

1 INTRODUÇÃO

O fornecimento de substâncias de origem vegetal com aplicação no tratamento de doenças tem sido de grande interesse na medicina tradicional.

Documentos históricos, tais como a *Tabuinha sumeriana*, fragmentos do *Papyrus Ebers*, *Matéria Médica* e *El libro de medicina interna Del Emperador Amarillo*, mostram a relação do homem com as plantas, demonstrando o interesse do homem no uso destas para o tratamento de suas enfermidades. Foi por meio do tratamento com as plantas medicinais que surgiu a Fitoterapia, cuja origem grega (*phtoi* = plantas e *qerapa* = tratamento) se caracteriza como a terapêutica por meio de plantas frescas, secas e seus preparados (MIGUEL; MIGUEL, 1999, p. 11-17).

O desenvolvimento dos fármacos a partir de plantas pode ser dividido em três períodos. O primeiro período entre 1800 e 1900 foi marcado pela descoberta de vários fármacos entre eles, morfina da *Papaver somniferum*, efedrina da *Ephedra sinica*, quinina da *Cinchona calisaya*, emetina e a cephaelina da *Cephalis ipeccacuanha*, e a salicina de *Salix alba* (que posteriormente originou o ácido acetilsalicílico). No segundo período, entre 1901 e 1970/80 aparecem somente os antibióticos obtidos dos fungos como produtos naturais de importância, sendo este período marcado pela síntese e consideração das plantas medicinais sem valor científico. No terceiro período, que compreende de 1970/80 até o presente, ocorre o retorno à busca de drogas vegetais com a descoberta de inúmeros fármacos, citando a artemisinina (presente na *Artemisia annua*) e o paclitaxel (taxol) isolado de *Taxus brevifolia* como exemplos (YUNES; CECHINEL FILHO, 2001, p. 17-75).

O promissor mercado de fitoterápicos atinge na Europa e na Ásia aproximadamente sete bilhões e quatro bilhões de dólares ao ano respectivamente, mas o maior crescimento de utilização de fitoterápicos é observado nos Estados Unidos, aonde cerca de 60 milhões de americanos fazem uso dos mesmos (CALIXTO, 2001, p. 297-315).

Inúmeros fatores têm contribuído para a busca de novos fármacos a partir de substâncias encontradas em plantas. Pode-se citar a grande aceitação por parte da população cujo entendimento encontra apoio na afirmação de que “o que é natural não faz mal”, a preferência por tratamentos “naturais” aliados a grande demanda de mercado e a recomendação da Organização Mundial da Saúde e seus países membros, a qual recomenda a pesquisa e o uso das plantas medicinais na terapêutica. Ainda nesta perspectiva o avanço tecnológico do domínio das patentes internacionais sobre nossas plantas, os grandes investimentos da indústria nacional de fitoterápicos na pesquisa fitoquímica, farmacológica e clínica tem representado fator determinante na busca de novos fármacos (MIGUEL; MIGUEL, 1999, p. 11-17, CALIXTO, 2001, p. 297-315, YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001, p. 147-152). Resultados satisfatórios com a aplicação direta no desenvolvimento tecnológico de substâncias ativas de origem vegetal com aplicação industrial são apresentados pela fitoquímica (YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001, p. 147-152). A fitoquímica aplicada tem viabilizado estudos multidisciplinares integrados (MACIEL, *et al.*, 2002, p. 429-438).

Atualmente estima-se que existam aproximadamente 500.000 espécies de plantas terrestres, metade constituída pelas angiospermas das quais são conhecidos aproximadamente 50.000 metabólitos secundários (MONTANARI; BOLZANI, 2001, p. 105-111). Os produtos químicos oriundos das plantas são divididos em metabólitos primários e secundários; antigamente pensava-se que estes eram apenas subprodutos dos metabólitos primários, mas atualmente aceita-se que estes metabólitos secundários são responsáveis por diversas ações, entre elas, defesa, atração de polinizadores e alelopatia (SIMÕES *et al.*, 2000, p. 67).

Para adquirir maior proporção de recursos (luz, água, macro e micronutrientes), as espécies adotam estratégias associadas com a produção de compostos químicos, denominando a alelopatia (MALHEIROS; PERES, 2001 p. 503-523).

O estudo alelopático vem contribuir para a busca de substâncias capazes de

atuar como agentes herbicidas no cultivo de plantas medicinais, uma vez que os mesmos são modelos de herbicidas naturais (MALHEIROS; PERES, 2001, p. 503-523). O uso de agroquímicos proporciona a obtenção de drogas medicinais expostas a produtos tóxicos inviabilizando as mesmas como matéria-prima para produção de medicamentos e como toda matéria-prima destinada a este fim, esta deve possuir qualidade. Nessa perspectiva entende-se droga com qualidade química, sanitária e livre de agrotóxicos.

Todas estas proposições justificam a pesquisa alelopática aplicada da *Aster lanceolatus*, uma vez que pode representar a identificação de substâncias com provável aplicação na indústria de fitoterápicos e na indústria de insumos agrícolas.

1.1 OBJETIVO GERAL

Realizar estudo alelopático aplicado de *Aster lanceolatus*, Willd.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Submeter os extratos e suas respectivas frações ao estudo da atividade alelopática.
- b) Submeter as frações à cromatografia gasosa.
- c) Identificar os constituintes do óleo essencial.
- d) Submeter a água aromática ao estudo da atividade alelopática.
- e) Isolar e identificar constituintes químicos com provável atividade alelopática, utilizando-se frações com melhores resultados no estudo alelopático.
- f) Realizar estudo alelopatográfico utilizando-se constituintes químicos isolados, com intuito de evidenciar a provável atividade alelopática.
- g) Isolar marcadores químicos da referida espécie.
- h) Submeter os extratos ao estudo da atividade antimicrobiana.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Realizou-se levantamento bibliográfico do gênero *Aster*, da espécie *Aster lanceolatus* e seus sinônimos no Biological Abstracts (1973-2003), Chemical Abstracts (1973-2003), Cab Abstracts (1972-2003), Medline (1966-03/2003), International Pharmaceuticals Abstracts (1970-2003), Lilacs (1990-03/2003), Sport Discus (1830-01/2004), PsycINFO (1966-2003) e Life Sciences (1990-2003).

2.1 ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DE *Aster lanceolatus*, Willd.

QUADRO 1 - ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DE *Aster lanceolatus*

	Segundo ENGLER (JOLY, 1998)	SEGUNDO CRONQUIST (1981)
Divisão	Angiospermae (Anthophyta)	Magnoliophyta
Classe	Dicotyledoneae	Magnoliopsida
Subclasse	Sympetalae (Gamopetalae)	Asteridae
Ordem	Campanulales (Synandreae)	Asterales
Família	Compositae	Asteraceae
Gênero	<i>Aster</i>	<i>Aster</i>
Espécie	<i>Aster lanceolatus</i> , Willd.	<i>Aster lanceolatus</i> , Willd.

2.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA ASTERACEAE

Compreende a maior família das angiospermas com aproximadamente 23.000 espécies, 1535 gêneros e representa aproximadamente 10% da flora mundial. Nos últimos 25 anos a família Asteraceae tem sido estudada em diversas áreas tais como anatomia, morfologia, ecologia, ontogenia, fitoquímica, estrutura macromolecular e citogenética (NAKAJIMA; SEMIR, 2001, p. 471-478).

Plantas de hábito variado, ervas, subarbustos, trepadeiras ou excepcionalmente árvores. Constitui a maioria dos gêneros de plantas de pequeno

porte. Apresentam folhas variadas, inteiras ou fendidas, de disposição alterna ou oposta, latescentes ou não. As flores estão reunidas em inflorescência característica (capítulo), de simetria radial bilabiadas, hermafrodita ou de sexo separado, pentâmeras, com cálice modificado. Androceu formado por cinco estames férteis. Ovário sempre ínfero, somente com um óvulo ereto (JOLY, 1998, p. 628-638).

Distribuição cosmopolita, melhor representada em clima temperado e subtropical aonde não existam densas florestas. Espécies de vários gêneros são cultivadas para ornamentos e poucas para alimentação e produção de óleos (CRONQUIST, 1981, p. 1021-1028).

Significativa diversidade da família Asteraceae é encontrada no Brasil, demonstrada por NAKAJIMA e SEMIR (2001, p. 471-478) ao apresentarem uma listagem florística das espécies da família Asteraceae no Parque Nacional da Serra da Canastra no Estado de Minas Gerais com 215 espécies pertencentes a 66 gêneros e 11 tribos.

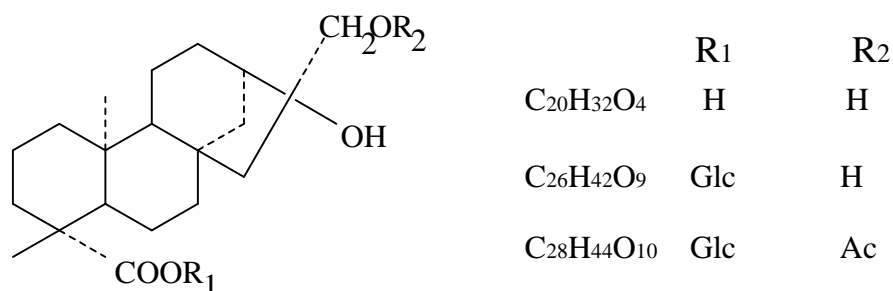
As plantas da família Asteraceae podem apresentar poliacetilenos, lactonas sesquiterpênicas, óleos essenciais voláteis terpenóides, monoterpenos voláteis, alcalóides, látex com triterpenos (CRONQUIST, 1981, p. 1021-1028), saponinas triterpenóides pentacíclicas (EVANS, 2002, p. 297), antocianinas (TAKEDA; HARBORNE; SELF, 1986, p. 1337-1342) e flavonóides (MARKHAM, 1982, p. 10-12).

HUDSON *et al.* (1993, p. 447-450) compararam atividade antibiótica, antiviral e citotóxica de tertiofenos e polienos isolados de espécies da família Asteraceae, evidenciando-se os tertiofenos com maior atividade antibiótica e citotóxica em relação ao controle α -tertienil.

2.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO *Aster*

A *Aster ageratoides* Turcz. apresenta larga distribuição na China e possui propriedades antipirética, desintoxicante e expectorante. Esta espécie é utilizada na medicina popular chinesa para tratamento de febre, resfriado, bronquite, picada de cobra e picada de abelha. Apresenta flavonas, saponinas, açúcares e ésteres (CHENG D-L *et al.*, 1993, p. 1181-1183). CHENG D-L *et al.* (1993, p. 1181-1183) relatam a identificação de constituintes químicos nesta espécie, apresentados na figura 1.

FIGURA 1- CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Aster ageratoides*



FONTE: CHENG *et al.*, 1993, p. 1181-1183.

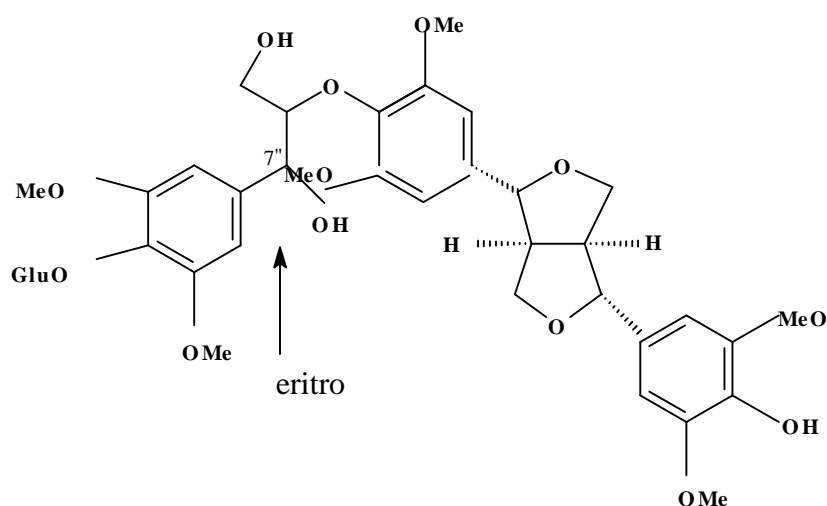
WANG e YU (1998, p. 711-717) isolaram um glucosídeo lignânico (Figura 2), de extrato etanólico das raízes de *Aster auriculatus*.

A *Aster batangensis* é utilizada na medicina popular chinesa contra picadas de cobras. Desta espécie, identificaram-se saponinas triterpenóides denominadas asterbatanosídeos D e E (SHAO *et al.*, 1995c, p. 246-249), asterbatanosídeos F, G, H e I (SHAO *et al.*, 1995b, p. 927-933) e asterbatanosídeos J e K (SHAO *et al.*, 1995a, p. 875-881) da fração n-butanol provinda de extrato etanólico das raízes de *Aster batangensis*. SHAO *et al.* (1996, p. 1593-1598) isolaram um diglicosídeo fenólico denominado asterbatanosídeo A (Figura 3) e duas saponinas triterpenóides denominadas asterbatanosídeo B e asterbatanosídeo C da referida espécie.

Saponinas triterpenóides isoladas de *Aster lingulatus* (asterlingulatosídeos A, B, C e D – figura 4) demonstraram efeito inibitório na incorporação de [³H]-timidina no

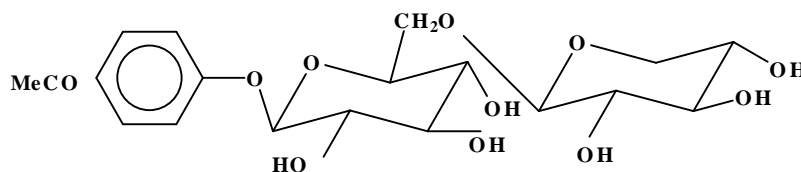
DNA de células HL60 (leucemia humana) (SHAO *et al.*, 1997a, p. 337-340; SHAO *et al.*, 1997b, p. 743-746). SHAO *et al.* (1998, p. 609-612) isolaram da *Aster lingulatus* um diterpeno linear denominado lingulatusina (Figura 5).

FIGURA 2 – ESTRUTURA QUÍMICA DO GLUCOSÍDEO LIGNÂNICO DE *Aster auriculatus*



FONTE: WANG; YU, 1998, P. 711-717.

FIGURA 3 – ESTRUTURA QUÍMICA DO COMPOSTO ASTERBATANOSÍDEO A



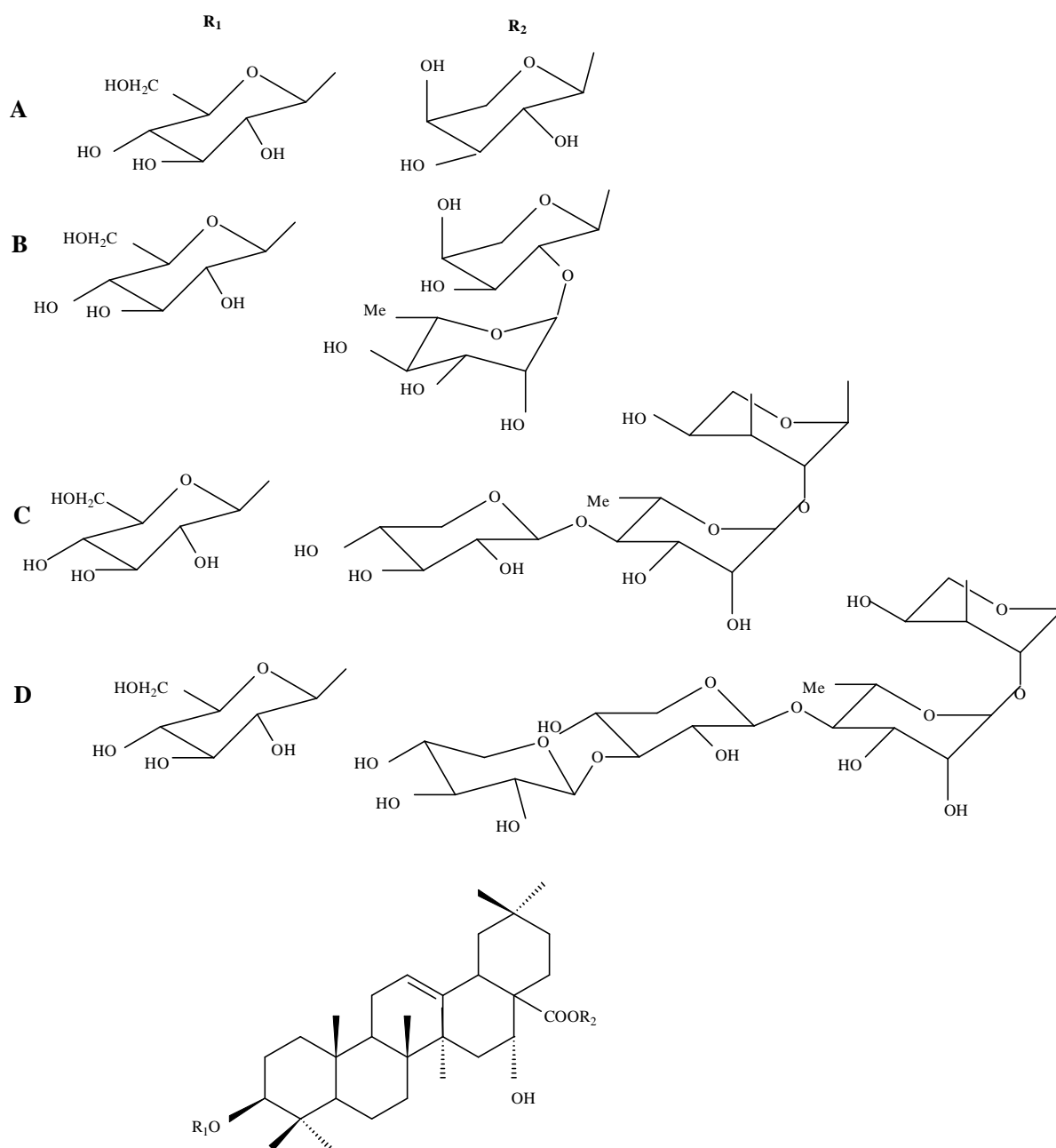
FONTE: SHAO *et al.*, 1996, p.1593-1598.

Da *Aster praealtus* identificaram-se oito cumarinas: umbeliferona, marmina, epoxiaurapteno, cicloaurapteno, praealtina A ($C_{21}H_{24}O_5$), praealtina B e C ($C_{24}H_{30}O_5$) e praealtina D ($C_{19}H_{24}O_6$) (WILZER *et al.*, 1989, p. 1729-1735).

HE e PAN (1992, p. 388) estudaram a *Aster poliothamnus*, uma planta nativa do noroeste da China, utilizada na medicina chinesa para tratamento de gripe, tosse e algumas doenças urinárias, e identificaram o α -espinasterol- β -D-glucopiranosídeo

como principal composto demonstrando atividade diurética em ratos semelhante à atividade do controle clortiazida. A presença de espinasteróis no gênero *Aster* foi relatada pela primeira vez por meio deste trabalho.

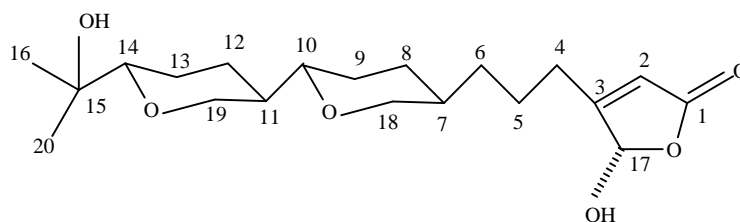
FIGURA 4 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS COMPOSTOS ASTERLINGULATOSÍDEOS A, B, C e D



FONTE: SHAO *et al.*, 1997b, p. 743-746.

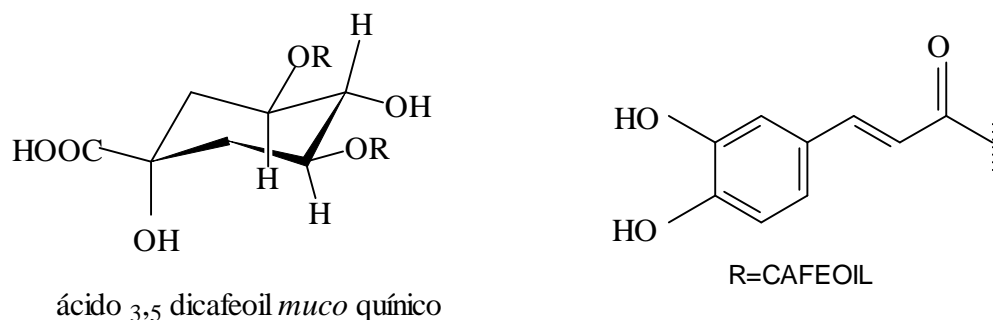
NOTA: A inclusão de diferentes radicais forma as estruturas denominadas Asterlingulatosídeos A,B,C e D.

FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO DA SUBSTÂNCIA LINGULATOSINA,



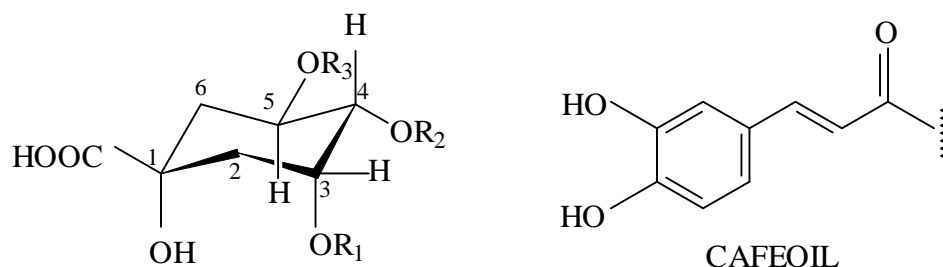
FONTE: SHAO *et al.*, 1998, p. 609-612.

Da *Aster scaber*, KWON *et al.* (2000, p. 1796-1798) identificaram um novo ácido cafeoil quínico (3,5-dicafeoil-*muco*-quínico – figura 6) e avaliaram a atividade deste sobre HIV-1-integrase juntamente com outros três ácidos cafeoil quínicos conhecidos (ácido 3,5-dicafeoil quínico, ácido 4,5 dicafeoil quínico e ácido 5-cafeoil quínico – figura 7), o qual demonstrou maior atividade antiviral. Os quatro compostos relatados anteriormente, foram testados em células PC12 por HUR *et al.* (2001, p.921-924) que demonstraram que o composto 3,5-dicafeoil-*muco*-quínico apresenta maior neuroproteção contra toxicidade induzida por proteína β amilóide e o composto 3,5-dicafeoil-quínico maior efeito neurotrófico, havendo sugestão por parte dos autores à utilização destes compostos como agentes terapêuticos em doenças neurodegenerativas.

FIGURA 6 – ESTRUTURA QUÍMICA DO COMPOSTO 3,5 dicafeoil-*muco*-quínico

FONTE: KWON *et al.*, 2000, p. 1796-1798.

FIGURA 7 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS COMPOSTOS ácido 3,5 dicafeoil quínico, ácido 4,5 dicafeoil quínico e ácido 5 cafeoil quínico



$R_1=R_3=\text{cafeoil}$ $R_2=\text{H}$ (ácido 3,5 dicafeoil quínico)

$R_1=\text{H}$ $R_2=R_3=\text{cafeoil}$ (ácido 4,5 dicafeoil quínico)

$R_1=R_2=\text{H}$ $R_3=\text{cafeoil}$ (ácido 5 cafeoil quínico)

FONTE: KWON *et al.*, 2000, p. 1796-1798.

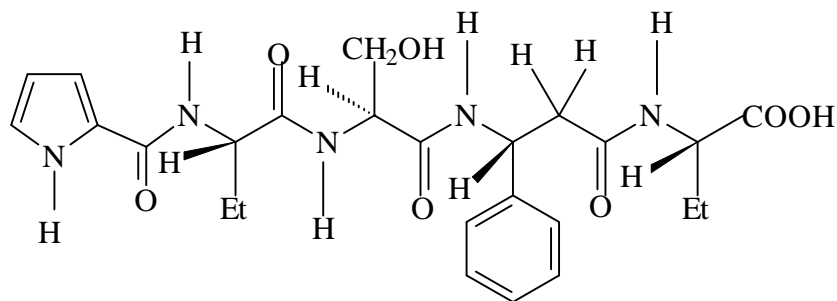
NOTA: Com inclusão de diferentes radicais obtêm-se diferentes estruturas.

ALMEIDA *et al.* (1995, p. 428-433) pesquisaram a atividade antidiarréica da *Aster squamatus*, conhecida popularmente como zé-da-silva e verificaram bom potencial antidiarreico, com aumento de absorção de água no intestino e redução da intensidade da propulsão gastrointestinal, nos animais testados.

MORITA *et al.* (1993, p. 992-993) identificaram em extrato butanólico de *Aster tataricus* pentapeptídeos cíclicos denominados astin A, B e C, que apresentaram atividade antitumor em sarcoma 180 de ratos. Da *Aster tataricus* CHENG e SHAO (1994, p.173-176) relatam a identificação na fração acetato de etila um glicosídeo monoterpênico (shionosídeo C) e na fração butanol um glicosídeo triterpênico (aster saponina G), ambas as frações provenientes de extrato etanólico das raízes.

CHENG *et al.* (1994, p. 945-948) identificaram a partir da fração acetato de etila de extrato etanólico de raízes de *Aster tataricus*, três oligopeptídeos, denominados asterinina A, B e C. MORITA *et al.* (1995, p. 271-273) identificaram em extrato butanólico de *Aster tataricus* um peptídeo acíclico denominado astin J (Figura 8), compararam sua atividade citotóxica (contra células L1210, P388 e KB) com o composto cíclico denominado astin C (Figura 9) e demonstraram a importância da ciclização para a atividade citotóxica.

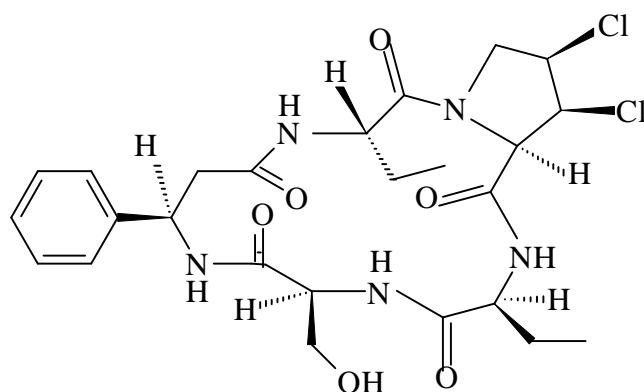
FIGURA 8 – ESTRUTURA QUÍMICA DO COMPOSTO ASTIN J



ASTIN J

FONTE: MORITA *et al*, 1993, p. 992-993.

FIGURA 9 – ESTRUTURA QUÍMICA DO COMPOSTO ASTIN C



ASTIN C

FONTE: MORITA *et al*, 1993, p. 992-993.

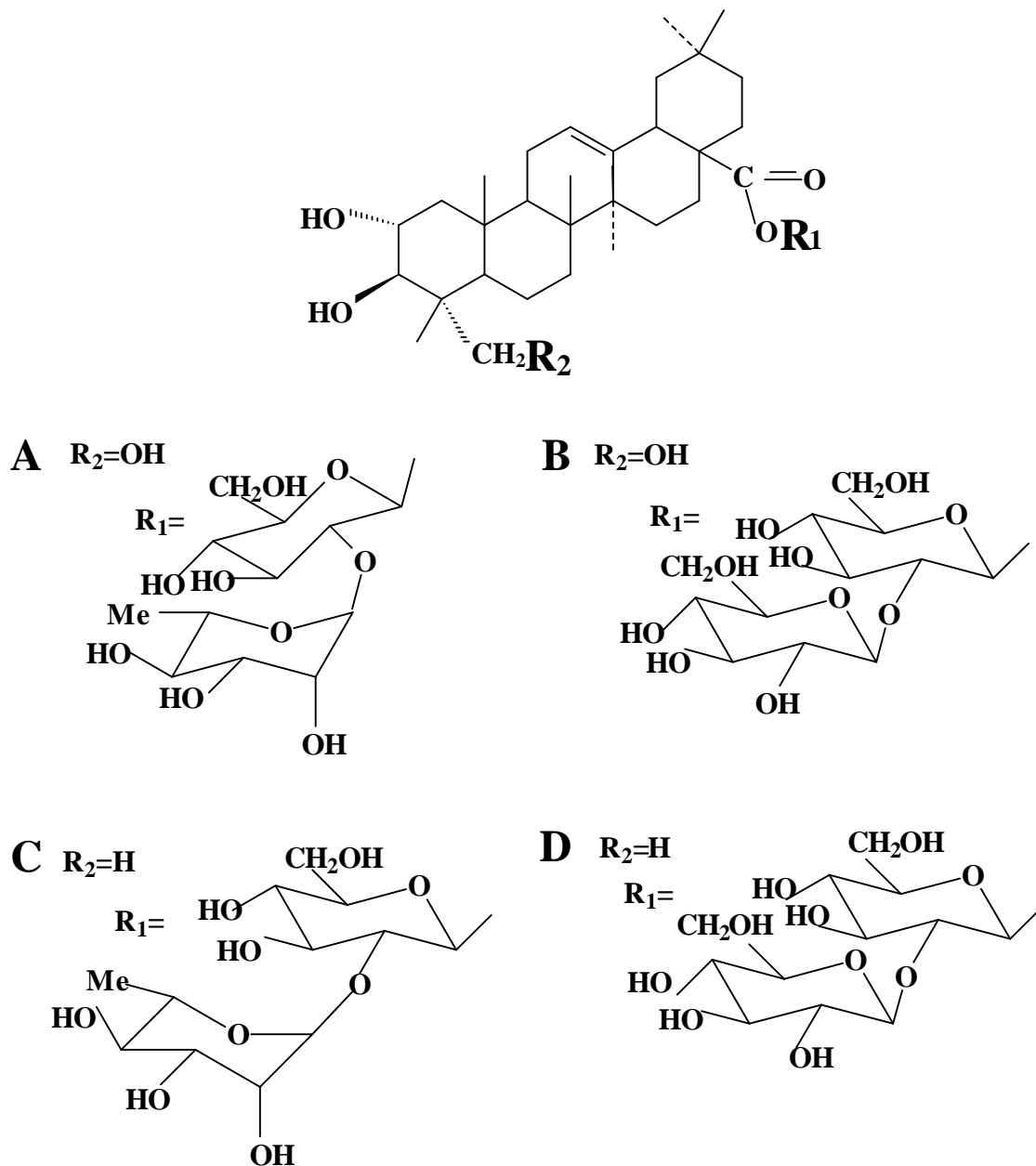
CHENG *et al.* (1996, p. 225-227) identificaram em *Aster tataricus*, três pentapeptídeos denominados asterinina D, E e F.

A *Aster tongolensis*, utilizada no Tibet em substituição a *Aster poliothamnus*, foi estudada por TAN, HU e LIU (1993, p. 1917-1922) e identificados compostos terpenóides: β -sitosterol, α -amirina e β -amirina.

A fração n-butanol (obtida de extrato etanólico de raízes) de *Aster yunnanensis* apresenta ação analgésica e sedativa (SHAO *et al.*, 1995e, p. 1487-1492, SHAO *et al.*, 1995f, p. 446-449, SHAO; ZHOU, 1995, p. 837-842). Pesquisas realizadas com a referida fração butanol revelaram saponinas triterpenóides, denominadas asteriunanosídeos A, B, C, D (Figura 10) (SHAO *et al.*, 1995e, p. 1487-1492), asteriunanosídeo E (SHAO *et al.*, 1995d, p. 675-680), asteriunanosídeos F, G

(SHAO *et al.*, 1995f, p. 446-449) e asteriunanosídeo H (SHAO; ZHOU, 1995, p. 837-842). Identificou-se também um composto denominado asteriunanosídeo I, um glicosídeo acetilênico (Figura 11) (SHAO *et al.*, 1995d, p. 675-680).

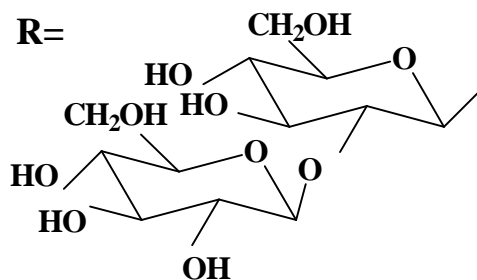
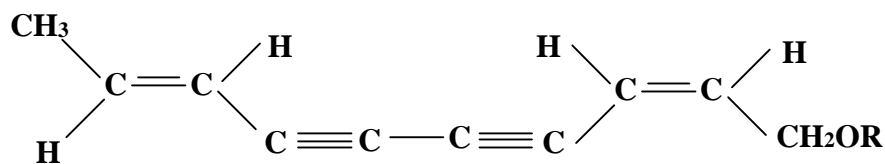
FIGURA 10 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS COMPOSTOS ASTERIUNANOSÍDEOS A, B, C e D



FONTE: SHAO *et al.*, 1995e, p. 1487-1492.

NOTA: A inclusão de diferentes radicais forma as estruturas denominadas asteriunanosídeos A, B, C e D.

FIGURA 11 – REPRESENTAÇÃO DO COMPOSTO ASTERIUNANOSÍDEO I



FONTE: SHAO *et al.*, 1995d, p. 675-680.

2.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE *Aster lanceolatus*, Willd.

2.4.1 Sinonímia Vulgar

Áster arbustiva, monte cassino (LORENZI; SOUZA, 1995, p. 269) e margarida-de-são-miguel (FERRONATO, 2000, p. 4).

2.4.2 Sinonímia Científica

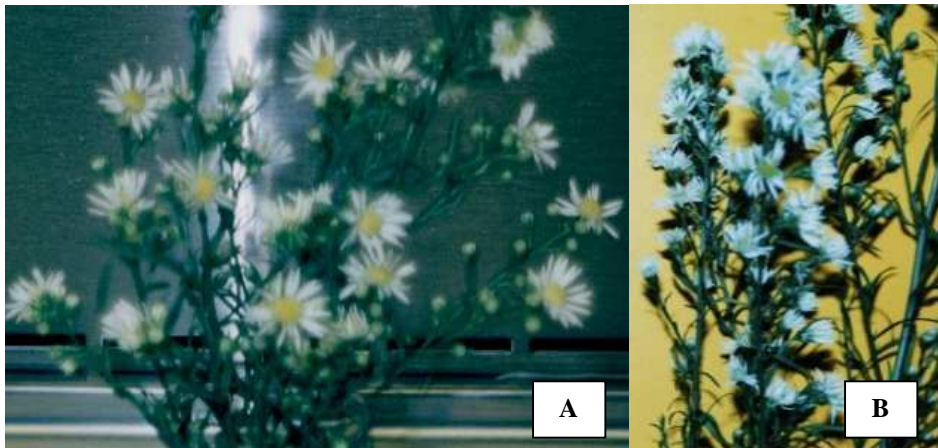
- Segundo INDEX KEWENSIS (1997): *Aplopappus lanceolatum*; *Aster lanceolatus* subsp *hesperius*; *Aster lanceolatus* var. *hirsuticaulis*; *Aster lanceolatus* subsp *interior*; *Aster lanceolatus* var. *interior*; *Aster lanceolatus* var. *latifolius*; *Aster lanceolatus* subsp *simplex*; *Aster lanceolatus* var. *simplex*.
- Segundo MUSEU BOTÂNICO DE CURITIBA (2003), na identificação da espécie: *Aster tradescantii*; *Aster fruticosus*.

- Segundo MISSOURI BOTANICAL GARDEN (2004): *Aster lanceolatus* subsp. *hesperius*; *Aster lanceolatus* subsp. *interior*; *Aster lanceolatus* subsp. *lanceolatus*; *Aster lanceolatus* subsp. *simplex*; *Aster lanceolatus* var. *hirsuticaulis*; *Aster lanceolatus* var. *interior*; *Aster lanceolatus* var. *lanceolatus*; *Aster lanceolatus* var. *latifolius*; *Aster lanceolatus* var. *simplex*; *Symphotricum lanceolatum*.

2.4.3 Descrição

Planta de corte, com crescimento uniforme, hastes longas e resistentes. Empregada para paisagismo e para produção de flores de corte e vaso. Seus ramos (Figura 12A) apresentam floração em formato cônico chamada inflorescência (FERRONATO, 2000, p. 5). As inflorescências são numerosas, ramificadas, com flores (Figura 12B) em capítulos brancos e centro amarelo (LORENZI; SOUZA, 1995, p. 269). Seus caules são estáveis medindo quando adultos cerca de oito mm de diâmetro e 1,1m de altura. Suas folhas são pequenas e lineares (LORENZI; SOUZA, 1995, p. 269, FERRONATO, 2000, p. 6). Raízes do tipo ramificadas e bem desenvolvidas (FERRONATO, 2000, p. 6).

FIGURA 12 – RAMO E FLORES DE *Aster lanceolatus*



FONTE: MIGUEL; DIAS, 2003.

NOTA: O ramo está representado na figura 12A e as flores na figura 12B.

2.5 ALELOPATIA

Registros da capacidade de influência de algumas espécies vegetais na fisiologia de outras espécies foram realizados por Democritus em 500 a.C., Theophrastus em 300 a.C., Plínio em 1 d.C., Culpeper em 1633, Browne em 1658, Young em 1804, De Candolle em 1832, Beobachter em 1845 e Stickney e Hoy em 1881, demonstrando que a observação desta influência não é recente (RICE, 1984, p. 2-3).

Em 1937, Hans Molisch criou o termo alelopatia por meio das palavras *allelon* (mútuo) e *pathos* (prejuízo) (ALMEIDA, 1988, p. 6) , usando esta definição em seu trabalho “Der Einfluss einer Pflanze auf die andere-Allelopathie” (A Influência de uma planta sobre a outra-Alelopatia) (MALHEIROS; PERES, 2001, p. 503-523).

Em 1971, Whittaker propôs que a alelopatia abrange todas as interferências ocorridas entre seres vivos provocadas por substâncias químicas elaboradas por eles, ocorridas no reino vegetal ou não (ALMEIDA, 1988, p. 6).

“Em 1975, Stewart definiu a alelopatia como sendo a inibição da germinação, crescimento ou metabolismo de uma planta em função da liberação de substâncias químicas orgânicas por outra planta” (MALHEIROS; PERES, 2001, p. 503-523).

Em 1977, Szczepanski diferenciou o termo “interferências” em alelospolia ou competição, alelopatia e alelomeadiação (interferência indireta, ou seja, alteração de ambiente físico ou biológico com reflexo nos seres vizinhos). A alelopatia não deve ser confundida como competição apenas, pois enquanto a competição caracteriza-se pela retirada ou redução de fatores do meio ambiente, a alelopatia caracteriza-se pela introdução de metabólitos secundários, ou seja, novos fatores ao ambiente (ALMEIDA, 1988, p.5).

Em 1987, Rice e Waller citam o termo alelopatia como interações

bioquímicas entre todos os tipos de plantas, incluindo microorganismos localizados no reino vegetal (MALHEIROS; PERES, 2001, p. 503-523).

A definição recente aceita pela Sociedade Internacional de Alelopatia cita: “É a ciência que estuda qualquer processo envolvendo, principalmente, metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos que influenciam o crescimento de sistemas biológicos com efeitos positivos e negativos” (PINTO *et al.*, 2002, p. 45-61).

Atualmente a alelopatia é caracterizada como uma nova ciência e tornando-se corrente na maioria dos países desenvolvidos (MALHEIROS; PERES, 2001, p. 503-523).

Os compostos alelopáticos podem ser produzidos em qualquer parte da planta e sua concentração pode variar dentro de uma mesma espécie ou entre espécies, com a parte da planta e desenvolvimento (MALHEIROS; PERES, 2001, p. 503-523).

A liberação e o mecanismo celular envolvido na liberação dos compostos alelopáticos ainda são pouco conhecidos e a liberação dos agentes alelopáticos pode ocorrer de várias maneiras pelas folhas, caules, raízes ou flores (MALHEIROS; PERES, 2001, p. 503-523). Esta liberação pode ser por meio de substâncias voláteis influenciando o crescimento das plantas; lixiviação de compostos orgânicos e inorgânicos pela ação da chuva ou orvalho; exsudados das raízes com influência direta ou indireta na ação de microorganismos e na interação planta-planta (ALMEIDA, 1988, p. 11, MALHEIROS; PERES, 2001, p. 503-523); decomposição de partes das plantas caídas no solo pelas condições climáticas e pelos microorganismos, podendo influenciar direta ou indiretamente (alteração química durante a decomposição, resultando em produtos secundários efetivos) em espécies adjacentes (MALHEIROS; PERES, 2001, p. 503-523).

Várias funções podem ser alteradas pelos agentes alelopáticos: absorção de nutrientes, regulação do crescimento, fotossíntese, respiração, permeabilidade da membrana, síntese protéica e atividade enzimática (ALMEIDA, 1988, p. 17-19,

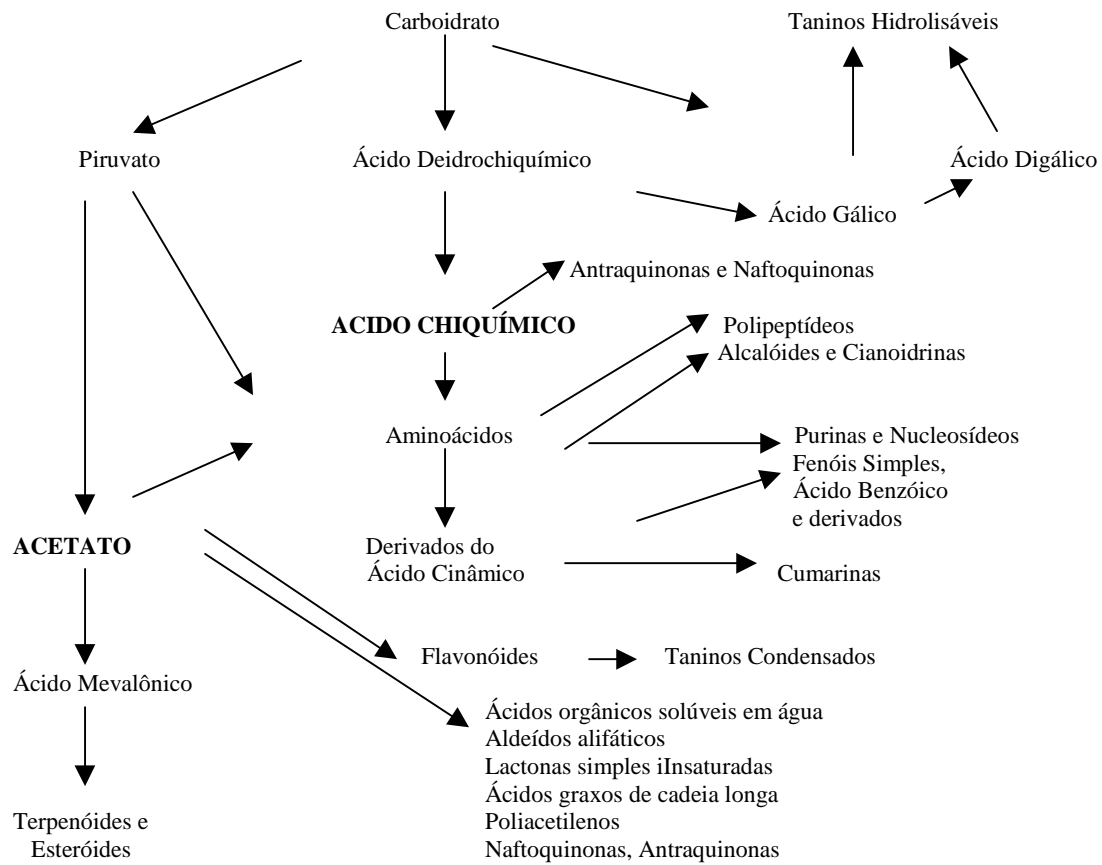
MALHEIROS; PERES, 2001, p. 503-523).

A atividade alelopática raramente é resultado de uma única substância, sendo mais comum um conjunto de substâncias apresentando tal atividade. O entendimento das inter-relações complica-se pelo fato de um mesmo composto influenciar várias funções biológicas e a mesma função poder ser influenciada por mais de um composto. Cumarinas podem influenciar a respiração, mas a respiração pode ser influenciada por compostos fenólicos, aromáticos, aldeídos, flavonóides e cumarinas. O composto (E)-2-hexanal inibe completamente a germinação das sementes de tomate; as quinonas sorgoleona e juglona influenciam a produção de ATP; monoterpenos como α -pineno, β -pineno e limoneno inibem o ciclo de nitrogênio; os ácidos ferúlico e p -cumárico influenciam a germinação de canola pela redução da mobilização lipídica (MALHEIROS; PERES, 2001, p. 503-523).

Os agentes alelopáticos, conhecidos como agentes aleloquímicos, pertencem a várias classes de metabólitos secundários (Figura 13) e apresentam vários tipos de esqueletos, mas, com algumas exceções, são metabólitos secundários derivados da rota acetato ou da rota chiquimato ou da combinação das duas origens (MALHEIROS; PERES, 2001, p. 503-523). As substâncias alelopáticas podem ser: ácidos orgânicos solúveis em água; lactonas simples insaturadas; ácidos graxos de cadeia longa; poliacetilenos; naftoquinonas; antroquinonas; quinonas complexas; fenóis simples; ácido cinâmico e derivados; flavonóides; taninos; terpenóides; esteróides; aminoácidos e polipeptídeos; alcalóides; cumarinas; purinas; álcoois e nucleosídeos (RICE, 1984, p. 267-291, ALMEIDA, 1988, p. 6-10, MALHEIROS; PERES, 2001, p. 503-523).

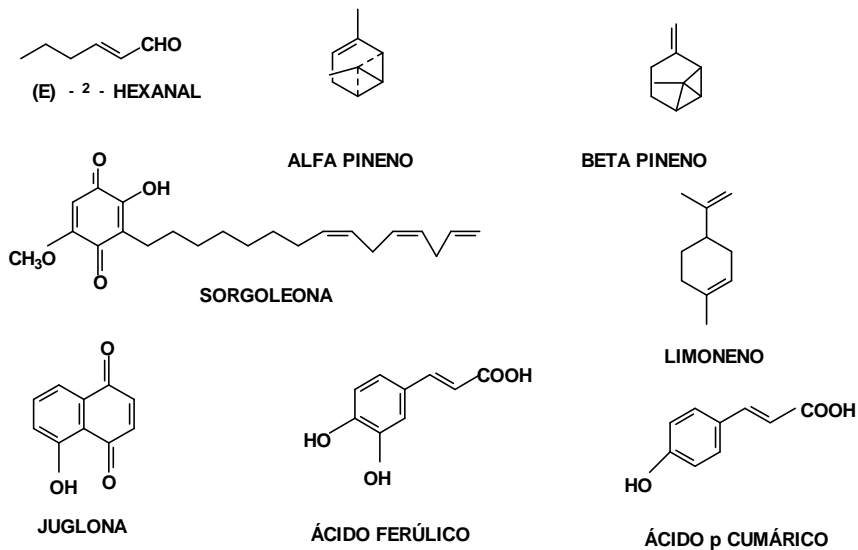
MALHEIROS e PERES (2001, p. 509), relatam os seguintes compostos alelopáticos: (E)-2-hexanal, sorgoleona, juglona, α -pineno, β -pineno, limoneno e os ácidos ferúlico e p -cumárico (Figura 14).

FIGURA 13 – PROVÁVEL ROTA METABÓLICA PARA PRODUÇÃO DE VÁRIAS CATEGORIAS DE AGENTES ALELOPÁTICOS



FONTE: RICE, 1984, p. 267.

FIGURA 14 – EXEMPLOS DE AGENTES ALELOPÁTICOS



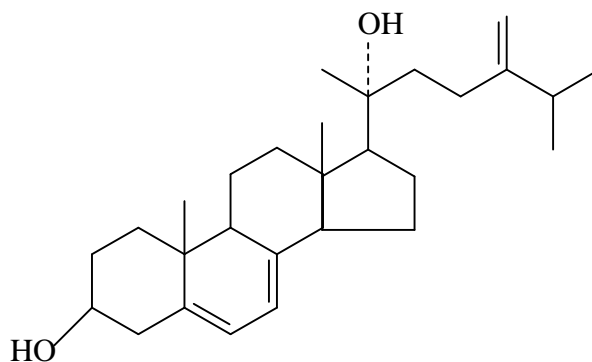
FONTE: MALHEIROS; PERES, 2001, p.509.

2.5.1 Especificidades

A inibição do crescimento de sementes de *Pinus resinosa* pelos extratos de *Aster macrophyllus*, *Lonicera tatarica*, *Prunus serotina*, *Rubus idaeus* var. *strigosus*, *Solanum dulcamara* e *Solidago gigantea* foi verificada por NORBY e KOZLOWSKI (1980, p. 363-374).

Amasterol (Figura 15), isolado de *Amaranthus viridis*, inibiu a germinação e crescimento de sementes de *Lactuca sativa* em ensaio realizado por ROY, DUTTIA e CHAKRABORTY (1982, p. 2417-2420).

FIGURA 15 – REPRESENTAÇÃO DO AMASTEROL



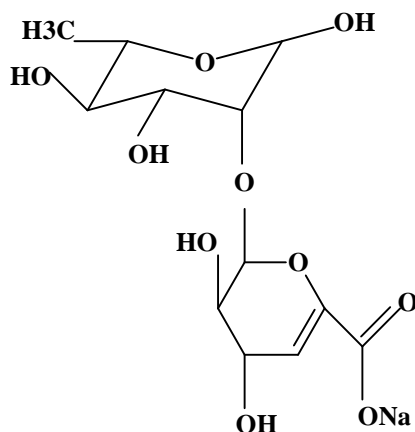
FONTE: ROY; DUTTIA; CHAKRABORTY,1982, p. 2417-2420.

O composto *Lepidimoide* (Figura 16), presente em exsudatos da germinação de sementes de várias famílias entre elas a família Compositae, apresenta efeito alelopático com promoção do crescimento de hipocótilo de *Amaranthus caudatus* (YAMADA; ANAI, HASEGAWA, 1995, p. 1031-1032).

DIETZ e WINTERHALTER (1996, p. 1005-1010) verificaram a fitotoxicidade de constituintes (ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido sinápico, 3-

hidroxi- β -ionona, 3-hidroxi- β -ionol, 3-hidroxi-5,6-epoxi- β -ionona, 3-hidroxi-5,6-epoxi- β -ionol e 3-hidroxiactinidol) das folhas de *Bunias orientalis* em sementes de *Matricaria inodora*, *Lactuca sativa* e *Hordeum vulgare*.

FIGURA 16- REPRESENTAÇÃO DO LEPIDIMOIDE



FONTE: YAMADA *et al.*, 1995, p.1031-1032.

FRIEBE *et al.* (1997, p. 979-983) fizeram ensaios com substâncias isoladas de *Secale cereale* e *Zea mays* (conhecidas respectivamente como diidroxi benzoxazinona - DIBOA e diidroxi metoxi benzoxazinona -DIMBOA) e seus produtos de decomposição, benzoxazolinona (BOA) e metoxi benzoxazolinona (MBOA) observando a inibição da atividade da H^+ -ATPase na membrana plasmática de raízes de *Avena sativa* e *Vicia faba*, e conseqüente inibição do crescimento da radícula, visto que a atividade da H^+ -ATPase na membrana plasmática exerce papel central na fisiologia celular.

MACÍAS *et al.* (1997, p. 683-687) testaram flavonóides isolados de *Helianthus annuus* em sementes de *Lycopersicum esculentum* e *Hordeum vulgare*, verificando-se inibição da germinação e crescimento.

SOARES e VIEIRA (2000, p. 190-197) verificaram a inibição de crescimento radicular e germinação de *Lactuca sativa*, por meio de cinco espécies da família Gleicheniaceae (*Dicranopteris flexuosa*, *Gleicheniella pectinata*, *Sticherus bifidus*, *Sticherus penniger* e *Sticherus nigropaleaceus*). Para este ensaio os autores

utilizaram modelo aleatório com distribuição de 50 sementes em placa de Petri contendo papel de filtro embebido com 5mL dos extratos aquosos com cinco repetições e utilização de um controle com água destilada.

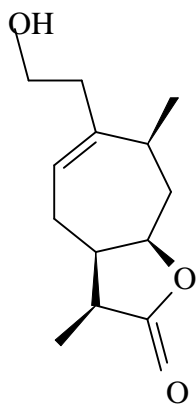
Como exemplo da atividade alelopática de microorganismos apresenta-se o composto nostociclâmida M, proveniente de *Nostoc 31* (uma cianobactéria) com atividade alelopática sobre *Anabaena 7120* (JÜTTNER *et al.*, 2001, p. 613-619).

A alelopatia pode ser empregada no controle de plantas daninhas aquáticas, citando o controle natural de *Eichhornia crassipes*, interferente no uso agrícola, urbano e recreativo da água, utilizando-se *Coleus amboinicus*, uma erva medicinal indiana, descartando-se uso de insetos e fungos patogênicos que poderiam trazer conseqüências desagradáveis (KATHIRESAN, 2000, p. 705-708).

D'ABROSCA *et al.* (2001, p. 1073-1081) obtiveram vinte e quatro compostos de *Sambucus nigra*, testaram suas propriedades alelopáticas em três diferentes espécies, *Lactuca sativa*, *Raphanus sativa* e *Allium cepa* com concentrações variadas e verificaram resultados diversificados como estímulo e inibição em variadas proporções no crescimento da radícula das três espécies.

Outro exsudato de germinação, o composto sundiversifolida (Figura 17), presente na espécie *Helianthus annuus* (Compositae) demonstrou atividade alelopática ao inibir o crescimento de sementes de *Lactuca sativa*, *Celosia cristata*, *Lycopersicum esculentum*, *Digitaria ciliaris* e *Echinochloa crus-galli* (OHNO *et al.*, 2001, p. 577-581).

FIGURA 17– REPRESENTAÇÃO DO COMPOSTO SUNDIVERSIFOLIDA



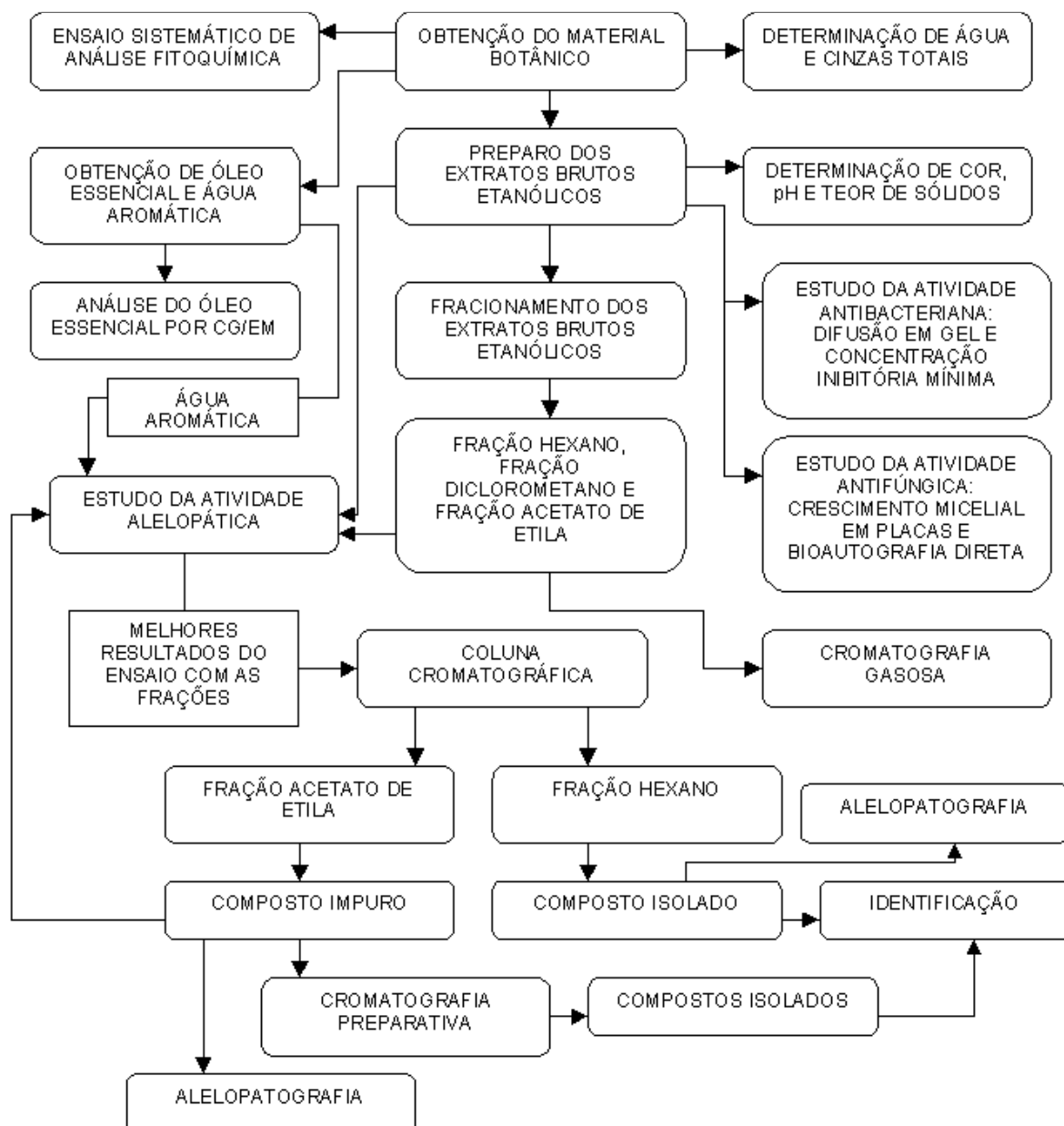
FONTE: OHNO *et al.*, 2001, p. 577-581.

BATISH *et al.* (2002, p. 149-155) verificaram o efeito alelopático da Partenina, uma lactona sesquiterpênica isolada das folhas de *Parthenium hysterophorus*, sobre *Avena fatua* e *Bidens pilosa*, inibindo a germinação e o crescimento. Outras pesquisas comprovam o efeito alelopático inibitório de lactonas sesquiterpênicas, citando os trabalhos de KALSI *et al.* (1984, p. 2855-2861), MACÍAS, GALINDO e MASSANET (1992, p. 1969-1977), MACÍAS *et al.* (1993, p. 669-674), MACÍAS *et al.* (1996, p. 1205-1215), MACÍAS *et al.* (2000, p. 165-171) e GOTO *et al.* (2001, p. 109-113).

O óleo essencial pode apresentar efeito alelopático, demonstrado no trabalho de DE FEO, DE SIMONE e SENATORE (2002, p. 573-578) que estudaram a atividade alelopática do óleo essencial de *Ruta graveolens*, ocorrendo inibição na germinação e crescimento de *Raphanus sativus*. MAZZAFERA (2003, p. 231-238), demonstrou o efeito alelopático do eugenol e do extrato alcóolico do cravo-da-índia ao influenciar a germinação de *Lycopersicum esculentum*, inibindo-a.

3 MATERIAL E MÉTODOS

FIGURA 18 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DE MATERIAL E MÉTODOS



A descrição detalhada do esquema apresentado por meio da figura 18, apresenta-se a seguir.

3.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

A espécie *Aster lanceolatus* foi coletada no mês de junho/2003 em São Paulo. As exsicatas foram identificadas pelo botânico Dr. Gerdt Hatchbach do Museu Botânico Municipal (MBM) de Curitiba/PR e registradas neste museu sob o número 287.063.

Flores, folhas e caules de *Aster lanceolatus* após secagem, foram estabilizados à temperatura ambiente. O material botânico foi separado em duas porções distintas, a primeira denominada porção I, constituída das flores e a segunda, denominada porção II, constituída de caules e folhas. A separação em duas porções foi realizada com o intuito de analisar separadamente as flores dos caules e folhas, visto que a primeira porção apresenta significativo valor comercial e a segunda porção representa a maior parcela de desprezo de *Aster lanceolatus*.

O material botânico após a separação foi moído, submetido à determinação de água e cinzas totais, e armazenado ao abrigo da luz e umidade.

3.1.1 Determinação de Água

Quantidade excessiva de água em material vegetal propicia desenvolvimento de insetos, microorganismos e hidrólise, resultando em deterioração do material vegetal e de seus constituintes (FARMACOPÉIA, 1988).

Para determinação da água nas flores e nos caules e folhas de *Aster lanceolatus*, empregou-se o método gravimétrico da FARMACOPÉIA (1988), que consiste em pesar determinada quantidade de material vegetal e submetê-lo a estufa 100-105 °C durante cinco horas, proceder a primeira pesagem após esfriamento à temperatura ambiente em dessecador, retornar a estufa e assim sucessivamente até o resultado de duas pesagens não diferir por mais de 5 mg. O resultado é apresentado em porcentagem de água em relação ao material vegetal seco ao ar.

3.1.2 Determinação de Cinzas Totais

A determinação de cinzas totais tem por finalidade estabelecer a quantidade de substância residual não volátil no processo de incineração (FARMACOPÉIA, 1988).

Para determinar as cinzas totais presentes nas flores e nos caules e folhas de *Aster lanceolatus*, empregou-se método da FARMACOPÉIA (1988), aonde se pesou o material vegetal (que foi transferido para cadinho calcinado, resfriado e pesado), incinerou-se até eliminação do carvão (não ultrapassando 450°C), resfriou-se em dessecador, procedeu-se a pesagem e cálculo da porcentagem de cinzas em relação ao material vegetal seco ao ar.

3.2 ENSAIO SISTEMÁTICO DE ANÁLISE FITOQUÍMICA

Visando a identificação dos principais grupos químicos presentes nas flores e nos caules e folhas de *Aster lanceolatus*, procedeu-se inicialmente o ensaio sistemático de análise fitoquímica utilizando metodologias descritas por MOREIRA (1979, p. 13-39), MATOS e MATOS (1988, p. 223-230) e MIGUEL (2003) com algumas adaptações.

3.2.1 Extrato Etanólico 20%

Preparou-se o extrato etanólico 20% pelo processo de maceração à quente em banho-maria a 70°C por uma hora, utilizando 40g de material vegetal e 200mL de etanol 70% (líquido extrator). Decorrida uma hora, retirou-se o frasco do banho-maria, filtrou-se o extrato e o volume completado até 200mL com o líquido extrator.

Concentrou-se o extrato etanólico 20% até adquirir 1/3 de seu volume com o intuito de eliminar o excesso de etanol. Realizou-se o fracionamento com hexano,

diclorometano e acetato de etila, solventes em ordem crescente de polaridade, com auxílio de um funil de separação. O extrato concentrado (10 mL) foi colocado em funil de separação com 50 mL do respectivo solvente e agitou-se. Repetiu-se esse processo quatro vezes. Obteve-se assim a fração hexano, a fração diclorometano, a fração acetato de etila e a fração hidroalcoólica, completando o volume das frações para 200mL com os respectivos solventes, quando necessário.

Estas frações foram utilizadas para pesquisa de alcalóides, leucoantocianidinas, flavonóides, cumarinas, antraquinonas, esteróides e triterpenos.

- Pesquisa de alcalóides

Os alcalóides são compostos de caráter básico e sua solubilidade em diferentes reagentes, modifica em função do pH. Os alcalóides na forma básica são solúveis em solventes orgânicos e insolúveis em solventes aquosos; na forma de sal, são solúveis em solventes aquosos e insolúveis em solventes orgânicos.

Esta pesquisa fundamenta-se na capacidade que os alcalóides possuem, em estado de sal, de combinar-se com iodo e metais pesados como bismuto, mercúrio e tungstênio e formarem precipitados.

Para realização deste ensaio 50mL de cada fração obtida pelo processo descrito anteriormente foram secos em banho-maria a 50°C. Dissolveu-se o resíduo em 1mL de etanol e acrescentou-se 20mL de ácido clorídrico a 1%. Transferiu-se para tubos de ensaio 1 mL de cada extrato clorídrico e procedeu-se a pesquisa para alcalóides com 2 gotas dos seguintes reativos: reativo de Mayer (mercúrio tetraiodeto de potássio) observando formação de precipitado branco ou leve turvação branca; reativo de Dragendorff (tetraiodeto bismuto de potássio) observando formação de precipitado de coloração tijolo; reativo de Bouchardat observando formação de precipitado de coloração alaranjado e reativo de Bertrand (ácido sílico túngstico) observando formação de precipitado branco ou leve turvação branca.

Ocorrendo reação positiva, transfere-se o restante do extrato clorídrico para um funil de separação, alcaliniza-se com hidróxido de amônio em pH 9 a 10 e extrai-se três vezes com 15 mL de uma solução de diclorometano e éter na proporção 3:1. Os extratos de éter diclorometano foram reunidos, levados à secura em banho-maria, adicionados 0,5mL de etanol e 5mL de ácido clorídrico a 1%, e após leve aquecimento, esfriados e divididos em tubos de ensaio. Procedeu-se novamente a pesquisa de alcalóides com os reativos descritos anteriormente. Havendo formação de precipitado a reação confirma-se com 2 mL de solução alcoólica de ácido tartárico 5% e dissolução do complexo formado.

- Pesquisa de Leucoantocianidinas

As leucoantocianidinas são consideradas flavonóides monoméricos 3,4-dióis ou raramente 4-óis. Esta pesquisa explica-se com a reação de redução da leucoantocianidina (de coloração amarela) em antocianidina (de coloração vermelha) em presença de ácido clorídrico.

Pesquisou-se leucoantocianidinas nas frações hexano, diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólica, submetendo-se 10mL das respectivas frações a secura em banho-maria (50°C) e recuperação com 5 mL de etanol, 5 gotas de ácido clorídrico concentrado e aquecimento até ebulição. O desenvolvimento de coloração vermelha indica reação positiva.

- Pesquisa de Flavonóides

Esta pesquisa baseia-se na modificação da estrutura do flavonóide em presença de ácido.

Levou-se à secura em banho-maria (50°C) 10 mL das frações hexano, diclorometano e acetato de etila, adicionou-se 5 mL de etanol e transferiu-as para tubos de ensaio. A fração hidroalcoólica não foi levada à secura, apenas transferida

diretamente (5 mL) para um tubo de ensaio. A cada tubo de ensaio adicionou-se pastilha de zinco, ácido clorídrico fumegante (lentamente) com ocorrência de reação exotérmica (esta pesquisa deve ser realizada com os tubos de ensaio dentro de um copo de béquer com gelo, dentro da capela). Reação positiva desenvolve coloração conforme as estruturas químicas presentes: flavona com coloração amarelo a vermelho; flavonol e dihidroflavonol com coloração vermelho a vermelho sangue; flavononas com coloração vermelho a violeta; derivados antociânicos com coloração vermelho tornando-se rosa e chalconas, auronas, dihidrochalconas, isoflavonas e isoflavononas não apresentam coloração.

Reação de Taubock ou Teste do Oxálico-Bórico: levou-se à secura em banho-maria 10mL de cada fração. Ao resíduo foi adicionado 5 gotas de acetona e 30mg de ácido bórico misturado com ácido oxálico na proporção 1:1, agitou-se e levou-se novamente à secura. Ao resíduo adicionou-se 5 mL de éter etílico e transferiu-se os respectivos resíduos para tubos de ensaio para verificação de fluorescência. Esta reação é explicada pela formação de quelatos, produzindo deslocamento batocrômico da banda I dos derivados do ácido borínico (compostos obtidos do ácido bórico com substituições na molécula por dois radicais orgânicos). A reação oxalo-bórica determina aparecimento de fluorescência amarela esverdeada para flavonóis; flavanonas e isoflavonas não apresentam fluorescência e os compostos antociânicos coram-se, mas não produzem fluorescência.

- Pesquisa de Cumarinas

Esta pesquisa baseia-se na conversão em sal alcalino fluorescente do ácido hidroxí cinâmico, por meio da dissolução das cumarinas em álcali cáustico com clivagem do anel pirrólico e consequente formação do ácido hidroxí cinâmico ou sais de seu ânion. Sem irradiação da luz ultravioleta, nenhuma fluorescência é exibida em soluções recém preparadas ou soluções estocadas no escuro por meses; no entanto, ao

irradiar luz ultravioleta, a forma *cis* migra para forma *trans*, que exhibe coloração azul ou verde amarelada em poucos minutos. Comparações efetuadas entre a forma *cis* e *trans* do ânion cumarínico demonstraram que apenas na forma *trans* o hidrogênio do grupo fenólico está localizado para possibilitar sua quelação (anel de seis membros), visto que, a insaturação não é bloqueada pelo grupo carboxila, havendo possibilidade da ligação quelato relacionar-se com a fluorescência. O foto efeito também aparece em soluções alcalinas dos derivados cumarínicos que não possuem hidroxila livre ligada ao grupo benzênico, havendo relação entre os substituintes e o grau de fluorescência. Derivados cumarínicos com grupos hidroxilas livres ligados ao anel benzênico, apresentam fluorescência azul intensa no estado sólido e em soluções alcalinas (em soluções alcalinas não ocorre foto efeito, havendo dificuldade para estabelecer um teste específico para hidroxí-cumarinas, visto que a observação de qualquer fluorescência produzida por irradiação é de difícil visualização, já que estes compostos possuem fluorescência própria).

A fração hidroalcoólica em pH 1 (acidificada com ácido clorídrico 2N) foi reduzida de 30mL a 5mL (em banho-maria), resfriada e com auxílio de funil de separação, extraída com éter etílico (2 vezes de 10mL). As frações adquiridas com as duas extrações foram reunidas e concentradas em banho-maria (50°C) até 5mL.

As frações hexano, diclorometano e acetato de etila, foram levadas ao banho-maria 50°C (30mL) até *secura* e recuperadas em 5mL de éter etílico.

Para tubos de ensaio, transferiu-se 3mL de cada extrato etéreo, adicionou-se 2mL de hidróxido de sódio 1N, levou-se os tubos à câmara de luz ultravioleta em 365nm e deixados em exposição por 15 minutos.

Para reação positiva observa-se no ultravioleta o aparecimento de fluorescência azul ou verde amarelada.

Depositou-se a sobra dos extratos etéreos em papel de filtro em três pontos previamente marcados com grafite, concentrando-os de modo a obter manchas com aproximadamente 1 cm de diâmetro. As manchas 1 e 2 foram tratadas com uma gota

de hidróxido de sódio 1N. Cobriu-se com uma moeda a mancha 1 e levou-se o papel de filtro à câmara de ultravioleta a 365nm, deixando-o em exposição por 15 minutos. Ocorrendo reação positiva observa-se no ultravioleta o aparecimento de fluorescência com coloração azul ou verde amarelada na mancha 2.

- Pesquisa de Antraquinonas

Transferiu-se para um balão de fundo chato com 250mL de capacidade, 30mL de cada fração e 5mL de solução aquosa a 10% de ácido sulfúrico. Acoplou-se o balão a um condensador de bolas e levou-o a refluxo por 30 minutos. Decorrido os trinta minutos, retirou-se o balão e filtrou-se o extrato sulfúrico ainda quente. Adicionou-se ao filtrado 30mL de água destilada para transferi-lo a um funil de separação e extrair duas vezes com 10mL de éter etílico. Reuniram-se os extratos etéreos para concentrá-los a 5 mL.

Os extratos etéreos foram colocados em tubos de ensaio e efetuou-se a reação de Borntraeger ao adicionar 5mL de hidróxido de amônio e agitar lentamente.

Para reação positiva observa-se o aparecimento de coloração vermelha devido ionização das hidroxilas fenólicas.

- Pesquisa de Esteróides e/ou Triterpenos

Evaporou-se à secura 30mL de cada fração, recuperou-se com 5mL de clorofórmio e filtrou-se.

Pipetou-se 1mL, 0,2mL e 0,1 mL de cada extrato clorofórmico para tubos de ensaio e completou-se o volume para 2mL com clorofórmio.

Efetuoou-se a reação de Liberman-Bouchard adicionando-se 1 mL de anidrido acético e 2 mL de ácido sulfúrico concentrado, lentamente.

A formação de coloração rósea escura ou azul indica a presença da função carbonila na posição três e duplo enlace na posição cinco e seis ou sete e oito.

Coloração verde indica função hidroxila na posição três e duplo enlace em cinco e seis ou sete e oito. Coloração amarela, possível presença de metila no carbono número cartorze.

3.2.2 Extrato Aquoso 20%

Preparou-se o extrato aquoso 20% pelo processo de maceração à quente em banho-maria a 70°C por uma hora, utilizando 40g de material vegetal e 200mL de água destilada (líquido extrator). Decorrida uma hora, retirou-se o frasco do banho-maria, filtrou-se o extrato e o volume completado até 200mL com o líquido extrator, lavando o material.

Este extrato foi submetido aos testes para antocianinas, heterosídeos saponínicos, heterosídeos cianogénéticos, taninos, amino grupos, ácidos fixos e ácidos voláteis.

- Pesquisa de Antocianinas

A antocianinas são pigmentos hidrossolúveis presentes nas plantas, com colorações que modificam de acordo com o pH. Com ácidos, as antocianinas reagem formando sais de oxônio corados de vermelho e com bases reagem com hidroxilas fenólicas livres e adquire coloração azul devido a estrutura quinóide.

Para realização deste ensaio, transferiu-se 5 mL do extrato aquoso para três tubos de ensaio, acidificou-se o primeiro tubo com ácido clorídrico 1% (pH aproximadamente 4), alcalinizou-se o segundo tubo com hidróxido de amônio (pH aproximadamente 10) e neutralizou-se o terceiro tubo (pH 7).

O desenvolvimento de coloração avermelhada em meio ácido, azulada em meio alcalino, ou violácea em meio neutro, indica reação positiva.

- Pesquisa de Heterosídeos Saponínicos

Agitou-se energicamente com movimentos succionais por cinco minutos os tubos da pesquisa de antocianinas, deixando-os em repouso por trinta minutos. Mediu-se a altura do anel de espuma, formado logo após agitação e decorrido trinta minutos.

Reação positiva é indicada com desenvolvimento de espuma com altura superior a um centímetro e persistente após o repouso.

As saponinas apresentam estruturas com assimetria hidrófilo-hidrofóbica, fazendo com que haja redução da tensão superficial dos compostos em solução aquosa, com conseqüente formação de espuma mediante agitação (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997, p.62).

- Pesquisa de Heterosídeos Cianogenéticos

Os heterosídeos cianogenéticos produzem ácido cianídrico nas plantas e são acompanhados por enzimas (β -glicosidases) responsáveis pela catálise da hidrólise (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997, p. 64).

Para este ensaio utilizou-se a reação do isopurpurato de sódio, que ocorre na transferência para um tubo de ensaio de 5 mL de extrato aquoso (cuidando-se para não umedecer as paredes do tubo de ensaio), adição de 1 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico 1N, suspensão de uma tira de papel picro-sódico no tubo e encaminhamento ao banho-maria por trinta minutos à 60°C.

Reação positiva é observada com a formação de isopurpurato de sódio que apresenta coloração castanha a avermelhada.

O papel picro-sódico é preparado embebendo tiras de papel de filtro com 1 cm de largura em solução de ácido pícrico 1% e secando-as ao abrigo da luz. As tiras pícricas secas são embebidas em solução de carbonato de sódio 10%, secas e armazenadas em frasco âmbar.

- Pesquisa de Taninos

Os taninos são divididos em duas classes considerando os núcleos fenólicos existentes e na união destes. Os taninos hidrolisáveis apresentam ácido gálico ou ácido hexaidroxidifênico com seus derivados esterificados com glicose. Estes ésteres são facilmente hidrolisados em ácidos fenólicos e açúcar (ROBBERS *et al.*, 1997 p. 159). Os taninos condensados contêm núcleos fenólicos que muitas vezes estão ligados a carboidratos ou a proteínas. A maioria dos taninos condensados, são resultantes da condensação de dois flavan-3-óis, ou mais (catequina) ou de flavan-3,4-dióis (leucocianidina) (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997 p. 159).

Para a pesquisa de taninos os seguintes reagentes foram utilizados:

- Cloreto Férrico: adicionou-se três a cinco gotas de solução aquosa a 1% de cloreto férrico a 1 mL de extrato aquoso. Reação positiva para taninos desenvolve coloração azul. O desenvolvimento de coloração verde indica flavonóides e coloração marrom indica polifenóis.
- Solução de Gelatina: transferiu-se respectivamente 0,5 mL, 1,0 mL e 2,0 mL de extrato aquoso para tubos de ensaio e adicionou-se 2 mL de solução aquosa de gelatina 2,5% . Desenvolvimento de precipitado indica reação positiva.
- Cloridrato de Emetina: adicionou-se 4 mL de água destilada e duas gotas de solução aquosa de emetina 1% a 1 mL de extrato aquoso. Desenvolvimento de precipitado indica reação positiva.
- Formol Clorídrico: também conhecido como ensaio de Staniasny. Transferiram-se 30 mL de extrato aquoso para um balão de fundo chato com 250 mL de capacidade e adicionou-se 6 mL de formaldeído 40% e 4 mL de ácido clorídrico 37%. Acoplou-se o balão a um condensador de bolas e levou-se a refluxo durante uma hora. Decorrido o tempo, deixou-se esfriar e filtrou-se o extrato formol-clorídrico reservando o filtrado para pesquisa de taninos hidrolisáveis. Lavou-se o resíduo da filtração com uma solução de etanol 50%,

gotejando sobre o resíduo da lavagem gotas de solução aquosa de hidróxido de potássio 5%. Reação positiva para taninos condensados visualiza-se com desenvolvimento de coloração verde ao gotejar o hidróxido de potássio. Utilizando-se o filtrado reservado, adicionou-se excesso de acetato de sódio, sem agitação, e gotas de solução aquosa de cloreto férrico 1%. Reação positiva para taninos hidrolisáveis visualiza-se com desenvolvimento de coloração azul ao adicionar o cloreto férrico.

- Pesquisa de Amino Grupos

Com auxílio de um condensador de bolas e temperatura de 60°C, concentrou-se 10 mL de extrato aquoso até 5 mL. Em tira de papel de filtro, adicionaram-se cinco gotas do extrato aquoso concentrado em pontos previamente demarcados. Após secagem, nebulizou-se o papel de filtro com solução de ninhidrina levando-o à estufa (95-100°C) durante quinze minutos. Reação positiva é visualizada com o aparecimento de coloração azul-violácea.

- Pesquisa de Ácidos Fixos

Transferiram-se 20 mL de extrato aquoso e 2 mL de hidróxido de sódio 1N para balão de fundo chato com 100 mL de capacidade, acoplou-se um condensador de bolas e levou-se a refluxo durante trinta minutos. Decorrido o tempo, esfriou-se e acidificou-se o extrato alcalino com solução de ácido sulfúrico 1N. Procedeu-se extração, com auxílio de um funil de separação, com 10 mL de éter etílico (três vezes). Os extratos etéreos foram reunidos, tratados com carvão ativado, filtrados e levados à secura em banho-maria a 50°C. Aqueceu-se o resíduo em estufa à 100°C por dez minutos, esfriou-se, adicionou-se 5 mL de solução aquosa de hidróxido de amônio 1N e filtrou-se. Adicionou-se três gotas do filtrado anterior a um papel de filtro, obtendo-se uma mancha com aproximadamente um centímetro de diâmetro e pingou-se sobre

esta mancha uma gota de reagente de Nessler. Para controle negativo utilizou-se uma mancha com o reativo de Nessler. Levou-se o papel de filtro à estufa por cinco minutos. Visualiza-se reação positiva com o aparecimento de coloração marrom.

- Pesquisa de Ácidos Voláteis

Com solução de ácido sulfúrico 1N, acidificou-se 10 mL de extrato aquoso. Colocou-se o extrato ácido em tubo de ensaio e levando à fervura, determinou-se o pH dos vapores com auxílio de fita indicadora de pH presa ao tubo com rolha de cortiça.

O aparecimento de pH abaixo de sete indica presença de ácidos voláteis.

3.3 ÓLEO ESSENCIAL E ÁGUA AROMÁTICA

Utilizando-se flores de *Aster lanceolatus*, buscou-se determinar o teor de óleo essencial segundo MIGUEL (2002) e obter água aromática. A água aromática segundo FARMACOPÉIA (1988), é solução saturada de óleo essencial ou outra substância aromática em água.

Empregou-se técnica de hidrodestilação, que consiste em utilizar 100g de material vegetal fragmentado em partículas de aproximadamente seis milímetros e água em quantidade suficiente para cobrir o vegetal (aproximadamente quatro vezes a quantidade de material vegetal). O material vegetal e a água foram colocados em balão, acoplou-se aparelho tipo “Clevenger” e condensador. O balão foi aquecido até temperatura suficiente para obter-se uma gota de condensado por minuto. A destilação foi contínua até observação da estabilização na quantidade de óleo no tubo graduado do aparelho (aproximadamente seis horas). Desligou-se o aparelho e com intuito de obter-se boa separação água-óleo e resfriamento do óleo à temperatura ambiente, deixou-se em repouso o aparelho. Decorrido o tempo necessário, procedeu-se a leitura do volume do óleo no tubo graduado do aparelho. O material em repouso no tubo

graduado foi recolhido e levado ao freezer por 24 horas. Após as 24 horas, o óleo essencial foi separado da água, obtendo-se o óleo essencial e a água aromática, e procedeu-se aos cálculos.

Enviou-se o óleo essencial para análise em CG-EM, com o intuito de pesquisar as substâncias presentes. Utilizou-se cromatógrafo gasoso 6890 da Agilent® equipado com coluna HP5 (5% fenil e 95% dimetilpolisiloxano) de 0,25mm de diâmetro interno por 15 cm de comprimento, e espectrômetro de massa 5973 da Agilent®. Utilizou-se como gás de arraste hélio a 0,8mL por minuto. O gradiente de temperatura utilizado foi: temperatura inicial 40°C com patamar de 2 minutos e rampa de aquecimento a 10°C por minuto até 250°C com patamar de 20 minutos. A temperatura do injetor foi de 250°C e do detector de 280°C. O volume de injeção foi de 20 µL com split de 100:1. A identificação dos constituintes do óleo essencial foi feita por comparação do espectro de massa do referido constituinte, com os espectros de massa existentes no banco de dados do equipamento (DATABASE/ NIST98).

3.4 PREPARO DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS

O etanol utilizado para o preparo dos extratos foi reservado para ser utilizado nos ensaios que o exigiram.

Os extratos brutos das flores (porção I) e caules e folhas (porção II) foram preparados com etanol absoluto em aparelho de soxhlet. Os extratos obtidos foram previamente filtrados com algodão e submetidos à concentração em evaporador rotatório com pressão reduzida à temperatura de 50°C e 90 rpm. Em seguida os extratos foram armazenados em frascos âmbar, colocados no freezer por 24 horas e após, filtrados a vácuo em funil de Büchner. Após filtração a vácuo, os extratos retornaram aos frascos âmbar e foram armazenados na geladeira. Após o preparo dos extratos, fez-se determinação de cor, pH e teor de sólidos.

3.4.1 Determinação de Cor

Para determinação da cor utilizou-se apenas a comparação do observador.

3.4.2 Determinação de pH

Utilizou-se tira indicadora Merck®.

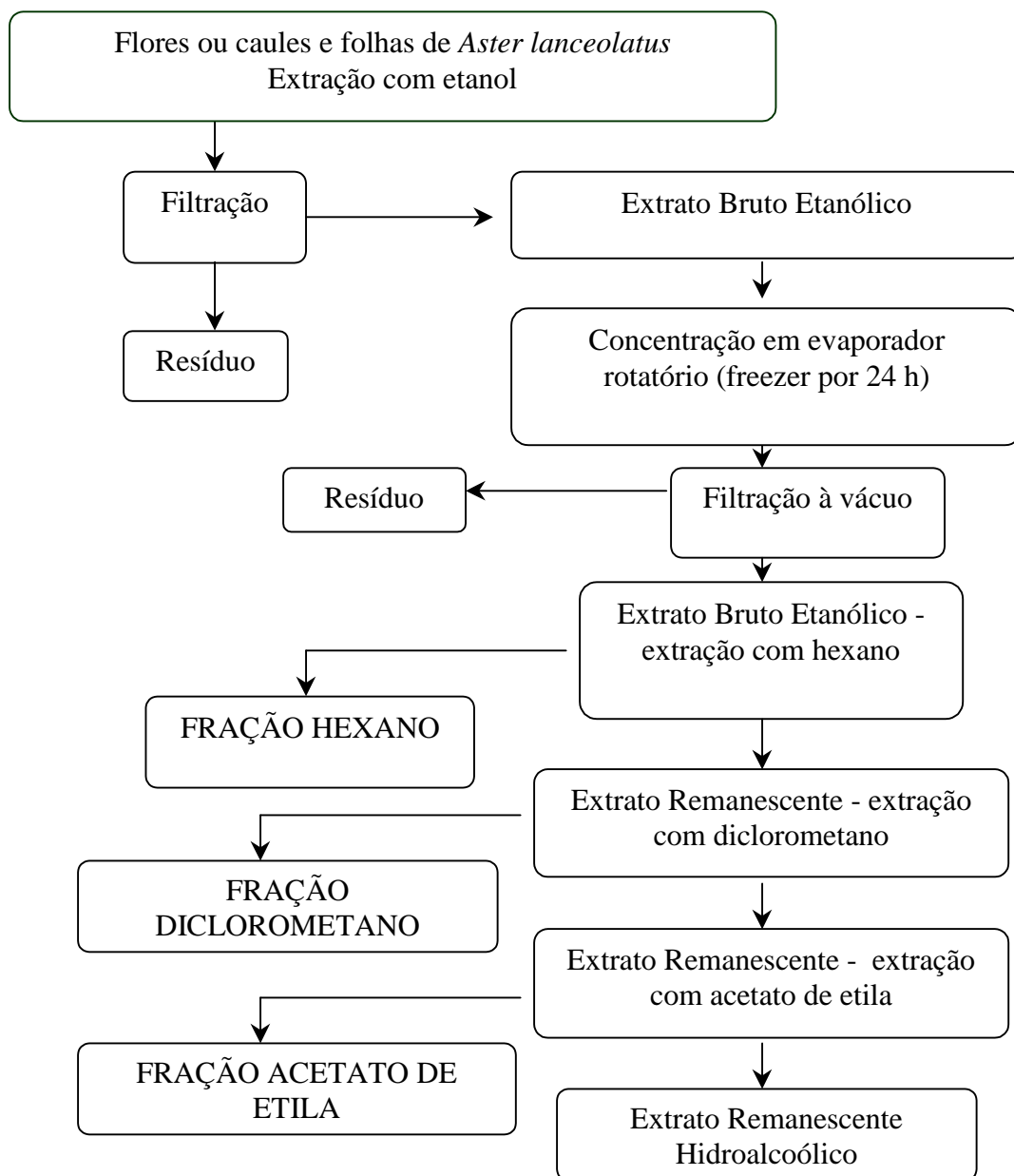
3.4.3 Determinação do Teor de Sólidos

Utilizando-se técnica adaptada de MIGUEL (2003), depositou-se 1 mL de extrato bruto etanólico a ser analisado em cadinho pesado, levou-se a estufa 100 °C até peso constante e procedeu-se aos cálculos aonde o resultado é apresentado em quantidade de sólidos em 1 mL e porcentagem em peso do teor de sólidos em relação ao material vegetal.

3.5 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS

Os extratos brutos etanólicos obtidos conforme descrito no item 3.4, foram fracionados separadamente, por meio de partição líquido-líquido (Figura 19) em aparelho de soxhlet modificado (CARVALHO, 2001, p. 26-27) com solventes de polaridade crescente (hexano, diclorometano e acetato de etila) obtendo-se frações denominadas fração hexano (FH), fração diclorometano (FDCM) e fração acetato de etila (FAE).

FIGURA 19 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DA EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO



As frações foram submetidas a cromatografia gasosa utilizando-se cromatógrafo gasoso Shimadzu® modelo 14B equipado com colunas megabore DB-1 (100% dimetilpolisiloxano – polaridade 5) e DB-17 (50% fenil e 50% dimetilpolisiloxano – polaridade 24) de 0,53mm de diâmetro interno por 30 cm de comprimento. Utilizou-se como gás de arraste hidrogênio a 6 mL por minuto, split a 6 mL por minuto (razão 1:1), purga do septo 3 mL por minuto, make up nitrogênio 25 mL por minuto e oxigênio a 100 mL por minuto. O gradiente de temperatura utilizado

foi: temperatura inicial 100°C com patamar de 1 minuto e rampa de aquecimento a 7°C por minuto até 260°C com patamar de 66 minutos. A temperatura do injetor foi de 260°C e do detector de 280°C. O volume de injeção foi de 2 µL.

Empregou-se metodologia por padronização interna com intuito de caracterizar os analitos voláteis por Retenção Relativa em relação ao acetato de tocoferol. Para tanto, utilizou-se cromatograma padrão de referências analisadas em CG por padronização interna (CARVALHO, 2001, p.29).

3.6 ESTUDO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA

Em estudos de atividade alelopática, procura-se determinar o efeito de uma planta doadora sobre uma planta receptora (MALHEIROS; PERES, 2001, p.503-523). Neste trabalho, buscou-se determinar possível atividade alelopática dos extratos brutos etanólicos de *Aster lanceolatus* (das flores e dos caules e folhas), suas respectivas frações, água aromática e substância isolada sobre sementes de *Lactuca sativa* (conhecida como alface, cultivar Babá de verão, da empresa Isla sob código 026, com 99% de germinação detectada através de teste padrão de germinação). Paralelamente ao ensaio da atividade alelopática de *Aster lanceolatus*, fez-se ensaio utilizando água destilada, etanol e metanol, para posterior verificação da influência ou não dos solventes (etanol e metanol) empregados no preparo dos extratos e na diluição das amostras utilizadas no ensaio alelopático.

A semente de *Lactuca sativa* é empregada em ensaios por apresentar germinação rápida e uniforme (DIETZ; WINTERHALTER, 1996, p. 1005-1010), ser pequena, possuir grande superfície de contato, sendo sensível ao meio que a rodeia e não requerer nenhuma manipulação além do contato no meio (MALHEIROS; PERES, 2001, p. 503-523).

Dos extratos brutos etanólicos e respectivas frações citadas anteriormente, prepararam-se sete soluções em concentrações decrescentes (0,6mg, 0,4mg, 0,3mg,

0,2mg, 0,1mg, 0,05mg e 0,025mg em 2mL de metanol) em duplicata. Para o preparo destas soluções utilizou-se uma solução-mãe preparada com extratos e frações secas a 50 °C em banho-maria e diluídas em metanol na proporção 1mg/mL. Com intuito de obter dissolução completa da amostra a ser analisada, escolheu-se metanol como solvente.

Papel de filtro (Whatman nº. 6) recortado do tamanho das caixas gerbox foi embebido com as soluções preparadas com as devidas concentrações e colocados em estufa a 60°C por 24 horas para total evaporação do solvente. Trabalhando-se em câmara de fluxo laminar, os papéis de filtro previamente secos foram colocados nos gerbox e umedecidos com 3 mL de água destilada. A água destilada foi utilizada em quantidade segundo KRZYZANOWSKI, VIEIRA, FRANÇA NETO (1999, p. 2.10), ou seja, de duas a três vezes o peso do papel. Após preparo das caixas gerbox, colocou-se 10 sementes de *Lactuca sativa* em cada caixa em quatro repetições.

Os gerbox foram protegidos da luz com papel alumínio e colocados em germinador de câmara à temperatura de 20 °C.

Para cada concentração prepararam-se duas caixas, uma para estudo da germinação e outra para estudo do crescimento. O ensaio de crescimento é utilizado por ser geralmente mais sensível ao ensaio de germinação (MALHEIROS; PERES, 2001, p. 503-523).

Para controle utilizou-se água destilada sob as mesmas condições do ensaio.

Para análise estatística empregou-se o programa SISVAR (FERREIRA, 2000). A verificação das diferenças de médias estatisticamente significantes foi realizada por meio do teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade. O teste de Scott-Knott foi escolhido por ser claro, objetivo e isento de ambigüidades (presentes na maioria dos testes de comparações múltiplas). O tratamento foi considerado efetivo quando todas as repetições estiveram no mesmo grupo de médias.

3.6.1 Germinação

Segundo CARVALHO e NAKAGAWA (1988, p. 97-101) a germinação não é somente o fenômeno que em condições adequadas o eixo embrionário prossegue em seu desenvolvimento. Deve-se ter em mente as fases que ocorrem antes da retomada do desenvolvimento, que se iniciam com a colocação da semente em substrato adequado e absorção de umidade. A primeira fase é caracterizada pelo aumento da intensidade respiratória, início da degradação de substâncias de reserva (carboidratos, proteínas e lipídios) e desdobramento destas em substâncias de menor tamanho para facilitar o transporte. Na segunda fase ocorre o transporte das substâncias desdobradas, diminuição da absorção de água e crescimento lento da intensidade respiratória. A partir de um teor de umidade (50 a 60% para as cotiledonares), a semente retorna à intensa absorção de água e respiração, iniciando-se crescimento visível do eixo embrionário e a terceira fase. Substâncias desdobradas na primeira fase e transportadas na segunda fase são reorganizadas em substâncias complexas que, na terceira fase permitem o crescimento do eixo embrionário.

Portanto, qualquer alteração ocorrida na germinação de uma planta por meio de outra planta, pode ser decorrente de influência em todas as fases da germinação ou especificamente em uma fase.

Para o estudo da germinação fez-se leitura diária no mesmo horário abrindo as caixas em fluxo laminar. As sementes que germinaram foram retiradas diariamente até o sétimo dia. As sementes foram consideradas germinadas conforme descrito por DE FEO, DE SIMONE e SENATORE (2002, p. 573-578) e ADEGAS, VOLL e PRETE (2003, p. 21-25), ou seja, quando se tornou visível a protrusão da radícula através do tegumento.

Calculou-se o índice de velocidade de germinação (IVG) segundo MAGUIRE (1962, p. 176-177) para cada repetição de cada tratamento (KRZYZANOWSKI; VIEIRA; FRANÇA NETO, 1999, p. 2.4). O referido índice é

calculado utilizando-se a quantidade de sementes germinadas, dividindo-a pelo dia da germinação e somando-se até o último dia de germinação. Tomando-se como exemplo a germinação de uma repetição com 10 sementes, que ao primeiro dia germinaram 4 sementes, o número 4 é dividido por 1; ao segundo dia germinaram 2 sementes, o número 2 é dividido por 2; ao terceiro dia germinaram 3 sementes, o número 3 é dividido por 3 e ao quarto dia germinou 1 semente, o número 1 é dividido por 4. Somando-se os resultados das divisões anteriores obtém-se o índice de velocidade de germinação 6,25.

As médias dos índices de velocidade de germinação foram submetidas ao Teste Scott-Knott.

3.6.2. Crescimento

Para avaliar o crescimento, ou seja, mensurar as radículas e os hipocótilos de *Lactuca sativa*, verificar presença de folíolos após tratamento com diferentes amostras e comparar os resultados aos obtidos com controle, deve-se lembrar que o crescimento é resultado da germinação.

O hipocótilo e a radícula são originados a partir do eixo embrionário. O eixo embrionário é a parte vital da semente, contendo tecido meristemático em suas duas extremidades, apresentando condições de crescimento para dois sentidos, o das raízes (radícula) e o do caule (hipocótilo), originando plântula com condições de fixação ao solo e de fotossintetizar substâncias necessárias. (CARVALHO; NAKAGAWA, 1983, p. 49).

O crescimento do eixo embrionário dá-se pelo aumento de suas células e pela multiplicação por meio de divisões mitóticas. Aumentando-se inicialmente o teor de água, as células sofrem certa expansão com posterior formação de novas células. Os processos de divisão celular e de expansão dependem da energia de moléculas simples (resultantes da degradação), de substâncias complexas armazenadas nos tecidos de

sustentação, de substâncias estruturais e das novas células. Para ocorrer estes processos envolvem-se sínteses, tais como, síntese de enzimas, lipídios, proteínas e componentes das paredes celulares (CARVALHO; NAKAGAWA, 1988, p. 127).

Alterações ocorridas no crescimento da radícula e do hipocótilo de *Lactuca sativa* podem ser oriundas da germinação ou dos processos envolvidos na fase do crescimento do eixo embrionário.

A leitura do crescimento foi realizada apenas ao último dia de experimento com abertura das caixas e retirada das plântulas uma a uma (com auxílio de uma pinça) para medir em papel milimetrado o comprimento da radícula e do hipocótilo.

Submeteram-se os resultados das leituras de crescimento ao Teste de Scott-Knott para comparação das médias, as quais também foram comparadas em porcentagem, considerando-se o tratamento controle com água destilada 100%.

Paralelamente à leitura do crescimento, verificou-se a presença ou ausência de folíolos nas plântulas de *Lactuca sativa*. Após medir os comprimentos da radícula e do hipocótilo, as quarenta plântulas de cada tratamento foram reunidas para verificação da massa e posterior comparação com a massa do tratamento controle.

3.7 CROMATOGRAFIA EM COLUNA

Orientando-se pelo estudo alelopático, o qual revelou as frações com maior potencial de inibição das sementes de *Lactuca sativa*, procedeu-se cromatografia em coluna para isolamento de substâncias com possível ação alelopática.

As frações hexano e acetato de etila, provenientes do extrato bruto etanólico das flores, foram submetidas a colunas cromatográficas com sílica-gel 60 (70-230 mesh).

3.7.1 Preparo das Pastilhas

As pastilhas a serem cromatografadas foram preparadas com sílica-gel 60 na proporção de 5 partes em relação a quantidade da amostra, e evaporada à secura em banho-maria a 50 °C, sob constante homogeneização.

3.7.2 Preparo das Colunas

Utilizando-se colunas de vidro, preparou-se a sílica-gel a ser depositada, na proporção de 5 partes em relação a quantidade da pastilha, com acréscimo de 10g de sílica-gel.

3.7.3 Procedimento para a Cromatografia em Coluna

Após preparo da coluna, colocou-se papel de filtro, a pastilha, novo papel de filtro e iniciou-se a eluição com fases móveis (100mL) com polaridade crescente, aumentando-se a proporção de solvente na ordem de 5 e 10%. Recolheram-se porções de aproximadamente 10 mL em frascos de vidro. Ao final da cromatografia, com o intuito de limpar a coluna, metanol e água destilada foram utilizados, sendo recolhidos em frasco único.

As frações obtidas das colunas cromatográficas foram reunidas após cromatografia em camada delgada (placas de sílica-gel GF₂₅₄), para obtenção de maior quantidade de material isolado, e levadas à secura em evaporador rotatório (Laborota®) com pressão reduzida à temperatura de 40°C e 90 rpm.

3.8 CROMATOGRAFIA PREPARATIVA

Esta técnica foi utilizada para separação de substância em mistura de difícil separação obtida na cromatografia em coluna. Baseia-se na separação em placas

cromatográficas com sílica-gel GF₂₅₄ (20 cm de largura e 10 cm de altura) eluídas com fase móvel apropriada, dissolução do composto separado em metanol, filtração a vácuo para retirada da sílica-gel e evaporação do solvente residual em banho-maria a 40 °C.

3.9 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS ISOLADOS

Para identificação, os compostos isolados foram submetidos à análise de ultravioleta e espectroscopia de ¹³C RNM.

Para ultravioleta, utilizou-se Espectrofotômetro de UV-Visível Shimadzu®, modelo UV-1601 diluindo-se as substâncias em análise conforme MABRY, MARKHAM e THOMAS (1970, p. 36-38).

Para ¹³C RNM, utilizou-se espectrofotômetro de Brucker® modelo AC 200, operando-se a 50 MHz. Os deslocamentos químicos foram registrados em unidades (ppm). O solvente utilizado na espectroscopia ¹³C-RNM foi DMSO-*d*₆ (dimetilsulfóxido) e como referência interna utilizou-se TMS (tetrametilsilano, cujo sinal aparece em 0 ppm).

3.10 ALELOPATOLOGRAFIA

Buscando-se testar a atividade alelopática dos compostos isolados por meio de colunas cromatográficas (frações que apresentaram melhor atividade alelopática), utilizamos técnica desenvolvida neste trabalho, a qual denominamos “alelopatografia”. A alelopatografia pode ser considerada um novo ensaio alelopático direcionado. A denominação “alelopatografia” deu-se somando a palavra alelopatia com grafia, ou seja, visualização de compostos com provável atividade alelopática.

O procedimento desenvolvido no presente trabalho tem como objetivo testar

com rapidez e eficiência a atividade alelopática de constituintes químicos isolados, e ao se tratar de mistura destes, obter separação para visualização clara da influência alelopática, utilizando como ferramenta a cromatografia em camada delgada (utilizaram-se placas cromatográficas de sílica-gel GF₂₅₄).

3.10.1 Preparo da Placa Cromatográfica para Alelopatografia

A amostra a ser analisada é diluída em solvente apropriado (50 µL) e distribuída uniformemente em 4 cm demarcados a partir de 1 cm de placa com 5 cm de largura e 8 cm de comprimento. Após 6,5 cm de eluição da fase móvel apropriada, a placa é retirada da cubeta, espera-se secagem do solvente, visualiza-se os compostos sob luz visível e ultravioleta (UV) a 365 nm (longo) e 254 nm (curto), demarca-se o local dos compostos e colocam-se as placas em estufa 60°C por 24 horas. Preparam-se duas placas para o ensaio alelopatográfico, uma destinada à avaliação da germinação e outra ao crescimento.

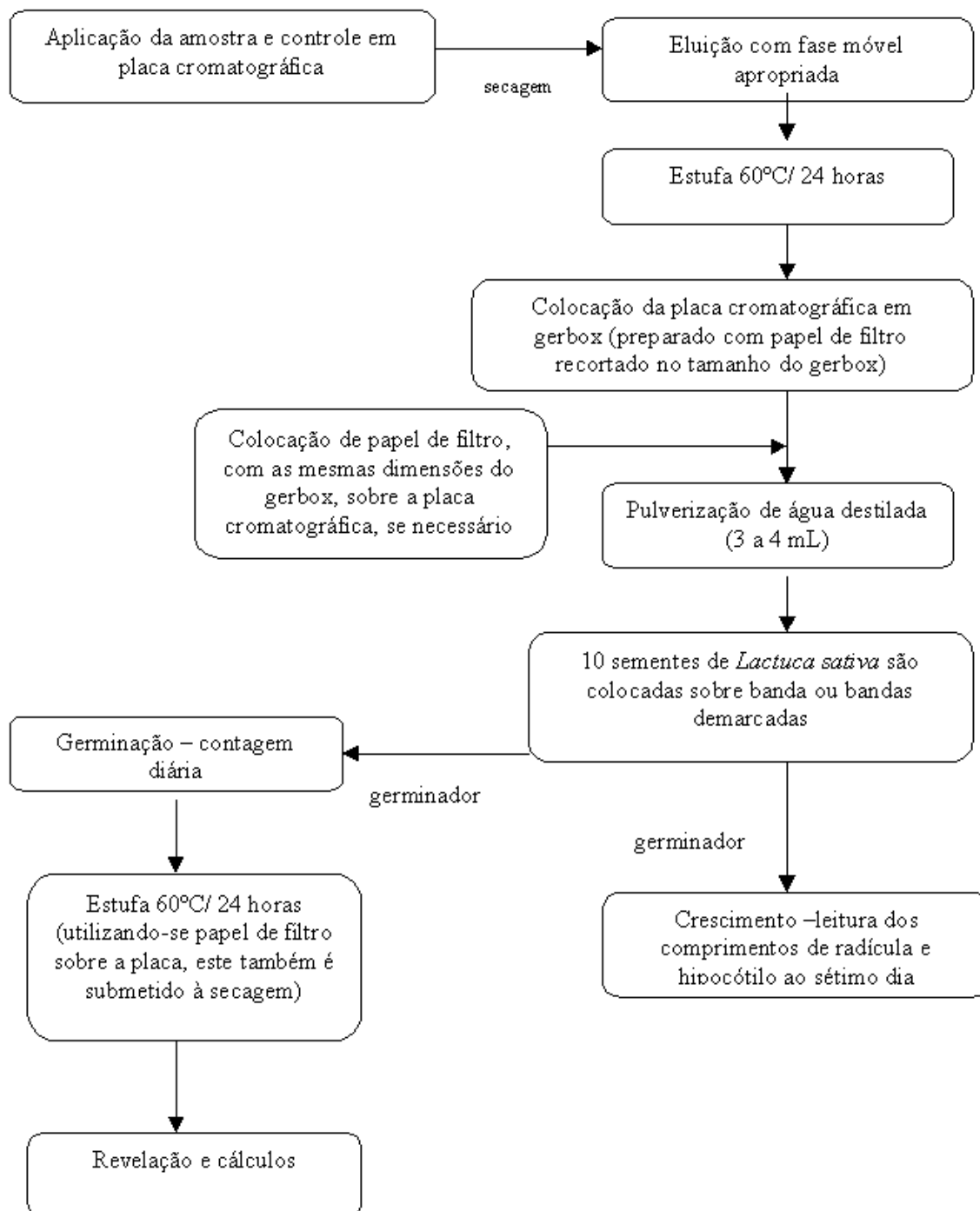
Placas controle são preparadas apenas com aplicação do solvente utilizado na diluição da amostra e eluição na mesma fase móvel com posterior envio a estufa, sob as mesmas condições do ensaio.

3.10.2 Ensaio Alelopatográfico

Após as 24 horas de estufa, as placas são retiradas e trabalhando-se em fluxo laminar, acomodam-se as placas em gerbox, as quais estão com papel de filtro (Whatman n.º.6), umedece-as com água destilada e acomodam-se dez sementes de *Lactuca sativa* (mesmas especificações do item 3.4) na região demarcada (Figura 20).

Trabalhando-se com compostos que apresentem solubilidade em água, um novo papel de filtro é acomodado sobre a placa cromatográfica antes de umedecê-la com água destilada.

FIGURA 20 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DA ALELOPATOGRAFIA



A utilização do papel de filtro sobre a placa cromatográfica, antes de acomodar as sementes, tem como finalidade evitar que substâncias solúveis em água, presentes nas bandas das placas cromatográficas, misturem-se e comprometam o ensaio. Com a utilização do papel de filtro, não ocorre mistura dos mesmos, pois os

compostos referenciados são absorvidos pelo papel em presença de água destilada, fato verificado com revelação do papel de filtro utilizado juntamente com a placa cromatográfica ao término do ensaio.

Os gerbox envoltos em papel alumínio foram enviados ao germinador à 20°C.

Para a análise da germinação e do crescimento procedeu-se conforme descrito no item 3.6, com modificações: na análise de germinação, os índices de velocidade de germinação não foram submetidos ao Teste de Scott-Knott e na análise de crescimento somente verifica-se o crescimento da radícula, do hipocótilo e formação de folíolo.

Decorridos os sete dias de ensaio e as leituras de germinação e crescimento, as placas retornaram a estufa para secagem e posterior revelação da placa cromatográfica com visualizador indicado para a classe do composto analisado.

Para análise estatística empregou-se o programa SISVAR (FERREIRA, 2000). O teste escolhido foi o de Scott-Knott (5% de probabilidade).

3.11 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Para realização deste estudo duas técnicas foram empregadas: difusão em gel, técnica adaptada de KONEMAN *et al.* (1993, p. 458-475), ROMEIRO (2001, p. 136-139) e CARVALHO *et al.* (2002, p. 255-258), e diluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM), técnica adaptada de MOURA *et al.* (1987, p. 262-263) e KONEMANN *et al.* (1993, p. 475-479).

Procurou-se testar *in vitro* a susceptibilidade de cepas de *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Proteus mirabilis* (ATCC 43071), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27283), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615) frente a diferentes concentrações de

extratos brutos etanólicos das flores e dos caules e folhas de *Aster lanceolatus*.

Para a escolha dos microorganismos a serem testados levou-se em consideração a facilidade e rapidez de crescimento destes em meios de rotina (ROMEIRO, 2001, p. 132), disponibilidade e significância clínica, procurando-se testar a atividade antibacteriana em maior quantidade possível de microorganismos.

3.11.1 Difusão em Gel

Este estudo baseou-se na inoculação de um microorganismo em meio de cultura específico, adição a este meio de discos de papel impregnados com amostras em estudo, difusão das substâncias impregnadas nos discos no meio de cultura e incubação em temperatura favorável ao desenvolvimento do microorganismo em teste.

A comprovação da atividade antibacteriana ocorre pela formação de halo de inibição ao redor do disco de papel impregnado com a amostra em estudo.

A escolha dos antimicrobianos utilizados para controle positivo de inibição seguiu critérios de disponibilidade (para o antimicrobiano cloranfenicol) e emprego na terapêutica, para o antimicrobiano cefalotina (CASTRO *et al.*, 2002, p. 553-558).

O etanol foi utilizado para controle, visto que o mesmo foi empregado para a obtenção e diluição dos extratos em estudo.

3.11.1.1 Preparo das amostras

As amostras foram obtidas a partir dos extratos brutos etanólicos das flores e dos caules e folhas de *Aster lanceolatus*. Primeiramente colocou-se em tubo de ensaio estéril apenas 200 µL de cada extrato bruto etanólico, utilizado como amostra 100%. No preparo das amostras subsequentes, 200 µL de cada extrato bruto etanólico foi transferido para um tubo de ensaio estéril e em seguida adicionado 200 µL de etanol, deste tubo, 200µL foram transferidos para outro tubo de ensaio, obtendo-se uma diluição a 50%, e assim sucessivamente até obter-se diluição a 12,5%.

Este procedimento foi realizado dentro de câmara de fluxo laminar.

3.11.1.2 Preparo dos discos de papel

Trabalhando-se em fluxo laminar, espalhou-se os discos de papel (6 mm) em placas de Petri, devidamente identificadas e impregnou-os com 10 µL de amostras previamente preparadas (tabela 1) e 10 µL de etanol. As placas contendo os discos foram fechadas e levadas à estufa 40°C por 24 horas.

TABELA 1 – CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS IMPREGNADOS NOS DISCOS DE PAPEL

DILUIÇÃO DA AMOSTRA	EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE FLORES	EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE CAULES E FOLHAS
100,0%	785,0µg/ 10 µL	475,0µg/ 10 µL
50,0%	392,5 µg/ 10 µL	237,5µg/ 10 µL
25,0%	196,2µg/ 10 µL	118,7µg/ 10 µL
12,5%	98,1µg/ 10 µL	59,4µg/ 10 µL

3.11.1.3 Preparo do inóculo

As cepas dos microorganismos em teste foram repicadas em ágar Mueller-Hinton e incubadas à 35°C, 24 horas antes do teste.

Para o preparo do inóculo, as culturas jovens de cada bactéria foram diluídas em 5 mL de salina estéril comparando-se com a turbidez do tubo 0,5 da escala de Mac Farland (0,5 mL de BaCl₂ · 2H₂O 0,048M – 1,75% p/v em 99,5 mL de H₂SO₄ 0,36N – 1% v/v). Realizou-se a inoculação com auxílio de swab estéril.

Este procedimento foi realizado dentro de câmara de fluxo laminar.

3.11.1.4 Teste de atividade antibacteriana com difusão em gel

O meio de cultura ágar Mueller-Hinton (ULUBELEN *et al.*, 2000, p. 458-462) (adquirido pronto da Newprov®) foi escolhido por ser um meio não enriquecido, porém suficientemente nutritivo para permitir o desenvolvimento das colônias

bacterianas (KONEMAN *et al.*, 1993, p. 460).

Para cada extrato testado procedeu-se da seguinte maneira: em cada placa inoculada, foram distribuídos discos de papéis impregnados com o extrato bruto etanólico puro, diluído a 50%, 25% e 12,5%, um disco impregnado apenas com etanol e um disco de controle positivo com cloranfenicol (CLO 30, lote A6389, validade jan/05 da Newprov®). Incubaram-se as placas inoculadas em estufa a 35°C, durante 24 horas. Após este período, as placas foram retiradas da estufa e medidos os halos de inibição, quando presentes, com auxílio de régua.

Paralelamente ao ensaio, prepararam-se placas com os microorganismos citados anteriormente contendo apenas discos com antimicrobianos (cefalotina - CFL30, lote 996, validade out/05 da Newprov® e cloranfenicol - CLO 30, lote A6389, validade jan/05 da Newprov®) e disco impregnado com etanol, obtendo-se placas controle. Os testes foram realizados em duplicata.

3.11.2 Concentração Inibitória Mínima

Utilizou-se o método de diluição em caldo, para determinação da CIM dos extratos brutos etanólicos das flores e dos caules e folhas de *Aster lanceolatus*, frente ao desenvolvimento de cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus pyogenes*.

Para este estudo inocularam-se microorganismos em meios de cultura com amostras a serem testadas em diferentes diluições. Decorrido o tempo necessário de incubação em temperatura favorável, efetuou-se as leituras das concentrações inibitórias mínimas, procurando-se o primeiro tubo onde não se observou crescimento bacteriano, ou seja, onde não ocorreu turvação.

3.11.2.1 Preparo do inóculo

Cepas dos microorganismos em teste foram repicadas em caldo tríptico de soja e incubadas à 35°C, 24 horas antes do teste.

Após as 24 horas de incubação, os tubos contendo os microorganismos e caldo (10mL), foram comparados com a turbidez do tubo 0,5 da escala de MacFarland (0,5 mL de BaCl₂. 2H₂O 0,048M – 1,75% p/v em 99,5 mL de H₂SO₄ 0,36N – 1% v/v). Do caldo tríptico de soja contendo os microorganismos, 2 mL foram retirados e colocados em 100 mL (2%) em solução estéril de Tween 80 a 2% em água destilada. Este procedimento foi realizado dentro de câmara de fluxo laminar.

3.11.2.2 Preparo das amostras e teste da concentração inibitória mínima

Utilizou-se para estudo amostras puras e diluídas a partir dos extratos brutos etanólicos das flores e dos caules e folhas de *Aster lanceolatus*.

Nove tubos foram preparados para cada microorganismo (em duplicata para cada amostra). O primeiro tubo foi preparado utilizando-se 1 mL de solução de extrato bruto etanólico. O segundo tubo foi preparado com 1 mL de extrato bruto etanólico e 1 mL de caldo tríptico de soja. O terceiro tubo foi preparado com 1 mL do segundo tubo e 1 mL de caldo tríptico de soja. O quarto tubo foi preparado com 1 mL do terceiro tubo e 1 mL de caldo tríptico de soja, e assim sucessivamente até o sétimo tubo. O oitavo tubo foi preparado apenas com 1 mL do sétimo tubo. O nono tubo preparou-se com 1 mL de caldo tríptico de soja. Após as diluições, os tubos receberam 1 mL de suspensão de microorganismos, com exceção do oitavo tubo que ficou apenas com 1mL do tubo número sete, sendo considerado o tratamento controle negativo. O tubo número nove é o tubo considerado tratamento controle positivo, pois não recebe extrato bruto etanólico. Este procedimento foi realizado em fluxo laminar. As concentrações obtidas após a diluição estão apresentadas na tabela 2. Os tubos foram incubados a 35°C por 24 horas e decorrido o tempo, procedeu-se às leituras.

TABELA 2 – CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS PARA ENSAIO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

DILUIÇÃO DA AMOSTRA	EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE FLORES	EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE CAULES E FOLHAS
1:1	78,50 mg/ mL	47,50 mg/ mL
1:2	39,25 mg/ mL	23,75 mg/ mL
1:4	19,62 mg/ mL	11,88 mg/ mL
1:8	9,81 mg/ mL	5,94 mg/ mL
1:16	4,91 mg/ mL	2,97 mg/ mL
1:32	2,45 mg/ mL	1,48 mg/ mL
1:64	1,23 mg/ mL	0,74 mg/ mL

3.12 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Para o estudo da atividade antifúngica do extrato bruto etanólico dos caules e folhas de *Aster lanceolatus*, utilizou-se o método adaptado de AUER e BETTIOL (1986, p. 49-51) e STANGARLIN *et al.* (1999, p. 16-21) com intuito de encontrar alguma inibição no crescimento micelial de isolados de *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum acutatum* (fornecidos pelo Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti-PR) e *Cylindrocladium spathulatum* (fornecido pela EMBRAPA Florestas -PR).

PARK *et al.* (1999, p. 126-130), documentaram a presença de várias espécies do gênero *Fusarium* em sementes de soja, dos quais detectou-se várias micotoxinas, entre elas a apicidina, a qual foi isolada, purificada e testada a toxicidade (ocasionando hemorragia de órgãos internos de ratos).

Segundo MENDES *et al.* (2001, p. 148-152), o *Fusarium oxysporum* é um fungo fitopatogênico encontrado em *Medicago sativa*, o qual ocasiona podridão radicular.

Colletotrichum acutatum é um fungo causador de antracnose do limoeiro galego (FEICHTENBERGER; MÜLLER; GUIRADO, 1997, p. 285) e flor preta em morangos (TANAKA; BETTI; KIMATI, 1997, p. 563).

O fungo *Cylindrocladium spathulatum* é causador da pinta-preta em folhas

de *Ilex paraguariensis*, sendo a principal doença fúngica da erva-mate, podendo ocasionar em viveiro e campo até 30 % de perdas de mudas (GRIGOLETTI JUNIOR; AUER, 1997, p. 345-346).

3.12.1 Crescimento Micelial em Placas

O extrato etanólico em teste foi adicionado em meio batata-dextrose-água (BDA) nas concentrações de 95, 190 e 285 mg/ 500mL e autoclavados (120°C e 1 atm por 15 minutos). O meio BDA contendo extrato foi vertido em placas de Petri (15 cm de diâmetro) e após uma hora de resfriamento, inocularam-se esporos de *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum acutatum* com sete dias de idade em meio BDA. Após vedação com filme plástico, as amostras foram incubadas a 25 °C no escuro por cinco dias. O teste foi efetuado com seis repetições. Para tratamento controle utilizou-se apenas o meio BDA.

As avaliações foram realizadas por meio de medições do diâmetro das colônias (média de duas medidas perpendiculares), após cinco dias de incubação dos patógenos e o resultado apresentado em médias das medidas.

3.12.2 Bioautografia Direta

Para o bioensaio por cromatografia em camada delgada utilizou-se alíquota de 50 µL (2,375mg) do extrato bruto etanólico dos caules e folhas de *Aster lanceolatus*, empregando-se método adaptado de STANGARLIN *et al.* (1999, p. 16-21).

Placas de sílica-gel GF₂₅₄, pré-lavadas com clorofórmio:metanol (1:1, v/v), foram preparadas e após a aplicação da amostra sobre a placa e secagem sob fluxo de ar, realizou-se a separação dos compostos utilizando-se o sistema diclorometano: metanol: água (95:4,5:0,5 - v/v/v).

Visualizaram-se os compostos sob luz visível e ultravioleta (UV) a 365 nm

(longo) e 254 nm (curto) e em seguida, as placas secas contendo as bandas individuais foram aspergidas com suspensão de esporos de *Cylindrocladium spathulatum* (1×10^5 esporos/ 1,6 mL de meio líquido batata-dextrose, 40 pulverizações), sendo mantidas sob umidade relativa de 100% a 25°C e luz.

Verificou-se nas placas em estudo (após sete dias), se havia presença de zonas de inibição de crescimento micelial ao redor das bandas individuais.

Para controle utilizou-se placa de sílica-gel GF₂₅₄ nas mesmas condições empregadas no bioensaio, porém sem aplicação de amostra. A bioautografia direta foi realizada em duplicata.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

TABELA 3- DETERMINAÇÃO DE ÁGUA E CINZAS TOTAIS EM *Aster lanceolatus*

DETERMINAÇÃO	FLORES (PORÇÃO I)	CAULES E FOLHAS (PORÇÃO II)
ÁGUA (%)	12,66	11,40
CINZAS TOTAIS (%)	7,11	5,58

Conforme tabela 3, os resultados apresentados para determinação de água em material vegetal, estão de acordo com os limites referenciados na FARMACOPÉIA (1988) que são de 8 a 14%. Pode-se observar resultados superiores nas determinações realizadas com as flores de *Aster lanceolatus* em relação aos caules e folhas.

4.2 ENSAIO SISTEMÁTICO DE ANÁLISE EM FITOQUÍMICA

4.2.1 Flores de *Aster lanceolatus*

Na pesquisa de flavonóides, a cor visualizada foi a cor vermelha a vermelho sangue na fração acetato de etila. O aparecimento da cor vermelha a vermelho sangue é indicativo de flavonóides da classe dos flavonóis, confirmada pela presença de fluorescência amarela esverdeada na Reação de Taubock.

Na pesquisa de esteróides e/ou triterpenos, a coloração visualizada foi verde, com mais intensidade na fração hexano e menos intensa nas frações diclorometano e acetato de etila. A coloração verde é indicativa de função hidroxila na posição três e duplo enlace na posição cinco e seis ou sete e oito no esqueleto terpenóide. A fração hidroalcolica não demonstrou presença de grupamentos terpenóides.

Na pesquisa de saponinas, o anel de espuma formado foi maior que um

centímetro após agitação e assim permaneceu após trinta minutos.

TABELA 4 – ENSAIO SISTEMÁTICO DE ANÁLISE FITOQUÍMICA COM EXTRATOS E FRAÇÕES DAS FLORES DE *Aster lanceolatus*

GRUPO FITOQUÍMICO PESQUISADO	FRAÇÃO/ EXTRATO				
	Fração Hexano	Fração Diclorometano	Fração Acetato de Etila	Fração Hidroalcoólica	Extrato Aquoso
Alcalóides	(-)	(-)	(-)	(-)	
Leucoantocianidinas	(-)	(-)	(-)	(-)	
Flavonóides	(-)	(-)	(++)	(+)	
- Reação de Taubock	(-)	(-)	(+)	(+)	
Cumarinas	(-)	(-)	(-)	(-)	
Antraquinonas	(-)	(-)	(-)	(-)	
Esteróides e/ou Triterpenos	(++)	(+)	(+)	(-)	
Heterosídeos Antociânicos					(-)
Saponinas					(+)
Heterosídeos Cianogenéticos					(-)
Taninos					
-Cloreto Férrico					(+)
-Solução de Gelatina					(+)
-Cloridrato de Emetina					(+)
-Formol Clorídrico					(+)
Amino Grupos					(+)
Ácidos Fixos					(-)
Ácidos Voláteis					(-)

NOTAS: (-) = Resultado Negativo

(+) = Resultado Positivo

(++) = Resultado Fortemente Positivo

Na pesquisa de taninos, utilizando-se solução aquosa de cloreto férrico 1%, visualizou-se coloração azul, indicativa de taninos. Ao utilizar-se solução aquosa de gelatina 2,5%, verificou-se leve turvação, turvação e intensa turvação com 0,5 mL, 1,0 mL e 2,0 mL de extrato aquoso de *Aster lanceolatus*, respectivamente, indicando presença de taninos. Utilizando solução aquosa de Emetina 1%, houve aparecimento de precipitado, indicativo de taninos. No último ensaio realizado para pesquisa de taninos (Ensaio de Staniasny), houve desenvolvimento de coloração azul ao adicionar-se cloreto férrico ao filtrado, indicando a presença de taninos hidrolisáveis.

A pesquisa de amino grupos apresentou resultado positivo com presença de coloração azul violácea.

4.2.2 Caules e Folhas de *Aster lanceolatus*

TABELA 5 – ENSAIO SISTEMÁTICO DE ANÁLISE FITOQUÍMICA COM EXTRATOS E FRAÇÕES DOS CAULES E FOLHAS DE *Aster lanceolatus*

GRUPO FITOQUÍMICO PESQUISADO	FRAÇÃO/ EXTRATO				
	Fração Hexano	Fração Diclorometano	Fração Acetato de Etila	Fração Hidroalcoólica	Extrato Aquoso
Alcalóides	(-)	(-)	(-)	(+)	
Leucoantocianidinas	(-)	(-)	(-)	(-)	
Flavonóides	(-)	(-)	(+)	(-)	
- Reação de Taubock	(-)	(-)	(+)	(-)	
Cumarinas	(-)	(-)	(-)	(-)	
Antraquinonas	(-)	(-)	(-)	(-)	
Esteróides e/ou Triterpenos	(+)	(+)	(-)	(-)	
Heterosídeos Antociânicos					(-)
Saponinas					(-)
Heterosídeos Cianogenéticos					(-)
Taninos					
-Cloreto Férrico					(-)
-Solução de Gelatina					(-)
-Cloridrato de Emetina					(-)
-Formol Clorídrico					(-)
Amino Grupos					(+)
Ácidos Fixos					(-)
Ácidos Voláteis					(+)

NOTAS: (-) = Resultado Negativo

(+) = Resultado Positivo

(++) = Resultado Fortemente Positivo

Ao pesquisar alcalóides nos caules e folhas de *Aster lanceolatus*, verificou-se reação positiva para os reativos de Mayer e Bertrand com o aparecimento de leve turvação branca. A confirmação foi realizada com uma segunda reação aonde houve desaparecimento do precipitado ao adicionar-se solução alcóolica de ácido tartárico 5%, possivelmente pela presença de alguma substância oxigenada com alta densidade eletrônica, pois a ausência de alcalóides foi confirmada com cromatografia em camada delgada com padrão.

O aparecimento de coloração vermelho a vermelho sangue na fração acetato de etila, na pesquisa de flavonóides, indica a presença de flavonóis. Houve

confirmação pela presença de fluorescência amarela esverdeada na Reação de Taubock.

Na pesquisa de esteróides e/ou triterpenos, a coloração visualizada foi verde, na fração hexano e fração diclorometano. A coloração verde é indicativa de função hidroxila na posição três e duplo enlace na posição cinco e seis no esqueleto terpenóide.

Na pesquisa de taninos, houve desenvolvimento de coloração verde com o cloreto férrico 1%, indicando a presença de flavonóides.

A presença de amino grupos foi confirmada com o aparecimento de coloração azul violácea. Este resultado positivo pode ser um indicativo para um resultado falso positivo na pesquisa de alcalóides.

No ensaio para verificação de ácidos voláteis, houve aparecimento de pH 3 na fita indicadora, indicando resultado positivo.

4.3 ÓLEO ESSENCIAL E ÁGUA AROMÁTICA

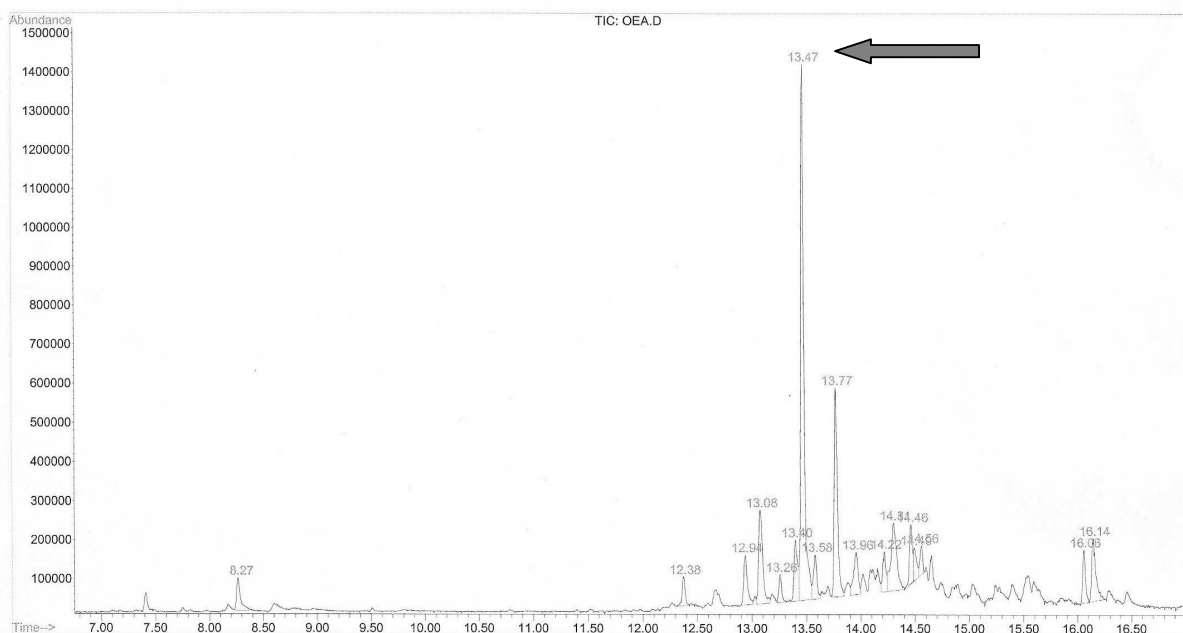
Apresenta-se o resultado em porcentagem peso/ volume, ou seja, volume em mL de óleo obtido em 100g de flores de *Aster lanceolatus* : 0,2 %.

Obtiveram-se 5 mL de água aromática remanescente no tubo graduado do aparelho tipo “Clevenger”, a qual foi submetida a ensaio alelopático.

4.3.1 Análise do Óleo Essencial por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrômetro de Massa

A análise do óleo essencial em aparelho CG-EM foi realizada solubilizando 0,2 mL de óleo em 1 mL de metanol. Os resultados encontram-se na figura 21 e tabela 6.

FIGURA 21- CROMATOGRAMA (CG/EM) DO ÓLEO ESSENCIAL

TABELA 6 – CONSTITUINTES DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Aster lanceolatus*

PICO	TEMPO DE RETENÇÃO (min)	ÁREA (%)	NOME DO CONSTITUINTE
1	8,27	2,58	Mirtenol
2	12,37	1,76	α -Muroleno
3	12,94	3,47	Naftaleno, 1,2-dihidro-1,1,6-trimetil
4	13,08	7,36	Bisaboleno
5	13,26	1,51	β -Lanona
6	13,40	4,11	Espatuleno
7	13,47	34,53	Oxido de Cariofileno
8	13,77	12,72	3-Ciclohexeno-1-carboxaldeído, 3,4
9	13,96	3,71	Cedren-13-ol, 8
10	14,22	2,48	Neocloveno-(I), dihidro
11	14,50	1,94	Azuleno, 1-4-dimetil-7-(1-metila)
12	14,56	1,53	2H-Benzociclohepteno-2-ona, 1,4a,5,6,7,8,9,9a-octahidro 4a metil, trans
13	16,15	5,19	1, hexahidrofarnesil acetona

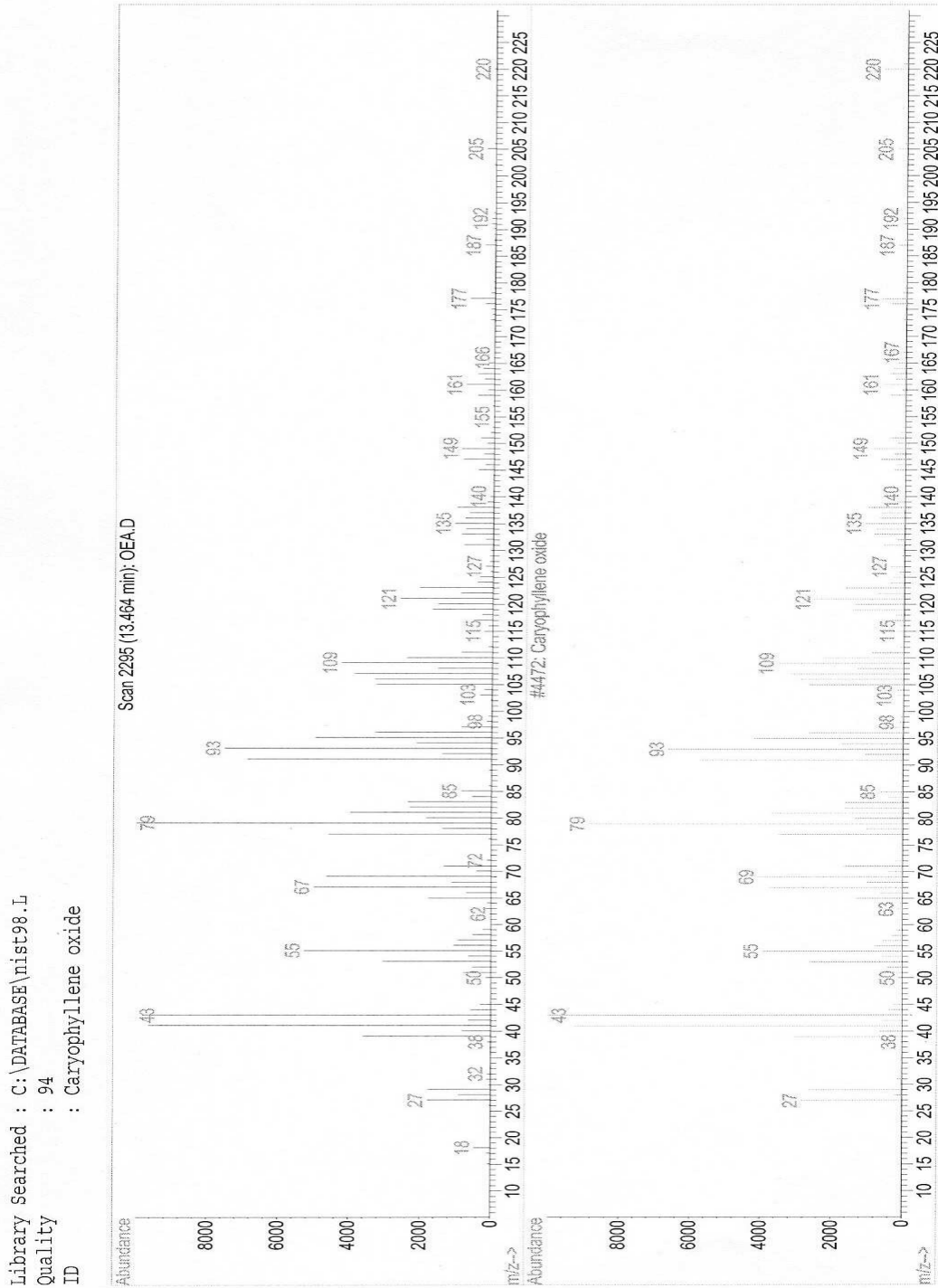
NOTA: Dados obtidos por meio de comparação ao banco de dados do aparelho (DATABASE/NIST98).

A tabela 6 apresenta os constituintes identificados no óleo essencial de *Aster lanceolatus*. A substância que apresentou maior porcentagem no óleo essencial foi o óxido de cariofileno.

O espectro de massa do óxido de cariofileno submetido à comparação com

espectro existente no banco de dados do aparelho apresenta-se na figura 22.

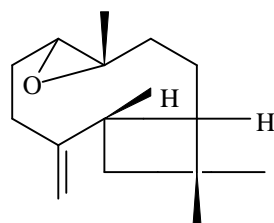
FIGURA 22 – ESPECTRO DE MASSA DO ÓXIDO DE CARIOFILENO



O óxido de cariofileno (Figura 23) é um sesquiterpeno presente em óleo

essencial de *Ageratum conyzoides* (conhecido como mentrasto) (CASTRO *et al.*, 2004, p. 55-57), *Calypttranthes concinna*, *Calypttranthes lúcida* e *Calypttranthes rubella* (LIMBERGER *et al.*, 2002, p. 355-360), com atividade biológica contra *Staphylococcus aureus* (UBELELEN *et al.*, 1994, p. 971-974).

FIGURA 23 – ÓXIDO DE CARIOFILENO



FONTE: CASTRO *et al.*, 2004, p. 55-57.

4.4 PREPARO DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS

TABELA 7 – DETERMINAÇÕES REALIZADAS NOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS DE *Aster lanceolatus*

PARÂMETRO	EXTRATO BRUTO ETANÓLICO	
	FLORES (PORÇÃO I)	CAULES E FOLHAS (PORÇÃO II)
QUANTIDADE INICIAL DE MATERIAL VEGETAL	560 g	800 g
VOLUME APÓS CONCENTRAÇÃO	515 mL	775mL
COR	MARROM ESCURO	MARROM ESVERDEADO
PH	6	6
TEOR DE SÓLIDOS (mg/mL)	78,5	47,5
TEOR DE SÓLIDOS (g%)	7,22	4,60

As flores de *Aster lanceolatus* apresentaram resultados superiores nas determinações de teor de sólidos em relação aos caules e folhas.

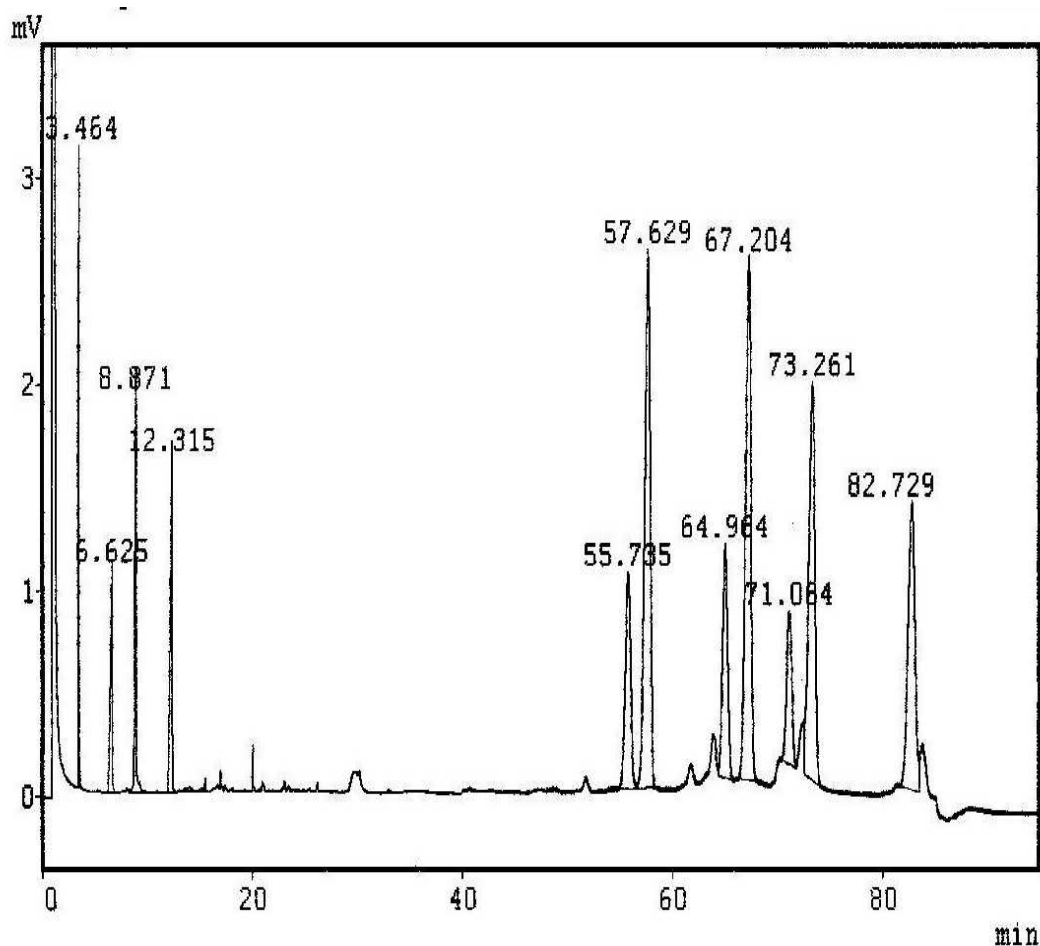
4.5 CROMATOGRAFIA GASOSA DAS FRAÇÕES

Amostras de 2mg das frações hexano, diclorometano e acetato de etila (de flores e de caules e folhas de *Aster lanceolatus*), foram submetidas à cromatografia gasosa diluídas em 1mL de metanol. Picos diferentes ao padrão (acetato de tocoferol)

foram apresentados apenas nos cromatogramas das frações hexano.

As análises dos cromatogramas obtidos foram efetuadas por comparação com o cromatograma padrão de referências analisadas em CG por padronização interna segundo CARVALHO (2001, p. 50).

FIGURA 24 - CROMATOGRAMA PADRÃO DE REFERÊNCIAS ANALISADAS EM CG POR PADRONIZAÇÃO INTERNA



FONTE: CARVALHO, 2001, p. 50.

TABELA 8 - DADOS DOS PADRÕES DE METABÓLICOS ANALISADOS EM CG POR PADRONIZAÇÃO INTERNA

REFERÊNCIA	tr	RR
Ácido Fênico	3.464	0.060
Ácido Benzoico	6.625	0.116
Ácido Salicílico	8.871	0.150
Ácido Cinâmico	12.315	0.214
Acetato de Tocoferol	57.629	1.000
Alfa amirina	64.964	1.130
Estigmasterol	67.204	1.170
Beta Amirina	71.064	1.230

Beta Sitosterol	73.261	1.270
Lupeol	82.729	1.440

FONTE: CARVALHO, 2001, p. 50.

NOTA: tr = tempo de retenção, RR = retenção relativa.

FIGURA 25 - CROMATOGRAMA DA FRAÇÃO HEXANO DAS FLORES DE *Aster lanceolatus*

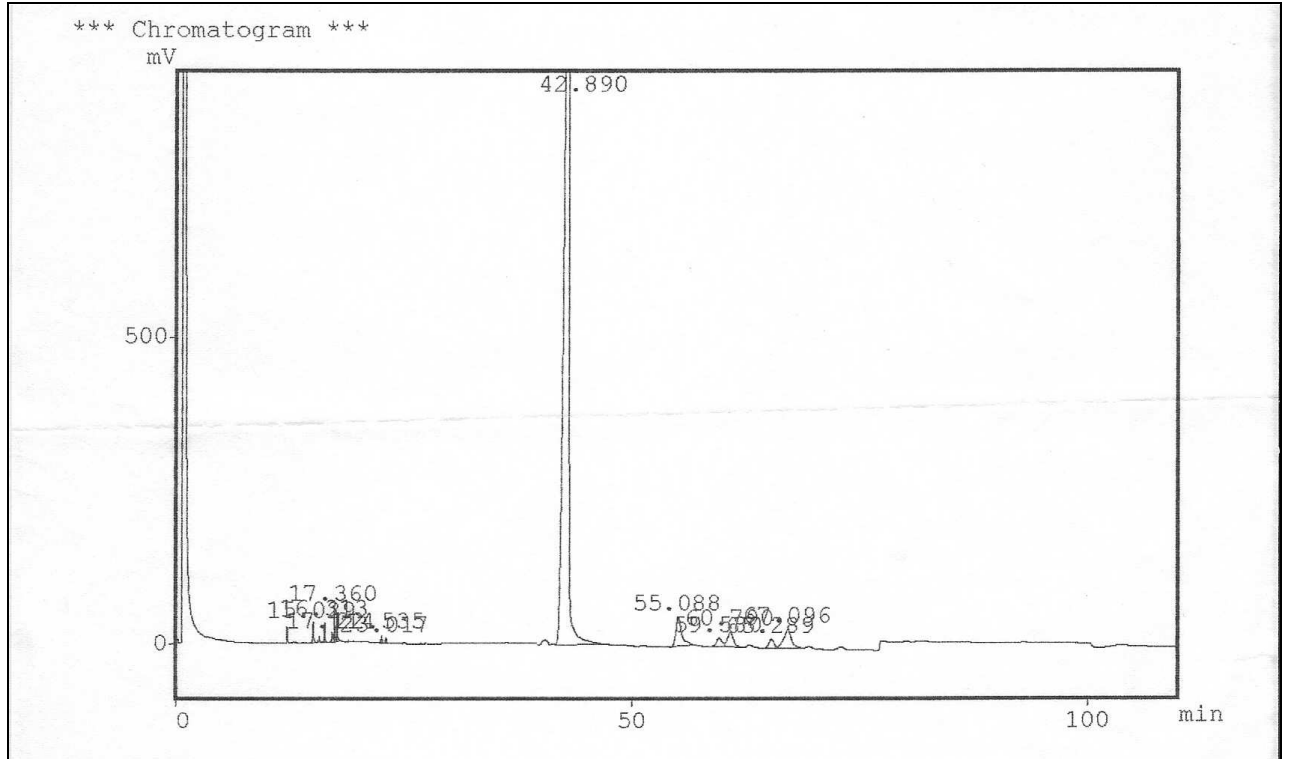


FIGURA 26 - CROMATOGRAMA DA FRAÇÃO HEXANO DOS CAULES E FOLHAS DE *Aster lanceolatus*

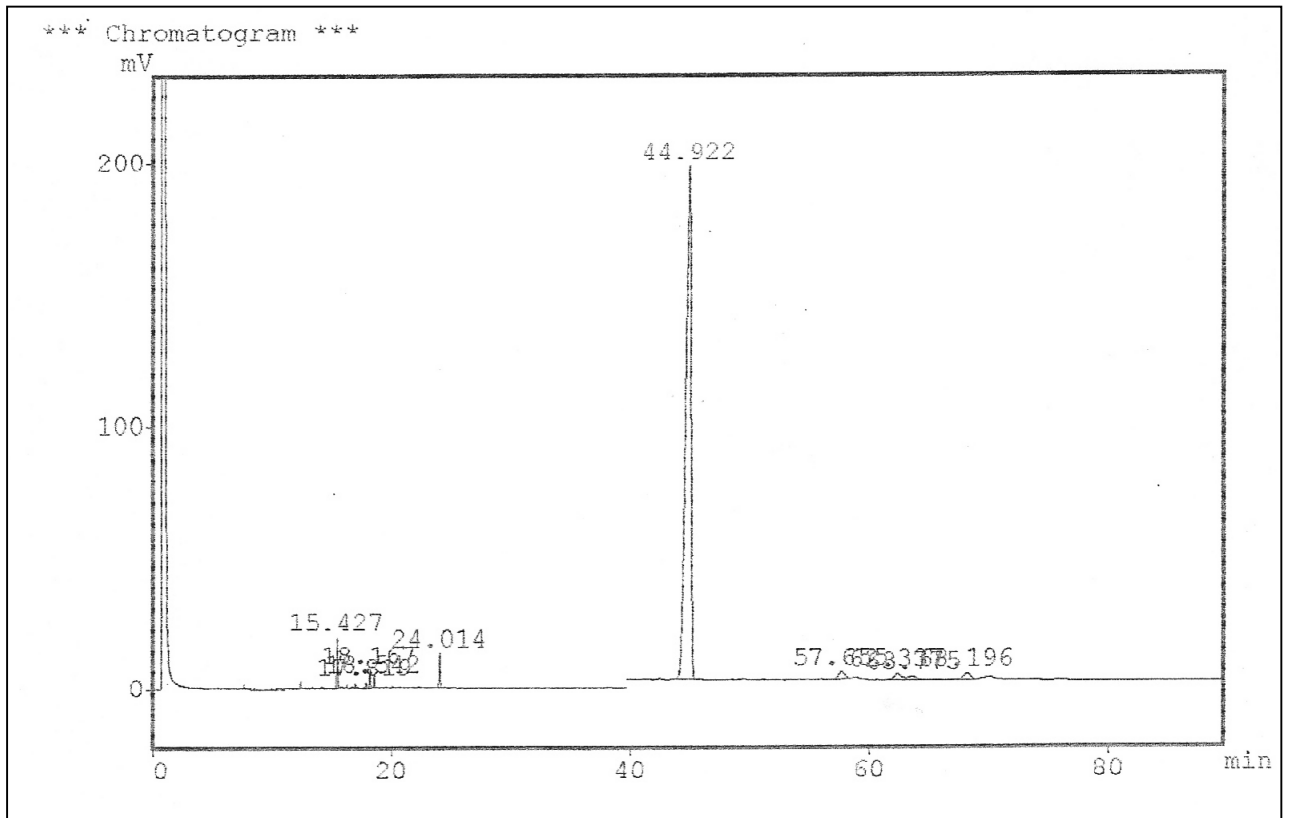


TABELA 9 - DADOS DOS CROMATOGRAMAS POR CG DAS FRAÇÕES HEXANO DE *Aster lanceolatus*

PICO	FLORES		CAULES E FOLHAS	
	tr	RR	tr	RR
1	15.029	0.3504	15.427	0.3434
2	16.313	0.3803	17.819	0.3967
3	17.114	0.3990	18.167	0.4044
4	17.360	0.4047	18.542	0.4127
5	22.535	0.5254	24.014	0.5345
6	23.017	0.5366	44.922	1.0000
7	42.890	1.0000	57.655	1.2834*
8	55.088	1.2844	62.337	1.3877
9	59.580	1.3891	63.775	1.4197
10	60.790	1.4173	68.196	1.5180
11	65.289	1.5222	-	-
12	67.096	1.5644	-	-

NOTA: tr = tempo de retenção, RR = retenção relativa.

Por meio de comparação da Retenção Relativa (com margem de 1% entre os valores) dos cromatogramas das amostras de frações hexano de *Aster lanceolatus* e do cromatograma padrão, verifica-se a presença de β -sitosterol nas frações hexano analisadas. Esta substância ainda não havia sido relatada na espécie em estudo.

4.6 ESTUDO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA

Submeteram-se a este estudo amostras dos extratos brutos etanólicos (flores, e caules e folhas), respectivas frações, água aromática, substância isolada da fração acetato de etila das flores e controles.

O ensaio alelopático utilizando-se água aromática teve algumas modificações: ao trabalhar com água aromática, esta não foi levada para estufa 60°C por 24 horas, mas utilizada diretamente sobre o papel de filtro, excluindo-se, portanto, o uso da água destilada para umedecer o papel de filtro. O controle utilizado foi água destilada sob as mesmas condições do ensaio. Neste trabalho a água aromática foi utilizada em pesquisa alelopática com o intuito de estabelecer uma relação entre a

atividade alelopática e os constituintes do óleo essencial.

A substância isolada da fração acetato de etila, denominada PPA, foi submetida a ensaio alelopático e alelopatográfico com o intuito de comparar os resultados obtidos com as duas técnicas.

4.6.1 Extrato e Frações das Flores de *Aster lanceolatus*

4.6.1.1 Avaliação da germinação

Observa-se diferença estatística em todas as concentrações da fração hexano e da fração acetato de etila, e diferença estatística em algumas concentrações do extrato bruto etanólico e da fração diclorometano, ao comparar com o controle (Tabela 10). Com os resultados apresentados, há indicação de influência inibitória da fração hexano e da fração acetato de etila sobre a germinação de *Lactuca sativa*, independente da concentração utilizada.

TABELA 10 – TESTE DE SCOTT-KNOTT REALIZADO NOS ÍNDICES DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DE *Lactuca sativa* NO ENSAIO ALELOPÁTICO COM FLORES DE *Aster lanceolatus*

EXTRATO/ FRAÇÃO	CONCENTRAÇÃO							CONTROLE ÁGUA DESTILADA
	0,6 mg	0,4 mg	0,3 mg	0,2 mg	0,1 mg	0,05 mg	0,025 mg	
EXTRATO BRUTO	6,6525	7,0625	9,4375	8,8950	9,3325	9,5000	9,2075	10,0000 b
ETANÓLICO	a	a	b	b	b	b	b	
FRAÇÃO HEXANO	7,9575	7,2650	9,2500	7,4250	8,0625	9,2075	8,9150	10,0000 c
	a	a	b	a	a	b	b	
FRAÇÃO	6,0825	6,8750	7,7575	8,8750	6,0525	8,7900	9,0000	9,3750 c
DICLOROMETANO	a	a	b	c	a	c	c	
FRAÇÃO ACETATO	5,3775	5,2700	5,0625	7,0800	4,9750	7,1650	4,7975	9,3750 c
DE ETILA	a	a	a	b	a	b	a	

NOTA: Médias seguidas com a mesma letra na mesma linha, não diferem estatisticamente entre si.

4.6.2.2 Avaliação do crescimento

- Comparação das médias das leituras de crescimento

De acordo com a tabela 11, estatisticamente, houve inibição do crescimento da radícula e do hipocótilo de *Lactuca sativa* ao utilizarmos a fração hexano em todas as concentrações, a fração diclorometano em 0,1mg e a fração acetato de etila diluída em 0,6mg, 0,4mg, 0,3mg, 0,2mg e 0,05mg.

Verificou-se que ocorreu influência inibitória na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* por meio da fração hexano e da fração acetato de etila. Estas influências explicam-se ao considerarmos que alterações ocorridas no crescimento da radícula e do hipocótilo de *Lactuca sativa* podem ser oriundas da germinação.

TABELA 11 – TESTE DE SCOTT-KNOTT REALIZADO NA AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA RADÍCULA E DO HIPOCÓTILO COM FLORES DE *Aster lanceolatus*

TRATAMENTO	REPETIÇÃO	RADÍCULA				HIPOCÓTILO			
		MÉDIA (mm)				MÉDIA (mm)			
		EBE	FH	FDCM	FAE	EBE	FH	FDCM	FAE
0,6mg	1	9,3 a	6,2 b	7,0 a	12,3 a	12,6 a	17,8 b	17,1 b	16,0 a
	2	10,6 b	7,7 b	6,7 a	8,7 a	16,0 a	18,0 b	14,1 a	11,8 a
	3	9,2 a	6,2 b	6,7 a	9,0 a	7,1 a	14,7 a	16,9 b	12,6 a
	4	9,7 a	5,5 b	5,3 a	8,4 a	13,9 a	16,4 b	15,5 a	14,1 a
0,4mg	1	4,5 a	4,0 a	8,2 a	11,4 a	7,6 a	8,2 a	18,9 b	12,9 a
	2	4,3 a	4,0 a	8,0 a	9,3 a	12,3 a	10,4 a	20,6 b	12,0 a
	3	5,8 a	5,2 b	9,9 a	9,1 a	10,6 a	12,2 a	18,2 b	6,7 a
	4	9,2 a	3,2 a	9,1 a	9,2 a	21,2 b	7,9 a	14,5 a	7,5 a
0,3mg	1	6,9 a	5,1 b	7,6 a	11,6 a	10,9 a	10,8 a	13,4 a	13,4 a
	2	7,6 a	4,1 a	11,7 b	9,0 a	11,8 a	10,7 a	12,4 a	14,4 a
	3	7,7 a	5,4 b	12,6 b	6,5 a	13,2 a	13,7 a	13,9 b	9,8 a
	4	10,4 b	4,8 b	13,0 b	5,6 a	15,8 a	13,6 a	16,0 a	10,9 a
0,2mg	1	7,4 a	5,4 b	12,6 b	6,6 a	10,6 a	10,0 a	16,5 b	12,0 a
	2	7,5 a	5,0 b	10,7 b	7,9 a	12,7 a	13,6 a	14,9 a	14,2 a
	3	11,6 b	3,7 a	10,9 b	8,8 a	18,0 b	9,6 a	17,5 b	14,0 a
	4	11,9 b	3,0 a	8,4 a	9,6 a	15,7 a	9,8 a	9,5 a	10,4 a
0,1mg	1	5,1 a	2,2 a	10,3 a	12,4 a	11,8 a	10,2 a	10,5 a	15,6 a
	2	10,8 b	3,0 a	7,7 a	11,8 a	15,3 a	11,8 a	9,6 a	10,7 a
	3	11,4 b	3,3 a	8,9 a	10,2 a	14,6 a	14,6 a	11,4 a	15,2 a
	4	10,9 b	3,3 a	9,8 a	13,7 b	14,7 a	9,8 a	12,2 a	14,6 a
0,05mg	1	9,5 a	4,1 a	11,9 b	9,2 a	11,4 a	10,5 a	17,1 b	11,3 a
	2	13,4 b	3,3 a	12,3 b	11,1 a	14,4 a	9,5 a	18,8 b	13,7 a
	3	10,3 b	2,7 a	9,1 a	12,3 a	14,0 a	8,5 a	14,3 a	12,0 a
	4	10,8 b	3,4 a	8,1 a	11,9 a	12,8 a	12,4 a	14,9 a	11,6 a
0,025mg	1	12,2 b	3,7 a	11,4 b	11,0 a	13,2 a	10,6 a	13,9 a	13,0 a
	2	8,1 a b	2,4 a	12,2 b	12,4 a	11,3 a	10,8 a	16,7 b	15,0 a
	3	9,5 a b	2,5 a	11,8 b	17,2 b	9,0 a	9,8 a	17,0 b	18,3 b
	4	11,5 b	2,8 a	10,8 b	13,8 b	14,7 a	11,8 a	13,6 a	15,7 a
Controle	1	14,8 b	14,8 c	15,8 c	15,8 b	24,5 b	24,5 c	21,5 b	21,5 b
	2	13,1 b	13,1 c	17,8 c	17,8 b	23,5 b	23,5 c	20,5 b	20,5 b
	3	14,1 b	14,1 c	18,4 c	18,4 b	24,1 b	24,1 c	21,7 b	21,7 b
	4	12,0 b	12,0 c	15,8 c	15,8 b	20,8 b	20,8 c	21,5 b	21,5 b

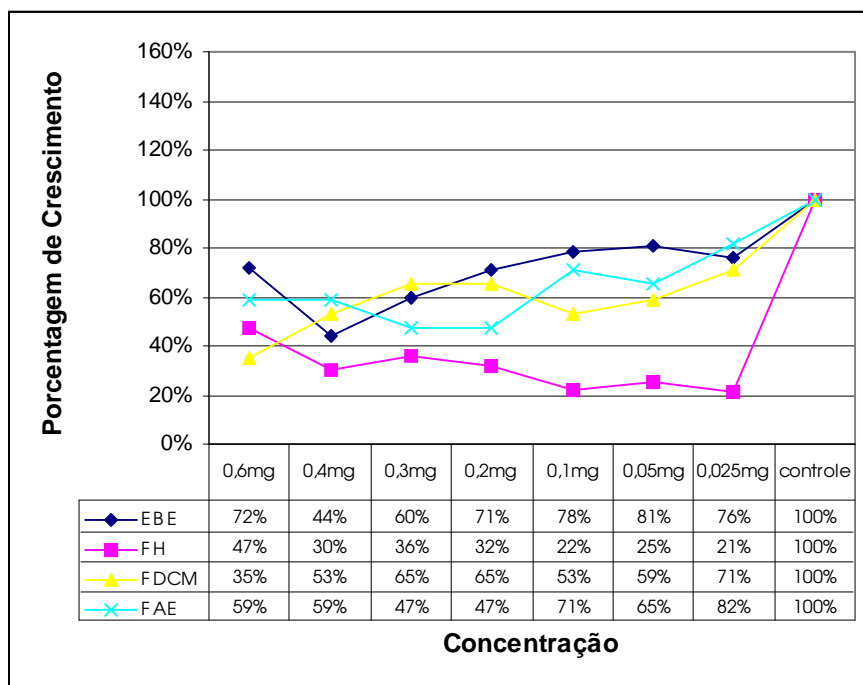
- NOTAS: (1) EBE= Extrato Bruto Etanólico; FH= Fração Hexano; FDCM= Fração Diclorometano; FAE= Fração Acetato de Etila.
 (2) Médias seguidas com a mesma letra na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si.

- Avaliação da porcentagem de crescimento de *Lactuca sativa*

A menor porcentagem de crescimento da radícula e do hipocótilo de *Lactuca sativa* pode ser observada nos gráficos 1 e 2, utilizando-se as frações hexano e acetato de etila de *Aster lanceolatus*.

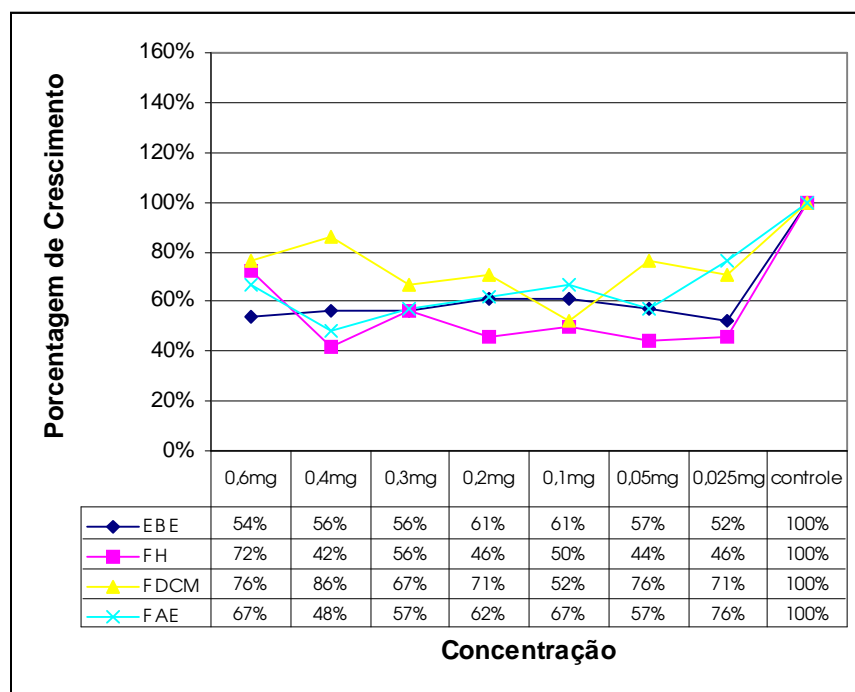
Plântulas com menores taxas de crescimento apresentam menor incorporação do suprimento de reserva dos tecidos pelo eixo embrionário, por meio da menor capacidade de transformação e de suprimento de reserva (KRZYZANOWSKI; VIEIRA; FRANÇA NETO, 1999, p. 2.9).

GRÁFICO 1 – PORCENTAGEM DE CRESCIMENTO DA RADÍCULA DE *Lactuca sativa* SUBMETIDA A ENSAIO ALELOPÁTICO COM EXTRATO BRUTO ETANÓLICO E FRAÇÕES DE FLORES DE *Aster lanceolatus*



NOTA: EBE= Extrato Bruto Etanólico; FH= Fração Hexano; FDCM= Fração Diclorometano; FAE= Fração Acetato de Etila.

GRÁFICO 2 – PORCENTAGEM DE CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DE *Lactuca sativa* SUBMETIDA A ENSAIO ALELOPÁTICO COM EXTRATO BRUTO ETANÓLICO E FRAÇÕES DE FLORES DE *Aster lanceolatus*



NOTA: EBE= Extrato Bruto Etanólico; FH= Fração Hexano; FDCM= Fração Diclorometano; FAE= Fração Acetato de Etila.

- Avaliação dos folíolos

TABELA 12– FOLÍOLOS NAS PLÂNTULAS DE *Lactuca sativa* NO ENSAIO ALELOPÁTICO COM FLORES DE *Aster lanceolatus*

EXTRATO/ FRAÇÃO	CONCENTRAÇÃO							CONTROLE ÁGUA DESTILADA
	0,6 mg	0,4 mg	0,3 mg	0,2 mg	0,1 mg	0,05 mg	0,025 mg	
EXTRATO BRUTO ETANÓLICO	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
FRAÇÃO HEXANO	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
FRAÇÃO DICLOROMETANO	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
FRAÇÃO ACETATO DE ETILA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)

NOTAS: (-) = Resultado Negativo

(+) = Resultado Positivo

Na tabela 12 observou-se ausência de folíolos nas plântulas de *Lactuca*

sativa submetidas a concentrações de extrato bruto etanólico de flores de *Aster lanceolatus* e respectivas frações, exceção para a concentração 0,05mg da fração diclorometano.

- Avaliação das massas das plântulas após leitura de crescimento

Resultados inibitórios do crescimento da radícula e hipocótilo por meio das frações hexano e acetato de etila, são apresentados na tabela 11 e evidenciados na tabela 13, com apresentação de diminuição da massa em relação ao controle utilizado. Sugere-se provável relação entre influência inibitória do crescimento e diminuição da massa das plântulas.

TABELA 13 – MASSAS DAS PLÂNTULAS DE *Lactuca sativa* NO ENSAIO ALELOPÁTICO COM FLORES DE *Aster lanceolatus*

SUBSTRATO	MASSA (g) DAS PLÂNTULAS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SUBSTRATO							MASSA DO CONTROLE
	0,6mg	0,4mg	0,3mg	0,2mg	0,1mg	0,05mg	0,025mg	
EBE	0,185	0,208	0,200	0,215	0,203	0,214	0,193	0,251
FH	0,234	0,219	0,224	0,184	0,180	0,191	0,227	0,251
FDCM	0,255	0,253	0,198	0,203	0,170	0,279	0,191	0,242
FAE	0,220	0,212	0,206	0,245	0,237	0,213	0,248	0,242

NOTA: EBE= Extrato Bruto Etanólico; FH= Fração Hexano; FDCM= Fração Diclorometano; FAE= Fração Acetato de Etila.

FIGURA 27 – COMPARAÇÃO ENTRE PLÂNTULAS DE *Lactuca sativa* SUBMETIDAS AO ENSAIO ALELOPÁTICO COM ÁGUA DESTILADA E 0,025mg DE FRAÇÃO HEXANO DAS FLORES DE *Aster lanceolatus*

EXTRATO BRUTO	9,3750	7,9150	8,6225	8,1450	9,5000	8,1875	8,6250	9,3750 b
ETANÓLICO	b	a	a	a	b	a	a	
FRAÇÃO HEXANO	5,1675	6,9775	8,4375	8,4150	8,6450	8,8325	5,4650	9,2075 c
	a	b	c	c	c	c	c	
FRAÇÃO	8,3825	9,3750	9,2075	9,2900	8,6250	8,8750	9,1250	9,2075 b
DICLOROMETANO	a	b	b	b	a	a	b	
FRAÇÃO ACETATO DE	8,7075	9,2500	9,1650	7,4575	9,7075	8,3725	9,1225	9,3750 b
ETILA	b	b	b	a	b	a	b	

NOTA: Médias seguidas com a mesma letra na mesma linha, não diferem estatisticamente entre si.

4.6.2.2 Avaliação do crescimento

- Comparação das médias das leituras de crescimento

De acordo com a tabela 15, estatisticamente, houve inibição do crescimento da radícula e do hipocótilo de *Lactuca sativa* ao utilizarmos extrato bruto etanólico na concentração de 0,6mg, 0,4mg e 0,025mg, e fração acetato de etila em 0,6mg, 0,3mg, 0,1mg, 0,05mg e 0,025mg.

As frações hexano e diclorometano não influenciam o crescimento de radículas e hipocótilos de *Lactuca sativa*, resultados confirmados estatisticamente na tabela 15.

TABELA 15 – TESTE DE SCOTT-KNOTT REALIZADO NA AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA RADÍCULA E DO HIPOCÓTILO NO ENSAIO ALELOPÁTICO COM CAULES E FOLHAS DE *Aster lanceolatus*

TRATAMENTO	REPETIÇÃO	RADÍCULA				HIPOCÓTILO			
		MÉDIA (mm)				MÉDIA (mm)			
		EBE	FH	FDCM	FAE	EBE	FH	FDCM	FAE
0,6mg	1	1,8 a	14,0 b	14,0 b	2,4 a	8,3 a	16,4 b	16,8 b	9,5 a
	2	3,0 a	13,4 b	14,4 b	2,3 a	11,2 a	16,9 b	14,1 a	9,7 a
	3	2,2 a	10,2 a	15,6 b	2,6 a	8,8 a	11,0 a	17,1 b	10,8 a
	4	3,2 a	9,0 a	14,7 b	2,6 a	11,6 a	9,3 a	19,0 b	8,8 a
0,4mg	1	4,3 a	14,5 b	15,9 b	2,7 a	10,2 a	15,6 b	16,5 b	9,1 a
	2	4,7 a	16,9 b	16,0 b	2,2 a	11,0 a	19,1 b	17,5 b	10,9 a
	3	5,5 a	10,8 a	15,6 a	2,9 a	10,2 a	14,5 b	16,1 b	10,5 a
	4	4,2 a	12,1 a	10,7 a	3,2 a	10,9 a	10,1 a	10,7 a	12,0 b
0,3mg	1	4,2 a	16,3 b	13,9 b	2,4 a	11,3 a	15,3 b	16,0 b	8,5 a
	2	4,2 a	15,8 b	14,1 b	2,9 a	12,4 b	15,6 b	15,3 b	12,8 a
	3	4,4 a	16,5 b	14,0 b	3,2 a	12,8 b	18,7 b	15,8 b	12,7 a
	4	3,7 a	8,2 a	10,2 a	3,7 a	10,1 a	10,3 a	11,8 a	10,5 a
0,2mg	1	3,4 a	14,0 b	17,3 b	5,1 a	13,4 b	17,6 b	15,2 b	15,4 a
	2	4,0 a	14,9 b	15,8 b	4,2 a	9,9 a	15,9 b	18,2 b	14,6 a

	3	4,2 a	14,2 b	17,2 b	3,4 a	15,4 b	13,3 a	16,5 b	12,8 b
	4	3,8 a	12,7 b	17,8 b	3,2 a	13,3 b	15,0 b	18,7 b	8,8 a
0,1mg	1	5,0 a	11,7 a	12,9 b	3,9 a	12,5 b	14,3 b	15,8 b	9,5 a
	2	5,0 a	10,8 a	16,0 b	2,6 a	15,0 b	12,8 a	16,1 b	5,4 a
	3	4,2 a	14,3 b	13,8 b	3,6 a	12,6 b	12,7 a	16,0 b	12,6 a
	4	4,6 a	5,9 a	13,3 a	3,0 a	13,0 b	8,4 a	16,4 b	8,2 a
0,05mg	1	3,4 a	17,8 b	12,6 a	2,7 a	9,2 a	17,2 b	12,6 a	9,6 a
	2	3,8 a	14,4 b	12,1 a	3,6 a	9,5 a	14,7 b	13,7 a	11,4 a
	3	3,4 a	13,1 b	11,3 a	3,5 a	12,0 b	16,8 b	11,1 a	13,4 a
	4	3,9 a	16,6 b	8,6 a	3,3 a	12,3 b	20,3 b	12,1 a	10,4 a
0,025mg	1	2,8 a	15,1 b	17,6 b	2,6 a	7,4 a	14,7 b	16,2 b	7,8 a
	2	3,1 a	12,1 a	14,9 b	2,8 a	10,5 a	13,1 a	12,4 a	8,0 a
	3	3,1 a	16,6 b	16,8 b	4,2 a	10,4 a	16,0 b	15,6 b	10,3 a
	4	3,7 a	9,8 a	10,2 a	3,0 a	10,4 a	8,4 a	10,8 a	10,1 a
Controle	1	20,0 d	14,4 b	14,4 b	20,0 c	27,1 d	21,7 b	21,7 b	27,1 b
	2	17,8 c	14,9 b	14,9 b	17,8 bc	19,7 c	22,5 b	22,5 b	19,7 b
	3	14,5 b	9,4 a	9,4 a	14,5 b	16,0 b	15,4 b	15,4 b	16,0 b
	4	16,9 c	7,9 a	7,9 a	16,9 bc	21,9 c	12,2 a	12,2 a	21,9 b

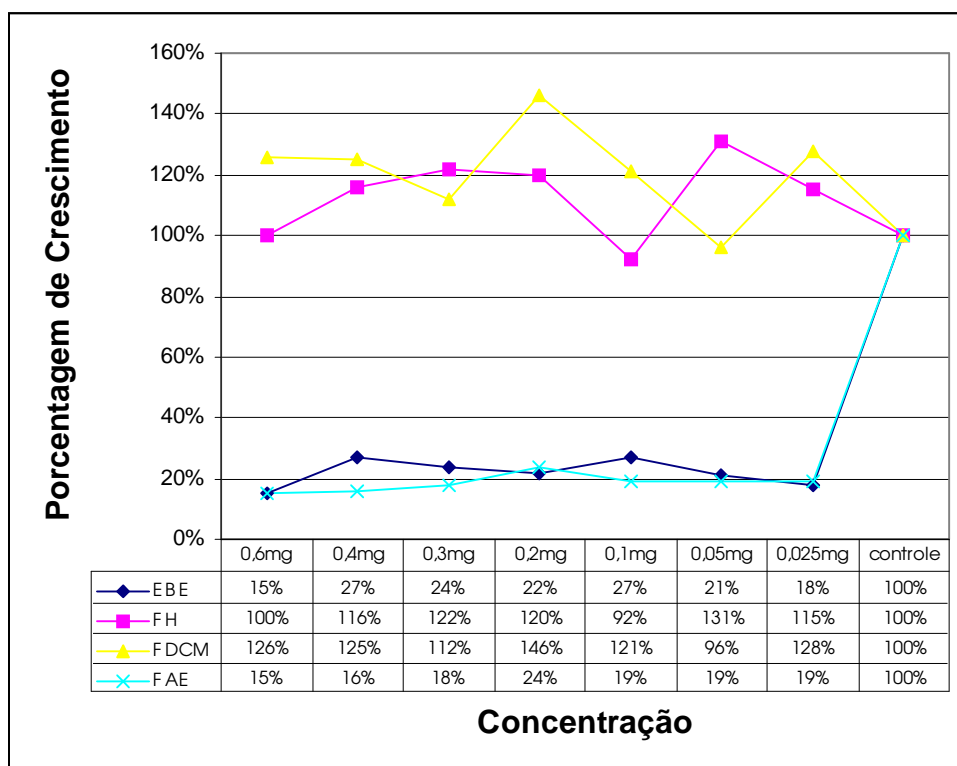
NOTAS: (1) EBE= Extrato Bruto Etanólico; FH= Fração Hexano; FDCM= Fração Diclorometano; FAE= Fração Acetato de Etila.

(2) Médias seguidas com a mesma letra na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si.

- Avaliação da porcentagem de crescimento de *Lactuca sativa*

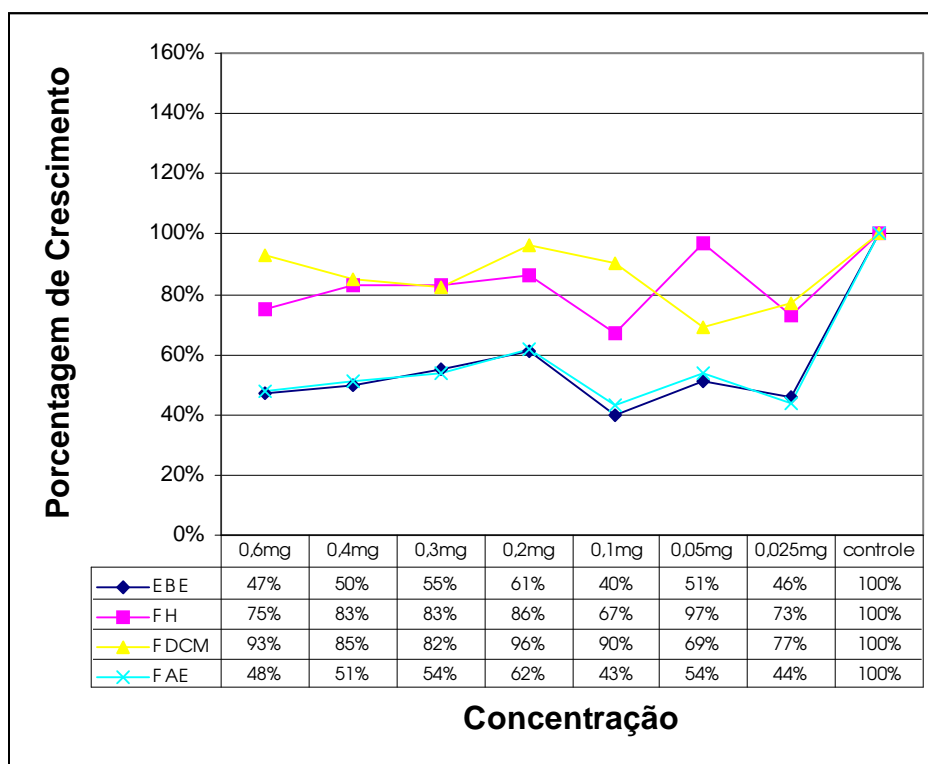
Nos gráficos 3 e 4 pode-se observar menor porcentagem de crescimento da radícula e do hipocótilo de *Lactuca sativa* utilizando-se a fração acetato de etila de caules e folhas de *Aster lanceolatus*.

GRÁFICO 3 – PORCENTAGEM DE CRESCIMENTO DA RADÍCULA DE *Lactuca sativa* SUBMETIDA A ENSAIO ALELOPÁTICO COM EXTRATO BRUTO ETANÓLICO E FRAÇÕES DOS CAULES E FOLHAS DE *Aster lanceolatus*



NOTA: EBE= Extrato Bruto Etanólico; FH= Fração Hexano; FDCM= Fração Diclorometano; FAE= Fração Acetato de Etila.

GRÁFICO 4 – PORCENTAGEM DE CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DE *Lactuca sativa* SUBMETIDA A ENSAIO ALELOPÁTICO COM EXTRATO BRUTO ETANÓLICO E FRAÇÕES DOS CAULES E FOLHAS DE *Aster lanceolatus*



NOTA: EBE= Extrato Bruto Etanólico; FH= Fração Hexano; FDCM= Fração Diclorometano; FAE= Fração Acetato de Etila.

Plântulas com menores taxas de crescimento apresentam menor incorporação do suprimento de reserva dos tecidos pelo eixo embrionário, por meio da menor capacidade de transformação e de suprimento de reserva (KRZYZANOWSKI; VIEIRA; FRANÇA NETO, 1999, p. 2.9).

- Avaliação dos folíolos

TABELA 16 – FOLIÓLOS NAS PLÂNTULAS DE *Lactuca sativa* NO ENSAIO ALELOPÁTICO COM CAULES E FOLHAS DE *Aster lanceolatus*

EXTRATO/ FRAÇÃO	CONCENTRAÇÃO							CONTROLE ÁGUA DESTILADA
	0,6 mg	0,4 mg	0,3 mg	0,2 mg	0,1 mg	0,05 mg	0,025 mg	
EXTRATO BRUTO ETANÓLICO	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
FRAÇÃO HEXANO	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
FRAÇÃO DICLOROMETANO	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
FRAÇÃO ACETATO DE ETILA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)

NOTAS: (-) = Resultado Negativo

(+) = Resultado Positivo

De acordo com a tabela 16, ocorreu ausência de folíolos nas plântulas de *Lactuca sativa* submetidas a concentrações de extrato bruto etanólico e respectivas

frações, exceção encontrada com as concentrações 0,6mg e 0,4mg da fração hexano e 0,2mg de extrato bruto etanólico.

Verificou-se que influência inibitória ocorrida na germinação de *Lactuca sativa* por meio da fração hexano não se repetiu no crescimento da radícula, do hipocótilo e desenvolvimento de folíolos. Verificando-se a fração diclorometano, observa-se inibição da germinação, nenhuma influência no crescimento da radícula e hipocótilo, mas, inibição no desenvolvimento dos folíolos de *Lactuca sativa*. Os resultados apresentados anteriormente se devem, provavelmente da influência em diferentes fases da germinação de *Lactuca sativa* por meio das frações de caules e folhas de *Aster lanceolatus*.

- Avaliação das massas das plântulas após leitura de crescimento

TABELA 17 – MASSAS DAS PLÂNTULAS DE *Lactuca sativa* NO ENSAIO ALELOPÁTICO COM CAULES E FOLHAS DE *Aster lanceolatus*

SUBSTRATO	MASSA (g) DAS PLÂNTULAS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SUBSTRATO							MASSA DO CONTROLE
	0,6mg	0,4mg	0,3mg	0,2mg	0,1mg	0,05mg	0,025mg	
EBE	0,157	0,150	0,175	0,200	0,199	0,162	0,152	0,227
FH	0,217	0,217	0,222	0,221	0,209	0,211	0,248	0,183
FDCM	0,237	0,208	0,203	0,220	0,233	0,205	0,220	0,183
FAE	0,155	0,170	0,169	0,178	0,163	0,185	0,161	0,227

NOTA: EBE= Extrato Bruto Etanólico; FH= Fração Hexano; FDCM= Fração Diclorometano; FAE= Fração Acetato de Etila.

Avaliando-se as leituras de crescimento, observou-se que a fração acetato de etila em comparação as outras frações, teve maior influência inibitória sobre o crescimento da radícula e do hipocótilo de *Lactuca sativa* (Tabela 15), o que refletiu diretamente na massa das plântulas, fato observado na tabela 17, onde a fração acetato de etila (em todas as concentrações) aparece com a massa abaixo do valor do controle utilizado.

Conforme ensaio realizado com os caules e folhas de *Aster lanceolatus*,

sugere-se provável relação entre influência inibitória do crescimento e diminuição da massa das plântulas.

FIGURA 28 – COMPARAÇÃO ENTRE PLÂNTULAS DE *Lactuca sativa* SUBMETIDAS AO ENSAIO ALELOPÁTICO COM ÁGUA DESTILADA E 0,025mg DE FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DOS CAULES E FOLHAS DE *Aster lanceolatus*



Ao considerarmos a fração acetato de etila como o melhor resultado no ensaio alelopático dos caules e folhas de *Aster lanceolatus*, procurou-se na figura 28 demonstrar que a menor concentração utilizada (0,025mg) foi capaz de inibir o crescimento da radícula e do hipocótilo de *Lactuca sativa*, resultado comprovado estatisticamente.

4.6.3 Água Aromática de *Aster lanceolatus*

4.6.3.1 Avaliação da germinação

A análise da tabela 18 demonstra diferença estatística entre os resultados de germinação de *Lactuca sativa* quando submetidos a ensaio com água aromática de

Aster lanceolatus e água destilada, sugerindo inibição sobre a germinação de sementes de *Lactuca sativa* por meio da referida água aromática.

TABELA 18– TESTE DE SCOTT-KNOTT REALIZADO NOS ÍNDICES DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DE *Lactuca sativa* NO ENSAIO ALELOPÁTICO COM ÁGUA AROMÁTICA DE *Aster lanceolatus*

AMOSTRA	ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO
ÁGUA AROMÁTICA	3,6625 a
CONTROLE	7,5425 b

NOTA: Médias seguidas com a mesma letra na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si.

4.6.3.2 Avaliação do crescimento

- Comparação das médias das leituras de crescimento

TABELA 19 – TESTE DE SCOTT-KNOTT REALIZADO NA AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO NO ENSAIO ALELOPÁTICO COM ÁGUA AROMÁTICA DE *Aster lanceolatus*

PARTE DA PLÂNTULA ANALISADA					
RADÍCULA			HIPOCÓTILO		
TRATAMENTO	REPETIÇÃO	MÉDIA (mm)	TRATAMENTO	REPETIÇÃO	MÉDIA (mm)
ÁGUA AROMÁTICA	1	16,9 a	ÁGUA AROMÁTICA	1	10,3 a
	2	7,9 a		2	8,2 a
	3	13,2 a		3	10,7 a
	4	19,9 a		4	13,8 a
CONTROLE	1	20,6 a	CONTROLE	1	22,4 b
	2	23,6 a		2	29,8 b
	3	21,2 a		3	20,6 b
	4	24,2 a		4	28,4 b

NOTA: Médias seguidas com a mesma letra na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si.

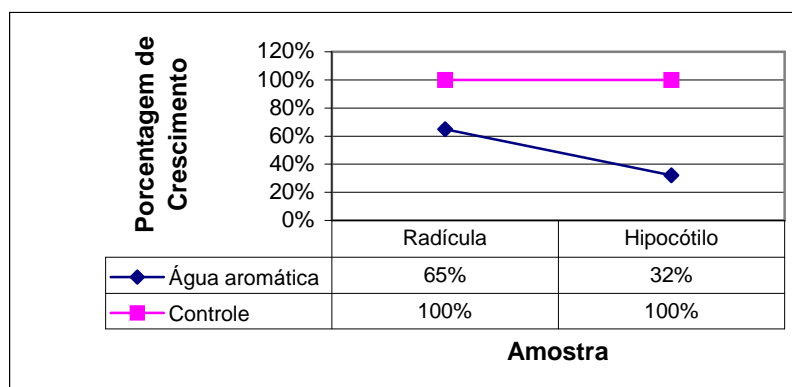
Na tabela 19 nos resultados das médias das leituras de comprimento das radículas, não se observam diferenças estatísticas. Na referida tabela observam-se diferenças estatísticas nos resultados das médias (em todas as repetições) das leituras de comprimento dos hipocótilos.

Os resultados apresentados sugerem que a influência alelopática no

crescimento de *Lactuca sativa*, por meio de água aromática de *Aster lanceolatus* dá-se apenas no crescimento do hipocótilo. Sugere-se que, em água aromática de *Aster lanceolatus* há constituintes químicos, capazes de inibir os processos envolvidos no crescimento do hipocótilo, mas incapazes de inibir o crescimento da radícula.

- Avaliação da porcentagem de crescimento de *Lactuca sativa*

GRÁFICO 5 – PORCENTAGEM DE CRESCIMENTO DA RADÍCULA E DO HIPOCÓTILO DE *Lactuca sativa* SUBMETIDA A ENSAIO ALELOPÁTICO COM ÁGUA AROMÁTICA DE *Aster lanceolatus*



No gráfico 5 observa-se menor percentual de crescimento nos hipocótilos de *Lactuca sativa* em comparação ao crescimento das radículas.

- Avaliação dos folíolos

As plântulas de *Lactuca sativa* submetidas à água aromática de *Aster lanceolatus* não apresentaram folíolos, ao contrário das plântulas submetidas ao controle água destilada.

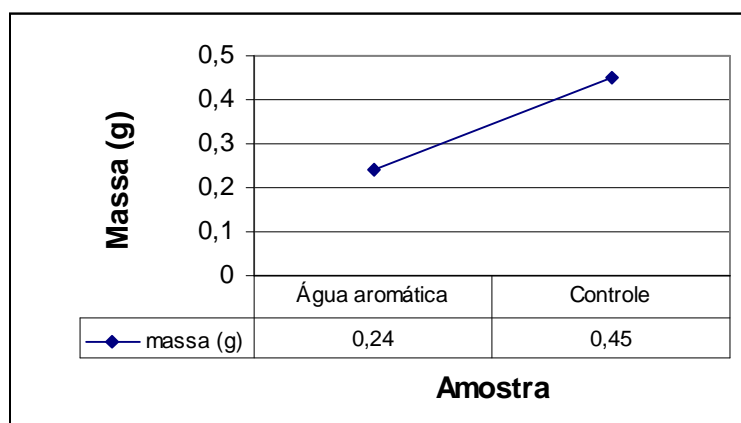
Na germinação, as folhas primárias estão no interior dos cotilédones

(CARVALHO; NAKAGAWA, 1988, p. 101). Para os cotilédones saírem à luz, o hipocótilo deve desenvolver sem alterações. Alteração ocorrida no hipocótilo, ou seja, inibição (apresentada neste trabalho), influencia a formação de folíolos.

- Avaliação das massas das plântulas após leitura de crescimento

No gráfico 6 evidencia-se redução da massa das plântulas de *Lactuca sativa* quando submetidas a ensaio alelopático com água aromática de *Aster lanceolatus*.

GRÁFICO 6 – MASSA DAS PLÂNTULAS DE *Lactuca sativa* SUBMETIDAS A ENSAIO ALELOPÁTICO COM ÁGUA AROMÁTICA DE *Aster lanceolatus*



4.6.4 Substância isolada - PPA

4.6.4.1 Avaliação da germinação

Analisando-se a tabela 20, verifica-se que não houve diferenças estatísticas entre os índices de velocidade de germinação do PPA (todas as concentrações) e o controle (água destilada), indicando que o precipitado amarelo não influencia na

germinação de *Lactuca sativa*.

TABELA 20 – TESTE DE SCOTT-KNOTT REALIZADO NOS ÍNDICES DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DE *Lactuca sativa* NO ENSAIO ALELOPÁTICO COM PPA

AMOSTRA	ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO
0,6 mg	7,2400 a
0,4 mg	7,8200 a
0,3 mg	7,5375 a
0,2 mg	8,3125 a
0,1 mg	7,8775 a
0,05 mg	7,4825 a
0,025 mg	6,9650 a
Controle	7,0000 a

NOTA: Médias seguidas com a mesma letra na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si.

4.6.4.2 Avaliação do crescimento

- Comparação das médias das leituras de crescimento

Não houve diferenças estatísticas entre as médias das medidas das radículas e dos hipocótilos de *Lactuca sativa* submetidas ao precipitado amarelo e as médias dos tratamentos controle, sugerindo influência do precipitado amarelo igual ao tratamento controle (água destilada) sobre as plântulas de *Lactuca sativa* (Tabela 21).

As plântulas submetidas ao precipitado amarelo não apresentaram folíolos (em todas as concentrações). A germinação, o hipocótilo e a radícula desenvolveram-se normalmente, mas, houve inibição do aparecimento dos folíolos. Sugere-se que o PPA influencia em alguma fase que compromete o desenvolvimento dos folíolos, mas não compromete a germinação e crescimento do hipocótilo e radícula.

TABELA 21 – TESTE DE SCOTT-KNOTT REALIZADO NA AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO NO ENSAIO ALELOPÁTICO COMPARATIVO COM PPA

PARTE DA PLÂNTULA ANALISADA					
RADÍCULA			HIPOCÓTILO		
TRATAMENTO	REPETIÇÃO	MÉDIA (mm)	TRATAMENTO	REPETIÇÃO	MÉDIA (mm)
0,6mg	1	31,9 a	0,6mg	1	34,0 a
	2	28,1 a		2	29,7 a
	3	24,6 a		3	28,2 a
	4	31,2 a		4	28,4 a
0,4mg	1	27,6 a	0,4mg	1	29,0 a
	2	34,5 a		2	30,7 a
	3	31,6 a		3	31,4 a
	4	23,9 a		4	23,9 a
0,3mg	1	35,1 a	0,3mg	1	30,3 a
	2	27,7 a		2	28,0 a
	3	23,8 a		3	20,7 a
	4	17,9 a		4	20,4 a
0,2mg	1	24,4 a	0,2mg	1	24,6 a
	2	36,6 a		2	32,4 a
	3	68,1 a		3	31,9 a
	4	25,6 a		4	23,2 a
0,1mg	1	25,2 a	0,1mg	1	26,4 a
	2	26,1 a		2	30,6 a
	3	32,4 a		3	29,4 a
	4	18,6 a		4	21,2 a
0,05mg	1	33,2 a	0,05mg	1	27,5 a
	2	27,4 a		2	32,7 a
	3	30,2 a		3	25,0 a
	4	16,0 a		4	21,6 a
0,025mg	1	29,2 a	0,025mg	1	26,7 a
	2	35,5 a		2	26,9 a
	3	14,1 a		3	25,5 a
	4	25,7 a		4	28,4 a
Controle	1	32,0 a	Controle	1	29,8 a
	2	28,2 a		2	32,4 a
	3	27,0 a		3	29,5 a
	4	26,4 a		4	29,4 a

NOTA: Médias seguidas com letra igual, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si.

4.6.5 Controles

4.6.5.1 Avaliação da germinação

TABELA 22– TESTE DE SCOTT-KNOTT REALIZADO NOS ÍNDICES DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DE *Lactuca sativa* NO ENSAIO ALEOPÁTICO COM ÁGUA DESTILADA, ETANOL E METANOL

CONTROLE	ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO
ÁGUA DESTILADA	9,2075 a
ETANOL	9,4375 a
METANOL	9,2075 a

NOTA: Médias seguidas com a mesma letra na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si.

Conforme tabela 22, estatisticamente não há diferença ao utilizar-se água destilada, etanol ou metanol no ensaio alelopático de germinação, portanto, descarta-se a possibilidade de influência dos solventes utilizados, na germinação das sementes de *Lactuca sativa*.

4.6.5.2 Avaliação do Crescimento

- Comparação das médias das leituras de crescimento

TABELA 23 – TESTE DE SCOTT-KNOTT REALIZADO NA AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO NO ENSAIO ALEOPÁTICO COM ÁGUA DESTILADA, ETANOL E METANOL

PARTE DA PLÂNTULA ANALISADA					
RADÍCULA			HIPOCÓTILO		
TRATAMENTO	REPETIÇÃO	MÉDIA (mm)	TRATAMENTO	REPETIÇÃO	MÉDIA (mm)
Água destilada	1	13,8 a	Água destilada	1	20,9 a
	2	11,9 a		2	18,6 a
	3	10,9 a		3	16,8 a
	4	10,0 a		4	15,5 a
Etanol	1	13,6 a	Etanol	1	24,3 a
	2	11,5 a		2	21,5 a
	3	9,0 a		3	15,4 a
	4	12,1 a		4	19,9 a
Metanol	1	10,5 a	Metanol	1	15,9 a
	2	12,6 a		2	20,7 a
	3	9,9 a		3	16,5 a
	4	8,9 a		4	13,5 a

NOTA: Médias seguidas com a mesma letra na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si.

Na tabela 23, observou-se que ao utilizar água destilada, etanol ou metanol, não há diferenças estatísticas nos resultados de crescimento no ensaio alelopático com *Lactuca sativa*.

- Avaliação dos folíolos

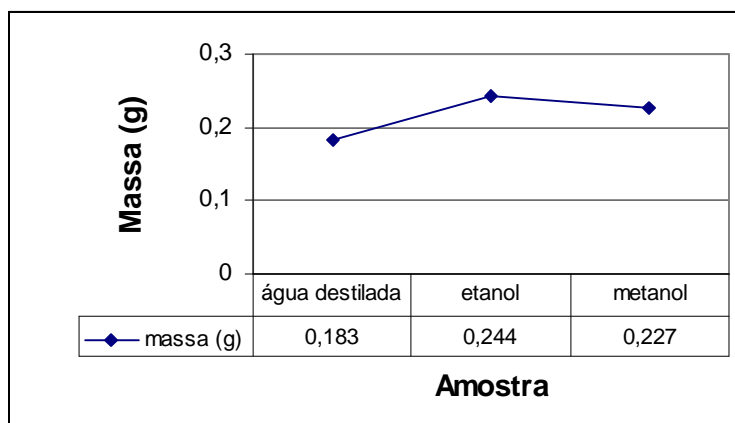
No ensaio alelopático realizado com água destilada, etanol e metanol, verificou-se presença de folíolos em todas os tratamentos e repetições.

- Avaliação das massas das plântulas após leitura de crescimento

Observa-se no gráfico 7 pequena diferença entre os valores das massas das amostras em teste.

Os resultados apresentados (Tabelas 22 e 23; Gráfico 7) confirmam ausência de influência dos solventes utilizados no preparo e diluição dos extratos brutos etanólicos e respectivas frações de *Aster lanceolatus* no ensaio alelopático utilizando sementes de *Lactuca sativa*.

GRÁFICO 7 – MASSA DAS PLÂNTULAS DE *Lactuca sativa* SUBMETIDAS A ENSAIO ALELOPÁTICO COM ÁGUA DESTILADA, ETANOL E METANOL



4.7 CROMATOGRAFIA EM COLUNA

Nos melhores resultados do ensaio alelopático, ocorreu inibição no desenvolvimento de *Lactuca sativa*, a qual foi obtida com a fração hexano proveniente do extrato bruto etanólico das flores de *Aster lanceolatus* e com a fração acetato de etila proveniente do extrato bruto etanólico dos caules e folhas de *Aster lanceolatus*. Estas frações foram submetidas à cromatografia em coluna com o intuito de isolar constituintes químicos.

4.7.1 Fração Hexano

Desta fração fez-se uma coluna cromatográfica, isolando-se um composto denominado CFH1 (Tabela 24).

TABELA 24 – RESULTADOS DA COLUNA CROMATOGRÁFICA DA FRAÇÃO HEXANO

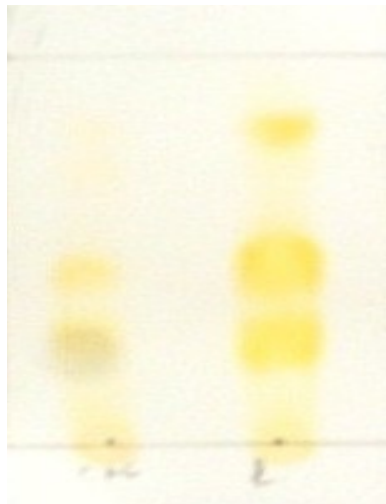
PARÂMETRO	RESULTADO
AMOSTRA	1,0407 g
PASTILHA	6,0370 g
SÍLICA-GEL PARA COLUNA	34,8878 g
TAMANHO DA COLUNA	2,7 cm de altura e 4,5 cm de largura
FASES MÓVEIS PARA ELUIÇÃO	Utilizando-se 100 mL de cada fase móvel, iniciou-se com hexano:acetato de etila (30:70 - v/v), num gradiente de polaridade crescente, aumentando-se a proporção de acetato de etila na ordem de 5%, até acetato de etila 70%, após aumentando-se a proporção de acetato de etila na ordem de 10%, até acetato de etila puro. Foram recolhidos 164 frascos com aproximadamente 10 ml de eluato. Após fez-se eluição com 100 mL metanol: água destilada (70:30 - v/v) e 100 mL de metanol puro. Os dois últimos eluatos foram recolhidos separadamente em frascos únicos.
CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA	Fase Móvel: (tolueno: acetato de etila) (93: 7 - v/v) Visualizador: vanilina sulfúrica com aquecimento
COMPOSTO ISOLADO	9 mg de cristal branco (CFH1) da reunião dos frascos 17-22 (hexano 90: acetato de etila 10 - v/v) após lavagem e filtração com éter de petróleo

4.7.2 Fração Acetato de Etila

Após a fração acetato de etila dos caules e folhas ser submetida à coluna cromatográfica e não resultar em quantidade suficiente de material para identificação fez-se comparação, por meio de cromatografia em camada delgada, dos compostos presentes na fração acetato de etila dos caules e folhas e compostos presentes na fração

acetato de etila das flores (Figura 29). Verificando-se presença de compostos semelhantes, preparou-se coluna cromatográfica com a fração acetato de etila das flores de *Aster lanceolatus*, da qual isolou-se um composto denominado PPA.

FIGURA 29– CCD COMPARATIVA



- NOTAS: (1) À esquerda encontra-se representada a fração acetato de etila dos caules e folhas e à direita, a fração acetato de etila das flores de *Aster lanceolatus*.
- (2) A fase móvel utilizada foi acetato de etila: acetona: água (15: 8: 2–v/v) e o visualizador, NEU.

TABELA 25 – RESULTADOS DA COLUNA CROMATOGRÁFICA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA

PARÂMETRO	RESULTADO
AMOSTRA	2,0000 g
PASTILHA	12,1265 g
SÍLICA -GEL PARA COLUNA	48,9508 g
TAMANHO DA COLUNA	5,5 cm de altura e 4,5 cm de largura
FASES MÓVEIS PARA ELUIÇÃO	Utilizando-se 100 mL de cada fase móvel, iniciou-se com acetato de etila: hexano (60:40 - v/v), num gradiente de polaridade crescente, aumentando-se a proporção de acetato de etila na ordem de 5%, até acetato de etila 100%, após adicionou-se metanol juntamente com acetato de etila, aumentando-se a proporção de metanol na ordem de 5%, até metanol 40%, após eluiu-se metanol: acetato de etila (50:50) e metanol puro. Foram recolhidos 189 frascos com aproximadamente 10 ml de eluato. Após fez-se eluição com 200 mL metanol: água destilada (70:30 – v/v) e 100 mL de água destilada. Os dois últimos eluatos foram recolhidos separadamente em frascos únicos.
CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA	Fase Móvel: (acetato de etila: acetona: água) (15: 8: 5 – v/v) Visualizador: NEU (2-amino etil butirato)
COMPOSTOS ISOLADOS	267,7 mg de precipitado amarelo (PPA) da reunião dos frascos 106-126 (acetato de etila: metanol 90:10, 85:15, 80:20 – v/v)

4.8 CROMATOGRAFIA PREPARATIVA

Com 30mg do precipitado amarelo (PPA) obtido da coluna cromatográfica da fração acetato de etila proveniente do extrato bruto etanólico das flores de *Aster lanceolatus* (Tabela 25), preparou-se cromatografia preparativa com eluição de acetato de etila: acetona: água (25: 8: 2 -v/v), obtendo-se 10,0 mg, 7,0 mg e 5,1 mg de compostos designados CFAE1, CFAE2 e CFAE3 respectivamente, os quais em CCD apresentaram-se puros.

O composto CFAE1 foi submetido à identificação. Os compostos CFAE2 e CFAE3 estão sendo submetidos à identificação.

4.9 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS ISOLADOS

4.9.1 Composto CFAE1

O composto CFAE1 foi submetido à análise de ultravioleta e ^{13}C RNM.

- Análise de Ultravioleta do CFAE1

Efetuuou-se análise de ultravioleta com diluição em solventes descritos por MABRY, MARKHAM e THOMAS (1970, p. 36-38). A presença de flavonóide foi evidenciada (utilizando metanol como solvente do CFAE1), com aparecimento de dois picos, um com absorção em 300-380nm (Banda I) e outro com 240-280nm (Banda II) (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970, p. 41), representados na figura 30.

MARKHAM (1982, p.39) cita a possibilidade de presença de flavonol com substituição na hidroxila do carbono 3 quando há absorção entre 330-360 nm para a Banda I e 250-280 nm para a Banda II para a solução metanólica em análise.

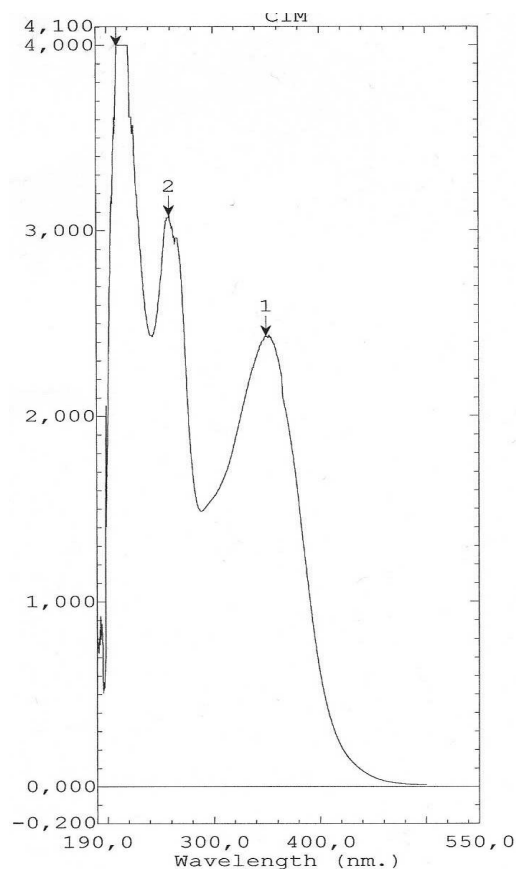
A tabela 26 apresenta os dados das bandas I e II após análise de ultravioleta do composto CFAE1.

TABELA 26 – DADOS DA ANÁLISE DE ULTRAVIOLETA DO COMPOSTO CFAE1

SOLVENTE	BANDA I (nm)	BANDA II (nm)
Metanol	349,6	258,4
AlCl ₃	426,2	272,4
AlCl ₃ /HCl	393,6	269,0
NaOAc	352,2	258,6
NaOAc /H ₃ BO ₃	361,0	257,2

Presuposto que contemos flavonol, pela análise sistemática preliminar, a análise de ultravioleta revela provável presença de substituição no carbono 3 devido efeito batocrômico de 44 nm (35-55 nm) na banda I, ao comparar a absorção da solução com metanol e solução com AlCl₃ /HCl (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970, p. 41-61).

FIGURA 30 – ESPECTRO DE ULTRAVIOLETA DO COMPOSTO CFAE1



NOTA: Composto CFAE1 em metanol.

- Análise de ^{13}C RNM do CFAE1

Analisando-se o espectro 1 de ^{13}C RNM do composto CFAE1, sinais de flavonol são evidenciados em 140,0-159,7 ppm para o carbono 2, 132,5-139,2 ppm para carbono 3 e 175,9-179,8 ppm para carbono 4 (AGRAWAL, 1989, p. 292).

Sabendo-se pela análise de UV a provável presença de carbono 3-substituído, aliando-se aos dados de ^{13}C RNM, (Figuras 31 e 32) procurou-se em literatura substância com sinais semelhantes de ^{13}C RNM aos sinais do CFAE1, verificando-se a semelhança de sinais com o composto canferol-3-O-rhamnosil-(1→6)-galactosideo (BRASSEUR; ANGENOT, 1986, p. 563-564), que apresenta como modelo de ligação: 5, 7, 4' (OH)₃, 3-O-gal (6'' → 1''') rha (AGRAWAL, 1989, p. 306, 341-342). A comparação dos sinais observados no espectro do CFAE1 com os sinais observados na literatura estão apresentados na tabela 27.

FIGURA 31 – ESPECTRO 2 DE ^{13}C RNM DO COMPOSTO CFAE1

A diferença entre o espectro 1 (Figura 32) e espectro 2 (Figura 31) de ^{13}C RNM está na consideração dos sinais. No espectro 1, foram considerados os sinais maiores que 1, e no espectro 2, sinais maiores que 0,8. Comparando os dois espectros obtidos, visualiza-se dois sinais a mais: 98.9106 e 98.2153.

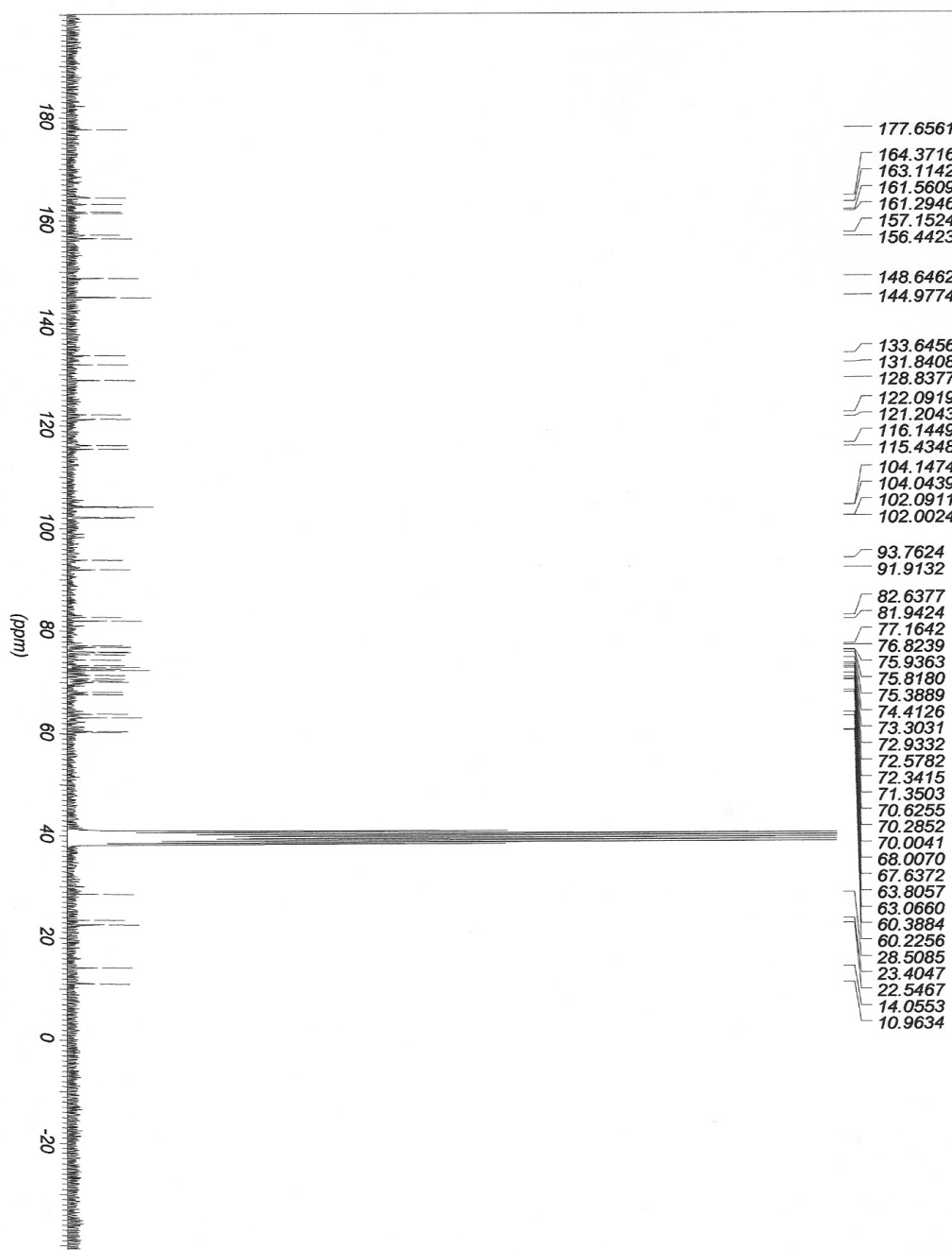
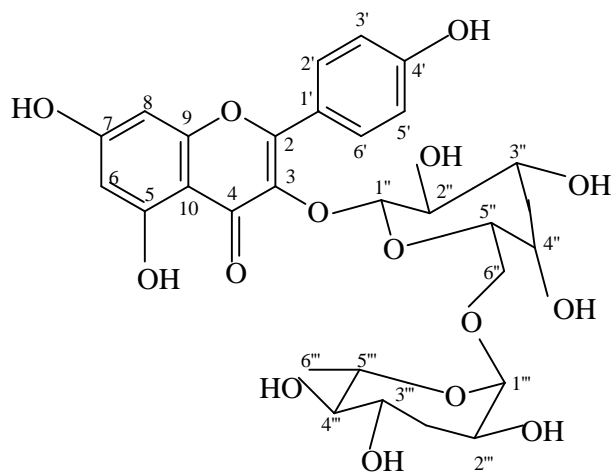
FIGURA 32 – ESPECTRO 1 DE ^{13}C RNM DO COMPOSTO CFAE1

TABELA 27 – COMPARAÇÃO ENTRE OS SINAIS DE ^{13}C RNM DO CFAE1 E LITERATURA

CARBONO	SINAL DO CFAE1 (ppm)	SINAL DA LITERATURA (ppm) SEGUNDO AGRAWAL (1989, p. 341-342); BRASSEUR e ANGENOT (1986, p. 563-564)
2	156.4	156.5
3	133.6	133.3
4	177.6	177.5
5	161.6	161.2
6	98.9	98.8
7	164.4	164.0
8	93.8	93.8
9	156.4	156.5
10	104.0	103.8
1'	121.2	120.9
2'	131.8	131.0
3'	115.4	115.1
4'	161.3	160.0
5'	115.4	115.1
6'	131.8	131.0
1''	102.1	102.1
2''	71.3	71.1
3''	72.9	73.0
4''	67.7	68.1
5''	73.3	73.6
6''	63.8	65.4
1'''	102.0	100.1
2'''	70.6	70.7
3'''	70.3	70.4
4'''	72.3	72.0
5'''	68.0	68.3
6'''	22.5	17.9

De acordo com as exposições anteriores, propõe-se que o composto CFAE1 seja canferol-3-O-rhamnosil-(1 →6)-galactosideo, composto não relatado nesta espécie até o momento, representado na figura 33.

FIGURA 33 – PROVÁVEL ESTRUTURA DO COMPOSTO CFAE1



4.9.2 Composto CFH1

O composto CFH1 foi submetido à análise de ^{13}C RNM (Figura 34). Comparando-se os resultados do espectro de ^{13}C RNM do composto CFH1, com dados apresentados em literatura (Tabela 28), propõe-se que o composto CFH1 é o espinasterol, representado na figura 35.

O espinasterol, conforme relatado por UCHIDA *et al.* (1982, p. 103-112), apresenta propriedade de diminuição dos níveis de colesterol no plasma e fígado de ratos.

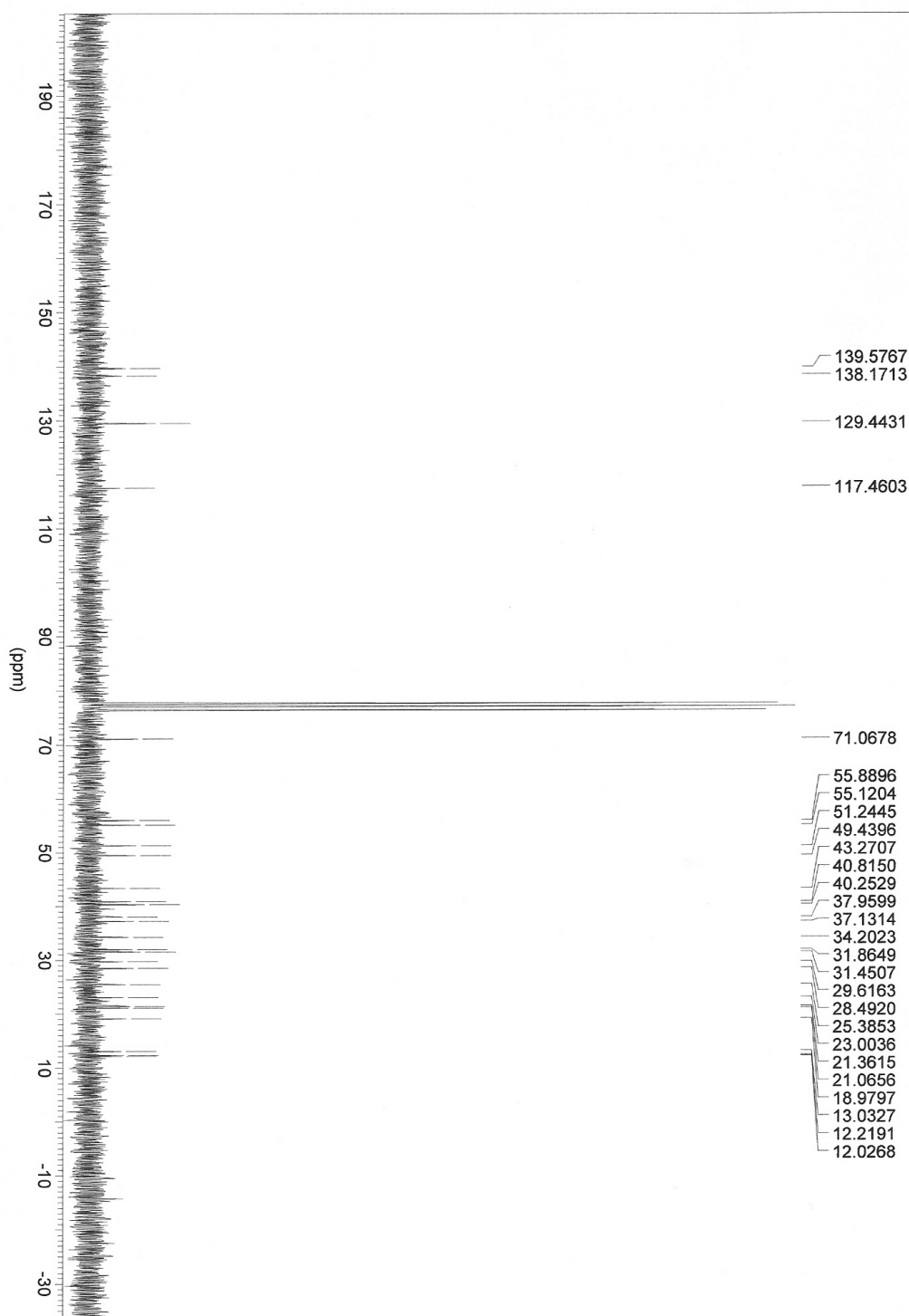
FIGURA 34 – ESPECTRO DE ^{13}C RNM DO COMPOSTO CFH1

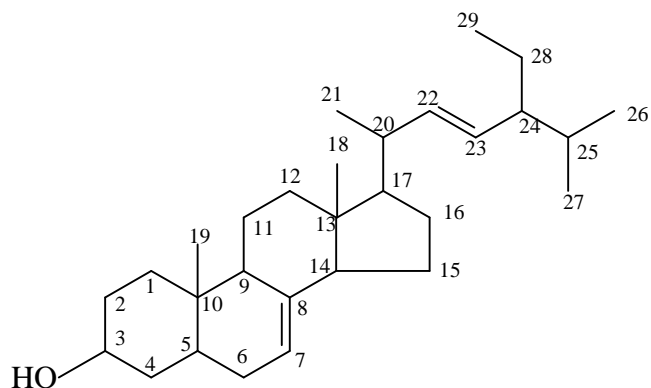
TABELA 28 – COMPARAÇÃO ENTRE OS SINAIS DE ^{13}C RNM DO CFH1 E LITERATURA

CARBONO	SINAL DO CFH1 (ppm)	SINAL DA LITERATURA (ppm) SEGUNDO MOREIRA (2000, p. 21); SOUZA <i>et al.</i> (2001, p. 439-442)
1	37.1	37.1
2	31.4	31.4
3	71.1	71.0
4	37.9	37.9
5	43.3	40.2
6	29.6	29.5
7	117.5	117.3
8	139.6	139.5
9	49.4	49.3
10	34.2	34.2
11	21.4	21.5
12	40.3	39.4
13	43.3	43.3
14	55.1	55.1
15	23.0	23.0
16	28.5	28.5
17	55.9	55.9
18	12.0	12.1
19	13.0	13.0
20	40.8	40.8
21	21.1	21.1
22	138.2	138.1
23	129.4	129.4
24	51.2	51.2
25	31.9	31.9
26	21.4	21.5
27	18.9	19.0
28	25.4	25.4
29	12.2	12.3

A presença de espinasterol no gênero *Aster* já foi relatada, citando a espécie *Aster scaber* (JUNG et al., 2001, p. 912-914).

Na espécie em estudo (*Aster lanceolatus*), até o momento não há relatos da presença de espinasterol.

FIGURA 35 – PROVÁVEL ESTRUTURA DO COMPOSTO CFH1



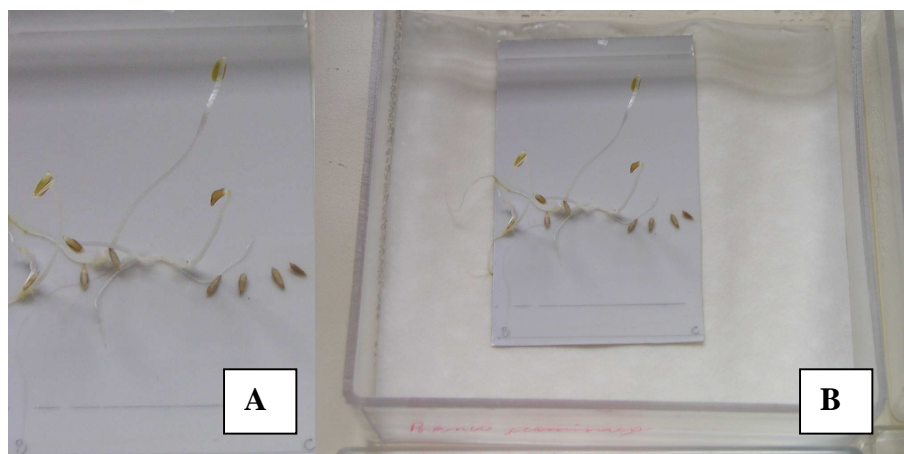
4.10 ALELOPATOLOGRAFIA

Utilizamos o espinasterol e o composto denominado PPA. Os resultados apresentados pelo PPA na alelopatografia foram comparados aos resultados obtidos por meio de outra técnica utilizada para testar atividade alelopática.

4.10.1 Espinasterol

Utilizou-se o espinasterol, primeiramente denominado CFH1, isolado conforme tabela 24 (p. 85). O espinasterol (0,5mg) foi diluído em benzina (50 μ L) utilizando como fase móvel o sistema hexano: acetato de etila (93:7 – v/v). Placas controle foram preparadas utilizando apenas benzina no ponto de plicação e a mesma fase móvel. Seguindo a técnica descrita (Item 3.10), decorridos os sete dias de ensaio (Figura 36), procederam-se leituras e cálculos.

FIGURA 36 – REPRESENTAÇÃO DA ALELOPATOLOGRAFIA DO ESPINASTEROL ANTES DA LEITURA DE CRESCIMENTO



NOTA: A figura 38A demonstra as plântulas de *Lactuca sativa* ao sétimo dia antes da leitura de crescimento, e a figura 38B representa a placa cromatográfica acomodada em gerbox.

4.10.1.1 Germinação

O índice de velocidade de germinação calculado demonstrou 3,35 para o controle e 2,27 para o CFH1 em análise.

Segundo KRZYZANOWSKI, VIEIRA e FRANÇA NETO (1999, p. 2.6), quanto menor o valor obtido no índice de velocidade de germinação, menor velocidade de germinação. A utilização do CFH1 no ensaio alelopatográfico demonstrou menor velocidade de germinação das sementes de *Lactuca sativa* em comparação com o controle utilizado.

4.10.1.2 Crescimento

TABELA 29 – TESTE DE SCOTT-KNOTT REALIZADO NA AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO NO ENSAIO ALELOPATOGRÁFICO COM ESPINASTEROL

RADÍCULA		HIPOCÓTILO	
TRATAMENTO	MÉDIA (mm)	TRATAMENTO	MÉDIA (mm)
ESPINASTEROL	12,0 a	ESPINASTEROL	16,7 a
CONTROLE	10,0 a	CONTROLE	12,7 a

NOTA: Médias seguidas com a mesma letra na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si.

Observando-se a tabela 29, verifica-se que não houve diferença estatística entre os resultados do espinasterol e os resultados do controle utilizado nas leituras do crescimento das radículas e dos hipocótilos de *Lactuca sativa*.

A presença de folíolos foi verificada nas plântulas da placa controle, o que não ocorreu nas plântulas da placa com espinasterol em teste.

Decorridas as leituras, as placas retornaram para a estufa e reveladas com visualizador vanilina sulfúrica e aquecimento.

Ao término do ensaio alelopatográfico com espinasterol, a placa apresenta características demonstradas por meio da figura 37, aonde se evidencia a substância em teste.

Apesar do espinasterol não influenciar significativamente no crescimento da radícula e do hipocótilo de *Lactuca sativa*, evidenciou-se diminuição da germinação e ausência de formação de folíolos. Evidenciou-se que diminuição da germinação influencia o aparecimento dos folíolos com consequente dificuldade para as plântulas de *Lactuca sativa* desenvolverem normalmente.

FIGURA 37- REPRESENTAÇÃO DO
ESPINASTEROL AO
TÉRMINO DO ENSAIO
ALELOPATOGRÁFICO



4.10.2 Composto PPA

Utilizou 1 mg do composto denominado PPA, isolado conforme tabela 25 (p. 86). O PPA foi diluído em metanol (50 μ L) e utilizou-se o sistema acetato de etila: acetona: água (25: 8: 2 – v/v) para fase móvel. Após cromatografia houve separação do PPA em três bandas distintas (conforme cromatografia preparativa – item 4.8 p. 87) e designação das mesmas em B1 (banda 1), B2 (banda 2) e B3 (banda 3), iniciando a contagem de baixo para cima. Tratando-se de compostos solúveis em água, utilizou-se papel de filtro sobre a placa cromatográfica antes da pulverização de água destilada e colocação das sementes de *Lactuca sativa*.

Ao colocar o papel de filtro e umedecê-lo, evidencia-se que os compostos solúveis em água, presentes na amostra, são absorvidos pelo papel de filtro, evitando-se assim que os mesmos misturem-se, ou, tratando-se de substância pura solúvel em água, que esta se espalhe sobre toda a superfície da placa, comprometendo o teste alelopatográfico, pois o objetivo do ensaio é testar substância ou substâncias, em local da corrida cromatográfica, otimizando o ensaio alelopático com auxílio da cromatografia em camada delgada.

Placas controle foram preparadas utilizando metanol no ponto de aplicação,

fase móvel igual à utilizada para a amostra, papel de filtro sobre a placa cromatográfica e colocação das sementes de *Lactuca sativa* nos mesmos locais das bandas separadas na placa com PPA em teste. Conforme técnica descrita no item 3.10., decorridos sete dias de ensaio, procederam-se leituras e cálculos.

4.10.2.1 Germinação

TABELA 30 – ÍNDICES DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DE *Lactuca sativa* NO ENSAIO ALELOPATOGRÁFICO COM PPA

BANDA/ SUBSTÂNCIA	IVG	IVG CONTROLE
B 1/ CFAE1	4,17	4,92
B 2/ CFAE2	3,09	4,25
B 3/ CFAE3	4,50	5,00

Na tabela 30 verifica-se menor índice de velocidade de germinação de *Lactuca sativa* ao ser submetida a ensaio alelopatográfico com PPA isolado da FAE das flores de *Aster lanceolatus*.

4.10.2.2 Crescimento

Ao observar a tabela 31, verificou-se que não houve diferença estatística entre os resultados das três bandas do PPA e o controle utilizado nas leituras do crescimento das radículas das plântulas de *Lactuca sativa*. Nas leituras do crescimento dos hipocótilos, houve diferença estatística somente no resultado da banda três, onde se verificou estímulo.

TABELA 31 – TESTE DE SCOTT-KNOTT REALIZADO NA AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO NO ENSAIO ALELOPATOGRÁFICO COM PPA

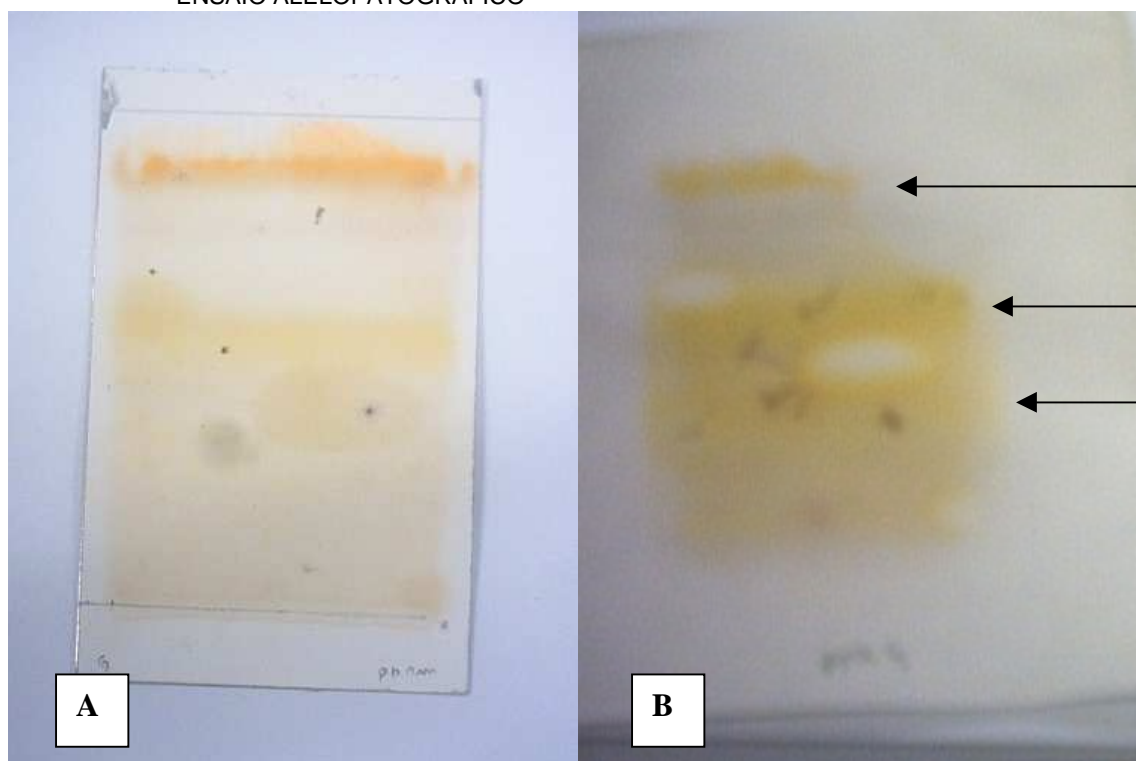
RADÍCULA		HIPOCÓTILO	
TRATAMENTO	MÉDIA (mm)	TRATAMENTO	MÉDIA (mm)
B 1 (CFAE1)	3,0 a	B 1 (CFAE1)	7,8 a
CONTROLE B 1	5,2 a	CONTROLE B 1	9,3 a
B 2 (CFAE2)	4,4 a	B 2 (CFAE2)	11,4 a
CONTROLE B 2	5,5 a	CONTROLE B 2	10,6 a
B 3 (CFAE3)	6,1 a	B 3 (CFAE3)	14,3 a
← CONTROLE B 3	4,5 a	CONTROLE B 3	5,5 b

NOTA: Médias seguidas com a mesma letra na mesma coluna (compara tratamento e referido controle), não diferem estatisticamente entre si.

Decorridas as leituras, as placas e os papéis de filtro retornaram para a estufa e reveladas com visualizador NEU, demonstrados por meio da figura 38.

A presença de folíolos foi verificada na placa controle, o que não ocorreu na placa com PPA (nas três bandas) em teste.

FIGURA 38- REPRESENTAÇÃO DOS COMPOSTOS CFAE1, CFAE2 E CFAE3 AO TÉRMINO DO ENSAIO ALELOPATOGRÁFICO



NOTA: (1) A figura 40A representa a placa cromatográfica e a figura 40B representa o papel de filtro umedecido colocado sobre a placa cromatográfica, demonstrando a absorção dos compostos hidrossolúveis.

(2) A placa e o papel foram revelados com NEU.

Evidenciou-se menor IVG e ausência de folíolos em *Lactuca sativa* submetida aos compostos CFAE1, CFAE2 e CFAE3. Provavelmente o composto

CFAE3 deve ser uma substância com características diferentes dos compostos CFAE1 e CFAE2, estimulando o crescimento do hipocótilo e inibindo a germinação e aparecimento de folíolos.

Comparando os resultados obtidos utilizando o composto PPA em dois ensaios distintos, verifica-se que a vantagem da alelopatografia está em testar compostos impuros, separando-os. A alelopatografia adianta, portanto, resultados alelopáticos de compostos impuros antes da utilização de técnicas de separação. Quando o interesse é separar apenas substâncias com atividade alelopática, a alelopatografia adianta estes resultados com maior facilidade.

4.11 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Os resultados da atividade antibacteriana de difusão em gel dos controles (etanol, cefalotina e cloranfenicol) estão apresentados na tabela 32 e os resultados da atividade antibacteriana com difusão em gel e concentração inibitória mínima dos extratos brutos etanólicos de *Aster lanceolatus* estão apresentados na tabela 33.

TABELA 32 – MÉDIAS DOS HALOS DE INIBIÇÃO (mm) DOS CONTROLES UTILIZADOS NO ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA COM DIFUSÃO EM GEL

MICROORGANISMO	CONTROLE		
	CEFALOTINA (30µg)	CLORANFENICOL (30µg)	ETANOL
<i>Escherichia coli</i>	0	32,5	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	25,5	30,0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	11,0	27,5	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	30,0	0
<i>Salmonella typhimurium</i>	29,0	35,5	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	49,5	33,5	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	40,0	37,5	0
<i>Streptococcus pyogenes</i>	44,5	34,5	0

O resultado negativo apresentado pelos microorganismos *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* para o controle cefalotina é devido à resistência destes

frente a cefalotina, ou seja, houve aparecimento de colônias no halo de inibição. Os outros resultados negativos devem-se pela ausência de halo de inibição (Tabela 32). Os resultados negativos na difusão em gel devem-se pela ausência de halo de inibição (Tabela 33).

A hidrofília dos constituintes químicos é determinante para a difusão em gel, pois segundo ROMEIRO (2001, p. 130), um meio semi-sólido, o qual contenha ágar como agente solidificante, é um gel perfeito.

Com os resultados do estudo antibacteriano, presume-se que a maioria dos constituintes químicos presentes nos extratos brutos etanólicos de *Aster lanceolatus* apresentam características lipofílicas, com exceção de algum constituinte presente no extrato bruto etanólico das flores que apresenta característica hidrofílica capaz de inibir o crescimento de *Streptococcus pyogenes* no ensaio de difusão em gel.

TABELA 33 – ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE *Aster lanceolatus*

EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE <i>Aster lanceolatus</i>		DIFUSÃO EM GEL - MÉDIA DO DIÂMETRO DOS HALOS DE INIBIÇÃO EM mm							
CONCENTRAÇÕES		MICROORGANISMOS							
		Ec	Kp	Pm	Pa	St	Sa	Se	Sp
FLORES	785,0 µg (100,0%)	0	0	0	0	0	0	0	8,5
	392,5 µg (50,0%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	196,2 µg (25,0%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	98,1 µg (12,5%)	0	0	0	0	0	0	0	0
Controle Cloranfenicol (30µg)		26,5	24,0	21,0	22,5	30,0	29,0	32,5	27,5
Controle etanol		0	0	0	0	0	0	0	0
CAULES E FOLHAS	475,0 µg (100,0%)	0	0	0	0	0	0	0	0
FOLHAS	237,5 µg (50,0%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	118,7 µg (25,0%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	59,4 µg (12,5%)	0	0	0	0	0	0	0	0
Controle Cloranfenicol (30µg)		25,0	21,0	19,5	18,5	29,0	27,5	31,0	25,0
Controle etanol		0	0	0	0	0	0	0	0
EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE <i>Aster lanceolatus</i>		CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (mg)							
		MICROORGANISMOS							
		Ec	Kp	Pm	Pa	St	Sa	Se	Sp
FLORES		9,81	NEG.	39,25	19,62	19,62	9,81	9,81	NEG.
		(1:8)		(1:2)	(1:4)	(1:4)	(1:8)	(1:8)	
Controle dos microorganismos		+	+	+	+	+	+	+	+
CAULES E FOLHAS		5,94	2,97	47,5	11,88	1,48	5,94	11,88	1,48
		(1:8)	(1:16)	(1:1)	(1:4)	(1:32)	(1:8)	(1:4)	(1:32)
Controle dos microorganismos		+	+	+	+	+	+	+	+

NOTA: Ec = *Escherichia coli*; Kp = *Klebsiella pneumoniae*; Pm = *Proteus mirabilis*; Pa = *Pseudomonas aeruginosa*; St = *Salmonella typhimurium*; Sa = *Staphylococcus aureus*; Se = *Staphylococcus epidermidis*; Sp = *Streptococcus pyogenes*; + = crescimento de microorganismos em meio de cultura isento de material testado, NEG. = resultado negativo, nenhuma concentração inibiu o crescimento de microorganismos.

4.12 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

4.12.1 Crescimento Micelial em Placas

Comparando-se o crescimento micelial dos patógenos testados, verifica-se atividade antifúngica diretamente proporcional à quantidade de extrato presente em meio de cultura.

Observa-se melhor resultado ao utilizar 0,57mg/mL de extrato bruto etanólico de caules e folhas de *Aster lanceolatus* sobre *Fusarium oxysporum*, o qual inibiu em 48,15% o crescimento micelial (Tabela 34).

Verifica-se que extrato bruto etanólico de caules e folhas de *Aster lanceolatus* inibe o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum*, mas que esta inibição não ultrapassa 50% ao compará-la ao resultado observado com raízes de *Ottonia martiana* que foi de 62,3% (CUNICO, 2001, p. 69-70).

TABELA 34 – ATIVIDADE ANTIFÚNGICA (CRESCIMENTO MICIAL EM PLACAS) DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE CAULES E FOLHAS DE *Aster lanceolatus*

AMOSTRA	Concentração do extrato bruto etanólico em meio batata dextrose (BDA)	<i>Fusarium oxysporum</i>			<i>Colletotrichum acutatum</i>		
		Média dos halos de crescimento micelial (mm)		Inibição do crescimento micelial	Média dos halos de crescimento micelial (mm)		Inibição do crescimento micelial
		Extrato bruto etanólico	Controle	(%)	Extrato bruto etanólico	Controle	(%)
Extrato bruto etanólico de caules e folhas	0,19mg/mL	4,0		25,92	3,3		13,15
	0,38mg/mL	3,8	5,4	29,62	3,1	3,8	18,42
	0,57mg/mL	2,8		48,15	3,1		18,42

4.12.2 Bioautografia Direta

O resultado (Figura 39) apresenta-se com ausência de crescimento de *Cylindrocladium spathulatum* com 2,375mg de extrato bruto etanólico de caules e folhas de *Aster lanceolatus*.

FIGURA 39 -- INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO FÚNGICO EM BIOAUTOGRAFIA DIRETA DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE CAULES E FOLHAS DE *Aster lanceolatus*



FONTE: CUNICO, 2003

5 CONCLUSÕES

O ensaio alelopático delineou frações com maior influência sobre germinação e crescimento de *Lactuca sativa*. O ensaio alelopático realizado com extrato bruto etanólico e frações das flores de *Aster lanceolatus* evidenciou a fração hexano e o ensaio realizado com extrato bruto etanólico e frações dos caules e folhas de *Aster lanceolatus*, a fração acetato de etila.

O constituinte β -sitosterol foi identificado nas frações hexano de flores e de caules e folhas, por meio de cromatografia gasosa.

Identificaram-se treze constituintes no óleo essencial: Mirtenol, Muroleno, Naftaleno, Bisaboleno, Lanona, Espatuleno, Óxido de Cariofileno, Ciclohexeno Carboxaldeído, Cedrenol, Neocloveno, Azuleno, Benzocicloheptenona e Hexahidrofarnesil acetona.

Utilizando-se água aromática em ensaio alelopático, observou-se que plântulas de *Lactuca sativa* quando submetidas à água aromática sofreram influência na germinação e crescimento do hipocótilo, em comparação ao controle. Provavelmente deve-se aos constituintes do óleo essencial a atividade alelopática da água aromática.

Isolou-se da fração hexano de flores de *Aster lanceolatus*, um constituinte químico inicialmente denominado CFH1, que foi identificado como espinasterol. Este referido composto, ao ser submetido a alelopatografia demonstrou influência sobre a germinação e formação de folíolos de *Lactuca sativa*. Da fração acetato de etila das flores, isolou-se três constiuintes denominados CFAE1, CFAE2 e CFAE3. O composto CFAE1 foi identificado como canferol-rhamnosil-galactosideo, o qual influenciou na germinação e formação de folíolos em ensaio alelopatográfico. Os compostos CFAE2 e CFAE3 ainda não foram identificados.

Os constituintes químicos canferol-rhamnosil-galactosideo, óxido de cariofileno e espinasterol, podem servir como marcadores da espécie, o que viabiliza e

oportuniza maior segurança na aquisição de *Aster lanceolatus*.

Na atividade antibacteriana utilizando difusão em gel, evidenciou-se que 785µg de extrato bruto etanólico de flores de *Aster lanceolatus* inibe o desenvolvimento de *Streptococcus pyogenes*. Ao utilizar-se diluição em caldo para testar a concentração inibitória mínima, evidenciou-se que 1,48 mg de extrato bruto etanólico de caules e folhas de *Aster lanceolatus* é capaz de inibir o desenvolvimento de *Salmonella typhimurium* e *Streptococcus pyogenes*, e que maiores quantidades de extrato bruto etanólico de flores são requeridas para inibir o desenvolvimento das bactérias testadas.

Na atividade antifúngica, observou-se que 0,57mg/mL de extrato bruto etanólico de caules e folhas de *Aster lanceolatus* é capaz de inibir em 48,15% o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* e que 2,375mg do referido extrato inibem o desenvolvimento de *Cylindrocladium spathulatum* em bioautografia direta.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O referido trabalho demonstra a necessidade de investir na busca de compostos com atividade alelopática a partir de extratos e óleos vegetais, e apresenta a alelopatografia, procedimento desenvolvido no presente trabalho, como bioensaio que pode representar pesquisa clara e segura da influência alelopática.

Quando se aceita que alelopatia é a ciência que pesquisa processos nos quais metabólitos secundários oriundos de plantas, podem influenciar positivamente ou negativamente sistemas biológicos, aceita-se alelopatia como ciência abrangente, podendo ser utilizada no controle de doenças, insetos e plantas daninhas que acometem plantas medicinais, proporcionando matéria-prima com qualidade para a indústria de fitoterápicos. Aceita-se ainda que influência ocorrida no desenvolvimento de microorganismos por meio de produtos vegetais é um processo alelopático.

REFERÊNCIAS

- ADEGAS, F.S.; VOLL, E.; PRETE, C.E.C. Embebição e germinação de sementes de picão-preto (*Bidens pilosa*). **Planta Daninha**, v.21, n.1., p.21-25, 2003.
- AGRAWAL, P.K. **Carbon-13 NMR of flavonoids**. New York: Elsevier, 1989. 564p.
- ALMEIDA, C.E.; KARNIKOWSKI, M.G.O.; FOLETO, R.; BALDISSEROTTO, B. Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. **Revista de Saúde Pública**, v.29, n.6, p. 428-433, 1995. ALMEIDA, F.S. **A Alelopatia e as plantas**. Londrina: IAPAR, 1988. 60p. Circular, 53.
- AUER, C.G.; BETTIOL, W. Efeito da serapilheira de *Eucalyptus grandis* no crescimento micelial de *Pisolithus tinctorius* em meio de cultura. **IPEF**, n.32, p.49-51, 1986.
- BATISH, D.R.; SINGH, H.P.; KOHLI, R.K.; SAXENA, D. B.; KAUER, S. Allelopathic effects of parthenin against two weedy species, *Avena fatua* and *Bidens pilosa*. **Environmental and Experimental Botany**, v.47, p.149-155, 2002.
- BRASSEUR, T.; ANGENOT, L. Flavonol glycosides from leaves of *Strychnos variabilis*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 2, p. 563-564, 1986.
- CALIXTO, J.B. Medicamentos fitoterápicos. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p.297-315.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Campinas: Fundação Cargill, 1983. p. 49.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Campinas: Fundação Cargill, 1988. p. 97-101, 127.
- CARVALHO, J. L.de S. **Contribuição ao estudo fitoquímico e analítico de *Nasturtium officinale* R. BR., Brassicaceae**. Curitiba, 2001. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.
- CARVALHO, A.A.T.; SAMPAIO, M.C.C.; SAMPAIO, F.C.; MELO, A.F.M.; SENA, K.X.F.R.; CHIAPPETA, A.A.; HIGINO, J.S. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos hidroalcoólicos de *Psidium guajava* L. sobre bactérias gram-negativas. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 21, n. 4, p. 255-258, 2002.
- CASTRO, H.G.; OLIVEIRA, L.O.; BARBOSA, L.C.; FERREIRA, F.A.; SILVA, D.J.H.; MOSQUIM, P.R.; NASCIMENTO, E.A. Teor e composição do óleo essencial de cinco acessos de mantrasto. **Química Nova**, v.27, n. 1, p. 55-57, 2004.
- CASTRO, M.S.; PELGER D.; FERREIRA, M.B.C.; KOPITKE, L.. Tendências na utilização de antimicrobianos em um hospital universitário, 1990-1996. **Revista de Saúde Pública**, v.36, n.5, p.553-558, 2002.
- CHENG, D-L.; CAO, X-P.; WEI, H-X.; HE, L. Kaurane diterpenoids from *Aster ageratoides*. **Phytochemistry**, v.33, n.5, p.1181-1183, 1993.
- CHENG, D.; SHAO, Y., HARTMANN, R.; RODER, E.; ZHAO, K. Oligopeptides from *Aster tataricus*. **Phytochemistry**, v.36, n.4, p. 945-948, 1994.

CHENG, D.; SHAO, Y. Terpenoid glycosides from the roots of *Aster tataricus*. **Phytochemistry**, v. 35, n.1, p. 173-176, 1994.

CHENG, D.; SHAO, Y.; HARTMANN, R.; ROEDER, E.; ZHAO, K. New pentapeptides from *Aster tataricus*. **Phytochemistry**, v. 41, n.1, p. 225-227, 1996.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981. p.1021-1028.

CUNICO, M. M. **Estudo fitoquímico e das atividades antimicrobianas da *Ottonia martiana* Miq., PIPERACEAE**. Curitiba, 2001. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

CUNICO, M.M. **Zonas de inibição do crescimento fúngico em frações do extrato bruto etanólico de *Aster lanceolatus* no bioensaio por ccd**. 2003.

D'ABROSCA, B.; DELLAGRECA, M.; FIORENTINO, A.; MONACO, P.; PREVITERA, L.; SIMONET, A.M.; ZARRELLI, A. Potential allelochemicals from *Sambucus nigra*. **Phytochemistry**, v.58, p.1073-1081, 2001.

DE FEO, V.; DE SIMONE, F.; SENATORE F. Potential allelochemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*. **Phytochemistry**, v.61, n. 5, p.573-578, 2002.

DIAS, S.L. **Evaporador rotatório**. 2003.

DIETZ, H.; WINTERHALTER, P. Phytotoxic constituents from *Bunias orientalis* leaves. **Phytochemistry**, v.42, n.4, p.1005-1010, 1996.

EVANS, W.C. **Trease and evans pharmacognosy**. Toronto: W.B. Saunders, 2002. p.297.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FEICHTENBERGER, E.; MÜLLER, G.W.; GUIRADO, N. Doenças dos citros. In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. v.2. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda, 1997. p.261-296.

FERREIRA, D.F. **Sistema de análise de variância de dados balanceados (SISVAR)**. Pacote computacional. Lavras: UFLA, 2000.

FERRONATO, M.L. **Aprimoramento de atributos comercialmente desejáveis em *Aster* sp cultivar White Master através do uso de reguladores do crescimento vegetal**. Curitiba, 2000. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

FRIEBE, A.; ROTH, U.; KÜCK, P.; SCHNABL, H.; SCHULZ, M. Effects of 2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones on the activity of plasma membrane H⁺-ATPase. **Phytochemistry**, v. 44, n. 6, p.979-983, 1997.

GRIGOLETTI JUNIOR, A.; AUER, C.G. Doenças Da erva-mate. In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. v.2. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda, 1997. p.345-347.

GOTO, Y.; KOJIMA, Y.; NAKAYAMA, T.; TERAZAWA, M. Allelopathic sesquiterpenoids from rhizomes of *Petasites japonicus* ssp. *giganteus* Kitam. **Phytochemistry**, n.57, p.109-113, 2001.

HE, L.; PAN, X. Triterpenoids and steroids from *Aster poliothamnus*. **Planta Medica**, v.58, n.4, p.388, 1992.

HUDSON, J.B.; GRAHAM, E.A.; ROSSI, R.; CARPITA, A.; NERI, D.; TOWERS, G.H.N. Biological activities of terthiophenes and polyynes from the Asteraceae. **Planta Medica**, v. 59, n.5, p.447-450, 1993.

HUR, J.Y.; SOH, Y.; KIM, B-H.; SUK, K.; SOHN, N.W.; KIM, H.C.; KWON, H.C.; LEE, K.R.; KIM S.Y. Neuroprotective and neurotrophic effects of quinic acids from *Aster scaber* in PC 12 cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, n. 8, p.921-924, 2001.

INDEX KEWENSIS: on compact disc. Oxford University Press, 1997. 1 CD-ROM.

JOLY, A.B. **Introdução à Taxonomia Vegetal**. 12ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1998. p.628-638.

JUNG, C.M.; KWON, H.C.; SEO, J.J.; OHIZUMI, Y.; MATSUNAGA, K.; SAITO, S.; LEE, K.R. Two new monoterpene peroxide glycosides from *Aster scaber*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 49, n. 7, p. 912-914, 2001.

JÜTTNER, F.; TODOROVA, A.K.; WALCH N.; VON PHILIPSBORN, W. Nostocyclamide M: a cyanobacterial cyclic peptide with allelopathic activity from *Nostoc* 31 **Phytochemistry**, v. 57, p. 613-619, 2001.

KATHIRESAN, R.M. Allelopathic potential of native plants against water hyacinth. **Crop Protection**, v.19, p.705-708, 2000.

KALSI, P.S.; KAUR, G.; SHARMA, S.; TALWAR, K.K. Dehydrocostuslactone and plant growth activity of derived guaianolides. **Phytochemistry**, v.23, n.12, p.2855-2861, 1984.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; DOWWEL JR, V. R.; SOMMERS, H. M. **Diagnóstico microbiológico – texto e atlas colorido**. 2 ed. São Paulo: Medicina Panamericana Editora do Brasil Ltda, 1993.p.458-479.

KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 218p.

KWON, H.C.; JUNG, C.M.; SHIN, C.G.; LEE, J.K.; CHOI, S.U.; KIM, S.Y.; LEE, K.R. A new caffeoyl quinic acid from *Aster scaber* and its inhibitory activity against human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) Integrase. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin** v. 48, n.11. p.1796-1798, 2000.

LIMBERGER, R. P.; SIMÕES-PIRES, C. A.; SOBRAL, M.; MENUT, C.; BESSIERE, J-L.; HENRIQUES, A. T. Essential oils from *Calyptanthes concinna*, *C. lucida*, *C. rubella* (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 3, p. 355- 360, 2002.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M. **Plantas ornamentais no Brasil : arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1995. p. 269.

MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. **The systematic identification of flavonoids**. New York: Springer-Verlag, 1970. 354p.

MACÍAS, F.A.; GALINDO, J.C.G.; MASSANET G.M. Potential allelopathic activity of several sesquiterpene lactone models. **Phytochemistry**, v.31, n.6, p.1969-1977, 1992.

MACÍAS, F.A.; VARELA, R.M.; TORRES, A.; MOLINILLO, J.M.G. Potential allelopathic guaianolides from cultivar sunflower leaves, var. SH-222. **Phytochemistry**, v.34, n.3, p.669-674, 1993.

MACÍAS, F.A.; TORRES, A.; MOLINILLO, J.M.G.; VARELA, R.M.; CASTELLANO, D. Potencial allelopathic sesquiterpene lactones from sunflower leaves. **Phytochemistry**, v.43, n.6, p.1205-1215, 1996.

MACÍAS, F.A.; MOLINILLO, J.M.G.; TORRES, A.; VARELA, R.M.; CASTELLANO, D. Bioactive flavonoids from *Helianthus annuus* cultivars. **Phytochemistry**, v.45, n.4, p. 683-687, 1997.

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

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JR, V.F.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p.429-438, 2002.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination – aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, n.2, p.176-177, 1962. MALHEIROS, A.; PERES, M. T. L. P. Alelopatia: interações químicas entre espécies. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 503-523.

MARKHAM, K.R. **Techniques of flavonoid identification**. London: Academic Press, 1982. p. 1-93.

MATOS, J. M. D; MATOS, M. E. O. **Farmacognosia: curso teórico – prático**. Fortaleza: Edições UFC, 1989. p. 223-229.

MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcóolico do cravo-da-índia e eugenol. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 2, p. 231-238, 2003.

MENDES, M.A.S.; LIMA, P.M.M.P.; FONSECA, J.N.L.; SANTOS, M.F. Erradicação de *Fusarium oxysporum* em sementes de alfafa utilizando termo e quimioterapia. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, n.2, p.148-152, 2001.

MIGUEL, O.G. **Óleo essencial**. Apostila da disciplina de fitoquímica do curso de farmácia da UFPR, Curitiba, 2002.

MIGUEL, M.D.; DIAS, S.L. **Ramo e flores de *Aster lanceolatus***. 2003.

MIGUEL, O.G. **Ensaio sistemático de análise em fitoquímica**. Apostila da disciplina de fitoquímica do curso de farmácia da UFPR, Curitiba, 2003.

MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. São Paulo: Robe Editorial, 1999. p.11-17.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN. *Aster lanceolatus*. Disponível em :<www.mobot.mobot.org/cgi-bin/search-vast> Acessos em: 03 jul. 2003 e 25 fev. 2004.

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n.1, p. 105-111, 2001.

MOREIRA, F. P. M. **Estudo fitoquímico de *Baccharis pseudotenuifolia*, *Baccharis ligustrina* e *Baccharis platypoda* e avaliação do potencial antimicrobiano**. Florianópolis, 2000. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Centro de Ciências Físicas e Matemática, Universidade Federal de Santa Catarina.

MOREIRA, E. A. Contribuição para o estudo fitoquímico de *Lobelia hassleri* A. Zahlb. E *Lobelia stellfeldii* R. Braga. Campanulaceae. **Tribuna Farmacêutica**, v. 47, n. 1, p.13-39, 1979.

MORITA, H.; NAGASHIMA, S.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. Astins A and B, antitumor cyclic pentapeptides from *Aster tataricus*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 41, n.5, p. 992-993, 1993.

MORITA, H.; NAGASHIMA, S.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. Structure of a new peptide, astin J, from *Aster tataricus*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.43, n.2, p.271-273, 1995.

MOURA, R.A.; WADA, C.S.; PURCHIO, A; ALMEIDA, T.V. **Técnicas de laboratório**. 3 ed. São Paulo: Livraria Atheneu, 1987. p. 262.

NAKAJIMA, J.N.; SEMIR, J. Asteraceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, n.4, p. 471-478, 2001.

NORBY, R.J; KOZLOWSKI, T.T. Allelopathic potential of ground cover species on pinus resinosa seedlings. **Plant and Soil**, v.57, p.363-374, 1980.

OHNO ,S.; TOMITA-YOKOTANI, K.; KOSEMURA, S.; NODE, M.; SUZUKI, T.; AMANO, M.; YASUI, K.; GOTO, T.; YAMAMURA, S.; HASEGAWA, K. A species-selective allelopathic substance from germinating sunflower (*Helianthus annuus* L.) Seeds. **Phytochemistry**, n.56, p.577-581, 2001.

PARK, J-S.; LEE, K-R.; KIM, J-C.; LIM, S-H.; SEO, J-A.; LEE, Y-W. A hemorrhagic factor (apicidin) produced by toxic *Fusarium* isolates from soybean seeds. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n.1, p. 126-130, 1999.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v.25, n.1, p. 45-61, 2002.

RICE, E.L. **Allelopathy**. Orlando: Academic Press, 1984. p. 2-3; 267-291.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Farmacognosia e farmacobiotechnologia**. São Paulo: Editorial Premier, 1997. p. 62, 64 e 159.

ROMEIRO, R. da S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: Editora UFV, 2001. 279p.

ROY, S.; DUTTA, A.K.; CHAKRABORTY, D.P. Amasterol, an ecdysone precursor and a growth inhibitor from *Amaranthus viridis*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 9, p. 2417-2420, 1982.

SHAO, Y.; ZHOU, B.; MA, K.; WU, H.; LIN, L.; CORDELL, G.A. Medicagenic acid saponins from *Aster batangensis*. **Phytochemistry**, v. 39, n.4, p. 875-881, 1995a.

- SHAO, Y.; ZHOU, B-N.; LIN, L-Z.; CORDELL, G.A. Triterpenoid saponins from *Aster batangensis*. **Phytochemistry**, v.38, n.4, p.927-933, 1995b.
- SHAO, Y.; ZHOU, B-N.; MA, K.; WU, H-M. New triterpenoid saponina, asterbatanoside D and E, from *Aster batangensis*. **Planta Medica**, v.61, n.3, p.246-249, 1995c.
- SHAO, Y.; LI, Y.L.; ZHOU, B.N. Phenolic and triterpenoid glycosides from *Aster batangensis*. **Phytochemistry**, v. 41, n.6, p. 1593-1598, 1996.
- SHAO, Y.; ZHOU, B-N.; GAO, J-H.; LIN, L-Z.; CORDELL, G.A. Glycosides from *Aster yunnanensis*. **Phytochemistry**, v.38, n.3, p. 675-680, 1995d.
- SHAO, Y.; ZHOU, B-N.; LIN, L-Z.; CORDELL, G.A. Triterpene saponins from *Aster yunnanensis*. **Phytochemistry**, v.38, n.6, p. 1487-1492, 1995e.
- SHAO, Y.; ZHOU, B-N; LIN, L-Z; CORDELL, G.A. Asteryunnanosides F and G: two new triterpenoid saponins from *Aster yunnanensis*. **Planta Medica**, v.61, n.5, p.446-449, 1995f.
- SHAO, Y.; ZHOU, B. Echinocystic acid saponins from *Aster yunnanensis*. **Journal of Natural Products**, v.58, n.6, p.837-842, 1995.
- SHAO, Y.; HO, C-T.; CHIN, C-K.; ROSEN, R.T.; HU, B.; QIN, G-W. Triterpenoid saponins from *Aster lingulatus*. **Phytochemistry**, v. 44, n.2, p. 337-340, 1997a.
- SHAO, Y.; HO, C-T.; CHIN, C-K. Asterlingulatosides C and D, cytotoxic triterpenoid saponins from *Aster lingulatus*. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 743-746, 1997b.
- SHAO, Y.; HO, C-T.; CHIN, C-K.; YANG, S-W.; CORDELL, G.A.; LOTTER, H.; WAGNER, H. Lingulatusin, two epimers of an unusual linear diterpene from *Aster lingulatus*. **Phytochemistry**, v.49, n.2, p.609-612, 1998.
- SIMÕES, C.M.O .; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. ; MENTEZ, L.A .; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 2 ed. Florianópolis:Editora da UFSC e Porto Alegre:Editora da UFRGS, 2000. p.67.
- SOARES, G.L.G.; VIEIRA, T.R. Inibição da germinação e do crescimento radicular de alface (cv. "grand rapids") por extratos aquosos de cinco espécies de Gleicheniaceae. **Floresta e Ambiente**, v. 7, n.1, p.180-107, 2000.
- SOUZA, A. D.L.; ROCHA, A. F.I.; PINHEIRO, M.L.B.; ANDRADE, C.H.S.; GALOTTA, A. L.A. Q; SANTOS, M.P.S. Constiuintes químicos de *Gustavia augusta* L. (Lecythidaceae). **Química Nova**, v. 24, n. 4, p. 439-442, 2001.
- STARGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; SILVA, CRUZ M.E.; NOZAKI, M.H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento**, ano II, n.11, p.16-21, 1999.
- TANAKA, M.A.S.; BETTI, J.A.; KIMATI, H. Doenças dos morangueiro. In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. v.2. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda, 1997. p.261-296.
- TAKEDA, K.; HARBORNE, J.B.; SELF, R. Identification and distribution of malonated anthocyanins in plants of the Compositae. **Phytochemistry**, v.25, n.6, p.1337-1342, 1986.

TAN, R.X.; HU, Y.H.; LIU, Z.L. New kaurane diterpenoids from *Aster tongolensis*. **Journal of Natural Products**, v.56, n.11, p.1917-1922, 1993.

UCHIDA, K.; MIZUNO, H.; HIROTA, K.; TAKEDA, K.; TAKEUCHI, N.; ISHIKAWA, Y. Effects of spinasterol and sitosterol on plasma and liver cholesterol levels and biliary and fecal sterol and bile acid excretions in mice. **Japan Journal Pharmacology**, v. 33, n. 1, p. 103-112, 1983.

ULUBELEN, A.; TOPCU, G.; ERIS, C.; SÖNMEZ, U.; KARTAL, M.; KURUCU, S.; BOZOK-JOHANSSON, C. Terpenoids from *Salvia sclarea*. **Phytochemistry**, v. 36, p. 971-974, 1994.

ULUBELEN, A.; ÖKSÜZ, S.; KOLAK, U.; BOZOK-JOHANSSON, C.; CELIK, C.; VOELTER, W. Antibacterial diterpenes from roots of *Salvia viridis*. **Planta Medica**, v. 66, p. 458-462, 2000.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Biblioteca Central. **Normas para apresentação de documentos científicos**. v. 1-10, Curitiba: Editora UFPR, 2001.

WANG, C.Z.; YU, D.Q.; Lignan and acetylenic glycosides from *Aster auriculatus*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 4, p. 711-717, 1998.

WILZER, K.A.; FRONCZEK, F.R.; URBATSCH, L.E.; FISCHER, N.H. Coumarins from *Aster praealtus*. **Phytochemistry**, v.28, n.6, p.1729-1735, 1989.

YAMADA, K.; ANAI, T.; HASEGAWA, K. Lepidimoide, an allelopathic substance in the exudates from germinated seeds. **Phytochemistry**, v.39, n.5, p.1031-1032, 1995.

YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. Breve análise histórica da química de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas Mediciniais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p.17-75.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v.24, n.1, p. 147-152, 2001.