise quimiométrica</b> .....	37
<b>4.3</b>	<b>Efeitos do estresse hídrico sobre o metabolismo oxidativo / antioxidante</b> .....	41
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	43
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	44

## 1 INTRODUÇÃO

Estima-se que 80% da população já utilizou alguma planta para tratar doença ou aliviar sintomas. Há séculos as plantas têm sido utilizadas como medicamentos, para diversas finalidades, em todo o mundo (ALVES; SILVA, 2002). Entretanto, poucas espécies vegetais com potencial terapêutico são estudadas. Apenas uma pequena parte das, cerca de, 500 mil plantas conhecidas tenha sido submetida a estudos fitoquímicos, biológicos ou farmacológicos. No Brasil, somente 10% da flora é objeto de pesquisas, o que indica que há um grande potencial para descoberta de novas plantas com propriedades medicinais, diante da enorme biodiversidade do país (BERNSTEIN, 2018).

Com o aumento da procura por produtos alternativos à medicina tradicional, os estudos foram intensificados na busca por novos fitofármacos, medicamentos compostos unicamente de produtos extraídos de plantas medicinais, e fitoterápicos, substâncias extraídas de plantas que podem ser usadas na medicina. Mais de 25% dos produtos farmacológicos são oriundos de vegetais. Espécies do gênero *Phyllanthus* são utilizadas há décadas no tratamento de patologias do trato urinário, principalmente urolitíase, mas também tem se mostrado eficaz contra inflamações e dores ao urinar, também sendo utilizado como antimicrobiano e antitumoral (LORENZI; MATOS, 2002); facilita a descida de cálculos renais através do relaxamento dos ureteres e reduz a dor (SIQUEIRA *et al.*, 2012). Também foi observada ação antiviral, principalmente em estudos com o vírus da hepatite B, (SHEAD, 1992). Além disso, foi observado que algumas espécies possuem ação hepatoprotetora (SINGH, 1989).

Com o crescimento do uso popular e industrial de *Phyllanthus* aumenta a necessidade de avaliar e maximizar a produção dos compostos de interesse. Isso pode ser alcançado pela aliança entre as ciências agrônômica, químicas, farmacêuticas e botânicas, tendo como resultado a adaptação às condições de cultivo, bem como o máximo potencial genético da espécie para o teor desejado dos princípios ativos (CASTRO *et al.*, 2004).

Sabe-se que, frequentemente, o déficit hídrico por um curto período de tempo está relacionado a elevações consideráveis na concentração de vários metabólitos secundários em plantas, como glicosídeos cianogênicos, glucosinolatos, alguns terpenóides, antocianinas e alcalóides. Entretanto, se o déficit de água se estender por períodos mais prolongados esses compostos tendem a reduzir sua concentração (WATERMAN, *et al.*, 1989). No entanto, a concentração de metabólitos fenólicos não é proporcional ao estresse osmótico sofrido pela planta (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Para tanto, as plantas desenvolveram um sistema de defesa antioxidante

constituído por enzimas catalase (CAT), peroxidase (APX), superóxido dismutase (SOD), bem como compostos não enzimáticos e fenólicos, que protegem a planta em situações de restrição. Considerando que vários desses compostos antioxidantes apresentam propriedades favoráveis à saúde humana, condições estressantes podem induzir sua acumulação ou preservar níveis mais altos na pós-colheita (BRAVO *et al.*, 2012).

Além disso, Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), como peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), podem atuar como molécula de sinalização e estimular enzimas da via sintética de polifenóis (POTTERS *et al.*, 2010). Assim, um fenômeno conhecido como hormesis, isto é, a estimulação fisiológica de respostas benéficas de plantas por baixos níveis de estresse, que de outra forma poderiam gerar respostas nocivas. Logo, uma restrição abiótica controlada pode ser usada como ferramenta para melhorar os níveis fitoquímicos em plantas ou órgãos inteiros. Sabendo que os estresses abióticos desencadeiam processos oxidativos através da geração de ERO, que são subprodutos normais da respiração (SHARMA *et al.*, 2012).

Diante do exposto, eleva-se a necessidade de mais estudos interdisciplinares aprofundados envolvendo *Phyllanthus* sp. Embora as pesquisas tenham avançado na última década, a possibilidade de monitorar um conjunto completo de metabólitos poderia melhorar a compreensão dos mecanismos fisiológicos da planta em resposta ao déficit hídrico. Verificando as alterações no teor de metabólitos secundários, os quais podem representar um bom mecanismo preditivo para espécies ou variedades mais tolerantes ao estresse abiótico, auxiliando na triagem de variedades vegetais mais indicadas para cada região e clima, e reduzindo o tempo em programas de melhoramento vegetal.

O objetivo deste estudo foi investigar a variação na resposta do metabolismo secundário, entre duas espécies de *Phyllanthus*, *P. amarus* e *P. niruri*, submetidas a diferentes níveis de estresse fisiológico, ocasionado pela restrição hídrica. Para isso, utilizou-se espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e análises quimiométricas detalhadas, através da Cromatografia Líquida de Ultra Precisão (UPLC). Sendo essas ferramentas importantes para caracterização de moléculas, orgânicas e inorgânicas, pois possibilita a determinação da fórmula molecular, estrutural e até mesmo espacial da substância (SILVA, 2005).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O emprego de *Phyllanthus* sp. como alternativa ao tratamento de enfermidades que acometem o sistema urinário já é bem difundido no Brasil. Popularmente a utilização dessas espécies se dá na forma de chás, infusões e misturas, muitas delas testadas de forma empírica e difundidas oralmente através de gerações; na indústria são produzidos extrato, com alta concentração dos princípios ativos, ou o princípio ativo puro (LORENZI; MATOS, 2002). As espécies comumente aplicadas nesse propósito são *Phyllanthus niruri* Lineu e *Phyllanthus amarus* Schum & Thonn.

### 2.1 Relevância das plantas medicinais

O tratamento de doenças através do uso de plantas acompanha a história do homem. Acredita-se que o homem reconhece as características curativas e tóxicas em algumas plantas há mais de 2000 a. C., quando o imperador chinês Shen Nung, elaborou um catálogo com 365 plantas medicinais e venenosas (SIMÕES; SCHENKEL; SIMON, 2001). Em meados de 500 a. C. os chineses já possuíam registros com nomes, doses e indicações de diversas espécies vegetais com propósitos medicinais. Os egípcios possuíam recomendações a base de plantas para mais de 800 enfermidades, algumas dessas plantas ainda são bastante difundidas atualmente, ginseng (*Panax* spp.) e ruibarbo (*Rheum palmatum*) são alguns exemplos (DUARTE, 2006).

A maior parte da população já utilizou preparações com ervas, frutas, especiarias, flores, além de sucos e xaropes para o tratamento de doenças ou alívio de sintomas, principalmente: gripe, dor de garganta, tosse, dor de estômago, diarreia e obesidade. Essas receitas têm importante contribuição, em especial, nas comunidades com pouco acesso a médicos e medicamentos industrializados, apesar de muitas vezes não terem conhecimento do princípio ativo, modo de ação, dose adequada ou risco de intoxicação (PALODETO; FISCHER, 2018).

Visando desenvolver novos produtos de origem natural, aumentar a produção e expandir a distribuição por todo o país, o Ministério da Saúde lançou, em 2006, uma Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, Decreto nº 5813, de 22 de junho de 2006, que incentiva a estruturação e o crescimento dos setores produtivos de fitomedicamentos no Brasil (BRASIL, 2006).

Dos agentes terapêuticos registradas de 1981 à 2010, 27% foram classificadas como fitoterápicas, produtos naturais ou derivados de produtos naturais e 24% foram classificadas como sintéticas inspiradas em compostos de origem vegetal (NEWMAN; CRAGG, 2012). Estudos também indicam que o número de entidades químicas encontradas tem relação direta com a diversidade vegetal conhecida, ou seja, quanto maior o espectro de espécies encontradas e analisadas quimicamente, maior a quantidade de moléculas com propriedades medicinais deverão ser encontradas.

Considerando que o Brasil possui mais de 46 mil espécies vegetais catalogadas, isto é, o maior patrimônio de biodiversidade do mundo (BRASIL, 2018). Acredita-se que o estudo das propriedades químicas destas espécies possa levar o Brasil a liderança no desenvolvimento de fármacos de origem natural. Isto é vantajoso uma vez que os medicamentos sintéticos causam maiores impactos ambientais, possuem mais contraindicações, restrições ao uso, e geram mais efeitos adversos ou colaterais em quem faz uso desses produtos (VEIGA JUNIOR *et al.*, 2005).

O aumento do interesse quanto à utilização das plantas medicinais também está relacionado a diversos outros fatores como o alto custo dos medicamentos sintéticos, a falta de acesso da população à assistência médica e farmacêutica, a crise econômica e uma tendência dos consumidores em utilizar produtos de origem natural (SIMÕES *et al.*, 1988). Entretanto, o fator mais relevante para o crescimento do uso da flora com propósitos terapêuticos é a comprovação, cada vez mais comum, de sua eficácia através de estudos clínicos (CASTRO *et al.*, 2004).

## 2.2 Descrição botânica de *Phyllanthus*

As plantas do gênero *Phyllanthus* são conhecidas popularmente como quebra-pedra, arrebeta-pedra ou erva-pombinha (SILVA; SALES, 2007). Muitas vezes são consideradas plantas daninhas ou invasoras por nascerem espontaneamente em vasos, gramados e, até mesmo, em fendas de calçadas, o que conferiu o nome popular: quebra-pedra (OLIVEIRA, 2012). São plantas ruderais, pois crescem e se reproduzem com naturalidade em áreas modificadas pelo homem, podendo ser alternativa de plantio em áreas degradadas por sua baixa exigência e alta rusticidade (SOUZA; MACHADO FILHO; ANDRADE, 2012).

O gênero *Phyllanthus* pertencia à família *Euphorbiaceae*, a partir de 2002 foi estabelecido em uma nova família, *Phyllanthaceae*, com base em estudos filogenéticos e moleculares que indicavam diferenças contrastantes entre este gênero e os demais (CHASE,

2002). Composta por 55 gêneros e 1745 espécies, a família *Phyllanthaceae* é encontrada em todos os continentes, especialmente em regiões de clima tropical, embora também esteja em regiões temperadas (MARTINS; LIMA; CORDEIRO, 2017). *Phyllanthus* é o maior e mais diversificado gênero da família *Phyllanthaceae*, com mais de 1200 espécies (KATRIARCHCHI *et al.*, 2006).

Nas Américas foram encontradas cerca de 200 espécies de *Phyllanthus*, dentre elas, 99 estão presentes no Brasil (ZAPPI, 2015). Devido suas familiaridades morfológicas, o conhecimento botânico se faz fundamental para correta distinção das espécies, principalmente quando essas serão destinadas ao uso terapêutico. O gênero *Phyllanthus*, é caracterizada pela ausência de células taníferas na epiderme, inflorescências glomeruliformes, flores com ou sem pétalas, cápsulas de deiscência explosiva e, é incomum, mas podem apresentarem frutos em forma de bagas ou drupas (MARTINS; LIMA; CORDEIRO, 2017).

Para a correta distinção de *P. niruri* e *P. amarus*, observa-se que a primeira espécie apresenta folhas assimétricas na base, flores com três estames, filetes livres e discos inteiros nas flores femininas, além de címulas com apenas uma flor. Já em *P. amarus* a címula contém duas flores, folhas de base retusa, androceu com dois estames unidos e disco de flores femininas 5-lobado (MARTINS; LIMA; CORDEIRO, 2017).

*Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn. pode ser encontrada em qualquer região dos trópicos. No Brasil é registrada em dezoito estados e no Distrito Federal. Devido sua ampla distribuição, apresenta status de conservação pouco preocupante. A floração de *Phyllanthus amarus* pode ser vista em fevereiro, março, junho e dezembro e a frutificação é comum em abril e dezembro (SECCO *et al.* 2013).

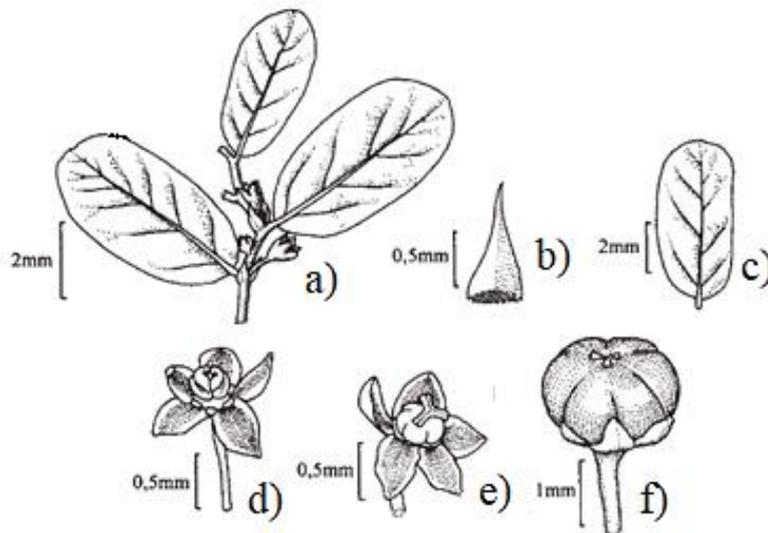
Com porte herbáceo, medindo de 20 a 30 cm de altura, *Phyllanthus amarus* apresenta caule liso com ramificações filantóides, ramos angulosos e glabos. Ramificação filantóide é um tipo de ramificação específico do gênero, comum a *P. amarus* e *P. niruri*, caracterizada por folhas um pouco acima dos cotilédones em alguns nós e ramos laterais plagiotróficos e caducos, no eixo principal, onde as flores são formadas. (WEBSTER, 1970).

Nesta espécie as folhas têm dimensões de até 13 × 6 mm, são membranáceas, levemente discolores ou discolores, oblongas a elípticas (Fig. 1 - c), com ápice arredondado a retuso, base retusa; face adaxial glabra, face abaxial pubescente, margem plana, nervação cladodrôma, pecíolos de 0,5 a 1 mm de comprimento, estípulas de 1 a 1,5 mm de comprimento (Fig. 1- b), lanceoladas e glabras.

Inflorescência em címulas axilares, compostas geralmente por duas flores, uma feminina e uma masculina em *P. amarus*, brácteas lanceoladas com 1 a 1,5 mm de

comprimento. Flores masculinas medindo de 1,5 a 2 mm de comprimento, com cinco sépalas membranáceas de 1 a 1,5 mm de comprimento, obovais a elípticas; dois estames com filetes completamente unidos; anteras com deiscência horizontal; cinco discos lobados; pedicelo com 1 a 1,5 mm de comprimento. Flores femininas de 1,5 a 2 mm de comprimento; cinco sépalas membranáceas, medindo de 0,5 a 1 mm de comprimento, elípticas a obovais; ovário medindo 0,5 mm comprimento, três estiletos, 2-fidos apenas no ápice; disco 5-lobado; pedicelo 1 a 1,5 mm de comprimento. Fruto tipo cápsula ca. 2,5 × 3 mm (Fig. 1 - f) e sementes de 0,5 a 1 mm de comprimento, castanho-claras e com estrias (MARTINS; LIMA; CORDEIRO, 2017).

Figura 1 - *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn. a) ramo florífero; b) estípula; c) folha face abaxial; d) flor estaminada; e) flor pistilada e f) fruto.



Fonte: Adaptado de Torres, 2003.

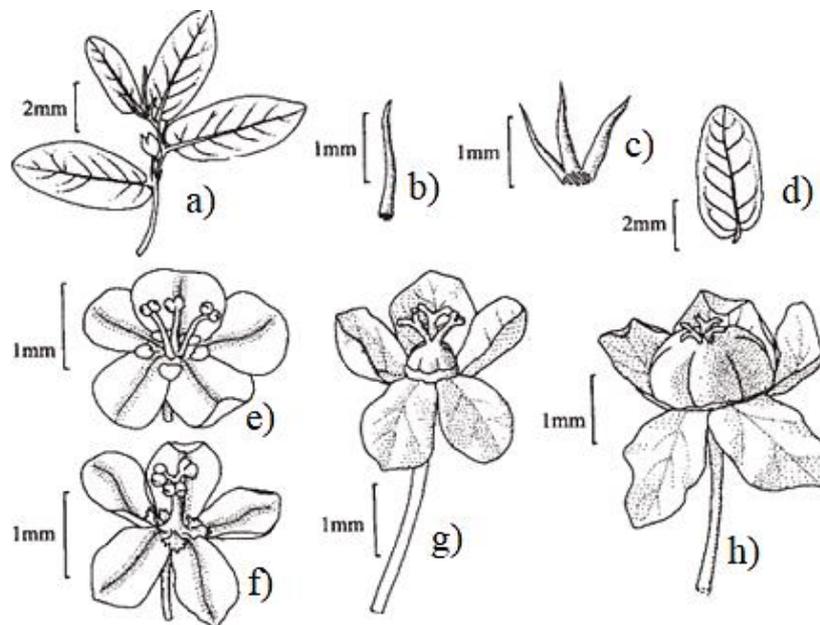
*Phyllanthus niruri* L. ocorre em toda área tropical do Continente Americano, dos Estados Unidos até a Argentina (WEBSTER, 1970). No Brasil essa espécie é encontrada em todos os Estados, em campos de cerrado e rupestres, em bordas de florestas ombrófilas densas ou mistas (SECCO *et al.*, 2013). Sua floração e a frutificação podem ocorrer em todos os meses do ano e há pouca preocupação quanto ao risco de extinção dessa espécie devido sua rusticidade (MARTINS; LIMA; CORDEIRO, 2017).

Com porte herbáceo, de 0,5 a 2 m de altura, *P. niruri*, possui caule liso, com ramificações filatóides, ramos cilíndricos e glabros. Folhas membranáceas, levemente discoloradas, com dimensões de até 12 × 6 mm, oblongas, ápice arredondado, apiculado, base assimétrica a cordada, faces adaxial e abaxial glabras, margem plana, nervação cladodrôma,

pecíolos de 1 a 1,5 mm de comprimento; estípulas de 1 a 2 mm de comprimento, estreitamente triangulares a lineares e glabras.

As inflorescências estão em címulas axilares, e geralmente são compostas por flores solitárias, brácteas lineares com 1 a 4 mm de comprimento. Flores masculinas de 2 a 3 mm de comprimento, cinco sépalas de 1,5 a 2 mm de comprimento, obovais a largamente obovais, membranáceas, três estames, filetes completamente livres, anteras com deiscência horizontal, disco 5-segmentado, pedicelo 2,5 a 4 mm de comprimento. Flores femininas de 2,5 a 3 mm de comprimento; sépalas 5, 2 a 3 mm de comprimento, obovais a largamente obovais, membranáceas; ovário ca. Com 0,5 mm de comprimento, três estiletos, 2-fidos até a metade, disco inteiro, pedicelo de 2 a 5 mm de comprimento. Cápsulas ca. 2 × 3 mm e sementes de 1 a 1,5 mm de comprimento, castanhas e verruculosas (MARTINS; LIMA; CORDEIRO, 2017).

Figura 2 - *Phyllanthus niruri* L. a) ramo florífero; b-c) variação morfológica da estípula; d) folha face abaxial; e-f) variação morfológica da flor estaminada; g) flor pistilada; h) fruto.



Fonte: Adaptado de Torres, 2003.

### 2.3 Propriedades terapêuticas de *Phyllanthus*

Diversas espécies do gênero *Phyllanthus* possuem ação farmacológica comprovada através de estudos clínicos. Porém, ainda se fazem necessários mais pesquisas que possibilitem elevar a concentração dos princípios ativos nas plantas e maximizem a

eficiência produtiva (MARQUES, 2010).

Em 2009, o Ministério da Saúde através do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos elaborou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), uma lista das principais espécies vegetais com propriedades terapêuticas relevantes para o país. Incentivando estudos e pesquisas científicas com a finalidade de tornar segura e eficaz a produção e distribuição de fitoterápicos para o tratamento de doenças (BRASIL, 2009).

Devido sua presença na RENISUS *Phyllanthus* sp. tornou-se alvo de muitas pesquisas nos últimos anos, porém sua utilização já era difundida há muitas décadas, especialmente na medicina popular brasileira. Muitas espécies do gênero *Phyllanthus* são de interesse medicinal, principalmente no tratamento de distúrbios urinários, renais, infecções intestinais, hepatite B e diabetes. (EZURUIKE; PRIETO, 2013; CALIXTO *et al.*, 1998).

*P. niruri* possui mais de 50 compostos identificados, dentre eles, alcaloides, flavonoides e lignanas. Os alcaloides encontrados têm propriedades antiespasmódicas, que facilitam a liberação de cálculos urinários através da inibição da mobilidade muscular visceral (CALIXTO *et al.*, 1998). Em estudo com ratos e humanos verificou-se que o extrato dessa espécie não reduziu o número de cristais, mas auxiliou na redução do tamanho e na agregação dos cristais na urina, comprovando o valor terapêutico de *P. niruri* como facilitador da eliminação dos cálculos renais. Também foi observada a normalização dos níveis de cálcio na urina de pacientes com hipercalciúria, um fator de risco para formação de cálculos, após a administração de extrato de *P. niruri* (MARQUES, 2010).

Para o tratamento popular de doenças do fígado, como hepatite B e icterícias, *Phyllanthus amarus* é a espécie do gênero *Phyllanthus* mais utilizada. Também é muito usada no tratamento de inflamações e, mais recentemente, têm sido observado o potencial para a redução dos níveis de açúcar no sangue de pacientes que sofrem do *Diabetes Mellitus*, e para quadros de hipertensão (ASHA *et al.*, 2014).

Estudos também indicam que *P. amarus* no pode ser um aliado na cura de cânceres de mama, mama resistente, ovário, próstata, cólon e melanoma, e o resultado demonstra ação citostática e/ou citocida (SRIVIDYA *et al.*, 1995). Além disso, também tem sido estudada como alternativa no combate ao vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), devido sua forte atividade antiviral (NOTKA *et al.*, 2003).

## 2.4 Déficit hídrico

A água compõe de 80 a 95% dos tecidos vegetais em crescimento, é o meio transportador de inúmeras substâncias solúveis e participa direta ou indiretamente de vários processos bioquímicos do metabolismo vegetal. Além disso, estima-se que para cada grama de matéria orgânica produzida pela planta seja necessário que as raízes absorvam 500 gramas de água (TAIZ; ZEIGER, 2004). Logo, a absorção de água em quantidade suficiente pelas plantas é fundamental para o seu desenvolvimento normal.

Diversos fatores podem influenciar a absorção hídrica, como condições climáticas, a capacidade do solo de reter água e das exigências de água pela planta durante os diferentes estágios de seu desenvolvimento (FRANZ, 1983). Pode-se dizer que o indivíduo está em situação estressante quando há um desvio significativo de suas condições ótimas, induzindo respostas que podem variar de acordo com a espécie, o estágio de desenvolvimento, as características genéticas da planta e as condições ambientais.

De forma geral, o estresse por déficit hídrico pode ser descrito em três etapas: na primeira, a planta tem um declínio de suas funções normais onde a taxa de fotossíntese é reduzida; na fase seguinte a planta tende a se estabilizar entrando em modo de resistência para manter-se viva durante o maior período possível e a terceira fase é a exaustão, que ocorre quando o indivíduo esgota suas reservas e entra em um estado crônico em que, caso não haja reestabelecimento das condições ótimas, levará a morte (LICHTENTHALER, 2006).

Na fase inicial do estresse hídrico causado pela baixa disponibilidade de água no solo ou pela dificuldade das raízes absorverem água, processos metabólicos são iniciados na planta para reduzir a desidratação. Esses processos geram fechamento dos estômatos, mobilização de reservas, acúmulo ou compartimentalização de solutos e antioxidantes, expressão de genes de estresse, redução ou pausa no crescimento, aceleração da senescência e queda de folhas, causando, por sua vez, alterações no metabolismo secundário das plantas submetidas ao estresse (CASALI, 2000; FERRARI; PAZ; SILVA, 2015).

Estudos feitos com Erva-de-são-joão (*Hypericum perforatum*) revelam que em situações de deficiência hídrica há um aumento na concentração de flavonóides, hipericinas e ácido clorogênico nas flores e redução na concentração de hiperforina (GRAY *et al.*, 2003). E pesquisas com cana-de-açúcar indicam que em situações de ausência hídrica prolongada as proteínas do grupo LEA (*Late Abundant Embriogenesis*) são sintetizadas para proteger outras proteínas, células e tecidos (BRITO *et al.*, 2008).

### 2.4.1 Estresse oxidativo

Radicais livres são produzidos constantemente no metabolismo celular normal ou por uma disfunção biológica. Esses radicais livres são chamados de Espécie Reativa de Oxigênio (ERO) ou de Espécie Reativa de Nitrogênio (ERN), quando o elétron desemparelhado encontra-se no oxigênio e quando o mesmo ocorre com o nitrogênio, respectivamente. As ERO são formadas durante a redução de oxigênio e participam de diversos processos celulares, como a síntese de adenosina trifosfato (ATP), crescimento, defesa celular e comunicação intercelular (OLIVEIRA; SCHOFFEN, 2010).

Contudo, as ERO podem ser danosas ao organismo se produzidas em concentrações maiores do que o sistema de proteção antioxidante é capaz de combater. O desequilíbrio pró-oxidativo / antioxidante é chamado de estresse oxidativo, processo causador de danos à células, tecidos, membranas, carboidratos e ácidos nucleicos (CELI, 2010). Devido à importância dos antioxidantes muitas substâncias com esse propósito foram sintetizadas nas últimas décadas, porém, estudos têm demonstrado relação desses antioxidantes sintéticos com o desenvolvimento de cânceres (BAKKALI *et al.*, 2008).

Neste contexto, a busca por compostos naturais que sejam capazes de equilibrar as ERO são de grande importância. Compostos fenólicos, como flavonoides, taninos, lignanas, xantonas, são destacados por seu potencial antioxidante, devido, principalmente, as hidroxilas fenólicas que agem como agentes redutores, doadores de hidrogênio (BARBOSA *et al.*, 2010).

## 2.5 Metabolismo secundário

Os compostos orgânicos metabolizados pelas células vegetais podem ser divididos em metabólitos primários e secundários. Os compostos que estão diretamente relacionados ao desenvolvimento da planta são chamados de metabólitos primários, são eles os carboidratos, proteínas, lipídeos, aminoácidos e ácidos graxos. Já os metabólitos secundários não têm função direta em processos fundamentais, como fotossíntese, respiração, síntese de carboidratos, proteínas e lipídeos, por exemplo. Entretanto, a função desses compostos é de grande importância podendo induzir respostas de defesa contra patógenos e predadores (VIZZOTTO *et al.*, 2010), atrair insetos polinizadores e ter efeitos medicinais e/ou tóxicos, são alguns exemplos (LÓPEZ, 2006).

Os estudos envolvendo produtos do metabolismo secundário tiveram início em meados do século XIX, por químicos orgânicos interessados em suas funções como medicamento, perfume, repelente e até veneno (TAIZ; ZEIGER, 2004). Inicialmente acreditava-se que os metabólitos secundários eram sobras das reações do metabolismo primário. Apenas no século XX ficou claro que o metabolismo secundário é uma especialização dos organismos para eventos específicos e que seus processos são ativados por genes (GOTTLIEB, 1996).

Sabe-se que os metabólitos secundários possuem uma forte influência do ambiente em que a planta está inserida e que a síntese desses compostos é muito afetada por fatores externos. Portanto, condições abióticas estressantes podem elevar ou reduzir a concentração dos metabólitos secundários (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Os gregos já tinham conhecimento das variações temporais que as plantas sofriam, pois a colheita de *Conium maculatum*, espécie usada para extrair o veneno cicuta era feita pela manhã quando os níveis de cicutina ou coníina estão mais altos. Essa toxina inibe o funcionamento do sistema nervoso central, e por isso era muito utilizada em ponta de flechas, porém a cicuta ganhou destaque por ter sido ingerida por Sócrates, levando-o a morte. No óleo essencial da alfavaca, *Ocimum gratissimum*, a maior concentração de eugenol, poderoso antisséptico, bactericida, antiviral e anestésico, é encontrada ao meio dia, enquanto que a menor concentração se dá ao final da tarde (SILVA *et al.*, 1999).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Preparação do experimento

O experimento foi realizado em casa de vegetação na Embrapa Agroindústria Tropical, situada em Fortaleza, Brasil (3°45'06.9"S 38°34'33.8"W), nos meses de julho e agosto de 2015. As mudas de *Phyllanthus amarus* e *P. niruri* foram produzidas a partir de sementes e cultivadas em bandejas com substrato comercial para mudas. Após 42 dias da semeadura as mudas foram transplantadas para vasos de 1,8 L, com uma planta por vaso, contendo substrato composto por areia e húmus de minhoca, na proporção 3:1. Os vasos foram dispostos sobre bancadas com espaçamento de 30 x 20 cm entre vasos e distribuídos em delineamento inteiramente casualizado (DIC).

A irrigação, por gotejamento, foi realizada diariamente até 35 dias após o transplântio das mudas, que foi realizado quando as plantas estavam bem desenvolvidas e no início da fase de floração. Ao final desse período a irrigação foi suspensa e foi coletado o material vegetal a qual foi aplicado o tratamento controle, cujas plantas não sofreram os efeitos da falta de água no solo. Os demais tratamentos foram colhidos aos 3, 5, 7 e 10 dias após a interrupção da irrigação, para avaliar o nível de estresse sofrido pelas plantas. Foram cultivadas 240 plantas no total, 120 de cada espécie.

As parcelas foram compostas por parte aérea de seis plantas, cada uma com quatro repetições. Após a coleta os materiais vegetais foram pesados em balança analítica com precisão de 0,0001 g, secos em estufa de circulação de ar forçada por 72 horas, a uma temperatura constante de 40° C e então pesados novamente para determinação da umidade. Em seguida os materiais vegetais foram triturados em moinho de facas e armazenados em sacos plásticos lacrados.

O teor de água do solo de cada vaso no momento da colheita foi determinado pelo método da estufa, no qual as amostras de solo foram pesadas em balança com duas casas decimais após a coleta das amostras, secas em um forno a temperatura constante de 105° C durante 24 horas e pesadas novamente para determinar a umidade do solo.

#### 3.2 Espectroscopia de RMN e identificação molecular

Uma amostra com 30 mg de material vegetal de cada parcela foi utilizada na análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de <sup>1</sup>H, suspensos em 600,0 µl de D<sub>2</sub>O /

sódio-3-trimetilsililpropionato (TMSP-d4) a partir da solução de reserva (0,17 mg.ml<sup>-1</sup>), sonicada durante 1 minuto e centrifugada por 5 minutos a 6000 rotações por minuto (rpm). Os sobrenadantes da solução final foram transferidos para tubos de RMN de 5 ml.

As análises de RMN foram realizadas em um espectrômetro Agilent de 600 MHz com detecção inversa de 5 milímetros (H-F / 15N-31P) e gradiente Z. Os espectros de RMN de 1H foram adquiridos utilizando a sequência de pulsos de PRESAT para a supressão de água (4,79 ppm). As amostras foram analisadas em triplicata com pulsos calibrados, 32 varreduras, 64k de pontos de domínio do tempo com uma janela espectral de 16,0 ppm, tempo de aquisição de 5,0 s e um atraso de relaxamento de 20,0 s. Como padrão interno utilizou-se TMSP-d4 (0,0 ppm), a temperatura de 298 K e os espectros foram processados aplicando a multiplicação exponencial das FID por um fator de 0,3 Hz e a transformação de Fourier de 64 k pontos. A correção de fase foi realizada manualmente e a correção de linha de base foi aplicada em toda a faixa espectral.

RMN 1H consiste na determinação da quantidade de radiação de alta frequência absorvida pelo núcleo, em um campo magnético forte, tendo como base número quântico *spin* de um hidrogênio ( $\frac{1}{2}$ ). Quando a radiação é absorvida o *spin* nuclear se alinha em direção à maior energia e, após receberem radiação de radiofrequência, volta ao seu estado original. A identificação dos constituintes das folhas de *P. amarus* e *P. niruri* foi realizada utilizando as experiências de 1H-1H COZY, 1H-13C HSQC e 1H-13C HMBC. Os resultados foram comparados com dados existentes em bancos de dados de acesso aberto e relatórios de literatura.

### 3.2.1 Análise química e quantitativa dos dados de RMN

Os dados obtidos, através da RMN de 1H, em *Phyllanthus amarus* e *P. niruri*, nos diferentes níveis de estresse hídrico, foram utilizados como base para o programa Unscrambler™ 10.4 com a finalidade de agrupar os resultados e facilitar a interpretação. Inicialmente, os valores das triplicatas de cada amostra foram centralizados por média. Os métodos quimiométricos de classificação utilizados foram: a Análise de Componentes Principais (ACP) e a Análise de Agrupamento Hierárquico (AAH).

A ACP consiste no ajuste dos eixos originais, onde os dados se encontram, para os componentes principais, do inglês *principal component*, (PC) em um gráfico bidimensional. Dessa forma é possível identificar as semelhanças e diferenças entre os dados inseridos no sistema e, principalmente, identificar a proximidade entre eles. Para AAH, o resultado foi

plotado em um dendrograma que relaciona a similaridade entre as amostras a partir da distância Euclidiana entre elas.

A fim de reduzir a dimensionalidade dos dados originais e criar uma visão geral mostrando tendências. Utilizaram-se agrupamentos isolados com um nível de confiança de 95%. Além disso, os dados foram centrados em média, para reduzir o efeito negativo dos ruídos nos espectros.

Depois, os metabólitos valina (1,07 ppm), alanina (1,50 ppm), prolina (2,11 ppm), ácido succínico (2,5 ppm), ácido cítrico (2,67 ppm), GABA (3,03 ppm), ácido málico (4,37 ppm),  $\alpha$  e  $\beta$ -glucose (5,21 e 4,64 ppm, respectivamente), sacarose (5,42 ppm), corilagina (7,06 ppm) e também a região aromática inteira (6,20 a 9,20 ppm) foram quantificadas por método de referência externo. Neste método, utilizou-se uma quantidade conhecida de solução padrão de sacarose para calibrar o equipamento.

Os possíveis erros do método e as diferenças nas concentrações entre as amostras foram estimadas estatisticamente com base nos erros analíticos do método e no desvio padrão das análises triplicadas. Os dados obtidos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) unidirecional, ao nível de significância de 5%, com o teste de Tukey e Levene's, a fim de determinar estatisticamente as variações.

### 3.2.2 Estimativa da variação da matéria orgânica total aromática

Com o propósito de obter um perfil da variação da matéria orgânica hidrogenada total utilizando os dados de RMN de  $^1\text{H}$ , apenas para os sinais na região aromática, como os prótons de alqueno, heteroaromáticos e aldeídicos. Portanto, todos os sinais entre 6,20 ppm e 9,20 ppm foram integrados. Os valores de redução são a associação de cada amostra submetida a déficit hídrico com a amostra controle para ambas as espécies de *Phyllanthus*. Os valores obtidos foram associados à quantidade de padrão interno (TMSP-d4).

### 3.3 Preparação da amostra e análise UPLC-QTOF-MS

O procedimento de extração do material para a Cromatografia Líquida de Ultra Precisão acoplada com Espectrômetro de Massas de quadrupolo-tempo de vôo (UPLC-QTOF-MS) consistiu na pesagem em balança analítica, com precisão de 0,0001 g, uma amostra de 0,05 g de material vegetal de cada parcela e em seguida foi adicionado 4 ml de hexano, agitada em vórtex por 1 min e submersa em banho de ultrassom por 20 min. Na

sequência, adicionou-se 4 ml de solução hidroetanólica, na proporção 3:7, agitada e sonicada novamente pelo mesmo tempo, em seguida as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm durante 15 min. Ao final do processo o material apresentou duas fases, hexânica (superior) e etanólica (inferior), onde 2 ml da fase inferior foi retirada e filtrada em filtro de 0,22 µm e depositadas em *vial* estéreo. Todas as extrações foram realizadas em triplicata para minimizar o erro.

A análise por Cromatografia Líquida de Ultra Precisão (UPLC) foi realizada no sistema *Acquity*, acoplado com quadrupolo / TOF, equipado com uma fonte ESI operada no modo íon positivo. A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna *Waters Acquity UPLC BEH* (150,0 x 2,1 mm, 1,7 µm) com temperatura ajustada a 40° C. Foram utilizadas como fase móvel água e acetonitrila, ambas com 0,1% de ácido fórmico. O gradiente variou de 2 a 95% de água em 15 min em um fluxo de 0,4 ml.min<sup>-1</sup> e o volume de injeção foi de 5,0 µl por amostra. O nitrogênio (N<sub>2</sub>) foi utilizado como gás de dessolvatação e a temperatura de dessolvatação foi ajustada a 350° C com uma vazão de 350 l.h<sup>-1</sup> a temperatura durante a injeção foi de 120° C. A tensão capilar foi ajustada para 3.200 V. As tensões de energia de colisão / cone foram ajustadas em 6 eV / 15 V (baixo) e 30-50 eV / 30 V (alto) para conseguir uma fragmentação suficiente. Os dados foram coletados usando modos de ionização negativos e positivos entre 100 Da e 1180 Da.

### 3.3.1 Análise quimiométrica dos dados UPLC-MS

Para compreender as variações dos produtos do metabolismo secundário desencadeadas pelos diferentes períodos de déficit hídrico, realizou-se análises quimiométricas, observando a região entre 0 (zero) e 8 min do cromatograma obtido pela análise de UPLC-MS, convertidos nos arquivos *American Standard Code for Interchange Information* (ASCII) e exportados para o programa *Unscrambler*™ X versão 10.4 para análise quimiométrica. A ACP (usando o algoritmo de decomposição de variação única) foi realizado e o parâmetro de escala de normalização com correção de linha de base (ajuste linear) foi aplicado para reduzir as diferenças de concentração e o ruído da amostra. O processamento centrado na média foi utilizado, pois forneceu uma melhor diferença entre as amostras e evitou qualquer interferência negativa do ruído.

### 3.4 Variáveis fisiológicas: estresse oxidativo e constituintes do metabolismo antioxidante

Os níveis de peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), como marcador de estresses oxidativos, foram determinados como descrito por Sergiev *et al.* (2001). Utilizou-se 0,5 g do material vegetal seco e moído, o qual foi homogeneizado em banho de gelo com 5 ml de ácido tricloroacético (TCA) a 5% (p / v) e, em seguida, centrifugou-se a 12.000 x g durante 15 minutos a 4° C. Retirou-se uma alíquota de 0,5 ml do sobrenadante e a ela adicionou-se 0,5 ml de solução tampão de fosfato de potássio (pH 7,0) e 1 ml de iodeto de potássio. A densidade óptica foi monitorada a 390 nm e o teor de  $H_2O_2$  foi dado numa curva padrão expressada em  $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ .

A peroxidação lipídica foi determinada com base na formação de malonaldeído (MDA), produto secundário da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados, que ao reagir com o ácido tiobarbitúrico (TBA) pode ser lido por espectrofotometria, com base no método descrito por Zhu *et al.* (2008). As amostras vegetais, pesando 0,05 g foram homogeneizadas em 5 ml de ácido tricloroacético (TCA) a 0,1% e centrifugado a 3000 x g a 4° C durante 10 min. O sobrenadante (75  $\mu\text{l}$ ) foi recolhido e adicionado a 300  $\mu\text{l}$  de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,5% em 20% de TCA e incubado a 95° C durante 30 min. Após a incubação, os tubos foram imediatamente resfriados em banho de gelo e centrifugados a 3000 x g durante 10 min. Mensurou-se a absorbância específica e não específica do sobrenadante a 532 nm e 600 nm, respectivamente. As espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) foram calculados utilizando o coeficiente de extinção ( $155 \text{ mmol.cm}^{-1}$ ), e expressos como nmol de MDA  $\text{g}^{-1}$ .

A atividade das enzimas antioxidantes foi determinada utilizando-se o extrato preparado seguindo protocolo modificado de Yang *et al.* (2009). As amostras liofilizadas (0,1 g) foram maceradas durante 5 min em 5 ml de solução tampão gelada (pH 8,0), contendo 0,05 M de Tris-HCl e 0,1 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), seguido por centrifugação a 12000 x g durante 15 min a 4 °C. O sobrenadante obtido constituiu o extrato enzimático para a determinação da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, APX.

A concentração de proteína em todos os extratos enzimáticos foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina bovina sérica como padrão. A cada 10  $\mu\text{L}$  de amostra, diluída ou não, 100  $\mu\text{L}$  do reagente de Bradford foram adicionados. A mistura foi deixada em repouso por 15 min, e em seguida a absorbância foi determinada a 595 nm em leitor de microplacas UV/VIS (Synergyx Mx, Biotek, EUA). A concentração de proteínas solúveis nas amostras analisadas foi determinada a partir de uma curva padrão obtida como uso de soluções de concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA). Os resultados

foram expressos em  $\text{mg g}^{-1}$  proteína.

A atividade da dismutase do superóxido (SOD) foi determinada com base na reação da riboflavina com o oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ), que na presença de luz reage com o nitro azul de tetrazólio (NBT), resultando na formação de formazana, um produto colorido monitorado espectrofotometricamente (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). A absorbância foi medida após 15 min a 560 nm e uma unidade de atividade da enzima (UA) foi definida como a quantidade de enzima necessária para causar uma redução de 50% na taxa de fotoredução do NBT (BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1971). Os resultados foram expressos como UA  $\text{mg}^{-1}$  P.

A determinação da atividade da catalase (CAT) foi feita de acordo com Beers e Sizer (1952). A diminuição do teor de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi monitorizada e quantificada utilizando o coeficiente de extinção molar ( $36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  P.

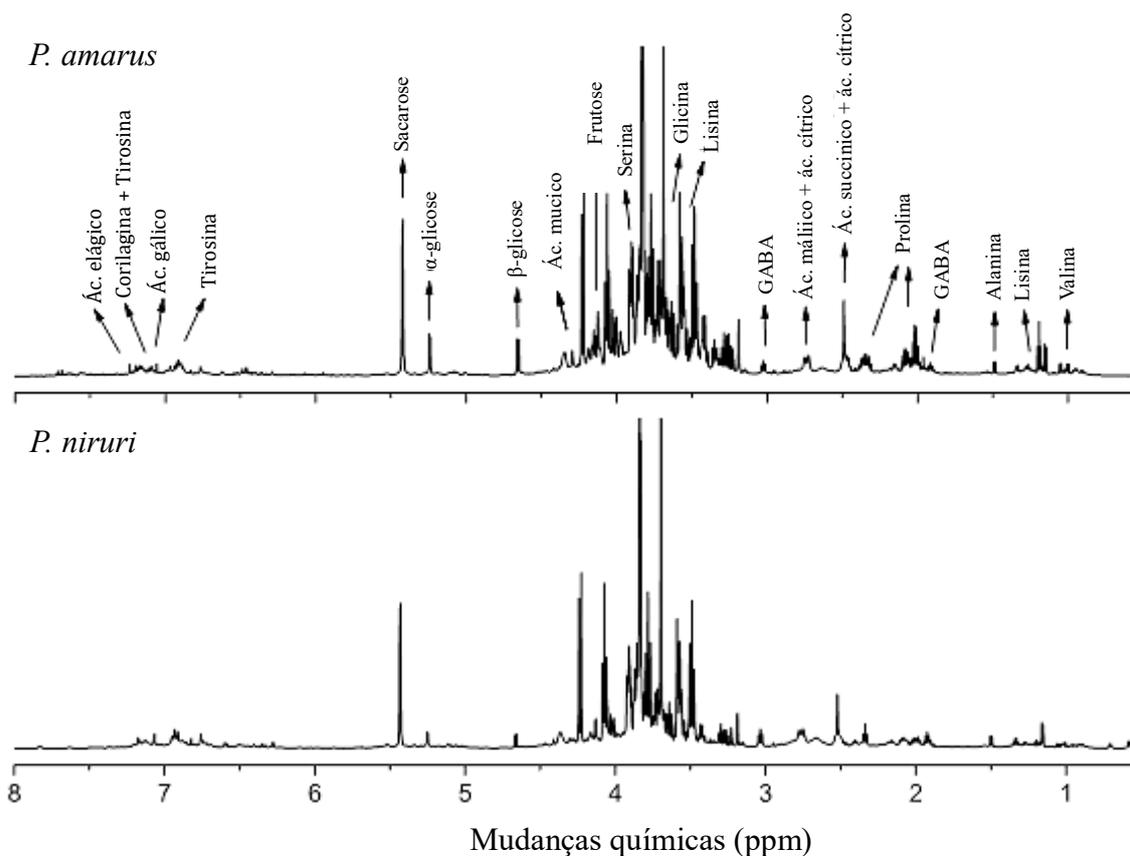
A atividade da peroxidase do ascorbato (APX,) foi realizada de acordo com Nakano e Asada (1981). A reação foi iniciada pela adição de ácido ascórbico, que é oxidado durante a degradação do  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A atividade da APX foi medida usando o coeficiente de extinção molar do ascorbato ( $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). As leituras foram realizadas a cada minuto durante 20 min, na absorbância de 290 nm e os resultados expressos em  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  P, considerando que 1 mol de ascorbato é necessário para a redução de 1 mol de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 RMN de $^1\text{H}$ e análise quimiométrica

No geral, os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Fig. 3) apresentaram compostos em três regiões diferentes: alifáticos alicíclicos; prótons alifáticos e alquílicos allylicos,  $\beta$ -substituídos (0,5-3,1 ppm); prótons alifáticos carbinólicos, olefínicos,  $\alpha$ -monossubstituídos e adissubstituídos (3.1-5,50 ppm); e alqueno, aromáticos, heteroaromáticos e prótons aldeídicos (6,20 - 9,20 ppm), o que mostra que as folhas de *Phyllanthus* contém grande quantidade de estruturas alifáticas e aromáticas. Os resultados da análise UPLC-MS foram complementares à caracterização de certos compostos orgânicos.

Figura 3 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de *Phyllanthus amarus* e *Phyllanthus niruri*, em condições normais (controle).



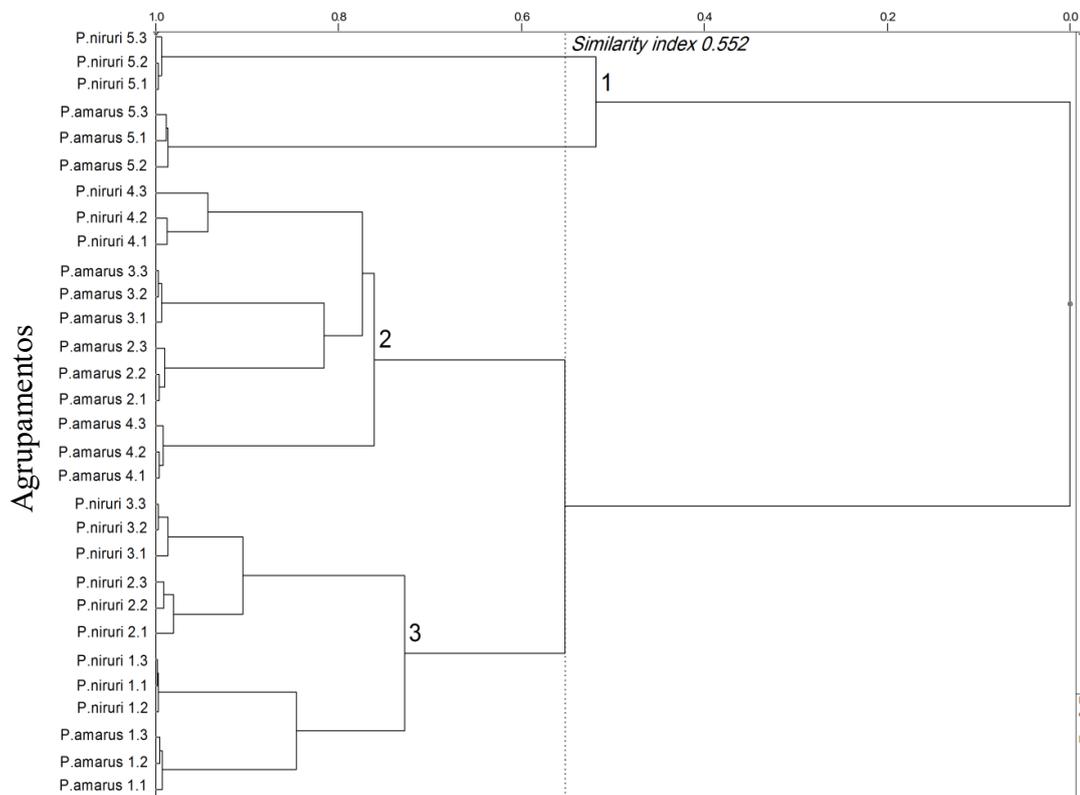
Devido à alta complexidade dos dados, foi realizada a análise quimiométrica para comparar as diferenças na composição da parte aérea das duas espécies de *Phyllanthus*, de

acordo com os cinco níveis de estresse hídrico a que foram submetidas, variando o número de dias após a suspensão da irrigação.

Inicialmente, realizou-se a Análise de Agrupamento Hierárquico (AAH), que apresentou agrupamento natural em espaço bidimensional. No dendrograma (Fig. 4), três grupos principais podem ser observados, o primeiro (1) compreende as plantas mais estressadas, ou seja, que foram submetidas ao maior período de déficit hídrico, e o agrupamento 1 pode ser dividido em dois subgrupos, *P. amarus* e *P. niruri* mais estressados; o segundo grupo (2) inclui predominantemente folhas de *P. amarus*, submetidas a nível intermediário de estresse hídrico, e o terceiro agrupamento (3) compreende, principalmente, plantas de *P. niruri* que passaram um curto período sem irrigação.

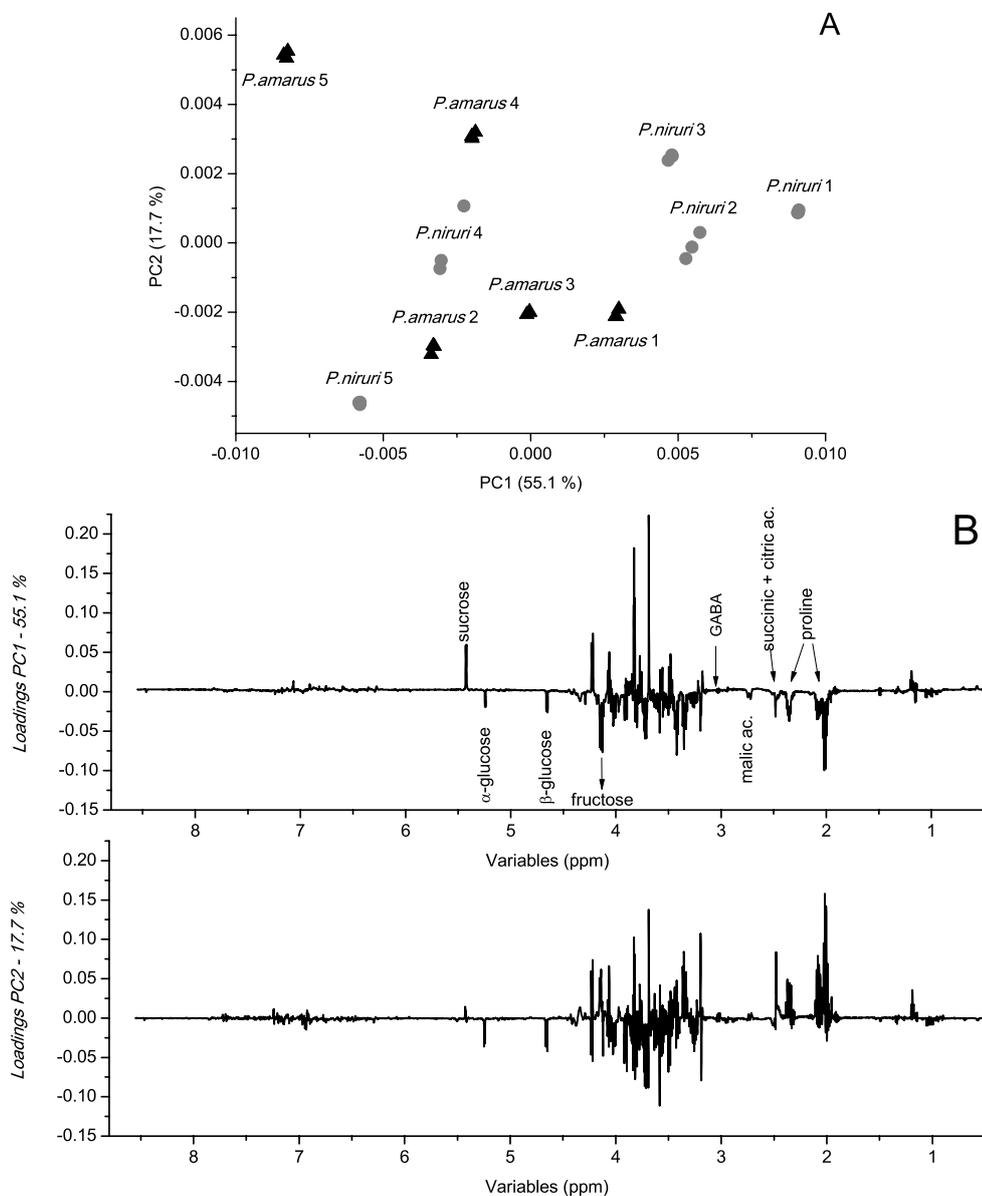
Por outro lado, no primeiro agrupamento (1), com índice de similaridade zero, formou-se um grupo composto por *P. amarus* e *P. niruri* que foram submetidos ao maior período de déficit hídrico. Isto indica que as condições de falta de água induzem mudanças no metabolismo das plantas para que se adequem as condições em que estão inseridas.

Figura 4 - Dendrograma obtido por AAH de *P. amarus* e *P. niruri* analisados por RMN de <sup>1</sup>H.



A Análise de Componentes Principais (ACP) (Fig. 5) apresenta a diversidade das amostras quanto às espécies e aos níveis de estresse hídrico a que foram submetidas (A) revela o carregamento da primeira componente principal (PC1) e a segunda componente principal (PC2). Em Fig. 5 - B) PC1 representa o eixo onde os pontos possuem máxima variância; já PC2 expressa o eixo com segunda maior variância, com a quantidade máxima de variáveis não contempladas em PC1.

Figura 5 - A) PC1 vs. PC2 para *P. amarus* e *P. niruri* submetidos a diferentes condições de estresse hídrico e B) carregamentos plotados em linhas (topo, carregamento para PC1 e carregamentos de botton para PC2).



Legenda: *P. amarus* em triângulos pretos; *P. niruri* em círculos cinza; O número 1 corresponde à planta não estressada (tratamento controle); 2, a três dias sem irrigação; 3, a cinco dias sem irrigação; 4, a sete dias sem irrigação e 5 corresponde a dez dias sem irrigação.

Basicamente, o PC1 (55,1%, Fig. 5 - A) mostra que as plantas com baixo (ou nenhum) estresse hídrico estão localizadas em pontuações positivas de PC1, enquanto as plantas estressadas por falta d'água estão localizadas em escores negativos de PC1 (para ambas as espécies). Conforme observado no gráfico da Fig. 5 - B), as quantidades mais elevadas de sacarose são encontradas na planta que não sofreram falta de água. Por outro lado, o ACP apresentou o comportamento oposto de glicose e frutose, que estão em maiores concentrações nas folhas e hastes de plantas estressadas pela falta de água no solo, indicando a conversão de sacarose em açúcares menos complexos como glicose e frutose.

Além disso, os gráficos de carregamento indicam uma maior quantidade de ácidos gama-aminobutírico (GABA), succínico, cítrico e málico além da alanina e da valina nas amostras, em valores negativos de PC1 (estresse por déficit hídrico). No entanto, o comportamento desses metabólitos foi determinado com a quantificação através de RMN, uma vez que o ACP mostra apenas tendências de variação.

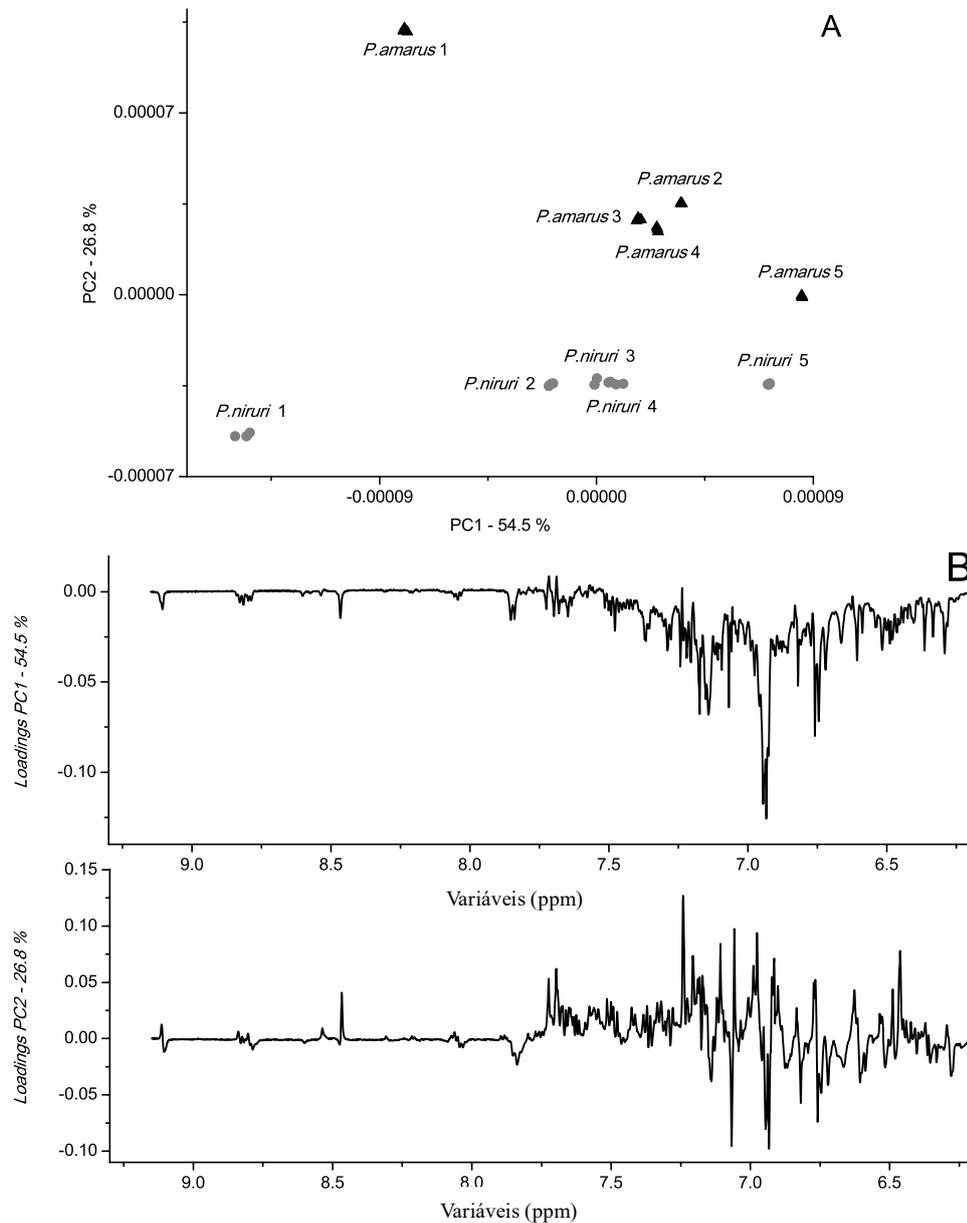
Também foi realizada uma avaliação apenas para a região alifática (0,50 a 3,17 ppm) que mostra a mesma tendência observada do ACP para todo o espectro. O eixo PC2 (17,7%) também mostra uma tendência de distinção dos tratamentos quanto à espécie e ao nível de estresse hídrico a que foram submetidos. *P. amarus* está localizado em resultados positivos de PC2 e *P. niruri* em pontuação negativa de PC2. Portanto, esse eixo indica que cada espécie responde de forma diferente às situações de baixa concentração de água no solo.

Como resultado, verificou-se a mesma tendência observada no ACP de todo o espectro para a região aromática com a discriminação das amostras quanto à espécie e ao estresse hídrico. Portanto, as espécies sob estresse hídrico mais baixo (ou nenhum) estão localizadas em pontuações negativas de PC1, enquanto as plantas submetidas a maior período com restrição de água no solo estão localizadas em resultados positivos de PC1.

A avaliação da região aromática (6,25 a 9,20 ppm – Fig. 6) também foi realizada para obter informações sobre a variabilidade de compostos aromáticos de *Phyllanthus* em diferentes condições hídricas. Como resultado, verificou-se a mesma tendência observada no ACP de todo o espectro para a região aromática com a discriminação das amostras quanto à espécie e ao grau de estresse hídrico.

De acordo com as parcelas de carga na Figura 6 (B), os escores positivos de PC1 estão relacionados com a diminuição da quantidade de compostos aromáticos e fenólicos, como os ácidos tirosina, corilagina, gálico e elagóico. Em resumo, é observada a mudança no conteúdo de vários compostos como carboidratos, aminoácidos, ácidos orgânicos e compostos fenólicos.

Figura 6 - A) Sistema de coordenadas de PC1 e PC2 e B) carregamentos plotados em linhas para região aromática das amostras de *Phyllanthus*.

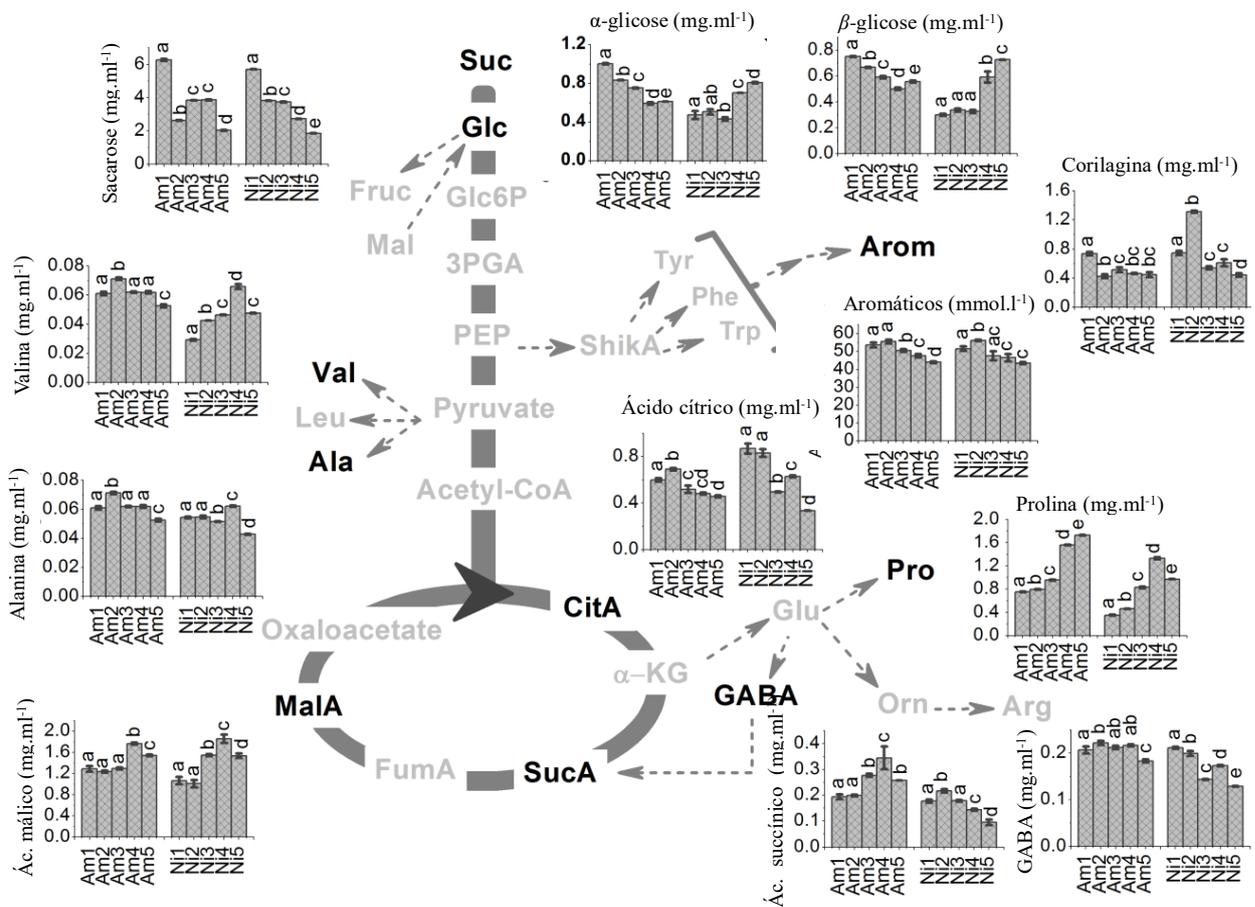


Legenda: *P. amarus* em triângulos pretos; e *P. niruri* em círculos cinza. Número 1 - planta não estressada (controle), 2 - três dias de estresse hídrico, 3 - cinco dias de estresse hídrico, 4 - sete dias de estresse hídrico e 5 - dez dias de estresse hídrico.

A falta de água no solo afeta diretamente a quantidade de água presente nos sistemas da planta e, por consequência, a fotossíntese, que é mediada pela abertura e fechamento dos estômatos (OSAKABE *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2010). Portanto, o metabolismo das plantas reconhece e transluz a condição ambiental adversa para desencadear respostas (HA *et al.*, 2014; NISHIYAMA *et al.*, 2013; OBIDIEGWU *et al.*, 2015).

Os compostos que apresentaram altas variações na análise quimiométrica e exibiram ressonâncias baixas ou não sobrepostas foram quantificados e correlacionados com as vias metabólicas da planta para compreensão dos mecanismos metabólicos induzidos pela desidratação. Além disso, foi analisada a variação da matéria orgânica aromática hidrogenada total durante o estresse hídrico (Fig. 7).

Figura 7 - Via metabólica da planta com os metabolitos relacionados ao estresse quantificados por qNMR



Legenda: Ni - *P. niruri*; Am - *P. amarus*; número 1 - planta não estressada, 2 - três dias de estresse hídrico, 3 - cinco dias de estresse hídrico, 4 - sete dias de estresse hídrico e 5 - dez dias de estresse hídrico.

Os resultados foram submetidos à análise estatística a fim de certificar as variações na quantidade dos metabolitos de interesse ao longo dos dias. Na figura 7, as letras superiores (*a, b, c, d e e*) significam que os valores diferiram ao nível de significância de 5%.

Os ácidos orgânicos são intermediários no ciclo do ácido tricarbóxico para a produção de energia, assimilação de carbono e nitrogênio, regulação osmótica (DU *et al.*,

2012) e estudos têm correlacionado o acúmulo de ácidos orgânicos com a tolerância ao déficit hídrico (LEVI *et al.*, 2011). A quantificação dos ácidos orgânicos indica que há variação em relação às espécies, em *P. amarus* é observado o acúmulo de ácido málico e succínico até sete dias de estresse (Am4) seguidos a uma queda, e o ácido cítrico inicialmente aumenta, até três dias sem irrigação (Am2) e depois diminui. Em *P. niruri*, observa-se o incremento de ácido málico até sete dias sem irrigação (Ni4), seguido pelo decréscimo; o ácido succínico atinge suas concentrações máximas aos três dias de estresse, e o ácido cítrico, que está mais concentrado em *P. niruri*, diminui ao longo dos dias sem água.

Para os aminoácidos também se observa uma variação em relação às espécies: em *P. amarus* é observado um acúmulo de valina e alanina aos três dias de estresse hídrico (Am2), seguido de um declínio nos dias seguintes. Para GABA, observa-se um declínio importante somente com dez dias de estresse hídrico (Am5) e para prolina, observa-se um aumento constante atingindo suas concentrações máximas em dez dias (Am5). Para *P. niruri* é possível observar que o teor de alanina e valina atinge seu máximo aos sete dias de déficit hídrico (Ni4) seguida de uma diminuição aos dez dias sem irrigação; Para GABA observa-se um redução significativa aos cinco dias de estresse hídrico (Ni3); e observa-se o acúmulo de prolina até sete dias sem irrigação (Ni4) seguido a uma queda.

Em geral, *P. amarus* apresentou maior conteúdo de valina, leucina, menor redução do teor de GABA e aumento da prolina. O acúmulo de aminoácidos melhora a tolerância da planta a situações de estresse (SILVENTE *et al.*, 2012; MARTINELLI *et al.*, 2007). A prolina favorece a regulação osmótica, induz vias de proteção antioxidante (ARANJUELO *et al.*, 2011), acumula-se como resposta ao déficit hídrico e, por esse motivo, está fortemente correlacionada com a tolerância ao período sem água (KRASENSKY; JONAK, 2012). Além disso, há uma relação inversamente proporcional na quantidade de GABA e o acúmulo de intermediários reativos de oxigênio (FAIT *et al.*, 2005), Portanto, o comportamento desses aminoácidos sugere que *Phyllanthus amarus* tem vantagem metabólica frente a *P. niruri*, em se tratando de períodos curtos de escassez hídrica.

Para o teor de carboidratos em *P. amarus*, observa-se que a quantidade de sacarose diminui aos três dias sem irrigação (Am2), mas aumenta ligeiramente aos cinco até os sete dias de déficit hídrico (Am3 e Am4) e diminui novamente no décimo dia (Am5). Para essa espécie, os níveis de  $\alpha$  e  $\beta$ -glicose decrescem ao longo dos sete primeiros dias de restrição hídrica e tem pequeno acréscimo aos dez dias (Am5). Em *P. niruri*, o teor de sacarose diminui continuamente, enquanto que a quantidade de glicose aumenta, principalmente nos dias finais do experimento (Ni4 e Ni5).

As plantas acumulam carboidratos para manter o turgor celular e a sacarose protege as membranas e as proteínas contra danos (KAPLAN *et al.*, 2004; LIVINGSTON *et al.*, 2009). No entanto, a limitação hídrica fez com que as plantas diminuam a taxa fotossintética e, por consequência, reduzam o metabolismo de carboidratos (LIU *et al.*, 2004).

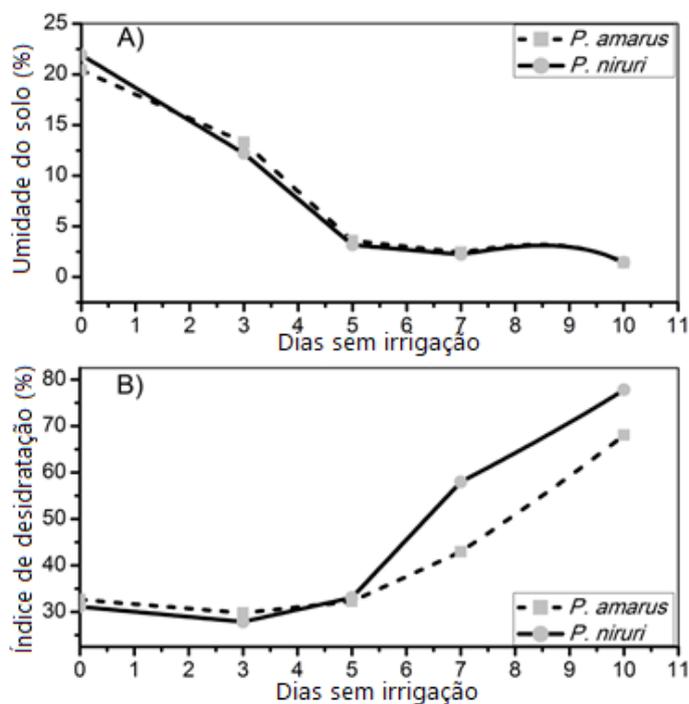
Para *P. amarus*, o teor de sacarose e glicose diminui ao longo dos dias com déficit hídrico (Fig. 7). Essa tendência pode estar correlacionada com o aumento da síntese de carboidratos para retomar seu crescimento. Em *P. niruri*, embora o conteúdo de sacarose diminua, a glicose aumenta como resposta ao estresse, mostrando que esta espécie pode ajustar o metabolismo para a regulação osmótica. No entanto, *P. amarus* apresenta um maior teor de carboidratos na planta não estressada, o que indica que esta espécie pode ser mais tolerante ao déficit hídrico do que *P. niruri*.

O conteúdo aromático apresentado como matéria orgânica aromática hidrogenada total mostrou as mesmas tendências para ambas às espécies: um ligeiro aumento com três dias de déficit hídrico (Am2 e Ni2) e em seguida ocorre a uma redução. Alguns autores relatam que há um aumento do conteúdo fenólico da planta em situações estressantes (CHUNG *et al.*, 2006) enquanto outros sugerem um declínio em longos períodos de déficit hídrico (KRÓL *et al.*, 2014; XIONG *et al.*, 2006).

Os compostos fenólicos protegem as plantas contra a oxidação através da eliminação de espécies reativas de oxigênio (ALLAKHVERDIEV *et al.*, 2008). Esses compostos são encontrados nas duas espécies de *Phyllanthus* analisadas e observa-se um ligeiro aumento do conteúdo fenólico aos três dias de déficit hídrico (Ni2 e Am2) seguido pela diminuição nos dias seguintes. Além disso, a corilagina é elevada em *P. niruri* aos três dias sem irrigação (Ni2), o que indica que períodos curtos de déficit hídrico induzem a alta produção deste composto. A corilagina é um tanino com atividades farmacológicas como antiaterogênico, ou seja, atua na regressão de placas formadas nas paredes das artérias (DUAN *et al.*, 2005), hepatoprotetor e antioxidante (KINOSHITA *et al.*, 2007)

A quantidade de água no solo afeta diretamente o desenvolvimento da planta. A determinação da umidade do solo foi semelhante para ambas às espécies, pois o substrato utilizado foi o mesmo (Fig. 8 - A). A umidade do solo diminuiu rapidamente até cinco dias após a suspensão da irrigação e manteve-se praticamente estável até o fim do experimento, indicando o esgotamento da reserva de água útil do solo cinco dias após a suspensão da irrigação.

Figura 8 - A) umidade do solo (% de peso) e B) índice de desidratação (%) de *P. amarus* e *P. niruri*.



A Figura 8 - B indica que, até cinco dias de déficit hídrico, ambas as espécies são capazes de manter um teor de água similar dentro da planta. No entanto, em períodos extensos de déficit hídrico, *P. amarus* foi capaz de manter níveis mais altos de teor de água (ou menos índices de desidratação). Este resultado corroborou com a tendência observada com as análises de metabolitos que mostram que *P. amarus* apresenta maior conteúdo de osmoprotetor (isto é, maior conteúdo de valina, leucina, menor diminuição no teor de GABA e aumento da prolina), mesmo no crescimento normal.

#### 4.2 UPLC-MS acoplado à análise quimiométrica

Para entender mais precisamente o efeito do estresse hídrico nos metabolitos secundários de *Phyllanthus amarus* e *P. niruri* separadamente, a análise multivariada também foi empregada para cada uma das espécies (Fig. 9).

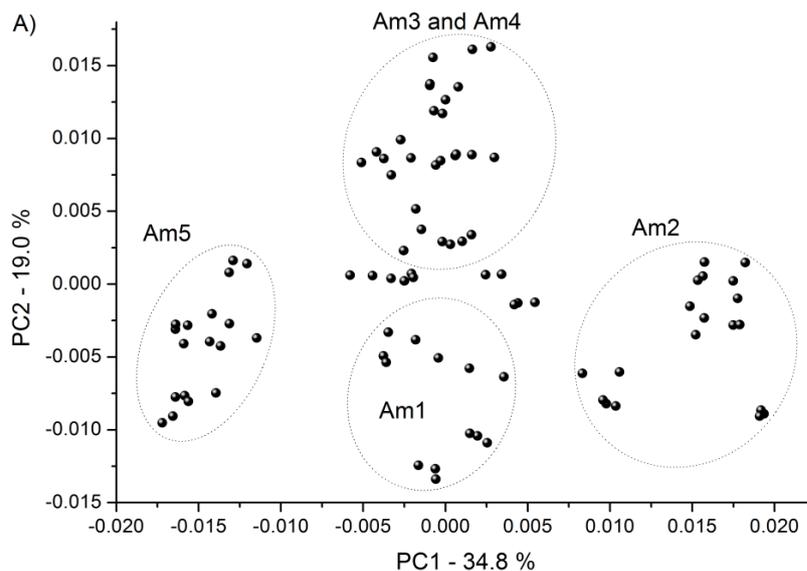
Informações importantes sobre o efeito do déficit hídrico no metabolito secundário de *P. amarus* estão presentes em PC1 e PC2. O PC1 (34,8%, Fig. 9 - A) separa principalmente a privação de água mais severa, 10 dias, (Am5) das outras amostras. De acordo com as cargas, estas amostras apresentaram maior concentração de ácido elágico e ácido tri-O-metilelágico e narirutina. Em geral, há um aumento do conteúdo fenólico após um

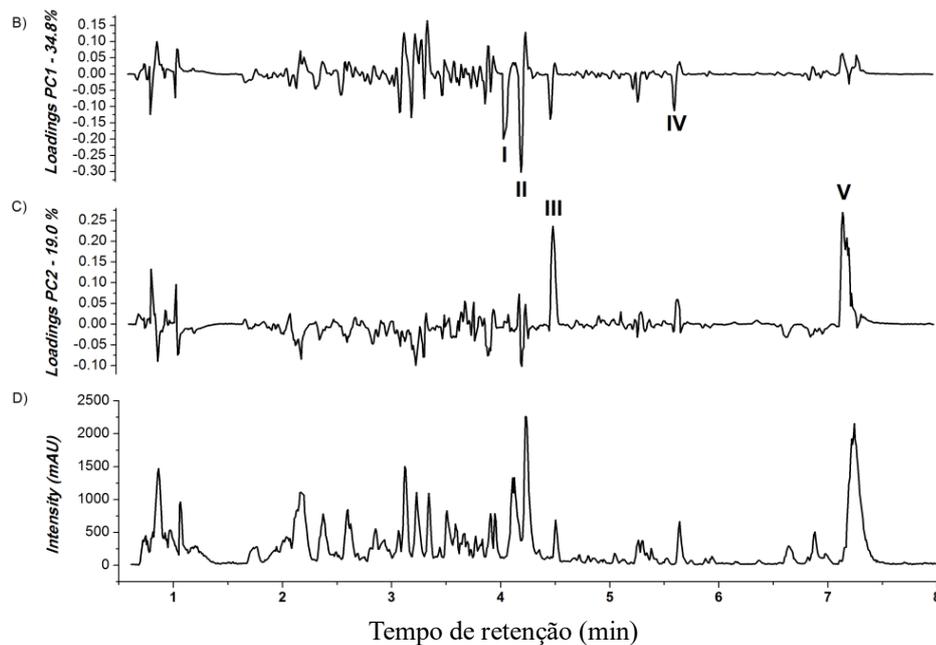
período de déficit hídrico, a fim de proteger as plantas contra a oxidação (ALLAKHVERDIEV *et al.*, 2008).

Estudos com sementes de grão-de-bico mostraram que o ácido elágico induziu redução do estresse osmótico, aumentando a capacidade antioxidante das sementes e aumentando a quantidade de osmoprotetores como prolina e glicina betaína (EL-SOUD *et al.*, 2013). Portanto, o aumento do ácido elágico e do ácido tri-O-metilelágico pode estar correlacionado com o aumento elevado da prolina (Fig. 7) de *P. amarus*, o que resulta em um aumento da tolerância ao déficit hídrico desta espécie. Além disso, o aumento de glicosídeos de flavonóides altamente modificados como quercentin-3-O-hexosídeo que apresentam atividades de eliminação radicais também contribuem para proteger as plantas contra a oxidação (NAKABAYASHI *et al.*, 2014).

Em valores positivos de PC2, que abrange 19,0% dos dados, (Fig. 9 – A e B) indicam que as amostras com cinco e sete dias de estresses hídricos (Am3 e Am4, respectivamente) apresentam maiores concentrações de narirutina (flavanonas) e niruriflavona (ácido flavone sulfônico) que são conhecidos como compostos antioxidantes (NAKABAYASHI *et al.*, 2014). Isso indica que, em resposta ao déficit hídrico, *P. amarus* está aumentando o conteúdo fenólico para proteger montagens celulares de danos oxidativos.

Figura 9 - A) ACP para *P. amarus* em diferentes períodos de estresse hídrico; B) carregamentos do eixo PC1 plotados na linha; C) carregamentos do eixo PC2 plotados na linha; D) cromatograma para destacar as variáveis (tempos de retenção).

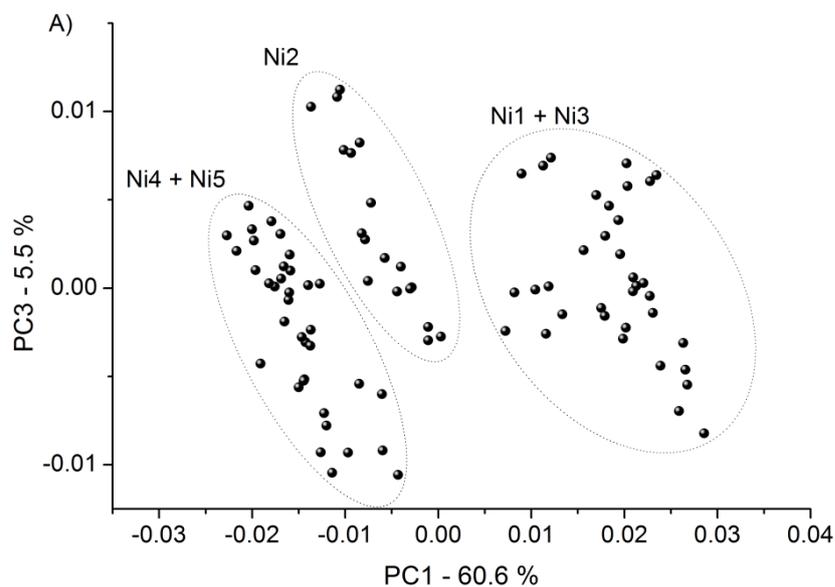


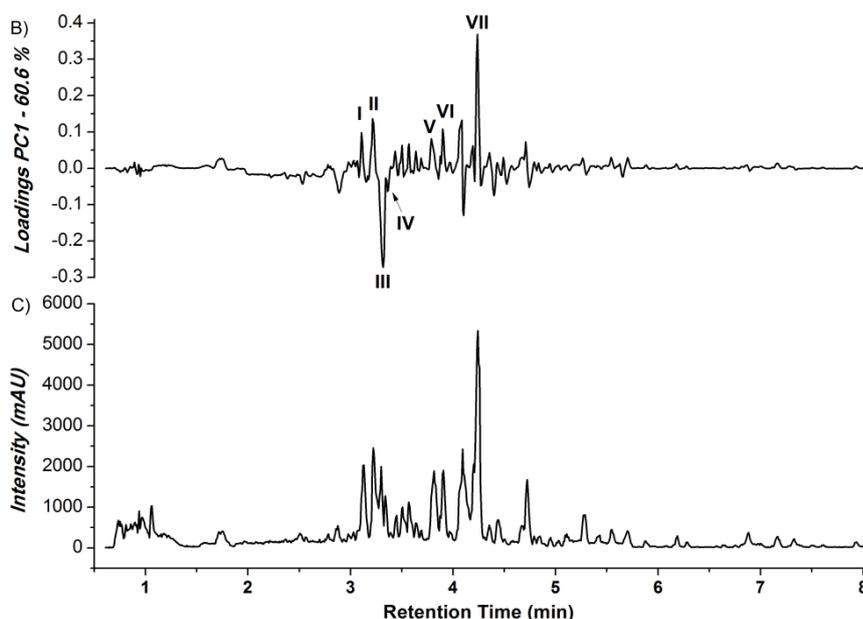


Legenda: Am - *P. amarum* número 1 - planta não estressada, 2 - três dias de estresse hídrico, 3 - cinco dias de estresse hídrico, 4 - sete dias de estresse hídrico e 5 - dez dias de estresse hídrico. Compostos: I -Ácido amílico; II- Quercetin-3- O-hexoside; III -Narirutina; IV-ácido tri-O-metilgláico; V -Niruriflavona.

A Figura 10 apresenta os resultados de ACP para *P. niruri*: A) parcelamento de pontos PC1 vs PC3; B) Cargas PC1 plotadas na linha; C) cromatograma representativo da amostra controle e os compostos mais relevantes do ACP indicados como números romanos.

Figura 10 - A) ACP para *P. niruri* em diferentes períodos de estresse hídrico; B) carregamentos de eixos PC1 plotados em linha; C) cromatograma para destacar as variáveis (tempos de retenção) responsáveis pela separação.





Legenda: Ni - *P. niruri*; número 1 - planta não estressada, 2 - três dias de estresse hídrico, 3 - cinco dias de estresse hídrico, 4 - sete dias de estresse hídrico e 5 - dez dias de estresse hídrico. Composição: I - Ácido Broncifolina Carboxílico; II - Acido Repandusínico A (isômero); III - Geraniina; IV - Corilagina; V - Orientin-2"-O-Rhamnoside; VI - Geraniina (isômero); VII- Quercetina-3-O-hexoside.

Na ACP de *P. niruri*, (Fig. 10 – A) a PC1 que abrange 60,6% dos dados, classifica as amostras em três agrupamentos: (1) em valores positivos de PC1 onde estão localizadas as amostras com nível intermediário de estresse hídrico (Ni1 e Ni3, isto é, amostra sem estresse e amostra submetida a cinco dias de déficit hídrico); (2) nos valores próximo a 0 (zero) do PC1 encontra-se a amostra que foi submetida a três dias sem irrigação (Ni2); (3) as plantas sob o estresse hídrico mais intenso (Ni4 e Ni5, isto é, amostra submetida a sete e dez dias de sem receber irrigação, respectivamente) estão localizadas em valores negativos de PC1.

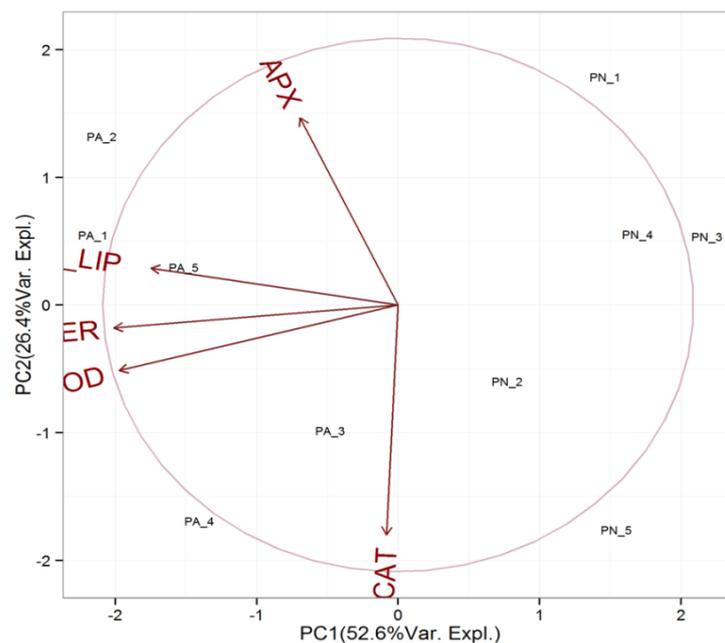
Os carregamentos de PC1 – 60,6% (Fig. 10 - B) indicam que, nas pontuações negativas de PC1 (Ni4 e Ni5) apresentam maior quantidade de geraniina (III). Além disso, observa-se que a corilagina (IV) também contribui para este eixo, mas em menor extensão. Geraniina e corilagina são elagitaninos com alta atividade antioxidante e terapêutica (THAN *et al.*, 2006; LIN *et al.*, 2008). Em *P. niruri*, a falta de água induz a produção de substâncias mais complexas como elagitaninos, derivados dos ácidos elágicos, que são uma classe importante de compostos que confere a atividade terapêutica de *P. niruri*. Portanto, esses dados corroboram a análise de qNMR (Fig. 7) que mostra que o conteúdo de corilagina é maior nas amostras expostas a três dias sem irrigação. Os dados indicam que, em condições específicas de déficit hídrico, a biossíntese de elagitaninos pode induzir a bioatividade da espécie.

### 4.3 Efeitos do estresse hídrico sobre o metabolismo oxidativo / antioxidante

Ambas as espécies de *Phyllanthus* foram avaliadas quanto às alterações fisiológicas que desenvolveram em resposta à escassez hídrica (Fig. 11). Em *P. niruri* não foram observadas alterações significativas quanto a sinais de estresse oxidativo e variáveis antioxidantes, indicando que esta espécie não é indicada para cultivos em sequeiro ou para condições em que haja períodos de falta d'água.

Enquanto isso, *P. amarus* exibiu diversas mudanças fisiológicas influenciadas pela redução da disponibilidade de água no solo. O conteúdo de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) aumentou consideravelmente em resposta ao déficit hídrico, indicando que o mecanismo de defesa antioxidante desta espécie reagiu eficientemente, uma vez que o  $H_2O_2$  é uma Espécie Reativa de Oxigênio (ERO) que em condições de estresse oxidativo atua como um sinalizador de defesa. Níveis mais elevados de  $H_2O_2$  explicam o maior grau de peroxidação lipídica observado nas membranas celulares que contribui para a desintegração do tecido. Em resposta a um desequilíbrio oxidativo, as células produzem antioxidantes de natureza química diferente como moléculas de defesa que podem eliminar ou neutralizar os radicais livres como enzimas superóxido dismutase (SOD) que recupera o superóxido radical, convertendo-o em  $H_2O_2$ , o que pode ser posteriormente neutralizado pela catalase (CAT) ou peroxidase de ascorbato (APX).

Figura 11 - ACP para *P. amarus* (PA) e *P. niruri* (PN) com déficit hídrico.



LEGENDA: APX, Peroxidase de Ascorbato; PER, Peróxido de Hidrogênio; PER\_LIP, Grau de Peroxidação Lipídica; SOD, Superóxido Dismutase e CAT, Catalase.

A produção de enzimas antioxidantes, como SOD e APX, também foi mais pronunciada em *P. amarus*. Essas enzimas atuam protegendo as células e cavidades subcelulares dos efeitos das ERO, embora o conteúdo de CAT não tenha sido influenciado pelo déficit hídrico no solo, mas pelo tempo, em ambas as espécies de *Phyllanthus*. Níveis mais elevados de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, SOD e APX corroboram com a ideia de que o sistema antioxidante enzimático é induzido em resposta ao estresse oxidativo contrabalanceando o efeito estressante da baixa umidade do solo e *P. amarus* reage melhor às mudanças ambientais que indicam um mecanismo de tolerância às situações de déficit hídrico, sendo assim, esta é mais tolerante a situações de déficit hídrico.

#### 4. CONCLUSÃO

A combinação de análises estruturais quantitativas, através da RMN, com as análises quimiométricas detalhadas, utilizando UPLC, demonstraram ser uma ferramenta poderosa para um estudo rápido da tolerância de plantas em condições de escassez hídrica. A falta de água induziu diversas alterações no metabolismo de *Phyllanthus amarus* devido a maior concentração de compostos osmoprotetores, valina e leucina são exemplos, menor redução do teor de GABA e aumento mais pronunciado de prolina, quando comparado a *P. niruri*. Isso indica que, *P. amarus* é mais apta à sobrevivência em situações de déficit hídricos mais prolongadas, considerando que o tempo máximo avaliado foi de dez dias sem irrigação. No entanto, *P. niruri* apresentou superposição de elagitaninas, como corilagina, após três dias da interrupção da irrigação. Portanto, a seca em curto prazo pode ser importante para aumentar a produção desta classe de compostos.

Este estudo pode ser estendido a outras espécies, comparando-as em relação à diversos fatores abióticos, não somente a seca. Também pode fornecer informações que aperfeiçoem as pesquisas em programas de melhoramento genético.

## REFERÊNCIAS

- ALLAKHVERDIEV, S. I. *et al.* **Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis.** *Photosynthesis Research*, 2008. v.98 (1-3), p.541-550.
- ALVES D. L; SILVA C. R. **Fitohormônios: abordagem natural da terapia hormonal.** São Paulo, SP: Atheneu, 2002. 105p.
- ARANJUELO, I. *et al.* **Plant physiology and proteomics reveals the leaf response to drought in alfalfa (*Medicago sativa* L.).** *Journal of Experimental Botany*, 2011. v.62 (2), p.111-123.
- ASHA, V. V. *et al.* **Further studies on the antihepatotoxic activity of *Phyllanthus maderaspatensis* Linn.** *Jornal of Ethnopharmacology*, Lausanne, 2004. v.92, n.1, p.67-70.
- BAKKALI, F. *et al.* **Biological effects of essential oils - a review,** *Food and Chemical Toxicology*, 2008. vol.46, n.2, pp.446-475.
- BARBOSA, K. B. F. *et al.* **Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios.** *Rev. Nutr.* [online]. 2010, vol.23, n.4, pp.629-643.
- BEAUCHAMP, C; FRIDOVICH, I. **Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels.** *Analytical Biochemistry*, v.44 (1), 1971. p. 276-287.
- BEERS JR, R.F; SIZER, I.W. **A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase.** *J. Biol. Chem.* 1952. v.195 (1), p.133-140.
- BERNSTEIN, N. *et al.* **Antiinflammatory Potential of Medicinal Plants: A Source for Therapeutic Secondary Metabolites,** *Advances in Agronomy*, 2018. v.150, p. 131-184.
- BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical Biochemistry*, 1976. v.72, (1-2), p.248-254
- BRASIL. Decreto nº 5813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 23 jun. 2006. Seção 1.
- BRASIL. **Flora do Brasil 2020 em construção.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2018. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 24 out. 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS.** Espécies vegetais. DAF/SCTIE/MS - RENISUS - 2009. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>>. Acesso em 20 out.2018.
- BRAVO, S. *et al.* **The influence of post-harvest UV-C hormesis on lycopene,  $\beta$ -carotene, and phenolic content and antioxidant activity of breaker tomatoes.** 2012. v.270, p.113-122.
- BRITO, L. K. L. F. *et al.* **Alterações no perfil de frações nitrogenadas em calos de cana-de-açúcar induzidas por déficit hídrico.** *Revista Agropecuária Brasileira*, 2008. v. 43, n. 6, p.683-690.

CALIXTO, J. B. *et al.* **A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: Their chemistry, pharmacology, and therapeutic potential.** Med Res Rev. 1998. v.18 (4), p.225-58.

CASALI, V.W.D. **Plantas medicinais e aromáticas: pós-colheita e óleos essenciais.** 2ed. Viçosa, MG: UFV. 2000. 153 p.

CASTRO, H. G. de *et al.* **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários.** 2ed. Viçosa, MG: UFV. 2004. 113p.

CELI, P. **O papel do estresse oxidativo na saúde e produção de pequenos ruminantes.** Revista Brasileira de Zootecnia, 2010. v.39, p. 348-363.

CHASE, M.W. *et al.* **When in doubt, put it in Flacourtiaceae: a molecular phylogenetic analysis based on plastid rbcL DNA sequences.** Kew Bulletin, 2002. v.57, n.1, p.141-181.

CHUNG, I.M. *et al.* **Comparison of resveratrol, SOD activity, phenolic compounds and free amino acids in *Rehmannia glutinosa* under temperature and water stress.** Environmental and Experimental Botany, 2006. v.56 (1), p. 44-53.

DU, H. *et al.* **Metabolic Responses of Hybrid Bermudagrass to Short-term and Long-term Drought Stress.** Journal of the American Society for Horticultural Science, 2012. v. 137 (6), p.411-420.

DUAN, W; YU, Y; ZHANG, L. **Antiatherogenic Effects of *Phyllanthus emblica* Associated with Corilagin and its Analogue.** Yakugaku Zasshi, v.125 (7), 2005. p.587-591.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. Revista Multiciência, Campinas, n.7, 2006.

EL-SOUD, W.A., *et al.*, **Ability of ellagic acid to alleviate osmotic stress on chickpea seedlings.** Plant Physiology and Biochemistry, v.71, 2013, p.173-183.

EZURUIKE, U. F; PRIETO J. M. **The use of plants in the traditional management of diabetes in Nigeria: Pharmacological and toxicological consideration.** Review. Journal of Ethnopharmacology, United Kingdom, 2013. v.155 (2). p.857-924.

FAIT, A; YELLIN, A; FROMM, H. **GABA shunt deficiencies and accumulation of reactive oxygen intermediates: insight from *Arabidopsis* mutants.** FEBS Letters, 2005. v.579, p.415-420.

FERRARI, E; PAZ, A; SILVA, A. C. **Déficit hídrico no metabolismo da soja em sementeiras anatecadas no Mato Grosso.** Pesquisas Agrárias e Ambientais, 2015. v. 3, n. 01, p. 67-77.

FRANZ, C. **Nutrient and water management of medicinal and aromatic plants.** Acta Horticulturae, 1983. v.132, p.203-15.

GIANNOPOLITIS, C. N; RIES, S. K. **Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants.** Plant Physiology, 1977. v.59, p.309-314.

GOBBO-NETO, L; LOPES, N. P. **Revisão Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários.** Universidade de São Paulo, 2006 *in* Quim. Nova, 2007. v.30 (2), p.374-381.

- GOTTLIEB, O. R; KAPLAN, M. A. C; BORIN, M. R. DE M. B. **Biodiversidade, um enfoque químico-biológico**. Rio de Janeiro: UFRJ, 1996. p. 267
- GRAY, D. E., et al. **Effect of Acute Drought Stress and Time of Harvest on Phytochemistry and Dry Weight of St. John's Wort Leaves and Flowers**. *Planta Med.* 2003. v.69 (11), p.1024-1030.
- HA, C.V. *et al.* **Positive regulatory role of strigolactone in plant responses to drought and salt stress**. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2014. v.111 (2), p.851-856.
- KAPLAN, F. *et al.* **Exploring the Temperature-Stress Metabolome of Arabidopsis**. *Plant Physiology*, 2004. v.136 (4), p.4159-4168.
- KATRIARCHCHI H, S. R. *et al.* **Phylogenetics of the tribe Phyllanthae (Phyllanthaceae; Euphorbiaceae sensu lato) based on ITS and plastid matk DNA sequence data**. *American Journal of Botany*, 2006. v.93 (4), p.637-655.
- KINOSHITA, S. *et al.* **Antioxidant and hepatoprotective actions of medicinal herb, Terminalia catappa L. from Okinawa Island and its tannin corilagin**. *Phytomedicine*, 2007. v.14 (11), p.755-62.
- KRASENSKY, J; JONAK, C. **Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks**. *Journal of Experimental Botany*, 2012. v.63 (4), p. 608-1593.
- KRÓL, A; AMAROWICZ, R; WEIDNER, S. **Changes in the composition of phenolic compounds and antioxidant properties of grapevine roots and leaves (Vitis vinifera L.) under continuous of long-term drought stress**. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2014. v.36 (6), p.1491-1499.
- LEVI, A. *et al.* **Metabolite and mineral analyses of cotton near-isogenic lines introgressed with QTLs for productivity and drought-related traits**. *Physiologia Plantarum*, 2011. v.141 (3), p.265-275.
- LICHTENTHALER, H. K. **The stress concept in plants: an introduction**. *Annals New York Academy of Science*, 2006. p.187-189.
- LIN, S. Y. *et al.* **Antioxidant, anti-semicarbazide-sensitive amine oxidase, and anti hypertensive activities of geraniin isolated from Phyllanthus urinaria**. *Food and Chemical Toxicology*, 2008. v.46 (7), p. 92-2485.
- LIU, C. C. *et al.* **Influence of drought intensity on the response of six woody karst species subjected to successive cycles of drought and rewatering**. *Physiologia Plantarum*, 2010. v.139 (1), p.39-54.
- LIU, F; JENSEN, C.R; ANDERSEN, M.N. **Drought stress effect on carbohydrate concentration in soybean leaves and pods during early reproductive development: its implication in altering pod set**. *Field Crops Research*, 2004. v.86 (1), p.1-13.

- LIVINGSTON, D.P; HINCHA, D.K; HEYER, A.G. **Fructan and its relationship to abiotic stress tolerance in plants**. Cellular and Molecular Life Sciences, 2009. v.66 (13), p.2007-2023.
- LÓPEZ, C. A. A. **Considerações gerais sobre plantas medicinais**. Ambiente: Gestão e Desenvolvimento, Boa Vista, 2006. v.1, p.19-27.
- LORENZI, H. E; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512p.
- MARQUES, L. C. **Phyllanthus niruri (Quebra-Pedra) no tratamento de Urolitíase: Proposta de Documentação para Registro Simplificado como Fitoterápico**. Revista Fitos. São Paulo, SP. 2010. v.5, n.03.
- MARTINELLI, T., et al., **Amino acid pattern and glutamate metabolism during dehydration stress in the ‘resurrection’ plant Sporobolus stapfianus: a comparison between desiccation-sensitive and desiccation-tolerant leaves**. Journal of Experimental Botany, 2007. v.58 (11), p.3037-3046.
- MARTINS, E. R.; LIMA, L. R. de; CORDEIRO, I. **Flora do Espírito Santo: Phyllanthus (Phyllanthaceae)**. Rodriguésia, Rio de Janeiro, v. 68, n. 5, p. 1813-1828, dez. 2017. <<http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860201768517>>. Acesso em: 16 abr. 2018.
- NAKABAYASHI, R. *et al.* **Enhancement of oxidative and drought tolerance in Arabidopsis by overaccumulation of antioxidant flavonoids**. The Plant Journal, 2014. v.77 (3), p.367-79.
- NAKANO, Y; ASADA, K. **Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidases in spinach chloroplast**. Plant and Cell Physiology, 1981. v.22, 5, p.867-880.
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. **Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010**. Journal Natural Prod, 2012. v.75, n.3, p. 311-35.
- NISHIYAMA, R. *et al.* **Arabidopsis AHP2, AHP3, and AHP5 histidine phosphotransfer proteins function as redundant negative regulators of drought stress response**. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013. v.110 (12), p.4840-4845.
- NOTKA, F; MEIER, G. R; WAGNER, F. **Inhibition of wild-type human immunodeficiency virus and reserve transcriptase inhibitor-resistant variants by Phyllanthus amarrus**. Antiviral Research, Netherlands, 2003. v.58, n.2, p.175-186.
- OBIDIEGWU, J.E. *et al.* **Coping with drought: stress and adaptive responses in potato and perspectives for improvement**. Frontiers in Plant Science, 2015. v.6, p.235-242.
- OLIVEIRA, B. E. D. et al. **Estudo Fitoquímico e avaliação da atividade antibacteriana de Phyllanthus Niruri (Quebra - Pedra) em Escherichia coli**. In: Congresso Norte e Nordeste de Pesquisa e Inovação. Anais. Palmas, TO. 2012. 5 p.
- OLIVEIRA, M. C. de; SCHOFFEN, J. P. F. **Oxidative stress action in cellular aging**. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2010. v. 53, n. 6, p. 1333-1342,
- OSAKABE, Y., *et al.*, **Response of plants to water stress**. Frontiers in Plant Science, 2014. v.5, 86, 8 p.

PALODETO, M. F. T; FISCHER, M. L. **A representação da medicação sob a perspectiva da Bioética.** Saude soc. 27 jan-mar 2018 <<https://doi.org/10.1590/S0104-12902018170831>> Acesso em: 28 out 2018.

POTTERS, G; HOREMANS, N; JANSEN, M. A. **The cellular redox state in plant stress biology a charging concept.** Plant Physiology and Biochemistry, 2010. v.48, p.292-300.

SECCO, R; CORDEIRO, I; MARTINS, E.R. **Phyllanthaceae. In: Lista de espécies da flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2013. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em 6 out 2018.

SERGIEV, A. V; MAPELLI, S. I; KARANOV, E. **The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat.** Plant, Cell & Environmental, Plant, Cell and Environment 2001. v.24, p.1337-1344.

SHARMA, P. *et al.* **Reactive oxygen species, oxidative damage and antioxidative defense mechanisms in plants under stressful conditions.** Journal of Botany, 2012, p.1-28.

SHEAD, A. *et al.* **Effects of Phyllanthus plant extracts on duck hepatitis B virus in vitro and in vivo.** Antiviral Research, 1992. v.2, n.18, p.127-38.

SILVA, J. B. P. DA *et al.* **Aplicação de análise de componentes principais para verificação de atribuições de sinais nos espectros de RMN 1H.** Rio de Janeiro - RJ *Quim. Nova*, 2005. v. 28, n. 3, p.492-496.

SILVA, M. G. V.; *et al.*, **Fitoterapia**, 1999. v.70, 134 p.

SILVA, M. J; SALES, M. **Phyllanthus L. (Phyllanthaceae) em Pernambuco, Brasil.** Acta Bot. Bras., São Paulo, v. 21, n. 1, p. 79-98, Mar. 2007. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062007000100008>>. Acesso em: 16 abr. 2018.

SILVENTE, S; SOBOLEV, A. P; LARA, M. **Metabolite Adjustments in Drought Tolerant and Sensitive Soybean Genotypes in Response to Water Stress.** PLoS ONE, 2012. v.7 (6), e38554.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul.** Porto Alegre: UFRG, 1988. 173 p.

SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P; SIMON, D. **O guia decepar chora de ervas: 40 receitas naturais para sua saúde perfeita.** Rio de Janeiro: Campus. 2001. 1.ed., 272 p.

SINGH, B. *et al.* **A new lignan and a new neolignan from Phyllanthus niruri.** Journal of Natural Products, 1989. v.52, n.1, p.48-51.

SIQUEIRA, J. M. *et al.* **Centro de Informação sobre Medicamentos, Plantas Medicinais e Tóxicas.** 11 ed. Divinópolis, MG: Ed. da UFSJ, 2012.

SOUZA, R. S. da S; MACHADO FILHO, H. de O; ANDRADE, T. M. de. **Levantamento preliminar da vegetação ruderal da cidade de João Pessoa – PB.** Revista Geonorte, Edição Especial, 2012. v. 1, n. 4, p.200-207.

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

TAIZ, L; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

THAN, N.N. *et al.* **Niruriflavone, a New Antioxidant Flavone Sulfonic Acid from *Phyllanthus niruri***, in Zeitschrift für Naturforschung B. 2006. v. 61, p. 57-60.

TORRES, D. S. C; CORDEIRO, I; GIULIETTI, A. M. **O Gênero *Phyllanthus* L. (Euphorbiaceae) na Chapada Diamantina, BA**. Acta Bot. Bras. 2003. 17(2): p. 265-278.

VEIGA JÚNIOR, V. F. *et al.* **Plantas medicinais: cura segura?** Química Nova, São Paulo, 2005. v. 28, n. 2, p. 519-528.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER, G. E. B. **Metabólitos Secundários encontrados em plantas e sua importância**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010.17 p.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S. Em **Insect-plant interactions**; BERNAYS, E. A. (1st ed., CRS Press: Boca Raton, 1989, vol. 1, cap. 4.) GERSHENZON, J.; Rec. Adv. Phytochem, 1984.

WEBSTER, G.L. **Revision of the *Phyllanthus* (Euphorbiaceae) in the continental United States**. Brittonia, 1970. v.22, p.44-76.

XIONG, L. *et al.* **Identification of Drought Tolerance Determinants by Genetic Analysis of Root Response to Drought Stress and Abscisic Acid**. Plant Physiology, 2006. v.142 (3), p.1065-1074.

YANG, Z; ZHENG, Y; CAO, S. **Effect of high oxygen atmosphere storage on quality, antioxidant enzymes, and DPPH-radical scavenging activity of Chinese bayberry fruit**. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2009. ed. 57 (1), p. 176-181.

ZAPPI, D. C. **Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil**. The Brazil Flora Group. Rodriguésia, 2015. v.66 (4), p.1085-1113.

ZHU, S. *et al.* **Effect of nitric oxide on reactive oxygen species and antioxidant enzymes in kiwifruit during storage**. Journal of the Science and Food Agriculture, 2008. v. 88, p. 2324-2331.