

Antioxidant and allelopathic activities of extract and fractions from *Rosmarinus officinalis*

Atividades antioxidante e alelopática do extrato e frações obtidos de *Rosmarinus officinalis*

Títulos abreviados:

Activities of extract and fractions from *Rosmarinus officinalis*

Atividades do extrato e frações de *Rosmarinus officinalis*

Sthéfane Guimarães Araújo¹; Maria Eduarda Amaral Pinto¹; Nathália Lucca Silva¹; Flávio José Leite dos Santos¹; Ana Hortência Fonsêca Castro¹; Luciana Alves Rodrigues dos Santos Lima^{*1}

ABSTRACT

The species *Rosmarinus officinalis* L. is popularly known as rosemary, being widely used in traditional medicine. In the present study, the ethanol extract and fractions obtained from *R. officinalis* were evaluated for allelopathic and antioxidant activities and determined the content of phenolic compounds. The ethanol extract and fractions showed antioxidant activity in five concentrations tested. Regarding the EC₅₀ values, the ethanol extract and fractions showed better results than the BHT, reference compound. The EC₅₀ values obtained for the ethanol extract and fractions could not be correlated directly with the content of phenolic compounds present in the samples. For allelopathic activity, the samples showed heterogeneous effects on growth of hypocotyl and radicle of seeds of lettuce and onion observed at different concentrations (50, 100 and 200 µg/mL). For the radicle onion (*Allium cepa*), the best results were obtained for the ethanol extract and fractions hexane and dichloromethane, which inhibited growth at all concentrations, and the dichloromethane fraction promoted an inhibition greater than 80.0%, at a concentration of 200 µg/mL. Regarding the onion hypocotyl, the effects were heterogeneous. The results for the growth of radicle and hypocotyl of lettuce seeds (*Lactuca sativa*) showed that the inhibitory effect was more significant than the stimulatory, when the seeds were treated with the ethanol extract and fractions. Regarding the inhibitory effect, they emphasized the dichloromethane fraction with a 100.0% inhibition, at a concentration of 200 µg/mL. Inhibition of hypocotyl was more significant than the radicle for lettuce seeds. The ethanol extract and dichloromethane fraction had an inhibitory effect, at all concentrations tested. In the search for new antioxidants and allelochemicals of natural origin, the species *Rosmarinus officinalis* may be a good candidate.

Keywords: antioxidant; allelopathic; phenol total; *Rosmarinus officinalis*.

¹ Campus Centro-Oeste Dona Lindu, Universidade Federal de São João Del-Rei, Divinópolis, MG, 35501-296, Brazil.

* Autor correspondente: Prof. Dr. Luciana Alves Rodrigues dos Santos Lima

Campus Centro-Oeste Dona Lindu, Universidade Federal de São João Del-Rei, Rua Sebastião Gonçalves Coelho 400, Chanadour, Divinópolis, 35501-296, MG, Brazil. Tel.: +55 (37) 3071-1878 Fax.: +55 (37) 3221-1614

E-mail: luarsantos@ufsj.edu.br

RESUMO

A espécie *Rosmarinus officinalis* L. é conhecida popularmente como alecrim, sendo bastante utilizada na medicina popular. No presente estudo, o extrato etanólico e as frações obtidas de *R. officinalis* foram avaliados quanto as atividades antioxidante e alelopática e tiveram determinado o teor de compostos fenólicos. O extrato etanólico e as frações apresentaram atividade antioxidante nas cinco concentrações testadas. Em relação aos valores de CE₅₀, o extrato etanólico e as frações apresentaram resultados melhores que do BHT, composto de referência. Os valores de CE₅₀ obtidos para o extrato etanólico e para as frações não puderam ser correlacionados diretamente com a quantidade de compostos fenólicos presentes nas amostras. Para a atividade alelopática, as amostras apresentaram efeitos heterogêneos sobre o crescimento do hipocótilo e da radícula das sementes de alface e de cebola, observado em diferentes concentrações (50, 100 e 200 µg/mL). Para a radícula da cebola (*Allium cepa*), os melhores resultados foram obtidos para o extrato etanólico e as frações hexânica e diclorometano, que inibiram o crescimento em todas as concentrações, sendo que a fração diclorometano promoveu uma inibição maior que 80,0%, na concentração de 200 µg/mL. Em relação ao hipocótilo da cebola, os efeitos foram heterogêneos. Os resultados para o crescimento da radícula e do hipocótilo das sementes de alface (*Lactuca sativa*) mostraram que o efeito inibitório foi mais expressivo que o estimulatório, quando as sementes foram tratadas com o extrato etanólico e as frações. Em relação ao efeito inibitório, destacou-se a fração diclorometano com uma inibição de 100,0%, na concentração de 200 µg/mL. A inibição do hipocótilo foi mais expressiva do que a da radícula para as sementes de alface. O extrato etanólico e a fração diclorometano tiveram ação inibitória em todas as concentrações testadas. Na busca por novos antioxidantes e aleloquímicos de origem natural, a espécie *Rosmarinus officinalis* pode ser uma boa candidata.

Palavras-chave: antioxidante; alelopático; fenóis totais; *Rosmarinus officinalis*.

INTRODUÇÃO

Espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e hidroperoxila ($\text{ROO}\cdot$), causam danos ao DNA ou podem oxidar lipídios e proteínas. Os EROs atacam as cadeias de ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolipídios e do colesterol, abstraindo um hidrogênio do grupo metileno bis-alílico, iniciando assim, o processo de peroxidação lipídica nas membranas celulares. Os radicais de carbono formados podem reagir com oxigênio originando radicais peroxila, que por sua vez podem atacar novas cadeias de ácidos graxos poliinsaturados, propagando a reação. O resultado deste processo é a oxidação de várias moléculas de ácidos graxos (SOUSA et al., 2007), que podem reagir com outros compostos, sendo prejudiciais para os organismos vivos (MARINOVA; YANISHILIEVA, 2003). Em bioquímica e medicina, antioxidantes são substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis, podendo ser estes enzimáticos ou não enzimáticos, tais como que α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ácido ascórbico (vitamina C) e os compostos fenólicos (flavonoides) (HUANG; OU; PNOR, 2005).

Triagens clínicas e estudos epidemiológicos têm estabelecido uma correlação inversa entre a utilização, na alimentação, de frutas, vegetais e chás e a ocorrência de doenças relacionadas com o estresse oxidativo (DROGE, 2002). O estresse oxidativo que as biomoléculas sofrem está relacionado com as patologias de um grande número de doenças crônicas, incluindo doenças cardiovasculares, inflamações, câncer e desordens relacionadas com a idade (por exemplo, a doença de Alzheimer) (ASOLINI et al., 2006).

Acredita-se que os antioxidantes absorvidos a partir dos alimentos vegetais, incluindo substâncias polifenólicas, vitaminas E e C e carotenoides são efetivos na prevenção dessas doenças relacionadas com o estresse oxidativo. Assim, é de grande interesse, do ponto de vista medicinal e nutricional, o conhecimento da capacidade antioxidante dos constituintes dos alimentos que consumimos. Neste contexto, os antioxidantes têm se tornado um tópico de progressivo interesse nos últimos anos e as publicações relativas a esse assunto quadruplicaram na última década (HUANG; OU; PNOR, 2005).

O termo alelopatia foi criado pelo pesquisador alemão Hans Molisch, em 1937, sendo empregado como o efeito prejudicial e/ou benéfico entre as plantas, através de interações bioquímicas, incluindo microrganismos. Tais interações ocorrem devido à liberação de substâncias químicas (aleloquímicos) produzidos

via metabolismo secundário das plantas (RICE, 1984).

Em geral, os agentes alelopáticos são metabólitos secundários, derivados da rota acetato ou chiquimato ou da combinação destas. Os compostos alelopáticos identificados pertencem a várias classes, como terpenos, alcaloides, compostos fenólicos, esteroides, ácidos graxos de cadeia longa e lactonas insaturadas (MALHEIROS; PERES, 2001). Podem ser liberados no ar, excretados pela raiz ou carregados até o solo pela água da chuva, que lava as partes aéreas da planta (LARCHER, 2000), interferindo na conservação, dormência e germinação das sementes, no crescimento de plântulas e no vigor vegetativo de plantas adultas, podendo também influenciar a competição entre espécies (YAMAGUSHI; GUSMAN; VESTENA, 2011). Estes compostos alelopáticos estão se revelando como herbicidas naturais, livres dos efeitos prejudiciais dos herbicidas sintéticos (MALHEIROS; PERES, 2001). Nesse sentido, nos últimos anos, vários esforços têm sido feitos a fim de identificar propriedades alelopáticas de substâncias, que ofereçam novas e excelentes oportunidades para diversificar o controle de ervas daninhas na agricultura do Brasil e, também, de outros países (SOUZA FILHO; FONSECA; ARRUDA, 2005).

O gênero *Rosmarinus* pertence à família Lamiaceae. A espécie *Rosmarinus officinalis*, conhecida popularmente como alecrim, é originária da Região Mediterrânea e cultivada em quase todos os países de clima temperado, de Portugal à Austrália. A planta possui porte subarborescente lenhoso, ereto e pouco ramificado com até 1,5 m de altura. As folhas são lineares, coriáceas e muito aromáticas, medindo 1,5 a 4 cm de comprimento por 1 a 3 mm de espessura. As flores azuladas-claras e pequenas possuem aroma forte e muito agradável. A planta é utilizada popularmente para dores de barriga, de cabeça e de estômago, e ainda, como tônica e estimulante estomacal (LORENZI; MATOS, 2008).

Na literatura existem vários trabalhos relacionados ao estudo fitoquímico e avaliação de atividades biológicas do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*. Várias atividades, como antibacteriana, antifúngica, antitumoral e larvicida, já foram relatadas para o óleo essencial, mas não para os extratos de *Rosmarinus officinalis*. Pelo fato de existirem poucos estudos sobre a composição de extratos e frações de *Rosmarinus officinalis*, assim como a avaliação de atividades biológicas para os mesmos, o objetivo deste trabalho foi avaliar as atividades antioxidante e alelopática e determinar o conteúdo de compostos fenólicos do extrato etanólico e das frações obtidas das partes aéreas dessa espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Materiais

Etanol, hexano, diclorometano, acetato de etila, *n*-butanol, metanol e dimetilsulfóxido foram adquiridos da Vetec (Brasil). DPPH, ácido tânico, BHT, reagente de Folin-Dennis e tampão MES foram comprados da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

Coleta do material vegetal

Partes aéreas de *Rosmarinus officinalis* em estágio adulto foram coletadas na cidade de Carmópolis de Minas (coordenadas -20° 32' 44.57", -44° 38' 37.09"), Minas Gerais, Brasil, entre março e abril de 2011, e uma exsicata foi depositada no Herbário do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, com o número de registro BHCB 147245, sendo identificada pelo Prof. Dr. Alexandre Salino.

Preparação e partição do extrato vegetal

Aproximadamente 106,84 g de material vegetal fresco foi triturado e deixado em maceração por 10 dias, em etanol P.A. Após esse período, o material foi filtrado e seco em rotavapor, obtendo-se 6,30 g de extrato etanólico. Parte do extrato (481,2 mg) foi solubilizado em etanol/água (1:1) e, posteriormente, particionado com hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol, obtendo-se as frações hexânica (130,8 mg), diclorometano (107,1 mg), acetato de etila (36,6 mg), butanólica (108,8 mg) e hidroetanólica (64,3 mg).

Determinação do conteúdo de compostos fenólicos

Para a determinação do conteúdo de compostos fenólicos foi utilizado material vegetal previamente seco em estufa e triturado. Aproximadamente 200 mg do material seco foi extraído com 2 mL de solução metanol:água (1:1), por maceração, com agitação ocasional por 4 h. O volume final da amostra foi completada para 10 mL. Uma alíquota de 100 µL dessa amostra foi utilizada para a determinação do teor de fenóis totais, através do método de Folin-Dennis, segundo as normas da AOAC (1995). As determinações foram feitas em triplicata e o resultado foi expresso em mg equivalentes de ácido tânico por 200 mg de amostra seca.

A amostra diluída (10 mL) foi submetida à partição com hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol. Para as frações obtidas também foi determinado o conteúdo de compostos fenólicos, conforme metodologia descrita anteriormente.

Os resultados obtidos foram analisados utilizando o Test t de Student, com $P < 0,05$, como nível de significância, comparado ao extrato etanólico.

Ensaio de atividade antioxidante

Para a determinação da atividade antioxidante foi utilizado o método da captura do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila, DPPH (FUKUMOTO; MAZZA, 2000). Resumidamente, uma solução de DPPH (0,002% p/v), foi preparada em metanol 80%. 75 µL das amostras ou do padrão foram adicionados a cada um dos poços da microplaca de 96 poços de fundo chato, contendo 150 µL da solução de DPPH. As amostras e o padrão foram preparados em triplicata para cada uma das cinco concentrações utilizadas (1, 10, 100, 250 e 500 µg/mL). A placa então foi coberta e deixada no escuro à temperatura ambiente (25 °C). Após 30 minutos, a absorvância a 517 nm foi medida em espectrofotômetro (Biotek Power Wave XS2/US). BHT (2,6-di-tert-butil-4-metilfenol) foi usado como composto de referência ou padrão.

O percentual de inibição do DPPH (ou a % da atividade antioxidante) foi calculado pela seguinte equação (BURDA; OLESZEK, 2001):

$$\% \text{ de inibição do DPPH} = [1 - (A_a / A_b)] \times 100$$

onde A_a = absorvância da amostra e A_b = absorvância da solução de DPPH.

O cálculo da CE_{50} (concentração efetiva para descolorir 50% da solução de DPPH) foi feito utilizando-se o método probitos de análise (FINNEY, 1980) e foi expressa em µg/mL. Os dados foram analisados utilizando o Test t de Student, com $P < 0,05$, como nível de significância, comparado ao padrão BHT.

Ensaio de atividade alelopática

O ensaio de atividade alelopática foi feito com sementes de dicotiledônea *Lactuca sativa* L. var. repolhuda (alface, Feltrin) e de monocotiledônea *Allium cepa* var. Red Creole (cebola, Topped Garden). A germinação e o crescimento foram conduzidos em solução tampão MES [ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfônico] na concentração de 1,95 g/L ajustando ao pH 6,00-6,20 com NaOH 1 mol/L. As amostras secas foram pesadas e solubilizadas em dimetilsulfóxido à 0,5%,

previamente destilado, e depois diluídas em tampão (5 µL de DMSO/mL de tampão) e testadas nas seguintes concentrações: 200, 100 e 50 µg/mL. Todas as sementes menores ou danificadas foram desprezadas. Foram distribuídas 25 sementes de *Lactuca sativa* (alface) e *Allium cepa* (cebola) distintamente em placas de petri (90 mm de diâmetro), com papel Whatman no. 1. Foram adicionados a essas placas de petri, 5 mL de solução tampão contendo as amostras ou 5 mL dos controles (solução tampão sem qualquer amostra testada). O teste foi realizado em triplicata para cada concentração e para o controle. As placas de petri foram fechadas, lacradas com papel filme e incubadas por sete dias em Câmara de Germinação, no escuro, a 25 °C. Completado esse tempo, as placas foram retiradas e resfriadas a -10 °C durante 24 h para interromper o processo de crescimento. Depois, as placas foram abertas e o comprimento de cada radícula e hipocótilo medidos (VIEIRA et al., 2005).

Os efeitos sobre o crescimento foram dados como diferenças na porcentagem em relação ao controle, e que consistem nas diferenças (em cm) entre os valores médios das sementes com as amostras testadas e a média dos valores para o controle (sementes cultivadas sem adição de amostras testadas) / valores médios para o controle × 100. Assim, o zero representou o controle, valores positivos estimulação do parâmetro estudado, e valores negativos inibição. Os dados foram analisados utilizando o Test t de Student, com $P < 0,05$, como nível de significância, quando comparado ao extrato etanólico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O relato de atividades biológicas de extratos e frações de *Rosmarinus officinalis* na literatura ainda é muito escasso, sendo este trabalho uma contribuição importante para a avaliação das atividades antioxidante e alelopática.

Os resultados para a atividade antioxidante estão apresentados na Tabela 1. Observando a tabela, verifica-se que houve maior alteração na atividade antioxidante de todas as amostras, da concentração de 10 para 100 µg/mL, mas não houve grandes variações nas demais concentrações. A fração com maior porcentagem de inibição foi a hexânica, com 99,76% na concentração de 500 µg/mL. O extrato etanólico e as frações foram ativas em todas as concentrações testadas. As frações diclorometano e hidroetanólica, nas concentrações de 250 e 500 µg/mL; a fração acetato de etila, nas concentrações de 100, 250 e 500 µg/mL, e a fração butanólica, na concentração de 10 µg/mL, não apresentaram

diferenças estatísticas significantes em relação à atividade do BHT ($P > 0,05$).

Quando se comparou a atividade do extrato etanólico e das frações entre si, observou-se uma diferença considerável nos valores obtidos para o percentual de inibição do DPPH, nas cinco concentrações testadas. Não se verificou diferenças estatísticas significantes ($P > 0,05$) para os seguintes resultados: a) o extrato etanólico e as frações acetato de etila e hidroetanólica, na concentração de 10 µg/mL, b) a fração hexânica e a fração diclorometano, nas concentrações de 1 e 250 µg/mL, c) a fração hexânica e a fração hidroetanólica, na concentração de 100 µg/mL, d) a fração diclorometano e a fração acetato de etila, nas concentrações de 1, 10, 250 e 500 µg/mL, e) a fração diclorometano e a fração hidroetanólica, na concentração de 500 µg/mL, f) a fração acetato de etila e a fração hidroetanólica, nas concentrações de 1, 10 e 500 µg/mL. Todos os demais resultados foram estatisticamente significantes ($P < 0,05$).

Os valores de CE_{50} (concentração efetiva para descolorir 50% da solução de DPPH) foram calculados e os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 2. Em relação aos valores de CE_{50} , o extrato etanólico e as frações apresentaram resultados melhores que do BHT, composto de referência, com diferenças estatísticas significantes ($P < 0,05$). A fração butanólica foi a que obteve melhor resultado, tendo um valor de CE_{50} igual a 1,59 µg/mL.

A Tabela 2 apresenta os resultados do conteúdo de compostos fenólicos, que foram expressos em mg equivalentes de ácido tânico por 200 mg de amostra seca. Fenóis são substâncias que possuem uma hidroxila ligada a um anel benzênico, apresentando diferentes atividades biológicas, dentre elas a atividade antioxidante.

Tabela 1 - Atividade antioxidante do extrato etanólico e das frações de *R. officinalis* nas cinco concentrações testadas (1, 10, 100, 250 e 500 µg/mL).

| Amostras | Concentrações (µg/mL) | | | | |
|-------------------------|------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | 1 | 10 | 100 | 250 | 500 |
| Extrato etanólico | 33,09 ± 0,34 * | 46,94 ± 0,68 * ^a | 83,03 ± 0,59 * | 87,32 ± 0,34 * | 91,61 ± 0,33 * |
| Fração hexânica | 43,58 ± 0,49 * ^a | 48,19 ± 0,36 * | 87,60 ± 0,24 * ^a | 93,32 ± 0,41 * ^a | 99,76 ± 0,14 * |
| Fração diclorometano | 42,63 ± 0,28 * ^{ab} | 45,80 ± 0,49 * ^b | 71,71 ± 0,14 * | 91,34 ± 0,50 * ^{ab} | 93,48 ± 0,36 * ^{ab} |
| Fração acetato de etila | 42,31 ± 0,24 * ^{bc} | 46,20 ± 0,36 * ^{abc} | 90,46 ± 0,24 | 91,82 ± 0,28 * ^b | 93,56 ± 0,17 * ^{ac} |
| Fração butanólica | 49,08 ± 0,24 * | 51,00 ± 0,36 | 61,33 ± 0,23 * | 77,86 ± 0,27 * | 96,24 ± 0,20 * |
| Fração hidroetanólica | 41,43 ± 0,27 * ^c | 47,16 ± 0,28 * ^{ac} | 88,56 ± 0,41 * ^a | 90,62 ± 0,14 | 93,32 ± 0,24 * ^{bc} |
| BHT | 39,50 ± 0,49 | 50,88 ± 0,36 | 89,99 ± 0,24 | 91,37 ± 0,41 | 94,19 ± 0,23 |

* $P < 0,05$ quando comparado ao composto de referência BHT (2,6-di-tert-butil-4-metilfenol). Na mesma coluna, as letras iguais indicam que os valores não são significativamente diferentes ($P > 0,05$).

Tabela 2 - Valores de CE_{50} e conteúdo de compostos fenólicos para o extrato etanólico e frações de *R. officinalis*.

| Amostras | Atividade antioxidante CE_{50} (µg/mL) | Conteúdo de compostos fenólicos (mg/200 mg) |
|-------------------------|--|---|
| Extrato etanólico | 11,53 ± 0,91 * | 1,68 ± 0,25 |
| Fração hexânica | 10,46 ± 0,43 * | 0,24 ± 0,03 * ^a |
| Fração diclorometano | 14,93 ± 2,40 * | 0,70 ± 0,08 |
| Fração acetato de etila | 11,46 ± 0,55 * | 0,26 ± 0,02 * ^a |
| Fração butanólica | 1,59 ± 0,21 * | 0,58 ± 0,04 |
| Fração hidroetanólica | 11,16 ± 1,49 * | 0,96 ± 0,11 |
| BHT | 16,36 ± 2,55 | - |

Conteúdo de compostos fenólicos: resultados expressos em mg equivalentes de ácido tânico por 200 mg de amostra seca. * $P < 0,05$ quando comparado ao composto de referência BHT. Na mesma coluna, as letras iguais indicam que os valores não são significativamente diferentes ($P > 0,05$).

Pelos resultados obtidos na Tabela 2, observou-se que o extrato etanólico apresentou maior concentração de compostos fenólicos. Dentre as frações, a hidroetanólica mostrou maior quantidade de substâncias com o grupamento fenólico. As frações hexânica e acetato de etila apresentaram menor quantidade destes compostos. As frações apresentaram diferenças estatísticas significantes quando comparadas ao extrato etanólico e, também, entre si ($P < 0,05$). O valor para o conteúdo de compostos fenólicos encontrado para as frações hexânica e acetato de etila foi muito semelhante, não apresentando diferença significativa ($P > 0,05$).

Um estudo realizado por Félix-Silva *et al.* (2012), verificou a presença de fenóis para *R. officinalis*, mais especificamente a presença de catequinas. Esse

fato corrobora com a presença de compostos fenólicos encontrados no nosso estudo.

Os valores de CE_{50} obtidos para o extrato etanólico e para as frações não puderam ser correlacionados diretamente com a quantidade de compostos fenólicos presentes nas amostras. Um exemplo é a fração butanólica que apresentou menor valor de CE_{50} , mas não mostrou maior quantidade de compostos fenólicos. Esse fato pode ser explicado pela presença de outros compostos, além dos fenólicos, que também podem apresentar atividade antioxidante, como diterpenos, triterpenos e esteroides (GENENA *et al.*, 2008). O ácido ursólico, um triterpeno já extraído de *Rosmarinus officinalis*, é conhecido pela sua atividade antioxidante (COLLINS; CHARLES, 1987).

Estudos correlacionando o conteúdo de polifenóis e os valores de IC_{50} também foram feitos por Zaouali *et al.* (2013) e Rodríguez-Rojo *et al.* (2012). Zaouali *et al.* (2013) prepararam extratos em acetona de vários órgãos (folhas, galhos, flores) de *R. officinalis*, determinando o conteúdo total de fenóis, flavonoides e taninos condensados e atividade antioxidante pelos métodos DPPH e FRAP. Este trabalho mostrou uma correlação negativa entre o conteúdo de fenóis totais e a atividade antioxidante por DPPH para todos os extratos em acetona obtidos. Já a atividade antioxidante pelo método FRAP mostrou uma correlação positiva com o teor de fenóis totais (ZAOUALI *et al.*, 2013). Os extratos em acetona mostraram IC_{50} maiores do que os encontrados para o extrato etanólico e as frações nesse trabalho, utilizando o método DPPH, com valores de 20,5 a 28 µg/mL.

Rodríguez-Rojo *et al.* (2012) prepararam extratos de *R. officinalis*, usando como solventes água ou etanol 96%, por extração comum, extração utilizando micro-ondas e extração utilizando ultra-som, sendo determinado o conteúdo de

polifenóis e a atividade antioxidante dos extratos obtidos pelo método DPPH. Os resultados mostraram que a atividade antioxidante encontrada não pode ser diretamente correlacionada com o maior teor de fenóis totais. Por exemplo, o extrato etanólico das folhas frescas de *R. officinalis* apresentou um teor de fenol total de 450 ppm GAE e valor de EC_{50} de 3,2 $\mu\text{g/mL}$, já o extrato aquoso das folhas frescas teve um teor de fenol total de 550 ppm GAE e valor de EC_{50} de 69 $\mu\text{g/mL}$ (RODRÍGUEZ-ROJO et al., 2012). Os trabalhos citados acima mostram que não há uma correlação direta entre maior teor de fenóis totais e uma melhor atividade antioxidante, quando utilizado o método DPPH, corroborando para os resultados encontrados em nosso estudo.

A atividade alelopática do extrato etanólico e das frações obtidas de *Rosmarinus officinalis* foi avaliada frente às sementes de *Lactuca sativa* (alface) e *Allium cepa* (cebola). As Figuras 1 e 2 apresentam os resultados obtidos para esse ensaio. As figuras mostram o percentual de crescimento das sementes quando tratadas com o extrato etanólico e as frações em relação ao grupo controle (sementes tratadas com tampão na ausência das amostras). As amostras foram capazes de estimular, e também inibir o crescimento do hipocótilo e da radícula, sendo os dois efeitos observados em diferentes concentrações (50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$).

As frações acetato de etila, butanólica e hidroetanólica estimularam o crescimento da radícula da cebola na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, chegando a quase 25,0% para a fração acetato de etila (Figura 1A). A fração butanólica também estimulou o crescimento da radícula na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. Os melhores resultados foram obtidos para o extrato etanólico e as frações hexânica e diclorometano, que inibiram o crescimento da radícula em todas as concentrações, sendo que a fração diclorometano promoveu uma inibição maior que 80,0%, na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$.

Em relação ao hipocótilo da cebola (Figura 1B), o crescimento e a inibição foram mais heterogêneos. Na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, todas as amostras estimularam o crescimento. Nas duas maiores concentrações, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$, houve tanto estimulação quanto inibição do crescimento do hipocótilo das sementes de cebola.

Comparando o crescimento e a inibição do hipocótilo e da radícula da espécie *Allium cepa*, pode-se perceber que os diferentes órgãos embrionários da cebola se comportaram diferentemente em relação às amostras testadas. O

extrato etanólico e a fração diclorometano foram as amostras que promoveram maior inibição nas sementes de cebola. A fração hexânica também teve predominantemente ação inibitória, especialmente na radícula.

Em relação a estimulação do crescimento da radícula e do hipocótilo das sementes de cebola, destacou-se a fração butanólica, que estimulou o crescimento em todas as concentrações frente ao hipocótilo, e frente à radícula nas duas menores concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$.

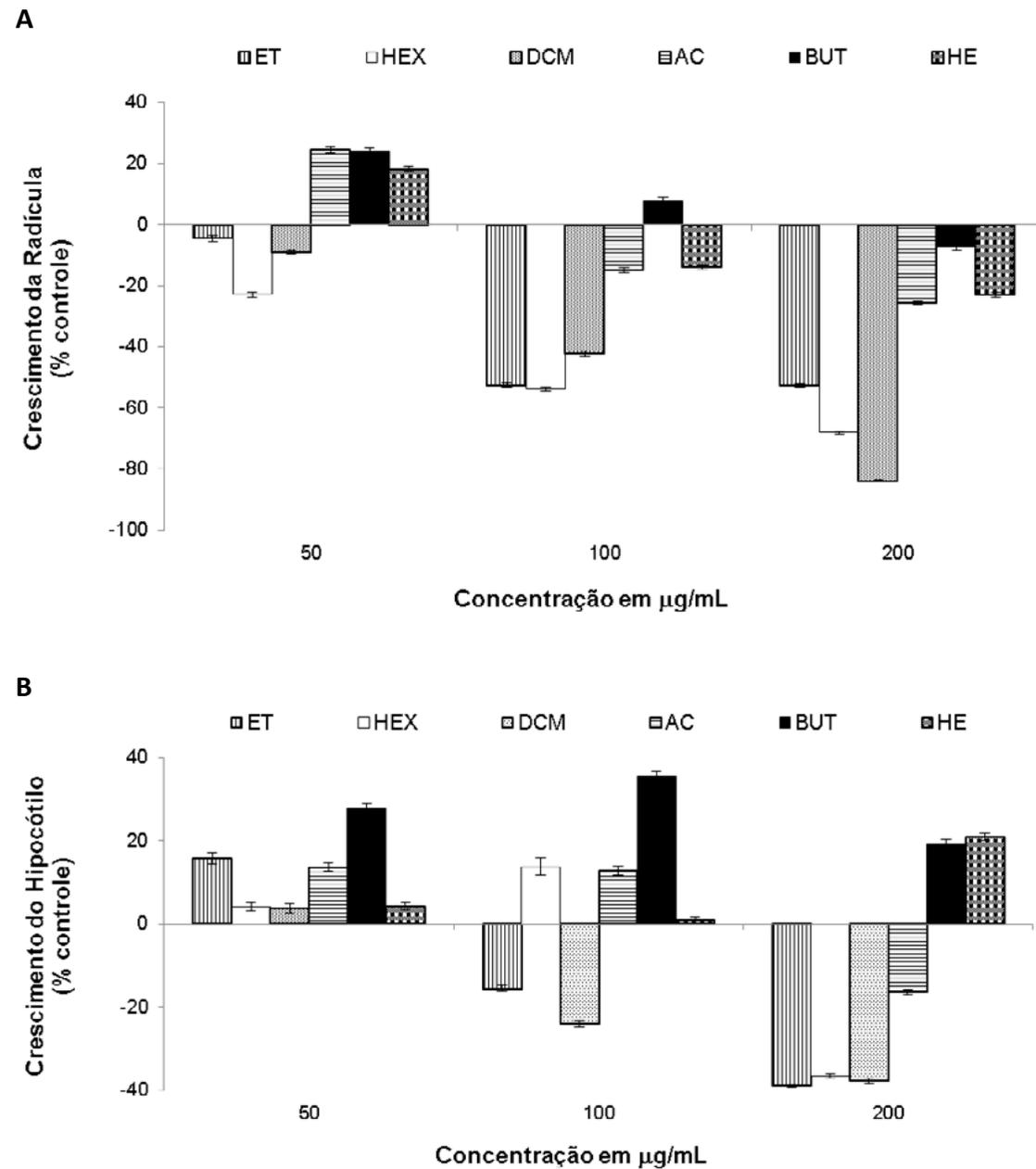
O extrato etanólico e as frações de *Rosmarinus officinalis* foram avaliadas quanto a atividade alelopática frente as sementes de alface (*Lactuca sativa*). Os resultados para o crescimento da radícula (Figura 2A) mostraram que o efeito inibitório foi mais expressivo que o estimulatório, quando as sementes foram tratadas com o extrato etanólico e as frações. O efeito de estimulação do crescimento da radícula foi observado para a fração acetato de etila, na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, e para as frações hexânica e hidroetanólica, na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$. Em relação ao efeito inibitório, destacou-se a fração diclorometano com uma inibição de 100,0%, na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$.

Na Figura 3B, verifica-se também a predominância da atividade inibitória do extrato etanólico e das frações de *R. officinalis*. Na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, todas as amostras inibiram o crescimento do hipocótilo. Na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, somente a fração hidroetanólica foi estimuladora do crescimento, e na de 200 $\mu\text{g/mL}$, as frações butanólica e hidroetanólica, sendo que a estimulação foi inferior a 20,0%, nesses dois casos. A inibição foi evidente, com ênfase para a ação da fração diclorometano, que inibiu o crescimento do hipocótilo em todas as concentrações, chegando 100,0% na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$.

A inibição do hipocótilo foi mais expressiva do que a da radícula para as sementes de alface. O extrato etanólico e a fração diclorometano tiveram ação inibitória em todas as concentrações testadas.

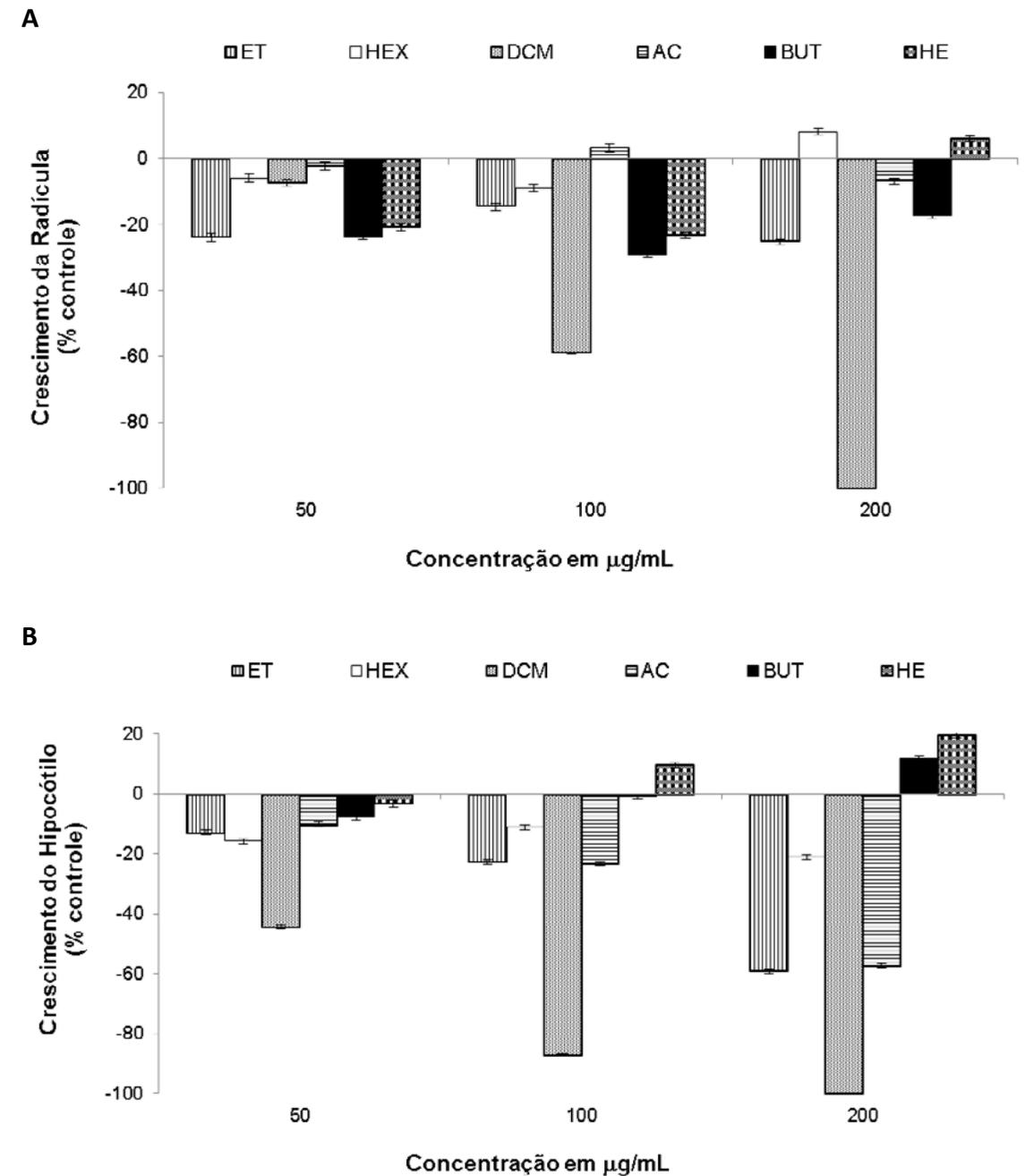
Os dados foram analisados utilizando o Test t de Student, com $P < 0,05$, como nível de significância. Os resultados demonstram que todas as frações tiveram diferenças estatísticas significativas em relação ao extrato etanólico, seja por inibição ou estimulação do crescimento do hipocótilo e da radícula das sementes de alface e de cebola.

Figura 1 - Crescimento das sementes quando submetidas às amostras de *Rosmarinus officinalis* nas concentrações testadas de 50, 100 e 200 g/mL. A) Radícula de *Allium cepa* (cebola); B) Hipocótilo de *Allium cepa* (cebola).



ET: extrato etanólico, HEX: fração hexânica, DCM: fração diclorometano, AC: fração acetato de etila, BUT: fração butanólica, HE: fração hidroetanólica.

Figura 2 - Crescimento das sementes quando submetidas às amostras de *Rosmarinus officinalis* nas concentrações testadas de 50, 100 e 200 g/mL. A) Radícula de *Lactuca sativa* (alface); B) Hipocótilo de *Lactuca sativa* (alface).



ET: extrato etanólico, HEX: fração hexânica, DCM: fração diclorometano, AC: fração acetato de etila, BUT: fração butanólica, HE: fração hidroetanólica.

Os resultados obtidos neste trabalho para a atividade alelopática de *Rosmarinus officinalis* corroboram com os resultados encontrados no estudo de Angelini et al. (2003). A atividade alelopática foi avaliada com a espécie coletada em duas regiões diferentes da Itália. Os óleos essenciais (tipo A e tipo B) tiveram como principais componentes o 1,8-cineol e o α -pineno, respectivamente. O efeito alelopático foi observado através de um aumento significativo na porcentagem de sementes frescas não germinadas de rabanete, pimenta e alface. O óleo essencial tipo B mostrou atividade fitotóxica maior que o óleo tipo A em relação às sementes das espécies analisadas, sendo capaz de inibir completamente a germinação de espécies de plantas daninhas e também de alface. Do ponto de vista de aplicação prática, a atividade deste óleo foi significativa e interessante, já que a germinação das sementes das espécies de plantas daninhas foi completamente inibida (ANGELINI et al., 2003).

CONCLUSÕES

Na busca por novos antioxidantes e aleloquímicos de origem natural, a *Rosmarinus officinalis* pode ser uma boa candidata. Os resultados demonstraram que *R. officinalis* possui grande potencial antioxidante, já que o extrato etanólico e as frações foram mais ativas que o BHT, composto de referência. Os valores de CE_{50} obtidos para o extrato etanólico e para as frações não puderam ser correlacionados diretamente com a quantidade de compostos fenólicos presentes nas amostras. Para a atividade alelopática, observaram-se resultados variados nas frações e no extrato etanólico de *R. officinalis*, sendo que alguns estimularam e outros inibiram o crescimento da radícula e do hipocótilo frente as sementes de alface e cebola. Esses resultados incentivam novos estudos com a espécie, no sentido de se isolar e identificar os compostos responsáveis por essas atividades para que, no futuro, possam ser usados como antioxidantes ou aleloquímicos de origem natural.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Universidade Federal de São João Del Rei (UFSJ) pelas bolsas concedidas. Ao Prof. Dr. Alexandre Salino pela identificação do material vegetal.

REFERÊNCIAS

- ANGELINI, L. G.; CARPANESE, G.; CIONI, P. G.; MORELLI, I.; MACCHIA, M.; FLAMINI, G. Essential oils from Mediterranean Lamiaceae as weed germination inhibitors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 21, p. 6158-6164, 2003.
- ASOLINI, F. C.; TEDESCO, A. M.; CARPES, S. T.; FERRAZ, C.; ALENCAR, S. M. Atividade antioxidante e antibacteriana dos compostos fenólicos dos extratos de plantas usadas como chás. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 9, n. 3, p. 209-215, 2006.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis**, 11. ed. Washington: Association of Official Analytical Chemistry, 1015 p., 1995.
- BURDA, S.; OLESZEK, W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 2774-2779, 2001.
- COLLINS, M. A.; CHARLES, H. P. Antimicrobial activity of carnosol and ursolic acid: two anti-oxidant constituents of *Rosmarinus officinalis* L. **Food Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 311-315, 1987.
- DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.
- FÉLIX-SILVA, J.; TOMAZ, I. M.; SILVA, M. G.; SANTOS, K. S. C. R.; SILVA-JÚNIOR, A. A.; CARVALHO, M. C. R. D.; SOARES, L. A. L.; FERNANDES-PEDROSA, M. J. Identificação botânica e química de espécies vegetais de uso popular no Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 3, p. 548-555, 2012.
- FINNEY, D. J. **Probit Analysis**, 3ª. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 333 p., 1980.
- FUKUMOTO, L. R.; MAZZA, G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3597-3604, 2000.
- GENENA, A. K.; HENSE, H.; SMÂNIA JUNIOR, A.; SOUZA, S. M. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) - a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 2, p. 463-469, 2008.
- HUANG, D.; OU, B.; PNOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 184-196, 2005.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos/SP: Rima, 531 p., 2000.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais do Brasil Nativas e Exóticas**, 2ª. edição. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda., 544 p., 2008.
- MALHEIROS, A.; PERES, M. T. L. P. Alelopatia: interações químicas entre espécies. In: Yunes, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001, p. 503-523.
- MARINOVA, E. M.; YANISHILIEVA, N. V. Antioxidant activity and mechanisms of action of some phenolic acids at ambient and high temperatures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 81, n. 2, p. 189-197, 2003.

RICE, E. L. **Allelopathy**, 2ª. edição. New York: Academic Press, 422 p., 1984.

RODRÍGUEZ-ROJO, S.; VISENTIN, A.; MAESTRI, D.; COCERO, M. J. Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. **Journal of Food Engineering**, v. 109, n. 1, p. 98-103, 2012.

SOUZA FILHO, A. P. S.; FONSECA, M. L.; ARRUDA, M. S. P. Substâncias químicas com atividades alelopáticas presentes nas folhas de *Parkia pendula* (Leguminosae). **Planta Daninha**, v. 23, n. 4, p. 565-573, 2005.

YAMAGUSHI, M. Q.; GUSMAN, G. S.; VESTENA, S. Allelopathic effect of aqueous extracts of *Eucalyptus globulus* Labill. and of *Casearia sylvestris* Sw. on crops. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 4, p. 1361-1374, 2011.

VIEIRA, H. S.; TAKAHASHI, J. A.; PIMENTA, L. P. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Effects of kaurane diterpene derivatives on germination and growth of *Lactuca sativa* seedlings. **Zeitschrift für Naturforschung C: A Journal of Biosciences**, v. 60, n. 1-2, p. 72-78, 2005.

ZAOUALI, Y.; CHOGRANI, H.; TRIMECH, R.; BOUSSAID, M. Changes in essential oil composition and phenolic fraction in *Rosmarinus officinalis* L. var. *typicus* Batt. organs during growth and incidence on the antioxidant activity. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 412-419, 2013.

Received 17 May 2013
Accepted 06 August 2013