



**MÍRIAN APARECIDA ISIDRO DOS SANTOS**

**FOLHAS DE MANDIOCA: CARACTERIZAÇÃO  
DE COMPOSTOS FENÓLICOS, ATIVIDADES  
ANTIOXIDANTE E INSETICIDA**

**LAVRAS-MG**

**2013**

**MÍRIAN APARECIDA ISIDRO DOS SANTOS**

**FOLHAS DE MANDIOCA: CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS  
FENÓLICOS, ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E INSETICIDA**

Tese apresentada à Universidade Federal  
de Lavras, como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Agroquímica, para a obtenção do título de  
Doutor.

Orientadora  
Dra. Angelita Duarte Corrêa

**LAVRAS-MG**

**2013**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e  
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Santos, Mírian Aparecida Isidro dos.

Folhas de mandioca : caracterização de compostos fenólicos,  
atividades antioxidante e inseticida / Mírian Aparecida Isidro dos  
Santos. – Lavras : UFLA, 2013.

114 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Angelita Duarte Corrêa.

Bibliografia.

1. Mandioca - Folhas - Polifenóis. 2. Lagarta-do-cartucho -  
Bioinseticida. 3. Formigas cortadeiras - Bioinseticida. 4. Ratas. I.  
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 547.632

**MÍRIAN APARECIDA ISIDRO DOS SANTOS**

**FOLHAS DE MANDIOCA: CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS  
FENÓLICOS, ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E INSETICIDA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 15 de julho de 2013.

Dr. Chrystian Araújo Pereira	ICBN/UFTM
Dra. Luciana Lopes Silva Pereira	FACTHUS
Dra. Luciana de Paula Naves	UFLA
Dra. Luciana de Matos Alves Pinto	UFLA

Dra. Angelita Duarte Corrêa  
Orientadora

Dr. Raimundo Vicente de Sousa  
Dr. Geraldo Andrade Carvalho  
Co-orientadores

**LAVRAS – MG**  
**2013**

À minha mãe Wilma, minha irmã Miranda e ao meu amado João Paulo.

**DEDICO**

Sem vocês nenhuma conquista teria graça.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, pelo amparo nos momentos difíceis, por me dar forças para superar as dificuldades, me mostrar o caminho certo e por suprir todas as minhas necessidades...

Agradeço também pelos anjos que Ele me enviou, a saber:

A minha mãe Wilma, pois a minha formação só foi possível graças aos sacrifícios e lutas dela.

A minha irmã Miranda, que me deu muito amor, carinho, apoio e incentivo.

Ao amor da minha vida João Paulo, que foi paciente, cúmplice e tão presente em minha vida, trazendo felicidade ao meu coração todos os dias.

Ao meu cunhado Leandro, que sempre me incentivou e ajudou quando precisei.

A minha orientadora Profa. Angelita, que confiou em mim, me ensinou tantas coisas, me deu apoio, carinho e sempre esteve pronta a me ajudar.

Aos amigos Ana Paula e Anderson, que sempre me apoiaram e estiveram prontos a ajudar sempre que precisei.

Aos professores Adelir Aparecida Saczk, Geraldo Andrade Carvalho e Raimundo Vicente de Sousa que muito contribuíram, abrindo as portas de seus laboratórios, emprestando equipamentos e transmitindo seus conhecimentos.

Sem vocês, eu não teria chegado até aqui.

Muito obrigada!

Deus abençoe a todos!

*Alegrem-se sempre. Orem continuamente. Em tudo dai graças, porque esta é a vontade de Deus em Cristo Jesus para convosco.*

1 Tessalonicenses 5:16-18

## RESUMO

Os objetivos neste trabalho foram caracterizar os compostos fenólicos e avaliar as atividades antioxidante e inseticida da farinha de folhas de mandioca (FFM). Folhas maduras de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz cv. Pão da China) foram coletadas aos 12 meses de idade da planta e transportadas ao laboratório. As folhas foram lavadas em água e em seguida colocadas em estufas com circulação de ar para secagem por 48 horas, à temperatura entre 30°C e 35°C. Após secagem, as folhas foram moídas para a obtenção da FFM. A caracterização dos compostos fenólicos foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência em três extratos diferentes: metanol 50%, metanol PA e etanol 50%/acetona 70%. Para a avaliação da atividade antioxidante e hepatoprotetora, as ratas receberam doses intraperitoneais de tetracloreto de carbono e doses diárias do extrato etanólico/acetona em diferentes concentrações, por gavagem. Avaliou-se os marcadores de função hepática, as enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama glutamil transferase (GGT), além da peroxidação lipídica, determinação da concentração de albumina e proteínas séricas, lipídeos totais no fígado e análise histopatológica. A atividade inseticida foi testada incorporando-se o extrato metanólico da FFM na dieta, a qual foi exposta à lagartas de *Spodoptera frugiperda*, a fim de se avaliar as características biológicas. A atividade subletal do extrato também foi avaliada após a emergência dos insetos. Além disso, o extrato metanólico foi solubilizado e aplicado em formigas cortadeiras *Atta sexdens* Rubropilosa. Foram encontrados seis compostos fenólicos nos extratos da FFM: ácido gálico, galocatequina, catequina, ácido clorogênico, epigalocatequina e ácido meta cumárico, sendo o extrato metanólico 50% o que revelou a presença do maior número destes compostos. Entre os fenólicos da FFM, independente do extrato, a catequina foi o majoritário. O extrato etanólico/acetona demonstrou ação hepatoprotetora, diminuindo os níveis de AST, ALT, GGT, peroxidação lipídica e aumentando os índices de albuminas e proteínas totais. Já o extrato metanólico PA reduziu a sobrevivência das formigas e das lagartas, além de apresentar efeitos como a redução no número de ovos e aumento no tempo necessário ao desenvolvimento de *S. frugiperda*.

Palavras-chave: Folhas de *Manihot esculenta*. Extrato. Polifenóis. Atividade antioxidante. Atividade inseticida.



## ABSTRACT

The objectives of this study were to characterize the phenolic compounds and antioxidant activities and assess the insecticide of cassava leaves flour (CLF). Mature leaves of cassava (*Manihot esculenta* Crantz cv. Loaf China) were collected at 12 months of age of the plant and transported to the laboratory. The leaves were rinsed in water and then placed in ovens with forced air drying for 48 hours at a temperature between 30°C and 35°C. After drying, the leaves were milled to obtain the CLF. The characterization of phenolic compounds was performed by high performance liquid chromatography in three different extracts: 50% methanol, methanol, and ethanol 50%/acetone 70%. To evaluate the antioxidant and hepatoprotective activity, the rats received intraperitoneal doses of carbon tetrachloride and daily doses of ethanol extract / acetone at different concentrations, by gavage. We assessed markers of liver function enzymes aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), gamma glutamyl transferase (GGT), and lipid peroxidation, determining the concentration of albumin and serum protein, total lipids in the liver and analysis Histopathological. Insecticidal activity was tested by incorporating the methanolic extract of the CLF in the diet, which was exposed to *Spodoptera frugiperda* in order to evaluate the biological characteristics. Sublethal activity of the extract was also evaluated after the emergence of insects. Moreover, the methanol extract was solubilized and applied in Atta leaf cutter ants. We found six phenolic compounds in extracts of CLF: gallic acid, gallic acid, gallic acid, gallic acid, gallic acid, and gallic acid. The 50% methanol extract which revealed the presence of many of these compounds. Among the phenolic CLF, independent extract, catechin was the majority. The ethanol extract / acetone showed hepatoprotective, decreasing the levels of AST, ALT, GGT, lipid peroxidation and enhancing the levels of albumin and total protein. Already methanol extract PA reduced the survival of ants and caterpillars, and present effects such as reduction in the number of eggs and increase the time needed for the development of *S. frugiperda*.

Keywords: Leaves of *Manihot esculenta*. Extract. Polyphenols. Antioxidant activity. Insecticidal activity.

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b>	
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1</b>	<b>Compostos fenólicos.....</b>	<b>14</b>
<b>2.1.1</b>	<b>Taninos.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Flavonoides.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2</b>	<b>Ação antioxidante.....</b>	<b>16</b>
<b>2.3</b>	<b>Lagarta-do-cartucho .....</b>	<b>20</b>
<b>2.4</b>	<b>Formigas cortadeiras .....</b>	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>24</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>25</b>
	<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGOS.....</b>	<b>30</b>
	<b>Artigo 1 - Farinha de folhas de mandioca: extração, caracterização e atividade antioxidante dos compostos fenólicos.....</b>	<b>31</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>42</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>52</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>53</b>
	<b>Artigo 2 - Antioxidant and hepatoprotective action of cassava leaf flour extract against injury induced by CCl<sub>4</sub> in rats.....</b>	<b>59</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>61</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL AND METHODS.....</b>	<b>63</b>
<b>3</b>	<b>RESULTS AND DISCUSSION.....</b>	<b>69</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>78</b>
	<b>REFERENCES.....</b>	<b>79</b>
	<b>Artigo 3 - Extrato metanólico de folhas de mandioca como alternativa ao controle da lagarta-do-cartucho e de formigas cortadeiras.....</b>	<b>84</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>86</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>88</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>93</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>103</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>104</b>
	<b>APÊNDICE.....</b>	<b>112</b>

## **PRIMEIRA PARTE**

### **APRESENTAÇÃO**

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de artigos, os quais se encontram no item artigos.

As referências bibliográficas referem-se somente as citações que aparecem no referencial teórico.

Cada artigo está estruturado de acordo com as normas das revistas científicas escolhidas para a submissão ou publicação do mesmo.

## 1 INTRODUÇÃO

Um grande número de substâncias orgânicas tem sido fornecido pela natureza, sendo os vegetais os principais contribuintes, biossintetizando os mais variados tipos de estruturas moleculares. As plantas desenvolveram mecanismos de defesa química para a sua sobrevivência, ao longo do processo evolutivo, com o desenvolvimento de rotas biossintéticas, conhecidas como metabolismo secundário.

Metabólitos secundários são as substâncias produzidas a partir de vias biossintéticas diversas, influenciando as interações ecológicas entre a planta e o meio ambiente. Esses compostos conferem vantagens adaptativas às plantas, atuam como agentes de defesa combatendo organismos patogênicos, insetos fitófagos, herbívoros predadores e agentes de competição para modificação do comportamento germinativo e do crescimento de espécies vegetais estranhas, entre outras funções. Entre os compostos produzidos pelo metabolismo secundário, encontram-se os compostos fenólicos.

Sabe-se que as folhas de mandioca podem exercer um importante papel na nutrição humana e animal, uma vez que são fontes de proteínas, ricas em minerais e vitaminas, porém, poucos estudos são encontrados na literatura quanto aos compostos fenólicos, envolvendo praticamente, apenas relatos do seu teor. Além disso, a busca por alimentos funcionais, fontes naturais de substâncias antioxidantes e formas eficientes de extração dessas substâncias tem sido alvo de intensas pesquisas.

Considerando a elevada proporção de resíduos folhosos provenientes da cultura da mandioca, a importância da utilização de compostos de origem natural na terapêutica, em especial os fenólicos, e a inexistência de estudos de identificação destes compostos na farinha de folhas de mandioca, torna-se relevante estudá-los.

A caracterização e quantificação dos constituintes fenólicos da farinha de folhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) trará contribuição significativa para o esclarecimento do seu potencial benéfico ou tóxico. Existem relatos na literatura de que os compostos fenólicos são frequentemente considerados antinutricionais por formarem complexos com proteínas, amido e enzimas digestivas, causando uma redução no valor nutritivo dos alimentos. Em contrapartida, as ações benéficas como antioxidante e anticarcinogênica destes compostos no organismo humano tem sido amplamente estudadas e comprovadas.

Os compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica *in vitro*. Além disso, são inúmeros os esforços na descoberta de novos produtos para uso em alternativa aos pesticidas existentes e com isso a busca por princípios ativos de plantas contra insetos-praga tem se intensificado, já que, muitas vezes, o método de controle químico pode se mostrar ineficiente, além de causar uma série de efeitos adversos ao ambiente.

Portanto, os objetivos neste trabalho foram a identificação e quantificação dos compostos fenólicos da farinha de folhas de mandioca, a realização de ensaios biológicos com ratas para estudar a atividade antioxidante e hepatoprotetora destes compostos, bem como o estudo da sua atividade inseticida.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

A mandioca, *Manihot esculenta* Crantz, é uma planta perene, arbustiva, pertencente à família Euforbiaceae. A parte mais importante da planta é a raiz, que é rica em fécula (amido), utilizada na alimentação humana e animal ou como matéria prima para diversas indústrias (FRAIFE FILHO; BAHIA, 2006).

As raízes de mandioca têm sua produção dirigida tanto para consumo direto como para indústria de transformação, onde são utilizadas na elaboração de diversos produtos como farinha de mesa comum, farinha d'água, farinha seca, goma de tapioca, polvilho doce e azedo, mandioca congelada, minimamente processada, *chips* (CARDOSO et al., 2001; FERREIRA NETO; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2003).

Além da importância da raiz de mandioca como alimento, as folhas, consideradas um subproduto da colheita da raiz, possuem elevada concentração de  $\beta$ -caroteno, minerais e proteínas (NASSAR et al., 2007). Nas folhas da mandioca as principais substâncias consideradas antinutritivas e/ou tóxicas são: cianeto, compostos fenólicos, nitrato, ácido oxálico, saponinas, hemaglutinina e inibidores de tripsina (MELO et al., 2007; WOBETO et al., 2007). Porém, estas substâncias podem ocasionar efeitos tóxicos dependendo da quantidade consumida, ou então podem trazer benefícios, dependendo da substância e das circunstâncias, por isto, atualmente são denominadas de compostos bioativos. As folhas de mandioca apresentam teor de compostos fenólicos que variam de  $4,72 \pm 0,64$  a  $6,37 \pm 4,11$  g 100 g<sup>-1</sup> para diferentes cultivares e processamentos (CORRÊA et al., 2004; MELO et al., 2007).

Segundo Melo et al. (2007), muitos estudos têm sido realizados com folhas de mandioca, objetivando propiciar níveis baixos de substâncias antinutritivas e/ou tóxicas. Sabe-se que a forma de secagem das folhas, a idade da planta e a própria cultivar têm grande influência tanto sobre os teores de

nutrientes quanto no de compostos bioativos (CORRÊA et al., 2004; SIMÃO et al., 2013).

## **2.1 Compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos ou polifenóis estão amplamente distribuídos no reino vegetal e nos microrganismos, fazendo também parte do metabolismo animal. No entanto, os animais em princípio são incapazes de sintetizar o anel aromático, e os compostos fenólicos produzidos em pequena quantidade pelos mesmos, utilizam o anel benzênico de substâncias presentes na dieta alimentar (SIMÕES et al., 2004). Portanto, os compostos fenólicos são majoritariamente obtidos pelos animais e humanos através da dieta alimentar.

Os polifenóis abrangem uma classe de compostos que inclui uma grande diversidade de estruturas simples e complexas. São metabólitos secundários largamente distribuídos na natureza, que participam de mecanismos de defesa das plantas, protegendo-as contra ataque de bactérias, vírus, fungos e outros, semelhante à função exercida pelo sistema imunológico nos animais e humanos, sendo consumidos através de dieta alimentar. São descritos como fenóis, os ácidos fenólicos e derivados, ligninas, taninos e flavonoides, os quais estão presentes nos alimentos de origem vegetal como folhas, cereais, leguminosas, frutas em geral e bebidas como chás, café e vinho tinto. Duas rotas metabólicas básicas estão envolvidas na síntese de compostos fenólicos: a rota do ácido chiquímico e a do ácido mevalônico (Figura 1) (SCHENKEL; GOSMANN; ATHAYDE, 2007; TAIZ; ZEIGER, 2004).

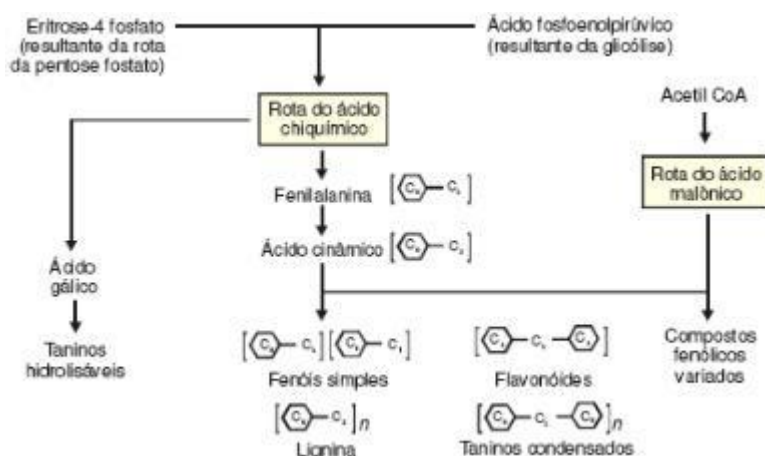


Figura 1 Biossíntese de compostos fenólicos (TAIZ: ZEIGER, 2004)

Os compostos fenólicos como lignina, flavonoides e taninos encontram-se entre as classes de metabólitos secundários de plantas com reconhecida atividade inseticida, sendo que tais compostos são conhecidos por conferirem proteção à planta contra a herbivoria (SCHALLER, 2008).

São inúmeros os relatos na literatura de trabalhos que atribuem atividade inseticida aos compostos fenólicos, como exemplo, pode-se citar os trabalhos de Hoffmann-Campo et al. (2006) e Mallikarjuna et al. (2004) que constataram que entre as variadas classes de metabólitos secundários produzidos por rubiáceas, estão presentes os compostos fenólicos, que se mostram ativos contra lepidópteros.

### 2.1.1 Taninos

O termo tanino foi primeiramente usado para descrever compostos que poderiam ser utilizados no processamento da pele animal, processo conhecido como curtimento. Os taninos ligam-se às moléculas de colágeno da pele dos



animais, aumentando sua resistência ao calor, à água e aos microrganismos (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Seus efeitos prejudiciais na dieta parecem estar relacionados com suas interações com proteínas alimentares, formando complexos responsáveis pelo comprometimento do crescimento, baixa digestibilidade proteica e aumento do nitrogênio fecal. Seus efeitos na saúde humana ainda são questionáveis devido à limitação de estudos nessa área, mas é importante considerar que o tanino também apresenta uma forte ação antioxidante que provavelmente poderá ser mais explorada em relação aos estudos na área de conservação de alimentos e ação no organismo humano.

Os taninos são classificados de acordo com sua estrutura química em dois grupos: hidrolisáveis e condensados. Os primeiros são sintetizados a partir do ácido gálico (rota do ácido chiquímico), incluindo os galitaninos e os elagitaninos, polímeros derivados dos ácidos gálico e elágico, respectivamente. Este grupo de taninos é comumente utilizado para a curtição de couros. Por outro lado, os taninos condensados, juntamente com os flavonoides são sintetizados a partir de duas rotas biossintéticas: a do ácido chiquímico e a do acetil CoA, via ácido mevalônico, e estão presentes na fração fibra alimentar de diferentes alimentos, podendo ser considerados indigeríveis ou pobremente digeríveis (CARNEIRO et al., 2001; MELO; GUERRA, 2002).

### **2.1.2 Flavonoides**

De acordo com Kuskoski et al. (2004) e Volp et al. (2008), os flavonoides constituem uma grande classe de substâncias fenólicas e estão presentes na maioria dos tecidos vegetais. Constituem um grupo de pigmentos vegetais amplamente distribuídos na natureza, que dão cor a folhas, flores e

frutos, além de desempenhar função de defesa, protegendo contra irradiação ultra violeta (UV) e outras.

Os flavonoides são subclassificados em seis subgrupos principais: flavonas, (como por exemplo, apigenina e lupeolina), flavonóis (quercetina e miricetina), catequinas ou flavanóis (epicatequina e galocatequina), flavanonas (naringenina e hesperitina), antocianinas (cianina e pelargonina) e isoflavonas (genisteína e daidzeína) (VOLP et al. 2008). Os flavonoides podem estar na forma livre ou como glicosídeos. A estrutura de suas agliconas consiste de dois anéis aromáticos conectados por um anel pirano.

A respeito da atividade inseticida de flavonoides sobre lepidópteros, pode-se citar as flavonas isoladas de *Gnaphalium affine* D. Don. (Asteraceae), as quais foram tóxicas a *Spodoptera litura* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae) (MORIMOTO et al., 2003).

Sua estrutura química permite a ocorrência de um grande número de transformações químicas como hidroxilação, metilação, acilação, glicosilação, entre outras, o que justifica a grande diversidade estrutural desses compostos (LOPES; NAGEM; PINTO, 2000).

## **2.2 Ação antioxidante**

A partir de 1980, o interesse em encontrar antioxidantes naturais para o emprego em produtos alimentícios ou para uso farmacêutico, aumentou consideravelmente, com o intuito de substituir antioxidantes sintéticos, os quais têm sido restringidos devido ao seu potencial carcinogênico, bem como pela comprovação de diversos outros males como: aumento do peso do fígado e significativa proliferação do retículo endoplasmático (MELO; GUERRA, 2002; YILDRIM; MAVI; KARA, 2002; ZHENG; WANG, 2001).

Antioxidantes são compostos que podem retardar ou inibir a oxidação de lipídios ou outras moléculas, evitando o início ou a propagação das reações em cadeia de oxidação. Em geral, existem duas categorias básicas de antioxidantes: os naturais e os sintéticos (BRENNNA; PAGLIARINI, 2001; ZHENG; WANG, 2001).

Diversos estudos têm demonstrado que o consumo de substâncias antioxidantes na dieta diária, pode produzir uma ação protetora efetiva contra os processos oxidativos que naturalmente ocorrem no organismo. Foi descoberto que uma série de doenças entre as quais câncer, arterosclerose, diabetes, artrite, doenças do coração, podem estar ligadas aos danos causados por formas de oxigênio extremamente reativas denominadas de “substâncias reativas oxigenadas” ou simplesmente espécies reativas ao oxigênio (ERO). Estas substâncias também estão ligadas com processos responsáveis pelo envelhecimento do corpo. Os mecanismos endógenos de defesa (ou mediadores de redox tais como: superóxido dismutase, catalase, peroxidase e metaloproteínas) podem ser auxiliadas favoravelmente com a introdução de antioxidantes na dieta (BRENNNA; PAGLIARINI, 2001; YILDRIM; MAVI; KARA, 2002).

As ERO são as várias formas de oxigênio ativado, entre as quais se incluem os denominados radicais livres. Nos organismos vivos, as várias formas de ERO podem ser constituídas de diversas maneiras. Por exemplo, como fontes exógenas produtoras de radicais livres tem-se a fumaça do tabaco, radiações ionizantes, solventes orgânicos e pesticidas (YILDRIM; MAVI; KARA, 2002).

O tetracloreto de carbono é uma potente droga hepatotóxica, a qual é metabolizada no fígado pelo complexo de enzimas oxidativas denominado complexo enzimático citocromo P-450. Esse processo oxidativo gera o radical triclorometil (-CCl<sub>3</sub>), sendo que parte deste gera o radical triclorometil-peroxil (-O<sub>2</sub>CCl<sub>3</sub>). A seguir, ocorre uma série de processos bioquímicos e secundários,

que são os últimos responsáveis pelas consequências patológicas do  $\text{CCl}_4$  (LEE et al., 2004; OZERCAN et al. 2006).

Os lipídeos das membranas celulares, formadas em grande parte por ácidos graxos poliinsaturados, podem sofrer alterações oxidativas e perder a sua funcionalidade através de alterações nos mecanismos de homeostase celular. A propagação em cadeia da peroxidação lipídica forma compostos reativos com o oxigênio, ampliando o seu dano. Esta agressão interfere em importantes mecanismos celulares, incluindo expressão gênica e sistemas enzimáticos, entre outros (LEE et al., 2004).

A atividade antioxidante (AA) de compostos fenólicos ocorre principalmente devido às suas propriedades de óxido-redução, as quais podem desempenhar um importante papel na neutralização de radicais livres (BRENNAN; PAGLIARINI, 2001; ZHENG; WANG, 2001).

Os compostos fenólicos apresentam um amplo espectro de propriedades medicinais, tendo ações comprovadas como antialérgicos, anti-inflamatórios, antibacterianos, anti-trombóticos, efeitos cardio-protetores, vasodilatadores e principalmente como antioxidantes (BALASUDRAM; SUNDRAM; SAMMAR, 2006), mostrando amplo campo de aplicação para os fenólicos da farinha de folhas de mandioca (FFM).

Como exemplo da AA de compostos fenólicos, pode-se citar as catequinas presentes nas plantas, que são poderosos antioxidantes inibindo os danos causados ao DNA pelas ERO, a imunossupressão e a inflamação cutânea induzida pelos raios UV (GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007).

A presença de compostos fenólicos, tais como flavonoides, ácidos fenólicos, antocianinas, além dos já conhecidos vitaminas C, E e carotenoides contribuem para os efeitos benéficos de alimentos (AJAIKUMAR, 2005; SILVA et al., 2004).

Estudos têm demonstrado que fenólicos naturais possuem efeitos significativos na redução do câncer, e evidências epidemiológicas demonstram correlação inversa entre doenças cardiovasculares e consumo de alimentos fonte de substâncias fenólicas, possivelmente por suas propriedades antioxidantes (KARAKAYA, 2004; NINFALI et al., 2005).

Os flavonoides e os ácidos fenólicos são os que mais se destacam no grande grupo de compostos fenólicos e são considerados os antioxidantes mais comuns de fontes naturais (KARAKAYA, 2004).

Grande ênfase tem sido dada à identificação e purificação de novos compostos com atividade antioxidante, oriundos de fontes naturais, que possam agir sozinhos ou sinergicamente com outros aditivos, como uma forma de prevenir a deterioração oxidativa de alimentos e restringir a utilização dos antioxidantes sintéticos (SHAHIDI; ALASALVAR; LIYANA-PATHIRANA, 2007).

Os ácidos fenólicos, por exemplo, são compostos que possuem potencial antioxidante bem caracterizado. Um estudo realizado em ratos com senescência acelerada alimentados com dieta suplementada com ácido gálico, mostrou que além do restabelecimento da atividade das enzimas antioxidantes catalase e glutatona peroxidase, houve redução do nível de peroxidação lipídica, levando à diminuição significativa da quantidade de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no fígado, cérebro e rim (LI et al., 2005).

### **2.3 Lagarta-do-cartucho**

Os extratos de plantas vêm sendo estudados como uma alternativa ao uso de inseticidas sintéticos. As características de produtos naturais, de baixa toxicidade e persistência, fazem com que os extratos vegetais sejam associados a um menor impacto ambiental (COSTA; SILVA; FIUZA, 2004).

Nesse contexto, inúmeros insetos-praga se destacam por serem de difícil controle por meio do uso de pesticidas sintéticos, merecendo destaque a *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), cujo nome comum é lagarta-do-cartucho (BARROS et al., 2005). Tal lagarta é um inseto polífago, de difícil controle, que causa danos a diversas culturas. No Brasil, é considerada uma das principais pragas das culturas do milho e do arroz e recentemente passou a ser uma praga importante da cultura do algodão (BARROS et al., 2005; MARTINELLI et al., 2006).

Assim, existem vários trabalhos visando avaliar a atividade biológica de produtos naturais sobre *S. frugiperda*. Estudos recentes têm demonstrado a eficiência de produtos vegetais como bioinseticidas, os quais podem retardar o desenvolvimento das larvas, reduzindo sua capacidade de alimentação, retardar o desenvolvimento e a emergência dos adultos, afetando também a capacidade de oviposição de muitas espécies (ASLAN et al., 2004; HAN; KIN; AHN, 2006; KORDALI et al., 2006; MATOS et al., 2006; NATHAN; KALAIVANI; SEHOON, 2006; RAHMAN; TALUKDER, 2006; TEWARY; BHARDWAJ; SHANKER, 2005).

Borgoni e Vendramim (2003) avaliaram a eficiência de extratos aquosos de ramos e folhas de seis espécies de *Trichilia* (*T. casaretti*, *T. catigua*, *T. claussenii*, *T. elegans*, *T. pallens* e *T. pallida*), em comparação com a do extrato aquoso de sementes de *Azadirachta indica* (nim) sobre a lagarta *S. frugiperda* em condições de laboratório. Para as seis espécies testadas, pelo menos uma das estruturas (ramos ou folhas) afetou o desenvolvimento do inseto. O extrato de folhas de *T. pallens* causou mortalidade larval semelhante à causada pelo extrato de nim. Os extratos de ramos de *T. pallens*, e de ramos e folhas de *T. pallida*, embora menos eficientes, também reduziram a sobrevivência e o peso larval de *S. frugiperda*.

As sementes de *A. indica* e *Chromolaena odorata* e os frutos de *Melia azedarach* foram altamente tóxicos às larvas de *S. frugiperda*, causando mortalidade acima de 80%. Frequentemente vem sendo relatada a seleção de populações de *S. frugiperda* resistentes aos pesticidas sintéticos (VIRLA et al., 2008; YU, 2006; YU; MCCORD JUNIOR, 2007), justificando-se, assim, estudos que busquem novas formas de controle para esse inseto-praga.

#### **2.4 Formigas cortadeiras**

As formigas cortadeiras pertencem à ordem Hymenoptera, Família Formicidae e Tribo Attini e estão entre as pragas mais severas da agrossilvicultura brasileira. O ataque realizado por essas pragas ocorre de maneira intensa e constante, causando danos em qualquer fase de desenvolvimento da planta, devido aos cortes de folhas, brotos, ramos finos e flores, os quais são carregados para o interior dos ninhos subterrâneos (ZANETTI et al., 2002).

Entre os insetos sociais, as formigas foram os que mais se adaptaram às cidades, sendo que no Brasil estima-se que das 2.000 espécies de formigas identificadas, cerca de 50 espécies são pragas urbanas causando prejuízos no campo, nas cidades e danos à saúde pública (CAMPOS-FARINHA et al., 2002).

Em relação à atividade de produtos de origem natural contra formigas, pode-se citar o trabalho de Bueno et al. (2005), que utilizaram extratos de diversas partes de *Cedrela Fissilis Vell* (Meliaceae) e observaram uma diminuição significativa na atividade das formigas, inibindo o crescimento do fungo simbionte, podendo concluir que esta planta apresenta substâncias secundárias que podem causar efeito tóxico às colônias do gênero *Atta*, uma vez que prejudicam tanto as operárias quanto o fungo simbionte.

Bueno et al. (2008) observaram que ninhos iniciais de laboratório, tratados exclusivamente com folhas de gergelim, foram drasticamente afetados e concluíram que nos extratos dessa planta existem compostos tóxicos para as formigas.

A obtenção de moléculas extraídas de extratos de plantas é uma das áreas de maiores perspectivas no manejo de formigas cortadeiras, sendo necessário estudar as plantas que apresentam resistência ao ataque desses insetos no campo (DELLA LÚCIA; MARINHO; RIBEIRO, 2008).



### 3 CONCLUSÃO

Encontram-se presentes nas folhas de mandioca os fenólicos: ácido gálico, galocatequina, catequina, ácido clorogênico, epigalocatequina e ácido meta cumárico. O extrator metanol 50% (v/v) foi o mais eficiente em extrair os compostos fenólicos da farinha de folhas de mandioca (FFM), quando comparado com metanol PA e etanol 50%/acetona 70%. Os constituintes majoritários detectados foram a catequina e os ácidos clorogênico e gálico.

O pré-tratamento com o extrato etanólico/acetona de FFM nas concentrações de 50, 150 e 450 mg kg<sup>-1</sup> demonstrou ação hepatoprotetora contra lesão induzida por CCl<sub>4</sub> em ratas. A ação benéfica do extrato foi constatada e as enzimas marcadoras da função hepática aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e gama glutamil transferase, as quais tiveram seus níveis reduzidos em comparação ao controle positivo. Pôde-se observar também, a diminuição da peroxidação lipídica e aumento dos níveis de albumina e proteínas totais. Os fenólicos ácido gálico, galocatequina, catequina e o ácido clorogênico, podem ser responsáveis pela ação encontrada, uma vez que esses compostos foram detectados no extrato empregado neste experimento.

O extrato metanólico PA provocou efeito subletal, aumentando o tempo necessário ao desenvolvimento de *S. frugiperda*, prolongando as fases larval e pupal, reduzindo o número de ovos, além de apresentar efeito negativo na sobrevivência das formigas e das lagartas. A atividade encontrada foi atribuída aos compostos ácido gálico e a catequina, os quais foram identificados nesse extrato.

## REFERÊNCIAS

- AJAIKUMAR, K. B. et al. The inhibition of gastric mucosal injury by *Punica granatum*, L. (pomegranate) methanolic extract. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 96, n. 1/2, p. 171-176, 2005.
- ASLAN, I. et al. Toxicity of essential oils vapors to two greenhouse pests, *Tetranychus urticae* Koch and *Bemisia tabaci* Genn. **Industrial Crops and Products**, London, v. 19, n. 2, p. 167-173, 2004.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAR, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, London, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.
- BARROS, R. G. et al. Eficiência de inseticidas no controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura do algodoeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 35, n. 3, p. 179-182, 2005.
- BOGORNÍ, P. C.; VENDRAMIM, J. D. Bioatividade de extratos aquosos de *Trichilia* spp. sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 32, n. 4, p. 665-669, 2003.
- BRENNA, O. V.; PAGLIARINI, E. Multivariate analyses of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 10, p. 4841-4844, Oct. 2001.
- BUENO, O. C. et al. Toxicity of *Cedrela fissilis* to *Atta sexdens* Rubropilosa (Hymenoptera: Formicidae) and its symbiotic fungus. **Sociobiology**, Chicago, v. 45, n. 2, p. 389-399, 2005.
- BUENO, O. C. et al. Utilização de alimentos pelas formigas. In: VILELA, E. F. et al. (Ed.). **Insetos sociais: da biologia a aplicação**. Viçosa, MG: UFV, 2008. v. 1, p. 97-114.
- CAMPOS-FARINHA, A. E. C. et al. As formigas urbanas no Brasil: retrospecto. **Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 129-133, 2002.

CARDOSO, E. M. R. et al. **Processamento e comercialização de produtos derivados de mandioca no nordeste paraense**. Belém: EMBRAPA Amazônia Oriental, 2001. 28 p. (Documentos, 102).

CARNEIRO, A. de C. O. et al. Reatividade dos taninos da casca de *Eucalyptus grandis* para produção de adesivos. **Cerne**, Lavras, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2001.

CORRÊA, A. D. et al. Removal of polyphenols of the flour cassava leaves. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 2, p. 159-164, 2004.

COSTA, E. L. N.; SILVA, R. F. P.; FIUZA, L. M. Efeitos aplicações e limitações de extratos de plantas inseticidas. **Acta Biológica Leopoldensia**, Porto Alegre, v. 26, n. 2, p. 173-185, 2004.

DELLA LÚCIA, T. M. C.; MARINHO, C. G. S.; RIBEIRO, M. M. R. Perspicita no manejo de formigas cortadeiras. In: VILELA, E. F. et al. (Ed.). **Insetos sociais: da biologia a aplicação**. Viçosa, MG: UFV, 2008. v. 1, p. 371-380.

FERREIRA NETO, C. J.; FIGUEIREDO, R. M. F.; QUEIROZ, A. J. M. Avaliação físico-química de farinhas de mandioca durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 5, n. 1, p. 25-31, 2003.

FRAIFE FILHO, G. de A.; BAHIA, J. J. S. **Mandioca**. Brasília: CEPLAC, 2006. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/radar/Mandioca.htm>>. Acesso em: 7 nov. 2012.

GUARATINI, T.; MEDEIROS, M. H. G.; COLEPICOLO, P. Antioxidante na manutenção de equilíbrio redox celtâneo: uso e avaliação de sua eficácia. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 206-213, jan./fev. 2007.

HAN, M.; KIN, S.; AHN, Y. Insecticidal and antifeedant activities of medicinal plant extracts against *Attagenus unicolor japonicus* (Coleoptera: Dermistidae). **Journal of Stored Products Research**, Elmsford, v. 42, n. 1, p. 15-22, 2006.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; OLIVEIRA, M. C. N. de; OLIVEIRA, L. J. Detrimental effect of rutin on *Anticarsia gemmatalis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 10, p. 1453-1459, out. 2006.

KARAKAYA, S. Bioavailability of phenolic compounds. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v. 44, n. 6, p. 453-464, 2004.

- KORDALI, S. et al. Toxicity of essential oils isolated from three *Artemisia* species and some of their major components to granary weevil, *Sitophilus granarius* (L) (Coleoptera:Curculionidae). **Industrial Crops and Products**, London, v. 23, n. 37, p. 162-170, 2006.
- KUSKOSKI, E. M. et al. Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 691-693, 2004.
- LEE, K. J. et al. Protective effect of acteoside on carbón tetrachloride induced hepatotoxicity. **Life Sciences**, Amsterdam, v. 74, n. 8, p. 1051-1064, Jan. 2004.
- LI, L. et al. Antioxidant activity of galic acid from rose flowers in senescence accelerated mice. **Life Sciences**, Amsterdam, v. 77, n. 2, p. 230-240, 2005.
- LOPES, R. M.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S. Flavonoides. **Biotecnologia, Ciencia & Desenvolvimento**, Brasília, v. 3, n. 14, p. 18-22, 2000.
- MALLIKARJUNA, N. et al. Influence of foliar chemical compounds on the development of *Spodoptera litura* (Fab.) in interspecific derivatives of groundnut. **Journal of Applied Entomology**, Hamburg, v. 128, n. 5, p. 321-328, 2004.
- MARTINELLI, S. et al. Molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations associated to maize and cotton crops in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 99, n. 2, p. 519-526, Apr. 2006.
- MATOS, A. P. et al. Atividades biológicas de extratos orgânicos de *Trichilia* spp. (Meliaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em dieta artificial. **BioAssay**, Londrina, v. 1, n. 1, p. 1-7, 2006.
- MELO, D. S. de et al. Efeitos da farinha de folhas de mandioca sobre a peroxidação lipídica, o perfil lipídico sangüíneo e o peso do fígado de ratos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 420-428, mar./abr. 2007.
- MELO, E. A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim SBCTA**, Campinas, v. 36, n. 1, p. 1-11, 2002.

MORIMOTO, M. et al. Insect antifeedant activity of flavones and chromones against *Spodoptera litura*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 2, p. 389-393, Feb. 2003.

NASSAR, N. et al. Cassava diversity in Brazil: the case of carotenoid-rich landraces. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 6, n. 1, p. 116-121, Jan./Feb. 2007.

NATHAN, S. S.; KALAIIVANI, K.; SEHOON, K. Effects of *Dysoxylum malabaricum* Bedd. (Meliaceae) extract on the malarial vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). **Bioresource Technology**, Essex, v. 97, n. 16, p. 2077-2083, 2006.

NINFALI, P. et al. Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressings relevant to nutrition. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 93, n. 2, p. 257-266, 2005.

OZERCAN, I. H. et al. Does instant coffee prevent acute liver injury induced by carbon tetrachloride (CCL<sub>4</sub>)? **Hepatology Research**, Cambridge, v. 35, n. 3, p. 163-168, 2006.

RAHMAN, A.; TALUKDER, F. A. Bioefficacy of some plant derivatives that protect grain against the pulse beetle, *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Insect Science**, Madison, v. 6, n. 3, p. 1-10, 2006.

SCHALLER, A. **Induced plant resistance to herbivory**. Hardcover: Springer, 2008. 464 p.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2007. p. 597-622.

SHAHIDI, F.; ALASALVAR, C.; LIYANA-PATHIRANA, C. M. Antioxidant phytochemicals in hazelnut kernel (*Corylus avellana* L.) and hazelnut byproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 4, p. 1212-1220, Feb. 2007.

SILVA, B. M. et al. Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit (pulp, peel, and seed) and jam: antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 15, p. 4705-4712, Aug. 2004.

SIMÃO, A. A. et al. Antioxidants from medicinal plants used in the treatment of obesity. **European Journal of Medicinal Plants**, London, v. 3, n. 3, p. 429-443, 2013.

SIMÕES, M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre, 2004. 609 p.

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

TEWARY, K. D.; BHARDWAJ, A.; SHANKER, A. Pesticidal activities in five medicinal plants collected from mid hills of western Himalayas. **Industrial Crops and Products**, London, v. 22, n. 3, p. 241-247, 2005.

VIRLA, E. G. et al. Fall armyworm strains (Lepidoptera: Noctuidae) in Argentina, their associate host plants and response to different mortality factors in laboratory. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 91, n. 1, p. 63-69, 2008.

VOLP, A. C. P. et al. Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 141-149, 2008.

WOBETO, C. et al. Antinutrientes in the cassava (*Manihot esculent* Crantz) leaf powder at three ages of the plant. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 108-112, 2007.

YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A. A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 8, p. 4083-4089, Aug. 2002.

YU, S. J. Insensitivity of acetylcholinesterase in a field strain of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 84, n. 2, p. 135-142, 2006.

YU, S. J.; MCCORD JUNIOR, E. Lack of cross-resistance to indoxacarb in insecticide-resistant *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). **Pest Management Science**, Sussex, v. 63, n. 1, p. 63-67, 2007.

ZANETTI, R. et al. **Manejo integrado de formigas cortadeiras**. Lavras: UFLA, 2002. 16 p.

ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 11, p. 5165-5170, Nov. 2001.

**SEGUNDA PARTE – ARTIGOS****Artigo 1 - Farinha de folhas de mandioca: extração, caracterização e atividade antioxidante de compostos fenólicos****Submetido à Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB)**

Mírian Aparecida Isidro dos Santos<sup>(1)</sup>, Ana Paula de Carvalho Alves<sup>(1)</sup>,  
Anderson Assaid Simão<sup>(1)</sup>, Adelir Aparecida Saczk<sup>(1)</sup>, Angelita Duarte  
Corrêa<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Universidade Federal de Lavras – UFLA, Departamento de Química,  
Laboratório de Bioquímica, Campus Universitário, Caixa Postal 3037,  
CEP 37200-000, Lavras, MG, Brasil. Email: miriansantos.a@gmail.com,  
anapaula.química@hotmail.com, andersonbsbufla@yahoo.com.br,  
adelir@dqi.ufla.br, angelita@dqi.ufla.br

Resumo - O conhecimento de que os antioxidantes desempenham inibição dos radicais livres, resultantes do metabolismo celular, tem motivado o interesse pela análise destes compostos em diversos produtos. No presente estudo, os objetivos foram identificar e quantificar os



compostos fenólicos presentes na farinha de folhas de mandioca (FFM), verificar a sua relação com a atividade antioxidante e o efeito de diferentes maneiras de extração. A extração dos compostos fenólicos foi realizada empregando-se os seguintes extratores: etanol 50%/seguido de acetona de 70%, metanol PA e metanol 50%. A caracterização e quantificação foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência e a atividade antioxidante determinada pelos métodos ABTS e  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico. Foram identificados seis compostos fenólicos nos extratos da FFM: ácido gálico, galocatequina, catequina, ácido clorogênico, epigalocatequina e ácido meta-cumárico, sendo o extrato metanólico 50% o que revelou a presença do maior número destes compostos e maior potencial antioxidante. Entre os fenólicos da FFM, independente do extrato, a catequina foi o majoritário. Pode-se inferir que a atividade antioxidante dos extratos da FFM está relacionada com a presença de fenólicos, pois a amostra com maior teor desses compostos foi a que demonstrou maior potencial antioxidante.

Termos para indexação: Farinha de folhas de mandioca, caracterização, compostos fenólicos, atividade antioxidante,

**Cassava leaf flour: extraction, characterization and antioxidant  
activity of phenolic compounds**

Abstract – The knowledge that antioxidants inhibit free radicals, resulting from the cellular metabolism, has motivated interest in the analysis of these compounds in various products. The objectives of the present study were to identify and quantify the phenolic compounds present in cassava leaf flour (CLF), verify its relationship with the antioxidant activity and the effect of different manners of extraction of these compounds. The extraction of phenolic compounds was performed using the following extractors: 50% ethanol followed by 70% acetone, methanol PA and 50% methanol. The identification and quantification were performed by high performance liquid chromatography, and the antioxidant activity was determined by the ABTS and the  $\beta$ -carotene/linoleic acid methods. Six phenolic compounds were found in the CLF extracts: gallic acid, gallic acid, gallic acid, catechin, chlorogenic acid, epigallocatechin and meta-coumaric acid, and the 50% methanol extract revealed the presence of many of these compounds and the highest antioxidant potential. Among the phenolic compounds of CLF, independent of extract, catechin was the majority one. It can be inferred that the antioxidant activity of the CLF

extracts is related to the presence of phenolic compounds, since the sample with the highest content of these compounds demonstrated the highest antioxidant potential.

Index Terms: cassava leaf flour, characterization, phenolic compounds, antioxidant activity

## **1. Introdução**

Atualmente há grande interesse no uso de produtos naturais como antioxidantes para a preservação de alimentos e principalmente na investigação de seus efeitos em condições fisiopatológicas, onde ocorre o envolvimento de espécies reativas do oxigênio. Esses compostos são considerados como coadjuvantes na redução do risco de desenvolvimento de doenças como aterosclerose, diabetes, hipertensão, doenças coronarianas, neurológicas degenerativas e alguns tipos de câncer (Auruoma, 2002), pois combatem radicais livres, que são espécies extremamente reativas que causam a oxidação de várias biomoléculas presentes em nosso organismo (lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos), podendo ser a causa ou o agravante do quadro geral destas doenças, e

inibem a peroxidação lipídica, responsável pela geração de radicais que causam a oxidação dos alimentos.

Dessa forma, pesquisas buscam alternativas para reduzir os efeitos prejudiciais de radicais livres em alimentos e melhorar a capacidade antioxidante do organismo, como forma de tratamento e prevenção das enfermidades e suas complicações (Simão et al., 2013b).

Os compostos fenólicos de origem vegetal têm sido alvo de muitos estudos, devido às suas ações biológicas associadas à prevenção de doenças e o seu potencial curativo. A proteção contra doenças por esses compostos é mediada por propriedades tais como a ação de captura de espécies reativas do oxigênio. Os fenólicos são importantes constituintes dietéticos, em virtude da sua elevada capacidade antioxidante, atribuída a sua habilidade em complexar íons metálicos, inativar reações radicalares e prevenir a conversão de hidroperóxido em oxirradicais reativos (Dimitrios, 2006).

Vários resíduos agroindustriais tem sido estudados, visando maior aproveitamento destes, agregação de valor e busca por possíveis substâncias com prováveis benefícios a saúde. Entre estas substâncias, as antioxidantes, com destaque para os compostos fenólicos, tem sido alvo

de vários estudos nesses resíduos, como, por exemplo, os realizados por Chantaro et al. (2008) que registraram potencial antioxidante em farinhas produzidas à partir de cascas de cenoura, os de Ajila et al. (2008) que constataram potencial antioxidante em biscoitos enriquecidos com farinha de casca de manga, e os de Zia-ur-Rehman et al. (2004) que utilizaram o extrato de casca de batata como antioxidante natural em óleos de semente de soja.

Outro resíduo que merece destaque são as folhas da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). Estas folhas, até então tratadas como subproduto agrícola, vem sendo alvo de estudos, pois nutricionalmente apresentam grande potencial para o consumo humano e animal. Sabe-se que estas folhas são fontes de proteínas, vitaminas A e C, ricas em minerais, especialmente Mg, Fe, Zn e Mn (Corrêa et al., 2004; Wobeto et al., 2006). Estas folhas têm sido utilizadas na alimentação humana, porém poucos estudos são encontrados na literatura quanto a sua composição fenólica, havendo praticamente, apenas relatos do seu teor (Corrêa et al., 2004; Simão et al., 2013a).

Considerando a elevada proporção de resíduos folhosos provenientes da cultura da mandioca, a importância da utilização de

compostos de origem natural na terapêutica, em especial os fenólicos, e a inexistência de estudos de identificação destes compostos na farinha de folhas de mandioca, torna-se relevante investigá-los.

Além disso, é necessário conhecer qual a maneira mais eficiente de extração dos compostos antioxidantes. Desta forma, os objetivos neste trabalho foram identificar e quantificar os compostos fenólicos presentes em diferentes extratos da farinha de folhas de mandioca, além de verificar a sua relação com a atividade antioxidante.

## **2. Material e Métodos**

Folhas maduras de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz cv. Pão da China) livres de pragas e doenças, foram coletadas no período da manhã, no mês de abril, aos 12 meses de idade da planta e transportadas ao laboratório. As folhas foram lavadas em água corrente e em água destilada e em seguida colocadas em estufas com circulação de ar para secagem por 48 horas, à temperatura entre 30°C e 35°C. Após secagem, as folhas tiveram seus pecíolos retirados e, em seguida, foram moídas para a obtenção da farinha de folhas de mandioca (FFM).

Os compostos fenólicos presentes na FFM foram extraídos de três formas: a) na primeira extração, a FFM foi mantida sob maceração em

etanol 50% na proporção 1:40 (p/v), por 30 minutos e, em seguida, centrifugadas a 2.500 x g, durante 15 minutos. O sobrenadante foi recolhido e o precipitado foi novamente submetido ao processo de extração descrito, porém desta vez com acetona 70%. Os dois sobrenadantes foram reunidos e rotaevaporados até 25 mL; b) a FFM foi mantida sob maceração em metanol durante 48 horas, na proporção de 10:15 (p v<sup>-1</sup>) e filtrado utilizando-se algodão hidrófilo. Ao resíduo foi adicionado mais metanol, sendo esse procedimento repetido sete vezes para garantir um bom rendimento da extração e c) na terceira extração, 1 g de FFM em 50 mL de metanol 50% foi mantida em refluxo por 15 minutos a 80°C, por três vezes consecutivas, e os extratos foram reunidos e evaporados até 25 mL.

As análises cromatográficas foram realizadas empregando o equipamento HPLC Agilent modelo 1100, equipado com uma bomba binária, injetor automático e detector com arranjo de diodos, no comprimento de onda 280 nm segundo metodologia proposta por (Aquino et al.,2006) com modificações.

Os extratos fenólicos e os padrões foram separados em uma coluna ascentis C<sub>18</sub> (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), conectada a uma pré-coluna ascentis C<sub>18</sub> (20 mm x 4,0 mm, 5 µm. A fase móvel foi composta pelas soluções: ácido acético 2% (A) e metanol:água:ácido acético

70:28:2 (v/v/v) (B). As análises foram realizadas com tempo total de 50 minutos, a uma temperatura de 15°C, em um sistema do tipo gradiente: 100% do solvente A de 0,01 a 5 minutos, 70% do solvente A de 5 a 25 minutos, 60% do solvente A de 25 a 43 minutos, 55% do solvente A de 43 a 50 minutos. O solvente A foi aumentado para 100% buscando manter o equilíbrio da coluna. O fluxo utilizado em todas as análises foi de 1 mL min<sup>-1</sup> e o volume de injeção foi de 20 µL.

Os padrões fenólicos utilizados foram: ácido gálico, galocatequina, 3,4-dihidroxibenzeno, catequina, ácido clorogênico, epigalocatequina, ácido vanílico, epicatequina, ácido siríngico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico e ácido m-cumárico, todos da marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). As soluções estoque dos padrões foram preparadas em dimetil sulfoxido e/ou metanol (Merck) em um intervalo de concentração de 0,1 a 177,15 mg L<sup>-1</sup>. O ácido acético e metanol (Merck, Darmstadt, Germany) foram usados na preparação da fase móvel e a água ultrapura foi obtida pelo sistema Milli-Q (Millipore, Billerica, MA, EUA).

Os extratos fenólicos e os padrões foram filtrados em membrana de nylon de 0,45 µm (Millipore®) e diretamente injetados no sistema



cromatográfico. Cada solução foi injetada três vezes no sistema HPLC, com a finalidade de se obter a média das concentrações e dos tempos de retenção. Os compostos fenólicos nos extratos foram identificados por comparação com os tempos de retenção dos padrões. A quantificação foi realizada por meio da construção de curvas analíticas, no qual cada ponto representou a média de três repetições.

A atividade antioxidante foi medida por duas metodologias. A primeira consiste na determinação da inibição da peroxidação lipídica pelo método  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, em que se utilizou a metodologia desenvolvida por Rufino et al. (2006), com modificações. Para o preparo da solução sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, utilizaram-se 50  $\mu$ L de  $\beta$ -caroteno diluído em clorofórmio (20 g L<sup>-1</sup>), aos quais adicionaram-se 40  $\mu$ L de ácido linoleico, 530  $\mu$ L de tween 20 (emulsificante) e, para solubilizar, 1 mL de clorofórmio. Em balão recoberto com alumínio para proteção contra luz, o clorofórmio foi evaporado em rota-evaporador e 100 mL de água saturada de oxigênio (água destilada tratada com oxigênio por 30 minutos) foram acrescentados e agitados até que a solução sistema apresentasse coloração amarelo-alaranjada. Em tubos de ensaio, 2,5 mL dessa solução sistema foram adicionados a 0,2 mL de cada

diluição (200, 1.000 e 10.000 mg mL<sup>-1</sup>) do extrato empregada para o teste.

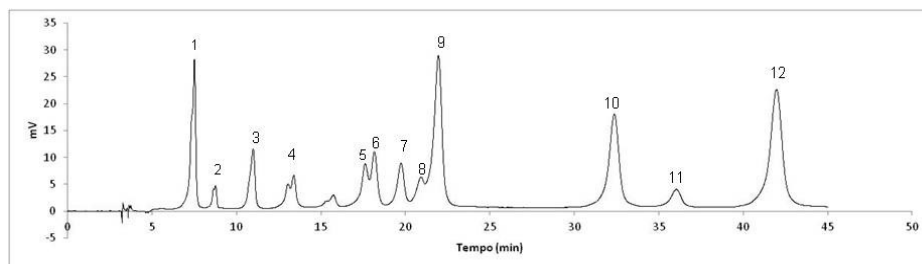
Foram feitos tubos controle contendo 2,5 mL da solução sistema com 0,2 mL de BHT (butil-hidroxitolueno - antioxidante sintético), quercetina e rutina, que são flavonoides com a atividade antioxidante comprovada, todos na concentração de 200 mg L<sup>-1</sup>. Os tubos padrões e testes foram colocados em banho-maria a 40°C e após 2 horas, os tubos foram homogeneizados e as leituras foram feitas à 470 nm utilizando-se água para calibrar o aparelho.

A segunda metodologia empregada (ABTS) mede a habilidade de um antioxidante de reduzir um radical livre por doação de hidrogênio ou elétron, (Re et al., 1999, com modificações feitas por Rufino et al., 2007). Nos extratos foram feitas quatro diluições (500, 1.000, 2.000 e 4.000 mg mL<sup>-1</sup>) diferentes para os ensaios e posterior construção de curva analítica.

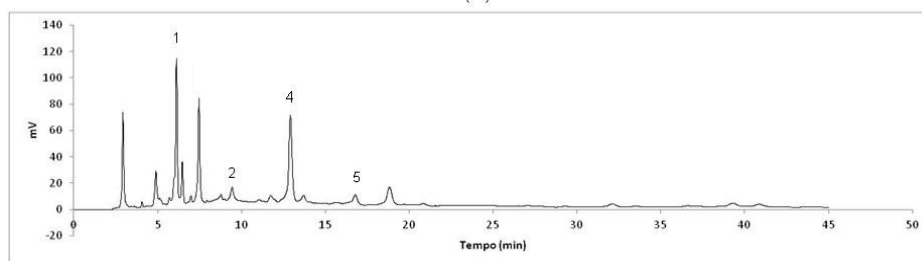
Foram feitas curvas analíticas com trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico) , além de teste para comparação com os padrões BHT, rutina e quercetina, preparados na concentração de 200 mg L<sup>-1</sup>.

### 3. Resultados e discussão

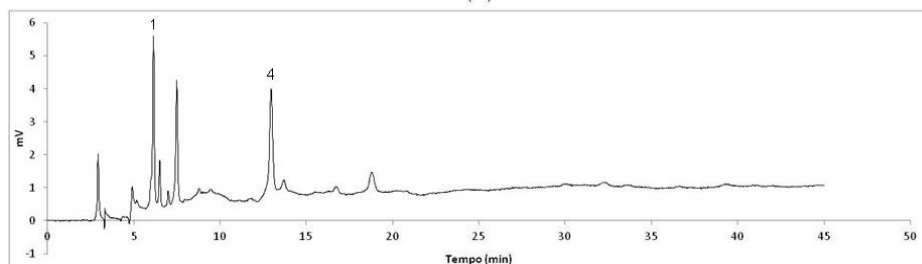
Na Figura 1 são apresentados os perfis cromatográficos e na Tabela 1, os teores de compostos fenólicos dos três extratos da FFM.



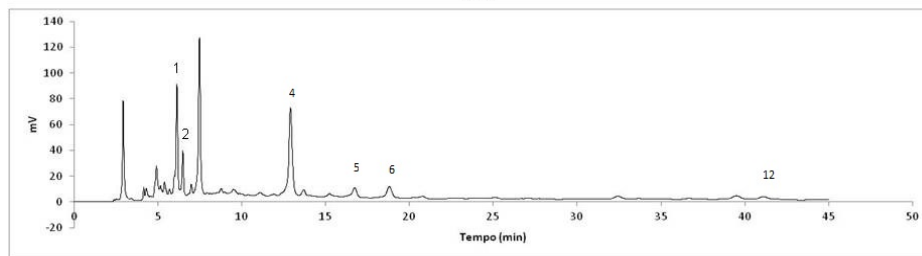
(A)



(B)



(C)



(D)

**Figura 1.** Cromatograma da solução de compostos fenólicos com detecção espectrofotométrica em 280 nm. Identificação dos picos: 1 = ácido gálico, 2 = Galocatequina, 3 = 3,4 dihidroxibenzeno, 4 = catequina, 5 = ácido clorogênico, 6 = epigalocatequina, 7 = ácido vanílico, 8 = epicatequina, 9 = ácido siríngico, 10 = ácido p-cumárico, 11 = ácido ferúlico, 12 = ácido m-cumárico (A); Extrator etanol 50% seguido de acetona 70% (B); Extrator metanol PA (C) e Extrator metanol 50% (D).

**Tabela 1.** Compostos fenólicos, em mg 100 g<sup>-1</sup>, em três extratos da farinha de folhas de mandioca.

Compostos fenólicos	Extratos		
	Etanol 50% seguido de acetona 70%	Metanol PA	Metanol 50%
Ácido gálico	33,00 ± 0,42	35,00 ± 1,37	43,00 ± 1,98
Galocatequina	9,10 ± 2,37	-	9,10 ± 0,57
Catequina	155,96 ± 14,07	191,00 ± 1,13	208,00 ± 2,10
Ácido clorogênico	104,80 ± 3,32	-	86,13 ± 5,02
Epigalocatequina	-	-	22,52 ± 3,61
Ácido m-cumárico	-	-	1,31 ± 0,08

Dados são a média de 3 repetições ± desvio padrão

Os diferentes sistemas de solventes utilizados na extração afetaram o conteúdo de fenólicos dos extratos de FFM. O extrato metanólico 50% revelou a presença do maior número de compostos fenólicos: ácido gálico, galocatequina, catequina, ácido clorogênico, epigalocatequina e ácido m-cumárico, com teores mais elevados, exceto

para o ácido clorogênico. O extrato metanol PA extraiu apenas dois compostos fenólicos, o ácido gálico e a catequina. O extrato obtido pela extração com etanol 50% seguido de acetona 70% revelou presença de : ácido gálico, galocatequina, catequina e ácido clorogênico. Entre os fenólicos da FFM, independente do extrato, a catequina foi a majoritária, seguida pelos ácidos clorogênico e gálico, sendo que o ácido clorogênico não foi detectado no extrato metanol PA.

Dos extratos analisados, o metanol 50% foi o que mostrou maior potencial antioxidante, tanto para o método ABTS, quanto para o método  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico (Tabela 2), provavelmente devido ao maior número e concentração de fenólicos neste extrato.

**Tabela 2.** Atividade antioxidante de três extratos da farinha de folhas de mandioca e de três padrões\*, pelos métodos ABTS e  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico.

Extratos	ABTS ( $\mu\text{mol trolox L}^{-1}\text{g}^{-1}$ )	$\beta$ -caroteno/ ácido linoleico (% de inibição)
Etanol 50% seguido de acetona		
70%	330,93 $\pm$ 1,27	83,52 $\pm$ 0,53
Metanol PA	233,17 $\pm$ 0,75	79,71 $\pm$ 0,83
Metanol 50%	383,33 $\pm$ 0,67	87,53 $\pm$ 0,57
Padrões		
Quercetina	3.984,06 $\pm$ 117,10	77,33 $\pm$ 0,91
Rutina	1.043,30 $\pm$ 11,27	17,42 $\pm$ 0,75
BHT	1.897,53 $\pm$ 95,93	100,40 $\pm$ 0,34

Dados são a média de 3 repetições  $\pm$  desvio padrão. \*Concentração dos padrões: 200 mg L<sup>-1</sup>

O ácido clorogênico e a galocatequina parecem ter um papel muito importante na atividade antioxidante destes extratos, visto que eles não foram detectados no extrato metanólico PA, que apresentou a menor AA.

Observou-se que, quando comparados aos padrões, o potencial antioxidante dos extratos da FFM no método ABTS alcançaram em média menos que 50% do potencial desses padrões, sendo considerados baixos.

No método  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, os extratos demonstraram maior potencial que a quercetina e rutina, sendo menor apenas que o BHT. Estas discrepâncias podem ser inerentes às características e ao mecanismo de ação dos compostos bioativos e a metodologia utilizada para avaliar sua propriedade antioxidante.

Os compostos fenólicos apresentam um amplo espectro de propriedades medicinais, tendo ações comprovadas como antialérgicos, anti-inflamatórios, anti-bacteriano, anti-trombóticos, efeitos cardioprotetores vasodilatadores e principalmente como antioxidantes (Balasudram et al., 2006), mostrando amplo campo de aplicação para os fenólicos da FFM.

A atividade antioxidante (AA) dos ácidos fenólicos e das catequinas identificadas neste estudo já é conhecida. Em estudos



realizados com extratos de casca de batata, através do método de Shall, observou-se que os ácidos clorogênico, gálico, protocatequínico e cafeico apresentaram potencial antioxidante similar ao BHA (butil-hidroxi-anisol-antioxidante sintético) quando o extrato e o BHA foram aplicados em óleo de girassol na dosagem de  $200 \text{ mg kg}^{-1}$  (Sotillo; Hadley; Holm, 1994).

Ramalho & Jorge (2006) realizaram uma revisão, reportando estudos sobre AA de substâncias naturais e sintéticas na conservação de óleos, gorduras e alimentos gordurosos. Os resultados mostraram que o ácido cafeico e o extrato metanólico de alecrim são os antioxidantes mais adequados para a gordura animal, apresentando inclusive efeito superior ao BHT e BHA. Também foi observado que os ácidos clorogênico, gálico, protocatequínico e cafeico, quando empregados na conservação do óleo de girassol apresentaram melhor efetividade que BHA e BHT, evidenciando a ótima ação antioxidante desses compostos fenólicos presentes em alimentos e plantas medicinais. Como na FFM foram identificados alguns desses fenólicos (ácidos gálico e clorogênico), esta se credencia para ser utilizada como fonte de antioxidantes naturais.

Segundo Guaratini et al. (2007), as catequinas presentes nas plantas são poderosos antioxidantes inibindo os danos causados ao DNA pelas espécies reativas de oxigênio (ERO), a imunossupressão e a inflamação cutânea induzida pelos raios UV. A AA das catequinas deve-se aos mecanismos de transferência de elétrons destas para as ERO, estabilizando essas substâncias.

A AA dos compostos de natureza fenólica é influenciada por muitos fatores, em especial a posição de substituição e o número de grupos hidroxila (OH), as propriedades de outros grupos substituintes e a possibilidade de formação de ligações de hidrogênio. A posição de substituição da hidroxila no anel fenólico, considerada em relação a uma posição fixa, influencia diretamente o potencial antioxidante. Compostos contendo a hidroxila em para (posição 4) são mais ativos do que aqueles substituídos em orto ou meta (posições 1 e 2, respectivamente). Compostos com dois (mais comum) ou três substituintes grupos hidroxilas no anel benzênico possuem maior potencial antioxidante do que os monohidroxilados (Pannala et al. 2001; Cheng et al., 2003).

O potencial antioxidante está altamente relacionado à capacidade de doação de elétrons. A etapa de transferência do hidrogênio tem se

destacado, mas o potencial antioxidante não depende apenas da força de energia da ligação O-H. A estabilização das espécies cátion-radicalar e radicalar formadas também deve ser considerada (Wright et al., 2001; Cao et al., 2005).

Na presença de grupo hidroxila substituído em posição orto e/ou para em anel contendo heteroátomo nitrogênio ou oxigênio, a AA é potencializada por efeito de ressonância entre o par de elétrons do tipo p do heteroátomo e o radical fenóxi formado (Zhang, 1999; Pannala et al., 2001).

Assim, o potencial antioxidante de um extrato não pode ser explicado apenas com base em seu teor de fenólicos totais. A caracterização da estrutura do composto ativo também é necessária.

Estudos realizados por Melo et al. (2007) com FFM, obtida da cultivar Cacao, mostraram que dietas contendo 10 e 15% desta farinha propiciaram redução nos níveis plasmáticos de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em ratos *Wistar*, confirmando a AA *in vivo* da FFM. Porém, estes autores não concluíram quais substâncias foram as responsáveis pela redução de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico,

mas provavelmente os compostos fenólicos presentes na farinha desta cultivar contribuíram para esta ação.

Yeh & Yen (2006) citam que entre todos os ácidos hidrogenoicis presentes nos vegetais, o ácido gálico é o que apresenta maior efetividade na inativação do radical ABTS. Segundo Koleva et al. (2002) a oxidação lipídica é um complexo processo em cadeia, no qual estão envolvidos vários tipos de radicais livres de diferentes reatividades, e a ação antioxidante de um composto bioativo depende do substrato lipídico, da sua solubilidade e do seu mecanismo de ação. Assim, em ensaios que contém lipídios como substrato oxidável, a exemplo da oxidação acoplada  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, o papel protetor do antioxidante depende de sua solubilidade que determina sua distribuição na fase do sistema, incluindo localização e orientação.

Além disso, a complexa composição dos extratos de vegetais pode provocar interações sinérgicas ou antagônicas entre os compostos presentes, podendo, também, afetar sua partição nas fases do meio e, conseqüentemente, sua ação antioxidante. Ainda, segundo Koleva et al. (2002) o exato mecanismo do antioxidante no sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico é difícil de ser explicado, especialmente ao testar a ação de

matrizes complexas, como os extratos de vegetais. Por outro lado, o ensaio do ABTS avalia a capacidade do antioxidante de sequestrar o radical, portanto não está associado à degradação lipídica oxidativa nem à hidro/lipossolubilidade do composto antioxidante, pois o sistema não contém substrato oxidável, depende principalmente da sua estrutura química. Neste caso, avalia-se a habilidade do antioxidante em doar hidrogênio.

#### **4. Conclusão**

O extrator metanol 50% (v/v) foi o mais eficaz em extrair os compostos fenólicos da FFM e foi o extrato que apresentou maior atividade antioxidante. Foram identificados o ácido gálico, galocatequina, catequina, ácido clorogênico, epigalocatequina e ácido m-cumárico, sendo majoritários a catequina, os ácidos clorogênico e gálico.

Pode-se inferir que a FFM é fonte de fenólicos e possivelmente pode ser utilizada como fonte natural de antioxidantes em preparações farmacológicas e alimentícias, visando benefícios a saúde.

### Referências

AJILA, C.M.; LEELAVATHI, K.; PRASADA, RAO, U.J.S.J. Improvement of dietary fiber content and antioxidant properties in soft dough biscuits with the incorporation of mango peel powder. **Cereal Science**, v. 48, n.2, p. 319-326, 2008.

AQUINO, F.W.B.; RODRIGUES, S.; NASCIMENTO, R. F.; CASSEMIRO, A. R. S. Simultaneous determination of agind markers in sugar cane spirits. *Food Chemistry*, London, v. 98, p. 569-574, 2006.

AURUOMA, O.I. Neuroprotection by dietary antioxidants: new age of research. *Nahrung. Food Nahrung*, v. 46, n. 6, p. 381-392, 2002.

BALASUNDRAM N, SUNDRAM K, SAMMAR S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**. v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.

CAO, H.; CHENG, W-X.; LI, C.; PAN, X-L.; XIE, X-G.; LI,T-H. DFT study on the antioxidant activity of rosmarinic acid. **Journal of Molecular. Strucuret**, v. 719, n. 1, p. 177-183, 2005.

CHENG, Z.; REN, J.; YAN, G.; LI, Y.; CHANG, W.; CHEN, Z. Quantitative elucidation of the molecular mechanisms of hydroxyl radical quenching reactivity of phenolic compounds. *ioorg. Bioorganic Chemistry*, v. 31, n. 2, p. 149-162, 2003.

CHANTARO, P.; DEVAHASTIN, S.; CHIEWCHAN, N.; Production of antioxidant high dietary fiber powder from carrot peels. **Food Science and Technology**, v. 41, n.10, p. 1987-1994, 2008.

CORRÊA, A.D.; SANTOS, S.R.; ABREU, C.M.P.; JOKL, L.; SANTOS, C.D. Removal of polyphenols of the flour cassava leaves. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 159-164, 2004.

DIMITRIOS, B. Source of natural phenolics antioxidants. Trends. **Food Science and Tecnology**, v. 17, n. 9, p. 505-512, 2006.

GUARATINI, T.; MEDEIROS, M. H. G.; COLEPICOLO, P. Antioxidante na manutenção de equilíbrio redox celtâneo: uso e avaliação de sua eficácia. **Química nova**, v. 30, n. 1, p. 206-213, 2007.

KOLEVA, I.I.; VAN BEEK, T.A.; LINSSEN, J.P.H.; GROOT, A.; EVSTATIEVA, L.N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. **Phytochemical Analysis**, v. 13, n. 1, p. 8-17, 2002.

MELO, D.S.; CORRÊA, A.D.; MARCOS, F.C.A.; SOUSA, R.V.; ABREU, C.M.P.; SANTOS, C.D. Effects of cassava leaf flour on lipidic peroxidation, blood lipidic profile and liver weight of rats. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 2, p. 420-428, 2007.

PANNALA, A.S.; CHAN, T.S.; O'BRIEN, P.J.; RICE-EVANS, C.A. Flavonoid b-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 282, n. 5, p. 1.161-1.168, 2001.

RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gorduras. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.



RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9, p. 1231–1237, 1999.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.S.; BRIT, E.S.; FILHO, J.M.; MOREIRA, A.V.B. **Determination of total antioxidant activity in fruit by the method  $\beta$ -caroteno/ácido linoleic**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria tropical. 2006.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R. S.; BRITO,E.S.; MORAIS, S. M. **Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS<sup>+</sup>**. Fortaleza: EMBRAPA, 2007.

SIMÃO, A.A.; LAGE, F.F.; CHAGA, P.M.B.; FRAGUAS, R.M.; FREI, J.M.; MARQUES, T.R.; CORRÊA, A.D. Antioxidants from Medicinal Plants Used in the Treatment of Obesity. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 3, n. 3, p. 429-443, 2013 a.

SIMÃO, A.A.; ISIDRO, M.A.; FRAGUAS, R.M.; MARQUES, T.R.; DUARTE, M.H.; SANTOS, C.M.; FREIRE, J.M.; CORRÊA, A.D. Antioxidants and chlorophyll in cassava leaves at three plant ages. **African Journal of Agricultural Research**, v. 8, n. 25, p. 2.650-2.658, 2013 b.

SOTILLO, D.R.; HADLEY, M.; HOLM, E.T.; Phenolics in Aqueous Potato Peel Extract: Extraction, Identification and Degradation. **Journal of Food Science**, v. 59, n. 3, p. 649-651, 1994.

WRIGHT, J.S.; JOHNSON, E.R.; DILABIO, G.A. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n. 6, p. 1173-1183, 2001.

WOBETO, C.; CORRÊA, A.D.; ABREU, C.M.P.; SANTOS, C.D.; ABREU, J.R. Nutrients in the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) leaf powder at three ages of the plant. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 865-869, 2006.

YEH, C.T.; YEN, G.C. Effects of phenolics acids on human phenolsulfotransferases in relation to their antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 1474-1479, 2006.

ZHANG, Y. Theoretical methods used in elucidating activity differences of phenolic antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, n. 6, p. 745-748, 1999.

ZIA-UR-REHMAN, HABBIB, F.; SHAH, W. H. Utilization of potato peels extract as a natural antioxidant in soy bean oil. **Food Chemistry**, v. 85, n. 2, p. 215-220, 2004.

**Artigo 2 - Antioxidant and hepatoprotective action of cassava leaf flour extract against injury induced by CCl<sub>4</sub> in rats**

**Artigo submetido à revista Plant Foods for Human Nutrition**

Mírian Aparecida Isidro dos Santos<sup>1</sup>; · Angelita Duarte Corrêa<sup>1</sup>; ·

Anderson Assaid Simão<sup>1</sup>; · Ana Paula de Carvalho Alves<sup>1</sup>; · Raimundo

Vicente de Sousa<sup>2</sup>; · Adelir Aparecida Saczk<sup>1</sup>

M. A. I. Santos (email) · A. D. Corrêa · A. A. Simão · A. P. C. Alves · R.

V. Sousa · A. A. Saczk

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Universidade Federal de Lavras – UFLA, PO Box 3037, zip code 37200-000, Lavras, MG, Brazil.

email: miriansantos.a@gmail.com and angelita@dqi.ufla.br, Phone

number: +55-35-3829-1272, Fax number: +55-35-3829-1271

<sup>2</sup>Department of Veterinary, Universidade Federal de Lavras – UFLA, PO Box 3037, zip code 37200-000, Lavras, MG, Brazil.

**Abstract** In the present study we assessed the effect of the cassava leaf flour (CLF) extract on the antioxidant activity and the protective action against liver injury in rats. For the extract preparation, the CLF was kept

under maceration in 50% ethanol at a 1:40 ratio (w/v) for 30 minutes and then centrifuged at 2,500 x g for 15 minutes. The supernatant was collected and the precipitate was again subjected to the extraction process with 70% acetone, as described above. Then, supernatants were collected, rotoevaporated for removal of solvents and lyophilized to give the extract. The animals received intraperitoneal doses of carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) and daily doses of the extract by gavage. After the treatment, we tested the activity of the enzymes aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and gamma glutamyl transferase (GGT), and lipid peroxidation, determining the concentration of albumin and serum protein, total lipids and liver histopathology. Treatment with the CLF extract inhibited the damage induced by CCl<sub>4</sub>, resulting in lower degree of steatosis. Protection of the liver damage was demonstrated by the lower activities of serum enzymes, such as AST, ALT and GGT, low levels of lipid peroxidation and by the histopathological observation. These actions were attributed to phenolic compounds, such as gallic acid, gallocatechin, catechin and chlorogenic acid found in the CLF extract.

**Keywords** *Manihot esculenta* • Leaves • Phenolic compounds • Carbon tetrachloride • Enzyme • Lipid peroxidation.

### **Abbreviations**

ALT alanine aminotransferase

AST aspartate aminotransferase

BSA bovine serum albumin

CCl<sub>4</sub> carbon tetrachloride

CLF cassava leaf flour

GGT gamma glutamyl transferase

HPLC high performance liquid chromatography

MDA malondialdehyde

TBARS thiobarbituric acid reactive substances

## **1. Introduction**

Carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) is a hepatotoxin that has been used to induce liver fibrosis in animals. One of the major consequences of liver injury caused by CCl<sub>4</sub> is lipid peroxidation, which is mediated by the production of free radicals derived from CCl<sub>4</sub> and, when repeatedly

administered in a low dose, induces liver fibrosis and then cirrhosis [1]. The hepatotoxic effects of CCl<sub>4</sub> are largely due to its active metabolite, trichloromethyl radical. These activated radicals can bind covalently to macromolecules and induce peroxidative degradation of lipids in the endoplasmic reticulum membrane, rich in polyunsaturated fatty acids. This leads to the formation of lipid peroxides. The toxicity of this compound can be evidenced by an elevation of serum marker enzymes, such as aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and gamma glutamyl transferase (GGT) [2].

Although no therapeutic approach has been successful in the pathogenetic mechanism of liver disease, antioxidant therapies have proven to be effective to achieve some positive effects. Natural products have been prominent in alternative treatments for some diseases.

It is known that cassava leaves exhibit several compounds that have diverse activities, such as phenolic compounds, which present antioxidant activity [3, 4]. Among the various classes of naturally occurring antioxidants, phenolic compounds have received much attention in recent years, especially by inhibiting *in vitro* lipid peroxidation [5, 6].

Melo et al. [4] reported that diets containing 10 and 15 % cassava leaf flour (CLF) were associated with a reduction in plasmatic levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in rats, confirming the *in vivo* antioxidant activity of CLF.

Therefore, the present study was performed to investigate the antioxidant and hepatoprotective activity of the CLF extract against liver injury induced by CCl<sub>4</sub> in Fischer rats.

## **2. Material and Methods**

### **Sample Collection and Preparation**

Mature cassava leaves (*Manihot esculenta* Crantz, Pão da China cultivar) free from pests and diseases were collected at 12 months of age, transported to the laboratory, washed in tap and distilled water, and then placed in air-circulating ovens for drying during 48 hours at temperatures between 30 and 35 °C. After drying, the leaves had their petioles removed and were milled to obtain the flour.

### **Extract preparation**

For the extract preparation, the CLF was kept under maceration in 50% ethanol at a 1:40 ratio (w/v) for 30 minutes, and then centrifuged at 2,500 x g for 15 minutes. The supernatant was collected and the



precipitate was again subjected to the extraction process with 70% acetone, as described above. The two supernatants were collected, rotoevaporated for removal of solvents and lyophilized to give the extract.

### **Animals and experimental conditions**

The biological assay was developed in accordance with the ethical principles in animal experimentation, and the project was approved by the Ethics Committee on Animal Use of Universidade Federal de Lavras/MG/ Brazil (UFLA - Protocol 075/11). Thirty Fischer albino female rats (*Rattus norvegicus*) were used, in growth phase, with initial body weight of approximately 115 g.

Throughout the experiment the animals were kept in polyethylene boxes (49 cm x 34 cm x 16 cm) with wood shavings bedding, with at most six animals per box, in a room with a temperature of  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ , light/dark cycle of 12 hours and with access to feed and water *ad libitum*. Daily cleaning, feeding and gavage were performed by the same person. For the induction of hepatic injury, amounts of  $1.5\text{ mL kg}^{-1}$  carbon tetrachloride ( $\text{CCl}_4$ ), solubilized in olive oil in a 1:1 ratio, were

administered to the animals intraperitoneally on the third, fifth and seventh days of the last week of the 21 days treatment.

The animals were divided into 5 groups of 6 animals each: group 1- Negative control (water), group 2- Positive control (water and CCl<sub>4</sub>), group 3- 50 mg CLF extract kg<sup>-1</sup> and CCl<sub>4</sub>, group 4- 150 mg CLF extract kg<sup>-1</sup> and CCl<sub>4</sub> and group 5- 450 mg CLF extract kg<sup>-1</sup> and CCl<sub>4</sub>.

The CLF extract or water were administered to animals at the concentrations mentioned above, by gavage, once daily, for 21 days. On the 22nd day, all animals were anaesthetized with thiopental sodium, intraperitoneally, at a dose of 40 mg kg<sup>-1</sup>, for the removal of blood by cardiac puncture and of the liver by median laparotomy. The blood was centrifuged at 2,370 x g for 15 minutes to separate the serum, which was used to determine concentrations of albumin and total proteins, activity of AST, ALT and GGT. The liver was washed with saline solution and stored at -20°C for ether extract, antioxidant activity and histopathological analyses.

### **Laboratory testing of blood**

Albumin was determined by a colorimetric method using a commercial kit (Labtest), and the concentration of total serum protein was

determined by the Bradford method [7], using bovine serum albumin (BSA) as a standard. The activities of AST, ALT and GGT were measured by the kinetic colorimetric method using commercial kits (Labtest).

### **Antioxidant Activity**

The lipid peroxidation was determined by the formation of (TBARS), according to Winterbourn et al. [8].

### **Analysis of liver lipids**

The amount of ether extract (total lipids) was determined using the methodologies proposed by AOAC [9]. Livers were dried at 65°C to constant weight, finely ground and defatted with ethyl ether on cellulose cartridges in a Soxhlet-type extractor for 6 hours.

### **Hepatic Histological Analyses**

For histopathological analyses, a liver fragment from each animal was fixed in 10 % formalin for the first 24 hours for conservation until the inclusion procedure. Subsequently, the fragments were processed for inclusion in paraffin blocks, then underwent microtomy, yielding approximately 4 µm sections, which were stained with hematoxylin-eosin (HE method) and mounted on glass slides. The samples were examined

under a light microscope and identified for the presence of hepatic steatosis, considering mild (+), moderate (+ +) or severe (+ + +).

### **Statistical Analysis**

The experimental design was completely randomized with five treatments and six replications, each animal representing an experimental unit. Data were subjected to analysis of variance and, when significant, the Scott-Knott test at 5 % probability was applied for comparison of means using Sisvar [10], a program for statistical analysis and design of experiments.

### **Phenolic Compounds**

Chromatographic analyses were performed using an Agilent HPLC equipment model 1100, equipped with a binary pump, an auto injector and a detector with diode array at a wavelength of 280 nm. The CLF extract and the standards were separated on an Ascentis C18 column (25 cm x 4.6 mm, 5  $\mu$ m), attached to an Ascentis C18 pre-column (2 cm x 4.0 mm, 5  $\mu$ m). The mobile phase was composed of the following solutions: 2 % acetic acid (A) and methanol:water:acetic acid (70:28:2 v/v/v) (B). Analyses were performed in a total time of 50 min at 15 °C, in a gradient-type system: 100 % solvent A from 0.01 to 5 min, 70 %

solvent A from 5 to 25 min, 60 % solvent A from 25 to 43 min, 55% solvent A from 43 to 50 min. Solvent A was increased to 100%, seeking to maintain a balanced column. The flux used in all tests was  $1 \text{ mL min}^{-1}$  and the injection volume was  $20 \text{ }\mu\text{L}$ .

The phenolic standards used were: gallic acid, galocatechin, 3,4-dihydroxybenzene, catechin, chlorogenic acid, epigallocatechin, vanillic acid, epicatechin, syringic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, m-coumaric acid, o-coumaric acid, resveratrol, ellagic acid, salicylic acid, all Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The stock standard solutions were prepared in dimethyl sulfoxide and/or methanol (Merck) in a concentration range of 0,1 to  $177.15 \text{ mg L}^{-1}$ . Acetic acid and methanol (Merck, Darmstadt, Germany) were used to prepare the mobile phase and ultrapure water was obtained by the Milli-Q system (Millipore, Billerica, MA, USA).

The phenolic compounds in the CLF extract were identified by comparison with retention times of standards. Quantification was performed by the construction of analytical curves, in which each point represents the mean of three replicates.

### **3. Results and Discussion**

#### **Antioxidant Activity**

It was possible to notice that all tested doses of the CLF extract reduced the formation of malonic dialdehyde (MDA), and antioxidant action was observed for the compounds present in the extract, no although there was no statistical difference between the three doses (Table 1). These results are in agreement with those reported by Melo et al. [4], who treated rats with diets containing 5%, 10% and 15% CLF for 7 weeks; in all diets, isocaloric diets contained 1 % cholesterol, and the authors observed that the diets formulated with 10% and 15% CLF were associated with the decrease in plasma levels of TBARS, corroborating the results of the present study.

**Table 1** Content of thiobarbituric acid reactive substances (nmol MDA mg<sup>-1</sup> protein) and activity of enzymes ALT, AST and GGT (U L<sup>-1</sup>) in control groups and in the ones treated with cassava leaf flour (CLF) extract in different doses

Treat*	TBARS	ALT	AST	GGT
1	0.16 ± 0.03 c	41.71 ± 2.73 c	115.35 ± 17.21 c	2.76 ± 0.27 c
2	0.36 ± 0.10 a	235.93 ± 3.97 a	357.22 ± 19.77 a	13.70 ± 0.73 a
3	0.25 ± 0.06 b	127.37 ± 2.83 b	238.91 ± 20.98 b	7.64 ± 0.51 b
4	0.21 ± 0.07 b	132.15 ± 2.75 b	241.35 ± 21.13 b	6.05 ± 0.65 b
5	0.23 ± 0.09 b	135.59 ± 2.98 b	233.77 ± 19.85 b	7.22 ± 0.49 b

\* Treatments: 1- Negative control (water), 2- Positive control (water and CCl<sub>4</sub>), 3- 50 mg CLF extract kg<sup>-1</sup> and CCl<sub>4</sub>, 4- 150 mg CLF extract kg<sup>-1</sup> and CCl<sub>4</sub> and 5- 450 mg CLF extract kg<sup>-1</sup> and CCl<sub>4</sub>. Values represent the average of 6 replicates ± standard deviation. <sup>a</sup>Means followed by the same letter in columns not differ by the Scott-Knott test at p<0.05.

### Biochemical Parameters

The group treated with water (negative control) showed a significantly smaller activity of AST, ALT and GGT than the group treated with CCl<sub>4</sub> (positive control), indicating that the administration of

this compound caused a significant raise in the levels of these enzymes (Table 1). In all groups treated with the CLF extract, there was a decrease in serum levels of AST, ALT and GGT compared to the group treated with CCl<sub>4</sub>. However, the recorded contents did not equal the negative control.

The results for AST and ALT differed from those reported by Melo et al. [11], who observed an increase in the ALT activity, and AST showed no significant difference when compared to the control; in this study, the authors treated rats for 7 weeks with diets plus 5%, 10% and 15% CLF; in all cases, isocaloric diets contained 1% cholesterol. However, Huo et al. [12] studied the antioxidant and hepatoprotective effects of licorice aqueous extract against the oxidative damage induced by CCl<sub>4</sub> (3 mL kg<sup>-1</sup>) in rats and the results showed that all tested concentrations (100, 150 and 300 mg kg<sup>-1</sup>) effectively protected the liver of animals, and the protective effect of the extract was evidenced by a decrease in the levels of AST and ALT.

Frazini et al. [13] and Teixeira et al. [14] reported that ALT is found primarily in the liver, and considered a more sensitive indicator than AST, since it exists in all body tissues, especially the heart, liver,



skeletal muscle, kidneys, brain, pancreas, leukocytes, erythrocytes. GGT is a glycoprotein enzyme regularly attached to the cell membrane and participates in the transport of amino acids and peptides to cells and tissue glutathione levels. It is found predominantly in the liver, kidneys and plasma. Thus, it is clearly important to simultaneously employ tests with different marker enzymes of liver function, because the results obtained are complementary.

The negative control showed a higher albumin level than the positive control, indicating that CCl<sub>4</sub> decreased albumin levels in the serum of animals (Table 2).

**Table 2** Serum albumin and total protein levels (g dL<sup>-1</sup>) and total lipids in the liver (g 100 g<sup>-1</sup> dry matter) in control groups and in the ones treated with cassava leaf flour (CLF) extract in different doses

Treatments*	Albumin	Total proteins	Total lipids
1	6.31 ± 0.87 a	7.73 ± 1.09 a	30.67 ± 1.47 c
2	4.30 ± 0.98 c	4.87 ± 0.73 c	47.46 ± 1.21 a
3	5.33 ± 1.05 b	6.45 ± 1.13 b	44.29 ± 1.13 b
4	5.46 ± 1.11 b	6.39 ± 1.19 b	43.96 ± 1.50 b
5	5.37 ± 1.02 b	6.43 ± 1.17 b	39.48 ± 1.39 b

\* 1- Negative control (water), 2- Positive control (water and CCl<sub>4</sub>), 3- 50 mg CLF extract kg<sup>-1</sup> and CCl<sub>4</sub>, 4- 150 mg CLF extract kg<sup>-1</sup> and CCl<sub>4</sub> and 5- 450 mg CLF extract kg<sup>-1</sup> and CCl<sub>4</sub>. Values represent the average of 6 replicates ± standard deviation. Means followed by the same letter in columns not differ by the Scott-Knott test at p<0.05.

The decrease in albumin production appears to be related to hepatic fat accumulation because, according to Nicoluzzi et al. [15], this build-up causes a reduction in the synthesis ability of the liver and the consequent reduction in albumin concentration. Groups that received treatment with different CLF extract doses had significantly higher levels than the positive control group and lower than the negative group, but no significant difference between the doses was observed. These results demonstrate that the CLF extract conferred protection to the liver of animals in all tested doses.

Albumin is the most abundant protein in blood plasma, constituting about 50 to 65%. It is synthesized in the liver and the most important factor for its blood concentration is the liver ability to synthesize it [15]. Albumin synthesis is affected in a number of disorders, especially those of the liver. The plasma of patients with liver diseases

often presents a decrease in the albumin:globulin ratio. Hypoalbuminemia is promoted by a decrease or defect in the synthesis, due to hepatocellular damage, among others [16].

The total protein test assesses plasma concentration of protein (albumin + globulin). In a model of experimental cirrhosis developed with CCl<sub>4</sub>, Díaz-Gil et al. [17] observed a decrease in serum albumin and total protein levels, corroborating data from this study.

The significant difference between the positive and negative control groups showed that CCl<sub>4</sub> administration led to a decrease in serum levels of total protein (Table 2). Treatment with CLF extract, in all doses, caused an increase in serum protein concentration, but they did not reach the baseline levels recorded for the negative control. Total proteins are reduced in the case of liver injury, due to the increase in capillary permeability and decrease in the liver ability to synthesize mainly albumin [18].

### **Hepatic Fat**

Hepatic steatosis is caused by fat accumulation in the liver, and this condition may be caused by the presence of toxic substances, such as CCl<sub>4</sub>. The total lipid content of the group treated with water (negative

control) was significantly lower than the group treated with CCl<sub>4</sub>, indicating that this xenobiotic increases the rate of hepatic lipids (Table 2). When compared with the positive control, groups pre-treated with CLF extract, in combination with CCl<sub>4</sub>, showed lower lipid levels. Among the different CLF extract doses, there was no significant difference. Fat accumulation in the liver was minimized by the CLF extract independently of dose, but the recorded contents did not equal the negative control. The liver can be protected from fat accumulation by agents capable of combating oxidative stress, therefore, the reduction in hepatic fat may have been caused by the phenolic compounds present in CLF extract.

### **Phenolic Compounds**

In the chromatographic profile of CLF extract, the following phenolic compounds were identified: gallic acid (33.00 mg 100 g<sup>-1</sup> ± 0.42), gallo catechin (9.10 mg 100 g<sup>-1</sup> ± 2.37), catechin (155.96 mg 100 g<sup>-1</sup> ± 14.07) and chlorogenic acid (104.80 mg 100 g<sup>-1</sup> ± 3.32); catechin presented the highest content, followed by chlorogenic acid. To date are no published data on the characterization of phenolic in CLF.

However, there are numerous reports associating the presence of phenolic compounds with antioxidant activity. Sotelo-Félix et al. [19] studied the effect of rosemary extract orally administered in rats in a concentration of  $200 \text{ mg kg}^{-1}$  for five days, and observed a hepatoprotective effect against severe injury induced by  $\text{CCl}_4$ . Rosemary played a role as an antioxidant, eliminating trichloromethylperoxyl radicals formed by hepatic metabolization of the chemical aggressor. According to Silva et al. [20], the antioxidant activity of rosemary extracts depends on their phenolic composition.

Balasubashini et al. [21] observed that the administration of a ferulic acid supplementation to diabetic rats for 45 days resulted in a decrease in TBARS; results were more pronounced when ferulic acid alone was employed.

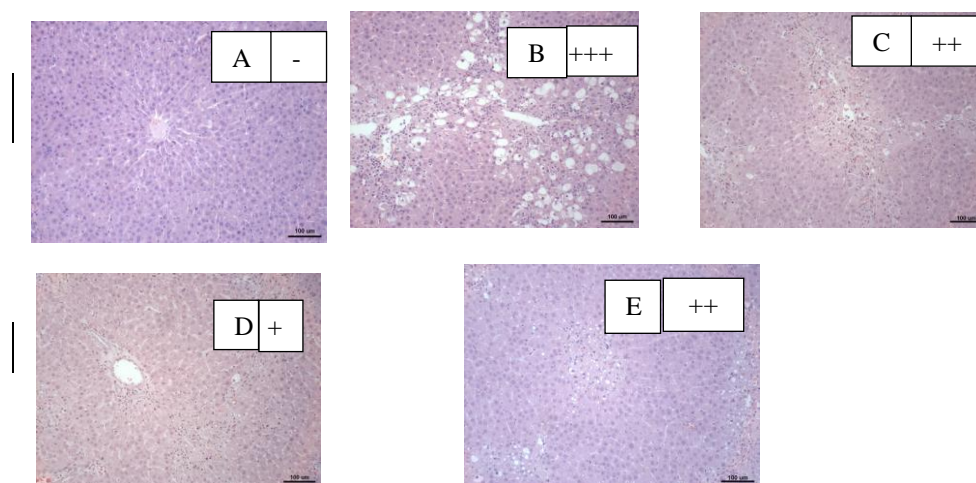
Hypercholesterolemic rats fed on diets containing 0.3% of strawberry phenolic compounds showed a decrease in lipid peroxidation [22]. A decrease in TBARS and in transaminases (AST and ALT) was also reported in diabetic rats. In this study it was demonstrated that olive phenolic compounds are effective in inhibiting oxidative stress [23]; besides, the hepatoprotective effect of *Acacia confusa* bark and gallic

acid, its active constituent, was tested against CCl<sub>4</sub> induced hepatotoxicity and it was found that the treatment was effective against damage induced by CCl<sub>4</sub>, which was evidenced by the significant decrease in AST, ALT and inhibition of lipid peroxidation. These data corroborate the results found in this study, and allow to infer that the phenolic compounds present in the CLF extract are responsible for their action.

### **Histological Examination**

Fat accumulation is more frequently observed in the liver, since this is the main organ involved in lipid metabolism. Lipid content in hepatocytes is regulated by the activities of cellular enzymes that catalyze lipid uptake, synthesis, oxidation and externalization from the cell. When the fat amount that enters into hepatocytes exceeds the capacity for their oxidation or externalization, hepatic steatosis settles [24].

The histopathological study revealed hepatic steatosis with hepatocyte vacuolization or degeneration (Figure 1). With the exception of the negative control group, all groups had this injury; however, the intensity was considered severe in the positive control, and mild or moderate in the other groups.



**Fig. 1** Cytoplasmic vacuolization of animal hepatocytes for five treatments (-) absent, (+) mild, (++) moderate and (+++) severe. A = rats received water; B = rats received water and  $\text{CCl}_4$ ; C = 50 mg cassava leaf flour (CLF) extract  $\text{kg}^{-1}$  and  $\text{CCl}_4$ ; D = 150 mg CLF extract  $\text{kg}^{-1}$  and  $\text{CCl}_4$  and E = 450 mg CLF extract  $\text{kg}^{-1}$  and  $\text{CCl}_4$ .

#### 4. Conclusions

The administration of the extract ethanol/acetone of CLF in concentrations of 50, 150 and 450 mg  $\text{kg}^{-1}$  decreases the activity of marker enzymes of liver damage, such as AST, ALT and GGT and lipid peroxidation, and increases the levels of albumin and total proteins, demonstrating the hepatoprotective action of this extract, which contains

the following phenolic compounds: gallic acid, gallo catechin, catechin and chlorogenic acid.

### References

- 1 Muriel P, Escobar Y (2003) Kupffer cells are responsible for liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride. *J Appl Toxicol* 23: 103-108.
- 2 Palanivel GM, Raj Kapoor B, Senthil Kumar R, Einstein JW, Kumar EP, Rupesh Kumar M, Kavitha K, Pradeep Kumar M, Jayakar B (2008) Hepatoprotective and antioxidant effect of *Pisonia aculeata* L. against CCl<sub>4</sub> - induced hepatic damage in rats. *Sci Pharm* 76: 203–215.
- 3 Corrêa AD, Santos SR dos, Abreu CMP de, Jokl L, Santos CD dos (2004) Removal polyphenols of the flour cassava leaves. *Ciênc Tecnol Aliment* 24: 159-164.
- 4 Melo DS de, Corrêa AD, Marcos FCA, Sousa RV de, Abreu CMP de, Santos CD dos (2007) Effects of cassava leaf flour on lipidic peroxidation, blood lipidic profile and liver weight of rats. *Ciênc Agrotec* 31: 420-428.
- 5 Naczki M, Shahidi F (2004) Extractions and analysis of phenolics in food. *J Chromatogr* 1054: 95-111.



- 6 Soares SE (2002) Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev Nutr* 15: 71-81.
- 7 Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 677-685.
- 8 Winterbourn CC, Gutteridge JM, Halliwell B (1985) Doxorubicin-dependent lipid peroxidation at low partial pressures of O<sub>2</sub>. *Free Radic Biol Med* 2: 1119-1122.
- 9 Association of Official Analytical Chemists (2005) Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists. 18 ed. Maryland: AOAC 1094p.
- 10 Ferreira DF (2003) SISVAR: versão 4.6 (build 61) software. Lavras: UFLA. Disponível em: <<http://www.dex.ufla.br/danielff/dff02.htm>> Acesso em: 27 setembro 2012.
- 11 Melo DS de, Corrêa AD, Marcos FCA, Sousa RV de, Abreu CMP de, Santos CD dos (2008) Effects of cassava leaves flour on the AST, ALT, ALP enzymes activity and hepatic lipids of Wistar rats. *Ciênc Tecnol Aliment* 28: 32-37.

12 Hou HZ, Wang B, Liang YK, Bao Y Y, GU Y (2011) Hepatoprotective and antioxidant effects of Licorice extract against CCl<sub>4</sub>-induced oxidative damage in rats. *Int J Mol Sci* 12: 6529-6543 doi:10.3390/ijms12106529.

13 Frazini M, Ottaviano V, Fierabracci V, Bramanti E, Zym WL, Barsacchi R, Scatena F, Boni C, Mammini C, Passino C, Pompella A, Emdin M, Paolicchi A (2008) Fractions of plasma gamma-glutamyltransferase in healthy individuals: Reference values. *Clin Chim Acta* 395: 188-9.

14 Teixeira LTA, Júnior LSS, Queiroz FM, Oliveira CN, Schwarz A (2009) Avaliação de efeitos toxicológicos e comportamentais da *Hypericum perforatum* da *Piper methysticum* em ratos. *Rev Bras Toxicol* 22: 42- 49.

15 Nicoluzzi JE, Barbu V, Baldrmont M (2000) Viabilité et état de différenciation des hépatocytes humains immunoprotégés par macroencapsulation et transplantés chez le rat. *Gastroenterol Clin Biol* 24: 342-348.

16 Ribeiro NJ, Oliveira TT de, Nagem JT, Pinto AS (2006) Evaluation in the sanguine parameters of hepatotoxicity in normal rabbits submitted to

treatment with anthcyanin and anthocyanin + naringenin. RBAC 38: 23-27.

17 Díaz-Gil JJ, Garcia-Monzon C, Rua C, Martin-Sanz P, Cereceda RM, Miquilena-Colina ME, Machin C, Fernandez-Martinez A, Garcia-Canero R (2009) Liver growth factor antifibrotic activity in vivo is associated with a decrease in activation of hepatic stellate cells. *Histol Histopathol* 24: 473-479.

18 Adhal NH, Manning D (2008) Diagnosis of liver fibrosis. *Gastroenterol Clin Biol* 32: 88-90.

19 Sotelo-Félix JI, Martinez-Fong D, Muriel P, Santillán RL, Castillo D, Yahuaca P (2002) Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in the rat. *J Ethnopharmacol* 81: 145-54.

20 Silva AM de O, Andrade-Wartha ERS de, Carvalho EBT de, Lima A de, Novoa AV, Mancini-Filho J (2011) Effect of aqueous rosemary extract (*Rosmarinus officinalis L.*) on the oxidative stress of diabetic rats. *Rev Nutr* 24: 121-130.

- 21 Balasubashini MS, Rukkumani R, Viswanathan P, Menon VP (2004) Ferulic acid alleviates lipid peroxidation in diabetic rats. *Phytother Res* 18: 310-14.
- 22 Mateos R, Lecumberri E, Ramos S, Goya L, Bravo L (2005) Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress: Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *J Chromatogr* 827: 76-82.
- 23 Tung YT, Wu JH, Huang CC, Peng CH, Chen YL, Yang SC, Chang TS (2009) protective effect of *Acacia confuse* bark extract and its active compound gallic acid against carbon tetrachloride-induced chronic liver injury in rats. *Food Chem Toxicol* 47: 1385-1392.
- 24 Koteish A, Diehl AM (2001) Animal models of steatosis. *Semin Liver Dis* 21: 89-104.

**Artigo 3 - Extrato metanólico de folhas de mandioca como alternativa ao controle da lagarta-do-cartucho e de formigas cortadeiras**  
**Cassava leaf methanolic extract as an alternative to control of fall armyworm and leaf cutter ants**

**Artigo aceito para publicação na revista Semina: Ciências Agrárias**

Mírian Aparecida Isidro dos Santos<sup>1\*</sup>; Angelita Duarte Corrêa<sup>2\*</sup>; Ana Paula de Carvalho Alves<sup>3</sup>; Anderson Assaid Simão<sup>4</sup>; Dejene Santos Alves<sup>5</sup>; Rodrigo Lopes de Oliveira<sup>6</sup>; Adelir Aparecida Saczk<sup>7</sup>; Geraldo Andrade Carvalho<sup>8</sup>

---

<sup>1</sup> Química, Discente de Doutorado do Depto. de Química, Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, MG. E-mail: miriansantos.a@gmail.com

<sup>2</sup> Profa. da UFLA, Lavras. MG. Email: angelita@dqi.ufla.br

<sup>3</sup> Química, Discente de Doutorado do Depto. de Química, Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, MG. E-mail: anapaula.quimica@hotmail.com

<sup>4</sup> Químico, Discente de Doutorado do Depto. de Química, Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, MG. E-mail: andersonbsbufla@yahoo.com.br

<sup>5</sup> Bióloga, Discente de Doutorado do Depto. de Entomologia, Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, MG. E-mail: dejane\_bio@yahoo.com.br

<sup>6</sup> Engº Agrº, Discente de Mestrado do Depto de Entomologia, Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, MG. E-mail: rodrigo\_lopes\_oliveira@yahoo.com.br

<sup>7</sup> Profa. da UFLA, Lavras. MG. Email: adelir@dqi.ufla.br

<sup>8</sup> Prof. da UFLA, Lavras. MG. E-mail: gacarval@den.ufla.br

\*Autor para correspondência

### Resumo

Objetivou-se neste trabalho caracterizar os compostos fenólicos e avaliar o efeito, em condições de laboratório, do extrato metanólico do pó de folhas de mandioca sobre o desenvolvimento da lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* e da saúva-limão *Atta sexdens rubropilosa*. O referido extrato, nas concentrações de 250, 500, 1000 e 1500 mg kg<sup>-1</sup>, foi incorporado na dieta artificial, a qual foi exposta à lagarta para avaliar características biológicas. Logo após a emergência dos insetos, outro experimento foi realizado para verificar a possível atividade subletal do extrato, para isso casais de *S. frugiperda* foram isolados em gaiolas e as posturas foram recolhidas para a quantificação. O extrato de *Manihot esculenta* Crantz provocou redução na porcentagem de sobrevivência das lagartas, bem como no número de ovos. A seguir, o mesmo extrato foi solubilizado em etanol 10% e aplicado em formigas. Observou-se a mortalidade em comparação com a testemunha. Conclui-se que o extrato metanólico do pó de folhas de *M. esculenta* Crantz, contendo ácido gálico e catequina, apresenta-se como uma alternativa promissora ao controle de *S. frugiperda* e de *A. sexdens rubropilosa*.

**Palavras-Chave:** extrato vegetal, planta inseticida, compostos fenólicos, *Spodoptera frugiperda*, *Atta sexdens*

### Abstract

The objective of this study was to characterize phenolic compounds and evaluate the effect, under laboratory conditions, of the cassava leaf powder methanol extract on the development of fall armyworm *Spodoptera frugiperda* and of leaf-cutting ant *Atta sexdens*

rubropilosa. The extract was incorporated into an artificial diet, to which the armyworm was exposed, at concentrations of 250, 500, 1,000 and 1,500 mg kg<sup>-1</sup>, in order to evaluate biological characteristics. Soon after the insects emergence, another experiment was conducted to verify the possible sub lethal activity of the extract; therefore, *S. frugiperda* couples were isolated in cages and eggs were collected and counted. The *Manihot esculenta* Crantz extract caused a reduction in the percentage of armyworm survival, as well as in the eggs number. Then, the same extract was solubilized in 10% ethanol and applied to ants; mortality was observed, compared to the control. It is possible to conclude that the *M. esculenta* Crantz leaf powder methanolic extract, containing gallic acid and catechin, is a promising alternative to control *S. frugiperda* and *Atta sexdens rubropilosa*.

**Key Words:** plant extract, plant insecticide, phenolic compounds, *Spodoptera frugiperda*, *Atta sexdens*

## 1. Introdução

Entre os inúmeros insetos pragas de culturas de importância econômica, destacam-se a lagarta militar ou lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) e a saúva *Atta sexdens rubropilosa* (Forel) (Hymenoptera: Formicidae). Ambas as pragas são polípagas e causam danos através da desfolha. A espécie *S. frugiperda* pode atacar culturas como milho, algodão, arroz, entre outras, provocando severos prejuízos devido à grande capacidade de desfolhamento que causa à parte aérea das plantas, ocasionando perdas que variam de 15 a 37%, dependendo da cultura (BUSATO et al., 2005).

As formigas causam perdas, como a morte de mudas, a redução do crescimento de árvores e provocam a diminuição da resistência da planta a outros insetos e agentes patogênicos. Estudos sobre os danos causados por formigas em florestas, mostraram que esses insetos são considerados pragas-severas podendo provocar perdas que podem chegar a 100% (ZANETTI et al., 2003).

O controle dessas pragas vem sendo feito por meio da aplicação de inseticidas sintéticos, como piretróides e organofosforados (REDOAN et al., 2012; ZANETTI et al., 2008). Desta forma, são inúmeros os esforços na descoberta de novos produtos em alternativa aos pesticidas existentes e com isso a busca por princípios ativos de plantas contra insetos-praga tem se intensificado, já que, muitas vezes, o método de controle químico pode se mostrar ineficiente, além de causar uma série de prejuízos ao ambiente e ao homem (AL-MAZRA'AWI; ATEYYAT, 2009; GEORGES et al., 2008; RAHUMAN et al., 2009).

Nesse contexto, sabe-se que folhas de mandioca, *Manihot esculenta* Crantz, contém metabólitos secundários tais como compostos fenólicos, lectinas e inibidores de tripsina (MELO et al., 2007). Entre as classes de metabólitos secundários de plantas com reconhecida atividade inseticida merecem destaque os compostos fenólicos, tais como lignina, flavonoides e taninos, conhecidos por conferirem proteção à planta contra a herbivoria (FRIEDMAN, 1997; MONTEIRO et al., 2005).

Assim, Cintra et al. (2002) constataram que insetos das ordens Lepidoptera, Orthoptera e Hymenoptera foram sensíveis à ingestão de compostos fenólicos em dietas artificiais. Neste contexto, Barbehenn et al. (2001) também verificaram que *Orygia leucostigma* Smith



(Lepidoptera: Lymantriidae) e *Helicoverpa zea* Boddie (Lepidoptera: Noctuidae) tiveram maior deformidade de pupas e mortalidade de lagartas ao se alimentarem de fenóis originados do extrato de plantas da família Asteraceae, devido à oxidação de tecidos no intestino médio.

Não foram encontrados relatos de caracterização de compostos fenólicos nas folhas de mandioca, sendo que os estudos existentes relatam apenas o seu teor. Desta forma, os objetivos neste trabalho foram caracterizar esses compostos e avaliar o efeito do extrato metanólico do pó de folhas de mandioca sobre o desenvolvimento da lagarta-do-cartucho *S. frugiperda* e da saúva-limão *A. sexdens rubropilosa*.

## **2. Material e métodos**

### **Obtenção dos insetos**

As lagartas de *S. frugiperda* utilizadas nos experimentos foram provenientes de criação de laboratório do Departamento de Entomologia da UFLA, em que as lagartas foram alimentadas com dieta artificial segundo Greene, Leppla e Dickerson (1976), e os adultos receberam como alimento solução aquosa de mel a 10%. Para a montagem dos experimentos, foram utilizadas lagartas provenientes de segunda postura.

Para a execução do bioensaio com *Atta sexdens rubropilosa*, formigas foram coletadas em ninhos existentes no Campus da UFLA e levadas ao laboratório do Departamento de Entomologia.

### **Coleta das folhas e preparo dos extratos**

Folhas maduras de mandioca (cultivar Pão da China), livres de pragas e doenças, obtidas junto ao Departamento de Agricultura, foram

coletadas no período da manhã, no mês de abril, aos 12 meses de idade da planta e transportadas ao laboratório de Bioquímica da UFLA. As folhas foram lavadas em água destilada e, em seguida colocadas em estufas com circulação de ar para secagem por 48 h, à temperatura entre 30 e 35°C. Após secagem, as folhas tiveram seus pecíolos retirados e, em seguida, foram moídas para a obtenção de um pó com granulometria de 35 mesh. O teor de umidade foi determinado segundo AOAC (2005) nas folhas de mandioca e no pó obtido em triplicata.

Para o preparo dos extratos, o pó foi macerado em metanol durante 48 h, na proporção de 10:15 (p v<sup>-1</sup>) e filtrado utilizando-se algodão hidrófilo. Ao resíduo foi adicionado mais metanol, sendo esse procedimento repetido sete vezes para garantir um bom rendimento da extração. As fases líquidas foram combinadas e concentradas em evaporador rotatório até a completa eliminação do solvente e, em seguida, foram liofilizadas, dando origem ao extrato metanólico (EM).

### **Determinação de fenólicos no EM**

A dosagem de compostos fenólicos no EM foi determinada em triplicata, segundo metodologia da (AOAC, 2005), utilizando como padrão o ácido tânico.

### **Caracterização dos compostos fenólicos**

As análises cromatográficas foram realizadas empregando o equipamento HPLC Agilent modelo 1100, equipado com uma bomba binária, injetor automático e detector com arranjo de diodos, no comprimento de onda 280 nm. O EM e os padrões foram separados em

uma coluna ascentis C18 25 cm x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , conectada a uma pré-coluna ascentis C18 2 cm x 4,0 mm, 5  $\mu\text{m}$ . A fase móvel foi composta pelas soluções: ácido acético 2% (A) e metanol:água:ácido acético 70:28:2 (v v v<sup>-1</sup>) (B). As análises foram realizadas com tempo total de 50 minutos, a uma temperatura de 15°C, em um sistema do tipo gradiente: 100% do solvente A de 0,01 a 5 minutos, 70% do solvente A de 5 a 25 minutos, 60% do solvente A de 25 a 43 minutos, 55% do solvente A de 43 a 50 minutos. O solvente A foi aumentado para 100% buscando manter o equilíbrio da coluna. O fluxo utilizado em todas as análises foi de 1 mL min<sup>-1</sup> e o volume de injeção foi de 20  $\mu\text{L}$ .

Os padrões fenólicos utilizados foram: ácido gálico, galocatequina, 3,4-dihidroxidobenzeno, catequina, ácido clorogênico, epigalocatequina, ácido vanílico, epicatequina, ácido siríngico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido m-cumárico, ácido o-cumárico, resveratrol, ácido elágico, ácido salicílico todos da marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). As soluções estoque dos padrões foram preparadas em dimetil sulfoxido e/ou metanol (Merck) em um intervalo de concentração de 0,10 a 177,15 mg L<sup>-1</sup>. O ácido acético e metanol (Merck, Darmstadt, Germany) foram usados na preparação da fase móvel e a água ultrapura foi obtida pelo sistema Milli-Q (Millipore, Billerica, MA, EUA).

O EM e os padrões foram filtrados em uma membrana de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore<sup>®</sup>) e diretamente injetados no sistema cromatográfico. Cada solução foi injetada três vezes no sistema HPLC, com a finalidade de se obter a média das concentrações e dos tempos de retenção. Os compostos fenólicos no EM foram identificados por comparação com os

tempos de retenção dos padrões. A quantificação foi realizada por meio da construção de curvas analíticas, no qual cada ponto representou a média de três repetições.

### **Ensaio com lagartas de *S. frugiperda***

O EM foi previamente solubilizado em água e incorporado à dieta artificial desenvolvida por Greene, Leppla e Dickerson (1976), nas concentrações de 250, 500, 1000 e 1500 mg kg<sup>-1</sup>. A incorporação do extrato foi realizada ao final do preparo da dieta, quando esta atingiu temperatura próxima a 55°C, a fim de se evitar a degradação de compostos presentes no extrato. Os pedaços de dieta (1,5 cm de diâmetro x 1,5 cm de altura) foram transferidos para recipientes plásticos de 50 mL, onde foi inoculada uma lagarta de aproximadamente segundo instar. Na testemunha, os insetos receberam dieta acrescida de água. Para cada tratamento foram utilizados 72 insetos, cada um considerado uma repetição, sendo o experimento conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e setenta e duas repetições. Cada parcela foi constituída por setenta e duas lagartas, mantidas de forma isolada. Os parâmetros avaliados foram: duração das fases larval e pupal, peso das pupas (após 24 horas de pupação), percentagem de sobrevivência dos insetos nas fases larval e pupal.

Logo após a emergência dos adultos, casais de *S. frugiperda* foram isolados em gaiolas. Os insetos receberam como alimento solução aquosa de mel a 10%. Nesse caso o experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por um casal. Os experimentos foram realizados em

sala climatizada a  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa de  $70 \pm 10\%$  e fotofase de 12 horas. A longevidade dos adultos foi determinada por meio de observações diárias. As posturas foram recolhidas diariamente para quantificação. Foram determinados os períodos de pré-oviposição, oviposição, longevidade dos adultos e número de ovos.

### **Ensaio com formigas cortadeiras**

Para a execução do bioensaio com *Atta sexdens* rubropilosa, formigas, de diferentes castas, foram coletadas em ninhos existentes no Campus da UFLA e levadas ao laboratório do Departamento de Entomologia. Para a montagem dos testes, o EM foi solubilizado em etanol 10% e 1 $\mu\text{L}$  foi aplicado no protórax das formigas com o auxílio de microseringa, em quatro concentrações, sendo: 0,1; 0,2; 0,3 e 0,4 mg mL<sup>-1</sup>. Como testemunhas negativas utilizaram-se água e etanol 10%. Para a aplicação dos extratos, as formigas foram imobilizadas com uso de CO<sub>2</sub> por aproximadamente três segundos.

O delineamento do experimento foi inteiramente casualizado, sendo que cada parcela experimental foi representada por uma placa de Petri de 10 cm de diâmetro contendo 10 formigas e 10 cm<sup>3</sup> de dieta artificial sólida confeccionada conforme metodologia de Bueno (1997). O experimento foi realizado em câmara climatizada a  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa de  $70 \pm 10\%$  e fotofase de 12 h. Avaliou-se o número de insetos mortos por um período de nove dias após as formigas receberem a aplicação dos extratos.

### **Análises estatísticas**

Os parâmetros referentes a peso de pupa, sobrevivência na fase pupal, duração do período larval e pupal, pré-oviposição, oviposição, longevidade dos adultos e número de ovos, foram submetidos a “one way” ANOVA e quando significativas as médias dos tratamentos foram submetidas à análise de regressão ( $p < 0,05$ ) em função da concentração do extrato (Statistical Analysis System program, 2008).

Os dados associados à sobrevivência das lagartas durante a fase larval e às formigas durante o período experimental foram submetidos à análise de sobrevivência, aplicando-se o modelo de Weibull, por meio do pacote Survival do software R<sup>®</sup> (R Development Core Team, 2009). Após a seleção do modelo matemático mais adequado por meio da análise de resíduos, realizou-se a análise de contraste para verificar a semelhança entre os tratamentos empregados e a formação de grupos congêneres. Também foram calculados os tempos letais 50 (TL50), tempo necessário para matar 50% dos insetos em teste, para cada grupo formado.

## **3. Resultados e discussão**

### **Compostos fenólicos**

Os teores de umidade das folhas frescas e do pó das folhas de mandioca foram, em  $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ , de  $70,46 \pm 0,07$  e  $16,12 \pm 0,24$ , respectivamente. O rendimento do EM do pó de folhas de mandioca foi cerca de 9,7%, o que está de acordo com os resultados de Ayres et al. (2008) para o preparo de extratos a partir de outras espécies vegetais. O EM apresentou teor de compostos fenólicos de  $1,58 \pm 0,27 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$  de matéria seca (MS), sendo que este valor está abaixo da faixa de variação

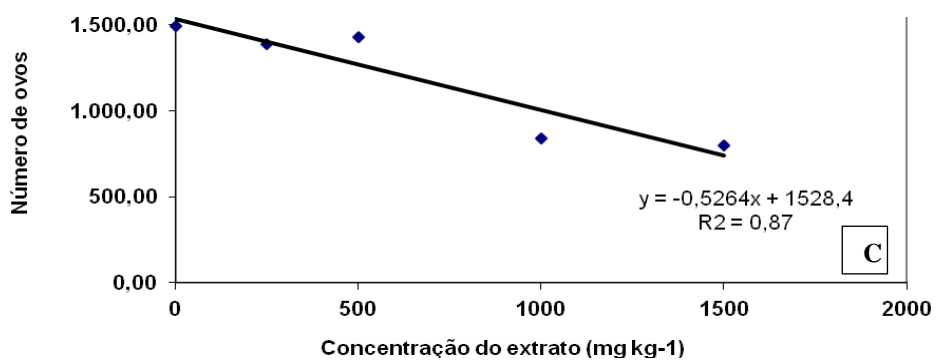
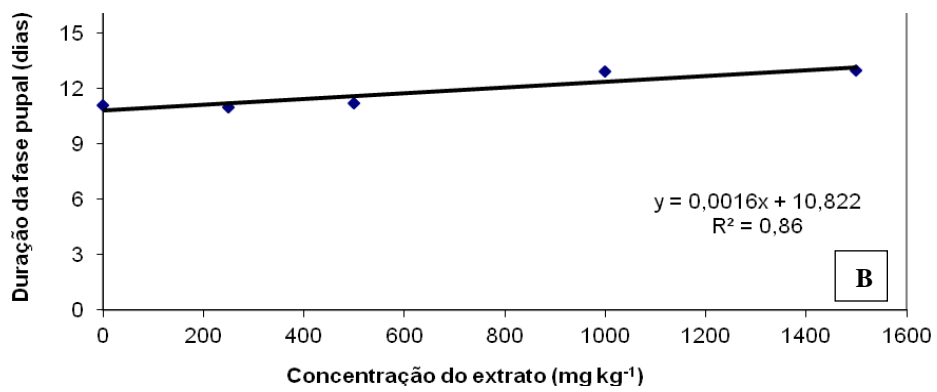
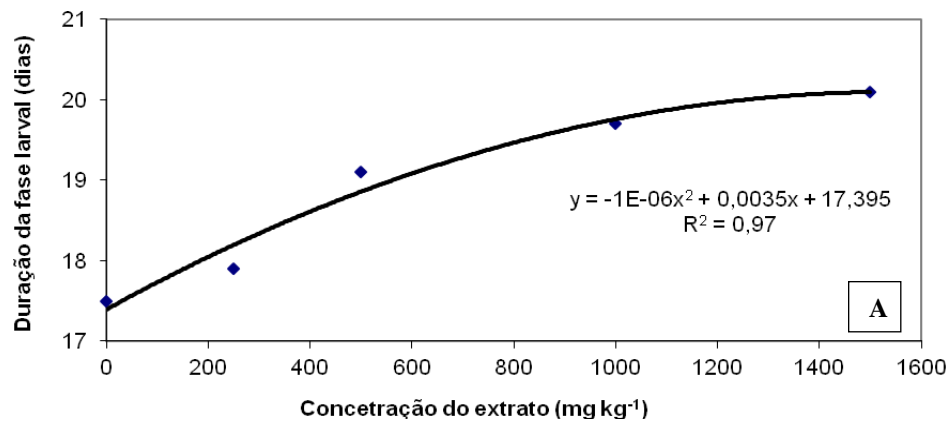
$4,72 \pm 0,64$  a  $6,37 \pm 4,11$  g 100 g<sup>-1</sup> para diferentes cultivares e processamentos (CORRÊA et al., 2004; MELO et al., 2007).

No perfil cromatográfico do EM identificou-se os seguintes compostos fenólicos: ácido gálico ( $35,00 \pm 1,37$  mg 100 g<sup>-1</sup>) e catequina ( $191,00 \pm 1,13$  mg 100 g<sup>-1</sup>). A respeito do modo de ação de compostos fenólicos sobre insetos, alguns autores relataram a formação de lesões degenerativas no intestino (ARTEEL; LINDROTH, 1992). Entretanto, mais recentemente, foi demonstrado que, para *Malacosoma disstria* Hübner (Lepidoptera: Lasiocampidae), a ingestão de compostos fenólicos não apenas produz um estresse oxidativo no conteúdo do lúmen do intestino médio, como também pode levar a um aumento do estresse oxidativo nos tecidos do intestino, o que provocaria a formação de lesões no mesmo (BARBEHENN et al., 2008).

#### **Ensaio com lagartas de *S. frugiperda***

Lagartas alimentadas com dieta artificial contendo o EM nas concentrações de 250, 500, 1000 e 1500 mg kg<sup>-1</sup> apresentaram prolongamento da fase larval em comparação com a testemunha (Figura 1A).

**Figura 1.** Efeito do extrato metanólico (EM) do pó de folhas de mandioca, em diferentes concentrações, sobre duração da fase larval (A), duração da fase pupal (B) e número de ovos (C).





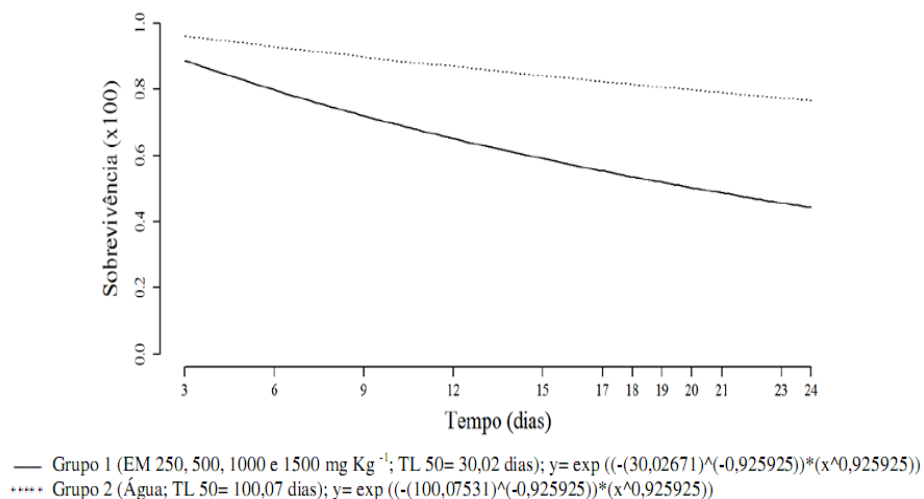
Referente à fase de pupa, somente os tratamentos contendo 1000 e 1500 mg kg<sup>-1</sup> do referido extrato alongaram esta fase em comparação ao controle (Figura 1B). O prolongamento da fase jovem de insetos causado pela ingestão de produtos de origem natural já foi relatado na literatura. Nomura e Itioca (2002) observaram o aumento na duração das fases larval e pupal, a partir da aplicação de taninos sintéticos em dietas artificiais de *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae), e constataram ainda que a redução de crescimento das larvas foi proporcional à concentração de substância ingerida. Tirelli et al. (2010) também observaram o prolongamento das fases larval e pupal de *S. frugiperda* quando estudaram a fração tânica de diversas cascas de árvore. De forma análoga, Santiago et al. (2008) verificaram que o extrato de *Ricinus comunis* L. (Euforbiaceae) provocou alongamento na fase larval de *S. frugiperda*. O prolongamento do período larval dessa praga, em consequência do tratamento com extratos de *Trichilia pallida*, também foi observado por Thomazine; Vendramin; Lopes, 2000; Roel, (2001). Pode-se dizer que a interferência do extrato empregado foi menor na duração da fase pupal quando comparada com a fase larval. De forma análoga Rodriguez (1996) também observou que o estágio pupal de *S. frugiperda* foi menos afetado pelos extratos de diversas plantas quando incorporados em dieta artificial, em comparação com o estágio larval.

O alongamento das fases larval e pupal observado possivelmente ocorreu devido a presença de substâncias fenólicas, tóxicas ao inseto, como por exemplo o ácido gálico, o qual foi identificado no extrato empregado nesse experimento. Segundo os estudos de Urrea-Bulla et al. (2004) esse tanino age como fagodeterrente contra larvas de *S.*

*frugiperda*. Uma maior duração da fase larval, em campo, é uma vantagem já que aumenta a exposição aos fatores de mortalidade natural tais como predadores e parasitoides.

Foi constatado que todas as concentrações testadas reduziram a sobrevivência dos insetos durante a fase larval, em comparação com a testemunha. O EM foi capaz de provocar mortalidade acima de 40% após o término do período de avaliação, com TL50 de 30,02 dias (Figura 2).

**Figura 2.** Sobrevivência de lagartas de *Spodoptera frugiperda*, ao longo do tempo, alimentadas com dieta artificial contendo extrato metanólico (EM) de pó de folhas de mandioca em diferentes concentrações, sendo  $y = \exp((\mu)^{-\alpha} * (x^\alpha))$ , em que  $y$  = sobrevivência;  $\mu$  = tempo letal 50;  $\alpha$  = 1,003917 e  $x$  = tempo (dias).



De forma semelhante ao constatado nesse trabalho, o aumento na duração das fases larval e pupal e acréscimo de mortalidade na fase larval também foram relatados por Tandon, Mittal e Pant (2008), quando aplicaram óleos essenciais de *Vitex trifolia* e *V. agnus-castus* L. (Verbenaceae) em lagartas de *Spilosoma obliqua* Walker (Lepidoptera: Arctiidae). Entretanto, para ambos os tratamentos, não foram observadas relações entre as doses utilizadas e a mortalidade acumulada, já que todos os tratamentos foram agrupados em um único grupo na distribuição de Weibull. Em estudo utilizando óleo essencial de *Pilocarpus spicatus* Saint-Hilaire (Rutaceae) para o controle de ninfas de quinto instar de *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera: Reduviidae), de maneira semelhante ao constatado no presente trabalho, os autores não puderam propor uma relação entre a dose aplicada e seu efeito na mortalidade (MELLO et al., 2007).

No que diz respeito ao peso de pupas e à sobrevivência na fase pupal, pode-se dizer que o extrato não afetou esses parâmetros, já que não houve diferença estatística entre os tratamentos e a testemunha (Tabela 1).

**Tabela 1.** Efeito do extrato metanólico (EM) do pó de folhas de mandioca, em diferentes concentrações, sobre o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda*.

Tratamento (mg kg <sup>-1</sup> )	Peso de pupas <sup>ns</sup> (mg)	Sobrevivência na fase pupal <sup>ns</sup> (%)
EM 250	260,0 ± 1,75	97,2 ± 7,30
EM 500	260,0 ± 2,70	96,3 ± 5,43
EM 1000	270,0 ± 3,10	93,9 ± 1,78
EM 1500	270,0 ± 5,30	91,7 ± 2,77

<sup>ns</sup>Médias não significativas pelo teste One-way anova a 5% de probabilidade.

Torrecillas e Vendramim (2001) observaram que as alterações no desenvolvimento de *S. frugiperda* ocorreram apenas na fase larval; isto pode ser explicado pelo fato de ser essa fase na qual o inseto se alimenta, o que o torna mais exposto aos possíveis aleloquímicos presentes no extrato da planta inseticida.

A duração dos períodos de pré-oviposição, oviposição e a longevidade dos adultos (tanto machos quanto fêmeas) não foram afetadas por nenhuma das concentrações do EM testadas (Tabela 2).

**Tabela 2.** Efeito do extrato metanólico (EM) do pó de folhas de mandioca em diferentes concentrações, sobre os períodos de pré-oviposição e oviposição, longevidade dos adultos e número de ovos de *Spodoptera frugiperda*.

Tratamento (mg kg <sup>-1</sup> )	Período de pré- oviposição <sup>ns</sup> (dias)	Período de oviposição <sup>ns</sup> (dias)	Longevidades <sup>ns</sup> (dias)	
			Fêmeas	Machos
EM 250	4,50 ± 0,28	5,70 ± 0,67	11,20 ± 0,69	11,80 ± 2,28
EM 500	3,90 ± 0,42	6,50 ± 0,61	11,30 ± 0,70	13,70 ± 1,15
EM 1000	4,30 ± 0,19	5,70 ± 0,88	11,80 ± 0,85	11,20 ± 1,09
EM 1500	4,30 ± 0,19	5,50 ± 1,07	8,00 ± 0,73	13,30 ± 2,14
Água	3,50 ± 0,34	8,10 ± 1,19	11,20 ± 1,27	12,60 ± 0,82
F	0,7341	0,7573	1,6747	1,3700
P≤	0,5713	0,5310	0,1791	0,2753

<sup>ns</sup>Médias não significativas pelo teste One-way anova a 5% de probabilidade.

Em relação ao número de ovos, constatou-se que os tratamentos com as concentrações mais elevadas, com 1.000 e 1.500 mg kg<sup>-1</sup>, apresentaram valores inferiores de número de ovos, diferindo estatisticamente da testemunha. Verificou-se assim, uma redução na oviposição (Figura 1C), quando as larvas de *Spodoptera frugiperda* ingeriram o EM adicionado à dieta artificial. Para Costa, Silva e Fiuza

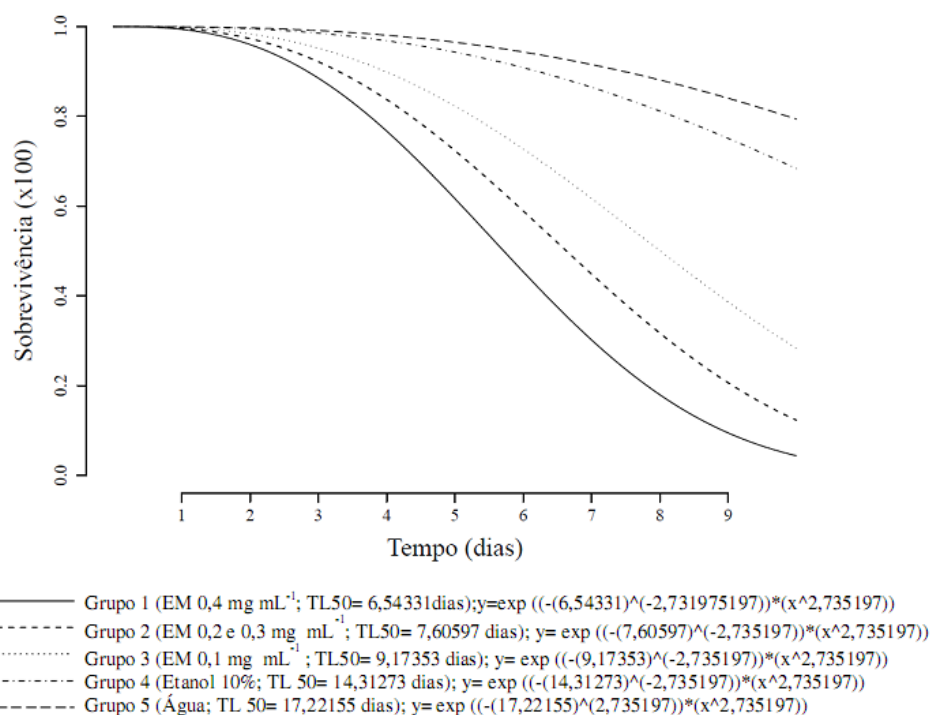
(2004), a redução do número de ovos e a inibição da oviposição são importantes efeitos dos extratos vegetais sobre a reprodução dos insetos, sendo que a ocorrência de esterilidade está geralmente associada a distúrbios alimentares e deficiência nutricional.

Levando-se em consideração que a catequina foi identificada no EM, acredita-se que esse composto possa ser um dos responsáveis pelo efeito do extrato sobre *S. frugiperda*, pois segundo Monteiro et al. (2005) a catequina apresenta maior toxicidade para os insetos que os taninos.

#### **Ensaio realizado com formigas**

Na Figura 3 é mostrada a análise de sobrevivência das formigas *Atta sexdens* rubropilosa quando expostas a aplicação tópica de diferentes concentrações do EM.

**Figura 3.** Sobrevivência de *Atta sexdens* tratadas topicamente com diferentes concentrações de extrato metanólico (EM) de pó de folhas de mandioca em diferentes concentrações, sendo  $y = \exp((\mu)^{-\alpha}) * (x^\alpha)$ , em que  $y$  = sobrevivência;  $\mu$  = tempo letal 50;  $\alpha = 2,735197$  e  $x$  = tempo (dias).



De acordo com os resultados, pôde-se observar que de modo geral, o EM apresentou efeito negativo sobre a sobrevivência das formigas ao longo do tempo, verificando-se redução no tempo de sobrevivência dos insetos tratados com o extrato proporcional ao aumento da concentração do mesmo, com médias de tempo letal (TL50) estimadas em 6,54; 7,60 e 9,17 dias nos grupos 1, 2 e 3, respectivamente. Com relação aos

tratamentos testemunha, constatou-se maior média de TL50 (17,22 dias) quando houve aplicação tópica de água sobre as formigas, sendo seguida pela média do tratamento que empregou etanol 10% (14,31 dias).

Existem relatos na literatura de que muitas plantas demonstram ser potencialmente tóxicas a esses insetos. Como exemplo pode-se citar o trabalho de Hebling et al. (2000), que observaram alterações metabólicas nas formigas retiradas de formigueiros tratados com folhas de gergelim e Morini et al. (2005), que demonstraram que as ligninas isoladas do óleo de gergelim são tóxicas para formigas. Neste trabalho verificou-se que o EM mostrou-se eficiente no controle de *Atta sexdens* rubropilosa.

#### **4. Conclusões**

Conclui-se que o EM das folhas de *M. esculenta* Crantz foi capaz de provocar efeito subletal aumentando o tempo necessário para o desenvolvimento de *S. frugiperda* prolongando as fases larval e pupal, além de provocar redução no número de ovos, sendo que a redução na sobrevivência da lagarta e de *Atta sexdens* rubropilosa também foi observada ao longo do tempo.

Foram identificados no EM ácido gálico e catequina que são tóxicos e podem causar efeitos nocivos aos insetos, de modo que a atividade encontrada pode ser atribuída à presença desses compostos fenólicos.

#### **Agradecimentos:**

A FAPEMIG pelo apoio financeiro e à CAPES pela concessão da bolsa de doutorado ao primeiro autor.



### Referências

AL-MAZRA'AWI, M. S.; ATEYYAT, M. Insecticidal and repellent activities of medicinal plant extracts against the sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci* (Hom.: Aleyrodidae) and its parasitoid *Eretmocerus mundus* (Hym.: Aphelinidae). *Journal of Pest Science*, Berlin, v. 82, n.2, p.149-154, 2009.

ARTEEL, G. E.; LINDROTH, R. L. Effects of aspen phenolic glycosides on gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) susceptibility to *Bacillus thuringiensis*. *The Great Lakes Entomologist*, Michigan, v. 25, n. 4, p. 239-244, 1992.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists. 18 ed. Maryland: AOAC, 2005.

AYRES, M. C. C.; BRANDÃO, M. S.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; MENOR, J. C. A. S.; SILVA, H. B.; SOARES, M. J. S.; CHAVES, M. H. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Coperniciaprunifera*. *Revista Brasileira de farmacognosia*, Maringá, v. 1, n. 18, p. 90-97, 2008.

BARBEHENN, R. V.; BUMGARNER, S. L.; ROOSEN, E. F.; MARTIN, M. M. Antioxidant defenses in caterpillars: role of the ascorbate recycling system in the midgut lumen. *Journal of Insect Physiology*, Oxford, v. 47, n. 4-5, p.349-357, 2001.

BARBEHENN, R. V.; MABEN, R. E.; KNOESTER, J. J. Linking phenolic oxidation in the midgut lumen with oxidative stress in the midgut tissues of a tree-feeding caterpillar *Malacosoma disstria* (Lepidoptera: Lasiocampidae). *Environmental Entomology*, Lanham, v. 37, n. 5, p.1113-1118, 2008.

BUENO, O. C.; MORINI, M. S. C.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A.; SILVA, O. A. Sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) isoladas do formigueiro e alimentadas com dietas artificiais. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, Londrina, v. 26, n.1, p. 107-113, 1997.

BUSATO, G. R.; GRUTZMACHER A. D.; GARCIA M. S.; GIOLO F. P.; ZOTTI M. J.; STEFANELLO JUNIOR G. J. Biologia comparada de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em folhas de milho e arroz. *Neotropical Entomology*, Londrina, v. 34, n. 5, p.743-750, 2005.

CINTRA, P.; MALASPINA, O.; PETACCI, F.; FERNANDES, J. B.; BUENO, O. C.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F. Toxicity of *Dimorphandra mollis* to workers of *Apis mellifera*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, Campinas, v. 13, n. 1, p.115-118, 2002.

CORRÊA, A. D.; SANTOS, S. R. dos.; ABREU, C. M. P. de.; JOKL, L.; SANTOS, C. D. dos. Remoção de polifenóis da farinha de folhas de mandioca. *Ciência e tecnologia de alimentos*, Campinas, v. 24, n. 2, p. 159-164, 2004.

COSTA, E. L. N.; SILVA, R. F. P. da.; FIUZA, L. M. Efeitos, aplicações e limitações de extratos de plantas inseticidas. *Acta Biologica Leopoldensia*, São Leopoldo, v. 26, n. 2, p.173-85, 2004.

FRIEDMAN, M. Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols. A review. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Easton, v. 45, n. 5, p.1523-1540, 1997.

GEORGES, K.; JAYAPRAKASAM, B.; DALAVOY, S. S.; NAIR, M. G. Pest-managing activities of plant extracts and anthraquinones from *Cassia nigricans* from Burkina Faso. *Bioresource Technology*, Essex, v. 99, n. 6, p. 2037-2045, 2008.

GREENE, G. L.; LEPPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *Journal of Economic Entomology*, Lanham, v. 69, n. 4, p.487-488, 1976.

HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; SILVA, O. A da.; MAROTI, P. S. Toxic effects of *Canavalia ensiformis* L. (Leguminosae) on laboratory colonies of *Atta sexdens* L. (Hym. Formicidae). *Journal of Applied Entomology*, Berlin, v. 124, n.1, p. 33-35, 2000.

MELLO, C. B.; UZEDA, C. D.; BERNARDINO, M. V.; MENDONÇA-LOPES, D. J. A. F. P. C. A.; GUERRA, M. S.; OLIVEIRA, A. P.; ROCHA, L. M.; GONZALES, M. S. Effects of the essential oil obtained from *Pilocarpus plicatus* Saint-Hilaire (Rutaceae) on the development of *Rhodnius prolixus* nymphae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Maringá, v. 17, n.4, p. 514-520, 2007.

MELO, D. S. de.; CORRÊA, A. D.; MARCOS, F. C. A.; SOUZA, R. V. de.; ABREU, C. M. P. de.; SANTOS, C. D. dos. Efeito da farinha de folhas de mandioca sobre a peroxidação lipídica, o perfil lipídico sanguíneo e o peso de fígado de ratos. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 31, n. 2, p. 420-428, 2007.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L.; AMORIM, E. L. C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Química Nova*, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MORINI, M. S. C.; BUENO, O. C.; BUENO, F. C.; LEITE, A. C.; HEBLING, M. J. A.; PAGNOCCA, F. C.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F. da. Toxicity of sesame seed to leafcutting ant *Atta sexdens* rubropilosa (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, Boston, v. 45, n. 1, p. 195-204, 2005.

NOMURA, M.; ITIOKA, T. Effects of synthesized tannin on the growth and survival of a generalist herbivorous insect, the common cutworm, *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae). *Applied Entomology and Zoology*, Tokyo, v. 37, n. 2, p. 285-289, 2002.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2009. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 17 jul. 2012.

RAHUMAN, A. A.; BAGAVAN, A.; KAMARAJ, C.; VADIVELU, M.; ABDUZ-ZAHIR, A.; ELANGO, G.; PANDIYAN, G. Evaluation of indigenous plant extracts against larvae of *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Journal Parasitology Research*, Berlin, v. 104, n.3, p. 637-643, 2009.

REDOAN, A. C. M.; CARVALHO, G. A.; CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M. de L. C.; SILVA, R. B. da. Seletividade de inseticidas utilizados no controle de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) para ovos e ninfas de *Doru luteipes* (Scudder) (Dermaptera: Forficulidae). *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, Sete Lagoas, v. 11, n. 1, p. 25-34, 2012.

RODRIGUEZ H. C.; VENDRAMIM, J. D. Toxicidade de extratos aquosos de Meliaceae em *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Manejo Integrado de Pragas, Turrialba*, San José, v. 42, n.1, p. 14-22, 1996.

ROEL, A. R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o Desenvolvimento Rural Sustentável. *Revista Internacional de desenvolvimento Local*, Campo Grande, v. 1, n. 2, p. 43-50, 2001.

SANTIAGO, G. P.; PÁDUA, L. E. M.; SILVA, P. R. R.; CARVALHO, E. M. S.; MAIA, C. B. Efeitos de Extratos de Plantas na Biologia de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) Mantida em dieta Artificial. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 32, n. 3, p. 792-796, 2008.

STATISTIC ANALYSIS SYSTEM- SAS Institute, SAS/STAT User's Guide v.8. Cary, NC, USA: SAS Institute. 2008.

TANDON, S.; MITTAL, A. K.; PANT, A. K. Insect growth regulatory activity of *Vitex trifolia* and *Vitex agnuscastus* essential oils against *Spilosoma oblique*. *Fitoterapia*, Milano, v. 79, n. 4, p. 283-286, 2008.

TIRELLI, A. A.; ALVES, D. S.; CARVALHO, G. A.; SÂMIA, R. R.; BRUM, S. S.; GUERREIRO, M. C. Efeito de frações tânicas sobre parâmetros biológicos e nutricionais de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 34, n. 6, p. 1417-1424, 2010.

TORRECILLAS, S. M.; VENDRAMIM, J. D. Extrato aquoso de ramos *Trichilia pallida* e o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* em genótipos de milho. *Scientia Agrícola*, Piracicaba, v. 58, n. 1, p. 27-31, 2001.

THOMAZINI, A. P. B. W.; VENDRAMIM, J. D.; LOPES, M. T. R. Extratos aquosos de *Trichilia pallida* e a traça-do-tomateiro. *Scientia Agrícola*, Piracicaba, v. 57, n.1, p. 13-17, 2000.

URREA-BULLA, A.; SUÁREZ, M. M.; MORENO-MURILLO, B. Biological activity of phenolic compounds from *Alchornea glandulosa*. *Fitoterapia*, Hefei, v. 75, n. 3, p. 392–394, 2004.

ZANETTI, R.; JANUCIO, J. C.; VILELA, E. F.; LEITE, H. G.; JAFFÉ, K.; OLIVEIRA, A. C. Level of economic damage for leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) in Eucalyptus plantations in Brazil. *Sociobiology*, Feira de Santana, v. 42, n. 2, p. 442-443, 2003.

ZANETTI, R.; ZANUCIO, J. C.; SOUZA-SILVA, A.; MENDONÇA, L. A.; MATTOS, J. O. S.; RIZENTAL, M. S. Eficiência de produtos termonebulígenos no controle de *Atta laevigata* (Himenoptera: Formicidae) em plantio de eucalipto. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 32, n. 4, p. 1313-1316, 2008.



**APÊNDICE**

Tabela 1A	Equação da regressão linear, linearidade, $R^2$ , Limites de detecção (LD), limites de quantificação (LQ) e tempo de retenção dos compostos fenólicos.....	113
Tabela 2A	Resumo da análise de variância para os parâmetros TBARS, ALT, AST, GGT, albumina, proteínas e lipídeos totais de ratas fischer submetidas a diferentes tratamentos .....	114

Tabela 1A Equação da regressão linear, linearidade,  $R^2$ , Limites de detecção (LD), limites de quantificação (LQ) e tempo de retenção dos compostos fenólicos.

Compostos fenólicos	Equação da regressão linear <sup>1</sup>	Linearidade (mg L <sup>-1</sup> )	$R^2$	LD (mg L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	LQ (mg L <sup>-1</sup> ) <sup>3</sup>	$t_R$ (min)
Ácido gálico	$y = 63,444x - 80,224$	0,34-42,53	0,998	2,7	8,18	7,51
Galocatequina	$y = -2388,241x + 8732,462$	1,53-39,47	0,999	0,8	2,3	8,65
Catequina	$y = 13,294x - 76,179$	2,90-127,72	0,996	15,11	45,79	13,03
Ácido clorogênico	$Y = 4,656x - 53,14$	35,43-177,16	0,997	12,58	38,11	15,74
Epigalocatequina	$Y = 22,144x + 2,569$	0,46-26,22	0,994	2,68	8,13	17,62
Ácido m-cumárico	$Y = 125,83x + 1,662$	0,23-0,72	0,994	0,05	0,16	41,97

Tabela 2A Resumo da análise de variância para os parâmetros TBARS, ALT, AST, GGT, albumina, proteínas e lipídeos totais de ratas fischer submetidas a diferentes tratamentos<sup>a</sup>.

<b>Parâmetro</b>	<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>CV</b>
TBARS	Tratamento	1	0,107*	13,1
	Erro	18	0,016	
ALT	Tratamento	1	375,071*	7,03
	Erro	18	165,735	
AST	Tratamento	1	357,781*	8,43
	Erro	18	157,570	
GGT	Tratamento	1	7,335*	11,24
	Erro	18	0,293	
Albumina	Tratamento	1	0,612*	3,01
	Erro	18	0,011	
Proteínas	Tratamento	1	11,830*	11,97
	Erro	18	0,373	
Lipídeos	Tratamento	1	0,270*	17,13
	Erro	18	0,317	

<sup>a</sup> Controle negativo (água), Controle positivo (água e CCl<sub>4</sub>, 50 mg kg<sup>-1</sup> FFM e CCl<sub>4</sub>, 150 mg kg<sup>-1</sup> FFM e CCl<sub>4</sub> e 4 50 mg kg<sup>-1</sup> FFM e CCl<sub>4</sub>, durante a fase experimental.

TBARS- Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; ALT- alanina amino transferase; AST- alanina amino transferase; GGT- gama glutamil transferase. CV- coeficiente de variação. \*Significativo a 1% de probabilidade pelo teste d F.