

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VANESSA CRISTINA DIAS CANTELI

COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *Duranta vestita*
Cham., VERBENACEAE

CURITIBA

2012

VANESSA CRISTINA DIAS CANTELI

COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *Duranta vestita*
Cham., VERBENACEAE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de
Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Paraná.

Orientador: Profº Dr. Obdulio Gomes Miguel
Co-Orientadora: Profaº Dra. Marilis Dallarmi
Miguel

CURITIBA
2012

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por estar sempre iluminando e guiando meus caminhos.

Aos meus pais **Margarida** e **Alceu**, e ao meu irmão **Anderson**, pelo apoio e incentivo.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel**, e a minha coorientadora **Profª Dra. Marilis Dallarmi Miguel**, pela oportunidade, confiança e paciência.

Ao meu colega de mestrado **Vinicius**, e as doutorandas **Milena**, **Cristiane Paula**, e **Maria Christina** por todo auxílio, apoio, companheirismo e amizade.

Aos doutorandos, **Beatriz**, **Cristina Mayumi**, **Cristina Peitz**, **Cristiane Bezerra**, **Ranieri** e a **Profa Josiane** pelo auxílio e apoio.

A mestranda **Angela** pela contribuição na atividade antimicrobiana.

À **Universidade Federal do Paraná** e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade.

A **Capes** pelo apoio financeiro.

Aos amigos, que mesmo longe, sempre estiveram de alguma forma presentes em meu coração.

E a todos aqueles que alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVO	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 FLORESTA OMBRÓFILA MISTA	15
3.2 FAMÍLIA VERBENACEAE	15
3.2.1 Gênero <i>Duranta</i>	16
3.2.1.1 <i>Duranta vestita</i> Cham.	16
3.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO GÊNERO	17
3.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA	18
3.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	23
3.5.1 Ensaio da Redução do Complexo Fosfomolibdênio	25
3.5.2 Atividade Antioxidante pela Redução do Radical DPPH	25
3.6 TOXICIDADE FRENTE A <i>Artemia salina</i>	26
3.7 ATIVIDADE ALELOPÁTICA E SUA RELAÇÃO COM O ESTRESSE OXIDATIVO	26
3.8 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	28
3.9 ATIVIDADE HEMOLÍTICA	29
4 METODOLOGIA DA PESQUISA	30
4.1 MATERIAL BOTÂNICO	30
4.2 ENSAIO PARA ANÁLISE FITOQUÍMICA	30
4.2.1 Metabólitos Solúveis em Álcool	30
4.2.1.1 Pesquisa de alcalóides	31
4.2.1.2 Pesquisa de leucoantocianidinas	31
4.2.1.3 Pesquisa de heterosídeo flavônico	31
4.2.1.4 Pesquisa de flavonóis	32
4.2.1.5 Pesquisa de di-hidroflavonóis	32
4.2.1.6 Pesquisa de cumarinas	32
4.2.1.7 Pesquisa de heterosídeos antraquinônicos	33
4.2.1.8 Pesquisa de esteróides e triterpenos	33
4.2.2 Metabólitos Solúveis em Água	34
4.2.2.1 Pesquisa de heterosídeos antocianínicos	34
4.2.2.2 Pesquisa de heterosídeos saponínicos	35
4.2.2.3 Pesquisa de heterosídeos cianogênicos	35
4.2.2.4 Pesquisa de taninos	35
4.2.2.5 Pesquisa de ácidos voláteis	36
4.2.2.6 Pesquisa de ácidos fixos	36
4.2.2.7 Pesquisa de aminogrupos	37
4.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO E DAS FRAÇÕES	37
4.4 ANÁLISE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES POR CLAE	38
4.5 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS	38
4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	39
4.6.1 Ensaio da Redução do Complexo Fosfomolibdênio	39
4.6.2 Potencial Antioxidante por Cromatografia de Camada Delgada	39
4.6.3 Avaliação da Atividade Antioxidante pela Redução do Radical DPPH	40

4.7 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE A <i>Artemia salina</i>	40
4.7.1 Preparo da Solução Salina	40
4.7.2 Eclosão dos Ovos	41
4.7.3 Preparo das Amostras	41
4.7.4 Avaliação da Toxicidade	41
4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA.....	42
4.8.1 Preparo do Teste	42
4.8.2 Bioensaios de Germinação.....	42
4.8.3 Bioensaios de Crescimento	43
4.8.4 Índice Mitótico	43
4.8.5 Respiração de Raízes	44
4.8.6 Fotossíntese.....	44
4.8.7 Avaliação do estresse oxidativo.....	45
4.8.7.1 Preparo do extrato enzimático.....	45
4.8.7.2 Atividade da peroxidase	45
4.8.7.3 Atividade da catalase	46
4.8.7.4 Atividade da superóxido dismutase.....	46
4.8.7.5 Polifenoloxidase.....	46
4.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	47
4.9.1 Microorganismos	47
4.9.2 Preparo dos Inóculos.....	47
4.9.3 Microdiluição em Caldo Para a Determinação da CIM.	47
4.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA.....	49
4.10.1 Ensaio da Atividade Hemolítica em Tubos.....	49
4.10.2 Ensaio da Atividade Hemolítica em Ágar Sangue.....	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA.....	50
5.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO E DAS FRAÇÕES	52
5.3 ANÁLISE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES POR CLAE	54
5.4 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS	58
5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	64
5.5.1 Ensaio da Redução do Complexo Fosfomolibdênio.....	64
5.5.2 Potencial Antioxidante por Cromatografia de Camada Delgada	66
5.5.3 Avaliação da Atividade Antioxidante pela Redução do Radical DPPH.....	67
5.6 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE A <i>Artemia salina</i>	73
5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA.....	74
5.7.1 Bioensaios de Germinação.....	74
5.7.2 Teste de Crescimento	76
5.7.3 Índice Mitótico	82
5.7.4 Conteúdo de clorofila	89
5.7.5 Respiração celular.....	91
5.7.6 Avaliação do Estresse Oxidativo	95
5.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	104
5.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA	105
5.9.1 Ensaio da Atividade Hemolítica em Tubos.....	105
5.9.2 Ensaio da Atividade Hemolítica em Agar Sangue.....	106
6 CONCLUSÃO	107
REFERÊNCIAS	109

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Duranta vestita</i>	17
Figura 2 - Saponinas já descritas para o gênero <i>Duranta</i>	19
Figura 3 - <i>Trans</i> -clerodanes tipo diterpenoide já descritos para o gênero <i>Duranta</i> ...	20
Figura 4 - Flavonóides já descritos para o gênero <i>Duranta</i>	21
Figura 5 - Cumarino-lignóides já descritos para o gênero <i>Duranta</i>	21
Figura 6 - Iridóides glicosilados já descritos para o gênero <i>Duranta</i>	22
Figura 7 - Feniletanóides já descritos para o gênero <i>Duranta</i>	22
Figura 8 - Outros compostos já descritos para o gênero <i>Duranta</i>	23
Figura 9 - Fluxograma da obtenção dos extratos e frações	53
Figura 10 - Obtenção dos extratos e frações	54
Figura 11 - Cromatograma do Ex C – C	55
Figura 12 - Cromatograma do Ex Alc – C.....	55
Figura 13 - Cromatograma da F Clo – C	55
Figura 14 - Cromatograma da F AcEt – C.....	56
Figura 15 - Cromatograma da F HalcR – C.....	56
Figura 16 - Cromatograma do Ex Alc – F	56
Figura 17 - Cromatograma da F Clo – F.....	57
Figura 18 - Cromatograma da F AcEt – F	57
Figura 19 - Cromatograma da F HalcR – F	57
Figura 20 - Cromatograma do CLAE-Preparativo das frações 49 - 90.....	59
Figura 21 - Estrutura química do Verbascosídeo	59
Figura 22 - Espectro de absorção de UV do Iso1*	60
Figura 23 - Espectro de absorção de UV do Verbascosídeo* (Pétille, 2007)	60
Figura 24 - Espectro de RMN ¹³ C do Iso1 (200 MHz; CD ₃ OD).....	61
Figura 25 - Espectro de RMN ¹ H do Iso1 (200 MHz; CD ₃ OD)	63
Figura 26 - Reação de Complexação do Fosfomolibdênio.....	66
Figura 27 - Cromatografia em Camada Delgada com Revelador DPPH	67
Figura 28 - Radículas de <i>L. sativa</i> evidenciando o engrossamento, e a ausência de pêlos absorventes.....	82
Figura 29 - Efeito das diferentes concentrações das amostras Ex C – C, Ex Alc – C, Ex Alc – F, F Hex – C, F Clo – C e F AcEt – C, sobre a divisão celular em células meristemáticas de raízes de plantas de <i>L. sativa</i> , evidenciando a diminuição da atividade celular	85
Figura 30 - Efeito das diferentes concentrações das amostras F HalcR – C, F Hex – F, F Clo – F, F AcEt – F, F HalcR – F e Controle, sobre a divisão celular em células meristemáticas de raízes de plantas de <i>L. sativa</i> , evidenciando a diminuição da atividade celular	86
Figura 31 - Efeito das diferentes concentrações das amostras Ex C – C, Ex Alc – C, Ex Alc – F, F Hex – C, F Clo – C e F AcEt – C, sobre a divisão celular em células meristemáticas de raízes de plantas de <i>A. cepa</i> , evidenciando a diminuição da atividade celular	87
Figura 32 - Efeito das diferentes concentrações das amostras F HalcR – C, F Hex – F, F Clo – F, F AcEt – F, F HalcR – F e Controle, sobre a divisão celular em células meristemáticas de raízes de plantas de <i>A. cepa</i> , evidenciando a diminuição da atividade celular Fotossíntese	88
Figura 33 - Avaliação da atividade hemolítica em Agar sangue.....	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise Sistemática das frações obtidas do Extrato Hidroetanólico das Folhas	50
Tabela 2 - Análise Sistemática do Extrato Hidroetanólico das Cascas	51
Tabela 3 - Análise Sistemática do Extrato Aquoso das Folhas e Cascas	51
Tabela 4 - Rendimento dos extratos	52
Tabela 5 - Rendimento das frações	52
Tabela 6 - Teor de verbascosídeo nos extratos e frações	58
Tabela 7 - Dados de RMN ¹³ C da literatura e dados obtidos	62
Tabela 8 - Dados de RMN ¹ H da literatura e dados obtidos	64
Tabela 9 - Atividade Antioxidante pela Redução do Complexo do Fosfomolibdênio ..	65
Tabela 10 - Atividade Antioxidante pela Redução do Radical DPPH	72
Tabela 11 - Avaliação da toxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	73
Tabela 12 - Índice de velocidade de germinação (IVG) e porcentagem de germinação (%G) das sementes de <i>L. sativa</i> e <i>A. cepa</i>	75
Tabela 13 - Crescimento da radícula e hipocótilo, e peso seco de <i>L. sativa</i>	77
Tabela 14 - Crescimento da radícula e hipocótilo, e peso seco de <i>A. cepa</i>	79
Tabela 15 - Índice mitótico	83
Tabela 16 - Conteúdo total de clorofila	90
Tabela 17 - Respiração celular	93
Tabela 18 - Atividade da peroxidase	96
Tabela 19 - Atividade da catalase	98
Tabela 20 - Atividade da superóxido dismutase	100
Tabela 21 - Atividade da Polifenoloxidase	102
Tabela 22 - CIM das amostras frente a <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>E. faecalis</i>	105
Tabela 23 - Avaliação da atividade hemolítica em tubos	105
Tabela 24 - Formação de alo na atividade hemolítica em ágar sangue	106

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curva de calibração do verbascosídeo.....	58
Gráfico 2 - Porcentagem de Inibição da Atividade Antioxidante pela Redução do Complexo do Fosfomolibdênio.....	66
Gráfico 3 - Curva da Rutina pela Redução do DPPH.....	68
Gráfico 4 - Curva da Vitamina C pela Redução do DPPH.....	68
Gráfico 5 - Curva do Ex Alc – C pela Redução do DPPH.....	68
Gráfico 6 - Curva do Ex Alc – F pela Redução do DPPH.....	69
Gráfico 7 - Curva do Ex C – C pela Redução do DPPH.....	69
Gráfico 8 - Curva da F Hex – C pela Redução do DPPH.....	69
Gráfico 9 - Curva da F AcEt – C pela Redução do DPPH.....	70
Gráfico 10 - Curva da F Clo – C pela Redução do DPPH.....	70
Gráfico 11 - Curva da F HalcR – C pela Redução do DPPH.....	70
Gráfico 12 - Curva da F Hex – F pela Redução do DPPH.....	71
Gráfico 13 - Curva da F Clo – F pela Redução do DPPH.....	71
Gráfico 14 - Curva da F AcEt – F pela Redução do DPPH.....	71
Gráfico 15 - Curva da F HalcR – F pela Redução do DPPH.....	72
Gráfico 16 - Atividade Antioxidante pela Redução do Radical DPPH.....	73
Gráfico 17 - Crescimento do hipocótilo de <i>L. sativa</i>	78
Gráfico 18 - Crescimento da radícula de <i>L. sativa</i>	78
Gráfico 19 - Crescimento do coleótilo de <i>A. cepa</i>	80
Gráfico 20 - Crescimento da radícula de <i>A. cepa</i>	80
Gráfico 21 - Índice mitótico - <i>L. sativa</i>	84
Gráfico 22 - Índice mitótico - <i>A. cepa</i>	84
Gráfico 23 - Conteúdo total de clorofila - <i>L. sativa</i>	91
Gráfico 24 - Conteúdo total de clorofila - <i>A. cepa</i>	91
Gráfico 25 - Respiração celular - <i>L. sativa</i>	94
Gráfico 26 - Respiração celular - <i>A. cepa</i>	94
Gráfico 27 - Peroxidase - <i>L. sativa</i>	97
Gráfico 28 - Peroxidase - <i>A. cepa</i>	97
Gráfico 29 - Catalase - <i>L. sativa</i>	99
Gráfico 30 - Catalase - <i>A. cepa</i>	99
Gráfico 31 - Atividade da superóxido dismutase - <i>A. cepa</i>	101
Gráfico 32 - Polifenoloxidase - <i>L. sativa</i>	103
Gráfico 33 - Polifenoloxidase - <i>A. cepa</i>	103

LISTA DE SIGLAS

%	- Porcentagem
%G	- Porcentagem de germinação
°C	- Graus Celsius
µg/µL	- Micrograma por microlitro
µg/mL	- Micrograma por mililitro
µL	- Microlitro
ATP	- Adenosina trifosfato
br	- Banda alargada
C18	- Fase reversa com 18 carbonos
CA(%)	- Capacidade antioxidante porcentual
CCD	- Cromatografia em Camada Delgada
CD3OD	- Clorofórmio deuterado
CIM	- Concentração Inibitória Mínima
CLAE	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cm	- Centímetro
CT	- Clorofila total
d	- Dupleto
D ₂ O	- Água deuterada
d ₆ -Acetona	- Acetona deuterada
d ₆ -DMSO	- Dimetilsulfóxido deuterado
dd	- Duplo dupleto
DL ₅₀	- Dose letal média
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
DPPH	- 2,2-difenil-1-picrilhidrazila
dq	- Duplo quarteto
EROs	- Radicais livres de oxigênio
Ex Alc – C	- Extrato hidrometanólico da casca
Ex Alc – F	- Extrato hidrometanólico da folha
Ex C – C	- Extrato cetônico da casca
F AcEt – C	- Fração acetato de etila da casca
F AcEt – F	- Fração acetato de etila da folha
F Clo – C	- Fração clorofórmica da casca
F Clo – F	- Fração clorofórmica da folha
F HalcR – C	- Fração hidroalcoólica da casca
F HalcR – F	- Fração hidroalcoólica da folha
F Hex – C	- Fração hexânica da casca
F Hex – F	- Fração clorofórmica da folha
g	- Grama
GL	- Gay Lussac
H ₂ O	- Água
H ₂ O ₂	- Peróxido de hidrogênio
HO ₂ ⁻	- Radical hidroperóxil
IC ₅₀	- Concentração inibitória média
IM	- Índice mitótico
Iso1	- Isolado 1
IVG	- Índice de velocidade de germinação

kg	- Kilograma
m	- Multipleteo
M	- Molar
MeOD	- Metanol deuterado
MeOH	- Metanol
mg	- Miligrama
mg/mL	- Miligrama por mililitro
MHz	- Mega-Hertz
mL	- Mililitro
mm	- Milímetro
mmol/L	- Milimol por litro
mmol/mL	- Milimol por mililitro
mol/L	- Mol por litro
N	- Normal
nm	- Nanômetro
O ₂	- Oxigênio
O ₂ ⁻	- Radical superóxido
OH ⁻	- Radical hidroxil
pH	- Potencial Hidrogeniônico
ppm	- Parte por milhão
p/v	- Peso/volume
RMN ¹³ C	- Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹ H	- Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
rpm	- Rotações por minuto
t	- Tripleto
td	- Triplo dubleto
UAE	- Unidade de atividade enzimática
UFC/mL	- Unidade formadora de colônia por mililitro
UPCB	- Herbário do Departamento de Botânica
UV	- Ultravioleta
v/v	- Volume/volume
W	- Watts

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo estudar a espécie *Duranta vestita* Cham., pertencente à família Verbenaceae. Este estudo foi realizado a partir das cascas e folhas desta espécie coletadas na cidade de Curitiba, estado do Paraná, com as quais foram preparados os extratos hidrometanólicos (casca e folha), que foram fracionados de acordo com a polaridade dos constituintes, e o extrato cetônico (casca). A partir da fração acetato de etila da folha foi obtido um composto isolado por meio de colunas cromatográficas, o qual foi identificado por espectroscopia de ultravioleta, RMN ¹³C e RMN ¹H, como o verbascosídeo. O estudo de algumas atividades biológicas, com os extratos e frações, revelaram capacidade antioxidante da espécie pelo método da redução do complexo do fosfomolibdênio (F AcEt – C, F HalcR – C, Ex Alc – F e F HalcR – F) e redução do radical DPPH (F AcEt – C, F AcEt – F e F HalcR – F). Os extratos demonstraram inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* e o extrato cetônico também demonstrou inibição do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*. As atividades alelopática, hemolítica e a toxicidade sobre o microcústáceo *Artemia salina*, mostraram que o extrato hidrometanólico da folha, bem como a sua fração hidroalcoólica remanescente, foram as amostras que mais evidenciaram a presença de toxicidade. Porém todas as amostras possuem alguma atividade alelopática. Além do extrato cetônico e da fração clorofórmica da casca também possuem atividade hemolítica.

Palavras chave: *Duranta vestita*, atividade antimicrobiana, antioxidantes, hemólise, alelopatia.

ABSTRACT

This work aimed to study the specie *Duranta vestita* Cham, that's belong to the family Verbenaceae. This study was conducted from the barks and leaves of this specie collected in the city of Curitiba, the state of Paraná, which are prepared the alcoholic extracts (bark and leave), that were fragmented according to the constituents polarity, and the ketone extract (bark). From the ethyl acetate fraction of the leaf was obtained a compound isolated by chromatography columns, which was identified by ultraviolet, RMN ¹³C and RMN ¹H spectroscopy, as the verbascoside. The study of some biological activities, with extracts and fractions, showed antioxidant capacity of the specie through phosphomolybdenum complexometry method (F AcEt – C, F HalcR – C, Ex Alc – F e F HalcR – F) and radical DPPH reduction (F AcEt – C, F AcEt – F e F HalcR – F). The extracts showed growth inhibition of *Staphylococcus aureus* and ketone extract also showed growth inhibition of *Pseudomonas aeruginosa*. The allelopathic activity, hemolytic and toxicity through micro crustacean *Artemia salina*, showed that the alcoholic extract of the leaf, as well as it's hydroalcoholic fraction remaining, were the samples more evidence of the presence of toxicity. However all the samples have some allelopathic activity. Besides the ketone extract and chloroform fraction of the bark also have hemolytic activity.

Key words: *Duranta vestita*, antimicrobial activity, antioxidants, hemolysis, allelopathy.

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas para o tratamento de doenças tem se tornado de grande valia tendo em vista que produtos fitoterápicos ganham, cada vez mais, a confiança da população por se tratar de produtos “naturais”.

O uso de fitoterápicos, de forma individualizada, não é considerado como de uso em Saúde Pública. No entanto, o uso de medicamentos naturais passou a ser um problema de Saúde Pública com o advento da produção e o consumo massificado de tais produtos. Esse problema se torna mais grave quando se verifica que além de propagandas pouco criteriosas, contrariando frontalmente princípios estabelecidos na terapêutica, constata-se um grande número de associações de plantas medicinais e seus derivados, inclusive com substâncias sintéticas. Estas na maioria das vezes não tiveram a eficácia e, principalmente, a segurança estudadas, assim como uma indústria desestruturada técnico e profissionalmente para produzir adequadamente (SCHENKEL *et al.*, 1985).

Hoje em dia a busca por novos medicamentos vem impulsionando a pesquisa científica, incluindo sobre plantas medicinais, para obtenção de novos fármacos. Diversos autores têm apontado a importância dos estudos químicos e farmacológicos, em várias espécies vegetais, pela intensa produção de metabólitos secundários, que podem ser medicinais ou tóxicos (BRITO e BRITO, 1993).

Sabe-se que a atividade farmacológica de diversas plantas é devido a alguma substância do metabolismo secundário, ou a um conjunto destas presentes nos vegetais. O conhecimento dos aspectos de atividade biológica do vegetal é requisito essencial para a transformação da planta medicinal em um medicamento fitoterápico (DE SMET e BROUWERS, 1997). Essa investigação pode ser realizada, verificando-se a atividade biológica e/ou farmacológica dos extratos e das substâncias isoladas.

A obtenção de um produto seguro a partir de uma planta não é simples, e demanda muitos estudos, recursos e envolve áreas distintas. Portanto muitos produtos circulam sem segurança e eficácia garantidas. Para se garantir a segurança deve-se avaliar a presença, ou não de toxicidade no produto. Além disso, o controle destes produtos, ou mesmo da matéria-prima, é complicado por se tratar de produtos fitoterápicos onde o número de substâncias desconhecidas é muito

grande.

A flora brasileira é muito grande e a maioria dos exemplares existentes ainda não possui nenhum estudo. Acredita-se que pelo menos a metade pode ter alguma propriedade terapêutica útil à população, mas a grande maioria dessas espécies ainda não foi motivo de estudos adequados. Portanto estudos sobre os potenciais medicinais de plantas brasileiras ainda não estudadas quimicamente, são de grande importância.

Muitos compostos têm sido isolados de espécies vegetais brasileiras e de outras partes do mundo, com potente atividade antimicrobiana, o que é de interesse para a indústria farmacêutica e para a medicina (YUNES e CALIXTO, 2001).

Vários trabalhos acadêmicos e artigos indicam que diversos tipos de danos teciduais, inclusive em tecidos vitais, são causados por grupos de substâncias químicas, conhecidas como radicais livres, produzidas naturalmente em grandes quantidades no organismo. Dessa forma, já se conhece o papel dos radicais livres na produção de doenças, agora deve-se buscar compostos antioxidantes que possam minimizar os danos causados pelos radicais livres (YOUNGSON, 1996).

A busca por herbicidas que possam ser extraídos de fontes naturais é essencialmente importante para as plantas medicinais, uma vez que não é recomendado o uso de agrotóxicos sintéticos no cultivo destas, devido aos vários problemas que estes podem causar como contaminação com resíduos tóxicos, e redução na concentração dos princípios ativos (REIS e MARIOT, 2001).

Considerando as atividades biológicas que têm sido encontradas em espécies da família Verbenaceae e a falta de estudos científicos da espécie *Duranta vestita* Cham., justifica-se o estudo desta espécie.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

O trabalho tem como objetivo avaliar a composição fitoquímica da espécie *Duranta vestita* Cham., Verbenaceae, e verificar as atividades antioxidante, alelopática, antimicrobiana e a toxicidade dos extratos obtidos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar a planta;
- Secar, estabilizar e moer as cascas e folhas;
- Preparar extratos hidrometanólicos das cascas e folhas;
- Concentrar e fracionar o extrato bruto;
- Isolar os constituintes químicos presentes nos extratos;
- Identificar os compostos isolados utilizando técnicas espectroscópicas de ultravioleta, infra-vermelho, ressonância magnética nuclear de ^{13}C e ^1H ;
- Estudar a bioatividade dos extratos e frações sobre *Artemia salina*;
- Estudar a atividade antibacteriana dos extratos e frações frente a diferentes cepas bacterianas;
- Estudar a atividade alelopática dos extratos e frações;
- Estudar a capacidade antioxidante dos extratos e frações;
- Verificar a atividade hemolítica dos extratos e frações.

3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

3.1 FLORESTA OMBRÓFILA MISTA

A Floresta Ombrófila Mista (Floresta com Araucária), a qual faz parte da Mata Atlântica, ocorre predominantemente nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, em regiões de clima extratropical pluvial temperado quente de altitude (FUNDAÇÃO DE PESQUISAS FLORESTAIS DO PARANÁ, 2004). Sendo encontrada em grande parte da região metropolitana de Curitiba, principalmente em terrenos baixos ao longo do rio Iguaçu e seus afluentes (CARVALHO, 2003).

Tem como característica marcante a coexistência de floras de origens distintas, uma temperada e outra tropical (SEGER *et al.*, 2005), sendo a *Araucaria angustifolia* (pinheiro-do-Paraná), a espécie mais marcante (FUNDAÇÃO DE PESQUISAS FLORESTAIS DO PARANÁ, 2004).

Seger *et al.* (2005) relatam entre outras espécies a *Duranta vestita*, como uma das principais espécies encontradas no estrato inferior de um remanescente de Floresta Ombrófila Mista, situado no perímetro urbano do município de Pinhais (PR).

3.2 FAMILIA VERBENACEAE

A família Verbenaceae pertence à ordem Lamiales e inclui cerca de 35 gêneros e 1000 espécies, que se distribuem principalmente nos países tropicais, mas existem espécies que são extratropicais (WETTSTEIN, 1944; JUDD *et al.*, 2008; SOUZA e LORENZI, 2008). No Brasil ocorrem 17 gêneros nativos: *Aloysia*, *Baillonia*, *Bouchea*, *Casselia*, *Cithrexyllum*, *Duranta*, *Glandularia*, *Lantana*, *Lippia*, *Monochilus*, *Petrea*, *Phyla*, *Priva*, *Stachytarpheta*, *Tamonea*, *Verbena*, *Verbenoxylum*; e um cultivado: *Congea*; sendo ao todo cerca de 250 espécies (SOUZA e LORENZI, 2008).

Essa família é composta por ervas, arbustos, lianas e árvores muitas vezes aromáticas. Podem conter ou não espinhos; possuem pelos simples, geralmente unicelulares e as vezes calcificados ou silicificados; glândulas oleíferas. Seus

caules são geralmente quadrados. Suas folhas podem ser distribuídas opostamente, ou helicoidalmente, sendo simples ou lobadas; inteiras ou serradas; com nervura peniforme. Inflorescência racemosa. Flores bissexuais e pentâmeras, vistosas sendo normalmente polinizadas por coleta de néctar através de abelhas, vespas e moscas. Fruto drupa ou esquizocarpo (WETTSTEIN, 1944; JOLY, 1991; JUDD *et al.*, 2008; SOUZA e LORENZI, 2008).

3.2.1 Gênero *Duranta*

Duranta o gênero (Verbenaceae) compreende cerca de 35 espécies que ocorrem principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (ANIS *et al.*, 2001; SHAHAT *et al.*, 2005; AHMAD *et al.*, 2009).

3.2.1.1 *Duranta vestita* Cham.

Duranta vestita (Figura 1) é uma planta nativa encontrada no sul e sudeste brasileiro, em Floresta Ombrófila Mista, também é conhecida como fruta-de-jacu, esporão-de-pomba, baga-de-pomba, espinho-de-pomba e pingo-dourado-silvestre (SEGER *et al.*, 2005; FLORASBS, 2010; SALIMENA *et al.* 2010). A sua taxonomia está descrita na Quadro 1

Classe	Equisetopsida C. Agardh
Subclasse	Magnoliidae Novák ex Takht.
Superordem	Asteranae Takht.
Ordem	Lamiales Bromhead
Família	Verbenaceae J. St.-Hil.
Gênero	<i>Duranta</i> L.
Espécie	<i>Duranta vestita</i> Cham.

QUADRO 1 - TAXONOMIA DA ESPÉCIE *Duranta vestita* CHAM.

FONTE: TROPICOS, 2010



Figura 1 - *Duranta vestita*

FONTE: A autora (2010)

NOTA: [a] *D. vestita*. [b] *D. vestita* frutificada. [c] Inflorescência de *D. vestita*. [d] Fruto de *D. vestita*. [e] Ramos de *D. vestita*.

É uma árvore de 4-5 m de altura, com espinhos aguçados nos ramos, folhas opostas, serrilhadas, sua inflorescência é na forma de racemos sendo que as flores aparecem de outubro a dezembro, sendo estas lilases. Seu fruto é do tipo baga, de cor amarela quando maduro, frutificando de dezembro a abril (FLORASBS, 2010).

3.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO GÊNERO

As frutas são usadas no tratamento de malária (ANIS *et al.*, 2001; ANIS *et al.*, 2002; NIKKON *et al.*, 2008; AHMAD *et al.*, 2009; LOPES, RITTER e RATESI, 2009), possuindo atividade comprovada contra *Plasmodium berghei* (SHAHAT *et al.*, 2005; AHMED *et al.*, 2009). Além dos frutos que também são usados contra vermes

intestinais (NIKKON *et al.*, 2008; LOPES, RITTER e RATESI, 2009), o extrato aquoso das folhas possui atividade antimalárica, além de ser usado para o tratamento de abscesso (NIKKON *et al.*, 2008). As flores também são usadas como estimulante e os frutos como febrífugo no México e na Guatemala. E, na Indochina, ela é considerada diurética (LOPES, RITTER e RATESI, 2009).

É comprovada a atividade inibitória frente à trombina, a qual está relacionada à doença vascular trombótica (ANIS *et al.*, 2001; ANIS *et al.*, 2002; SHAHAT *et al.*, 2005; LOPES, RITTER e RATESI, 2009), e a atividade inibitória de enzimas proil endopeptidases (ANIS *et al.*, 2002; SHAHAT *et al.*, 2005; LOPES, RITTER e RATESI, 2009). Substâncias isoladas a partir da fração solúvel em clorofórmio possuem capacidade antioxidante potente frente ao DPPH (AHMAD *et al.*, 2009), e a fração solúvel em acetato possui atividade antioxidante e antiviral (AHMED *et al.*, 2009).

O extrato metanólico das folhas possui citotoxicidade frente à *Artemia salina* e uma linha celular HepG2 (linhagem de células tumorais) (AHMED *et al.*, 2009), atividade inseticida contra *Aedes aegypti* e antialimentar *Piceus atagenus* (ANIS *et al.*, 2001; AHMAD *et al.*, 2009). Também foi relatada atividade frente aos fungos *Ceratocystis paradoxa* e a *Phytophthora capsici* (VIJAYA, KULKARNI e HEGDE, 2007; SHASHIDHARA *et al.*, 2008).

Foram descritos casos de intoxicação de animais que comeram folhas de *Duranta repens* L., a qual é muito usada em jardinagem (SCANLAN *et al.*, 2006), mas ainda segundo Scanlan *et al.* (2006) devido a raridade de casos relatados o risco de intoxicação em mamíferos é muito pequeno. A fração solúvel em clorofórmio possui toxicidade aguda frente a ratos (NIKKON *et al.*, 2008).

Ervas daninha e arbustos que crescem em torno de *Duranta* normalmente não são saudáveis, o que sugere que haja um inibidor de crescimento da planta, indicando um possível efeito alelopático (HIRADATE *et al.*, 1999).

3.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

Quanto ao gênero *Duranta* existem relatos sobre a presença de alcaloides, flavonoides, acetofenona, cumarina, iridoides, diterpenos, triterpenos, saponinas, glicídios, glicosídeos fenólicos, glicosídeos esteroidais e esteroides (ANIS *et al.*,

2001; ANIS *et al.*, 2002; SHAHAT *et al.*, 2005; JUDD *et al.*, 2008; NIKKON *et al.*, 2008; AHMAD *et al.*, 2009; AHMED *et al.*, 2009).

Entre essas várias classes as substâncias já descritas para este gênero são:

- Saponinas: durantanina I; II; III; IV e V; 3,28-bidemosideo de ácido oleanólico; ácido 3-[(O- β -4C1-glucuranopiranosil)-oxy]olean-12-en-28-oico éster O- β -D-4C1-glucopiranosil; ácido oleanólico; 12-Oleaneno 3 β , 21 β -diol; β -Amirina (Figura 2) (HIRADATE *et al.*, 1999; SHAHAT *et al.*, 2005; NIKKON *et al.*, 2008; AHMED *et al.*, 2009);

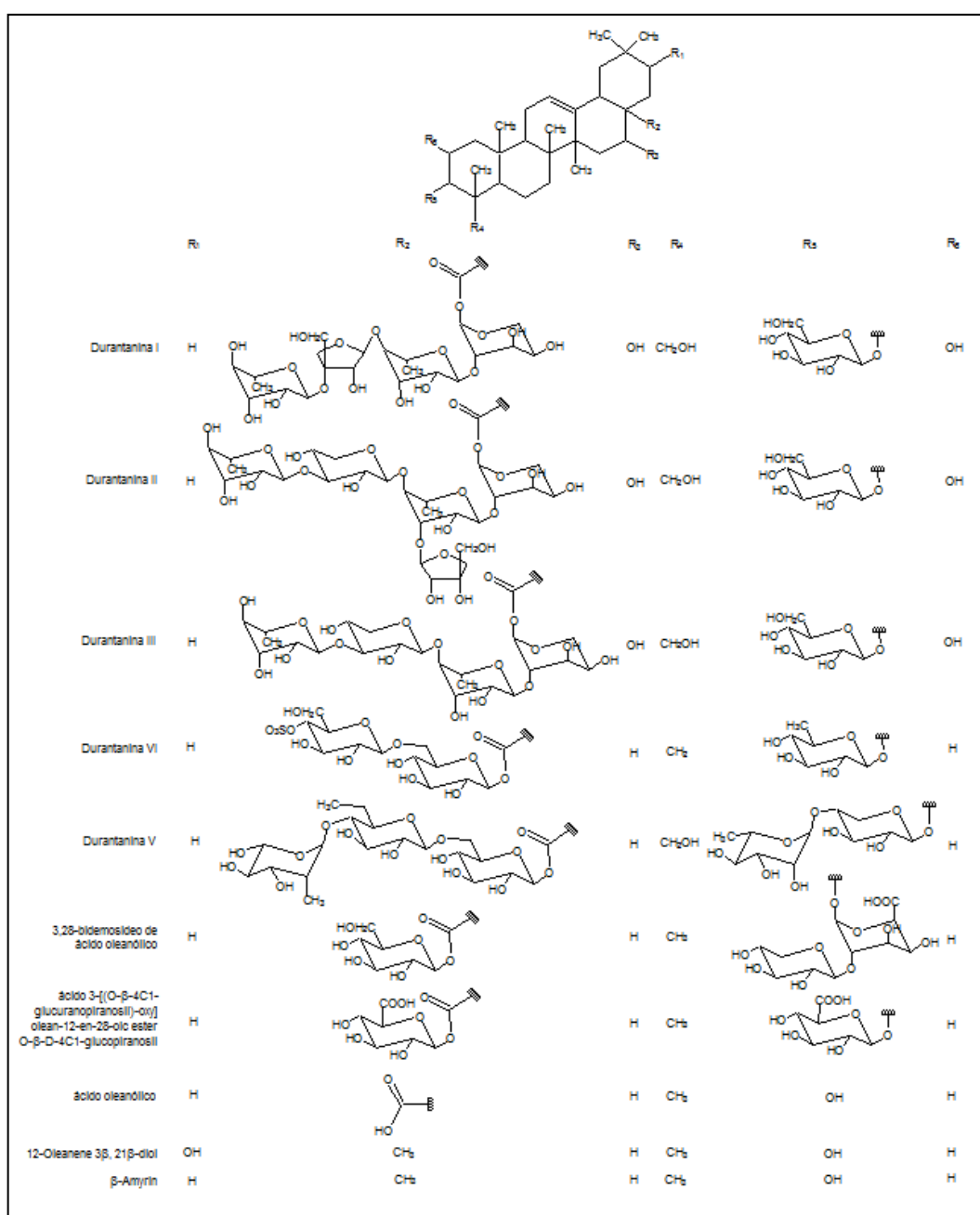


Figura 2 - Saponinas já descritas para o gênero *Duranta*.

- *Trans*-clerodanos tipo diterpenoide: ácido 6 β -hidróxi-15,16-epoxi-5 β ,8 β ,9 α ,10 α -cleroda-3,13(16),14-trien-18-oico; ácido 2 β -hidróxi-15,16-epoxi-5 β ,8 β ,9 β ,10 α -cleroda-3,13(16),14-trien-18-oico; ácido (+)-hardwickiico; ácido (+)-3,13-clerodadien-16,15-olid-18-oico; ácido (-)-6 β -hidróxi-5 β ,8 β ,9 β ,10 α -cleroda-3,13-dien-16,15-olid-18-oico (Figura 3) (ANIS *et al.*, 2001; IQBAL *et al.*, 2004);

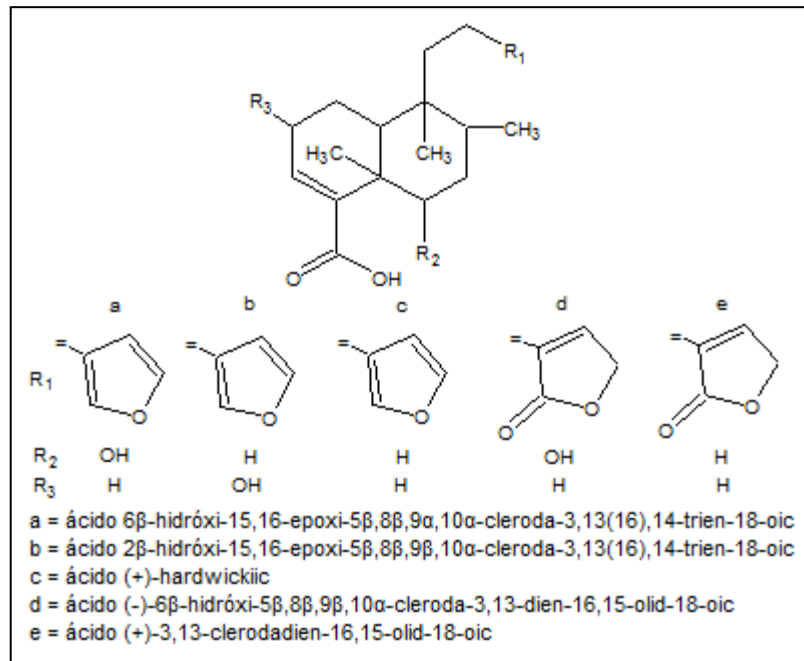


Figura 3 - *Trans*-clerodanes tipo diterpenoide já descritos para o gênero *Duranta*.

- Flavonoides: 3,7,4'-trihidróxi-3'-(8''-aceto-7''-metilooctil)-5,6-dimetóxi-flavona; 7-O- α -D-glucopiranosil-3,4'-dihidróxi-3'-(4''-acetoxil-3''-metilbutil)-5,6-dimetóxi-flavona; 7-O- α -D-glucopiranosil-3,5-dihidróxi-3'-(4''-acetoxil-3''-metilbutil)-6,4'-dimetóxi-flavona; 5,7-dihidróxi-3'-(2-hidróxi-3-metil-3-butenil)-3,6,4'-trimetoxiflavona; 3,7-dihidróxi-3'-(2-hidróxi-3-metil-3-butenil)-5,6,4'-trimetóxi-flavona; 5-hidróxi-3,6,7,4'-tetrametóxi-flavona; 3,7,4'-trihidróxi-3'-(4-hidróxi-3-metilbutil)-5,6-dimetóxi-flavona; 3,7-dihidróxi-3'-(4-hidróxi-3-metilbutil)-5,6,4'-trimetóxi-flavona; acacetina; diosmetina; apigenina; luteolina; quercetina (Figura 4) (ANIS *et al.*, 2001; ANIS *et al.*, 2002; IQBAL *et al.*, 2004; AHMED *et al.*, 2009);

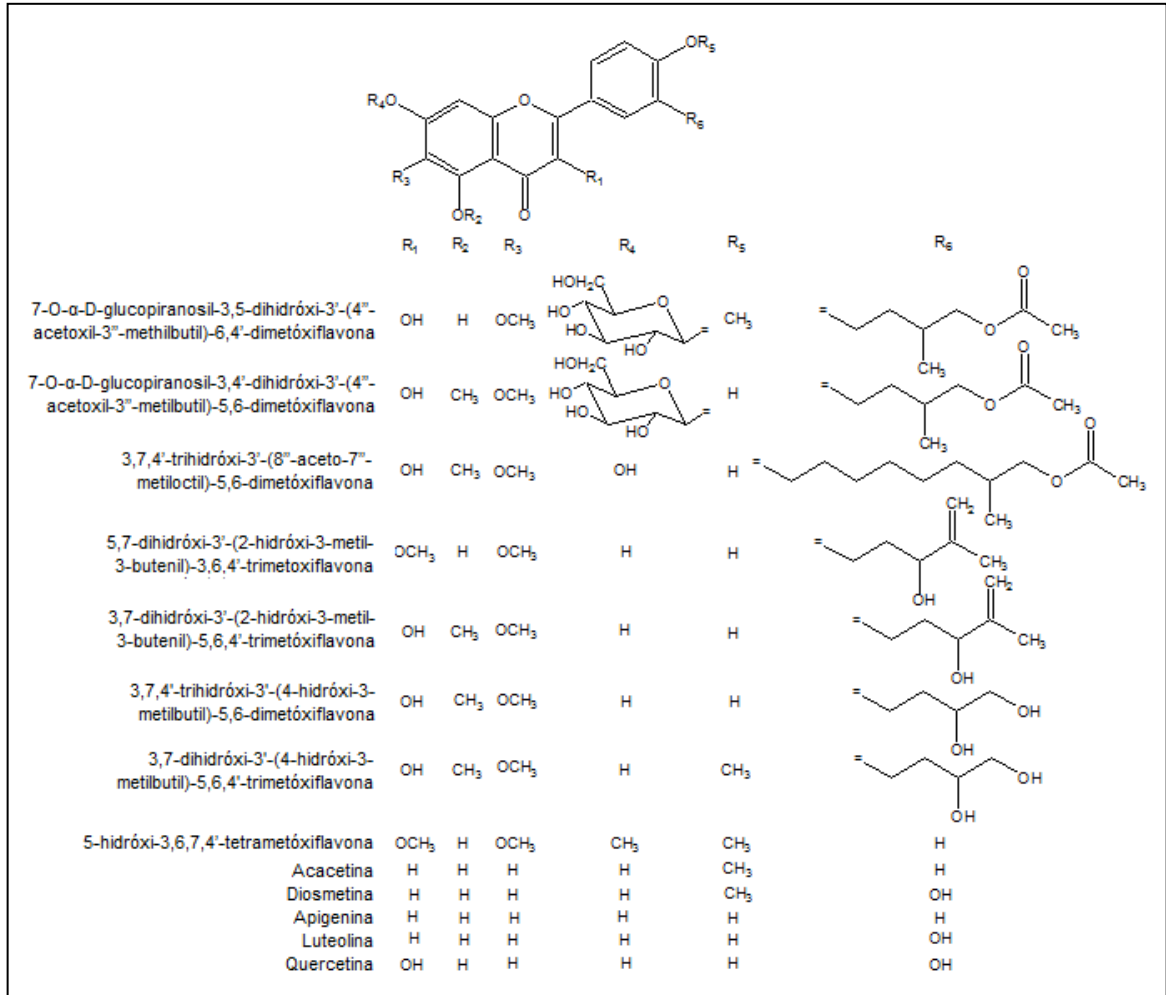


Figura 4 - Flavonoides já descritos para o gênero *Duranta*.

- Cumarino-lignoides: cleomiscosina A; durantina A; repeninas A; B; C e D (Figura 5) (AHMAD *et al.*, 2009);

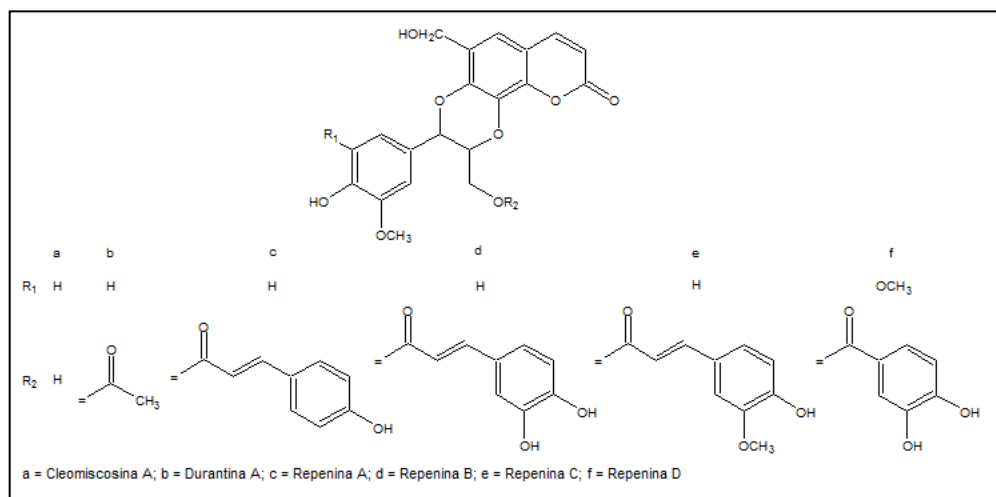


Figura 5 - Cumarino-lignoides já descritos para o gênero *Duranta*.

- Iridoides glicosilados: duranterectosideo A; B; C e D; lamiideo; durantosideo I; II; III; lamiidosideo (Figura 6) (TAKEDA *et al.*, 1995; POSER *et al.*, 1997; HIRADATE *et al.*, 1999; SHAHAT *et al.*, 2005; AHMED *et al.*, 2009);

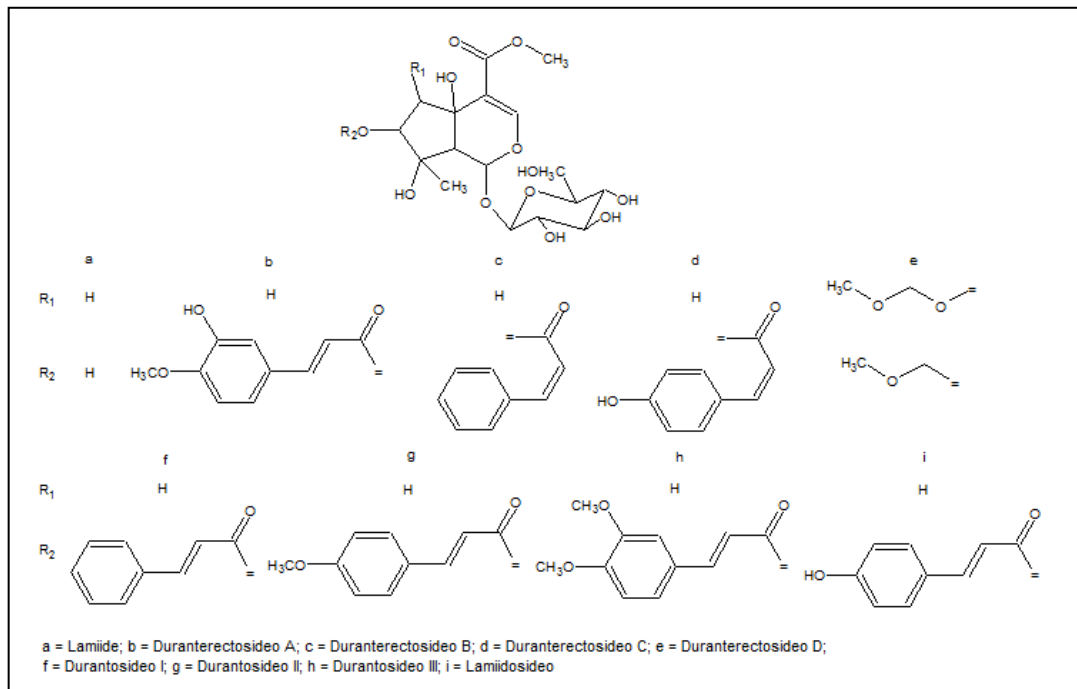


Figura 6 - Iridoides glicosilados já descritos para o gênero *Duranta*.

- Feniletanóides: nameli campenosideo I; cistanosideo E; verbascosídeo (Figura 7) (SHAHAT *et al.*, 2005; AHMED *et al.*, 2009);

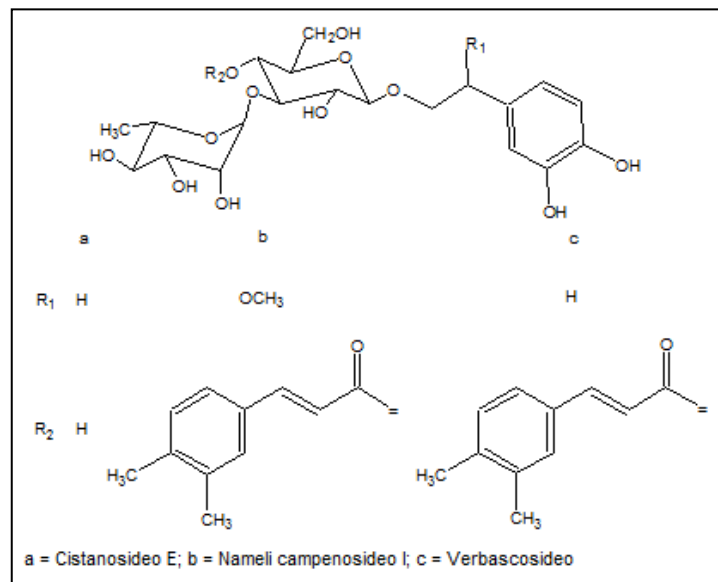


Figura 7 - Feniletanóides já descritos para o gênero *Duranta*.

- Outros: 5 α ,8 α -epidioxiergosta-6,22-dien-3 β -ol; 5 α ,8 α -epidioxiergosta-6,9(11),22-trien-3 β -ol; 6,7-dimetóxicumarina; 2,4'-dimetoxi-3'-(2-hidróxi-3-metil-3-butenil)acetofenona; rosenonolactona (Figura 8) (ANIS *et al.*, 2002).

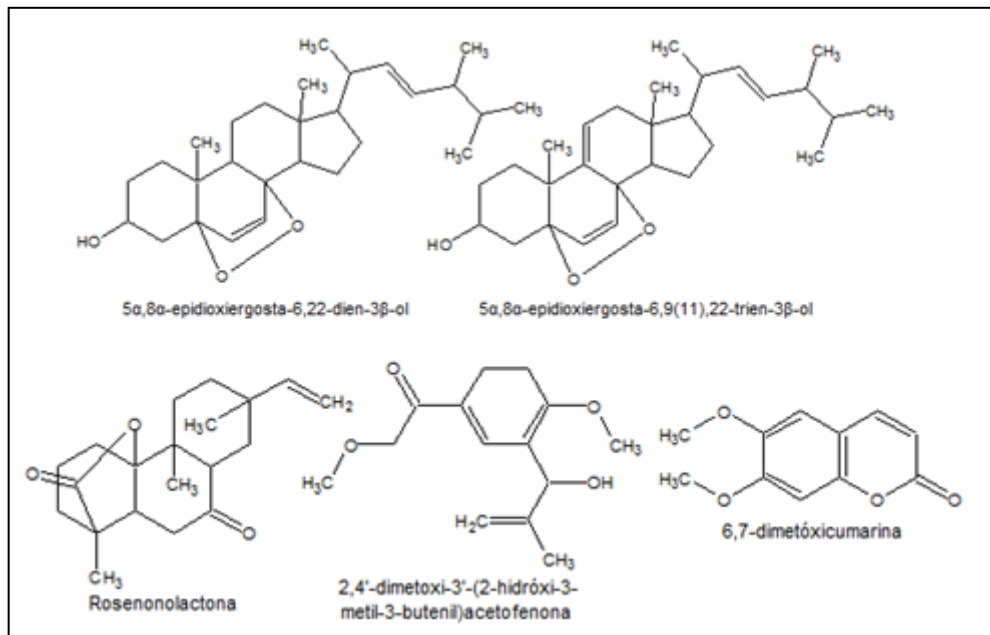


Figura 8 - Outros compostos já descritos para o gênero *Duranta*.

3.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os radicais livres de oxigênio são moléculas que apresentam elétrons desemparelhados, capazes de reagir com outras moléculas, como proteínas, carboidratos, lipídios e o DNA (ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2005; NEGRI, POSSAMAI e NAKASHIMA, 2009). Essas moléculas podem ser geradas durante o metabolismo celular, como a respiração aeróbica, processos inflamatórios, regulação do crescimento celular e síntese de substâncias; mas também podem ter origem externa como o tabaco, alguns poluentes, solventes orgânicos, pesticidas; ou ainda serem produzidos por radiações ionizantes e luz ultravioleta (GÜLÇİN *et al.*, 2003; ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2005).

Os radicais livres têm importante função biológica, sendo sua produção observada em diversas condições fisiológicas (VASCONCELOS *et al.*, 2007; PIENIZ *et al.*, 2009; KEDARE e SINGH, 2011). Normalmente, sua produção é mantida em equilíbrio por antioxidantes endógenos como a superóxido dismutase, peroxidase,

catalase, glutationa, entre outras (GAIKWAD *et al.*, 1010). Quando a sua produção é exacerbada, o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio, sendo os antioxidantes, produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta (BARREIROS, DAVID e DAVID, 2006). O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes resulta no estresse oxidativo que nada mais é que a indução de danos celulares pelos radicais livres (VASCONCELOS *et al.*, 2007; PIENIZ *et al.*, 2009).

Há grandes evidências do envolvimento do estresse oxidativo em várias patologias, como causa direta ou como consequência, entre elas câncer, artrite reumatoide, aterosclerose, mal de Alzheimer, doença de Parkinson, catarata, choque hemorrágico, aterosclerose, diabetes, inflamações crônicas, envelhecimento precoce, propagação de AIDS em pacientes soropositivos, doenças do coração, pulmão, autoimunes e neurodegenerativas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; BOKOV, CHAUDHURI e RICHARDSON, 2004; SORG, 2004; BARREIROS, DAVID e DAVID, 2006; VASCONCELOS *et al.*, 2007; MAGALHÃES *et al.*, 2008; NEGRI, POSSAMAI e NAKASHIMA, 2009; ALVES *et al.*, 2010; KEDARE e SINGH, 2011).

Em Halliwell e Gutteridge (1999) antioxidantes são definidos como substâncias que, presentes em baixas concentrações retardam ou previnem significativamente a oxidação dos substratos atuando cataliticamente, captando, suprimindo, neutralizando ou removendo os radicais livres e outras espécies reativas, ou ainda, promovendo a ligação dos íons metálicos e outros agentes prooxidantes às proteínas, indisponibilizando-os para a produção de espécies oxidantes. Do ponto de vista biológico, podemos definir antioxidantes como aqueles compostos que protegem os sistemas biológicos contra os efeitos deletérios dos processos ou das reações que levam à oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares. Os antioxidantes não podem prevenir completamente a oxidação (JORDÃO JÚNIOR *et al.*, 1998).

Existem diversos métodos para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de substâncias biologicamente ativas, que podem ser classificados em dois grupos: os ensaios usados para avaliar peroxidação lipídica, e os ensaios usados para medir a habilidade de sequestro de radicais livres (ALVES *et al.*, 2010).

Devido à complexidade das substâncias químicas presentes é necessário fazer a avaliação da capacidade antioxidante da planta pelo menos por dois métodos sendo que alguns autores sugerem o uso de uma "bateria" de ensaios

(CHOI *et al.*, 2002; MAGALHÃES *et al.*, 2008; NEGRI, POSSAMAI e NAKASHIMA, 2009), uma vez que os diferentes antioxidantes podem atuar em níveis e com modo de ação distintos (JORDÃO JÚNIOR *et al.*, 1998). Sendo assim dificilmente existirá um método simples e universal pelo qual a atividade antioxidante possa ser medida precisa e quantitativamente. (ALVES *et al.*, 2010)

Existe um interesse crescente em antioxidantes, particularmente no que se destinem a prevenir os efeitos deletérios presumido de radicais livres no corpo humano, e para evitar a deterioração de gorduras e outros constituintes dos alimentos (GAIKWAD *et al.*, 2010). Sendo assim esses testes têm se tornado ferramentas usuais e extremamente necessárias na seleção inicial de substâncias que possam ser utilizadas como fármacos (ALVES *et al.*, 2010).

3.5.1 Ensaio da Redução do Complexo Fosfomolibdênio

Este método, descrito por Prieto, Pineda e Aguilar (1999), fundamenta-se na redução do molibdênio VI a molibdênio V ocorrida em presença de determinadas substâncias com capacidade antioxidante, com formação de um complexo verde entre fosfato/molibdênio V, em pH ácido, o qual é determinado espectrofotometricamente a 695 nm. Sendo que a coloração amarela, torna-se verde à medida que se reduz.

3.5.2 Atividade Antioxidante pela Redução do Radical DPPH

O método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) é baseado no sequestro do radical DPPH por antioxidantes, reduzindo-o a hidrazina, assim produzindo um decréscimo da absorbância a 518 nm. Quando o DPPH é colocado em presença de substâncias capazes de sequestrar radicais livres, a absorção é inibida, resultando em uma descoloração estequiométrica em relação ao número de elétrons retirados e independente de qualquer atividade enzimática. O grau de descoloração indica a capacidade sequestradora de radical livre (MATHIESENA, MALTERUDB e SUNDA, 1997; LEHUÉDÉA *et al.*, 1999; RUFINO *et al.*, 2007; ALVES *et al.*, 2010).

3.6 TOXICIDADE FRENTE A *Artemia salina*

Artemia salina é um microcrustáceo de água salgada utilizado para a investigação de atividade biológica dos extratos e frações, e é uma importante ferramenta para o estabelecimento da toxicidade geral e dos parâmetros de citotoxicidade (MEYER *et al.*, 1982; CAVALCANTE *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2009).

Inúmeros trabalhos procuram correlacionar a toxicidade sobre *Artemia salina* com atividades como antifúngica, viruscida, antimicrobiana, tripanossomicida (MACRAE, HUDSON e TOWERS, 1988), parasiticida (CHAN-BACAB *et al.*, 2003) e antitumoral (RUPPRECHT, HUI e MCLAUGHLIN, 1990; SIQUEIRA *et al.*, 2001), sendo esta técnica recomendada como ensaio preliminar para avaliar a citotoxicidade e atividades antitumorais (MEYER *et al.*, 1982; CAVALCANTE *et al.*, 2000).

3.7 ATIVIDADE ALELOPÁTICA E SUA RELAÇÃO COM O ESTRESSE OXIDATIVO

A alelopatia pode ser definida como qualquer efeito direto ou indireto, danoso ou benéfico que uma planta exerce sobre outra pela produção de compostos do metabolismo secundário, aleloquímicos, liberados no ambiente (ALVES *et al.*, 2004; NEVES, 2005; TOKURA e NÓBREGA, 2006; BRITO, 2010).

As substâncias alelopáticas podem ser encontradas em concentrações que podem variar durante o ciclo de vida da planta em questão e geralmente são mais encontradas nas folhas e raízes, podendo também estar presentes em colmos, flores, frutos e sementes (TOKURA e NÓBREGA, 2006; GOLDFARB, PIMENTEL e PIMENTEL, 2009; BRITO, 2010). Essas substâncias apresentam uma grande diversidade química, e dentre as classes mais conhecidas têm-se os taninos, saponinas, glicosídeos cianogênicos, alcaloides, cumarina, sesquiterpenos, flavonoides e ácidos fenólicos, entre outros (ALVES *et al.*, 2004; MARASCHIN-SILVA e AQUILA, 2005; NEVES, 2005; BORELLA e PASTORINI, 2009).

Essas substâncias podem causar inibição ou estímulo na germinação, crescimento e/ou desenvolvimento, e quando os efeitos são negativos, a germinação

e o crescimento são os parâmetros mais afetados, sendo a germinação menos sensível do que o crescimento da plântula (FERREIRA e AQUILA, 2000; BORELLA e PASTORINI, 2009; GOLDFARB, PIMENTEL e PIMENTEL, 2009).

A produção de aleloquímicos pelas plantas tem fundamental importância no que diz respeito à autodefesa (MACÍAS *et al.*, 2007), pois estimulam a produção de radicais livres de oxigênio (EROs) por diversos mecanismos; dentre eles, o bloqueio da cadeia transportadora de elétrons, onde estes ficam livres e reagem facilmente com o O₂ formando superóxido (GNIAZDOWSKA e BOGATEK, 2005). Atualmente, as investigações em alelopatia têm se concentrado nas interações entre espécies vegetais cultivadas e na prospecção de novas moléculas com propriedades herbicidas (CARMO, BORGES e TAKAKI, 2007).

Segundo Ferreira e Aquila (2000) as alterações no padrão de germinação podem ser causadas através de alterações na: permeabilidade de membranas; transcrição e tradução do DNA; funcionamento dos mensageiros secundários; respiração, (sequestro de oxigênio – fenóis); conformação de enzimas e de receptores; ou combinação destes fatores. As mudanças metabólicas que se iniciam logo após a embebição de água pelas sementes se iniciam pelo aumento das enzimas hidrolíticas como a alfa-amilase e protease. Além disso, também ocorre a reativação do metabolismo mitocondrial que participa na síntese de enzimas que atuam contra as EROs. Estas enzimas podem eficientemente destruir as EROs, incluindo superóxido dismutase, catalase, peroxidase, enzimas do sistema thioredoxin, ascorbato e enzimas do ciclo da glutatona. Perturbação das vias que geram EROs, como a cadeia respiratória mitocondrial ou das atividades de enzimas antioxidantes, pode ocorrer devido a um estresse causado pela presença de aleloquímicos durante a germinação e/ou crescimento inicial das plântulas, resultando na inibição da germinação e/ou crescimento (MUNIZI *et al.*, 2007; KHAN, HUSSAIN e KHAN, 2008; PERGO e ISHII-IWAMOTO, 2011).

Um dos diversos efeitos das substâncias alelopáticas nas plantas é o controle da produção e acumulação de EROs, que se acumula nas células em respostas ao aleloquímico, sendo desta forma, responsáveis por danificar as células causando a sua morte (TESTA, 1995).

Os aleloquímicos estimulam a produção de EROs por diversos mecanismos, sendo um deles, o bloqueio da cadeia transportadora de elétrons, onde os elétrons ficam livres e reagem facilmente com o O₂ formando superóxido, inibindo a

fotossíntese pelo bloqueio da cadeia transportadora de elétrons do fotossistema II para fotossistema I (GNIAZDOWSKA e BOGATEK, 2005), além de aumentar a produção de EROs que atuam no estresse oxidativo das membranas celulares.

Os aleloquímicos também podem formar radicais semioquímicos, um composto derivado das quinonas, o qual é altamente reativo e doa elétrons para o O_2 , formando o superóxido (WEIR, PARK e VIVANCO, 2004).

Em plantas superiores, a presença dos aleloquímicos pode determinar a produção de EROs (MAKSYMIEC e KRUPA, 2006), onde os radicais superóxido podem sofrer uma série de transformações através de processos enzimáticos e se tornarem mais reativos, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), hidroxil (OH^\cdot) ou hidroperóxido (HO_2^\cdot) (HAMMOND-KOSAK e JONES, 1996). Consequentemente, estes radicais afetam diretamente a permeabilidade das membranas celulares, causando danos ao DNA e às proteínas.

Alguns aleloquímicos rapidamente despolarizam as membranas das células, aumentando sua permeabilidade e induzindo a peroxidação do lipídeo, causando um distúrbio celular generalizado que conduz à morte das células (YU, YE e ZHANG, 2003). A eliminação do radical superóxido (O_2^\cdot) é realizada por enzimas como a superóxido dismutase e a peroxidase, que catalisa o O_2^\cdot em H_2O_2 , protegendo as células dos efeitos tóxicos desses radicais (DEL RIO *et al.*, 2002). Entretanto, os níveis intracelulares de H_2O_2 são regulados por outras enzimas, como a catalase e a glutatona redutase, que atuam transformando as EROs intermediárias em água (BLOKHINA, VIROLAINEN e FAGERSTEDT, 2003).

São conhecidos vários modos de ação dos aleloquímicos envolvidos na inibição e alterações no crescimento de plantas e seu desenvolvimento. Porém a produção de espécies reativas de oxigênio e o estresse oxidativo, vem sendo considerado como um dos principais mecanismos de ação dos aleloquímicos (ZENG *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2007).

3.8 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A busca de substâncias com atividades antimicrobianas vem atraindo a atenção sobre os produtos naturais, despertado o interesse por se investigar o potencial da flora brasileira (AYRES *et al.*, 2008).

Para tanto existem inúmeras técnicas de *screening* para atividade antimicrobiana de plantas. Entre eles os dois métodos mais usados são o de difusão em ágar e de diluição em caldo. O método de diluição serve para determinar a concentração mínima de um agente necessário para inibir ou matar um microrganismo. Os agentes antimicrobianos são normalmente testados em diluições consecutivas, onde a menor concentração capaz de inibir o crescimento de um organismo é considerada como a Concentração Inibitória Mínima (CIM). Estas são consideradas excelentes ferramentas para determinar a susceptibilidade dos organismos aos antimicrobianos (ALVES *et al.*, 2008).

A técnica de microdiluição em caldo é uma adaptação da macrodiluição e envolve o uso de pequenos volumes de caldo colocados em placas de 80, 96 ou mais poços de fundo redondo ou cônico estéreis, próprias para microdiluição (ALVES *et al.*, 2008).

3.9 ATIVIDADE HEMOLÍTICA

A OMS (1998) preconiza que seja verificada a atividade hemolítica das plantas medicinais, para saber se a planta em questão não causa hemólise das células sanguíneas, a qual dependendo do grau pode levar a sérios problemas de saúde. A avaliação da atividade hemolítica também está presente no Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos da Anvisa de 2003 (ANVISA, 2003)

O teste de hemólise *in vitro* vem sendo utilizado como metodologia para a avaliação toxicológica de plantas medicinais (GANDHI e CHERIAN, 2000). Sendo esse método também utilizado como forma de triagem para agentes tóxicos (KUBLIK *et al.*, 1996), uma vez que esse teste é um indicador geral de citotoxicidade e bioatividade (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

4 METODOLOGIA DA PESQUISA

4.1 MATERIAL BOTÂNICO

As amostras de cascas e folhas de *Duranta vestita* Cham., Verbenaceae, foram coletadas no mês de março de 2010, na cidade de Curitiba, Paraná, no campus Jardim Botânico da Universidade Federal do Paraná, e foi identificada por comparação com as exsiccatas já existentes no UPCB (Herbário do Departamento de Botânica). Sendo as cascas e folhas secas e estabilizadas em estufa com circulação de ar forçada à temperatura 35 °C, por 24 horas.

4.2 ENSAIO PARA ANÁLISE FITOQUÍMICA

Para realização destes testes foi utilizada a metodologia desenvolvida por Moreira (1979), com adaptações, que constam nas etapas abaixo descritas.

4.2.1 Metabólitos Solúveis em Álcool

O extrato hidroetanólico a 20% (p/v) foi preparado por maceração de 40 g de material vegetal seco e moído em 200 mL de álcool etílico a 70% (v/v), em banho-maria a 70 °C por 1 hora, o qual foi filtrado em papel de filtro completando-se o volume para 200 mL, com álcool etílico 70% (v/v). Depois o extrato foi concentrado até um terço do seu volume e particionado com solventes de polaridade crescente: hexano, clorofórmio e acetato de etila, em funil de separação. Para cada fração foram utilizados 10 vezes de 20 mL de cada solvente sendo o volume completado para 200 mL com o próprio solvente. O resíduo do extrato foi denominado de fração hidroalcoólica remanescente, tendo seu volume completado para 200 mL com etanol.

As quatro frações obtidas foram usadas para a pesquisa dos seguintes grupos fitoquímicos: glicosídeos flavônicos, alcaloides, esteroides e/ou triterpenos, glicosídeos cumarínicos e glicosídeos antraquinônicos.

4.2.1.1 Pesquisa de alcaloides

A pesquisa qualitativa de alcaloides foi feita com os reativos conhecidos como reativos gerais de alcaloides: mercúrio tetraiodeto de potássio (Reativo de Mayer), tetraiodeto bismuto de potássio (Reativo de Dragendorff), ácido sílico túngstico (Reativo de Bertrand), *p*-dimetilamino benzaldeído (Reativo de Ehrlich) e Reativo de Vitali-Morin (promove a nitração de alcaloides).

De cada fração foi retirada uma alíquota de 50 mL, a qual foi evaporada em banho-maria a 50 °C. O resíduo foi dissolvido em 1 mL de etanol e acrescido de 20 mL de ácido clorídrico a 1%. Para cada fração testada foram feitos 5 tubos de ensaio, cada um com 1 mL do respectivo extrato clorídrico, para cada tubo foi adicionada duas gotas de um dos reativos.

Foi considerada positiva a presença de alcaloides na amostra com as seguintes visualizações para os reativos:

- Mayer: formação de precipitado branco ou leve turvação branca.
- Dragendorff: formação de precipitado de coloração tijolo.
- Bouchardat: formação de precipitado de coloração alaranjada.
- Bertrand: formação de precipitado branco ou leve turvação branca.

Para cada fração, foi utilizado um único tubo com o extrato, que serviu como controle negativo.

4.2.1.2 Pesquisa de leucoantocianidinas

Foram levados à secura 10 mL de cada uma das frações e depois dissolvidas com 5 mL de etanol. Posteriormente foi adicionado 5 gotas de ácido clorídrico concentrado, e então levadas ao aquecimento até ebulição. A reação foi considerada positiva quando do desenvolvimento de coloração vermelha.

4.2.1.3 Pesquisa de heterosídeo flavônico

Cada fração teve 20 mL levados à secura e dissolvidos posteriormente com

10 mL de etanol. Dessas frações 5 mL foram transferidos para cada tubo de ensaio. Em cada tubo foram adicionados 200mg de limalha de magnésio e ácido clorídrico fumegante lentamente. O resultado é considerado positivo quando ocorrer o desenvolvimento de coloração vermelho a vermelho sangue.

4.2.1.4 Pesquisa de flavonóis

Esta pesquisa foi realizada pelo teste do Oxálico Bórico ou reação de Taubock. Para tal, 10 mL de cada fração foram levados à secura, sendo então adicionadas 5 gotas de acetona e 30mg da mistura de ácido bórico e ácido oxálico (1:1), e levado novamente a secura, a este resíduo foram adicionados 5 mL de acetato de etila. A visualização foi realizada em ultravioleta, sendo considerada positiva a fração que apresentar fluorescência.

4.2.1.5 Pesquisa de di-hidroflavonóis

Em cápsulas de porcelana foram adicionados 10 mL de cada fração, as quais foram levadas à secura. O resíduo foi aquecido em fogareiro com alguns cristais de acetato de sódio, 0,1 mL de anidrido acético e 0,1 mL de ácido clorídrico concentrado. O desenvolvimento de coloração roxa foi o indicativo de reação positiva.

4.2.1.6 Pesquisa de cumarinas

Para a pesquisa de cumarinas 30 mL das frações hexano, clorofórmio e acetato de etila foram concentradas até 5 mL em banho-maria a 50 °C. E 30 mL da fração hidroalcoólica foi levada até pH 1 por adição de ácido clorídrico 2N, e posteriormente concentrada até 5 mL. Esta foi resfriada e transferida para um funil de separação para extração com acetato de etila (2 vezes de 10 mL). Essas últimas foram reunidas e concentradas em banho-maria até 5 mL.

Das frações foram transferidos 3 mL para tubos de ensaio, onde foram

adicionados 2 mL de hidróxido de sódio 2N. Os tubos foram levados para a câmara de luz ultravioleta em 366 nm por 15 minutos. A reação é considerada positiva quando se observada fluorescência azul ou verde amarelada.

Paralelamente, com o restante das frações, foram marcados, em um papel de filtro, três pontos com manchas de aproximadamente 1 cm de diâmetro. As manchas 1 e 2 foram tratadas com hidróxido de sódio 1N e, sobre a mancha 1, foi colocada uma moeda, depois foi levada à câmara de ultravioleta a 366 nm, deixando em exposição por 15 minutos. A reação é considerada positiva com o desenvolvimento de fluorescência, com coloração azul ou verde amarelada na mancha 2.

4.2.1.7 Pesquisa de heterosídeos antraquinônicos

Em balões de fundo chato foram transferidos 30 mL das frações, juntamente com 5 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico a 10%. A mistura foi deixada em refluxo por uma hora, e posteriormente filtrada, adicionando-se em seguida 30 mL de água. Transferindo-se então para um funil de separação, sendo posteriormente recolhidas as frações orgânicas (hexano, clorofórmio e acetato de etila). A fração hidroalcoólica foi extraída com acetato de etila (2 vezes de 10 mL). As frações obtidas foram reunidas e concentradas em banho-maria até 5 mL, e colocadas em um tubo de ensaio, adicionando-se então 5 mL de hidróxido de amônio, agitando-se lentamente (Reação de Borntraeger). A reação foi considerada positiva com observação de coloração vermelha.

4.2.1.8 Pesquisa de esteroides e triterpenos

As frações (10 mL) foram evaporadas até *secura* e os resíduos redissolvidos em 5 mL de clorofórmio e filtrados em algodão.

- Reação de Liberman-Bouchard

De cada uma das frações 0,1, 0,5 e 1,0 mL foram transferidos para três tubos de ensaio, e o volume completado para 2 mL com clorofórmio. Para essa reação, foi adicionado aos tubos de ensaio 1 mL de anidrido acético e lentamente

pelas paredes do tubo 2 mL de ácido sulfúrico concentrado.

A coloração indica:

- Rósea ou azul: presença de função carbonila na posição 3 e dupla ligação nas posições 5 e 6 ou 7 e 8.
 - Verde: função hidroxila em 3 e dupla ligação entre 5 e 6 ou 7 e 8.
 - Amarela: grupamento metila no carbono 14.
- Reação de Keller Kelliani

Foi levado à secura 2 mL de cada uma das frações clorofórmicas preparadas anteriormente. Os resíduos foram dissolvidos com 2 mL de ácido acético glacial e 0,2 mL de solução aquosa de cloreto férrico 1%. Transferindo-se então as misturas para tubos de ensaio contendo 2 mL de ácido sulfúrico.

O desenvolvimento de coloração azul ou verde na zona de contato entre as duas fases indica a presença de desoxiaçúcares, sendo:

- azul: esteroides;
- verde: triterpenos.

4.2.2 Metabólitos Solúveis em Água

O extrato aquoso foi preparado com 40 g do vegetal seco e moído, em 200 mL de água em banho-maria por 1 hora à 70 °C. Depois o material foi filtrado e completado o volume com água até 200 mL. Nesse extrato foram pesquisados os seguintes grupos fitoquímicos: glicosídeos antociânicos, saponinas, glicosídeos cianogénicos, taninos condensados e hidrolisáveis, aminogrupos e flavonoides.

4.2.2.1 Pesquisa de heterosídeos antociânicos

Foram separados 5 mL do extrato em 3 tubos de ensaio. No primeiro foi colocado ácido clorídrico 1% até pH 4, sendo considerado positivo os tubos que apresentam tons avermelhados. O segundo foi alcalinizado com hidróxido de sódio até pH 10, e foi considerado positivo os tubos onde se observam tons azulados. O terceiro foi neutralizado a pH 7, sendo considerado positivo quando se observam tons violáceos.

Paralelamente 10 mL do extrato foi extraído com álcool butílico saturado com água (2 vezes de 10 mL) em funil de separação. Foram reunidas as duas frações obtidas em uma cápsula de porcelana e concentradas até 5 mL. Foram adicionadas 5 gotas de ácido clorídrico concentrado e aquecidos até ebulição. O desenvolvimento de coloração vermelha indicou a presença de antocianidina.

4.2.2.2 Pesquisa de heterosídeos saponínicos

Para este foram utilizados 3 tubos de ensaio com 5 mL de extrato, estes foram agitados energicamente por cinco minutos medindo-se em seguida a espuma formada. Após repouso de 30 minutos, a presença de saponinas é confirmada pela formação de espuma persistente com altura superior a 1 cm.

4.2.2.3 Pesquisa de heterosídeos cianogênicos

A um tubo de ensaio, foram adicionados 5 mL do extrato aquoso, de modo a não umedecer as paredes do tubo, e 1 mL de ácido sulfúrico 10% ou 1N. Foi suspendida uma tira de papel picro-sódico, com o auxílio de uma rolha de cortiça, mantendo-se em banho-maria (60 °C) por 30 minutos. O resultado positivo para heterosídeos cianogênicos é observado pelo desenvolvimento de coloração marrom a vermelho no papel picro-sódico.

Para preparar o papel picro-sódico tiras de papel de filtro com 1 cm de largura foram embebidas em solução de ácido pícrico a 1% e secas ao abrigo da luz. As tiras pícricas secas foram embebidas em solução de carbonato de sódio a 10%, e secas e armazenadas em frasco âmbar.

4.2.2.4 Pesquisa de taninos

Foi transferido 1 mL de extrato aquoso para quatro tubos de ensaio e então adicionados os seguintes reagentes:

- Tubo 1: 3 gotas de solução aquosa de cloreto férrico a 1%. Coloração

azul ou verde, com formação ou não de precipitado – resultado positivo para taninos.

– Tubo 2: 1 a 3 gotas de sulfato amoniacal a 1%. Coloração azul ou verde – resultado positivo.

– Tubo 3: 1 a 3 gotas de solução aquosa de cloridrato de emetina a 1%. Formação de precipitado – resultado positivo.

– Tubo 4: 3 gotas de dicromato de potássio 1%. Desenvolvimento de precipitado – resultado positivo.

Para a pesquisa de taninos condensados e hidrolisáveis foram transferidos 30 mL do extrato para um balão de fundo chato junto com 6 mL de formaldeído a 40% e 4 mL de ácido clorídrico a 37%. Essa mistura foi aquecida em refluxo por uma hora, e depois de frio, filtrado. O resíduo do papel de filtro foi lavado com solução de álcool a 50% e gotejado sobre o resíduo algumas gotas de hidróxido de potássio a 5%. A coloração verde indica a presença de taninos condensados. Ao filtrado foi adicionado excesso de acetato de sódio e gotas de solução aquosa de cloreto férrico a 1%, a coloração azul indica a presença de taninos hidrolisáveis.

4.2.2.5 Pesquisa de ácidos voláteis

A um tubo de ensaio, foi adicionado 5 mL do extrato aquoso, de modo a não umedecer as paredes do tubo. Foi suspensa uma fita de pH, com o auxílio de uma rolha de cortiça, mantendo-se em banho-maria (60 °C) por 30 minutos. A presença desses ácidos é indicada pela coloração da fita para valores abaixo de pH 7.

4.2.2.6 Pesquisa de ácidos fixos

Em um balão, foram adicionados 20 mL do extrato aquoso e 2 mL de hidróxido de sódio 1N, permanecendo em refluxo por 30 minutos. Após o resfriamento, este foi acidificado com ácido sulfúrico 2N e extraído com acetato de etila (3 vezes de 10 mL). Os extratos etílicos foram reunidos e tratados com carvão ativo, sendo em seguida filtrados e evaporados em banho-maria (50 °C) até a secura. O resíduo foi deixado em estufa a 100 °C por 10 minutos, resfriado e adicionando-se 5 mL de hidróxido de amônio 1N. Em uma tira de papel de filtro

foram feitas duas manchas (3 gotas em cada mancha) com o resíduo amoniacal, deixando na estufa até secar, sobre uma das manchas foi gotejado o reativo de Nessler. A coloração marrom nessa mancha é indicativa de presença de ácidos fixos. Os ácidos fórmico, propiônico e aminoacético não formam manchas, pois não fixam a amônia, apresentando reação negativa.

4.2.2.7 Pesquisa de aminogrupos

Nesse teste 10 mL do extrato aquoso foram concentrados até 5 mL a temperatura de 60 °C. Em uma cromatoplaça de CCD (cromatografia em camada delgada) foram depositadas 3 gotas desse extrato concentrado, e após secas, sobre uma das manchas foi colocada uma gota de ninhidrina. A placa foi aquecida em estufa por 15 minutos com temperatura de 90-100 °C. A coloração azul-violácea indica a presença de aminogrupos.

4.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO E DAS FRAÇÕES

O extrato bruto metanólico das cascas foi obtido a partir de 2,1 kg do material vegetal, através do aparelho de Soxhlet, até o esgotamento do material, utilizando como líquido extrator etanol 96GL. Este foi concentrado até 280 mL. Sendo, parte deste (40 mL), seco em banho-maria. O restante (240 mL) foi utilizado para a obtenção das frações por partição líquido/líquido com solventes de diferentes polaridades, na seguinte ordem: *n*-hexano, clorofórmio e acetato de etila.

O extrato bruto cetônico das cascas foi obtido a partir de 1,0 kg do material vegetal, através do aparelho de Soxhlet, até o esgotamento do material, utilizando como líquido extrator acetona. Este foi concentrado em banho-maria.

O extrato bruto metanólico das folhas foi obtido a partir de 0,9 kg do material vegetal, através do aparelho de Soxhlet, até o esgotamento do material, utilizando como líquido extrator etanol 96GL. Este foi concentrado até 290 mL. Sendo, parte deste (50 mL), seco em banho-maria, o restante (240 mL) foi utilizado para a obtenção das frações por partição líquido/líquido com solventes de diferentes polaridades, na seguinte ordem: *n*-hexano, clorofórmio e acetato de etila.

4.4 ANÁLISE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES POR CLAE

Os extratos e frações foram analisados por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) – ProStar Gradiente VARIAN – utilizando coluna C18 (XTerra® RP₁₈ 4,6mm x 250mm, 5µm). Como fase móvel foi utilizado metanol:fase ácida (ácido sulfúrico 0,02N e ácido fórmico 0,2% em água) gradiente variando o metanol de 5 a 95% em 32 minutos. A análise foi acompanhada a 331 nm. Foram injetados 20 µL dos extratos e frações a 4mg/mL.

4.5 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS

A fração acetato de etila das folhas (F AcEt – F) foi eluída em coluna cromatográfica com fase estacionária sílica gel 60 Merck 0,063 – 0,200mm, e fase móvel hexano/acetato de etila, acetato de etila/metanol e metanol/água. A pastilha a ser cromatografada foi preparada com sílica gel 60 na proporção de 5 partes em relação à quantidade de amostra e levada à secura em banho-maria a 50 °C, sob constante homogeneização.

Em uma coluna de vidro, foi preparada a sílica-gel a ser depositada na proporção de 5 partes em relação à quantidade de pastilha. O sistema eluente foi iniciado com 100% de hexano, tendo acetato de etila como gradiente de polaridade, com variação de 10% até 100% de acetato de etila, a partir deste foi utilizado metanol como gradiente, com variação de 10% até 100% de metanol, e a partir deste foi utilizado água como gradiente, com variação de 50% até 100% de água.

As amostras recolhidas entre as frações 49 - 90 foram reunidas e posteriormente foram passadas em CLAE preparativo, coluna C18 (XTerra® Prep RP₁₈ 7,8mm x 300mm, 10µm) para isolamento do composto principal que as constituem. Para tanto foi utilizado uma fase móvel gradiente metanol:água onde o metanol vai de 15 a 20% nos 7 primeiros minutos e posteriormente a 65% em 32 minutos. A substância isolada foi identificada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) ¹³C e ¹H. Para RMN de ¹³C e ¹H utilizou-se espectrofotômetro Bruker® modelo AC200 MHz, realizada no Laboratório de RMN do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná.

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.6.1 Ensaio da Redução do Complexo Fosfomolibdênio

O complexo fosfomolibdênio é formado pela reação da solução de fosfato de sódio tribásico (28 mL, 0,1mol/L) com solução de molibdato de amônio tetraidratado (12 mL, 0,03mol/L) e solução de H₂SO₄ (20 mL, 3mol/L), em meio aquoso, sendo o volume final, ajustado com H₂O destilada para 100 mL, e possui coloração amarela, tornando-se verde à medida que se reduz (PIETRO, PINEDA e AGUILAR, 1999).

Os extratos e frações secas foram solubilizados em metanol com concentração final de 200µg/mL. Destas, 0,3 mL foram adicionados à 3 mL de solução reagente do complexo fosfomolibdênio. Os tubos foram fechados e mantidos em banho-maria à 95°C por 90 minutos. Após resfriamento, foi feita a leitura a 695 nm para obtenção das absorbâncias, sendo então usado 0,3 mL de metanol com 3 mL do reagente como branco. A capacidade antioxidante das amostras foi expressa em relação à vitamina C (200µg/mL), cuja atividade antioxidante de referência será considerada 1,00, a atividade antioxidante também foi comparada frente à rutina (200µg/mL). O teste foi realizado em triplicata. Os dados foram analisados com o método estatístico de Tukey ($p < 0,05$).

4.6.2 Potencial Antioxidante por Cromatografia de Camada Delgada

De acordo com o método descrito por Conforti *et al.* (2002), as amostras e os padrões (10mg/mL) foram submetidos à cromatografia em camada delgada (CCD), usando como fase móvel, a mistura tolueno, acetato de etila (93:7). Em seguida, as placas foram reveladas com solução a 0,2% (p/v) de DPPH em etanol, o desenvolvimento de coloração amarela nas manchas revela reação positiva.

4.6.3 Avaliação da Capacidade Antioxidante pela Redução do Radical DPPH

O potencial de redução do radical DPPH das amostras foi analisado espectrofotometricamente segundo Mensor *et al.* (2001). Foi preparada uma solução mãe de cada amostra em concentrações entre 20 a 300µg/mL, dependendo da amostra, a partir destas foram preparadas cinco concentrações para cada amostra. Em 2,5 mL de cada concentração, foi adicionado 1 mL de uma solução metanólica de DPPH na concentração de 0,03 mmol/mL. Foi feito um controle negativo com 2,5 mL de metanol e 1 mL de DPPH. Após trinta minutos de reação foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 518 nm, tendo como branco metanol. A leitura do controle negativo corresponde a absorção máxima do radical em estudo. Como padrões foram utilizados a rutina e a vitamina C. O teste foi realizado em triplicata.

A habilidade dos extratos em reduzir o radical foi calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ inibição de DPPH} = \frac{(A_c - A_a)}{A_c} \times 100$$

onde: A_c = Absorbância do controle negativo

A_a = Absorbância da amostra

A partir das porcentagens de inibição de DPPH, por regressão linear foi possível calcular o IC_{50} , ou seja a concentração da amostra que reduz 50% da concentração inicial de DPPH. Os valores de IC_{50} foram comparados segundo o método estatístico de Tukey ($p < 0,05$).

4.7 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE A *Artemia salina*

4.7.1 Preparo da Solução Salina

Água do mar artificial foi preparada com 38 g de sal marinho (23 g cloreto de sódio, 11 g cloreto de magnésio hexaidratado, 4 g sulfato de sódio, 1,3 g cloreto de cálcio biidratado, 0,7 g cloreto de potássio) e 1000 mL de água purificada.

O pH foi ajustado em 9,0 com carbonato de sódio para evitar o risco de

morte das larvas por diminuição do pH durante a incubação. Segundo Lewan, Anderson e Morales-Gomes (1992), um pH superior a 6 é essencial para o desenvolvimento de *Artemia salina*, e um pH superior a 10,5 deve ser evitado.

4.7.2 Eclosão dos Ovos

Os ovos de *Artemia salina* (0,5mg/mL) foram colocados na água salgada para eclodir por 48 horas sob aeração contínua e expostos à luz natural. A temperatura foi controlada entre 27 e 30°C e o pH entre 8-9. Na primeira hora do processo foi mantida iluminação (20W) sobre o recipiente.

4.7.3 Preparo das Amostras

O estudo foi realizado com os extratos e as frações. Foi preparada uma solução de cada uma das amostras em uma concentração de 10mg/mL em metanol. Desta solução 2,5, 25 e 250µL foram transferidos com pipeta automática para tubos de ensaio correspondendo respectivamente a 10, 100 e 1000µg/mL, em triplicata. O solvente foi evaporado por 12 horas (DALL'STELLA, 2008).

4.7.4 Avaliação da Toxicidade

Após a eclosão dos ovos, 10 larvas de *Artemia salina* foram transferidas para cada tubo de ensaio contendo as frações e para os tubos controles. Os controles negativos foram constituídos de tubos com metanol, o qual foi evaporado juntamente com as amostras. O volume de todos os tubos foi ajustado com água do mar artificial para 2,5 mL.

Após 24 horas, foi realizada a contagem das larvas mortas e vivas com auxílio de lupa e iluminação incandescente.

Os dados foram analisados com o método estatístico Probitos e determinados os valores de DL₅₀ a 95% de intervalos de confiança. As frações foram consideradas ativas quando o DL₅₀ foi menor que 1000 ppm (MEYER *et al.*, 1982).

4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA

4.8.1 Preparo do Teste

As placas de Petri (9,0 cm de diâmetro) contendo papel filtro Whatman nº. 1,0, previamente autoclavados a 120 °C por 20 minutos, receberam 5,0 mL da solução das amostras (extratos e frações), preparadas em solução de dimetilsulfóxido a 0,1% (DAYAN ROMAGNI e DUKE, 2000), tamponadas com solução de ácido 2-morfolinoetanosulfônico 10mmol/L nas concentrações de 250µg/mL, 500µg/mL e 1.000 µg/mL tendo o pH ajustado para 6,0 (MACIAS, CASTELLANO e MOLINILLO, 2000) com solução de hidróxido de potássio 0,1N. Em seguida, foram semeados aleatoriamente sobre cada disco de papel filtro, 50 diásporos da espécie alvo (*Lactuca sativa* – alface e *Allium cepa* - cebola), distribuídos aleatoriamente, com quatro repetições para cada solução, conforme Brasil (2009). Como controle, procedimento similar foi utilizado, porém com ausência dos extratos e frações.

As placas de Petri contendo os diásporos foram levadas a uma câmara de germinação, com condições de luz (160 W), umidade relativa (\pm 80%) e temperatura constante, adequadas a cada espécie alvo, conforme Brasil (2009) (*L. sativa*, 25°C com luz interna constante; e *A. cepa* 20 °C, com foto período de 12 horas; \pm 2 °C).

4.8.2 Bioensaios de Germinação

Para os bioensaios de germinação, foi aplicada a metodologia de MACIAS, CASTELLANO e MOLINILLO (2000). A contagem para avaliar a germinação foi realizada diariamente, por 5 dias, (sendo que para *L. sativa* a cada 12 horas), tendo como critério a protrusão radicular com no mínimo 2,0mm de comprimento. O experimento foi considerado concluído quando a germinação foi nula por três dias consecutivos. Os dados foram analisados com o método estatístico de Tukey ($p < 0,05$).

4.8.3 Bioensaios de Crescimento

Para os bioensaios de crescimento utilizou-se a metodologia descrita por Barnes *et al.* (1987) e Macias, Castellano e Molinillo (2000). Após três dias da protrusão radicular, mediu-se o alongamento da raiz e do hipocótilo/coleótilo (dez plântulas por placa) utilizando papel milimetrado. Posteriormente essas plântulas foram levadas para secar em uma estufa a 60 °C até peso constante para a obtenção da massa seca. Os dados foram analisados com o método estatístico de Tukey ($p < 0,05$).

4.8.4 Índice Mitótico

A determinação do índice mitótico foi feita segundo Oliveira *et al.* (1996) Dois centímetros, de três raízes primárias de cada repetição, foram retirados da extremidade distal e em seguida serão colocadas em 5 mL de solução de Farmer (3:1 etanol; ácido acético glacial) durante 2 horas, a 25 °C. Em seguida transferida para uma solução de álcool 70% e armazenada a 8 °C.

Para determinação do índice mitótico as pontas das raízes foram tratadas sequencialmente com água destilada por 5 minutos; ácido clorídrico 1M por 30 minutos, à temperatura ambiente; água destilada por 5 minutos; orceína acética 2% por 30 minutos ou azul de toluidina por 2 minutos.

As pontas das raízes coradas foram cortadas sobre lâmina de microscópio (2mm iniciais), colocando-se em seguida a lamínula e pressionando-se sob essa o papel filtro, para esmagamento do ápice e retirada do excesso de corante.

O material foi observado em microscópio óptico comum (1000 X), contando-se o número de células em cada fase mitótica (prófase, metáfase, anáfase e telófase). Foi avaliado 3 campos/lâmina.

O índice mitótico é obtido através do cálculo:

$$\text{Índice mitótico} = \frac{\text{Número de células em mitose}}{\text{Número total de células}} \times 100$$

Os dados foram analisados com o método estatístico de Tukey ($p < 0,05$).

4.8.5 Respiração de Raízes

O teste de respiração das raízes foi realizado segundo Steponkus e Lanphear (1967). Foram cortadas 10 raízes a 1,0 cm a partir da coifa e transferidas para tubos de ensaio, adicionando em cada tubo 5 mL de cloridrato de trifenil tetrazólio 0,6% (p/v), 1 mL de tampão fosfato de sódio (mono e dibásico) a 0,05M (pH 7,0), e então os tubos foram deixados à temperatura ambiente por 2 horas. Após esse período os tubos foram transferidos para banho-maria a 30 °C por 15 horas (ou em estufa a 40 °C).

Ao final desse tempo, as soluções dos tubos foram drenadas dos tubos de ensaio e as raízes lavadas uma vez com água destilada, que em seguida também foi drenada ao máximo. Posteriormente foram adicionados 7 mL de etanol 95% (v/v) e então os tubos foram levados para o banho-maria com água fervente (± 100 °C) durante 15 minutos, ou até secura. Após esse período os tubos foram resfriados à temperatura ambiente e acrescidos de 10 mL de etanol 95% (v/v). Em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 530 nm. Foi usado como branco etanol 95% (v/v). Os dados foram analisados com o método estatístico de Tukey ($p < 0,05$).

4.8.6 Fotossíntese

Foram cortadas 10 folhas primárias inteiras e transferidas para tubos de ensaio, contendo 5,0 mL de dimetilsulfóxido e então os tubos foram embrulhados em papel alumínio e deixados à temperatura ambiente por 24 horas. Quando então foi realizada a leitura da absorvância da clorofila a (645 nm) e b (663 nm) em espectrofotômetro. Foi usado como branco dimetilsulfóxido.

O teor de clorofila total foi calculado de acordo com a equação de Arnon (1949) e Lichtenthaler (1987).

$$\text{Clorofila total} = 20,2 \times A_A + 8,02 \times A_B$$

onde: A_A = absorvância da clorofila a;

A_B = absorvância da clorofila b

Os dados foram analisados com o método estatístico de Tukey ($p < 0,05$).

4.8.7 Avaliação do estresse oxidativo

4.8.7.1 Preparo do extrato enzimático

O extrato enzimático foi preparado logo após a coleta das amostras segundo Marques e Xavier-Filho (1991). Para tanto, as plântulas restantes de cada tratamento (as quatro repetições juntas), foram maceradas em grau de porcelana com auxílio de nitrogênio líquido e levados ao freezer (-20 °C). Posteriormente foram adicionados 10 mL de tampão fosfato de potássio (0,2M, pH 7), sendo as amostras então centrifugadas a 2500rpm por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante é o extrato enzimático. Os dados foram analisados com o método estatístico de Tukey ($p < 0,05$).

4.8.7.2 Atividade da peroxidase

A atividade da peroxidase foi determinada segundo Putter (1974). A 1 mL de extrato foi adicionado 1 mL de tampão fosfato de potássio (0,2M; pH 7,0), deixando-se então em banho-maria, a 25 °C, até a estabilização da temperatura. Em seguida, foram adicionados 500 µL de guaiacol (0,5%) e 500 µL de peróxido de hidrogênio (0,08%), sendo imediatamente realizadas as leituras de absorbância a 470 nm. Como branco foi preparada uma solução com 2 mL de tampão fosfato de potássio (0,2M; pH 7,0), 500 µL de guaiacol (0,5%) e 500 µL de peróxido de hidrogênio (0,08%).

O teste foi realizado em triplicata, e o resultado foi expresso em µmol de tetraguaiacol produzido (GRAY, ARNOYS e BLANKESPOOR, 1996)

$$\mu\text{mol de tetraguaiacol} = \text{mg de proteina} - 1$$

Os dados foram analisados com o método estatístico de Tukey ($p < 0,05$).

4.8.7.3 Atividade da catalase

A atividade da catalase foi determinada segundo Aebi (1984). A 100 μ L de extrato enzimático foram adicionados 3 mL de peróxido de hidrogênio (12,5mmol/L) em água destilada, a 30 °C. Em seguida foram realizadas as leituras de absorbância a 240 nm. Como branco foi utilizado o peróxido de hidrogênio (12,5mmol/L). O teste será realizado em triplicata. Os dados foram analisados com o método estatístico de Tukey ($p < 0,05$).

4.8.7.4 Atividade da superóxido dismutase

A atividade da superóxido dismutase foi determinada segundo Gupta *et al.* (1993). A 100 μ L de extrato enzimático foram adicionados 3 mL de tampão fosfato de potássio (0,1M; pH 7,0) contendo *L*-metionina (13mmol/L), NBT (0,44mmol/L), e riboflavina (1mmol/L). A reação foi iniciada após a colocação dos tubos de ensaios sob duas lâmpadas fluorescentes de 15W cada, a 25 °C. Após 15 minutos de reação os tubos foram retirados da fonte luminosa, encerrando-se assim a reação. A absorbância foi medida a 560 nm em espectrofotômetro. Como controle negativo foi usada a solução sem extrato enzimático e sem que essa seja iluminada. E como branco foi usado tampão fosfato. O teste foi realizado em triplicata. Os dados foram analisados com o método estatístico de Tukey ($p < 0,05$).

4.8.7.5 Polifenoloxidase

A polifenoloxidase foi determinada segundo Duangmal e Apenten (1999). Foi adicionado 1 mL de tampão fosfato de potássio (0,05M, pH 6,0), e 0,5 mL de catecol 0,1M, a 1 mL de extrato enzimático. A mistura foi incubada a 30 °C por 30 minutos e transferida então para um banho de gelo. A esta foi adicionada 0,5 mL de ácido perclórico a 1,4%, e então a mistura foi deixada em repouso por 10 minutos. Foi realizada a leitura em 395 nm. Como branco foi usado 2 mL de tampão fosfato de potássio (0,05 M, pH 6,0), e 0,5 mL de catecol 0,1M. Os dados foram analisados

com o método estatístico de Tukey ($p < 0,05$).

4.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos e frações foi avaliada pela técnica de microdiluição em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) (AYRES *et al.*, 2008; CLSI, 2009).

4.9.1 Microorganismos

Foram testados os microorganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC[®] 25923, *Escherichia coli* ATCC[®] 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC[®] 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC[®] 29212

Para reativação, as cepas conservadas em condições de congelamento foram subcultivadas em ágar TSA (Difco), à temperatura de 37 °C por 20-24 horas.

4.9.2 Preparo dos Inóculos

Para o preparo dos inóculos das linhagens referência, foram realizadas suspensões em tubo contendo salina estéril (cloreto de sódio a 0,85%) na concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL, equivalente ao tubo 0,5 de McFarland.

4.9.3 Microdiluição em Caldo Para a Determinação da CIM.

O ensaio foi realizado em microplacas estéreis de 96 cavidades com fundo em forma de “U”, contendo 12 colunas e 8 linhas, identificadas de A a H. O extratos preparados na concentração de 100 mg/mL e as frações 20mg/mL, diluídos em etanol a 10% e dimetilsulfóxido a 2%, foram filtrados utilizando membrana milipore 0,22µm. Após a filtração foi preparada uma solução na concentração de 10000µg/mL e 400µg/mL de cada extrato e fração a ser testada. Em seguida foram transferidos

100 µL de caldo Mueller-Hinton (Merck) na linha A das colunas 2 a 9. Na coluna 2 foi inoculado 100 µL de extrato ou fração e transferidos após homogeneização 100 µL para o orifício da coluna 3, repetindo-se o procedimento até a coluna 9, e desprezando-se após homogeneização o excesso da diluição, obtendo-se assim concentrações decrescentes dos extratos (5000µg/mL - coluna 2; 2500µg/mL - coluna 3; 1250µg/mL - coluna 4; 625µg/mL - coluna 5; 312µg/mL - coluna 6; 156µg/mL - coluna 7; 78µg/mL - coluna 8; 39µg/mL - coluna 9) e frações (200µg/mL - coluna 2; 100µg/mL - coluna 3; 50µg/mL - coluna 4; 25µg/mL - coluna 5; 1µg/mL - coluna 6; 6µg/mL - coluna 7; 3µg/mL - coluna 8; 1µg/mL - coluna 9).

Os inóculos bacterianos preparados na concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL, equivalente ao tubo 0,5 de "McFarland" foram inoculados em um volume de 5 µL nos orifícios das colunas de 2 a 9, permanecendo uma concentração final de 104 por poço.

Os orifícios das colunas 1, 10, 11 e 12 foram destinados para os testes de controle do experimento. A coluna 1 foi reservada para o controle negativo ou de esterilidade, utilizando 100 µL de caldo Mueller-Hinton e 100 µL de extrato ou fração na concentração de 10000µg/mL e 400µg/mL respectivamente. O orifício da coluna 10 e 11 para o controle negativo da atividade inibitória do diluente etanol e dimetilsulfóxido, utilizado na preparação dos extratos. Na coluna 10, 100 µL de solução de etanol a 10% foram adicionados com 100 µL de caldo Mueller-Hinton e 5 µL do inóculo bacteriano e na coluna 11, 100 µL de solução de dimetilsulfóxido a 2% foram adicionados com 100 µL de caldo Mueller-Hinton e 5 µL do inóculo bacteriano. O orifício da coluna 12 para controle positivo ou de viabilidade, receberam 100 µL de caldo Mueller-Hinton e 5 µL do inóculo bacteriano.

As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C por 16 a 20 horas. Decorrido este intervalo de tempo foram acrescidos 20 µL de solução aquosa de cloreto de trifetil tetrazolium (Merck) a 0,5% e as microplacas foram reincubadas por três horas a 35 °C. Após esta incubação foi realizada a leitura dos resultados.

A presença de coloração vermelha nos orifícios foi interpretada como prova negativa de efeito inibitório do extrato ou fração vegetal, enquanto que a ausência da coloração vermelha foi considerada prova positiva da ação inibitória do extrato ou fração vegetal. Cada teste foi realizado em duplicata.

4.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA

4.10.1 Ensaio da Atividade Hemolítica em Tubos

A atividade hemolítica foi realizada segundo a OMS (1998) com adaptações. As amostras foram diluídas a 1000µg/mL em tampão fosfato (0,1M) pH 7,4, utilizando Tween 0,2% e etanol10,0% como auxiliar na diluição.

Foram preparados quatro tubos nas concentrações de 1000, 500, 200 e 100 µg/mL dos extratos e frações (1 mL por tubo), sendo que foi usado como diluente para a amostra tampão fosfato (0,1M) pH 7,4. Como controle negativo foi usado a solução tampão (0,1M) pH 7,4, contendo, se for o caso, o auxiliar da diluição. E como controle positivo foi utilizada água. A esses tubos foi acrescido 1 mL de uma suspensão de sangue de carneiro (Newprov) a 2% em tampão fosfato (0,1M) pH 7,4.

Os tubos foram agitados cuidadosamente de modo a evitar a formação de espuma. E foram deixados em repouso por 3 horas, sendo que após decorrido os primeiros 30 minutos os tubos foram agitados novamente. Os tubos foram então centrifugados por 5 minutos a 3000 rpm. Foi considerado resultado positivo os tubos em que ocorreu hemólise total, ou seja, onde a solução se apresentar límpida, vermelha e sem depósito de eritrócitos.

4.10.2 Ensaio da Atividade Hemolítica em Ágar Sangue

O teste foi realizado segundo Eging (2008). Os extratos e frações foram diluídos em metanol. Foi aplicado em papel whatman número 1 1000µg das amostras a serem testadas. Como controle positivo foi usado uma solução de saponina ou solução 2% (p/v) de Triton, aplicando-se 1000µg. Como controle negativo foi usado uma solução salina 0,9% (20 µL). Também foi feito o controle do solvente aplicando-se sobre papel o mesmo volume utilizado para aplicar a amostra. Os papeis foram então levados a secura em estufa a 50 °C e aplicados sobre placa de Ágar sangue. As placas foram então incubadas por 24 horas em estufa a 35 °C.

Foi então medido o halo formado e comparado aos controles.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA

A análise fitoquímica preliminar nos informa quais são os principais grupos de metabólitos que se encontram presentes na amostra. Esse conhecimento é utilizado como base para o isolamento de substâncias. Os resultados desta análise são apresentados nas tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1 - Análise Sistemática das frações obtidas do Extrato Hidroetanólico das Folhas

Análise		Fração Hexano	Fração Clorofórmio	Fração Acetato de Etila	Fração Hidroalcoólica remanescente
Alcaloides	Meyer	-	-	-	-
	Dragendorff	-	++	-	-
	Bouchardat	-	-	-	-
	Bertrand	-	-	-	-
Flavonoides	Leucoantocianidinas	-	-	-	-
	Heterosídeos flavônicos	-	+	++	+
	Flavonóis	++	++	++	++
	Di-hidroflavonóis	-	-	-	-
Cumarina	Tubo	-	++	++	++
	Papel	-	++	++	++
Antraquinonas		-	+	-	-
Esteroides e triterpenos	Reação Liberman-Bouchard	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo
	Reação Keller-Kelliani	Verde	-	-	-

NOTA: += fraco positivo, ++= positivo, +++= altamente positivo, - = negativo

Foram encontrados flavonoides (heterosídeos flavônicos nas folhas, e flavonóis nas folhas e cascas), antraquinona, cumarinas, alcaloides, e esteroides e triterpenos no extrato hidroetanólico das folhas e cascas. Sendo que destes apenas as antraquinonas ainda não haviam sido relatadas no gênero.

Tabela 2 - Análise Sistemática do Extrato Hidroetanólico das Cascas

Análise		Fração Hexano	Fração Clorofórmio	Fração Acetato de Etila	Fração Hidroalcoólica remanescente
Alcaloides	Meyer	++	-	-	+
	Dragendorff	++	++	-	+
	Bouchardat	++	++	-	+
	Bertrand	++	++	-	-
Flavonoides	Leucoantocianidinas	-	-	-	-
	Heterosídeos flavônicos	-	-	-	-
	Flavonóis	++	++	++	++
	Di-hidroflavonóis	-	-	-	++
Cumarina	Tubo	-	++	++	++
	Papel	-	++	++	++
Antraquinonas		-	+	-	-
Esteroides e triterpenos	Reação Liberman-Bouchard	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo
	Reação Keller-Kelliani	-	-	-	Verde+

NOTA: += fraco positivo, ++= positivo, +++= altamente positivo, - = negativo

Tabela 3 - Análise Sistemática do Extrato Aquoso das Folhas e Cascas

Análise		Extrato Aquoso das Folhas	Extrato Aquoso das Cascas
Heterosídeos	pH 4	-	-
	pH 7	-	-
Antociânicos	pH 10	-	-
	Antociânidina	-	-
Heterosídeos Saponínicos		+++	+++
Heterosídeos Cianogênicos		-	-
Aminogrupos		++	++
Taninos	Cloreto férrico	++	++
	Sulfato amoniacal	++	++
	Cloridrato de emetina	++	++
	Dicromato de potássio	-	-
	Hidrolisáveis	++	-
	Condensados	++	++
Ácidos Fixos		++	-
Ácidos Voláteis		-	-

NOTA: += fraco positivo, ++= positivo, +++= altamente positivo, - = negativo

Foram encontrados saponinas, aminogrupos e taninos condensados nas

cascas e folhas. E taninos hidrolisáveis e ácidos fixos nas folhas. Destes apenas as saponinas já haviam sido relatadas na literatura para o gênero.

5.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO E DAS FRAÇÕES

A partir das cascas foram obtidos o extrato cetônico das cascas (Ex C – C), o extrato hidrometanólico da casca (Ex Alc – C), e suas frações hexânica (F Hex – C), clorofórmica (F Clo – C), acetato de etila (F AcEt – C) e hidroalcoólica remanescente (F HalcR – C).

A partir das folhas foram obtidos o extrato hidrometanólico das folhas (Ex Alc – F), e suas frações hexânica (F Hex – F), clorofórmica (F Clo – F), acetato de etila (F AcEt – F) e hidroalcoólica remanescente (F HalcR – F).

O fluxograma da obtenção dos extratos e frações é mostrado na figura 9. A obtenção do Ex Alc – C, da F Hex – C e do Ex Alc – F é mostrada na figura 10.

O rendimento de cada um dos extratos considerando o teor de umidade da palnta seca é mostrado na tabela 4. E o rendimento das frações frente aos extratos da qual tem origem é mostrado na tabela 5.

Tabela 4 - Rendimento dos extratos

	Massa seca obtida (g)	Rendimento (%)
Ex C – C	26,02	2,68
Ex Alc – C	94,38	4,35
Ex Alc – F	105,86	11,98

Tabela 5 - Rendimento das frações

	Massa seca obtida (g)	Rendimento (%)
F Hex – C	26,95	28,72
F Clo – C	11,54	12,30
F AcEt – C	0,47	0,50
F HalcR – C	54,87	58,48
F Hex – F	26,02	26,19
F Clo – F	10,41	10,48
F AcEt – F	7,59	7,63
F HalcR – F	55,34	55,70

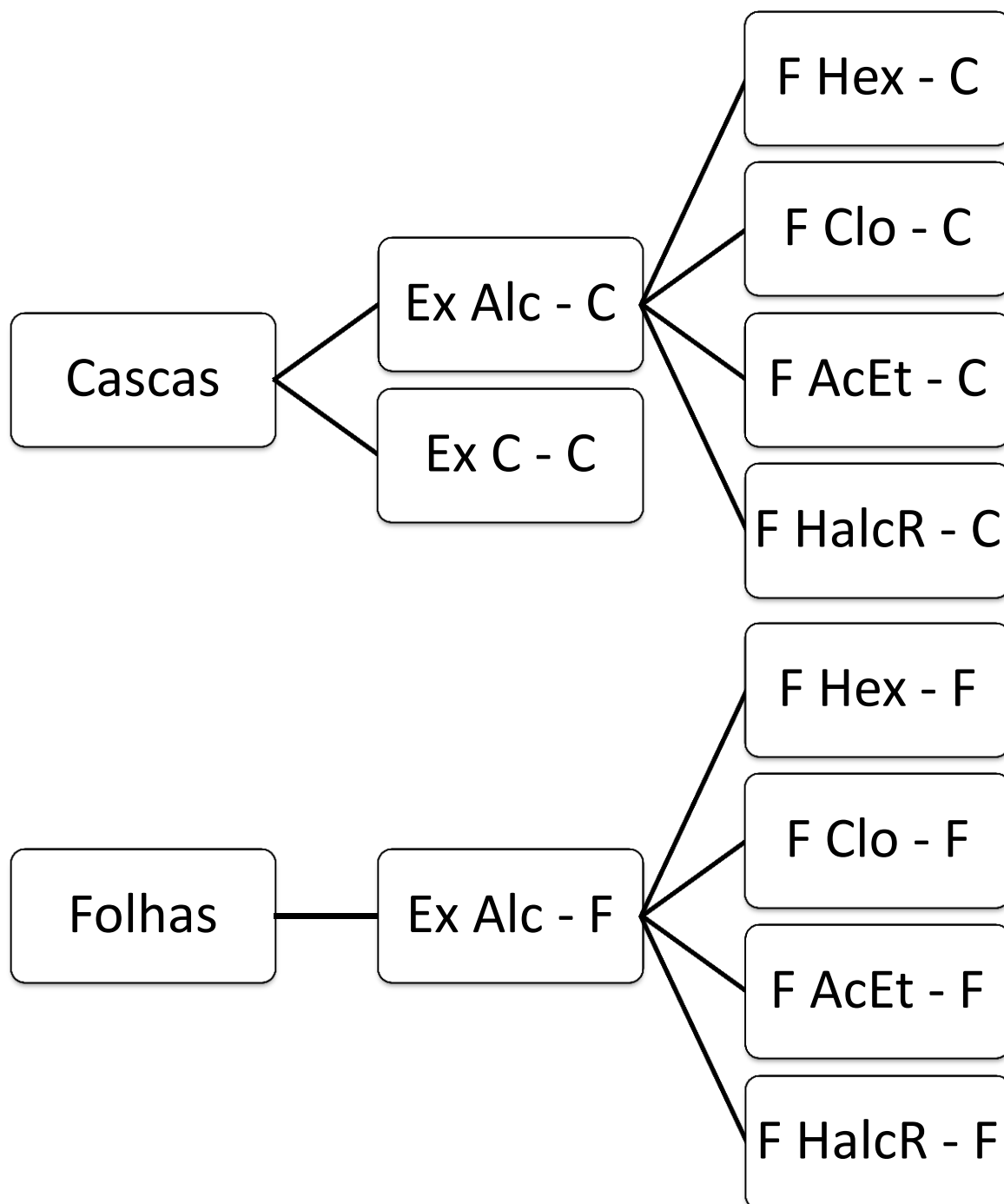


Figura 9 - Fluxograma da obtenção dos extratos e frações



Figura 10 - Obtenção dos extratos e frações em extrator de soxhlet

FONTE: A autora (2010)

Nota: [a] Extração das cascas para a obtenção do Ex Alc – C. [b] Extração das folhas para a obtenção do Ex Alc – F. [c] Fracionamento do Ex Alc – C para a obtenção da F Hex – C.

5.3 ANÁLISE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES POR CLAE

Como é possível visualizar através dos cromatogramas (Figuras 11 a 19) com exceção das frações clorofórmicas, todas as outras frações e extratos analisados possuem o mesmo composto principal, o qual foi posteriormente identificado como verbascosídeo. Devido a sua presença de forma majoritária, esse composto foi doseado nos estratos e frações, podendo ser utilizado como marcador fitoquímico para a espécie *D. vestita*.

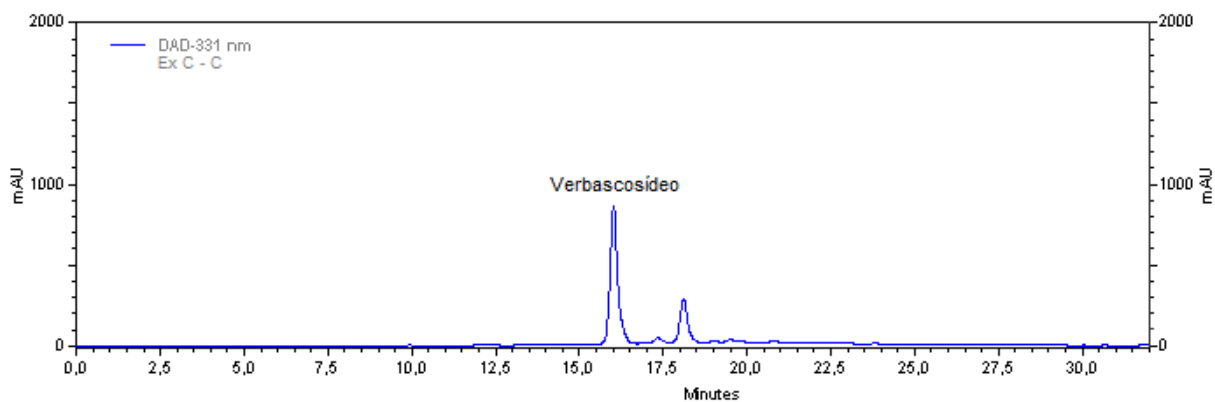


Figura 11 - Cromatograma do Ex C – C

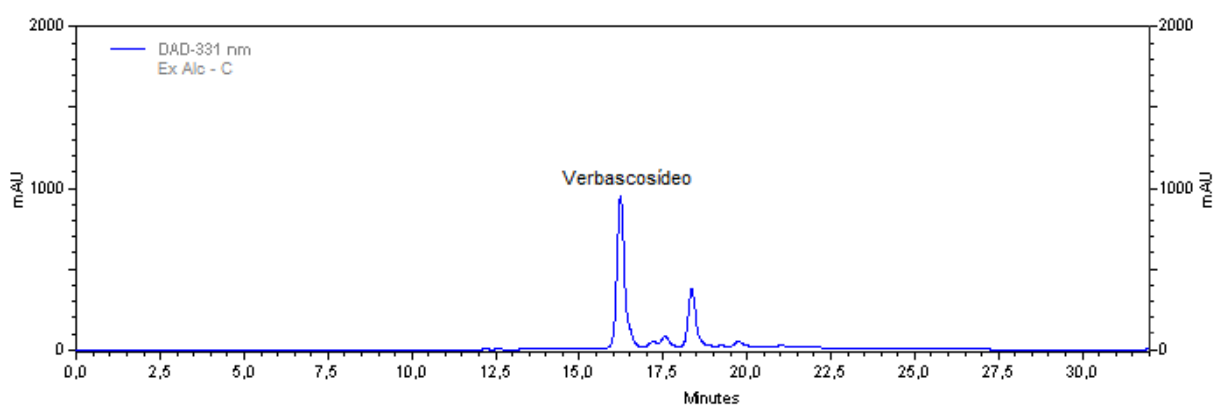


Figura 12 - Cromatograma do Ex Alc – C

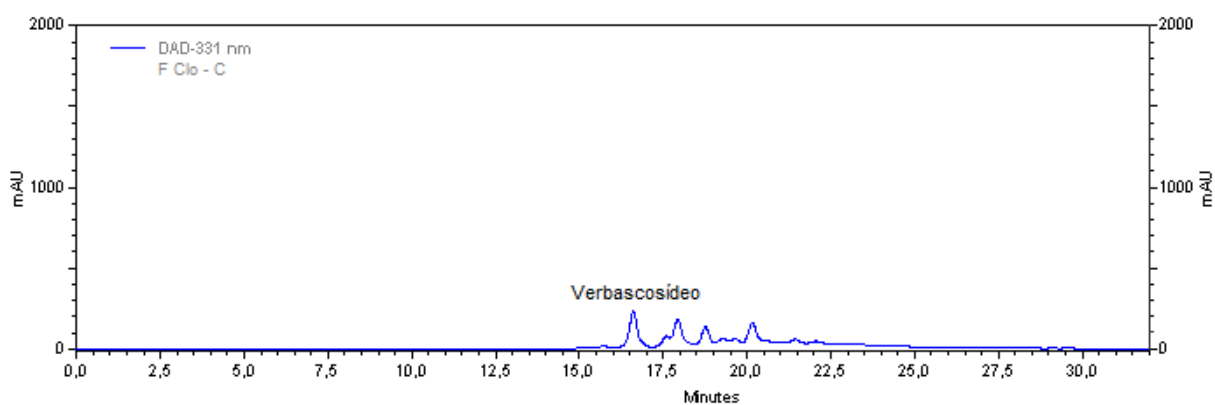


Figura 13 - Cromatograma da F Clo – C

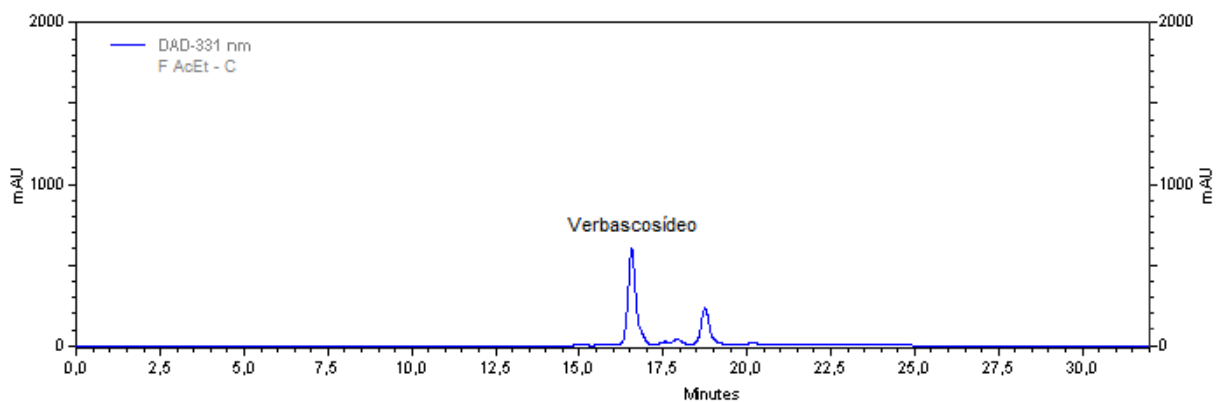


Figura 14 - Cromatograma da F AcEt – C

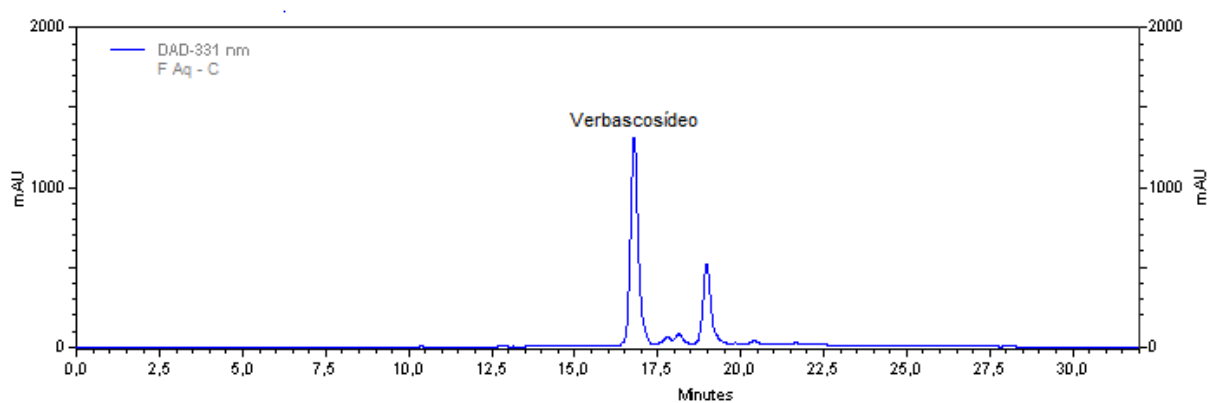


Figura 15 - Cromatograma da F HalcR – C

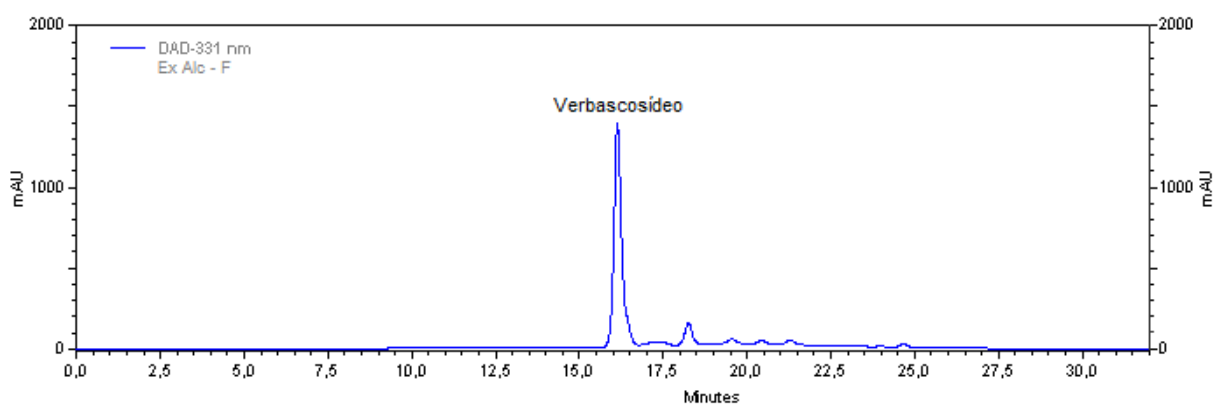


Figura 16 - Cromatograma do Ex Alc – F

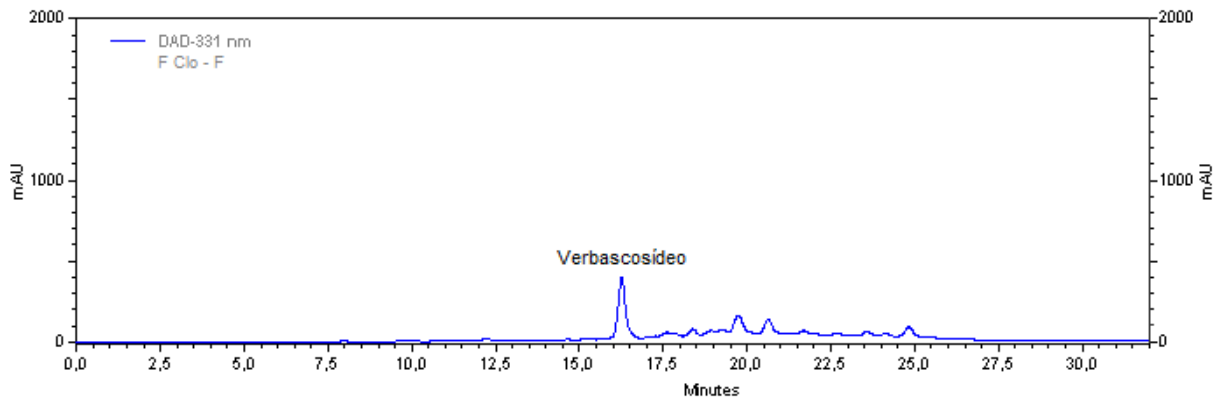


Figura 17 - Cromatograma da F Clo – F

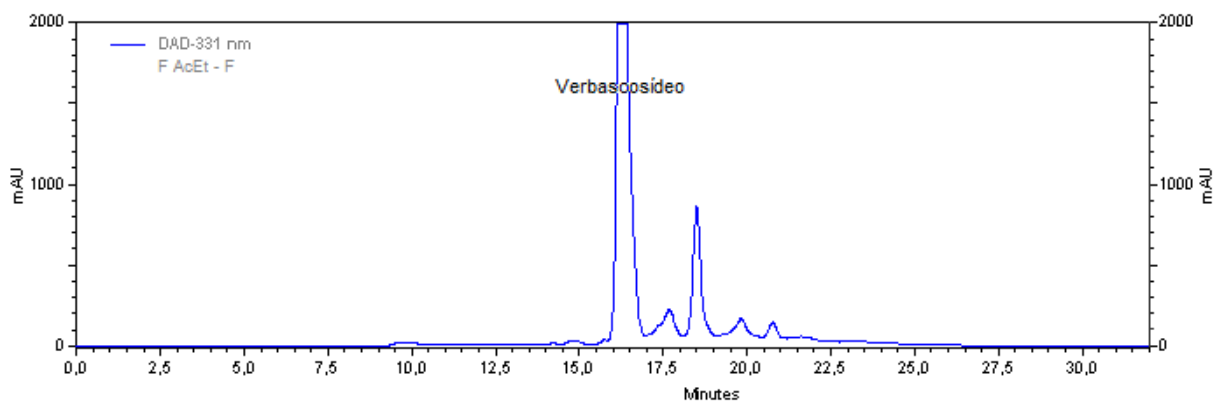


Figura 18 - Cromatograma da F AcEt – F

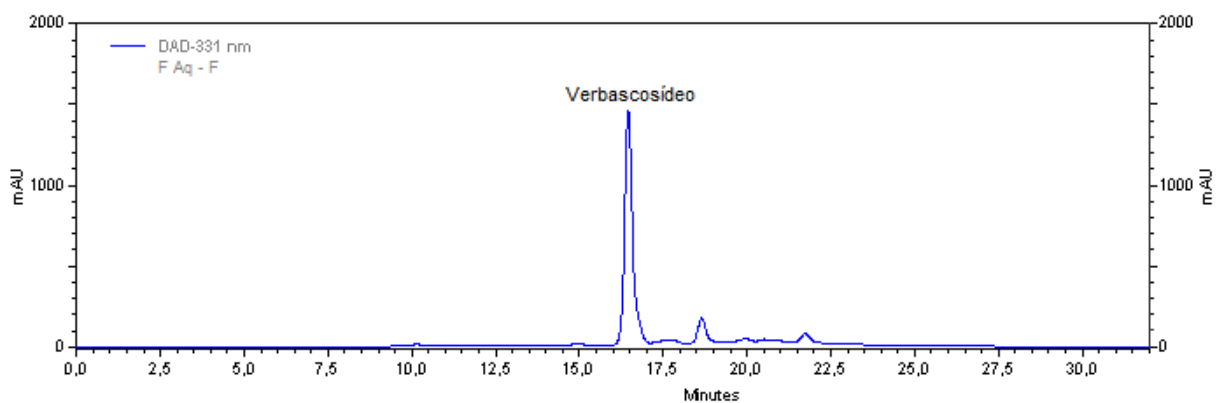


Figura 19 - Cromatograma da F HalcR – F

Através do doseamento (Gráfico 1 e Tabela 6) foi possível perceber que esse composto está presente em maior concentração na F AcEt – F (91%), sendo que o extrato da folha possui 23,8% dessa substância. Esse composto apesar de já ter sido relatado na literatura para o gênero, não havia sido descrito como um dos principais compostos presentes nas plantas do gênero *Duranta* (SHAHAT *et al.*,

2005; AHMED *et al.*, 2009).

Gráfico 1 - Curava de calibração do verbascosídeo

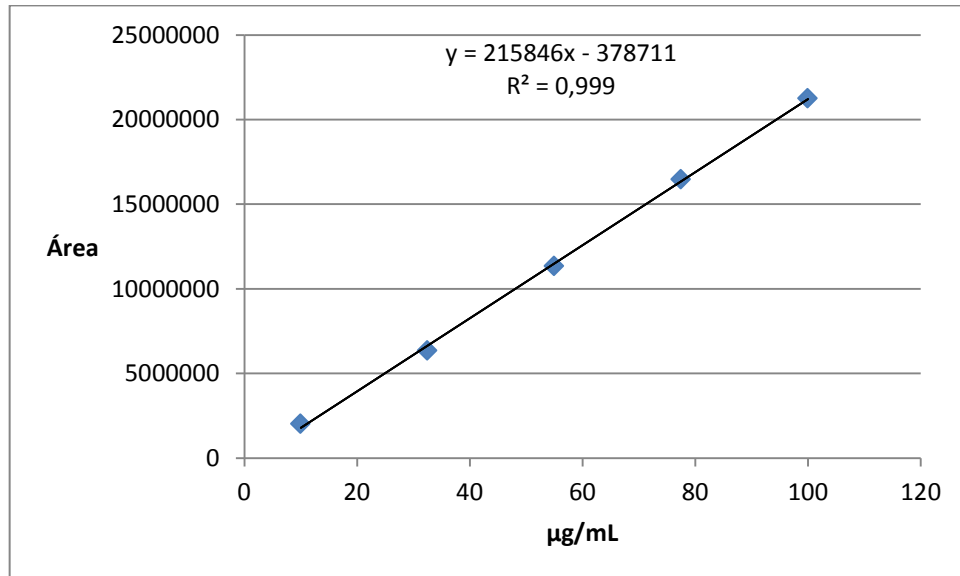


Tabela 6 - Teor de verbascosídeo nos extratos e frações

	% de verbascosídeo
Ex Alc - F	23,77
F Clo - F	6,04
F AcEt - F	91,20
F HalcR - F	25,49
Ex C - C	20,01
Ex Alc - C	15,10
F Clo - C	3,06
F AcEt - C	17,27
F HalcR - C	21,87

5.4 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS

As frações obtidas na primeira coluna foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD), sendo então reunidas as frações 49 - 90, as quais apresentavam-se semelhantes. Após a passagem destas frações em CLAE preparativo (Figura 20) foi isolado um composto, que foi inicialmente denominado de

Iso1, sendo posteriormente identificado como verbascosídeo (Figura 21).

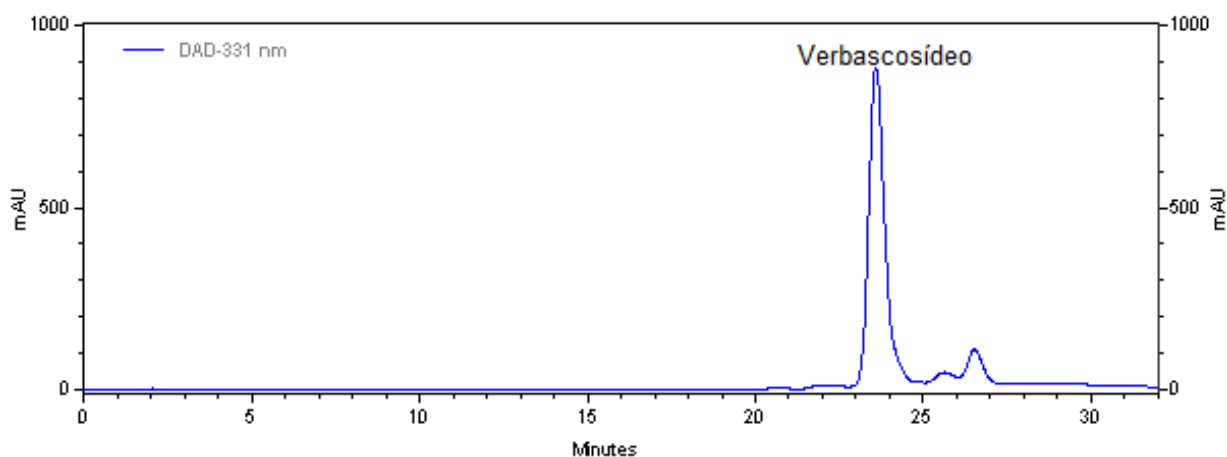


Figura 20 - Cromatograma do CLAE-Preparativo das frações 49 - 90

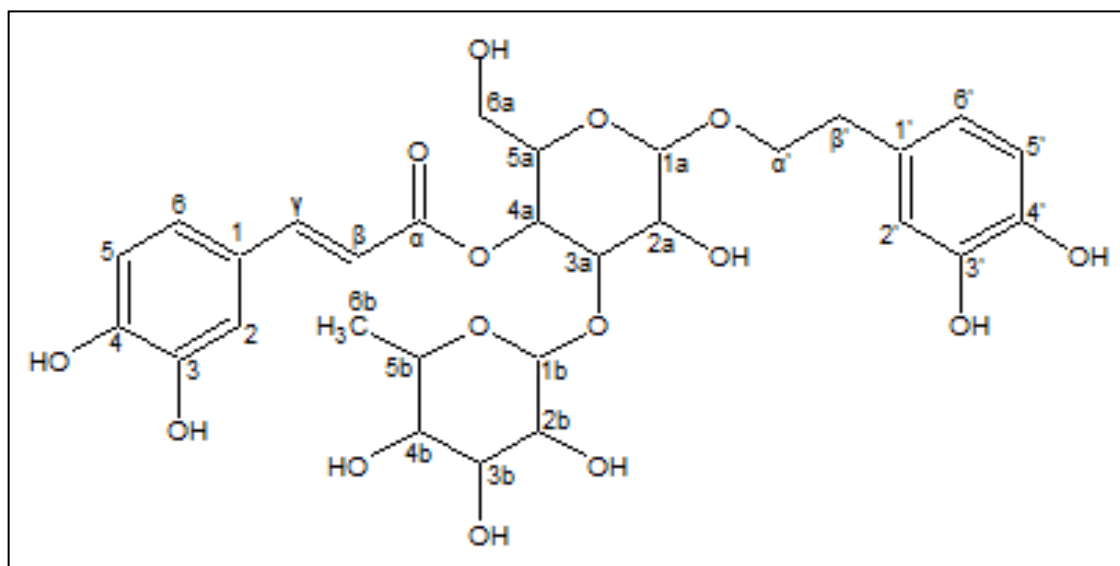


Figura 21 - Estrutura química do Verbascosídeo

No espectro de absorção de ultravioleta (UV) (Figura 22) se observou as bandas de absorção. O resultado pode ser comparado com o dado da literatura de Pértile (2007) (Figura 23).

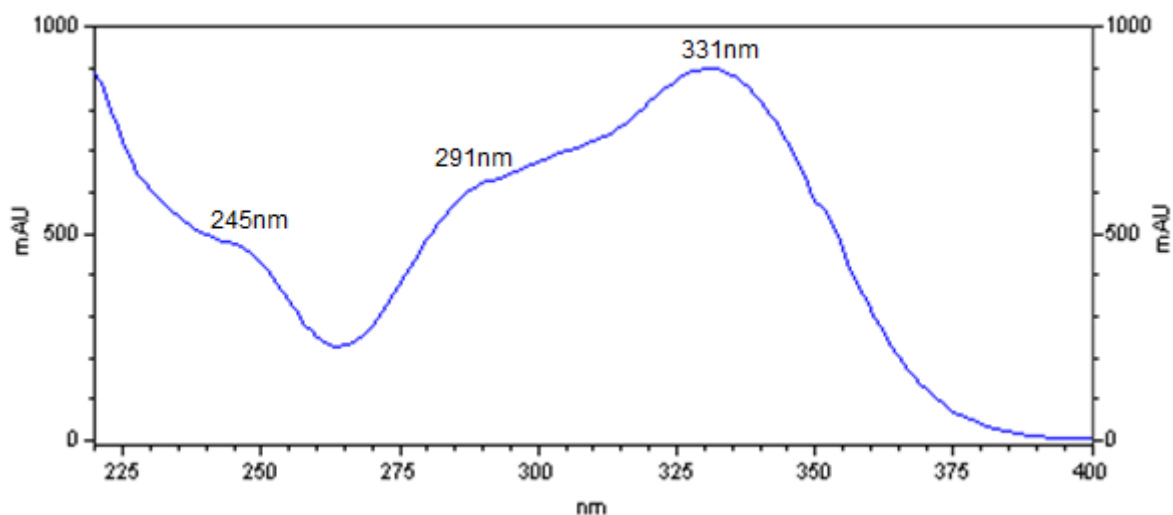


Figura 22 - Espectro de absorção de UV do Iso1*

NOTA: *Em solução de MeOH/H₂O.

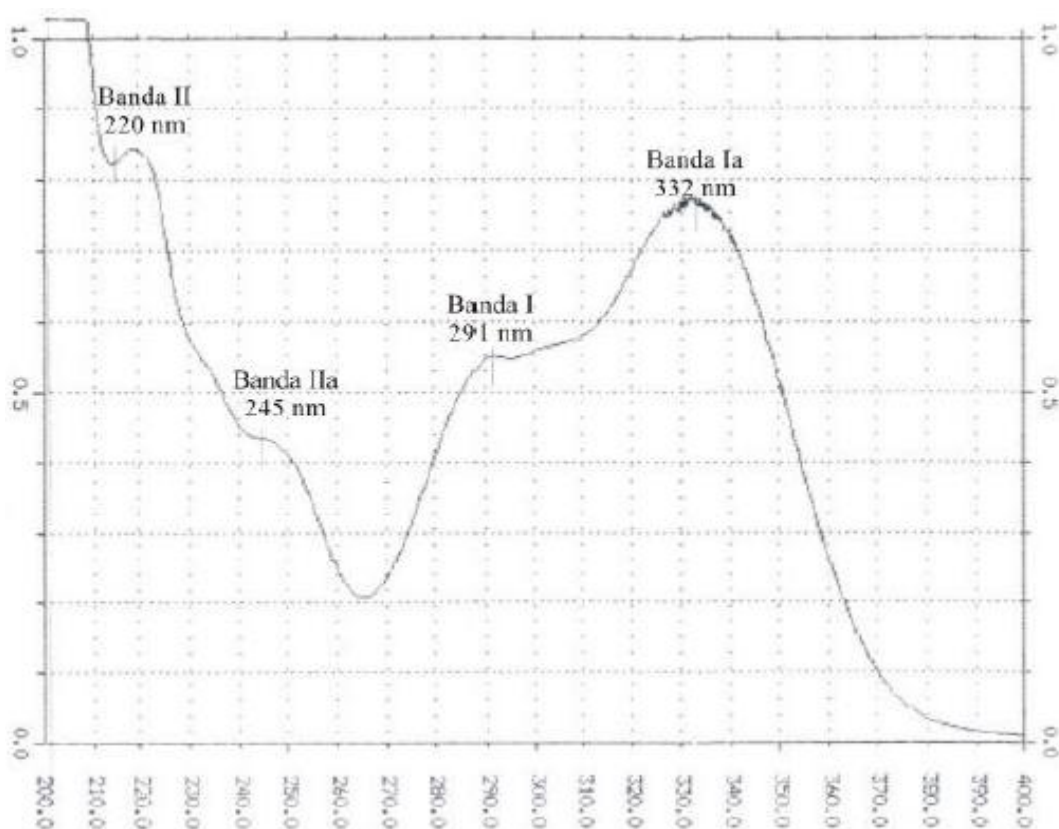


Figura 23 - Espectro de absorção de UV do Verbascosídeo* (Pétille, 2007)

NOTA: *Em solução de MeOH.

O espectro de RMN ¹³C para Iso1, usando como solvente CD₃OD à 200 MHz, apresentou sinais na região de 18 a 170ppm (Figura 24). Os resultados podem ser observados na tabela 7, comparados com os dados da literatura de Gering e Wichtl (1987).

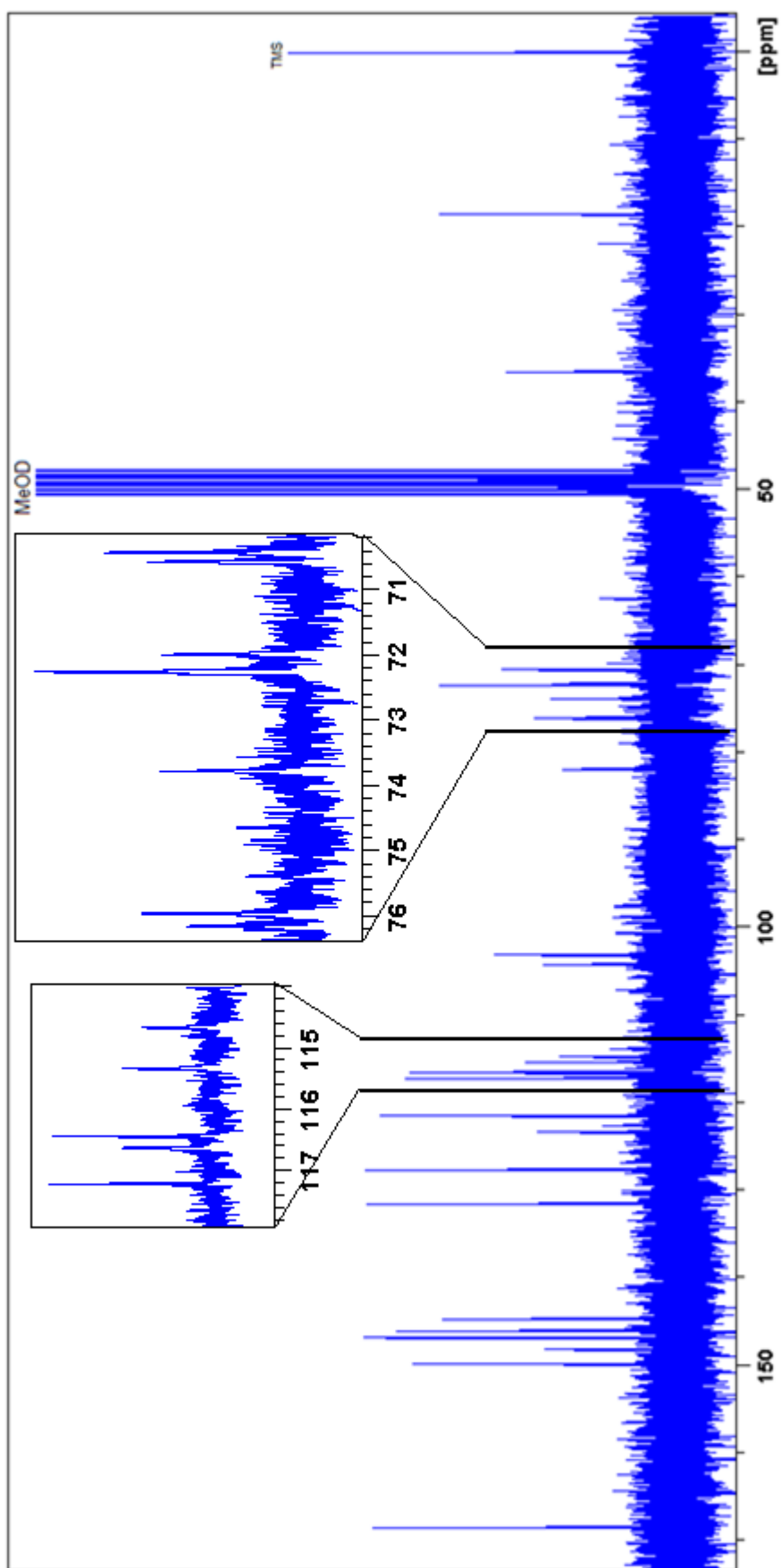


Figura 24 - Espectro de RMN ^{13}C do Iso1 (200 MHz; CD_3OD)

Tabela 7 - Dados de RMN ^{13}C da literatura e dados obtidos

Carbono	RMN ^{13}C (GERING e WICHTL, 1987) CD_3OD	RMN ^{13}C CD_3OD
1	127,6	127,7
2	116,3	116,4
3	146,8	146,8
4	149,8	149,8
5	114,7	114,7
6	123,2	123,3
α	168,3	168,5
β	115,2	115,3
γ	148,0	148,1
1'	131,4	131,5
2'	116,5	116,6
3'	144,6	144,6
4'	146,1	146,1
5'	117,1	117,2
6'	121,3	121,4
α'	72,2	72,3
β'	36,5	36,5
1 ^a	104,2	104,1
2 ^a	76,2	76,1
3 ^a	81,6	81,8
4 ^a	70,6	70,6
5 ^a	76,0	76,0
6 ^a	62,3	62,3
1b	103,0	103,1
2b	72,3	72,3
3b	72,0	72,0
4b	73,8	73,8
5b	70,4	70,5
6b	18,4	18,5

NOTA: d= duplete; dd= duplo duplete; td= triplo duplete; t= tripleto; dq= duplo quarteto; m= multiplete; br= banda alargada.

No espectro de RMN ^1H (Figura 25) observou-se todos os deslocamentos na região de 1 a 8ppm. Os duplete com deslocamento em 5,17 e 4,40ppm indicam a presença de açúcares, Bem como a grande quantidade de sinais na região de 3 a 4,5ppm região. Os sinais presentes ente 6 a 8ppm indicam a presença de hidrogênios aromáticos. Os resultados podem ser observados na tabela 8, comparados com os dados da literatura de Gering e Wichtl (1987).

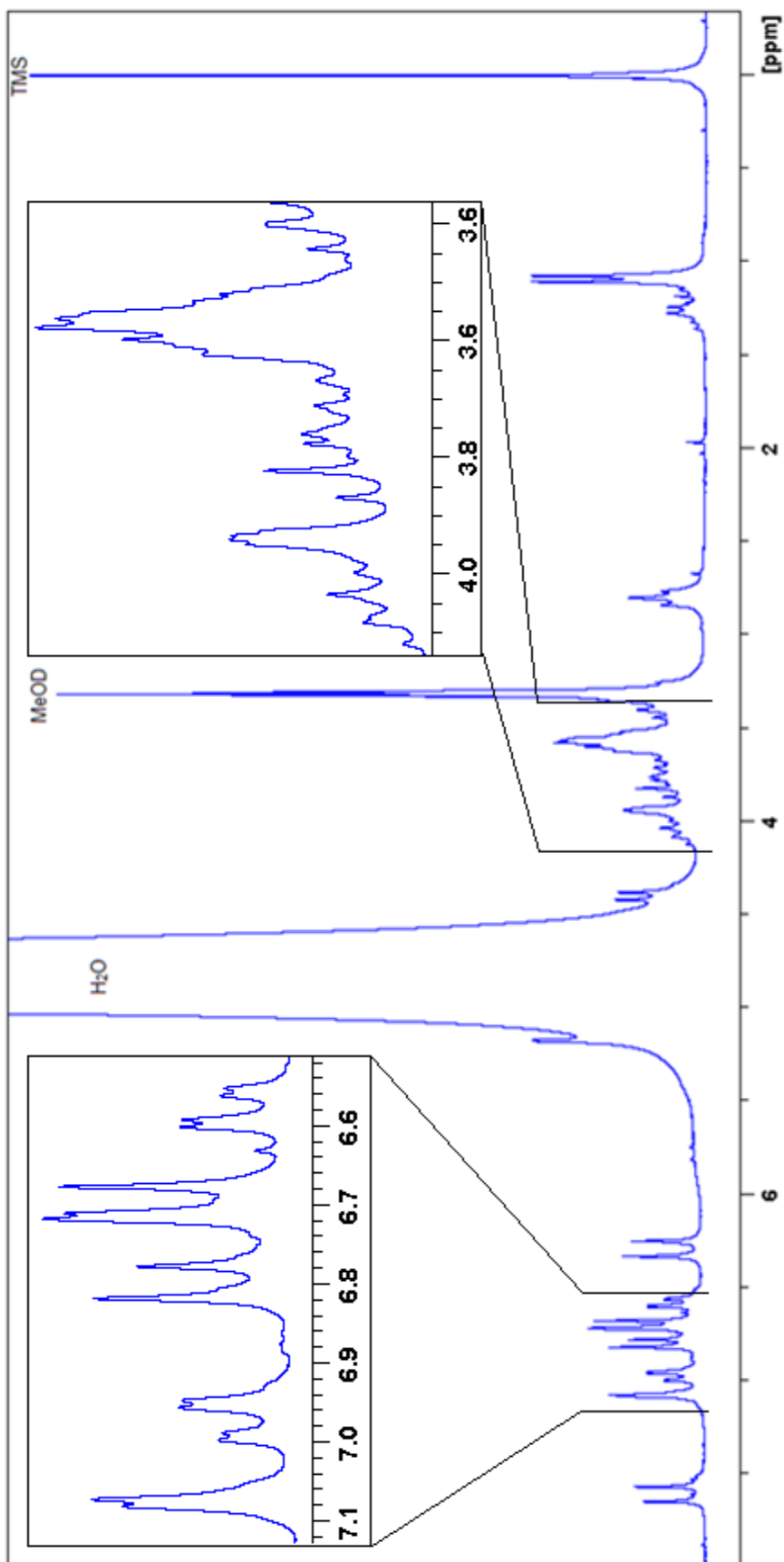


Figura 25 - Espectro de RMN ^1H do Iso1 (200 MHz; CD_3OD)

Tabela 8 - Dados de RMN ¹H da literatura e dados obtidos

Posição	RMN ¹ H (GERING e WICHTL, 1987) CD ₃ OD	RMN ¹ H MeOD
2	7,04 (d, 2)	7,08 (d, 1,8)
5	6,77 (d, 8,1)	6,80 (d, 8,2)
6	6,95 (dd, 2, 8,1)	6,97 (dd, 8,2; 1,8)
β	6,26 (d 15,9)	6,28 (d, 15,9)
γ	7,58 (d 15,9)	7,60 (d, 15,9)
2'	6,69 (d, 2)	6,72 (d, 1,9)
5'	6,66 (d, 8)	6,70 (d, 8,0)
6'	6,5 (dd, 2; 8)	6,58 (dd, 8,0; 1,9)
α'	-	-
	4,03 (m)	4,03 (td,7,3; 2,1)
β'	2,78 (br t)	2,80 (t, 7,3)
1 ^a	4,37 (d, 7,9)	4,40 (d, 7,95)
2 ^a	3,38 (dd, 7,9; 9,2)	3,40 (dd, 7,95; 9,0)
3 ^a	-	-
4 ^a	-	-
5 ^a	-	-
6 ^a	-	-
	-	-
1b	5,18 (d, 1,6)	5,17 (d, 1,6)
2b	3,90 (dd, 1,6; 3,2)	3,94 (dd, 3,0; 1,6)
3b	3,57 (dd, 3,2; 9,4)	3,58 (dd, 9,1; 3,0)
4b	3,80 (t, 9,2)	3,82 (t, 9,1)
5b	3,72 (m)	3,71 (dq, 9,1; 6,1)
6b	1,08 (d, 6,2)	1,09 (d, 6,1)

NOTA: br= Banda alargada; d= Dubleto; dd= Duplo dubleto; dq= Duplo quarteto; m= Multipleteo; t= Tripleto; td= Triplo dubleto.

Analisando todos esses dados, foi possível concluir que a substância isolada chamada inicialmente de Iso1 se trata do verbascosídeo.

5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

5.5.1 Ensaio da Redução do Complexo Fosfomolibdênio

A atividade antioxidante dos extratos e frações foi calculada em relação à vitamina C, atividade considerada 100%, e comparadas com a rutina. Os resultados encontrados são mostrados na tabela 9.

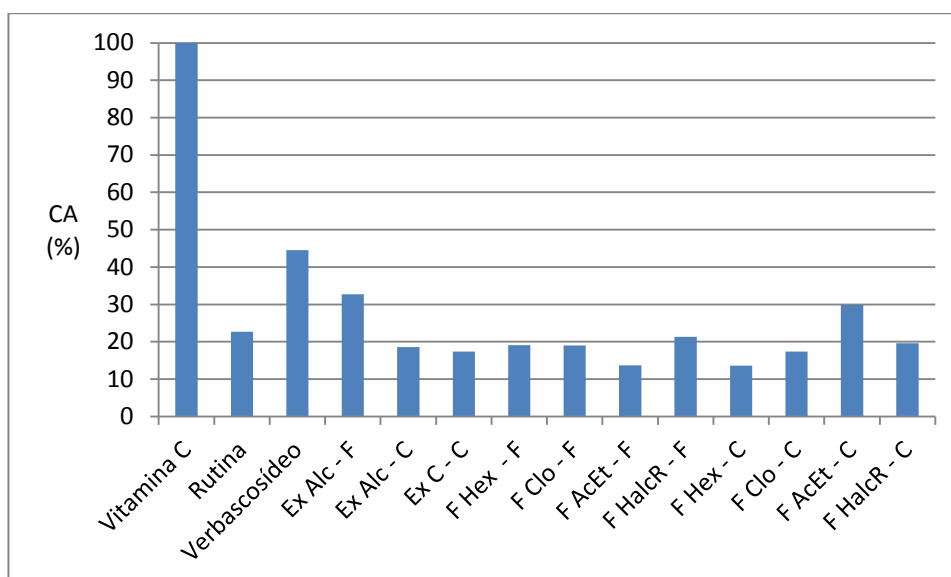
Tabela 9 - Atividade Antioxidante pela Redução do Complexo do Fosfomolibdênio

	CA (%) \pm dp	CV (%)	Tukey*
Ex C – C	17,37 \pm 0,71	4,10	b
Ex Alc – C	18,56 \pm 0,68	3,64	b c
Ex Alc – F	32,75 \pm 0,96	2,93	e
F Hex – C	13,64 \pm 0,60	4,41	a
F Clo – C	17,40 \pm 0,76	4,36	b
F AcEt – C	29,92 \pm 0,68	2,26	e
F HalcR – C	19,57 \pm 0,40	2,04	b c d
F Hex – F	19,12 \pm 0,56	2,92	b c
F Clo – F	19,04 \pm 0,64	3,35	b c
F AcEt – F	13,69 \pm 0,12	0,89	a
F HalcR – F	21,32 \pm 1,00	4,69	c d
Verbascosídeo	44,54 \pm 0,65	1,45	f
Rutina	22,70 \pm 1,02	4,51	d
Vitamina C	100,00 \pm 3,56	3,56	g

NOTA: *Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Tukey.

De acordo com os dados obtidos é possível concluir que todos os extratos e frações testadas, apresentam atividade antioxidante por redução do complexo fosfomolibdênio. Considerando as atividades da rutina e vitamina C como referências, todas as amostras apresentaram atividade antioxidante por redução do complexo do fosfomolibdênio, inferior a vitamina C, sendo que a substância verbascosídeo apresenta 44,5% da atividade da vitamina C e as amostras que demonstraram maior atividade (Ex Alc – F e F AcEt – C), apresentaram uma atividade em torno de 31% da atividade da vitamina C. Quando comparados à rutina essas amostras (Ex Alc – F e F AcEt – C) e a substância verbascosídeo se mostraram mais ativas que este padrão, e as frações F HalcR – C e F HalcR – F, apresentaram atividade significativamente semelhante ao padrão rutina. Desta forma essas frações podem ser consideradas antioxidantes em potencial, uma vez que a rutina é um flavonoide de reconhecida ação antioxidante. Os resultados podem ser melhor visualizados na gráfico 2.

Gráfico 2 - Porcentagem de Inibição da Atividade Antioxidante pela Redução do Complexo do Fosfomolibdênio



A figura 26 apresenta a visualização da reação de complexação com o fosfomolibdênio.



Figura 26 - Reação de Complexação do Fosfomolibdênio

NOTA: [1] Vitamina C; [2] Rutina; [3] Ex Alc - C; [4] F Hex - C; [5] F Clo - C; [6] F AcEt - C; [7] F HalcR - C; [8] Ex C - C; [9] Ex Alc - F; [10] F Hex - F; [11] F Clo - F; [12] F AcEt - F; [13] F HalcR - F.

5.5.2 Potencial Antioxidante por Cromatografia de Camada Delgada

O teste qualitativo nos permite uma visualização de possível atividade antioxidante. Os resultados das cromatografias são mostrados na figura 27:

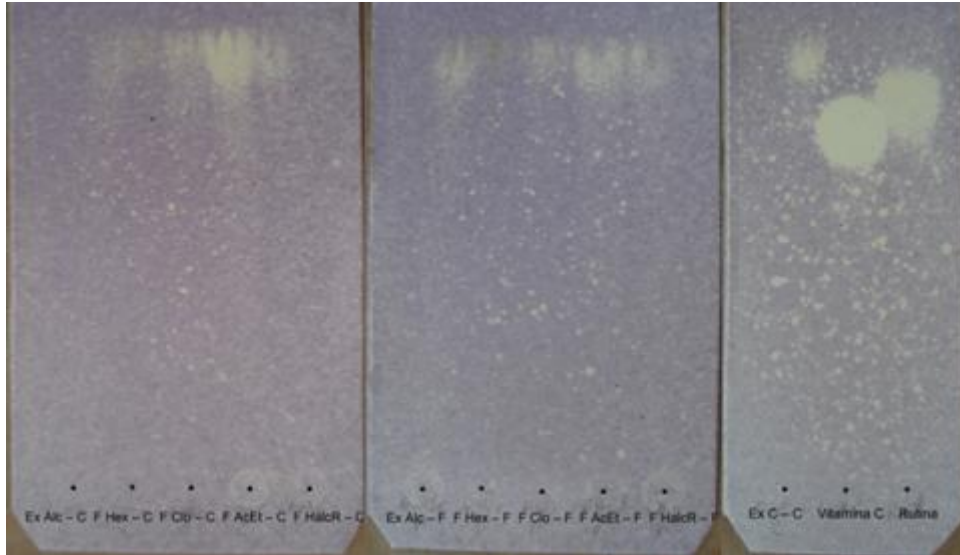


Figura 27 - Cromatografia em Camada Delgada com Revelador DPPH

NOTA: [1] Ex Alc – C; [2] F Hex – C; [3] F Clo – C; [4] F AcEt – C; [5] F HalcR – C; [6] Ex Alc – F; [7] F Hex – F; [8] F Clo – F; [9] F AcEt – F; [10] F HalcR – F; [11] Ex C – C; [12] Vitamina C; [13] Rutina.

Observando as fotos é possível visualizar que todos os extratos e frações reagiram com revelador DPPH, assim como que as frações F AcEt – C e F AcEt – F, foram as que apresentaram uma reação mais forte, sendo assim todas as amostras apresentam potencial antioxidante.

5.5.3 Avaliação da Atividade Antioxidante pela Redução do Radical DPPH

Os resultados para o teste quantitativo foram expressos em IC_{50} , ou seja, a concentração da amostra capaz de exercer 50% de atividade antioxidante. Para análise dos dados utilizou-se a regressão linear sendo assim possível calcular pela equação da reta o valor de IC_{50} . Os gráficos 3 a 15 apresentam as retas médias obtidas para cada teste, e os valores de IC_{50} são mostrados na tabela 10.

Gráfico 3 - Curva da Rutina pela Redução do DPPH

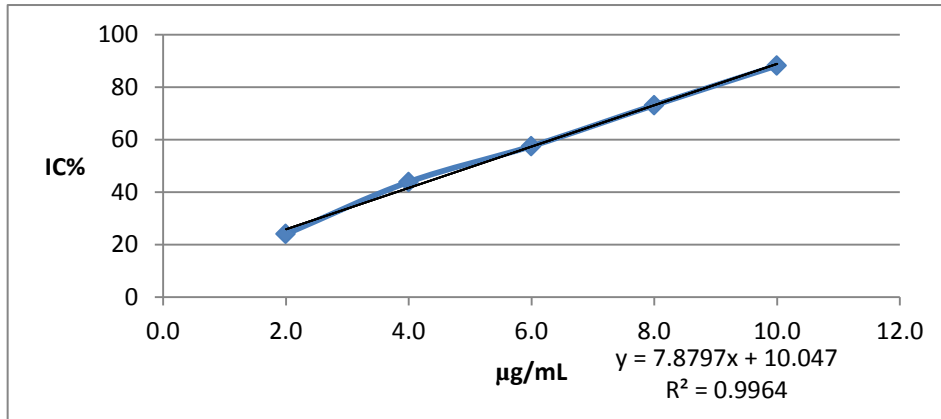


Gráfico 4 - Curva da Vitamina C pela Redução do DPPH

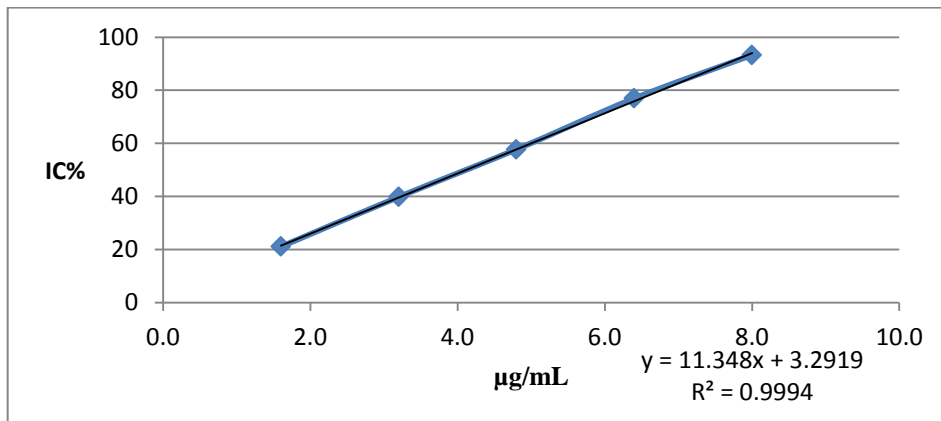


Gráfico 5 - Curva do Ex Alc – C pela Redução do DPPH

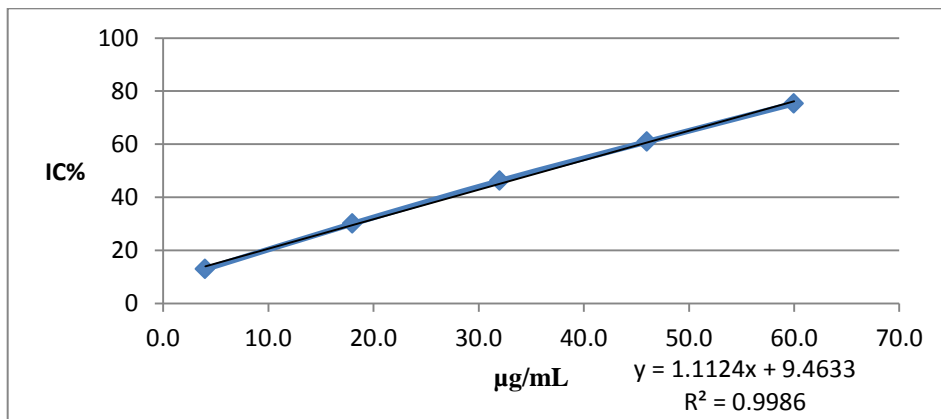


Gráfico 6 - Curva do Ex Alc – F pela Redução do DPPH

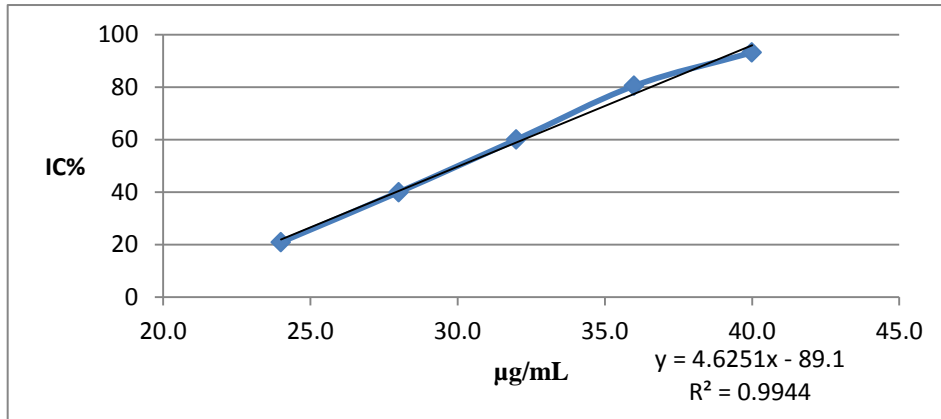


Gráfico 7 - Curva do Ex C – C pela Redução do DPPH

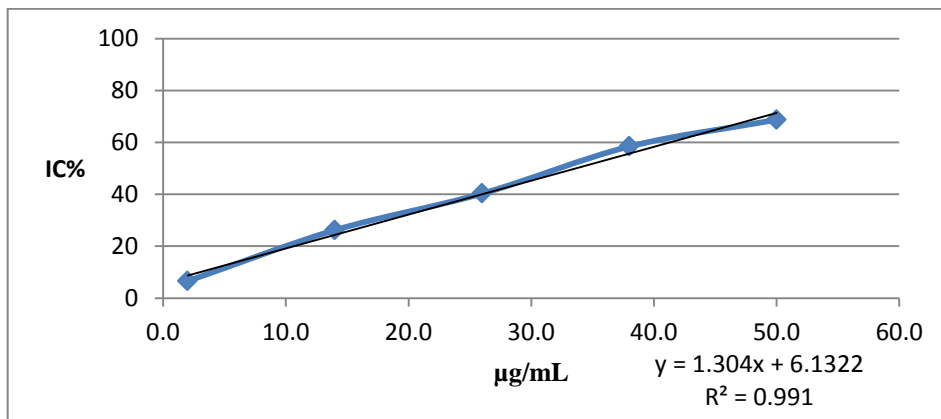


Gráfico 8 - Curva da F Hex – C pela Redução do DPPH

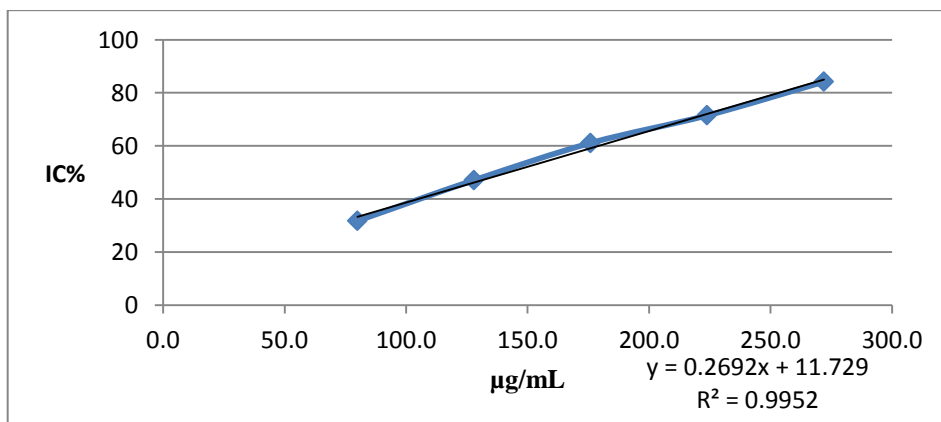


Gráfico 9 - Curva da F AcEt – C pela Redução do DPPH

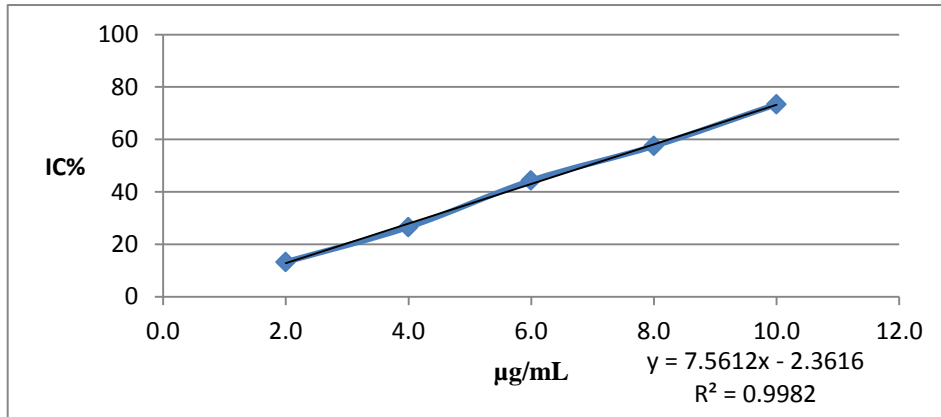


Gráfico 10 - Curva da F Clo – C pela Redução do DPPH

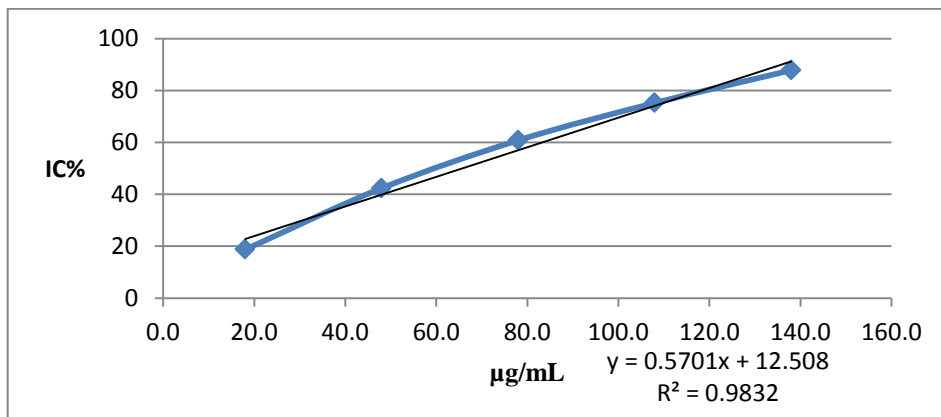


Gráfico 11 - Curva da F HalcR – C pela Redução do DPPH

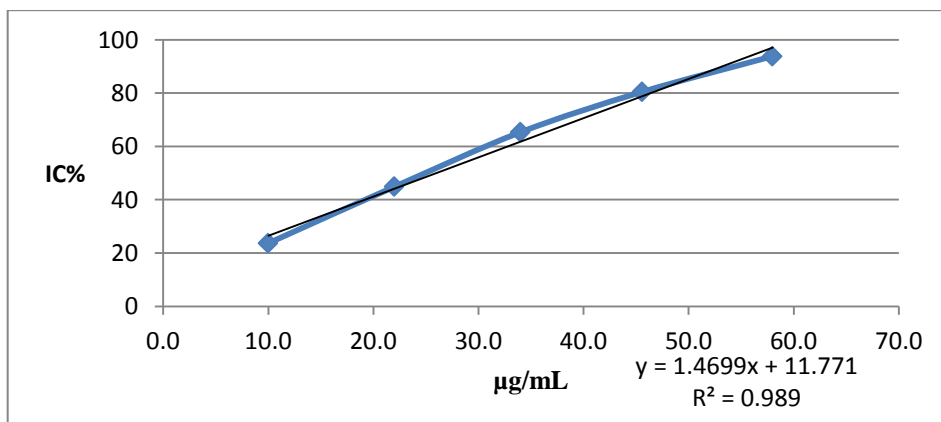


Gráfico 12 - Curva da F Hex – F pela Redução do DPPH

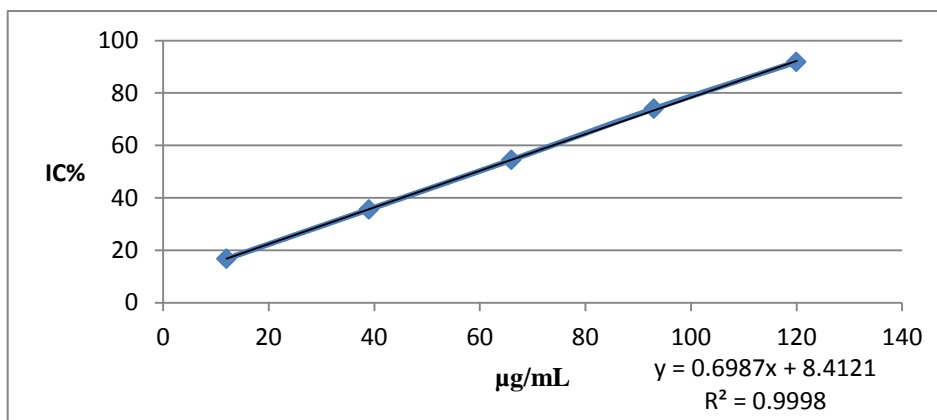


Gráfico 13 - Curva da F Clo – F pela Redução do DPPH

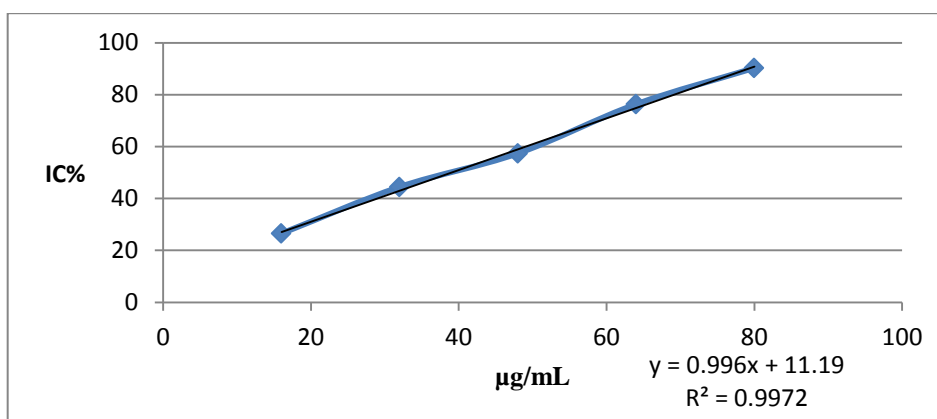


Gráfico 14 - Curva da F AcEt – F pela Redução do DPPH

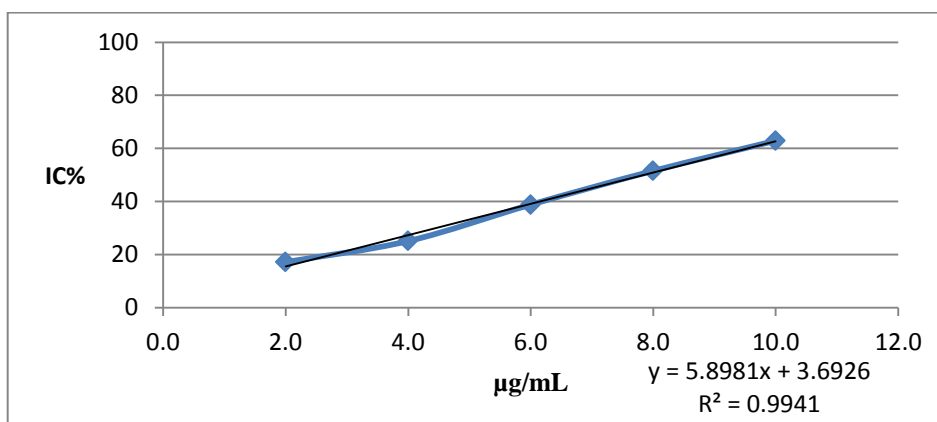


Gráfico 15 - Curva da F HalcR – F pela Redução do DPPH

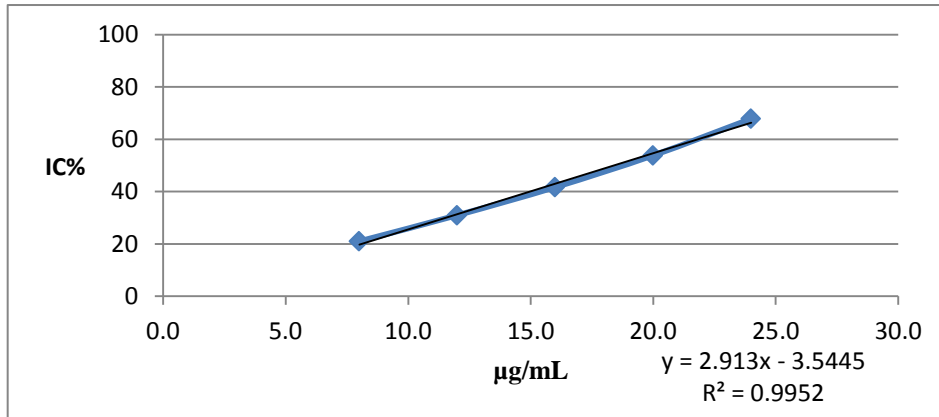


Tabela 10 - Atividade Antioxidante pela Redução do Radical DPPH

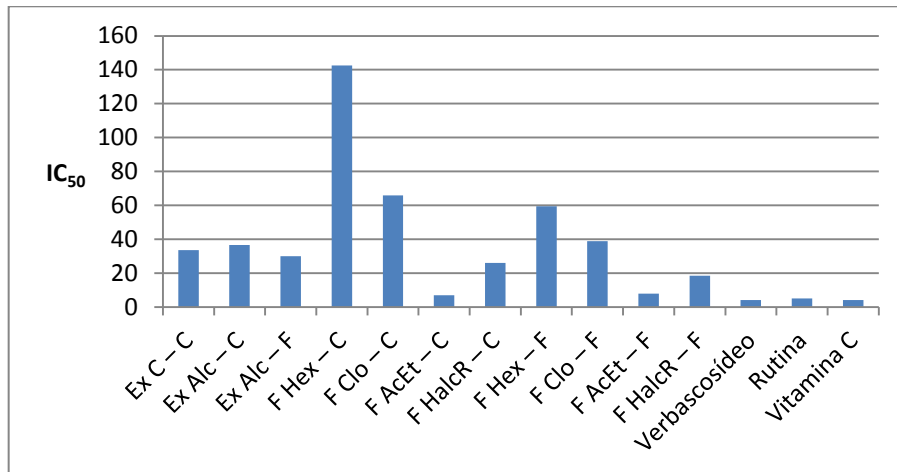
	IC ₅₀ ± dp	CV (%)	Tukey*
Ex C – C	33,68±2,14	6,37	d e
Ex Alc – C	36,63±2,89	7,88	e
Ex Alc – F	30,07±0,39	1,30	c d
F Hex – C	142,56±6,05	4,24	h
F Clo – C	65,81±0,78	1,18	g
F AcEt – C	6,93±0,29	4,12	a
F HalcR – C	26,03±0,70	2,70	c
F Hex – F	59,44±0,63	1,06	f
F Clo – F	38,93±1,40	3,60	e
F AcEt – F	7,86±0,37	4,66	a
F HalcR – F	18,45±0,62	3,38	b
Verbascosídeo	4,21±0,32	7,60	a
Rutina	5,05±0,42	8,26	a
Vitamina C	4,13±0,24	5,88	a

NOTA: * Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Tukey.

Levando em consideração a análise estatística dos dados verificou-se que as frações F AcEt – C e F AcEt – F e a substância verbascosídeo, tem atividade antioxidante igual aos padrões (vitamina C e rutina), pois não há diferença estatística entre estas amostras. Essa atividade das frações provavelmente é devido à presença de flavonoides, os quais são normalmente encontrados em maior quantidade nessa fração.

Já as demais frações e os extratos apresentaram valores de IC₅₀ superiores aos padrões. Indicado que as essas frações são menos ativas do que os padrões analisados, pois é necessária uma quantidade maior destas amostras para reduzir 50% da concentração inicial de DPPH. Isso pode ser visualizado no gráfico 16.

Gráfico 16 - Atividade Antioxidante pela Redução do Radical DPPH



5.6 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE A *Artemia salina*

Tabela 11 - Avaliação da toxicidade frente à *Artemia salina*

	DL ₅₀ (µg/mL)
Ex C - C	> 1000
Ex Alc - C	> 1000
Ex Alc - F	735,64
F Hex - C	> 1000
F Clo - C	> 1000
F AcEt - C	> 1000
F HalcR - C	> 1000
F Hex - F	> 1000
F Clo - F	> 1000
F AcEt - F	> 1000
F HalcR - F	509,70
Verbascosídeo	> 1000

Observando os dados na tabela 11 é possível perceber que apenas o Ex Alc - F e a F HalcR - F se mostraram ativas contra o micro crustáceo *Artemia salina*, dado que todas as outras apresentaram um resultado de DL₅₀ superior a 1000µg/mL, concentração máxima para uma amostra ser considerada ativa segundo Meyer *et al.* (1982). O que é esperado, pois já foi relatado em literatura casos de intoxicação pelas folhas de *D. repens* (SCANLAN *et al.*, 2006), além de toxicidade aguda frente a ratos (NIKKON *et al.*, 2008). O resultado positivo do Ex Alc - F e da F HalcR - F indicam uma possível bioatividade desses extratos.

5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA

5.7.1 Bioensaios de Germinação

O processo global da germinação é constituído por três processos parciais: embebição, ativação e crescimento intraseminal. A dificuldade em estabelecer o início e o final do processo faz com que a determinação da germinação seja avaliada por um critério macroscópico: a protrusão da raiz primária (RANAL e SANTANA, 2006). Esse processo é menos sensível aos aleloquímicos do que o crescimento da plântula, mas a quantificação experimental é muito mais simples, pois para cada semente o fenômeno é discreto, com a germinação ou não da semente (FERREIRA e ÁQUILA, 2000).

Com relação aos bioensaios de germinação, foi verificado que os extratos e frações não interferiram na velocidade e nem na porcentagem final da germinação das espécies *L. sativa* e *A. cepa* (Tabela 12) indicando que eles não atuam na germinação das espécies avaliadas.

Na germinação das sementes, o ciclo do glioxalato inicia uma função de mobilização dos triglicerídeos, onde durante cada estágio de germinação, enzimas como a isocitrato liase, aumentam sua atividade devido ao metabolismo de lipídeos armazenados nos tecidos de germinação (GNIAZDOWSKA e BOGATEK, 2005). Os resultados aqui apresentados indicam que os extratos e frações utilizados não causam a redução da atividade destas enzimas envolvidas na glicólise e na via oxidativa das pentoses fosfato, as quais asseguram níveis de ATP e esqueletos de carbono suficientes para a germinação das sementes (GNIAZDOWSKA e BOGATEK, 2005).

Tabela 12 - Índice de velocidade de germinação (IVG) e porcentagem de germinação (%G) das sementes de *L. sativa* e *A. cepa*

		<i>L. sativa</i>		<i>A. cepa</i>	
		IVG \pm dp	%G \pm dp	IVG \pm dp	%G \pm dp
Controle		20,34 \pm 1,31	89,0 \pm 2,45	8,78 \pm 0,99	86,5 \pm 4,43
Ex C – C	1000	17,6 \pm 1,07 ^{na}	83,0 \pm 2,00 ^{na}	9,64 \pm 0,87 ^{na}	90,5 \pm 7,72 ^{na}
	500	18,8 \pm 1,21 ^{na}	87,0 \pm 2,00 ^{na}	8,93 \pm 0,87 ^{na}	86,5 \pm 6,19 ^{na}
	250	18,7 \pm 1,87 ^{na}	85,5 \pm 9,15 ^{na}	9,79 \pm 0,95 ^{na}	87,0 \pm 3,46 ^{na}
Ex Alc – C	1000	18,2 \pm 1,08 ^{na}	85,0 \pm 4,16 ^{na}	8,93 \pm 0,51 ^{na}	85,5 \pm 3,42 ^{na}
	500	17,0 \pm 0,31 ^{na}	84,0 \pm 5,42 ^{na}	9,58 \pm 0,85 ^{na}	89,0 \pm 5,03 ^{na}
	250	18,0 \pm 1,35 ^{na}	83,5 \pm 4,12 ^{na}	9,68 \pm 0,49 ^{na}	90,5 \pm 1,00 ^{na}
F Hex – C	1000	20,0 \pm 1,34 ^{na}	85,0 \pm 5,00 ^{na}	6,56 \pm 0,25 ^{na}	75,5 \pm 3,00 ^{na}
	500	20,2 \pm 2,10 ^{na}	96,5 \pm 3,83 ^{na}	8,09 \pm 0,56 ^{na}	83,5 \pm 4,43 ^{na}
	250	20,7 \pm 0,85 ^{na}	90,0 \pm 1,63 ^{na}	8,47 \pm 0,28 ^{na}	86,5 \pm 4,43 ^{na}
F Clo – C	1000	17,1 \pm 1,71 ^{na}	87,5 \pm 5,74 ^{na}	6,92 \pm 0,60 ^{na}	78,5 \pm 4,43 ^{na}
	500	16,5 \pm 1,71 ^{na}	81,5 \pm 6,61 ^{na}	7,32 \pm 0,33 ^{na}	82,0 \pm 1,63 ^{na}
	250	19,3 \pm 1,56 ^{na}	87,5 \pm 5,74 ^{na}	8,62 \pm 0,61 ^{na}	88,5 \pm 4,12 ^{na}
F AcEt – C	1000	18,9 \pm 2,06 ^{na}	87,0 \pm 9,02 ^{na}	9,96 \pm 2,06 ^{na}	87,0 \pm 6,63 ^{na}
	500	18,6 \pm 1,79 ^{na}	85,5 \pm 6,81 ^{na}	10,36 \pm 0,73 ^{na}	90,0 \pm 2,83 ^{na}
	250	21,0 \pm 1,05 ^{na}	91,0 \pm 3,46 ^{na}	10,92 \pm 1,08 ^{na}	87,5 \pm 4,12 ^{na}
F HalcR – C	1000	19,6 \pm 1,88 ^{na}	86,5 \pm 7,75 ^{na}	9,06 \pm 1,64 ^{na}	80,5 \pm 3,42 ^{na}
	500	20,6 \pm 0,88 ^{na}	89,5 \pm 5,00 ^{na}	10,92 \pm 1,57 ^{na}	92,5 \pm 4,43 ^{na}
	250	20,7 \pm 1,08 ^{na}	81,0 \pm 4,73 ^{na}	10,06 \pm 0,87 ^{na}	88,5 \pm 5,00 ^{na}
Ex Alc – F	1000	18,4 \pm 0,61 ^{na}	83,5 \pm 4,73 ^{na}	8,22 \pm 0,64 ^{na}	78,5 \pm 3,00 ^{na}
	500	19,5 \pm 0,85 ^{na}	87,5 \pm 2,52 ^{na}	9,05 \pm 1,64 ^{na}	84,5 \pm 9,71 ^{na}
	250	18,9 \pm 1,27 ^{na}	84,5 \pm 2,52 ^{na}	9,95 \pm 0,47 ^{na}	85,0 \pm 6,22 ^{na}
F Hex – F	1000	17,2 \pm 1,10 ^{na}	81,0 \pm 3,46 ^{na}	7,40 \pm 0,61 ^{na}	85,5 \pm 1,91 ^{na}
	500	19,7 \pm 0,63 ^{na}	86,0 \pm 2,83 ^{na}	7,48 \pm 0,89 ^{na}	84,5 \pm 7,19 ^{na}
	250	19,9 \pm 1,39 ^{na}	88,0 \pm 6,73 ^{na}	8,20 \pm 1,27 ^{na}	84,0 \pm 5,66 ^{na}
F Clo – F	1000	18,7 \pm 1,18 ^{na}	85,0 \pm 6,22 ^{na}	7,48 \pm 0,99 ^{na}	80,5 \pm 9,98 ^{na}
	500	18,0 \pm 1,88 ^{na}	78,0 \pm 6,93 ^{na}	6,96 \pm 0,86 ^{na}	78,5 \pm 9,15 ^{na}
	250	18,4 \pm 1,47 ^{na}	81,5 \pm 4,43 ^{na}	7,69 \pm 0,88 ^{na}	84,0 \pm 2,31 ^{na}
F AcEt – F	1000	18,0 \pm 0,47 ^{na}	79,0 \pm 3,46 ^{na}	9,16 \pm 1,40 ^{na}	83,0 \pm 4,16 ^{na}
	500	20,3 \pm 1,30 ^{na}	89,5 \pm 3,42 ^{na}	9,62 \pm 0,66 ^{na}	85,0 \pm 3,83 ^{na}
	250	19,3 \pm 1,44 ^{na}	83,0 \pm 3,46 ^{na}	11,18 \pm 0,96 ^{na}	90,5 \pm 3,00 ^{na}
F HalcR – F	1000	18,2 \pm 2,06 ^{na}	80,0 \pm 3,46 ^{na}	6,24 \pm 0,67 ^{na}	74,0 \pm 4,90 ^{na}
	500	20,4 \pm 0,67 ^{na}	86,5 \pm 6,93 ^{na}	7,38 \pm 0,61 ^{na}	83,0 \pm 9,45 ^{na}
	250	19,1 \pm 1,16 ^{na}	84,5 \pm 5,74 ^{na}	7,74 \pm 0,86 ^{na}	81,3 \pm 9,45 ^{na}

NOTA: na = A média do tratamento não difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey.

5.7.2 Teste de Crescimento

Nos bioensaios biométricos (germinação e crescimento), foi verificado que os efeitos variaram em função das concentrações e espécies avaliadas (mono e eudicotiledôneas).

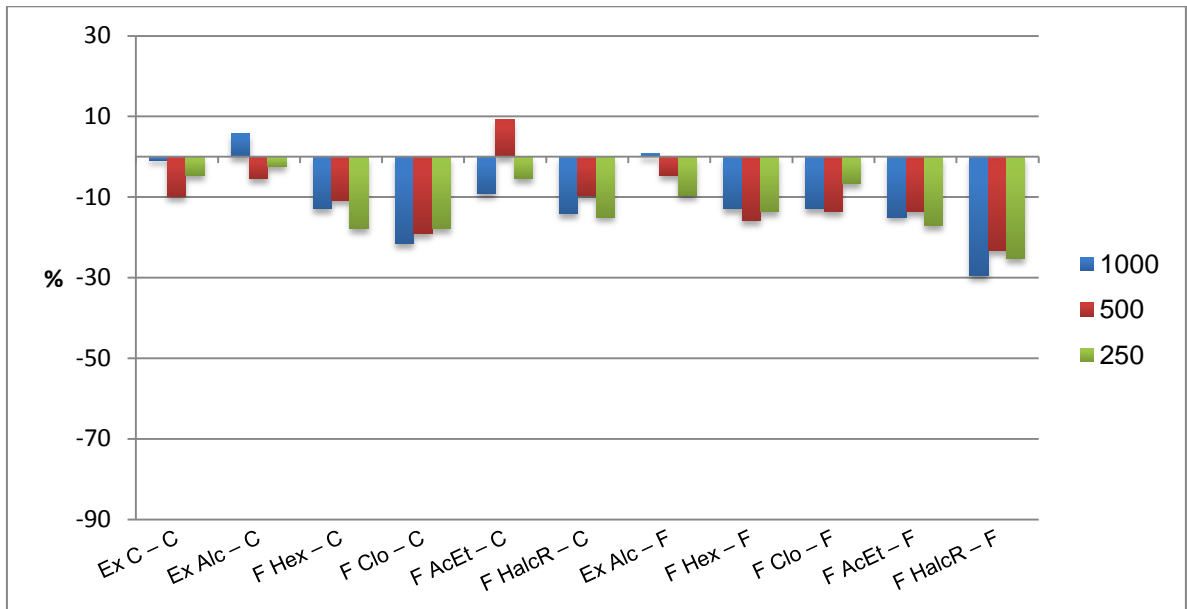
Em *L. sativa*, foi verificado que os extratos e frações não afetaram o crescimento do hipocótilo (Tabela 13 e Gráfico 17), sendo este efeito mais pronunciado para o crescimento da radícula (Tabela 13 e Gráfico 18), com reduções superiores a 50% na menor concentração ensaiada da F HalcR – F (± 80 , ± 74 e $\pm 58\%$ para 1.000, 500 e 250 $\mu\text{g/L}$ respectivamente, sendo seguidos pelo Ex Alc – F (± 74 , ± 65 e $\pm 41\%$ para 1.000, 500 e 250 $\mu\text{g/L}$ respectivamente). Efeito similar também foi observado para Ex C – C, F Hex – C, e a F Clo – C, com interferências acentuadas, sendo dependentes da concentração utilizada.

No crescimento de *A. cepa*, foi verificado que todos os extratos causaram reduções significativas no coleótilo em todas as concentrações (Tabela 14 e Gráfico 19), e a F HalcR – F causou redução significativa nas duas maiores concentrações (Ex C – C: ± 33 , ± 31 e $\pm 36\%$ para 1.000, 500 e 250 $\mu\text{g/L}$ respectivamente; Ex Alc – C: ± 45 , ± 46 e $\pm 48\%$ para 1.000, 500 e 250 $\mu\text{g/L}$ respectivamente; Ex Alc – F: ± 65 , ± 52 e $\pm 49\%$ para 1.000, 500 e 250 $\mu\text{g/L}$ respectivamente; F HalcR – F: ± 54 , $\pm 39\%$ para 1.000 e 500 $\mu\text{g/L}$ respectivamente). Entretanto na radícula (Tabela 14 e Gráfico 20), somente o Ex Alc – F e a F HalcR – F causaram reduções significativas quando comparadas ao controle (Ex Alc – F: ± 85 , ± 77 e $\pm 66\%$ para 1.000, 500 e 250 $\mu\text{g/L}$ respectivamente; F HalcR – F: ± 80 , ± 67 e $\pm 62\%$ para 1.000, 500 e 250 $\mu\text{g/L}$ respectivamente).

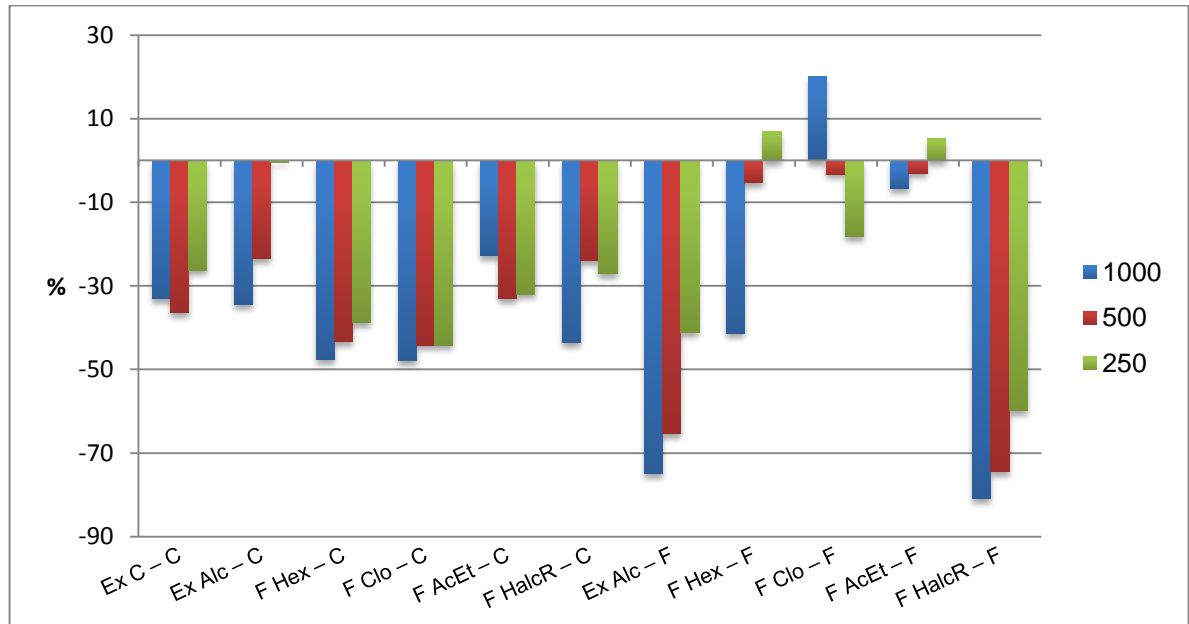
Tabela 13 - Crescimento da radícula e hipocótilo, e peso seco de *L. sativa*

		<i>L. sativa</i>		
		Radícula	Hipocótilo	Peso seco
		mm ± dp	mm ± dp	mg ± dp
Controle		13,13±3,56	2,41±0,55	0,58±0,05
Ex C – C	1000	8,78±1,87	2,39±0,79 ^{na}	0,52±0,06 ^{na}
	500	8,34±1,46	2,17±0,67 ^{na}	0,54±0,03 ^{na}
	250	9,68±1,74	2,30±0,46 ^{na}	0,60±0,06 ^{na}
Ex Alc – C	1000	8,60±1,96	2,55±0,60 ^{na}	0,61±0,06 ^{na}
	500	10,05±1,75 ^{na}	2,28±0,45 ^{na}	0,59±0,03 ^{na}
	250	13,08±3,39 ^{na}	2,35±0,48 ^{na}	0,57±0,02 ^{na}
F Hex – C	1000	6,88±1,16	2,10±0,44 ^{na}	0,60±0,05 ^{na}
	500	7,43±1,26	2,15±0,43 ^{na}	0,56±0,05 ^{na}
	250	8,05±1,45	1,98±0,58 ^{na}	0,61±0,05 ^{na}
F Clo – C	1000	6,83±1,68	1,89±0,42 ^{na}	0,56±0,08 ^{na}
	500	7,33±1,49	1,95±0,44 ^{na}	0,58±0,06 ^{na}
	250	7,33±3,95	1,98±0,37 ^{na}	0,55±0,11 ^{na}
F AcEt – C	1000	10,15±1,49 ^{na}	2,19±0,43 ^{na}	0,55±0,04 ^{na}
	500	8,80±2,13	2,63±0,66 ^{na}	0,57±0,04 ^{na}
	250	8,93±2,02	2,28±0,57 ^{na}	0,57±0,10 ^{na}
F HalcR – C	1000	7,40±1,38	2,07±0,52 ^{na}	0,60±0,04 ^{na}
	500	9,98±1,85 ^{na}	2,18±0,38 ^{na}	0,52±0,03 ^{na}
	250	9,58±1,90	2,05±0,39 ^{na}	0,59±0,05 ^{na}
Ex Alc – F	1000	3,30±0,91	2,43±0,59 ^{na}	0,60±0,05 ^{na}
	500	4,55±0,93	2,30±0,65 ^{na}	0,60±0,07 ^{na}
	250	7,73±1,15	2,18±0,55 ^{na}	0,58±0,04 ^{na}
F Hex – F	1000	7,70±0,94	2,10±0,44 ^{na}	0,63±0,06 ^{na}
	500	12,44±1,93 ^{na}	2,03±0,28 ^{na}	0,55±0,05 ^{na}
	250	14,05±2,50 ^{na}	2,08±0,48 ^{na}	0,60±0,02 ^{na}
F Clo – F	1000	15,78±2,74 ^{na}	2,10±0,55 ^{na}	0,62±0,06 ^{na}
	500	12,70±2,69 ^{na}	2,08±0,57 ^{na}	0,66±0,03 ^{na}
	250	10,73±2,65 ^{na}	2,25±0,49 ^{na}	0,63±0,04 ^{na}
F AcEt – F	1000	12,25±2,17 ^{na}	2,05±0,32 ^{na}	0,67±0,01 ^{na}
	500	12,73±2,08 ^{na}	2,08±0,47 ^{na}	0,64±0,04 ^{na}
	250	13,83±2,94 ^{na}	2,00±0,45 ^{na}	0,68±0,04 ^{na}
F HalcR – F	1000	2,50±0,51	1,70±0,46 ^{na}	0,65±0,03 ^{na}
	500	3,35±0,70	1,85±0,43 ^{na}	0,63±0,05 ^{na}
	250	5,28±0,88	1,80±0,46 ^{na}	0,64±0,02 ^{na}

NOTA: na = A média do tratamento não difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey.

Gráfico 17 - Crescimento do hipocótilo de *L. sativa*

NOTA: Os resultados estão apresentados em porcentagem em relação ao controle, sendo que o zero representa o controle, valores positivos representam estímulo e valores negativos representam inibição (MACIAS *et al.*, 2006).

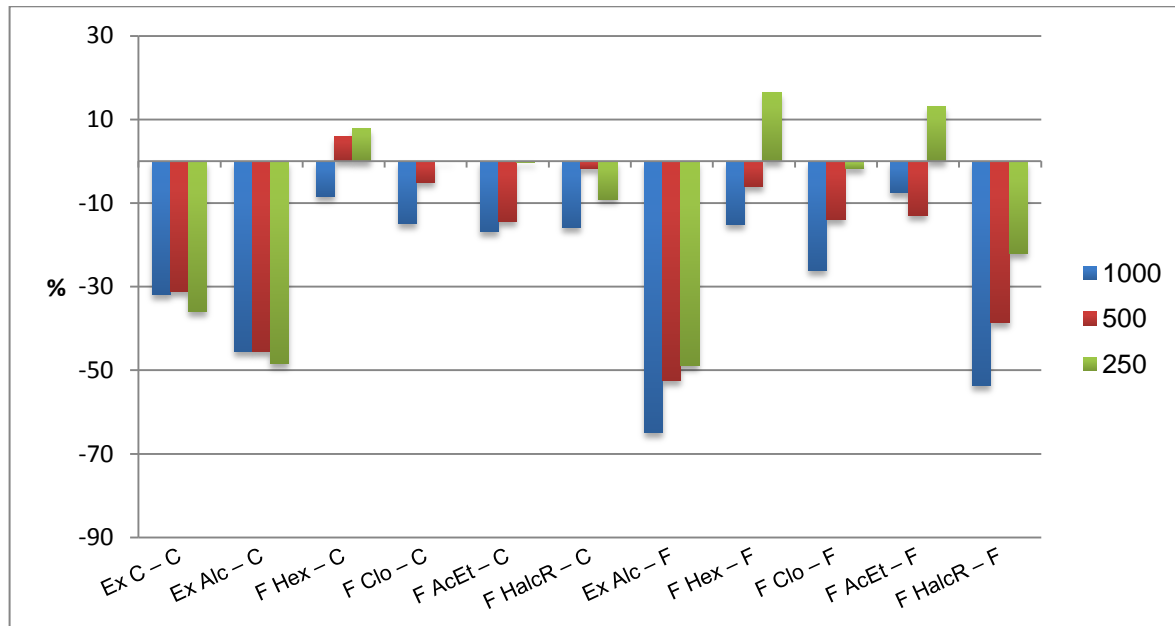
Gráfico 18 - Crescimento da radícula de *L. sativa*

NOTA: Os resultados estão apresentados em porcentagem em relação ao controle, sendo que o zero representa o controle, valores positivos representam estímulo e valores negativos representam inibição (MACIAS *et al.*, 2006).

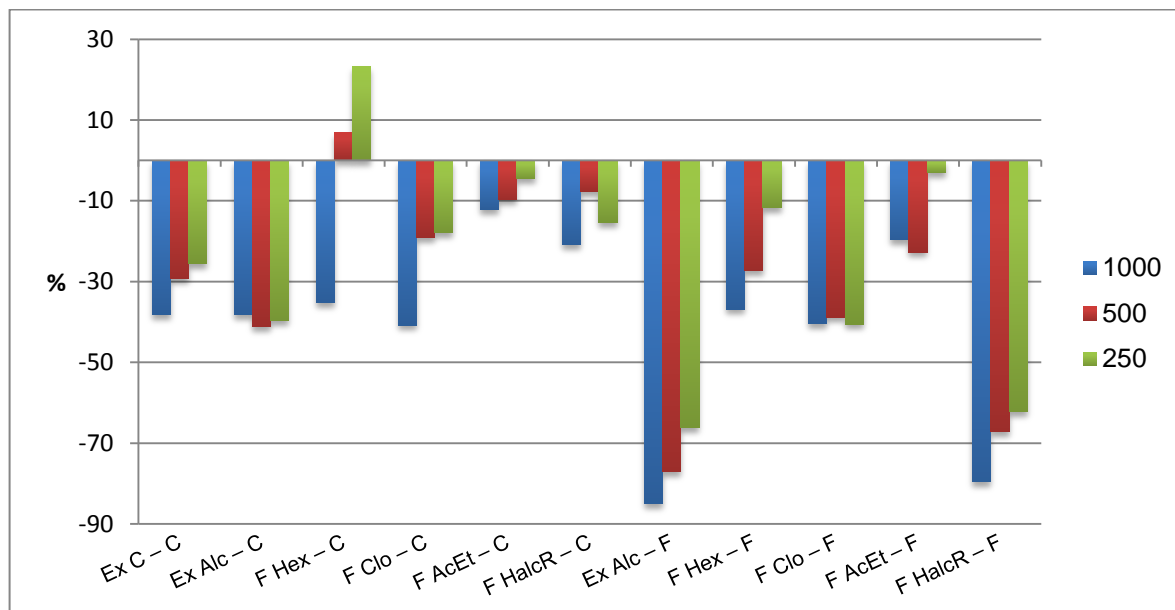
Tabela 14 - Crescimento da radícula e hipocótilo, e peso seco de *A. cepa*

		<i>A. cepa</i>		
		Radícula	Coleóptilo	Peso seco
		mm ± dp	mm ± dp	mg ± dp
Controle		8,08±2,36	11,64±3,44	2,72±0,29
Ex C – C	1000	5,00±3,10 ^{na}	7,92±3,30	2,81±0,17 ^{na}
	500	5,71±3,11 ^{na}	8,01±3,08	2,77±0,17 ^{na}
	250	6,01±2,37 ^{na}	7,45±3,11	2,98±0,29 ^{na}
Ex Alc – C	1000	4,99±2,81 ^{na}	6,35±2,81	2,92±0,11 ^{na}
	500	4,75±2,92 ^{na}	6,34±3,69	2,99±0,16 ^{na}
	250	4,88±3,42 ^{na}	6,00±3,88	2,86±2,27 ^{na}
F Hex – C	1000	5,23±1,12 ^{na}	10,65±2,69 ^{na}	2,55±0,27 ^{na}
	500	8,63±2,52 ^{na}	12,33±2,63 ^{na}	2,54±0,23 ^{na}
	250	9,95±3,37 ^{na}	12,55±2,24 ^{na}	2,54±0,06 ^{na}
F Clo – C	1000	4,78±1,67 ^{na}	9,90±2,55 ^{na}	2,29±0,40 ^{na}
	500	6,53±2,08 ^{na}	11,05±2,72 ^{na}	2,25±0,50 ^{na}
	250	6,63±2,54 ^{na}	11,63±3,41 ^{na}	2,73±0,51 ^{na}
F AcEt – C	1000	7,10±5,40 ^{na}	9,69±5,43 ^{na}	2,78±0,13 ^{na}
	500	7,29±4,63 ^{na}	9,96±5,71 ^{na}	2,70±0,11 ^{na}
	250	7,71±4,14 ^{na}	11,60±3,74 ^{na}	2,66±0,11 ^{na}
F HalcR – C	1000	6,39±3,21 ^{na}	9,79±5,01 ^{na}	2,71±0,11 ^{na}
	500	7,46±3,29 ^{na}	11,44±4,65 ^{na}	2,72±0,26 ^{na}
	250	6,84±4,35 ^{na}	10,59±5,67 ^{na}	2,69±0,30 ^{na}
Ex Alc – F	1000	1,22±1,43	4,09±2,41	3,03±0,16 ^{na}
	500	1,86±0,91	5,54±2,00	3,13±0,04 ^{na}
	250	2,74±1,66	5,94±3,46	3,06±0,37 ^{na}
F Hex – F	1000	5,10±1,39 ^{na}	9,88±2,36 ^{na}	2,73±0,16 ^{na}
	500	5,88±1,71 ^{na}	10,93±2,99 ^{na}	2,46±0,25 ^{na}
	250	7,13±8,21 ^{na}	13,55±3,22 ^{na}	2,45±0,19 ^{na}
F Clo – F	1000	4,81±1,33 ^{na}	8,61±2,25 ^{na}	2,96±0,68 ^{na}
	500	4,94±1,81 ^{na}	10,01±2,24 ^{na}	3,05±0,56 ^{na}
	250	4,80±1,84 ^{na}	11,43±2,99 ^{na}	2,75±0,34 ^{na}
F AcEt – F	1000	6,49±4,96 ^{na}	10,76±5,53 ^{na}	2,64±0,11 ^{na}
	500	6,24±4,03 ^{na}	10,14±4,64 ^{na}	2,64±0,16 ^{na}
	250	7,83±3,67 ^{na}	13,17±4,44 ^{na}	2,58±0,12 ^{na}
F HalcR – F	1000	1,65±0,53	5,40±0,84	2,95±0,08 ^{na}
	500	2,65±0,66	7,15±1,39	2,83±0,06 ^{na}
	250	3,05±0,90	9,08±1,40 ^{na}	2,82±0,09 ^{na}

NOTA: na = A média do tratamento não difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey.

Gráfico 19 - Crescimento do coleóptilo de *A. cepa*

NOTA: Os resultados estão apresentados em porcentagem em relação ao controle, sendo que o zero representa o controle, valores positivos representam estímulo e valores negativos representam inibição (MACIAS *et al.*, 2006).

Gráfico 20 - Crescimento da radícula de *A. cepa*

NOTA: Os resultados estão apresentados em porcentagem em relação ao controle, sendo que o zero representa o controle, valores positivos representam estímulo e valores negativos representam inibição (MACIAS *et al.*, 2006).

Além dos testes de germinação, os testes biométricos (medição da raiz e hipocótilo) são importantes na determinação de mudanças nas plântulas causadas pelas substâncias-teste (PIÑA-RODRIGUEZ *et al.*, 2004). Assim como observado na

germinação, a intensidade dos efeitos sobre o desenvolvimento da raiz de *L. sativa* e *A. cepa* ocorreu em todas as concentrações avaliadas, existindo uma relação dose-dependente, onde o aumento da atividade inibitória é proporcional ao aumento da concentração do extrato. No crescimento do hipocótilo/coleóptilo, os efeitos não foram tão sensíveis quanto os observados para a raiz primária (Gráficos 16 a 19). Comparando-se o crescimento da raiz primária e da parte aérea, observa-se que os efeitos fitotóxicos foram mais evidentes no crescimento da raiz do que no da parte aérea (hipocótilo/coleóptilo), isso pode ter ocorrido devido a absorção e, conseqüentemente, a concentração de fitotoxinas nos tecidos radiculares ser favorecida pelo contato físico da raiz com o papel filtro, o qual contém as frações. Desta forma a bioatividade das frações está condicionada à capacidade de absorção, translocação e mecanismo de ação dos seus compostos potencialmente alelopáticos (CORREIA, CENTURION e ALVES, 2005).

Estes resultados indicam que os extratos avaliados afetaram de forma significativa o desenvolvimento da radícula em *L. sativa* e *A. cepa*, o que acarreta alterações no desenvolvimento de ambas as espécies. As avaliações têm fundamental importância em alelopatia, pois a redução acentuada da raiz pode afetar a capacidade competitiva e a produtividade da planta, e a redução da parte aérea (hipocótilo) pode diminuir a capacidade da planta em competir por luz (NINKOVIC, 2003).

Com relação a massa seca (Tabelas 13 e 14), foi verificado que as concentrações dos extratos e frações não causaram redução na massa final das plântulas, sendo que durante a condução dos experimentos observou-se em *L. sativa* que nos casos de estímulo no crescimento das radículas, estas se apresentavam mais finas enquanto que na inibição verificou-se engrossamento das raízes, além de ausência de pêlos absorventes, justificando os resultados observados (Figura 28).

Dessa forma, é possível inferir que os extratos causaram inibição tanto para eudicotiledônea quanto para monocotiledôneas, quando se avalia a taxa de crescimento, podendo ser utilizado como um herbicida pós-emergente, uma vez que atuou com mais especificidade na redução da raiz primária de *L. sativa* e *A. cepa*.

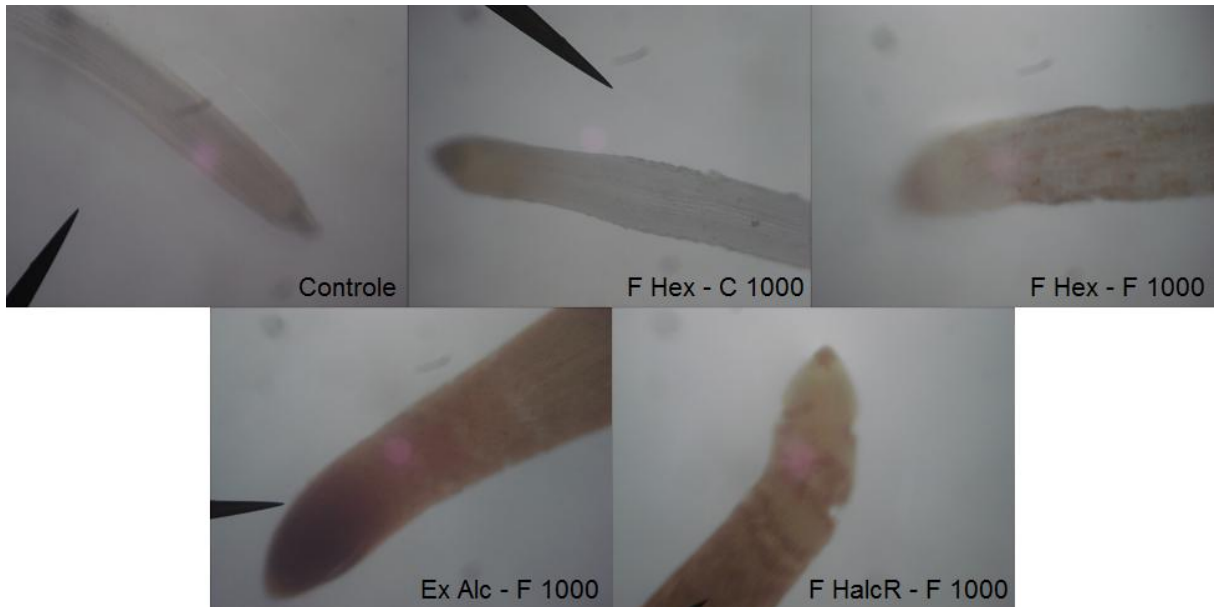


Figura 28 – Radículas de *L. sativa* evidenciando o engrossamento, e a ausência de pêlos absorventes.

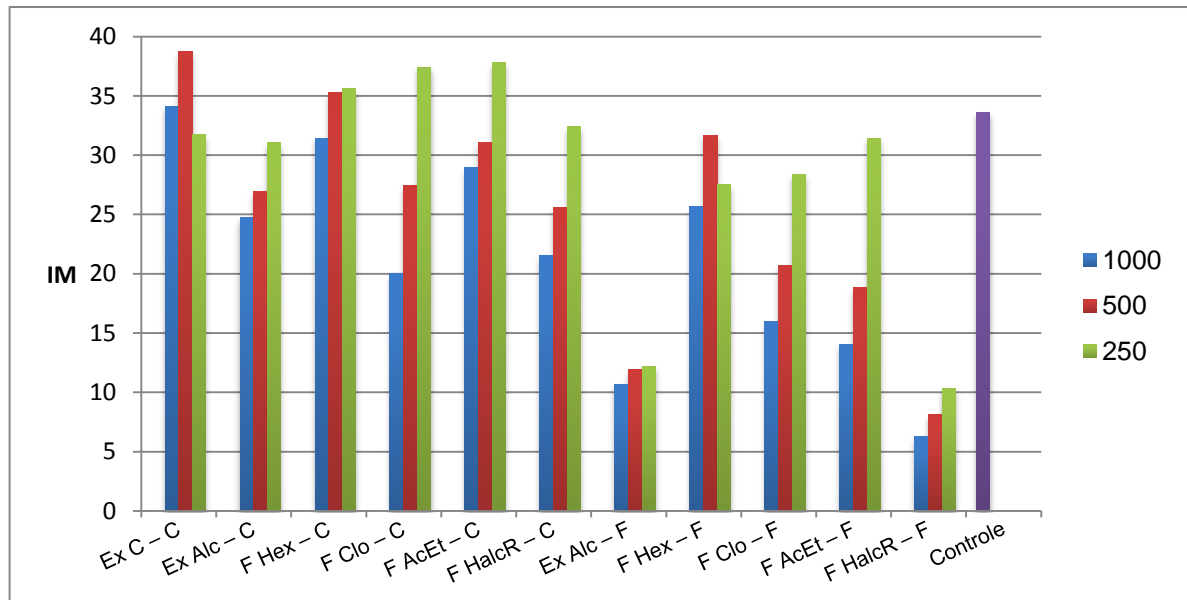
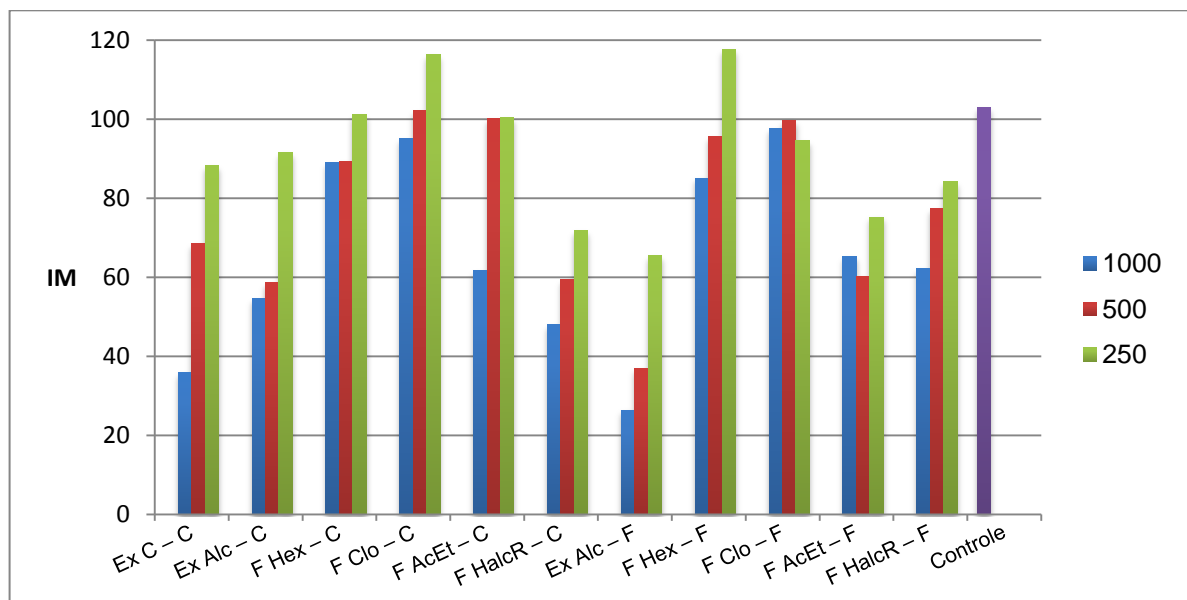
5.7.3 Índice Mitótico

No parâmetro divisão celular, foi observado que com o aumento da concentração das frações, causou redução no processo de divisão das células, sendo o maior efeito depressivo verificado na concentração de 1000mg/L. Em *L. sativa* (Tabela 15 e Gráfico 21) foi verificado que o Ex Alc – F e F HalcR – F, em todas as concentrações ensaiadas causaram alterações nos padrões de divisão celular. Porém as amostras Ex Alc -C, F Clo - C, F HalcR – C, F Clo – F e F AcEt –F causaram interferência nas padrões de divisão celular nas maiores concentrações testadas quando comparados ao controle. Já frente a *A. cepa* (Tabela 15 e Gráfico 22), além das amostras Ex Alc – F e F HalcR – F, as amostras H HalcR – C e F AcEt – F também alteraram a divisão celular em todas as concentrações testadas. Além destas as amostras Ex C – C, Ex Alc – C, F AcEt – C e F Hex – F interferiram na divisão celular nas maiores concentrações testadas. Justificando o efeito inibitório nas raízes de ambas as espécies-alvo.

Tabela 15 - Índice mitótico

		<i>L. sativa</i>	<i>A. cepa</i>
		IM \pm dp	IM \pm dp
Controle		33,63 \pm 2,58	102,81 \pm 2,10
Ex C – C	1000	34,14 \pm 5,33 ^{na}	35,78 \pm 1,64
	500	38,74 \pm 2,08 ^{na}	68,48 \pm 3,07
	250	31,74 \pm 2,08 ^{na}	88,26 \pm 5,15 ^{na}
Ex Alc – C	1000	24,76 \pm 3,95	54,56 \pm 3,47
	500	26,96 \pm 3,10 ^{na}	58,67 \pm 5,40
	250	31,09 \pm 2,16 ^{na}	91,44 \pm 2,18 ^{na}
F Hex – C	1000	31,44 \pm 1,45 ^{na}	88,89 \pm 3,31 ^{na}
	500	35,30 \pm 3,32 ^{na}	64,22 \pm 184
	250	35,63 \pm 3,62 ^{na}	101,15 \pm 0,85 ^{na}
F Clo – C	1000	20,00 \pm 3,18	95,09 \pm 1,73 ^{na}
	500	27,41 \pm 0,67 ^{na}	102,24 \pm 1,28 ^{na}
	250	37,44 \pm 5,26 ^{na}	116,30 \pm 3,30 ^{na}
F AcEt – C	1000	28,96 \pm 3,15 ^{na}	61,74 \pm 6,67
	500	31,11 \pm 4,08 ^{na}	100,22 \pm 5,43 ^{na}
	250	37,78 \pm 2,80 ^{na}	100,26 \pm 2,39 ^{na}
F HalcR – C	1000	21,52 \pm 1,16	48,04 \pm 0,23
	500	25,59 \pm 0,79 ^{na}	59,30 \pm 8,17
	250	32,41 \pm 2,94 ^{na}	71,89 \pm 1,76
Ex Alc – F	1000	10,71 \pm 1,11	26,37 \pm 1,41
	500	11,90 \pm 1,33	37,00 \pm 4,23
	250	12,18 \pm 0,57	89,56 \pm 9,64
F Hex – F	1000	25,67 \pm 3,10 ^{na}	85,06 \pm 2,75
	500	31,70 \pm 4,78 ^{na}	95,67 \pm 2,69 ^{na}
	250	27,56 \pm 2,26 ^{na}	117,63 \pm 1,70 ^{na}
F Clo – F	1000	16,00 \pm 2,04	97,55 \pm 4,49 ^{na}
	500	20,70 \pm 0,82	99,53 \pm 2,72 ^{na}
	250	28,41 \pm 0,93 ^{na}	94,46 \pm 4,75 ^{na}
F AcEt – F	1000	14,00 \pm 0,40	65,33 \pm 2,15
	500	18,81 \pm 2,03	60,04 \pm 2,89
	250	31,44 \pm 1,82 ^{na}	75,15 \pm 6,31
F HalcR – F	1000	6,26 \pm 1,20	62,12 \pm 0,22
	500	8,11 \pm 0,44	77,33 \pm 6,07
	250	10,37 \pm 0,61	84,21 \pm 5,56

NOTA: na = A média do tratamento não difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey.

Gráfico 21 - Índice mitótico - *L. sativa*Gráfico 22 - Índice mitótico - *A. cepa*

Os resultados das observações citológicas em células meristemáticas das raízes de plântulas de *L. sativa* e *A. cepa*, tratadas com as diferentes amostras em diferentes concentrações são apresentadas nas figuras 29 a 32. A microscopia das plântulas sobre influência das amostras testadas, bem como o controle, mostra pouca divisão celular presente das plântulas, sendo também possível visualizar em alguns casos a ausência de núcleo. Essas interferências foram mais evidentes nas plântulas de *L. sativa* sobre influência das amostras Ex Alc - F e F HalcR - F.

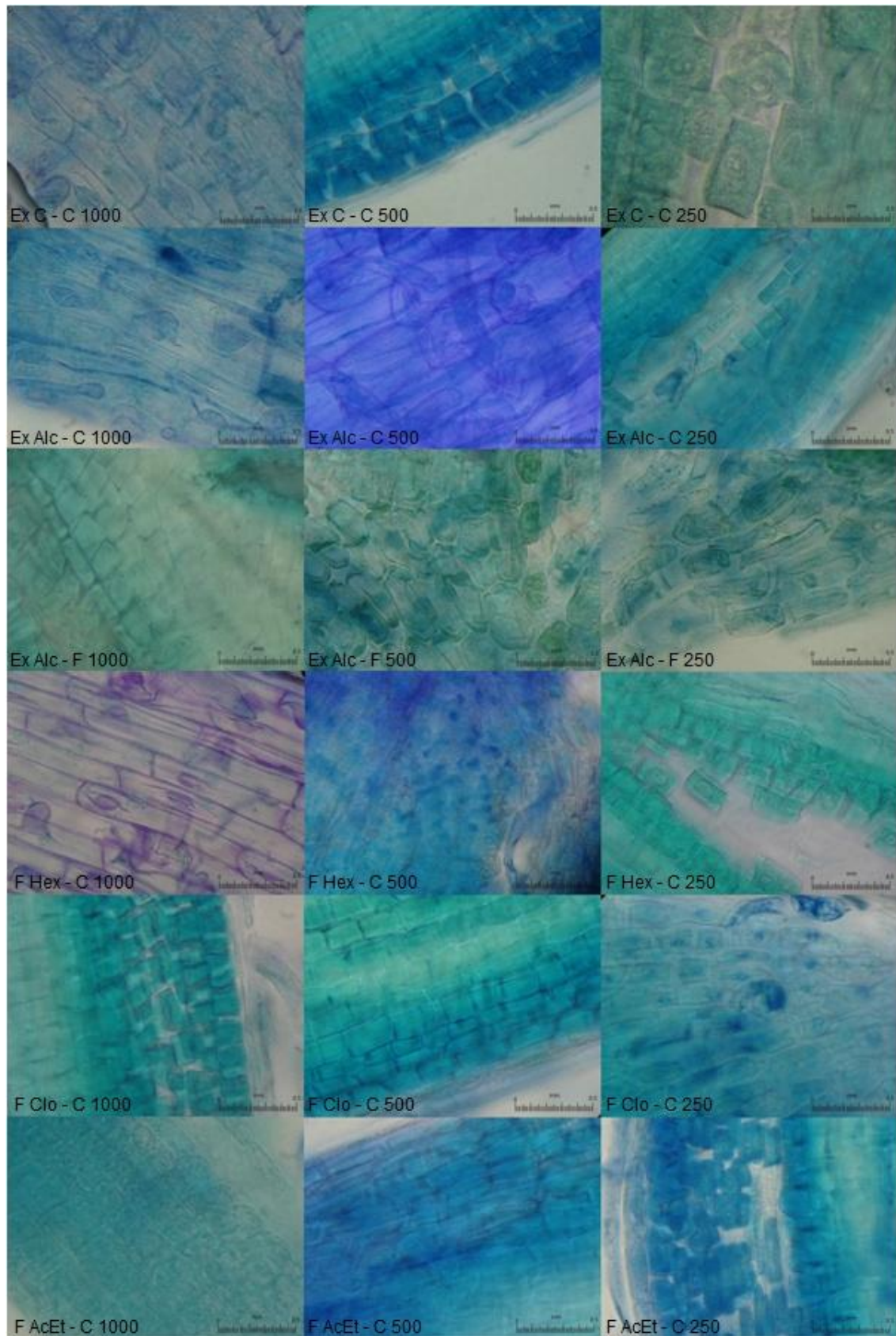


Figura 29 - Efeito das diferentes concentrações das amostras Ex C – C, Ex Alc – C, Ex Alc – F, F Hex – C, F Clo – C e F AcEt - C, sobre a divisão celular em células meristemáticas de raízes de plantas de *L. sativa*, evidenciando a diminuição da atividade celular

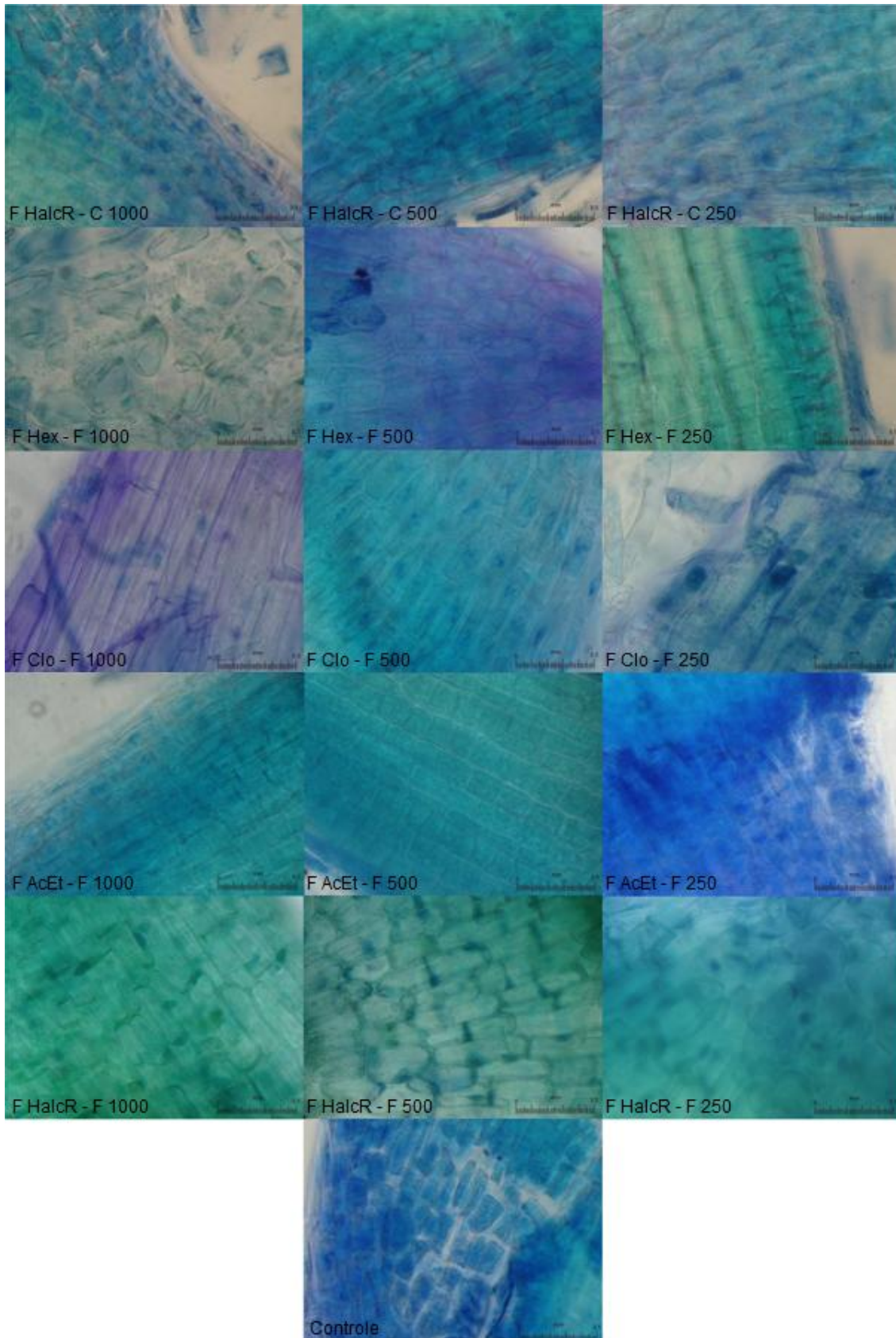


Figura 30 - Efeito das diferentes concentrações das amostras F HalcR – C, F Hex – F, F Clo – F, F AcEt – F, F HalcR – F e Controle, sobre a divisão celular em células meristemáticas de raízes de plantas de *L. sativa*, evidenciando a diminuição da atividade celular

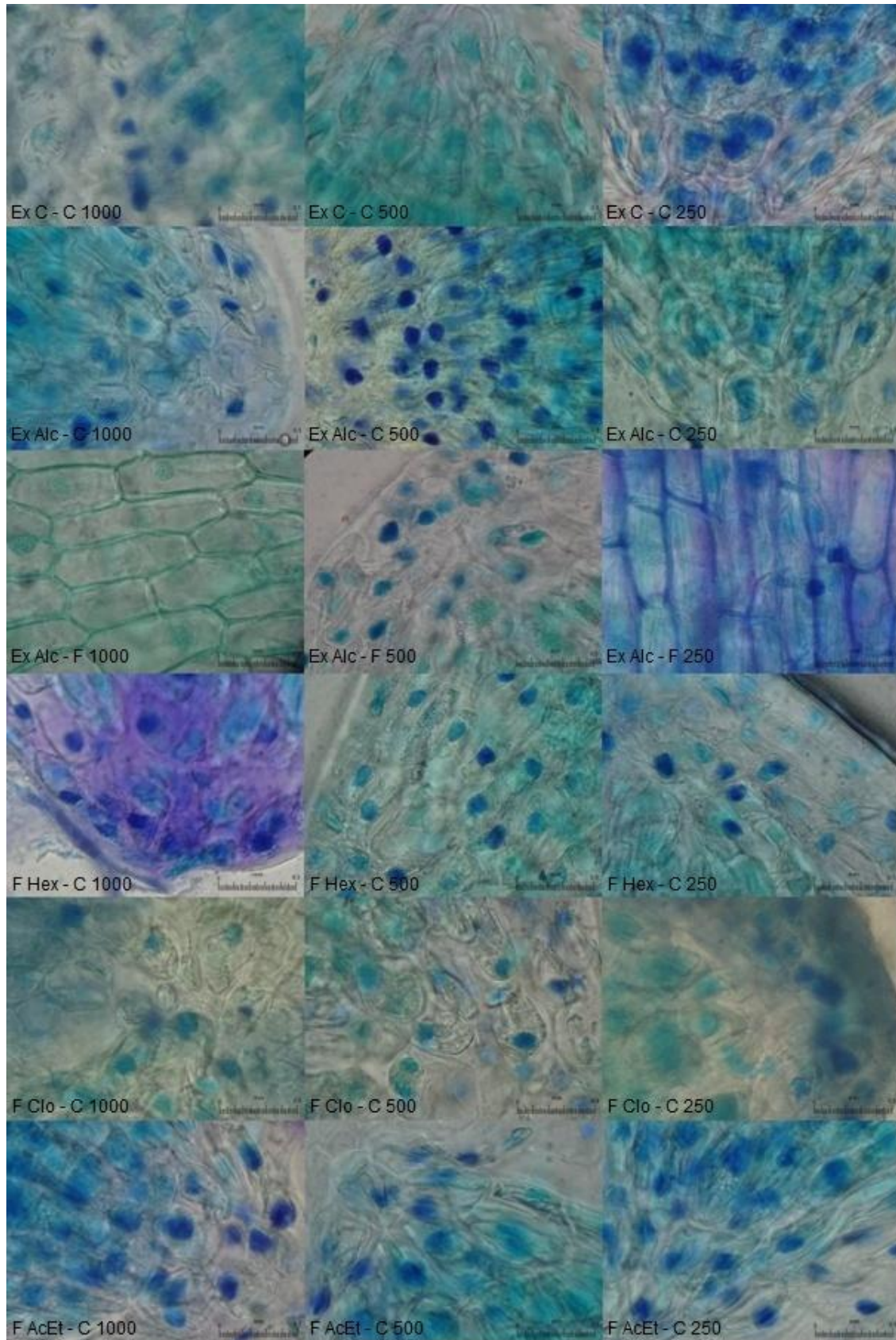


Figura 31 - Efeito das diferentes concentrações das amostras Ex C – C, Ex Alc – C, Ex Alc – F, F Hex – C, F Clo – C e F AcEt - C, sobre a divisão celular em células meristemáticas de raízes de plantas de *A. cepa*, evidenciando a diminuição da atividade celular

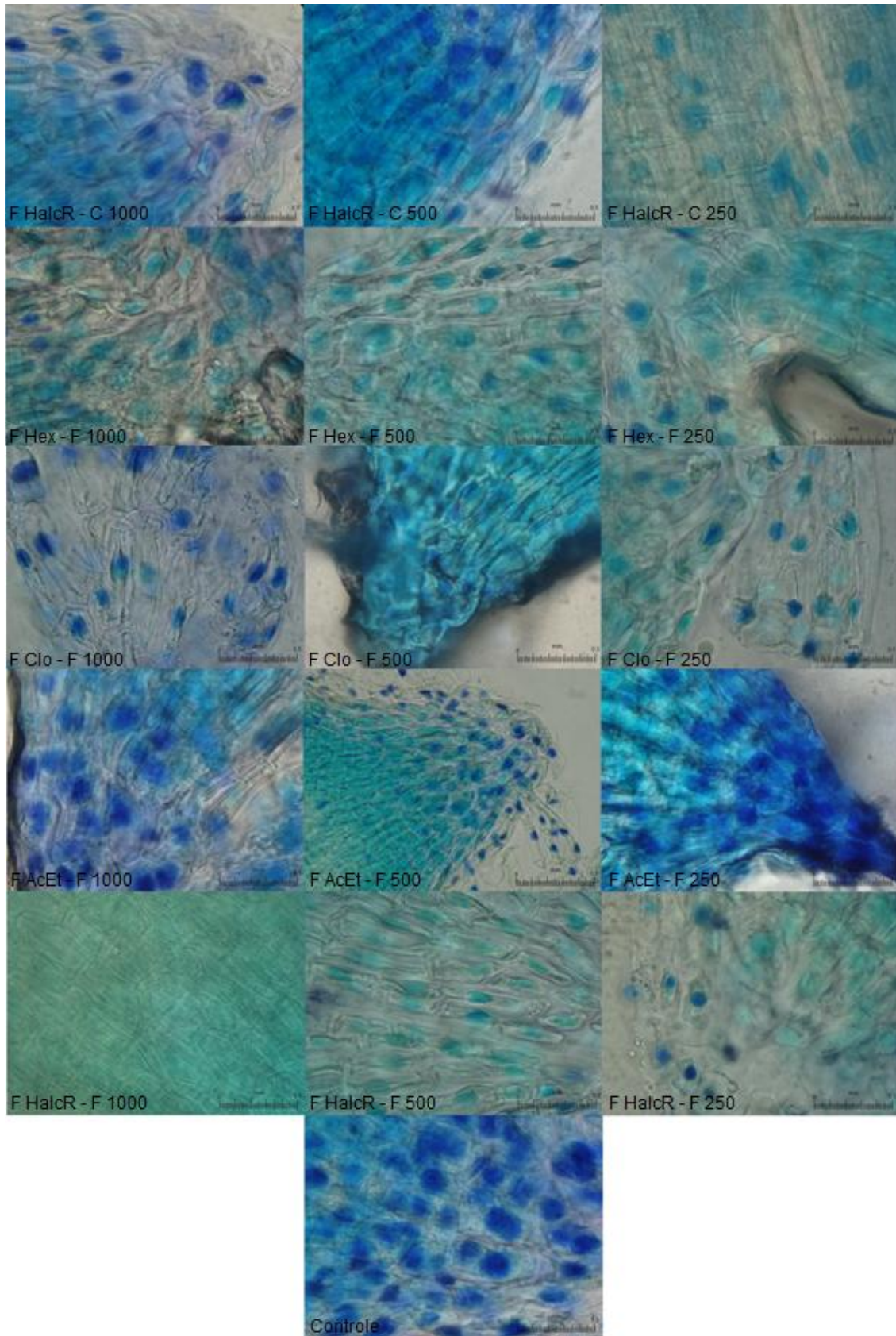


Figura 32 - Efeito das diferentes concentrações das amostras F HalcR – C, F Hex – F, F Clo – F, F AcEt – F, F HalcR – F e Controle, sobre a divisão celular em células meristemáticas de raízes de plantas de *A. cepa*, evidenciando a diminuição da atividade celular Fotossíntese

Nos resultados observa-se que *A. cepa* apresentou os maiores efeitos fitotóxicos, verificando-se que o aumento da concentração levou a uma drástica redução do índice mitótico, com paralisação do crescimento radicular, em consequência principalmente da quase ausência da telófase. Essa interferência na divisão celular causada pela ação do extrato com acentuado efeito sobre a morfologia do sistema radicular (inibição do crescimento) provavelmente representa um dos mecanismos de ação dos extratos e frações sobre o desenvolvimento da planta-teste.

5.7.4 Conteúdo de clorofila

Com relação ao conteúdo total de clorofila, foi observado que para *L. sativa* (Tabela 16 e Gráfico 23) as maiores concentrações das amostras Ex Alc – C, Ex Alc – F e F HalcR – F reduziram o conteúdo total de clorofila das plântulas avaliadas. Enquanto que para *A. cepa* (Tabela 16 e Gráfico 24) todas as concentrações dos Ex C – C e Ex Alc – F e as maiores concentrações das amostras Ex Alc – C, F Hex – C, F Clo – C, F AcEt – C, F Clo - F e F HalcR – F reduziram o conteúdo total de clorofila das plântulas avaliadas.

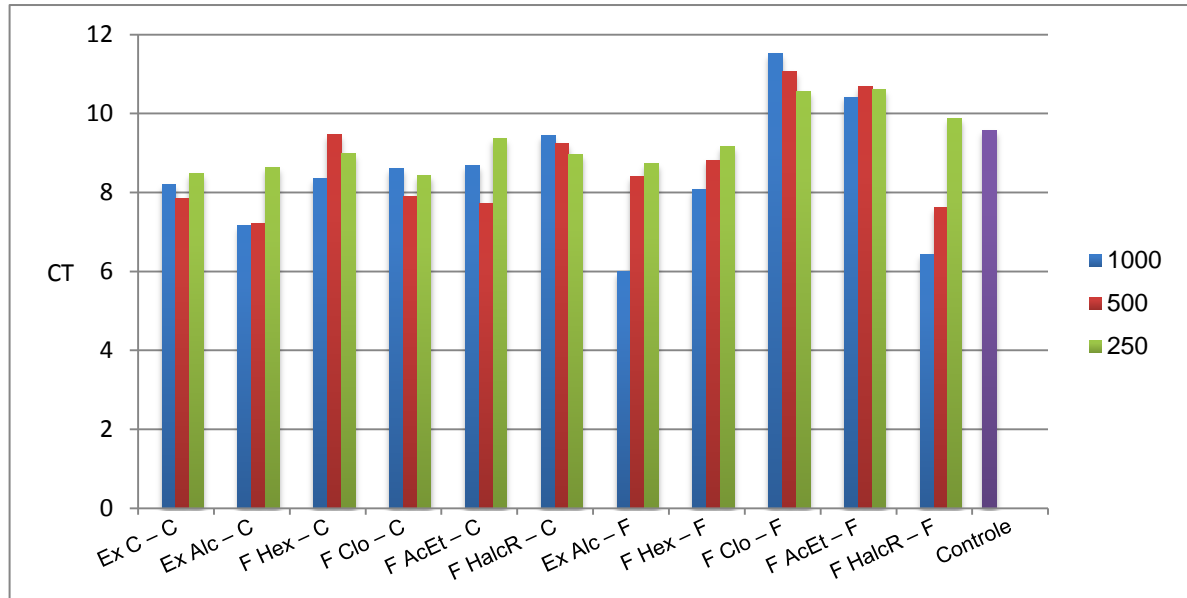
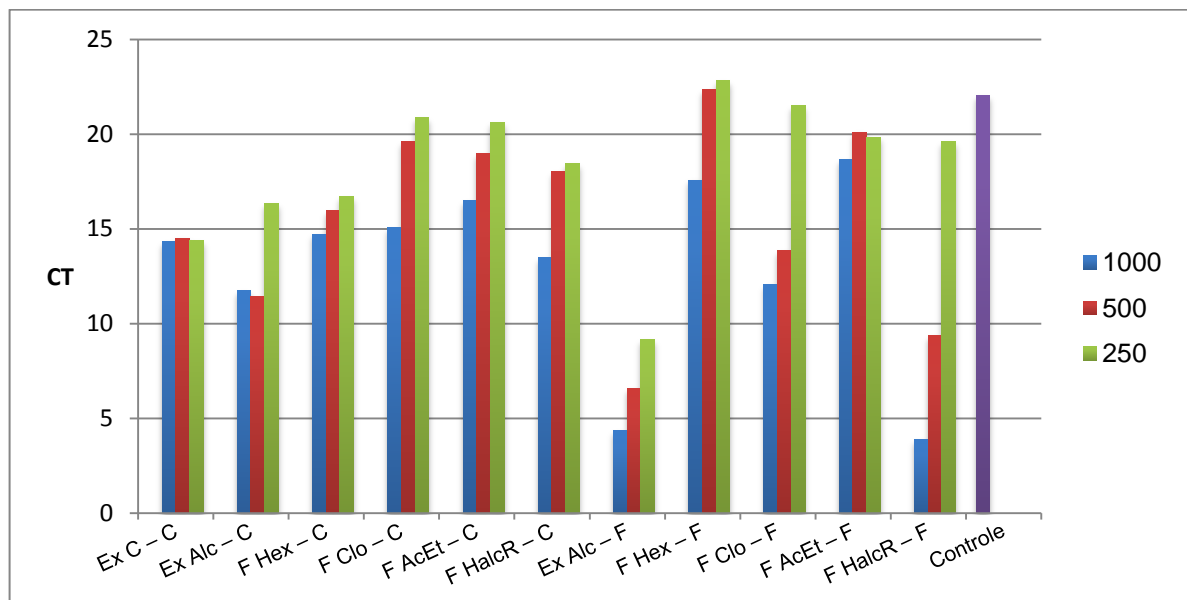
Vários autores têm reportado que algumas classes de aleloquímicos inibem a fotossíntese por induzir mudanças no conteúdo de clorofila das plantas receptoras (EINHELLIG e KUAN, 1971; EINHELLIG e RASMUSSEN, 1979; BLUM e REBBECK, 1989; BAZIRAMAKENGA, SIMARD e LEROUX, 1994; CHOU, 1999).

A aparência clorótica das plantas seria um sintoma da degradação das moléculas de clorofila ou da inibição da sua síntese, ambos os efeitos mediados por aleloquímicos, que impedem a formação das Mg-porfirinas (EINHELLIG, 1986). Em ambos os casos, esses efeitos lembram a atuação dos herbicidas, como as piridazinonas e imidazolinonas (DUKE, 1985; CAYON *et al.*, 1990).

Tabela 16 - Conteúdo total de clorofila

		<i>L. sativa</i>	<i>A. cepa</i>
		CT ± dp	CT ± dp
Controle		9,57±0,25	22,04±0,74
Ex C – C	1000	8,21±0,59 ^{na}	14,31±0,56
	500	7,86±0,78 ^{na}	14,51±1,04
	250	8,48±0,57 ^{na}	14,38±0,56
Ex Alc – C	1000	7,16±0,77	11,74±0,86
	500	7,22±0,76	11,44±0,70
	250	8,63±0,45 ^{na}	16,33±0,71 ^{na}
F Hex – C	1000	8,36±0,32 ^{na}	14,72±0,94
	500	9,46±0,97 ^{na}	15,95±0,66
	250	8,98±0,60 ^{na}	16,68±0,78 ^{na}
F Clo – C	1000	8,61±0,70 ^{na}	15,05±0,34
	500	7,90±1,02 ^{na}	19,58±0,26 ^{na}
	250	8,42±0,78 ^{na}	20,86±0,39 ^{na}
F AcEt – C	1000	8,68±0,77 ^{na}	16,48±0,30
	500	7,71±0,34 ^{na}	18,95±0,26 ^{na}
	250	9,37±0,06 ^{na}	20,62±0,74 ^{na}
F HalcR – C	1000	9,45±1,05 ^{na}	13,48±0,77 ^{na}
	500	9,24±0,72 ^{na}	18,02±0,83 ^{na}
	250	8,97±0,84 ^{na}	18,45±0,61 ^{na}
Ex Alc – F	1000	6,00±0,99	4,37±0,52
	500	8,41±1,07 ^{na}	6,55±1,08
	250	8,73±0,99 ^{na}	9,16±0,50
F Hex – F	1000	8,07±0,34 ^{na}	17,57±0,74 ^{na}
	500	8,82±0,55 ^{na}	22,33±0,82 ^{na}
	250	9,17±0,96 ^{na}	22,82±0,42 ^{na}
F Clo – F	1000	11,52±0,42 ^{na}	12,07±0,98
	500	11,06±0,60 ^{na}	13,86±0,49
	250	10,55±0,46 ^{na}	21,49±0,59 ^{na}
F AcEt – F	1000	10,42±0,91 ^{na}	18,68±0,84 ^{na}
	500	10,69±0,64 ^{na}	20,10±0,70 ^{na}
	250	10,61±0,41 ^{na}	19,84±0,67 ^{na}
F HalcR – F	1000	6,44±0,99	3,88±0,29
	500	7,63±1,08	9,38±0,57
	250	9,87±0,74 ^{na}	19,58±0,92 ^{na}

NOTA: na = A média do tratamento não difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey.

Gráfico 23 - Conteúdo total de clorofila - *L. sativa*Gráfico 24 - Conteúdo total de clorofila - *A. cepa*

5.7.5 Respiração celular

As amostras Ex Alc - F e F HalcR - F (Tabela 17 e Gráfico 25), reduziram a respiração celular das plântulas de *L. sativa* que cresceram com a influência de todas concentrações dos extratos (Ex Alc - F), e da maior concentração da fração (F HalcR - F). Já as amostras F Clo - C, F AcEt - C e F HalcR - C alentaram a

respiração celular das plântulas de *L. sativa*, provavelmente como uma tentativa de auto-proteção. As plântulas de *A. cepa* (Tabela 17 e Gráfico 26) também tiveram a sua respiração reduzida pelas amostras Ex Alc – F (nas duas maiores concentrações) e F HalcR – F (em todas as concentrações), além das maiores concentrações das amostras Ex Clo – C, F Hex – F e F Clo – F. Já as amostras Ex C – C, Ex Alc – C, F AcEt – C, F HalcR – C e F AcEt – F aumentaram a respiração celular das plântulas de *A. cepa*.

A respiração celular também pode ser fortemente afetada pela presença de aleloquímicos (RICE, 1984; REIGOSA, *et al.* 1999; OHNO, 2000) que interferem em várias etapas desse processo em um ou mais níveis, dos quais dependem as respostas observadas (CHON, COUTTS e NELSON, 2000). A juglona, uma naftoquinona isolada das folhas, da casca dos frutos secos e da casca do tronco de indivíduos do gênero *Juglans* (Juglandaceae), pode reduzir em até 90% a respiração das raízes de milho, enquanto o macerado de folhas de artemisia (*Artemisia tridentata* Nutt., Asteraceae) acelera a respiração das células radiculares de pepino, devido à presença de substâncias do grupo das lactonas (DURIGAN e ALMEIDA, 1993). Portanto, a respiração das células radiculares pode ser aumentada ou diminuída, dependendo da natureza química dos compostos presentes nos extratos vegetais empregados.

Song, Zheng e Chun (1996), reporta que as alterações nos processos fisiológicos normais resultam na redução da fotossíntese bem como no aumento da respiração, contribuindo para a redução do crescimento das plantas.

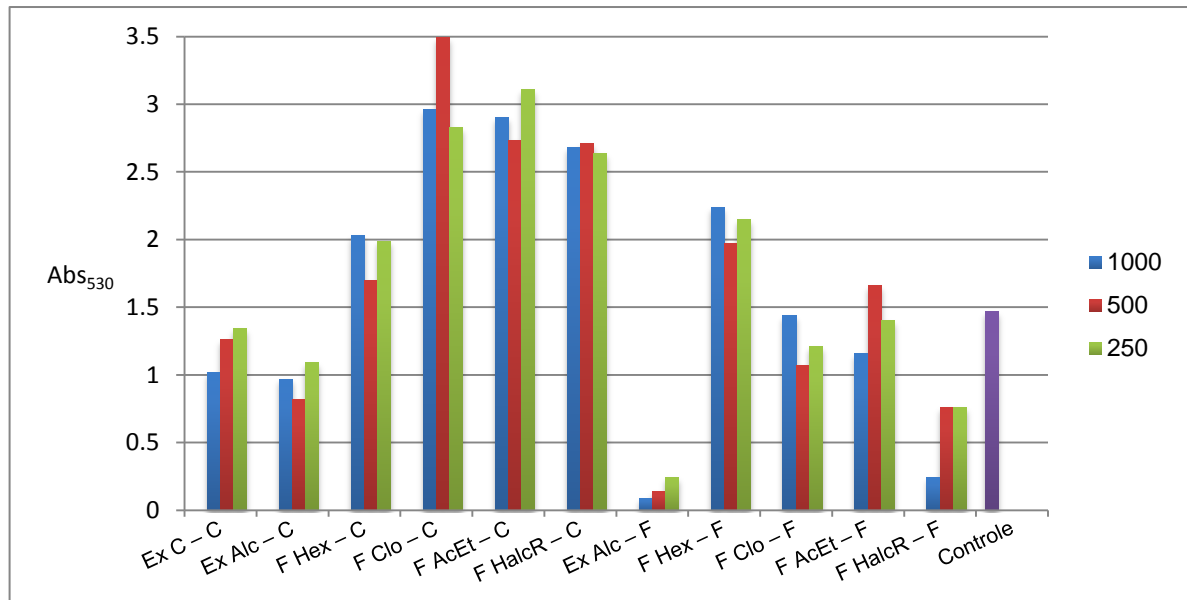
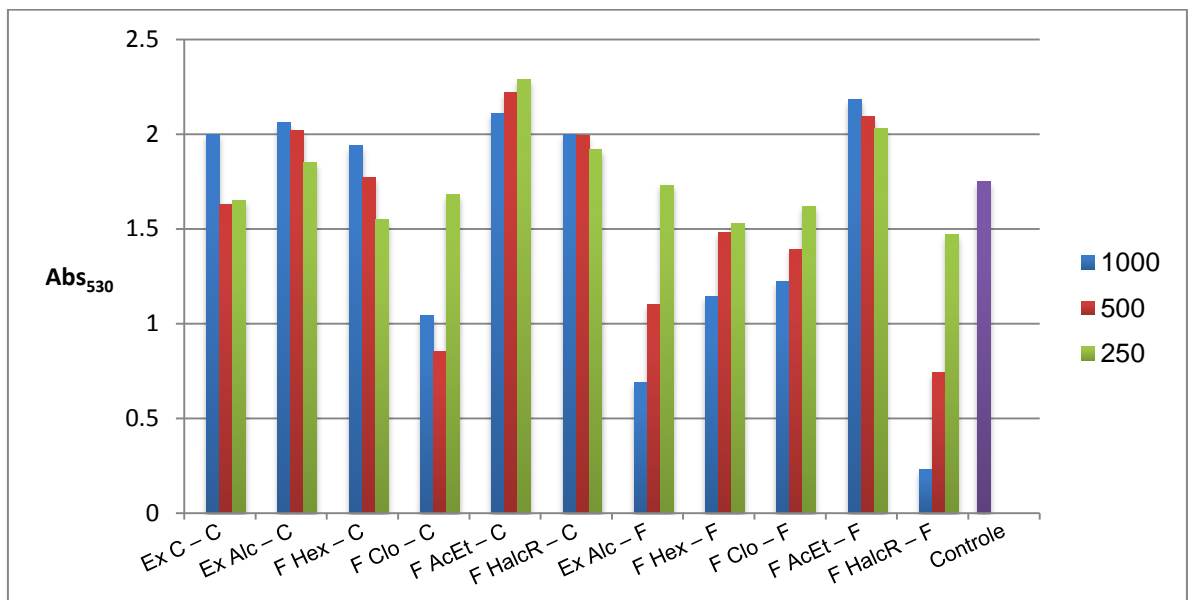
Tabela 17 – Respiração celular

		<i>L. sativa</i>		<i>A. cepa</i>	
		Abs ₅₃₀ ± dp	Tukey	Abs ₅₃₀ ± dp	Tukey
Controle		1,47±0,08	-	1,75±0,04	-
Ex C – C	1000	1,02±0,06	na	2,00±0,08	**
	500	1,26±0,08	na	1,63±0,06	na
	250	1,34±0,12	na	1,65±0,05	na
Ex Alc – C	1000	0,97±0,03	na	2,06±0,03	**
	500	0,82±0,05	na	2,02±0,03	**
	250	1,09±0,09	na	1,85±0,04	na
F Hex – C	1000	2,03±0,05	na	1,94±0,07	na
	500	1,70±0,10	na	1,77±0,07	na
	250	1,99±0,09	na	1,55±0,12	na
F Clo – C	1000	2,96±0,05	**	1,04±0,16	*
	500	3,49±0,02	**	0,85±0,16	*
	250	2,83±0,10	**	1,68±0,09	na
F AcEt – C	1000	2,90±0,06	**	2,11±0,10	**
	500	2,73±0,10	**	2,22±0,07	**
	250	3,11±0,07	**	2,29±0,06	**
F HalcR – C	1000	2,68±0,05	**	2,00±0,08	**
	500	2,71±0,05	**	1,99±0,04	**
	250	2,64±0,09	**	1,92±0,08	na
Ex Alc – F	1000	0,09±0,06	*	0,69±0,03	*
	500	0,14±0,03	*	1,10±0,09	*
	250	0,24±0,04	*	1,73±0,01	na
F Hex – F	1000	2,24±0,09	na	1,14±0,06	*
	500	1,97±0,04	na	1,48±0,05	*
	250	2,15±0,02	na	1,53±0,10	na
F Clo – F	1000	1,44±0,09	na	1,22±0,09	*
	500	1,07±0,06	na	1,39±0,11	*
	250	1,21±0,11	na	1,62±0,01	na
F AcEt – F	1000	1,16±0,11	na	2,18±0,07	**
	500	1,66±0,04	na	2,09±0,11	**
	250	1,40±0,06	na	2,03±0,05	**
F HalcR – F	1000	0,24±0,06	*	0,23±0,05	*
	500	0,76±0,64	na	0,74±0,06	*
	250	0,76±0,03	na	1,47±0,10	*

NOTA: na = A média do tratamento não difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey.

* = Amostras estatisticamente inferiores ao controle.

** = Amostras estatisticamente superiores ao controle.

Gráfico 25 - Respiração celular - *L. sativa*Gráfico 26 - Respiração celular - *A. cepa*

Foi verificada a interferência de várias amostras nas plântulas, com predomínio das Ex Alc - F e F HalcR - F, entretanto quando comparadas ambas as espécies a *L. sativa*, mostrou-se ser mais sensível.

5.7.6 Avaliação do Estresse Oxidativo

Na atividade das enzimas relacionadas ao estresse oxidativo, foi verificado que a produção das enzimas avaliadas variou em função da amostra/concentração e espécie-alvo utilizada. As amostras F AcEt – C (concentração de 1000), F HalcR – C, aumentaram de maneira acentuada a atividade da peroxidase em *L. sativa* (Tabela 18 e Gráfico 27). Em *A. cepa*, foi verificado que as amostras F Hex – F e a F HalcR –F causaram interferência na produção da peroxidase, sendo observada uma baixa atividade (tabela 18 e gráfico 28). Efeito similar foi observado para a atividade da catalase em *A. cepa*, sendo observado que as frações F Hex – C, F Clo – C, F Hex – F, F Clo - F e F HalcR – F (Tabela 19 e Gráfico 29), também causaram redução nos níveis dessa enzima. Em *L. sativa*, a interferência se deu de maneira acentuada, com aumento dos níveis de catalase para as F Hex – C, F Clo – C, F AcEt – C, F HalcR – C, F Hex – F e F AcEt - F (tabela 19 e gráfico 30).

Alterações na produção da peroxidase e catalase, de plantas submetidas a estresse, já foram reportadas na literatura, (WEIR, PARK e VIVANCO, 2004), indicando que tais atividades podem aumentar e/ou diminuir. Com a elevação de concentrações de sais no espaço do citosol a síntese de proteínas e algumas enzimas são bloqueadas inibindo o processo metabólico no vegetal. Contudo, as espécies podem tolerar o estresse, causando o aumento de enzimas antioxidantes (LARCHER, 2000).

A redução da atividade da peroxidase e catalase pode indicar que, em algumas plantas mantidas sob condições de estresse, o peróxido de hidrogênio produzido pode ser mais consumido em processos oxidativos, como na peroxidação de lipídeos, do que eliminado do metabolismo pela ação destas enzimas (CAKMAK e HORST, 1991).

Desta forma, pode-se inferir que o efeito estressante dos extratos e frações tenha causado alterações na estrutura protéica da enzima, diminuindo sua atividade (KALIR e POLJAKOFF-MAYBER, 1981; BROETTO, LUTTGE e RATAJCZAK, 2002).

Tabela 18 - Atividade da peroxidase

		<i>L. sativa</i>		<i>A. cepa</i>	
		UAE/mg.prot ± dp	Tukey	UAE/mg.prot ± dp	Tukey
Controle		1,74±0,54	-	4,13±0,10	-
Ex C – C	1000	2,15±0,31	na	4,06±0,09	na
	500	1,71±0,09	na	3,98±0,15	na
	250	2,98±0,15	na	4,60±0,10	na
Ex Alc – C	1000	2,66±0,15	na	4,10±0,14	na
	500	2,29±0,06	na	3,69±0,12	na
	250	2,71±0,33	na	4,07±0,17	na
F Hex – C	1000	2,04±0,22	na	4,09±0,08	na
	500	0,96±0,04	na	3,92±0,55	na
	250	2,61±0,46	na	3,57±0,16	na
F Clo – C	1000	2,06±0,15	na	3,95±0,25	na
	500	2,26±0,02	na	3,83±0,15	na
	250	2,25±0,09	na	3,27±0,11	na
F AcEt – C	1000	7,82±0,04	**	4,39±0,24	na
	500	1,74±0,16	na	4,08±0,14	na
	250	2,85±0,31	na	3,56±0,12	na
F HalcR – C	1000	7,88±0,57	**	3,74±0,25	na
	500	6,66±0,25	**	3,68±0,30	na
	250	7,15±0,32	**	3,95±0,05	na
Ex Alc – F	1000	0,48±0,30	na	3,84±0,05	na
	500	2,50±0,22	na	4,51±0,58	na
	250	2,87±0,32	na	3,75±0,08	na
F Hex – F	1000	3,27±0,63	na	3,33±0,19	*
	500	2,13±0,31	na	3,11±0,06	*
	250	3,65±0,80	na	3,14±0,12	*
F Clo – F	1000	1,90±0,12	na	4,28±0,30	na
	500	1,91±0,02	na	3,82±0,70	na
	250	1,92±0,01	na	3,60±0,42	na
F AcEt – F	1000	1,92±0,01	na	4,20±0,15	na
	500	1,92±0,02	na	3,82±0,08	na
	250	1,91±0,04	na	4,38±0,17	na
F HalcR – F	1000	1,25±0,82	na	3,34±0,25	*
	500	1,54±0,87	na	3,21±0,15	*
	250	1,89±0,10	na	3,27±0,11	*

NOTA: na = A média do tratamento não difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey. controle.

* = Amostras estatisticamente inferiores ao controle.

** = Amostras estatisticamente superiores ao controle.

Gráfico 27 - Peroxidase - *L. sativa*

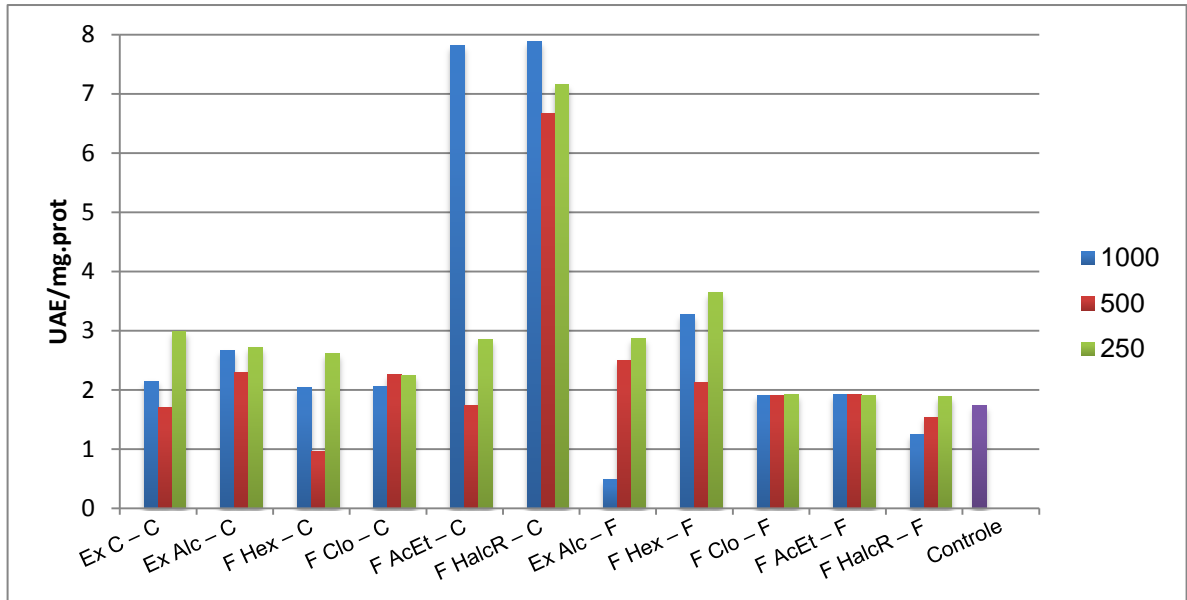


Gráfico 28 - Peroxidase - *A. cepa*

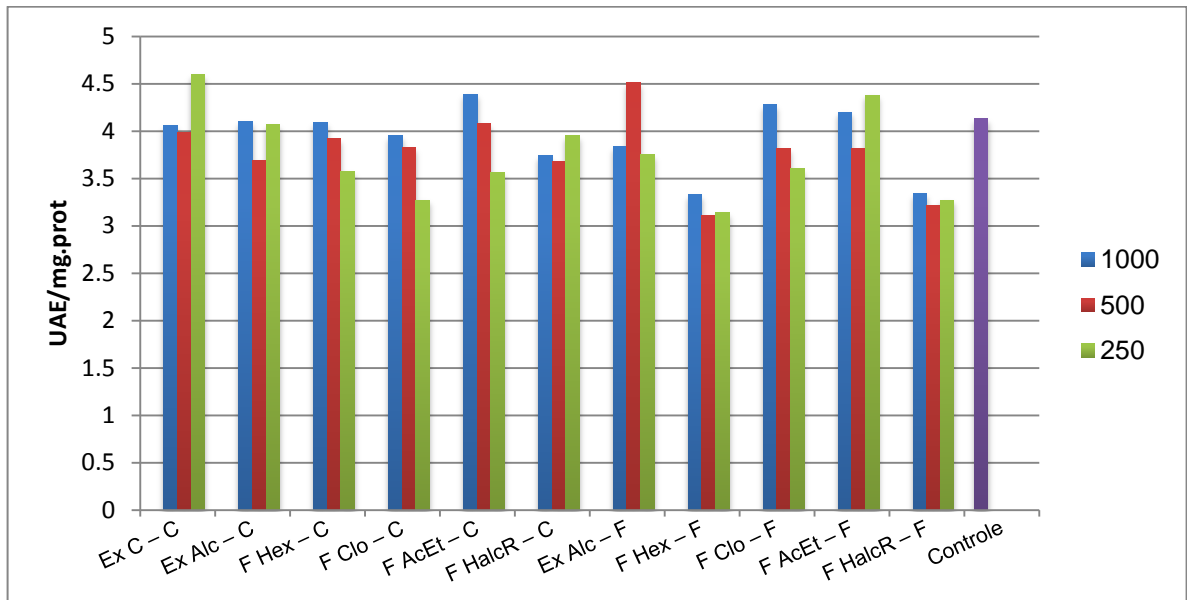


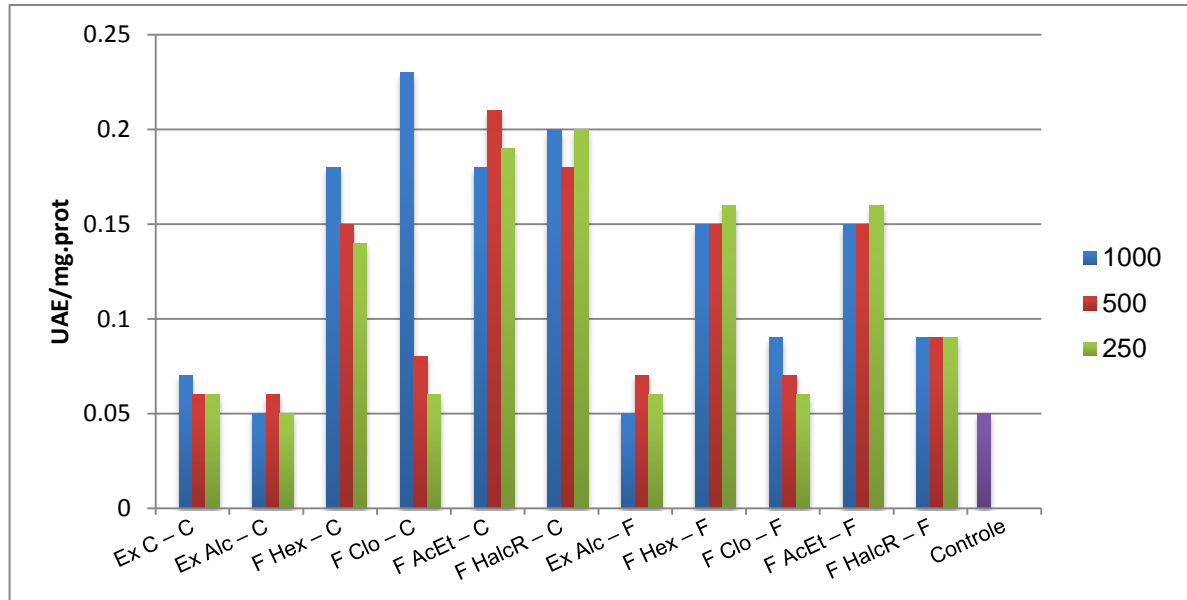
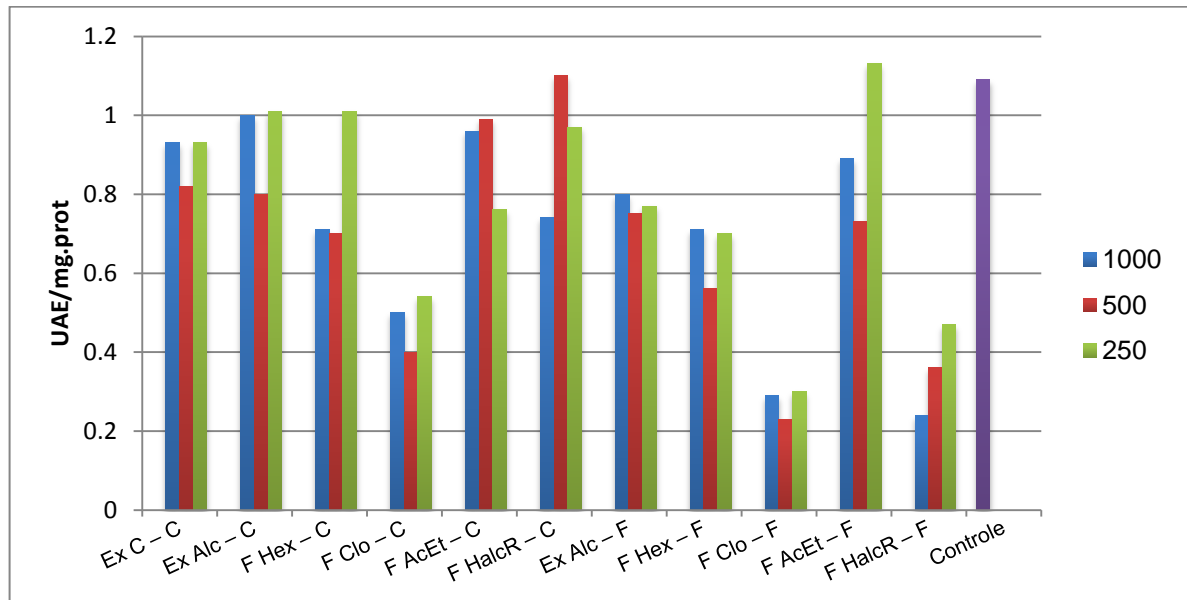
Tabela 19 - Atividade da catalase

		<i>L. sativa</i>		<i>A. cepa</i>	
		UAE.100/mg.prot ± dp	Tukey	UAE.100/mg.prot ± dp	Tukey
Controle		0,05±0,01	-	1,09±0,06	-
Ex C – C	1000	0,07±0,26	na	0,93±0,07	na
	500	0,06±0,12	na	0,82±0,06	na
	250	0,06±0,01	na	0,93±0,07	na
Ex Alc – C	1000	0,05±0,08	na	1,00±0,05	na
	500	0,06±0,12	na	0,80±0,02	na
	250	0,05±0,10	na	1,01±0,03	na
F Hex – C	1000	0,18±0,01	**	0,71±0,05	*
	500	0,15±0,02	**	0,70±0,05	*
	250	0,14±0,01	na	1,01±0,10	na
F Clo – C	1000	0,23±0,04	**	0,50±0,07	*
	500	0,08±0,09	na	0,40±0,04	*
	250	0,06±0,11	na	0,54±0,01	*
F AcEt – C	1000	0,18±0,02	**	0,96±0,09	na
	500	0,21±0,05	**	0,99±0,07	na
	250	0,19±0,07	**	0,76±0,11	na
F HalcR – C	1000	0,20±0,06	**	0,74±0,01	na
	500	0,18±0,03	**	1,10±0,03	na
	250	0,20±0,01	**	0,97±0,03	na
Ex Alc – F	1000	0,05±0,12	na	0,80±0,04	na
	500	0,07±0,11	na	0,75±0,04	na
	250	0,06±0,22	na	0,77±0,03	na
F Hex – F	1000	0,15±0,01	**	0,71±0,03	*
	500	0,15±0,02	**	0,56±0,03	*
	250	0,16±0,01	**	0,70±0,05	*
F Clo – F	1000	0,09±0,01	na	0,29±0,07	*
	500	0,07±0,01	na	0,23±0,01	*
	250	0,06±0,05	na	0,30±0,01	*
F AcEt – F	1000	0,15±0,02	**	0,89±0,04	na
	500	0,15±0,03	**	0,73±0,01	na
	250	0,16±0,01	**	1,13±0,17	na
F HalcR – F	1000	0,09±0,02	na	0,24±0,01	*
	500	0,09±0,03	na	0,36±0,03	*
	250	0,09±0,03	na	0,47±0,02	*

NOTA: na = A média do tratamento não difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey.

* = Amostras estatisticamente inferiores ao controle.

** = Amostras estatisticamente superiores ao controle.

Gráfico 29 - Catalase - *L. sativa*Gráfico 30 - Catalase - *A. cepa*

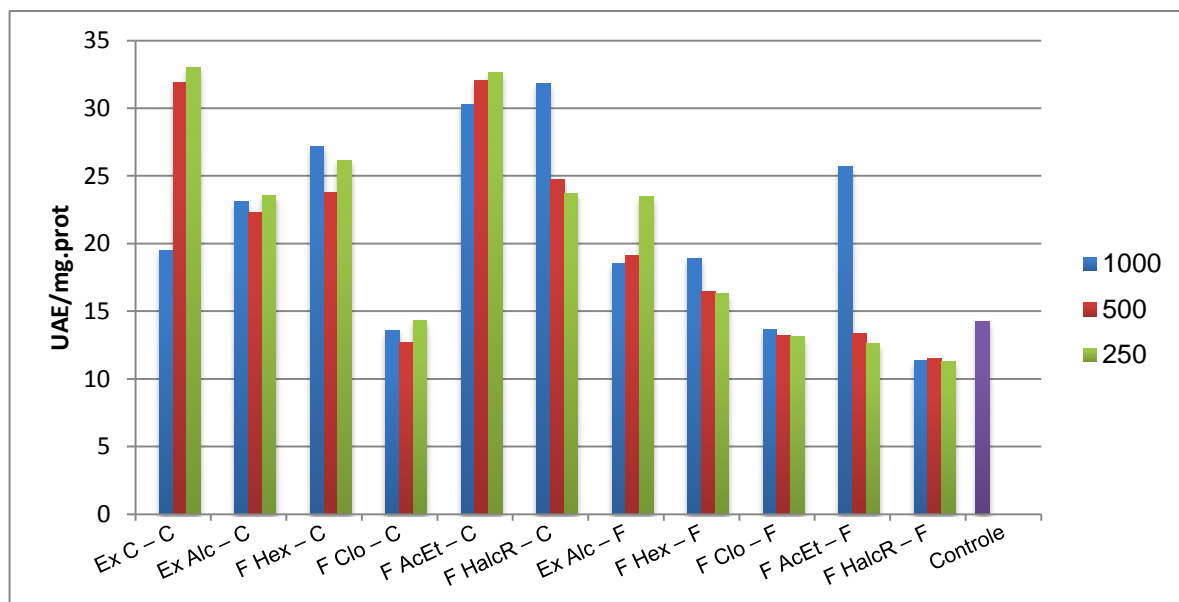
Na atividade da superóxido dismutase, não foi verificado aumento da atividade em *L. sativa* (tabela 19). Entretanto, as amostras Ex C – C, Ex Alc – C, Ex Alc – F, F Hex – C, F AcEt – C, F HalcR – C, F Hex – F e F AcEt – F causaram aumento na produção da superóxido dismutase em cebola (Tabela 20 e Gráfico 31).

Tabela 20 - Atividade da superóxido dismutase

		<i>L. sativa</i>		<i>A. cepa</i>	
		UAE/mg.prot ± dp	Tukey	UAE/mg.prot ± dp	Tukey
Controle		1,92±0,06	-	14,27±0,54	-
Ex C – C	1000	1,94±0,08	na	19,52±1,00	**
	500	1,96±0,04	na	31,89±0,70	**
	250	1,96±0,03	na	33,00±0,45	**
Ex Alc – C	1000	2,00±0,03	na	23,08±1,76	**
	500	1,97±0,02	na	22,30±0,26	**
	250	1,98±0,04	na	23,56±0,98	**
F Hex – C	1000	2,11±0,20	na	27,19±0,25	**
	500	1,94±0,21	na	23,79±1,15	**
	250	2,03±0,54	na	26,17±0,60	**
F Clo – C	1000	1,35±0,39	na	13,57±1,84	na
	500	1,92±0,25	na	12,70±0,16	na
	250	2,03±0,19	na	14,34±3,72	na
F AcEt – C	1000	1,92±0,37	na	30,27±0,51	**
	500	1,60±0,18	na	32,08±0,90	**
	250	2,08±0,19	na	32,65±0,60	**
F HalcR – C	1000	2,14±0,16	na	31,86±0,48	**
	500	1,82±0,57	na	24,75±0,79	**
	250	1,65±0,16	na	23,73±0,57	**
Ex Alc – F	1000	1,97±0,04	na	18,52±1,93	**
	500	1,84±0,17	na	19,13±0,70	**
	250	1,82±0,09	na	23,51±0,81	**
F Hex – F	1000	1,87±0,19	na	18,89±1,13	**
	500	1,92±0,41	na	16,45±0,59	na
	250	2,20±0,18	na	16,32±1,20	na
F Clo – F	1000	1,83±0,13	na	13,66±1,90	na
	500	1,79±0,15	na	13,21±0,69	na
	250	1,71±0,13	na	13,14±2,26	na
F AcEt – F	1000	1,92±0,07	na	25,67±0,94	**
	500	1,92±0,07	na	13,37±1,36	na
	250	1,92±0,07	na	12,62±0,60	na
F HalcR – F	1000	1,88±0,7	na	11,35±1,79	na
	500	1,83±0,22	na	11,50±1,10	na
	250	1,96±0,01	na	11,28±0,42	na

NOTA: na = A média do tratamento não difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey.

** = Amostras estatisticamente superiores ao controle.

Gráfico 31 - Atividade da superóxido dismutase - *A. cepa*

Segundo McDonald (1999), as superóxidos dismutase catalisam a reação de dismutação de radicais superóxidos livres produzidos em diferentes locais na célula para oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio, sendo este último decomposto pela atividade da catalase, onde peróxido de hidrogênio é transformado em oxigênio e água. A fase de plântula é muito sensível a estresses e quando elevados provocam danos irreversíveis à planta.

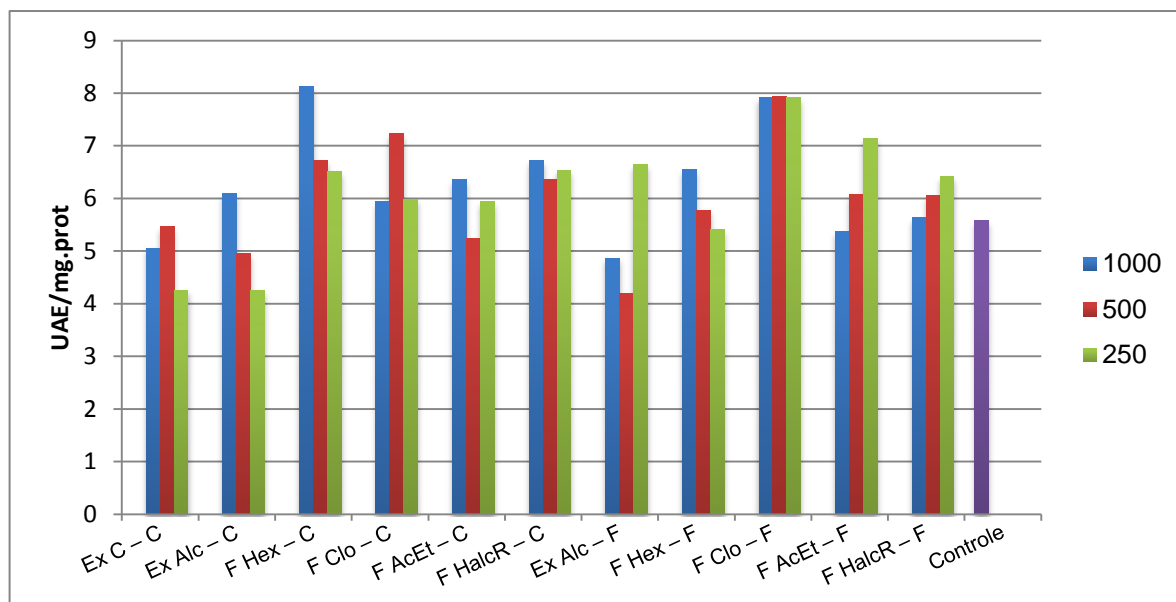
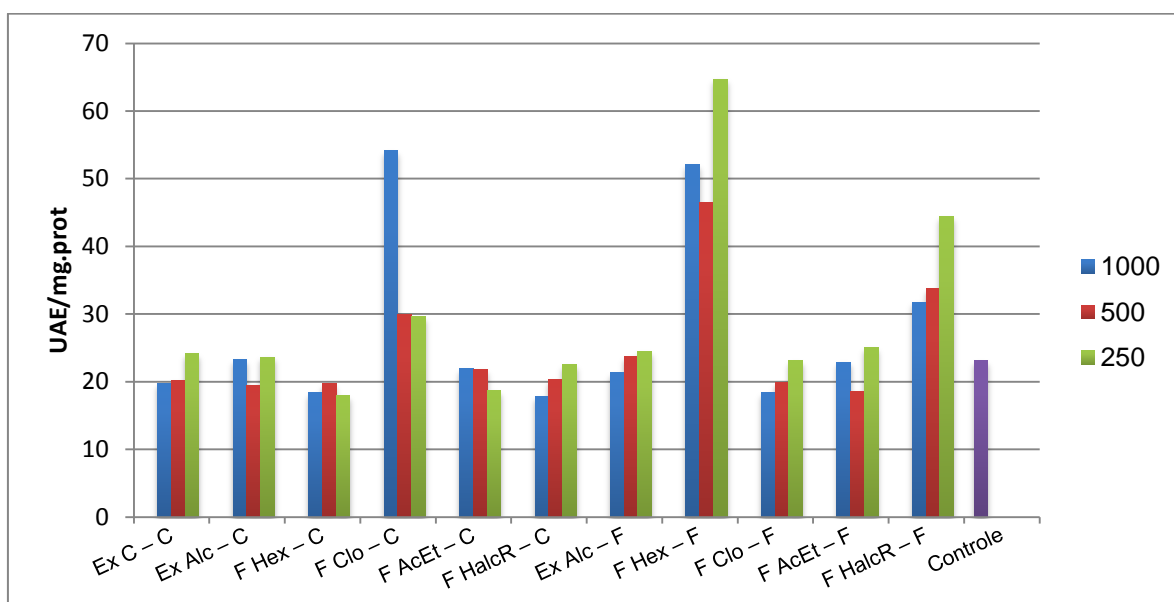
Para a polifenoloxidase, foi verificado que as amostras F Hex – C (concentração de 1000) e F Clo – F, causaram aumento significativo da polifenoloxidase em plântulas de *L. sativa* (Tabela 21 e Gráfico 32). Em *A. cepa*, também houve aumento da atividade das plântulas submetidas as amostras F Clo – C, F Hex – F e F HalcR – F (Tabela 21 e Gráfico 33).

Tabela 21 - Atividade da Polifenoloxidase

		<i>L. sativa</i>		<i>A. cepa</i>	
		UAE/mg.prot ± dp	Tukey	UAE/mg.prot ± dp	Tukey
Controle		5,59±0,05	-	23,13±0,68	-
Ex C – C	1000	5,06±0,33	na	19,77±0,63	na
	500	5,47±0,30	na	20,24±0,71	na
	250	4,26±0,28	na	24,14±0,39	na
Ex Alc – C	1000	6,10±0,28	na	23,29±0,41	na
	500	4,96±0,20	na	19,49±0,33	na
	250	4,26±0,37	na	23,61±0,99	na
F Hex – C	1000	8,12±0,03	**	18,40±0,15	na
	500	6,72±0,03	na	19,75±0,41	na
	250	6,51±0,08	na	17,95±0,58	na
F Clo – C	1000	5,94±0,09	na	54,11±0,58	**
	500	7,23±0,99	na	29,98±0,03	**
	250	5,99±0,30	na	29,68±0,11	**
F AcEt – C	1000	6,36±0,26	na	21,90±0,84	na
	500	5,24±0,23	na	21,85±0,12	na
	250	5,94±0,26	na	18,62±1,00	na
F HalcR – C	1000	6,72±0,23	na	17,82±0,24	na
	500	6,36±0,48	na	20,32±0,91	na
	250	6,54±0,10	na	22,52±0,86	na
Ex Alc – F	1000	4,87±0,21	na	21,29±0,69	na
	500	4,19±0,41	na	23,76±0,49	na
	250	6,65±0,34	na	24,45±0,13	na
F Hex – F	1000	6,55±0,11	na	52,06±0,33	**
	500	5,78±0,23	na	46,45±0,45	**
	250	5,41±0,29	na	64,70±2,46	**
F Clo – F	1000	7,91±1,61	**	18,42±1,28	na
	500	7,93±0,29	**	19,91±0,78	na
	250	7,92±1,61	**	23,10±0,32	na
F AcEt – F	1000	5,37±0,13	na	22,90±0,51	na
	500	6,08±0,27	na	18,51±0,42	na
	250	7,14±0,39	na	25,01±0,61	na
F HalcR – F	1000	5,64±0,09	na	31,74±1,58	**
	500	6,05±0,50	na	33,72±1,49	**
	250	6,42±0,33	na	44,36±0,36	**

NOTA: * na = A média do tratamento não difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey.

** = Amostras estatisticamente superiores ao controle.

Gráfico 32 - Polifenoloxidase - *L. sativa*Gráfico 33 - Polifenoloxidase - *A. cepa*

A polifenoloxidase está diretamente envolvida na via metabólica dos fenóis, e geralmente está associada à resistência de plantas a doenças (BUTT e LAMB, 1980). Quando associadas à catalase, peroxidase e superóxido dismutase, contribui na resposta de plantas ao estresse (PASSARDI *et al*, 2005; ALMAGRO *et al*, 2009). Esse aumento nas plântulas avaliadas, juntamente com a diminuição no teor de clorofila e respiração sugere que a produção de espécies reativas de oxigênio ocorreu durante o crescimento das plântulas.

Comparando-se os resultados, observa-se que *A. cepa* foi mais sensível do que *L. sativa*, e que apesar das amostras Ex Alc – F e F HalcR – F provocarem efeito mais acentuado no crescimento das espécies avaliadas, as outras frações das folhas e cascas que não apresentaram tal efeito, e mostraram atividade pronunciada quando estudado o estresse oxidativo. Esse tipo de efeito já foi reportado por Bais *et al.*, (2003), sugerindo que o aumento da atividade das enzimas antioxidantes, sem alterações no padrão de germinação e crescimento, é provavelmente um efeito secundário de muitos aleloquímicos.

Dessa forma, pode-se inferir que existem várias substâncias com atividade alelopática presentes em *D. vestita*, porém a mais ativa, ou a maior proporção destas se encontra presentes nas folhas e são de caráter mais polar. Através dos resultados obtidos também pode-se concluir que essas substâncias presentes não possuem um único mecanismo de ação, interferindo em várias enzimas, e até mesmo no DNA das plântulas. Essa atividade alelopática, apesar de não ser descrita para a espécie em estudo, já foi descrita como provável, devido a observações de outras espécies do gênero, aonde se verificou que ervas daninha e arbustos que crescem em torno de *Duranta* normalmente não são saudáveis (HIRADATE *et al.*, 1999).

5.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Como mostra na tabela 22, os três extratos apresentaram atividade antimicrobiana, principalmente contra *S. aureus*. Sendo que o Ex C – C também apresentou uma boa atividade contra *P. aeruginosa*. No entanto nenhuma das frações apresentou atividade antimicrobiana nas concentrações testadas. Isso pode ser explicado pelo fato que às vezes não é uma única substância que possui atividade, mas sim um conjunto de substâncias, que quando interagem entre si, apresentam uma dada atividade.

Tabela 22 - CIM das amostras frente a *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *E. faecalis*

	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i>
Ex C – C	625	5000	2500	>5000
Ex Alc – C	625	5000	5000	>5000
F Hex – C	>200	>200	>200	>200
F Clo – C	>200	>200	>200	>200
F AcEt – C	>200	200	>200	>200
F HalcR – C	>200	200	>200	>200
Ex Alc – F	312	5000	5000	>5000
F Hex – F	>200	200	>200	>200
F Clo – F	>200	>200	>200	>200
F AcEt – F	200	200	>200	>200
F HalcR – F	>200	200	>200	>200

5.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA

5.9.1 Ensaio da Atividade Hemolítica em Tubos

Pelos resultados mostrados na tabela 23, o teste de hemólise em tubos foi positivo apenas para a F HalcR – F nas concentrações de 1000 e 500 µg/mL. Na concentração de 200µg/mL houve a ocorrência de hemólise parcial, resultado negativo segundo a OMS, o que também foi observado no Ex Alc – F.

Tabela 23 - Avaliação da atividade hemolítica em tubos

	100 µg/mL	200 µg/mL	500 µg/mL	1000 µg/mL
Ex C – C	-	-	-	-
Ex Alc – C	-	-	-	-
Ex Alc – F	-	-	-*	-*
F Hex – C	-	-	-	-
F Clo – C	-	-	-	-
F AcEt – C	-	-	-	-
F HalcR – C	-	-	-	-
F Hex – F	-	-	-	-
F Clo – F	-	-	-	-
F AcEt – F	-	-	-	-
F HalcR – F	-	-*	+	+
Verbascosídeo	-	-	-	-

NOTA: += positivo, - = negativo, -*=hemólise parcial

5.9.2 Ensaio da Atividade Hemolítica em Agar Sangue

Como mostra a tabela 24 e a figura 33, no teste de hemólise em ágar sangue, as amostras Ex Alc – F e F HalcR – F apresentam halos grandes, 70,0% e 67,5% de hemólise, respectivamente, confirmando o resultado obtido na hemólise de tubos. As amostras Ex C – C e F Clo – C, apresentaram halos pequenos, 42,5% e 33,8%, respectivamente. A baixa capacidade hemolítica destas amostras nessa concentração provavelmente impediu a detecção da atividade hemolítica no teste em tubos. O resultado positivo indica que essas amostras possuem uma provável citotoxicidade e bioatividade (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Tabela 24 - Formação de alo na atividade hemolítica em ágar sangue

	Halo (cm)	% Hemólise
Ex C – C	0,90x0,80	42,50
Ex Alc – C	nfa	0,00
Ex Alc – F	1,40x1,40	70,00
F Hex – C	nfa	0,00
F Clo – C	0,70x0,650	33,75
F AcEt – C	nfa	0,00
F HalcR – C	nfa	0,00
F Hex – F	nfa	0,00
F Clo – F	nfa	0,00
F AcEt – F	nfa	0,00
F HalcR – F	1,40x1,30	67,50
Verbascosídeo	nfa	0,00
Saponinas	2,00x2,00	100,00

NOTA: nfa= não formou halo

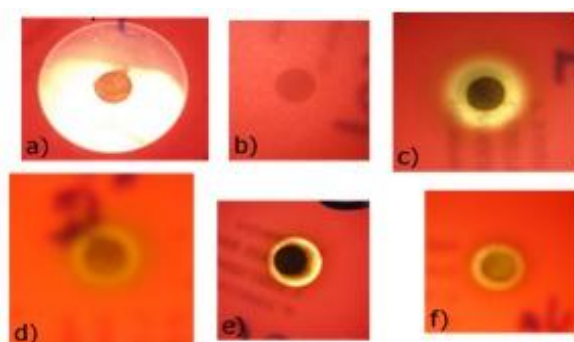


Figura 33 - Avaliação da atividade hemolítica em ágar sangue

NOTA: a) Controle positivo de saponinas; b) Controle negativo ; c) Ex Alc – F; d) F HalcR – F; e) Ex C – C; f) F Clo - C

6 CONCLUSÃO

Considerando os objetivos propostos para este trabalho de estudo da composição fitoquímica e avaliação das atividades antioxidante, microbiológica, alelopática e toxicidade pode-se fazer algumas conclusões:

- A espécie *Duranta vestita* Cham. Planch, pertencente à família Verbenaceae, não apresenta descrição na literatura sobre sua composição fitoquímica. Em uma pesquisa fitoquímica preliminar, esta espécie evidenciou a presença de grupos fitoquímicos como: flavonoides (flavonóis e heterosídeos flavônicos), cumarinas, triterpenos, taninos condensados e hidrolisáveis, antraquinona, alcaloides, esteroides, saponinas, ácidos fixos e aminogrupos.

- Foi isolado e identificado a substância verbascosídeo, que se apresenta em maior concentração na planta, podendo ser utilizado como marcador fitoquímico para *D. vestita*. Sendo que a F AcEt – F tem 91% dessa substância, enquanto os extratos tem de 15 a 24%.

- A atividade antioxidante, nos dois métodos testados (redução do complexo do fosfomolibdênio e do radical DPPH) foi expressiva. A F AcEt – C, a F HalcR – F e a substância verbascosídeo apresentaram uma boa atividade pelas duas metodologias, provavelmente devido a presença de flavonóides nas frações, apesar da segunda apresentar uma atividade estatisticamente inferior a primeira, em ambas metodologias. Já a F AcEt – F apresentou boa atividade frente ao DPPH, enquanto as amostras Ex Alc – F e F HalcR – C apresentou boa atividade pela metodologia do fosfomolibdênio.

- Na atividade antimicrobiana verificou-se que apenas os extratos brutos (Ex C – C, Ex Alc – C e Ex Alc – F) apresentaram atividade significativa, sendo essa atividade contra *S. aureus*, além do Ex C – C também ter apresentado atividade contra *P. aeruginosa*.

- O teste de toxidade contra o microcrustáceo *Artemia salina*, mostrou que apenas as amostras Ex Alc – F e F HalcR – F apresentaram toxicidade.

- O teste de hemólise mostrou que as amostras Ex C – C e F Clo – C apresentaram uma baixa atividade hemolítica enquanto que o Ex Alc – F e a F HalcR – F apresentaram uma alta atividade hemolítica.

- Nos bioensaios de atividade alelopática mostrou que todas as amostras de alguma forma possuem uma atividade alelopática, porém *A. cepa* foi mais sensível

que *L. sativa* quando se avalia o crescimento e o estresse oxidativo. As amostras com atividade mais significativa foram as Ex Alc – F e a F HalcR – F (atividade superior a 50%), as quais mostraram inclusive a capacidade de interferir na divisão celular.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods Enzymology**. v. 105, p. 121-126, 1984.
- AHMAD, N. *et al.* Reperins A–D, four new antioxidative coumarinlignoids from *Duranta repens* Linn. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, p. 3521-5324, 2009.
- AHMED, W. S. *et al.* New triterpene saponins from *Duranta repens* linn. and their cytotoxic activity. **Molecules**, v. 14, p. 1952-1965, 2009.
- ALMAGRO, L. *et al.*, Class III peroxidases in plant defence reactions. **J. Exp. Bot.** v. 60, p. 377–390, 2009.
- ALVES, C. Q. *et al.* Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos, **Quim. Nova**. v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- ALVES, E. G. *et al.* Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras, **Quim. Nova**. v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.
- ALVES, M. da C. S. *et al.* Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface, **Pesq. agropec. bras.** v.39, n.11, p.1083-1086, nov., 2004.
- ANDRADE JÚNIOR, D. R de *et al.* Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v. 31, n. 1, 2005
- ANIS, I. *et al.* Thrombin inhibitory constituents from *Duranta repens*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 84, p. 649-655, 2001.
- ANIS, I. *et al.* Enzyme inhibitory constituents from *Duranta repens*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 50, n. 4, p. 515-518, 2002.
- ANVISA. **Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos**, Brasília, 2003, p. 23.
- AOAC (Association Of Official Agricultural Chemists). **Official methods of analysis**.

10 ed. Washington: Editorial Board, 909p, 1965.

ARNON, D. J. Copper enzymes in isolated chloroplast polyphenoloxidases in *Beta vulgaris*. **Plant Physiol**, v. 24, p. 1-15, 1949.

AYRES, M.C.C *et al.* Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*, **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, n. 1, p. 90-97, jan./mar., 2008.

BAIS, H. P. *et al.*, Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions. **Science** v. 301, n. 5638, p. 1377-1380, 2003.

BARNES, J. P. *et al.* Isolation and characterization of allelochemicals in rye herbage, **Phytochemistry**, v. 26 n. 5, p. 1385-1390, 1987.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo, **Quim. Nova**. v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BAZIRAMAKENGA, R.; SIMARD, R. R.; LEROUX, G. D. Effects of benzoic and cinnamic acids on growth, mineral composition and chlorophyll content of soybean. **Journal of Chemical Ecology**, v. 20, p. 2821-2833, 1994.

BLOKHINA, O.; VIROLAINEN E.; K. V. Fagerstedt. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Ann. Bot.** v. 91, n. 2, p. 179–194, 2003.

BLUM, U.; REBBECK, J. Inhibition and recover of cucumber roots given multiple treatments of ferulic acid in nutrient culture. **Journal of Chemical Ecology**, v. 15, p. 917-928, 1989.

BOKOV, A.; CHAUDHURI, A.; RICHARDSON, A. The role of oxidative damage and stress in ageing, **Mechan. Ageing Devel.** v. 125, p. 811-826, 2004.

BORELLA, J.; PASTORINI, L. H. Biotemas Influência alelopática de *Phytolacca dioica* L. na germinação e crescimento inicial de tomate e picão-preto, v. 22, n. 3, p. 67-75, set., 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para a Análise de Sementes**, SNDA/DNDU/CLU, Brasília, v.2, 2009.

BRITO, A. R. M. S.; BRITO, A. A. S. Forty years of Brazilian medicinal plant research, **J. of Ethnopharmacol.** v. 49, n. 2, p. 53-67, 1993.

BRITO, I. C. A. **Alelopatia de espécies arbóreas da caatinga na germinação e vigor de sementes de feijão macaçar e de milho.** 53 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2010.

BROETTO, F.; LUTTGE, U.; RATAJCZAK, R. Influence of light intensity and salt treatment on mode of photosynthesis and enzymes of the antioxidative response system of *mesembryanthemum crystallium*, functional. **Plant Biology**, v. 29, p. 13-23, 2002.

BUTT, V. S.; LAMB, C. J. Oxygenase and the metabolism of plant products. In: CONN, E.E., ed. **The Biochemistry of plants: secondary products.** New York, Academic Press. v. 7, p. 627-665, 1980.

CARMAK, I.; HORST, W. J. Effect of Al lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max* L.). **Physiologia Plantarum**, v. 834, p. 463-468, 1991.

CARMO, F. M. da S.; BORGES, E. E. L.; TAKAKI, M. Alelopatia de extratos aquosos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer). **Acta Botânica Brasileira**, v. 21, n. 3, 2007.

CARVALHO, J. **Florística e estrutura do estrato de regeneração de uma floresta ombrófila mista aluvial, rio Barigui, Araucária, PR.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal), Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

CAVALCANTE, M. F. *et al.* Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* Leach, **Quim. Nova**. v. 23, n. 1, p. 20-22, 2000.

CAYON, D. G. *et al.* Teores de clorofila e proteína bruta em soja (*Glycine max* (L.) Merrill) tratada com imazaquin. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 2, p. 33-40, 1990.

CHAN-BACAB, M. J. *et al.* Variation of leishmanicidal activity in four populations of *Urechites andrieuxii*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 86, p. 243-247, 2003.

CHOI, C. W. *et al.* Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison, **Plant Science**. v. 163, p.1161-1168, 2002.

CHON, S-U.; COUTTS, J. H.; NELSON, C. J. Effects of light, growth media and seedling orientation on bioassays of alfaa autotoxicity. **Agronomy Journal** v. 92, p. 715-720, 2000.

CHOU, C. H. Roles of allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 18, p. 609-636, 1999.

CLSI (National Committee for Clinical Laboratory Standards). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. 8 ed., M7-A8, 2009.

CONFORTI, F. *et al.* Antioxidant activity of methanolic extract of *Hypericum triquetrifolium* Turra aerial part. **Fitoterapia**, v. 73, n. 6, p. 479-483, 2002.

CORREIA, N. M.; CENTURION, M. A. P. C.; ALVES, P. L. C. A. Influência de extratos aquosos sobre a germinação e o desenvolvimento de plântulas de soja. **Ciência Rural**, v. 3, n. 35, p.498-503, 2005.

DALL'STELLA, D. S. G. **Estudo fitoquímico de *Dorstenia multiformis* Miquel (Moraceae) e de suas ações antibacteriana, antifúngica, alelopática, antioxidante e toxicológica**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

DAYAN, F. E.; ROMAGNI, J. G.; DUKE, S.O. Investigating the mode of action of natural phytotoxins, **Journal of Chemical Ecology**. v. 26, n. 9, p. 2079-2093, 2000.

DE SMET, P. A. G. M.; BROUWERS, J. R. B. J. Pharmacokinetic evaluation of herbal remedies. **Clinical pharmacokinetics**, v. 32, n. 6, p. 427-436, 1997.

DEL RIO, L. A. *et al.* Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. **J. Exp. Bot.** v. 53, n. 372, p. 1255-1272, 2002.

DUANGMAL, K.; APENTEN, R. K. O., A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano), **Food Chemistry**. v. 64, p. 351-359, 1999.

DUKE, S. O. Effects of herbicide on nonphotosynthetic biosynthetic process. In: DUKE S.O (ed.) **Weed Physiology**. Vol. II. Boca Raton, CRC Press, 1985. p. 91-112.

DURIGAN, J. C.; ALMEIDA, F. S. **Noções sobre a alelopatia**. Jaboticabal: UNESP/FUNEP, 1993. 28p.

EFING, L. M. A. C., **Compostos bioativos do material resinoso, subproduto do processamento da erva- mate**. Tese (Doutorado em Tecnologia de alimentos) Setor de tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

EINHELLIG, F. A. Mechanisms and modes of action of allelochemicals. In: PUTNAM, A.R., TANG, C.H.-S. (eds.). **The Science of Allelopathy**. Nova York, John Wiley and Sons, 1986, p. 171-188.

EINHELLIG, F. A.; KUAN, L. Effects of scopolin on growth, CO₂ exchange rates, and concentration of scopolin, scopolin and chlorogenic acids in tobacco, sunflower and pigweed. **Bulletin Torrey Botanical Club**, v. 98, p.155-162, 1971.

EINHELLIG, F. A.; RASMUSSEN, J. A. Effects of tree phenolics acids on chlorophyll content and growth of soybean and grain sorghum. **Journal of Chemical Ecology**, v.5, p. 815-24, 1979.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia, **R. Bras.Fisiol.Veg.** v. 12, p. 175-204, 2000.

FLORASBS: Baga-de-pomba - *Duranta vestita*. Disponível em: <<http://sites.google.com/site/florasbs/verb-e/baga-de-pomba>>. Acesso em: 19/08/2010.

FUNDAÇÃO DE PESQUISAS FLORESTAIS DO PARANÁ. **A floresta com Araucaria no Paraná**: conservação e diagnóstico dos remanescentes florestais. Brasília: Ministério do meio ambiente, 2004.

GAIKWAD, P. *et al.* Antioxidant activities of phenols in different solvents using DPPH assay, **Res Chem Intermed.** v. 36, p. 1065–1072, 2010.

GANDHI, V. M.; CHERIAN, K. M. Red cell haemolysis test as an *in vitro* approach for the assessment of toxicity of karanja oil, **Toxicology In Vitro**. V. 14, p. 513-516, 2000.

GERING, B.; WITCHEL, M. Phytochemical investigations on *Penstemon hirsutus*, **J. Nat Prod**. v. 50, p. 1048-1054, 1987

GNIAZDOWSKA, A.; BOGATEK, R. Allelopathic interactions between plants. Multisite action of allelochemicals. **Acta Physiol. Plant**. v. 27, p. 395-407, 2005.

GOLDFARB, M.; PIMENTEL, L. W.; PIMENTEL, N. W. Alelopatia: relações nos agroecossistemas, **Tecnol. & Ciên. Agropec**. v. 3, n. 1, p. 23-28, fev., 2009.

GRAY, T. M.; ARNOYS, E. J.; BLANKESPOOR, S. Destabilizing effect of proline substitutions in two helical regions of T4 lysozyme: Leucine 66 to proline and leucine 91 to proline. **Protein Science**, v. 5, p. 742-751, 1996.

GÜLÇİN, İ. *et al.* Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts, **Food Chemistry**. v. 83, n. 3, p. 371-382, nov., 2003.

GUPTA, A. S. *et al.* Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress,. **Plant Physiology**. v. 103, p. 1067-1073, 1993.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free radicals in biology and medicine**. New York: Oxford University, 1999.

HAMMOND-KOSACK, K.E; JONES, J.D. Resistance gene-dependent plant defense responses. **Plant Cell**, v. 8, n. 10, p. 1773-1791, 1996.

HIRADATE, S, *et al.* Three plant growth inhibiting saponins from *Duranta repens*. **Phytochemistry**, v. 52, n. 7, p. 1223-1228, 1999.

IQBAL, K., *et al.* α -Glucosidase Inhibitory Constituents from *Duranta repens*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 52, n. 7, p. 785-789, 2004.

JOLY, A. B. **Botânica**: Introdução à taxonomia vegetal. 10. ed. São Paulo: Companhia Editira Nacional, 1991.

JORDÃO JÚNIOR, A. A.; *et al.* Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutathione reduzida e da vitamina E **Medicina Ribeirão Preto**, v. 31, p. 434-449, jul./set, 1998.

JUDD, W. S. *et al.* **Plant Systematics: A Phylogenetic approach**. 3 ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2008.

KALIR, A.; POLJAKOFF-MAYBER, A.; Changes in activity of malate dehydrogenase, catalase, peroxidase and superoxido dismutase in leaves of *Halimione portulacoides* L. aellen exposed to high sodium chloride concentrations. **Annals of Botany**. v. 47, p. 75-85, 1981.

KEDARE, S. B.; SINGH, R. P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay, **J Food Sci Technol**. v. 48, n. 4, p. 412-422, 2011.

KHAN, M. A.; HUSSAIN, I.; KHAN, E. A. Allelopathic effects of eucalyptus (*Eucalyptus camaldulensis* L.) on germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum* L.), **Pak. J. Weed Sci. Res.** v. 14, n. 1-2, p. 9-18, 2008.

KUBLIK, H. *et al.*, Nasal absorption of 17- β estradiol from different cyclodextrin inclusion formulations in sheep, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 42, p. 320-324, 1996.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. 2. ed. São Carlos: Rima, 2000.

LEHUÉDÉA, J. *et al.* Synthesis and antioxidant activity of new tetraarylpyrroles, **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 34, n. 11, p. 991-996, 1999.

LEWAN, L.; ANDERSON, M.; MORALES-GOMEZ, P. The use of *Artemia salina* in toxicity testing. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 20, p. 297-301, 1992.

LICHTENTHALER, B. K., Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes, **Methods Enzimol**, v. 148, p. 350-382, 1987.

LOPES, R. K.; RITTER, M. R.; RATES, S. M. K. Revisão das atividades biológicas e toxicidade das plantas ornamentais mais utilizadas no Rio Grande do Sul, Brasil **R. bras. Bioci.** v. 7, n. 3, p. 305-315, jul./set., 2009.

MACIAS, A. F.; *et al.* Sesquiterpene lactones as allelochemicals. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 5, p. 795-800, 2006.

MACÍAS, F. A. *et al.* Allelopathy – A natural alternative for weed Control, **Pest Management Science**. v. 63, p. 327-348, 2007.

MACIAS, F. A.; CASTELLANO, D.; MOLINILLO, J. M. G. Search for a standart phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species, **Journal Agricultural and Food Chemistry**. v. 48, n. 6, p. 2512-2521, 2000.

MACRAE, W. D.; HUDSON, J. B.; TOWERS, G. H. Studies on the pharmacological activity of Amazonian Euphorbiaceae, **Journal of Ethnopharmacology**. v. 22, p. 143-172, 1988.

MAGALHÃES, L. M., *et al.* Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties, **Analytica Chimica Acta**. v. 613, p. 1-19, 2008.

MAKSYMIEC, W.; KRUPA, Z. The effects of short-term exposition to Cd, excess Cu ions and jasmonate on oxidative stress appearing in *Arabidopsis thaliana*. **Env. Exp. Bot.** v. 57, n. 1-2, p. 187-194, 2006.

MARASCHIN-SILVA, F.; AQUILA, M. E. A. Potencial alelopático de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq., **Sér. Bot.** v. 60, n. 1, p. 91-98, jan./jun. 2005.

MARQUES, M. R.; XAVIER-FILHO, J. Enzymatic and inhibitory activities of cashew tree gum exudates, **Phytochemistry**. v. 30, n. 5, p. 1431-1433, 1991.

MATHIESENA, L.; MALTERUDB, K. E.; SUNDA, R. B. Hydrogen bond formation as basis for radical scavenging activity: a structure–activity study of c-methylated dihydrochalcones from *Myrica gale* and structurally related acetophenones, **Free Radical Biology and Medicine**. v. 22, n. 1-2, p. 307-311, 1997.

McDONALD, M. B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. **Seed Science and Technology**, v. 27, n. 1, p. 177-237, 1999.

MENSOR, L. L. *et al.* Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytoterapy Research**, v. 15, p. 127-130, 2001.

MEYER, B. N., *et al.* Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MOREIRA, E. A. Marcha sistemática de análise em fitoquímica. **Tribuna Farmacêutica**, v. 47, n. 1, p. 1-19, 1979.

MORAIS, S. M. *et al.* Antioxidant activity of essential oils from Northeastern Brazilian *Croton* species, **Quím. Nova**. v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.

MUNIZI, F. R. *et al.* Qualidade fisiológica de sementes de milho, feijão, soja e alface na presença de extrato de tiririca. **Rev. bras. Sementes** v. 29, n. 2, Ago., 2007.

NEGRI, M. L. S.; POSSAMAI, J. C.; NAKASHIMA, T. Atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa -*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., secas em diferentes temperaturas, **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 19, n. 2B, p. 553-556, Abr./Jun, 2009

NEVES, R. **Potencial alelopático da cultura da canola (*Brassica napus* L. var. oleifera) na supressão de picão-preto (*Bidens* sp.) e soja.** 87 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2005.

NIKKON, F. *et al.* Biochemical, Hematological and Histopathological Effects of *Duranta repens* Stems on Rats. **Asian Jornal of Biochemistry**, v. 3, n. 6, p. 366-372, 2008.

NINKOVIC, V. Volatile communication between barley plants affects biomass allocation. **J. Exp. Bot.** v. 54, p. 1931-1939, 2003.

OHNO, T. Phytotoxic effects of red clover amended soils on wild mustard seedling growth. **Agriculture, Ecosystems & Environment** v. 78, p. 187-192, 2000.

OLIVEIRA, V. M. A de, *et al.*, In vitro screening of Amazonian plants for hemolytic activity and inhibition of platelet aggregation in human blood, **Acta amazônica**. v. 39, n. 4, p. 973 – 980, 2009.

OLIVEIRA, V. R. *et al.* Efeito do herbicida trifluralin sobre a germinação de sementes e índice mitótico em raízes de milho (*Zea mays* L.). **Revista Unimar**, v. 18 p. 537-544, 1996.

OMS (World Health Organization) **Quality control methods for medicinal plants**

materials, Geneva, p. 41-43,1998.

PASSARDI, F. *et al.* Peroxidases have more function than a Swiss army knife. **Plant Cell Rep.** v. 24, p. 255–265, 2005.

PERGO, É. M.; ISHII-IWAMOTO, E. L. Changes in energy metabolism and antioxidant defense systems during seed germination of the weed species *Ipomoea triloba* L. and the responses to allelochemicals, **J Chem Ecol.** v. 37, p. 500-513, 2011.

PIENIZ, S. *et al.* Avaliação *in vitro* do potencialantioxidante de frutas e hortaliças, **Ciênc. agrotec., Lavras.** v. 33, n. 2, p. 552-559, mar./abr., 2009.

PIÑÃ-RODRIGUEZ, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B.; PEIXOTO, M. C. Testes de Qualidade. In: A. G. FERREIRA & F. BORGHETTI. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Ed. Artmed. p. 251-262, 2004.

POSER, G. L. von, *et al.* Iridoid glucosides substitution patterns in *Verbenaceae* and their taxonomic implication, **Pl. Syst. Evol.** v. 205, p. 265-287, 1997.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337-341, 1999.

PUTTER, J. Peroxidase. In: **Methods of Enzymatic Analysis**, Bergmeyer, H.U. (Ed.), Verlag Chemie, Weinhan, pp. 685-690, 1974.

RANAL, M. A.; SANTANA, D. G. How and why to measure the germination process? **Rev. Bras. Bot.** v. 29, p. 1-11, 2006.

REIGOSA, M. J.; SÁNCHEZ-MOREIRA, A.; GONZÁLEZ, L. Ecophysiological approach in allelopathy. **Critical Reviews in Plant Science** v. 18, p. 577-608, 1999.

REIS, M. S. dos; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. Diversidade natural e aspectos agrônômicos de plantas medicinais. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/UFSC, 2004. p. 41-62.

RICE, L. **Allelopathy**, Academic Press: Londres, 1984. 423p.

RUFINO, M. do S. M. *et al.* **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH**. Fortaleza-CE, jul., 2007.

RUPPRECHT, J. K.; HUI, Y. H.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: a review. **Journal of Natural Products**, v. 53, p. 237-278, 1990.

SALIMENA, F. R. G. *et al.* Verbenaceae: *Duranta vestita* Cham. in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**, Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB039655>>. Acesso em: 15/07/2010.

SANTOS, L. D. T. *et al.* Morphological responses of different eucalypt clones submitted to glyphosate drift, **Environmental and Experimental Botany**. v. 59, n. 11-20, 2007.

SANTOS, E. L. *et al.* Toxicidade e atividade antioxidante de flavonoides das cascas das raízes de *Lonchocarpus filipes*, **Quim. Nova**. v. 32, n. 9, p. 2255-2258, 2009.

SCANLAN, S. *et al.* *Duranta erecta* poisoning in nine dogs and a cat, **Australian Veterinary Journal**. v. 84, n. 10, p. 367-370, 2006.

SCHENKEL, E. P. *et al.* O espaço das plantas medicinais e suas formas derivadas na medicina científica. **Caderno de Farmácia**, v. 1, p. 65-72, 1985.

SEGER, C. D. *et al.* Levantamento florístico e análise fitossociológica de um remanescente de floresta ombrófila mista localizado no município de pinhais, paraná-brasil. **Floresta**, v. 35, n. 2, p. 291-302, 2005.

SHAHAT, A. A. *et al.* Phytochemical Investigation and Antioxidant Activity of *Duranta repens*. **Phytotherapy research**, v. 19, p. 1071-1073, 2005.

SHASHIDHARA, S. *et al.* *In vitro* evaluation of microbial antagonists, botanicals and fungicides against *Phytophthora capsici* Leon. the causal agent of foot rot of black pepper, **Karnataka J. Agric. Sci.** v. 21, n. 4, p. 527-531, 2008.

SIQUEIRA, J. M. de, *et al.* Estudo fitoquímico das cascas do caule de *Duguetia glabriuscula* - annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade frente a *Artemia*

salina Leach, **Quim. Nova.** v. 24, n. 2, p. 185-187, 2001.

SONG, F. M.; ZHENG, Z.; CHUN, G. X. Role of active oxygen and membrane lipid peroxidation in plantpathogegeen interactions. **Plant Physiol.** v. 32, p. 377-385, 1992.

SORG, O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? **C.R. Bioi.** v. 327, p. 649-662, 2004.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática:** guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2 ed. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2008.

STEPONKUS, P. L.; LANPHEAR, F. O. Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury, **Journal of Plant Physiology.** v. 42, p. 1423-1426, 1967.

TAKEDA, Y. *et al.* Iridoid glucosides from the leaves and stems of *Duranta erecta*, **Phytochemistry.** v. 39, n. 4, p. 829-833, 1995.

TESTA, B. **The metabolism of drugs and other xenobiotics.** Academic Press, New York. 1995, 475p.

TOKURA, L. K.; NÓBREGA, L. H. P. Alelopatia de cultivos de cobertura vegetal sobre plantas Infestantes, **Acta Sci. Agric.** v. 28, n. 3, p. 379-384, jul/set., 2006.

TROPICOS: *Duranta vestita* Cham. Disponível em:
<<http://www.tropicos.org/Name/50069490>>. Acesso em: 12/05/2010.

VASCONCELOS, S. M. L. *et al.* Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação, **Quim. Nova.** v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VIJAYA, H. K.; KULKARNI, I S.; HEGDE, Y. R. Evaluation of Plant Extracts Against *Ceratocystis paradoxa* Causing Sett Rot of Sugarcane **Karnataka J. Agric. Sci.** v. 20, n. 1, p. 168-169, 2007.

WEIR, T. L.; PARK, S. M.; VIVANCO, J. M. Biochemical and physiological

mechanisms mediated by allelochemicals. **Curr. Opin. Plant Biol.** v. 7, n. 4, p. 472–479, 2004.

WETTSTEIN, R. **Tratado de Botânica Sistemática**, 4 ed. Barcelona: Labor S.A., 1944.

YOUNGSON, R. **Como combater os Radicais Livres**. Rio de Janeiro: Editora Campus Ltda, 1996.

YU, J.Q. *et al.* Effects of root exudates and aqueous root extracts of cucumber (*Cucumis sativus*), and allelochemicals on photosynthesis and antioxidant enzymes in cucumber. **Biochem. Syst. Ecol.** v. 31, n. 2, p. 129-139, 2003.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001.

ZENG, R. S. *et al.* Physiological and biochemical mechanism of allelopathy of secalonic acid f on higher plants, **Agron. J.** v. 93, p. 72-79, 2001.