



# Avaliação da atividade antioxidante e alelopática do extrato etanólico e frações das cascas do caule de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam., Rutaceae

Joelle de Melo Turnes<sup>1\*</sup>; Aline de Fatima Bonetti<sup>1</sup>; Mariana Saragiotto Krause<sup>2</sup>; Vanessa Cristina Dias Canteli<sup>1</sup>; Cristiane da Silva Paula<sup>1</sup>; Marcia do Rocio Duarte<sup>2</sup>; Sandra Maria Warumby Zanin<sup>3</sup>; Josiane de Fátima Gaspari Dias<sup>3</sup>; Marilis Dallarmi Miguel<sup>3</sup>; Obdulio Gomes Miguel<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Fitoquímica, Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PR, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PR, Brasil.

<sup>3</sup>Laboratório de Farmacotécnica, Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PR, Brasil.

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo o estudo das atividades antioxidante e alelopática das cascas do caule de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam., Rutaceae, de modo a conduzir à descoberta de substâncias biologicamente ativas. O material vegetal foi submetido à extração etanólica e este extrato foi fracionado obtendo as frações (hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica). Para a avaliação da atividade antioxidante, empregaram-se os métodos de redução do complexo fosfomolibdênio, de redução do radical DPPH e das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Quanto à alelopatia, as amostras foram testadas em quatro concentrações sobre a germinação e o desenvolvimento de radícula e hipocótilo das sementes de *Lactuca sativa*. As amostras evidenciaram atividade antioxidante significativa frente ao método de redução do complexo fosfomolibdênio quando comparada à rutina, e do TBARS quando comparado ao BHT, assim como a atividade alelopática, uma vez que estimularam tanto a germinação como o crescimento das sementes. A fração clorofórmica e acetato de etila demonstraram melhor potencial antioxidante com 204,17% e 127,11% em relação à rutina no método de formação do complexo fosfomolibdênio, e o extrato bruto e a fração hexano com 64,2% e 60,9%, em relação ao BHT, no método TBARS. No ensaio alelopático, destaca-se a fração clorofórmica, pois foi a única amostra que estimulou o crescimento do hipocótilo e radícula na maioria das concentrações, variando de 41 a 144%, e a fração acetato de etila que apresentou a maior porcentagem de estímulo nesse bioensaio, demonstrando estímulo de 274% do crescimento do hipocótilo. Este é o primeiro trabalho que demonstra a atividade antioxidante e alelopática de *Z. rhoifolium*.

Palavras-chave: *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. DPPH. Fosfomolibdênio. Alelopatia. TBARS.

*Autor correspondente:* Joelle de Melo Turnes, Laboratório de Fitoquímica - Departamento de Farmácia - Universidade Federal do Paraná - Avenida Prefeito Lothário Meissner, nº 632 - CEP. 80210-170 - Curitiba, PR, Brasil. e-mail: joelle.turnes@gmail.com

## INTRODUÇÃO

A família Rutaceae apresenta uma diversidade de metabólitos secundários, tais como: alcalóides (Fournet et al., 1994), cumarinas (Mafezoli, 2011), lignanas (Bastos et al., 1999), flavonóides (Moraes et al., 2003), terpenóides (Cortez, 2002) e limonóides (Wu et al., 1999). Tais metabólitos são responsáveis por muitas propriedades medicinais já conhecidas, como analgésica (Lima et al., 2007), antifúngica (Balakumar, 2011), antiparasitária (Cortez, 2006), antibacteriana (Severino, 2009), anti-inflamatória (Moura et al., 1997), antioxidante e citotóxica (Yi et al., 2008).

O gênero *Zanthoxylum* vem sendo amplamente estudado, devido, principalmente, às suas propriedades febrífugas, sudoríferas e diuréticas (Vieira et al., 2009). A espécie *Zanthoxylum rhoifolium* Lam., popularmente conhecida como mamica-de-cadela, é uma das espécies da família Rutaceae de maior polimorfismo, encontrada em regiões temperadas e tropicais do mundo, principalmente na América do Sul, inclusive na floresta Amazônica (Floyd, 1989; Lorenzi, 1992).

A casca e a raiz desta planta são utilizadas há muito tempo como tônica, antipirética e para dor de dente, sendo que já foram atribuídas a espécie outras propriedades até então, como antibacteriana, antifúngica, citotóxica para células tumorais e também antinociceptiva, sendo o lupeol um dos constituintes possivelmente responsáveis por este efeito (Lemée, 1956; Gonzaga et al., 2003; Silva et al., 2006; Silva et al., 2007). Sua casca é tradicionalmente utilizada por tribos indígenas na Guiana Francesa para o tratamento de malária, tendo sua atividade antiplasmodial comprovada no estudo de Jullian et al. (2006).

Recentemente foi descrita a atividade gastroprotetora em camundongos do extrato etanólico da casca desta espécie. O efeito gastroprotetor é multifatorial e possivelmente envolve um mecanismo antioxidante, o qual não foi aprofundado por Freitas et al. (2011).

Evidências clínicas demonstram que radicais livres como as espécies reativas de oxigênio, são grandes

responsáveis pelo desenvolvimento de câncer, doenças cardiovasculares, catarata, disfunções cerebrais, declínio do sistema imune, e envelhecimento, uma vez que promovem a oxidação do DNA, proteínas e lipídeos, (Valko et al., 2004; Velloso et al., 2007). Assim, é de fundamental importância o uso de substâncias com potencial antioxidante, pois são capazes de retardar significativamente ou inibir a oxidação do substrato (Velloso et al., 2007). As plantas, de um modo geral, podem apresentar propriedades antioxidantes, uma vez que muitas delas apresentam flavonóides, taninos e outras substâncias fenólicas que atuam como sequestradores de radicais de oxigênio (Quettier-Deleu et al., 2000).

Muitas plantas medicinais também apresentam compostos alelopáticos, os quais geralmente são os mesmos constituintes químicos responsáveis pelas atividades terapêuticas. Entendem-se como aleloquímicos, metabólitos secundários de plantas, microrganismos e fungos que possuem ação direta ou indireta sobre outra planta, que uma vez liberados no ambiente, influenciam tanto inibindo quanto estimulando o desenvolvimento de sistemas biológicos. Ainda existem poucas informações sobre os mecanismos de ação desses compostos, mas, segundo Ferreira e Aquila (2000), eles podem atuar sobre hormônios, membranas, síntese de pigmentos, minerais e proteínas, na fotossíntese, respiração, atividade enzimática e até mesmo no material genético, induzindo alterações no DNA e RNA.

Os aleloquímicos são muito utilizados para o desenvolvimento de herbicidas naturais ou como estimulantes para a germinação, crescimento e/ou desenvolvimento de plantas (Goldfarb et al., 2009; Lima et al., 2011; Silva et al., 2011). Nicoloso et al. (1999) relata que a reprodução vegetativa por estaquia é considerada uma alternativa para aumentar a produtividade de muitos plantios. Os fitohormônios e nutrientes minerais são de fundamental importância para esse tipo de reprodução assexuada, como exemplo a auxina, que se destaca dentre os fitohormônios reguladores nesse método de reprodução.

O excesso de herbicidas sintéticos promove danos ao meio ambiente, alterando as propriedades físico-químicas do solo, resultando na diminuição da produtividade. Dessa forma, justifica-se o estudo do potencial alelopático de diferentes espécies vegetais para a busca de herbicidas naturais, uma vez que os mesmos não apresentam os inconvenientes dos herbicidas sintéticos (Lima et al., 2011). Outra aplicação importante seria na agricultura orgânica, onde é vedado o uso de agrotóxicos e reguladores de crescimento sintéticos (Brasil, 2011).

Ademais, estudos comprovaram a atividade alelopática das espécies da família Rutaceae, como o óleo das partes aéreas de *Ruta graveolens* L., que segundo Feo et al. (2002) inibiu a germinação e o crescimento da radícula de *Raphanus sativus* L. A espécie *Citrus junos* Sieb. ex Tanaka, Rutaceae, também apresenta efeito alelopático inibitório, influenciando no crescimento do hipocótilo e da raiz de *Lactuca sativa* L., ocasionado pelo isolado abscissato de P-D-giucopiranosídeo (ABA-GE) (Kato-Noguchi et al., 2002).

Visto a importância de buscar novas substâncias com potencial antioxidante e alelopático, o presente estudo teve como intuito pesquisar tais propriedades das cascas do caule de *Z. rhoifolium*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal

As cascas do caule de *Z. rhoifolium* foram coletadas no Campus Jardim Botânico da Universidade Federal do Paraná, no mês abril de 2010. A identificação do material vegetal foi realizada pelo biólogo Osmar dos Santos Ribas no Museu Botânico Municipal da cidade de Curitiba, Paraná e foi depositada a exsiccata de número MBM 375903.

### Obtenção do extrato e das frações

As cascas (2 kg) foram secas, moídas e extraídas com 1000 mL etanol 96 °GL em aparelho de Soxhlet modificado segundo Carvalho et al. (2009). Fracionou-se parte do extrato alcoólico, depois de concentrado, em extrator Soxhlet com solventes (P. A.) em ordem crescente de polaridade (n-hexano, clorofórmio e acetato de etila) por 6 horas. As frações obtidas (hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica), após evaporação dos solventes em banho-maria a 50 °C foram submetidas à avaliação das atividades antioxidante e alelopática.

### Avaliação da atividade antioxidante pela redução do complexo fosfomolibdênio

Para a avaliação da atividade antioxidante pela redução do complexo fosfomolibdênio, empregou-se a técnica de Pietro et al. (1999). Este complexo é formado pela reação da solução de fosfato de sódio monobásico (28 mL; 0,1 mol/L), solução de molibdato de amônio (12 mL, 0,03 mol/L) e de uma solução de ácido sulfúrico (20 mL; 3 mol/L), em meio aquoso, sendo o volume final, ajustado com água destilada para 100 mL.

Dilui-se as amostras em metanol obtendo-se a concentração de 200 µg/mL e, a partir desta concentração, alíquotas de 0,3 mL foram transferidas para tubos de ensaio contendo 3 mL do reagente fosfomolibdênio. Como branco, utilizou-se uma solução de 0,3 mL de metanol com 3 mL do reagente. Os tubos foram fechados e mantidos em banho-maria a 95 °C por 90 min. Após resfriamento, procedeu-se a leitura em espectrofotômetro (UV/Vis, 1601, Shimadzu, Kyoto, Japão) a 695 nm.

A capacidade antioxidante das amostras foi expressa em relação à rutina (200 µg/mL), a qual foi usada como padrão, e à vitamina C (200 µg/mL), cuja atividade antioxidante de referência foi considerada igual a 1,00. O teste foi realizado em triplicata e os dados foram analisados com o método estatístico de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### Avaliação da atividade antioxidante pela redução do radical DPPH

O potencial de redução do radical DPPH

(2,2-difenil-1-picrilhidrazila) das amostras foi analisado por ensaio espectrofotométrico, segundo a metodologia descrita por Mensor et al. (2001). Cinco soluções das amostras foram preparadas em metanol, na faixa de 20 e 500 µg/mL, realizando-se em quintuplicata cada concentração. O volume final foi completado com o próprio solvente para 2,5 mL, sendo adicionado 1 mL da solução metanólica de DPPH (0,03 mmol/mL). Como controle negativo, foi utilizado uma solução de 2,5 mL de metanol e 1 mL de DPPH (0,03 mmol/mL). Após trinta minutos de reação, realizaram-se as leituras em espectrofotômetro (UV/Vis, 1601, Shimadzu, Kyoto, Japão) a 518 nm. Como padrões foram empregados a rutina (nas concentrações de 2; 4; 6; 8 e 10 µg/mL) e a vitamina C (nas concentrações de 1,6; 3,2; 4,8; 6,4 e 8 µg/mL).

A concentração da amostra capaz de reduzir 50% do radical (IC50) foi calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ inibição de DPPH} = \frac{(\text{Absorbância amostra} - \text{Absorbância branco}) \times 100}{\text{Absorbância branco}}$$

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

Avaliação da atividade antioxidante pelo método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS

Este teste verifica as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), no qual uma solução de gema de ovo homogeneizado foi utilizada como fonte de lipídeos (Morais et al., 2006). As amostras foram solubilizadas em metanol e testadas na concentração de 1000 ppm (m/v). Um controle foi feito para o solvente e um controle positivo foi elaborado para observação da completa peroxidação dos lipídeos, onde foram adicionados todos os reativos com exceção da amostra. Empregou-se o BHT (butil-hidroxi-tolueno) como padrão.

O ensaio foi realizado adicionando-se uma solução de ácido acético a 20% (v/v), TBA (ácido tiobarbitúrico) 0,8% (m/v), SDS (dodecil sulfato de sódio) 1,1% (m/v) e solução de gema de ovo homogeneizado 10% (m/v). Como indutor da peroxidação lipídica foi utilizado o cloreto de ABAP (2,2'-azo-bis 2-amidinopropano) 0,07 mol/L. Os tubos contendo os reativos foram levados ao banho-maria a 95 °C, após o resfriamento, foi adicionado 1-butanol e posteriormente submetidos à centrifugação em 3000 rpm por 10 min. As leituras de absorbância (A) foram feitas no espectrofotômetro (UV, 1800, Shimadzu, Kyoto, Japão), em 695 nm. Os resultados foram aplicados na fórmula abaixo, os quais foram expressos em Índice Antioxidante (IA), onde A é a média aritmética das absorbâncias das amostras testadas e C é a absorbância do controle positivo totalmente oxidado.

#### Avaliação da atividade alelopática

A análise da atividade alelopática do extrato bruto e das frações de *Z. rhoifolium* foi desenvolvida seguindo a metodologia de Dias et al. (2005). Prepararam-se soluções de concentrações decrescentes de cada amostra (0,8; 0,4; 0,2; 0,1 mg) diluídas em 3 mL de metanol, em duplicata.

As soluções foram aplicadas no papel filtro e colocadas em estufa a 60 °C por 24 horas para total evaporação do solvente.

Em câmara de fluxo laminar, adicionaram-se os papéis previamente secos nas Gerbox® (caixas quadradas de poliestireno cristal, com 11 cm e 3,5 cm de altura, contendo tampas), acrescentou-se água destilada equivalente ao dobro do peso do papel filtro (Krzyzanowski et al., 1999) e mediu-se o pH com uma fita indicadora da marca Macherey- Nagel®. Posteriormente, colocaram-se cinco sementes de *Lactuca. Sativa L.* (Baba de verão), em cada caixa com quatro repetições.

Após a aplicação das sementes, as Gerbox® cobertas com papel alumínio foram colocadas em germinador com temperatura controlada a 20 °C, sendo preparadas duas caixas para cada concentração, uma para o estudo da germinação e outra para o estudo do crescimento. Utilizou-se como controle a água destilada e o metanol, ambos preparados sob as mesmas condições do ensaio.

Para o estudo da germinação, foram realizadas leituras diárias das caixas no mesmo horário, sob fluxo laminar durante sete dias. Considerou-se como germinadas quando a protrusão da radícula através do tegumento se tornasse visível, conforme descrito por Feo et al. (2002) e Adegas et al. (2003).

O índice de velocidade de germinação (IVG) foi calculado segundo Maguire (1962) para cada repetição de cada tratamento, utilizando a quantidade de sementes germinadas, dividindo pelo dia da germinação e somando-se até o último dia de germinação. As médias dos índices de velocidade de germinação foram submetidas à análise estatística, empregando-se o programa SISVAR® (Ferreira, 2000).

Realizou-se a leitura do crescimento apenas no sétimo dia de ensaio, através da medição do comprimento da radícula e do hipocótilo. Os resultados das leituras de crescimento foram submetidos à análise estatística, empregando o programa SISVAR® (Ferreira, 2000). A verificação das diferenças de médias estatisticamente significantes foi realizada por meio do teste Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade. As médias obtidas por esse teste foram comparadas percentualmente em relação ao controle (Silva, 2009). O tratamento foi considerado efetivo quando todas as repetições estiveram no mesmo grupo de médias.

## RESULTADOS

O rendimento do extrato bruto e das frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e hidroalcoólica remanescente, considerando o teor de umidade da planta seca, está representado na Tabela 1.

Os resultados dos bioensaios de antioxidantes estão expressos nas Figuras 1, 2 e 3. Na técnica de redução do complexo fosfomolibdênio, os resultados são apresentados em Atividade Antioxidante Relativa à vitamina C (AAR% Vit. C), no método de redução do

Tabela 1. Rendimento do extrato e das frações

	Massa seca obtida (g)	Rendimento (%)
Extrato etanólico	82,2737	4,95
Hexano	24,6294	36,58
Clorofórmio	8,3941	12,46
Acetato de etila	0,7226	1,07
Hidroalcoólica	33,4385	49,67

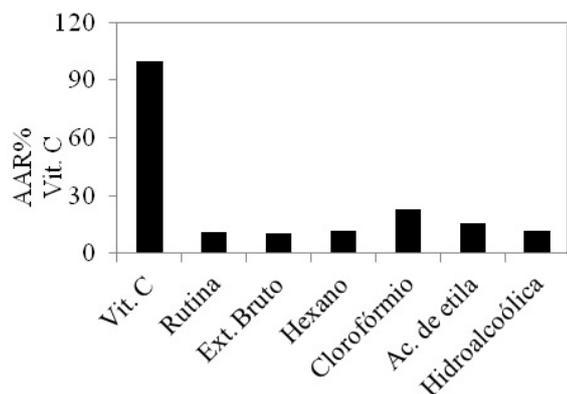


Figura 1. Porcentagem de atividade antioxidante pela redução do complexo fosfomolibdênio.

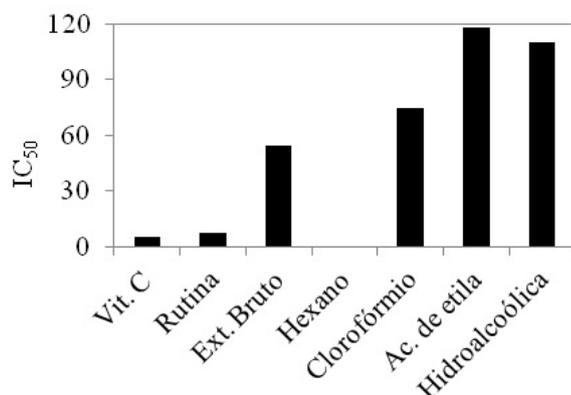


Figura 2. Atividade antioxidante pela redução do radical DPPH.

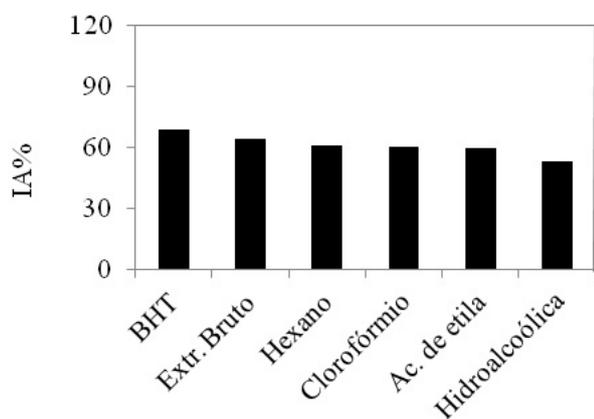


Figura 3. Atividade antioxidante pelo método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

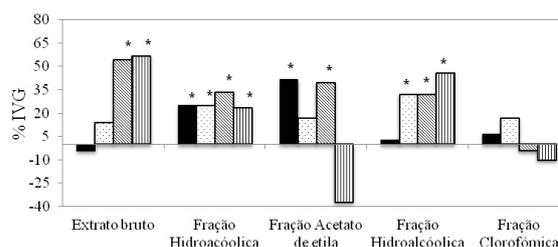


Figura 4. Médias do IVG de *Lactuca sativa* submetida a ensaio alelopático com o extrato e frações de *Z. rhoifolium*. Concentrações das amostras (mg): 0,8 ( ); 0,4 ( ); 0,2 ( ); 0,1 ( ). Os resultados estão apresentados em porcentagem em relação ao controle. As colunas com (\*) representam valores significativamente diferentes do controle água.

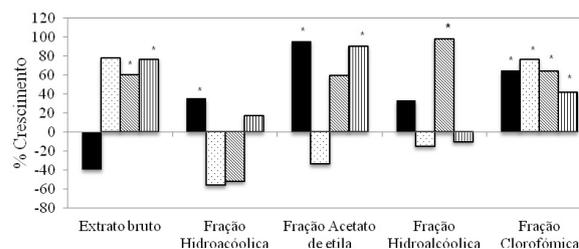


Figura 5. Crescimento do hipocótilo de *Lactuca sativa* submetida a ensaio alelopático com o extrato e frações de *Z. rhoifolium*. Concentrações das amostras (mg): 0,8 ( ); 0,4 ( ); 0,2 ( ); 0,1 ( ). Os resultados estão apresentados em porcentagem em relação ao controle. As colunas com (\*) representam valores significativamente diferentes do controle água.

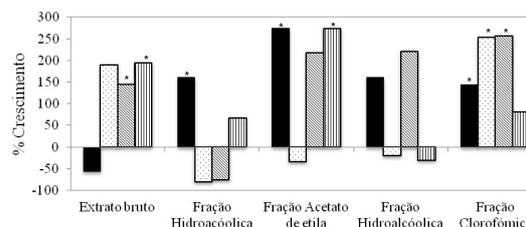


Figura 6. Crescimento da radícula de *Lactuca sativa* submetida a ensaio alelopático com o extrato e frações de *Z. rhoifolium*. Concentrações das amostras (mg): 0,8 ( ); 0,4 ( ); 0,2 ( ); 0,1 ( ). Os resultados estão apresentados em porcentagem em relação ao controle. As colunas com (\*) representam valores significativamente diferentes do controle água.

radical DPPH os resultados são expressos em IC50, e no método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em Índice Antioxidante (IA).

As Figuras 4, 5 e 6 representam os resultados do ensaio alelopático (IVG, crescimento da radícula e hipocótilo respectivamente), sendo que o zero representa o controle água, valores positivos correspondem ao estímulo e valores negativos a inibição. Verificou-se pH 7,0 no início do ensaio em todos os extratos e respectivas concentrações, bem como nos controles.

## DISCUSSÃO

### Avaliação da atividade antioxidante

O extrato da espécie estudada pode ser considerado antioxidante principalmente frente à técnica de redução do complexo fosfomolibdênio, como verificado na Figura 1. Este método fundamenta-se na redução de molibdênio VI em molibdênio V, ocorrido na presença de determinadas substâncias antioxidantes, com formação de complexo verde. (Prieto et al., 1999).

A análise estatística de Tukey ( $p < 0,05$ ) revelou que todas as amostras apresentaram atividade antioxidante inferior à vitamina C, porém o extrato bruto e as frações hexano e hidroalcoólica apresentaram atividades significativamente semelhantes à rutina, enquanto que as frações clorofórmica e acetato de etila demonstraram um potencial antioxidante superior a este padrão, com 204,17% e 127,11% de atividade, respectivamente. A fração acetato de etila demonstrou este perfil, possivelmente devido à presença de flavonóides, metabólito secundário amplamente presente na família Rutaceae (Moraes, et al., 2003). Portanto, todas as amostras podem ser consideradas antioxidantes em potencial, uma vez que a rutina é um flavonóide de ação antioxidante reconhecida.

A capacidade antioxidante pela técnica do DPPH demonstrou um perfil diferente, visto que o princípio do método é outro e existem vários mecanismos de ação antioxidante. O fundamento desta técnica se baseia pela capacidade das substâncias presentes nos extratos de impedirem a oxidação do radical DPPH, reduzindo-o à hidrazina e consequentemente promovendo mudança de coloração de roxo para amarelo, produzindo um decréscimo da absorbância a 518 nm (Mensor et al., 2001). A partir da análise estatística de Tukey ( $p < 0,05$ ), verificou-se que as amostras apresentaram atividade antioxidante inferior à vitamina C e à rutina, sendo necessário, portanto, uma quantidade maior dessas amostras para reduzir 50% da concentração inicial de DPPH (Figura 2). Assim, pode-se afirmar que as amostras possuem uma atividade menor que os padrões frente a este método.

A fração hexânica apresentou baixo efeito de captura do radical DPPH, não sendo observada mudança de coloração de roxo para amarelo nas concentrações utilizadas. Sendo assim, esta fração não apresenta atividade antioxidante abaixo de 500  $\mu\text{g/mL}$  frente ao método de redução do radical DPPH.

O resultado da atividade antioxidante pelo método TBARS demonstrou resultados semelhantes à técnica de redução do complexo fosfomolibdênio (Figura 3).

Os testes estatísticos de Anova e Tukey ( $p < 0,05$ ) foram utilizados nesse método e pôde-se observar que todas as frações demonstraram atividade significativamente semelhante ao do padrão BHT. Porém, as maiores atividades foram a do extrato etanólico bruto, da fração hexano e da fração clorofórmica, com valores de 64,2%, 60,9% e 60,3%, respectivamente. O padrão BHT demonstrou atividade antioxidante de 68,4%. Portanto, por este método, todas as amostras podem ser consideradas antioxidantes em potencial, no entanto são necessários mais estudos na elucidação das substâncias responsáveis por tal ação.

### Avaliação da atividade alelopática

As Figuras 3, 4 e 5 representam os resultados do ensaio alelopático, sendo que o zero representa o controle, valores positivos correspondem ao estímulo e valores negativos a inibição.

Verificou-se que as cascas de *Z. rhoifolium* apresentaram atividade alelopática, variando o potencial de acordo com o tratamento e amostra, sendo que todas as amostras estimularam a germinação e crescimento das sementes de *L. sativa*.

Destaca-se a fração clorofórmica (Figura 5 e 6), que demonstrou estimular o crescimento do hipocótilo e da radícula na maioria das concentrações (41 a 144% de estímulo), porém não influenciou a germinação das sementes de *L. sativa* (Figura 4).

As seguintes amostras demonstraram as maiores porcentagens estatisticamente significantes neste bioensaio: a fração acetato de etila estimulou 274% (0,8 e 0,1 mg), o crescimento do hipocótilo (Figura 5), a hidroalcoólica evidenciou um estímulo do crescimento da radícula de 98% na concentração de 0,2 mg (Figura 6) e o extrato bruto estimulou 55% a germinação nas concentrações 0,2 e 0,1 mg (Figura 4).

Verificou-se que o extrato de *Z. rhoifolium* apresentou atividade alelopática de estímulo, na germinação das sementes e crescimento do hipocótilo e radícula. Ao contrário do isolado xanthoxyline de *Zanthoxylum limonella* que inibe a germinação e crescimento das partes aéreas e raízes do capim, *Echinochloa crus-galli* L. Beauv. (Charoenying et al., 2010). Também foi relatado em estudos de outras espécies da família Rutaceae, como a *Ruta graveolens* L., que segundo Feo et al. (2002) apresenta um efeito inibitório na germinação e no crescimento da radícula de *Raphanus sativus* L., assim como a *Citrus junos* Sieb. ex Tanaka, cujo isolado ABA-GE, possui ação inibitória no crescimento do hipocótilo e da raiz de *Lactuca sativa* L. (Kato-Noguchi et al., 2002).

Reigosa et al. (1999) relata que o efeito dos aleloquímicos nos diferentes processos fisiológicos de uma planta geralmente são dependentes da concentração. Apesar disso, percebe-se no presente estudo que o estímulo alelopático sobre as sementes de alface não apresentam

uma relação dose-dependente. O referido autor ressalta ainda que cada processo fisiológico tem resposta diferente a certas doses de cada aleloquímico em particular, não sendo esse efeito necessariamente dose-dependente. A auxina, por exemplo, um regulador de crescimento, promove efeito benéfico até uma determinada concentração, após isso, torna-se nocivo à planta (Fachinello et al., 1996).

As explicações sobre o estímulo na germinação e crescimento das sementes de alface ainda são muito escassas, entre elas pode-se sugerir uma interferência dos aleloquímicos nos fitohormônios (Áquila et al., 1999), além da presença de nutrientes no extrato bruto, como açúcares, aminoácidos e sais (Sausen et al., 2009). As cascas do caule da espécie *Z. rhoifolium* apresentam significativa quantidade de sacarose (Bonetti & Turnes, 2013), nutriente que pôde ter favorecido positivamente no desenvolvimento das sementes de *L. sativa*. Esses resultados embasam possíveis estudos relacionados à genética e agricultura dos compostos alelopáticos presentes em *Z. rhoifolium*.

O estudo desenvolvido permitiu avaliar o potencial antioxidante e alelopático do extrato de *Z. rhoifolium*, verificando-se positividade em ambas atividades. Uma vez elucidado o potencial antioxidante do extrato de *Z. rhoifolium*, pode ser realizada a identificação das substâncias que promovem esta influência, assim como a investigação de substâncias com propriedades terapêuticas. Além disso, pode ser feita a pesquisa de fitohormônios, metabólitos secundários potencialmente alelopáticos, ou de outros componentes aleloquímicos responsáveis pelas atividades verificadas na casca desta planta.

Este é o primeiro trabalho descrevendo o estudo antioxidante e alelopático da espécie *Z. rhoifolium*.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Fundação Araucária pelo apoio financeiro e a empresa Laborclin (Pinhais - PR) por conceder alguns materiais para os experimentos.

## ABSTRACT

*Assessment of antioxidant and allelopathic activities of ethanolic extract and solvent fractions from stem bark of Zanthoxylum rhoifolium Lam. (Rutaceae)*

**The purpose of this study was to test for antioxidant and allelopathic activities in stem bark of *Zanthoxylum rhoifolium* Lam., Rutaceae, with the eventual aim of discovering biologically active substances. The plant material was subjected to ethanolic extraction and this extract was partitioned, yielding hexane, chloroform, ethyl acetate and hydroalcoholic fractions. Antioxidant activity was estimated by the reduction of phosphomolybdenum complex, of DPPH• and of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS). To**

**detect allelopathy, the samples were tested, at four concentrations, on the germination and development of the radicle and hypocotyl of *L. sativa* seeds. The samples showed significant antioxidant activity against the reduction of the phosphomolybdenum complex, as compared to rutin, and reduction of TBARS, as compared to BHT, as well as allelopathic activity, since they stimulated growth and seed germination. The chloroform and ethyl acetate fractions showed the best antioxidant potentials, with 204.17% and 127.11% compared to rutin, in the reduction of phosphomolybdenum complex, as did the crude ethanolic extract and hexane fraction, with 64.2% and 60.9% compared to BHT, in the TBARS method. In the allelopathic assay, the chloroform fraction stood out as the only sample that stimulated the growth of both the radicle and hypocotyl at most concentrations, ranging from 41 to 144%, while the ethyl acetate fraction achieved the greatest stimulus in this bioassay, increasing the growth of the hypocotyl by 274%. This is the first study that demonstrates the antioxidant and allelopathic activities of the species *Z. rhoifolium*.**

Keywords: *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. DPPH. Phosphomolybdenum. Allelopathy. TBARS.

## REFERÊNCIAS

Adegas FS, Voll E, Prete CEC. Embebição e germinação de sementes de picão-preto (*Bidens pilosa*). Planta Daninha [Internet] 2003 [citado 2006 dez. 12];21(1)21-5. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/pd/v21n1/a03v21n1.pdf>.

Aquila MEA, Ungarett JAC, Michelin A. Preliminary observation on allelopathic activity in *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Acta Hort [Internet] 1999 [citado 2006 abr. 5];502(1)383-388. Disponível em: [http://www.actahort.org/books/502/502\\_63.htm](http://www.actahort.org/books/502/502_63.htm).

Balakumar S, Rajan S, Thirunalasundari T, Jeeva S. Antifunga activity of *Aegle marmelos* (L.) Correa (Rutaceae) leaf extract on dermatophytes. Asian Pac J Trop Biomed [Internet] 2011 [citado 2011 set.];309-312. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S222116911160049X>.

Bastos JK, De Albuquerque S, Silva MLA. Evaluation of the trypanocidal activity of lignans isolated from the leaves of *Zanthoxylum naranjillo*. Planta Med [Internet] 1999 [citado 2012 jan. 18];65(6)541-4. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10483375>.

Bonetti A de F, Turnes de MJ. Estudo fitoquímico e das propriedades biológicas das cascas de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam., Rutaceae. [Monografia]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, UFPR; 2013.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 46, de 6 de outubro de 2011. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal, bem como as listas de

Substâncias Permitidas para uso nos Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal. Diário Oficial da União, nº 194, 7 de outubro de 2011. Seção 1. p. 4-11.

Carvalho JLS, Cunico MM, Dias J de FG, Miguel MD, Miguel OG. Termoestabilidade de processos extrativos de *Nasturtium officinale* R. Br., Brassicaceae por sistema soxhlet modificado. Quím Nova [Internet] 2009 [citado 2010 out.];32 (1)1031-1035.

Charoenying P, Teerarak M, Laosinwattana C. An allelopathic substance isolated from *Zanthoxylum limonella* Alston fruit. Sci Hortic [Internet] 2010 [citado 2010 jun28];125(3)411-416. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423810002116>.

Cortez LER. Estudo fitoquímico de *Conchocarpus gaudichaudianus* subsp. bahiensis e Almeida coerulea. [Tese]. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos; 2002.

Cortez LER. Constituintes químicos de Almeida coerulea (Nees & Mart.) A. St.-Hil. Rutaceae. Braz J Pharmacogn. [Internet] 2006 [citado 2009 dez. 12];16(2)164-9. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-695X2006000200006&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-695X2006000200006&script=sci_arttext).

Dias JFG, Círio GM, Miguel MD, Miguel OG. Contribuição ao estudo alelopático de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., Celastraceae. Rev Bras Farmacogn. [Internet] 2005 [citado 2005 set.];15(3)220-223. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-695X2005000300011&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-695X2005000300011&script=sci_arttext).

Fachinello JC, Nachtigal JC, Kersten E. Fruticultura: fundamentos e práticas. Pelotas: UFPEL; 1996.

Feo VD, De Simone F, Senatore F. Potential allelochemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*. Phytochemistry. [Internet] 2002 [citado 2002 nov.];61(5):573-8. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942202002844> Ferreira DF. SISVAR: Pacote computacional. Versão 4.0. Lavras, UFLA: Sistema de análise de variância de dados balanceados; 2000.

Ferreira AG, Aquila MEA. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. Rev Bras Fisiol Veg. [Internet] 2000 [citado 2009 jan. 1];12(1)175-204. Disponível em: <http://www.uv.mx/personal/tcarmona/files/2010/08/Gui-y-Alvez-1999.pdf>.

Floyd AG. Rainforest: Trees of Mainland South-Eastern Australian. Sidney: Inkata Press; 1989.

Freitas FFB, et al. Gastroprotective activity of *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. in animal models. J Ethnopharmacol. [Internet] 2011 [citado 2011 set.];137(1)700-8. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874111004430>.

Fournet A, Barrios AA, Munoz, V, Hocquemiller R, Roblot F, Cavé A, Richomme P. Antiprotozoal activity of quinoline alkaloids isolated from *Galipea longiflora*, a Bolivian plant used as treatment for cutaneous leishmaniasis. Phytother

Res. [Internet] 1994 [citado 2004 jan. 12];8(3)174-8. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ptr.2650080312/abstract>.

Goldfarb M, Pimentel LW, Pimentel NW. Alelopatia: relações nos agroecossistemas. Tecnol & Ciên Agropec. [Internet] 2009 [citado 2010 jul. 20];3(1)23-8. Disponível em: [http://www.emepa.org.br/revista/volumes/tca\\_v3\\_n1\\_fev/tca05\\_alelopatia.pdf](http://www.emepa.org.br/revista/volumes/tca_v3_n1_fev/tca05_alelopatia.pdf).

Gonzaga W de A, Weber AD, Giacomelli SR, Simionatto E, Dalcol II, Desoy ECM, Morel AF. Composition and antibacterial alkaloids from *Zanthoxylum rhoifolium*. Planta Med. [Internet] 2003 [citado 2010 maio 27];69(8)773-5. Disponível em: <https://www.thieme-connect.com/ejournals/pdf/10.1055/s-2003-42783.pdf>

Jullian V, Bourdy G, Georges S, Maurel S, Sauvain M. Validation of use of a traditional antimalarial remedy from French Guiana *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. J Ethnopharmacol. [Internet] 2006 [citado 2006 fev. 28];106(2006)348-52. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16504432>.

Kato-Noguchi H, Tanaka Y, Murakami T, Yamamura S, Fujihara S. Isolation and identification of an allelopathic substance from peel of *Citrus junos*. Phytochemistry. [Internet] 2002 [citado 2002 dez.];61(7)849-53. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942202003825>.

Krzyzanowski FC, Vieira RD, França Neto JB. Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina: Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes (ABRATES); 1999.

Lima CP, Cunico MM, Miguel OG, Miguel MD 2011. Efeito dos extratos de duas plantas medicinais do gênero *Bidens* sobre o crescimento de plântulas de *Lactuca sativa* L. Rev Ciênc Farm Básica Apl. [Internet] 2002 [citado 2002 dez.];32(1):83-7. Disponível em: [http://serv-bib.fcfa.unesp.br/seer/index.php/Cien\\_Farm/article/viewFile/1367/1050](http://serv-bib.fcfa.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/article/viewFile/1367/1050).

Lima LM, Perazzo FF, Carvalho JCT, Bastos JK. Anti-inflammatory and analgesic activities of the ethanolic extracts from *Zanthoxylum riedelianum* (Rutaceae) leaves and stem bark. J Pharm Pharmacol. [Internet] 2007 [citado 2009 nov. 29];59:1151-8. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1211/jpp.59.8.0014/pdf>.

Lemée A. Flore de la Guyane Française. Paris: Paul Chevalier Editions; 1956.

Lorenzi H. Árvores Brasileiras – Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum; 1992.

Mafezoli J, Vieira PC, Fernandes JB, Da Silva MF das GF, De Albuquerque S. In vitro activity of Rutaceae species against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. J Ethnopharmacol [Internet] 2000 [citado 2004 jan. 12];72(1-2)335-40. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874100003159>.

Maguire JD. Speed of germination – aid in selection and evaluation for seedling

emergence and vigor. Rev Bras Sementes. [Internet] 1962 [citado 1962 mar.];2(2)176-7. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-31222010000300015&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-31222010000300015&script=sci_arttext).

Mensor LL, Menezes FS, Leitão GG, Reis AS, Dos Santos TC, Coube CS, Leitão SG. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. Phytoter Res. [Internet] 2001 [citado 2001 mar. 16];15(2)127-30. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ptr.687/pdf>.

Moraes VR de S, et al. Enzymatic inhibition studies of selected flavonoids and chemosystematic significance of polymethoxylated flavonoids and quinoline alkaloids in *Neoraputia* (Rutaceae). J Braz Chem Soc. [Internet] 2003 [citado 2012 dez. 5];14(3)380-7. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-50532003000300007](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532003000300007).

Morais SM, Junior FEAC, Silva ARA, Neto JSM, Rondina D, Cardoso JHL. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil. Quím Nova [Internet] 2006 [citado 2006 out.];29(5)907-10. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422006000500004](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422006000500004).

Moura NF, Ribeiro HB, Machado ECS, Ethur EM, Zanatta N, Morel AF. Benzophenanthridine alkaloids from *Zanthoxylum rhoifolium*. Phytochemistry. [Internet] 1997 [citado 1997 mar.];46(8)1443-6. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942297004986>.

Nicoloso FT, Lazzari M, Fortunato RP. Propagação vegetativa de *Platanus acerifolia* Ait: (II) efeito da aplicação de zinco, boro e ácido indolbutírico no enraizamento de estacas. Ciênc Rural. [Internet] 1999 [citado 2009 maio 25];29(3)487-92. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84781999000300018&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84781999000300018&script=sci_arttext).

Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex: specific application to the determination of vitamin E. Anal Biochem. [Internet] 1999 [citado 1999 maio 1]; 269(2)337-41. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10222007>.

Reigosa MJ, Sánchez-Moreiras A, González L. Ecophysiological approach in allelopathy. Crit Rev Plant Sci. [Internet] 1999 [citado 2006 abr. 5];18(5)577-608. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07352689991309405#.UiK0bGe5f4g>.

Silva SLD, Figueredo PM, Yano T. Antibacterial and antifungal activities of volatile oils from *Zanthoxylum rhoifolium* leaves. Pharm Biol. [Internet] 2006 [citado 2008 nov.];44(9)657-9. Disponível em: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/13880200601006871?journalCode=phb>

Silva SLD, Figueredo PM, Yano T. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. leaves. Acta Amaz. [Internet] 2007 [citado 2007 jun.];37(2)281-286. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0044-59672007000200015](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0044-59672007000200015).

Silva CB. Avaliação do potencial de atividade alelopática da parte aérea e subterrânea de *Hydrocotyle bonariensis* Lam. (ARALIACEAE). [Dissertação]. Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2009.

Quettier-Deleu C, Gressier B, Vasseur J, Dine, T.; Brunet, C, Luychx M, Cazin JC, Bailleul F, Trotin F. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. J Ethnopharmacol. [Internet] 2000 [citado 2000 set.];72(1)35-42. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874100001963>.

Sausen TL, Lowe TR, Figueiredo LS, Buzatto CR. Avaliação da atividade alelopática do extrato aquoso de folhas de *Eugenia involucrata* dc. e *Acca sellowiana* (o. Berg) Burret. Polibotânica [Internet] 2009 [citado 2009 abr.];(27)145-58. Disponível em: <http://www.scielo.org.mx/pdf/polib/n27/n27a9.pdf>.

Severino VGP, Silva MF das GF, Lucarini R, Montanari LB, Cunha WR, Vinholis AHC, Martins CHG. Determination of the antibacterial activity of crude extracts and compounds isolated from *Hortia oreadica* (Rutaceae) against oral pathogens. Braz J Microbiol. [Internet] 2009 [citado 2013 jul. 11];40:335-540. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S151783822009000300015&script=sci\\_arttext&tlng=es](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S151783822009000300015&script=sci_arttext&tlng=es).

Silva PB, Medeiros ACM, Duarte MCT, Ruiz ALTG, Kolb RM, Frei F, Santos C. Avaliação do potencial alelopático, atividade antimicrobiana e antioxidante dos extratos orgânicos das folhas de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers (Bignoniaceae). Rev Bras Plantas Med. [Internet] 2011 [citado 2011 mar.]; 13(4)447-55. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v13n4/a10v13n4.pdf>.

Vieira MGS, De Freitas JVB, Neto MN de L; Gramosa NV. Constituintes químicos voláteis das folhas e galhos de *Zanthoxylum syncarpum* Tull. Quím Nova. [Internet] 2009 [citado 2009 jan. 26];32(2)391-3. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v32n2/v32n2a23.pdf>.

Valko M, Isakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser CJ. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. Mol Cell Biochem. [Internet] 2004 [citado 2004 nov.]; 266(1-2)37-56. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1023%2FB%3AMCBI.0000049134.69131.89?LI=true#page-1>.

Velhosa JCR, Barbosa V de F, Khalil NM, Dos Santos VA de FFM, Furlan M, Brunetti IL, Oliveira MM de F. Profile of *Maytenus aquifolium* action over free radicals and reactive oxygen species. Rev Bras Ciênc Farm. [Internet] 2007 [citado 2007 set.];43(3)447-53. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v43n3/a13v43n3.pdf>.

Wu TS, Li CY, Leu YL, Hu CQ. Limonoids and alkaloids of the root bark of *Dictamnus angustifolius*. *Phytochemistry*. [Internet] 1999 [citado 2005 out.];50(3)509-12. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942298005196>.

Yi Z, Yu Y, Liang Y, Zeng, B. In vitro antioxidant and antimicrobial activities of the extract of *Pericarpium Citri Reticulatae* of a new Citrus cultivar and its main flavonoids. *LWT – Food Sci Technol*. [Internet] 2008 [citado 2007 abr.];41(4)597-603. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002364380700165X>.

Recebido em 16 de maio de 2013

Aceito em 17 de setembro de 2013

