

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROBIOLOGIA**

**CONTROLE DE QUALIDADE, ANÁLISE  
FITOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE  
*Bidens pilosa* LINNAEUS (ASTERACEAE)**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Daniele Damian dos Santos**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2015**

**CONTROLE DE QUALIDADE, ANÁLISE FITOQUÍMICA E  
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Bidens pilosa* LINNAEUS  
(ASTERACEAE)**

**Daniele Damian dos Santos**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, Linha de pesquisa Propagação, desenvolvimento e metabolismo vegetal *in vitro* e *ex vitro* da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Agrobiologia**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Melânia Palermo Manfron  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Juçara Teresinha Paranhos**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**CONTROLE DE QUALIDADE, ANÁLISE FITOQUÍMICA E ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA DE *Bidens pilosa* LINNAEUS (ASTERACEAE)**

elaborada por  
**Daniele Damian dos Santos**

como requisito parcial para obtenção de do grau de  
**Mestre em Agrobiologia**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Melânia Palermo Manfron, Dr<sup>a</sup> (UFSM)**  
(Presidente/Orientadora)

**Michel Mansur Machado, Dr (UNIPAMPA)**

**Hilda Hildebrand Soriani, Dr<sup>a</sup> (UFSM)**

Santa Maria, 13 de julho de 2015.

## AGRADECIMENTOS

- Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por me acompanhar e me conceder forças durante essa trajetória.
- A minha mãe Silvana por todo amor, carinho e apoio em todos os momentos, e por não medir esforços para me ajudar. E a meu pai Antonio, que mesmo distante tenho certeza que se orgulha do trajeto que percorri até chegar aqui. Amo vocês incondicionalmente!
- A meus irmãos Alan, Eduardo, Rozeara, Júlio e Rafael por todo carinho.
- A minha orientadora professora Melânia Palermo por acreditar em meu potencial como acadêmica e ser humano, e por todos os ensinamentos, paciência e contribuições durante esse período. Obrigada por essa oportunidade.
- A minha co-orientadora professora Juçara Paranhos pela determinação, disponibilidade e ajuda sempre que precisei.
- A professora Rosmari Hörner, membro de meu comitê de orientação, por toda atenção, disponibilidade e carinho.
- A amiga e colega Rafaela Dornelles por me acolher de braços abertos no laboratório e por tudo que me ensinou sempre com muito amor e boa vontade.
- A amiga-irmã Bruna Biassi por ter me ensinado e ajudado durante as análises estatísticas e pela amizade.
- As pessoas que me ajudaram e auxiliaram durante o desenvolvimento dos experimentos Tatiana Feyh, Danielly Silva, Simone Lucho, Aline Pereira, Ana Carla Decian, Gabriela Leal, Rachel Lima, Welinton Baldin, Ritiel da Cruz, Débora Nunes e Vera Pagliarin.
- Aos colegas de mestrado por dividirem comigo momentos de felicidade, mas também de nervosismo, hehehe!
- Aos colegas de laboratório pela amizade, convivência e as muitas risadas compartilhadas.
- Ao meu namorado Adriano Feltrin pelo incansável apoio, paciência e amor.
- Aos professores Michel Machado e Hilda Hildebrand por aceitarem fazer parte de minha banca de dissertação.

- A Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-graduação em Agrobiologia por me proporcionarem excelentes professores, que puderam contribuir significativamente em minha formação.
- A CAPES (Centro de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudos.
- A todos que de uma maneira ou outra fizeram parte dessa inesquecível trajetória. Foi uma honra poder dividir meus dias com todos vocês, o meu sincero MUITO OBRIGADA!

“Aprender não é um ato findo.  
Aprender é um exercício constante de renovação!”  
(Paulo Freire)

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia  
Universidade Federal de Santa Maria

### CONTROLE DE QUALIDADE, ANÁLISE FITOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Bidens pilosa* LINNAEUS (ASTERACEAE)

AUTORA: DANIELE DAMIAN DOS SANTOS

ORIENTADORA: MELÂNIA PALERMO MANFRON

Data e local da defesa: Santa Maria, 13 de julho de 2015.

A utilização dos recursos naturais como forma de tratamento e cura de doenças é um método antigo e ainda muito utilizado. O estudo teve por objetivo determinar a atividade antimicrobiana e os metabólitos secundários, a partir de plantas de *Bidens pilosa* L. obtidas em diferentes cultivos, bem como realizar o controle de qualidade físico-químico da droga vegetal. Estudando a germinação *in vitro* foram testados diferentes condições e períodos de armazenamento dos diásporos, e com a *ex vitro* diferentes preparos de substrato. Na micropropagação, foram utilizados segmentos apicais e nodais, e combinações de BAP e ANA. As condições e período de armazenamento dos diásporos influenciaram na germinação, com maior porcentagem de germinação quando mantidos a 25°C por 30 dias (60,4%), e por 120 dias a 10°C (75%). Com o cultivo em casa de vegetação não houve diferença na porcentagem de germinação entre os diferentes preparos de substrato (76% não autoclavado e 70% autoclavado). Na micropropagação, a ausência de fitorreguladores proporcionou a maior porcentagem de brotações (37,5% segmento apical e 10% segmento nodal). A partir das plantas obtidas dos diferentes cultivos, tradicional (CT), casa de vegetação (CV), germinação *in vitro* (GI) e micropropagação *in vitro* (MI), foram realizados extratos e frações, avaliando-se a atividade antimicrobiana. A melhor atividade antibacteriana foi obtida com a fração butanólica (CT), com *S. epidermidis* (CIM-16 µg/mL) e a melhor atividade antifúngica foi obtida com as frações hexânica (CV) e clorofórmica (CT) com *S. cerevisiae* (CIM-16 µg/mL). A análise por CLAE-DAD identificou ácido clorogênico, ácido caféico e rutina. Onde os maiores teores de ácido clorogênico foram com extrato e fração acetato de casa de vegetação (22,92 e 10,32 mg/g, respectivamente) e fração butanólica de cultivo tradicional (21,71 mg/g); os maiores teores de rutina encontradas foram com extrato, fração acetato e butanólica de cultivo tradicional (46,39; 229,81 e 23,16 mg/g, respectivamente). Os parâmetros de controle de qualidade estabelecido para o material vegetal, permite o uso de *B. pilosa* com qualidade e segurança. Os diferentes cultivos de *B. pilosa* proporcionaram uma variação na produção de metabólitos secundários, e aos compostos identificados pode ser atribuída a atividade antimicrobiana da espécie vegetal.

**Palavras-chave:** *Bidens pilosa*. Controle de qualidade. Atividade antimicrobiana. Metabólitos secundários.

## ABSTRACT

Mastership Dissertation  
Post- Graduation Program in Agrobiolology  
Federal University of Santa Maria

### QUALITY CONTROL, PHYTOCHEMICAL ANALYSIS AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *Bidens pilosa* LINNAEUS (ASTERACEAE)

AUTHOR: DANIELE DAMIAN DOS SANTOS

ADVISER: MELÂNIA PALERMO MANFRON

Date and location of defense: Santa Maria, july 13<sup>th</sup>, 2015.

The use of natural resources as a treatment and cure of diseases is an old and still widely used method. The study aims to determine the antimicrobial activity and secondary metabolites from plants *Bidens pilosa* L. obtained in different crops as well as perform the physical-chemical quality control of plant drug. Studying the *in vitro* germination were tested different conditions and diasporas storage periods, and the *ex vitro* different substrate preparation. In micropropagation, they were used apical segments and nodal, and combinations of BAP and NAA. The conditions and diasporas storage period influenced the germination, with the highest percentage of germination when kept at 25°C for 30 days (60.4%), and for 120 days at 10°C (75%). With cultivation in greenhouse there was no difference in the percentage of germination among different substrate preparation (76% and 70% not autoclaved autoclaved). In micropropagation, the absence of growth regulators gave the highest percentage of shoots (37.5% apical segment and 10% nodal segment). From the plants obtained from different crops, traditional (TC), greenhouse (GC), *in vitro* germination (IG) and micropropagation *in vitro* (IM), extracts and fractions were performed, evaluating the antimicrobial activity. The best antibacterial activity was obtained with the butanol fraction (TC), with *S. epidermidis* (MIC-16 µg/mL) and the best antifungal activity was obtained with hexane fraction (GC) and chloroform (TC) with *S. cerevisiae* (MIC-16 µg/mL). The analysis identified by HPLC-DAD chlorogenic acid, caffeic acid and rutin. Where the greatest chlorogenic acid contents were to extract and acetate fraction of the greenhouse (22.92 and 10.32 mg/g, respectively) and butanol fraction of traditional cultivation (21.71 mg/g); the highest rutin content were found to extract, acetate and butanol fraction of traditional farming (46.39, 229.81 and 23.16 mg/g, respectively). The quality control parameters established for the plant material, allows the use of *B. pilosa* with quality and safety. The different cultures of *B. pilosa* provided a variation in production of secondary metabolites and the identified compounds can be attributed to antimicrobial activity on plant species.

**Keywords:** *Bidens pilosa*. Quality control. Antimicrobial activity. Secondary metabolites.



## LISTA DE FIGURAS

### 2 REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 - Planta de *Bidens pilosa*. **a:** vista geral da espécie; **b:** flores reunidas em capítulos; **c:** folha serrilhada; **d:** frutos do tipo cipsela; **e:** nós levemente pilosos.....19

### 3 MANUSCRITOS

#### 3.1 Manuscrito I

Figura 1 - Porcentagem de germinação das sementes de *Bidens pilosa* L. em diásporos (fruto aderido à semente) mantidos em duas condições de armazenamento, refrigerador a 10°C e em temperatura ambiente a 25°C. Foram utilizadas cinco repetições de 100 sementes por tratamento e o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado. \*As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).....45

Figura 2 - Índice de velocidade de germinação das sementes de *Bidens pilosa* L. em função de diferentes condições de armazenamento dos diásporos (fruto aderido à semente), 10°C e 25°C. Foram utilizadas cinco repetições de 100 sementes por tratamento e o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado. ....46

Figura 3 - Porcentagem de germinação das sementes de *Bidens pilosa* L. em diásporos mantidos a 10°C em dois períodos de armazenamento, 30 dias e 120 dias. Foram utilizadas cinco repetições de 100 sementes por tratamento e o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado. \*As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).....47

Figura 4 - Índice de velocidade de germinação das sementes de *Bidens pilosa* em função de diferentes períodos de armazenamento das sementes, 30 dias e 120 dias. Foram utilizadas cinco repetições de 100 sementes por tratamento e o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado.....48

Figura 5 - Porcentagem de germinação das sementes de *Bidens pilosa* L. em duas condições de preparo do substrato, não autoclavado e autoclavado. Foram utilizadas cinco repetições de 90 sementes por tratamento e o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado. \*As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). ....50

Figura 6 - Índice de velocidade de germinação das sementes de *Bidens pilosa* em função de diferentes preparos do substrato, não autoclavado e autoclavado. Foram

utilizadas cinco repetições de 90 sementes por tratamento e o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado.....51

Figura 7 - Respostas obtidas *in vitro* de *Bidens pilosa* cultivadas em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) completo, testando-se três combinações de fitorreguladores. **A:** Porcentagem de brotações aéreas, **B:** Porcentagem de explantes oxidados, **C:** Porcentagem de contaminação. \*As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), seguidas de letras minúsculas para comparação entre doses de fitorreguladores dentro do mesmo segmento e letras maiúsculas para comparação entre segmentos na mesma dose.....52

### 3.2 Manuscrito II

**FIGURE 1** - Chromatographic profile obtained by HPLC-DAD, where it is possible to observe the presence of chlorogenic acid (A) and rutin (B), obtained from the crude extract and butanol fraction of plants grown in a greenhouse, respectively.....71

## LISTA DE TABELAS

### 3 MANUSCRITOS

#### 3.1 Manuscrito I

Daniele/mestrado AGROBIOLOGIA!!/Dissertação/dissertação de mestrado final.doc - \_Toc423337212  
Tabela 1 - Teor de flavonoides, polifenóis e taninos nos extratos bruto e frações obtidas através de diferentes cultivos, bem como as concentrações testadas. Cultivo tradicional (CT), cultivo em casa de vegetação (CV), concentração da amostra (CONC.), desvio padrão (DP).....54

#### 3.2 Manuscrito II

**TABLE I** - Yield of the crude extract.....66

**TABLE II** - Yield of fractions.....66

**TABLE III** - Quality control parameters: Foreign matter (FM), swelling index (SI), water in vegetable drug (W), total ashes (TA), acid insoluble ash (AA) and sulphated ash (SA) .....66

**TABLE IV** - Antibacterial activity: Traditional cultivation (TC), cultivation in greenhouse (GC) and *in vitro* germination (IG) .....68

**TABLE V** - Antifungal activity: Traditional cultivation (TC), cultivation in greenhouse (GC) and *in vitro* germination (IG). .....70

**TABLE VI** - Concentrations of chlorogenic acid and rutin obtained from the extracts and fractions: Traditional cultivation (TC), Cultivation in greenhouse (GC), *in vitro* germination (IG), *in vitro* micropropagation (IM), not detected (nd), standard deviation (SD).....72

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A - Água em drogas vegetais  
AIA – Ácido indolacético  
AIB - Ácido indolbutírico  
ANA – Ácido 1-naftalenoacético  
ANOVA – Análise de Variância  
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
ATCC - American Type Culture Collection  
atm – Atmosfera  
BAP – 6-benzilaminopurina  
BD – Batata dextrose  
CA - Cinzas insolúveis em ácido  
CIM – Concentração Inibitória Mínima  
CLSI - Clinical and Laboratory Standards  
CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono  
CONC. – Concentração  
CS - Cinzas sulfatadas  
CT - Cinzas totais  
CT – Cultivo tradicional  
CV – Casa de vegetação  
d.a.i – Dias após inoculação  
DAD - Detector Diode Array  
DNA - Ácido desoxirribonucleico  
DP – Desvio padrão  
GI – Germinação in vitro  
h - Horas  
i.p. - Intraperitoneal

IC50 - Inhibitory Concentration 50%

II - Índice de intumescência

IVG – Índice de velocidade de germinação

KIN - Cinetina

ME - Matéria estranha

MeOH – Metanol

MI – Micropropagação *in vitro*

MS - Muraschige e Skoog

nd – Não detectado

NE - Norepinefrina

O<sub>2</sub> - Oxigênio

OMS – Organização Mundial da Saúde

pH - Potencial hidrogeniônico

ppm – Parte por milhão

PVC – Policloreto de vinila

R.F.A. – Radiação fotossinteticamente ativa

RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde

SMDB - Santa Maria Departamento da Biologia

spp. - Espécies

SUS – Sistema Único de Saúde

TDZ - Thidiazuron

TSA – Trypticase soy agar

UFC – Unidade formadora de colônia

UV – Ultravioleta

vi – Volume inicial

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	15
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
<b>2.1 Família Asteraceae e gênero <i>Bidens</i></b> .....	17
<b>2.2 <i>Bidens pilosa</i> L.</b> .....	18
<b>2.3 Usos populares e atividades biológicas</b> .....	20
<b>2.4 Controle de qualidade e legislação</b> .....	22
<b>2.5 Metabólitos secundários</b> .....	24
2.5.1 Poliacetilenos .....	25
2.5.2 Flavonoides .....	26
2.5.3 Outros compostos .....	27
<b>2.6 Atividade antimicrobiana</b> .....	27
<b>2.7 Propagação</b> .....	30
2.7.1 Propagação Sexuada.....	30
2.7.2 Propagação Vegetativa .....	32
<b>3 MANUSCRITOS</b> .....	35
<b>3.1 Manuscrito I</b> .....	35
<b>3.2 Manuscrito II</b> .....	35
<b>Propagação de <i>Bidens pilosa</i> e dosagem de flavonoides, polifenóis e taninos</b> .....	36
RESUMO.....	36
INTRODUÇÃO .....	37
MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	56

<b>Antimicrobial activity, quality control and phytochemical analysis by HPLC-DAD of <i>Bidens pilosa</i> Linnaeus</b> .....	60
ABSTRACT .....	60
INTRODUCTION.....	61
MATERIALS AND METHODS.....	63
RESULTS AND DISCUSSION .....	65
CONCLUSION .....	74
REFERENCES.....	74
<b>4 DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>80</b>
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>83</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>84</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O uso de plantas medicinais no tratamento de enfermidades é conhecido desde a antiguidade, onde as sociedades acumulavam informações e experiências sobre o ambiente que as cercavam, para com ele interagir e prover suas necessidades de sobrevivência. Dentre tantas práticas difundidas pela cultura popular, as plantas têm uma importância fundamental, em função de suas potencialidades terapêuticas aplicadas ao longo das gerações (DUARTE, 2006; RANGEL; BRAGANÇA, 2009).

As plantas têm sido avaliadas como fonte de produtos naturais para conservar a saúde humana, especialmente nas últimas décadas, com intensivos estudos sobre a terapia natural. O uso de componentes das plantas na área farmacêutica vem gradualmente aumentando no Brasil. De acordo com Organização Mundial de Saúde (OMS), plantas medicinais deveriam ser a melhor fonte para obtenção de uma variedade de drogas (BERTINI et al., 2005).

Muitos fatores contribuem para o aumento da utilização das plantas como recurso medicinal, entre eles, o alto custo dos medicamentos sintéticos, o difícil acesso da população à assistência médica, bem como a tendência ao uso de produtos de origem natural. O uso das plantas medicinais pode ser favorável à saúde humana, desde que se tenha conhecimento prévio de sua finalidade, riscos e benefícios (ISERHARD et al., 2009).

A validação da utilização das plantas medicinais depende de uma investigação sistemática realizada sob aspectos químicos, farmacológicos e microbiológicos, que somados poderão resultar no medicamento fitoterápico (NIERO et al., 2003).

No setor farmacêutico, as drogas vegetais são muito utilizadas por profissionais da saúde e por órgãos governamentais como um recurso terapêutico nos serviços de saúde (BRASIL, 2001). Para serem utilizados, os compostos provenientes de vegetais devem ser padronizados, com a caracterização qualitativa e quantitativa de seus princípios ativos, fornecendo os requisitos de qualidade, efetividade e segurança exigidos em uma preparação farmacêutica (BRASIL, 2004).



Os metabólitos secundários são fontes promissoras de novas moléculas para o desenvolvimento de novos fármacos, em função de suas diversas atividades farmacológicas, havendo um interesse crescente nessas substâncias por profissionais nas áreas alimentar, agrônômica, cosmética e farmacêutica. Metabólitos secundários como os flavonoides apresentam interesse econômico devido a suas diferentes propriedades, como antimicrobiano, antiviral, antiulcerogênico, antineoplásico, citotóxico, antioxidante, anti-hipertensivo, hipolipidêmico e anti-inflamatório (MACHADO et al., 2008).

Produtos ou substâncias vegetais com propriedades antimicrobianas ganharam interesse especial devido à resistência a antibióticos que alguns microrganismos têm adquirido (ESSAWI; SROUR, 2000). O uso de antimicrobianos necessita de critérios rigorosos em função dos efeitos colaterais produzidos pela grande maioria desses compostos. A pesquisa com extratos, frações e óleos essenciais oriundos de espécies vegetais visa uma possível aplicação racional de princípios ativos no tratamento de infecções causadas por fungos, bactérias, parasitas e vírus (ARAÚJO et al., 2004).

A Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), estabelecida pelo Ministério da Saúde em 2009, apresenta uma lista de 71 plantas que são amplamente utilizadas pela população brasileira e apresentam potencial para avançar nas etapas da cadeia produtiva e gerar produtos de interesse ao SUS. A espécie *Bidens pilosa* é uma das plantas de interesse ao RENISUS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Nas últimas décadas, extensas investigações têm mostrado que *B. pilosa* possui compostos com atividade anti-inflamatória (PEREIRA et al., 1999), antiúlcera (TAN et al., 2000), antimalárica (OLIVEIRA et al., 2004), antioxidante (CHIANG et al., 2004), imunodilatadora (CHIANG et al., 2006), relaxante muscular (THÉOPHILE et al., 2006), anti-hiperglicêmica (HSU et al., 2008; CHIEN et al., 2009), antitumoral (KVICINSKI et al., 2008) e antimicrobiana (DEBA et al., 2008).

As condições ambientais alteram a produção e concentração das substâncias ou metabólitos secundários nas plantas, como a temperatura, sazonalidade, disponibilidade de água, radiação ultravioleta, nutrientes do solo, altitude, composição atmosférica e fase de desenvolvimento das plantas. Sendo assim, uma mesma espécie provinda de diferentes populações ou sistemas de cultivo, pode

apresentar diferenças na síntese e acúmulo dessas substâncias (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

O estudo teve como objetivo determinar a atividade antimicrobiana e os metabólitos secundários, a partir de plantas de *Bidens pilosa* L. obtidas em diferentes cultivos, bem como realizar o controle de qualidade físico-químico da droga vegetal.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Família Asteraceae e gênero *Bidens*

A família Asteraceae apresenta uma distribuição cosmopolita e está presente em todos os continentes, podendo ser encontrada principalmente nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas, com exceção da Antártida (ANDERBERG et al., 2007). Constitui a maior família em número de espécies, possuindo em torno de 25.000, reunidas em 1.500 gêneros, ocorrendo no Brasil 2.000 espécies e 250 gêneros (SOUZA; LORENZI, 2012).

Está representada por ervas anuais e perenes, lianas, subarbustos, arbustos e árvores (MONDIN, 2006), sendo que um dos fatores que garantem seu sucesso biológico é a elevada capacidade de dispersão, em função da presença de frutos com *pappus*, considerado estruturas de aderência (VENABLE; LEVIN, 1983).

Possui o maior número de espécies que apresentam sementes com heteromorfismo (63%), sendo comum ocorrer diferenças entre frutos localizados na periferia e no centro da inflorescência denominada capítulo, em relação ao tamanho, massa e estrutura de dispersão. É considerada modelo biológico adequado para avaliar a evolução das taxas de dispersão ou estratégias de germinação (IMBERT, 2002).

É a família de maior importância entre as fanerógamas devido ao grande número de espécies, representando dez por cento do total da flora de angiospermas (WILSON, 1986). A maioria das espécies têm hábito herbáceo, com poucas espécies arbóreas e aquáticas, porém apresenta grande diversidade, não apenas

quanto ao hábitat e forma de vida, mas principalmente pelos métodos de polinização e de dispersão das sementes (CRONQUIST, 1981).

As espécies apresentam importância econômica, tendo destaque o predomínio de plantas medicinais, ornamentais, produtos alimentícios e cosméticos, as quais vêm sendo estudadas nos últimos 25 anos em aspectos da sua morfologia, ecologia, anatomia e ontogenia, como também nas áreas de fisiologia, fitoquímica, citogenética e molecular (CRONQUIST, 1988; BREMER, 1994).

O gênero *Bidens* é composto por cerca de 240 espécies e pertence a tribo Heliantheae, conhecida também como a tribo do girassol (JULIO; OLIVEIRA, 2009). Em todo o mundo, as espécies do gênero têm sido usadas para tratar diferentes doenças, destacando-se no Brasil a espécie *Bidens pilosa* (OLIVEIRA; CASARI, 1999).

## **2.2 *Bidens pilosa* L.**

*Bidens pilosa* é conhecida popularmente por picão-preto, amor-seco, carrapicho, carrapicho-de-agulha, carrapicho-de-duas-pontas, carrapicho-picão, coambi, cuambri, cuambu, erva-picão, fura-capá, guambu, macela-do-campo, picão, picão-amarelo, picão-das-horas, picão-do-capo, pico-pico, entre outros (LORENZI, 2002). Acredita-se que a planta tenha se originado na América do Sul de onde se espalhou para o resto do mundo (SILVA et al., 2011; BARTOLOME; VILLASEÑOR; YANG, 2013). No Brasil está presente em quase todos os territórios, com maior concentração nas áreas agrícolas da região Sul, Sudeste e Centro-Oeste, sendo considerado uma planta invasora tanto de culturas anuais como perenes, onde a cultura mais afetada é a da soja, causando um decréscimo de até 30% em sua produtividade (KISSMAN; GROTH, 1999; LORENZI; MATOS, 2008).

A denominação *Bidens pilosa* é originária do latim, onde *Bidens* significa dois dentes, referindo-se às duas projeções do fruto (cerdas), e “pilosa”, devido à presença de pêlos nas brácteas (BALLARD, 1986). A espécie caracteriza-se como planta herbácea, ereta, anual, com altura de 50-130 cm e ramificada desde a base (Figura 1a), as flores são pequenas reunidas em capítulos (Figura 1b), folhas

simples, pinatissectas, opostas e bordas serrilhadas (Figura 1c). Os frutos são do tipo cipselas alongadas (aquênios originados de ovário ínfero), de cor preta com duas a três aristas aderentes numa das extremidades (Figura 1d) e caule com nós levemente pilosos (Figura 1e). Uma planta pode produzir até 3000 sementes no ciclo e, após a maturação, a maioria germina em três a quatro dias. A multiplicação ocorre naturalmente por sementes (KISSMANN; GROTH, 1999; LORENZI, 2002; MORAES, 2006; SOUZA; LORENZI, 2012).



Figura 1 - Planta de *Bidens pilosa*. **a**: vista geral da espécie; **b**: flores reunidas em capítulos; **c**: folha serrilhada; **d**: frutos do tipo cipsela; **e**: nós levemente pilosos.

Fonte: <https://sites.google.com/site/biodiversidadecatarinense/plantae/magnoliophyta/asteraceae/bidens-pilosa>

### 2.3 Usos populares e atividades biológicas

*B. pilosa* tem uma longa história de uso medicinal entre os povos indígenas e praticamente todas as partes da planta são usadas em preparações. Normalmente a planta é preparada em decocção ou infusões para uso interno, e/ou esmagadas em pasta ou cataplasma para uso externo (TAYLOR, 2004).

As folhas, flores e raízes dessa espécie são referidas na literatura para tratamento de diversas moléstias (ALICE et al., 1995). A decocção das raízes é usada para hepatite alcoólica e como vermífuga. As folhas esmagadas misturadas com água para tratar dor de cabeça; também podem ser enroladas e aplicadas para dor de dente; secas e moídas misturadas com azeite como cataplasmas em ferimentos e lacerações. A infusão das flores é usada na dor de estômago por intoxicação alimentar. A decocção da planta inteira misturada com suco de limão é usada para tratar angina, hepatite, dor de garganta e retenção de água (TAYLOR, 2004).

Estudos sobre a atividade antimalárica desta espécie demonstraram que o extrato bruto etanólico (80%) das raízes é ativo frente ao *Plasmodium falciparum*, observado por testes realizados *in vivo* com o extrato na concentração de 250 mg kg<sup>-1</sup>, onde houve redução da parasitemia no quinto dia (36%), e no sétimo dia (29%), sendo atribuída esta atividade aos compostos poliacetilenos e flavonoides (OLIVEIRA et al., 2004).

A atividade anti-hiperglicêmica de *Bidens pilosa* L. var. *radiata* (BPR), *B. pilosa* L. var. *pilosa* (BPP) e *B. pilosa* L. var. *minor* (BPM), foi avaliada com o uso do extrato bruto metanólico, buscando reduzir os níveis de glicose no sangue em ratos diabéticos (através de uma dose única). O extrato da *B. pilosa* L. var. *radiata* proporcionou um maior aumento de insulina no soro e uma maior diminuição nos níveis de glicose no sangue, do que os extratos das outras variedades (CHIEN et al., 2009). A atividade anti-hiperglicêmica da espécie foi também observada em ratos com o extrato aquoso na dose 50 mg kg<sup>-1</sup>, havendo diminuição dos níveis de glicose com aumento dos níveis séricos de insulina sugerindo que o extrato aquoso da *B. pilosa* estimula a secreção de insulina via pâncreas (HSU et al., 2008).

O potencial antitumoral das frações (clorofórmica, acetato de etila e metanólica) de *B. pilosa* foi avaliado nas doses 150 mg kg<sup>-1</sup> e 300 mg kg<sup>-1</sup> via i.p. por

nove dias em ratos, demonstrando que as frações clorofórmica e acetato reduziram significativamente o peso corporal do tumor, circunferência abdominal e o volume tumoral, quando comparado com o grupo controle. A fração clorofórmica, exibiu valores IC50 entre quatro e nove vezes mais baixa do que outras frações e a fração metanólica considerada inativa (KVIECINSKI et al., 2008).

O efeito imunossupressor e anti-inflamatório de *B. pilosa* foi testado com o extrato metanólico e o composto poliacetileno isolado. Tanto o extrato, quanto o poliacetileno, suprimiu a proliferação de linfócitos humanos. O poliacetileno foi 10 vezes mais potente na inibição da proliferação dos linfócitos do que o extrato metanólico, com valores de IC50 em torno de 1,5 mg mL<sup>-1</sup> (PEREIRA et al., 1999).

A atividade antiúlcera dos extratos metanólico, ciclohexânico e diclorometano de *B. pilosa* foi avaliada em ratos em diferentes modelos de úlcera gástrica. O extrato metanólico produziu uma inibição dose-dependente de úlcera gástrica que varia de 30,4% na dose de 500 mg kg<sup>-1</sup> para 82,2% na dose de 1000 mg kg<sup>-1</sup>. Para o extrato ciclohexânico a inibição da formação da lesão foi de 13,3, 40,0 e 79,7% para doses de 500, 750 e 1000 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. O extrato diclorometano produziu inibição de 46,4% na dose de 500 mg kg<sup>-1</sup> e quando a dose de 750 mg kg<sup>-1</sup> foi administrada ocorreu 100% de inibição na formação da lesão. O teste mostrou que o extrato diclorometano da espécie é um protetor mais potente da mucosa gástrica em comparação com os demais extratos. (TAN et al., 2000).

A ação imunomoduladora do extrato metanólico da *B. pilosa* avaliada frente ao composto químico citopiloine, um poliacetileno glicosídeo apresentou um resultado promissor frente às células T auxiliares, sugerindo que o efeito modulador das células T auxiliares pode ajudar na prevenção de doenças como a diabetes (CHIANG et al., 2006).

Théophile et al. (2006) analisaram as propriedades do extrato metanólico das folhas de *B. pilosa* sob o efeito relaxante muscular. Foram identificados 12,3% dos compostos fenólicos presentes no extrato com um elevado nível de ácido elágico, ácido caféico, ácido caftárico, galato e epicatequina, rutina, resveratrol e astilbina. O extrato causou o relaxamento tônico, mas não conseguiu inibir o componente básico da contração induzida pela norepinefrina (NE) em aorta de ratos. A atividade vaso relaxante do extrato da planta é provavelmente devido aos seus compostos fenólicos e estilbenos.

## 2.4 Controle de qualidade e legislação

Os critérios de qualidade para insumos farmacêuticos de origem vegetal são de suma importância para garantir a manutenção da eficácia e segurança do produto final, especialmente devido à complexidade de composição destas matérias-primas (SONAGLIO et al., 2003).

Muitas das preparações que utilizam plantas medicinais ainda necessitam de estudos científicos mais detalhados, incluindo padronização química, testes biológicos *in vitro*, *in vivo* em modelos animais, e avaliação clínica. Para a etapa de avaliação clínica, o controle de qualidade passa a ser uma prática totalmente indispensável. Métodos de controle de qualidade de algumas plantas medicinais já validados estão presentes em monografias encontradas, na Farmacopeia dos Estados Unidos, Farmacopeia Chinesa, monografias da OMS, Farmacopeia Japonesa e Farmacopeia Brasileira, que por sua vez, inclui 44 monografias de plantas medicinais (ONG, 2004; BRANDÃO et al., 2006). A quarta edição da Farmacopeia Brasileira (1988) e outras literaturas não oficiais, como o livro organizado por Simões et al. (2004), contêm parâmetros semelhantes aos da OMS para verificação da identidade e controle de qualidade de drogas vegetais.

Em 1998, a Organização Mundial da Saúde reuniu procedimentos no documento *Quality control methods for medicinal plant materials*, que podem ser tomados como base para auxiliar as nações, a partir de sua legislação, formar padrões de controle de qualidade de drogas vegetais e produtos (WHO, 1998). Em 2005, houve revisão do guia com adequação para a detecção e quantificação de alguns contaminantes e resíduos em plantas medicinais (WHO, 2005).

Em 2004, no Brasil, foi aprovada a Resolução nº 90, que dispõe da realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. O guia tem por objetivo indicar métodos padronizados para os estudos de toxicologia pré-clínica de acordo com a Resolução vigente para registro e renovação de registro de fitoterápicos, sendo que os estudos devem ser conduzidos com amostras padronizadas do medicamento fitoterápico ou do derivado vegetal a partir do qual é produzido (ANVISA 2004).

O Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006, sobre a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, tem como algumas de suas diretrizes garantir e

promover a segurança, a eficácia e a qualidade no acesso à plantas medicinais e fitoterápicos, promover e reconhecer as práticas populares de uso de plantas medicinais e remédios caseiros e promover a adoção de boas práticas de cultivo e manipulação de plantas medicinais e de manipulação e produção de fitoterápicos, a partir de uma legislação específica.

No Brasil, em 2014, foi aprovada a Resolução nº 26, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e, entre outros pontos, abrange as etapas de controle de qualidade da droga vegetal, do produto acabado e da importação de produtos fitoterápicos (ANVISA, 2014).

A Farmacopeia Brasileira (2010) estabelece limites para a presença de impurezas nas drogas vegetais, como órgãos da própria planta, fragmentos de outras plantas, materiais de outra origem como areia ou terra os quais não fazem parte do farmacógeno, ainda presença de fungos, insetos e outros materiais contaminantes, já que determinadas impurezas podem ser provenientes da própria planta. De maneira geral, o percentual máximo aceitável de elementos estranhos é 2%, porém existem algumas exceções como *Melissa officinalis* em que a Farmacopeia Brasileira (2010) admite para seus caules e flores até 10% de material estranho.

A mucilagem é composta por derivados de carboidratos que provavelmente representam produtos de decomposição de celulose (PRATT, YOUNGKEN, 1951). Drogas contendo mucilagens são analisadas através da determinação do índice de intumescimento que corresponde ao aumento do volume de 1 g da amostra, em contato com um volume pré-estabelecido de água por três horas. Frasson et al. (2003) em seu estudo com *Caesalpinia leiostachya* (Fabaceae) encontrou o índice de intumescimento de 1,5 mL, sendo que quantidade de mucilagens está diretamente relacionada com a capacidade de reter água.

O excesso de umidade em matérias-primas vegetais permite a ação de enzimas, podendo acarretar a degradação de constituintes químicos, além de possibilitar o desenvolvimento de fungos e bactérias (FARIAS, 2004). O teor de água das folhas de *Mikania glomerata* (guaco) avaliado através do método gravimétrico apresentou 9,55; 11,11 e 12,71% nas três amostras analisadas (ALVARENGA et al., 2009). Na espécie *Operculina macrocarpa* o teor de água foi de 8,09%. (MICHELIN et al., 2010). A Farmacopeia Brasileira de 2010 estabelece uma variação entre 8 e 14%, com exceções especificadas nas monografias.



A determinação do teor de cinzas totais permite verificar as impurezas inorgânicas não-voláteis que podem estar presentes como contaminantes (WHO, 1998). Barni et al. (2009) em um estudo com as folhas de *Ipomoea pes-caprae* encontraram o teor de 12,51% de cinzas totais. Outro estudo analisou sazonalmente o conteúdo de cinzas totais de *Morus alba* e foi obtido 20,48; 9,57; 11,88 e 17,86% no outono, inverno, primavera e verão, respectivamente (PEREIRA et al., 2011).

Na determinação de cinzas insolúveis em ácido, o ácido clorídrico consome as cinzas fisiológicas expressando o conteúdo em sílica e derivados silícicos, podendo ser decorrentes de contaminação com areia, terra e pedras (MARQUES, 1996). Michelin et al. (2010) com a espécie *Operculina macrocarpa* encontraram o teor de 0,98% de cinzas insolúveis em ácido, estando de acordo com o preconizado pela ANVISA (1998) que é de no máximo 1,5%.

Cinzas sulfatadas são representadas pelo resíduo não volatilizado após calcinação com ácido sulfúrico concentrado. Os metais presentes na droga se convertem em sulfatos e como estes são mais resistentes ao calor, permitem obter resultados mais precisos do que os obtidos somente com calcinação (SHARAPIN, 2001).

Para *Pithecoctenium echinatum* foram obtidos 7,15; 7,10 e 7,57% nas três análises realizadas quanto ao teor de cinzas sulfatadas (CASOTI, 2012), enquanto que nas folhas, flores e planta inteira de *Ipomoea pes-caprae* foram obtidos 12,60; 6,85 e 8,48%, respectivamente (BARNI et al., 2009).

## **2.5 Metabólitos secundários**

Os metabólitos primários, por definição, são macromoléculas que se encontram em todas as células vegetais e são necessários para a vida da planta como os açúcares, aminoácidos, proteínas e os ácidos nucleicos, responsáveis pela sobrevivência do vegetal e participam dos processos de fotossíntese, respiração e assimilação dos nutrientes. Os metabólitos secundários ou micromoléculas são importantes para a sobrevivência e a perpetuação das plantas em seu ecossistema, embora não necessariamente essenciais para o organismo produtor, sendo

compostos fenólicos, terpenoides, óleos essenciais e alcaloides, entre outros. São esses compostos os responsáveis pelos efeitos medicinais ou tóxicos das plantas, estando intimamente associados à estratégia de defesa dos vegetais (SIMÕES et al., 2010).

Segundo Gobbo-Neto e Lopes (2007) existem condições ambientais que alteram a produção e concentração dos metabólitos secundários, como a temperatura, sazonalidade, disponibilidade de água, radiação ultravioleta, nutrientes do solo, altitude, composição atmosférica e fase de desenvolvimento das plantas. Sendo assim, uma mesma espécie provinda de diferentes populações ou sistemas de cultivo, pode apresentar diferenças na síntese e acúmulo dessas substâncias.

O gênero *Bidens* é marcante no que se refere à metabólitos especiais como poliacetilenos e flavonoides, presentes em extratos e frações da espécie *Bidens pilosa* com a qual foi demonstrada atividade contra malária (OLIVEIRA et al., 2004), em menor proporção, estão presentes os terpenoides e os fenilpropanoides.

### 2.5.1 Poliacetilenos

Os poliacetilenos compreendem uma classe relativamente rara de derivados acetilênicos de cadeia longa, geralmente composta por vinte a trinta átomos de carbono, tanto pares como ímpares. Mais de 1000 poliacetilenos são conhecidos como produtos de plantas, somente alguns são derivados de hidrocarbonetos de cadeia simples. A maioria possui grupos funcionais adicionais que podem ser álcoois, cetonas, ácidos, ésteres, aromáticos ou furanos (HARBORNE, 1998; SIMÕES et al., 2010).

Há interesse taxonômico sobre os poliacetilenos devido ao seu padrão de distribuição nas famílias de plantas superiores, uma vez que eles só ocorrem regularmente em cinco famílias de organismos vivos. Alguns são tóxicos e têm sido considerados fitoalexinas, tóxicos para microrganismos que atacam as plantas que apresentam estes compostos em sua constituição (HARBORNE, 1998).

Os poliacetilenos são hidrocarbonetos relativamente instáveis, pois absorvem fortemente luz ultravioleta e sua atividade é alterada com a exposição à luz (WAT et

al., 1980). Os poliacetilenos podem possuir funcionalidade relacionada à presença de triplas ligações carbono-carbono em suas moléculas, o que é intrigante por sua ampla variedade de atividades biológicas (HARBORNE, 1998).

*Bidens pilosa* possui variedades químicas em que os poliacetilenos preponderantes variam, às vezes, com um anel benzênico como 7-fenilhepta-2,4,6-triino e derivados dele, portanto uma hidroxila, glicolisada ou não, ou com uma das ligações triplas reduzida a dupla trans. Outras variedades são inteiramente alifáticas; a maioria conservando o total de 13 átomos de carbono em cadeia sendo encontrados em todas as partes da planta (LUCCHETTI et al., 2009; SILVA et al., 2011; BARTOLOME; VILLASEÑOR; YANG, 2013).

### 2.5.2 Flavonoides

Os flavonoides, biossintetizados a partir da via dos fenilpropanoides, constituem uma importante classe de polifenóis, presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários dos vegetais. Uma substância fenólica ou polifenólica é aquela que possui um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilados e/ou seus derivados funcionais, ésteres, éteres, glicosídeos e outros (SIMÕES et al., 2007).

Os flavonoides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural, sendo uma classe de compostos amplamente distribuída no reino vegetal. A maioria dos representantes dessa classe possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre eles (SIMÕES et al., 2007).

Diversas funções são atribuídas a estes compostos nas plantas, dentre elas a proteção dos vegetais contra a incidência de raios ultravioleta e visível, além de proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias, atração de animais com função de polinização, antioxidantes, controle da ação de hormônios vegetais, agentes alelopáticos e inibidores de enzimas (HARBORNE, 1989; HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

O interesse econômico desses compostos é decorrente de suas propriedades sendo usado como pigmentos, por conferir cor e valor nutricional para alguns alimentos, no processo de tanagem do couro, na fermentação do chá-da-índia, na manufatura do cacau, e pela importância farmacológica, como antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante e antiviral (SIMÕES et al., 2007).

Em *Bidens pilosa* foram identificados os flavonoides chalconas e auronas (LUCCHETTI et al., 2009). As chalconas e auronas normalmente, são pentahidroxiladas em posições 2,3,4,3', 4', as vezes glicolisadas em posições 3 e 4 (SILVA et al., 2011; BARTOLOME; VILLASEÑOR; YANG, 2013;).

### 2.5.3 Outros compostos

Análises fitoquímicas realizadas com diferentes plantas têm demonstrado a presença de substâncias fenólicas, taninos, flavonoides, antraquinonas, cumarinas, saponinas, heterosídeos cardiotônicos e alcaloides, sendo que estes metabólitos apresentam diversas atividades sobre organismos vivos. Na espécie *Bidens pilosa* através das análises farmacognósticas encontrou-se resultados positivos para estas classes de compostos, exceto para antraquinonas (BORGES, 2009).

## 2.6 Atividade antimicrobiana

A pesquisa de novos agentes antimicrobianos se faz necessária devido ao surgimento de microrganismos resistentes, impulsionando pesquisas para busca de novas moléculas obtidas a partir de plantas (PENNA et al., 2001). A descoberta da atividade farmacológica de novos agentes é de extrema importância, principalmente em um país como o Brasil que apresenta uma imensa biodiversidade. Desta forma, tais pesquisas podem contribuir significativamente no desenvolvimento na área da saúde em nível mundial, encontrando novas substâncias eficazes no combate de microrganismos patogênicos resistentes e menos tóxicas para o homem (MICHELIN

et al., 2005; LEITÃO et al., 2006; LIMA et al., 2006; BARBOSA-FILHO et al., 2007; SAÚDE-GUIMARÃES; FARIA, 2007).

As propriedades antimicrobianas de substâncias presentes em extratos, frações e óleos essenciais produzidos pelas plantas como uma consequência do metabolismo secundário, são reconhecidas empiricamente há séculos e foram comprovadas cientificamente apenas recentemente (JANSEN et al., 1987). Estudos sobre as atividades antimicrobianas de plantas nativas têm sido relatados em muitos países como Brasil, Cuba, Índia, México e Jordânia, que possuem uma flora diversificada e tradição na utilização de plantas medicinais para uso como antibacteriano ou antifúngico (MARTÍNEZ et al., 1996; NAVARRO et al., 1996; MAHASNEH et al., 1999; AHMAD; BEG, 2001; DUARTE et al., 2005).

Existem vários métodos para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos vegetais. Os mais conhecidos incluem método de difusão em ágar, método de macrodiluição e microdiluição em caldo.

O teste de difusão em ágar, também chamado de difusão em placas foi idealizado por Bauer et al. (1966). O princípio desse método baseia-se na difusão, através do ágar, de um antimicrobiano impregnado normalmente em um disco de papel-filtro. A difusão do antimicrobiano leva à formação de um halo de inibição do crescimento bacteriano, sendo considerado um método qualitativo, ou seja, permite classificar a amostra bacteriana em suscetível, intermediária ou resistente ao antimicrobiano (NCCLS, 2000). As técnicas de aplicação da substância antimicrobiana no método de difusão são por meio de disco, cilindros de aço inoxidável ou vidro e perfuração em ágar (PINTO et al., 2003).

O método de diluição em caldo determina a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de um agente antimicrobiano capaz de inibir o crescimento de um microrganismo, fornecendo assim resultados quantitativos.

A macrodiluição envolve testes em tubos de ensaio, com volume de meio de cultura variando de 1 e 10 mL. Por ser laborioso, consumir muito tempo, requerer muito espaço no laboratório e gerar grande quantidade de resíduos é usado pequeno número de repetições (SAHM; WASHINGTON, 1991; ZGODA; PORTER, 2001).

A microdiluição utiliza microplacas com 96 poços, com volume de meio de cultura entre 0,1 e 0,2 mL, onde através de diluições sucessivas do antimicrobiano a ser testado, em meios de cultura sólida ou líquida, semeia-se o microrganismo e

após a incubação é realizada a leitura das placas (CLSI, 2002; 2003; OSTROSKY et al., 2008). As vantagens desse método são proporcionar informações quantitativas, utilizar uma pequena quantidade de amostra e pode ser aplicado a uma variedade mais ampla de microrganismos (KONEMAN et al., 2001).

Para interpretação dos resultados pode ser usada a classificação descrita por Cos et al. (2006), que descrevem que para uma boa atividade a concentração inibitória mínima para extratos deve ser  $>100 \mu\text{g/mL}$  e para compostos puros  $>25 \mu\text{g/mL}$ .

Os óleos essenciais das folhas e flores de *B. pilosa* apresentam atividade frente as bactérias *Micrococcus flavus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas ovalis* e os fungos *Corticium rolfsii*, *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum*. A atividade antibacteriana foi determinada pelo método de difusão em ágar, onde o óleo essencial ( $400 \mu\text{g/disco}$ ) das flores foi mais ativo na inibição de *E. coli* com halo de 20,3 mm, enquanto que se observou uma melhor atividade dos óleos das folhas frente a *B. cereus* e *B. subtilis* com halos de 19,0 e 17,3 mm, respectivamente. A atividade antifúngica foi determinada pelo método de diluição em ágar e expressa em porcentagem de inibição, sendo que a atividade do óleo das flores foi maior que das folhas. Na concentração de 100 ppm, os óleos de *B. pilosa* parecem ser eficazes contra o crescimento destes fitopatógenos acima de 80%. Essas atividades foram atribuídas principalmente ao  $\beta$ -cariofileno e  $\alpha$ -pineno, componentes mais abundantes do óleo essencial (DEBA, et al., 2008).

Pereira et al. (2012) verificaram a atividade antimicrobiana do extrato hidroetanólico e frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e butanólica das folhas de *Morus alba* através do método da microdiluição em caldo sendo que as frações acetato de etila e clorofórmica apresentaram melhores respostas com CIM de  $256 \mu\text{g/ml}$ .

Mendes et al. (2011) pelo método difusão em ágar com o uso de disco avaliaram extratos etanólicos brutos de *Peperonia pellucida* e *Portulaca pilosa* frente a diferentes microrganismos, sendo que *Pseudomonas aeruginosa* foi sensível ao extrato de *P. pilosa* e os microrganismos *Staphylococcus aureus* e *P. aeruginosa*, foram sensíveis ao extrato de *P. pellucida*. Através do método da microdiluição em caldo, o extrato de *P. pelúcida* frente a *S. aureus* e *P. aeruginosa* apresentaram uma

CIM de 62,5 µg/ml, enquanto que *P. pilosa* apresentou CIM igual a 250 µg/ml frente a *P. aeruginosa*.

## 2.7 Propagação

### 2.7.1 Propagação Sexuada

O principal mecanismo de multiplicação das plantas vasculares ocorre através da germinação de sementes, tendo como uma de suas características a variabilidade que pode ocorrer entre as plantas obtidas (FACHINELLO et al., 2005). O processo de germinação de sementes corresponde à reativação do metabolismo do embrião, conduzindo ao aparecimento de uma nova planta (HARTMANN et al., 2002).

O desenvolvimento da semente é um evento complexo, com inúmeros sistemas de controle e regulação, em que, dependendo de fatores internos e/ou externos, tem-se uma semente quiescente ou dormente (CARDOSO, 2004). Diferenças genéticas e fisiológicas bem como fatores ambientais afetam esse desenvolvimento, que pode não ser temporalmente uniforme mesmo que as plantas sejam cultivadas em ambientes idênticos (REN; BEWLEY, 1998).

A planta mãe influencia nas características germinativas da progênie através da herança genética e a movimentação de substâncias químicas dos tecidos maternos para a semente em desenvolvimento (CARDOSO, 2004). Para ocorrer a germinação, a semente precisa estar com os mecanismos internos (físico, fisiológico e bioquímico) e com as condições externas (água, oxigênio, temperatura e luz) apropriadas (MAYER; POLJAKOFF-MAYER, 1989), e qualquer condição primária de dormência superada. A dormência faz com que as sementes não germinem até passar por um período de pós-maturação e as condições serem ideais para a sobrevivência das plântulas (BEWLEY; BLACK, 1982; CHING, 1972).

Vários são os métodos de superação da dormência das sementes, dentre eles a estratificação (tratamento a baixa temperatura), que parece agir através de uma combinação de alterações fisiológicas no embrião e seus tecidos circundantes

(HARTMANN et al., 2002) e as giberelinas, as quais estão entre os principais grupos de reguladores de crescimento envolvidos na superação da dormência em sementes, por modular o metabolismo celular através da atividade de várias proteínas, de maneira a promover o alongamento embrionário (ZAIDAN; BARBEDO, 2004).

Na família Asteraceae, estudos sobre a germinação das sementes de várias espécies foram desenvolvidos. Amaral e Takaki (1998), estudando a estrutura dos aquênios de *B. pilosa*, verificaram que aqueles com tegumento verrugoso mostraram dormência e sensibilidade à luz com percentual máximo de 50% de germinação, no entanto os aquênios sem ornamento no tegumento não apresentaram dormência e nem sensibilidade à luz.

A interferência da luz na dormência está ligada à ativação do sistema fitocromo, em que este se relaciona ao funcionamento das membranas celulares, mudando sua permeabilidade e alterando o fluxo de inúmeras substâncias nas células (HILHORST; KARSSSEN, 1988). As sementes podem apresentar germinação indiferente à luz (afotoblásticas), maior germinabilidade e/ou velocidade de germinação sob luz (fotoblásticas positivas) ou germinarem mais no escuro (fotoblásticas negativas) (CARDOSO, 2004).

Estudo envolvendo fotoblastismo foi realizado para a espécie *B. pilosa*, por Souza et al. (2009), os quais analisaram a emergência de plântulas em diferentes profundidades, observando que houve maior germinação a 1,0 cm de profundidade do solo e a partir de 2,0 cm diminuía gradativamente. As sementes mantidas de 1,0 a 3,0 cm emergiram a partir dos sete dias após semeadura; sementes colocadas a 4,0 cm de profundidade emergiram a partir de dez dias; e não ocorreu emergência para as sementes colocadas a 5,0 cm de profundidade. A emergência das plântulas não depende só da energia contida no endosperma ou cotilédones, mas também da profundidade em que a semente é colocada (HACKBART; CORDAZZO, 2003).

Fleck et al. (2001) estudando os efeitos da luz na germinação de sementes de *Bidens pilosa* e *Sida rhombifolia* constataram que as sementes de *B. pilosa* são sensíveis à luz, apresentando maior germinação na sua presença, ao passo que sementes de *S. rhombifolia* são insensíveis à luz.

Segundo Chivinge (1996) o melhor intervalo de temperatura para germinação das sementes de *B. pilosa* é a faixa de 20° a 35°C, com maior porcentagem de



germinação (70%) ocorrendo a 25°C, o que foi comprovado também por Rios et al. (1989).

Além da dormência, as sementes também podem apresentar inviabilidade. Fatores como polinização insuficiente e estresse ambiental podem influenciar negativamente na viabilidade das sementes, interferindo na reprodução sexuada das espécies (VELTEN; GARCIA, 2005).

### 2.7.2 Propagação Vegetativa

Diversas técnicas são utilizadas para se propagar plantas vegetativamente, dentre elas a enxertia, mergulhia, alporquia, estaquia e micropropagação. A propagação vegetativa *in vitro*, denominada micropropagação devido ao tamanho dos propágulos, é a aplicação mais eficiente da cultura de tecidos vegetais, sendo seu sucesso dependente do estabelecimento de protocolos que atendam às necessidades específicas de cada espécie (GRATTAPLAGLIA; MACHADO, 1998).

Esta técnica baseia-se na capacidade que estruturas possuem de formar um novo indivíduo completo e geneticamente idêntico ao progenitor, um clone (HARTMANN et al., 2002; WENDLING et al., 2005). Segundo Hartmann et al. (2002), esse tipo de propagação é possível devido a duas propriedades fundamentais das células vegetais a totipotência e dediferenciação. A totipotência está relacionada ao fato de que, qualquer célula vegetal viva possui suficiente informação genética para produzir uma planta normal, desde que seja propiciada condição nutricional e ambientais adequadas. A dediferenciação refere-se à capacidade previamente desenvolvida das células de retornarem à condição meristemática e desenvolverem um novo ponto de crescimento.

A cultura de tecidos propicia a regeneração de uma planta a partir de fragmentos de outra, sendo que um dos aspectos importantes dentro desta técnica é a seleção da planta mãe doadora de explantes ou propágulos, principalmente no que diz respeito às características genéticas, epigenéticas e o condicionamento fisiológico para otimizar sua capacidade de estabelecer uma cultura e controlar patógenos (GRATTAPLAGLIA; MACHADO, 1998; TORRES et al., 1998).

A micropropagação é desenvolvida há mais de 30 anos e têm sido amplamente usada em nível comercial, por laboratórios, com finalidades de melhoramento, clonagem e multiplicação de plantas livres de vírus, com alta qualidade fitossanitária e genética, em um menor espaço de tempo (VILLALOBOS; THORPE, 1991; TORRES et al., 1998).

Além do controle efetivo de doenças, apresenta também facilidade no manuseio e transporte, independência da sazonalidade e utilização de pequenas porções da planta para produção em larga escala comercial. Tal fato pode ser exemplificado pela micropropagação obtida a partir de um segmento nodal de *Rosmarinus officinalis* L. var. *genuína*, onde obtiveram aproximadamente 5.000 plantas no período de um ano (CHATUVERDI et al., 1984).

O controle quase absoluto do crescimento e da morfogênese a partir de explantes *in vitro* é uma das principais características da cultura de tecidos vegetais. O crescimento e o desenvolvimento *in vitro* de uma planta estão determinados por fatores complexos como a constituição genética, presença de nutrientes (macro e micronutrientes e açúcar), fatores físicos que influenciam o crescimento (luz, temperatura, pH e concentrações de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>) e, por fim, adição de algumas substâncias orgânicas (como reguladores de crescimento e vitaminas) (TORRES; CALDAS, 1990). Desta maneira, aproximam-se as condições *in vitro* àquelas necessárias para que as plantas se desenvolvam no ambiente, como energia proveniente da luz, água, alimentos minerais, entre outros (TAIZ; ZAYGER, 2004).

Os reguladores de crescimento são substâncias sintéticas que, quando aplicadas nas plantas, apresentam propriedades químicas semelhantes à dos fitorreguladores. Os mais utilizados no estabelecimento e multiplicação *in vitro* são as auxinas ácido indolbutírico (AIB), ácido naftalenoacético (ANA) e ácido indolacético (AIA), e as citocininas 6-benzilaminopurina (BAP), cinetina (KIN) e thidiazuron (TDZ) (CALDAS et al., 1998).

Alguns estudos obtiveram bons resultados utilizando combinações entre BAP e ANA, como o de Li et al. (2012), que constataram que a citocinina BAP foi significativamente eficaz para a proliferação de *Solidago canadensis* L., com a exigência da razão citocinina: auxina alta, favorável à indução de brotações a partir de segmentos nodais, sendo a combinação de 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA acrescentada ao meio MS, a ideal para a multiplicação de mudas a partir de explantes nodais. Lima et al. (2012) observaram que para a micropropagação da

espécie *Orthophytum mucugense* (Bromeliaceae) o meio que proporcionou os melhores resultados foi MS½ suplementado com 2,22 mM de BAP e 0,65 mM de ANA.

Teixeira e Teixeira (2004) com a micropropagação a partir de segmentos apicais da espécie *Carica papaya* cultivar Sunrise Solo (mameiro), obtiveram resultados mais promissores com a utilização de BAP na concentração de 1,0 a 2,0 mg L<sup>-1</sup>, estimulando o alongamento das gemas apicais, mas não a quebra da dormência nas gemas axilares; e as diferentes concentrações de ANA testadas não influenciaram a porcentagem de calos e nem estimulou a rizogênese, mas interferiu no aumento do peso dos calos formado na base dos explantes e no peso da parte aérea.

A micropropagação da espécie *Ficus carica* L. (figueira), realizada a partir de segmentos nodais cultivados em meio com citocinina KIN na concentração de 0,5 mg L<sup>-1</sup> mostrou uma taxa mais satisfatória de multiplicação *in vitro*. O GA<sub>3</sub> reduziu a formação e multiplicação dos brotos e induziu ao estiolamento, à hiperidricidade, clorose e necrose apical das plântulas (FRÁGUAS et al., 2004).

A oxidação dos explantes é uma dificuldade frequente no cultivo *in vitro*, devido à liberação no meio de cultura de compostos fenólicos pelas células danificadas dos mesmos, por ocasião do corte. Conforme Fachinello et al. (2005), os fenóis, ao entrarem em contato com o oxigênio, iniciam reações de oxidação nos tecidos, resultando em produtos tóxicos a esses.

Podem ocorrer perdas significativas devido à contaminação por microrganismos endofíticos presentes nos explantes. A ocorrência de contaminações é mais frequente quando se realiza a micropropagação de espécies lenhosas, ou quando a assepsia é difícil de ser executada, devido às características do explante, ou por este estar localizado em regiões da planta matriz próximas do solo (SUZIN, 2004).

### 3 MANUSCRITOS

#### 3.1 Manuscrito I

- Propagação de *Bidens pilosa* e dosagem de flavonoides, polifenóis e taninos

#### 3.2 Manuscrito II

- Antimicrobial activity, quality control and phytochemical analysis by HPLC-DAD of *Bidens pilosa* Linnaeus

Artigo submetido à revista “Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences”.

## Propagação de *Bidens pilosa* e dosagem de flavonoides, polifenóis e taninos

SANTOS, D.D.<sup>1</sup>; LUCHO, S.R.<sup>1</sup>; DORNELLES, R.C.<sup>1</sup>; PEREIRA, A.S.<sup>1</sup>; DECIAN, A.C.<sup>2</sup>; PARANHOS, J.T.<sup>1</sup>; MANFRON, M.P.<sup>2</sup>

Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS  
Departamento de Biologia<sup>1</sup>  
Departamento de Farmácia Industrial<sup>2</sup>

### RESUMO

Plantas medicinais são amplamente utilizadas, porém as informações científicas são insuficientes sobre a propagação de algumas espécies. Este trabalho objetivou estudar a propagação sexuada e vegetativa de *Bidens pilosa* L., através da germinação de sementes e micropropagação, e quantificar o acúmulo de metabólitos secundários das plantas obtidas. Com o estudo da germinação *in vitro* foram testados diferentes condições e períodos de armazenamento dos diásporos, e com a germinação *ex vitro* diferentes preparos de substrato. Para a micropropagação, foram utilizados segmentos apicais e nodais e combinações de BAP e ANA. Na quantificação de flavonoides, polifenóis totais e taninos por espectrofotometria, foi utilizado o extrato bruto e frações obtidos através de dois cultivos (tradicional e casa de vegetação). As condições de armazenamento dos diásporos influenciaram na germinação, com maior porcentagem de germinação (60,4%) quando mantidos a 25°C por 30 dias. O período de armazenamento também influenciou na germinação, os diásporos mantidos por 120 dias por 10°C apresentaram maior germinação (75%). Através do cultivo em casa de vegetação não houve diferença na porcentagem de germinação entre os diferentes preparos de substrato (76% para não autoclavado; 70% para autoclavado). Na micropropagação, a ausência de fitorreguladores proporcionou uma maior porcentagem de brotações (37,5% para segmento apical; 10% para segmento nodal). O maior teor de flavonoides e polifenóis foi encontrado no extrato bruto e frações obtidos do cultivo tradicional. Diferentemente dos taninos, onde os maiores teores foram em cultivo em casa de vegetação.

**Palavras-chave:** Picão-preto. Propagação sexuada. Micropropagação. Metabólitos secundários.

## INTRODUÇÃO

A diversidade vegetal no Brasil é imensa, assim como a quantidade de espécies que são utilizadas pela população como medicinais, porém carecem estudos que contemplem as formas de propagação para a maioria das plantas. As espécies medicinais nativas são retiradas de seu ambiente e utilizadas pela população em geral ou pela indústria farmacêutica para fabricação de remédios, sem a devida reposição ou cultivo racional, o que faz com que muitas delas estejam na lista das plantas ameaçadas de extinção. Assim, o estudo de suas formas de propagação torna-se relevante, visando o conhecimento e padronização de um sistema de cultivo adequado, como alternativa de matéria prima para os usuários.

A espécie *Bidens pilosa* Linnaeus, que ocorre amplamente em regiões tropicais e apresenta vários nomes populares, de acordo com o local onde for encontrada, Caracteriza-se como uma espécie herbácea, anual, ereta, com 50 a 130 cm de altura, ramificada, apresentando odor característico. As folhas são simples e pinatissectas, flores pequenas reunidas em capítulos e fruto do tipo cipsela alongada de cor preta com aristas aderentes numa das extremidades. Multiplica-se somente por sementes (LORENZI, 2002).

No Brasil é conhecida como picão-preto e é amplamente usada na medicina popular pelos povos indígenas para o tratamento de uma variedade de doenças incluindo febre, angina, diabetes, edema (retenção de água), infecções e inflamações (KUMARI, 2009).

As formas de se propagar uma planta variam e conforme se observam avanços nos métodos utilizados, procura-se aperfeiçoar a maneira de propagar determinada espécie. A propagação sexuada, ou seja, a partir de sementes, corresponde à reativação do metabolismo do embrião, conduzindo ao aparecimento de uma nova planta (HARTMANN et al., 2002). Para que a germinação ocorra, deve-se considerar alguns fatores extrínsecos (ambientais) e intrínsecos (sementes), que se não estiverem favoráveis, podem ocasionar a dormência das sementes (BEWLEY; BLACK, 1994). Após serem dispersas, sementes de muitas espécies não germinam até experimentar um período de pós-maturação (BASKIN; BASKIN, 1998).

Várias são as técnicas de propagação vegetativa empregadas com o objetivo de manter as características desejadas da planta matriz. Dentre elas destaca-se a micropropagação, técnica baseada na capacidade que estruturas possuem de formar um novo indivíduo completo e geneticamente idêntico ao progenitor (HARTMANN et al., 2002; WENDLING et al., 2005). É a aplicação mais eficiente da cultura de tecidos vegetais e a de maior impacto, capaz de gerar plantas uniformes e de alta qualidade fitossanitária, multiplicadas rapidamente (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

As condições ambientais do cultivo *in vitro* e *ex vitro* como luminosidade (qualidade e quantidade), umidade relativa do ar, nutrientes e os tipos de substrato são características que diferenciam fisiológica e anatomicamente as plantas, fatores que podem ocasionar diferente produção e acúmulo de metabólitos secundários (HAZARIKA, 2003).

O objetivo do trabalho visou a propagação sexuada e vegetativa, *in vitro* e *ex vitro*, da espécie *Bidens pilosa* L., e quantificar o acúmulo de metabólitos secundários de extratos e frações das plantas obtidas e cultivadas, no campo e em casa de vegetação.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Os experimentos de propagação *in vitro* foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e o de germinação *ex vitro* em casa de vegetação, ambos pertencentes ao Departamento de Biologia, Centro de Ciências Naturais e Exatas, da Universidade Federal de Santa Maria/ Santa Maria – RS. Os frutos de *Bidens pilosa* foram coletados em plantas crescendo naturalmente em um terreno baldio localizado na Universidade Federal de Santa Maria.

### **1. Germinação *in vitro* e *ex vitro* das sementes**

## Experimento 1:

As cipselas foram utilizadas como diásporos (fruto aderido à semente) sendo previamente armazenados por 30 dias à temperatura ambiente ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e em refrigerador ( $10 \pm 1^\circ\text{C}$ ), ambos na luz (fotoperíodo de 16 horas). A desinfestação dos diásporos foi realizada em câmara de fluxo laminar, com etanol 70% por um minuto, solução de hipoclorito de sódio na concentração de 2,5% por 15 minutos, enxágue triplo em água destilada e autoclavada, imersão por cinco minutos em fungicida carbendazim ( $1,5 \text{ mL L}^{-1}$ ) e em bactericida clortetraciclina ( $1 \text{ mL L}^{-1}$ ). Após, em condições assépticas os mesmos foram inoculados em tubos de ensaio (150 mm x 25 mm) contendo 15 mL de meio de cultura com 20% dos sais minerais MS (MURASCHIGE e SKOOG, 1962), livre de substâncias orgânicas e suplementado com  $15 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose, fungicida carbendazim ( $1,5 \text{ mL L}^{-1}$ ) e bactericida clortetraciclina ( $1 \text{ mL L}^{-1}$ ). Após o ajuste do pH para  $5,8 \pm 0,1$ , o meio foi semi-solidificado com ágar ( $6 \text{ g L}^{-1}$ ) e autoclavado a  $120^\circ\text{C}$  e 1 atm de pressão por 20 minutos.

Foi inoculado um diásporo por tubo de ensaio, sendo os mesmos fechados com filme de PVC e então transferidos para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas (R.F.A de  $\sim 40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , lâmpadas fluorescentes brancas) e temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento e 100 diásporos por repetição. A avaliação da germinação das sementes foi realizada no próximo dia após a inoculação, e após, a cada dois dias, por um período de 27 dias. Posteriormente, foi determinada a porcentagem de germinação e velocidade de germinação.

## Experimento 2:

Diásporos foram previamente armazenados em refrigerador a  $10 \pm 1^\circ\text{C}$  por 30 ou 120 dias antes da inoculação e após, mantidos em câmara de crescimento a temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas. A assepsia dos diásporos, preparo do meio, inoculação e avaliação da germinação das sementes foram realizadas nas mesmas condições do experimento 1. O delineamento utilizado foi



inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento e 100 diásporos por repetição.

### **Experimento 3:**

Na germinação *ex vitro*, utilizou-se uma amostra de 900 frutos (diásporos). Foi usado o delineamento experimental inteiramente casualizado, constando de dois tratamentos (T1=substrato não autoclavado e sem desinfestação dos diásporos; T2=substrato autoclavado e com desinfestação dos diásporos), com cinco repetições por tratamento, cada uma composta de uma subamostra de 90 diásporos.

Os frutos de *B. pilosa* foram coletados em infestações naturais da espécie localizado em um terreno baldio na Universidade Federal de Santa Maria, sendo colhidos manualmente quando maduros e em fase de desprendimento. O armazenamento dos mesmos foi feito em embalagens abertas de plástico, por 15 dias à temperatura ambiente ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ).

Utilizou-se o substrato composto por solo comercial Plantmax® e vermiculita (2:1) para realização da germinação. O substrato foi previamente passado em uma peneira de malha de 5 mm antes de ser locado em bandejas (23 cm x 16,5 cm x 3,7 cm). Parte do substrato foi submetido a autoclavagem a  $120^\circ\text{C}$  e 1 atm de pressão por 40 minutos, durante três dias consecutivos. A desinfestação dos diásporos foi realizada em câmara de fluxo laminar, com etanol 70% por um minuto, solução de hipoclorito de sódio na concentração de 2,5% por 15 minutos, enxágue triplo em água destilada e autoclavada, imersão por cinco minutos em fungicida carbendazim ( $1,5 \text{ mL L}^{-1}$ ) e em bactericida clortetraciclina ( $1 \text{ mL L}^{-1}$ ). Posteriormente foi realizado a semeadura a 1 cm de profundidade no solo, em condições assépticas. Outra parte do substrato não foi realizado a autoclavagem e os diásporos não passaram pelo processo de desinfestação. As bandejas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  recebendo irrigação diária.

As avaliações foram realizadas no próximo dia após a semeadura, e após, de dois em dois dias, pelo período de um mês. Determinou-se a porcentagem e a velocidade de germinação.

## 2. Micropropagação *in vitro*

As plântulas assépticas obtidas da germinação *in vitro* das sementes na presença de luz (fotoperíodo de 16 horas) foram utilizadas como fonte de explantes (segmentos apicais e nodais, estes de diferentes posições do ramo) para a propagação *in vitro*. O meio de cultura utilizado foi o MS completo (MURASCHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 1,5 mL L<sup>-1</sup> de fungicida carbendazim, 1 mL L<sup>-1</sup> de bactericida clortetraciclina e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar. Foram testadas em mg L<sup>-1</sup>, três combinações de BAP (6-Benzil amino purina) e ANA (ácido naftaleno acético): T1= controle (meio de cultura desprovido de BAP e ANA); T2=0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,05 mg L<sup>-1</sup> de ANA e T3= 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA. Antes da autoclavagem, o pH foi ajustado a 5,8 ±0,1 e foram utilizados tubos de ensaio medindo 25 x 150 mm com 15 mL de meio de cultura. Cada tubo de ensaio recebeu um explante e foi fechado com filme de PVC. Após as culturas foram transferidas para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas (R.F.A de ~40 μm mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, lâmpadas fluorescentes brancas) e temperatura de 25 ±1°C.

Os experimentos constaram de duas repetições por tratamento, sendo que a parcela experimental dos segmentos apicais foi composta por 12 tubos de ensaio, e dos segmentos nodais foi composta por 10 tubos de ensaio. As avaliações foram feitas aos 30 dias após a inoculação, analisando-se a porcentagem de brotações; porcentagem de oxidação dos explantes e porcentagem de contaminação.

## 3. Obtenção do extrato bruto e frações

As partes aéreas de *B. pilosa* obtidas através do cultivo em casa de vegetação, e outra parcela coletada no campo (cultivo tradicional) foram secas em estufa de ar circulante, separadamente, à temperatura de aproximadamente ±40°C e após foi reduzido a pó, através de moinho de facas. A extração foi realizada através de maceração com solvente hidroalcoólico 70%, com renovação do solvente por aproximadamente um mês, sendo posteriormente o extrato concentrado em rotaevaporador e reduzido a resíduo seco por liofilização.

O extrato bruto foi fracionado segundo Falkenberg et al. (2004), através da partição por solventes orgânicos de polaridade crescente, iniciando com n-hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol, obtendo-se assim as frações semi-purificadas. Os extratos e frações acetato de etila e butanólica obtidas foram utilizadas na realização do doseamento em espectrofotômetro.

Realizou-se a identificação da espécie vegetal coletada no campo e uma amostra foi depositada no herbário Santa Maria Departamento da Biologia (SMDB) da UFSM sob registro nº14.650.

#### **4. Doseamento de flavonoides, polifenóis e taninos**

O doseamento em espectrofotômetro foi realizado a partir do extrato bruto e frações de plantas obtidas do cultivo tradicional (CT) e do cultivo em casa de vegetação (CV).

Foram dosados polifenóis totais de acordo com Chandra e Mejjia (2004), flavonoides segundo Rio (1996) e taninos conforme Agostini-Costa et al. (2003) adaptado. Cada ponto da curva e amostra foram realizados em triplicata.

No doseamento de flavonoides foi utilizado como padrão a rutina, e solução de cloreto de alumínio como reagente. A equação obtida para a curva de calibração da rutina nos seguintes pontos, 10,0; 20,0; 50,0; 100,0 e 150,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foi  $y=0,0055x+0,0019$  com r de 0,9998. As amostras foram preparadas a 0,04% e 0,02% em metanol 70%. A leitura do padrão e das amostras foi realizada em 425 nm em espectrofotômetro (Shimadzu-UV-1201). O conteúdo total de flavonoides foi expresso em miligramas equivalentes de rutina por grama de amostra.

Para a determinação de polifenóis totais foi utilizado o ácido gálico como padrão, e utilizou-se Folin-Ciocalteu (1N) como reagente. A equação obtida para a curva de calibração nos seguintes pontos, 1,0; 3,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; e 40,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foi  $y=0,0247x-0,0035$ , com r de 0,9997. As amostras foram preparadas na concentração de 0,01% e 0,005% e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 730 nm. Os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de amostra.

A dosagem de taninos foi realizada pelo método da vanilina, utilizando como padrão a catequina, com a qual se obteve a equação para a curva de calibração nos seguintes pontos, 25,0; 50,0; 150,0; 300,0; 450,0; 600,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , sendo  $y=0,0002x+0,0064$  com  $r$  de 0,9990. As amostras foram preparadas na concentração de 0,4% e 0,02% e a leitura em espectrofotômetro a 490 nm. O conteúdo total de taninos foi expresso em miligramas equivalentes de catequina por grama de cada amostra.

### **Análise estatística**

Em todos os estudos foi realizado a análise de variância (ANOVA) e a comparação entre as médias foi efetuada através do teste de Tuckey ( $p \leq 0,05$ ), para dados não homocedásticos foi utilizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, utilizando-se programa estatístico BioEstat 5.3.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **1. Germinação *in vitro* e *ex vitro* das sementes**

#### **Experimento 1:**

As condições de pré-armazenamento dos diásporos influenciaram significativamente a germinação das sementes de *Bidens pilosa* (Figura 1). A maior porcentagem de germinação (60,4%) ocorreu em diásporos armazenados em temperatura ambiente (25°C), diferindo estatisticamente ( $p \leq 0,05$ ) dos armazenados em refrigerador a 10°C (36,8%). Segundo Baskin e Baskin (1998), muitas espécies produzem sementes que não germinam logo após a dispersão e requerem um período de armazenamento a seco. Entre os métodos de superação da dormência, está a estratificação (tratamento a baixas temperaturas), que parece agir através de

uma combinação de alterações fisiológicas no embrião e seus tecidos circundantes (HARTMANN et al., 2002). No presente estudo, o armazenamento dos diásporos à temperatura ambiente proporcionou germinação das sementes em torno de 70% comparado as armazenados a 10°C, portanto a estratificação não favoreceu a germinação das mesmas.

Araújo Neto et al. (2003), trabalhando com *Acacia polyphylla* DC. observaram que as sementes apresentaram maior porcentagem final de germinação a 25°C, sendo que houve inibição da germinação sob temperaturas superiores a 35°C e inferiores a 25°C. Em duas espécies, *Albizia grandibracteata* e *Albizia gummifera*, temperaturas de 20°C e 25°C proporcionaram maiores porcentagens e velocidades de germinação (TIGABU; ODEM, 2001).

Conforme Bewley e Black (1985), a temperatura afeta tanto a capacidade como a velocidade de germinação. As sementes têm a capacidade de germinar dentro de uma determinada faixa de temperatura, característica para cada espécie, mas o tempo necessário para se obter a porcentagem máxima de germinação é dependente da temperatura. De acordo com Carvalho e Nakagawa (1988), temperaturas inferiores ou superiores à ótima tendem a reduzir a velocidade do processo germinativo, expondo as plântulas por maior período a fatores adversos, o que pode levar à redução no total de germinação.

O tempo necessário para as sementes de *B. pilosa* germinarem foi de aproximadamente um mês, iniciando a germinação um dia após inoculação, estendendo-se até os vinte e nove dias. Distintas condições e tempo de armazenamento podem causar em sementes de ervas invasoras diferentes condições de maturação, superando a dormência em intervalos de tempo irregulares, exibindo germinação intermitente (QADERI, 2003), bem como diferenças na emergência das plântulas.

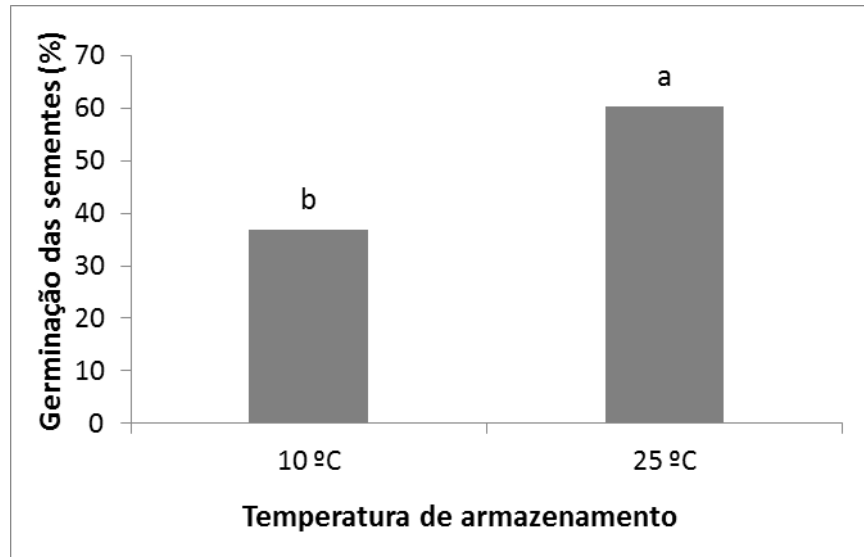


Figura 1 - Porcentagem de germinação das sementes de *Bidens pilosa* L. em diásporos (fruto aderido à semente) mantidos em duas condições de armazenamento, refrigerador a 10°C e em temperatura ambiente a 25°C. Foram utilizadas cinco repetições de 100 sementes por tratamento e o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado. \*As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Em relação ao índice de velocidade de germinação (Figura 2) os dois tratamentos apresentaram comportamentos semelhantes e a germinação teve início um dia após a inoculação (d.a.i.), porém os diásporos armazenados a 10°C apresentaram menor número de sementes germinadas do que quando os diásporos foram armazenados a 25°C. Nesta temperatura de armazenamento, o maior número de sementes germinadas ocorreu no terceiro d.a.i., com 144 sementes germinadas. Em diásporos mantidos a 10°C, as sementes atingiram a maior germinação no quinto d.a.i., com 62 sementes germinadas, demonstrando que a 10°C além da germinação ser menor, houve um atraso na velocidade de germinação.

Oliveira et al. (2009) estudando o comportamento germinativo de sementes de *Talisia subalbans* (Mart.) observaram que a velocidade de germinação das sementes submetidas à 35°C obtiveram germinação mais rápida, seguida das sementes à 25°C e 25°C-35°C. Todavia, o menor valor de índice de velocidade de germinação (IVG) foi observado a 15°C-25°C, em que as sementes apresentaram um atraso considerável na germinação. Esses resultados estão de acordo com o encontrado para *B. pilosa*, onde os diásporos armazenados a 25°C germinaram mais rápido, enquanto que os diásporos mantidos a 10°C apresentaram um atraso na velocidade de germinação.

A menor porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação encontrados para os diásporos submetidos à temperatura de 10°C, possivelmente, ocorreu em razão da temperatura, consideravelmente baixa, na qual diversos autores relatam reduzir a porcentagem de germinação, bem como, retardar o processo, em razão da redução das atividades enzimáticas envolvidas no metabolismo da semente (BEWLEY; BLACK, 1994).

Segundo Scatena et al. (1996), a correlação positiva entre porcentagem e velocidade de emergência das sementes garante o sucesso na obtenção e no estabelecimento das plântulas. Por outro lado, sob temperaturas altas, a velocidade de absorção de água bem como as atividades enzimáticas, tornam-se mais elevadas, fazendo com que as sementes germinem mais rapidamente (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

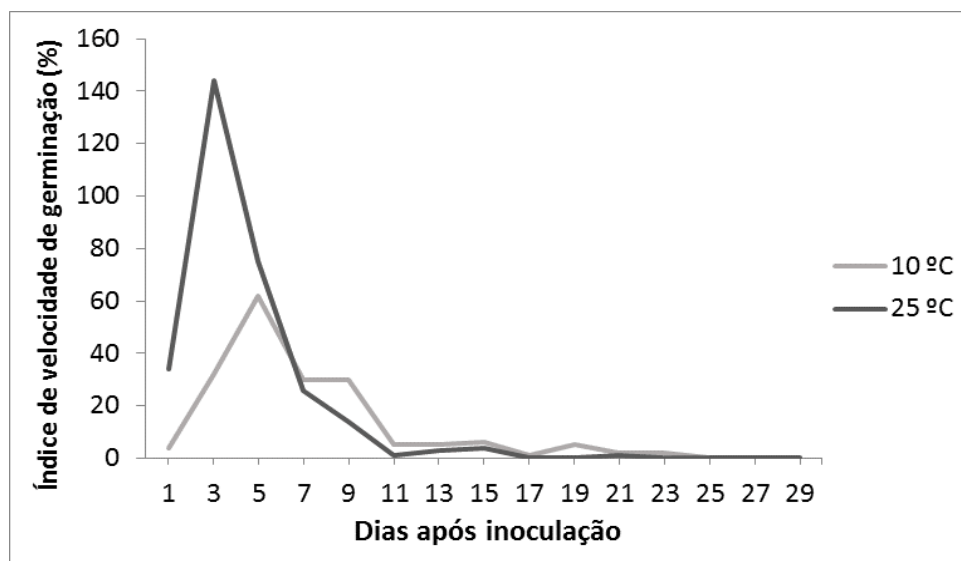


Figura 2 - Índice de velocidade de germinação das sementes de *Bidens pilosa* L. em função de diferentes condições de armazenamento dos diásporos (fruto aderido à semente), 10°C e 25°C. Foram utilizadas cinco repetições de 100 sementes por tratamento e o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado.

## Experimento 2:

As condições de pré-armazenamento dos diásporos influenciaram significativamente a germinação das sementes de *Bidens pilosa* (Figura 3). A maior porcentagem de germinação (75%) ocorreu em diásporos armazenados por 120 dias

em refrigerador a  $\pm 10^{\circ}\text{C}$ , diferindo estatisticamente ( $p \leq 0,05$ ) dos armazenados por 30 dias (36,8%), o que está de acordo com outros pesquisadores como Hartmann et al. (2002) que argumentam que a temperatura regula o tempo de germinação devido ao controle e/ou superação da dormência e à adaptação climática. Vieira et al. (2008) em estudo com *Cupania vernalis* Cambess. (Camboatã), observaram que sementes acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas a  $10^{\circ}\text{C}$  em câmara fria durante o período de 120 dias, apresentaram uma maior porcentagem de germinação, comparado com os demais tratamentos.

Bratcher et al. (1993) testaram o efeito da estratificação a seco ( $5^{\circ}\text{C}$ ) após 0, 2, 4, 6, 8 e 10 semanas, em cinco espécies ornamentais, dentre as quais *Solidago petiolaris* Ait. (Asteraceae) sendo observado que a porcentagem de germinação aumentou em todas as espécies após essas semanas de estratificação. Para *S. petiolaris*, o tempo máximo de estratificação, 10 semanas, foi o mais eficiente, com 95% de sementes germinadas.

O estudo de *B. pilosa* está em concordância com outros estudos, demonstrando que as sementes desta espécie apresentam um tipo de dormência, que pode ser superada através da estratificação por um período mais prolongado de armazenamento. O tempo necessário para as sementes de *B. pilosa* germinarem foi de aproximadamente um mês.

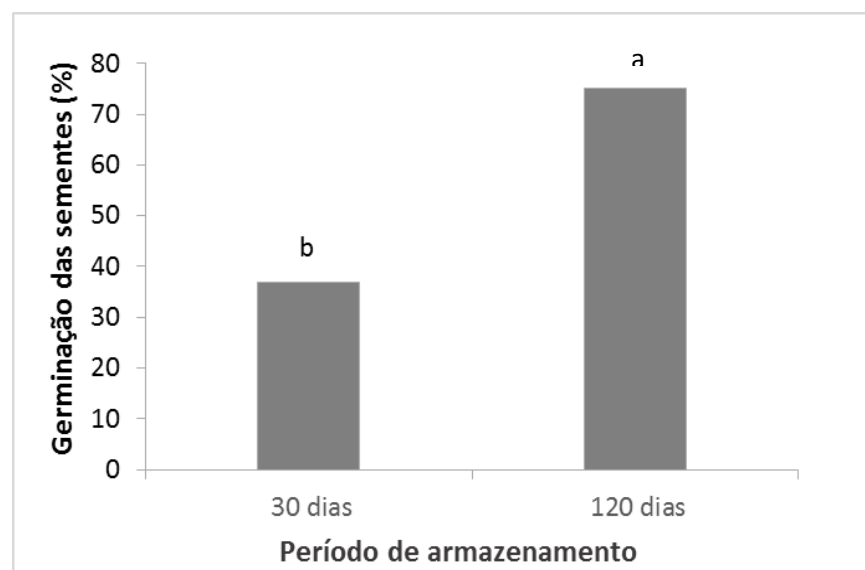


Figura 3 - Porcentagem de germinação das sementes de *Bidens pilosa* L. em diásporos mantidos a  $10^{\circ}\text{C}$  em dois períodos de armazenamento, 30 dias e 120 dias. Foram utilizadas cinco repetições de 100 sementes por tratamento e o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado. \*As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).



Quanto ao índice de velocidade de germinação (Figura 4) os dois tratamentos apresentaram comportamentos semelhantes e a germinação teve início um d.a.i., porém os diásporos armazenados por 30 dias apresentaram menor número de sementes germinadas do que quando os diásporos foram armazenados por 120 dias. Neste período de armazenamento, o maior número de sementes germinadas ocorreu no terceiro d.a.i., com 181 sementes germinadas. Em diásporos armazenados por 30 dias, as sementes atingiram maior germinação no quinto d.a.i., com 62 sementes germinadas, demonstrando que por 30 dias além da germinação ser menor, houve um atraso na velocidade de germinação.

No índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *Cupania vernalis* Cambess. armazenadas por diferentes períodos em câmara fria a temperatura de 10°C, também foi observado comportamentos distintos entre os tratamentos avaliados, onde o melhor IVG foi encontrado com as sementes pré-armazenadas por 120 dias (VIEIRA et al., 2008).

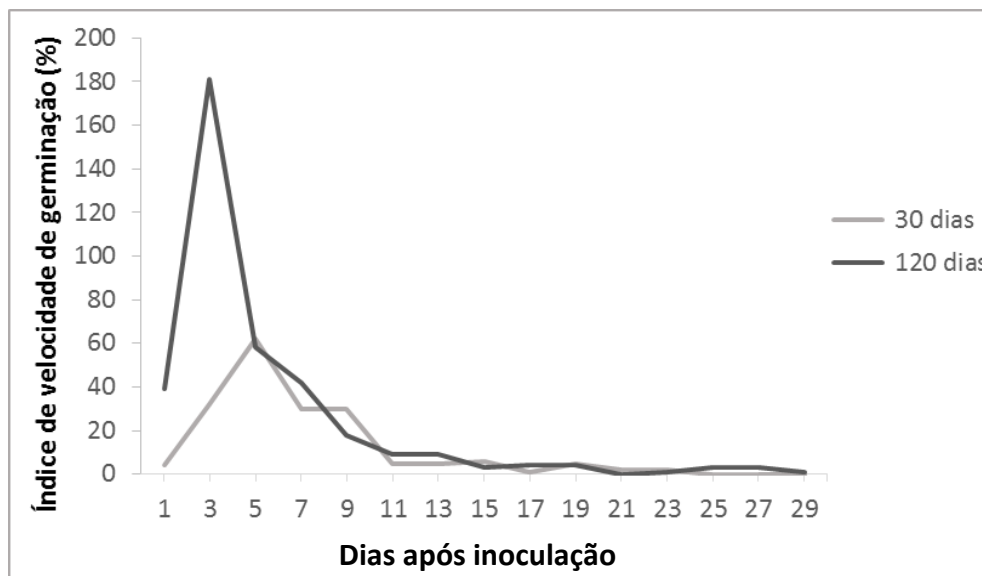


Figura 4 - Índice de velocidade de germinação das sementes de *Bidens pilosa* em função de diferentes períodos de armazenamento das sementes, 30 dias e 120 dias. Foram utilizadas cinco repetições de 100 sementes por tratamento e o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado.

### Experimento 3:

A maior porcentagem de germinação (76%) ocorreu em diásporos mantidos no substrato não autoclavado, não diferindo estatisticamente ( $p \leq 0,05$ ) das semeadas em substrato autoclavado (70%). As condições de preparo do substrato não influenciaram significativamente a germinação das sementes de *Bidens pilosa* (Figura 5), o que está de acordo com os estudos de Machado (2012) que analisou a germinação e o efeito de *Trichoderma* spp. no crescimento de *Gochnatia polymorpha* (Asteraceae), verificando a porcentagem total de emergência de plântulas ao final de 12 semanas, onde observou que não houve diferença significativa entre os tratamentos com substrato autoclavado e não autoclavado.

No entanto, Kleifeld e Chet (1992) encontraram resultados opostos ao do presente estudo, onde observaram a ação positiva de isolado de *Trichoderma harzianum* na emergência do feijão, rabanete, tomate e pepino, onde houve diferença entre os tratamentos com trichoderma e o controle, e Luz (2001) verificou em experimentos de campo que a microbiolização, com *T. harzianum*, isolado T-22, proporcionou aumento significativo na emergência de plântulas de milho. Diniz et al. (2006), concluíram que a inoculação de sementes de alface com *Trichoderma viride* promove o aumento na emergência e no índice de velocidade de emergência das plântulas, mas no teste de germinação das sementes em laboratório, o mesmo isolado não difere do tratamento testemunha. Já Ousley et al. (1993), observaram que alguns isolados auxiliaram e outros inibiram a germinação de sementes de alface, demonstrando que o mecanismo de promoção de germinação é específico e alguns isolados.

Em um estudo com a mangabeira não houve diferença significativa entre os tratamentos analisados, observando-se uma maior porcentagem de germinação de sementes no substrato autoclavado (68%) quando comparado com o solo natural (56%) (NOGUEIRA et al., 2003). Esse estudo está de acordo com o de *B. pilosa* por não apresentar diferença significativa entre os dois tratamentos.

Conforme Ethur (2002), o substrato autoclavado pode apresentar diferenças químicas quando comparado ao substrato não autoclavado e essas diferenças podem interferir na germinação das sementes. O processo de autoclavagem também pode acelerar a decomposição da matéria orgânica, causando, segundo Ghini e Bettiol (1995), modificações na solubilidade ou disponibilidade dos nutrientes.

A esterilidade do substrato é um fator importante para o aumento na taxa de germinação das sementes, não servindo como fonte de patógenos de solo que pode afetar a germinação e o estabelecimento das plântulas (SIMÃO, 1971). Porém percebe-se que a autoclavagem do substrato não aumentou a porcentagem de germinação dos diásporos de *Bidens pilosa*.

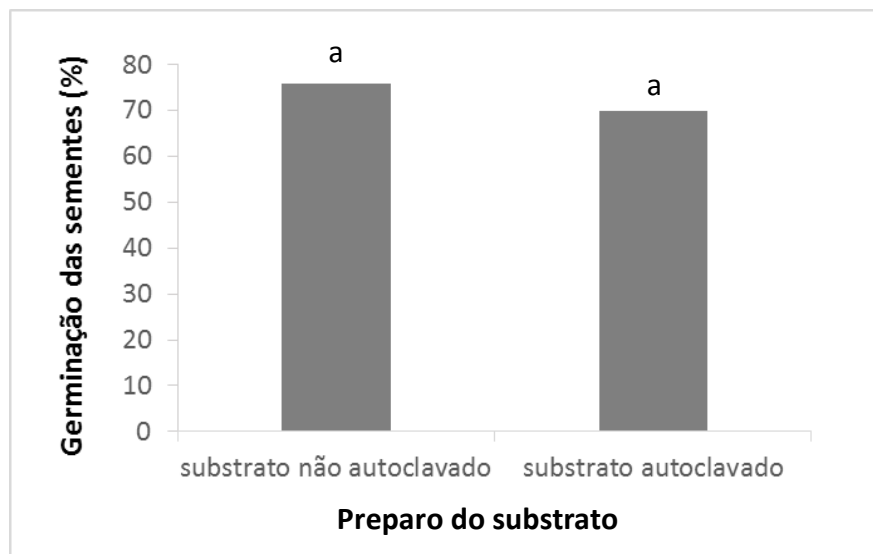


Figura 5 - Porcentagem de germinação das sementes de *Bidens pilosa* L. em duas condições de preparo do substrato, não autoclavado e autoclavado. Foram utilizadas cinco repetições de 90 sementes por tratamento e o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado. \*As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Os dois tratamentos apresentaram comportamentos semelhantes quanto ao índice de velocidade de germinação, que teve início no 3º d.a.i., estendendo-se até os 25 d.a.i. O maior número de sementes germinadas no solo não autoclavado e autoclavado ocorreu no 9º d.a.i., com 117 e 199 sementes germinadas, respectivamente.

Diniz et al. (2006) analisando o índice de velocidade de emergência das sementes de alface inoculadas com *Trichoderma viride*, observou melhor IVG se comparado com o tratamento controle. Já Resende (2003), encontrou redução no índice de velocidade de emergência quando inoculou *Trichoderma harzianum* em sementes de milho. O estudo com *Bidens pilosa* apresentou comportamentos semelhantes quanto ao índice de velocidade de germinação, não estando de acordo com estes estudos.

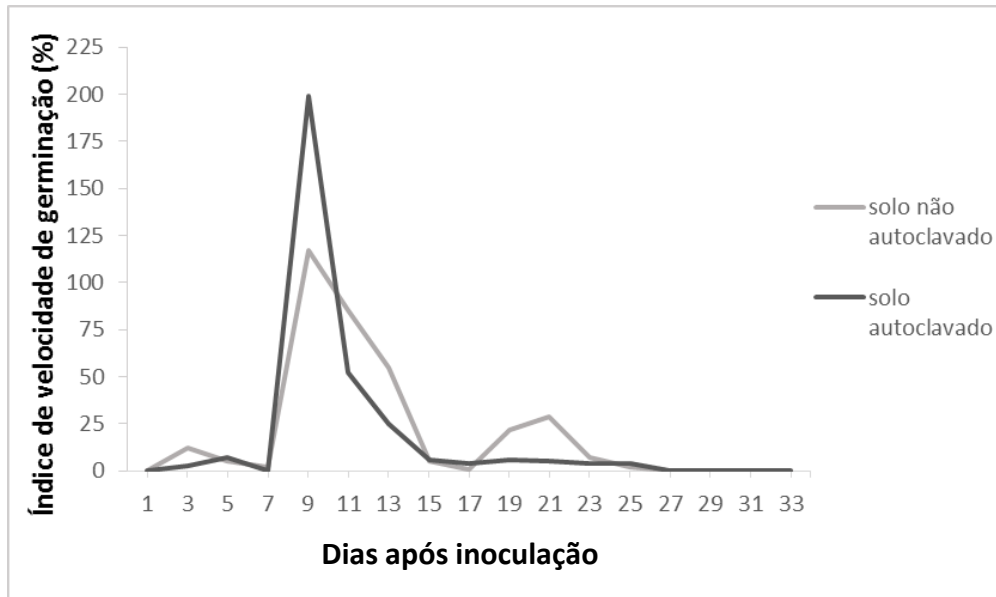


Figura 6 - Índice de velocidade de germinação das sementes de *Bidens pilosa* em função de diferentes preparos do substrato, não autoclavado e autoclavado. Foram utilizadas cinco repetições de 90 sementes por tratamento e o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado.

## 2. Micropropagação *in vitro*

A figura 7 demonstra a porcentagem de brotação, oxidação e contaminação nos explantes obtidos a partir de diferentes segmentos de *Bidens pilosa*. Observa-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos quanto a porcentagem de brotações em comparação entre doses de fitorreguladores dentro de um mesmo segmento e entre segmentos na mesma dose, onde a maior porcentagem de brotação ocorreu no meio sem a presença de fitorreguladores, com 37,5% (segmento apical) e 10% (segmento nodal). Na presença de hormônios observa-se que houve baixa (4,17%) ou nenhuma (0%) porcentagem de brotações a partir dos dois segmentos.

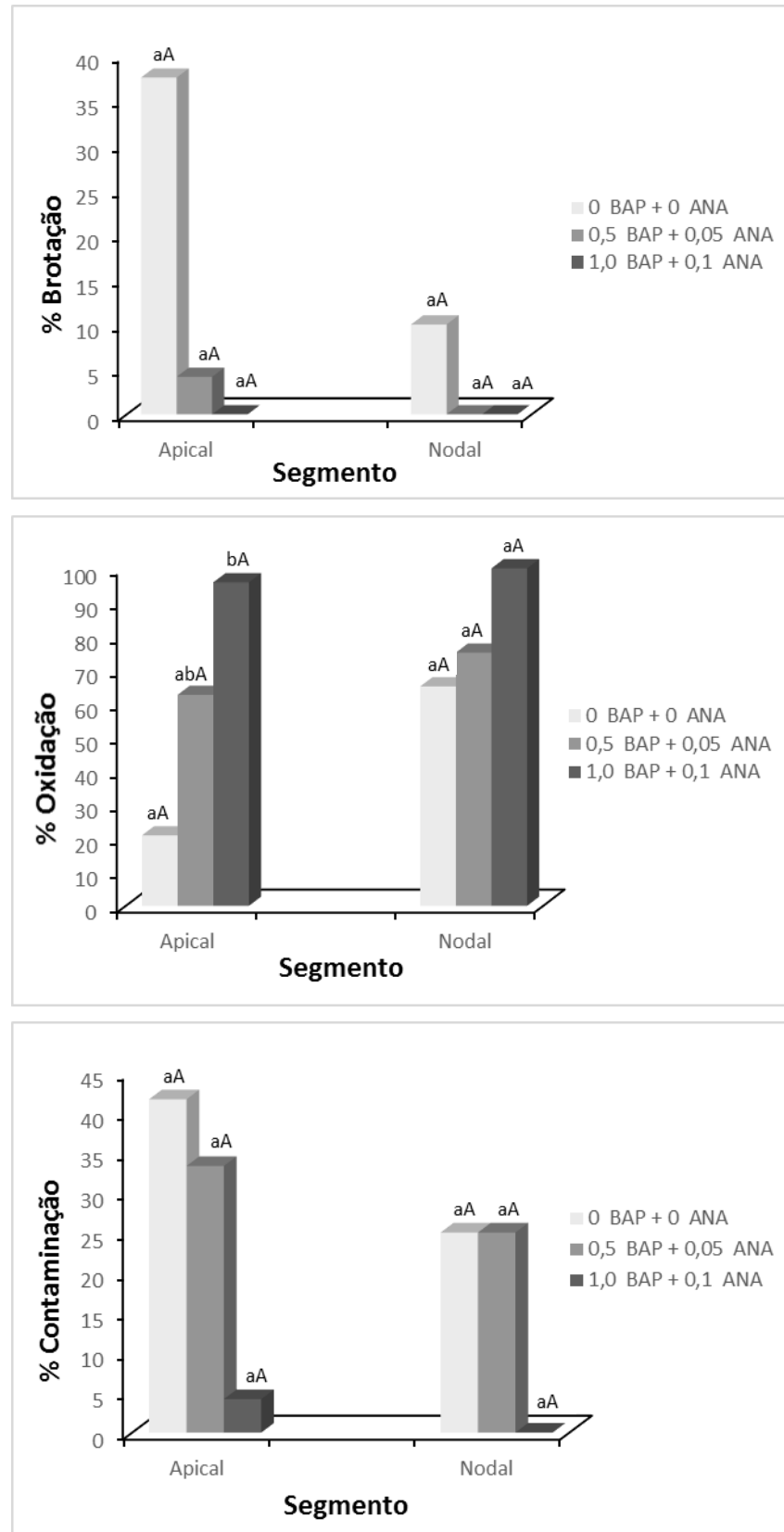


Figura 7 - Respostas obtidas *in vitro* de *Bidens pilosa* cultivadas em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) completo, testando-se três combinações de fitoreguladores. **A:** Porcentagem de brotações aéreas, **B:** Porcentagem de explantes oxidados, **C:** Porcentagem de contaminação. \*As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), seguidas de letras minúsculas para comparação entre doses de fitoreguladores dentro do mesmo segmento e letras maiúsculas para comparação entre segmentos na mesma dose.

De acordo com estudos realizados por Vieira et al. (2009), com cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), o aumento nas concentrações dos reguladores de crescimento, no meio de cultura, não implica, necessariamente, no melhor desenvolvimento das brotações, havendo um limite sutil entre a indução e a inibição, o que é específico para cada espécie vegetal.

Macêdo et al. (2003) estudando o efeito de diferentes concentrações de ANA e BAP na micropropagação do abacaxizeiro, observou que a maior taxa de regeneração de brotos foi obtida utilizando-se 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA, enquanto Araújo et al. (2008) com a mesma espécie obteve a maior porcentagem de brotos na ausência de ANA e 2,243 mg L<sup>-1</sup> de BAP, resultados diferentes do encontrado com *B. pilosa*.

A porcentagem de oxidação mais elevado ocorreu nas concentrações mais altas de reguladores de crescimento (1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA), com 95,83% nos segmentos apicais e 100% nos segmentos nodais, não diferindo estatisticamente dos demais tratamentos nas mesmas doses. O corte do explante com bisturi desencadeia a oxidação fenólica na cultura de tecidos *in vitro*, sendo comum para algumas espécies que as células danificadas pelo corte ocasionem a liberação de compostos fenólicos, difundindo-se rapidamente pelo meio de cultura, sendo tóxicos ao explante (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; CID; TEIXEIRA, 2010). Os compostos fenólicos liberados no meio juntamente com as maiores concentrações de reguladores de crescimento possivelmente foram fitotóxicos para os explantes, aumentando a oxidação dos mesmos. A oxidação dificulta o estabelecimento do cultivo *in vitro*, podendo comprometer ou inviabilizar o desenvolvimento do explante de várias espécies.

Independente do tipo de explante, se observa que não houve diferença significativa entre a porcentagem de contaminação nos meios sem reguladores de crescimento e na combinação de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,05 mg L<sup>-1</sup> de ANA. Entretanto, nas concentrações de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA, embora não tenha sido verificado diferenças estatística, a contaminação foi abaixo de 5%, o que se considera normal dentro das técnicas de cultivo de tecido (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Dzazio (2000) estudando a micropropagação da videira, obteve a média de 50,63% de explantes perdidos por contaminação, valor semelhante ao

encontrado no estudo com *Bidens pilosa*, concluindo que os métodos de desinfestação foram pouco eficientes para ambos os estudos.

### 3. Doseamento de flavonoides, polifenóis e taninos

A tabela 1 demonstra o teor de flavonoides, polifenóis e taninos nos extratos bruto e frações obtidas através de diferentes cultivos.

Tabela 1 - Teor de flavonoides, polifenóis e taninos nos extratos bruto e frações obtidas através de diferentes cultivos, bem como as concentrações testadas. Cultivo tradicional (CT), cultivo em casa de vegetação (CV), concentração da amostra (CONC.), desvio padrão (DP).

AMOSTRAS	FLAVONOIDES mg/g $\pm$ DP	POLIFENOIS mg/g $\pm$ DP	TANINOS mg/g $\pm$ DP
Extrato bruto CT	91,79 <sup>a</sup> $\pm$ 0,16	119,77 <sup>a</sup> $\pm$ 0,93	97,00 <sup>b</sup> $\pm$ 0,65
Extrato bruto CV	73,68 <sup>b</sup> $\pm$ 0,45	80,16 <sup>b</sup> $\pm$ 0,70	136,75 <sup>a</sup> $\pm$ 1,25
Fração acetato de etila CT	477,52 <sup>a</sup> $\pm$ 1,86	604,32 <sup>a</sup> $\pm$ 0,09	118,42 <sup>b</sup> $\pm$ 0,72
Fração acetato de etila CV	348,73 <sup>b</sup> $\pm$ 1,89	554,25 <sup>b</sup> $\pm$ 0,03	139,25 <sup>a</sup> $\pm$ 1,25
Fração butanólica CT	42,09 <sup>a</sup> $\pm$ 0,16	200,47 <sup>a</sup> $\pm$ 1,03	57,04 <sup>a</sup> $\pm$ 0,19
Fração butanólica CV	23,98 <sup>b</sup> $\pm$ 1,05	70,11 <sup>b</sup> $\pm$ 0,93	58,42 <sup>a</sup> $\pm$ 0,72

\*As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

O extrato bruto, a fração acetato de etila e a butanólica obtido do cultivo tradicional de *B. pilosa* apresentaram maiores teores de flavonoides (91,79; 477,52; 42,09 mg/g) e polifenóis (119,77; 604,32; 200,47 mg/g), respectivamente. Diferentemente dos taninos, onde os maiores teores foram em cultivo em casa de vegetação para o extrato e fração acetato de etila (136,75; 139,25 mg/g), entretanto na fração butanólica obtida através dos diferentes cultivos não houve diferença significativa.

Através de procedimento semelhante Gindri et al. (2010) obteve valores inferiores que no estudo com *B. pilosa*, sendo que o extrato bruto de *Urera baccifera* (L.) Gaudich (Urticaceae) apresentou 16,42, 29,76 e 19,11 mg/g em flavonoides, polifenóis e taninos, respectivamente.

Janovik et al. (2009) com *Cariniana domestica* (Lecythidaceae) analisou o teor de flavonoides no extrato bruto e frações acetato de etila e butanólica encontrando 13,69, 13,98 e 14,18 mg/g, respectivamente, teores menores do que os de *B. pilosa*.

## CONCLUSÃO

- As condições de pré-armazenamento de diásporos de *B. pilosa* influenciam no processo de germinação.
- Diásporos armazenados por 30 dias a temperatura ambiente ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ) e por 120 dias em refrigerador ( $\pm 10^{\circ}\text{C}$ ) apresentam uma maior porcentagem de germinação.
- As condições de preparo do substrato não influenciam na germinação das sementes de *B. pilosa*.
- Brotações aéreas obtidas *in vitro* em segmentos apicais e nodais ocorrem sem a necessidade do uso dos reguladores de crescimento benzil amino purina (BAP) e ácido naftaleno acético (ANA) no meio de cultura MS.
- Diferentes sistemas de cultivos de uma espécie vegetal proporcionam uma variação no acúmulo de metabólitos secundários.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINI-COSTA, T. S.; LIMA, A.; LIMA, M. V. Determinação de tanino em pedúnculo de caju: método da vanilina versus método do butanol ácido. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 5, p. 763-765, 2003.

ARAÚJO NETO, J. C.; AGUIAR, I. B.; FERREIRA, V. M. Efeito da temperatura e da luz na germinação de sementes de *Acacia poluphylla* DC. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 249-256, abr./jun. 2003.

ARAUJO, R.F., SIQUEIRA, D.L., CECON, P.R. Multiplicação *in vitro* do abacaxizeiro 'smooth cayenne' utilizando benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenoacético (ANA). **Revista Ceres**. v.55, n.5, p.455-460, 2008.

BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. **Seeds: Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination**. San Diego, CA, USA: Academic Press, 1998.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and Germination**. 2. ed. New York: Plenum, p. 445, 1994.

BEWLEY, J.D. & BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. Plenum Press, New York, 1985.

BRATCHER, C. B.; DOLE, J. M.; COLE, J. C. Stratification improves seed germination off ive native wildflower species. **HortScience**, v. 28, n. 9, p. 899-901, 1993.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 3<sup>a</sup> ed. Fundação Cargill, Campinas, 1988.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: Funep, p. 588, 2000.

CHANDRA, S.; MEJIA, E. G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3583-3589, 2004.

CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. Oxidação fenólica, vitrificação e variação somaclonal. In: CID, L. P. B. **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília, p. 51- 66, 2010.

DINIZ, K. A.; OLIVEIRA, J. A.; GUIMARÃES, R. M.; CARVALHO, M. L. M.; MACHADO, J.C. Incorporação de microrganismos, aminoácidos, micronutrientes e reguladores de crescimento em sementes de alface pela técnica de peliculização. **Revista Brasileira de Sementes**. v.28, n.3, p. 37-43, 2006.

DZAZIO, P.M. **Micropropagação do porta enxerto de videira '420-A'**. Dissertação de mestrado (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2000.

ETHUR, L. Z. **Avaliação de fungos como antagonistas para o biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary em pepineiro cultivado em estufa**. 2002. 155f. Dissertação. (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agronomia) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2002.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I. S.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O.; SHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 5<sup>o</sup> ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFSC; UFRGS, 2004.

GHINI, R.; BETTIOL, W. Controle físico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 3 ed. São Paulo: Ceres, 1995.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, v.1, p. 43-76, 1998.

GINDRI, A.L.; SILVA, M.; MARCHI, M.B.; BRUM, L.S.; ATHAYDE, M.L.; HOELZEL, S.C.S.M. Análise fitoquímica das cascas e do miolo da raiz de *Urerabaccifera* (L.) Gaudich (Urticaceae). **Saúde**, Santa Maria, vol.36, n.2, p.63-70, 2010.

HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation: principles and practices**. 7. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002.

HAZARIKA, B. N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, Stamford, v. 85, n. 12, p. 1704-1712, 2003.

JANOVIW, V.; BOLIGON, A. A.; FELTRIN, A. C.; PEREIRA, D. F.; FROHLICH, J.K.; ATHAYDE, M. L. Doseamento de polifenóis, flavonoides e taninos no extrato bruto e frações de *Cariniana domestica* (Mart.) Miers. **Saúde**, Santa Maria, vol.35, n.2, p. 25-28, 2009.

KLEIFELD, O.; CHET, I. *Trichoderma harzianum* – interaction with plants and effect on growth response. **Plant and Soil**. v.144, p. 267-272, 1992.

LORENZI, H. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, p.544, 2002.

LUZ, W. C. da. Efeito de bioprotetores em patógenos de sementes e na emergência e rendimento de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**. v.26, n.1, p. 16-20, 2001.

MACÊDO, C.E.C., SILVA, M.G, NÓBREGA, F.S., MARTINS, C.P., BARROSO P.A.V., ALLOUFA, M.A.I. Concentrações de ANA e BAP na micropropagação de abacaxizeiro L. Merrill (*Ananas comosus*) e no cultivo hidropônico das plântulas obtidas *in vitro*. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 25, n. 3, p. 501-504, 2003.

MACHADO, D. F. M. **Estudo da germinação e do efeito de *Trichoderma* spp. na promoção do Crescimento de *Gochnatia polymorpha* (Less.) cabrera**. Dissertação de Mestrado, 2012.

NOGUEIRA, R.J.M.C.; ALBUQUERQUE, M.B. de & JUNIOR, J.F.S. Efeito do substrato na emergência, crescimento e comportamento estomático em plântulas de mangabeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.25, p.15-18, 2003.

OLIVEIRA, H.M.; NERY, F.C.; ALVARENGA, A.A.; BARBOSA, J.P.D.; CARVALHO, D.D.C. Comportamento germinativo de sementes de *Talisia subalbans* (mart.) radlk. (Sapindaceae) submetidas a diferentes temperaturas e condições de secagem. **Ciênc. agrotec.**, v.33, n.2, 2009.

OUSLEY, M. A.; LYNCH, J. M.; WHIPPS, J. M. Effect of *Trichoderma* on plant growth: a balance between inhibition and growth promotion. **Microbial Ecology**. v.26, p.277-285, 1993.

KUMARI, P., MISRA, K., SISODIA, B.S., FARIDI, U., SRIVASTAVA, S., LUQMAN, S., DAROKAR, M.P., NEGI, A.S., GUPTA, M.M., SINGH, S.C., KUMAR, J.K. A promising anticâncer and antimalarial componente from the leaves of *Bidens pilosa*. **Planta Med**. v.1, p.59-61, 2009.

RESENDE, M.L. **Inoculação de sementes com *Trichoderma harzianum*, tratamento fungicida e adubação nitrogenada na cultura do milho.** Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

RIO, R. G. W. **Métodos de controle químico de amostras de própolis.** Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

SIMÃO, S. **Manual de Fruticultura.** São Paulo: Ceres, p.530, 1971.

SCATENA, V. L.; LEMOS, F. J. P.; LIMA, A. A. A. Morfologia do desenvolvimento pós-seminal de *Syngonanthus elegans* e *S. niveus* (Eriocaulaceae). **Acta Botânica Brasílica**, São Carlos, v. 10, n. 1, p. 85-91, jan./abr. 1996.

TIGABU, M.; ODEM, P. C. Effect of scarification, gibberellic acid and temperature on seed germination of two multipurpose *Albizia* species from Ethiopia. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 29, n. 1, p. 11-20, 2001.

VIEIRA, C.V., ALVARENGA, A.A., CASTRO, E.M., NERY, F.C., SANTOS, M.O. Germinação e armazenamento de sementes de camboatã (*Cupania vernalis* Cambess.) Sapindaceae. **Ciênc. agrotec.**, v.32, n.2, Mar./Apr. 2008.

VIEIRA, R. A. et al. Diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina e cinetina na micropropagação *in vitro* das variedades rb867515 e rb855156 de cana-de açúcar. **Campo Digital**, Campo Mourão, v. 4, n. 1, p. 122-126, 2009.

WENDLING, I.; PAIVA, H. N.; GONÇALVES, W. **Técnicas de produção de mudas de plantas ornamentais.** Viçosa, MG: Aprenda Fácil, v. 3, p.223, 2005.

## **Antimicrobial activity, quality control and phytochemical analysis by HPLC-DAD of *Bidens pilosa* Linnaeus**

Daniele Damian dos Santos<sup>1,\*</sup>, Rafaela Castro Dornelles<sup>1</sup>, Tatiana Feyh Wagner<sup>1</sup>, Ana Carla Decian<sup>1</sup>, Danielly da Costa Silva<sup>1</sup>, Débora Alves Nunes Mario<sup>1</sup>, Rosmari Hörner<sup>1</sup>, Melânia Palermo Manfron<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

\*1876, Duque de Caxias Street, 1876 - apartment 401. ZIP CODE: 97015-190.

Neighborhood: City Centre. Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. e-mail:

daniele.ds@hotmail.com

Parents: Antonio Valdemar Rodrigues dos Santos and Silvana Maria Damian dos Santos

### **ABSTRACT**

The species *Bidens pilosa* Linnaeus belongs to National Medicinal of Interest to the National Health System Plants ratio (RENISUS), with the potential to advance the stages of the production chain and eventually become a product of interest to the Unified Health System (SUS). It analyzed the antimicrobial activity of the species obtained by different crops: traditional (TC), greenhouse (GC), *in vitro* germination (IG) and *in vitro* micropropagation (IM). The best antibacterial activity was obtained with the butanolic fraction (TC), in front of *S. epidermidis* (MIC - 16 µg/mL) and the best antifungal activity was obtained with the hexane fraction (GC) and chloroform (TC) front to *S. cerevisiae* species (MIC -16 µg/mL). Analysis was performed by HPLC-DAD two compounds, chlorogenic acid and rutin. Highest concentration of chlorogenic acid was found in the GC extract (22.92 mg/g), and rutin in ethyl acetate fraction TC (229.81 mg/g). It was determined parameters of quality control of plant material, where through the results obtained allows the use of *B. pilosa* with quality and safety. It is concluded that different strains of *B. pilosa* provided a variation in the production of secondary metabolites, and the identified compounds may be responsible for the antimicrobial activity of the species.

**Uniterms:** *Bidens pilosa* Linnaeus, quality control, antimicrobial activity, chlorogenic acid and rutin.

## RESUMO

A espécie *Bidens pilosa* Linnaeus pertence a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), apresentando potencial para avançar nas etapas da cadeia produtiva e vir a se tornar um produto de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS). Analisou-se a atividade antimicrobiana da espécie obtida através de diferentes cultivos: tradicional (CT), casa de vegetação (CV), germinação *in vitro* (GI) e micropropagação *in vitro* (MI). A melhor atividade antibacteriana foi obtida com a fração butanólica (CT), frente a *S. epidermidis* (CIM-16 µg/mL) e a melhor atividade antifúngica foi obtida com as frações hexânica (CV) e clorofórmica (CT) frente a *S. cerevisiae* (CIM-16 µg/mL). Foi realizado uma análise por HPLC-DAD de dois compostos, ácido clorogênico e rutina. Maior concentração de ácido clorogênico foi encontrado no extrato CV (22,92 mg/g), e de rutina na fração acetato de etila CT (229,81 mg/g). Determinou-se parâmetros de controle de qualidade do material vegetal, onde através dos resultados obtidos permite-se o uso de *B. pilosa* com qualidade e segurança. Conclui-se que diferentes cultivos de *B. pilosa* proporcionaram uma variação na produção de metabólitos secundários, e os compostos identificados podem ser os responsáveis pela atividade antimicrobiana da espécie vegetal.

**Unitermos:** *Bidens pilosa* Linnaeus, controle de qualidade, atividade antimicrobiana, ácido clorogênico e rutina.

## INTRODUCTION

Throughout the centuries, products of natural origin, especially from plants have been the basis for the treatment of different diseases, and their use for therapeutic purposes by the population requires the use of those selected for their efficacy and safety, based on the popular tradition and/or scientifically validated as Medicinal (Correa *et al.*, 2003; Maciel *et al.*, 2002; Vilegas *et al.*, 2007).

There is a great deal of concern in the use of medicinal plants, with the quality of the drugs, which begins in the correct identification of the species, stage as important as planting, harvesting and processing. The stretching in preparation of plant extracts, where several factors will influence the final quality of the phytotherapeutic (Michelin *et al.*, 2010).

The genus *Bidens* has been used worldwide to treat different diseases, and in Brazil the *Bidens pilosa* species Linnaeus belonging to the Daisy family and known popularly by “picão-preto” (Oliveira; Casari, 1999). The plant is believed to have originated in South America where it spread to the rest of the world (Bartolome; Villaseñor; Yang, 2013; Silva *et al.*, 2011).

The species is characterized as an herbaceous plant, erect and annual, simple leaves, pinatissectas, small flowers gathered into chapters and fruits of cipselas type of elongated black color with adherent artists at one end (Kissmann; Groth, 1999; Souza; Lorenzi, 2012). It is considered invasive plant annual crops both as a perennial of the Central-South and with a long history of use in folk medicine (Kissman; Groth, 1992; Lorenzi; Matos, 2008).

Practically all parts of the plant is used in medicinal preparations topically and/or orally. The flowers are used for gastric discomforts in food poisoning as diarrhea medication, the roots as anthelmintic and alcoholic hepatitis and leaves the active principles are more consumed in medicinal area and in herbal medicine, among them the polyacetylenes and flavonoids (Kwiecinski *et al.*, 2008).

Among other secondary metabolites described for *B. pilosa*, is reported the presence of polyacetylenes, flavonoids, alkaloids, sterols, tannins, linoleic acid and linolenic acid, important substances for medicinal use (Sundararajan *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2004).

The search for new antimicrobials from plant species is a measure suggested to solve the problem of bacterial and fungal resistance (Souza *et al.*, 2003). Since the species belongs to the National List of Medicinal Plants of Interest to the Unified Health System (RENISUS), with the potential to advance the stages of the production chain and eventually become a product of interest to the Unified Health System (SUS) (Porta da Saúde, 2015).

The study aims to evaluate the antimicrobial activity of *Bidens pilosa*, perform a qualitative and quantitative analysis of their secondary metabolites, as well as determine parameters of physical-chemical quality control, from different crops.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Plant material**

The aerial parts of *Bidens pilosa* were collected at the Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil (S 29° 43.033` W 053° 43.180`). A sample of the material is identified and deposited in the Herbarium Santa Maria Department of Biology (SMDB) from UFSM, under number 14.650.

### **Preparation of the crude extract and fractions**

The extract and fractions were obtained from cultivated plants in their natural environment, i.e., traditional cultivation (TC), the *ex vitro* germination of seeds and grown under greenhouse conditions (GC), plantlets *in vitro* germination of seeds and grown under growth chamber (IG), aerial shoots obtained from *in vitro* micropropagation from apical segments and nodal grown in growth chamber (IM). The crude extract of TC and GC were obtained by cold maceration of vegetable material powder (dry to 40°C and ground) with the hydroethanolic solution 70% and renewal of the solvent, concentrated in rotary evaporator, freeze-dried and fractional part.

The fractionation was carried out through the partition with increasing polarity solvents, n-hexane, chloroform, ethyl acetate and butane second Falkenberg *et al.*, (2004). The extract from the *in vitro* germination and micropropagation *in vitro* were performed the ultrasound with methanol, due to the low amount of raw material obtained.

### **Physical-chemical parameters of vegetable drug quality**

Control analyses were performed in triplicate, in accordance with the Brazilian Pharmacopeia (2010) and Anvisa (1998). We evaluated the foreign material on drugs, determination of water in vegetable drug, swelling index, total ash content, acid insoluble ash and sulphated.

### **Antimicrobial activity**



For the evaluation of antimicrobial activity of extracts and fractions of traditional cultivation plant, greenhouse and germination *in vitro*, we used the microdilution method in broth followed by the document M7-A9 (CLSI 2012) for bacteria, M27-A3 (CLSI 2008) for yeast and CLSI M38-A2 (CLSI 2008) for filamentous fungi, according to Clinical and Laboratory Standards, determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC).

### **Microorganisms**

Microorganisms used in the evaluation were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC): *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Candida albicans* (ATCC 14057), *Candida parapsilosis* (ATCC 90018), *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 2601), *Cryptococcus neoformans* (ATCC 2857), and the clinical isolates: *Staphylococcus epidermidis*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus*.

### **Preparation of inoculum**

The bacterial inoculum was prepared in sterile saline solution, using the method of direct suspension of recent colonies grown in middle of soy and tripticaseína, while 12:0 am (35°C). The reference to the turbidity of bacterial suspension was the default 0.5 MacFarland scale, which corresponds to the  $1-2 \times 10^8$  CFU/mL at 625 nm wavelength.

The fungal inoculum was prepared similarly bacteria, replacing the means of cultivation being Sabouraud dextrose agar (SDA) for 48 h (30°C) for Potato dextrose agar and yeasts (PDA) to the filamentous fungi for 7 days (35°C). The solutions were adjusted to 0.04 to 0.06 of absorbance (yeasts) and for the 0.13 0.09 absorbance (filamentous fungi) in 530 nm wavelength.

After homogenization, the suspensions were inoculated in micro-plate wells so that the final concentration of  $5 \times 10^5$  CFU/mL, as advocates the CLSI. The samples were initially diluted in water: alcohol (3: 1) and tested in ten different concentrations (0.25 µg/mL – 128 µg/mL), in duplicate with a series of dilutions of each extract and fraction in sterile plates with 96 micro-wells. We used the positive control (inoculum + broth), negative control (broth) and control of the chemical compound (broth + extract). After 12:0 am of incubation at 35°C for bacteria and 48 hours of incubation

at 30°C for fungi, the MIC was regarded as the lowest concentration of the extract and/or fraction that inhibited microbial growth.

### **High Performance Liquid Chromatography (HPLC)**

Chromatographic analysis was performed by HPLC, according to Evaristo and Leitão (2001), in liquid chromatograph (SHIMADZU, Kyoto/Japan), model pump LC-20AT, automatic gun SIL-20A, DAD detector SPD-M20A, Communicator CBM 20A and controlled by LC SP1 Software. The analytical column used was Shim-pack CLC-ODS (M), particle with 5  $\mu$  in diameter, 4.6 mm dimensions X 150 mm.

Optimization of separation conditions on gradient system was obtained by applying a mobile phase consisting of two solvents, the solvent – water: 2% acetic acid and solvent B-methanol UV/HPLC, with a flow rate of 0.9 mL/min<sup>-1</sup>.

Injection volumes were made in triplicate (initial volume = 40  $\mu$ L) and accompanied with photodiodes system detection between 230-400 nm, for 55 minutes. The identification of the compounds was accomplished by comparing the retention time of the samples with the default and the quantification through the corresponding peak areas. The patterns of use of pyrogallol used phenolics, gallic acid, catechin, pyrocatechin, chlorogenic acid, rutin and quercetin.

Was used the chlorogenic acid and rutin as commercial standards for quantification. For the calibration curve, prepared a solution to 1000  $\mu$ g/mL in MeOH UV/HPLC and the following points were used: 5, 10, 25, 35 and 50  $\mu$ g/mL. The content of chlorogenic acid and rutin was calculated from the equation of the line obtained and the results were expressed in milligrams of each of the standards equivalents per gram of each extract or fraction.

### **Statistical analysis**

The statistical analysis used to determine the differences between the levels of secondary metabolites obtained was performed through analysis of variance (ANOVA) and averages compared by Tuckey test ( $p \leq 0.05$ ), using specific statistical programme.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### Yields of crude extracts and fractions

Of percentage yield crude extracts and fractions through the different crops are shown in table I and II.

**TABLE I** - Yield of the crude extract

DIFFERENT CROPS	YIELD OF THE CRUDE EXTRACT (%)
Traditional cultivation	23.66
Greenhouse cultivation	42.35
Germination <i>in vitro</i>	28.36
Micropropagation <i>in vitro</i>	52.58

**TABLE II** - Yield of fractions

FRACTIONS	TRADITIONAL CULTIVATION	GREENHOUSE CULTIVATION
n-hexane	6.63%	5.05%
Chloroform	2.17%	1.64%
Ethyl acetate	7.76%	5.52%
Butane	7.83%	14.43%

There was a variation in the yield of the extracts of *B. pilosa* obtained through different crops. The hexane fractions, chloroform and ethyl acetate have similar income and the butanolic fraction presented a variation on yield in different crops.

### Physical-chemical parameters of vegetable drug quality control

Results established as physico-chemical parameters for quality control of *Bidens pilosa*, obtained from the traditional cultivation, are represented in the table III.

**TABLE III** - Quality control parameters: Foreign matter (FM), swelling index (SI), water in vegetable drug (W), total ashes (TA), acid insoluble ash (AA) and sulphated ash (SA)

QUALITY CONTROL PARAMETERS	FM (%)	SI (mL)	W (%)	TA (%)	AA (%)	SA (%)
Traditional cultivation	0.01 ±0.00	8.27 ±1.19	6.03 ±0.47	11.84 ±0.02	10.0 ±0.02	16.36 ±2.31

The Brazilian Pharmacopeia establishes limits for the presence of impurities in drugs vegetables such as organs of the plant itself, fragments of other plants, materials from another source such as sand or earth which are not part of pharmacy, yet the presence of fungi, insects and other contaminating materials, since certain impurities may come from the plant itself. The analyses performed with *B. pilosa* contact that it is within the standards established for the majority of vegetable drugs studied.

The maximum acceptable percentage of foreign elements is 2% m/m, noting that the drug presented 0.01% of foreign matter, not exceeding the value advocated by the Brazilian Pharmacopeia 2010, suggesting that there was management, cleaning and proper separation of plant species when collected in the field.

The swelling of the drug measures the volume (mL) occupied by plant material due to the presence of mucilage, and the swelling index found was 8.27 mL, suggesting the presence of that substance. Frasson *et al.*, (2003) in his study with *Caesalpinia ferrea* Mart. (Caesalpinaceae) found the swelling index of 1.5 mL, lower value found for *B. pilosa*.

By gravimetric method was observed that *B. pilosa* presented the water content of 6.03%, while Michelin *et al.*, (2010) in his study with *Operculina macrocarpa* found the value of 8.09%. The result found for *B. pilosa* is less than that specified by the Brazilian Pharmacopeia (2010) which advocates a value in the range of 8-14% for vegetable drugs, suggesting that their vegetable drug storage conditions are suitable and there is hardly microbial contamination or degradation of its chemical constituents, suggesting that there was management, cleaning and proper separation of plant species when collected in the field.

The determination of total ash content is important in quality control, because it indicates the presence of inorganic non-volatile impurities that may be contaminating the drug plant (Brazilian Pharmacopeia, 2000; Sonaglio *et al.*, 2003). The total ash content found in *B. pilosa* was 11.84%, compiling with the one found in the study with the leaves of *Ipomoea pes-caprae* that was 12.51% (Barni *et al.*, 2009).

On determination of ash insoluble in hydrochloric acid, acid consumes physiological ashes expressing the content in silica and silica derivatives, which may be caused by contamination with sand, earth and stones (Marques, 1996). The found

concentration was 10% above the recommended through the Anvisa (1998), which is a maximum of 1.5%, suggesting silicon derivatives and analyzes the sample.

Sulphated ash are represented by the non-volatilized residue after calcination with concentrated sulphuric acid. Barni *et al.*, (2009) in the study with the leaf, flower and entire plant *Ipomoea pes-caprae*, gained 12.60%, 6.85% and 8.48%, respectively, of sulphated ash and the content obtained from *B. pilosa* was 16.36%, a result similar to that reported by Barni and collaborators. The metals present in drug converted in sulfates and as these are more resistant to heat, allow to obtain more accurate results than those obtained with only calcination (Sharapin, 2001).

### Antimicrobial activity

Of different microorganisms were evaluated in this study to verify the action of extracts and fractions of *B. pilosa* against bacteria and fungi.

In table IV and V are the results obtained for the antibacterial and antifungal activity, respectively.

**TABLE IV** - Antibacterial activity: Traditional cultivation (TC), cultivation in greenhouse (GC) and *in vitro* germination (IG)

SAMPLES	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	<i>S. epidermidis</i> (clinical isolate)
Crude extract TC	64	64	128	64	32	32
Crude extract GC	128	128	128	128	64	>128
Crude extract IG	>128	>128	>128	>128	128	>128
Hexane fraction TC	64	128	128	128	64	64
Hexane fraction GC	128	128	>128	128	128	128
Chloroform fraction TC	64	128	64	128	64	64
Chloroform fraction GC	128	>128	128	128	128	>128
Ethyl acetate fraction TC	64	64	64	64	32	32
Ethyl acetate fraction GC	128	64	64	64	64	128
Butanolic fraction TC	64	64	64	64	16	16
Butanolic fraction GC	64	64	128	64	64	64

The extracts and fractions showed greater activity against Gram-positive bacteria, while the crude extract and fractions ethyl acetate and butanolic of traditional cultivation showed better activity. For *S. epidermidis* (both the ATCC as clinical isolate) the MIC was 32 µg/mL in the crude extract (TC) and ethyl acetate fraction (TC), and 16 µg/mL in the fraction butanolic (TC). *S. epidermidis* is part of normal human skin micro biota, and for this reason was considered a contaminant when developed in cultivation of clinical specimens. However, in actuality, with the intensification in the use of implantable materials like catheters and the acquisition of virulence factors due acquisition of several antimicrobial resistance genes, like gene *MecA* (Rakib, 2010), which confers resistance methicillin/oxacillin and *ica* genes (Contreras, 2014), responsible for the formation of biofilm formation, these microorganisms have assumed an important role in the infection process (Otto, 2009; Eiff *et al.*, 2002; Vuong *et al.*, 2003).

The picão-preto presented broad spectrum activity, but less expressive front of gram-negative microorganisms tested. Due to the values of CIM ( $\geq 64$  µg/mL) obtained in this study, we can suggest their potential activity as antibacterial. Some groups of metabolites such as phenols, polyphenols, terpenoids and essential oils, alkaloids, lectins and polypeptides may be related with the antimicrobial activity (Cowan, 1999). The flavonoids are described by possess antibacterial, antiviral and antifungal activity (Cowan, 1999; Cushnie; Lamb, 2005; Hernandez; Tereschuk; Abdala, 2000; Oh *et al.*, 2011) and may be the constituent responsible for the antimicrobial activity of *Bidens pilosa*.

**TABLE V** - Antifungal activity: Traditional cultivation (TC), cultivation in greenhouse (GC) and *in vitro* germination (IG).

SAMPLES	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	<i>C. albicans</i> ATCC 14057	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 2601	<i>C. neoformans</i> ATCC 2857	<i>A. flavus</i> (clinical isolate)	<i>A. fumigattus</i> (clinical isolate)
Crude extract TC	>128	>128	128	>128	>128	>128
Crude extract GC	128	>128	64	>128	>128	>128
Crude extract IG	>128	>128	>128	>128	>128	>128
Hexane fraction TC	>128	>128	128	>128	>128	>128
Hexane fraction GC	32	64	16	64	>128	128
Chloroform fraction TC	32	64	16	64	128	>128
Chloroform fraction GC	64	64	32	64	>128	>128
Ethyl acetate fraction TC	>128	>128	>128	>128	>128	>128
Ethyl acetate fraction GC	>128	>128	>128	>128	>128	>128
Butanolic fraction TC	>128	>128	>128	>128	>128	>128
Butanolic fraction GC	>128	>128	>128	>128	>128	>128

Antifungal activity observed that the yeasts showed the best results, *S. cerevisiae* species presented the best activity, with MIC of 16  $\mu\text{g/mL}$  in hexane fraction (GC) and chloroform (TC) and 32  $\mu\text{g/mL}$  in chloroform fraction (GC). This microorganism is used as raw material in the baking industry and brewing, being also used as a probiotic in humans. It can also cause infections in humans by different forms of invasive infection after ingestion (Sidrim *et al.*, 2003). For *C. albicans* MIC was promising, showing good activity against some fractions. MIC for this organism was 32  $\mu\text{g/mL}$  in hexane fraction (GC) and chloroform (TC) and 64  $\mu\text{g/mL}$  in chloroform fraction (GC). *Candida albicans* in humans is found in the intestinal and respiratory tract, vagina and mouth, on the skin, where he lives with more often between the natural fold that are relatively hot and humid locations (Woods, 1973).

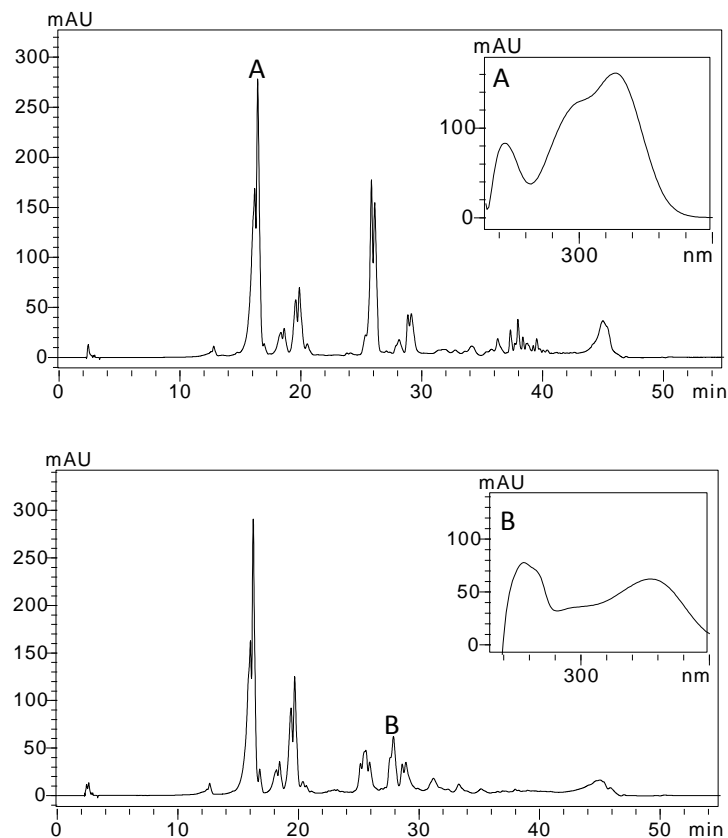
The filamentous fungi MIC was  $\geq 64$   $\mu\text{g/mL}$ . It is noticed that the realization of fractionation from the crude extract has great importance for testing of antimicrobial activity, once the crude extract is often not enough for this kind of analysis.

Deba *et al.*, (2008) showed that the essential oils from the leaves and flowers of *B. pilosa* presented a significant activity measured by halos of inhibition in agar

plate for six species of bacteria (*Micrococcus flavus*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *E. coli* and *Pseudomonas ovalis*) and three fungus (*Corticium rolfsii*, *Fusarium solani* e *F. oxysporum*), being these results as promising as the study with the crude extract and fractions of *B. pilosa*.

### High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Using HPLC-DAD, we analyzed the presence of chlorogenic acid, caffeic acid and rutin (Figure 1) in the extracts and fractions ethyl acetate and butanolic. The extracts and fractions were chromatographed in conditions identical to commercial standards, obtaining the retention time of 16.5 for chlorogenic acid and to 28.6 for rutin.



**FIGURE 1** - Chromatographic profile obtained by HPLC-DAD, where it is possible to observe the presence of chlorogenic acid (A) and rutin (B), obtained from the crude extract and butanol fraction of plants grown in a greenhouse, respectively.



The concentrations of chlorogenic acid and rutin were calculated with the equation of the line, where  $y = 167629x - 352755$  with  $r = 0.9995$  for chlorogenic acid and  $y = 43174x - 80246$  with  $r = 0.9995$  for rutin. Table VI shows the concentrations of chlorogenic acid and rutin in crude extracts and fractions ethyl acetate and butanolic obtained through different crops.

**TABLE VI** - Concentrations of chlorogenic acid and rutin obtained from the extracts and fractions: Traditional cultivation (TC), Cultivation in greenhouse (GC), *in vitro* germination

SAMPLES	CHLOROGENIC ACID (mg/g) $\pm$ SD	RUTIN (mg/g) $\pm$ SD
Crude extract TC	16.17 <sup>b</sup> $\pm$ 0.18	46.39 <sup>a</sup> $\pm$ 1.12
Crude extract GC	22.92 <sup>a</sup> $\pm$ 0.12	11.16 <sup>b</sup> $\pm$ 0.12
Crude extract IG	7.67 <sup>c</sup> $\pm$ 0.16	6.67 <sup>c</sup> $\pm$ 0.08
Crude extract IM	3.95 <sup>d</sup> $\pm$ 0.02	nd
Ethyl acetate fraction TC	5.3 <sup>b</sup> $\pm$ 0.10	229.81 <sup>a</sup> $\pm$ 1.17
Ethyl acetate fraction GC	10.32 <sup>a</sup> $\pm$ 0.11	52.56 <sup>b</sup> $\pm$ 0.57
Butanolic fraction TC	21.71 <sup>a</sup> $\pm$ 0.20	23.16 <sup>a</sup> $\pm$ 0.06
Butanolic fraction GC	16.8 <sup>b</sup> $\pm$ 0.28	20.46 <sup>b</sup> $\pm$ 0.18

\* Medium followed by the same letter in the column do not differ by Tukey test at 5% probability of error.

The greatest concentration of chlorogenic acid was found in the extract of GC (22.92  $\pm$ 0.12), differed statistically the other extracts. The rutin appeared most concentrated in the extract of TC (46.39  $\pm$ 1.12), differing from other extracts. It is known that the variations in the biosynthesis of secondary metabolites is a complex process and is subject to influence of different environmental variables, where biotic and abiotic factors will interfere both in quality and in quantity of by-products (Gobbo-Grandson; Lee, 2007).

The contents of secondary metabolites analyzed by HPLC in the crude extract of species *Solidago chilenses* Meyen (Asteraceae) obtained through different forms of cultivation showed chlorogenic acid and rutin, being 441.40 mg/g; 47.33 mg/g (plants of wasteland); 88.90; 46.63 mg/g (greenhouse plants); 61.80; 46.42 mg/g (micro propagated plants *in vitro*) and 63.70; 47.23 mg/g (staking plants), respectively (Löbner, 2013). These levels were higher than those found species *Bidens pilosa*.

Biosynthesis and accumulation of flavonoids are related, under natural conditions, the various functions in plants, including protection against the incidence of ultraviolet and visible, in addition to protection against insects, fungi, viruses and bacteria, acting as a defense mechanism against stresses (Simões *et al.*, 2010). Traditional cultivation and plants grown in the greenhouse were more exposed to the elements and the stress factors, since the environmental conditions are not controlled, with the exception of temperature in greenhouse conditions. This may have favored the biggest accumulation of these compounds.

The production of metabolites can also be restricted to a specific stage of plant development or environmental or ecological conditions (Simões *et al.*, 2010). Which might explain the lower content of chlorogenic acid and rutin in the crude extract of plants obtained from micropropagation *in vitro* and *in vitro* germination, as they may not have reached all stages of development.

The ethyl acetate fraction obtained from plant cultivation in greenhouse (GC) presented a greater concentration of chlorogenic acid ( $10.32 \pm 0.11$ ), differed statistically from fraction obtained by traditional farming ( $5.3 \pm 0.10$ ). The rutin appeared most concentrated in the fraction obtained from traditional cultivation ( $229.81 \pm 1.17$ ), differing from the fraction obtained from cultivation in greenhouse ( $52.56 \pm 0.57$ ), which should be specific metabolites.

As the butanolic fraction, it turns out that the chlorogenic acid and rutin are more focused on this, when obtained from traditional cultivation ( $21.71 \pm 0.20$ ;  $23.16 \pm 0.06$ , respectively), differing from the obtained through cultivation in greenhouse. The high concentration of rutin in ethyl acetate fraction TC ( $229.81 \pm 1.17$ ) evidence that during the process of fractionation from the crude extract, there is a higher concentration of active ingredients.

The antimicrobial activity observed in this study may be due to the presence of phenolic substances identified in *Bidens pilosa*, and various medicinal plants extracts containing phenolic compounds and flavonoids, have been reported by possessing antimicrobial activity (Ayaz, 2008; Rahman; Moon, 2007; Cushnie; Lamb, 2005; Teffo; Aderogba; Eloff, 2010; Demetzos *et al.*, 2001; Li; Xu, 2008; Mandalari *et al.*, 2007).

## CONCLUSION

- Different cultivations of a species provide a variation in the production of secondary metabolites.
- Quality control data obtained allow the proper use of *B. pilosa* and may contribute in getting herbal remedies with quality, efficacy and safety.
- The most significant antibacterial activity was with the butanolic fraction (TC) in front of the *S. epidermidis*, both with the strain ATCC as to clinical isolated, with MIC of 16 µg/mL.
- The best antifungal activity was obtained with the hexane fraction (GC) and chloroform (TC) front to *S. cerevisiae* species, showing the MIC of 16 µg/mL.
- The presence of chlorogenic acid and rutin in the crude extract and fractions of *B. pilosa*, may be contributing to the antimicrobial activity.

## ACKNOWLEDGEMENTS

To the Coordination of Personal Superior Improvement (CAPES) for providing the scholarship, and to the Pos-Graduation Program in Agrobiology of the Federal University of Santa Maria.

## REFERENCES

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Portaria nº 519, de 26 de junho de 1998. Dispõe sobre o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de “chás – Plantas destinadas à preparação de infusões ou decocções”. Diário Oficial da União, 29 jun. 1998.

AYAZ, F.; HAYIRLIOGLU-AYAZ, S.; ALPAY-KARAOGLU, S.; GRUZ, J.; VALENTOVÁ, K.; ULRICHOVÁ, J.; STRNAD, M. Phenolic acid content of kale (*Brassica oleraceae* L. var. *acephala* DC.) extracts and their antioxidant and antibacterial activities. **Food Chem**, v.107, p. 19–25, 2008.

BARNI, S.T., FILHO, V.C., COUTO, A.G. Caracterização química e tecnológica das folhas, caules e planta inteira da *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br., Convolvulaceae, como matéria-prima farmacêutica. **Rev Bras Farmacogn**, 19.ed., v.4, p.865-870, 2009.

BARTOLOME, A.P.; VILLASEÑOR, I.M.; YANG, W.C. – *Bidens pilosa* L. (Asteraceae): Botanical properties, traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Evid-Based Compl Alt**, p.1-51, 2013.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing yeasts. Approved standard M27-A3, 3rd ed., CLSI, Wayne, PA, 2008.

CLSI – Clinical Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard, 2nd ed. M38-A2. CLSI, Wayne, PA, 2008.

CLSI – Clinical Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A9. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, 2012.

CONTRERAS, J. J.; SEPÚLVEDA, M. Bases moleculares de la infección asociada a implantes ortopédicos. **Rev Chil Infectol**, v.31, n.3, p.309-322, 2014.

CORRÊA, A.D.; BATISTA, R.S.; QUINTAS, L.E.M. **Plantas medicinais: do cultivo à terapêutica**. 6.ed., Petrópolis: Vozes, p.247, 2003.

COWAN, M.M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clin Microbiol Rev**, p.564-582, 1999.

CUSHNIE, T.P.T.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **Int J Antimicrob Ag**, p.343-356, 2005.

DEBA, F.; XUAN, T.D.; YASUDA, M.; TAWATA, S. Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *radiata*. **Food Control**, v.19, n.4, p.346-352, 2008.

DEMETZOS, C.; ANGELOPOULOU, D.; KOLOCOURIS, A.; DALIANI, I.; MAVROMOUSTAKOS, T. Structure elucidation, conformational analysis and thermal effects on membrane bilayers of an antimicrobial myricetin ether derivative. **J Heterocyclic Chem**, v.38, p.703–710, 2001.

EIFF, C.V.; PETERS, G.; HEILMANN, C. Pathogenesis of infections due to coagulase negative staphylococci. **Lancet Infect Dis**, v.2, p.677-685, 2002.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I. S.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O.; SHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed., Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFSC, UFRGS, 2004.

FARIAS, M.R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais In: SIMÕES, C. M. O.; SHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre / Florianópolis: Ed. UFSC, UFRGS, 2003.

Farmacopeia Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

Farmacopeia Brasileira. 5.ed. Brasília: Anvisa, 2010.

FRASSON, A.P.Z.; BITTENCOURT, C.F.; HEINZIMANN, B.M.; Caracterização físico-química e biológica do caule de *Caesalpinia ferrea* Mart. **Rev Bras Farmacogn**, v.13, n.1, p.35-39, 2003.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quim Nova**, v.30, n.2, p.374-81, 2007.

HERNANDEZ, N.E.; TERESCHUK, M.L.; ABDALA, L.R.; Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafídel Valle (Tucumán, Argentina). **J Ethnopharmacol**, v.73, p.317-322, 2000.

ISENGARD, H.D., FÄRBER, J.M. Water determination in products with high sugar content by infrared drying. **Food Chem**, v.82, p.161-167, 2003.

LÖBLER, L. Propagação, metabolismo secundário e genotoxicidade de *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae). Dissertation (Mestrado em Agrobiologia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

LI, M.; XU, Z. Quercetin in a lotus leaves extract may be responsible for antibacterial activity. **Arch Pharm Res**, v.31, p.640–644, 2008.

KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. 2.ed., p.227, 1999.

KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nociva**. Publishing house BASF Brazilian, São Paulo, SP, p.798, 1999.

KVIECINSKI, M. R. et al. Study of the antitumor potential of *Bidens pilosa* (Asteraceae) used in Brazilian folk medicine. **J Ethnopharmacol**, v.117, n.1, p. 69-75, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F.J. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2.ed., p. 544, 2008.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA, J.R.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim Nova**, v.25, n.3, p.429-38, 2002.

MANDALARI, G.; BENNETT, R.; BISIGNANO, G.; TROMBETTA, D.; SAIJA, A.; FAULDS, C.; GASSON, M.; NARBAD, A. Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a by product of the essential oil industry. **J Appl Microbiol**, v.103, p.2056–2064, 2007.

MARQUES, L.C. **Curso de Fitoterapia**. Recife: Sindicato das Indústrias de Produtos Farmacêuticos do Estado de Pernambuco, 1996.

MATA, M.; *Candida albicans* saprófito y patógeno de la cavidad bucal. **Acta Odontol Venez**, p.663-680, 1973.

MICHELIN, D.C.; FINATI, S.C.G.; SACRAMENTO, L.V.S.; VILEGAS, W.; SALGADO, H.R.N. Controle de qualidade da raiz de *Operculina macrocarpa* (Linn) Urb., Convolvulaceae. **Rev Bras Farmacogn**, 20.ed., v.1, p.18-22, 2010.

OH, I., YANG, W., CHUNG, S., KIM, T., OH, K., SHIN, J. In Vitro Sortase: a Inhibitory and Antimicrobial Activity of Flavonoids Isolated from the Roots of *Sophora flavescens*. **Arch Pharm Res**, v.34, p.217-222, 2011.

OLIVEIRA, F.Q.; ANDRADE-NETO, V.; KRETTLI, A.U.; BRANDAO, M.G.L. New evidences of antimalarial activity of *Bidens pilosa* root extracts correlated with polyacetylene and flavonoids. **J Ethnopharmacol**, v.93, p.39-42, 2004.

OLIVEIRA, J. E. Z.; CASARI, V. W. D. Caracterização isozimática de acessos de *Bidens pilosa* L. **Rev Bras Plantas Med**, v.2, n.1, p.19-26, 1999.

OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* – the “accidental” pathogen. **Nat rev**, v.6, p.555-567, 2009.

PORTAL DA SAÚDE. RENISUS - Relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS. Ministério da Saúde. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus.pdf>. Acesso em: 25 maio de 2015.

RAHMAN, M.; MOON, S. Antimicrobial phenolic derivatives from *Dendranthema zawadskii* var. *latilobum* kitamura (Asteraceae). **Arch Pharm Res**, v.30, p.1374–1379, 2007.

RIGATTI, F.; TIZOTTI, M.K.; HÖRNER, R.; DOMINGUES, V. O.; MARTINI, R.; MAYER, L.E.; KHUN, F.T.; FRANÇA, C.A.; COSTA, M.M. Bacteremias por *Staphylococcus coagulase* negativos oxacilina resistentes em um hospital escola na cidade de Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. **Rev Soc Bras Med Tro**, v.43, n.6, p.686-690, 2010.

SHARAPIN, N. Controle de Qualidade de Plantas Medicinais e Fitofármacos – Prescrições Farmacopéicas. **Boletín Oficial de la corporacion para la investigación Multidisciplinaria y el desarrollo sustentable de la Flora Nacional**, v.2, n.3, p.3-7, 2001.

SIDRIM, J.J.C., ROCHA, M.F.G., CÂMARA, L.M.C., BRILHANTE, R.S.N., DIOGENES, M.J.N., OLIVEIRA, A.M.A. Onycholysis caused by a mixed infection *Bidens* of *Prototheca zopfii* and *Candida albicans*. **Clin. Microbiol. Newsletter**, v.25, p.69-71, 2003.

SILVA, F.L.; FISCHER, D.C.H.F; TAVARES, J.F.; SILVA, M.S.; ATHAYDE-FILHO, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. – Compilation of secondary metabolites from *Bidens pilosa* L. **Molecules**, v.16, p.1070-1102, 2011.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Ed. da UFRGS, Florianópolis: Ed. da UFSC, 6.ed., p.1102, 2010.

SONAGLIO, D., ORTEGA, G.G., PETROVICK, P.R., BASSANI, V.L. 2003. Desenvolvimento tecnológico e produção e fitoterápicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R.

**Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2003.

SOUZA, E. L.; LIMA, E. O.; NARAIN, N. Especiarias: uma alternativa para o controle de qualidade sanitária e de vida útil de alimentos, frente às novas perspectivas da indústria alimentícia. **Higiene alimentar**, v.17, p.28-42, 2003.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática:** guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2012.

SUNDARARAJAN, P.; DEY, A.; SMITH, A.; DOSS, A.G.; RAJAPPAN, M.; NATARAJAN, S. Studies of anticancer and antipyretic activity of *Bidens pilosa* whole plant. **Afr Health Sci**, v.6, n.1, p.27-30, 2006.

TEFFO, L.; ADEROGBA, M.; ELOFF, J. Antibacterial and antioxidant activities of four kaempferol methyl ethers isolated from *Dodonaea viscosa* Jacq. var. *angustifolia* leaf extracts. **S Afr J Bot**, v.76, p.25–29, 2010.

VILEGAS, W.; CARDOSO, C.A.L. Controle químico de qualidade de fitoterápicos e plantas medicinais. In: YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia.** Itajaí: UNIVALI, p.155-82, 2007.

VOLPATO, A.M.M.; RIOS, E.M.; MIGUEL, M.D.; SANDER, P.C.; MIGUEL, O.G.; Investigação da atividade antibacteriana de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). **Revista Visão Acadêmica**, v.2, n.1, p.7-10, 2001.

VUONG, D.; GERKE, C.; SOMERVILLE, G.A.; FISCHER, R.R.; OTTO, M. Quorum-sensing Control of Biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. **J Infect Dis**, v.188, p. 706-718, 2003.



## 4 DISCUSSÃO GERAL

Com o estudo da propagação sexuada de *Bidens pilosa* através da germinação *in vitro*, percebe-se que a maior porcentagem de germinação ocorreu em diásporos armazenados por 30 dias a temperatura ambiente ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ), e a menor porcentagem nos diásporos mantidos em refrigerador ( $\pm 10^{\circ}\text{C}$ ). A baixa germinação pode ser justificada pelo fato de que baixas temperaturas podem reduzir a porcentagem de germinação, bem como, retardar o processo, em razão da redução das atividades enzimáticas envolvidas no metabolismo da semente (BEWLEY; BLACK, 1994).

Estudando diferentes períodos de armazenamento dos diásporos do picão-preto, através da germinação *in vitro*, percebe-se que a maior porcentagem de germinação ocorreu em diásporos armazenados a 120 dias em refrigerador a  $\pm 10^{\circ}\text{C}$ , diferindo dos armazenados por 30 dias, demonstrando que os diásporos de *B. pilosa* apresentam um tipo de dormência, que pode ser superada através da estratificação por um período mais prolongado de armazenamento.

A partir do estudo com a germinação *ex vitro* de *B. pilosa* se observa que o substrato não autoclavado apresentou maior porcentagem de germinação, porém não diferiu estatisticamente do substrato autoclavado. Conforme Ethur (2002), o substrato autoclavado pode apresentar diferenças químicas quando comparado ao substrato não autoclavado e essas diferenças podem interferir na germinação das sementes. O processo de autoclavagem também pode acelerar a decomposição da matéria orgânica, causando, segundo Ghini e Bettiol (1995), modificações na solubilidade ou disponibilidade dos nutrientes, podendo ser esses fatores os responsáveis pela menor germinação no substrato autoclavado.

Estudando a propagação vegetativa de *B. pilosa*, através da micropropagação *in vitro*, obteve-se a maior porcentagem de brotação no meio sem a presença de fitorreguladores, e o percentual de oxidação mais elevado ocorreu nas concentrações mais altas de reguladores de crescimento. Com o corte do explante com bisturi desencadeia-se a oxidação fenólica na cultura de tecidos *in vitro*, sendo os compostos fenólicos liberados no meio juntamente com as maiores concentrações de reguladores de crescimento possivelmente foram fitotóxicos para os explantes (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; CID; TEIXEIRA, 2010).

Houve uma variação no rendimento dos extratos de *B. pilosa* obtidos através de diferentes cultivos. As frações hexânica, clorofórmica e acetato de etila apresentaram rendimentos semelhantes e a fração butanólica apresentou uma variação no rendimento nos diferentes cultivos.

A Farmacopeia Brasileira estabelece parâmetros de controle de qualidade físico-químicos para presença de determinadas impurezas nas drogas vegetais, e pelas análises realizadas com *B. pilosa* constatamos que a mesma está dentro dos padrões recomendados. A droga apresentou 0,01% de matéria estranha, não ultrapassando o valor preconizado pela Farmacopeia Brasileira de 2010 que é de no máximo 2%, sugerindo que houve manejo, limpeza e separação adequada da espécie vegetal quando coletada no campo.

Em relação à perda de água por dessecação, o teor encontrado para *B. pilosa* foi de 6,03%, inferior ao especificado pela Farmacopeia Brasileira (2010) que preconiza a faixa de 8 - 14%, sugerindo que suas condições de armazenamento da droga vegetal são adequadas e dificilmente haverá contaminação microbiana ou degradação de seus constituintes químicos.

O índice de intumescimento encontrado foi de 8,27 mL, enquanto que Frasson et al. (2003) em estudo com *Caesalpinia ferrea* Mart. (Caesalpiniaceae) encontrou o índice de intumescimento de 1,5 mL, valor inferior do encontrado para *B. pilosa*, sugerindo a presença de mucilagem no material vegetal analisado.

O teor de cinzas totais e cinzas sulfatadas encontrado para *B. pilosa* foi de 11,84% e 12,60%, respectivamente, estando de acordo com o encontrado em outros estudos. Para cinzas insolúveis em ácido o teor encontrado foi de 10%, acima do preconizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (1998), que é de no máximo 1,5%. A determinação do teor de cinzas são importantes parâmetros de qualidade por indicar possíveis adulterações, pois avaliam a presença de resíduos inorgânicos não voláteis como areia, pedra e terra (SONAGLIO et al., 2003), com isso se sugere análises de silício e derivados na amostra.

A resistência a antibióticos que os microrganismos têm apresentado faz com que o interesse por produtos vegetais com propriedades antimicrobianas vem aumentando (ESSAWI; SROUR, 2000). A partir de análises de extratos e frações de diferentes cultivos de *B. pilosa*, foi demonstrada a atividade antimicrobiana, com níveis diferentes frente a cada microrganismo analisado, exibindo boa (64, 32 e 16

$\mu\text{g/mL}$ ) e moderada ( $128 \mu\text{g/mL}$ ) ação antimicrobiana, de acordo com o estabelecido por Holetz et al. (2002), justificando o uso do picão-preto pela população.

Existem condições ambientais que alteram a produção e concentração dos metabólitos secundários, como a temperatura, sazonalidade, disponibilidade de água, radiação ultravioleta, nutrientes do solo, altitude, composição atmosférica e fase de desenvolvimento das plantas (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Através da análise por CLAE-DAD observou-se variações nos teores dos compostos, ácido clorogênico, ácido caféico e rutina, demonstrando que uma mesma espécie provinda de diferentes populações ou sistemas de cultivo, apresenta diferenças no acúmulo dessas substâncias.

As plantas obtidas da micropropagação *in vitro* e da germinação *in vitro*, podem não ter atingido todos os estágios de desenvolvimento, justificando o menor teor de ácido clorogênico e rutina no extrato bruto. Conforme Simões et al. (2010) a produção de metabólitos também pode estar restrita a um estágio específico do desenvolvimento do vegetal ou a determinadas condições ambientais ou ecológicas.

As substâncias fenólicas, identificadas em *Bidens pilosa*, podem ser atribuídas a atividade antimicrobiana, sendo que extratos de várias plantas medicinais, que contem compostos fenólicos e flavonoides, têm sido relatados por possuir esta atividade (DEMETZOS et al., 2001; LAMB, 2005; RAHMAN; MOON, 2007; MANDALARI et al., 2007; AYZAZ, 2008; LI; XU, 2008; CUSHNIE; TEFFO; ADEROGBA; ELOFF, 2010).

## 5 CONCLUSÕES

- As condições de pré-armazenamento de diásporos de *B. pilosa* influenciaram no processo de germinação.
- As condições de preparo do substrato não influenciaram na germinação das sementes de *B. pilosa*.
- Brotações aéreas obtidas *in vitro* em segmentos apicais e nodais ocorreram sem a necessidade do uso dos reguladores no meio de cultura MS.
- Os parâmetros físico-químicos preconizados pela Farmacopeia Brasileira permitem estabelecer parâmetros de qualidade para o picão-preto.
- Os extratos e frações do *B.pilosa* apresentam atividade antimicrobiana.
- A melhor atividade antibacteriana foi obtida com a fração butanólica, obtida de plantas oriundas do cultivo tradicional.
- A mais expressiva atividade antifúngica foi encontrada com as frações hexânica, obtida de plantas oriundas da casa de vegetação, e clorofórmica, oriundas do cultivo tradicional.
- Diferentes cultivos de uma espécie vegetal proporcionaram variação na produção de metabólitos secundários.
- A atividade antimicrobiana pode ser atribuída ao clorogênico, ácido caféico e rutina presentes em *B. pilosa*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, I.; BEG, A.Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian plants against multi-drug resistant human pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, v.74, p.113-123, 2001.

ALICE, C.B.; SIQUEIRA, N.C.S.; MENTZ, I.A.; SILVA, G.A.A.B.; JOSÉ, K.F.D. **Plantas medicinais de uso popular: Atlas farmacognóstico**. Ed. Universidade Luterana do Brasil, Canoas, 1995.

ALVARENGA, F. C. R. et al. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de folhas e tinturas de guaco. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, (2A), p. 442-448, 2009.

AMARAL, A.; TAKAKI, M. Achene dimorphism in *Bidens pilosa* L. as determined by germination test. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 41, n. 1, p. 11-16, 1998.

ANDERBERG, A. A. et al. Compositae. In: KUBITSKI, K. (Ed.). **The families and genera of vascular plants**. Springer, Berlim, p. 61-588. 2007.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº. 90 de 16 de março de 2004**. Dispõe sobre o Guia para os estudos de toxicidade de medicamentos fitoterápicos. DOU. Poder Executivo, Brasília, DF, 18 mar. 2004.

ANVISA. **Resolução RDC nº 26, de 13 de maio de 2014**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da União. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/f8183a004707cee086319741cdd33a01/Consolidado+COFID+V.pdf?MOD=AJPERES>, acesso em março de 2015, 2014.

ANVISA, 2006. **Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006**. Aprova a política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília-DF, 2006. [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica\\_nacional\\_fitoterapicos.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf), acesso em março de 2015.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria nº 519, de 26 de junho de 1998**. Dispõe sobre o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de “chás – Plantas destinadas à preparação de infusões ou decocções”. Diário Oficial da União, 29 jun. 1998.

AYAZ, F.; HAYIRLIOGLU-AYAZ, S.; ALPAY-KARAOGLU, S.; GRUZ, J.; VALENTOVÁ, K.; ULRICHOVÁ, J.; STRNAD, M. Phenolic acid content of kale (*Brassica oleraceae* L. var. *acephala* DC.) extracts and their antioxidante and antibacterial activities. **Food Chemistry**, v.107, p. 19–25, 2008.

ARAÚJO, et al. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Revista de Patologia Tropical**, v. 33, n. 1, p. 55-64, 2004.

BALLARD, R. *Bidens pilosa* complex (Asteraceae) in North and Central America. **American Journal of Botany**, v. 73, n. 10, p. 1452-1465, 1986.

BARBOSA-FILHO, J.M., NASCIMENTO-JÚNIOR, F.A., TOMAZ, A.C.A., ATHAYDE-FILHO, P.F., SILVA, M.S., CUNHA, E.V.L., SOUZA, M.F.V., BATISTA, L.M., DINIZ, M.F.F.M. Natural products with antileprotic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.17, p.141-148, 2007.

BARNI, S.T., FILHO, V.C., COUTO, A.G. Caracterização química e tecnológica das folhas, caules e planta inteira da *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br., Convolvulaceae, como matéria-prima farmacêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 19.ed., v.4, p. 865-870, 2009.

BARTOLOME, A.P.; VILLASEÑOR, I.M.; YANG, W.C. *Bidens pilosa* L. (Asteraceae): Botanical properties, traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, p.1-51, 2013.

BAUER, A.W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Microbiol.**, v.40, p. 2413-5, 1966.

BERTINI, L. M.; PEREIRA, A. F.; OLIVEIRA, C. L. L.; MENEZES, E. A.; MORAIS S. M.; CUNHA, F. A.; CAVALCANTI, E. S. B. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, v.17, p.80-83, 2005.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination**. v. II. Viability, dormancy and environmental control. Berlin: Springer-Verlag, p.375, 1982.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and Germination**. 2. ed. New York: Plenum, p. 445, 1994.

BORGES, C.C. **Análise farmacognóstica de *Bidens pilosa* (L.) (Asteraceae)**. Trabalho de conclusão de curso (Farmácia). Universidade do Extremo Sul Catarinense (UFSC), Santa Catarina, 2009.

BRANDÃO M.G.L., COSENZA G.P., MOREIRA R.A., MONTE-MOR R.L.M. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.408-420, 2006.

BRASIL, **Ministério da Saúde. Proposta de política Nacional de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos**. 1.ed., Brasília, D.F., 2001.

BRASIL, Resolução RE, nº 48, de 16 de março de 2004. **Registros de produtos fitoterápicos no Brasil**, Diário Oficial da União. Poder Executivo, Brasília, D.F., 2004.

BREMER, K. **Asteraceae: Cladistics and classification**. Timber Press, p.429, 1994.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: SPI/Embrapa-CNPQ, v.1, 1998. p. 87-132.

CARDOSO, V. J. M. Dormência: estabelecimento do processo. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Orgs). **Germinação: do básico ao aplicado**. Editora Artmed, Porto Alegre, p. 95-108, 2004.

CASOTI, R. **Estudo Farmacognóstico de *Pithecoctenium echinatum* (Jacq.) Baill.** 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

CHATUVERDI, H.C.; MISRA, P.; SHARMA, M. In vitro multiplication of *Rosmarinus officinalis* L. **Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie Bd.**, Stuttgart, v. 113, p. 301-304, 1984.

CHIANG, Y.M., CHANG, C.L.T., CHANG, S.L., YANG, W.C., SHYUR, L.F. Cytopylyne, a novel polyacetylenic glucoside from *Bidens pilosa*, functions as a T helper cell modulator. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, p. 532-538, 2006.

CHIANG, Y. M., CHUANG, D.Y., WANG, S.Y., KUO, Y.H., TSAI, P.W., TSAI, L.F. Metabolite profiling and chemopreventive bioactivity of plant extracts from *Bidens pilosa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, n. 2-3, p. 409-419, 2004.

CHIEN, S.C., YOUNG, P.H., HSU, Y.J., CHEN, C.H., TIEN, Y.J., SHIU, S.Y., LI, T.H., YANG, C.W., MARIMUTHU, P., TSAI, L.F.L., YANG, W.C. Anti-diabetic properties of three common *Bidens pilosa* variants in Taiwan. **Phytochemistry**, v.70, p.1246-1254, 2009.

CHING, T. M. Metabolism of germinating seeds. In: T. T. Kozlowski, Ed. **Seed biology**, New York: Academic Press, v.2, 1972.

CHIVINGE, O. A. Studies on the germination and seedling emergence of *Bidens pilosa* and its response to fertilizer application. **Trans. Zimb. Scient. Assoc.**, v. 70, p. 1-5, 1996.

CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. Oxidação fenólica, vitrificação e variação somaclonal. In: CID, L. P. B. **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília, p. 51- 66, 2010.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard. Sixth Edition. CLSI document M7-A6 (ISBN 1- 56238-486-4). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087- 1898 USA. 2003.

CLSI. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras**; Norma Aprovada – Segunda Edição. CLSI document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos. 2002.

COS, P.; VLIETINCK, A.J.; BERGHE, D.V.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* 'proof-of-concept'. **Journal of Ethnopharmacology**. pag. 290–302, 2006.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press. p.1262, 1981.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. Columbia University Press, New York. 2.ed., 1988.



CUSHNIE, T.P.T.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **Int. J. Antimicrob. Agents**, p.343-356, 2005.

DEBA, F.; XUAN, T.D.; YASUDA, M.; TAWATA, S. Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *radiata*. **Food Control**, v. 19, n. 4, p. 346-352, 2008.

DEMETZOS, C.; ANGELOPOULOU, D.; KOLOCOURIS, A.; DALIANI, I.; MAVROMOUSTAKOS, T. Structure elucidation, conformational analysis and thermal effects on membrane bilayers of an antimicrobial myricetin ether derivative. **J. Heterocycl. Chem**, v.38, p.703–710, 2001.

DUARTE, M.C.T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. Construindo a História dos produtos naturais. **Multiciência**. v.7, p.16, 2006.

DUARTE M.C.T.; FIGUEIRA G.M.; SARTORATTO A.; REHDER V.L.G.; MACHADO A.L.M.; DELARMELENA C. Anti-Candida activity of essential oils and extracts from native and exotic medicinal plants used in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, p. 305-311, 2005.

ESSAWI, T.; SROUR, M. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 70, p. 343-349, 2000.

ETHUR, L. Z. **Avaliação de fungos como antagonistas para o biocontrole de Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary em pepineiro cultivado em estufa**. 2002. 155f. Dissertação. (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agronomia) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2002.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. (Eds). Propagação de plantas frutíferas. **Embrapa Informações Tecnológicas**, Brasília, DF, p.221, 2005.

FARIAS, M.R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C.M.O; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 Ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. UFRGS/ Ed. UFSC, 2004.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. Brasília: Anvisa, 5.ed., 2010.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. São Paulo: Siqueira, 2. ed., 1959.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. São Paulo: Atheneu, 4.ed., v.1, 1988.

FLECK, N.G.; AGOSTINETTO, D.; VIDAL, R.A.; JÚNIOR, A.M. Efeitos de fontes nitrogenadas e de luz na germinação de sementes de *Bidens pilosa* e *Sida rhombifolia*. **Ciênc. agrotec.**, v.25, n.3, p. 592-600, maio/jun., 2001.

FRÁGUAS, C. B.; PASQUAL, M.; PEREIRA, A. R. Multiplicação in vitro de *Ficus carica* L.: efeito da cinetina e do ácido giberélico. **Ciência e Agrotecnologia, Lavras**, v. 28, n. 1, p. 49-55, 2004.

FRASSON, A.P.Z.; BITTENCOURT, C.F.; HEINZIMANN, B.M.; Caracterização físico-química e biológica do caule de *Caesalpinia ferrea* Mart. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, n.1, p. 35-39, 2003.

GHINI, R.; BETTIOL, W. Controle físico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 3 ed. São Paulo: Ceres, 1995.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas Medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Ministério da Agricultura, p.99-170, 1998.

HACKBART, V. C. S.; CORDAZZO, C. V. Ecologia das sementes e estabelecimento das plântulas de *Hydrocotyle bonariensis* Lam. *Atlântica*, Rio Grande, v. 1, n. 25, p. 61-65, 2003.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis**. 3. ed. London: Chapman & Hall, p.302, 1998.

HARBORNE, J.B. (ed.). **Methods in plant biochemistry**. Plant phenolics. London: Academic, v.1, 1989.

HARBORNE, J.B. WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v.55, p.481-504, 2000.

HARTMANN, H. T. et al. Plant propagation: principles and practices. **Prentice Hall**, 7. ed. New Jersey, 2002.

HSU, Y.J.; LEE, T.H.; CHANG, C.L.T.; HUANG, Y.T.; YANG, W.C. Anti-hyperglycemic effects and mechanism of *Bidens pilosa* water extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v.122, p.379-383, 2008.

IMBERT, E. Ecological consequences and ontogeny of seed heteromorphism. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 5, n. 1, p. 13-36, 2002.

ISERHARD, A.R.M.; BUDÓ, M.L.D.; NEVES, E.T.; BADKE, M.R. Práticas culturais de cuidados de mulheres mães de recém-nascido de risco do Sul do Brasil. **Esc. Anna Nery Rev. Enferm.**, v.13, n.1, p.116-22, 2009.

JANSEN A.M., SCHEFFER J.J.C., BAERHEIM S. A. Antimicrobial activity of essential oils from Greek *Sideritis* species. **Pharmazie**, v.45, p.70, 1987.

JULIO, P.G.S.; OLIVEIRA, D.M.T. Morfoanatomia comparada e ontogênese do pericardo de *Bidens gardneri* Backer e *B.pilosa* Linnaeus (Asteraceae). **Revista Brasil. Bot.** v.32, n.1, p.109-116, 2009.

KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. 2 ed., p.227, 1999.

KONEMAN, E W, et al. **Diagnóstico microbiológico**. Rio de Janeiro: Medsi, 5 ed, p.494, 2001.

KVIECINSKI, M. R. et al. Study of the antitumor potential of *Bidens pilosa* (Asteraceae) used in Brazilian folk medicine. **J. Ethnopharmacol.**, v. 117, n. 1, p. 69-75, 2008.

LEITÃO, S.G.; CASTRO, O.; FONSECA, E.M.; JULIÃO, L.S.; TAVARES, E.S.; LEO, R.R.T.; VIEIRA, R.C.; OLIVEIRA, D.R.; LEITÃO, G.G.; MARTINO, V.; SULSEN, V.; BARBOSA, Y.A.G.; PINHEIRO, D.P.G.; SILVA, P.E.A.; TEIXEIRA, D.F.; LOURENÇO, M.C.S. Screening of Central and South American plant extracts for antimycobacterial activity by the Alamar Blue test. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.6-11, 2006.

LI, J. et al. Propagation of goldenrod (*Solidago canadensis* L.) from leaf and nodal explants. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, v. 81, n. 1, p. 53-60, 2012.

LI, M.; XU, Z. Quercetin in a lotus leaves extract may be responsible for antibacterial activity. **Arch. Pharm. Res.**, v.31, p.640–644, 2008.

LIMA, C. O. de C. et al.. Organogênese direta de *Orthophytum mucugense*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 2, p. 249-254, fev. 2012.

LIMA, I.O.; OLIVEIRA, R.A.G.; LIMA, E.O.; FARIAS, N.M.P.; SOUZA, E.L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.197-201, 2006.

LORENZI, H. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, p.544, 2002.

LORENZI, H.; MATOS, F.J. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2. ed., p. 544, 2008.

LUCCHETTI, L.; TEIXEIRA, D.F.; BARBI, N.S.; SILVA, A.J.R. *Bidens pilosa* L.(Asteraceae). **Revista Fitos**, v.4, p.60-70, 2009.

MACHADO, H. et al. **Flavonoides e seu potencial terapêutico**. Boletim do Centro de Biologia da Reprodução, Juiz de Fora, v. 27, n 1/2, p.33-39, 2008.

MAHASNEH, A.M.A.; ADEL, M.A.; EL-OQLAH, A.A.B. Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in the traditional medicine of Jordan. **J. of Ethnopharmacol.** v.64, p.271-276, 1999.

MANDALARI, G.; BENNETT, R.; BISIGNANO, G.; TROMBETTA, D.; SAIJA, A.; FAULDS, C.; GASSON, M.; NARBAD, A. Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a by product of the essential oil industry. **J. Appl. Microbiol.**, v.103, p.2056–2064, 2007.

MARQUES, L.C. **Curso de Fitoterapia**. Recife: Sindicato das Indústrias de Produtos Farmacêuticos do Estado de Pernambuco, 1996.

MARTÍNEZ M.J., BETANCOURT J., ALONSO-GONZÁLEZ N., JAUREGUI A. (1996). Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity. **J. of Ethnopharmacol.** v.52, n.3, p.171-174, 1996.

MAYER, A.M.; POLJAKOFF-MAYER, A. **The germination of seeds.** New York: Pergamon Press, p.210, 1989.

MENDES, L. P. M. et al. Atividade Antimicrobiana de Extratos Etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*. **Rev. Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 121-125, 2011.

MICHELIN, D.C.; FINATI, S.C.G.; SACRAMENTO, L.V.S.; VILEGAS, W.; SALGADO, H.R.N. Controle de qualidade da raiz de *Operculina macrocarpa* (Linn) Urb., Convolvulaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 20.ed., v.1, p.18-22, Jan./Mar. 2010.

MICHELIN, D.C.; MORESCHI, P.E.; LIMA, A.C.; NASCIMENTO, G.G.F.; PAGANELLI, M.O.; CHAUD, M.V. 2005. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, p.316-320, 2005.

MONDIN, C. A. Riqueza genérica e dados biogeográficos das asteráceas brasileiras. In: Conferências Plenárias e Simpósios do 57º Congresso Nacional de Botânica. **Os avanços da Botânica no início do século XXI: morfologia, fisiologia, taxonomia, ecologia e genética.** 1. ed. 2006, Porto Alegre. Anais.Porto Alegre: Pallotti, 2006.

MORAES, M. D.; MONTEIRO, R. A. **Família Asteraceae na Planície Litorânea de Picinguaba.** Dissertação de mestrado. Ubatuba, São Paulo, Hoehnea, v.33, n.1, p.41-78, 2006.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests.** Approved standards M7-A5. Wayne, PA, 2000.

NAVARRO V., VILLARREAL M.L., ROJAS G., XAVIERB L. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. **J. of Ethnopharmacol**, v.53, n.3, p.143-147, 1996.

NIERO R.; MALHEIROS, A.; BITTENCOURT, C.M.S.; BIAVATTI, M.W.; LEITE, S.N.; CECHINEL FILHO, V. Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. In: BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEL FILHO, V.

**Ciências Farmacêuticas:** Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Editora UNIVALE, 2003.

OLIVEIRA, F.Q.; ANDRADE-NETO, V.; KRETTLI, A.U.; BRANDÃO, M.G.L. New evidences of antimalarial activity of *Bidens pilosa* roots extract correlated with polyacetylene and flavonoids. **Journal of Ethnopharmacol**, v.93, p.39-42, 2004.

OLIVEIRA, J. E. Z.; CASARI, V. W. D. Caracterização isozimática de acessos de *Bidens pilosa* L. **R. Bras. Plantas. Med.**, v. 2, n. 1, p. 19-26, 1999.

ONG, E.S. Extraction methods and chemical standardization of botanicals and herbal preparations. **J Chromatogr B**. p. 23-33, 2004.

OSTROSKY, E. A., MIZUMOTO, M. K., LIMA, M. E. L., KANEKO, T. M., NISHIKAWA, S. O., FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.18, p.301-307, 2008.

PENNA, C.; MARINO, S.; VIVOT, E.; CRUAÑES, M.C.; MUÑOZ, J.D.; CRUAÑES, J.; FERRARO, G.; GUTKIND, G.; MARTINO, V. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. **J Ethnopharmacol**, v. 77, p. 37-40, 2001.

PEREIRA, C. B. et al. Atividade Antimicrobiana e Citotoxicidade do extrato bruto obtido de *Morus Alba* L. (Moraceae). **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 33, n. 1, p.133-137, 2012.

PEREIRA, C. B. et al. Physico-chemical quality control and dosage of total polyphenols, flavonoids of *Morus alba* Leaves (Moraceae). **Revista Saúde**, v. 37, n. 2, p. 57-68, 2011.

PEREIRA, R.L.C.; IBRAHIM, T.; LUCCHETTI, L.; SILVA, A.J.R.; MORAES, V.L.G. Immunosuppressive and antiinflammatory effects of methanolic extract and the polyacetylene isolated from *Bidens pilosa* L. **Immunopharmacology**, v.43, p.31-37, 1999.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. São Paulo: Atheneu Editora, 2 ed., p.325, 2003.

PORTAL DA SAÚDE. RENISUS - Relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS. Ministério da Saúde. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus.pdf>. Acesso em: 25 maio de 2015.

PRATT, R; YOUNGKEN, H. **Pharmacognosy**, Philadelphia: Copyright, 1951.

RAHMAN, M.; MOON, S. Antimicrobial phenolic derivatives from *Dendranthema zawadskii* var. *latilobum* kitamura (Asteraceae). **Arch. Pharm. Res.**, v.30, p.1374–1379, 2007.

RANGEL, M.; BRAGANÇA, F.C.R. Representações de gestantes sobre o uso de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.1, p.100-9, 2009.

REN, C.; BEWLEY, J. D. Seed development, testa structure and precocious germination of Chinese cabbage (*Brassica rapa* subsp. *pekinensis*). **Seed Science Research**, v. 8, n.3, p. 385-397, sept. 1998.

RIOS, A.; MANTOVANI, E.; SEDIYAMA, C. **Efeito da temperatura na germinação de frutos polimórficos de *Bidens pilosa* L.** *Malezas*, v. 17, n. 2, p. 20-26, 1989.

SAÚDE-GUIMARÃES, D.A.; FARIA, A.R. Substâncias da natureza com atividade anti-Trypanosoma cruzi. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p.455-465, 2007.

SAHM, D.F., WASHINGTON, J.A. 1991. Antibacterial susceptibility tests: Dilution methods. In: BALOWS, A.; HAUSER, W.J.; HERMANN, K.L.; ISENBERG, H.D.; SHAMODY, H.J. **Manual of clinical microbiology**. 5.ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, p. 1105-1116.

SHARAPIN, N. **Controle de Qualidade de Plantas Mediciniais e Fitofármacos – Prescrições Farmacopéicas**. Boletim Oficial de la corporacion para la investigación Multidisciplinaria y el desarrollo sustentable de la Flora Nacional, v. 2, n. 3, p. 3-7, 2001.

SILVA, F.L.; FISCHER, D.C.H.F; TAVARES, J.F.; SILVA, M.S.; ATHAYDE-FILHO, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Compilation of secondary metabolites from *Bidens pilosa* L. **Molecules**, v.16, p.1070-1102, 2011.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª edição. Porto Alegre/Florianópolis, Ed. Universidade UFRGS/Ed. da UFSC, 2007.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed. da UFSC, 2004.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Ed. da UFRGS, Florianópolis: Ed. da UFSC, 6.ed., p.1102, 2010.

SONAGLIO, D.; GONZÁLEZ-ORTEGA, G.; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis: UFSC, 2003.

SOUZA, M.C. et al. Emergência de *Bidens pilosa* em diferentes profundidades de semeadura. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 27, n. 1, p. 29-34, 2009.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2012.

SUZIN M. **Microrganismos e sua relação com plantas**. Passo Fundo: UPF – Instituto de Ciências Biológicas. (Monografia especialização), p.68, 2004.

TAIZ, L.; ZAYGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed. p.119, 2004.

TAN, P.V.; DIMO, T.; DONGO, E. Effects of methanol, cyclohexane and methylene chloride extracts of *Bidens pilosa* on various gastric ulcer models in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.73, p.415-421, 2000.

TAYLOR, L. The Healing Power of Rainforest Herbs. **Square one Publishers, INC.** New York, p.535, 2004.

TEIXEIRA, M. T.; TEIXEIRA, S. L. Estabelecimento de segmentos apicais de mamoeiro *in vitro*. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 51, n. 296, p. 477-483, 2004.



TEFFO, L.; ADEROGBA, M.; ELOFF, J. Antibacterial and antioxidant activities of four kaempferol methyl ethers isolated from *Dodonaea viscosa* Jacq. var. *angustifolia* leaf extracts. **S. Afr. J. Bot.**, v.76, p.25–29, 2010.

THÉOPHILE, D., TÉLESPHORE, N.B., PAUL, T.V., LAURENT, F., SILVERE, R.V., LOUIS, T.P., CROS, G. Vascular smooth muscle relaxant properties of the leaf methanol extract of *Bidens pilosa* Linn (Asteraceae). **Pharmacology online** , v.3, 180-191p, 2006.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPQ, p.433, 1990.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPQ, v.1, p. 184-185, 1998.

VELTEN, S. B.; GARCIA, Q. S. Efeitos da luz e da temperatura na germinação de sementes de *Eremanthus* (Asteraceae), ocorrentes na Serra do Cipó, MG, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 19, n. 4, p. 753-761, 2005.

VENABLE, D. L.; LEVIN, D.A. Morphological dispersal structures in relation to growth habit in the Compositae. **Plant Systematics and Evolution**, v.143, n. 1-2, p.1-16, 1983.

VILLALOBOS, V. M.; THORPE, T. A. Micropropagación: concepto, metodología y resultados. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, cap.6, p.127-142, 1991.

WAT, C. K.; JOHNS, T.; TOWERS, G. H. N. Phototoxic and antibiotic activities of plants of the Asteraceae used in folk medicine. **J. Ethnopharmacol.** v.2, n.3, p.279-290, 1980.

WENDLING, I.; PAIVA, H. N.; GONÇALVES, W. **Técnicas de produção de mudas de plantas ornamentais**. Viçosa, MG: Aprenda Fácil, v. 3, p.223, 2005.

WHO. **Quality control methods for medicinal plant materials**. <http://whqlibdoc.who.int/publications/1998/9241545100.pdf>, acesso em março de 2015, 1998.

WHO. **Quality control methods for medicinal plant materials. Revised Draft Update.** [http://www.who.int/medicines/services/expertcommittees/pharmprep/QAS05\\_131Rev1\\_QCMethods\\_Med\\_PlantMaterialsUpdateSept05.pdf](http://www.who.int/medicines/services/expertcommittees/pharmprep/QAS05_131Rev1_QCMethods_Med_PlantMaterialsUpdateSept05.pdf), acessada em março de 2015, 2005.

WILSON, E. O. Biodiversity. **National Academy Press**, Washington, 1986.

ZAIDAN, L. B. P.; BARBEDO, C. J. Quebra de dormência em sementes. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Orgs). **Germinação: do básico ao aplicado.** Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 135-146.

ZGODA J.R., PORTER J.R. A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. **Pharm. Biol.**, p.221-225, 2001.