

POTENCIAL ALELOPÁTICO E ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS VEGETAIS

ALLELOPATHIC AND ANTIOXIDANT POTENTIAL OF PLANTS EXTRACTS

Anelise Samara Nazari FORMAGIO¹; Tathiana Elisa MASETTO¹; Maria do Carmo VIEIRA¹;
Néstor Antonio Heredia ZÁRATE¹; Ana Isabel Neves DE MATOS²;
Carla Roberta Ferreira VOLOBUFF³

1. Doutor(a), Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD, Dourados, MS, Brasil. aneliseformagio@ufgd.edu.br. 2. Bioquímica, Estudante de Pós-Graduação de Portugal – IAESTE Brasil, Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD, Dourados, MS, Brasil; 3. Estudante de Graduação de Biotecnologia - Faculdade de Ciências Biológicas e Ambiental, Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD, Dourados, MS, Brasil.

RESUMO: Objetivou-se com este trabalho avaliar a atividade alelopática, antioxidante e o conteúdo de fenóis e flavonóides totais no extrato metanólico de quatro plantas medicinais: *Hibiscus sabdariffa*, *Ocimum gratissimum*, *Palicourea crocea* e *Trichilia silvatica*. Para isso, folhas, flores e caules de *Trichilia silvatica*, folhas de *Palicourea crocea*, cálice e folhas de *Hibiscus sabdariffa* e folhas de *Ocimum gratissimum* foram utilizados. A avaliação da atividade alelopática foi realizada pelo ensaio de germinação e crescimento inicial de sementes de alface (*Lactuca sativa*), com três repetições de 50 sementes em delineamento inteiramente casualizado. A atividade antioxidante foi determinada pelo método fotocolorimétrico *in vitro* do radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). O crescimento das plântulas de alface foi mais sensível à ação dos aleloquímicos presentes nos extratos metanólicos do que a germinação das sementes, e evidenciaram o efeito inibitório dos extratos metanólicos do cálice e folhas de *H. sabdariffa* e das folhas de *O. gratissimum* e *P. crocea*. Os extratos metanólicos obtidos das folhas, flores e casca de *T. silvatica* apresentaram maior capacidade de sequestrar radicais livres com valores de IC₅₀ de 62,36; 19,4 18,38 µg mL⁻¹, no ensaio com DPPH e maior teor de compostos fenólicos 520,80; 545,27 e 546,56 mg de ácido gálico g de amostra⁻¹, respectivamente, avaliado pelo ensaio de Folin-Ciocalteu.

PALAVRAS-CHAVE: Atividade alelopática. Atividade antioxidante. Plantas medicinais. Total de fenóis e flavonóides.

INTRODUÇÃO

Muitas plantas apresentam efeito alelopático, que se refere ao efeito direto ou indireto danoso ou benéfico que uma planta exerce sobre a outra, pela produção de compostos químicos liberados no ambiente. Os aleloquímicos têm sido usados como alternativa ao uso de herbicidas, inseticidas e nematicidas, cujo uso intensivo e indiscriminado pode representar implicações negativas ao ambiente, à saúde humana e animal, além de representar uma parcela significativa dos custos de produção e da seleção de biótipos tolerantes e resistentes (INOUE et al., 2009). A maioria destas substâncias provém do metabolismo secundário, porque, na evolução das plantas, representaram alguma vantagem contra a ação de microrganismos, vírus, insetos e outros patógenos ou predadores, seja inibindo a ação destes ou estimulando o crescimento ou desenvolvimento das plantas (FERREIRA; AQUILA, 2000).

Para avaliar o potencial alelopático de uma planta, uma das principais variáveis analisadas é a germinação, e as sementes testes devem ser de espécies cultivadas de boa qualidade. A principal

vantagem do uso de alface (*Lactuca sativa* L., Asteraceae) reside na sensibilidade aos aleloquímicos mesmo em baixas concentrações, germinação rápida, crescimento linear e insensibilidade aos potenciais osmóticos (SOUZA et al., 2005).

Nossos estudos anteriores com plantas medicinais demonstraram ação alelopática inibitória de extratos metanólicos em sementes de alface e picão-preto (FORMAGIO et al., 2010, 2012). A ocorrência do efeito alelopático de planta medicinal pode assumir uma grande importância para o sistema de cultivo de tais espécies, principalmente no que diz respeito a interferências entre espécies e o potencial de aproveitamento no controle de espécies invasoras. Quando se cultivam plantas, a alelopátia pode ser um fator determinante do sucesso ou insucesso da cultura (FERREIRA, 2004).

Além do potencial alelopático, diversas pesquisas têm mostrado que as plantas são fontes potenciais de antioxidantes naturais. Investigações neste sentido sugerem que as propriedades antioxidantes de plantas podem estar relacionadas com defesa do estresse oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio (ROS) (MALENCINC

et al., 2000). Nesse sentido, as plantas para sua sobrevivência produzem vários compostos antioxidantes para capturar estes radicais livres, dentre eles flavonóides e compostos fenólicos.

Ocimum gratissimum (Lamiaceae), conhecido popularmente no Brasil como manjeriço ou alfavaca, é utilizado na medicina popular para o tratamento de infecções do sistema respiratório, diarreia, dor de cabeça, febre, doenças de pele, pneumonia e conjuntivites (CORRÊA, 1932; ONAJOB, 1986). Folhas de *O. gratissimum* apresenta alto teor de óleo essencial, hidrocarbonetos saturados de cadeia longa (C31, C33, C34 e C35), eugenol, óxido de cariofileno, mistura de estigmasterol e sitosterol e ácido oleanóico (NJOKU et al., 1997). Apresenta potencial contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (JUNAID et al., 2006).

Hibiscus sabdariffa (Malvaceae), popularmente conhecida como “rosela”, apresenta cálice com grande quantidade de vitamina C, sendo utilizado no tratamento de febre, além de existir a perspectiva de utilização das folhas no tratamento do câncer de próstata (HUI-HSUAN et al., 2012). Cálices de *H. sabdariffa* apresentam ácidos polifenólicos, flavonóides e antocianinas, como delphinidina-3-O-glicosídeo, delphinidina 3-O-sambubioside e cianidina 3-O-sambubioside (ALI et al., 2005).

Palicourea crocea (Rubiaceae), é um arbusto de porte médio, conhecido popularmente como “palicourea vermelha” ou “palicourea amarela”. O estudo das folhas resultou no isolamento de alcalóides indólicos monoterpênicos, croceanas A e B (DUSMAN et al., 2004).

Trichilia silvatica DC. (Meliaceae), conhecida popularmente como “café-do-mato” ou catiguá-branco, é endêmica no Brasil e encontra-se na categoria vulnerável de extinção de acordo com a União Internacional para Conservação da Natureza (PIRES O'BRIEN, 1998). Estudos realizados com as folhas mostraram o isolamento de terpenos, sesquiterpenos e triterpenos (SOUZA et al., 2009). Plantas deste gênero são utilizadas na medicina popular para o tratamento de reumatismo, emética e agente purgativo (CORRÊA, 1984). Atividades antivirais, analgésicas e inseticidas têm sido relatadas para o extrato das folhas de plantas de *Trichilia* (CHAMPAGNE et al., 1989; ROMIN et al., 1992).

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a atividade alelopática, teor de fenóis, flavonóides e atividade antioxidante de *Ocimum gratissimum*, *Palicourea crocea*, *Trichilia silvatica* e *Hibiscus sabdariffa*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Folhas de *O. gratissimum* e cálices e folhas de *H. sabdariffa* foram coletadas no Horto de plantas Medicinais da UFGD, 22°11'43.7"S e 54°56'08.5"W. Folhas de *P. crocea* e folhas, casca e flores de *T. silvatica* foram coletadas na fazenda coqueiro 22° 12' 37.4"S e 54° 50' 04"W próximo do município de Dourados, Mato Grosso do Sul. A cidade de Dourados está situada a 22°14'16"S e 54°48'02"W, em altitude média de 452 m. O clima da região, segundo a classificação de Köppen, é Mesotérmico Úmido, do tipo Cwa (verão quente e úmido e inverno seco), com temperaturas e precipitações médias anuais variando de 20 a 24 °C e 1250 a 1500 mm, respectivamente.

Após a coleta, as plantas em estudo foram identificadas pela Dra. Zefa Valdevina Pereira (UFGD) e as exsicatas foram depositadas no Herbário da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), em Dourados, MS.

Extratos vegetais

Os experimentos foram realizados nos Laboratório de Plantas Medicinais e de Sementes da Faculdade de Ciências Agrárias, pertencentes à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Dourados, MS.

Para a preparação dos extratos, o material vegetal (folhas, caules e flores/cálices) foi seco separadamente em estufa de ar circulante a 45 °C, durante quatro dias. Após secagem, foram triturados em moinho de facas (MA340/A), *O. gratissimum* (folhas 530 g), *P. crocea* (folhas 270 g), *T. silvatica* (folhas 380 g; caule 720 g; flores 155 g) e *H. sabdariffa* (folhas 446 g; cálices 340 g) e submetidos à extração por maceração com metanol 100% (P.A) por 10 dias (1:5 planta/solvente). Posteriormente foram filtrados e concentrados em evaporador rotativo (MA-120) sob pressão reduzida, para obtenção dos extratos metanólicos.

Avaliação do pH dos extratos

O pH foi avaliado, com pHmetro Tecnal, nos extratos metanólicos ressuspensos em água (5mg mL⁻¹).

Ensaio da inibição germinativa (alelopatia)

Para avaliar o efeito alelopático dos extratos, foram realizados ensaios de inibição de germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* cv. Grands rapids), obtidas comercialmente, utilizando soluções dos extratos de 1% (m/v). Os

bioensaios foram realizados aplicando-se 2 mL das soluções sobre discos de papel germitest contidos em placas de petri ($\varnothing = 9$ cm). Após a evaporação do solvente (metanol), foram adicionados 2 mL de Tween 80 (100 mg mL^{-1}) em cada placa. O tratamento controle foi conduzido com a semeadura das sementes sobre papel umedecido com água destilada/Tween. Os bioensaios foram conduzidos em câmaras de germinação do tipo B.O.D. (*Biochemical Oxygen Demand*), sob temperatura de 25°C e luz branca constante (BRASIL, 2009).

O efeito alelopático foi avaliado pela contagem de germinação aos quatro (primeira contagem) e sete dias (contagem final) após a semeadura. O critério de germinação utilizado foi a protrusão radicular mínima de dois mm. O comprimento da raiz primária e de hipocótilo (cm) de plântulas normais foi obtido ao final do teste, com auxílio de régua graduada em milímetros e os resultados foram expressos em cm plântula⁻¹.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições de 50 sementes cada, sendo os dados submetidos à análise de variância e quando significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico STATISTICS 6.0 (FERREIRA, 2000).

Análises químicas

As classes de metabólitos secundários foram determinadas utilizando os extratos orgânicos previamente preparados. Os flavonóides foram determinados pela reação de Shinodas, os alcalóides pelo reagente de Dragendorff e Mayer, os esteróides e triterpenóides pela reação de Lieberman-Burchard e os taninos pela reação química com sais de ferro (MATOS, 1988; FALKENBERG et al., 2003).

Determinação de fenólicos totais

A concentração de fenólicos totais foi determinada pelo Método Folin-Ciocalteu's (SINGLENTON; ROSSI, 1965). Para os testes, a cada 100 μL de amostra adicionou-se 1,5 mL de solução aquosa de carbonato de sódio 2%, 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu (1: 10 v/v) e 1 mL de água destilada. Reagiu-se por 30 minutos. A leitura foi realizada no espectrofotômetro em comprimento de onda de 760 nm. O mesmo procedimento foi empregado na análise do branco, sendo substituídos 100 μL de amostra por 100 μL de metanol (DJERIDANE et al., 2006). Para calcular a concentração de fenóis foi preparada uma curva analítica (1,0; 5,0; 10,0; 15,0; 30,0 e 40,0 μg) empregando o ácido gálico como padrão e as respectivas absorvâncias foram lidas. O

procedimento experimental realizado com o padrão foi o mesmo utilizado para as amostras. Com estes dados foi feita a regressão linear e obtida a equação da reta, a qual teve seus dados empregados no cálculo das amostras reais. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Determinação de flavonóides total

A cada 500 μL das amostras adicionaram-se 1,50 mL de álcool etílico 95%, 0,10 mL de cloreto de alumínio 10% ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 0,10 mL de acetato de sódio ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (1 mol L^{-1}) e 2,80 mL de água destilada. Deixou-se reagir à temperatura ambiente por 40 minutos. Fez-se a leitura no espectrofotômetro em comprimento de onda de 415 nm. O mesmo procedimento foi empregado na análise do branco (LIN; TANG, 2007). Para calcular a concentração de flavonóides foi preparada uma curva analítica (2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 25,0; 50,0; 100,0 e 125,0 μg) empregando a quercetina como padrão e as respectivas absorvâncias foram lidas. Com estes dados foi feita a regressão linear e a equação da reta foi obtida, a qual teve seus dados empregados no cálculo das amostras reais. Todos os testes foram realizados em triplicata.

As médias dos dados obtidos foram submetidas à análise de variância e as médias comparadas por Tukey a 5% de probabilidade.

Análise qualitativa da atividade antioxidante

Os extratos vegetais foram analisados por CCD utilizando quercetina como padrão positivo de comparação. As placas foram eluídas em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (7:3) e $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:30:5) e, após secagem, foram nebulizadas com solução a $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ do radical DPPH em MeOH (SOLER-RIVAS et al., 2000). As placas foram observadas até o aparecimento de manchas amareladas sob fundo de coloração púrpura, indicativo de possível atividade antioxidante.

Análise quantitativa da atividade sequestradora de radical livre DPPH

A investigação da atividade antioxidante dos extratos metanólicos foi realizada pelo método fotocolorimétrico *in vitro* do radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), utilizando como controle positivo o BHT. O método consiste no monitoramento do consumo do radical livre DPPH pelas amostras, por meio do decréscimo da medida de absorvância. Alíquotas de 1 mL das amostras foram adicionadas a 2 mL da solução de DPPH 0,004% e incubada na temperatura ambiente por 30 minutos. A leitura da absorvância de cada amostra foi realizada no espectrofotômetro a 517nm

(BLOIS, 1958). Todas as análises foram realizadas em triplicata. A porcentagem de inibição (% I) foi calculada pela fórmula: $\% I = (A_0 - A) / A_0 \times 100$, em que A_0 é a absorbância do DPPH (controle) e A é a absorbância da amostra mais DPPH.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foram observadas diferenças significativas entre os extratos metanólicos das plantas estudadas para a primeira contagem e na porcentagem de germinação de sementes de alface (Figura 1A), verificando resultado médio de 80% na primeira contagem e 94% na porcentagem de germinação. Possivelmente, os compostos presentes

nos extratos não influenciaram as reações metabólicas que culminam na germinação. De acordo com Bewley e Black (1994), a germinação tem início com a entrada de água pelo embrião e termina com a protrusão da radícula. Assim, os eventos necessários para culminar com a germinação dependem da rápida entrada de água, em função da grande diferença de potencial hídrico entre as sementes e o meio, que foi proporcionada pela presença dos extratos nos substratos. Contudo, este ensaio não demonstrou interferência alelopática dos extratos nas fases iniciais da germinação de *L. sativa*.

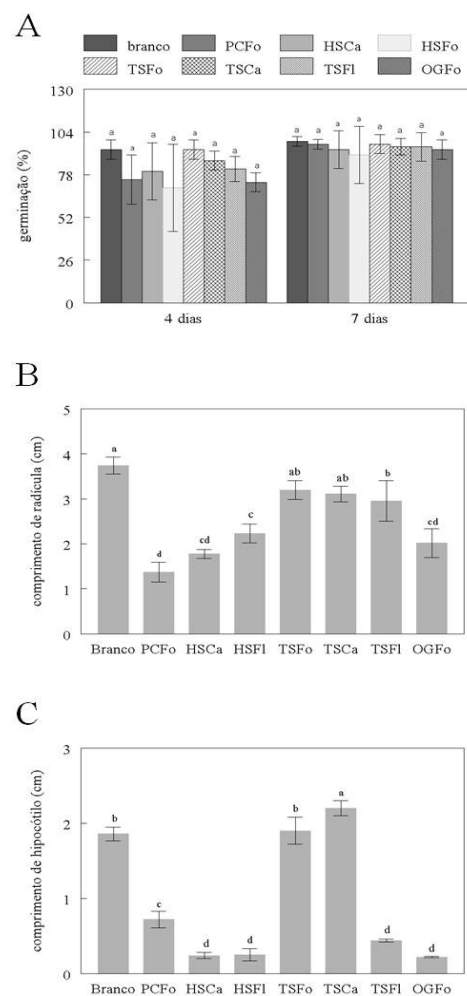


Figura 1. (A) Primeira contagem (quatro dias) e germinação (sete dias); (B) Comprimento de radícula (cm); (C) Comprimento de hipocótilo (cm) de sementes alface submetidas aos extratos metanólicos de folhas (TSFo), flores (TSFI) e caules (TSCa) de *Trichilia silvatica*, folhas de *Palicourea crocea* (PCFo), cálice (HSCa) e folhas (HSFo) de *Hibiscus sabdariffa* e folhas de *Ocimum gratissimum* (OGFo). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey. Comparação do grupo controle (branco). Programa utilizado Slide Write 4.0.

Entretanto, a análise de crescimento das plântulas demonstrou efeito alelopático inibitório dos extratos das diferentes partes das plantas avaliadas. Observou-se redução do comprimento de radícula sob o efeito dos extratos, exceto para aqueles obtidos de folhas (TSFo) e caule (TSCa) de *Trichilia silvatica*, que não diferiram da testemunha e apresentaram efeito inibitório menos acentuado do que os extratos das flores (TSFI) (Figura 1B). Eventos similares foram observados em sementes de alface submetidas às folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf (SILVA et al., 2012) e aos extratos das flores de *Acacia podalyriaefolia* A. Cunn (ANDRADE et al., 2003), cujo efeito foi caracterizado pela presença de compostos fenólicos e flavonóides, sendo que a sensibilidade radicular aos aleloquímicos é bem documentada na literatura por ser uma das características que melhor indica a ação alelopática.

Verificou-se que não houve diferença entre os extratos metanólicos das folhas (HSFo) e do cálice (HSCa) de *H. sabdariffa* e entre as folhas de *O. gratissimum* (OGFo) que proporcionaram, respectivamente, comprimento de raiz de 2,23, 1,78 e 2,02 cm. O maior efeito inibitório sobre o crescimento da raiz foi observado pela ação dos extratos metanólicos das folhas de *P. crocea* (PCFo) que apresentaram resultado médio de 1,37 cm (Figura 1B). De acordo com Ferreira (2004), a emergência da plântula e o seu crescimento são as fases mais sensíveis na ontogênese do indivíduo e o comprimento da radícula é um dos parâmetros mais usados para avaliar o efeito alelopático sobre o crescimento. Assim, os resultados obtidos permitem inferir que a inibição do crescimento radicular seja um aspecto ecológico importante, uma vez que, ocorre redução na pressão competitiva da planta, o que favorece as espécies vizinhas, que podem assim estabelecer aspectos de dominância.

Verificou-se que o extrato do caule de *T. silvatica* (TSCa) apresentou efeito estimulante no crescimento do hypocótilo das plântulas de alface, com 2,2 cm em relação aos demais tratamentos (Figura 1C). O modo de ação dos aleloquímicos pode ser direto quando o aleloquímico se liga às membranas da planta receptora ou penetra nas células, interferindo diretamente no seu metabolismo. As alterações do aleloquímico podem ser pontuais, mas, como o metabolismo consiste em uma série de reações com vários controles do tipo *feedback*, rotas inteiras podem ser alteradas, mudando processos. Assim, o tempo de residência dos aleloquímicos, a persistência e a transformação podem aumentar, diminuir ou fazer cessar seu efeito alelopático. Inclusive, o próprio andamento diário

do metabolismo primário, com formação de cadeias carbonadas que variam nas diferentes horas do dia, tem repercussões no metabolismo secundário (FERREIRA, 2004).

Para o crescimento de hypocótilo, não foi observada diferença significativa entre o extrato das folhas de *T. silvatica* (TSFo) e a testemunha, que apresentaram menor potencial inibitório em relação ao extrato das folhas de *P. crocea* (PCFo) (Figura 1C). Esses resultados permitem inferir que os extratos metanólicos do caule e das folhas de *T. silvatica* apresentaram baixo potencial alelopático de inibição em relação ao extrato das flores sobre o crescimento da parte aérea das plântulas de alface (Figura 1C).

Para o comprimento de hypocótilo, os extratos do cálice e das folhas de *H. sabdariffa* (HSFo) e das folhas de *O. gratissimum* (OGFo) não diferiram entre si e apresentaram a maior atividade inibitória sobre as plântulas de alface (Figura 1C). Resultados semelhantes foram observados por Souza Filho et al. (2009) com o óleo essencial de *O. americanum* sobre as sementes de alface. Os efeitos observados foram atribuídos à presença, no óleo essencial, de monoterpenos, monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos, alifáticos e fenilpropanóides, com destaque para os constituintes com atividade alelopática já comprovada, como o limoneno, a cânfora e o linalol.

De maneira geral, a análise de crescimento de plântulas evidenciou o potencial alelopático inibitório dos extratos metanólicos do cálice e folhas de *H. sabdariffa* e das folhas de *O. gratissimum* e *P. crocea*. De acordo com Ferreira (2004), o desenvolvimento e a sobrevivência das plântulas são eventos cruciais para o crescimento e/ou manutenção das populações, que inicialmente depende da germinação das sementes (emissão da radícula) e do estabelecimento das plântulas (emissão das superfícies fotossintéticas). De maneira geral, a germinação foi menos sensível aos aleloquímicos do que o crescimento das plântulas. Nesse contexto, substâncias alelopáticas podem induzir o aparecimento de plântulas anormais, sendo a necrose da radícula um dos sintomas mais comuns. Assim, a avaliação da normalidade das plântulas é um instrumento valioso e quantitativo.

Na análise dos valores de pH, não verificou-se diferença marcante entre os extratos metanólicos e o controle (Tabela 1), descartando esse fator de interferência no desenvolvimento inicial das plântulas de alface. De acordo com Ferreira e Áquila (2000), valores extremos de pH podem mascarar o efeito alelopático.

Tabela 1. Valores de pH do controle e de extratos metanólicos de quatro plantas medicinais.

Amostras	pH
Controle (água destilada)	6,01
PCFo	6,11
TSFo	5,75
TSCa	5,68
TSFI	5,85
HSCa	6,15
HSFo	5,50
OGFo	6,65

Compostos com propriedades alelopáticas são comumente encontrados nas plantas superiores, e a quantidade e a composição podem variar de cada espécie (PUTNAM, 1985). Whittaker e Feeny (1971) classificaram esses compostos em cinco categorias principais: terpenóides, esteróides, alcalóides, acetogeninas e fenilpropanóides. Segundo Rice (1984), dentre os compostos polares, os fenólicos e derivados correspondem à classe de metabólitos secundários na qual se encontra a maior

parte dos compostos apontados como tendo atividade alelopática, compreendendo desde fenóis simples até taninos de estrutura complexa. Nos ensaios qualitativos da prospecção fitoquímica dos extratos metanólicos das espécies em estudo, verificou-se a presença de classes de substâncias com potencial alelopático como flavonóides, esteróides e triterpenóides em todos os extratos avaliados (Tabela 2).

Tabela 2. Ensaios qualitativos da prospecção fitoquímica dos extratos metanólicos utilizados em bioensaios de germinação e crescimento de plântulas de alface.

Extratos metanólicos	Alcalóides		Flavonóides	Esteróides	Taninos	Triterpenóides
	Dragendorf	Mayer				
PCFo	-	-	+	+	-	+
TSFo	+	+	+	+	-	+
TSCa	+	+	+	+	+	+
TSFI	-	-	+	+	+	+
HSCa	+	+	+	+	+	+
HSFo	+	+	+	+	+	+
OGFo	-	-	+	+	+	+

(-) não detectado; (+) detectado; folhas de *P. crocea* (PCFo); folhas (TSFo), caule (TSCa) e flores (TSFI) de *T. silvatica*; cálice (HSCa) e folhas (HSFo) de *H. Sabdariffa* e folhas de *O. gratissimum* (OGFo).

Os resultados de fenóis totais presentes nos extratos foram expressos como equivalentes de ácido gálico (mg g^{-1} de extrato) e para flavonóides em equivalente de quercetina (mg g^{-1} de extrato). Os extratos metanólicos obtidos das diferentes partes de *T. silvatica* apresentaram maior concentração total de fenóis e menores concentrações de flavonóides. O extrato metanólico de *O. gratissimum* apresentou maior concentração de flavonóides e menor concentração de fenóis com valores de $360,77 \text{ mg g}^{-1}$ e $151,88 \text{ mg g}^{-1}$, respectivamente (Figura 2). Estudos realizados por Mahapatra (2010) com o extrato aquoso de *O. gratissimum*, apresentaram alta concentração de fenóis ($82,3 \text{ mg g}^{-1}$) e de flavonóides ($72,5 \text{ mg g}^{-1}$). Provavelmente, a diferença de teor destes aleloquímicos em comparativo a presente pesquisa deve-se à extração

com metanol, que possivelmente proporcionou maior extração dos constituintes presentes.

Devido à presença de fenóis e flavonóides nos extratos estudadas e à importância da pesquisa de novos agentes antioxidantes, foi avaliada a capacidade de sequestrar radicais livres *in vitro* pelo método do 2,2 difenil-1-picril hidrazil radical (DPPH), sendo inicialmente escolhido por se tratar de uma metodologia simples, rápida, eficaz e sensível, muito conveniente para realização de “screening” de várias amostras.

A avaliação preliminar qualitativa dos extratos por CCD, revelada com solução metanólica $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ do radical DPPH, sugeriu a existência de substâncias com potencial antioxidante, evidenciadas pela presença de manchas amareladas sobre fundo púrpuro, resultante da redução do radical DPPH.

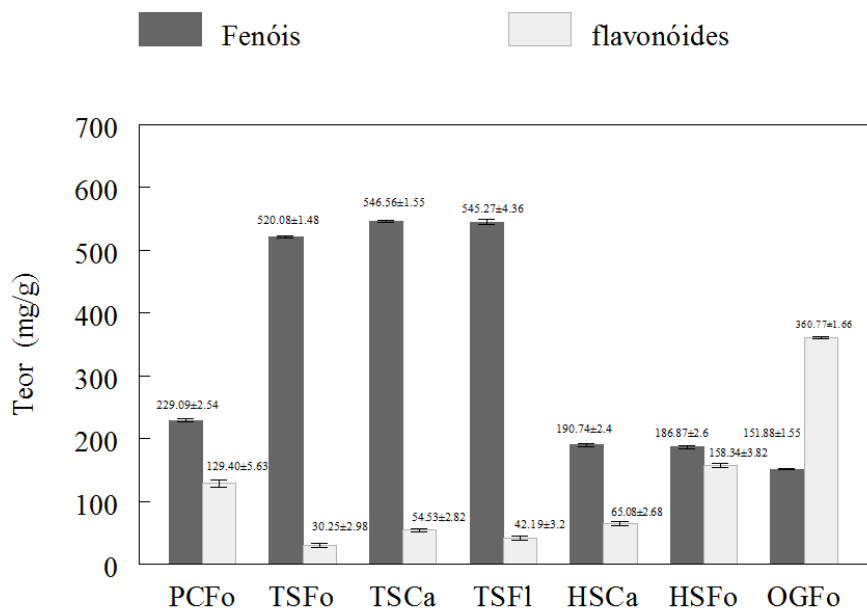


Figura 2. Teor de fenóis (mg de ácido g de extrato⁻¹) e de flavonóides (mg de quercetina g de extrato⁻¹) dos extratos metanólicos obtidos das folhas de *P. crocea* (PCFo); folhas (TSFo), caule (TSCa) e flores (TSFl) de *T. silvatica*; cálice (HSCa) e folhas (HSFo) de *H. Sabdariffa* e folhas de *O. gratissimum* (OGFo). Programa utilizado Slide Write 4.0.

Conforme observado na determinação de compostos fenólicos, o extrato metanólico obtido tanto das folhas, caule e flores de *T. silvatica* apresentou alto conteúdo de fenóis e consequentemente, bom potencial para sequestrar radicais livres com valores de IC₅₀ 62,36; 18,38 e 19,4 µg mL⁻¹, respectivamente (Tabela 3). É

importante ressaltar que esse extrato poderá ser ainda mais efetivo como antioxidante por meio de aprimoramentos no processo de extração dos compostos fenólicos e de flavonóides. Os demais extratos apresentaram moderado efeito sequestrador de radical livre quando comparado com o antioxidante comercial BHT (IC₅₀ = 16,9 µg mL⁻¹).

Tabela 3. Atividade da capacidade de sequestrar radicais livres DPPH (IC₅₀) para os oito extratos metanólicos avaliados.

Extratos metanólicos	IC ₅₀ (µg mL ⁻¹) (95% limite de confiança)
PCFo	218,49 (216,5 – 247,2)
TSFo	62,36 (60,4 – 66,8)
TSCa	18,38 (15,6 – 21,8)
TSFl	19,4 (16,8 – 22,4)
HSCa	163,84 (147,8 – 186,2)
HSFo	248,76 (233,7 – 272,6)
OGFo	186,98 (193,4 – 204,0)
BHT	16,9 (14,3 – 20,1)

Folhas de *P. crocea* (PCFo); folhas (TSFo), caule (TSCa) e flores (TSFl) de *T. silvatica*; cálice (HSCa) e folhas (HSFo) de *H. Sabdariffa* e folhas (OGFo) de *O. gratissimum*. BHT (butilhidroxitolueno) foi utilizado como controle positivo.

CONCLUSÕES

O crescimento das plântulas de alface foi mais sensível à ação dos aleloquímicos presentes nos extratos metanólicos do que a germinação das sementes.

Os extratos metanólicos do cálice e folhas de *H. sabdariffa* e das folhas de *O. gratissimum* e *P. crocea* apresentam potencial alelopático inibitório.

A espécie *T. silvatica* demonstrou propriedade antioxidante como sequestrador de radicais livres e este efeito pode ser atribuído ao elevado teor de fenóis encontrado nos extratos.

ABSTRACT: The aim of this work was to evaluate allelopathic and antioxidant activity and total flavonoids and phenols content in methanolic extract of four medicinal plants: *Hibiscus sabdariffa*, *Ocimum gratissimum*, *Palicourea*

crocea and *Trichilia silvatica*. Leaves (TSFo), flowers (TSFl) and stems (TSCa) of *T. silvatica*; leaves (PCFo) of *P. crocea*; chalice (HSCa) and leaves (HSFo) of *H. sabdariffa* and leaves of *O. gratissimum* (OGFo) were used in experiment. The evaluation of allelopathic activity was carried out by test of seed germination and initial growth of lettuce seedlings (*Lactuca sativa*), with three replications of 50 seeds in completely randomized design. The antioxidant activity was determined by method photo colorimetric *in vitro* of stable free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). The growth of lettuce seedlings was more sensitive to the action of allelochemicals in methanolic extracts than seeds germination, and showed the inhibitory effect of methanolic extracts from leaves and chalice of *H. sabdariffa* and leaves of *O. gratissimum* and *P. crocea*. Methanolic extracts obtained from the leaves (TSFo), flowers (TSFl) and bark (TSCa) of *T. silvatica* showed higher ability to scavenging free radical with IC₅₀ values of 62.36; 19.4 18.38 µg mL⁻¹, in assay with DPPH and highest content of phenolics, 520.80; 545.27 546.56 mg gallic acid per g of sample, respectively, evaluated by the Folin-Ciocalteu assay.

KEYWORDS: Allelopathic Activity. Antioxidant Activity. Medicinal plants. Total phenolics and flavonoids.

REFERÊNCIAS

- ALI, B. H.; WABEL, N. A.; BLUNDEN, G. Phytochemical and toxicological aspects of *Hibiscus sabdariffa* L. **Phytotherapy Research**, Germany, v. 19, p. 369–75, 2005.
- ANDRADE, C. A.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G.; FERRONATO, M. L.; PEITZ, C.; CUNICO, M.; DIAS, J. F. G.; BALESTRIN, L.; KERBER, V. A. Efeitos alelopáticos das flores da *Acacia podalyriaefolia* A. CUNN. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 4, n. 2, p. 93-98, 2003.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: Physiology of development and germination**. New York, Plenum Press, 1994.
- BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, p. 1199-880, 1958.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS. 399 p. 2009.
- CHAMPAGNE, D. E., ISMAN, M.; TOWER, G. H. N. In: **Insecticides of Plant Origin**. ARNASON, J. T.; PHILOGENE, B. J. R. (ed.). American Chemical Society, Washington, 1989, p. 95-109.
- CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. IBDF, Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, 1932, 63 p.
- CORRÊA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das Exóticas cultivadas**. Ministério da Agricultura, Imprensa Nacional, 1984.
- DJERIDANE, A. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. **Food Chemistry**, Reading, v. 97, p. 654-660, 2006.
- DUSMAN, L. T.; JORGE, T. C. M.; SOUZA, M.C.; EBERLIN, M. N.; MEURER, E. C.; BOCCA, C. C.; BASSO, E. A.; SARRAGIOTTO, M. H. Monoterpene Indole Alkaloids from *Palicourea crocea*. **Journal of Natural Products**, Columbus, v. 67, p. 1886-1888, 2004.
- FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. 2003. Introdução à análise fitoquímica. 229-245p. In: SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A.; PETROVICK, J. C. P. (eds.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5a ed. Porto Alegre. 1102 p.
- FERREIRA, A. G., AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 12, p. 175 – 204, 2000.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR Sistema para análise de variância**. Lavras: Universidade Federal de Lavras (Departamento de Ciências Exatas DEX), (CD-ROM). 2000.

- FERREIRA, A. G. Interferência: competição e alelopatia. In: **Germinação: do básico ao aplicado**. FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. Orgs. Porto Alegre: Artmed, 2004, p. 251-262.
- FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 323 p.
- FORMAGIO, A. S. N.; MASETTO, T.E.; BALDIVIA, D. S.; VIEIRA, M. C.; HEREDIA ZÁRATE, N. A.; PEREIRA, Z. V. Potencial alelopático de cinco espécies da família Annonaceae. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 8, n. 4, p. 349-354, out./dez. 2010.
- FORMAGIO, A. S. N.; MASETTO, T. E.; VIEIRA, M. C.; HEREDIA ZÁRATE, N. A.; COSTA, W. F.; TREVIZAN, L. N. F.; SARRAGIOTTO, M. H. Potencial alelopático de *Tropaeolum majus* L. na germinação e crescimento inicial de plântulas de picão-preto. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 1, jan, 2012.
- HUI-HSUAN LIN, KUEI-CHUAN CHAN, JENN-YUAN SHEU, SHU-WEN HSUAN, CHAU-JONG WANG, JING-HSIEN CHEN. *Hibiscus sabdariffa* leaf induces apoptosis of human prostate cancer cells *in vitro* and *in vivo*. **Food Chemistry**, Reading, v. 132, n. 2, p. 880-892, 2012.
- INOUE, M. H.; SANTANA, D. C.; PEREIRA, M. J. B.; POSSAMAI, A. C. S.; AZEVEDO, V. H. Extratos aquosos de *Xylopia aromatica* e *Annona crassiflora* sobre capim-marandu (*Brachiaria brizantha*) e soja. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 10, n. 3, p. 245-250, 2009.
- JUNAID, S. A.; OLABODE, A. O.; ONWULIRI, F. C.; OKWORI, A. E. J.; AGINA S. E. The antimicrobial properties of *Ocimum gratissimum* extracts on some selected bacterial gastrointestinal isolates. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 5, n. 22, p. 2315-2321, 2006.
- KÖPPEN, W. **Climatologia**: com um estúdio de los climas de la tierra. México: Fondo de Cultura Econômica, Cidade do México, 1948. 478p.
- LIN, J. Y.; TANG, C. Y. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. **Food Chemistry**, Reading, v. 101, p. 140-147, 2007.
- MAHAPATRA, K. S.; CHAKRABORTY, S. P.; ROY, S. Aqueous extract of *Ocimum gratissimum* Linn and ascorbic acid ameliorate nicotine-induced cellular damage in murine peritoneal macrophage. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Singapura, v. 3, n. 10, p. 775-782, 2010.
- MALENCINC, D. J.; GASIC, O.; POPOVIC, M.; BOZA, P. Screening for antioxidant properties of *Salvia reflexa* Hornem. **Phytotherapy Research**, Germany, v. 14, p. 546-548, 2000.
- MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: Edições UFC. 1988. 246 p.
- NJOKU, C.; ZENG, L. A.; OBERLIES, N. H. D; MCLAUGHLIN, L. Oleanolic acid, a bioactive component of the leaves of *Ocimum gratissimum* (Lamiaceae). **International of Journal Pharmacognosy**, Melbourne, v. 5, p. 134-177, 1997.
- ONAJOBI, F. D. Smooth muscle contracting lipidsoluble principles in chromatographic fractions of *Ocimum gratissimum*. **Journal of Ethnopharmacology**, Einsteinwegv. 18, p. 3-11, 1986.
- PIRES O'BRIEN, J. *Trichilia sylvatica*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. 1998. Version 2012.1. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 24 set 2012.
- PUTNAM, A. R. Weed allelopathy. In: DUKE, S.O. (Ed.) **Weed physiology**. Florida: CRS Press, 1985. p. 131-155.

RICE, E. L. **Allelopathy**. San Diego: Academic Press, 2. ed. 1984. 422p.

ROMIN, T. L.; WEBER, N. D.; MURRAY, B K.; NORTH, J. A.; S. G. WOOD, B. G. Antiviral activity of panamanian plant extracts. **Phytotherapy Research**, Germany, v. 6, p. 38-43, 1992.

SILVA, R. M. G.; SANTOS, V. H. M.; BORGES, F. M.; MELO, F. F. Q.; SILVA, L. P. Potencial alelopático e levantamento do banco natural de sementes sob a copa de *Copaifera langsdorffii* Desf. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, n. 4, p. 641-653, 2012.

SINGLENTON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology Viticulture**, Missouri, v. 16, p. 144-158, 1965.

SOLER-RIVAS, C.; ESPIN, J. C.; WICHERS, H. J. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. **Phytochemical Analysis**, Wolverhampton, v. 11, p. 330-338, 2000.

SOUZA, S. A. M.; CATTELAN, L. V.; VARGAS, D. P.; PIANA, C. F. B.; BOBROWSKI, V. L.; ROCHA, B. H. G. Efeito de extratos aquosos de plantas medicinais nativas do Rio Grande do Sul sobre a germinação de sementes de alface. **Publicações UEPG Ciências Biológicas e Saúde**, Ponta Grossa, v. 11, p. 29-38, 2005.

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

SOUZA, P. R. T.; PAULA, V. F.; CORREIA, S. J.; NASCIMENTO, J. C. Terpenos das folhas de *Trichilia silvatica* (Meliaceae). Reunião Anual Da Sociedade Brasileira De Química, 32, 2009, Fortaleza. **Anais**. Fortaleza, Ce: SBQ, 2009. CD-ROM.

WHITTAKER, R. H., FEENY, P. P. Allelochemies: chemical interaction between species. **Science**, Washington v. 171, p. 757-770, 1971.