

INFLUÊNCIA DAS EMBALAGENS E DO ARMAZENAMENTO NO CRESCIMENTO MICROBIOLÓGICO E NA CONCENTRAÇÃO DE TANINO EM *SPHAGNETICOLA TRILOBATA* (L.) PRUSKI¹

Iraci Fidelis²

Vicente Wagner Dias Casali³

Nélio Andrade⁴

Junia C. de Lima⁴

Franceline A. Lopes⁴

Nilda de Fátima F. Soares⁴

Paulo Roberto Cecon⁵

RESUMO

O objetivo deste ensaio foi avaliar os efeitos das embalagens, do ambiente e do tempo de armazenamento no crescimento microbiológico e na concentração de tanino em *S. trilobata*. Foram utilizadas embalagens de vidro, polipropileno e papel metalizado. Foi usado o esquema de parcelas subdivididas em delineamento inteiramente ao acaso. Nas parcelas, ficaram as épocas de avaliações, e nas subparcelas, os tipos de embalagens, com três repetições. Nas análises microbiológicas foi utilizada a metodologia proposta pelo Ministério da Agricultura, isto é, o produto seco e moído, preparado a partir de folhas de *Sphagneticola trilobata*, foi acondicionado em embalagens de papel metalizado e armazenado sob refrigeração (5°C). Nessas condições houve a preservação da cor do produto, o percentual de umidade foi menor, a concentração de tanino foi maior, e as contagens médias de fungos filamentosos e leveduras, mesófilos aeróbios e *Staphylococcus aureus* estavam dentro de níveis aceitáveis. No entanto, deve-se preocupar com as

¹ Aceito para publicação em 04.01.2004.

² BR 364, km 329, São Vicente da Serra, 78106-000, Cuiabá – MT. E-mail: iracifid@bol.com.br

³ Av. P. H. Rolfs, Dep. de Fitotecnia, UFV, 36570-000, Viçosa MG.

⁴ Av. P. H. Rolfs, s/n. Dep. de Tecnologia Alimentos, UFV, 36570-000, Viçosa MG.

⁵ Av. P. H. Rolfs, s/n. Dep. de Informática, UFV, 36570-000, Viçosa MG.

condições higiênicas do produto seco e moído, já que a contagem de coliformes totais foi elevada.

Palavras chave: margaridinha, planta medicinal, cultivo orgânico.

ABSTRACT

INFLUENCE OF PACKAGING AND STORAGE ON THE MICROBIOLOGICAL GROWTH AND TANNIN CONCENTRATION IN *Sphagneticola trilobata* (L.) PRUSKI

The objective of this assay was to evaluate the effects of packaging, environment and storage time on the microbiological growth and tannin concentration in *S. trilobata*. Glass, polypropylene and metallic paper packagings were used. A completely randomized design with 3 replications and split-plot scheme was used. The plots included the evaluation times and the split-plots the types of packaging. The methodology proposed by the Ministry of Agriculture was applied for the microbiological analyses. The dried and ground product, prepared from *Sphagneticola trilobata* leaves, was stored under refrigeration (5°C) and with metallic paper packaging. Under these conditions, product color was preserved, moisture percent was lower, tannin concentration was higher and the medium countings of filamentous fungi and yeasts, aerobic mesophyles and *Staphylococcus aureus* were found to be within acceptable values. However, care should be devoted to the sanitary conditions of the dried and ground product, since total coliform counting was high.

Key words: medicinal plant, organic cultivation

INTRODUÇÃO

Sphagneticola trilobata (L.) Pruski, da família Asteraceae, também conhecida por malmequer-do-brejo, picão-da-praia, vedélia, malmequer e margaridinha, é herbácea prostrada, com nós radicantes, caule castanho-avermelhado, folhas opostas, flores amarelas e em capítulos solitários. Sinonímia: *Wedelia paludosa* D.C., *Wedelia trilobata* (L.) Hitch, *Bruphthalmum renpens* Lam., *Complaya trilobata* (L.) Strother, *Seruneum trilobatum* (L.) Kuntze e *Silphium trilobatum* L. (12). É planta nativa do Brasil, ornamental, empregada na formação de relvados, vegetando bem ao sol e à sombra, própria para plantio de encostas. É encontrada freqüentemente em lugares sombrios, úmidos e em praias e terrenos baldios (4). Sua composição química revela a presença de tanino, wedelactona, ácido caurenóico e luteolina como metabólitos secundários majoritários (20).

Há relatos de diversos constituintes químicos nesta planta, como ácido caurenóico, terpenos, ácido endesmanolide e lactonas. O ácido caurenóico, diterpeno bem conhecido, já foi isolado da parte aérea desta espécie, tendo atividades biológicas de antibacteriano, larvicida e tripanomicida (1,11, 23). Ele é potente estimulador da contração uterina (17).

Sphagneticola trilobata é empregada na medicina popular de muitos países no tratamento de dor de cabeça, febre, infecções e patologias do trato respiratório (12, 24). A luteolina tem efeito antitumoral, mutagênico (6) e antioxidante (24). Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional no tratamento de diversas moléstias orgânicas, como diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras e em problemas estomacais (azia, náusea, gastrite e úlceras gástricas), problemas renais e do sistema urinário; bem como em processos inflamatórios em geral (7).

Nas últimas décadas, vários grupos têm investigado as atividades farmacológica e biológica dos taninos. Testes *in vitro*, realizados com extratos ricos em taninos ou com taninos puros, têm identificado diversas atividades dessa substância, como ação bactericida e fungicida (19), antiviral, muluscicida, antitumoral (15) e inibição de enzimas, como as glucosiltransferases de *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus* (8, 16). Acredita-se que as atividades farmacológicas dos taninos são devidas a três características gerais comuns, em maior ou menor grau, aos dois grupos de taninos, condensados e hidrolisáveis: 1) complexação com íons metálicos (ferro, manganês, vanádio, cobre, alumínio, cálcio, dentre outros); 2) atividade antioxidante e seqüestradora de radicais livres; e 3) habilidade de formar complexos com outras moléculas, incluindo macromoléculas como proteínas e polissacarídeos. É possível que os modos de ação dos taninos no tratamento de doenças estejam intimamente ligados a essas três propriedades (7). Várias doenças degenerativas, como câncer, esclerose múltipla e arteriosclerose, e o próprio processo de envelhecimento estão associados a radicais livres. Estudos recentes mostram que vários taninos atuam como captadores de radicais, os quais interceptam o oxigênio ativo, formando radicais estáveis, como no bloqueio da peroxidação de lipídeos em mitocôndrias hepáticas; bloqueio da lipoxigenase em leucócitos; bloqueio da xantinoxidase; e na repressão da formação de radicais livres de ânion superóxido e dos radicais 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH). Dessa forma, os taninos têm possível importância na prevenção e no tratamento de doenças causadas pela peroxidação de lipídeos (21).

Sendo as plantas medicinais classificadas como produtos naturais, a legislação permite que sejam comercializadas livremente, desde que haja condições mínimas de higiene (13). Atualmente, isso não vem sendo observado (3). Depois de colhidas, as plantas medicinais podem perder qualidade nas etapas sucessivas ao processamento; entretanto, ao serem consumidas, devem estar em boas condições de higiene. A inobservância destas condições ocasiona a inutilização de todo o lote na fase de comercialização (18). Quando indevidamente manuseadas, corre-se o risco

de afetar a saúde dos consumidores, pelo fato de estarem contaminadas com microrganismos, por serem mal processadas ou mantidas em embalagens ou locais inadequados (18). O prazo de validade varia de planta para planta, no máximo de seis meses a um ano (22).

O objetivo deste ensaio foi avaliar os efeitos das embalagens, do ambiente e do tempo de armazenamento no crescimento microbiológico e na concentração de tanino em *S. trilobata*.

MATERIAL E MÉTODOS

O produto seco foi obtido de plantas de *Sphagneticola trilobata* cultivadas em viveiro, do campus da Universidade Federal de Viçosa. Após a coleta, a parte aérea das plantas foi lavada, permanecendo à sombra. A espécie apresenta diferentes atividades farmacológicas nos respectivos órgãos (folhas, flores, raízes). Neste presente trabalho, optou-se por analisar o produto seco obtido apenas das folhas. Estas foram separadas dos ramos e submetidas à secagem (11 dias) em câmara de secagem (temperatura de $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$) com aparelho desumidificador, mantendo a umidade relativa do ar próxima de 48%. Foram utilizados três tipos de embalagens: i) frasco de vidro transparente, de 3 cm de diâmetro e 9 cm de altura, com tampa plástica vedada com borracha de silicone; ii) embalagens de polipropileno de 15 x 18 cm, com espessura de 0,10 mm; e iii) embalagens de papel metalizado opaco de 10 x 20 cm, com espessura de 6 μm . O produto em pó foi acondicionado nas embalagens de polipropileno seladas sem vácuo. As embalagens de papel metalizadas foram seladas a vácuo, e as de vidro foram lavadas com água, detergente e água destilada e, em seguida, secas em estufa. As de papel metalizado e polipropileno foram adquiridas no comércio especializado.

Foi utilizado o esquema de parcelas subdivididas em delineamento inteiramente ao acaso. Nas parcelas, ficaram as épocas de avaliação e, nas subparcelas, os tipos de embalagens, com três repetições. Vários dados tiveram valor zero, devido ao não-crescimento de microrganismos. Foram realizados os testes de Cochran e de Lilliefors, visando verificar as hipóteses de homogeneidade das variâncias e a normalidade e independência de erros, sendo feita, por esse motivo, a transformação dos dados (raiz de x). Os dados não seguiam essas pressuposições, assim foi realizada apenas a análise descritiva indicada nos Quadros de 1 a 7. Na análise da concentração de tanino (mg/g), o método foi o espectrofotométrico (2, 14), sendo as análises realizadas no Laboratório de Nutrição Mineral do Departamento de Fitotecnia da UFV.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Quadro 1 mostra os percentuais de umidade nas folhas secas. Nas amostras do produto armazenadas sob refrigeração e acondicionadas em papel metalizado, observaram-se as menores variações no teor de umidade. Nessas embalagens, o teor de umidade, que aos três meses de armazenamento era de 8,8%, elevou-se para 9,6 e 10,5%, aos 9 e 12 meses, respectivamente. A maior alteração no teor de umidade sob refrigeração ocorreu na embalagem de polipropileno. Neste caso, os teores foram de 10,1, 9,0, 10,9 e 12,2% nos períodos de armazenamento de 3, 6, 9 e 12 meses, respectivamente. O percentual de umidade do produto nas embalagens armazenadas em condições ambientes apresentou mais alterações do que aqueles mantidos sob refrigeração. Nas condições ambientes, independentemente da embalagem, o teor de umidade sempre esteve, em média, acima de 10%, sendo os maiores valores 14,2 e 14,4% nas embalagens de vidro e papel metalizado, respectivamente, em 12 meses de armazenamento.

		Período de Armazenamento (Meses)			
		3	6	9	12
Condições ambientes (20-25°C)	Vidro	10,5 ± 0,503	10,7 ± 0,611	11,1 ± 0,416	14,2 ± 0,200
	Polipropileno	12,0 ± 0,200	11,3 ± 0,462	10,7 ± 0,115	13,9 ± 0,643
	Papel metalizado	10,9 ± 0,230	10,7 ± 0,503	11,1 ± 0,611	14,4 ± 0,529
Condições refrigeradas (5°C)	Vidro	9,2 ± 0,200	8,4 ± 1,058	10,5 ± 0,231	11,7 ± 1,553
	Polipropileno	10,1 ± 0,115	9,0 ± 0,400	10,9 ± 0,231	12,2 ± 1,442
	Papel metalizado	8,8 ± 1,039	8,7 ± 0,115	9,6 ± 0,346	10,5 ± 0,702

O Quadro 2 mostra o número de fungos filamentosos e leveduras no produto seco e moído, expresso em UFC.g⁻¹. Esse número apresentou variações durante o armazenamento. Constatou-se tendência de diminuição do número desses microrganismos no produto armazenado em condições ambientes, acondicionado em embalagens de vidro e papel metalizado. Outra observação importante é que o produto, em condições refrigeradas, apresentou número maior do que em temperatura ambiente, independente da embalagem ou do período de armazenamento. No entanto, notou-se a tendência de manutenção do número dos microrganismos no produto durante o período de armazenamento.

		Período de Armazenamento (Meses)			
		3	6	9	12
Condições ambientes (20-25°C)	Vidro	4,5 ± 0,9	3,1 ± 0,7	2,0 ± 0,5	1,7 ± 0,2
	Polipropileno	2,4 ± 0,2	2,0 ± 0,3	2,2 ± 0,7	2,3 ± 0,6
	Papel metalizado	2,5 ± 0,3	2,0 ± 0,5	1,8 ± 0,1	1,6 ± 0,2
Condições refrigeradas (5°C)	Vidro	4,9 ± 0,1	6,2 ± 0,2	5,0 ± 0,1	5,3 ± 0,3
	Polipropileno	5,4 ± 0,3	3,8 ± 0,1	4,5 ± 0,6	4,8 ± 0,1
	Papel metalizado	5,5 ± 0,4	3,9 ± 0,8	5,0 ± 0,1	5,3 ± 0,2

O Quadro 3 mostra a evolução do número de coliformes totais nas folhas secas durante o armazenamento. O resultado foi, na maioria das vezes, semelhante àqueles encontrados em fungos filamentosos e leveduras. Assim, as contagens de coliformes totais apresentaram tendência de decréscimo, com algumas oscilações, quando as folhas foram armazenadas em condições ambientes e acondicionadas em embalagens de polipropileno ou papel metalizado. O número desses microrganismos aumentou no produto refrigerado, em todas as embalagens utilizadas após o período de incubação. O número de coliformes totais foi maior quando o produto foi armazenado sob refrigeração, independente da embalagem ou do período.

		Período de Armazenamento (Meses)			
		3	6	9	12
Condições ambientes (20- 25°C)	Vidro	3,3 ± 0,3	3,7 ± 0,1	4,1 ± 0,3	2,2 ± 0,9
	Polipropileno	2,0 ± 0,5	3,5 ± 0,7	1,8 ± 1,2	2,3 ± 0,8
	Papel metalizado	3,9 ± 1,2	3,2 ± 1,0	3,5 ± 0,7	3,2 ± 0,3
Condições refrigeradas (5°C)	Vidro	4,7 ± 0,2	4,2 ± 2,8	6,0 ± 0,6	6,0 ± 0,2
	Polipropileno	3,0 ± 0,0	6,0 ± 0,6	4,1 ± 0,3	4,1 ± 1,1
	Papel metalizado	3,0 ± 0,0	5,2 ± 1,1	4,6 ± 1,5	6,1 ± 0,2

O Quadro 4 mostra o número de bactérias aeróbicas mesófilas no produto seco, de acordo com as condições de armazenamento, o período e os tipos de embalagens. Pelos resultados, verifica-se que não houve variação no número de mesófilos aeróbios no produto armazenado em temperatura ambiente, independente do tipo de embalagem ou do período. O número deste grupo microbiano situou-se em torno de 10^5 UFC.g⁻¹. Já no produto armazenado sob refrigeração, verificou-se aumento de um ciclo logarítmico quando o produto foi acondicionado nas embalagens de vidro e de papel metalizado. As contagens, inicialmente de 10^5 UFC.g⁻¹ aumentaram para 10^6 UFC.g⁻¹ no final do período de armazenamento.

QUADRO 4 - Logaritmo decimal e desvio-padrão do número de UFC/g de bactérias aeróbicas mesófilas em extrato seco de *Sphagneticola trilobata* armazenada em condições ambientes e sob refrigeração, nas embalagens de vidro, polipropileno e papel metalizado

		Período de Armazenamento (Meses)			
		3	6	9	12
Condições ambientes (20-25°C)	Vidro	5,0 ± 0,0	4,5 ± 0,3	4,6 ± 0,3	4,8 ± 0,2
	Polipropileno	5,0 ± 0,1	4,7 ± 0,2	4,7 ± 0,0	4,7 ± 0,2
	Papel metalizado	5,0 ± 0,0	4,6 ± 0,1	4,9 ± 0,1	4,7 ± 0,2
Condições refrigeradas (5°C)	Vidro	5,0 ± 0,0	5,7 ± 1,1	5,4 ± 0,4	6,2 ± 0,1
	Polipropileno	5,5 ± 0,8	6,4 ± 0,2	5,0 ± 0,8	5,2 ± 1,1
	Papel metalizado	5,1 ± 0,2	5,6 ± 1,2	5,9 ± 0,5	6,3 ± 0,3

O Quadro 5 mostra as contagens de *Staphylococcus spp.* no produto seco, de acordo com as condições de armazenamento e as embalagens durante o período. Deve-se ressaltar que no Quadro 5 encontram-se os números de colônias que cresceram no meio seletivo Baird-Parker ágar, apresentando-se negras pela redução do telurito de potássio e pela produção de lecitinase, observada pelo precipitado branco com halo transparente em volta das colônias. Isso significa que as contagens se referem ao gênero *Staphylococcus* e não à espécie *S. aureus*. Pelos resultados, verificou-se que houve aumento do número de microrganismos deste gênero bacteriano no produto em todas as condições de armazenamento, independente do tipo de embalagem. Em média, o aumento destes microrganismos foi de 10 vezes no armazenamento em condições ambientes e de 100 vezes sob refrigeração.

QUADRO 5 - Logaritmo decimal e desvio-padrão do número de UFC/g de *Staphylococcus* em extrato seco de *Sphagneticola trilobata* armazenada em condições ambientes e sob refrigeração, nas embalagens de vidro, polipropileno e papel metalizado

		Período de Armazenamento (Meses)			
		3	6	9	12
Condições ambientes (20-25°C)	Vidro	2,1 ± 0,2	2,2 ± 0,2	2,6 ± 0,6	3,0 ± 0,4
	Polipropileno	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	3,0 ± 0,8	2,7 ± 0,3
	Papel metalizado	2,0 ± 0,0	2,4 ± 0,1	2,7 ± 0,2	3,5 ± 0,6
Condições refrigeradas (5°C)	Vidro	2,0 ± 0,0	2,8 ± 0,8	4,1 ± 0,3	3,4 ± 0,6
	Polipropileno	2,0 ± 0,0	2,1 ± 0,2	3,1 ± 0,5	3,7 ± 0,2
	Papel metalizado	2,0 ± 0,0	2,8 ± 0,5	2,8 ± 0,8	3,8 ± 0,7

O Quadro 6 resume o teste de catalase, que permite a confirmação ou não da presença de *Staphylococcus aureus*. Dos microrganismos isolados no meio Baird-Parker ágar, apenas pequeno percentual foi positivo no teste de catalase e nenhum isolado foi positivo no teste de coagulase, indicando não se tratar de *S. aureus*. Pode-se, assim, estimar que o número de *S. aureus* nas amostras, independente da condição e do período de armazenamento, estava abaixo de 10^2 UFC.g⁻¹.

QUADRO 6 - Logaritmo decimal e desvio-padrão do número de UFC/g de *Staphylococcus* (catalase) em extrato seco de *S. trilobata* armazenada em condições ambientes e sob refrigeração, nas embalagens de vidro, polipropileno e papel metalizado

		Período de Armazenamento (Meses)			
		3	6	9	12
Condições ambientes (20-25°C)	Vidro	< 2,0 ± 0,0	1,8 ± 0,3	1,7 ± 0,2	1,7 ± 0,2
	Polipropileno	< 2,0 ± 0,0	< 2,0 ± 0,0	1,9 ± 0,3	1,9 ± 0,1
	Papel metalizado	< 2,0 ± 0,0	1,9 ± 0,1	2,0 ± 0,0	1,6 ± 0,4
Condições refrigeradas (5°C)	Vidro	< 2,0 ± 0,0	< 2,0 ± 0,0	1,9 ± 0,1	1,6 ± 0,5
	Polipropileno	< 2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	1,9 ± 0,1	1,9 ± 0,2
	Papel metalizado	< 2,0 ± 0,0	1,7 ± 0,3	2,0 ± 0,0	1,8 ± 0,2

O Quadro 7 indica o efeito das embalagens, do ambiente e tempo de armazenamento sobre a degradação de tanino. Sob refrigeração, houve

maior preservação de tanino do que em condições ambientes. Sob refrigeração, a concentração de tanino nas embalagens e no período de armazenamento ficou entre 1,10 e 1,64%, com média acima de 1%. A embalagem de papel metalizado preservou melhor a concentração de tanino durante armazenamento, sendo, no final de 3, 6, 9 e 12 meses, de 1,34; 1,13; 1,35 e 1,64%, respectivamente. A maior preservação da concentração de tanino no produto em pó, aos 12 meses, representa 49% a mais de tanino em relação à embalagem de vidro, que em seis meses foi a que menos preservou a concentração de tanino. Em condições ambientes, a concentração de tanino foi maior aos três meses na embalagem de papel metalizado, com 1,35%, que correspondeu a 42% acima da menor concentração nas embalagens de polipropileno aos seis meses de armazenamento, com 0,97%.

		Período de Armazenamento (Meses)			
		3	6	9	12
Condições ambientes (20-25°C)	Vidro	1,088 ± 0,085	1,065 ± 0,065	1,025 ± 0,057	0,977 ± 0,072
	Polipropileno	1,035 ± 0,020	0,975 ± 0,009	0,947 ± 0,007	0,977 ± 0,060
	Papel metalizado	1,352 ± 0,033	1,195 ± 0,010	1,086 ± 0,052	1,162 ± 0,019
Condições refrigeradas (5°C)	Vidro	1,140 ± 0,071	1,097 ± 0,104	1,237 ± 0,037	1,240 ± 0,009
	Polipropileno	1,178 ± 0,097	1,170 ± 0,028	1,182 ± 0,072	1,263 ± 0,150
	Papel metalizado	1,340 ± 0,018	1,129 ± 0,073	1,352 ± 0,039	1,638 ± 0,500

CONCLUSÕES

1) O produto seco e moído, preparado a partir de folhas de *Sphagneticola trilobata*, foi melhor quando armazenado sob refrigeração (5°C) e em embalagens de papel metalizado.

2) O percentual de umidade foi menor, a concentração de tanino foi maior, e os números médios de fungos filamentosos e leveduras (cerca de 10^5 UFC.g⁻¹), mesófilos aeróbios (entre 10^5 e 10^6 UFC.g⁻¹) e *Staphylococcus aureus* ($< 10^2$ UFC.g⁻¹) encontram-se dentro de valores aceitáveis.

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

1. ALVES, T.M.C.; CHAVES, P.P.G.; SANTOS, L.M.S.T.; NAGEM, T.J.; MURTA, S.M.F.; CERAVOLO, I.P.; ROMANHA, A.J. & ZANI, C.L. A diterpene from *Mikania abtusata* active on *Trypanosoma cruzi*. *Planta Medical*, 61:85-7. 1995.
2. ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST - A.O.A.C. Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemistry. 11 ed. Washington, D.C.: 1970. 1015p.
3. BACCHI, E.M. Controle de qualidade de fitoterápicos. In: DI STASI, L.C. Plantas medicinais: arte e ciência. Botucatu, SP: UNESP, 1996. p. 169-86.
4. CORREIA, M.P. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. v.I – VII, Brasília, Ministério da Agricultura, I.B.D.F., reimpressão, 1984.
5. CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; MACHADO, M.I.L.; KRUSH, A. & SILVA, M.G.V. Volatile constituents of two *Wedelia* species. *Journal of Essential Oils Research*, 5:439-41, 1993.
6. CZECZOT, H.; TUDEK, B.; KUSZTELAK, J.; SZYMEZYK, T.; DOBROWOLSKA, B.; GLINKOWSKA, G.; MALINOWSKI, J. & STRZELECKA, H. Isolation and studies of the mutagenic activity in the Ames test of flavonoids naturally accruing in medical herbs. *Mutation Research*, 240:209-16. 1990.
7. HASLAM, E. & CAI, Y. Plant polyphenols (vegetable tannins): gallic acid metabolism. *Natural Product Letters*, p. 41-6, 1994.
8. HATTORI, M.; KUSUMOTO, L.T.; NAMBA, T.; ISHIGAMI, T. & HARA, Y. Effect of tea polyphenols on glucan synthesis by glucosyl transferase from *Streptococcus mutans*. *Chemical Pharmacology Bulletin*, 37:717-20, 1990.
9. HERTWIG, I.F.V. Plantas aromáticas e medicinais. São Paulo, Editora Ícone, 1986.
10. HOWARD, M.D. Cotton boll weevil antifeedant activity and antifungal activity (*Rhizoctonia solani* and *Phythium ultimum*) of extracts of the stems of *Wedelia biflora*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 38:1591-4. 1990.
11. LAWANDE, W.; MACFOY, C.; OKECJ, M.; DELLE MONACHE & MARINI BETTOLO, G.B. Kaurenoic acid from *Aspilia pluriseta*. *Fitoterapia*, 56:126-8. 1985.
12. LORENZI, H. Plantas Daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitárias e tóxicas. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2000. 608p.
13. MARTINS, E.R. & CASTRO, D.M. et al. Plantas medicinais. Imprensa Universitária – Viçosa, UFV, 1994.
14. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária: Métodos de Análise Microbiológica para Alimentos. 1991-1992.
15. OKUDA, T.; YOSHIDA, T. & HATANO, T. Ellagitannins as active constituents of medicinal plants. *Planta Med.*, 55:117-22, 1989.
16. OOSHIMA, T.; MINAMI, T.; AONO, W.; IZUMATANI, A.; SOBUE, S.; FIJIWARA, T.; KAWABATA, S. & HAMADA, S. Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in SPF rats infected with *Streptococcus mutans*. *Caries Res.*, 27:124-9, 1993.
17. PAGE, J.E. Biologically active diterpenes from *Aspilia mossambicensis*, a chimpanzee medicinal plant. *Phytochemistry*, 31:3437-9, 1992.
18. PREGNOLATTO, W. & PREGNOLATO, N.P. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Editora do Instituto Adolfo Lutz, vol. 1, 3ª ed., São Paulo, SP, 1985, p.25.
19. SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30:3875-83, 1991.
20. SCHLEMPER, S.R. de M.; CORDEIRO, F. & CECHINEL FILHO, V. Atividade antibacteriana das frações semipurificadas e dos princípios ativos isolados da *Wedelia paludosa*. Ação alelopática de *Wedelia paludosa*. In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 15, 1998, Águas de Lindóia. Resumos... Águas de Lindóia, s.n., 1998. p. 53.

21. SCHOLZ, E. Pflanzliche Gebsoffe: Pharmakologie un Toxikologie. Deutsch Apotheker Zeitung, 134(34):3167-79, 1994.
22. SILVA, I.; FRANCO, S.L.; MOLINARI, S.L.; CONEGERO, C.I. & MIRANDA, M.H. Organismo Humano e Utilização de Plantas Mediciniais. Cascavel: Assoeste, 1995, 203p.
23. SLIMECTAD, R.; MARSTON, A.; MOVI,S. & HOSTETTMANN, K. Larvicidal constituents of *Melantheria albinervia*. Planta Medica, 61:562-3. 1995.
24. TOREL, J. & CILLARD, P. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. Phytochemistry, 25:383-6. 1986.