

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANA
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA CURSO DE QUÍMICA
BACHARELADO

MARIANA REGINA PASSOS DE SOUZA
CLAUDIA DYANA DOS SANTOS PERETIATKO

**AVALIAÇÃO QUÍMICA DE ÓLEO ESSENCIAL E ALELOPÁTICA
DE EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Artemisia vulgaris* L.**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Pato Branco – PR
2014

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANA
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA CURSO DE QUÍMICA
BACHARELADO

MARIANA REGINA PASSOS DE SOUZA
CLAUDIA DYANA DOS SANTOS PERETIATKO

**AVALIAÇÃO QUÍMICA DE ÓLEO ESSENCIAL E ALELOPÁTICA
DE EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Artemisia vulgaris* L.**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Pato Branco – PR
2014

MARIANA REGINA PASSOS DE SOUZA
CLAUDIA DYANA DOS SANTOS PERETIATKO

**AVALIAÇÃO QUÍMICA DE ÓLEO ESSENCIAL E ALELOPÁTICA
DE EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Artemisia vulgaris* L.**

Trabalho de conclusão de curso,
apresentado à Comissão de Diplomação do
Curso de Bacharelado em Química da
Universidade Tecnológica Federal do
Paraná (UTFPR), Câmpus Pato Branco,
como requisito parcial para obtenção do
título de Bacharel em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Tatiane Luiza
Cadorin Oldoni

Co-orientadora: Profa. Dra. Giovana Faneco
Pereira

FOLHA DE APROVAÇÃO

O trabalho de diplomação intitulado **AVALIAÇÃO QUÍMICA DE ÓLEO ESSENCIAL E ALELOPÁTICA DE EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Artemisia vulgaris* L.** foi considerado APROVADO de acordo com a ata da banca examinadora **Nº2.2/2013-B.**

Fizeram parte da banca os professores

Tatiane Luiza Cadorin Oldoni

Giovana Faneco Pereira

Marina Leite Mitterer Daltoé

DEDICATÓRIA

A meu pai João David de Souza e a minha mãe Luzia Aparecida Passos de Souza, aos quais amo.

Mariana Regina Passos de Souza.

Dedico primeiramente a meu marido, Mauricio Peretiatko, que me deu forças para continuar a faculdade apesar das provações passadas, a meus pais que mesmo longe torcem por minha vitória, e a todos que me ajudaram nessa etapa de minha vida.

Claudia D.Santos Peretiatko

OFERECEMOS e DEDICAMOS.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por nos permitir chegar até este momento, concedendo a sabedoria e vontade de realizar este trabalho e nos enviando “anjos” (professores) para nos auxiliarmos em nossa jornada.

À professora Dra. Tatiane Luiza Cadorin Oldoni, pela oportunidade de realizarmos este trabalho, agradecemos pela sua gentileza, compreensão, e dedicação como orientadora, por permitir e ajudar a conhecer melhor a área do conhecimento científico, obrigado por sempre estar disposta a novas ideias.

À professora Dra. Giovana Faneco Pereira por estar sempre disposta a contribuir com a realização deste trabalho, agradecemos pela sua dedicação e gentileza como co-orientadora, também por seu carinho e amizade.

Ao Prof. Dr. Vanderlei Lima por auxiliar com a parte estatística do trabalho.

À professora Dra. Marisa de Cácia Oliveira e à Dra. Taciane Finatto pelo empréstimo e confiança na utilização do laboratório de Bioquímica.

A todos os Professores que fizeram parte da nossa vida acadêmica, agradecemos por nos auxiliar a adquirir conhecimento em cada área ministrada, e também àqueles que de alguma forma nos ajudaram na realização deste trabalho.

Agradecemos a todos os colegas pelo carinho e amizade, por serem parceiros e estarem presentes nos momentos bons e ruins de nossa caminhada acadêmica e pessoal.

Às nossas famílias pelo companheirismo e dedicação sempre dispostos a ajudar, pela compressão de nossas ausências em certas ocasiões.

“A mente humana, uma vez ampliada por uma nova ideia, nunca mais volta ao seu tamanho original” (Oliver Wendell Homes).

RESUMO

SOUZA, Mariana Regina Passos; PERETIATKO, Claudia Dyana dos Santos. Avaliação química de óleo essencial e alelopática de extrato hidroalcoólico de *Artemisia vulgaris* L. 2014. 71 f. TCC (Trabalho de conclusão de curso) – Graduação em Química (Bacharel), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2014.

As plantas sempre foram o principal meio a que a humanidade recorreu para o tratamento de doenças. Embora várias plantas tenham sido estudadas com relação à provável existência de constituintes bioativos, ainda existe uma infinidade de plantas que podem servir como base para estudos. A planta *Artemisia vulgaris* L., originária da Ásia, é uma espécie daninha infestante que pode causar grandes problemas para a agricultura. Contudo, é utilizada como medicamento natural devido à sua rica composição de compostos bioativos. Dentro deste contexto, o principal objetivo deste estudo foi determinar a condição ideal para extração de óleo essencial por hidrodestilação e produção de extrato hidroalcoólico de folhas, caule e flor de *A. vulgaris*. além de determinar potencial alelopático desta espécie. O material vegetal foi coletado na cidade de São Jorge D'Oeste, na região Sudoeste do Paraná. O material seco foi utilizado nos ensaios de otimização, utilizando como variáveis dependentes o teor de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante pelo método de sequestro dos radicais DPPH e ABTS. O estudo de otimização apontou que para o óleo essencial o fator tempo de secagem é significativo e a melhor condição foi obtida com um tempo de secagem de 120 horas e um período de extração de 2 horas. Já para a produção do extrato hidroalcoólico, a variável quantidade de massa de *Artemisia vulgaris* foi a mais influente e a melhor condição foi obtida com uma temperatura de extração de 70°C, utilizando 1g de amostra e sistema extrator água: etanol 50:50 Após a otimização, novo extrato hidroalcoólico e óleo essencial na melhor condição foram produzidos e avaliados quanto ao teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante, sendo observado elevada quantidade dos compostos de interesse. A partir destes, foi determinado atividade alelopática demonstrou que

extrato hidroalcoólico promoveu a inibição total das sementes de picão-preto (*Bidens pilosa* L.), alface (*Lactuca sativa* L.) e tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) em concentrações de 3-5%.

Palavras-chave: Otimização. DPPH. ABTS. FRAP. Compostos fenólicos.

ABSTRACTS

Souza, Mariana Regina Passos; Peretiatko, Claudia Dyana dos Santos. Chemical evaluation of essential oil and hydroalcoholic extract of allelopathic *Artemisia vulgaris* L. 2014. 71 f. TCC (Completion of course work) – Degree in Chemistry (Bachelor), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2014.

The Plants have always been the primary means to mankind appealed to the treatment of diseases. While several plants have been studied with respect to the probable existence of bioactive constituents, there is still a plethora of plants that can serve as a basis for studies. The plant *Artemisia vulgaris* L., native to Asia, is a weed weed species that can cause major problems for agriculture. However, it is used as a natural medicine due to its rich composition of bioactive compounds. Within this context, the aim of this study was to determine the optimal extraction of essential oil by hydrodistillation and production of alcoholic extract of leaves, stem and flower condition *A. vulgaris* and determine allelopathic potential of this species. The plant material was collected in São Jorge D'Oeste, in the west of Paraná. The dried material was used for testing optimization, using as dependent variables the content of total phenolic compounds and antioxidant activity by the DPPH method kidnapping and ABTS radicals. The optimization study showed that the essential oil drying time factor is significant and the best condition was obtained with a drying time of 120 hours and a period of 2 hours extraction. As for the production of the aqueous extract, the variable mass amount of *Artemisia vulgaris* is the most influential and the best condition was obtained with an extraction temperature of 70°C using 1 g of sample and extractant system water: ethanol 50:50 After optimization, new hydroalcoholic extract and essential oil in best condition were produced and evaluated for phenolic compounds and antioxidant content, high amount of the compounds of interest observable. From these, it was determined allelopathic activity showed that hydroalcoholic extract promoted the total inhibition of seed beggartick (*Bidens*

pilosa L.), lettuce (*Lactuca sativa* L.) and tomato (*Solanum lycopersicum* L.) at concentrations of 3-5 %.

Keywords: optimization. DPPH. ABTS. FRAP. Phenolic compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figure 1- <i>Artemisia vulgaris</i> L.....	19
Figure 2- Rota da biossíntese do metabolismo secundário.....	20
Figure 3- Antioxidantes sintéticos utilizados em alimentos	23
Figure 4- Mecanismo Antioxidante de Compostos Fenólicos.....	25
Figure 5- Reação entre a molécula de DPPH ^o e um antioxidante para formar DPPH reduzido.....	26
Figure 6- Formação do radical ABTS pela sua oxidação com persulfato de potássio.....	27
Figure 7- Redução do Fe(III) a Fe(II) pela adição de um antioxidante	28
Figure 8- Ralação entre aleloquímicos e fatores ambientais influenciando o crescimento das plantas.....	30
Figure 9- Diagrama de pareto para a atividade antioxidante ABTS demonstrando a significância do tempo de extração em relação ao tempo de secagem.....	39
Figure 10- Gráfico de superfície de resposta do sequestro do radical ABTS (A) e curva de contorno (B) para atividade antioxidante do óleo essencial de <i>Artemisia vulgaris</i> L. em função do tempo de secagem e do tempo de extração.	40
Figure 11- Diagrama de Pareto demonstrando a Significância da variável massa (g) para resultados de compostos fenólicos totais	43
Figure 12- Gráficos de superfície de resposta de Compostos Fenólicos Totais. A) Gráfico de superfície de resposta para variável temperatura (°C) x massa (g), B) Gráfico de contorno para variável temperatura (°C) x massa(g)	44
Figure 13- Gráficos de superfície de resposta de compostos fenólicos. A) Gráfico de superfície de resposta para variável etanol (%) x massa (g), B) Gráfico de contorno para variável etanol (%) x massa(g)	45
Figure 14- Diagrama de Pareto demonstrando a Significância da variável massa(g) para resultados de atividade de sequestro do radical DPPH (nível de confiança de 95%).....	47
Figure 15- Gráficos do radical DPPH. A) Superfície de resposta e B) Contorno do efeito da variável Temperatura (°C) x massa(g).....	49
Figure 16- Gráficos do radical DPPH. A) Superfície de resposta e B) Gráfico de superfície de resposta para variáveis [] etanol (%) x massa(g)	50
Figure 17- Representação do gráfico de coluna para porcentagem de germinação em função do tempo de incubação para a amostragem branco com água.	56
Figure 18- Representação do gráfico de coluna para porcentagem de germinação em função do tempo de incubação para branco com álcool e água.	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Os níveis das variáveis independentes empregadas na extração dos antioxidantes do óleo essencial de <i>Artemisia vulgaris</i> L.....	33
Tabela 2: Os níveis das variáveis independentes empregados na extração dos compostos fenólicos totais e antioxidantes do extrato bruto vegetal de <i>Artemisia vulgaris</i> L.....	33
Tabela 3: Resultados de atividade antioxidante pelo método de sequestro dos radicais ABTS e DPPH do óleo essencial de <i>A. vulgaris</i> obtidos no planejamento fatorial.....	38
Tabela 4: Efeito das variáveis tempo de extração e tempo de secagem do planejamento fatorial completo 2^2 do método ABTS no óleo essencial de <i>Artemisia vulgaris</i> L.....	39
Tabela 5: Análise de variância no estudo do efeito das variáveis tempo de extração e tempo de secagem na atividade antioxidante do óleo essencial de <i>Artemisia vulgaris</i>	41
Tabela 6: Resposta ao planejamento fatorial para atividade antioxidante e para compostos fenólicos do extrato de <i>A vulgaris</i> L.....	42
Tabela 7: Efeito das variáveis temperatura, etanol e massa no teor de compostos fenólicos do extrato hidroalcoólico de <i>A. vulgaris</i>	42
Tabela 8: Análise de variância no estudo do efeito das variáveis temperatura, concentração de etanol e massa na atividade de compostos fenólicos do extrato de <i>Artemisia vulgaris</i> L.....	46
Tabela 9: Efeito das variáveis temperatura, etanol e massa na atividade antioxidante do extrato de <i>A. vulgaris</i> L.....	46
Tabela 10: Análise de variância no estudo do efeito das variáveis temperatura, concentração de etanol e massa na atividade de compostos fenólicos do extrato de <i>Artemisia vulgaris</i> L.....	51
Tabela 11: Comparação entre concentração de compostos com atividade antioxidante em óleo essencial e extrato bruto etanólico.....	52

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1 TAXONOMIA DE <i>Artemisia vulgaris</i> L.....	18
3.2 METABOLISMO DAS PLANTAS	19
3.3 ÓLEO ESSENCIAL	21
3.4 COMPOSTOS FENÓLICOS	21
3.5 ANTIOXIDANTES	22
3.5.1 Determinação <i>in vitro</i> da atividade antioxidante.....	24
3.5.1.1 Determinação de compostos fenólicos totais pelo método folin- ciocalteau	25
3.5.1.2 Método de sequestro do radical DPPH	25
3.5.1.3 Método de sequestro do radical ABTS	26
3.5.1.4 Método do poder antioxidante de redução de ferro	27
3.6 ALELOPATIA	28
3.7 OTIMIZAÇÃO OU PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 MATERIAL VEGETAL	32
4.2 PROCESSO DE OTIMIZAÇÃO	32
4.2.1. Delineamento experimental e análise estatística dos dados	32
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
4.4 CÁLCULO DO RENDIMENTO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	34
4.5 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	34
4.5.1 Compostos Fenólicos Totais	34
4.5.2 Sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil).....	35
4.5.3 Sequestro do radical ABTS+. (2,2- azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6- ácidosulfônico)	35
4.5.4 Atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro – FRAP	36
4.6 ANÁLISE DE ATIVIDADE ALELOPÁTICA	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.2.1 Delineamento experimental para o Óleo essencial de <i>A vulgaris</i> L.....	38
5.2.2 Delineamento experimental para o extrato hidroalcoólico de <i>A. vulgaris</i> L. ...	41
5.2.2.2 Atividade de sequestro do radical DPPH.....	46
5.3 ANÁLISES DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO E EXTRATO HIDROALCOÓLICO PRODUZIDOS DE <i>A. Vulgaris</i> NAS MELHORES CONDIÇÕES.....	51
5.4 RENDIMENTO DO ÓLEO E DO EXTRATO	53
5.5 ATIVIDADE ALELOPÁTICA	54
6 CONCLUSÕES	57
7 REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

O homem tem manifestado interesse crescente pelo seu bem-estar e qualidade de vida. Este fato tem motivado a comunidade científica a procurar e identificar novas substâncias, a partir das plantas, que sejam benéficas ao organismo humano. Além disso, muitas espécies vegetais vêm sendo utilizadas, desde a antiguidade, para fins medicinais na busca de tratamento e cura de doenças, fator este que se expandiu pelo mundo de maneira empírica, passando de geração em geração (LEITE, 2009).

Neste sentido, as plantas são uma grande fonte de novos princípios ativos, permitindo o avanço na descoberta de biomoléculas com potencial e aplicação em várias áreas da ciência. Dentre as diversas formas de utilização das plantas medicinais destacam-se sua utilização no combate a radicais livres e no controle do crescimento de espécies vegetais invasoras. Essas diferentes atividades relacionadas às plantas são resultado da ação dos chamados metabólitos secundários, tendo como destaque as substâncias pertencentes à classe de compostos fenólicos.

Os compostos fenólicos estão envolvidos em vários aspectos da vida da planta, desde o estrutural até os de proteção. A principal característica na estrutura molecular deste grupo é a presença de um grupamento hidroxila ligada a um anel aromático (STALIKAS, 2007). Estes compostos são reconhecidos por apresentarem atividade antioxidante *in vivo* e *in vitro*, tais como sequestro do radical ABTS, ânion superóxido, radical hidroxil (MALDONADO *et al.*, 2005) e inibição da peroxidação lipídica (VERSTRAETEN *et al.*, 2005). Os antioxidantes atuam, no organismo, na defesa contra os radicais livres impedindo sua formação, principalmente pela inibição de reações em cadeia e pela capacidade de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas. Assim os radicais livres são impedidos de atacar os lipídios, os aminoácidos das proteínas, a dupla ligação dos ácidos graxos poli-insaturados e as bases do DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular (BIANCHI, 1999).

A alelopatia pode ser definida como a capacidade de uma espécie em inibir o crescimento ou desenvolvimento de outra. Essa ação é ocasionada pela

liberação de compostos através das raízes, caules, folhas e flores, o que garante a sobrevivência da espécie inibidora. Esta atividade vem sendo estudada em ecologia química, sendo uma importante alternativa não só para agroindústria, mas também para preservação ambiental.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a melhor condição de extração de óleo essencial por hidrodestilação e produção de extrato hidroalcoólico de folha, caule e flor de *Artemisia vulgaris* L. em função do potencial antioxidante e dos compostos fenólicos totais, além de estudar o potencial alelopático desta espécie.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar, utilizando o planejamento fatorial, a melhor condição de extração de óleo essencial de *Artemisia vulgaris* L. pela técnica de hidrodestilação;
 - Determinar, utilizando o planejamento fatorial, a melhor condição de extração de compostos bioativos no extrato bruto vegetal;
 - Quantificar o teor de compostos fenólicos totais no óleo essencial e extrato bruto, obtidos na melhor condição, pelo método de Folin-Ciocalteu;
 - Determinar a atividade antioxidante no óleo essencial e extrato bruto, obtidos na melhor condição, utilizando três métodos distintos: sequestro do radical DPPH e ABTS e redução de Fe^{3+} a Fe^{2+} (FRAP);
 - Determinar o rendimento da extração do óleo essencial e extrato hidroalcoólico após a filtragem e a liofilização;
 - Determinar a ação alelopática do extrato hidroalcoólico de *Artemisia vulgaris* L., em sementes das plantas picão-preto (*Bidens pilosa* L.), alface (*Lactuca sativa* L.) e tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.).

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 TAXONOMIA DE *Artemisia vulgaris* L.

A Família Asteraceae é a maior família de Eudicotiledôneas, compreendendo entre 24.000-30.000 espécies e 1.600-1.700 gêneros. No Brasil é bem representada com cerca de 2.000 espécies distribuídas em aproximadamente 260 gêneros (SOUZA & LORENZI, 2012). Apresenta ampla distribuição, sendo bem representada tanto em regiões tropicais quanto em regiões subtropicais e temperada (BARROSO, 1991). É considerada uma das famílias mais bem sucedidas, possuindo uma alta diversidade de hábitat, forma de vida e métodos de polinização e dispersão de sementes (CRONQUIST 1981).

Artemisia é um dos principais gêneros de Asteraceae, sendo um dos mais amplos, com 300-400 espécies, diversificados e economicamente importantes desta família, muito utilizados principalmente na indústria farmacêutica para diferentes usos (Anonymous 1993 *apud* SINGH *et al.*, 2009).

Artemisia vulgaris L. (Figura 1), conhecida popularmente como losna-brava, é uma espécie herbácea perene, originária da Ásia e que vem se proliferando no Sul e Sudeste do Brasil graças a sua eficiência reprodutiva. É considerada uma planta muito severa pela sua capacidade de infestar tanto solos cultivados e jardins, quanto beira de estradas e pastagens (LORENZI, 1982). Apresenta entre 30-60 cm de altura, com poucas ramificações e forte aroma de losna (*Artemisia absinthium* L.), folhas pinatipartidas, flores pequenas reunidas em pequenos capítulos dispostos em panículas terminais (LORENZI 2008). Possui grande importância na farmacopéia popular, sendo utilizada como febrífuga, vermífuga, emenagoga e em doenças do aparelho digestório (LORENZI, 1982).

Dentre os componentes ativos identificados em *A. vulgaris* estão flavonoides, cumarinas, lactonas sesquiterpênicas, óleos voláteis, inulina e traços de alcaloides (SINGH *et al.*, 2009). Para os óleos voláteis são citados como principais componentes a cânfora, canfeno, alfa- tujona, germacreno D, 1,8-cineol e β -cariofileno (HAIDER *et al.*, 2003; TEIXEIRA DA SILVA, 2004; JUDZENTIENE e BUZELYTE, 2006).



Figure 1- *Artemisia vulgaris* L.
Fonte: Autor próprio

3.2 METABOLISMO DAS PLANTAS

Os vegetais são constituídos por células onde se processam complexas reações metabólicas. O metabolismo consiste no somatório de todos os processos bioquímicos relacionados ao ser vivo, que nas plantas, de acordo com Taiz e Ziger (2006), compreende dois processos distintos. O primeiro consiste no **catabolismo**, ou degradação, pelo qual os nutrientes e os constituintes celulares são degradados para o aproveitamento de seus metabólitos e/ou para a geração de energia. Já o segundo, o **anabolismo**, ou biossíntese, os metabólitos são sintetizados a partir de precursores.

O processo anabólico é responsável pela biossíntese de macromoléculas a partir de monômeros e também apresentam vias alternativas: o metabolismo primário e o metabolismo secundário. Os metabólitos primários são fundamentais para a sustentação estrutural das plantas, estando dentre os compostos produzidos os açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, nucleotídeos e seus derivados (LEITE, 2009). Os metabólitos secundários são biossintetizados a partir dos metabólitos primários como lipídios, carboidratos, e aminoácidos, por intervenção de enzimas, reações estas que ocorrem no interior das células vegetais (LEITE, 2009). Na Figura 2 observam-se, de forma simplificada, as rotas envolvidas na biossíntese dos metabólitos secundários e seu envolvimento com o metabolismo primário (TAIZ e ZEIGER, 2006).

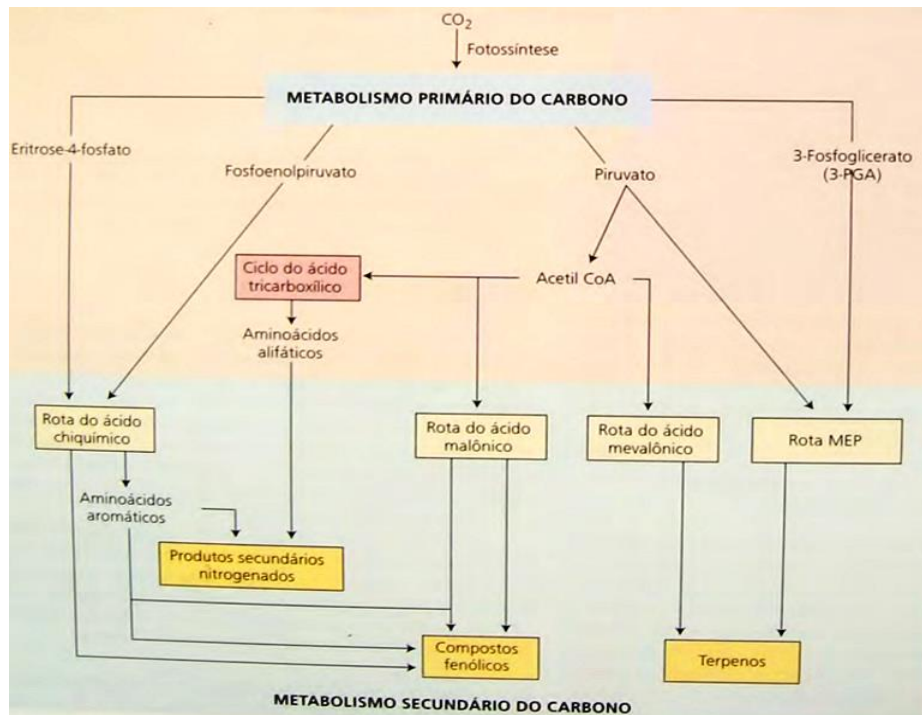


Figure 2- Rota da biossíntese do metabolismo secundário
Fonte: Taiz e Zeiger, 2006

Dentre estes distintos grupos do metabolismo secundário os terpenos se destacam por constituírem a maior parte de produtos secundários. Estes são formados da união de unidades pentacarbonadas, sendo sintetizado a partir acetil CoA ou intermediários glicolíticos. Muitos Vegetais possuem a mistura de monoterpenos e sesquiterpenos voláteis, chamados óleos

essenciais, os quais conferem aroma característico as suas folhas (TAIZ e ZEIGER, 2006).

3.3 ÓLEO ESSENCIAL

Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, obtidas de plantas (OLIVEIRA, 2007), onde se encontram em estruturas secretoras internas e externas como, por exemplo, nos tricomas glandulares (LEITE, 2009), que têm fortes componentes aromáticos. Estas substâncias aromáticas são obtidas de diferentes compostos químicos que ocorrem naturalmente na planta (OLIVEIRA, 2007). Estes grupos aromáticos em temperatura ambiente são voláteis, por isso, também são chamados óleos voláteis. São muito utilizados nas indústrias farmacêutica, cosmética e de fragrância.

Em geral, os óleos essenciais apresentam composição química complexa, contendo constituintes químicos de baixa massa molecular, especialmente hidrocarbonetos e derivados oxigenados (LEITE, 2009). Na maioria das vezes são constituídos por substâncias terpênicas, normalmente constituída de 10 a 15 átomos de carbono (mono e sexquiterpeno). Os principais constituintes das substâncias terpênicas encontradas no óleo são álcoois, ésteres, aldeídos e cetonas de cadeia curta (NICARETA, 2006).

Govindaraj *et al.* (2008) avaliaram a composição química do óleo essencial de *A. vulgaris* e determinaram como principais constituintes: cânfora, alfa-tuiona, 1,8-cineol, canfeno, alfa-fencheno, beta-cariofileno e germacreno D.

3.4 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos estão associados a um elevado número de atividades biológicas, dentre as quais se destaca a atividade antioxidante. O

consumo de compostos antioxidantes ou alimentos com níveis elevados destes compostos está associado à prevenção e a redução do risco de doenças associadas a reações de radicais livres. O aumento de doenças degenerativas, como a doença cardíaca coronária, diabetes, câncer e doenças relacionadas com a idade tem aumentado o interesse em encontrar novas fontes naturais de compostos antioxidantes não tóxicos (GOUVEIA & CASTILHO, 2011).

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários das plantas. Estes podem ser definidos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilas (Figura 2) (SOARES, 2002). Eles diferem de acordo com o número e a posição da hidroxilação e metoxilação do anel aromático, alguns destes são o ácido p-cumárico, cafeico, ferúlico e ácidos glicosilados ou esterificados (GOUVEIA & CASTILHO, 2011). Os principais compostos fenólicos comumente encontrados em vegetais superiores podem ser classificados em várias classes de acordo com o tipo e número de anéis fenólicos, e em subclasses de acordo com substituições específicas na estrutura básica, associações com carboidratos e formas polimerizadas. Os compostos fenólicos são classificados em duas classes: os não flavonoides e os flavonoides.

Os compostos flavonoides, como, por exemplo, flavononas, proantocianinas, antocianidinas, isoflanonas (FARAH & DONANGELO, 2006), podem apresentar atividade antioxidante em determinadas condições, essas propriedades benéficas podem ser atribuídas à sua capacidade de sequestrar os radicais livres (DECKER, 1997). Os flavonoides atuam como antioxidantes na inativação dos radicais livres, em ambos os compartimentos celulares, lipofílico e hidrofílico. Esses compostos têm a capacidade de doar átomos de hidrogênio e, portanto, inibir as reações em cadeia provocadas pelos radicais livres (HARTMAN & SHANKEL, 1990; ARORA *et al.*, 1998)

3.5 ANTIOXIDANTES

Antioxidantes podem ser definidos como substâncias que em baixas concentrações inibem a oxidação do substrato de maneira eficaz quando comparada a um substrato oxidável. Estes atuam como agentes redutores, capazes de sequestrar os radicais livres, inibidores de enzimas e, também, como quelantes de metais, porém os seus efeitos biológicos estão correlacionados à atividade antioxidante (VELIOGLU *et al.*, 1998), esta é muito importante para combater os radicais livres (VEDANA *et al.*, 2008)

Algumas espécies de radicais livres existentes que podemos encontrar são O^{-1} oxigênio singlete, O^{2-} radical superóxido, OH^{\cdot} radical hidroxila, NO^{\cdot} óxido nítrico, $ONOO^{\cdot}$ peroxinitrito e Q^{\cdot} radical semiquinona (BIANCHI, 1999, p.123).

Os antioxidantes podem ser classificados em primários e secundários. São considerados primários os compostos de ação antioxidante capazes de inibir ou retardar a oxidação por inativação de radicais livres graças à doação de átomos de hidrogênio ou de elétrons, o que transforma os radicais em substâncias estáveis (MAISUTHISAKUL *et al.*, 2007). Alguns antioxidantes primários são compostos sintéticos utilizados em alimentos, podendo ser citado o BHA (butil hidroxianisol), BHT (butil hidroxitolueno), PG (galato de propila) e TBHQ (Terc-butil hidroquinona) (REISCHE *et al.*, 2002) (Figura 3).

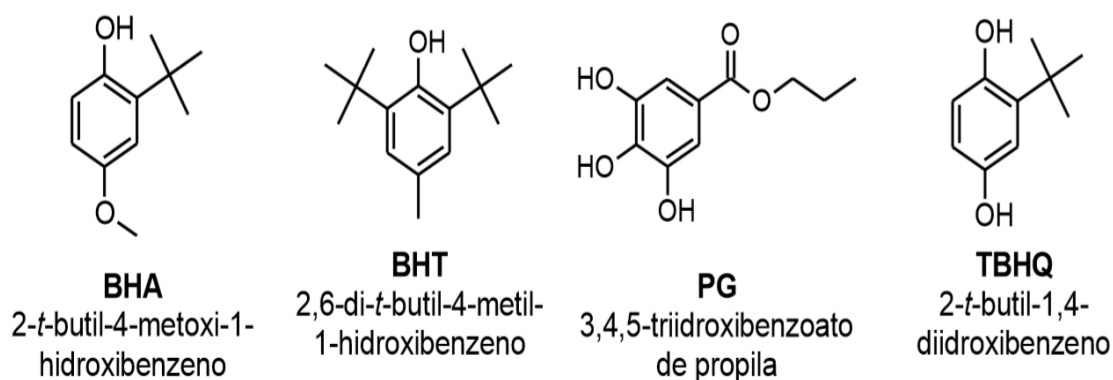


Figure 3- Antioxidantes sintéticos utilizados em alimentos
Fonte: Sandro, 2011

Os antioxidantes secundários ou preventivos agem por meio de vários mecanismos, diminuindo a taxa de oxidação por diferentes formas, mas não

convertem radicais livres em produtos mais estáveis. Podem quelar metais pró-oxidantes e desativá-los, repor hidrogênio para antioxidantes primários, decompor hidroperóxidos a espécies não radicais, desativar o oxigênio singlete, absorver radiação ultravioleta ou agir com sequestrante de oxigênio. Os antioxidantes secundários são classificados como sinergistas, pelo fato de promoverem a atividade dos antioxidantes primários, podendo-se citar o ácido cítrico, ácido ascórbico e ácido tartárico como bons exemplos de sinergistas (REISCHE *et al.*, 2002).

3.5.1 Determinação *in vitro* da atividade antioxidante.

Existem diferentes métodos analíticos para a determinação da atividade antioxidante de uma amostra, envolvendo desde ensaios químicos com substratos lipídicos a ensaios mais complexos utilizando as mais diversas técnicas instrumentais. (WRIGHT *et al.*, 2001).

Estes testes têm se tornado ferramentas usuais e extremamente necessárias na seleção inicial de substâncias que possam ser utilizadas como fármacos, auxiliando os pesquisadores na avaliação da atividade de substâncias isoladas de produtos naturais, bem como obtidas de fontes sintéticas. Além disso, estes métodos podem auxiliar na escolha das espécies de planta para estudos químicos e farmacológicos, bem como grau de maturação, condições ambientais, etc. e comprovar a presença de substâncias antioxidantes em alimentos como frutas, legumes e bebidas, ressaltando a importância de uma dieta rica em vegetais.

Devido aos diferentes tipos de radicais livres e as suas diferentes formas de atuação nos organismos vivos, dificilmente existirá um método simples e universal pelo qual a atividade antioxidante possa ser medida precisa e quantitativamente. Assim, a busca por testes mais rápidos e eficientes tem gerado um grande número de métodos para avaliar a atividade de antioxidantes naturais pelo uso de uma grande variedade de sistemas geradores de radicais livres.

3.5.1.1 Determinação de compostos fenólicos totais pelo método folin-ciocalteau

A quantificação de fenólicos totais, só permite quantificar compostos fenólicos simples que possuam baixa massa molecular (BECKER *et al.*, 2004). A quantificação de compostos fenólicos totais é, geralmente, realizada pelo método de Folin-Ciocalteu, que se baseia no número de grupos fenólicos ou em outros potenciais grupos oxidáveis presentes nos compostos da amostra. A reação ocorre pela transferência do elétron entre os reagentes redutores e o Mo(VI) em pH básico próximo a 10. Nesse pH, forma-se o íon fenolato a partir do composto fenólico, por perda de próton (Figura 4). O íon fenolato formado é capaz de reduzir o reagente Folin-Ciocalteu, formando-se compostos azuis (HUANG *et al.*, 2005).

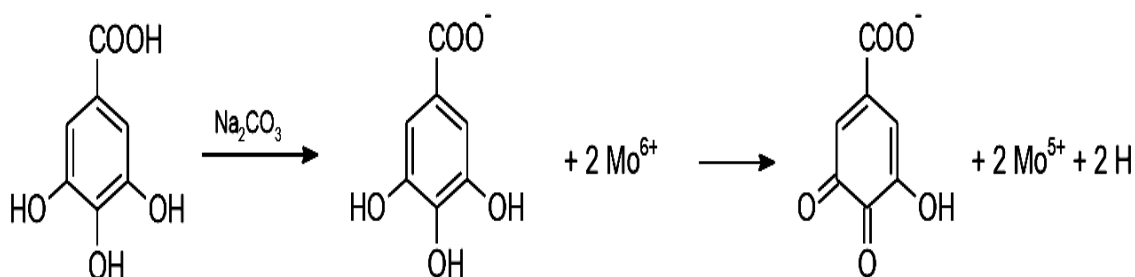


Figure 4- Mecanismo Antioxidante de Compostos Fenólicos
Fonte: (Oliveira, 2011)

3.5.1.2 Método de sequestro do radical DPPH

O DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) é um radical de nitrogênio orgânico estável de cor violeta e sua redução pode ser monitorada pelo decréscimo da absorvância durante a reação (BRANDWILLIANS *et al.*, 1995).

O método de sequestro do radical livre DPPH (Figura 5) pode ser utilizado para avaliar a atividade antioxidante de compostos específicos ou de um extrato em curto período de tempo. Na presença de um doador de hidrogênio ou elétron a intensidade de absorção diminui e a solução com o radical perde cor, tornando-se amarela, de acordo com o número de elétrons capturados, ou seja, quando o elétron desemparelhado do átomo de nitrogênio no DPPH recebe um átomo de hidrogênio proveniente de compostos antioxidantes, ocorre uma mudança de cor (PRADO, 2009).

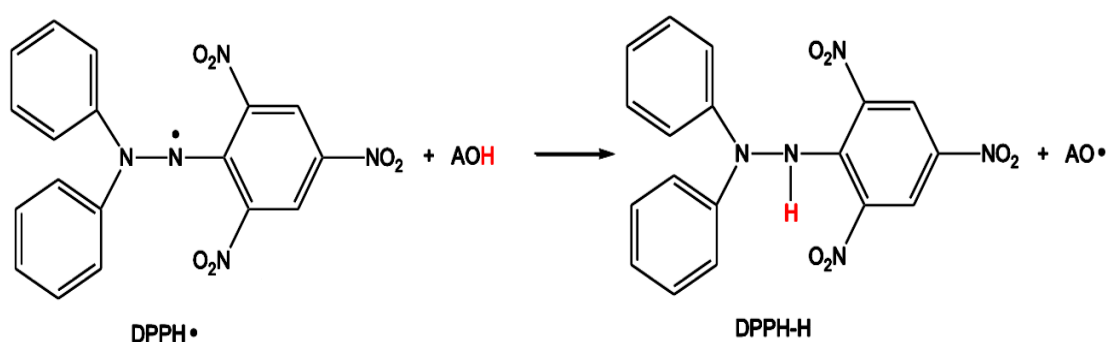


Figure 5- Reação entre a molécula de DPPH^o e um antioxidante para formar DPPH reduzido
Fonte: (Oliveira, 2011)

3.5.1.3 Método de sequestro do radical ABTS

O método ABTS⁺⁺ é um dos testes de atividade antioxidante mais rápidos e que oferece resultados reprodutíveis, além de permitir análises de compostos tanto de natureza lipofílica como hidrofílica (KUSKOSKI *et al.*, 2005). O método baseia-se na geração do ABTS⁺⁺ (Figura 6), de cor azul esverdeado, por meio da reação do ABTS com persulfato de potássio (RE *et al.*, 1999). Com a adição do antioxidante ocorre a redução do ABTS⁺⁺ a ABTS promovendo a perda da coloração do meio reacional, a porcentagem de inibição do ABTS⁺⁺ é determinada em função do Trolox, um padrão submetido às mesmas condições de análise do antioxidante.

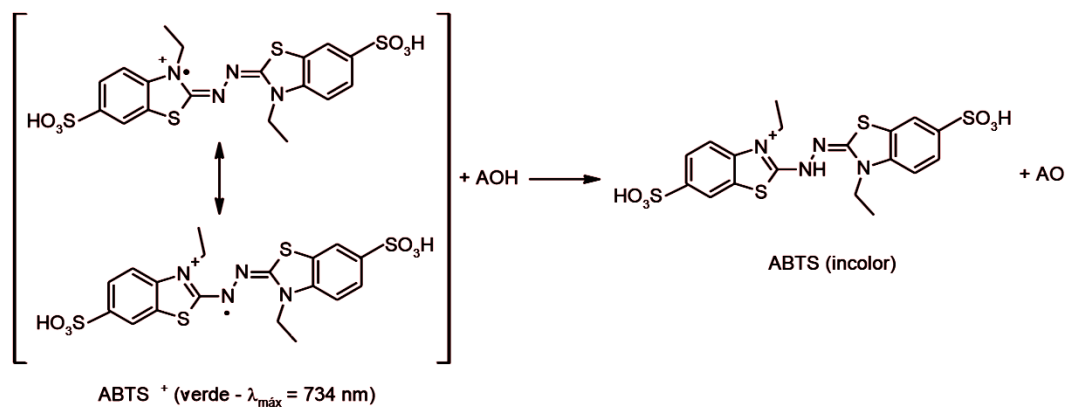


Figure 6- Formação do radical ABTS pela sua oxidação com persulfato de potássio
 Fonte(Oliveira, 2011)

3.5.1.4 Método do poder antioxidante de redução de ferro

O método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) – poder antioxidante de redução do ferro – é considerado como sendo uma alternativa desenvolvida para determinar a redução do ferro em fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos puros. O método pode ser aplicado não somente para estudos da atividade antioxidante em extratos de alimentos e bebidas, mas, também, para o estudo da eficiência antioxidante de substâncias puras, com resultados comparáveis àqueles obtidos com outras metodologias mais complexas (PULIDO *et al.*, 2000).

O ensaio do FRAP foi desenvolvido inicialmente para quantificar o ácido ascórbico em soro ou plasma. Este método está baseado na capacidade de um antioxidante em reduzir o Fe^{3+} em Fe^{2+} (Figura 7). Quando isso ocorre na presença de 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ) e em condições ácidas, a redução é acompanhada pela formação de um complexo corado (azul intenso) com o Fe^{2+} , com uma absorção máxima a 593 nm. Este ensaio oferece resultados rápidos e reprodutíveis, apresentando como desvantagens o fato de que a curva padrão deverá ser realizada com um antioxidante que seja solúvel em água como o ácido ascórbico e o Trolox e, geralmente, não se consegue medir todos os antioxidantes presentes em uma matriz complexa. No

entanto, muitos estudos sobre plantas e alimentos utilizam esse método em conjunto com outros ensaios (RUFINO *et al.*, 2006).

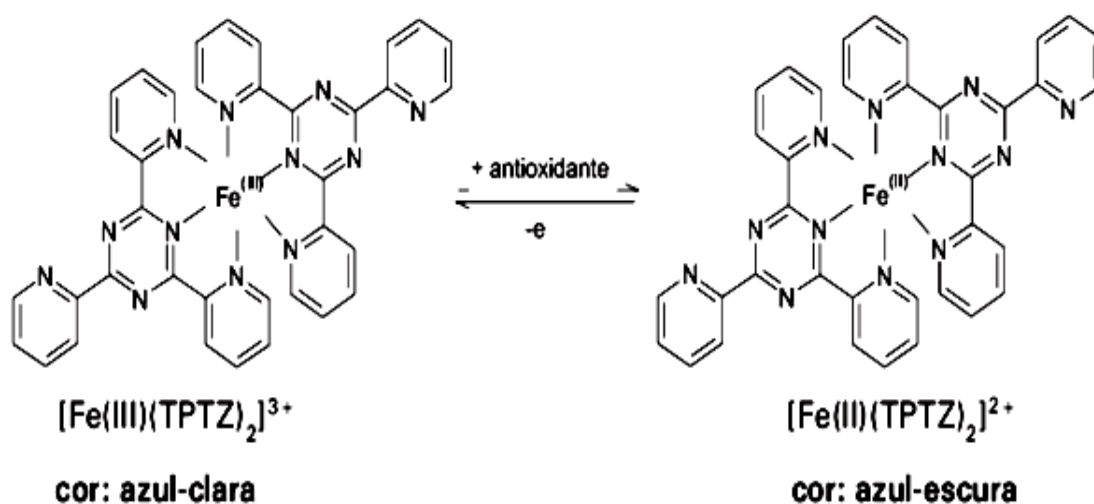


Figure 7- Redução do Fe(III) a Fe(II) pela adição de um antioxidante
Fonte: Bergamaschi (2010, p.39)

3.6 ALELOPATIA

As plantas liberam no ambiente uma variedade de compostos, primários e secundários através de suas raízes, folhas e partes em decomposição. O campo de estudos relacionados aos efeitos desses compostos nas plantas, denomina-se alelopatia. Por meio dessas substâncias químicas liberadas no solo uma planta pode inibir o crescimento de outra planta vizinha, , garantindo para si um aumento ao acesso à luz, à água e outros nutrientes, e proporcionando-lhe uma maior adaptação evolutiva (TAIZ & ZEIGER, 2004). Dentre os principais grupos de compostos secundários, segundo Waller *et al.* (1999), estão fitoalexinas, flavonoides, isoflavonoides, chalconas, auronas e xantinas, flavonas, flavonóis, e seus glicosídeos, ligninas, monoterpenos e monoterpenóides, naftoquinonas, antroquinonas, estilbenos, fenantrenos, poliacetilenos, policetonas, saponinas, sesquiterpenos e sesquiterpenoides, taninos, triterpenos e triterpenóides, muitos dos quais são potencialmente aleloquímicos. Os principais compostos conhecidos e que

favorecem esta inibição são os chamados fenilpropanoides simples e os derivados do ácido benzoico, além dos derivados do ácido cafeico e do ácido ferúlico, os quais atuam impedindo a germinação de outras plantas (TAIZ & ZIEGER, 2004).

A concentração, localização e composição variam de acordo com a espécie e suas condições ambientais, podendo ser excretados para o meio no solo ou no ar de forma ativa ou simplesmente lixiviados (FERREIRA, 2000). Esses compostos podem afetar: as estruturas citológicas e ultra-estruturais; os hormônios, tanto alterando suas concentrações quanto o balanço entre os diferentes hormônios; as membranas e sua permeabilidade; a absorção de minerais; o movimento dos estômatos, síntese de pigmentos e fotossíntese; a respiração; a síntese de proteínas; a atividade enzimática; as relações hídricas e condução; o material genético, induzindo alterações no DNA e RNA (Rizvi e Rizvi 1992).

As alterações do aleloquímico podem ser pontuais, mas, como o metabolismo consiste numa série de reações com vários controles do tipo “feedback”, rotas inteiras podem ser alteradas, mudando processos (Rizvi e Rizvi 1992). O resultado da ação alelopática é uma combinação de vários fatores, não estando isoladas dos fatores que alteram o crescimento das plantas, esta interação foi representada Einhellig (1996) na forma de um triângulo como pode ser verificado na Figura 8.

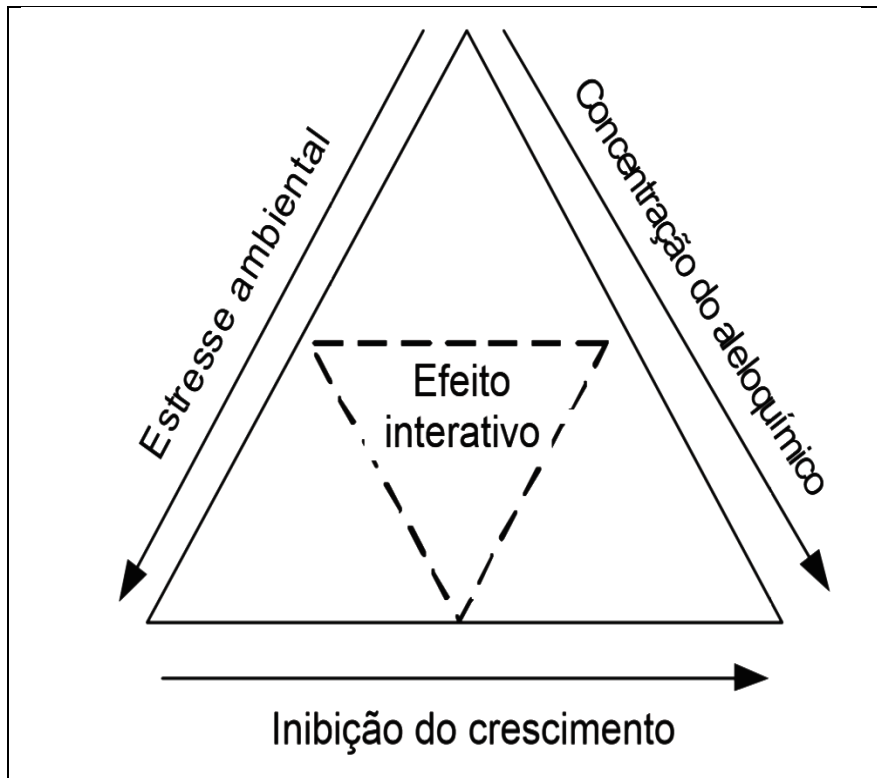


Figure 8- Ralação entre aleloquímicos e fatores ambientais influenciando o crescimento das plantas
Fonte: Einhellig, 1996

Os estudos de atividade alelopática permitem apresentar alternativas no manejo de plantas daninhas, fornecendo novas moléculas com potencial para compor novos produtos que possam substituir os herbicidas já existentes. (SOUZA FILHO *et al.*, 2005) diminuindo os riscos ao ambiente.

3.7 OTIMIZAÇÃO OU PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

O planejamento experimental, também denominado delineamento fatorial, representa um conjunto de ensaios estabelecidos com critérios científicos e estatísticos, com o objetivo de determinar a influência de diversas variáveis nos resultados de um dado sistema ou processo. Tais ensaios são frequentemente utilizados em estudos de processos para investigações

qualitativas ou quantitativas, explorando os efeitos e relações de variáveis de entrada (parâmetros) sobre variáveis de saída (respostas) (SANTOS, 2006).

A metodologia da superfície de resposta (RSM) se compõe de duas etapas: modelagem e deslocamento, em que a primeira ajusta modelos lineares ou quadráticos a resultados experimentais obtidos de planejamentos experimentais e a segunda busca o caminho de máxima inclinação de um modelo, que é o caminho no qual a resposta varia de forma mais pronunciada (MYERS & MONTGOMERY, 2002).

Se n variáveis controladas estão envolvidas, o planejamento necessita de 2^k ensaios diferentes. Calculam-se os efeitos principais e de interação das variáveis independentes sobre as respostas, determinando aqueles mais significativos e os comparando com o valor do efeito e erro experimental estimado (PIGHINELLI, 2009). Quando o modelo de primeira ordem não for eficiente, poderão ser realizados novos ensaios utilizando pontos axiais, gerando um modelo de segunda ordem.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

O material vegetal foi coletado na cidade de São Jorge D'Oeste, na região Sudoeste do Paraná. Logo após levado ate laboratório de Botânica da UTFPR-Pato Branco para identificação da espécie, para assim iniciar as análises.

Foi elaborada uma exsicata da espécie, a qual foi identificada e acervada no Herbário da UTFPR-Pato Branco. As amostras foram coletadas, processadas e em seguida submetidas às análises químicas e estatísticas, para a determinação da melhor condição de extração dos compostos bioativos. A segunda etapa foi determinar o teor de compostos fenólicos e antioxidantes por diferentes métodos. E por último a avaliação da ação alelopática do extrato em três diferentes concentrações.

4.2 PROCESSO DE OTIMIZAÇÃO

4.2.1. Delineamento experimental e análise estatística dos dados

Para o planejamento experimental da extração do óleo essencial foi utilizado um delineamento 2^2 , sendo as variáveis independentes: tempo de secagem (TS) e tempo de extração (TE) e as variáveis dependentes a atividade antioxidante pelo método de sequestro dos radicais DPPH e ABTS (Tabela 1).

O experimento foi desenvolvido utilizando um extrator clevenger, sendo pesados em um balão de fundo redondo 60g de amostra e adicionados 480 mL de água destilada e as extrações realizadas variando-se o TE e TS conforme indicado na Tabela 1.

Tabela 1: Os níveis das variáveis independentes empregadas na extração dos antioxidantes do óleo essencial de *Artemisia vulgaris* L..

Variáveis Independentes	Níveis		
	-1	0	1
Tempo de secagem (TS)	24h	72h	120h
Tempo de Extração (TE)	2h	3h	4h

No planejamento experimental para obtenção do extrato hidroalcoólico vegetal foi utilizado um delineamento 2^3 , sendo as três variáveis independentes: concentração de etanol P.A (%), massa (g) de amostra utilizada e temperatura ($^{\circ}\text{C}$) na extração. As variáveis dependentes foram a concentração de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante pelos métodos de sequestro do radicais DPPH e ABTS (Tabela 2).

Para o desenvolvimento dos ensaios, a amostra (composta por folhas, caule e flor) foi acrescida de 25 mL da mistura etanol: água em diferentes concentrações (Tabela 2) e os compostos extraídos em banho-maria por um período de 30 minutos, na sequencia, os extratos permaneceram em repouso durante 24h em geladeira, sendo posteriormente filtradas em papel filtro qualitativo.

Tabela 2: Os níveis das variáveis independentes empregados na extração dos compostos fenólicos totais e antioxidantes do extrato bruto vegetal de *Artemisia vulgaris* L..

Variáveis Independentes	Níveis		
	-1	0	1
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	40	55	70
Concentração de Etanol (%)	50	65	80
Massa (g)	1	1,5	2

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os coeficientes de regressão dos efeitos lineares e de interação foram determinados por Regressão Linear Múltipla (MLR). A diferença foi considerada significativa quando $p < 0,05$. Análise de variância (ANOVA) foi aplicada para validar o modelo. As equações geradas através da tabela do efeito de regressão foram usadas para gerar o gráfico de superfície de resposta. Todos os cálculos e gráficos do planejamento experimental foram feitos com o auxílio do software Statistica 8.0.

4.4 CÁLCULO DO RENDIMENTO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

O cálculo de rendimento do óleo essencia segundo Gurgel (2009), é expresso em ml/ 100g de acordo com a equação a seguir (eq. 1):

$$\text{Rendimento} = (V_{\text{óleo essencial}} \times 100) / P \quad (\text{Equação 1})$$

P = Peso do material botânico

$V_{\text{óleo}}$ = Volume do óleo;

4.5 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.5.1 Compostos Fenólicos Totais

A análise do teor de compostos fenólicos totais do óleo essencial e dos extratos da *A. vulgaris* foi realizada de acordo com o método

espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton (1999), utilizando o ácido gálico como padrão (SINGLETON, 1996).

A reação consistiu em colocar em um tubo de ensaio uma alíquota de 0,5 mL da amostra, previamente diluída 10 vezes, e adicionar 2,0 mL da solução de carbonato de sódio (4%) e por fim, adicionar 2,5 mL da solução Folin-Ciocalteu (1:10 v/v). Em seguida, as amostras foram deixadas em repouso por 2 horas, ao abrigo da luz. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 740 nm. Uma amostra em branco foi conduzida nas mesmas condições e os resultados dos compostos fenólicos totais foi expressos em equivalente de ácido gálico (mg EAG/g por grama de amostra) calculados por meio do ajuste da curva de calibração do ácido gálico com concentrações que variaram de 5 a 80 µg/mL (SINGLETON, 1996).

4.5.2 Sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil)

O padrão utilizado foi o Trolox (+/-)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico) nas concentrações de 15, 25, 50, 75 e 100µM. A mistura de reação foi realizada em tubos de ensaio e constituída pela adição de 500 µL dos padrões ou das amostras previamente diluídas 10 vezes para extrato e 2000 vezes para o óleo, 3,0mL de etanol 80% e 300µL do radical DPPH 0,5 mM em solução de etanol e incubada por 45 minutos, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. (MENSOR *et al.*, 2001). Após o tempo de reação as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro a 517nm (MENSOR *et al.*, 2001).

4.5.3 Sequestro do radical ABTS+. (2,2- azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácidosulfônico)

O radical ABTS^{•+} foi formado pela reação de 140 mM de persulfato de potássio com 7 mM de ABTS e, armazenado no escuro e a temperatura

ambiente, por 16 horas. Uma vez formado, o radical foi diluído com etanol até a obtenção do valor de absorvância de $0,700 \pm 0,020$ em comprimento de onda 734 nm (RE *et al.*, 1999).

Em ambiente escuro foi transferida uma alíquota de 30 μ L do padrão ou das amostras em suas respectivas diluições 50 vezes para extrato e 2000 vezes para óleo, tanto para o óleo como para o extrato, para tubos de ensaio e adiciona-se 3,0 mL do radical ABTS⁺. As absorvâncias foram lidas a 734 nm, após 6 minutos da reação, utilizando o etanol como branco (RE *et al.*, 1999).

4.5.4 Atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro – FRAP

O reagente FRAP é obtido a partir da combinação de 25 mL de tampão acetato (0,3 M), 2,5 mL de uma solução de TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina)(10 mM) e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico (20 mM), devendo ser usado imediatamente após seu preparo (RUFINO, *et al.*, 2006).

Para a curva padrão do sulfato ferroso utilizou-se a solução padrão de sulfato ferroso em concentrações que variaram de 500 μ M a 1500 μ M (RUFINO, *et al.*, 2006). Em ambiente escuro, foi transferida uma alíquota de 90 μ L do padrão ou das amostras para tubos de ensaio, acrescentar 270 μ L de água destilada e misturar com 2,7 mL do reagente FRAP, homogeneizar em agitador de tubos e manter em banho-maria a 37 °C. Realizar a leitura (595 nm) após 30 minutos da mistura e utilizar o reagente FRAP como branco para calibrar o espectrofotômetro (RUFINO, *et al.*, 2006).

4.6 ANÁLISE DE ATIVIDADE ALELOPÁTICA

O teste de atividade alelopática foi realizado por meio de um bioensaio de germinação. Para tanto, foi levado em conta o tempo médio de germinação, a germinabilidade, a velocidade média de germinação, a velocidade de germinação de Maguire, o coeficiente de variação do tempo, a incerteza e a

sincronia (RANAL & SANTANA, 2006). Para as análises utilizou-se a melhor condição determinada pelo planejamento fatorial, sendo este determinado para a extração a uma temperatura de 70°C, utilizando-se 1g de amostra diluída em Etanol 65% com volume de 25ml durante 30 minutos. Logo após a extração, a amostra foi filtrada e submetida ao rota-evaporador até a eliminação da parte alcoólica, assim o extrato concentrado sem a presença de álcool foi liofilizado (com os valores de massa após a liofilização pôde-se calcular o rendimento do extrato) e novamente diluída em 3, 4 e 5%.

Foram utilizadas sementes de *Lactuca sativa* L. (alface), já que esta é considerada uma planta indicadora de atividade alelopática (ALVES *et al.*, 2004), sementes de *Solanum lycopersicum* L. (tomateiro), que, assim como o alface, é muito utilizada em biotestes de laboratório (FERREIRA & AQUILA, 2000), adquiridas em comércio local . Além dessas, foram utilizadas sementes de *Bidens pilosa* L. (picão-preto), uma espécie infestante de lavouras (LORENZI, 1982), coleta em campo da cidade de Pato Branco/PR.

As análises foram realizadas em triplicatas e, em cada placa de petri, foram colocados dois papéis filtro qualitativos, aos quais foram acrescentados 3ml da amostra. Aguardou-se a secagem e, logo após, foram acrescentados 3ml de água destilada e colocadas, em cada placa, 10 sementes de cada espécie. Essas foram incubadas em estufa BOD, com temperatura de 24°C, fotoluminescência de 12h durante 8 dias. Foram utilizadas placas controle com água destilada e com álcool, para o qual se esperava evaporar e se acrescentava água destilada para as três espécies testadas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2.1 Delineamento experimental para o Óleo essencial de *A vulgaris L.*

Os valores obtidos no planejamento experimental para os antioxidantes DPPH e ABTS estão descritos na tabela 3. Observa-se que os maiores valores de atividade antioxidante para ambos os métodos foram obtidos na condição de 2h de extração e 120h de secagem.

Tabela 3: Resultados de atividade antioxidante pelo método de sequestro dos radicais ABTS e DPPH do óleo essencial de *A. vulgaris* obtidos no planejamento fatorial

Ensaio	TE	TS	ABTS (μmol trolox/góleo)	DPPH (μmol trolox/g óleo)
1	-1 (2h)	-1 (24h)	759,00	1.941,00
2	1 (4h)	-1 (24h)	493,20	1.116,25
3	-1 (2h)	1 (120h)	923,40	1.699,50
4	1 (4h)	1 (120h)	592,50	1.494,00
5	0 (3h)	0 (72h)	586,50	1.282,50
6	0 (3h)	0 (72h)	562,50	1.302,00
7	0 (3h)	0 (72h)	617,40	1.092,00

TS- tempo de secagem e TE- tempo de extração

Os valores do efeito (Tabela 4) para o modelo de regressão linear do óleo essencial de *A. vulgaris* mostrou que o tempo de extração foi significativo ($p < 0,05$) quando utilizado o método de sequestro do radical ABTS, no entanto, os modelos gerados não foram significativos ($p > 0,05$) quando o método de sequestro do radical DPPH foi utilizado como variável dependente.

Os fatores Temperatura de extração (TE) e média linear apresentaram efeito significativo a nível de 95% de confiança. (Tabela 4).

Tabela 4: Efeito das variáveis tempo de extração e tempo de secagem do planejamento fatorial completo 2² do método ABTS no óleo essencial de *Artemisia vulgaris* L.

Fatores	Efeito	Desvio padrão	t(3)	P	Limite de confiança (-95 %)	Limite de confiança (+95,%)
*Media Linear	647,786	30,69151	21,10635	0,000233	550,112	745,4598
Temperatura de extração (TE)	-298,350	81,20210	-3,67417	0,034899	-556,771	-39,9287
*Tempo de secagem (TS)	131,850	81,20210	1,62373	0,202896	-126,571	390,2713
TE x TS	-32,550	81,20210	-0,40085	0,715371	-290,971	225,8713

*Fatores significativos no limite de confiança de 5%, R²= 0,84453

O Diagrama de Pareto (Figura 9) indica que o tempo de extração (TE) representa efeito significativo sobre o sistema e o sinal negativo do termo implica a existência de um ponto de mínima expressão da atividade.

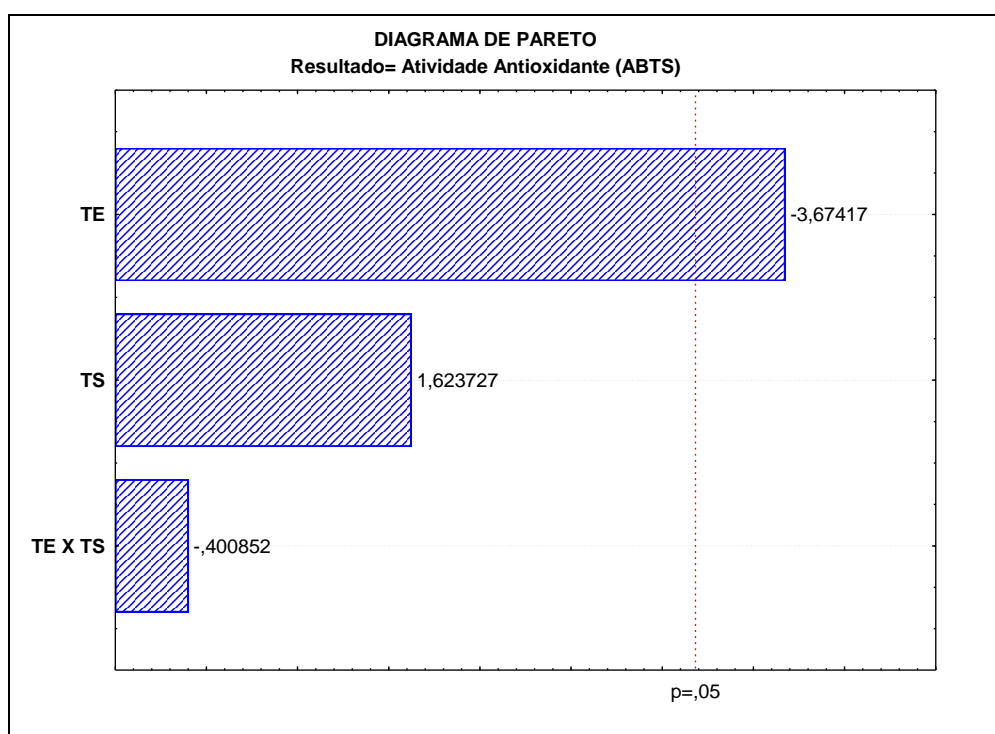


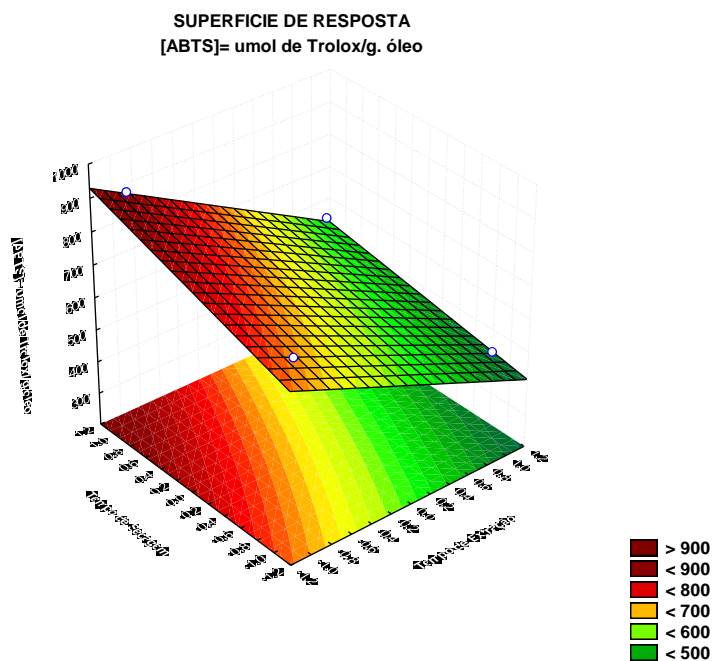
Figure 9- Diagrama de pareto para a atividade antioxidante ABTS demonstrando a significância do tempo de extração em relação ao tempo de secagem

A equação 1 foi gerada a partir dos valores codificados e dos resultados dos efeitos para a atividade antioxidante pelo método ABTS. Na

sequencia foram gerados os gráficos de superfície de resposta (a) e o gráfico de contorno (b) conforme (Figura 10).

$$\text{Atividade Antioxidante (ABTS) \%} = 647,786 - 298,350 \times \text{TE} \quad (\text{Eq. 2})$$

A



B

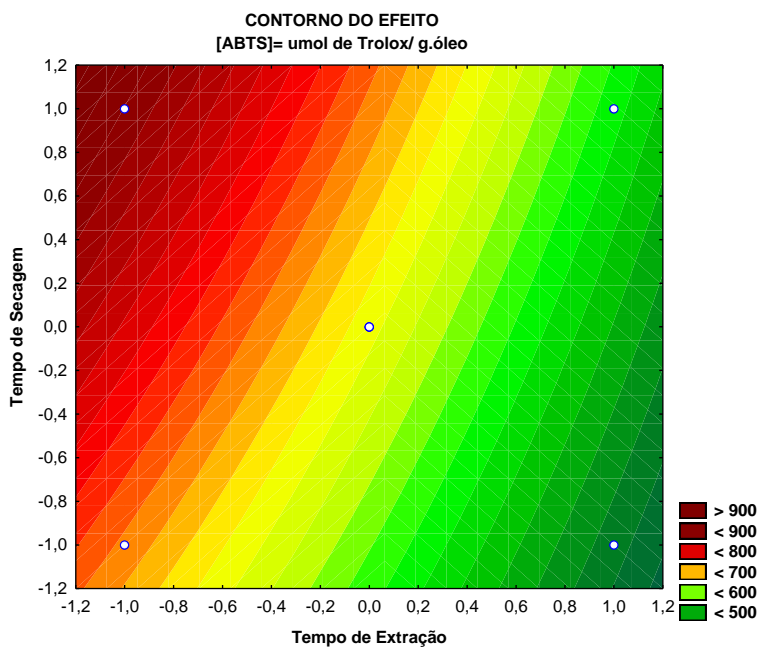


Figure 10- Gráfico de superfície de resposta do sequestro do radical ABTS (A) e curva de contorno (B) para atividade antioxidante do óleo essencial de *Artemisia vulgaris* L. em função do tempo de secagem e do tempo de extração.

A melhor condição da atividade de sequestro do radical ABTS foi obtida no tempo de secagem de 120h indicando que o maior tempo de secagem aumenta o potencial antioxidante do óleo essencial, o que pode ser devido a concentração dos constituintes bioativos quando há a eliminação da água do meio, e também por estar extraindo de uma maior quantidade de massa. Masetto *et al.* (2007) relata a influência do tempo de secagem no rendimento do óleo essencial de *pacthouli*, mas não relaciona com a atividade antioxidante.

A análise de variância (ANOVA) (Tabela 5) foi utilizada para verificar a adequação do modelo. Para que este seja significativo o $F_{\text{regressão}}$ deve ser igual ao $F_{\text{calculado}}$, o qual, por sua vez, deve obter um valor maior que o F_{tabelado} . Neste estudo, o fator TE $F_{\text{calculado}}$ foi de 4,10 vezes superior ao F_{tabelado} , indicando que o modelo é estatisticamente significativo e preditivo.

Tabela 5: Análise de variância no estudo do efeito das variáveis tempo de extração e tempo de secagem na atividade antioxidante do óleo essencial de *Artemisia vulgares*.

Fonte de Variação	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado médio	$F_{\text{calculado}}$
Regressão	107456,6	1	107456,6475	27,1611129
Resíduo	19781,3	5	3956,268214	
Total SS	127238,0	6		

* no limite de confiança de 5%, $F_{\text{tabelado}}_{0,95;1;5} = 6,61$.

5.2.2 Delineamento experimental para o extrato hidroalcoólico de *A. vulgaris L.*

5.2.2.1 Compostos Fenólicos

As respostas do planejamento fatorial obtidas nos diferentes ensaios para as variáveis dependentes compostos fenólicos e sequestro do radical DPPH, apresentaram maiores valores nos ensaios 1 e 2 respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6: Resposta ao planejamento fatorial para atividade antioxidante e para compostos fenólicos do extrato de *A vulgaris L*

Ensaio	Temperatura (°C)	Etanol (%)	Massa (g)	Compostos Fenólicos (mg EAG.g ⁻¹)	DPPH (µmol trolox.g ⁻¹)
1	-1(40)	-1 (50)	-1 (1)	76,35	131,35
2	1(70)	-1 (50)	-1 (1)	72,40	137,90
3	-1 (40)	1 (80)	-1 (1)	63,25	120,70
4	1 (70)	1 (80)	-1 (1)	67,50	126,05
5	-1 (40)	-1 (50)	1 (2)	63,15	68,55
6	1 (70)	-1 (50)	1 (2)	59,35	70,40
7	-1 (40)	1 (80)	1 (2)	54,65	72,05
8	1 (70)	1 (80)	1 (2)	51,60	71,00
9	0 (55)	0 (65)	0 (1)	70,40	94,95
10	0 (55)	0 (65)	0 (1)	71,20	94,40
11	0 (55)	0 (65)	0 (1)	68,80	91,15

* R² = 0,82371

Os valores de efeito para o modelo de regressão do extrato hidroalcoólico de *A vulgaris L.* se apresentam na Tabela 7.

Tabela 7: Efeito das variáveis temperatura, etanol e massa no teor de compostos fenólicos do extrato hidroalcoólico de *A. vulgaris*.

FATORES	Efeito	Desvio padrão	t(3)	P	Limite de confiança (-95 %)	Limite de confiança (+95,%)
Media Linear* (L)	65,3318	1,544966	42,28689	0,000002	61,0423	69,62133
T (°C)	-1,6375	3,623267	-0,45194	0,674735	-11,6973	8,42230
Etanol (%)	-8,5625	3,623267	-2,36320	0,077392	-18,6223	1,49730
Massa (g)*	-12,6875	3,623267	-3,50167	0,024858	-22,7473	-2,62770
T X Etanol	2,2375	3,623267	0,61754	0,570302	-7,8223	12,29730
T X Massa	-1,7875	3,623267	-0,49334	0,647631	-11,8473	8,27230
Etanol X Massa	0,4375	3,623267	0,12075	0,909713	-9,6223	10,49730

Fatores significativos no limite de confiança de 5%

A variável massa (g) obteve significância (p<0,05), para a análise de compostos fenólicos totais e o sinal negativo do termo indica que menor

quantidade de massa da amostra, implicará em uma maior atividade de compostos fenólicos (Tabela 7). Os resultados também estão representados no gráfico de pareto (Figura 11).

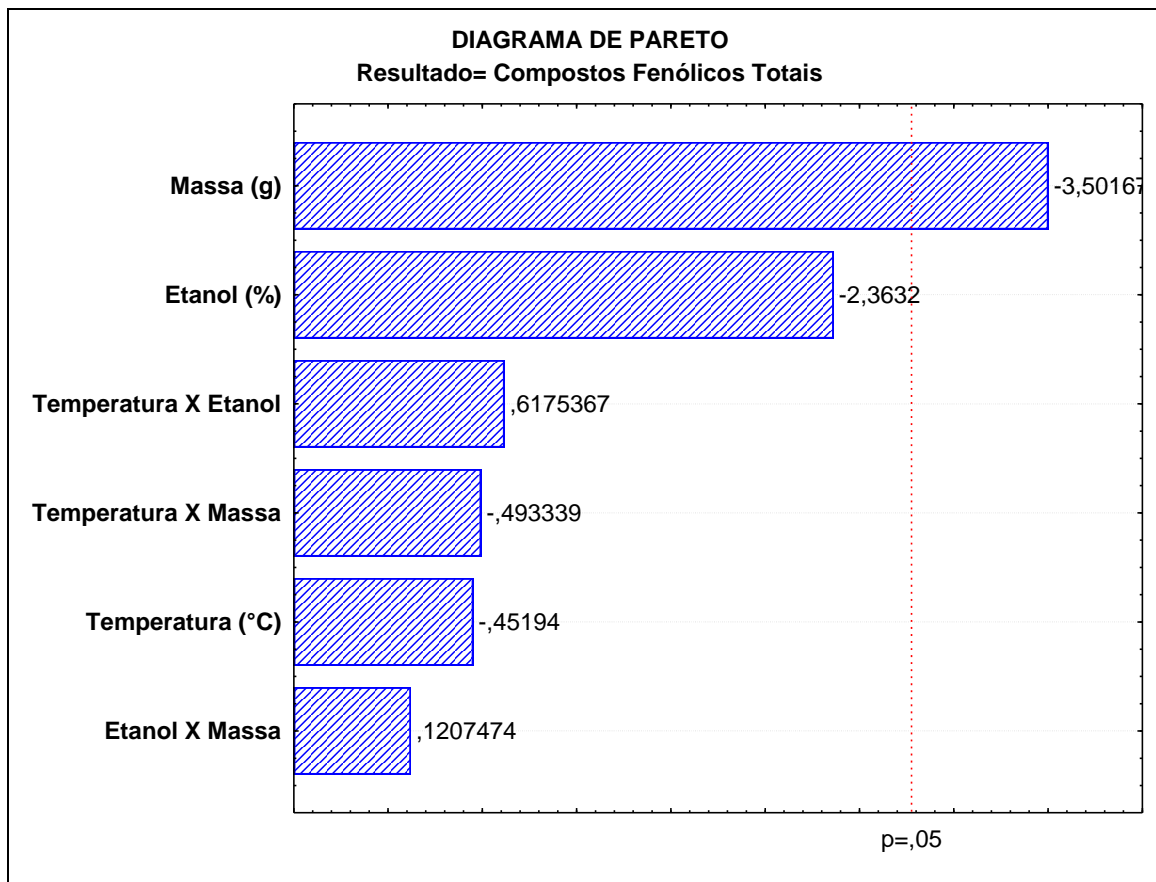


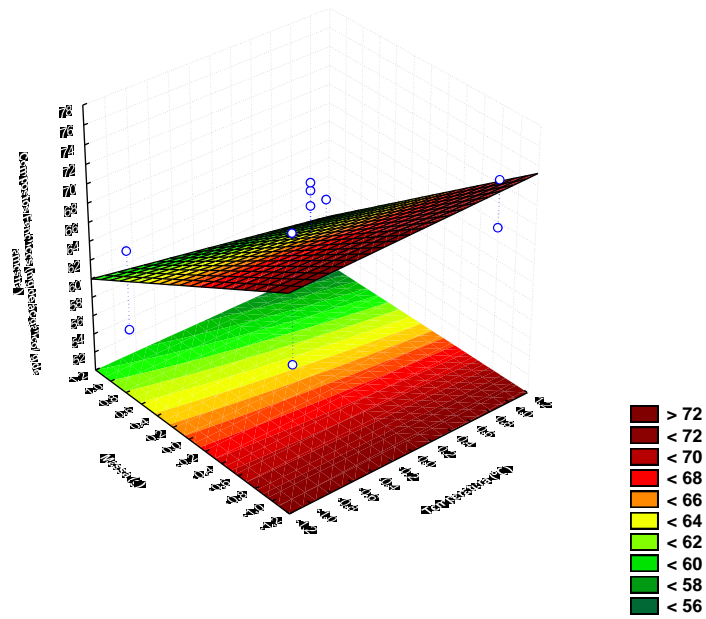
Figure 11- Diagrama de Pareto demonstrando a Significância da variável massa (g) para resultados de compostos fenólicos totais

Na sequência a equação de porcentagem de compostos fenólicos totais (Eq. 3), foi gerada a partir dos valores codificados e os resultados dos efeitos foram utilizados para obter os gráficos de superfície de resposta (A) e o gráfico de contorno (B) (Figuras 12 e 13).

$$\text{Compostos Fenólicos Totais \%} = 65,3318 - 12,6875 \times \text{Massa} \quad (\text{Eq. 3})$$

A

SUPERFICIE DE RESPOSTA Compostos Fenolicos



B

CONTORNO DO EFEITO Compostos Fenolicos

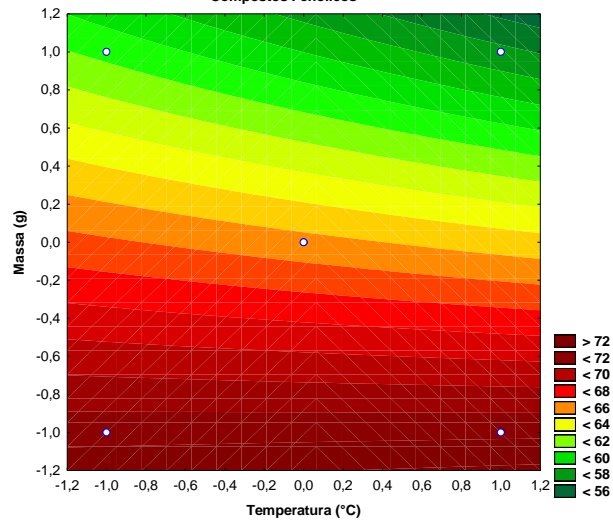
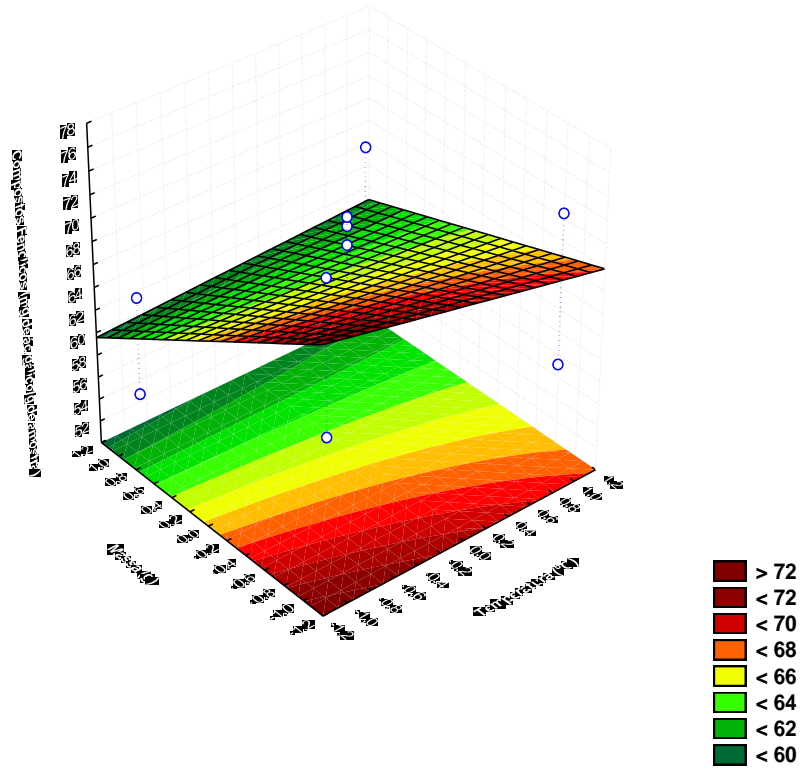


Figure 12- Gráficos de superfície de resposta de Compostos Fenólicos Totais. A) Gráfico de superfície de resposta para variável temperatura (°C) x massa (g), B) Gráfico de contorno para variável temperatura (°C) x massa(g)

A

SUPERFICIE DE RESPOSTA Compostos Fenolicos



B

CONTORNO DO EFEITO Compostos Fenolicos

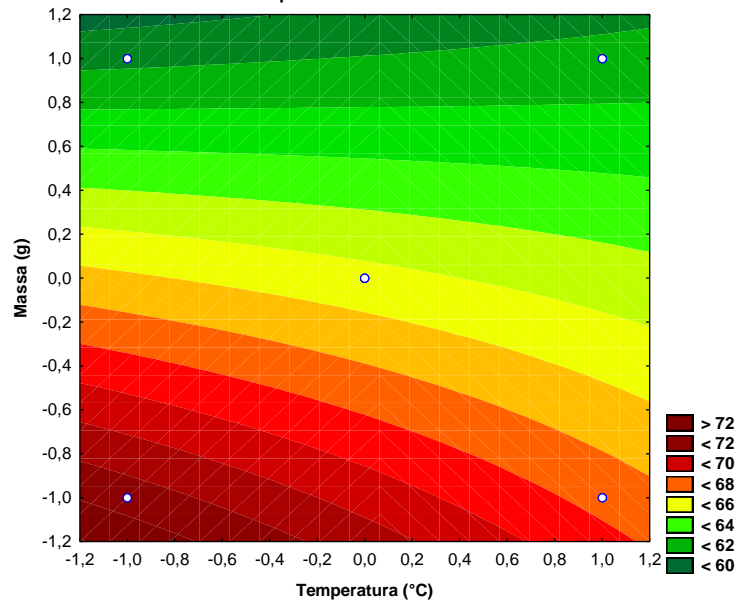


Figure 13- Gráficos de superfície de resposta de compostos fenólicos. A) Gráfico de superfície de resposta para variável etanol (%) x massa (g), B) Gráfico de contorno para variável etanol (%) x massa(g)

Ao analisar as Figuras 12 e 13, conclui-se que o maior teor de compostos fenólicos totais foi obtido com menor quantidade de massa da planta, nos limite ate 1g de amostra.

O $F_{\text{calculado}}$ (Tabela 8) foi de 8,21 vezes maior que o F_{tabelado} , indicando que o modelo é significativo, para variável dependente compostos fenólicos.

Tabela 8: Análise de variância no estudo do efeito das varáveis temperatura, concentração de etanol e massa na atividade de compostos fenolicos do extrato de *Artemisia vulgaris L.*

Fonte de Variação	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado médio	$F_{\text{calculado}}$
Regressão	490,7000	1	490,726875	42,052496
Resíduo	105,0245	9	11,66938763	
Total SS	595,7514	10		

* no limite de confiança de 5%, $F_{\text{tabelado } 0,95, 1, 9} = 5,12$.

5.2.2.2 Atividade de sequestro do radical DPPH

Os valores de efeito para o modelo de regressão do extrato de *A. vulgaris L.* estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Efeito das variáveis temperatura, etanol e massa na atividade antioxidante do extrato de *A. vulgaris L.*

FATORES	Efeito	Desvio padrão	$t(3)$	P	Limite de confiança (-95 %)	Limite de confiança (+95,%)
Media Linear*	98,0455	1,461813	67,0711	0,000000	93,9868	102,1041
T (°C)	3,1750	3,428256	0,9261	0,406799	-6,3434	12,6934
Etanol (%)	-4,6000	3,428256	-1,3418	0,250771	-14,1184	4,9184
Massa (g)*	-58,5000	3,428256	-17,0641	0,000069	-68,0184	-48,9816
T X Etanol	-1,0250	3,428256	-0,2990	0,779841	-10,5434	8,4934

T X Massa	-2,7750	3,428256	-0,8094	0,463657	-12,2934	6,7434
Etanol X Massa	6,6500	3,428256	1,9398	0,124411	-2,8684	16,1684

*Fatores significativos no limite de confiança de 5%, $R^2 = 0,98677$

O modelo de regressão apontou que a atividade antioxidante pelo método de seqüestro do radical DPPH foi significativa ($p < 0,05$) para a quantidade de massa de amostra (Tabela 9).

O fator massa apresenta efeito negativo e significativo no limite de confiança de 95%, sugerindo que uma diminuição da variável massa ocasiona um aumento da atividade antioxidante pelo método do radical DPPH (Figura 14).

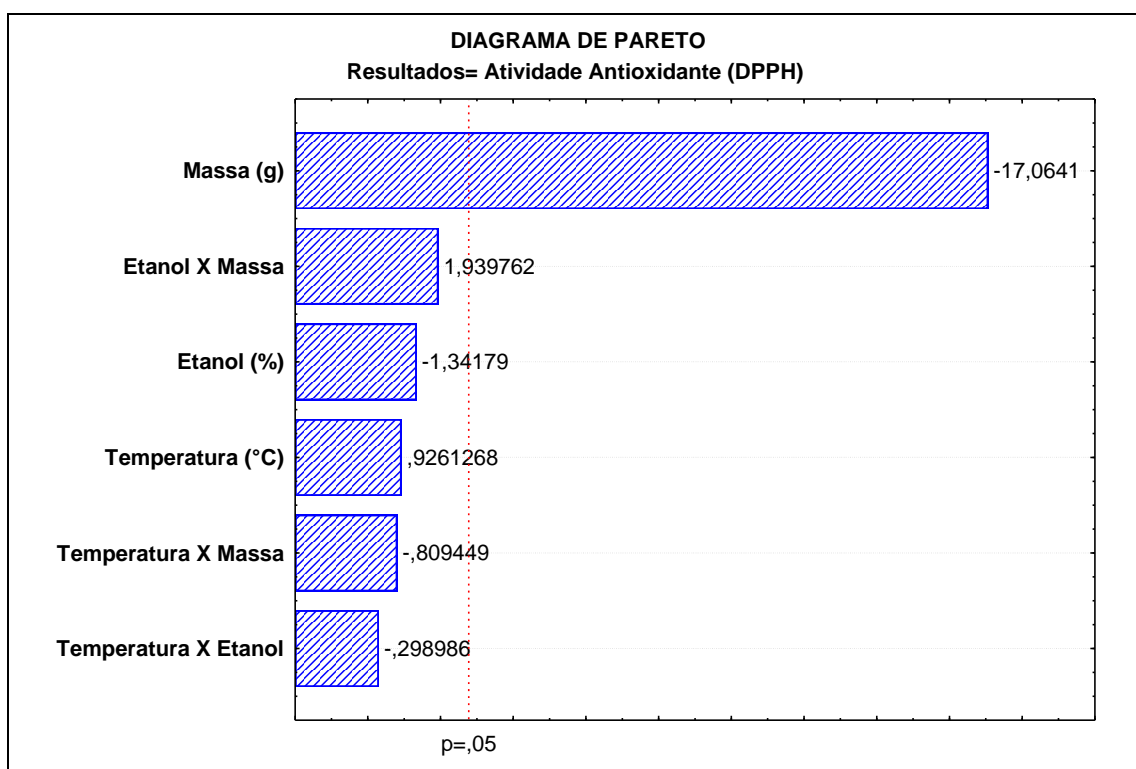


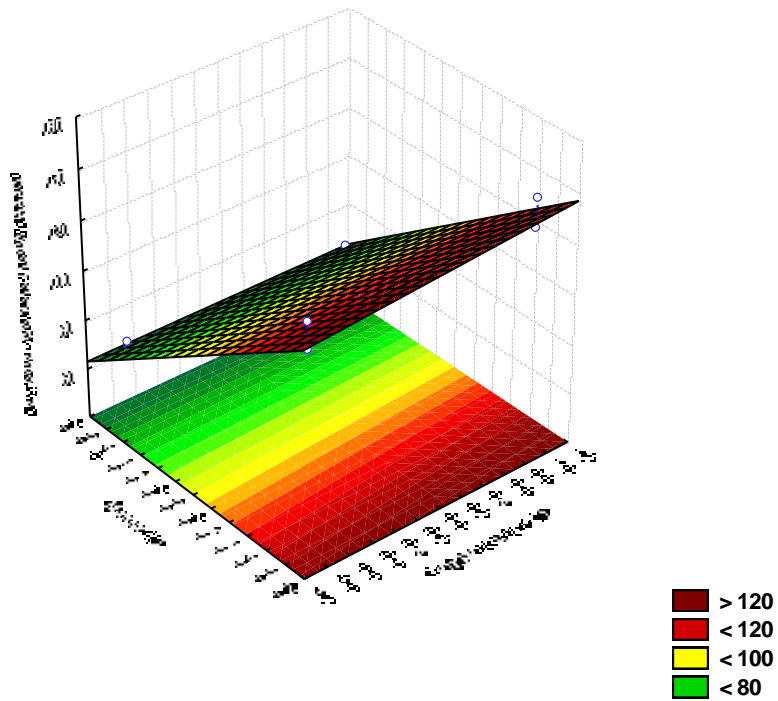
Figure 14- Diagrama de Pareto demonstrando a Significância da variável massa(g) para resultados de atividade de seqüestro do radical DPPH (nível de confiança de 95%)

Através da tabela dos efeitos foi possível obter a equação 4, sendo utilizada para obtenção da superfície de resposta e o gráfico de contorno (Figura 15 e 16).

$$\text{Atividade Antioxidante \%} = 98,0455 - 58,5 \times \text{Massa} \quad (\text{Eq. 4})$$

A

SUPERFICIE DE RESPOSTA
Resultado= Atividade Antioxidante ([DPPH] ($\mu\text{mol.trolox/g}$ de amostra))



B

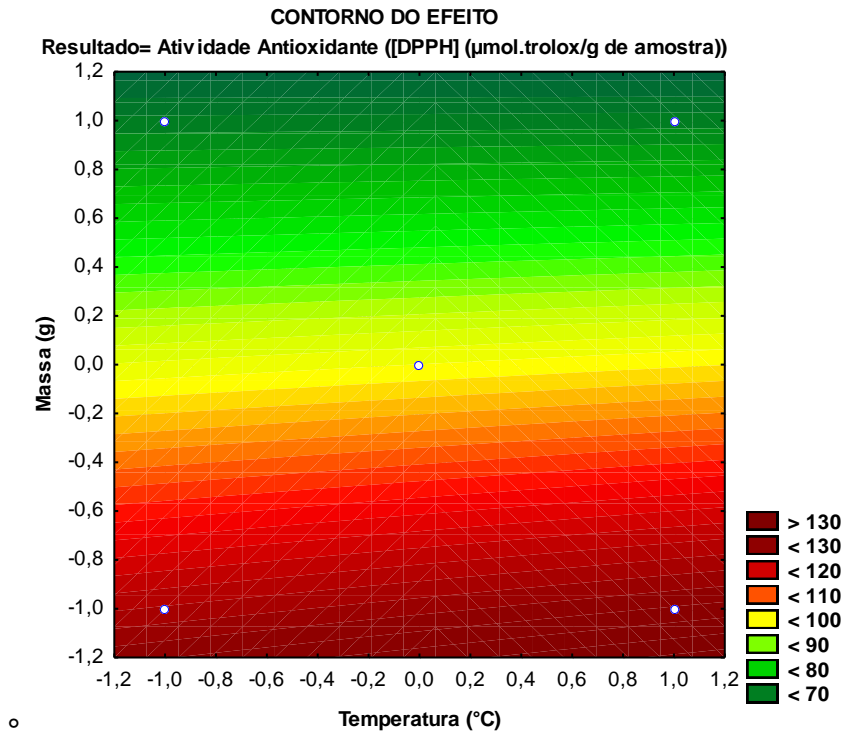
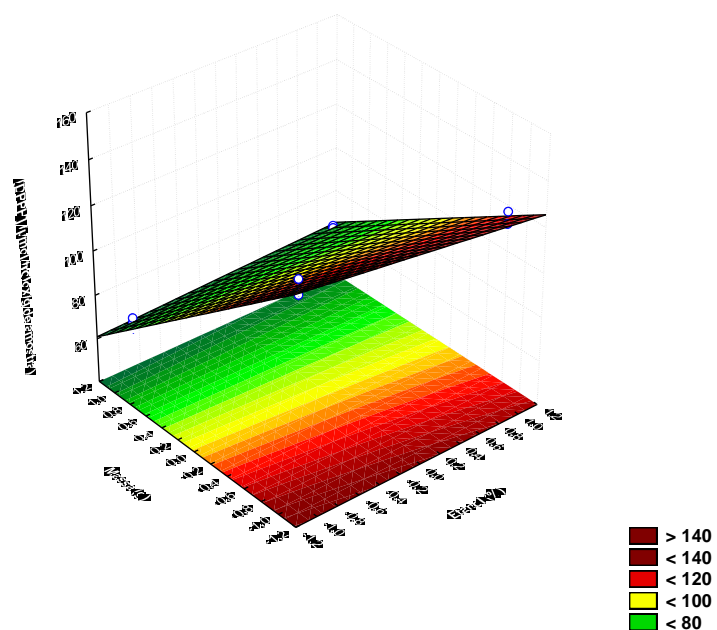


Figure 15- Gráficos do radical DPPH. A) Superfície de resposta e B) Contorno do efeito da variável Temperatura (°C) x massa(g)

A

SUPERFICIE DE RESPOSTA
Resultado= Atividade Antioxidante ([DPPH] ($\mu\text{mol.trolox/g}$ de amostra))



B

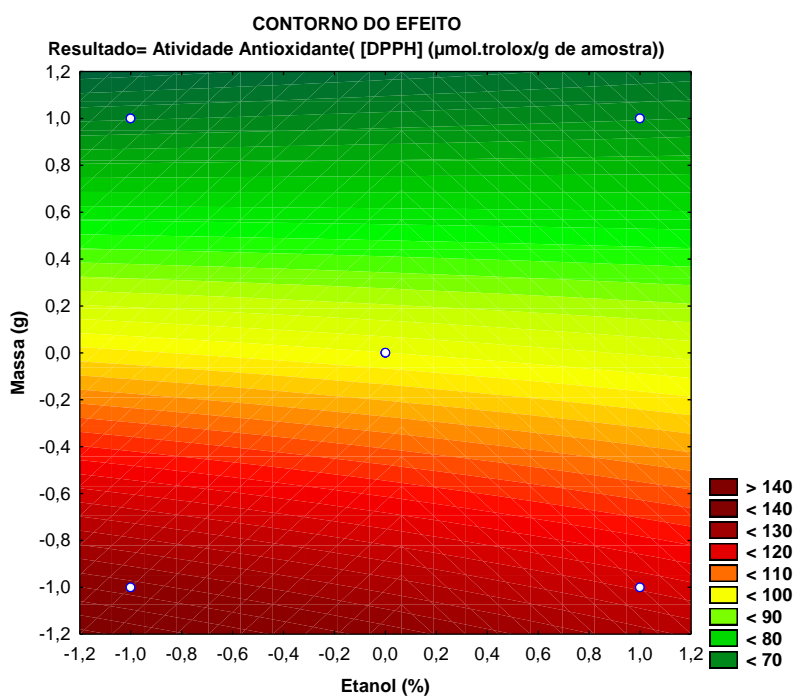


Figure 16- Gráficos do radical DPPH. A) Superfície de resposta e B) Gráfico de superfície de resposta para variáveis [] etanol (%) x massa(g)

A melhor resposta da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH, assim como ocorreu com atividade de compostos fenólicos totais, foi obtida com a menor quantidade de massa (1g) de amostra, conforme se pode observar nas Figuras 16 e 17. Provavelmente, isto ocorra, pois há

variação de concentração da amostra, o que indica que em menores concentrações ocorre maior atividade, já que em baixas concentrações não há a saturação da amostra, facilitando assim a captura dos radicais livres.

Como o grau de liberdade da regressão foi superior a zero, as variáveis utilizadas se adequaram ao modelo, podendo assim ser gerado o gráfico de contorno do efeito. O $F_{\text{calculado}}$ apresentou um valor 37,76 vezes maior que o F_{tabelado} , indicando que o modelo é estatisticamente significativo e preditivo.

Tabela 10: Análise de variância no estudo do efeito das variáveis temperatura, concentração de etanol e massa na atividade de compostos fenólicos do extrato de *Artemisia vulgaris* L.

Fonte de Variação	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado médio	$F_{\text{calculado}}$
Regressão	7012,9	1	7012,92875	671,28264
Resíduo	94,024	9	10,44705808	
Total SS	7106,952	10		

* Fatores significativos no limite de confiança de 5%, $F_{\text{tabelado } 0,95, 1, 4} = 7,71$.

Em função dos resultados observados a partir do planejamento experimental, optou-se em produzir extrato hidroalcoólico para os demais ensaios biológicos, nas seguintes condições: 1 grama de amostra, utilizando a mistura de solventes etanol: água na proporção 65:35 a uma temperatura de 70°C.

5.3 ANÁLISES DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO E EXTRATO HIDROALCOÓLICO PRODUZIDOS DE *A. Vulgaris* NAS MELHORES CONDIÇÕES

Após o planejamento fatorial realizado, tanto para o óleo como para o extrato, foi possível realizar análises do teor de compostos fenólicos totais

atividade antioxidante por diferentes métodos (Tabela 11), sendo o óleo essencial e o extrato bruto obtidos nas melhores condições de extração.

Tabela 11: Comparação entre concentração de compostos com atividade antioxidante em óleo essencial e extrato bruto etanólico

Amostras	DPPH ($\mu\text{mol trolox.g}^{-1}$)	ABTS ⁺ ($\mu\text{mol trolox.g}^{-1}$)	FRAP ($\mu\text{mol sulfato ferroso.g}^{-1}$)	Fenólicos Totais (mg de ác.g ⁻¹)
Óleo	69,60 ± 0	864,98 ± 64,68	2.795,16 ± 60,04	
Extrato	18,19 ± 0,40	596,92 ± 22,48	421,58 ± 54,13	6,20 ± 3,19

O óleo essencial de *A.vulgaris* foi o mais ativo ao se comparar com extrato hidroalcoólico apresentando maior atividade em todos os métodos antioxidantes utilizados (Tabela 11).

Os compostos fenólicos foram realizados somente para o extrato da planta, pois o óleo essencial devido, a sua característica apolar, não solubilizou em meio aquoso. O resultado encontrado para o extrato hidroalcoólico foi superior ao encontrado por Murakami (2010) para folha de *Ilex paraguariensis* que obteve 2,497 mg de ác.gálico.g⁻¹.

O valor obtido para a atividade antioxidante medida pelo método de sequestro do radical ABTS, tanto para o óleo quanto para o extrato, foi superior ao obtido para o radical DPPH. No trabalho desenvolvido por Sousa, Vieira e Lima (2011) foi observado comportamento semelhante para extrato hidroalcoólico de acerola, segundo os autores os antioxidantes hidrofílicos e de alta pigmentação são melhores refletidos pelo ensaio ABTS⁺. Ainda, Floegel *et al.* (2011), ao avaliarem o potencial antioxidante de frutas, legumes e bebidas consumidas nos Estados Unidos, constataram que a capacidade antioxidante detectada pelo método do radical ABTS foi superior ao ensaio do radical DPPH. Já Carva *et al.*(2012) ao analisarem a *Artemisia anua* L., também

obtiveram teores elevados de atividade antioxidante com os métodos de sequestro dos Radicais ABTS e DPPH.

Ressalta-se que a atividade antioxidante foi equivalente ou superior a outras espécies já estudadas. Conforme Cardenas-Sandoval *et al.* (2012) o material botânico de *Cuphea aequipetala* utilizando o bioensaio de DPPH obteve resultados que variaram de 19,19 a 18,48 $\mu\text{mol trolox.g}^{-1}$, enquanto para a média de valores ABTS variaram entre 20,07 a 3,9 $\text{mmol trolox.g}^{-1}$. E ainda Ferrari (2013), em seu trabalho com extrato alcoólico de *Petiveria alliacea* L., obteve valores inferiores ao encontrado neste trabalho, pois para o método de sequestro do radical ABTS^{•+} os valores variaram de 39.23 ± 10.2 a 42.90 ± 8.0 $\mu\text{mol.g}^{-1}$, já para o método FRAP os valores encontrados foram de $327,92 \text{ Fe}^{+2} \text{ g.MS}^{-1}$. Os resultados de atividade antioxidante indicam que tanto o óleo quanto o extrato hidroalcoólico podem ser considerados promissores na prevenção de alterações oxidativas em alimentos, e ainda, uma fonte alternativa para a agroindústria como controle de pragas.

5.4 RENDIMENTO DO ÓLEO E DO EXTRATO

O rendimento do óleo essencial de *A. vulgaris* foi de 0,512%. Segundo Carvalho *et al.* (2005) o rendimento de óleo essencial de *Cymbopogon citratus* é de 0,28 a 0,50%, demonstrando que o valor encontrado neste trabalho apresenta um potencial equivalente a outra espécie, e ainda quanto comparando com a mesma espécie apresentou um valor superior como pode ser verificado com o trabalho de Soares (2012) no qual obteve o rendimento de *A. vulgaris* encontrando para o óleo essencial de folhas frescas 0,014%, esta diferença positiva pode ter ocorrido por neste trabalho ter se realizado a extração do óleo de folhas secas, e também pela época de colheita de material botânico.

O rendimento do extrato hidroalcoólico encontrado foi de 10,98%, ao se comparar com o extrato de *Solanum cernuun* citado por Oliveira *et al.* (2013) a o qual encontrou um rendimento de 3,8%, mostrou ser maior, caracterizando um maior potencial de rendimento de extrato, este valor positivo pode ter

ocorrido pela diferença de sazonalidade e também por se tratar de outra espécie.

5.5 ATIVIDADE ALELOPÁTICA

A atividade alelopática do extrato de *A. vulgaris* apresentou potencial alelopático para todas as concentrações testadas de 3, 4 e 5%, não ocorrendo a germinação de nenhuma semente das espécies de *Lactuca sativa* (alface), *Solanum lycopersicum* (tomateiro) e *Bidens pilosa* (picão-preto). Já nos bioensaios de inibição do branco com água (Figura 17 e 18), observou-se que o tomate foi a primeira semente a germinar, seguida do alface e do picão-preto, no tempo de 48, 60 horas. No branco com álcool (Figura 18), observou-se que o tomate apresentou maior germinação, seguido do alface e picão-preto, porém o início da germinação ocorreu após o período de 48h para o tomate, 60h para o alface e 84h para o picão-preto.

Esses resultados demonstram o grande potencial alelopático da espécie em questão, pois as concentrações utilizadas foram consideradas baixas, quando comparadas a outras plantas utilizadas, como no estudo de Alves (2004), o qual encontrou inibição para semente de alface aplicando óleo essencial há 1% de canela, alecrim-pimenta, capim-citronela e alfavaca-cravo, a porcentagem de concentração para inibição foi menor para obtenção ação alelopática, porém foi aplicado óleo essencial que, como já citado anteriormente apresenta atividade antioxidante, maior que no extrato. Já, Ferreira (2007) constatou que o extrato etanólico de *Eucalyptus citriodora* reduziu a velocidade de germinação do picão-preto em concentração de 4%, na mesma concentração utilizada neste trabalho para extrato de *A. vulgaris* ocorreu a inibição total assim como na menor concentração testada de 3%. Já Simoneto (2009) com extrato aquoso de 30% das folhas de *Salvia officinalis* observou diminuição da germinação do tomate, valores superiores aos testados neste estudo.

Quando comparado com outra espécie do mesmo gênero *Artemisia*, a espécie em estudo ainda obteve boa ação aleloquímica. Como no trabalho de Magiero (2009) que ao estudar *Artemisia annua*, obteve inibição de germinação na semente de alface em concentração de 75%, porém só foram observadas as germinações até 144 horas, neste trabalho foram controladas as germinações das sementes até o tempo de 204 horas, não havendo indício de germinação de nenhuma das espécies avaliadas.

Uma das explicações para este efeito fitoquímico de *A. vulgaris* pode estar relacionada aos terpenos. Estes são caracterizados por serem metabólitos que vem recebendo cada vez mais atenção em estudos, devido às suas propriedades biológicas, dentre elas os efeitos alelopáticos. De acordo com Schimidt (2009), provavelmente a maioria desses compostos aleloquímicos possui a alquilação de moléculas orgânicas como mecanismo de ação, permitindo a inibição de uma variedade de enzimas e de outras macromoléculas essenciais aos vegetais. Rice (1984) relata que dentre os compostos polares, os compostos fenólicos, e seus derivados, correspondem à classe de produtos vegetais naturais onde se encontram a maior quantidade de aleloquímicos. Para Ribeiro & Lima (2011), não só fatores como o tipo de solvente, mas também o tempo, a temperatura da extração interferem sobre os compostos aleloquímicos extraídos dos vegetais, o que sugere que por meio do planejamento fatorial pode se obter a melhor forma de extrair os compostos bioativos e, assim, determinar a melhor maneira de preparar o extrato utilizado para análises alelopáticas.

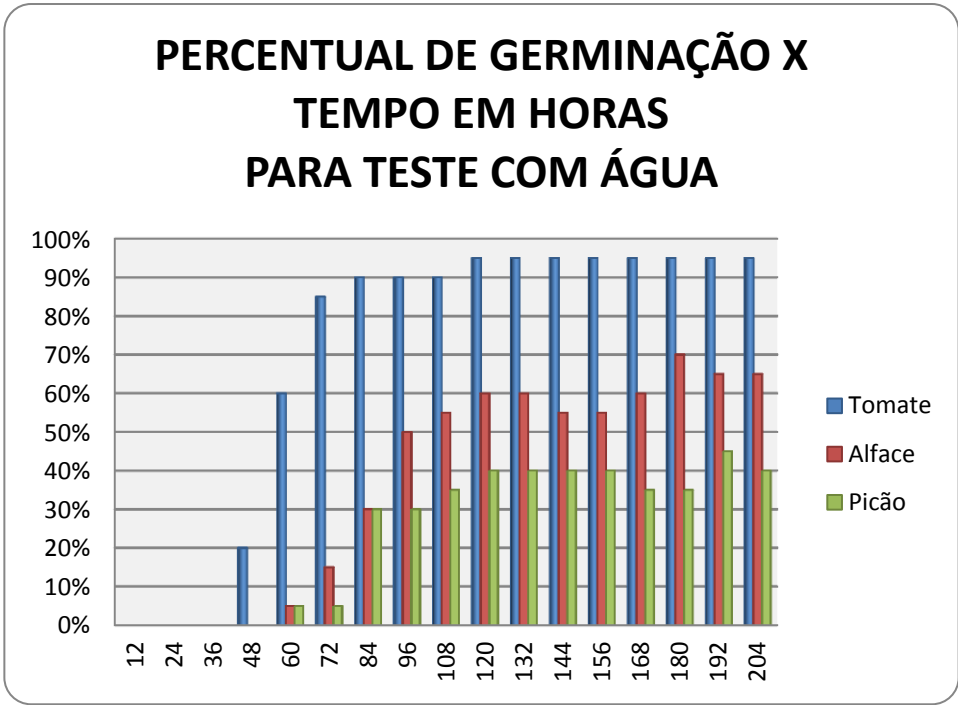


Figure 17- Representação do gráfico de coluna para porcentagem de germinação em função do tempo de incubação para a amostragem branco com água.

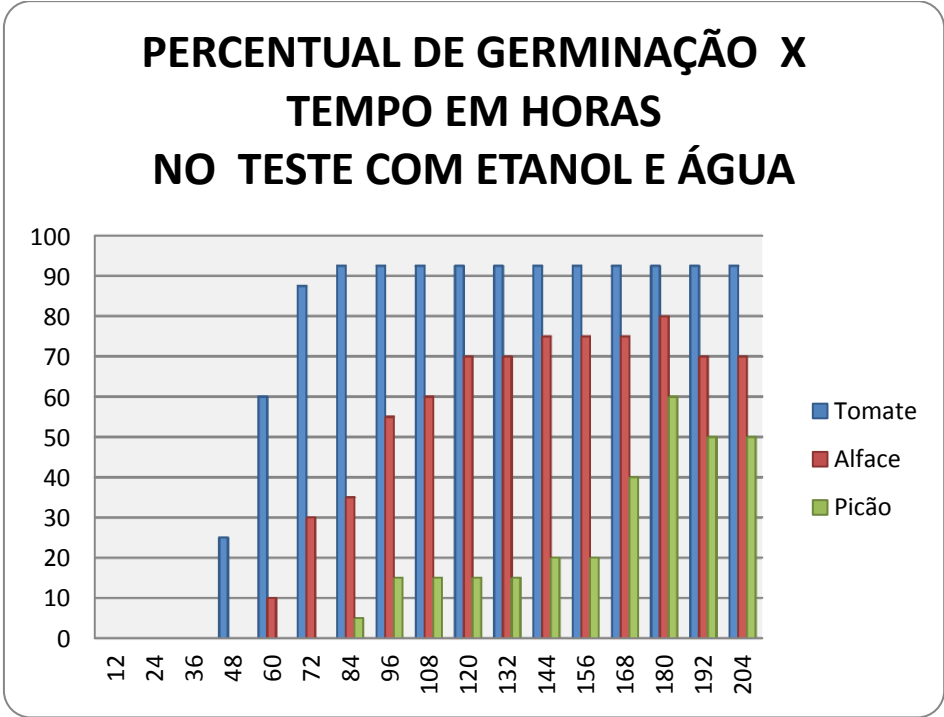


Figure 18- Representação do gráfico de coluna para porcentagem de germinação em função do tempo de incubação para branco com álcool e água

6 CONCLUSÕES

- O planejamento experimental demonstrou que a melhor condição para a produção de óleo essencial de *Artemisia vulgaris* rico em compostos bioativos ocorreu em tempo de secagem de 120h;
- O planejamento experimental demonstrou que a melhor condição para a produção de extrato de *A. vulgaris* rico em compostos bioativos ocorreu em menor quantidade de massa (1g), tanto para compostos fenólicos quanto para atividade antioxidante pelo método DPPH;
- O rendimento tanto do extrato quanto do óleo foi superior a outras espécies encontrado na literatura;
- Tanto óleo quanto extrato hidroalcoólico de *A. vulgaris* apresentaram elevada atividade antioxidante;
- Os extratos em concentrações de 3,4 e 5% apresentaram inibição total nas sementes de tomate, alface e picão, indicando uma alta atividade alelopática e um uso potencial no combate às espécies daninhas que causam grandes prejuízos na agricultura, além da diminuição aos danos causados no ambiente pelo uso excessivo de herbicidas.

7 REFERÊNCIAS

ALVES, Maria da C. S.; FILHO, Sebastião M.; INNECCO, Renato; TORRES, Salvador B. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.11, p.1083-1086, nov. 2004.

ARORA, Arti., NAIR, Muraleedharan G., STRASBURG, Gale M. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v.24, n.9, p.1355-1363, 1998.

BARROSO, Graziela. M.; PEIXOTO, Ariane L.; COSTA, Carmen G.; ICHASSO, Carmen L. F.; GUIMARÃES, Elsie F; LIMA, H. C. **Sistemática das Angiospermas do Brasil**. v. 2. Viçosa: Imprensa Universitária. 1991.
BECKER, Eleonora M.; NISSEN, Lise R.; SKIBSTED, Leif H. Antioxidant evaluation protocols: food quality or health effects. **European Food Research Technology**, v. 219, n.6, p. 561-571, 1991.

BELINELO, Valdenir J.; CZEPAK, Márcio P.; VIEIRA FILHO, Sidiney A.; MENEZES, Luis F.T.; JAMAL, Cláudia M. Alelopatia de *Arctium minus* Bernh (*Asteraceae*) na germinação e crescimento radicular de sorgo e pepino. **Revista Caatinga**, v.21, n.4, p.12-16, 2008.

BIANCHI, Maria de L.P.; ANTUNES, Lusânia M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta- free radicals and the main dietary antioxidants. **Revevista de Nutrição.**, Campinas, p.123-130, maio/ago., 1999.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie**, v.28, n.1, p.25-30, 1995.

CACACE, J. E.; MAZZA, G. Mass transfer process during extraction of phenol compounds from milled berries. **Journal of Food Engineering** , v. 59, p. 379-389, 2003.

CAO, G.; Prior, R. L. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. **Clinical Chemistry**, v.44, p.1309-1315, 1998.

CARDENAS-SANDOVAL, B.A.; LÓPEZ-LAREDO, A.R.; MARTÍNEZ-BONFIL, B.P.; BERMÚDEZ-TORRES, K. ; TREJO-TAPIA, G.. Advances in the phytochemistry of *Cuphea aequipetala*, *C. aequipetala* var. *hispida* and *C. lanceolata*: Extraction and quantification of phenolic compounds and antioxidant activity. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v.11, n.3, 2012.

CARVALHO, Clayton M.; COSTA, Carlos Pedro de M.; SOUSA, nas dos S.; SILVA, Roberto H.D.; OLIVEIRA, Cyntia Lima .; PAIXÃO, Francisco Jardel Rodrigues .Rendimento da produção de óleo essencial de capim-santo submetido a diferentes tipos de adubação. **Revista de biologia e ciências da terra**. V.5, n.2, 2005.

CASTRO, P.R.C.; RODRIGUES, J.D.; MORAES, M.A.; CARVALHO, V.L.M. Efeitos alelopáticos de alguns extratos vegetais na germinação do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. SantaCruz). **Planta Daninha**, v.2, p.79-85, 1983

CAVAR, Sandra; MAKSIMOVIC, Milk; VIDIC, Danijela.; PARIÉ, Adisa. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Artemisia annua* L. from Bosnia. **News paper Industrial crops and Products**, v.37, p.479-485. 2012.

DECKER, E.A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? **Nutrition Reviews**, New York, v. 55, n. 11, p. 396-407, 1997.

DI STASI, Luiz Carlos. **Plantas medicinais: arte e ciência**. São Paulo: UNESP, p.502, 1996.

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

EINHELLIG, F.A. Interaction involving allelopathy in cropping systems. **Agronomy Journal**, v.88, p.886-893, 1996.

FARAH, Adriana.; DONAGELO, Carmen M.. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v.18, n.1, p.23-36, 2006.

FERRARI, Ana P.. **Atividade alelopática, antioxidante e antimicrobiana de plantas com uso popular antimalárico**. 2013. (Dissertação de Mestrado em Agronomia). Universidade Tecnológica federal do Paraná, Pato Branco, 2013.

FERREIRA, A.G.; AQUILA, M.E.A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** n.12, pg.175-204, 2000.

FERREIRA, M.C.; SOUZA, J. R. P.; FARIA, T.J. Potenciação alelopática de extratos vegetais na germinação e no crescimento inicial de picão-preto e alface. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 4, p. 1054-1060, jul./ago., 2007.

GOUVEIA, Sandra; CASTILHO, Paula C. Helichrysum monizii Lowe: phenolic composition and antioxidante potential. **Phytochemical Analysis**, n. 23, p.72-83, 2012.

GOUVEIA, Sandra; Castilho, Paula.C. Antioxidant potential of *Artemisia argentea* L'Hér alcoholic extract and its relation with the phenolic composition. **Food Research International**, vol.44, n.6, jul., p.1620-1631, 2011.

GOVINDARAJ, Sujatha; KUMARI, Billipo D. R.; CIONI, Pier L.; FLAMINI, Guido. Mass propagation and essential oil analysis of *Artemisia vulgaris*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. Japão, v.105, n.3, p.176-183, 2008.

GURGEL, Ely S.C.. **Morfoanatomia, perfil químico e atividade alelopática de três espécies de *Copaifera* L.** (Leguminosae Caesalpinioideae) nativas da Amazônia. (Tese de Doutorado para o título de Botânico). Instituto nacional de pesquisas da Amazônia - INPA Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus, Amazonas Maio, 2009.

HAIDER, Flora.; DWIVEDI, P. D.; NAQVI, A. A.; Bagchi, G. D. Essential oil composition of *Artemisia vulgaris* harvested at different growth periods under Indo-Gangetic plain conditions. **Journal Essential Oil Research.**, n.15, p. 376–378, 2003.

HARTMAN, P.E., SHANKEL, D.M. Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v.15, n.3, p.145-182, 1990.

HRAZDINA, G.; BORZEL, A. J.; ROBINSON, W. B. Studies on the stability of the anthocyanidin-3,5- diglucosides. **American Journal Enology Viticulture**, v. 21, n. 4, p. 201-204, 1970.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, p.1841-1856, 2005.

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

JUDZENTIENE, A.; BUZELYTE, J.: Chemical composition of essential oils of *Artemisia vulgaris* L. (mugwort) from plants grown in North Lithuania. **Chemija**, n.17, p.12–15, 2006.

KARABEGOVIÜ, Ivana; NIKOLOVA, Milena; VELIÞKOVIÜ, Dragan; STOJIÞEVIÜ, Sæa; VELJKOVIÜ, Vlada; LAZIÜ, Miodrag Comparison of antioxidante and antimicrobial activities of methanolic extracts of the *Artemisia* sp. Recoved by diferente extration techniques. **Chinese Journal os Chemical Engineering**, v.19, n.3, p.511, 2011.

KIM, S. Y.;JEONG, S.M.; PARK, H.P.; NAM, K.C.; AHN, D.U.; LEE, S.C.Effect of heating conditions of grape seeds on the antioxidant activity of grapes seed extracts. **Food Chemistry**, v. 97, n. 3, p. 472-479, 2006.

KUKIC, J.; POPOVIC, V.; PETROVIC, S.; MUCAJI, P.; CIRIC, A.; STOJKOVIC, D.; LOU, H.; YUAN, H.; MA, B.; REN, D.; JI, M.; OKA, S. Polyphenols from peanut skins and their free radical-scavenging effects. **Phytochemistry**, Oxford, v. 65, p. 2391-2399, 2004.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A.M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 726- 732, 2005.

LEITE, João Paulo V. **Fitoterapia**. Bases Científicas e Tecnológicas. São Paulo : Atheneu .2009.

LEJA, M.; MARECZEK, A.; WYZGOLIK, G.; KLEPACZ-BANIAK, J.; CZEKONSKA, K. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species.**Food Chemistry**, v.100, p.237-240, 2007.

LEMANSKA, K.; SZYMUSIAK, H.; TYRAKOWSKA, B.; ZIELINKI, R.; SOFFERS, A.E.M.; RIETJENS, M.C.M. The influence of pH on antioxidant

properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. **Free Radical Biology e Medicine**, v.31, p.869-881, 2001.

LORENZI, Harri. **Plantas Daninhas do Brasil**. 1.ed.São Paulo: Marprint S.A , 1982.

LORENZI, Harri; MATOS, Abreu, F.J. **Plantas Medicinais no Brasil – Nativas e Exóticas**. 2 ed. São Paulo: Instituto Plantarum, p.121, 2008.

MACDONALD-WICKS, L.K.; WOOD, L.G.; GARG, M.L. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. **Journal of Science of Food Agriculture**, v.86, p.2046-2056, 2006.

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

MAISUTHISAKUL, P.; SUTTAJIT, M.; PONGSAWATMANIT, R. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. **Food Chemistry**. London, v.100, p.1409-1418, 2007.

MASETTO, M.A.M. *et al.* Rendimento e qualidade do óleo essencial de *Pogostemon cablin* Benth em diferentes períodos de secagem. 2007. In: IV **Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais - IVSBOE** (CD Simpósio). Anais... IV Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais. Disponível em: <http://www.ivsboe.padetec.ufc.br/CDSimpósio/quimicaeatividadesbiologicasdosoleosessenciais/Resumo_MasettoMAM.pdf>. Acesso em: 02/01/2013

MENSOR LL, MENEZES FS, LEITÃO GG, REIS AS, DOS SANTOS TC, COUBE CS. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy**, Leitão SG, v.15, p.127- 130, 2001.

MOON, J.K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, p. 1655–1666, 2009.

MURAKAMI, Aureanna N.N.. **Concentração de compostos fenólicos de extrato aquoso de folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.)**.

(Dissertação de mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

MYERS, R.H.; MONTGOMERY, D.C. Response expression of oil from linsed (*Linum usitatissimum* L.). **Journal of Oilseeds Research**, v.7, p.106-110, 1990.

NEWMAN, David J.; Cragg, Gordon M. Natural products in medicinal chemistry. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, England, v. 17, n. 3, 2009.

NICARETA, Cleiton. **Óleos essenciais de *Solanum* e a interação com morcegos frugívoros**. 2006. 164 f. (Dissertação de Mestrado em Química Orgânica) Setor de Ciência Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

OLIVEIRA, Luis G.A.; DUQUE, Fernanda F.; BELINELO, Valdenir J.; SCHMILDT, Edilson R.; ALMEIDA, Marcelo S. Atividade alelopática de extrato acetato-etílico de folhas de *Solanum cernuum* Vell. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 44, n. 3, p. 538-543, Fortaleza - CE, 2013.

OLIVEIRA, M.M.S.; JOSE, A.L.V. **Processos de extração de óleos essenciais**. Dossiê técnico. Instituto de Tecnologia do Paraná, 2007.

OLIVERA, Sandro. **Determinação da capacidade antiradicalar de produtos naturais utilizando-se a quimioluminescência do luminol e ensaios fotométricos com radicais estáveis**. 2011. (Dissertação de Mestrado em Química), USP, São Paulo, 2011.

PIGHINELLI, A.L.M.T.; RAUEN, A.M.; OLIVEIRA, R.A. Otimização da prensagem de grãos de girassol e sua caracterização. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.13, n.1, p.63-67, 2009.

PRADO, Adna. **Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais**. 2009. 107 f. (Dissertação de Mestrado em Ciências, na área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo", Piracicaba, 2009.

PRINS, C.L.; LEMOS, C.S.; FREITAS, S.P. Efeito do tempo de extração sobre a composição e o rendimento do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu**, v. 8, n. 4, p. 92-95. 2006.

PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.4290-4302, 2005.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.3396-3402, 2000.

RANAL, M. A.; SANTANA, D. G. How and why to measure the germination process. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 29, p. 1-11, jan./mar. 2006.

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

REISCHE, D. W.; LILLARD, D. A.; EITENMILLER, R. R. **Antioxidants**. In: AKOH, C. C.; MIN, D. B. Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology. 2.ed. New York: Marcel Dekker, p. 489-516, 2002.

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

RICE, Elroy L.. **Allelopathy**. 2. ed. Orlando: Academic, 422 p., 1984.
RIVELLI, Diogo P.. **Biodisponibilidade, distribuição tecidual e atividade antioxidante do extrato hidroetanólico de *Ilex paraguariensis* hidrolisado e não hidrolisado** (Tese de doutorado em Fármacos e Medicamentos). USP, São Paulo, 2010.

ROCKENBACH, I. I.; SILVA, G. L.; RODRIGUES, E.; GONZAGA, L. V.; FETT, R. Atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva das variedades Regente e Pinot Noir (*Vitis vinifera*). **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 2, p. 158-163, 2007.

RUFINO, Maria Socorro de Moura.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. **Metodologia Científica**: Determinação de Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo

Método de Redução de Ferro (FRAP). Comunicado Técnico 125 EMBRAPA, 2006.

SADRÉ FILHO, Joilson. **Manejo integrado de plantas daninhas**. 1.ed. Brasília/Fortaleza: Embrapa, 2003.

SANTOS, Elisa. **Avaliação das propriedades tecnológicas de tripas naturais submetidas ao tratamento com soluções emulsificantes**. 2006. 101.f. (Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

SANTOS, Marcelo H.; BATISTA, B.L.; DUARTE, S.M.S.; ABREU, C.M.P.; GOUVÊA, C.M.C.P. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade do café (*Coffea arabica*). **Química Nova**, p. 604-610, 2007.

SARTOR, V.; HENDERSON, P.T.; SCHUSTER, G.B. Radical cation transport and reaction in RNA/DANN hybrid duplexes: effect os global struture on reactivity. **Journal of American Chemistry Society**, v.121, p.11027-11033, 1999.

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

SHAIIDI, F; NACZK, M. **Food phenolics**: sources, chemistry, effects and applications. Lancaster: Technomic Publishing, 1995. p. 281-319.

SILVA, L.V. *et al.* Extração do óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus molle*) usando hidrodestilação e soxhlet. In: VI Congresso brasileiro de engenharia química em iniciação científica - COBEQ - IC, 2005, Foz do Iguaçu. **Anais...** VI Congresso Brasileiro de Engenharia química em iniciação científica. 2005 p. 1-7.

SILVEIRA, Andrea M.; BRITO, Vitti J.O.. Avaliação do rendimento e do teor de citronelal do óleo essencial de procedências e raças locais de *Eucalyptus citriodora*. **Scientia Forestalis**, n. 56, p. 145-154, dez. 1999.

SIMONETO, Eliane Loiola. **Alelopatia de sálvia sobre a germinação e o desenvolvimento do milho, tomate e girassol**. (Trabalho de Conclusão de Curso), FAG, Cascavel-PR, 2009.

SINGH, Harminder Pal; MITTAL, Sunil; KAUR, Shalinder; BATISH, Daizy R.; KOHLI, Ravinder K. Chemical composition and antioxidant activity of essential oil from residues of *Artemisia scoparia*. **Food Chemistry**, Chandigarh, v. 114, p. 642-645, 2009.

SINGLETON, V.L.; Rossi, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. **American Journal Enology Viticulture**, v.16, 1996, p.144-158.

SOARES, Leyla B.. **A constituição química do óleo essencial de folhas, atividade fungicida e acaricida de *Artemisia vulgaris* L. e potencial aplicação na avicultura industrial** . 2012. (Dissertação de Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio/Biologia). Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios. São Paulo 2012

SOARES, Sergio Eduardo. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n.1, p.71-81, 2002.

SOUSA, Cleyton M.M.; SILVA, Hilris R.; VIEIRA-JR, Gerardo M.; AYRES, Mariane C.C.; COSTA, Charlyton L.S.; ARAÚJO, Delton S.; CAVALCANTE, Luis C.D.; BARROS, Elcio D.S.; ARAÚJO, Paulo B.M.; BRANDÃO, Marcela S.; CHAVES, Mariana H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v.30, n. 2, p.351-355, 2007.

SOUSA, M.S.B.; VIEIRA, L.M.; LIMA, A. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de resíduos de polpas de frutas tropicais. **Brazilian Journal Food Technology**, Campinas, v. 14, n. 3, p. 202-210, jul./set. 2011.

STALIKAS, Constantine D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal Separation Science** ,v. 30, p. 3268–3295, 2007.

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

STRATIL, Pavel; KUBÁŇ, Vlastimil; FOJTOVÁ, Jitka. Comparison of the Phenolic Content and Total Antioxidant Activity in Wines as Determined by Spectrophotometric Methods. **Czech Journal Food Sciences**, p. 242–253, 2008.

TAIZ, Lincoln; ZEIGER, Eduardo. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. São Paulo: Artmed, p.309-319, 2004.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A.: Mining the essential oils of the Anthemideae. **African Journal Biotechnology**, n.3, p. 706–720, 2004.

VALMORBIDA, J.; BOARO, C.S.F.; MARQUES, M.O.M.; FERRI, A.F. Rendimento e composição química de óleos essenciais de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes concentrações de potássio. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botacatu, v.8, n.4, p.56-61, 2006.

VEDANA, Maria I.S.; ZIEMER, Cristiane; OBDÚLIO, Miguel Gomes; PORTELLA, Augustus C.; CANDIDO, Lys M.B. Efeito do processamento na atividade antioxidante de uva. **Alimentos e Nutrição Araraquara**. n.2, v.19, p. 159-165, abr/jun. 2008.

VELIOGLU, Y. S.; MAZZA, G.; CAO, L.; OOMAH, B.D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4113-4117, 1998.

VOGEL, H, GONZALEZ; FAINI M.; RAZMILIC, F.; RODRIGUEZ, I; SAN MARTIN, J.; URBINA, F. J. Antioxidant properties and TLC characterization of four Chilean haplopappus-species known as bailahue'n. **Journal of Ethnopharmacology**. 2004.

WEIR, Tiffany L.; PARK, Sang-Wook.; VIVANCO, Jorge M. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. **Current Opinion in Plant Biology**, v.7, p.472-479, 2004.

WRIGHT, J.S.; JOHNSON, E.R.; DILABIO, G.A. Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. **Journal of American Chemistry Society**, v.123, p.1173-1185, 2001.