

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**ANA PAULA FERRARI**

**ATIVIDADE ALELOPÁTICA, ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA  
DE PLANTAS COM USO POPULAR ANTIMALÁRICO**

**DISSERTAÇÃO**

**PATO BRANCO**

**2013**

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**ANA PAULA FERRARI**

**ATIVIDADE ALELOPÁTICA, ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA  
DE PLANTAS COM USO POPULAR ANTIMALÁRICO**

**DISSERTAÇÃO**

**PATO BRANCO**

**2013**

ANA PAULA FERRARI

**ATIVIDADE ALELOPÁTICA, ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE  
PLANTAS COM USO POPULAR ANTIMALÁRICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia - Área de Concentração: Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. José Abramo  
Marchese

Co-Orientador: Prof. Dra. Solange  
Teresinha Carpes

PATO BRANCO

2013

F375a

Ferrari, Ana Paula.

Atividade alelopática antioxidante e antimicrobiana de plantas com uso popular antimalárico / Ana Paula Ferrari. -- 2013.

115 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. José Abramo Marchese

Coorientador: Prof. Dra. Solange Teresinha Carpes

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Pato Branco, PR, 2013.

Bibliografia: f. 89 – 110.

1. *Bidens pilosa*. 2. *Phyllanthus niruri*. 3. *Petiveria alliacea*. 4. *Senna hirsuta*. 5. *Quassia amara*. I. Marchese, José Abramo, orient. II. Carpes, Solange Teresinha, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDD (22. ed.) 630

Ficha Catalográfica elaborada por:  
Suélem Belmudes Cardoso CRB 9/1630  
Biblioteca da UTFPR Campus Pato Branco



Ministério da Educação  
**Universidade Tecnológica Federal do Paraná**  
Câmpus Pato Branco  
Gerência de Ensino e Pesquisa  
**Programa de Pós-Graduação em Agronomia**



## TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação n° XXX

### **ATIVIDADE ALELOPÁTICA, ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE PLANTAS COM USO POPULAR ANTIMALÁRICO**

por

ANA PAULA FERRARI

Dissertação apresentada às . . . horas . . . min. do dia . . . de . . . . . de 2013 como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM AGRONOMIA, Linha de Pesquisa – XXX, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho . . . . .

Banca examinadora:

---

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Natasha Akemi Hamada**  
IFPR/Palmas

---

**Prof. Dr. Michelangelo Muzell Trezi**  
UTFPR/PB

---

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Solange Teresinha Carpes**  
UTFPR/PB  
Coorientadora

---

**Prof. Dr. José Abramo Marchese**  
UTFPR/PB  
Orientador

Visto da Coordenação:

---

**Prof. Dr. Idalmir dos Santos**  
Coordenador do PPGAG

Aos meus pais, Neivo José Ferrari e Terezinha Artuso Ferrari, meus exemplos de força, determinação e coragem,  
Dedico.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela força, persistência e determinação de nunca, mesmo nos momentos mais difíceis, desistir.

A minha família e amigos, pelas palavras de apoio, paciência e carinho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Abramo Marchese, pela confiança, compreensão e auxílio.

A minha co-orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Solange Teresinha Carpes, pela ajuda nas análises bioquímicas e grande parceria.

Aos colegas Marcos Vily Paladini e Marco Antônio Bosse, pela colaboração na condução do experimento.

Aos professores Vanderlei de Lima e Lindolfo Storck, pelo auxílio nas análises estatísticas.

À Embrapa Amazônia Oriental, por ceder as folhas de ***Quassia amara***.

Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas - UNICAMP, em especial ao pesquisador Ílio Montanari Júnior, pelo envio das sementes de ***Phyllanthus niruri***.

Ao Prof. Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk, pela realização das análises cromatográficas (CLAE – FR).

À Capes, pela concessão de bolsa de mestrado.

“A mente que se abre a uma nova ideia, jamais voltará ao seu tamanho original”.

Albert Einstein



## RESUMO

FERRARI, Ana Paula. Atividade alelopática, antioxidante e antimicrobiana de plantas com uso popular antimalárico. 115f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2013

O objetivo desse trabalho foi analisar a influência de diferentes concentrações dos extratos brutos etanólicos (EET) e diclorometânicos (EDC) das espécies medicinais antimaláricas *Bidens pilosa* L. (picão-preto), *Phyllanthus niruri* L. (quebra-pedra), *Petiveria alliacea* L. (guiné) e *Senna hirsuta* L. (fedegoso), sobre a germinabilidade (GER), tempo médio de germinação (TMG), velocidade média de germinação (VMG), comprimento de radícula (RAD) e comprimento de hipocótilo (HIP) de *Lactuca sativa* L. (alface) e *Ipomoea grandifolia* (Dammer) O'Donel (corda-de-viola). O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, distribuído em um trifatorial (espécie antimalárica vs. extrator vs. concentração). Os bioensaios foram realizados com quatro repetições de 25 sementes, para os testes germinativos, e 10 sementes pré-germinadas, para os bioensaios de crescimento. As sementes germinadas foram contadas diariamente, para a obtenção do TMG e VMG, enquanto a GER, RAD e HIP foram mensurados após 144 horas da aplicação dos extratos. Paralelamente ao estudo de atividade alelopática, objetivou-se também analisar a atividade antioxidante e antimicrobiana dos EET e EDC das quatro espécies antimaláricas utilizadas nos bioensaios, assim como, da espécie *Quassia amara* L. (quássia-amarga). As análises antioxidantes foram realizadas através de três metodologias distintas, sendo elas: sequestro do radical ABTS<sup>•+</sup> e sequestro do radical DPPH<sup>•</sup>, ambas realizadas com os EET e EDC, e poder antioxidante de redução do Ferro (FRAP), realizada apenas com os EET, assim como o teor de compostos fenólicos totais (TCF). Os EET foram comparados aos antioxidantes comerciais BHT (butil hidroxitolueno), BHA (butil hidroxianisol) e  $\alpha$ -tocoferol. Os resultados dos bioensaios dos extratos brutos das plantas antimaláricas, e suas respectivas concentrações, demonstraram efeitos inibitórios, e em alguns casos estimulatórios, de magnitudes diferentes sobre os processos de germinação e/ou crescimento das espécies alvo. O aumento das concentrações dos EET e EDC de *P. alliacea* e do EET de *S. hirsuta*, não afetaram o TMG, VMG e GER de corda-de-viola, sendo que o EDC de *P. alliacea* também não influenciou sobre RAD e HIP da mesma, enquanto o EET de *B. pilosa* apresentou ótimos resultados de inibição do RAD e HIP de alface e GER, TMG, VMG, RAD e HIP de corda-de-viola. Em todas as metodologias de atividade antioxidante analisadas, o EET de *Q. amara* demonstrou-se como o tratamento mais eficaz, seguido do EET de *P. niruri*, sendo estes, analisados em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase-Reversa (CLAE-FR), evidenciando a presença de rutina, miricetina, quercetina e ácido gálico para ambas as espécies, sendo estes compostos, reconhecidos por suas propriedades antioxidantes. As análises antimicrobianas foram realizadas através da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos das plantas, com concentrações entre 5,0 e 0,88 mg mL<sup>-1</sup>, em microplacas de 96 poços inoculadas com *Bacillus cereus* ATCC 11.778. Os EET de *Q. amara*, *P. niruri* e *S. hirsuta* e o EDC de *B. pilosa* apresentaram concentração inibitória mínima (MIC) =  $\leq 0,088$  mg mL<sup>-1</sup>. Dessa forma, os dados apresentados

nesse estudo indicam, em especial, um potencial uso do EET de ***B. pilosa*** e do EET de ***Q. amara*** como fontes de moléculas com atividade herbicida, antioxidantes e antimicrobianas, sendo estes extratos, importantes fontes para a busca de moléculas que possam ser utilizadas como protótipos para o desenvolvimento de novos produtos nas indústrias de agroquímicos, alimentícia e /ou farmacêutica, requerendo estudos futuros quanto a extração, purificação, isolamento e identificação dos compostos bioativos e seus respectivos mecanismos de ação.

**Palavras-chave:** *Bidens pilosa*. *Phyllanthus niruri*. *Petiveria alliacea*. *Senna hirsuta*. *Quassia amara*.

## ABSTRACT

FERRARI, Ana Paula. Allelopathic activity, antioxidant and antimicrobial properties of plants with antimalarial popular use. 115f. Dissertation (MSc in Agronomy) - Graduate Program in Agronomy (Area of Concentration: Crop), Federal Technological University of Paraná. Pato Branco, 2013.

The aim of this study was to analyze the influence of different concentrations of crude ethanol extracts (EET) and dichloromethanic (EDC) of antimalarial medicinal species *Bidens pilosa* L. (beggartick), *Phyllanthus niruri* L. (shatter stone), *Petiveria alliacea* L. (guinea) and *Senna hirsuta* L. (sicklepod) on germination (GER), mean germination time (TMG), mean speed of germination (VMG), radicle (RAD) and hypocotyls (HIP) of *Lactuca sativa* L. (lettuce) and *Ipomoea grandifolia* (Dammer) O'Donel (rope-glory). The experimental design was completely randomized, distributed in a factorial (species antimalarial *vs.* extractor *vs.* concentration). Bioassays were performed with four replicates of 25 seeds for germination tests, and 10 pre-germinated seeds for the growth bioassays. Germinated seeds were counted daily for obtaining the TMG and VMG while GER, DAR and HIP were measured after 144 hours of application of the extracts. In parallel to the study of allelopathic activity aimed also to examine the antioxidant and antimicrobial activities of EET and EDC of four malarial species used in bioassays, as well as the species *Quassia amara* L. (quássia amarga). Analyses antioxidants were performed through three different methodologies, namely: scavenging of ABTS<sup>•+</sup>, scavenging DPPH<sup>•</sup>, both performed with EET and EDC, and antioxidant power reduction iron (FRAP), performed with EET, as well as the content of total phenolic compounds (TCF). The EET were compared to commercial antioxidant BHT (butylated hydroxytoluene), BHA (butylated hydroxyanisole) and  $\alpha$ -tocopherol. The results of bioassays of extracts of plants antimalarial and their respective concentrations showed inhibitory effects, and in some cases stimulatory, different magnitudes of the processes of germination and/or growth of the target species. Increasing the concentration of EET and EDC of *P. alliacea* and EET of *S. hirsuta*, did not show significant results for variables TMG, VMG and GER of corda-de-viola, and the EDC of *P. alliacea* also did not influence RAD HIP. The EET of *B. pilosa* showed excellent results compared to inhibition of RAD and HIP lettuce and GER, TMG, VMG and RAD rope-glory, suggesting the use of this extract for future work of purification, isolation and identification of bioactive substances. In all methods of antioxidant activity analyzed, the EET of *Q. amara* shown as the most effective treatment, followed by EET of *P. niruri*, which are analyzed in High Performance Liquid Chromatography Reverse-Phase (HPLC-RP), indicating the presence of rutin, myricetin, quercetin and gallic acid for both species, these compounds being recognized for its antioxidant properties. Analyses were performed using antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) of the plant extracts with concentrations between 5.0 and 0.88 mg mL<sup>-1</sup> in 96-well microplates inoculated with *Bacillus cereus* ATCC 11.778. The EET of *Q. amara*, *P. niruri* and *S. hirsuta* and EDC of *B. pilosa* showed minimal inhibitory concentration (MIC) =  $\leq$  0.088 mg mL<sup>-1</sup>. Thus, the data presented in this study indicate the potential use of the EET of *B. pilosa* and EET of *Q. amara* as sources of molecules having herbicidal activity, antioxidants and antimicrobial properties, and these extracts are important sources for the search of molecules that can be used as a prototype for the

development of new products in the agrochemical industries, food and/or pharmaceuticals, requiring future studies on the extraction, purification, isolation and identification of bioactive compounds and their mechanisms of action.

**Keywords:** *Bidens pilosa*. *Phyllanthus niruri*. *Petiveria alliacea*. *Senna hirsuta*. *Quassia amara*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Rota do ácido-chiquímico composta pelas enzimas, 3-deoxi-D-arabino-ácido heptulosônico 7-fosfato Sintase (DAHPS), 3-Desidroquinato Sintase (DHQS), 3-Desidroquinato Desidratase (DHQD), Chiquimato-5-Desidrogenase (CD), Chiquimato Quinase (CQ), 5-Enoilpiruvilchiquimato 3-fosfato Sintase (EPSPS) e Corismato Sintase (CS). A ação do herbicida glifosato inibe a atividade da enzima EPSPS, interrompendo a biossíntese dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano, precursores de uma série de compostos fenólicos, ocasionando conseqüentemente, a morte do vegetal e de parasitas *P. falciparum*. Adaptado de Estevez & Estevez, 2012. .... 33
- Figura 2. Rota do 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato (DXP), também conhecida como rota do metileritritol fosfato (MEP), composta pelas enzimas 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato sintase (DXPS), 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato redutoisomerase (DXR), 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol sintase (CMS), 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol quinase (CMK), 2C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato sintase (MCS), 1-hidroxi-2C-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato sintase (HDS) e 1-hidroxi-2C-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato redutoisomerase (HDR). A ação da fosmidomicina inibe a atividade da enzima DXR, inibindo a biossíntese de isopentenil difosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil difosfato (DMAPP), precursores dos demais compostos terpênicos, ocasionando, conseqüentemente, a morte do vegetal e de parasitas *P. falciparum*. Adaptado de LANGE et al., (2001) ..... 35
- Figura 3. Germinabilidade (GER) de sementes de *Lactuca sativa* (alface) e *Ipomoea grandifolia* (corda-de-viola), submetidas à diferentes extratores, etanol (ETT) e diclorometano (EDC), e concentrações (0, 25%, 50%, 75% e 100%) de extratos de quatro plantas antimaláricas. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013. .... 50
- Figura 4. Tempo médio de germinação (TMG) de sementes de *Lactuca sativa* L. (alface), submetidas ao extrator etanol, e *Ipomoea grandifolia* (corda-de-viola), submetidas à diferentes extratores, etanol (ETT) e diclorometano (EDC), e diferentes concentrações (0, 25%, 50%, 75% e 100%) de extratos de quatro plantas antimaláricas. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013..... 53
- Figura 5. Velocidade média de germinação (VMG) de sementes de *Lactuca sativa* L. (alface), submetidas ao extrator etanol, e *Ipomoea grandifolia* (corda-de-viola), submetidas à diferentes extratores, etanol (ETT) e diclorometano (EDC), e diferentes concentrações (0, 25%, 50%, 75% e 100%) de extratos de quatro plantas antimaláricas. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013..... 54
- Figura 6. Comprimento de radícula (RAD) de sementes de *Lactuca sativa* L. (alface) e *Ipomoea grandifolia* (corda-de-viola), submetidas à diferentes extratores, etanol (ETT) e diclorometano (EDC), e concentrações (0, 25%, 50%, 75% e 100%) de extratos de quatro plantas antimaláricas. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013.. .... 58
- Figura 7. Efeito de diferentes concentrações do extrato etanólico (EET) de *B. pilosa* sobre a radícula e o hipocótilo de *Lactuca sativa* (alface). Ana Paula Ferrari. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013.. .... 59

- Figura 8. Efeito de diferentes concentrações do extrato etanólico (EET) de *S. hirsuta* sobre plântulas de *Lactuca sativa* (alface). Ana Paula Ferrari. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013.....59
- Figura 9. Efeito de diferentes concentrações do extrato etanólico (EET) de ***S. hirsuta*** sobre plântulas de ***Ipomoea grandifolia*** (corda-de-viola). Ana Paula Ferrari. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013..... 60
- Figura 10. Efeito de diferentes concentrações do extrato etanólico (EET) de ***B. pilosa*** sobre plântulas de ***Ipomoea grandifolia*** (corda-de-viola). Ana Paula Ferrari. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013..... 60
- Figura 11. Comprimento de hipocótilo (HIP) de sementes de ***Lactuca sativa*** L. (alface) e ***Ipomoea grandifolia*** (corda-de-viola), submetidas à diferentes extratores, etanol (ETT) e diclorometano (EDC), e concentrações (0, 25%, 50%, 75% e 100%) de extratos de quatro plantas antimaláricas. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013.....62
- Figura 12. Efeito de diferentes concentrações do extrato diclorometânico (EDC) de ***B. pilosa*** sobre plântulas de ***Ipomoea grandifolia*** (corda-de-viola). Ana Paula Ferrari. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013.....63

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical ABTS <sup>•+</sup> , DPPH <sup>•</sup> e FRAP entre os extratos etanólicos (EET) das espécies antimaláricas e antioxidantes comerciais (BHT, BHA e $\alpha$ -tocoferol), e teor de compostos fenólicos totais (TCF) dos extratos etanólicos das espécies em estudo. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013. ....	80
Tabela 2. Atividade antioxidante de extratos etanólicos (EET) e diclorometânicos (EDC) de cinco espécies antimaláricas pelo método de sequestro do radical ABTS <sup>•+</sup> . UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013.....	82
Tabela 3. Atividade antioxidante de extratos etanólicos (EET) e diclorometânicos (EDC) de cinco espécies antimaláricas pelo método de sequestro do radical DPPH <sup>•</sup> . UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013. ....	83
Tabela 4. Compostos fenólicos identificados na análise cromatográfica (CLAE) dos extratos etanólicos de <i>Phyllanthus niruri</i> e <i>Quassia amara</i> . UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013.....	83
Tabela 5. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos brutos etanólicos (EET) e diclorometânicos (EDC) de cinco plantas medicinais sobre cepas de <i>Bacillus cereus</i> . UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013.....	87
Apêndice 1. Fontes de variação (FV), graus de liberdade (GL) e quadrado médio da análise de variância dos caracteres germinabilidade (GER), tempo médio de germinação (TMG), velocidade média de germinação (VMG), comprimento de radícula (RAD) e comprimento de hipocótilo (HIP), média geral e coeficiente de variação (CV), referentes às sementes de <i>Lactuca sativa</i> L. (alface), submetidas a diferentes extratores e concentrações dos extratos de diferentes plantas antimaláricas. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013. ....	111
Apêndice 2. Fontes de variação (FV), graus de liberdade (GL) e quadrado médio da análise de variância dos caracteres germinabilidade (GER), tempo médio de germinação (TMG), velocidade média de germinação (VMG), comprimento de radícula (RAD) e comprimento de hipocótilo (HIP), média geral e coeficiente de variação (CV), referentes às sementes de <i>Ipomoea grandifolia</i> (corda-de-viola), submetidas a diferentes extratores e concentrações dos extratos de diferentes plantas antimaláricas. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013.....	111
Apêndice 3. Estimativas das regressões referentes à variável germinabilidade (GER) e coeficiente de determinação (r <sup>2</sup> ) de <i>Lactuca sativa</i> L. (alface) e <i>Ipomoea grandifolia</i> (corda-de-viola), sobre o efeito de diferentes extratores (etanol e diclorometano) e concentrações (0, 25%, 50%, 75% e 100%) de extratos de quatro plantas antimaláricas. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013. ....	112
Apêndice 4. Estimativas das regressões referentes à variável tempo médio de germinação (TMG) e coeficiente de determinação (r <sup>2</sup> ) de <i>Lactuca sativa</i> L. (alface), sobre o efeito de diferentes concentrações (0, 25%, 50%, 75% e 100%) de extratos de quatro plantas antimaláricas. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013. ....	112
Apêndice 5. Estimativas das regressões referentes à variável tempo médio de germinação (TMG) e coeficiente de determinação (r <sup>2</sup> ) de <i>Ipomoea grandifolia</i> (corda-de-viola), sobre o efeito de diferentes extratores (etanol	

	e diclorometano) e concentrações (0, 25%, 50%, 75% e 100%) de extratos de quatro plantas antimaláricas. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013. ....	113
Apêndice 6.	Estimativas das regressões referentes à variável velocidade média de germinação (VMG) e coeficiente de determinação (r <sup>2</sup> ) de <b>Lactuca sativa</b> L. (alface), sobre o efeito de diferentes concentrações (0, 25%, 50%, 75% e 100%) de extratos de quatro plantas antimaláricas. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013.....	113
Apêndice 7.	Estimativas das regressões referentes à variável velocidade média de germinação (VMG) e coeficiente de determinação (r <sup>2</sup> ) de <b>Ipomoea grandifolia</b> (corda-de-viola), sobre o efeito de diferentes extratores (etanol e diclorometano) e concentrações (0, 25%, 50%, 75% e 100%) de extratos de quatro plantas antimaláricas. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013. ....	113
Apêndice 8.	Estimativas das regressões referentes à variável comprimento de radícula (RAD) e coeficiente de determinação (r <sup>2</sup> ) de <b>Lactuca sativa</b> L. (alface) e <b>Ipomoea grandifolia</b> (corda-de-viola), sobre o efeito de diferentes extratores (etanol e diclorometano) e concentrações (0, 25%, 50%, 75% e 100%) de extratos de quatro plantas antimaláricas. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013.....	114
Apêndice 9.	Estimativas das regressões referentes à variável comprimento de hipocótilo (HIP) e coeficiente de determinação (r <sup>2</sup> ) de <b>Lactuca sativa</b> L. (alface) e <b>Ipomoea grandifolia</b> (corda-de-viola), sobre o efeito de diferentes extratores (etanol e diclorometano) e concentrações (0, 25%, 50%, 75% e 100%) de extratos de quatro plantas antimaláricas. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013.....	115



## LISTA DE SIGLAS

ABRASCO	Associação Brasileira de Saúde Coletiva
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
SINDAG	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos de Defesa Agrícola
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
WHO	Organização Mundial da Saúde

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS <sup>++</sup>	Radical 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico
ALS	Enzima acetolactato sintase
BHA	Butil hidroxianisol
BHT	Butil hidroxitolueno
CD	Enzima Chiquimato-5-Desidrogenase
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE-FR	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase-Reversa
CMK	Enzima 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol quinase
CMS	Enzima 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol sintase
CQ	Enzima Chiquimato Quinase
CS	Enzima Corismato Sintase
DAHPS	Enzima 3-deoxi-D-arabino-ácido heptulosônico 7-fosfato Sintase
DHQD	Enzima 3-Desidroquinato Desidratase
DHQS	Enzima 3-Desidroquinato Sintase
DMAPP	Dimetilalil difosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH <sup>•</sup>	Radical 2,2 difenil-1-picrilhidrazina
DXP	1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato
DXPS	Enzima 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato sintase
DXR	Enzima 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato redutoisomerase
EAG	Equivalente em ácido gálico
EDC	Extrato diclorometânico
EET	Extrato etanólico
EPSPS	Enzima 5-fosfoenolpiruvil-chiquimato-3-fosfato-sintase
FRAP	Poder antioxidante de redução do Ferro
g	Gramas
GER	Germinabilidade
GPP	Geranil difosfato
h	Horas
HDR	Enzima 1-hidroxi-2C-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato redutoisomerase
HDS	Enzima 1-hidroxi-2C-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato sintase
HIP	Comprimento de hipocótilo
HPPD	<i>p</i> -hidroxifenilpiruvato dioxigenase
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória capaz de sequestrar 50% do radical DPPH

IPP	Isopentenil difosfato
m/v	Massa/volume
MAV	Rota do ácido mevalônico
MCS	Enzima 2C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato sintase
MEP	Rota do metileritritol fosfato
µg	Micrograma
µmol	Micromol
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MS	Massa seca
nm	Nanômetro
p.a.	Grau analítico para análise
p.ex.	Por exemplo
RAD	Comprimento de radícula
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rpm	Rotações por minuto
sementes h <sup>-1</sup>	Sementes por hora
TCF	Teor de compostos fenólicos totais
TEAC	Capacidade equivalente em Trolox
TMG	Tempo Médio de Germinação
TPTZ	2,4,6-tripiridils-triazina
VMG	Velocidade Média de Germinação

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\leq$	Maior, igual que
%	Porcentagem
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
$\Psi\pi$	Potencial osmótico

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>20</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>22</b>
<b>3 ATIVIDADE ALELOPÁTICA DE PLANTAS COM USO POPULAR ANTIMALÁRICO</b> .....	<b>42</b>
3.1 RESUMO.....	42
3.2 ABSTRACT .....	42
3.3 INTRODUÇÃO .....	43
3.4 MATERIAL E MÉTODOS .....	45
3.4.1 Espécies selecionadas.....	45
3.4.2 Preparo dos extratos brutos e determinação do Potencial Osmótico.....	46
3.4.3 Bioensaios alelopáticos.....	47
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	49
3.6 CONCLUSÕES .....	68
<b>4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE PLANTAS COM USO POPULAR ANTIMALÁRICO</b> .....	<b>70</b>
4.1 RESUMO .....	70
4.2 ABSTRACT .....	70
4.3 INTRODUÇÃO .....	71
4.4 MATERIAL E MÉTODOS .....	74
4.4.1 Seleção e coleta das amostras .....	74
4.4.2 Preparo dos Extratos Brutos .....	74
4.4.3 Teor de compostos fenólicos .....	75
4.4.4 Atividade de sequestro do radical DPPH <sup>*</sup> (2,2-difenil-1-picril-hidrazil).....	75
4.4.5 Atividade Antioxidante de Sequestro do Radical ABTS <sup>*+</sup> (TEAC) .....	76
4.4.6 Atividade antioxidante pelo método FRAP .....	76
4.4.7 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE - FR) .....	77
4.4.8 Atividade antimicrobiana dos extratos .....	78
4.4.9 Análise Estatística .....	78
4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	79
4.5.1 Compostos Fenólicos e Atividade Antioxidante.....	79
4.5.2 Perfil Cromatográfico.....	83
4.5.3 Atividade Antimicrobiana .....	85
4.6 CONCLUSÕES .....	87
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>88</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>89</b>
<b>APÊNDICES</b> .....	<b>111</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O intenso e indiscriminado uso de produtos sintéticos para o controle de plantas daninhas tem elevado o aparecimento de biótipos de plantas resistentes e tolerantes ao uso de herbicidas, ocasionando aumento nos custos de produção das culturas comerciais, assim como, contaminação do ambiente e prejuízos à saúde dos agricultores, devido sua toxicidade, longa persistência no meio, atividade carcinogênica e mutagênica. Dessa forma, a alelopatia apresenta-se como um método alternativo no controle de plantas daninhas, estimulando a busca por formas sustentáveis no controle das plantas daninhas, como o uso de biomoléculas, através da bioprospecção, como modelos para a síntese de novos defensivos agrícolas menos agressivos ao ambiente.

A alelopatia é uma ciência cujo o termo oriunda-se das palavras gregas **allelon** (mútuo) e **pathos** (prejuízo), conceituando a influência de um organismo sobre outro, seja estimulando ou inibindo o seu desenvolvimento. Para a Sociedade Internacional de Alelopatia, o termo refere-se a “qualquer processo envolvendo metabólitos especializados (no passado, cunhados como metabólitos secundários) produzidos por plantas, algas, fungos e bactérias e que influenciam no desenvolvimento de sistemas naturais e agrícolas”.

Bioensaios laboratoriais que estudam os efeitos de extratos vegetais sobre a germinação de sementes e crescimento de plântulas de espécies alvo, são os experimentos iniciais realizados em estudos alelopáticos. Após a confirmação da bioatividade dos extratos, técnicas de fracionamento, isolamento, purificação e identificação das moléculas naturais podem permitir a descoberta da (s) substância (s) natural (ais) responsável (eis) por determinado efeito (aleloquímicos), de forma que sua simplificação e aperfeiçoamento possibilitam o desenvolvimento e aprimoramento de novas estruturas sintéticas, como ocorrido com os herbicidas mesotrione e cinmetilina, os quais foram produzidos a partir dos aleloquímicos leptospermon e cineol, demonstrando o uso dessas moléculas naturais como bons protótipos para o desenvolvimento de herbicidas sintéticos.

Algumas moléculas com conhecida atividade herbicida vêm sendo estudadas como drogas antimaláricas, atuando sobre a atividade de enzimas e processos metabólicos específicos em comum entre plantas e parasitas da espécie **Plasmodium falciparum** (agente etiológico da malária), inibindo o desenvolvimento

de ambos os organismos. Entre essas substâncias, destacam-se o glifosato, a fosmidomicina e a trifluralina. Dessa forma, partindo-se do princípio de que um composto herbicida pode ser testado como medicamento, pressupõe-se que um medicamento, ou uma planta antimalárica, possam ser testados como herbicidas. Um bom exemplo disto é a *Artemisia annua*, espécie reconhecida por suas propriedades antimaláricas e com atividade herbicida já comprovada.

Dentre os compostos vegetais, a classe dos compostos fenólicos e terpenóides são as mais ricas em aleloquímicos. Os compostos fenólicos, em especial os flavonoides, possuem efeitos sobre o combate de radicais livres (antioxidante), em sistemas biológicos e em alimentos, assim como, são reconhecidos devido suas propriedades antimicrobianas, podendo ser utilizados na substituição dos antioxidantes comerciais, utilizados nas indústrias alimentícias, ou na substituição de substâncias antimicrobianas, em especial, sobre cepas de *Bacillus cereus*, bactéria encontrada em alimentos mal conservados e responsável pela proliferação de casos de intoxicação alimentar e doenças diarreicas, podendo ainda ser utilizados como protótipos para a confecção de novos produtos.

Contudo, o presente trabalho visa, através de um raciocínio inverso, fazer uso de plantas antimaláricas, que assim como *A. annua*, possam ser potenciais fontes de moléculas herbicidas. Devido à complexidade dos estudos que visam o isolamento, purificação e identificação dos compostos com atividade alelopática, o presente trabalho objetivou atender as etapas iniciais desse processo, como a seleção das espécies antimaláricas, através de critérios etnobotânicos, e bioensaios em laboratório, a partir da aplicação de extratos brutos, etanólicos (EET) e diclorometânicos (EDC) das espécies *Bidens pilosa* L., *Phyllanthus niruri* L., *Petiveria alliacea* L. e *Senna hirsuta* L. sobre *Lactuca sativa* L. (alface), espécie bioindicadora em estudos de alelopatia, e *Ipomoea grandifolia* (corda-de-viola), planta daninha infestante da região. Paralelamente ao estudo de atividade alelopática, objetivou-se também, analisar a atividade antioxidante, pelos métodos sequestro do radical livre DPPH<sup>•</sup> (2,2 difenil-1-picrilhidrazina), sequestro do radical livre ABTS<sup>•+</sup> (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) e poder antioxidante de redução do ferro (FRAP), e atividade antimicrobiana, sobre cepas de *Bacillus cereus* 11.778, dos EET e EDC das quatro espécies utilizadas nos bioensaios, assim como da espécie *Quassia amara* L.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Os organismos vegetais produzem uma série de substâncias químicas responsáveis pelas suas atividades metabólicas, promovendo não só o seu desenvolvimento, mas também, sua defesa. Esses compostos de defesa, denominados tradicionalmente como “metabólitos secundários”, não possuem funções diretamente relacionadas aos processos de crescimento do vegetal, no entanto, restritos dentro de determinados grupos de espécies, são de extrema importância para a perpetuação dos organismos em ambientes adversos (DEWICK, 2001). CROTEAU et al. (2000), sugere a substituição do termo “metabólitos secundários” para “produtos naturais vegetais”, no entanto recentemente, Pichersky & Lewinsohn (2011) cunharam o termo como “metabólitos especializados”, conceito que parece ser o mais adequado, uma vez que são substâncias cuja função é essencial na defesa das plantas, sendo sua distribuição restrita às espécies produtoras.

Durante muito tempo os metabólitos especializados vegetais foram considerados apenas como resíduos do seu metabolismo, sem função aparente (LI et al. 2010). Hoje, sabe-se que esses compostos atuam na defesa das plantas ao ataque de herbívoros e patógenos, assim como, atuam como agentes alelopáticos (aleloquímicos) na interação com outras plantas e micro-organismos que competem por luz, água e nutrientes, contribuindo também para a atração de agentes polinizadores e dispersores de sementes, comunicação entre plantas e micro-organismos simbiotes, proteção contra radiação ultravioleta e outros fatores de estresse físico (WINK, 2004). Fatores ambientais como radiação solar, temperatura, intensidade luminosa, tipo de solo, ataque de patógenos, disponibilidade de água e nutrientes, podem afetar a produção, acúmulo e liberação dos metabólitos especializados dos vegetais no ambiente, uma vez que essas substâncias são produzidas para a defesa do vegetal (MARCHESE & FIGUEIRA, 2005; GOBBONETO & LOPES, 2007).

Há muito se tem conhecimento da aplicação dos metabólitos especializados vegetais como corantes, realçadores de sabor, fragrâncias, estimulantes, alucinógenos e agentes terapêuticos (WINK, 2004), o que vêm impulsionando a busca por novos medicamentos, inseticidas, herbicidas e o



desenvolvimento de técnicas de biossíntese, separação e identificação das estruturas moleculares, as quais vêm evoluindo desde então (PICKENS et al., 2011).

A “busca e coleta de material biológico para fins comerciais” designa-se bioprospecção (SANT’ANA, 2002), no entanto, Berlinck (2012) sugere uma definição mais ampla para esse termo, “incluindo a descoberta, descrição e potencial utilização de seres vivos e como estes se relacionam com o ambiente, pois, desse relacionamento, ocorre a expressão de seu metabolismo, em parte na forma de substâncias químicas grandes e pequenas, que atuam em diferentes níveis, como resultado do longo processo de evolução biológica”.

Segundo dados do Ministério do Meio Ambiente, o Brasil é um dos países mais ricos em biodiversidade, abrigando cerca de 22% da flora mundial (BRASIL, 2013), sendo fonte de uma infinidade de substâncias biologicamente ativas, despertando um vasto interesse das indústrias, que vão de setores de fármacos, a setores da agricultura, horticultura, cosméticos, alimentos e bebidas (SANT’ANA, 2002; SIMÕES & SCHENKEL, 2002; ZUANAZZI & MAYORGA, 2010).

Dentre as práticas de manejo de plantas daninhas, o uso de defensivos agrícolas, que apesar de ser oneroso aos produtores e estar relacionado à impactos ambientais e à saúde dos agricultores, é uma das técnicas mais utilizadas. Segundo dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos de Defesa Agrícola (SINDAG), o setor de defensivos agrícolas movimentou cerca de U\$\$ 9,71 bilhões no ano de 2012, demonstrando a enorme demanda do setor de químicos sintéticos no Brasil (AGROLINK, 2013). No entanto, esse uso intenso e indiscriminado de agroquímicos tem levado a um crescente aparecimento de biótipos de plantas daninhas resistentes, como é o caso de *Conyza bonariensis* (buva) e *Lolium multiflorum* (azevém), ambos resistentes ao herbicida de amplo espectro glifosato, assim como *Bidens pilosa* (picão-preto) e *Euphorbia heterophylla* (amendoim-bravo), ambos resistentes aos herbicidas inibidores da ALS (CHRISTOFFOLETI, 2002; ROMAN et al., 2004; VIDAL & WINKLER, 2004; VARGAS et al., 2007). Há também o aparecimento de plantas daninhas tolerantes ao uso de herbicidas, como *Ipomoea grandifolia* (corda-de-viola) e *Commelia benghalensis* (trapoeraba), ambas tolerantes ao herbicida glifosato (MONQUERO et al., 2004). Uma planta daninha é considerada resistente a um herbicida quando resiste a aplicação de determinada dose desse produto, que em condições normais, é eficaz no controle das demais plantas integrantes da mesma população. Já a tolerância é uma característica inata de

algumas plantas em sobreviver e se reproduzir, mesmo após a aplicação de determinado herbicida (VARGAS & ROMAN, 2006). Casos de resistência e tolerância de plantas daninhas frente ao uso de herbicidas, assim como os impactos ambientais e os riscos à saúde dos agricultores e consumidores (MOURA et al., 2008) vêm estimulando a busca por formas sustentáveis no controle das plantas daninhas, como o uso de biomoléculas, através da bioprospecção, como modelos para a síntese de novos defensivos agrícolas menos agressivos ao ambiente (DUKE et al., 2000), pois, por serem moléculas naturais, entende-se que o ambiente consiga degradar essas substâncias de maneira mais eficiente. A bioprospecção de moléculas possibilitou o desenvolvimento e aprimoramento de estruturas sintéticas, utilizando recursos de simplificação de moléculas naturais, no entanto, sem deixar de reproduzir a bioatividade dessas estruturas (BARREIRO & BONZANI, 2009). As estratégias para a descoberta de um composto aleloquímico são idênticas às utilizadas pela indústria farmacêutica na busca por novos fármacos (DUKE et al., 2000), envolvendo o **screening** de extratos brutos e purificação dos compostos com atividade biológica.

Dessa forma, considerando o elevado tempo e custos empregados para o desenvolvimento de novos produtos, técnicas corretas que direcionam a seleção das plantas em potencial para a reprodução dos efeitos desejados, são imprescindíveis. Existem quatro tipos de estratégias para a escolha das espécies a serem estudadas, sendo elas: randômica, etológica, quimiotaxonômica e etnobotânica (SANT'ANA, 2002; ALBUQUERQUE & HANAZAKI, 2006).

A estratégia randômica compreende a pesquisa por plantas que contenham princípios ativos de interesse através de buscas ao acaso, sem critérios específicos. A estratégia etológica é baseada em estudos de comportamento animal, tendo como objetivo, analisar a utilização de metabólitos especializados vegetais, por animais, com a finalidade de combater doenças ou controlá-las. A estratégia quimiotaxonômica baseia-se na seleção de espécies de uma família ou gênero que já se tenha um conhecimento sobre o perfil fitoquímico de pelo menos uma espécie do grupo. E por último, a estratégia etnobotânica, que se baseia na seleção de espécies de acordo com os conhecimentos populares de uma comunidade local a respeito dos seus efeitos terapêuticos e toxicológicos (ALBUQUERQUE & HANAZAKI, 2006).

Neste presente trabalho, optou-se pela estratégia etnobotânica, onde plantas com atividade antimalárica, reconhecida por estudos científicos e por conhecimentos culturais de populações/comunidades, foram selecionadas para a realização de testes de potencial alelopático, assim como, atividade antioxidante e antimicrobiana. No entanto, foco maior foi dado para o potencial alelopático dessas espécies.

As pesquisas de bioprospecção de moléculas com atividade herbicida sobre o controle de plantas daninhas inicia-se com estudos laboratoriais referentes ao seu potencial alelopático (alelopatia).

O termo “alelopatia” foi determinado pioneiramente pelo fisiologista vegetal austríaco Hans Molísch em 1937, a partir das palavras gregas *alleton* (mútuo) e *pathos* (prejuízo). Rice (1984) definiu alelopatia como o efeito inibitório ou estimulatório de uma planta (incluindo micro-organismos) sobre outra, através da liberação de compostos químicos (aleloquímicos) no ambiente, de forma que esse efeito é dependente da concentração das substâncias liberadas no meio. Para a Sociedade Internacional de Alelopatia, o termo se refere a “qualquer processo envolvendo metabólitos secundários (especializados) produzidos por plantas, algas, fungos e bactérias e que influenciam no desenvolvimento de sistemas naturais e agrícolas” (IAS, 2012).

Apesar de ser considerada uma nova ciência, desde os tempos da antiguidade as interações entre plantas são relatadas por estudiosos da época. Em 300 a.C., o estudioso grego Theophrastus já havia relatado os efeitos de grão-de-bico sobre o desenvolvimento de outras plantas (PENG et al., 2004). Para Weir et al. (2004), os aleloquímicos são metabólitos especializados liberados em interações químicas entre planta-planta, micro-organismo-micro-organismo, planta-micro-organismo, planta-inseto e planta-patógeno que afetam positiva ou negativamente o seu desenvolvimento. Esses compostos encontram-se distribuídos em diferentes concentrações em várias partes da planta, como nas folhas, caules, raízes e seus exsudatos, sementes, frutos, flores, e até mesmo no pólen dos agentes doadores, de forma que, estresses bióticos e abióticos influenciam na produção dessas substâncias químicas (ALBUQUERQUE et al., 2011).

Em estudos de interações alelopáticas, é importante não confundir alelopatia com competição. O primeiro termo refere-se à liberação de substâncias químicas por um organismo doador sobre um organismo receptor, já o segundo

termo, refere-se aos organismos que, ao retirarem elementos essenciais do ambiente, como água, luz, nutrientes e redução do espaço físico, baixam os níveis desses elementos para os demais organismos, abaixo da concentração considerada crítica, dificultando o seu desenvolvimento. No ambiente, esses mecanismos ocorrem simultaneamente, o que dificulta a identificação dos processos, de forma que muitas vezes a competição pode ser ocasionada pelo efeito alelopático de alguma substância liberada no meio, sendo a alelopatia uma estratégia ecológica de competição (ALMEIDA, 1988; GOLDFARB et al., 2009), pois através desse mecanismo, uma planta pode interferir no desenvolvimento de outra, influenciando a dominância de certas espécies vegetais, assim como a produtividade e manejo de culturas (OLIVEIRA et al., 2010).

Bioensaios em laboratório, que visam a inibição do processo germinativo das espécies alvo, constituem os primeiros passos para a identificação de um extrato vegetal com potencial alelopático. Nesses experimentos, as sementes alvo são dispostas em placas de Petri, ou em caixas do tipo gerbox, sendo normalmente, utilizadas espécies sensíveis, ditas bioindicadoras, as quais devem apresentar rápida e uniforme germinação, sendo sensíveis já em baixas concentrações de extratos (PIRES & OLIVEIRA, 2011). Dentre as espécies sensíveis bioindicadoras, normalmente utilizam-se *Lactuca sativa* L. (alface) ou *Lycopersicon esculentum* Miller (tomate) (FERREIRA & ÁQUILA, 2000). No entanto, considerando que as verdadeiras “pragas da agricultura” são as plantas daninhas, o uso dessas sementes também se torna interessante para a investigação de extratos com potencial atividade herbicida. Condições ideais de fotoperíodo e temperatura devem ser reguladas conforme a necessidade para germinação de cada espécie alvo (FERREIRA & ÁQUILA, 2000), confirmando que o efeito observado sobre as mesmas é derivado dos compostos presentes no extrato, e não de fatores abióticos.

O controle da concentração osmótica dos extratos brutos é fundamental, uma vez que substâncias como açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos podem estar presentes nos extratos e serem osmoticamente ativos, influenciando a (não) germinação das sementes, mascarando os efeitos alelopáticos (FERREIRA & ÁQUILA, 2000).

No ambiente, os mecanismos de liberação dos aleloquímicos nos vegetais normalmente ocorrem por meio de lixiviação foliar pelas águas das chuvas, exsudação das raízes, decomposição de resíduos ou volatilização. A fitotoxicidade

destes compostos está relacionada com a sua capacidade de afetar processos metabólicos essenciais nas plantas, como fotossíntese e respiração, podendo ocorrer também a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Os aleloquímicos que estimulam a germinação e o crescimento de outras plantas não são menos importantes que os aleloquímicos inibidores, sendo também fundamentais para as pesquisas de alelopatia (VYVYAN, 2002; WEIR et al., 2004).

Fatores como meios de liberação, efeito fitotóxico, concentração dos compostos bioativos e persistência no ambiente, influenciam a determinação do efeito dos compostos aleloquímicos, uma vez que uma substância química pode promover efeito alelopático em uma determinada situação, mas não em outra (WEIR et al., 2004). O mesmo organismo é capaz de produzir uma ampla variedade de aleloquímicos e estes, podem atuar de forma isolada, sinérgica ou antagonicamente entre si, de modo que os efeitos observados nos organismos alvos tornam-se difíceis de serem atribuídos à apenas uma substância específica (ALMEIDA, 1988; DUKE et al., 2000). A sensibilidade das espécies alvo pode variar consideravelmente conforme a concentração do aleloquímicos, estágio de desenvolvimento da planta e condições ambientais (WEIR et al., 2004).

Para a comprovação da atividade alelopática de um determinado composto, Vyvyan (2002) cita alguns requisitos necessários, que vão desde a demonstração da interferência de uma espécie doadora sobre a espécie alvo, através de bioensaios em laboratório e em campo, ao isolamento, identificação, caracterização e determinação do modo de ação dos possíveis aleloquímicos. Bioensaios de laboratório demonstram o potencial alelopático de um determinado composto ou extrato vegetal, no entanto, estudos em casa de vegetação devem ser realizados como forma de reproduzir os seus efeitos no ambiente (DUKE et al., 2000). Alguns desses requisitos são relativamente difíceis de serem alcançados, uma vez que os aleloquímicos podem estar presentes em concentrações muito pequenas e/ou juntamente com outros produtos do metabolismo das plantas, de forma que as interações entre esses compostos podem afetar os efeitos observados. Dessa forma, o avanço de estudos que visam a identificação da estrutura química, do modo de ação e da rota de biossíntese dessas substâncias de interesse têm se demonstrado atraentes para a síntese de produtos químicos (VYVYAN, 2002).

Uma variedade de compostos aleloquímicos já foram identificados, no entanto, apenas um pequeno grupo possui seus mecanismos de ação reconhecidos.

Muitos aleloquímicos possuem mecanismo de ação diferente dos herbicidas sintéticos já conhecidos, tornando os metabólitos especializados, fontes promissoras para o desenvolvimento de novos herbicidas sintéticos. Dentre os mecanismos já desvendados, observam-se interferências sobre a síntese de aminoácidos, síntese de pigmentos, funcionamento da membrana plasmática, fotossíntese, síntese de lipídeos e síntese de ácidos nucleicos (PENG et al., 2004).

As plantas receptoras podem responder de diferentes formas à ação dos aleloquímicos, de maneira que algumas desenvolvem mecanismos que diminuem os efeitos dessas substâncias sobre o seu metabolismo, como a detoxificação, que inclui a oxidação, conjugação de carboidratos e outras substâncias e incorporação dos aleloquímicos em compartimentos, normalmente em vacúolos, e sua excreção. A formação de açúcares conjugados através da atividade de glicosil-transferases é um importante passo para a detoxificação de determinados aleloquímicos. Essas reações resultam em compostos menos tóxicos, que ao serem liberados no ambiente, podem ser metabolizados por micro-organismos do solo (INDERJIT & DUKE, 2003). O mecanismo de detoxificação de aleloquímicos pode servir também para evitar a autotoxicidade da planta ou fornecer resistência à substâncias aleloquímicas produzidas por outras espécies (WEIR et al. 2004).

Os metabólitos especializados, não só das plantas, mas também de fungos e bactérias, podem ser utilizados como fonte de biomoléculas com atividade herbicida, demonstrando seu efeito através de uso direto, ou como modelos moleculares para a síntese de novos químicos. Um exemplo disso é o herbicida cinmetilina, que foi desenvolvido a partir dos compostos monoterpênicos 1,4 e 1,8-cineol, presentes em uma variedade de óleos essenciais vegetais. Devido à alta volatilidade desses compostos e suas dificuldades de aplicação como herbicida, esses compostos não puderam ser utilizados de forma direta, no entanto, serviram como protótipos para o desenvolvimento do herbicida cinmetilina (VYVYAN, 2002; DUKE & OLIVA, 2004). Outros exemplos de herbicidas produzidos a partir de metabólitos especializados são o Bialaphos e a Fosfinotricina (PPT), produzidos a partir de bactérias *Streptomyces* sp., e a AAL-toxina, produzida a partir de fungos *Alternaria alternata*, que apesar de já patenteada, encontra barreiras em seu uso devido sua citotoxicidade e potencial carcinogênico (DIAS & DIAS, 2007).

Uma importante espécie vegetal produtora de excelentes aleloquímicos que, assim como as espécies utilizadas neste estudo, é reconhecida por sua

propriedade medicinal antimalárica, é a *Artemisia annua*. Devido aos casos de resistência de *Plasmodium falciparum* (agente etiológico da doença), aos medicamentos antimaláricos já existentes, essa espécie destacou-se na década de 70, na China, como um potente agente antimalárico natural, graças à presença do composto artemisinina (BRAZ\_FILHO, 2010). A artemisinina é uma lactona sesquiterpênica isolada a partir dos tricomas glandulares de *A. annua* e apresenta-se como um potente aleloquímico sobre a inibição de várias espécies vegetais, possuindo atividade fitotóxica semelhante à do herbicida cinmetilina (WESTON & INDERJIT, 2007). Seu modo de ação ainda é desconhecido, sugerindo um novo mecanismo de ação, o que torna essa molécula uma interessante fonte de exploração quando ao desenvolvimento de novos herbicidas (DUKE & OLIVA, 2004). No entanto, o uso direto desse composto como herbicida encontra barreiras devido seu alto custo e baixa absorção pelas plantas (DUKE et al., 2000), de forma que pesquisas que visam o aperfeiçoamento dessa molécula são ainda necessárias.

O potencial alelopático de *A. annua* foi confirmado por Magiero et al. (2009), com a aplicação de diferentes concentrações de extratos aquosos das folhas da espécie sobre *Lactuca sativa* L. (alface) e *Euphorbia heterophylla* L. (leiteiro), demonstrando interferência dos extratos nos processos germinativos e de desenvolvimento de ambas as espécies alvo. Lydon et al. (1997) e Moussavi-Nik et al. (2011) também evidenciaram o potencial alelopático de *A. annua*, no entanto, apesar da artemisinina ser um composto aleloquímico produzido nas folhas de *A. annua*, o efeito fitotóxico dessa espécie pode não ser oriundo apenas da presença de artemisinina, e sim da interação química entre vários compostos (BHOWMIK & INDERJIT, 2003), uma vez que os resultados fitotóxicos de extratos aquosos de *A. annua*, sem artemisinina, foram semelhantes aos resultados observados pela atividade de artemisinina pura (LYDON et al., 1997; INDERJIT et al., 2002), evidenciando a ação conjunta entre aleloquímicos. Além de antimalárica e fitotóxica, a *A. annua* possui ainda atividade antioxidante, devido seus altos teores de compostos fenólicos, especialmente de flavonoides (FERREIRA et al., 2010), e antimicrobiana, com efeito sobre às cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, e *Enterococcus faecalis* (MASSIHA et al., 2013).

Algumas substâncias aleloquímicas identificadas nas plantas possuem destaque, como o sorgoleone, um complexo de substâncias lipídicas, constituintes de exsudatos radiculares das espécies de *Sorghum* (SANTOS et al., 2012). O

sorgoleone possui diferentes tipos de efeitos sobre os vegetais (WESTON & INDERJIT, 2007). Em teoria, sua atividade alelopática deriva do seu efeito sobre a inibição da transferência de elétrons no fotossistema II (CZARNOTA et al., 2001). Devido sua atividade alelopática, tem sido muito utilizado em sistemas de cultivo consorciado na tentativa de diminuir o uso de herbicidas sintéticos (SANTOS et al. 2012).

Outros compostos aleloquímicos de grande relevância são o ailantone e o leptospermone. O primeiro trata-se de um composto quassinóide isolado a partir de árvore-do-céu (*Ailanthus altissima*), possuindo atividade herbicida em pré e pós-emergência (WESTON & INDERJIT, 2007). Apesar do seu reconhecido efeito fitotóxico, esse composto ainda não é utilizado como herbicida devido sua rápida degradação no solo, sendo necessárias múltiplas aplicações ao longo do desenvolvimento da cultura, tornando seu uso inviável (BHOWMIK & INDERJIT, 2003). Já o leptospermone, componente do óleo essencial de *Lepstopermum scoparium* e secretado pelas raízes de *Callistemon citrinus*, foi utilizado pela Syngenta AG como protótipo para o desenvolvimento de um herbicida análogo sintético, o mesotrione (Callisto<sup>®</sup>), herbicida pré e pós-emergente inibidor da *p*-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (HPPD), utilizado no controle de plantas daninhas de folhas largas nas culturas de milho (WESTON & INDERJIT, 2007; CORNES, 2005), evidenciando o potencial de metabólitos especializados vegetais como modelos para a elaboração de novos compostos químicos sintéticos com atividade herbicida.

Dessa forma, considerando-se a ampla variedade de compostos aleloquímicos de origem vegetal, vê-se a alelopatia como uma alternativa à descoberta de novos herbicidas. No entanto, devido a baixa persistência no solo e alta especificidade no controle de plantas daninhas, e até mesmo a toxicidade à organismos não-alvo (BHOWMIK & INDERJIT, 2003), pesquisas que compreendam a regulação da produção desses aleloquímicos, assim como o seu mecanismo de ação e os genes responsáveis pelo seu efeito e sua especificidade, são imprescindíveis para elaboração de novos herbicidas (PIRES & OLIVEIRA, 2011). A complexidade das estruturas químicas de alguns metabólitos especializados é uma das principais dificuldades para a produção sintética de determinado composto em grande escala, de forma que, ao serem simplificadas, essas moléculas podem reduzir a sua bioatividade (BHOWMIK & INDERJIT, 2003), assim como, corre-se o risco de, após todo o processo de bioensaios, isolamento e identificação dos



compostos, chegar-se a uma molécula com bioatividade já conhecida (DUKE et al., 2000). Além disso, nas plantas, os compostos bioativos geralmente produzem seu efeito através de interações com outras substâncias, de forma que, quando isolados, os aleloquímicos podem ter sua bioatividade reduzida (VYVYAN, 2002).

Para Weir et al. (2004), estudos que comprovem a atividade alelopática no ambiente são mais difíceis de serem demonstrados, uma vez que as concentrações de aleloquímicos liberadas pela planta produtora podem ser insuficientes para garantir o efeito alelopático na planta alvo, de forma que os efeitos só seriam observados se somados os aleloquímicos de todo o vegetal, como nos estudos laboratoriais onde se utilizam extratos das plantas inteira. Outro fator que dificulta a observação dos efeitos é que, em alguns casos, algumas espécies desenvolvem resistência à determinadas fitotoxinas, diminuindo o seu efeito.

No entanto, apesar do longo e difícil caminho, existe um enorme potencial dos produtos naturais vegetais serem utilizados como protótipos para desenvolvimento de novos produtos agroquímicos. Considerando os altos custos envolvidos nesse tipo de pesquisa, são necessários maiores incentivos financeiros e a busca por estratégias de exploração e purificação desses compostos bioativos, através de uma equipe capaz de estudar e alterar suas estruturas bioquímicas no intuito de se criar uma nova molécula com maior atividade herbicida, assim como, com características de persistência no solo e seletividade adequada e baixa toxicidade à organismos não-alvos e ao ambiente. A ideia de que novos produtos possam dispor de novos mecanismos de ação nas plantas e que o desenvolvimento de bancos de germoplasma de culturas, que expressam características melhoradas quanto a competição e aos efeitos alelopáticos no manejo de plantas daninhas, possam ocasionar a redução do uso de produtos químicos sintéticos nas lavouras, impulsionam a busca por novas moléculas e/ou a redução (WESTON & INDERJIT, 2007).

Além de substâncias aleloquímicas, as plantas são fontes de uma variedade de substâncias, incluindo antioxidantes e antimicrobianas, auxiliando diversos ramos de indústrias na procura por novas moléculas que possam ser utilizadas na produção de novos fármacos e aditivos alimentares, conferindo a esses produtos, menos toxicidade e efeitos prejudiciais à saúde, assim como, apresentando-se como uma alternativa à resistência de patógenos, com ***Bacillus cereus***, bactéria gram-positiva aeróbia facultativa encontrada em solos, vegetais e

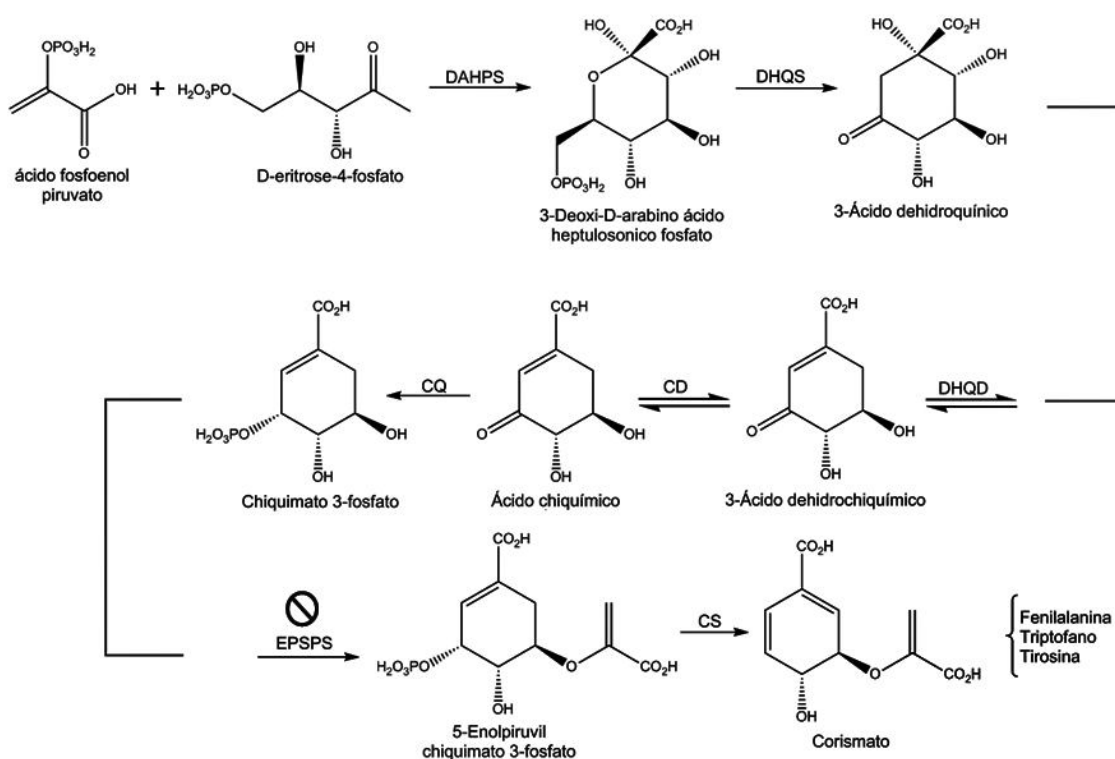
alimentos, processados ou crus, e responsável pelos quadros intoxicação alimentar, seguidos de diarreia e vômito (GOMES et al., 2004).

Os metabólitos especializados vegetais são importantes fontes de moléculas com atividade herbicida, antioxidante, antimicrobiana, entre outras, sendo divididos em três principais classes bioquímicas, sendo elas: compostos fenólicos, terpenóides e alcalóides. Os compostos fenólicos e terpenóides são as maiores classes que estão relacionadas ao fenômeno de alelopatia (WEIR et al., 2004). Os compostos fenólicos mais comuns na alelopatia são derivados do ácido cinâmico, sendo fenóis simples, ácido benzóico, cumarinas, taninos e polifenóis complexos. Os ácidos fenólicos e aldeídos são compostos amplamente identificados como inibidores de crescimento de plantas e micro-organismos (EINHELLING, 2004). Os efeitos fitotóxicos dos ácidos fenólicos dependem da sua concentração, de forma que em alguns casos, podem causar respostas estimulatórias nos bioensaios (EINHELLING, 2004). Geralmente, a concentração de aleloquímicos necessária para inibir a germinação da semente é maior do que a concentração necessária para inibir o desenvolvimento das plântulas (FERREIRA & ÁQUILA, 2000).

Embora os flavonoides sejam um grupo bastante extenso dentro dos compostos fenólicos, apenas um pequeno número é reconhecido como potencial alelopático, de forma que seus mecanismos de ação são pouco conhecidos (EINHELLING, 2004). No entanto, essas substâncias são amplamente reconhecidas devido sua atividade antioxidante (DORNAS et al., 2007) e antimicrobiana (MANRIQUE & SANTANA, 2008). Nos vegetais, os compostos fenólicos possuem uma vasta diversidade química e diferentes funções, incluindo defesa contra estresses bióticos e abióticos, suporte mecânico, atrativos a agentes polinizadores e proteção à radiação ultravioleta, sendo capazes também de inibir ou retardar o desenvolvimento de plantas adjacentes (CROTEAU et al., 2000).

Em vegetais superiores, o ácido-chiquímico é o intermediário na principal rota de biossíntese dos compostos fenólicos, a rota do ácido-chiquímico (Figura 1). Essa rota de biossíntese deriva-se do ácido fosfoenolpiruvato (PEP), resultante da glicólise, e da eritrose-4-fosfato, proveniente da rota da pentose fosfato, formando o corismato, substância precursora dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano. Esses aminoácidos são essenciais para a síntese de proteínas em todos os organismos vivos, e nos vegetais, atuam como precursores para a formação de uma variedade de produtos. A enzima fenilalanina

amônia-liase (PAL) é a enzima central para a produção de compostos fenólicos em plantas, convertendo o aminoácido fenilalanina em ácido trans-cinâmico, sendo este, precursor de uma variedade de outros fenóis, fenilpropanóides, flavonoides, taninos, alcalóides, pigmentos, hormônios, cumarinas, ligninas, lignanas, ácido salicílico, constituintes celulares, entre outros, proporcionando o crescimento, desenvolvimento, e as respostas de defesas dos vegetais (DEWICK, 2001; MAEDA & DUDAREVA, 2012).



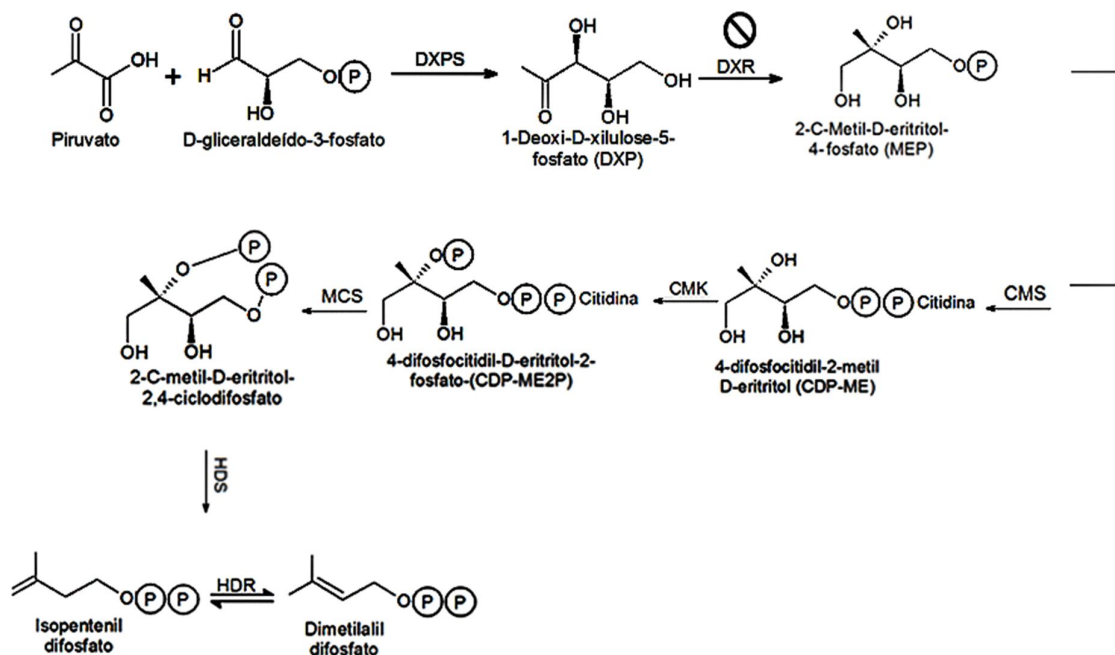
**Figura 1.** Rota do ácido-chiquímico composta pelas enzimas, 3-deoxi-D-arabino-ácido heptulosônico 7-fosfato Sintase (DAHPS), 3-Desidroquinato Sintase (DHQS), 3-Desidroquinato Desidratase (DHQD), Chiquimato-5-Desidrogenase (CD), Chiquimato Quinase (CQ), 5-Enolpiruvilchiquimato 3-fosfato Sintase (EPSPS) e Corismato Sintase (CS). A ação do herbicida glifosato inibe a atividade da enzima EPSPS, interrompendo a biossíntese dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano, precursores de uma série de compostos fenólicos, ocasionando consequentemente, a morte do vegetal e de parasitas *P. falciparum*. Adaptado de Estevez & Estevez, 2012.

Ausente em mamíferos, no entanto presente em plantas, algas, fungos, bactérias e em parasitas do filo Apicomplexa, como o *Plasmodium falciparum* (agente etiológico da malária) (PHILLIPS, 1998; ROBERTS et al., 1998; McROBERT et al., 2005), a rota do ácido-chiquímico apresenta-se como um alvo interessante para a produção de substâncias antimicrobianas e herbicidas, sem ou com menores riscos de intoxicação aos mamíferos. O herbicida glifosato (*N*-

fosfometil glicina), amplamente utilizado em cultivos agrícolas, possui seu mecanismo de ação sobre uma enzima específica dessa rota, a enzima 5-fosfoenolpiruvil-chiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPS) (SCHONBRUNN et al., 2001), que catalisa a reação de chiquimato-3-fosfato e fosfoenolpiruvato (PEP) para formar 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato (EPSP). A ação do glifosato inibe a atividade da enzima EPSPS (Figura 1), interrompendo a biossíntese de aminoácidos essenciais, ocasionando, conseqüentemente, a morte do vegetal (POWLES & YU, 2010; MAEDA & DUDAREVA, 2012) assim como de parasitas *P. falciparum*.

Diferentemente dos compostos fenólicos, os compostos terpênicos são biossintetizados a partir de duas rotas metabólicas diferentes, sendo elas a rota do ácido mevalônico (MAV) e 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato (DXP), a última também conhecida como rota do metileritritol fosfato (MEP) (DEWICK, 2001; PICKENS et al., 2011).

A rota do MEP, além de presente nos vegetais, é também presente nos parasitas *P. falciparum* (JOMAA et al., 1999). A fosmidomicina (3-[N-formil-N-hidroxi amino] propil ácido fosfônico), um composto antibiótico isolado a partir de cepas de *Streptomyces lavendulae*, também com atividade herbicida (KAMURO et al., 1991), apresenta-se como um potente inibidor dessa rota (Figura 2), inibindo a atividade da enzima DXR (1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato redutoisomerase), impedindo a formação dos compostos penta-carbonados isopentenil difosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil difosfato (DMAPP), precursores dos demais terpenos (KUZUYAMA et al., 1998). O IPP e DMAPP reagem entre si para a formação de uma molécula de geranyl difosfato (GPP), uma molécula de 10 carbonos, precursora dos monoterpenos (C<sub>10</sub>). A partir do (GPP), novas moléculas de IPP podem ser ligadas, originando os demais terpenos, que podem ser classificados de acordo com o número de unidades isoprênicas presentes, podendo ser hemiterpenos, com apenas uma unidade isoprênicas (C<sub>5</sub>), monoterpenos (C<sub>10</sub>), sesquiterpenos (C<sub>15</sub>), diterpenos (C<sub>20</sub>), sesterpenos (C<sub>25</sub>), triterpenos (C<sub>30</sub>), tetraterpenos (C<sub>40</sub>) e politerpenóides ([C<sub>5</sub>]<sub>n</sub> carbonos, onde n >8) (KIRBY & KEASLING, 2009).



**Figura 2.** Rota do 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato (DXP), também conhecida como rota do metileritritol fosfato (MEP), composta pelas enzimas 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato sintase (DXPS), 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato redutoisomerase (DXR), 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol sintase (CMS), 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol quinase (CMK), 2C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato sintase (MCS), 1-hidroxi-2C-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato sintase (HDS) e 1-hidroxi-2C-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato redutoisomerase (HDR). A ação da fosmidomicina inibe a atividade da enzima DXR, inibindo a biossíntese de isopentenil difosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil difosfato (DMAPP), precursores dos demais compostos terpênicos, ocasionando, conseqüentemente, a morte do vegetal e de parasitas *P. falciparum*. Adaptado de LANGE et al., (2001).

A produção, armazenamento e liberação dos compostos terpênicos estão relacionadas à presença de estruturas especializadas. Os terpenos produzidos nos tricomas glandulares das folhas e nas glândulas epidérmicas das pétalas de flores sintetizam, armazenam e liberam óleos essenciais que auxiliam a polinização por insetos (CROTEAU et al., 2000; REGNAULT-ROGER et al., 2011). Em outros casos, as substâncias terpênicas voláteis produzidas pelas plantas podem ser fundamentais para a defesa indireta do vegetal, como é o caso do tabaco selvagem (*Nicotiana attenuata*). Essa planta, ao sofrer ataque da lagarta do gênero *Manduca*, reconhece as secreções orais liberadas pelo agressor e estimula a liberação de compostos orgânicos voláteis, os quais atraem predadores naturais da lagarta, demonstrando a evolução dos mecanismos de defesa dos vegetais através do auxílio de outros organismos (KESSLER & BALDWIN, 2002).

Alguns compostos terpênicos podem ser considerados como metabólitos primários, atuando em funções essenciais ao crescimento e

desenvolvimento dos vegetais, como é o caso dos hormônios giberelina e ácido abscísico, esteróis e carotenoides, que auxiliam no crescimento celular e alongação no vegetal, na fotossíntese e proteção contra foto-oxidação, e na fluidez e permeabilidade das membranas (KIRBY & KEASLING, 2009).

O número de substâncias aleloquímicas derivadas dos terpenos é considerado extenso, no entanto, apenas um pequeno número dessas fitotoxinas possui seu mecanismo de ação compreendido. As piretrinas, ésteres de monoterpeno com baixa toxicidade aos mamíferos e de baixa persistência no ambiente, isolado a partir das flores de *Chrysanthemum cinerariaefolium* e espécies relacionadas, são reconhecidas pela sua forte atividade como inseticidas. Por ser uma substância facilmente degradada pela ação da luz e muito volátil, pesquisadores empenharam-se em alterar sua estrutura química a fim de se aumentar a sua eficácia no controle de pragas na agricultura, aumentando sua estabilidade e potencial inseticida, dando origem aos inseticidas sintéticos piretróides (SANTOS et al., 2007).

Os óleos essenciais vegetais, compostos por uma mistura de mono e sesquiterpenos voláteis e fenilpropanóides, são importantes fontes de matéria prima para as indústrias. Os derivados do óleo essencial de laranja (*Citrus sinensis* L.) são muito utilizados pelas indústrias mundiais de perfumaria, produtos farmacêuticos e alimentos (BIZZO et al., 2009). Muitos estudos empregam também os óleos vegetais como potentes substâncias antioxidantes e antimicrobianas (CANSIAN et al., 2010; STIEVEN et al., 2009; TRAJANO et al., 2009; BIANCHIN & CARPES, 2012).

Por fim, a classe dos alcalóides é reconhecida por seus mecanismos de defesa vegetal, incluindo compostos geralmente amargos, tóxicos e deterrentes aos mamíferos e artrópodes, atuando sobre o mecanismo de enzimas e afetando diversos processos metabólicos (MITHOFER & BOLAND, 2012). Os alcalóides são compostos nitrogenados biossintetizados a partir de aminoácidos comuns, classificando-se em mais de 20 classes diferentes. A produção e armazenamento dessas substâncias muitas vezes resultam da mistura de alcalóides estruturalmente diversos, que são armazenados em locais específicos, podendo variar quali e quantitativamente em resposta a fatores externos. Alcalóides como a nicotina, piperina, alcalóides esteroidais, efedrina, estricnina, berberina e cafeína, são exemplos de alcalóides inseticidas. Uma variedade de alcalóides, como quinino,

cinchonina, ergotamina, harmalina, estricnina, berberina, colchicina, morfina, cocaína, cafeína e nicotina tem sido relacionados a efeitos alelopáticos, apresentado também funções ecológicas importantes, como atividade antibacteriana e antifúngica (BLUM, 2004). Dessa forma, muitos alcalóides apresentam-se como importantes modelos para as indústrias agroquímicas e farmacêuticas na descoberta de novos produtos (BARREIRO & BOZZANI, 2009).

Além do glifosato e da fosmidomicina, há ainda outra substância herbicida com atividade inibidora sobre o parasita *P. falciparum*, a trifluralina (NAUGHTON et al. 2008), um herbicida pré-emergente utilizado no controle de plantas daninhas do tipo gramíneas. Essa substância inibe o arranjo dos microtúbulos na mitose, inibindo a polimerização e despolimerização das proteínas tubulinas, impedindo a formação do fuso cromático e a migração dos cromossomos da região equatorial para a região dos pólos das células, promovendo a ruptura da sequência mitótica, já iniciada, tendo efeito direto sobre a divisão celular, com o aparecimento de células multinucleadas (OLIVEIRA-JÚNIOR, 2011). Em parasitas *P. falciparum*, a trifluralina afeta importantes funções dos microtúbulos, interferindo na divisão, suporte e mobilidade celular, no entanto em mamíferos, apresenta baixa ou quase que indetectável citotoxicidade, tornando-se uma fonte interessante de exploração quanto ao desenvolvimento de novas drogas antimaláricas (NAUGHTON et al., 2008).

Com o intuito de buscar novas fontes de biomoléculas com atividade herbicida, extratos etanólicos e diclorometânicos de quatro espécies vegetais, com reconhecimento científico e popular quanto ao seu uso como antimaláricas (critério etnobotânico), foram selecionadas para a realização de bioensaios, sendo elas: *Bidens pilosa* L., *Phyllanthus niruri* L., *Petiveria alliacea* L. e *Senna hirsuta* L. Para a realização das análises complementares de atividade antioxidante e antimicrobiana, além das quatro espécies citadas, utilizou-se também a espécie *Quassia amara*.

*Bidens pilosa* L., conhecida popularmente como picão-preto e pertencente à família Asteraceae (Compositae), é uma planta nativa da América Tropical, com maior presença na América do Sul. No Brasil está presente em quase todo o território (KISSMANN & GROTH, 1999). Em todo o mundo destaca-se como uma planta daninha de alta disseminação em meios agrícolas, no entanto, também é reconhecida devido suas propriedades terapêuticas (SANTOS & CURY, 2011). Estudos fitoquímicos evidenciaram a presença de compostos alcalóides, esteróis,

antraquinonas, flavonoides, saponinas, taninos e glicosídeos, polissacarídeos, entre outros (VALDÉS & REGO, 2001; BALANGCOD et al., 2012). Entre as propriedades medicinais, são observados efeitos anti-inflamatória, diurético, anti-reumático, antibiótico e anti-diabético na medicina tradicional (BRANDÃO et al., 1998), assim como atividade antimalárica (BRANDÃO et al., 1997; KRETTLI et al., 2001; BOTSARIS, 2007; CLARKSON et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2004; PILLAY et al., 2008; MARIATH et al., 2009; e REINERS et al., 2010), antifúngica (DEBA et al., 2007) antimicrobiana (KHAN et al., 2001; DEBA et al., 2007; BALANGCOD et al., 2012) e antioxidante (DEBA et al., 2007; MUCHUWETI et al., 2007; KRISHNAIAN et al., 2011; KATERERE et al., 2012). Extratos aquosos de folhas de *B. pilosa* indicam potencial alelopático sobre a germinação e o crescimento de plântulas de *Brassica oleracea* (repolho), *Brassica rapa* (nabo), *Lactuca sativa* (alface) e *Raphanus sativus* (rabanete) (RABELO et al., 2008) e (*Lycopersicon esculentum* Miller) tomate (GUSMAN et al., 2011). O extrato etanólico das partes aéreas de *B. pilosa*, preparados em suspensão do material vegetal em etanol por sete dias, também apresentou potencial alelopático sobre o crescimento de plântulas de alface (LIMA et al., 2011). Apesar do efeito do extrato etanólico de *B. pilosa* já ter sido estudado sobre sementes de alface, mesmo que em diferentes condições de preparação do extrato, o efeito do extrato etanólico da espécie não foi estudado sobre *Ipomoea grandifolia*. De acordo com estudo de revisão realizado por Santos & Cury (2011), a atividade alelopática de *B. pilosa* pode estar relacionada com a presença da substância fenilheptatrina (PHT), um poliácetileno produtor de radicais livres tóxicos às larvas de insetos herbívoros, fungos, bactérias, vírus e plantas. Outras espécies vegetais, pertencentes à família Asteraceae, são reconhecidas quanto ao seu potencial alelopático, como é o caso de *Helianthus annuus* (girassol), onde importantes aleloquímicos da classe dos fenóis, terpenos e flavonoides já foram identificados (VYVYAN, 2002). A lactona sesquiterpênica dehydrozalanin C (DHZ), obtida de diferentes plantas da família Asteraceae, é um aleloquímico que ocasiona a ruptura das membranas das células, possuindo forte atividade inibidora sobre o crescimento de diferentes espécies de dicotiledôneas (MACIAS et al., 2000). Outra lactona sesquiterpênica com atividade aleloquímica reconhecida é a artemisinina, extraída da *A. annua*, espécie pertencente à mesma família que *B. pilosa* (WESTON & INDERJIT, 2007).



*Phyllanthus niruri* L., conhecida popularmente como “quebra-pedra”, é pertencente à família Euphorbiaceae, nativa do continente americano, ocorrendo em toda a região tropical. As plantas do gênero *Phyllanthus* possuem grande semelhança, dificultando sua classificação e caracterização botânica (KISSMANN & GROTH, 1999). Essa planta é muito utilizada em tratamento de doenças renais (MARQUES, 2010; BOIM et al., 2010), sendo também um importante antioxidante (AMIN et al., 2012), antimicrobiano (RAJESHWAR et al., 2008; GAMI & KOTHARI, 2011), anti-inflamatório, analgésico, antiespasmódica, anti-hepático, diurético (BAGALKOTKAR et al., 2006), nematicida (SHAKIL et al., 2008). Sua atividade antimalárica foi comprovada (MILLIKEN, 1997; TONA et al., 2001; CARABALLO & RODRIGUEZ-ACOSTA, 2004; CIMANGA et al., 2004; TONA et al., 2004). Em estudo de revisão, Calixto et al. (1998) descreve a presença de alcalóides, benzenoides, cumarinas, flavonoides, lignanas, lipídeos, esteróis, taninos e terpenos como constituintes de *P. niruri*. Em alguns locais, é reconhecida como planta daninha (ALBERTINO et al., 2004; ALL, 2010). Estudos referentes ao potencial alelopático dessa espécie não foram encontrados na literatura.

*Petiveria alliacea* L., conhecida popularmente como guiné, é uma planta da família das Phytolaccaceae, nativa da região Amazônica, possuindo hábito persistente e de difícil erradicação em algumas regiões (LORENZI & MATOS, 2002). Em análise fitoquímica, Lucena et al. (2011) evidenciaram a presença de flavonoides, fenóis, taninos, saponinas, quinonas, triterpenos, esteroides e alcalóides em folhas de *P. alliacea* L. Essa espécie é reconhecida devido suas atividades antimicrobiana (KIM et al., 2006; GUEDES et al., 2008; PACHECO et al., 2011), antioxidante (OKADA et al., 2008), hipogliceminante, com efeito secundário sobre o sistema nervoso central (CAMARGO, 2007), antiagregante plaquetária (VILLAR et al., 1997), analgésica (LIMA et al., 1991), antitumoral (URUENA et al., 2008), abortiva (BOSCOLO & VALLE, 2008), entre outros. De acordo com Vigneron et al., (2005), em estudo investigativo, constatou-se que folhas de *Petiveria alliacea*, são utilizadas para a cura e prevenção da malária. O uso de *P. alliacea* como antimalárico também é descrito por Caraballo et al. (2004) e Milliken (1997). O potencial alelopático de extratos metanólicos e diclorometânicos de folhas de *P. alliacea* sobre germinação e desenvolvimento de *Amaranthus hypochondriacus* e *Lactuca sativa* foi estudado por Pérez-Leal et al., (2005), no entanto, dados

referentes ao efeito de extratos etanólicos e diclorometânicos de *P. alliacea* sobre *Ipomoea grandifolia*, e do extrato etanólico sobre alface, ainda são desconhecidos.

*Senna hirsuta* (L.) H.S. Irwin & Barneby, conhecida popularmente como fedegoso e pertencente à família Fabaceae, é uma planta nativa do Brasil e amplamente distribuída na América, desde os Estados Unidos da América até o Brasil (KISSMANN & GROTH, 1999). Estudos botânicos recentes levaram a transposição taxonômica de espécies do gênero *Cassia* para o táxon *Senna*, de forma que as espécies de *Cassia* e *Senna* formam um dos maiores gêneros da família Fabaceae (VIEGAS-JÚNIOR et al., 2006), sendo *Cassia hirsuta* L. citada como sinônimo botânico de *Senna hirsuta* L. (SOUZA & BORTOLUZZI, 2010). Em estudo etnomedicinal em aldeias em torno da reserva florestal de Kimboza, na Tanzânia, Amri & Kisangau (2012), relatam o uso de folhas de *S. hirsuta* no tratamento de doenças como pneumonia, hérnia e dores estomacais e de cabeça por essas comunidades. Em levantamento etnobotânico em Ponta Porã, no estado do Mato Grosso do Sul, Brasil, *S. hirsuta* foi relatada, pelas comunidades locais, como laxante e com efeitos sobre doenças relacionadas ao fígado. As sementes torradas auxiliam em tratamentos de inflamações da próstata e também podem ser utilizadas como vermífugo (PEREIRA et al., 2009). *S. hirsuta* possui ação antimicrobiana contra cepas de *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexnerii*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* (TEKWU et al., 2012), e atividade antioxidante correlacionada com o teor de compostos fenólicos totais (VADIVEL et al., 2011). Algumas espécies do gênero *Senna* são descritas como plantas infestantes de sistemas agrícolas, como *S. obtusifolia* (ERASMO et al., 2000), *S. occidentalis* (CHRISTOFFOLETI et al., 2010) e *S. alata* (RODRIGUES et al., 2009). Segundo Titanji et al. (2008), a casca do caule e as folhas de *S. hirsuta* são utilizados na medicina popular de Camarões no tratamento contra malária. A espécie *S. occidentalis*, pertencente ao gênero *Senna* e à família Fabaceae, é amplamente reconhecida devido sua ação antimalárica (TONA et al., 1999, TONA et al., 2001; CIMANGA et al., 2004; ZIRIHI et al., 2005).

*Quassia amara* L., conhecida popularmente como quássia-amarga, é uma planta da família das Simaroubaceae, nativa do norte do Brasil (LORENZI & MATOS, 2002). Dentre os componentes químicos já descritos na espécie, destacam-se os quassinóides (quassina e neoquassina), alcalóides indólicos (derivados da cantina e de  $\beta$ -carbolina), esteroides, ácidos alifáticos e ácidos aromáticos

(GILBERT & FAVORETO, 2010). Os quassinóides - substâncias triterpênicas com alto poder de oxigenação, encontrados principalmente em plantas da família Simaroubaceae - como ailantone, holancatone, glaucarubolone e chaparrinone, são compostos vegetais altamente fitotóxicos, no entanto, a maioria dos mecanismos de ação dessas substâncias permanecem desconhecidos (DUKE & OLIVA, 2004). Em estudo de revisão, Almeida et al. (2007) destaca outras propriedades dos quassinóides, como anticâncer, antimalárica, inseticida, amebicida, nematocida, antiviral, antioxidante, anti-inflamatória, entre outros. Espécies como *Ailanthus altissima* e *Samandera indica*, da família Simaroubaceae, também demonstram-se como importantes antimicrobianos (RAHMAN et al., 2008; VISWANAD et al., 2012). Na medicina tradicional, *Q. amara* é utilizada em problemas gastrointestinais, dores de cabeça, arritmia cardíaca, leucemia, anemia, picadas de cobras (GILBERT & FAVORETO, 2010) e analgésica (TOMA et al., 2003). Sua atividade antimalárica foi comprovada por Ajaiyeoba et al. (1998), Bertani et al. (2005), Bertani et al. (2007), Cachet et al. (2009) e Houel et al. (2009). Estudos referentes à atividade antimicrobiana e antioxidante de *Q. amara* não foram encontrados na literatura.

### 3 ATIVIDADE ALELOPÁTICA DE PLANTAS COM USO POPULAR ANTIMALÁRICO

#### 3.1 RESUMO

Considerando-se que compostos herbicidas, como o glifosato, estão sendo testados como medicamento antimalárico, pressupõe-se que um medicamento, ou uma planta medicinal antimalárica, possam ser testados como herbicidas. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi analisar a influência de diferentes concentrações dos extratos brutos etanólicos (EET) e diclorometânicos (EDC) das espécies medicinais antimaláricas *Bidens pilosa* L. (picão-preto), *Phyllanthus niruri* L. (quebra-pedra), *Petiveria alliacea* L. (guiné) e *Senna hirsuta* L. (fedegoso), sobre a germinabilidade (GER), tempo médio de germinação (TMG), velocidade média de germinação (VMG), comprimento de radícula (RAD) e comprimento de hipocótilo (HIP) de *Lactuca sativa* L. (alface) e *Ipomoea grandifolia* (Dammer) O'Donel (corda-de-viola). O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado distribuído em um trifatorial (espécie antimalárica vs. extrator vs. concentração). Os bioensaios foram realizados com quatro repetições de 25 sementes, para os testes germinativos, e 10 sementes pré-germinadas, para os bioensaios de crescimento. As sementes germinadas foram contadas diariamente, durante o período de 144 horas, como meio de obtenção das variáveis TMG e VMG, já as variáveis GER, RAD e HIP foram mensuradas após 144 horas da aplicação dos extratos. Os extratos brutos das plantas antimaláricas, e suas respectivas concentrações, demonstraram efeitos inibitórios, e em alguns casos estimulatórios, de magnitudes diferentes sobre os processos de germinação e/ou desenvolvimento das espécies alvo. O aumento da concentração dos EET e EDC de *P. alliacea* e do EET de *S. hirsuta*, não influenciaram o TMG, VMG e GER de corda-de-viola, sendo que o EDC de *P. alliacea* também não influenciou sobre RAD e HIP da mesma. O EET de *B. Pilosa* apresentou ótimos resultados frente à inibição do RAD e HIP de alface e GER, TMG, VMG, RAD e HIP de corda-de-viola, sugerindo-se a utilização do mesmo para trabalhos futuros de purificação, isolamento e identificação das substâncias bioativas e seus respectivos mecanismos de ação.

#### 3.2 ABSTRACT

Considering that compounds herbicides such as glyphosate are being tested as antimalarial drugs, it is assumed that a drug or a antimalarial medicinal plant, can be tested as herbicides. Thus, the aim of this study was to analyze the influence of different concentrations of crude ethanol extracts (EET) and dichloromethanic (EDC) of antimalarial medicinal species *Bidens pilosa* L. (beggartick), *Phyllanthus niruri* L. (shatterstone), *Petiveria alliacea* L. (guinea) and *Senna hirsuta* L. (sicklepod) on germination (GER), mean germination time (TMG), mean speed of germination (VMG), radicle (RAD) and hypocotyls (HIP) of *Lactuca sativa* L. (lettuce) and *Ipomoea grandifolia* (Dammer) O'Donel (rope-glory). The experimental design was completely randomized distributed in a factorial (species antimalarial vs. extractor vs. concentration). Bioassays were performed with four replicates of 25 seeds for

germination tests, and 10 pre-germinated seeds for the growth bioassays. Germinated seeds were counted daily for a period of 144 hours, to obtaining the TMG and the VMG variables, the variables have GER, RAD and HIP were measured after 144 hours of application of the extracts. The results of bioassays of extracts of plants antimalarial and their respective concentrations showed inhibitory effects, and in some cases stimulatory, different magnitudes of the processes of germination and/or growth of the target species. Increasing the concentration of EET and EDC of *P. alliacea* and EET of *S. hirsuta*, not influenced the TMG, VMG and GER rope-glory, and the EDC of *P. alliacea* also did not influence RAD and HIP the same. The EET of *B. Pilosa* showed excellent results compared to inhibition of RAD and HIP of lettuce and GER, TMG, VMG, RAD and HIP of do rope-glory, suggesting the use of the same for future work of purification, isolation and identification of bioactive substances and their mechanisms of action

### 3.3 INTRODUÇÃO

O intenso uso de agroquímicos no controle de plantas daninhas tem elevado o desenvolvimento de biótipos de plantas daninhas resistentes e tolerantes ao uso de herbicidas sintéticos, como *Ipomoea grandifolia* (Dammer) O'Donel, tolerante ao herbicida de amplo espectro glifosato (*N*-fosfometil glicina) (MONQUERO et al., 2004), assim como, ocasiona aumento nos custos de produção das culturas comerciais (MACIAS et al., 2000; CHRISTOFFOLETI et al., 2008), causando também contaminação do ambiente e prejuízos à saúde dos agricultores, devido sua toxicidade, longa persistência no meio, atividade carcinogênica e mutagênica (ABRASCO, 2012).

Através de estudos alelopáticos, substâncias químicas liberadas pelas plantas e micro-organismos podem ser utilizadas para o desenvolvimento de novos produtos para o controle eficiente de plantas daninhas, auxiliando na prevenção de novos casos de resistência e degradação ambiental (WESTON & INDERJIT, 2007). Há uma compreensão de que herbicidas com base natural possam ser mais rapidamente absorvidos e degradados pelo ambiente, minimizando os impactos ocasionados pela persistência desses produtos. A bioprospecção de moléculas com atividade herbicida envolve o **screening** de extratos brutos e a purificação dos compostos com atividade biológica, de forma que a simplificação e o aperfeiçoamento das moléculas naturais bioativas possibilitam o desenvolvimento e aprimoramento de novas estruturas sintéticas (DUKE et al., 2000). Muitos aleloquímicos possuem mecanismo de ação diferente dos herbicidas sintéticos já

conhecidos, tornando os metabólitos especializados (no passado, cunhados metabólitos especializados), fontes promissoras para o desenvolvimento de novos herbicidas sintéticos de base natural. Exemplos disso são os aleloquímicos leptospermone, protótipo do herbicida sintético mesotrione e os compostos 1,4 e 1,8-cineol, protótipos do herbicida sintético cinmetilina. Esses modelos são bons arquétipos do uso de moléculas naturais como protótipos para o desenvolvimento de herbicidas sintéticos (VYVYAN, 2002; DUKE & OLIVA, 2004; CORNES, 2005; WESTON & INDERJIT, 2007).

Algumas moléculas com conhecida atividade herbicida vêm sendo testadas como drogas antimaláricas, como o i) glifosato (ROBERTS et al., 1998; PHILLIPIS, 1998; McROBERT et al., 2005), a ii) fosmidomicina (JOMAA et al., 1999) e a iii) trifluralina (NAUGHTON et al., 2008). O glifosato possui como mecanismo de ação a inibição da atividade da enzima 5-fosfoenolpiruvil-chiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPS) da rota do ácido chiquímico (SCHONBRUNN et al., 2001), interrompendo a biossíntese dos aminoácidos tirosina, triptofano e fenilalanina, ocasionando, conseqüentemente, a morte do vegetal (POWLES & YU, 2010; MAEDA & DUDAREVA, 2012). A rota do ácido chiquímico é ausente em mamíferos e presente em plantas, algas, fungos, bactérias e também em parasitas do filo Apicomplexa, como o *Plasmodium falciparum*, agente etiológico da malária, de forma que o herbicida glifosato ocasiona não só a morte de vegetais, mas também do parasita *P. falciparum* (ROBERTS et al., 1998; PHILLIPIS, 1998; McROBERT et al., 2005). A fosmidomicina atua sobre a rota metabólica 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato (DXP), também conhecida como via do metileritritol fosfato (MEP) (DEWICK, 2001), inibindo a atividade da enzima DXR (1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato redutoisomerase) (KUZUYAMA et al. 1998), e conseqüentemente, a biossíntese de compostos terpênicos. A trifluralina é um herbicida antimitótico que ocasiona colapso nas estruturas microtubulares mitóticas de *P. falciparum*, apresentando baixa ou quase que indetectável citotoxicidade aos mamíferos (NAUGHTON et al., 2008). Por serem ausentes em mamíferos, as rotas de biossíntese do ácido chiquímico e do metileritritol fosfato apresentam-se como alvos interessantes para a produção de substâncias antimicrobianas e herbicidas, em tese, oferecendo baixos riscos de intoxicação para os mesmos.

Partindo-se do princípio de que um composto herbicida pode ser utilizado como medicamento, atuando sobre o parasita *P. falciparum*, pressupõe-se

que um medicamento, ou uma planta medicinal antimalárica, possam ser testados como herbicidas, inibindo a atividade de enzimas na rota do ácido-chiquímico (p.ex., EPSPS), ou da rota do MEP (p.ex., a enzima DXR), ou mesmo a formação de microtúbulos nas células vegetais. Corroborando com esse raciocínio, a espécie ***Artemisia annua***, reconhecida por sua propriedade antimalárica, já possui atividade herbicida comprovada (DUKE & OLIVA, 2004; MAGIERO et al., 2009, FERREIRA et al., 2010).

Dessa forma, o presente trabalho visa verificar se plantas com atividade antimalárica reportadas na literatura, assim como ***A. annua***, são potenciais fontes de moléculas herbicidas. Devido à complexidade dos estudos que visam a purificação, isolamento e identificação de compostos com atividade alelopática e seus respectivos mecanismo de ação, o presente trabalho objetivou atender as etapas iniciais desse processo, como a seleção das espécies antimaláricas, ***Bidens pilosa*** L. (picão-preto, Asteraceae), ***Phyllanthus niruri*** L. (quebra-pedra, Euphorbiaceae), ***Petiveria alliacea*** L. (guiné, Phytolaccaceae) e ***Senna hirsuta*** L. (fedegoso, Fabaceae), e a realização de bioensaios em laboratório, a partir da aplicação de extratos brutos etanólicos (ETT) e diclorometânicos (EDC) sobre ***Lactuca sativa*** L. (alface), espécie bioindicadora em estudos de alelopatia, e sobre ***Ipomoea grandifolia*** (Dammer) O'Donel (corda-de-viola), planta daninha infestante da região.

### 3.4 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.4.1 Espécies Seleccionadas

As espécies utilizadas no estudo foram selecionadas a partir de critério etnobotânico, com atividade antimalárica reconhecida/descrita na literatura. As amostras de parte aérea de ***Bidens pilosa*** L., ***Senna hirsuta*** L. e ***Petiveria alliacea*** L. foram coletadas em uma propriedade particular no município de Francisco Beltrão, Paraná, em estado reprodutivo, sendo posteriormente identificados e registrados junto ao Herbário da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - SP, obtendo-se os seguintes registros: ESA 120143; ESA 120144 e ESA 120145, respectivamente. As sementes de ***Phyllanthus niruri*** L. foram cedidas do banco de sementes do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas - UNICAMP,

sobre registro UEC 112740, sendo cultivadas em vasos para posterior utilização da sua parte área, também em estado reprodutivo, para a obtenção dos extratos.

### 3.4.2 Preparo dos extratos brutos e determinação do Potencial osmótico

Os materiais vegetais foram secos em estufa à 40°C, até secagem completa, sendo posteriormente triturados em moinho de facas (Pulverisette 14, Fritsch, Germany), e armazenados em freezer à -4 °C, até sua utilização.

Para a obtenção dos extratos brutos, 25 g das amostras vegetais, previamente moídas, foram solubilizadas em 200 mL de etanol p.a. (Vetec Química Fina, Brasil), e 200 mL de diclorometano p.a. (Vetec Química Fina, Brasil), separadamente, obtendo-se dois extratos (EET e EDC, respectivamente). A extração foi realizada em agitador termostatizado em 35 °C, por 30 min, sob agitação constante de 150 rpm, em incubadora Shaker (Solab, SL 222). Após o término da extração, os extratos foram filtrados em papel filtro e submetidos à rotaevaporador rotativo para a completa evaporação do solvente.

Após a evaporação dos solventes, 2,5 g da massa bruta dos extratos foram mesclados com 0,5 mL de DMSO (Dimetilsulfóxido; Vetec Química Fina, Brasil), e 0,5 mL de Tween 20 (Vetec Química Fina, Brasil), para a diluição em 500 mL de água destilada, obtendo-se assim os extratos brutos na concentração 100%. A partir deste, as demais diluições dos extratos 75%, 50% e 25%, foram realizadas, para todos os tratamentos. Água destilada foi utilizada como controle.

A fim de se confirmar a não interferência do DMSO e do Tween 20 nos processos germinativos e de crescimento das espécies alvo em análise, foi realizado um bioteste com concentrações descritas de DMSO, Tween 20 e água destilada (OLIVA, 2006). Do mesmo modo, a fim de se confirmar a não interferência osmótica, os potenciais osmóticos das concentrações 100%, de todos os extratos, foram determinados comparando-os com soluções de sacarose com potencial osmótico ( $\Psi\pi$ ) determinado, conforme o Método de Sharda (MAESTRI et al., 1998). Soluções de sacarose com  $\Psi\pi$  igual aos extratos de concentração 100% foram aplicadas sobre as espécies alvo para avaliar possível interferência osmótica.



### 3.4.3 Bioensaios alelopáticos

As sementes de *Lactuca sativa* (alface), variedade Grand Rapids (Feltrin, Brasil), utilizadas como alvo nos bioensaios alelopáticos, foram compradas no comércio local. As sementes de *Ipomoea grandifolia* (corda-de-viola) foram cedidas por agricultores da região e identificadas pela Bióloga Priscila Ferreira, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Antes da aplicação dos extratos, as sementes passaram por um processo de esterilização em álcool etílico 50% por 1 min, seguido de hipoclorito de sódio 3:1 por 10 min. Após, as sementes de alface foram deixadas secando ao ar livre, enquanto as sementes de corda-de-viola receberam tratamento de quebra de dormência, com água morna, durante uma hora. Após, as mesmas também foram secas ao ar livre.

Os bioensaios alelopáticos foram realizados com a aplicação dos extratos etanólicos (EET) e diclorometânicos (EDC) de *B. pilosa*, *P. niruri*, *P. alliacea* e *S. hirsuta* sobre as sementes de alface e corda-de-viola. Para os bioensaios de germinação, os extratos foram aplicados sobre placas de Petri, sendo disponibilizadas 25 sementes em cada placa, distribuídas equidistantemente sobre uma camada de papel filtro. Cada placa recebeu 5 mL do seu respectivo tratamento, antes da semeadura. Após, as placas foram mantidas sob fotoperíodo e temperaturas constantes em estufas do tipo BOD (Fanem, 347, São Paulo, Brasil). Ambas as espécies permaneceram sob fotoperíodo de 12 h e temperatura de  $\pm 26$  °C. A coleta dos dados de sementes germinadas realizaram-se após 24, 48, 72, 96, 120 e 144 h da aplicação dos extratos, para obtenção dos cálculos das variáveis tempo médio de germinação (TMG) e velocidade média de germinação (VMG), enquanto o cálculo da variável germinabilidade (GER) foi obtido ao fim das 144 h de aplicação dos extratos, sendo consideradas germinadas as sementes com protusão radicular de 2 mm (GATTI et al., 2004). Os cálculos foram realizados de acordo com Labouriau & Valadares (1976):

$$\text{Germinabilidade: GER} = (N/A) * 100$$

onde: GER = germinabilidade; N = número de sementes germinadas; A = número total de sementes colocadas para germinar.

**Tempo médio de germinação:  $TMG = (\sum ni) / \sum ti$** 

onde: TMG = tempo médio de germinação; ni = número de sementes germinadas por dia; ti = tempo de incubação (24 horas).

**Velocidade média de germinação:  $VMG = 1/t$** 

onde: VMG = velocidade média de germinação; t = tempo médio de germinação.

Para os bioensaios de crescimento de radícula (RAD) e crescimento de hipocótilo (HIP), foram utilizados os mesmos extratos dos testes de germinação. Os experimentos foram realizados em caixas transparentes do tipo gerbox (11 x 11 x 3,5 cm) forradas com uma camada de papel filtro, onde foram dispostas 10 sementes pré-germinadas. As caixas gerbox foram mantidas em estufa BOD à  $\pm 26$  °C e fotoperíodo de 12 h, para ambas as espécies alvo. As avaliações de comprimento radicular e do hipocótilo das plântulas tratadas foram realizadas ao término de 144 h (6 dias), considerando-se o comprimento radicular (mm) como a distância do colo da planta até o ápice meristemático do sistema radicular, e o comprimento de hipocótilo (mm) como a distância do colo da planta até o ápice (GATTI et al., 2004). As plântulas foram classificadas como normais ou anormais conforme as Regras para Análise de Sementes, do Ministério da Agricultura e Reforma Agrária (BRASIL, 2009).

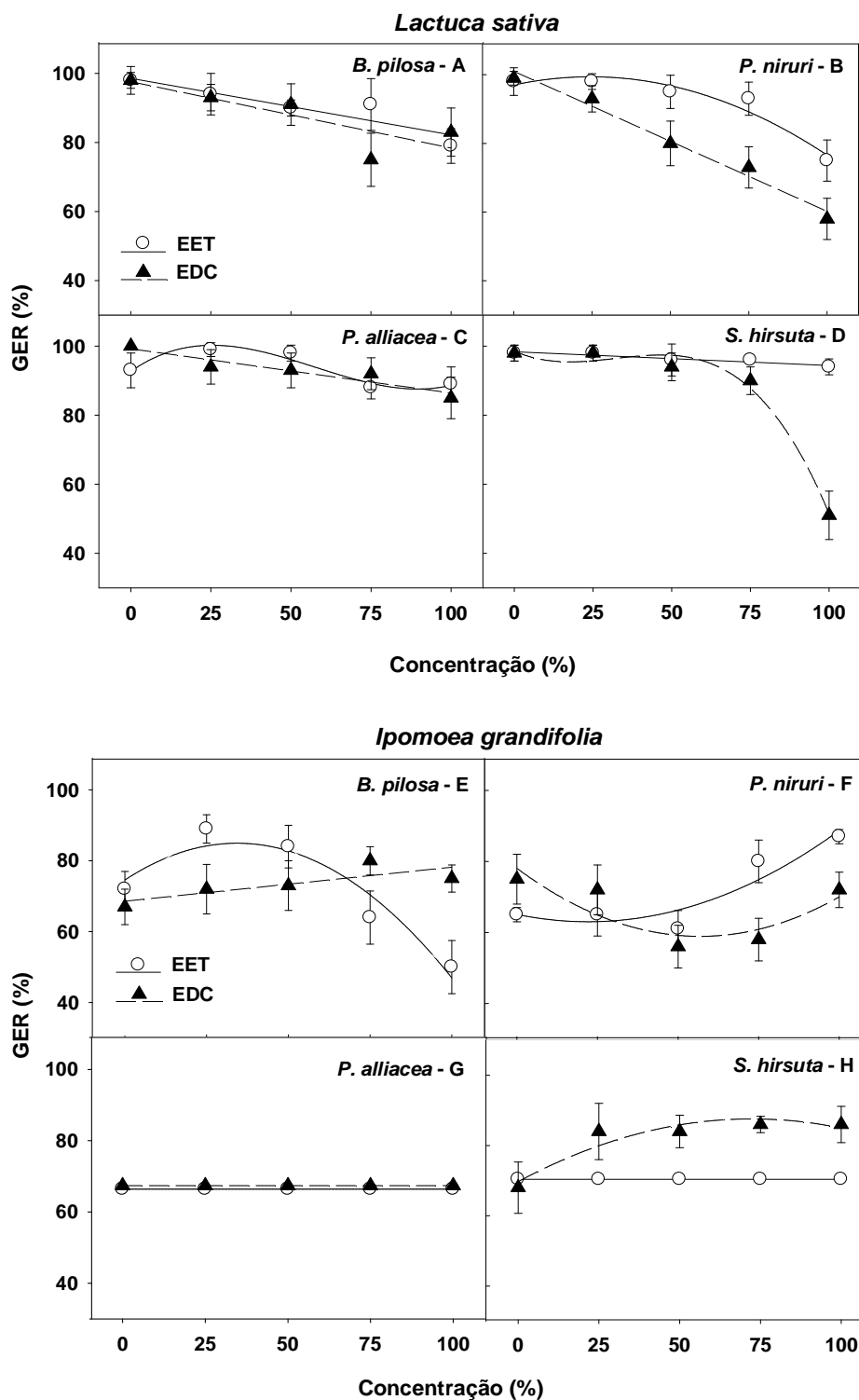
O delineamento experimental utilizado foi do tipo trifatorial inteiramente casualizado (4 espécies **vs.** 2 extratores **vs.** 5 concentrações), com quatro repetições para cada tratamento. Os dados referentes à germinabilidade foram submetidos à teste de normalidade e transformados para arco seno [ $\sqrt{(x/100)}$ ]. Os resultados das avaliações foram submetidos à análise da variância. Os caracteres que expressaram interação significativa foram submetidos à análise de regressão e testados até o grau de polinômio cúbico, considerando apenas o fator concentração como fator quantitativo, sendo posteriormente, confeccionados os gráficos a partir do programa SigmaPlot 11.0. A análise estatística foi realizada no Programa SAEG 9.1.

### 3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da análise de variância de *L. sativa* (alface) e *L. grandifolia* (corda-de-viola) demonstraram a presença de interação significativa tripla entre os fatores principais (espécie antimalárica **vs.** extrator **vs.** concentração), indicando que cada espécie antimalárica possui um efeito de potencial alelopático de magnitude diferente, sendo esse efeito, dependente do tipo de extrator utilizado e da concentração de cada extrato analisado, com exceção das variáveis tempo médio de germinação (TMG) e velocidade média de germinação (VMG) de alface (Apêndice 1 e 2).

Para a variável GER, em sementes de alface submetidas aos extratos de diferentes extratores e concentrações de espécies antimaláricas (Figura 3), observou-se que, ao final das 144 horas de experimento, o extrato mais efetivo sobre a inibição do processo germinativo foi o EDC de *S. hirsuta* (Figura 3D), o qual reduziu bruscamente a porcentagem de sementes germinadas de 90% para 51%, com a aplicação dos extratos com concentrações de 75% e 100%, respectivamente, em relação à sua testemunha (98%), inibindo cerca de 47,9% da germinação. Os demais extratos testados não inibiram mais do que 25% do total de sementes germinadas de alface (Figura 3), mesmo em suas concentrações 100%, com exceção do EDC de *P. niruri* (Figura 3B), de resposta linear, o qual inibiu 41,4% das sementes germinadas, em relação à testemunha (99%).

Em corda-de-viola, a variável GER foi mais afetada pela aplicação do EET de *B. pilosa* (Figura 3E), o qual apresentou um leve estímulo à germinação nas concentrações iniciais de 25% e 50%, com taxas de GER de 89% e 84%, respectivamente, em relação à GER da testemunha (72%). A partir da concentração 75% desse extrato, observou-se o início da redução na GER de corda-de-viola (64%), atingindo GER de 50%, com a aplicação do extrato na concentração 100%, ou seja, uma inibição de 31% das sementes, em relação à testemunha.



**Figura 3.** Germinabilidade (GER) de sementes de *Lactuca sativa* (alface) e *Ipomoea grandifolia* (corda-de-viola), submetidas à diferentes extratores, etanol (ETT) e diclorometano (EDC), e concentrações (0, 25%, 50%, 75% e 100%) de extratos de quatro plantas antimaláricas. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013.

Outros tratamentos apresentaram uma leve tendência de efeito estimulatório sobre a GER de corda-de-viola, como o EDC de *B. pilosa* (Figura 3E), o EET de *P. niruri* (Figura 3F), e o EDC de *S. hirsuta* (Figura 3H), sendo estes efeitos, dependentes da concentração dos respectivos extratos. A concentração 50% do EDC de *P. niruri* apresentou GER de 56%, em relação à testemunha (75%), sendo este, o segundo melhor tratamento na inibição dessa variável (Figura 3F). Ambos os extratos de *P. alliacea* e o EET de *S. hirsuta* não afetaram a GER de corda-de-viola, frente à aplicação de diferentes concentrações de extrato, sendo estes, representados graficamente por uma reta, conforme o valor da média das repetições de cada tratamento.

Os efeitos fitotóxicos dos compostos aleloquímicos são normalmente dependentes da sua concentração, de forma que respostas estimulatórias podem ser observadas geralmente em baixas concentrações de extratos (EINHELING, 2004). Efeitos alelopáticos estimulatórios sobre a germinação de sementes também foram observados por Rosa et al. (2011), com a aplicação de extrato aquoso de *Panicum maximum* (capim colonião) sobre sementes de *Peltophorum dubim* (canafístula) e *Parapiptadenia rigida* (angico). Souza Filho et al. (2006) também verificou efeito estimulatório do óleo essencial de *Myrcia guianensis* sobre a GER de sementes de *Senna obtusifolia*.

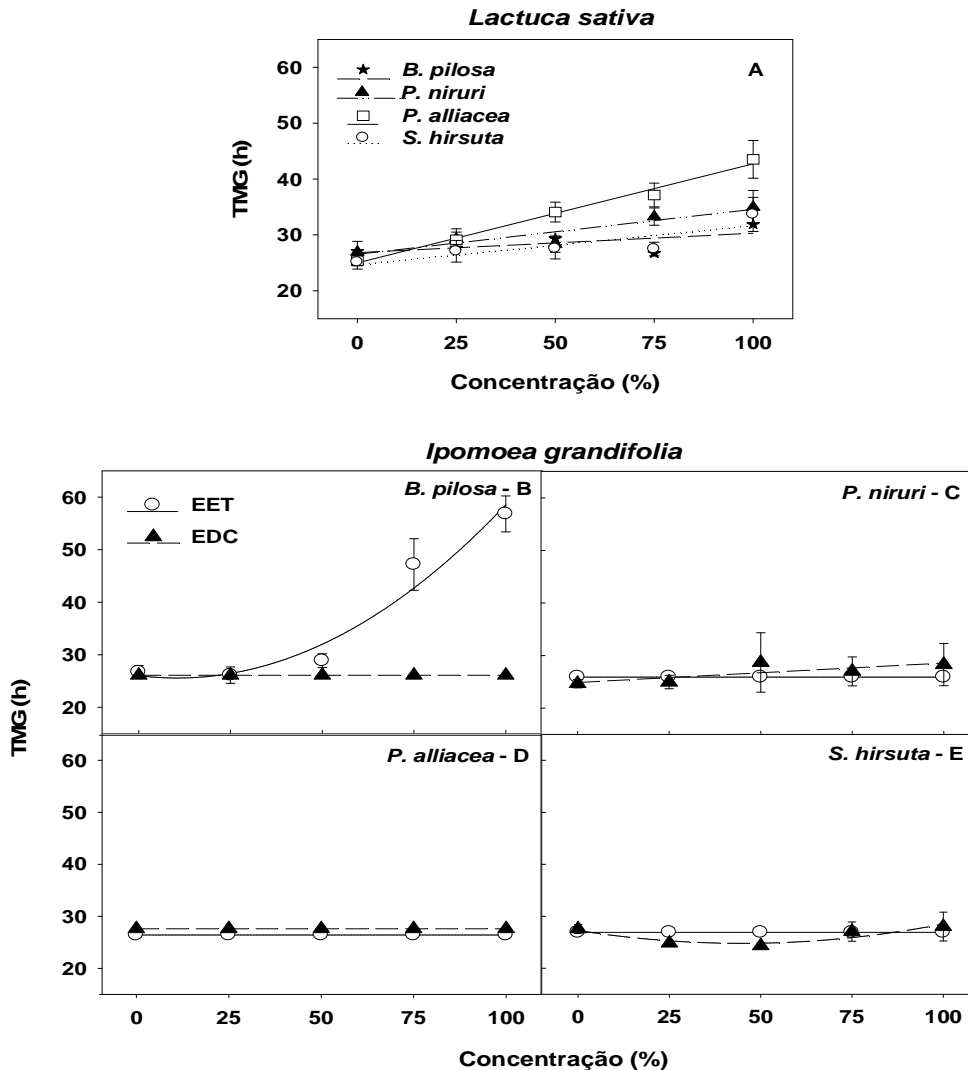
O potencial osmótico dos extratos é outro fator que pode influenciar sobre os resultados de fitotoxicidade dos aleloquímicos, pois, quando em elevadas concentrações, pode ocasionar efeitos que reduzem a germinabilidade das sementes, mascarando os reais efeitos dos compostos aleloquímicos (FERREIRA & ÁQUILA, 2000). Os testes de potencial osmótico das concentrações 100%, de todos os extratos de plantas antimaláricas, não apresentaram valores superiores à -0,10 Mpa. Segundo Rego et al. (2007), apenas potenciais osmóticos superiores à -0,6 Mpa influenciaram sobre os processos germinativos de *Anadenanthera colubrina*. Dessa forma, pode-se concluir que o potencial osmótico referente aos extratos foi insuficiente para a ocorrência de efeitos osmóticos prejudiciais à germinação das espécies alvo. Além do potencial osmótico, as substâncias utilizadas na solubilização dos extratos, como DMSO e Tween 20, também podem influenciar os processos de germinação e desenvolvimento das espécie alvo. Dessa forma, realizou-se a aplicação de uma solução com as mesmas concentrações dessas substâncias utilizadas na confecção dos extratos brutos (0,5 mL de DMSO, 0,5 mL

de Tween 20 e 500 mL água destilada), podendo-se observar que não houve alterações de germinação e desenvolvimento das plântulas, em relação com os tratamentos controle (água destilada).

O processo de germinação de sementes pode ser influenciado por determinados tratamentos os quais as sementes são submetidas, podendo fazê-las germinar de forma mais rápida ou mais lenta, tornando-as mais ou menos competitivas em sistemas naturais. Dessa forma, existem medidas que quantificam a germinação das sementes cineticamente, como o tempo médio de germinação (TMG) e velocidade média de germinação (VMG) (FERREIRA & BORGHETTI, 2004).

Ao analisar-se a Figura 4A, observou-se a influência das espécies antimaláricas em estudo (sem diferença significativa entre os extratores), sobre a cinética do processo germinativo de alface, observando-se que os extratos das espécies **B. pilosa**, **P. niruri** e **S. hirsuta** apresentaram pouca influência sobre o aumento do TMG. No entanto, a espécie **P. alliacea** (Figura 4A), apresentou, já na concentração 50%, resultados que ultrapassaram os valores das demais espécies em suas concentrações 100%, variando 18,15 horas, entre o TMG da sua testemunha (25,38 h) e da sua concentração 100% (43,53 h), sendo esta, a espécie que melhor afetou o TMG das sementes de alface, considerando que quanto maior o TMG, maior é o tempo necessário para que o grupo de sementes germine.

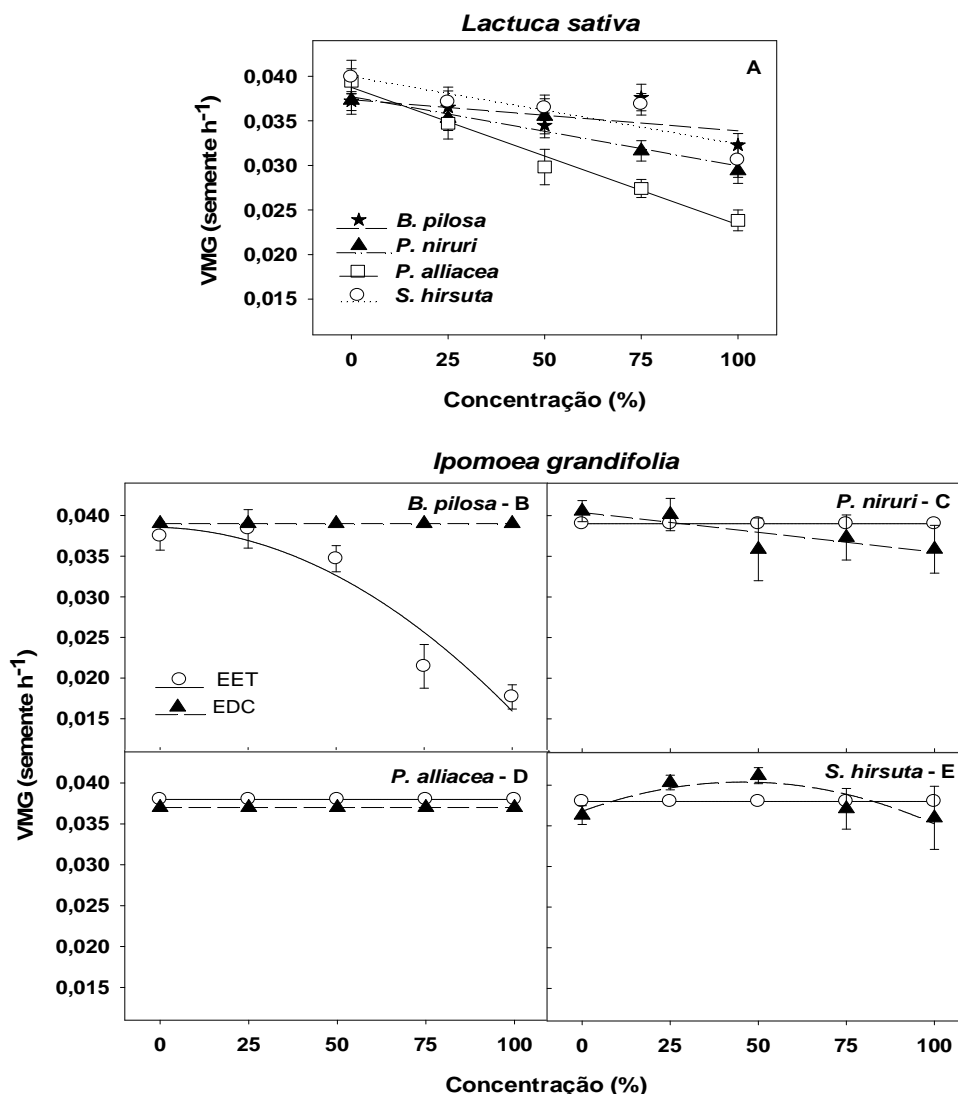
No que diz respeito ao TMG de corda-de-viola, observou-se que os extratores diferiram entre si, apenas para a espécie **B. pilosa**, de forma que seu respectivo extrato etanólico (Figura 4B) foi o único que apresentou resultados satisfatórios, com valores de TMG de 47,19 h e 56,80 h nas concentrações 75% e 100%, respectivamente, em relação à sua testemunha (26,72 h). Ademais, apenas os extratos de EDC de **P. niruri** (Gráfico 4C) e **S. hirsuta** (Figura 4E) reproduziram algum efeito sobre o TMG de corda-de-viola, no entanto, esses efeitos foram pouco expressivos, se comparados ao efeito do EET de **B. pilosa** (Figura 4B). Todos os demais extratos testados, e suas respectivas concentrações, não afetaram o TMG de corda-de-viola, sendo representados, graficamente, por uma reta, conforme o valor da média das repetições de cada tratamento (Figura 4). As estimativas das análises de regressão, referentes à variável TMG de alface e corda-de-viola, estão dispostas nos Apêndices 4 e 5, respectivamente.



**Figura 4.** Tempo médio de germinação (TMG) de sementes de *Lactuca sativa* L. (alface), submetidas ao extrator etanol, e *Ipomoea grandifolia* (corda-de-viola), submetidas à diferentes extratores, etanol (ETT) e diclorometano (EDC), e diferentes concentrações (0, 25%, 50%, 75% e 100%) de extratos de quatro plantas antimaláricas. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013.

Os resultados referentes à VMG de alface e corda-de-viola (Figura 5), os quais caracterizam-se como o inverso do TMG, expressando o número de sementes germinadas por hora (sementes  $h^{-1}$ ) (FERREIRA & BORGHETTI, 2004), demonstraram que, para alface, não houve diferença significativa entre os extratores utilizados, de forma que os extratos da espécie *P. alliacea* (Figura 5A) apresentaram os melhores efeitos sobre o atraso da germinação, com VMG de 0,024 sementes  $hora^{-1}$ , para sua concentração 100%, em relação à sua testemunha (0,039 sementes  $hora^{-1}$ ), enquanto *B. pilosa*, *P. niruri* e *S. hirsuta* (Figura 5A) não diferiram

estatisticamente entre si em suas concentrações 100%, corroborando com os resultados de TMG, para essa espécie.



**Figura 5.** Velocidade média de germinação (VMG) de sementes de *Lactuca sativa* L. (alface), submetidas ao extrator etanol, e *Ipomoea grandifolia* (corda-de-viola), submetidas à diferentes extratores, etanol (ETT) e diclorometano (EDC), e diferentes concentrações (0, 25%, 50%, 75% e 100%) de extratos de quatro plantas antimaláricas. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013.

No que diz respeito à VMG de corda-de-viola, assim como ocorreu com o TMG da mesma, a aplicação do EET de *B. pilosa* foi o único tratamento que apresentou resultado satisfatório frente ao atraso da germinação, a partir de sua concentração 50% (0,035 sementes hora<sup>-1</sup>), tendo seu efeito intensificado com o aumento de sua concentração. Todos os demais tratamentos não afetaram o TMG de corda-de-viola, com exceção do EDC de *P. niruri* e do EDC de *S. hirsuta*, no



entanto, o efeito desses dois extratos citados foi quase imperceptível. Os resultados não significativos foram expressos, graficamente, por uma reta, representando a média das repetições dos respectivos tratamentos (Figura 5). As estimativas das análises de regressão, referentes à variável VMG de alface e corda-de-viola, estão dispostas nos Apêndices 6 e 7, respectivamente.

Apesar do aumento das concentrações dos extratos da espécie *P. alliacea* apresentarem efeitos negativos sobre a cinética da germinação das sementes de alface (Figura 4A e 5A), os mesmos apresentaram pouco efeito sobre a inibição da GER da mesma (Figura 3C), demonstrando que esses extratos são mais eficazes sobre o atraso do que sobre a inibição final da germinação dessas sementes. Esse efeito também foi observado em trabalho desenvolvido por Maraschi-Silva & Áquila (2006), onde os extratos aquosos de *Sapium glandulatum* não afetaram a GER de sementes de alface, mas a maior concentração afetou o TMG. Segundo Ferreira & Áquila (2000), é comum, em experimentos sobre o processo de germinação de sementes, os efeitos dos extratos serem significativos sobre cinética da germinação e com pouca diferença na germinabilidade, em relação ao controle. No entanto, esses resultados divergem dos encontrados em estudo realizado por Pérez-Leal et al. (2005), no qual extratos brutos metanólicos e diclorometânicos de *P. alliacea* apresentaram efeitos fitotóxicos, não só sobre a VMG, mas também sobre a GER de sementes de alface. Essa diferença entre os resultados observados pode ser oriunda do diferente método de extração utilizado em cada experimento, de forma que Pérez-Leal et al. (2005) obtiveram seus extratos orgânicos a partir da maceração das folhas de *P. alliacea* em metanol e diclorometano, respectivamente, por um período de três dias em temperatura ambiente, sendo posteriormente rotaevaporados, podendo dessa forma, contribuir para a extração de diferentes tipos de compostos aleloquímicos.

Quanto à redução da GER das sementes de corda-de-viola, o EET de *B. pilosa* demonstrou-se efetivo, apesar do estímulo nas concentrações iniciais, apresentando inibição de 30,5% da germinação das sementes, na maior concentração (Figura 3E), em relação à sua testemunha, corroborando com os resultados de TMG (Figura 4A) e VMG (Figura 5A), demonstrando que esse extrato não só atrasa, mas também inibe o processo germinativo, sendo esse efeito dependente da concentração.

Considerando-se que a aplicação de diferentes concentrações de ambos os extratos de *P. alliacea* e do EET de *S. hirsuta* demonstraram resultados não significativos sobre a GER (Figura 3), TMG (Figura 4) e VMG (Figura 5) das sementes de corda-de-viola, conclui-se que a aplicação desses extratos não afetam o processo germinativo dessa espécie.

Diferenças de sensibilidade entre as espécies alvo são comuns em estudos alelopáticos devido à diferença de mecanismos de absorção, translocação e sítio ativo das substâncias aleloquímicas nos órgãos e tecidos das espécies receptoras, podendo variar conforme a concentração dos aleloquímicos, estágio de desenvolvimento da planta e condições ambientais (WEIR et al., 2004). Alterações nos processos germinativos são indicativos de alterações nas rotas metabólicas, modificando processos de desenvolvimento do embrião (FERREIRA & ÁQUILA, 2000), ocasionando alterações na permeabilidade de membranas, na transcrição e tradução do DNA, no funcionamento de mensageiros secundários, na respiração celular, no sequestro de oxigênio, na conformação de enzimas e receptores, ou ainda pela combinação destes fatores (FERREIRA & BORGUETTI, 2004). Para que os efeitos dos aleloquímicos sejam eficazes nas espécies alvo, os compostos necessitam ser absorvidos e translocados em concentrações suficientes para agir sobre algum mecanismo bioquímico relevante. Dessa forma, a germinação de *Ipomoea grandifolia* pode ter sido mais dificilmente afetada, do que em alface, devido suas características selvagens, sendo reconhecida por sua tolerância à determinados herbicidas, como o glifosato (MONQUERO et al., 2004; RAMIRES et al., 2010). Segundo Matsumoto et al. (2010), extratos a partir dos solventes hexano e de acetato de etila de folhas de *Annona glabra* L. também não afetaram a GER e o TMG de *I. grandifolia* (corda-de-viola), afetando apenas o crescimento total das plântulas. Esse mesmo efeito foi observado por Lima et al. (2009) através da aplicação de extratos aquoso de *Cymbopogon citratus* (capim-limão) e *Sambucus australis* (sabugueiro) sobre sementes de *I. grandifolia*.

Quanto ao RAD de alface (Figura 6), observou-se que o EET de *B. pilosa* ocasionou o maior efeito alelopático, com RAD de 14,55 mm, com a aplicação de sua concentração 100%, inibindo 57,5% do comprimento radicular, em relação à sua testemunha (34,25 mm) (Figura 6A). O EET e o EDC de *S. hirsuta* também apresentaram inibições radiculares acima de 50%, em relação às suas respectivas testemunhas (Figura 6D), com RAD de 14,03 mm e 13,78 mm com a aplicação de

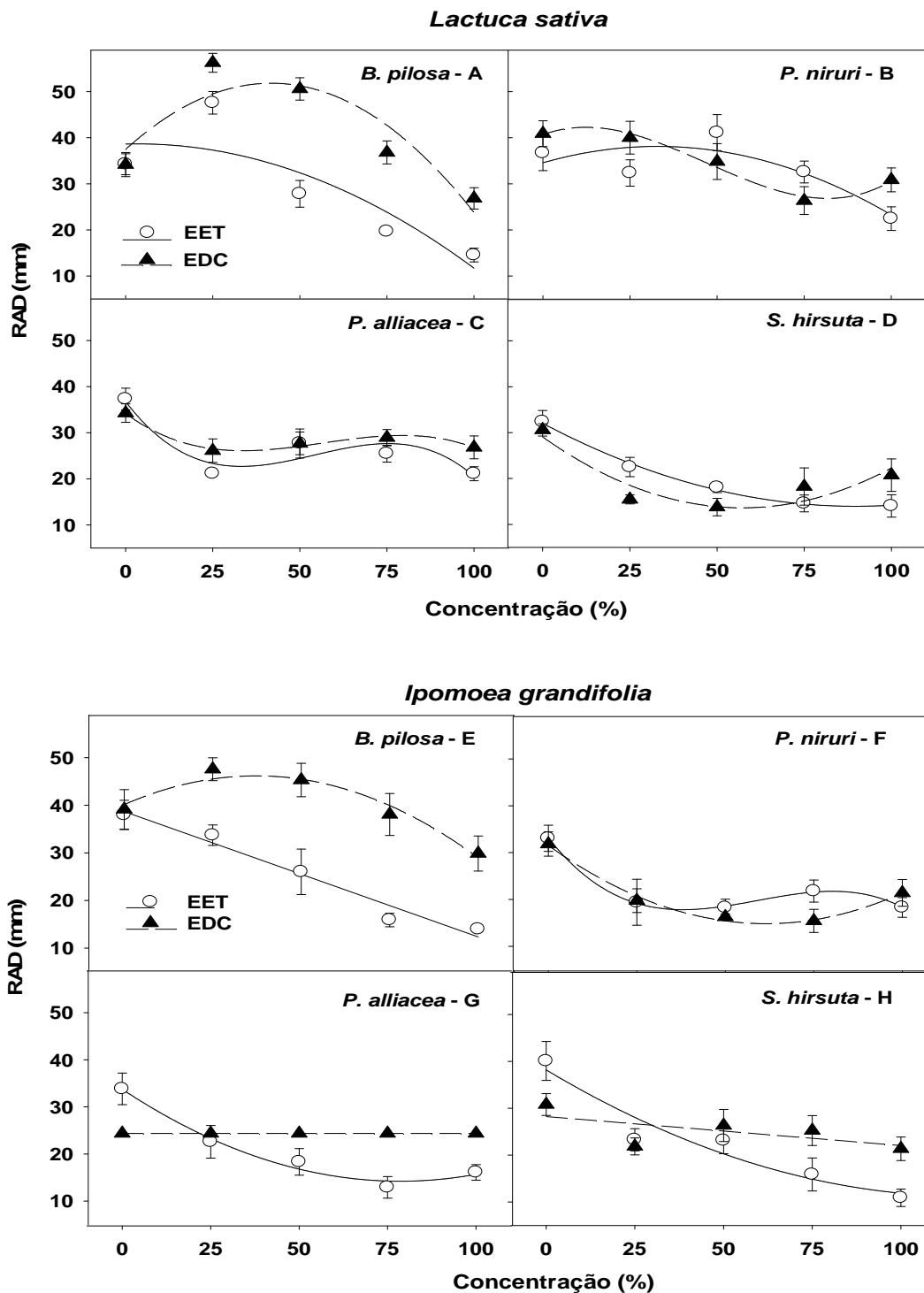
suas respectivas concentrações de 100% e 50%. Os efeitos ocasionados sobre o RAD de alface com a aplicação do ETT de *S. hirsuta* e do EET de *B. pilosa* podem ser observados nas Figuras 7 e 8. Os demais extratos testados, e suas respectivas concentrações, não foram suficientes para ocasionar um crescimento radicular inferior à 20,0 mm, no entanto, todos apresentaram efeitos positivos sobre a redução do RAD de alface (Figura 6).

Em corda-de-viola, o extrato que apresentou melhor efeito inibitório sobre o RAD foi o EET de *S. hirsuta* (Figura 6H). Suas concentrações 75% e 100% inibiram cerca de 60,4% e 72,7% do RAD, com comprimentos de 15,88 e 10,91 mm, respectivamente, em comparação à sua testemunha (40,10 mm) (Figura 6H). Esse efeito pode ser observado na Figura 9. O EET de *P. alliacea* (Figura 6G) e o EET de *B. pilosa* (Figura 6E) também apresentaram bons resultados quanto à inibição da radícula, com RAD de 12,93 mm, para a aplicação da concentração 75% do primeiro extrato, e 13,98 mm, para a concentração 100% do segundo, podendo esse efeito ser observado na Figura 10. Contudo, todos os demais extratos, e suas respectivas concentrações, não apresentaram redução do RAD de corda-de-viola inferiores à 15,0 mm, em comparação às suas respectivas testemunhas (Figura 6), de forma que o EDC de *P. alliacea* não afetou o RAD dessa espécie (Figura 6G). As estimativas das análises de regressão referentes à variável RAD, de alface e corda-de-viola, estão dispostas no Apêndice 8.

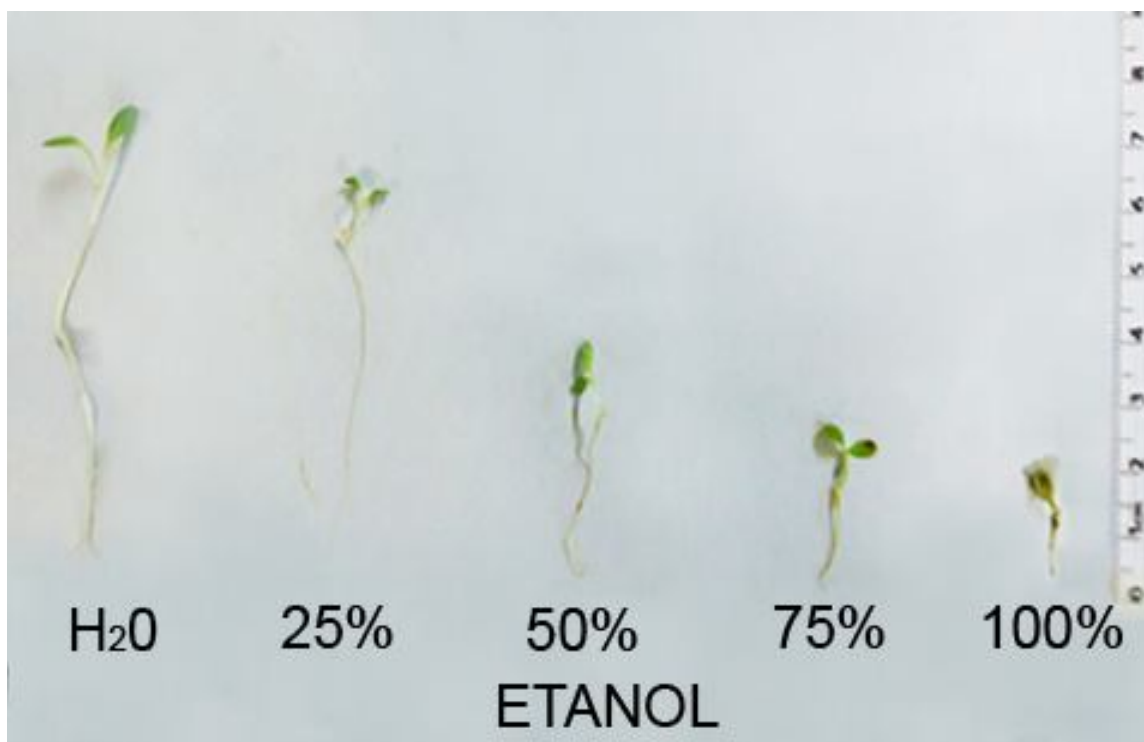
Dados referentes ao potencial alelopático de *S. hirsuta* não foram encontrados na literatura, no entanto, Rodrigues et al. (2009), isolaram substâncias químicas das folhas de *Senna alata*, espécie pertencente à família Fabaceae (Leguminosae), mesma família que *S. hirsuta*, demonstrando a presença de compostos alelopáticos pertencentes a classe dos flavonoides glicosilados, com núcleo aromático caempferol. A fração mais pura do extrato hidrometanólico evidenciou potencial alelopático sobre a GER e o RAD de *Senna obtusifolia* e *Mimosa pudica*, no entanto, os resultados referentes à inibição do HIP foram não significativos entre os fatores espécie alvo *vs.* concentração. Os efeitos dos extratos sobre a cinética da germinação das sementes não foram avaliados no referido experimento.

Mesmo que a aplicação de extratos vegetais não seja capaz de ocasionar a inibição completa do RAD das plântulas alvo, qualquer redução é válida, uma vez que, em se tratando de plantas daninhas, esses efeitos podem auxiliar na

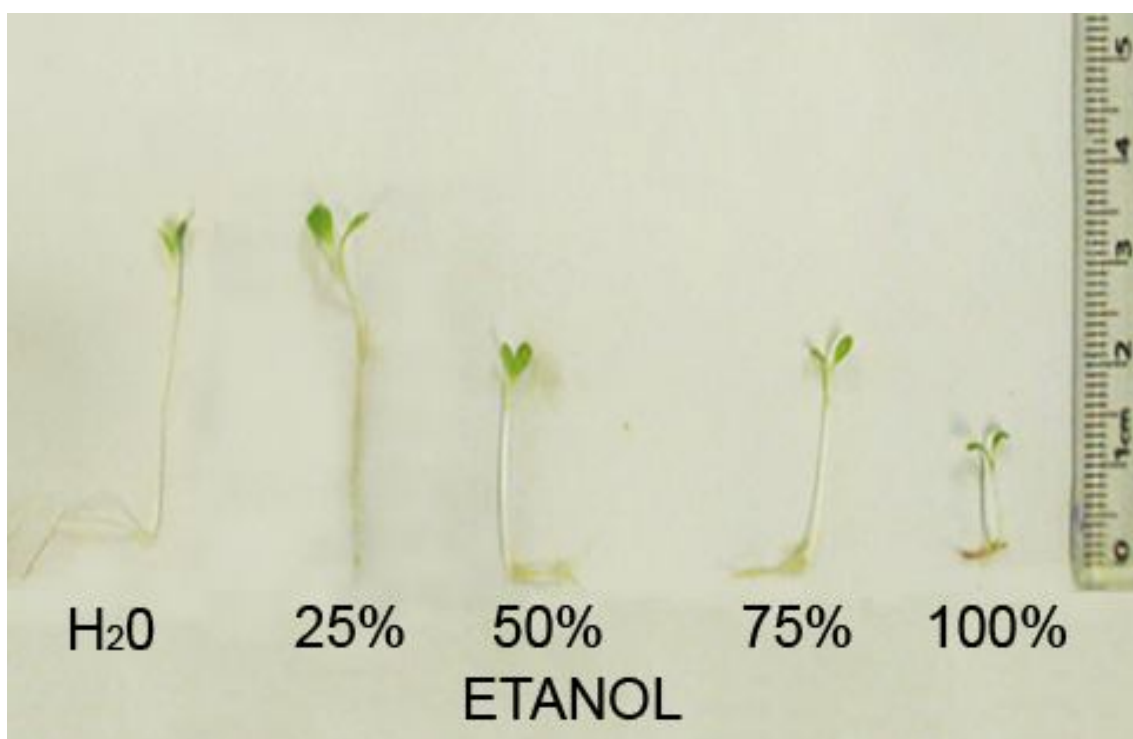
redução da capacidade competitiva das mesmas, favorecendo o desenvolvimento das espécies desejáveis (SOUZA-FILHO et al., 1997).



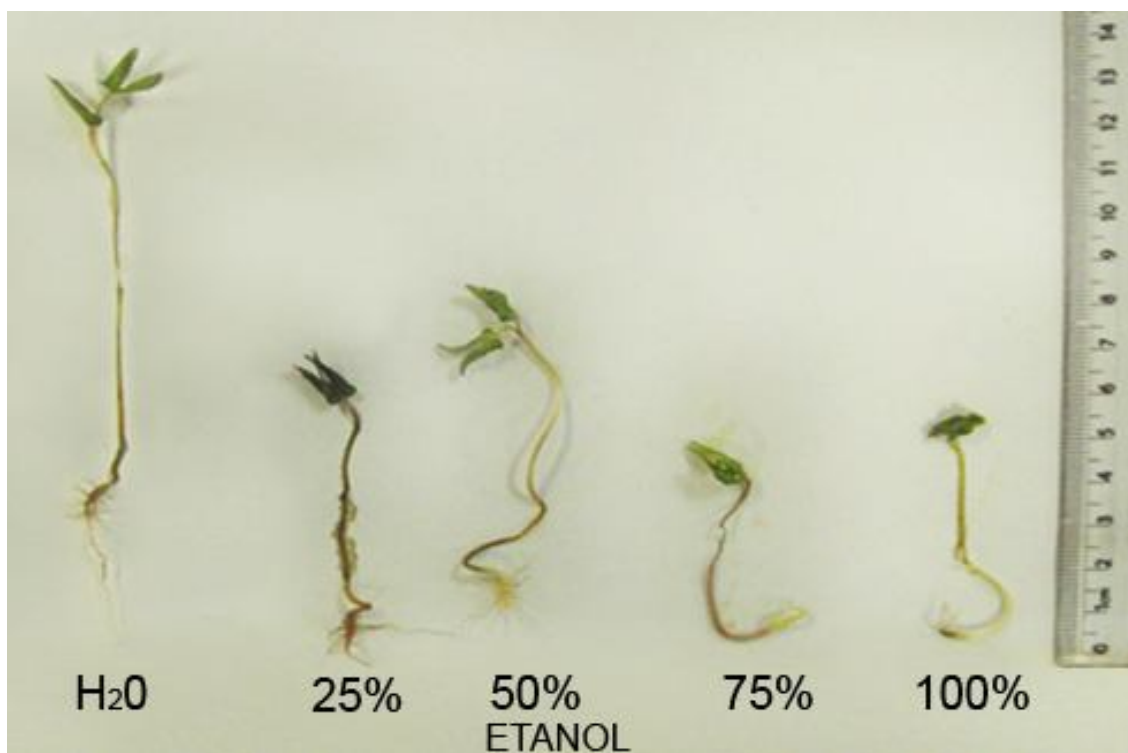
**Figura 6.** Comprimento de radícula (RAD) de sementes de *Lactuca sativa* L. (alface) e *Ipomoea grandifolia* (corda-de-viola), submetidas à diferentes extratores, etanol (ETT) e diclorometano (EDC), e concentrações (0, 25%, 50%, 75% e 100%) de extratos de quatro plantas antimaláricas. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013.



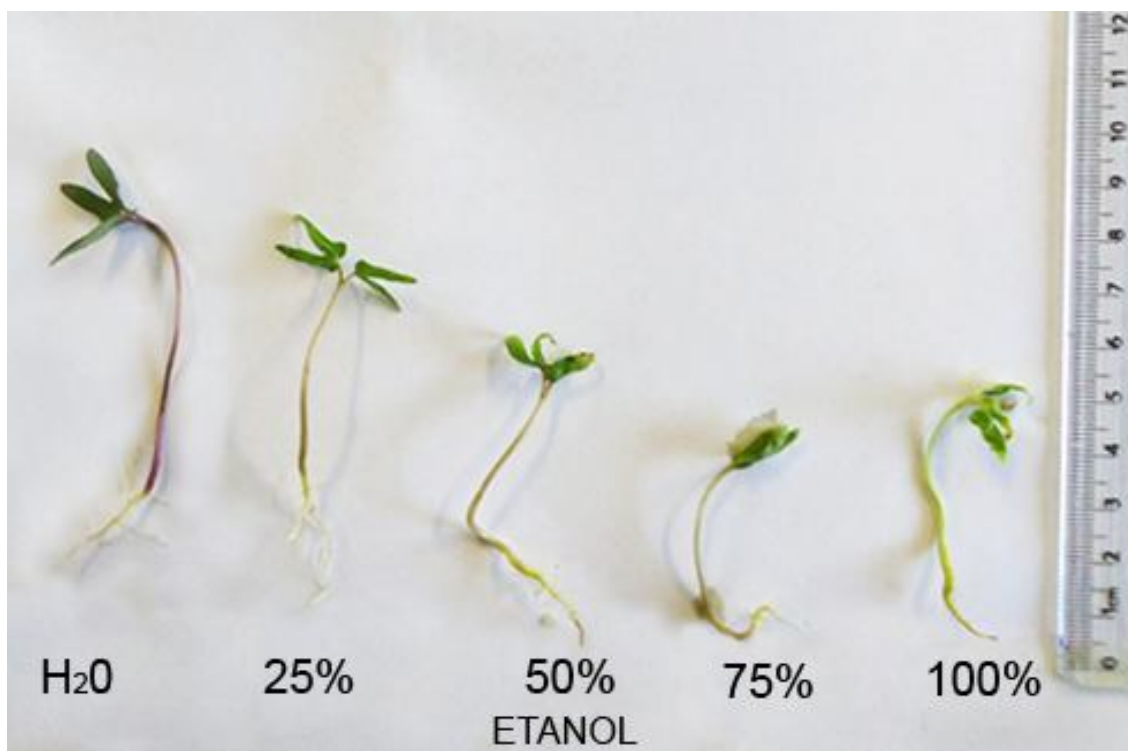
**Figura 7.** Efeito de diferentes concentrações do extrato etanólico (EET) de *B. pilosa* sobre plântulas de *Lactuca sativa* (alface). Ana Paula Ferrari. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013.



**Figura 8.** Efeito de diferentes concentrações do extrato etanólico (EET) de *S. hirsuta* sobre plântulas de *Lactuca sativa* (alface). Ana Paula Ferrari. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013.



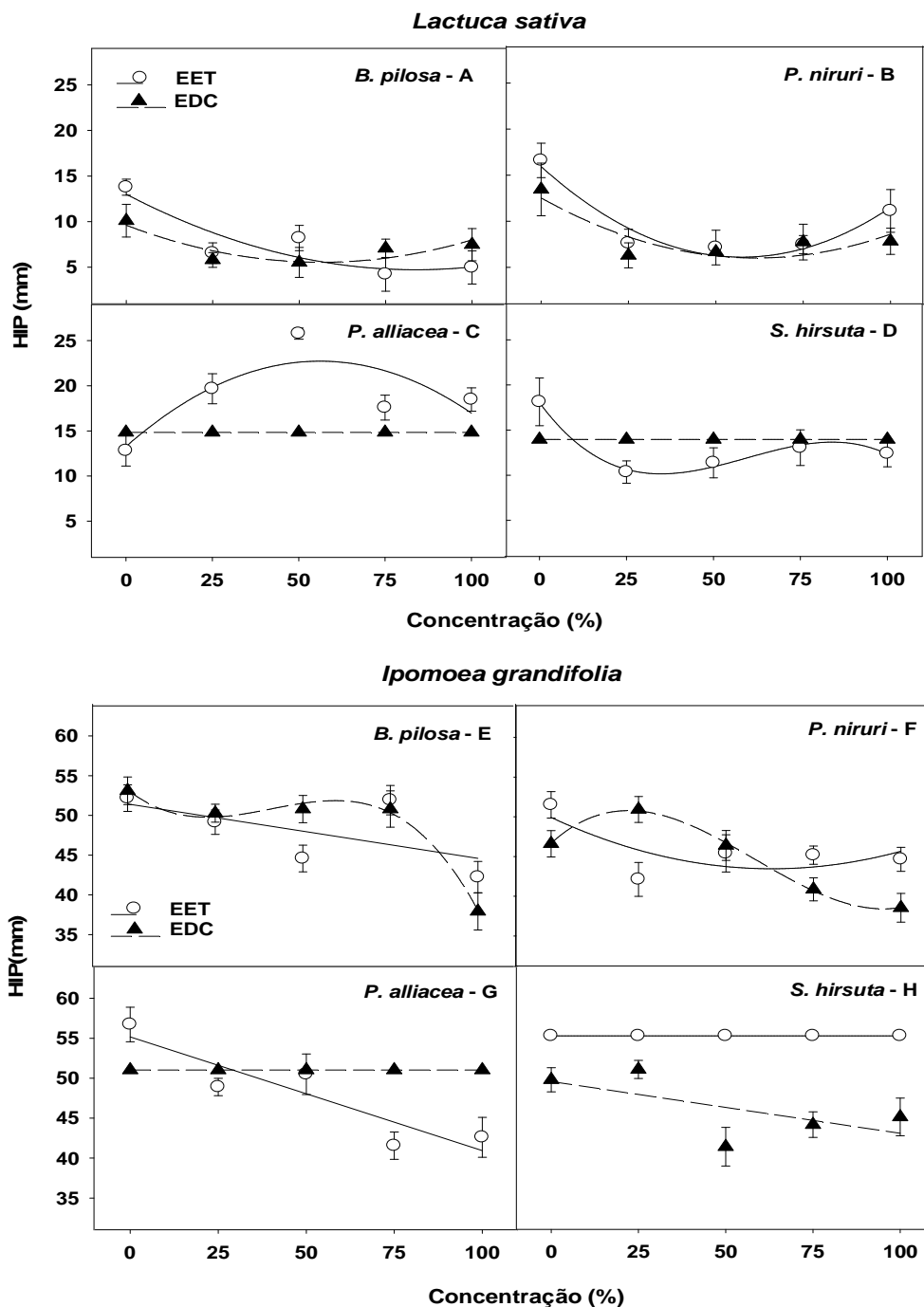
**Figura 9.** Efeito de diferentes concentrações do extrato etanólico (EET) de *S. hirsuta* sobre plântulas de *Ipomoea grandifolia* (corda-de-viola). Ana Paula Ferrari. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013.



**Figura 10.** Efeito de diferentes concentrações do extrato etanólico (EET) de *B. pilosa* sobre plântulas de *Ipomoea grandifolia* (corda-de-viola). Ana Paula Ferrari. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013.

Os efeitos de supressão sobre o HIP das plântulas de alface foram observados já a partir das concentrações 25% dos extratos, com exceção do EDC de *P. alliacea* (Figura 11C) e de EDC de *S. hirsuta* (Figura 11D), que não afetaram essa variável, e do EET de *P. alliacea* (Figura 11C), que, ao invés de efeito inibitório, ocasionou um efeito estimulatório em todas as concentrações testadas. A maior inibição do HIP de alface ocorreu com a aplicação do EET de *B. pilosa* (Figura 11A), obtendo-se 4,23 e 4,98 mm, nas concentrações 75% e 100%, inibindo cerca de 69,3% e 63,9% do HIP, respectivamente, em relação à testemunha (13,78 mm). O EET e o EDC de *P. niruri* também apresentaram bons resultados, com supressão do HIP de alface de 56,9 e 50,4%, respectivamente, ambos na concentração 50%. Os demais extratos não inibiram mais que 50% do HIP de alface (Figura 11). Dessa forma, o EET de *B. pilosa* demonstrou-se como o mais eficaz sobre a redução do crescimento total das plântulas de alface, uma vez que também obteve ótimos resultados sobre a inibição do RAD (Figura 6A). Esses resultados corroboram com Lima et al. (2011), onde o extrato etanólico da parte aérea de *B. pilosa*, preparado em suspensão do material vegetal em etanol por sete dias, apresentou inibição de 47,3% do crescimento radicular e 60,6% do crescimento do hipocótilo de alface, demonstrando a capacidade de uso dessa espécie em estudos que visam a busca por biomoléculas com ação herbicida. Extratos aquosos de folhas de *B. pilosa* também afetaram a germinação e o crescimento de plântulas de *Brassica oleracea* (repolho), *Brassica rapa* (nabo), *Lactuca sativa* (alface) e *Raphanus sativus* (rabanete) (RABELO et al., 2008) e (*Lycopersicon esculentum* Miller) tomate (GUSMAN et al., 2011).

Não só fatores como o tipo de solvente, mas também o tempo, a temperatura e a agitação da extração interferem sobre os compostos aleloquímicos extraídos dos vegetais, de forma que o conhecimento dos métodos mais adequados de extração, para cada espécie em estudo, auxilia na redução da matéria-prima necessária para a confecção do extrato, o que pode ser considerado um passo importante para o futuro desenvolvimento de herbicidas orgânicos em escala comercial (RIBEIRO & LIMA, 2011). Dessa forma, é importante ressaltar que, apesar da atividade alelopática do EET de *B. pilosa* sobre alface já ter sido estudada há diferenças entre as metodologias de extração dos compostos aleloquímicos dos dois estudos, o que no entanto, não caracterizou grande divergência entre os potenciais alelopáticos obtidos pelos diferentes métodos.

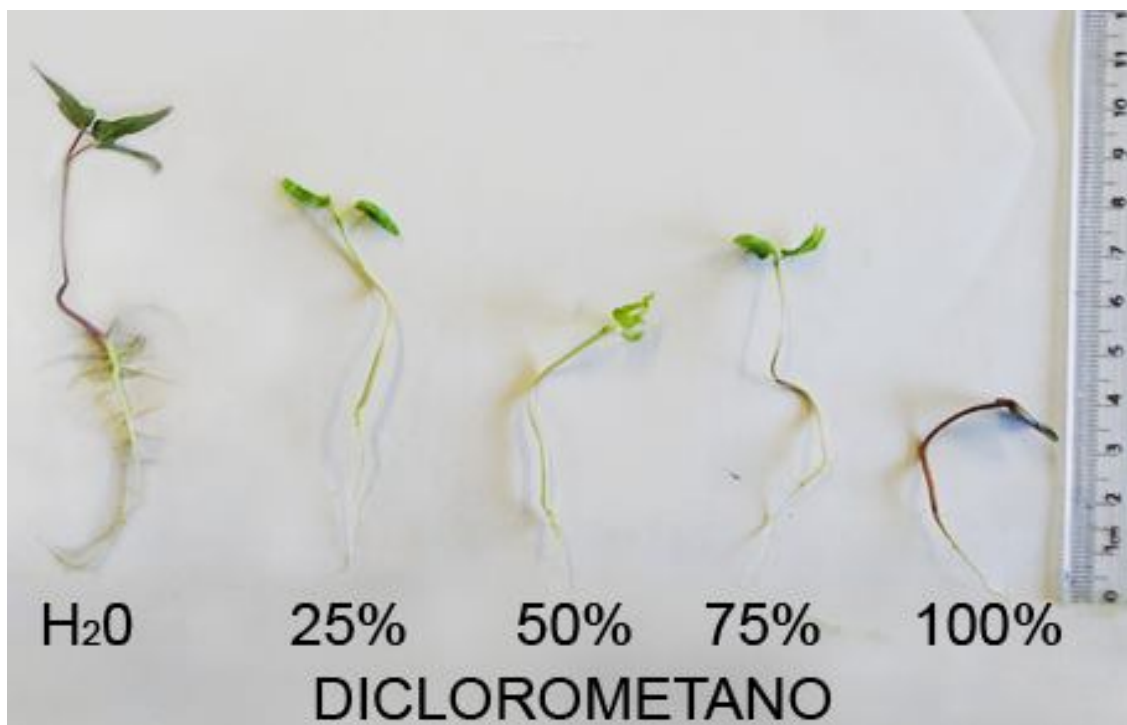


**Figura 11.** Comprimento de hipocótilo (HIP) de sementes de *Lactuca sativa* L. (alface) e *Ipomoea grandifolia* (corda-de-viola), submetidas à diferentes extratores, etanol (ETT) e diclorometano (EDC), e concentrações (0, 25%, 50%, 75% e 100%) de extratos de quatro plantas antimaláricas. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013.

Já os efeitos de inibição sobre os hipocótilos das plântulas de corda-de-viola, observamos que a concentração 100% do EDC de *B. pilosa* (Figura 11E),



apresentou 28,6% de inibição, com HIP em torno de 37,93 mm, em relação à sua testemunha (53,1 mm), sendo esse efeito observado na Figura 12.



**Figura 12.** Efeito de diferentes concentrações do extrato diclorometânico (EDC) de *B. pilosa* sobre plântulas de *Ipomoea grandifolia* (corda-de-viola). Ana Paula Ferrari. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013.

O segundo melhor tratamento de supressão do crescimento do hipocótilo de corda-de-viola foi do EET de *P. alliacea* (Figura 11G), cujo nas concentrações 75% e 100%, inibiram cerca de 26,7% e 24,9% do HIP, respectivamente, seguidos do EET de *B. pilosa* e do EET de *P. niruri*, com 19,1% de inibição do HIP, na concentração 100% do primeiro extrato e 18,2% de inibição do HIP na concentração 25% do segundo extrato. Os demais tratamentos, e suas respectivas concentrações, não apresentaram respostas inibitórias de HIP de corda-de-viola superior à 15% (Figura 11), com exceção do EDC de *P. niruri*, o qual apresentou HIP de 38,55 mm, equivalente à 17,3% de inibição, em relação à sua respectiva testemunha. O EDC de *P. alliacea* novamente demonstrou-se não significativo, tanto sobre o HIP de corda-de-viola (Figura 11G), quanto sobre seu RAD (Figura 6G), GER (Figura 3G), TMG (Figura 4D) e VMG (Figura 5D), demonstrando que esse extrato não afeta os processos de germinação e de crescimento dessa espécie alvo. As estimativas de regressão referentes à variável HIP de alface e corda-de-viola estão dispostas no Apêndice 9.

Em estudos de potencial alelopático, variações nas intensidades dos efeitos observados são comumente relacionadas às concentrações dos extratos aplicados, assim como, ao tecido e à espécie receptora (LUZ et al., 2010), justificando as distintas respostas dos extratos sobre as diferentes variáveis analisadas.

Respostas cúbicas de potencial alelopático sobre as variáveis GER, RAD e HIP também foram observadas em estudo de Hagemann et al. (2010), caracterizando esses efeitos como uma resposta da espécie alvo frente à concentração de extrato necessária para lhe causar fitotoxicidade. O fenômeno de detoxificação também pode estar relacionado à resistência ou tolerância das sementes aos aleloquímicos presentes nos extratos, sendo esse efeito observado nas fases iniciais do processo germinativo. Amoo et al. (2008) também obteve resultados em que as respostas de estímulo e inibição do crescimento da parte aérea das plântulas de *Lycopersicon esculentum*, *Abelmoschus esculentum* e *Amaranthus spinosus*, foram dependentes das concentrações do extratos aquosos de folhas de *Tetrapleura tetraptera*, de forma que as menores concentrações estimularam o crescimento da parte aérea, enquanto concentrações intermediárias tiveram caráter inibitório, onde por fim, concentrações mais elevadas, novamente estimularam o crescimento, demonstrando que o efeito sobre espécie receptora é depende da concentração do extrato utilizado.

Dentre as anomalias observadas nas plântulas de alface e corda-de-viola, em relação às suas testemunhas tratadas apenas com água destilada, observou-se a presença de danificações nas raízes primárias, as quais desenvolveram-se de forma mais fina e menor, apresentando também, oxidação da coifa, indicando a ação das substâncias tóxicas presentes nos extratos. Em corda-de-viola, nenhum extrato acima da concentração 50% permitiu o desenvolvimento de raízes laterais, diferentemente do que pode ser observado nas testemunhas. Os hipocótilos, de ambas as espécies, apresentaram-se menos afetados com a aplicação dos extratos, apresentando apenas uma redução de tamanho e, em alguns casos, redução de diâmetro, no entanto, sem efeitos de oxidação. Efeitos de redução sobre o desenvolvimento das folhas das plântulas também foram observados em todos os tratamentos sobre alface e corda-de-viola, com exceção do EDC de *S. hirsuta*, do EET de *P. alliacea* e do EET de *P. niruri*, sobre corda-de-viola, onde os efeitos visuais sobre as folhas das plântulas, dos dois primeiros extratos,

foram observados apenas a partir das concentrações 25%, ao passo que o terceiro extrato não afetou visualmente o tamanho das folhas de corda-de-viola em nenhuma das concentrações testadas.

Considerando que a concentração do composto necessária para inibir a germinação da semente normalmente é mais elevada do que a concentração necessária para inibir o desenvolvimento das plântulas (PIRES & OLIVEIRA, 2011), observou-se que, embora efeitos sobre os processos germinativos das sementes de alface e corda-de-viola tenham sido observados, os extratos das plantas antimaláricas produziram efeitos mais acentuados sobre a inibição do desenvolvimento das plântulas das espécies alvo, em especial, sobre o crescimento radicular. Segundo Souza-Filho et al. (1997), a interferência do crescimento da radícula é um dos melhores indicadores de potencial alelopático em extratos vegetais. Esse fato provavelmente se deve ao contato mais íntimo das raízes à solução de aleloquímicos (FERREIRA & ÁQUILA, 2000), o que facilita a absorção e atividade desses compostos devido ao alto metabolismo e estresse ambiental em que a planta se encontra durante sua fase inicial de desenvolvimento, afetando diretamente a divisão celular.

A visualização dos efeitos dos aleloquímicos sobre as plântulas indicam reflexos de alterações ocorridas a nível celular e molecular (FERREIRA & BORGUETI, 2004), no entanto, a grande maioria dos estudos alelopáticos caracterizam apenas os efeitos de extratos sobre os processos de germinação e crescimento das espécies alvo, sem aprofundamentos sobre as alterações celulares relacionadas aos efeitos fisiológicos ocasionados. Pires et al. (2001) estudou a ação do extrato aquoso de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit (leucena) sobre plântulas de milho, evidenciando efeitos sobre a paralisação do crescimento radicular, conseqüente da redução do índice mitótico das células radiculares, assim como do aumento da lignificação dos tecidos, ocasionando espessamento e endurecimento das raízes devido ao aumento da atividade da enzima peroxidase, apresentando o que, supostamente seriam, mecanismos de ação dos aleloquímicos do extrato sobre o crescimento radicular da espécie alvo. Segundo Almeida (1988), os efeitos dos aleloquímicos são mais pronunciados sobre a assimilação de nutrientes, crescimento, fotossíntese, respiração, síntese de proteínas, permeabilidade da membrana e atividade enzimática.

Ao analisarmos os melhores extratos inibidores do RAD e do HIP de

alface e corda-de-viola (Figura 6 e 11), observou-se que, no geral, o extrator etanol apresentou resultados superiores aos observados pelo extrator diclorometano. Segundo Belinelo et al. (2008) extratos etanólicos de folhas de *Arctium minus* apresentaram valores mais satisfatórios, aos observados pelo extrato diclorometânico, sobre a inibição do processo germinativo e do crescimento radicular de *Sorghum bicolor* L. (sorgo) e *Cucumis sativus* L. (pepino). Segundo o autor, o solvente etanol, extrai moléculas com afinidade de polarização, tornando os extratos etanólicos mais polares que os extratos diclorometânicos. Rice (1984), relata que dentre os compostos polares, os compostos fenólicos, e seus derivados, correspondem à classe de produtos vegetais naturais onde se encontram a maior quantidade de aleloquímicos, que vão de fenóis simples à taninos complexos (BELINELO et al., 2008). Os ótimos resultados inibitórios ocasionados pela aplicação do EET de *B. pilosa* sobre as variáveis GER, TMG, VMG, RAD e HIP de corda-de-viola, e RAD e HIP de alface, em comparação ao seu extrato análogo EDC, e aos demais extratos analisados, corroboram com essa afirmação.

A espécie *Bidens pilosa* L. é pertencente à família Asteraceae (Compositae) (KISSMANN & GROTH, 1999), compreendendo mais de 25.000 espécies e cerca de 1.100 gêneros de plantas (VERDI et al., 2005), sendo identificadas mais de 4.000 lactonas sesquiterpênicas em seus indivíduos constituintes. As lactonas sesquiterpênicas compõe a classe dos terpenos e caracteriza-se por ser um metabólito que vem recebendo cada vez mais atenção em estudos, devido suas propriedades biológicas, como por exemplo, efeitos alelopáticos. Acredita-se que a maioria desses compostos aleloquímicos possui a alquilação de moléculas orgânicas como mecanismo de ação, permitindo a inibição de uma variedade de enzimas e de outras macromoléculas essenciais aos vegetais (SCHIMIDT, 1999).

Algumas lactonas sesquiterpênicas, constituintes de espécies vegetais pertencentes à família Asteraceae e com atividade aleloquímica reconhecida, são a dehidrozaluzanina C (DHZ), obtida de diferentes plantas e cujo mecanismo de ação se baseia na ruptura das membranas das células, possuindo forte atividade inibidora sobre o crescimento de diferentes espécies de dicotiledôneas (MACÍAS et al., 2000), e a artemisinina, extraída das folhas de *Artemisia annua* e cujo mecanismo de ação ainda não foi totalmente elucidado (WESTON & INDERJIT, 2007). Outras espécies vegetais como *Helianthus annuus* (girassol) (VYVYAN, 2002), assim como *Cirsium*

sp. e *Xanthium* sp. (CHON et al. 2010), também pertencentes à família Asteraceae, são amplamente reconhecidas por seus potenciais alelopáticos.

Dentre os compostos sesquiterpênicos já identificados em *B. pilosa*, germacreno-D e  $\beta$ -cariofileno são os maiores constituintes encontrados na espécie (SILVA et al., 2011), sendo o germacreno-D considerado um precursor de muitos sesquiterpenos (BULOW & KONIG, 2000), enquanto o  $\beta$ -cariofileno é descrito como um importante aleloquímico sesquiterpeno volátil, extraído de algumas espécies vegetais, como *Mikania micranta* (WANG et al., 2009) e *Senecio salignu* (SÁNCHEZ-MUNÓZ et al., 2012), ambos da família Asteraceae, demonstrando potencial alelopático sobre a germinação e crescimento de *Brassica campestris* (canola), *Raphanus sativus* (rabanete) (WANG et al., 2009) e *Physalis ixocarpa*, nesse último, caracterizando-se como inibidor de fotossíntese (SÁNCHEZ-MUNÓZ et al., 2012). O óleo essencial dos vegetais é composto por uma mistura de compostos mono e sesquiterpenos, e fenilpropanoides, obtendo muitos resultados significativos em estudos de potencial alelopático (ALVES et al., 2004; DIAS et al., 2009; SOUZA-FILHO, et al., 2009). No entanto, apesar da família Asteraceae ser reconhecida devido as propriedades alelopáticas dos óleos essenciais em muitas de suas espécies vegetais constituintes (AMRI et al., 2013), estudos que caracterizam a atividade alelopática do óleo essencial de *B. pilosa*, não foram encontrados na literatura. Apesar disso, Campbel et al. (1982) sugere que a atividade alelopática de *B. pilosa* pode estar relacionada com a presença da substância fenil-heptatrina (PHT), um composto poliacetileno encontrado nas folhas da espécie que apresenta efeito fitotóxico sobre *Asclepias syriaca* (asclepia-comum), *Trifolium pratense* (trevo-vermelho), *Chenopodium album* (ançarinha-branca) e *Phleum pratense* (rabo-de-gato), espécies pertencentes à famílias botânicas muito distintas de Asteraceae, demonstrando o amplo espectro de ação desse composto. A presença de PHT como constituinte de *B. pilosa* foi confirmada em estudos posteriores (GEISSBERGER & SEQUIN, 1991; ALVAREZ et al., 1996), sendo inclusive, relatado como um composto antimalárico, isolado das folhas da espécie (KUMARI ET AL., 2009).

De acordo com Rice (1984), entre os metabólitos especializados vegetais, os ácidos fenólicos, flavonoides, quinonas, terpenos, esteróis, purinas, ácidos graxos de cadeia longa e poliacetilenos, quinonas, cumarinas, taninos, alcalóides, ácidos orgânicos, lactonas insaturadas, assim como os compostos fenólicos, derivados do ácido benzoico e ácido cinâmico, entre outros, são

comumente relatados como compostos aleloquímicos (XUAN et al., 2003), de forma que estudos fitoquímicos em *B. pilosa* evidenciaram a rica presença principalmente de compostos poliacetilênicos e flavonoides (BRANDÃO et al., 1997), assim como terpenos, alcalóides, esteróis, antraquinonas, saponinas, taninos, glicosídeos, polissacarídeos, fenilpropanóides, ácido nicotínico, ácido tânico, ácido p-cumárico, ácido salicílico, ácido linólico, entre outros (VALDÉS & REGO, 2001; BALANGCOD et al., 2012), sugerindo a ação dessas classes de compostos como responsáveis pelos efeitos alelopáticos observados. Os efeitos fitotóxicos dos ácidos fenólicos dependem da sua concentração, de forma que em alguns casos, podem causar respostas estimulatórias nos bioensaios. Embora os flavonoides sejam um grupo bastante extenso dentro dos compostos fenólicos, apenas um pequeno número é reconhecido como potencial alelopático, sendo seus mecanismos de ação, pouco conhecidos (EINHELLIG, 2004).

### 3.6 CONCLUSÕES

Os efeitos dos extratos etanólicos (EET) e diclorometânicos (EDC) de diferentes concentrações (0, 25%, 50%, 75% e 100%) das quatro plantas antimaláricas (*Bidens pilosa*, *Phyllanthus niruri*, *Petiveria alliacea* e *Senna hirsuta*) apresentaram efeitos de magnitude diferente sobre as variáveis analisadas [Germinabilidade (GER), Tempo médio de germinação (TMG), Velocidade média de germinação (VMG), Comprimento de radícula (RAD) e Comprimento de hipocótilo (HIP)] sobre *Lactuca sativa* (alface) e *Ipomoea grandifolia* (corda-de-viola), de forma que o extrato que se observou maior bioatividade sobre o maior número de variáveis, em ambas as espécies alvo, foi o EET de *B. pilosa*, o qual demonstrou ótimos efeitos de inibição sobre o RAD e o HIP de alface e sobre a GER, o TMG, a VMG, o RAD e o HIP de corda-de-viola. Considerando o grande potencial de espécies da família Asteraceae como fontes de compostos aleloquímicos, entre eles, lactonas sesquiterpênicas e poliacetilenos, estes últimos sendo grandes constituintes de *Bidens pilosa*, uma vez comprovado o potencial alelopático do EET de *B. pilosa*, estudos futuros que visam o fracionamento do extrato bruto, assim como purificação, isolamento e identificação das substâncias bioativas e de suas possíveis rotas de biossíntese e mecanismos de ação, devem ser realizados no

intuito de se elucidar as substâncias bioativas presentes na espécie e responsáveis por determinados efeitos.

O presente estudo também evidenciou a vantagem do extrator etanol sobre o extrator diclorometano na extração de moléculas com atividade alelopática.

## 4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE PLANTAS COM USO POPULAR ANTIMALÁRICO

### 4.1 RESUMO

O objetivo do presente estudo foi caracterizar a atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos etanólicos (EET) e diclorometânicos (EDC) das espécies medicinais antimaláricas *Bidens pilosa* L. (picão-preto), *Phyllanthus niruri* L. (quebra-pedra), *Petiveria alliacea* L. (guiné), *Senna hirsuta* L. (fedegoso) e *Quassia amara* (quássia-amarga). Os ensaios de atividade antioxidante foram realizados a partir de três metodologias distintas, sendo elas: sequestro do radical ABTS<sup>•+</sup>, sequestro do radical DPPH<sup>•</sup>, ambas realizadas com os extratos etanólicos e diclorometânicos, e poder antioxidante de redução do Ferro (FRAP), realizada apenas com os extratos etanólicos, assim como o teor de compostos fenólicos totais (TCF). Os resultados dos extratos etanólicos foram comparados aos valores dos antioxidantes comerciais BHT (butil hidroxitolueno), BHA (butil hidroxianisol) e  $\alpha$ -tocoferol. Em todas as metodologias de atividade antioxidante analisadas, o EET de *Q. amara* demonstrou-se como o tratamento mais eficaz, seguido do EET de *P. niruri*, sendo estes, analisados em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase-Reversa (CLAE-FR), evidenciando a presença de rutina, miricetina, quercetina e ácido gálico para ambas as espécies, sendo estes compostos, reconhecidos por suas propriedades antioxidantes. As análises antimicrobianas foram realizadas através da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos das plantas, com concentrações entre 5,0 e 0,88 mg mL<sup>-1</sup>, em microplacas inoculadas de 96 poços inoculadas com *Bacillus cereus* ATCC 11.778. Os EET de *Q. amara*, *P. niruri* e *S. hirsuta* e o EDC de *B. pilosa* apresentaram concentração inibitória mínima (MIC) =  $\leq 0,088$  mg mL<sup>-1</sup>. Os dados apresentados nesse estudo indicaram uma excelente atividade antioxidante do EET de *Q. amara*, sendo esse, uma importante fonte para a busca de moléculas, ou protótipos, com atividade antioxidante, requerendo maiores estudos quanto a extração e purificação dos compostos bioativos para uma futura aplicação na indústria alimentícia e /ou farmacêutica.

### 4.2 ABSTRACT

The aim of this study was to characterize the antioxidant and antimicrobial activity of ethanol extracts (EET) and dichloromethanic (EDC) of antimalarial medicinal species *Bidens pilosa* L. (beggartick), *Phyllanthus niruri* L. (shatterstone), *Petiveria alliacea* L. (guinea), *Senna hirsuta* L. (sicklepod) and *Quassia amara* (bitter wood). The antioxidant activity assays were performed using three different methods, namely: the scavenging of radical ABTS<sup>•+</sup>, scavenging of radical DPPH<sup>•</sup>, both performed with the ethanol extracts and dichloromethanic and antioxidant power reduction iron (FRAP), held only ethanol extracts, as well as the content of total phenolic compounds (TCF). The results of the ethanol extracts were compared to values commercial antioxidant BHT (butylated hydroxytoluene), BHA (butylated hydroxyanisole) and  $\alpha$ -tocopherol. In all methods of antioxidant activity analyzed, the EET of *Q. amara* shown as the most effective treatment, followed by EET *P. niruri*, which are analyzed in High



Performance Liquid Chromatography Reverse-Phase (HPLC-RP), indicating the presence of rutin, myricetin, quercetin and gallic acid for both species, these compounds being recognized for its antioxidant properties. Analyses were performed using antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) of the plant extracts with concentrations between 5.0 and 0.88 mg mL<sup>-1</sup> in 96-well microplates inoculated with *Bacillus cereus* ATCC 11.778. The EET of *Q. amara*, *P. niruri* and *S. hirsuta* and the EDC of *B. pilosa* showed minimal inhibitory concentration (MIC) = ≤ 0.088 mg mL<sup>-1</sup>. The data presented in this study showed an excellent antioxidant activity of EET of *Q. amara*, being this an important source for the search of molecules, or prototypes, with antioxidant activity, requiring further studies on the extraction and purification of bioactive compounds for future application in the food industry and/or pharmaceutical.

### 4.3 INTRODUÇÃO

Muitos estudos têm evidenciado a utilização de plantas medicinais que, além de suas propriedades biológicas reconhecidas, são excelentes fontes de moléculas com atividade antioxidante e antimicrobiana (SOUSA et al., 2007; SILVA et al., 2012; MILANI et al., 2012). Dentre os metabólitos especializados dos vegetais (anteriormente cunhados como metabólitos secundários) (PICHERSKY & LEWINSOHN, 2011), a classe dos compostos fenólicos (FALCÃO et al., 2002; PARISI et al., 2009), em especial os flavonoides, são reconhecidos pela sua atividade antioxidante (CAO et al., 1997; DORNAS et al., 2007) devido suas propriedades de óxido-redução, incluindo o sequestro e neutralização dos radicais livres, assim como, atividade quelante de oxigênio tripleto e singleto, ou decompositora de peróxidos (HAMINIUK et al., 2012; DEGASPARI & WASZCZYNSKYJ, 2004). Outros compostos como vitaminas (C, E e A), carotenoides e alguns polifenóis, também são importantes antioxidantes (OLIVEIRA et al., 2009).

Os antioxidantes são substâncias que protegem as células contra a ação dos radicais livres, que em sistemas biológicos, são originados através de processos metabólicos naturais do organismo, ou por fatores externos, como tabaco, poluição, radiação e contato com substâncias tóxicas (BIANCHI & ANTUNES, 1999). Nos alimentos, os radicais livres atuam através de reações de oxidação lipídica, afetando características organolépticas como sabor, odor, cor e qualidade (SOARES, 2002). No Brasil, as indústrias alimentícias, no intuito de evitar ou retardar a degradação desses alimentos, faz uso de antioxidantes sintéticos, como o

BHT (butil hidroxitolueno) e o BHA (butil hidroxianisol), e de antioxidantes naturais como os tocoferóis (RAMALHO & JORGE, 2006). No entanto, o uso de compostos como BHT e BHA têm levantado questionamentos quanto sua ação mutagênica e carcinogênica em animais (BOTTERWECK et al., 2000), enquanto que o uso de tocoferóis encontra barreiras devido sua insolubilidade em água (CHIN & FERREIRA, 1998). Dessa forma, pesquisas que visam a substituição dos antioxidantes comerciais, através da aplicação de substâncias naturais vegetais, vêm ganhando espaço em estudos acadêmicos (SOUSA et al., 2007; CARPES et al., 2009; NASCIMENTO et al., 2010) devido o interesse de desenvolvimento de produtos aditivos mais eficazes e menos tóxicos à saúde e ao ambiente (OSTROSKY et al., 2008).

A correlação positiva entre teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante de extratos vegetais torna as análises de compostos fenólicos imprescindíveis nesses estudos (ROCKENBACH et al., 2008; PRADO et al., 2009). No entanto, devido à variedade de compostos bioativos e seus diferentes mecanismos de ação, é impossível de se mensurar totalmente a atividade antioxidante de extratos vegetais, através de apenas uma determinada metodologia. Dessa forma, diferentes técnicas de análise devem ser ensaiadas para abranger o maior número de compostos que possam ser mensurados na análise de atividade antioxidante *in vitro* nas plantas selecionadas (DEL RÉ & JORGE, 2011; FLOEGEL et al., 2011; KATERERE, 2012).

Os métodos mais utilizados para a determinação da ação antioxidante são os espectrofotométricos, como o i) método de sequestro do radical DPPH<sup>·</sup> (radical 2,2-difenil-1-picrihidrazil), ii) sequestro do radical ABTS<sup>·+</sup> 2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico) e o iii) poder antioxidante de redução do Ferro (FRAP). Os métodos DPPH<sup>·</sup> e ABTS<sup>·+</sup> são caracterizados como altamente estáveis e sensíveis, proporcionando a rápida análise de elevado número de amostras (BRAND-WILLIAMS, 1996; SINGLETON, 1999). O radical ABTS<sup>·+</sup> é solúvel tanto em solução aquosa quanto em solvente orgânico. Sendo assim, a partir dele é possível determinar a atividade antioxidante de sistemas hidro e lipofílicos (ARNAO, 2000). O método FRAP (Poder antioxidante de redução do Ferro), também reconhecido por sua praticidade e rapidez, baseia-se na capacidade dos fenóis em reduzir o Fe<sup>+3</sup> em Fe<sup>+2</sup> (STRATIL, et al., 2006). O poder redutor do íon férrico está relacionado com a capacidade de um composto doar elétrons, mecanismo de ação

que está relacionado com a capacidade antioxidante de muitos compostos naturais (RUFINO et al., 2006; FLOEGEL et al., 2011).

Alimentos mal conservados, processados ou crus, e a falta de higiene na sua preparação, são fatores responsáveis pelo aparecimento de algumas enfermidades devido à proliferação de micro-organismos patogênicos, como ***Bacillus cereus***, uma bactéria gram-positiva aeróbia facultativa encontrada em solos, vegetais e alimentos. O consumo de alimentos contaminados com esse micro-organismo pode ocasionar intoxicação alimentar, seguido de diarreia e vômito (GOMES et al., 2004; PAIVA et al., 2009). Por ser um micro-organismo resistente às condições ambientais extremas, como aquecimento, congelamento, secagem e radiação, seus esporos podem contaminar facilmente os alimentos e os sistemas de produção de indústrias alimentícias, em especial laticínios. Além disso, em estudo realizado por Chaves et al. (2011), cepas de ***B. cereus*** demonstraram-se resistentes aos antibióticos tetraciclina, clindamicina e vancomicina.

Os compostos fenólicos, assim como outros metabólitos especializados dos vegetais, são reconhecidos também como agentes promotores de atividade antimicrobiana (FALCÃO et al., 2002; PARISI et al., 2009). Dessa forma, considerando a natureza como uma potencial fonte de agentes terapêuticos, muitas plantas medicinais são utilizadas por comunidades tradicionais para o tratamento de doenças, alavancando as pesquisas que visam a caracterização dos efeitos químicos e biológicos dos metabólitos presentes nesses vegetais, assim como das demais plantas pertencentes à família botânica da mesma. Os produtos naturais podem servir como modelos para a síntese de novos compostos bioativos, assim como, podem ser utilizados como substratos para a obtenção de derivados que obtenham as características químicas desejadas (OSTROSKY et al., 2008).

Contudo, a exploração sustentável de nossa biodiversidade, com base na etnofarmacologia e medicina popular, é um campo vasto e muito promissor. Atualmente, o mercado mundial, tanto produtor quanto consumidor, busca alternativas para novas fontes de alimentos, assim como, compostos que sirvam de matéria-prima para a indústria química, alimentícia e farmacêutica, preocupando-se com os impactos ambientais, garantindo o desenvolvimento sustentável do planeta (FERRO et al., 2006).

Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo analisar a atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos etanólicos e diclorometânicos

de quatro espécies vegetais reportadas na literatura como antimaláricas *Bidens pilosa* L., *Phyllanthus niruri* L., *Petiveria alliacea* L., *Senna hirsuta* L. e *Quassia amara* L.. Foi objetivo também determinar o perfil fenólico por cromatografia líquida de alta eficiência das ervas mais promissoras em termos de atividade antioxidante antibacteriana.

#### 4.4 MATERIAL E MÉTODOS

##### 4.4.1 Seleção e coleta das amostras

As plantas selecionadas a partir de critério etnobotânico de plantas antimaláricas foram: folhas de *Quassia amara* L. (registro IAN 188175) cedida pela Embrapa Oriental de Manaus (registro IAN 188175); partes aéreas de *Bidens pilosa* L., *Senna hirsuta* L. e *Petiveria alliacea* L. coletadas no município de Francisco Beltrão, Paraná, em estado reprodutivo, sendo posteriormente identificados e registrados junto ao Herbário da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - SP, obtendo-se os seguintes registros: ESA 120143; ESA 120144 e ESA 120145, respectivamente; *Phyllanthus niruri* L., sementes cedidas pela Unicamp-SP (registro UEC 112740) e cultivadas em vaso para posterior utilização da sua parte aérea, em estado reprodutivo, para a obtenção dos extratos.

##### 4.4.2 Preparo dos Extratos Brutos

Os materiais vegetais foram secos em estufa à 40°C, até secagem completa, sendo posteriormente triturados em moinho de facas (Pulverisette 14, Fritsch, Germany) e armazenados em freezer à -4 °C até o momento do preparo dos extratos. 25 g das amostras foram extraídos com 200 mL de etanol p.a. e 200 mL de diclorometano p.a. separadamente, em incubadora Shaker (Solab, SL 222) a 35 °C, por 30 min, sob agitação constante de 150 rpm, obtendo-se os extratos etanólico (EET) e diclorometânico (EDC), respectivamente. Após o término da extração, os extratos foram filtrados, em papel filtro qualitativo, identificados e armazenados em freezer à -4 °C, ao abrigo da luz.

#### 4.4.3 Teor de compostos fenólicos

Para a determinação do teor de compostos fenólicos totais (TCF), uma alíquota do extrato (0,5 mL) foi misturada com 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (diluído em água destilada 1:10) e 2,0 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  4% (m/v) em água destilada. Após duas horas de incubação na ausência de luz, à temperatura ambiente, a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 740 nm. Os resultados do teor de compostos fenólicos totais foram expressos como equivalentes de ácido gálico [ $\text{mg. EAG (g.MS)}^{-1}$ ] e calculados por meio de uma curva construída com concentrações que variam de 5 à  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  (SINGLETON et al., 1999).

O TCF foi determinado apenas nos extratos etanólicos, devido à especificidade do método e, principalmente, a insolubilidade dos extratos diclorometânicos aos reagentes utilizados na metodologia citada. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### 4.4.4 Atividade de sequestro do radical DPPH $\cdot$ (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)

A análise de atividade sequestrante do radical DPPH $\cdot$  foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Brand-Williams et al. (1995). O DPPH $\cdot$  é um radical livre estável que aceita um elétron ou um radical hidrogênio para tornar-se uma molécula diamagnética estável e, desta forma, é reduzido na presença de um antioxidante. Para avaliação da atividade antioxidante, os extratos etanólicos e diclorometânicos, das cinco espécies antimaláricas, foram reagidos com o radical estável DPPH $\cdot$  em uma solução de etanol. Na forma de radical, o DPPH $\cdot$  possui uma absorção característica a 517 nm, a qual desaparece após a redução pelo hidrogênio arrancado de um composto antioxidante. A mistura de reação foi constituída pela adição de 0,5 mL dos extratos, 3 mL de etanol absoluto e 0,3 mL da solução do radical DPPH $\cdot$  0,3 mM, em etanol. As substâncias de referência – antioxidantes sintéticos comerciais (BHT, BHA e  $\alpha$ -tocoferol) foram avaliadas na concentração final de  $100 \text{ mg mL}^{-1}$ . Os valores de atividade antioxidante foram calculados via % média da atividade antioxidante das triplicatas, segundo a fórmula usada por Mensor et al. (2001).

$$\%AA = 100 - \{[(Abs amostra - Abs branco) \times 100] / Abs controle\}$$

As concentrações testadas de cada extrato foram adequadas até que se alcançasse 50% de sequestro do radical DPPH $\cdot$  (IC $_{50}$ ). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### 4.4.5 Atividade antioxidante de sequestro do radical ABTS $\cdot^+$ (TEAC)

A atividade antioxidante pelo método ABTS $\cdot^+$  [2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico)] foi feita conforme metodologia descrita por Re et al. (1999) e Rufino et al. (2007). O radical ABTS $\cdot^+$  foi formado pela reação da solução ABTS $\cdot^+$  7 mM com persulfato de potássio 140 mM, incubados à temperatura de 25 °C ao abrigo da luz, durante 12-16 h. Uma vez formado, o radical foi diluído em etanol absoluto até a obtenção do valor de absorbância de 700 a 734 nm. Em ambiente escuro, transferiu-se uma alíquota de 30  $\mu$ L dos extratos etanólicos e diclorometânicos das cinco espécies antimaláricas, e os antioxidantes comerciais (BHT, BHA e  $\alpha$ -tocoferol) em concentrações de 100 ppm para tubos de ensaio com 3 mL da solução do radical ABTS $\cdot^+$ . A leitura foi feita após 6 min da reação a 734 nm, utilizando etanol p.a. como branco. Foi utilizado como referência o Trolox, um antioxidante sintético análogo à vitamina E, nas concentrações de 50-1500  $\mu$ M. Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em [ $\mu$ mol TEAC (g.MS) $^{-1}$ ] (TEAC - atividade antioxidante equivalente ao Trolox). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### 4.4.6 Atividade antioxidante pelo método FRAP

O ensaio do FRAP (Poder Antioxidante de Redução do Ferro) segue metodologia adaptada de Rufino et al. (2006), e baseia-se na capacidade do antioxidante reduzir o Fe $^{+3}$  em Fe $^{+2}$ , na presença de 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ) e em condições ácidas, formando-se um complexo de coloração azul intensa com o Fe $^{+2}$ . Essa análise realizou-se em ambiente escuro, transferindo-se uma alíquota de 100  $\mu$ L de extrato diluído e 3,0 mL de reagente FRAP. Após

homogeneização, manteve-se as amostras em banho-maria à 37 °C por 30 minutos. Após esse período, realizou-se a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro em 595 nm. Os antioxidantes comerciais BHT, BHA e  $\alpha$ -tocoferol, foram avaliados na concentração final de 100 mg mL<sup>-1</sup>. Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em [ $\mu$ mol Fe<sup>+2</sup> g.MS<sup>-1</sup>]. Os extratos diclorometânicos, das cinco espécies em estudo, não foram analisados por esse método devido à especificidade do método e, principalmente, a insolubilidade dos extratos diclorometânicos aos reagentes utilizados na metodologia citada. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Nos três métodos de atividade antioxidante, a atividade dos antioxidantes comerciais (BHT, BHA e  $\alpha$ -tocoferol) foi comparada apenas à atividade antioxidante dos extratos etanólicos das cinco plantas medicinais em estudo.

#### 4.4.7 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE - FR)

Os extratos que obtiveram os melhores resultados de atividade antioxidante foram submetidos à CLAE-FR, utilizada para quantificar a presença de compostos fenólicos individuais. Nessa análise, foi utilizado um sistema Dionex Ultimate 3000 HPLC (Dionex, Idstein, Alemanha) equipado com uma bomba Ultimate 3000, coluna do compartimento de amostra Ultimate 3000, detector de fotodiodo Ultimate 3000 e software Chromeleon para qualificação e quantificação dos compostos fenólicos. Utilizou-se uma coluna de fase reversa Acclaim<sup>®</sup> 120, C18 5 mm 120 A (4,6 mm x 250 mm) para a separação dos compostos fenólicos. A coluna foi mantida a 40°C durante toda a análise e a detecção foi realizada em três comprimentos de onda (280, 300 e 320 nm). O volume de injeção das amostras foi de 5  $\mu$ l. A fase móvel (A) foi composta de água acidificada com ácido fosfórico 1% e metanol fase (B). A eluição dos compostos fenólicos foi realizada através de gradiente entre as duas fases móveis, onde no tempo de 45 minutos a coluna foi mantida com 100% de fase móvel B por 5 minutos. Após este período, a fase (B) reduziu-se gradualmente até as condições iniciais de injeção para o condicionamento da coluna (95% A e 5% B). Utilizou-se uma vazão de 1,0 mL/min. Os padrões de ácido gálico, catequina, ácido p- cumárico, rutina, miricetina,

quercetina, trans-cinâmico e ácido siríngico foram utilizados para a obtenção da curva padrão de compostos fenólicos (HAMINIUK et al., 2011).

#### 4.4.8 Atividade antimicrobiana dos extratos

Utilizou-se a cepa liofilizada de *Bacillus cereus* ATCC 11778 - American Type Culture Collection (ATCC), cedida pela Laborclin, Brasil, foi armazenada sob temperatura de congelamento (-10 °C) e reativada com 5 mL de caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) e incubada à 37 °C por 12 h, e posteriormente, transferida por esgotamento em ágar BHI e incubadas por 24 h à 37 °C. Após o crescimento bacteriano, as colônias individuais foram suspensas em uma solução de NaCl 0,89% estéril e homogeneizadas a uma absorbância de 0,135, equivalente a  $1-2 \times 10^8$  UFC na escala de Mc Farland, em espectrofotômetro Fentom 2000, à 660 nm. Alíquotas de 50 µL das ressuspensões bacterianas foram inoculadas em 50 mL do caldo BHI, de modo a obter uma concentração bacteriana de  $1-2 \times 10^5$  UFC/mL, sendo as misturas homogeneizadas e utilizadas para as análises. Em microplaca de 96 poços, 190 µL do caldo com a bactéria inoculada foi transferida para cada poço, juntamente com 10 µL dos extratos em concentrações entre 5,0 e 0,88 mg mL<sup>-1</sup>. O solvente utilizado na extração foi usado como controle negativo, o antibiótico cloranfenicol 0,12% (m/v) como controle positivo, e como controle de crescimento bacteriano utilizou-se somente o caldo inoculado. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), foram adicionados 30 µL do corante Resazurina 0,01% (m/v). A resazurina tem cor azul não fluorescente. Quando em presença de células viáveis, o meio de cultura é acidificado e a resazurina é reduzida a resofurin, de cor rosa fluorescente. Dessa forma, os poços que obtiveram cor azulada indicaram inibição do crescimento bacteriano (CABRAL et al., 2009). Todos as análises foram realizadas em triplicata.

#### 4.4.9 Análise estatística

Os resultados referentes à atividade antioxidante dos EET, nas metodologias de sequestro do radical ABTS<sup>+</sup>, sequestro do radical DPPH', FRAP e



compostos fenólicos, foram comparados aos resultados dos antioxidantes comerciais BHT, BHA e  $\alpha$ -tocoferol, através de análise de variância e teste de comparação de médias pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Os resultados referentes aos EET e EDC, referentes às metodologias de sequestro do radical ABTS<sup>•+</sup> e sequestro do radical DPPH<sup>•</sup>, foram do tipo bifatorial (espécie **vs.** extrator), e também submetidos à análise de variância e teste de comparação de médias pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Todas as análises foram realizadas com três repetições para todos os tratamentos e realizadas através do programa Assistat.

## 4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.5.1 Compostos fenólicos e atividade antioxidante

Os resultados das análises de determinação do teor dos compostos fenólicos totais (TCF) dos extratos etanólicos das cinco plantas antimaláricas, pelo método Folin-Ciocalteu, estão apresentados na Tabela 1. Observa-se que o EET de **Q. amara** ( $113,59 \pm 8,102$  mg.EAG g.MS<sup>-1</sup>) apresentou TCF estatisticamente superior à todos os demais extratos analisados, enquanto que o EET de **P. alliacea** apresentou o menor TCF ( $5,75 \pm 0,357$  mg.EAG g.MS<sup>-1</sup>), no entanto, esse último, sem variar estatisticamente dos demais extratos (Tabela 1).

Em relação aos dados de atividade antioxidante pelo método sequestro do radical DPPH<sup>•</sup> (Tabela 1), observa-se que, dos extratos etanólicos das cinco espécies antimaláricas, o EET de **Q. amara** apresentou os melhores resultados de atividade antioxidante ( $0,088$  mg mL<sup>-1</sup>), seguido do EET de **P. niruri** ( $2,52$  mg mL<sup>-1</sup>) e do EET de **B. pilosa** ( $2,92$  mg mL<sup>-1</sup>). O EET de **Q. amara** apresentou atividade antioxidante similar aos antioxidantes comerciais BHT, BHA e  $\alpha$ -tocoferol ( $0,072$  mg mL<sup>-1</sup>;  $0,114$  mg mL<sup>-1</sup>;  $0,061$  mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente), enquanto o EET de **P. alliacea** apresentou a menor atividade antioxidante dentre os extratos analisados ( $21,88$  mg mL<sup>-1</sup>). Alguns autores correlacionam positivamente o TCF com a atividade antioxidante de extratos vegetais (ROCKENBACH et al., 2008; PRADO et al., 2009), de forma que a elevada atividade antioxidante do EET de **Q. amara** pode estar relacionadas ao alto teor de compostos fenólicos totais extraído dessa espécie.

Uma elevada atividade antioxidante do EET de *Q. amara* também foi observada pelo método de sequestro do radical ABTS<sup>+</sup> ( $618,91 \pm 12,5 \mu\text{mol.g}^{-1}$  TEAC) e FRAP ( $11774,15 \pm 441,7 \mu\text{mol Fe}^{+2} \text{g.MS}^{-1}$ ), (Tabela 1). Pelo sequestro do radical ABTS<sup>+</sup>, o EET de *Q. amara* demonstrou superioridade aos extratos etanólicos das demais espécies antimaláricas analisadas neste estudo, porém foi inferior aos antioxidantes comerciais BHT, BHA e  $\alpha$ -tocoferol ( $4265,33 \pm 0,01$ ;  $4816,66 \pm 0,014$  e  $5270,33 \pm 0,016 \mu\text{mol.g}^{-1}$  TEAC, respectivamente), seguido pelo EET de *P. niruri* ( $219,38 \pm 8,00 \mu\text{mol.g}^{-1}$  TEAC), de forma que o EET de *S. hirsuta* e o EET de *P. alliacea* apresentaram a menor atividade pelo sequestro do radical ABTS<sup>+</sup> ( $39,23 \pm 10,2$  e  $42,90 \pm 8,0 \mu\text{mol.g}^{-1}$  TEAC, respectivamente) (Tabela 1). Já pelo método redução de Ferro (FRAP), o EET de *Q. amara* apresentou atividade antioxidante superior aos demais extratos etanólicos ( $11774,15 \mu\text{mol Fe}^{+2} \text{g.MS}^{-1}$ ) e também aos antioxidantes comerciais BHT, BHA e  $\alpha$ -tocoferol. O EET de *B. pilosa* ( $1446,60 \pm 108,4 \mu\text{mol Fe}^{+2} \text{g.MS}^{-1}$ ) e o EET de *P. niruri* ( $970,96 \pm 26,0 \mu\text{mol Fe}^{+2} \text{g.MS}^{-1}$ ) não apresentaram diferença em comparação ao  $\alpha$ -tocoferol ( $1328,80 \pm 22,1 \text{Fe}^{+2} \text{g.MS}^{-1}$ ) (Figura 1), enquanto o EET de *P. alliacea* ( $327,92 \pm 4,6 \text{Fe}^{+2} \text{g.MS}^{-1}$ ) novamente apresentou-se com menor atividade antioxidante, no entanto sem diferir do EET de *S. hirsuta* e do EET de *P. niruri* (Tabela 1).

**Tabela 1.** Atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical ABTS<sup>+</sup>, DPPH<sup>\*</sup> e FRAP entre os extratos etanólicos (EET) das espécies antimaláricas e antioxidantes comerciais (BHT, BHA e  $\alpha$ -tocoferol), e teor de compostos fenólicos totais (TCF) dos extratos etanólicos das espécies em estudo. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013.

EET	TCF (mg.EAG* g.MS <sup>-1</sup> )	IC <sub>50</sub> ** (mg.mL <sup>-1</sup> )	ABTS <sup>+</sup> ( $\mu\text{mol.TEAC}^{***}$ g.MS <sup>-1</sup> )	FRAP ( $\mu\text{mol Fe}^{+2}$ g.MS <sup>-1</sup> )
<i>S. hirsuta</i>	$6,56 \pm 0,12$ B	$6,81 \pm 0,80$ D	$39,23 \pm 10,2$ G	$512,83 \pm 31,4$ D
<i>B. pilosa</i>	$13,85 \pm 0,50$ B	$2,92 \pm 0,04$ C	$83,34 \pm 12,0$ F	$1446,60 \pm 108,4$ C
<i>Q. amara</i>	$113,59 \pm 8,10$ A	$0,088 \pm 0,02$ A	$618,91 \pm 12,5$ D	$11774,15 \pm 441,7$ A
<i>P. alliacea</i>	$5,75 \pm 0,36$ B	$21,88 \pm 1,06$ E	$42,90 \pm 8,0$ G	$327,92 \pm 4,6$ D
<i>P. niruri</i>	$8,87 \pm 1,38$ B	$2,52 \pm 0,56$ B	$219,38 \pm 8,0$ E	$970,96 \pm 26,0$ CD
BHT	-	$0,072 \pm 0,02$ A	$4265,33 \pm 0,013$ C	$2310,10 \pm 70,6$ B
BHA	-	$0,114 \pm 0,01$ A	$4816,66 \pm 0,014$ B	$2717,78 \pm 118,8$ B
$\alpha$ -tocoferol	-	$0,061 \pm 0,01$ A	$5270,33 \pm 0,016$ A	$1328,80 \pm 22,1$ C
CV (%)	12,4	11,87	0,53	9,72

Médias seguidas pelas mesmas letras em uma mesma coluna não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey ( $p \leq 0,05$ )

\*EAG: equivalente em ácido gálico

\*\*IC<sub>50</sub>: concentração inibitória capaz de sequestrar 50% do radical DPPH<sup>\*</sup>

\*\*\*TEAC: Capacidade equivalente em Trolox

Considerando os problemas relacionados à toxicidade dos antioxidantes sintéticos BHT e BHA (BOTTERWECK et al., 2000) e insolubilidade de tocoferóis em sistemas hidrofílicos (CHIN & FERREIRA, 1998), os excelentes resultados de atividade antioxidante do EET de **Q. amara**, em comparação aos antioxidantes comerciais BHT, BHA e  $\alpha$ -tocoferol, demonstram o potencial uso dessa planta na substituição desses produtos. Estudos referentes à atividade antioxidante de **Q. amara** ainda são inéditos na literatura, o que contribui para a realização de estudos futuros que investiguem as substâncias responsáveis por tal atividade.

Fatores como a polaridade dos solventes, assim como tempo, temperatura e agitação, utilizados na confecção dos extratos, podem influenciar na extração das substâncias bioativas dos vegetais (ANDREO E JORGE, 2006), de forma que extratos confeccionados a partir de diferentes solventes ou modos de preparo, mesmo sendo da mesma espécie vegetal, podem apresentar atividade antioxidante diferentes.

Os resultados a análise estatística demonstram a presença de interação significativa entre os fatores extrator **vs.** espécie, pelo método de sequestro do radical  $ABTS^{\cdot+}$ , indicando que as substâncias antioxidantes, sequestrantes do radical  $ABTS^{\cdot+}$ , extraídas em cada espécie antimalárica, são dependentes do tipo de extrator utilizado na extração (Tabela 2).

Analisando-se a atividade antioxidante pelo ABTS dos extratos diclorometânicos, observa-se que a espécie **P. niruri** apresentou a maior atividade antioxidante entre as espécies estudadas (Tabela 2), no entanto, ao compararmos a atividade antioxidante do EDC de *P. niruri* com o EET dessa mesma espécie ( $155.04 \pm 12.0$  e  $219.38 \pm 8.0 \mu\text{mol.TEAC g.MS}^{-1}$ , respectivamente), nota-se que o solvente etanol foi mais efetivo no sequestro do radical  $ABTS^{\cdot+}$  (Tabela 2). Corroborando com essa afirmação, observa-se que o EET de **Q. amara** sequestrou cerca de 15 vezes mais radical  $ABTS^{\cdot+}$  que seu extrato análogo diclorometânico (Tabela 2). Os extratos de **S. hirsuta** e de **P. alliacea** não demonstraram diferença significativa entre os extratores, no entanto, os resultados de atividade antioxidante de sequestro do radical  $ABTS^{\cdot+}$ , de ambos os extratos dessas duas espécies, foram baixos, em comparação ao demais (Tabela 2).

**Tabela 2.** Atividade antioxidante de extratos etanólicos (EET) e diclorometânicos (EDC) de cinco espécies antimaláricas pelo método de sequestro do radical  $ABTS^{\cdot+}$ . UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013.

Espécie antimalárica	ABTS <sup>·+</sup> ( $\mu\text{mol.TEAC}^* \text{g.MS}^{-1}$ )	
	EET	EDC
<i>S. hirsuta</i>	39,23 ± 10,2 dA	51,48 ± 13,9 bA
<i>B. pilosa</i>	83,34 ± 12,0 cA	32,48 ± 14,2 bB
<i>Q. amara</i>	618,91 ± 12,5 aA	38,61 ± 21,5 bB
<i>P. alliacea</i>	42,90 ± 8,0 dA	33,71 ± 8,4 bA
<i>P. niruri</i>	219,38 ± 8,0 bA	155,04 ± 12,0 aB
CV (%)	9,66	

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na linha e minúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey ( $p \leq 0,05$ )

\*TEAC: Capacidade equivalente em Trolox

A superioridade do extrator etanol sobre o extrator diclorometano, na extração de moléculas com atividade antioxidante, também pode ser observada pelo método de sequestro do radical DPPH<sup>·</sup> (Tabela 3). Esse efeito foi observado em todos os extratos de todas as plantas analisadas, exceto para *P. alliacea*, onde o extrator diclorometano obteve atividade antioxidante ligeiramente superior ao extrator etanol (Tabela 3).

Andrade et al. (2007) também observou uma maior atividade antioxidante do extrato etanólico bruto de *Acacia podalyriifolia*, em comparação à fração diclorometano. A vantagem do extrator etanol sobre o extrator diclorometano pode ser explicada pela diferença de polaridade entre os dois solventes. Sendo o etanol mais polar, este extrai uma quantidade superior de compostos fenólicos e flavonoides, que são substâncias normalmente correlacionadas positivamente à atividade antioxidante (RAMALHO & JORGE, 2006). Esse efeito também foi observado em experimento realizado por Borges et al. (2007), onde o aumento da atividade antioxidante dos extratos de *Baccharis trimera* (carqueja) estava relacionada ao aumento da polaridade do solvente utilizado na extração dos compostos antioxidantes.

Como não foi possível realizar as análises dos extratos diclorometânicos das cinco espécies antimaláricas pelo método FRAP, não há análise estatística de comparação entre fatores extrator *vs.* espécie, para essa metodologia.

**Tabela 3.** Atividade antioxidante de extratos etanólicos (EET) e diclorometânicos (EDC) de cinco espécies antimaláricas pelo método de sequestro do radical DPPH'. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013.

Espécie antimalárica	DPPH' - IC <sub>50</sub> * (mg.mL <sup>-1</sup> ) ARP (1/IC <sub>50</sub> )	
	EET	EDC
<i>S. hirsuta</i>	6,81 ± 0,80 cA	16,6 ± 0,11 bB
<i>B. pilosa</i>	2,92 ± 0,04 bA	20,58 ± 0,95 cB
<i>Q. amara</i>	0,088 ± 0,02 aA	9,73 ± 1,16 aB
<i>P. alliacea</i>	21,88 ± 1,06 dB	17,01 ± 1,06 bA
<i>P. niruri</i>	2,52 ± 0,56 bA	17,87 ± 0,54 bB
CV (%)	6,52	

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na linha e minúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey (p≤0,05)

\*IC<sub>50</sub> (Concentração inibitória capaz de sequestrar 50% do radical DPPH')

#### 4.5.2 Perfil Cromatográfico

Considerando que os compostos fenólicos são amplamente reconhecidos como substâncias antioxidantes, o perfil cromatográfico dos dois extratos com maior potencial antioxidante, pelas três metodologias testadas (EET de *Q. amara* e EET de *P. niruri*), foram analisados por CLAE/FR. A identificação dos compostos foi realizada utilizando detector de arranjo de diodo e comparando-se o tempo de retenção, o espectro de absorção e co-cromatografia com os padrões disponíveis. Neste estudo foi possível obter a separação de vários compostos bioativos, entretanto, sendo possível apenas a identificação e quantificação de 8 compostos fenólicos – 4 ácidos fenólicos e 4 flavonoides (Tabela 4).

**Tabela 4.** Compostos fenólicos identificados na análise cromatográfica (CLAE) dos extratos etanólicos de *Phyllanthus niruri* e *Quassia amara*. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013.

Compostos fenólicos	<i>Phyllanthus niruri</i>	<i>Quassia amara</i>
Rutina	0,0619	0,1217
Miricetina	0,0673	0,5371
Quercetina	0,0194	0,0286
Catequina	nd	0,0307
Ácido Gálico	0,1304	0,0093
Ácido Siringico	0,4643	nd
Ácido p-Cumárico	nd	0,0364
Ácido Trans-cinâmico	nd	0,2889
Total [mg.g <sup>-1</sup> ]*	0,7434	1,0526

nd = não detectado

\*resultados em mg.g<sup>-1</sup> de amostra seca

Os flavonoides identificados foram da classe dos flavonóis (quercetina, miricetina e rutina) e da classe flavanol (catequina). Os ácidos fenólicos identificados foram o ácido gálico, ácido siríngico, ácido *p*-cumárico e ácido trans-cinâmico (Tabela 4). Segundo vários autores, os flavonoides como quercetina, rutina, miricetina e catequina são os de maior ocorrência em folhas, frutos e outras partes aéreas de vegetais, possuindo forte atividade antioxidante (SALAH et al., 1995; SPRENGER et al., 2011).

O EET de ***Q. amara*** apresentou o maior número dos compostos identificados, sendo que a catequina, o ácido *p*-cumárico e o ácido trans-cinâmico foram encontrados somente neste extrato, nas concentrações de 0,0307; 0,0364 e 0,2889 mg.g.MS<sup>-1</sup>, respectivamente. No EET de ***Q. amara*** a miricetina foi a majoritária (0,5371 mg.g.MS<sup>-1</sup>), seguida do ácido trans-cinâmico (0,2889 mg.g.MS<sup>-1</sup>) (Tabela 4).

No EET de ***P. niruri***, o ácido siríngico foi encontrado somente nesta espécie analisada e foi o composto fenólico majoritário na concentração de 0,4643 mg.g.MS<sup>-1</sup> (Tabela 4). Compostos como ácido gálico, rutina, miricetina e quercetina também foram encontrados por Sprenger et al. (2011), em ***P. niruri***.

Os compostos quercetina, rutina e ácido gálico são compostos reconhecidos por sua atividade antioxidante (BEHLING et al., 2004; RODRIGUES et al., 2003, HAIDA et al., 2011), sendo muitas vezes utilizados como controles positivos em estudos que mensuram essa atividade. Outros compostos como ácido siríngico, catequina e ácido *p*-cumárico também são relatados como substâncias com efeitos antioxidantes (RAMALHO e JORGE, 2006), de forma que esses compostos, assim como de outras substâncias, possam estar interagindo entre si e estar relacionados à atividade antioxidante dos extratos analisados.

Devido aos excelentes resultados de atividade antioxidante obtidos pelo EET de ***Q. amara*** e a ausência desse tipo de dados na literatura, incentiva-se o aprofundamento dos estudos referentes à atividade antioxidante dessa espécie, buscando o isolamento e a identificação das substâncias responsáveis por essa atividade. A ***Quassia amara*** é uma espécie pertencente à família Simaroubaceae, e dentre os componentes químicos já descritos nessa espécie, destacam-se os quassinóides, alcalóides indólicos (derivados da cantina e de  $\beta$ -carbolina), esteroides, ácidos alifáticos e ácidos aromáticos (GILBERT & FAVORETO, 2010), sendo os quassinóides – substâncias triterpênicas com alto poder de oxigenação e

os principais constituintes dessa família (DUKE & OLIVA, 2004), descritos como substâncias com propriedades anticâncer, antimalárica, inseticida, amebicida, nematocida, antiviral, antioxidante, anti-inflamatória, entre outras (ALMEIDA et al. 2007). Os quassinoides ailantinol E e F, extraídos de *Ailanthus altissima*, são compostos com alto poder antioxidante (TAMURA et al., 2003). Seis quassinóides foram isolados no caule de *Quassia amara*, sendo eles: dihidronomeoquassina, 11- $\alpha$ -O-( $\beta$ -D-glicopiranosil)-16- $\alpha$ -O-metilneoquassina, 1- $\alpha$ -O-metilquassina, 12- $\alpha$ -hidroxi-13,18-dehidroparain, 16- $\alpha$ -O-metilneoquassin e 11-acetilparain (VIEIRA & BRAZ-FILHO, 2006), no entanto, não foram encontrados dados na literatura que referenciem esses compostos como antioxidante, assim como, não há evidência de ailantinol em *Q. amara*, de forma que as substâncias antioxidantes responsáveis por tão alta atividade, ainda permanecem desconhecidas.

#### 4.5.3 Atividade Antimicrobiana

Os resultados referentes à Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos etanólicos e diclorometânicos das cinco plantas antimaláricas estão expostos na Tabela 5. Como pode-se observar, o EDC de *B. pilosa*, assim como os EET de *P. niruri*, *Q. amara* e *S. hirsuta* apresentaram os melhores resultados, inibindo a multiplicação de *B. cereus* com concentrações  $\leq 0,08 \text{ mg m}^{-1}$ .

Segundo Balangcod et al. (2012), extratos metanólicos de *B. pilosa* apresentaram atividade antimicrobiana frente às cepas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Em análise fitoquímica, o extrato evidenciou a presença de compostos alcalóides, esteróis, antraquinonas, flavonoides, saponinas, taninos e glicosídeos (BALANGCOD et al., 2012), podendo estes, estar relacionados à atividade antimicrobiana da espécie. O óleo essencial de *B. pilosa* foi relatado como antimicrobiana frente a cepas de *B. cereus* por Deba et al. (2007), podendo esse efeito estar relacionado à presença de terpenos como pino, mirceno, limoneno, ocimeno, linalol e verbenol.

Dados referentes à atividade antimicrobiana de *Q. amara* não foram encontrados na literatura, no entanto, o extrato etanólico de *P. niruri* demonstrou-se inibitório frente às cepas de *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, assim como *Phyllanthus amarus* e *Phyllanthus tenellus*, demonstrando que as espécies vegetais

do gênero *Phyllanthus* são promissoras fontes para a confecção de novos fármacos com atividade antimicrobiana (SILVA et al., 2010), assim como a espécie *S. hirsuta*, onde extratos de acetato de etila da planta inteira demonstraram atividade antimicrobiana frente à cepas de *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri* e *Salmonella typhi*, enquanto o extrato metanólico demonstrou-se eficaz frente à *S. flexnerii*, *S. typhi*, e *Bacillus cereus* (TEKWU, et al., 2012).

O EET de *P. alliacea* não inibiu o *Bacillus cereus* em nenhuma das concentrações analisadas neste estudo, sendo sua CIM  $>5 \text{ mg.mL}^{-1}$  (Tabela 5). Já o EDC desta planta mostrou uma leve inibição em concentrações maiores de extratos  $\geq 1,25 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Apesar dos extratos da parte aérea de *P. alliacea* apresentarem pouco, ou nenhuma, atividade antimicrobiana sobre *B. cereus*, compostos organosulfurados, extraídos das raízes desse vegetal, demonstram atividade sobre as cepas desse micro-organismo (KIM et al., 2006). Considerando que a extração de compostos bioativos depende da parte do vegetal utilizada para a preparação do extrato e do solvente utilizado na extração (NCUBE, et al., 2008), resultados obtidos de experimentos com a mesma espécie, mas realizados com solventes e partes diferentes do vegetal, podem apresentar diferença quanto a inibição de determinadas bactérias.

Considerando que a bactéria *Bacillus cereus* pode ser encontrada em solos e alimentos mal conservados, estando relacionada à quadros de intoxicação alimentar, seguidos de diarreia e vômito (GOMES et al., 2004), assim como à casos de infecções não gastrointestinais (KALPOE et al., 2008) e até mesmo risco de vida à crianças desnutridas ou de baixa imunidade (WHO, 2013), apresentando resistência à antibióticos como tetraciclina, clindamicina e vancomicina (CHAVES et al., 2011), é interessante o avanço de estudos futuros que visem o fracionamento desses extratos brutos, assim como o isolamento e a identificação das substâncias bioativas promotoras de tal atividade, podendo estas serem utilizadas para a confecção de novos agentes antimicrobianos.



**Tabela 5.** Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos brutos etanólicos (EET) e diclorometânicos (EDC) de cinco plantas medicinais sobre cepas de *Bacillus cereus*. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013

Espécie antimalárica	Extrator	MIC (mg mL <sup>-1</sup> )
<i>B. pilosa</i>	EET	0,08 - 0,16
	EDC	< 0,08
<i>P. alliacea</i>	EET	nd*
	EDC	0,63 - 1,25
<i>P. niruri</i>	EET	< 0,08
	EDC	0,31 - 0,63
<i>Q. amara</i>	EET	< 0,08
	EDC	0,08 - 0,16
<i>S. hirsuta</i>	EET	< 0,08
	EDC	0,16 - 0,31

\*nd: atividade não detectada nas concentrações máximas testadas

#### 4. CONCLUSÕES

A superioridade dos extratos etanólicos de *Q. amara* e *P. niruri* na atividade antioxidante e antimicrobiana pode estar associado aos teores de compostos fenólicos totais e a presença dos ácidos fenólicos como o ácido gálico, ácido siríngico, ácido p-cumárico e ácido trans-cinâmico além dos flavonoides como quercetina, rutina, e miricetina. Entretanto, maiores estudos serão necessários para buscando o isolamento e a identificação das substâncias responsáveis por essa atividade.

O etanol como solvente extrator apresentou uma capacidade maior de extração de moléculas com atividade antioxidante, quando comparado ao diclorometano. Todos os extratos demonstraram-se eficazes na inibição de *B. cereus*, com exceção do EET de *P. alliacea*. Este estudo preliminar sugere que a pesquisa pode ser complementada para que as plantas analisadas possam ser utilizadas como antioxidantes pela indústria alimentícia e farmacêutica ou como protótipos para a confecção de novos produtos.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As espécies antimaláricas *Bidens pilosa*, *Senna hirsuta* e *Phyllanthus niruri*, utilizadas no experimento, são por vezes consideradas como plantas daninhas infestantes de culturas comerciais e com fácil propagação. Desta forma, sugere-se que pesquisas futuras sejam realizadas no intuito de analisar a atividade alelopática dessas espécies a campo por meio de liberação de seus exsudatos, lixiviados, compostos voláteis ou até mesmo de sua decomposição. No entanto, deve-se ressaltar a importância de uma investigação cautelosa, uma vez que esses compostos aleloquímicos podem afetar, juntamente às plantas daninhas, a cultura comercial de interesse (PIRES & OLIVEIRA, 2011).

Tendo em vista os resultados promissores do EET de *B. pilosa*, nos bioensaios alelopáticos, e do EET de *Q. amara*, tanto nas análises de atividade antioxidante como nas análises de atividade antimicrobiana, sugere-se a elaboração de estudos sequentes para o fracionamento, purificação e isolamento das substâncias bioativas desses extratos, com o intuito de, futuramente, se elucidar quais moléculas são responsáveis pelos efeitos de interesse e o mecanismo de ação das mesmas, assim como, se atuam de forma isolada ou sinérgica.

## REFERÊNCIAS

- ABRASCO – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SAÚDE COLETIVA. Dossiê Abrasco: Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na Saúde. In: **Agrotóxicos, Segurança Alimentar e Saúde - Parte 1**. Rio de Janeiro, 2012.
- AGROLINK. **Venda de defensivos agrícolas cresce 9,2% no Paraná**. Disponível em: [http://www.agrolink.com.br/noticias/venda-de-defensivos-agricolas-cresce-9-2--no-parana\\_169099.html](http://www.agrolink.com.br/noticias/venda-de-defensivos-agricolas-cresce-9-2--no-parana_169099.html). Acesso em: 19 de jul. 2013.
- AJAIYEOBA, E. O.; ABALOGU, U. I.; BREBS, H. C.; ODUOLA, A. M. J. In vivo antimalarial actives of *Quassia amara* and *Quassia undulata* plant extracts in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.67, p.321-325, 1999.
- ALBERTINO, S. M. F.; SILVA, J. F.; PARENTE, R. C.; SOUZA, L. A. S. Composição florística das plantas daninhas na cultura de guaraná (*Paullinia cupana*), no estado do Amazonas. **Planta Daninha**, v.22, n.3, p.351-358, 2004.
- ALBUQUERQUE, A. P. & HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidade e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.678-689, 2006.
- ALBUQUERQUE, M. B.; DOS SANTOS, R. C.; LIMA, L. M.; MELO FILHO, .P. A.; NOGUEIRA, R. J. M. C.; CAMARA, C. A. G.; RAMOS, A. R. Allelopathy, na alternative tool to improve cropping systems. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v.31, p.379-395, 2011.
- ALL (América Latina Logística Malha Sul). **Monitoramento e Controle de Vegetação invasora da Linha**. BSI, Rio Grande do Sul, 2010.
- ALMEIDA, F. S. **A alelopatia e as planta**. IAPAR, Circular, 60p., 1988.
- ALMEIDA, M. M. B.; ARRIAGA, A. M. C.; SANTOS, A. K. L.; LEMOS, T. L. G.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I. J. C. Ocorrência e atividade biológica de quassinóides da última década. **Química Nova**, v.30, n.4, p.935-951, 2007.
- ALVAREZ, L.; MARQUINA, S.; VILLARREAL, M.L.; ALONSO, D.; ARANDA, E.; DELGADO, G. Bioactive polyacetylenes from *Bidens pilosa*. **Planta Medica**, v.62, p. 355–357, 1996.
- ALVES, M. C. S.; MEDEIROS-FILHO, S.; INNECO, R.; TORRES, S. B. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.11, 2004.
- AMIN, Z. A.; ABDULLA, M. A.; ALI, H. M.; ALSHAWSH, M. A.; QADIR, S. W. Assessment of in vitro antioxidant, antibacterial and immune activation potentials of

aqueous and ethanol extracts of *Phyllanthus niruri*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.92, p.1874-1877, 2012.

AMOO, S. O.; OGÓ, A.U.; VAN STADEN, J. Allelopathic potential of *Tetrapleura tetraptera* leaf extracts on early seedling growth of five agricultural crops. **South African Journal of Botany**, v.74, p.149-152, 2008.

AMRI, E.; KISANGAU, D. P. Ethnomedicinal study of plants used in villages around Kimboza forest reserve in Morogoro, Tanzania. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v.8, n.1, p.1-9, 2012.

AMRI, I.; HAMROUNI, L.; HANANA, M.; JAMOUSI, B. Reviews on phytotoxic effects of essential oils and their individual components: News approach for weeds management. **International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology**, v.4, n.1, 2013.

ANDRADE, C. A.; COSTA, C. K.; BORA, K.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G.; KERBER, V. A. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.2, p.231-235, 2007.

ANDREO, D. & JORGE, N. Antioxidantes naturais: Técnicas de extração. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.24, n.2, p.319-336, 2006.

ARNAO, M.B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science & Technology**, v.1, p.419-421, 2000.

BAGALKOTKAR, G. SAGINEEDU, S. R.; SAAD, M. S.; STANSLAS, J. Phytochemicals from *Phyllanthus niruri* Linn, and their pharmacological properties: a review. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.58, p.1559-1570, 2006.

BALANGCOD, T. D.; VALLEJO, V. L.; PATACSIL, M.; APOSTOL, O. LARUAN, L. M. V. A.; MANUEL, J.; CORTEZ, S.; GUTIERREZ, R. M. Phytochemical screening and antibacterial activity of selected medicinal plants of Bayabas, Sablan, Benguet Province, Cordillera Administrative Region, Luzon, Philippines. **Indian Journal of Traditional Knowledge**, v.11, n.4, p.580-585, 2012.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: Fonte Potencial para a Descoberta de Fármacos. **Química Nova**, v.32, n.3, p.679-688, 2009.

BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição**, v.15, n.3, p.285-292, 2004.

BELINELO, V.J.; CZEPAK, M.P.; VIEIRA FILHO, S.A.; MENEZES, L.F.T.; JAMAL, C.M. Alelopatia de *Arctium minus* Bernh (Asteraceae) na germinação e crescimento radicular de sorgo e pepimno. **Revista Caatinga**, v.21, n.4, p.12-16, 2008.

BERLINCK, R. G. de S. Bioprospecção no Brasil: um breve histórico. **Ciência e Cultura**, v.64, n.3, p. 27-30, 2012.

BERTANI, S.; BOURDY, G.; LANDAU, I.; ROBINSON, J. C.; ESTERRE, PH., DEHARO, E. Evaluation of French Guiana traditional antimalarial remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v.98, p.45-54, 2005.

BERTANI, S.; HOUEL, E.; BOURDY, G.; STIEN, D.; JULLIAN, V.; LANDAU, I.; DEHARO, E. *Quassia amara* L. (Simaroubaceae) leaf tea: Effect of the growing stage and desiccation status on the antimalarial activity of a traditional preparation. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p. 40-4, 2007.

BHOWMIK, P. C.; INDERJIT. Challenges and opportunities in implementing allelopathy for natural weed management. **Crop Protection**, v.22, p.661-671, 2003.

BIANCHI, N. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista Nutrição**, v.12, n.2, p.123-130, 1999.

BIANCHIN, M.; CARPES, S. T. Propriedades antioxidante e antimicrobiana dos extratos etanólicos e óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*. In: Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica da UTFPR, 2012.

BIZZO, AH. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: Aspectos gerais, desenvolvimetro e perspectivas. **Química Nova**, v.32, n.3, p.588-594, 2009.

BLUM, U. Fate of Phenolic Allelochemicals in Soils – the Role of Soil and Rhizosphere Microorganisms. In: **Allelopathy. Chemistry and Mode of Action of Allelochemicals**. CRC Press, p.57-72, 2004.

BOIM, M. A.; HEILBERG, I. P.; SCHOR, N. *Phyllanthus niruri* as a promising alternative treatment for nephrolithiasis. **International Brazilian Journal of Urology**, v.36, n.6, p.657-664, 2010.

BORGES, L. R.; ASTOLFI, V.; MOSSI, A. J.; CANSIAN, R. L. Determinação de atividades biológicas em extratos de carqueja (*Baccharis trimera* (Less) D.C.). In: Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, 23 a 28 de setembro de 2007, Caxambu, MG.

BOSCOLO, O. H.; VALLE, L. S. Plantas de uso medicinal em Quissamã, Rio de Janeiro, Brasil. **Iheringia, Série Botânica**, v.63, n.2, p.263-277, 2008.

BOTSARIS, A. S. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of Flora Medicinal. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 3, n.18, 2007.

BOTTERWECK, A. A. M.; VERHAGEN, H.; GOLDBOHN, R. A.; KLEINJANS J.; VAN DEN BRANDT, P. A. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene

and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands cohort study. **Food and Chemical Toxicology**, v.38, p.599-605, 2000.

BRANDAO, M. G.L.; NERY, C.G. C.; MAMAO, M. A. S.; KRETTLI, A. U. Two methoxylated flavone glycosides from *Bidens pilosa*. **Phytochemistry**, v.48, n.2, p.397-399, 1998.

BRANDÃO, M.G.L.; KRETTLI, A.U.; SOARES, L.S.R.; NERY, C.G.C.; MARINUZZI, H.C.. Antimalarial activity of extracts and fractions from *Bidens pilosa* and other *Bidens* species (Asteraceae) correlated with the presence of acetylene and flavonoid compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v.57, p.131-38, 1997.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v.28, n.1, p. 25-30, 1995.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Mercado de fertilizantes e defensivos segue em crescimento**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2012/06/mercado-de-fertilizantes-e-defensivos-segue-em-crescimento>>. Acesso em: 25 fev. 2013.

BRASIL, MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Plantas para o futuro**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/conserva%C3%A7%C3%A3o-e-promo%C3%A7%C3%A3o-do-uso-da-diversidade-gen%C3%A9tica/plantas-para-o-futuro>> Acesso em: 23 jan. 2013.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Regras para Análise de Sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 395p.

BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v.33, n.1, p.229-239, 2010.

BULOW, N.; KONIG, W. A. The role of germacrene D as a precursor in sesquiterpene biosynthesis: investigations of acid catalyzed, photochemically and thermally induced rearrangements. **Phytochemistry**, v.55, p.141-168, 2000.

CACHET, N.; HOAKWIE, F.; BERTANI, S.; BOURDY, G.; DEHARO, E.; STIEN, D.; HOUEL, E.; GORNITZKA, H.; FILLAUX, J.; CHEVALLEY, S.; VALENTIN, A.; JULLIAN, V. Antimalarial activity of simalikalactone E, a new quassinoid from *Quassia amara* L. (Simaroubaceae). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, n.10, p.4393-4398, 2009.

CALIXTO, J. B.; SANTOS, A. R. S.; CECHINEL\_FILHO, V.; YUNES, R. A. A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: Theirs chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. **Medicinal Research Reviews**, v.18, n.4, p.225-258, 1998.

CAMARGO, M. T. L. A. Contribuição etnofarmacológica ao estudo de *Petiveria alliacea* L. – Phytolacaceae – (amanda-senhor) e a atividade hipogliceminante relacionada a transtornos mentais. **Dominguezia**, v.23, n.1, 2007.

CAMPBELL, G.; LAMBERT, J. D. H.; ARNASON, T.; TOWERS, G. H. N. Allelopathic properties of  $\alpha$ -terthienyl and phenylheptatriene, naturally occurring compounds from species of asteracea. **Journal of Chemical Ecology**, v.8, n.6, 1982.

CANSIAN, R. L.; MOSSI, A. J.; OLIVEIRA, D.; TONIAZZO, G.; TREICHEL, H.; PAROUL, N.; ASTOLFI, V.; SERAFINI, L. A. Atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de ho-sho (*Cinnamomum camphora* Ness e Eberm Var. *Linaloolifera fujita*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, n.2, p.378-384, 2010.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. **Free Radical Biology & Medicine**, v.22, n.5, p.749-760, 1997.

CARABALLO, A.; CARABALLO, B.; RODRIGUEZ-ACOSTA, A. Preliminary assessment of medicinal plants used as antimalarials in the couthastern Venezuelan Amazon. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.37, n.2, p.186-188, 2004.

CARPES, S. T. **Estudo das características físico-químicas e biológicas do pólen apícola de *Apis melífera* L. da região sul do Brasil**. 2008.278f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

CHAVES, J. Q.; PIRES, E. S.; VIVONI, A. M. Genetic diversity, antimicrobial resistance and toxigenic profiles of *Bacillus cereus* isolated from food in Brazil over three decades. **International Journal of Food Microbiology**, v.147, p.12-16, 2011.

CHIN, C. M.; FERREIRA, E. I. O processo de latenciação no planejamento de fármacos. **Química Nova**, v.22, n.1, 1999.

CHON, S. U.; NELSON, C. J. Allelopathy in compositae plants. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v.30, p.349-358, 2010.

CHRISTOFFOLETI, P. J. Curvas de dose-resposta de biótipos resistente e suscetível de *Bidens pilosa* L. aos herbicidas inibidores da ALS. **Scientia Agricola**, v.59, n.3, p.513-519, 2002.

CHRISTOFFOLETI, P. J.; BORGATO, E. A.; FIGUEIREDO, M. R. A.; MELO, M. S.C.; SOUZA JÚNIOR, J. A.; NICOLAI, M. Determinação de doses ótimas de controle do herbicida flumioxazina por meio de curvas de dose-resposta em solos de texturas contrastantes para as plantas daninhas *Commelina benghalensis*, *Euphorbia*

***heterophylla*** e ***Senna occidentalis***. In: XXVII Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas, Ribeirão Preto – SP, 2010.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; OVEREJO, R.F.L.; NICOLAI, M.; VARGAS, L.; CARVALHO, S.J.P.; CATANEO, A.C.; CARVALHO, J.C.; MOREIRA, M.S. **Aspectos de Resistência de Plantas Daninhas a Herbicidas**. 3ed. Piracicaba, 2008.

CIMANGA, R. K.; TONA, L.; LUYINDULA, N.; MESIA, K.; LUSAKIBANZA, M.; MUSUAMBA, C. T.; APERS, S.; DE BRUYNE, T.; VAN-MIERT, S.; HERMANS, N.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. In vitro antiplasmodial activity of extracts and fractions from apical stems of ***Phyllanthus niruri*** L. (Euphorbiaceae): part 2. **Journal of Ethnopharmacology**, v.95,p.399-404, 2004.

CLARKSON, C.; MAHAHAJ, V. J.; CROUCH, N. R.; GRACE, O. M.; PILLAY, P.; MATSABISA, M. G.; BHAGWANDIN, N.; SMITH, P. J. FOLB, P. I. In vitro antiplasmodial activity of medicinal plants native to or naturalized in South Africa. **Journal of Ethnopharmacology**, v.92, p.177-191, 2004.

CORNES, D. **Callisto: a very successful maize herbicide inspired by allelochemistry**, 2005. Disponível em: [http://www.regional.org.au/au/allelopathy/2005/2/7/2636\\_cornesd.htm](http://www.regional.org.au/au/allelopathy/2005/2/7/2636_cornesd.htm) Acesso em: 12 fev 2013.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWI, N. G. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAM, B.B; GRUISSEM, W; JONES, R. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville: Courier Companies, p.1250-1318, 2000.

CZARNOTA, M. A.; PAUL, R. N.; DAYAN, F. E.; NIMBAL, C. I.; WESTON, L. A. Mode of Action, Localization of Production, Chemical Nature, and Activity of Sorgoleone: A Potent PSII Inhibitor in Sorghum spp. Root Exudates. **Weed Technology**, v.15, p.813-825, 2001.

DEBA, F.; XUAN, T. D.; YASUDA, M.; TAWATA, S. Chemical composition and antioxidante, antibacterial and antifungal activities of the essencial oils from ***Bidens pilosa*** Linn. Var. Radiata. **Food Control**, v.19, p.346-352, 2008.

DEGASPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. Antioxidants properties of phenolic compounds. **Visão Acadêmica**, v.5, p.33-40, 2004.

DEL-RÉ, P. V; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. Revista Brasileira de Plantas Medicinaias, v.14, n.2, p.389-399, 2012.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. Wiley, 2ed., 2001.



DIAS, J. F. G.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. Composition of essential oil and allelopathic activity of aromatic water of *Aster lanceolatus* Willd. (Asteraceae) **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.45, n.3, 2009.

DIAS, L.S.; DIAS, A. S. Metabólitos secundários como fontes de bioherbicidas: situação atual e perspectivas. **Revista de Ciências Agrárias**, v.30, n.1, 2007.

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

DUKE, S. O.; ROMAGNI, J. G.; DAYAN, F. E. Natural products as sources for a new mechanisms of herbicidal action. **Crop Protection**, v.19, p.583-589, 2000.

DUKE, S.O.; OLIVA, A. Mode of Action of Phytotoxic Terpenoids. In: **Allelopathy. Chemistry and Mode of Action of Allelochemicals**. CRC Press, p.201-212, 2004.

EINHELLIG, F.A. Mode of Allelochemical Action of Phenolic Compounds. In: **Allelopathy. Chemistry and Mode of Action of Allelochemicals**. CRC Press, p.217-233, 2004.

ERASMO. E. A. I.; BIANCO, S.; PITELLI, R. A.; BERRINGELI, P. Efeitos de níveis crescentes de calagem no crescimento e estado nutricional de fedegoso. **Planta Daninha**, v.8, n.2, p. 253-263, 2000.

ESTEVEZ, A. M. & ESTEVEZ, R. J. A short Overview on the Medicinal Chemistry of Shikimic Acid. **Mini-peviews in Medicinal Chemistry**, v.12, p. 1443-1454, 2012.

FALCÃO, E. P. S.; SILVA, N. H.; GUSMÃO, N. B.; RIBEIRO, S. M.; HONDA, N. K.; PEREIRA, E. C. Atividade Antimicrobiana de Compostos Fenólicos do Líquen *Heterodermia leucomela* (L.) Poelt. **Acta Farmácia Bonaerense**, v.21, n.1, p.43-49, 2002.

FERREIRA, A. G. & AQUILA, M. E. A. ALELOPATIA: Uma área emergente da Ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, p.175-204, 2000.

FERREIRA, A. G.; BORGUETTI, F. Interferência: Competição e Alelopatia. In: **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre, Artmed, p.252-253, 2004.

FERREIRA, J.F.S.; LUTHRIA, D.L.; SASAKI, T.; HEYERICK, A. Flavonoids from *Artemisia annua* L. as Antioxidante an their Potencital Synergism with Artemisini agains Malaria and Cancer. **Molecules**, v.15, p.3135-3170, 2010.

FERRO, A. F. P.; BONACELLI, M. B. M.; ASSAD, A. L. D. Oportunidades tecnológicas e estratégicas concorrenciais de gestão ambiental: O uso sustentável da biodiversidade brasileira. **Gestão e Produção**, v.13, n.3, p.489-501, 2006.

FLOEGEL, A.; KIM, D-O; CHUNG, S.J.; KOO, S.I.; CHUN, O. K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal Food Composition and Analysis**, v.24, p.1043-1048, 2011.

GAMI, B.; KOTHARI, I. L. Antioxidant & antimicrobial activity of in vivo and in vitro grown plants of *Phyllanthus niruri* L. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v.2, n.2, p.78-89, 2011.

GATTI, A.B.; PEREZ, S.C.J.G.A.; LIMA, M.I.S. Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. **Acta Botanica Brasilica**, v.18, p.459-472, 2004.

GEISSBERGER, P.; SEQUIN, U. Constituents of *Bidens pilosa* L.: do the components found so far explain the use of this plant in traditional medicine? **Acta Tropica**, v.48, p.251-261, 1991.

GILBERT, B.; FAVORETO, R. *Quassia amara* L. (Simaroubaceae). **Revista Fitos**, v.5, n.3, 2010.

GOBBO-NETO, L; LOPES, N. P. Plantas Medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, n.2, p.374-381, 2007.

GOLDFARB, M.; PIMENTAL, L. W.; PIMENTAL, N. W. Alelopatia: relações nos agrossistemas. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, v.3, n.1, p.23-28, 2009.

GOMES, L. P.; RODRIGUES, M. M.; SOARES, G.; BARONI, F. A.; SOUZA, M. M. S. *Bacillus cereus* em amostras de doces industrializados comercializados por ambulantes no municípios de Seropédica e Itaguaí – Rj. **Revista Universidade Rural. Série Ciências da Vida. Seropédica**, v.24, n.2, p.181-184, 2004.

GUEDES, R. C. M.; NOGUEIRA, N. G. P.; SOUZA, C. R. F.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. OLIVEIRA, W. P. Atividade antimicrobiana de extratos de *Petiveria alliacea* (guiné) frente a cepas padrão de fungos e bactérias. In: 16º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP. Anais em CD-ROM do 16º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo, 2008.

GUSMAN, G. S.; YAMAGUSHI, M. Q.; VESTENA, S. Potencial alelopático de extratos aquosos de *Bidens pilosa* L., *Cyperus rotundus* L. e *Euphorbia heterophylla* L. **Iheringia, Série Botanica**, v.66, n.1, p.87-98, 2011.

HAGEMANN, T. R.; BENIN, G.; LEMES, C.; MARCHESE, J. A.; MARTIN, T. N.; PAGLIOSA, E. S.; BECHE, E. Potencial alelopático de extratos aquosos foliares de aveia sobre azevém e amendoim-bravo. **Bragantia**. V.69, n.3, p.509-518, 2010.

HAIDA, K. S.; BARON, A.; HAIDA, K. S.; FACI, D.; HAAS, J.; SILVA, F. J. Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de duas variedades de goiaba e arruda. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v.9, n.28, 2011.

HAMINIUK, C. W. I.; MACIEL, G. M.; PLATA-OVIEDO, M. S. V.; PERALTA, R. M. Phenolic compounds in fruits – na overview. **International Journal of Food Science & Technology**, 2012.

HAMINIUK, C. W. I.; PLATA-OVIEDO, M. S. V.; GUEDES, A. R.; STAFUSSA, A. P.; BONA, E.; CARPES, S. T. Chemical, antioxidante and antibacterial study of Brazilian fruits. **International Journal of Food Science & Technology**, v.46, p.1529-1537, 2011.

HOUEL, E.; BERTANI, S.; BOURDY, G.; DEHARO, E.; JULLIAN, V.; VALENTIN, A.; CHEVALLEY, S.; STIEN, D. Quassinoid constituents of *Quassia amara* L. leaf herbal tea. Impact on its antimalarial activity cytotoxicity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.126, p.114-118, 2009.

IAS (INTERNATIONAL ALLELOPATHY SOCIETY). Disponível em: <<http://www.international-allelopathy-society.org/>>. Acessado em: 12 jan 2013.

INDERJIT; DUKE, S. O. Ecophysiological aspects of allelopathy. **Planta. An International Journal of Plant Biology**, v.217, p.529-539, 2003.

INDERJIT; STREIBIG, J. C.; OLOFSDOTTER, M. Joint action of phenolic acid mixtures and its significance in allelopathy research. **Physiologia Plantarum**, v.114, p.422-428, 2002.

JOMAA, H.; WIESNER, J.; SANDERHRAND, S.; ALTINCICEK, B., WEIDEMEYER, C.; HINTZ, M.; TURBACHOVA, I.; EBERL, M.; ZEIDLER, J.; LICHTENTHALER, H.K.; SOLDATI, D.; BECK, E. Inhibitors of the Nonmevalonate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis as antimalarial Drugs. **Science**, v.285, p.1573-1575, 1999.

KALPOE, J. S.; HOGENBIRK, K.; MAARSEVEEN, N. M.; VEER, B. J. G.; KRAAKMAN, M. E. M.; MAARLEVELD, J. J.; REYDEN, T. J. K.; DIJKSHOORN, L.; BERNARDS, A. T. Dissemination of *Bacillus cereus* in a paediatric intensive care unit traced to insufficient disinfection of reusable ventilator air-flow sensors. **Journal of Hospital Infection**, v.68, p.341-347, 2008.

KAMURO, Y.; KAWAI, T.; KAKIUCHI, T. (inventors). Herbicidal methods and compositions comprising fosmidomycin. Fujisawa Pharmaceutical Co. Ltd., US. Patent Application, n.5.002.602, March 26, 1991.

KATERERE, D. R.; GRAZIANI, G.; THEMBO, K. M.; NYAZEMA, N. Z.; RITIENI, A. antioxidante activity of some African medicinal and dietary leafy African vegetables. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n17, p.4103-4108, 2012.

KESSLER a. & BALDWIN, I. T. Plant Responses to Insect Herbivory: The Emerging Molecular Analysis. **Annual Reviews Plant Biology**, v.53, p.299-328, 2002.

KHAN, M. R.; KIHARA, M.; OMOLOSO, A. D. Anti-microbial activity of *Bidens pilosa*, *Bischofia javanica*, *Elmerillia papuana* and *Sigesbekia orientalis*. **Fitoterapia**, v.72, p.662-665, 2001.

KIM, S.; KUBEC, R.; MUSAH. R. A. Antibacterial and antifungal activity of sulfur-containing compounds from *Petiveria alliacea* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v.104, p.188-192, 2006.

KIRBY, J.; KEASLING, J. D. Biosynthesis of Plant Isoprenoids: Perspectives for Microbial Engineering. **Annual Reviews Plant Biology**, v.60, p.335-355, 2009.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. Tomo II – 2ª ed. São Paulo: BASF, 1999.

KOTIRANTA, A.; LOUNATMAA, K.; HAAPASALO, M. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. **Microbes and Infectin**, v.2, p.189-198, 2000.

KRETTLI, A. U.; ANDRADE-NETO, V. F.; BRANDÃO, M. G. L.; FERRARI, W. M. S. The search for new antimalarial drugs from plants used to treat fever and malaria or plants randomly selected: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n.8, p. 1033-1042, 2001.

KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and Bioproducts Processing**, v.89, p.217-233, 2011.

KROYER, G.; HEGEDUS, N. Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. v.2, p.171-174, 2001.

KUMARI, P.; MISRA, K.; SISODIA, B. S.; FARIDI, U.; SRIVASTAVA, S.; LUQMAN, S.,; DAROKAR, MP.; NEGI, A. S.; GUPTA, M. M.; SINGH, S. C.; KUMAR, J. K. A. A promising anticancer and antimalarial component from the leaves of *Bidens pilosa*. **Planta Medica**, v.75, p.59-61, 2009.

KUZUYAMA, T.; SHIMIZU, T.; TAKAHASHI, S.; SETO, H. Fosmidomycin, a specific inhibitor of 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate reductoisomerase in the nonmevalonate pathway for terpenoids biosynthesis. **Tetraedron Letters**, v.39, p.7913-7916, 1998.

LABOURIAU, L.G.; VALADARES, M.B. On the germination of seeds of *Calotropis procera*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.48, p.263-84, 1976.

LANGE, B. M.; KETCHUM, R. E. B.; CROTEAUA, R. B. Isoprenoid Biosynthesis. Metabolite Profiling of Peppermint Oil Gland Secretory Cells and Application to Herbicide Target Analysis. **Plant Physiology**, v.127, p.305-314, 2001.

LI, A. H; WANG, Q; RUAN, X; PAN, CD.; JIANG, DA. Phenolics and Plant Allelopathy. **Molecules**, p.8933-8952, 2010.

LIMA, C. P.; CUNICO, M. M.; MIGUEL, O. G. MIGUEL, M. D. Efeitos dos extratos de duas plantas medicinais do gênero *Bidens* sobre o crescimento de plântulas de ***Lactuca sativa* L.** **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.32, n.1, 2011.

LIMA, G.P.L.; FORTES, A.M.T.; MAULI, M.M.; ROSA, D.M.; MARQUES, D.S. alelopatia de capim-limão (***Cymbopogon citratus***) e sabugueiro (***Sambucus australis***) na germinação e desenvolvimento inicial de corda-de-viola (***Ipomoea grandifolia***). **Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias**, v.15, n.2, p.121-127, 2009.

LIMA, T. C. M.; MORATO, G. S.; TAKAHASHI, R. N. Evaluation of Antinociceptive Effect of ***Petiveria alliacea*** (guiné) in animals. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.86, n.2, p.153-158, 1991.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas.** Instituto Plantarum, Nova Odessa, 512p, 2002.

LUCENA, K. L.; PACHECO, A. O.; MORAN, J. M.; BREFF, D. R.; BEZERRA, D. A. C.; SIQUEIRA, C. D.; MADEIRO, S. A. L. Caracterização física, físico-química e química de extratos totais de folhas frescas de ***Petiveria alliacea* L.** com ação antimicrobiana. In: 34<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis. 34<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011.

LUZ, S.M.; SOUZA FILHO, A.P.S.; GUILOHN, G.M.S. P.; VILHENA, K.S.S. Atividade alelopática de substâncias químicas isoladas da ***Acacia mangium*** e suas variações em função do pH. **Planta Daninha**, v.28, n.3, p.478-487, 2010.

LYDON, J.; TEASDALE, J. R.; CHEN, P. K. Allelopathic activity of annual wormwood (***Artemisia annua***) and the role of artemisinin. **Weed Science**, v.45, p.807-811, 1997.

MACIAS, F. A.; GALINDO, J. C. G.; MOLINILLO, J. M. G.; CASTELLANO, D. Dehydrozaluzanin C: a potente plant growth regulator with potential use as a natural herbicide template. **Phytochemistry**, v.54, p.165-171, 2000.

MAEDA, H.; DUDAREVA, N. The shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis in Plants. **Annual Reviews Plant Biology**, v.63, p. 73-105, 2012.

MAESTRI M.; ALVIM, P. T.; SILVA, M. A. P.; MOSQUIN, P. R.; PUSHMANN, R. CANO, M. A. O.; BARROS, R. S. **Fisiologia Vegetal: exercícios práticos**. 4ª Reimpressão (2002). Viçosa: UFV, 1998.

MAGIERO, E.C.; ASSMAN, J.M.; MARCHESE, J. A.; CAPELIN, D.; PALADINI, M.V.; TREZZI, M.M. Efeito alelopático de *Artemisia annua* L. na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.) e leiteiro (*Euphorbia heterophylla* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.3, p.317-324, 2009.

MANRIQUE, A. J; SANTANA, W. C. Flavonoides, atividades antibacteriana y antioxidante de propóleos de abejas sin aguijón, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona compressipes*, *Tetragonisca angustula* y *Nannotrigona* sp. de Brasil y Venezuela. **Zootecnia Tropical**, v.26, n.2, p.157-166, 2008.

MARASCHI-SILVA, F. & ÁQUILA, M.E.A. Potencial alelopático de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. **Iheringia, Série Botânica**, v.60, n.1, p.91-98, 2005.

MARCHESE, J. A.; FIGUEIRA, G. M. O uso de tecnologias pré e pós colheita e boas práticas agrícolas na produção de plantas medicinais e aromáticas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.7, n.3, p.86-96, 2005.

MARIATH, I. R.; FALCÃO, H. S.; BRABOSA-FILHO, J. M.; SOUSA, L. C. F.; TOMAZ, A. C. A.; BATISTA, L. M.; DINIZ, M. F. F. M.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L. Plants on the American continent with antimalarial activity. **Brazilian Journal Pharmacognosy**. v.19, p.158-192, 2009.

MARQUES, L. C. *Phyllanthus niruri* (Quebra-pedra) no tratamento de urolitíase: Proposta de documentação para registro simplificado como fitoterápico. **Revista Fitos**, v.5, n.3, p.20-33, 2010.

MASSIHA, A.; Khoshkholgh-Pahlaviani, M. M.; ISSAZADEH, K.; BIDARIGH, S.; ZARRABI, S. Antibacterial Activity of essential Oils Plant Extracts of *Artemisia annua* L.) In Vitro. **Zahedan Journal of Research in Medical Sciences**, v.15, n.6, p.14-18, 2013.

MATSUMOTO, R. S.; RIBEIRO, J. P. N.; TAKAO, L. K.; LIMA, M. I. S. Potencial alelopático do extrato foliar de *Annona glabra* L. (Annonaceae). **Acta Botânica Brasileira**, v.24, n.3, p.631-635, 2010.

McROBERT, L.; JIANG, S.; STEAD, A.; McCONKEY, G. A. *Plasmodium falciparum*: Interaction of shikimate analogues with antimalarial drugs. **Experimental Parasitology**, v.111, n.3, p.178-181, 2005.

MEDA, A.; LAMIEN, C. E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOULMA, O. G. Determination of the phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Faso

honey, as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v.91, n.3, p.571-577, 2005.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v.15, p.127-130, 2001.

MILANI, L. I. G.; TERRA, N. N.; FRIES, L. L. M.; CICHOSKI, A. J.; REZER, A. P. S.; BACKES, A. M.; PARODIA, C. G. Atividade antioxidante e antimicrobiana in vitro de extratos de caqui (*Diospyros kaki* L.) cultivar Rama Forte. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.5, n.2, p.118-124, 2012.

MILLIKEN, W. Traditional anti-malarial medicine in Roraima, Brazil. **Economic Botany**, v.51, n.3, p. 212-237, 1997.

MITHOFER, A.; BOLAND, W. Plant Defense Against Herbivores: Chemical Aspects. **Annual Reviews Plant Biology**, v.63, p.431-450, 2012.

MONQUERO, P. A.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; OSUNA, M. D.; DE PRADO, R. A. Absorção, translocação e metabolismo do glyphosate por plantas tolerantes e suscetíveis a este herbicida. **Planta Daninha**, v.22, n.3, p.445-451, 2004.

MOURA, M. A. M.; FRANCO, D. A. S.; MATALLO, M. B. Impacto de herbicidas sobre os recursos hídricos. **Revista Tecnologia & Inovação Agropecuária**, 2008.

MOUSSAVI-NIK, S. M.; KESHAVARZI, H. B.; GHARIBDOSTI, A. B. Effect of aqueous extracts of allelopathic *Artemisia annua* on germination and early growth of Isabgol (*Plantago ovate*). **Annual of Biological Research**, v.2, n.6, p.687-691, 2011.

MUCHUWETI, M.; MUPURE, C.; NDHLALA, A., MURENJE, T.; BENHURA, M. A. N. Screening of Antioxidant and Radical Scavenging Activity of *Vigna unguiculata*, *Bidens pilosa* and *Cleome gynandra*. **American Journal of Food Technology**, v.2, n.3, p.161-168, 2007.

NASCIMENTO, R. J.; ARAUJO, C. R.; MELO, E. A. Atividade antioxidante de extratos de resíduo agroindustrial de goiaba (*Psidium guajava* L.). **Alimentos e Nutrição**, v.21, n.2, p.209-216, 2010.

NAUGHTON, J.A.; HUGHES, R.; BRAY, P.; BELL, A. Accumulation of the antimicrobial microtubule inhibitors trifluralin and vinblastine by *Plasmodium falciparum*. **Biochemical Pharmacology**, v.75, p.1580-1587, 2008.

NCUBE, N. S.; AFOLAYAN, A. J.; OKOH, A. I. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. **African Journal of biotechnology**, v.7, n.12, p.1797-1806, 2008.

OKADA, Y.; TANAKA, K.; SATO, E.; OKAJIMA, H. Antioxidant activity of the new thiosulfinate derivate, S-benzyl phenylmethanethiosulfinate, from *Petiveria alliacea* L. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v.6, p.1097-1102, 2008.

OLIVA, K. M. F. Atividade alelopática de extratos de *Caryocar brasiliense* Camb. Sobre a germinação, crescimento e aspectos fisiológicos de *Bidens pilosa*, *Glycine max* e *Zea mays*. 2006. 62f. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal). Universidade Federal de Viçosa, 2006.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes Vegetais Naturais de Antioxidantes. **Química Nova**, v.32, n.3, p.689-702, 2009.

OLIVEIRA, F. Q.; ANDRADE-NETO, V., KRETTLI, A. U., BRANDÃO, M. G. L. New evidences on antimalarial activity do *Bidens pilosa* roots extract correlated with polyacetylene and flavonoids. **Journal of Ethnopharmacology**, v.93, p.39-42, 2004.

OLIVEIRA, J. R.; DUARTE, N. F.; RODRIGUES, B. O.; MALUF, H. J. G. M.; TONACO, I. A.; LUIZ, M. S. Avaliação dos efeitos alelopáticos de diferentes tipos de solo na germinação de alface. **Revista Agrogeoambiental**, abr, 2010.

OLIVEIRA-JUNIOR, R. S. Mecanismos de ação de herbicidas. In: **Biologia e Manejo de Plantas Daninhas**, p.141-192, 2011.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação de concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n.2, p.301-307, 2008.

PACHECO, A. O.; MORÁN, J. M.; GIRO, Z. G.; RODRIGUEZ, A. H.; BEZERRA, D. A. C.; LUCENA, K. L.; SIQUEIRA, C. D.; MADEIROS, S. A. L. Atividade Antimicrobiana in vitro de extratos totais de folhas da *Petieria alliacea* L. (Anamú). In: Anais 34ª Reunião Anual. Sociedade Brasileira de Química. Florianópolis, 2011.

PAIVA, E. P.; FAI, A. E. C.; SOARES, D. S.; STAMFORD, T. L. M. *Bacillus cereus* e suas toxinas em alimentos. **Higiene alimentar**, v.23, n.170/171, p.87-92, 2009.

PARISI, A. S.; YOUNES, S.; REINEHR, C. O.; COLLA, L. M. Avaliação da atividade antibacteriana da microalga *Spirulina platensis*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.30, n.3, p.297-301, 2009.

PENG, SL.; WEN, J.; GUO, QF. Mechanism and Active Variety of allelochemicals. **Acta Botanica Sinica**, v.46, n.7, p.757-766, 2004.



PEREIRA, Z. V.; MUSSURY, R. M.; ALMEIDA, A. B.; SANGALLI, A. Medicinal plants used by Ponta Porã community, Mato Grosso do Sul state. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v.31. n.3, p.293-299, 2009.

PÉREZ-LEAL, R., GARCÍA-MATEOS, M.R., B, VÁSQUEZ-ROJAS, T.R. & M.T, COLINAS-LEÓN, M.T. Allelopathic potential of *Petiveria alliacea* L. **Agronomy for Sustainable Development**, v.25, p.177-182, 2005.

PHILLIPS, H. Could malária be killed by a Garden weedkiller? **Nature**, 1998. Disponível em: < <http://www.nature.com/news/1998/980702/full/news980702-2.html> > Acesso em: 23 abr de 2013.

PICHERSKY, E; LEWINSOHN, E. Convergent Evolution in Plant Specialized Metabolism. **Annual Reviews Plant Biology**, v.62, p.549-566, 2011.

PICKENS, L. B.; TANG, Y.; CHOOI, Y.H. Metabolic Engineering for the Production of Natural Products. **Annual Reviews Chemical and Biomolecular Engineering**, v.2, p.211-236, 2011.

PILLAY, P. MAHARAJ, V. J.; SMITH, P. J. Investigating South African plants a source of new antimalarial drugs. **Journal of Ethnopharmacology**, v.119, p.438-454, 2008.

PIRES, N. M.; OLIVEIRA, V. R. Alelopatia. In: **Biologia e Manejo de Plantas Daninhas**, p.95-214, 2011.

PIRES, N. M.; SOUZA, I. R. P.; PRATES, H. T.; FARIA, T. C. L.; PREREIRA-FILHO, I. A.; MAGALHAES, P. C. Efeito do extrato aquoso de leucina sobre o desenvolvimento, índice mitótico e atividade da peroxidase em plântulas de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, n.1, 2001.

POWLES, S. B. & YU, Q. Evolution in Action: Plants Resistant to Herbicides. **Annual Reviews Plant Biology**, v.61, p.317-347.

PRADO, A. C. P.; ARAGÃO, A. M.; FETT, R. Compostos fenólicos e atividade antioxidante de extratos da casca de noz-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch]. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.12, n.4, p.323-332, 2009.

RABELO, G. O.; FERREIRA, A. L. SILVA; YAMAGUSHI, M. Q.; VESTENA, S. Potencial efeito de *Bidens pilosa* L. na germinação e desenvolvimento de espécies cultivadas. **Revista Científica da Faminas**, v.4, n.1, 2008.

RAHMAN, A.; KIM, E. L.; KANG, S. C. Antibacterial and antioxidant properties of *Ailanthus altissima* Swingle leaf extract to reduce foodborne pathogens and spoiling bacteria. **Journal of Food Safety**, v.29. p.499-510, 2009.

RAJESHWAR, Y.; AHMAD, R.; SUNDER, A.S S.; DEVILAL, J.; GUPTA, M.; MAZUMDER, U. K. In vitro lipid peroxidation inhibitory and antimicrobial activity of

***Phyllanthus niruri*** (Euphorbiaceae) extract. **Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics**, v.7,n.1, p.67-70, 2008.

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

RAMIRES, A.C.; CONSTANTINI, J.; OLIVEIRA JR,R.S.; GUERRA, N.; ALONSO, D.G.; BIFFE, D.F. Controle de ***Euphorbia heterophylla*** e ***Ipomoea grandifolia*** com a utilização de ghyphoste isolado ou em associação com latifolicidas. **Planta Daninha**, v.28, n.3, p.621-629, 2010.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying na improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v.26, n.9-10, p.1231-1237, 1999.

REGNAULT-ROGER, C.; VINCENT, C.; ARNASON, J. T. Essential oils in insects controle: Low-risk products in high-stakes world. **Annual Reviews of Entomology**, v.57, p.405-424, 2012.

REGO, S. S.; FERREIRA, M. M.; NOGUEIRA, A. C.; GROSSI, F. Influência de Potenciais Osmóticos na Germinação de Sementes de ***Anadenanthera colurina*** (Veloso) Brenan (Angico-branco) – Mimosaceae. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, n.2, p.549-551, 2007.

REINERS, A. A. O.; RICCI, H. A.; AZEVEDO, R. C. SOUZA. Uso de plantas medicinais para tratar a malária. **Cogitare Enfermagem**, v.15, n.3, p.454-459, 2010.

RIBEIRO, J. P. N.; LIMA, M. I. S. Potencial alelopático de ***Crinum americanum*** L. sob diferentes condições de extração. **Semina: Ciências Agrárias**, v.32, n.2, p.465-472, 2011.

RICE, E. L. **Allelopathy**. 2. ed. Orlando: Academic, 422 p., 1984.

ROBERTS, F.; ROBERTS, C.W.; JOHNSON, J.J.; KYLEL, D.E.; KRELL, T.; COGGINS, J.R.; COOMBS, G.H.; MILHOUS, W.K.; TZIPORI, S.; FERGUSON, D.J.P.; CHAKRABARTI, D.; McLeod R. Evidence for the shikimate pathway in Apicomplexan parasites. **Nature**, v. 393, 1998.

ROCKENBACH, I. I.; RODRIGUES, E.; CATANEO, C.; GONZAGA, L. V.; LIMA, A.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Ácidos fenólicos e atividade antioxidante em fruto de ***Physalis peruviana*** L. **Alimentos e Nutrição**, v.19, n.3, p.271-276, 2008.

RODRIGUES, H. G.; DINIZ, Y. S.; FAINE, L. A.; ALMEIDA, J. A.; FERNANDES, A. A. H.; NOVELLI, E. L. B. Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rutina na concentração de colesterol-HDL. **Revista Nutrição**, v.16, n.3, p.315-320, 2003.

RODRIGUES, I.M.C., SOUZA FILHO, A.P.S.; FERREIRA, F.A. Estudo fitoquímico de *Senna alata* por duas metodologias. **Planta Daninha**, v., 27, n.3, p.507-513, 2009.

ROMAN, E.S. VARGAS, L.; RIZZARDI, M. A.; MATTEI, R. W. Resistência de azevém (*Lolium multiflorum*) ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, v.22, p.301-306, 2004.

ROSA, D.M.; FORTES, A.M.T.; MAULI, M.M.; MARQUES, D.S.; PALMA, D. Potencial alelopático de *Panicum maximum* JACQ sobre a germinação de sementes de espécies nativas. **Floresta e Ambiente**, v.18, n.2, p.198-203, 2011.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R. E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.D. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP)**, 2006.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R. E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.D. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela captura do Radical Livre ABTS<sup>•+</sup>**, 2007.

SALAH, N.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G.; TIJBURG, L.; RICE-EVANS, C. A. Polyphenolic flavonols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. **Archives of Biochemistry Biophysics**, v.322, p.339–346, 1995.

SÁNCHEZ-MUNÓZ, B. A.; AGUILAR, M. I.; KING-DIAZ, B.; RIVERO, J. F.; LOTINA-HENNSEN, B. The Sesquiterpenes  $\beta$ -Caryophyllene and Caryophyllene Oxide Isolated from *Senecio salignus* Act as Phyto-growth and Photosynthesis Inhibitors. **Molecules**, v.17, p.1437-1447, 2012.

SANT'ANA, P. J. P. **Bioprospecção no Brasil. Contribuições para uma gestão ética**. Paralelo 15, 220 p., 2002.

SANTOS, I. L. V. L.; SILVA, C. R. C.; SANTOS, S. L.; MAIA, M. M. D. Sorgoleone: Benzoquinona lipídica de sorgo com efeitos alelopáticos na agricultura como herbicida. **Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo**, v.79, n.1, p.135-144, 2012.

SANTOS, J. B.; CURY, J. P. Picão-Preto: Uma planta daninha especial em solos tropicais. **Planta Daninha**, v.29, p.1159-1171, 2011.

SANTOS, M. A. T.; AREA, N.S, M. A.; REYES, F. G. R. Piretróides: Uma visão Geral. **Alimentos e Nutrição**, v.18, n.3, p.339-349, 2007.

SCHIMIDT, T.J. Toxic activities of sesquiterpene lactones: structural and biochemical aspects. **Current Organic Chemistry**, v.3, n.3, p.577-608, 1999.

SCHONBRUNN, E.; ESCHENBURG, S.; SHUTTLEWORTH, W. A.; SCHLOSS, J. V.; AMRHEIN, N.; EVANS, J.N.S.; KABSCH, W. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.98, n.4, 2001.

SHAKIL, N. A.; PANKAJ, KUMAR, J.; PANDEY, R. K.; SAXENA, D. B. Nematicidal prenylated flavanones from *Phyllanthus niruri*. **Phytochemistry**, v.69, p.759-764, 2008.

SILVA, A. C. & JORGE, N. Cogumelos: compostos bioativos e propriedades antioxidantes. **UNOPAR Científica: Ciências Biológicas e da Saúde**, v.13, p.375-384, 2011.

SILVA, F. L.; FISCHER, D. C. H.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Compilation of Secondary Metabolites from *Bidens pilosa* L. **Molecules**, v.16, p.1070-1102, 2011.

SILVA, M. J. D.; ENDO, L. H.; DIAS, A. L. T.; SILVA, G. A.; SANTOS, M. H.; SILVA, M. A. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos e frações orgânicas de *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. (Mimosaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.33, n.2, p.267-274, 2012.

SILVA, T. C. L.; VERAS-FILHO, J.; ARAUJO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; LIMA, V. T.; AMORIM, E. L. C. Antimicrobial activity of three species of *Phyllanthus* (quebra pedra) and its comercial product. *Revista de Enfermagem*, v. 4, n.1, p.93-97, 2010.

SIMOES, C. M. O.; Schenkel, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária intenção da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, n.1, p.35-40, 2002.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods of Enzymology**, p.152-178, 1999.

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

SOUSA, C. M. M.; ROCHA e SILVA, H.; VIEIRA-Jr, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAUJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAUJO, P. B. M.; BRANDAO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v.30,n. 2,n p.351-355, 2007.

SOUZA,V.C.; BORTOLUZZI,R.L.C. 2010. **Senna** In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/download?vol1.pdf>>. Acesso em: 23 dez. 2012.

SOUZA-FILHO, A. P. S.; BAYMA, J. C.; GUILHON, G. M. S. P.; ZOGHBI, M. G.B. Atividade potencialmente alelopática do óleo essencial de *Ocimum americanum*. **Planta Daninha**, v.27, n.3, p.499-505, 2009.

SOUZA-FILHO, A. P.S.; SANTOS, R.A.; SANTOS, L.S.; GUILHON, G.M.P.; SANTOS, A.S.; ARRUDA, M.S.P.; MULLER, A.H.; ARRUDA, A.C. Potencial alelopático de *Myrcia guianensis*. **Planta Daninha**, v.24, n.4, p.649-656, 2006.

SOUZA-FILHO, A.P., RODRIGUES, L.R.A., & RODRIGUES, T.J.D. Efeitos do potencial alelopático de três leguminosas forrageiras sobre três invasoras de pastagens. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 32: 165-170, 1997.

SPRENGER, R. F.; FERNANDES, J. B.; CASS, Q. B. Caracterização fitoquímica de duas espécies de *Phyllanthus* (Quebra-pedra) por Cromatografia líquida hifenada a espectrometria de massa de múltiplos estágios. In: Anais da 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011.

STIEVEN, A. C.; MOREIRA, J. J. S.; SILVA, C. F. Óleos essenciais de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess): avaliação das atividades microbiana e antioxidante. **Eclética Química**, v.34, n.3, p.7-16, 2009.

STRATIL, P., KLEJDUS, B., KUBAN, V. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables evaluation of spectrophotometric methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.607-616, 2006.

TAMURA, S.; FUKAMIYA, N.; OKANO, M.; KPYAMA, J.; KOIKE, K.; TOKUDA, H.; AOI, W.; TAKAYASU, J.; KUCHIDE, M.; NISHINO, H. Three new quassinoids, Ailantinol E, F and G, from *Ailanthus altissima*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.51, n.4, p.385-389, 2003.

TEKWU, E. M.; PIEME, A. C.; BENG, V. P. Investigations of antimicrobial activity of some Cameroonian medicinal plant extracts against bacteria and yeast with gastrointestinal relevance. **Journal of Ethnopharmacology**, v.142, p.265-276, 2012.

TITANJI, V.P.K.; ZOFOU, D.; NGEMENYA, M.N. The antimalarial potential of medicinal plants used for the treatment of malaria in cameroonian folk medicine. **Africa Journal Traditional**, v.5, n.3, p. 302-321, 2008.

TOMA, W.; GRACIOSO, J. S.; HIRUMA-LIMA, C. A.; ANDRADE, F. D. P.; VILEGAS, W.; SOUZA BRITO, A. R. M. Evaluation of the analgesic and antiedematogenic activities of Quassia amara bark extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v.85, p.19-23, 2003.

TONA, L.; CIMANGA, R. K.; MESIA, K.; MSUAMBA, C. T.; DE BRUYNE, T.; APERS, S.; HERNANS, N.; VAN-MIERT, S.; PIETERS, L.; TOTTÉ, J.; VLIETINCK, A.J. In vitro antiplasmodial activity of extract and fractions from seven medicinal plants used

in the Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, v.93, p.27-32, 2004.

TONA, L.; MESIA, K.; NGIMBI N. P.; CHRIMWAMI, B.; OKOND'AHOKA; CIMANGA, K.; DE BRUYNE, T.; APERS, S.; HERMANS, N.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. In-vivo antimalarial activity of **Cassia occidentalis**, **Morinda morindoides** and **Phyllanthus niruri**. **Tropical Medicine and Parasitology**, p.47-57, 2001.

TONA, L.; NGIMBI, N. P.; TSAKALA, M.; MESIA, K.; CIMANGA, K.; APERS, S.; DE BRUYNE, T. PIETERS, L.; TOTTÉ, J.; VLIETINCK, A. J. Antimalarial activity of twenty crude extracts from nine African medicinal plants used in Kinshasa, Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, n.68, p.193–203, 1999.

TRAJANO, V. N.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; TRAVASSOS, A. E. R. Propriedades antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n.3, p.542-545, 2009.

URUENA, C. CIFUENTES, C.; CASTANEDA, D.; ARANGO, A.; KAUR, P.; ASEA, A.; FIORENTINO, S. **Petiveria alliacea** extracts uses multiple mechanisms to inhibit growth of human and mouse tumoral cells. **BioMedCentral Complementary and Alternative Medicine**, v.8, n.60, p.1-17, 2008.

VADIVEL, V.; NANDETY, A.; BIESALSKI, H. K. Antioxidant potential and health relevant functionality of traditionally processed **Cassia hirsuta** L. Seeds: An Indian Underutilized Food Legume. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.66, p.245-253, 2011.

VALDÉS, H. A. L.; REGO, H. P. L. **Bidens pilosa** Linné. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.6, n.1, p. 28-33, 2001.

VARGAS, L.; BIANCHI, M. A.; RIZZARDI, M. A.; AGOSTINETTO, D.; DAL MAGRO, T. Buva (**Conyza bonariensis**) resistente ao Glyphosate na região Sul do Brasil. **Planta Daninha**, v.25, n.3, p.576-578, 2007.

VARGAS, L.; ROMAN, E. S. **Resistência de plantas daninhas a herbicidas: conceitos, origem e evolução**. Documentos online, Embrapa Trigo, ago, 2006. Disponível em: < [http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p\\_do58.pdf](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do58.pdf) > Acesso em: 12 fev 2013.

VERDI, L.G.; BRIGHENTE, I.M.C.; PIZZOLATTI, M.G. Gênero **Baccharis** (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v.28, n.1, p.85-94, 2005.

VIDAL, R.; WINKLER, L. M. **Euphorbia heterophylla** L. resistente aos herbicidas inibidores de acetolactato sintase: ii – distribuição geográfica e caracterização

genética de biótipos do planalto do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.10, n.4, p.461-465, 2004.

VIEGAS JUNIOR, C., REZENDE, A., SILVA, D.H.S., CASTRO-GAMBÔA, I., BOLZANI, V.S., BARREIRO, E.J., MIRANDA, A.L.P., ALEXANDRE-MOREIRA, M.S., YOUNG, M.C.M. Aspectos Químicos, Biológicos e Etnofarmacológicos do Gênero Cassia. **Química Nova**, v.29, n.6, p. 1-8, 2006.

VIEIRA, I. J. C.; BRAZ-FILHO, R. Quassinoids: Structural diversity, biological activity and synthetic studies. **Studies in Natural Products Chemistry**, v.33, 2006.

VIGNERON, M.; DEPARIS, X.; DEHARO, E.; BOURDY, G. Antimalarial remedies in French Guiana: A knowledge attitudes and practices study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p.351-360, 2005.

VILLAR, R.; CALLEJA, J. M.; MORALES, C.; CÁCERES, A. Screening os 17 Guatemalan Medicinal Plants for Platelet Antiaggregant Activity. **Phytotherapy research**, v.11, p.441-445, 1997.

VISWANAD, V.; ALEYKUTTY, N. A.; JAYAKAR, B.; ZACHARIA, S.M. THOMAS, L. Development and evaluation of antimicrobial herbal formulations containing the methanolic extract of *Samadera indica* for skin diseases. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v.3, n.2, p.106-111, 2012.

VYVYAN, J.R. Allelochemicals as leads for news herbicides and agrochemicals. **Tetradedron**, v.58, p.1631-1646, 2002.

WANG, R.; PENG, S.; ZENG, R.; DING, L. W.; XU, Z. Cloning, expression and wounding induction of  $\beta$ -caryophyllene synthase gene from *Mikania micrantha* H.B.K. and allelopathic potential of  $\beta$ -caryophyllene. **Allelopathy Journal**, v.24, n.1, p.35-44, 2009.

WEIR, T.L.; PARK, S.W.; VIVANCO, J.M. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. **Current Opinion in Plant Biology**, v.7, p.472-479, 2004.

WESTON, L. A.; INDERJIT. Allelopathy: A Potential Tool in the Development of Strategies for Biorational Weed Management. In: **Non-chemical Weed Management. Principles, concepts and Technology**. CAB, p. 65-76, 2007.

WHO (World Health Organization). **Diarrhoeal Disease**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/>> Acesso em: 13 mai. 2013.

WINK, M. Allelochemical Properties of Quinolizidine Alkaloids. In: **Allelopathy. Chemistry and Mode of Action of Allelochemicals**. CRC Press, p.183-195, 2004.

XUAN. T. D.; TSUZUKI, E.; TERAU, H.; MATSUO, M.; KHANH, T. D. Correlation between growth inhibitory exhibition and suspected allelochemicals (phenolic

compounds) in the extract of alfafa (medicago sativa L.). **Plant Production Science**, v.6, 2003.

ZIRIHI, G.N.; MAMBU, L.; GUÉDÉ-GUINA, F.; BODO, B.; GRELLIER, P. In vitro antiplasmodial activity and cytotoxicity of 33 West African plants used for treatment of malaria. **Journal of Ethnopharmacology**, v.98, p.281–285, 2005.

ZUANAZZI, J. A. S. & MAYORGA, P. Fitoprodutos e Desenvolvimento Econômico. **Química Nova**, v.33. n.6, p.1421-1428, 2010.



## APÊNDICES

**Apêndice 1.** Fontes de variação (FV), graus de liberdade (GL) e quadrado médio da análise de variância dos caracteres germinabilidade (GER), tempo médio de germinação (TMG), velocidade média de germinação (VMG), comprimento de radícula (RAD) e comprimento de hipocótilo (HIP), média geral e coeficiente de variação (CV), referentes às sementes de *Lactuca sativa* L. (alface), submetidas a diferentes extratores e concentrações dos extratos de diferentes plantas antimaláricas. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013.

FV	GL	Quadrado Médio				
		GER	TMG	VMG	RAD	HIP
Espécie (Es)	3	351,6*	270,5**	0,000214**	1861,4**	730,44**
Extrator (Ex)	1	1488,4**	2,9 <sup>ns</sup>	0,000000 <sup>ns</sup>	590,76**	64,26**
Concentração (C)	4	2257,7**	440,5**	0,000389**	893,78**	71,74**
C x Ex	4	336,7*	13,5 <sup>ns</sup>	0,000014 <sup>ns</sup>	74,15**	24,44**
C x Es	12	165,2 <sup>ns</sup>	56,5**	0,000043**	327,02**	42,59**
Ex x Es	3	289,2 <sup>ns</sup>	56,7*	0,000048*	320,89**	44,17**
C x Ex x Es	12	230,5*	23,3 <sup>ns</sup>	0,000019 <sup>ns</sup>	90,84**	31,75**
Erro	120	77	20,5	0,000017	10,82	6,41
Média	-	89,9	30,3	0,0342	29,08	11,73
CV(%)	-	9,75	14,9	12,1	11,3	21,6

\* e \*\* significativo a 5% e 1% de erro, respectivamente, pelo teste F; <sup>ns</sup> não significativo;

**Apêndice 2.** Fontes de variação (FV), graus de liberdade (GL) e quadrado médio da análise de variância dos caracteres germinabilidade (GER), tempo médio de germinação (TMG), velocidade média de germinação (VMG), comprimento de radícula (RAD) e comprimento de hipocótilo (HIP), média geral e coeficiente de variação (CV), referentes às sementes de *Ipomoea grandifolia* (corda-de-viola), submetidas a diferentes extratores e concentrações dos extratos de diferentes plantas antimaláricas. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013.

FV	GL	Quadrado Médio				
		GER	TMG	VMG	RAD	HIP
Espécie (Es)	3	633,17**	250,97**	0,00014**	1055,252**	231,37**
Extrator (Ex)	1	184,9 <sup>ns</sup>	226,73**	0,00010**	933,80**	107,99**
Concentração (C)	4	243,7*	162,09**	0,00011**	1023,37**	226,47**
C x Ex	4	168,15 <sup>ns</sup>	69,98**	0,000026 <sup>ns</sup>	260,37**	36,72**
C x Es	12	456,92**	98,50**	0,000051**	122,90**	66,83**
Ex x Es	3	458,5**	338,60**	0,00022**	455,87**	269,35**
C x Ex x Es	12	470,75**	100,53**	0,000053**	47,22**	60,97**
Erro	120	86,8	8,57	0,000012	10,6	10,22
Média	-	71,2	27,9	0,036	25,18	48,47
CV(%)	-	13,1	10,5	9,5	12,9	6,6

\* e \*\* significativo a 5% e 1% de erro, respectivamente, pelo teste F; <sup>ns</sup> não significativo;

**Apêndice 3.** Estimativas das regressões referentes à variável germinabilidade (GER) e coeficiente de determinação ( $r^2$ ) de *Lactuca sativa* L. (alface) e *Ipomoea grandifolia* (corda-de-viola), sobre o efeito de diferentes extratores (etanol e diclorometano) e concentrações (0, 25%, 50%, 75% e 100%) de extratos de quatro plantas antimaláricas. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013.

Espécie	Extrator	Equações de regressão	$r^2$
Y = Germinabilidade de alface (%)			
<i>B. pilosa</i>	Etanol	$y = 98,6 - 0,164x$	0,83
<i>B. pilosa</i>	Diclorometano	$y = 97,6 - 0,192x$	0,7
<i>P. niruri</i>	Etanol	$y = 97,0 + 0,196x - 0,004000x^2$	0,93
<i>P. niruri</i>	Diclorometano	$y = 101,0 - 0,408x$	0,98
<i>P. alliacea</i>	Etanol	$y = 92,7 + 0,657x - 0,0166x^2 + 0,0000960x^3$	0,93
<i>P. alliacea</i>	Diclorometano	$y = 99,2 - 0,128x$	0,89
<i>S. hirsuta</i>	Etanol	$y = 98,4 - 0,0400x$	0,89
<i>S. hirsuta</i>	Diclorometano	$y = 98,6 - 0,405x + 0,0159x^2 - 0,000165x^3$	0,98
Germinabilidade de corda-de-viola (%)			
<i>B. pilosa</i>	Etanol	$Y = 74,6 + 0,604X - 0,00880X^2$	0,91
<i>B. pilosa</i>	Diclorometano	$Y = 68,6 + 0,096X$	0,65
<i>P. niruri</i>	Etanol	$Y = 65,08 - 0,187X + 0,004228X^2$	0,88
<i>P. niruri</i>	Diclorometano	$Y = 78,02 - 0,674X + 0,00594X^2$	0,73
<i>P. alliacea</i>	Etanol	$Y = 66,4$	-
<i>P. alliacea</i>	Diclorometano	$Y = 67,4$	-
<i>S. hirsuta</i>	Etanol	$Y = 70,4$	-
<i>S. hirsuta</i>	Diclorometano	$Y = 69,7 + 0,495X - 0,00343X^2$	0,88

**Apêndice 4.** Estimativas das regressões referentes à variável tempo médio de germinação (TMG) e coeficiente de determinação ( $r^2$ ) de *Lactuca sativa* L. (alface), sobre o efeito de diferentes concentrações (0, 25%, 50%, 75% e 100%) de extratos de quatro plantas antimaláricas. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013.

Espécie	Equações de regressão	$r^2$
Tempo médio de germinação (h)		
<i>B. pilosa</i>	$y = 26,8 + 0,0346x$	0,41
<i>P. niruri</i>	$y = 26,5 + 0,0803x$	0,87
<i>P. alliacea</i>	$y = 24,9 + 0,1772x$	0,99
<i>S. hirsuta</i>	$y = 24,6 + 0,0700x$	0,73

**Apêndice 5.** Estimativas das regressões referentes à variável tempo médio de germinação (TMG) e coeficiente de determinação ( $r^2$ ) de *Ipomoea grandifolia* (corda-de-viola), sobre o efeito de diferentes extratores (etanol e diclorometano) e concentrações (0, 25%, 50%, 75% e 100%) de extratos de quatro plantas antimaláricas. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013.

Espécie	Extrator	Equações de regressão	$r^2$
Tempo médio de germinação (h)			
<i>B. pilosa</i>	Etanol	$y = 26,04 - 0,0862x + 0,00411x^2$	0,96
<i>B. pilosa</i>	Diclorometano	$y = 26,1$	-
<i>P. niruri</i>	Etanol	$y = 25,9$	-
<i>P. niruri</i>	Diclorometano	$24,8 + 0,0371x$	0,63
<i>P. alliacea</i>	Etanol	$y = 26,4$	-
<i>P. alliacea</i>	Diclorometano	$y = 27,6$	-
<i>S. hirsuta</i>	Etanol	$y = 26,9$	-
<i>S. hirsuta</i>	Diclorometano	$y = 27,2 - 0,109x + 0,00122x^2$	0,81

**Apêndice 6.** Estimativas das regressões referentes à variável velocidade média de germinação (VMG) e coeficiente de determinação ( $r^2$ ) de *Lactuca sativa* L. (alface), sobre o efeito de diferentes concentrações (0, 25%, 50%, 75% e 100%) de extratos de quatro plantas antimaláricas. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013.

Espécie	Equações de regressão	$r^2$
Velocidade média de germinação (sementes $h^{-1}$ )		
<i>B. pilosa</i>	$y = 0,0374 - 0,00003503x$	0,39
<i>P. niruri</i>	$y = 0,0377 - 0,0000778x$	0,91
<i>P. alliacea</i>	$y = 0,0387 - 0,000154x$	0,98
<i>S. hirsuta</i>	$y = 0,0399 - 0,0000755x$	0,77

**Apêndice 7.** Estimativas das regressões referentes à variável velocidade média de germinação (VMG) e coeficiente de determinação ( $r^2$ ) de *Ipomoea grandifolia* (corda-de-viola), sobre o efeito de diferentes extratores (etanol e diclorometano) e concentrações (0, 25%, 50%, 75% e 100%) de extratos de quatro plantas antimaláricas. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013.

Espécie	Extrator	Equações de regressão	$r^2$
Velocidade média de germinação (sementes $h^{-1}$ )			
<i>B. pilosa</i>	Etanol	$y = 0,038 - 0,0000108x - 0,000002151x^2$	0,92
<i>B. pilosa</i>	Diclorometano	$y = 0,039$	-
<i>P. niruri</i>	Etanol	$y = 0,039$	-
<i>P. niruri</i>	Diclorometano	$y = 0,040 - 0,0000487x$	0,72
<i>P. alliacea</i>	Etanol	$y = 0,038$	-
<i>P. alliacea</i>	Diclorometano	$y = 0,037$	-
<i>S. hirsuta</i>	Etanol	$y = 0,038$	-
<i>S. hirsuta</i>	Diclorometano	$y = 0,036 + 0,000157x - 0,00000173x^2$	0,78

**Apêndice 8.** Estimativas das regressões referentes à variável comprimento de radícula (RAD) e coeficiente de determinação ( $r^2$ ) de *Lactuca sativa* L. (alface) e *Ipomoea grandifolia* (corda-de-viola), sobre o efeito de diferentes extratores (etanol e diclorometano) e concentrações (0, 25%, 50%, 75% e 100%) de extratos de quatro plantas antimaláricas. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013.

Espécie	Extrator	Equações de regressão	$r^2$
Comprimento de radícula de alface (mm)			
<i>B. pilosa</i>	Etanol	$y = 38,62 + 0,0199x - 0,00289x^2$	0,74
<i>B. pilosa</i>	Diclorometano	$y = 37,44 + 0,688x - 0,00824x^2$	0,83
<i>P. niruri</i>	Etanol	$y = 34,55 + 0,216x - 0,00329x^2$	0,73
<i>P. niruri</i>	Diclorometano	$y = 40,65 + 0,275x - 0,0129x^2 + 0,0000921x^3$	0,98
<i>P. alliacea</i>	Etanol	$y = 36,75 - 0,992x + 0,0215x^2 - 0,000132x^3$	0,88
<i>P. alliacea</i>	Diclorometano	$y = 34,15 - 0,558x + 0,0118x^2 - 0,0000697x^3$	0,98
<i>S. hirsuta</i>	Etanol	$y = 32,03 - 0,403x + 0,00224x^2$	0,99
<i>S. hirsuta</i>	Diclorometano	$y = 29,04 - 0,5401x + 0,00472x^2$	0,86
Comprimento de radícula de corda-de-viola (mm)			
<i>B. pilosa</i>	Etanol	$y = 38,68 - 0,263x$	0,97
<i>B. pilosa</i>	Diclorometano	$y = 40,14 + 0,324x - 0,00436x^2$	0,95
<i>P. niruri</i>	Etanol	$y = 33,10 - 0,954x + 0,0184x^2 - 0,000104x^3$	0,99
<i>P. niruri</i>	Diclorometano	$y = 31,50 - 0,543x + 0,00442x^2$	0,99
<i>P. alliacea</i>	Etanol	$y = 33,73 - 0,496x + 0,00316x^2$	0,98
<i>P. alliacea</i>	Diclorometano	$y = 24,36$	-
<i>S. hirsuta</i>	Etanol	$y = 38,18 - 0,452x + 0,00189x^2$	0,93
<i>S. hirsuta</i>	Diclorometano	$y = 28,22 - 0,0620x$	0,41

**Apêndice 9.** Estimativas das regressões referentes à variável comprimento de hipocótilo (HIP) e coeficiente de determinação ( $r^2$ ) de *Lactuca sativa* L. (alface) e *Ipomoea grandifolia* (corda-de-viola), sobre o efeito de diferentes extratores (etanol e diclorometano) e concentrações (0, 25%, 50%, 75% e 100%) de extratos de quatro plantas antimaláricas. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2013.

Espécie	Extrator	Equações de regressão	$r^2$
Comprimento de hipocótilo de alface (mm)			
<i>B. pilosa</i>	Etanol	$y = 13,00 - 0,197x + 0,00118x^2$	0,82
<i>B. pilosa</i>	Diclorometano	$y = 9,59 - 0,144x + 0,00128x^2$	0,8
<i>P. niruri</i>	Etanol	$y = 15,93 - 0,342x + 0,00297x^2$	0,93
<i>P. niruri</i>	Diclorometano	$y = 12,52 - 0,212x + 0,00173x^2$	0,77
<i>P. alliacea</i>	Etanol	$y = 13,26 + 0,337x - 0,0030x^2$	0,66
<i>P. alliacea</i>	Diclorometano	$y = 14,83$	-
<i>S. hirsuta</i>	Etanol	$y = 18,05 - 0,524x + 0,0106x^2 - 0,0000593x^3$	0,99
<i>S. hirsuta</i>	Diclorometano	$y = 13,96$	-
Comprimento de hipocótilo de corda-de-viola (mm)			
<i>B. pilosa</i>	Etanol	$y = 51,43 - 0,0685x$	0,37
<i>B. pilosa</i>	Diclorometano	$y = 53,22 - 0,348x + 0,0106x^2 - 0,0000865x^3$	0,99
<i>P. niruri</i>	Etanol	$y = 49,92 - 0,204x + 0,00163x^2$	0,54
<i>P. niruri</i>	Diclorometano	$y = 46,66 + 0,403x - 0,0112x^2 + 0,0000642x^3$	0,99
<i>P. alliacea</i>	Etanol	$y = 55,17 - 0,142x$	0,82
<i>P. alliacea</i>	Diclorometano	$y = 51,03$	-
<i>S. hirsuta</i>	Etanol	$y = 55,35$	-
<i>S. hirsuta</i>	Diclorometano	$y = 49,59 - 0,0652x$	0,41