

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP CÂMPUS DE
JABOTICABAL**

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Vernonia ferruginea*:
ABORDAGENS ALELOPÁTICAS E
METABOLÔMICAS**

Carita Liberato do Amaral
Engenheira Agrônoma

2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP CÂMPUS DE
JABOTICABAL**

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Vernonia ferruginea*:
ABORDAGENS ALELOPÁTICAS E
METABOLÔMICAS**

Carita Liberato do Amaral

Orientador: Prof. Dr. Pedro Luís da Costa Aguiar Alves

Coorientadores: Prof. Dr. Fernando Batista da Costa

Dr. Marcelo Claro de Souza

**Tese apresentada à Faculdade
de Ciências Agrárias e
Veterinárias – Unesp, Câmpus
de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do
título Doutor em Agronomia
(Produção Vegetal)**

2017

A485e Amaral, Carita Liberato do
Estudo fitoquímico de *Vernonia ferruginea*: Abordagens
alelopáticos e metabolômicas / Carita Liberato do Amaral. – –
Jaboticabal, 2017
iv, 135 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
Orientador: Pedro Luís da Costa Aguiar Alves
Coorientadores: Fernando Batista da Costa, Marcelo Claro de
Souza
Banca examinadora: Sonia Cristina Juliano Gualtieri, Dagoberto
Martins, Ricardo Victória Filho, Mariluce Pascoina Nepomuceno
Bibliografia

1. Atividade biológica. 2. Metabólitos secundários. 3. Ecologia
funcional. 4. Ecologia química. 5. Extratos vegetais. 6. Planta daninha.
I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 632:51:631.95

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Diretoria
Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Vernonia ferruginea*: ABORDAGENS
ALELOPÁTICAS E METABOLÔMICAS

AUTORA: CARITA LIBERATO DO AMARAL

ORIENTADOR: PEDRO LUÍS DA COSTA AGUIAR ALVES

COORIENTADOR: FERNANDO BATISTA DA COSTA

COORIENTADOR: MARCELO CLARO DE SOUZA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA
(PRODUÇÃO VEGETAL), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. PEDRO LUÍS DA COSTA AGUIAR ALVES

Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



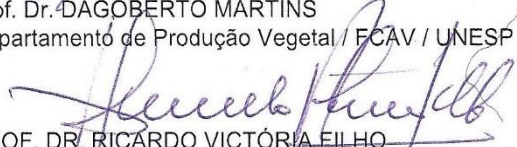
Profa. Dra. SONIA CRISTINA JULIANO GUALTIERI

Departamento de Botânica / UFSCar - São Carlos/SP



Prof. Dr. DAGOBERTO MARTINS

Departamento de Produção Vegetal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



PROF. DR. RICARDO VICTÓRIA FILHO

Departamento de Produção Vegetal / ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA - Piracicaba-SP



Pós-doutoranda MARILUCE PASCOINA NEPOMUCENO

Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 20 de fevereiro de 2017.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

CARITA LIBERATO DO AMARAL - nascida em 02 de março de 1981, em Jaboticabal - SP, filha de José Pedro Liberato do Amaral e Aparecida de Jesus Silva do Amaral. Graduiu-se Engenheira Agrônoma pelo Câmpus de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista (UNESP), no ano de 2010. Em 2006 desenvolveu projeto de extensão pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - PIBIC/CNPq. Logo após, em 2007 desenvolveu pesquisa de Iniciação Científica com bolsa da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP. Desde 2007, atua em pesquisa na área de Produção Vegetal, principalmente em fisiologia vegetal, competição, plantas daninhas, herbicidas, alelopatia e levantamento fitossociológico. Obteve o título de Mestre em Agronomia na área de Produção Vegetal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), no ano de 2013. No mesmo ano, ingressou no curso de Doutorado nessa mesma instituição, iniciando sua pesquisa sobre abordagens alelopáticas e metabolômicas de uma espécie nativa do Cerrado, com bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior - Capes por um ano e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, por dois anos. Nos últimos anos tem participado de eventos científicos nacionais e internacionais na sua área de atuação, bem como da organização de eventos nacionais. A autora também publicou e colaborou na publicação de artigos científicos em revistas nacionais e internacionais.

DEDICO

Aos meus pais José Pedro e Aparecida, ao meu irmão Leonardo e ao Christian, pelo amor e apoio durante todos estes anos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pela força que me dá todos os dias.

Aos meus pais José Pedro e Aparecida, ao meu irmão Leonardo e ao meu tio Luís, luzes do meu caminho, pelo amor, carinho, incentivo incondicional, estímulo, constante dedicação, apoio sem restrições e por estarem sempre ao meu lado, sem os quais nada disso aconteceria.

À minha querida avozinha Rosa, e aos meus avozinhos Arnaldo, Francisca e Orlando (*in memoriam*), bênçãos em minha vida, que sempre foram meus exemplos a seguir e a fonte da minha força, coragem e fé.

Ao meu namorado Christian, que nunca mediu esforços, tempo, dedicação e paciência para me ajudar no trabalho e na vida, sempre me apoiando nos momentos bons e ruins, com quem aprendi muito e pelo qual tenho grande amor, carinho e admiração.

À minha família do coração, Nelira, Francisco e Michelle, pelo carinho, apoio, amizade e pelas inúmeras e calorosas acolhidas.

Ao Prof. Dr. Pedro, pela sua valiosa orientação, pela amizade, compreensão, apoio, incentivo, ensinamentos transmitidos, segurança e sabedoria, que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Fernando, pelos valiosos conselhos e por ter me recebido tão bem no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP).

Ao Dr. Marcelo, pela orientação e pelos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Silvano e ao Prof. Dr. Eduardo, pelo carinho e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

À FAPESP (Processo nº 2012/25298-0) e à CAPES pela concessão das bolsas de estudo para a realização do curso de doutorado.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP), por meio do Programa de Produção Vegetal, que possibilitou a realização do curso de doutorado.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (USP), local do desenvolvimento de parte do meu doutorado.

Ao Prof. Dr. Jairo e a Profa. Dra. Niede da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (USP), pelo apoio, suporte científico para o desenvolvimento de análises.

À Juciléia, Andreísa e Mariluce, pela colaboração indispensável nas atividades diárias, na redação da tese e artigos, e principalmente, por todos os ótimos momentos que passamos juntas ao longo desses anos.

Aos amigos do LAPDA Amanda, Ana, Anne, Arthur, Bruna, Caetano, Cecília, Felipe, Fernanda, Gabriel, Gianmarco, Isa, Izabela, Juliano, Lívia, Mariana, Marina, Matheus, Micheli, Nathalia, Nelson, Neriane, Paulo, Pedro, Rafael, Rodrigo, Sérgio, Thiago, Vinícius, Wendy e Willians, pela colaboração, carinho e amizade.

Aos amigos do laboratório de Farmacognosia (FCFRP-USP), pelos ensinamentos, boa convivência e apoio.

Aos amigos Federico e Gari, pelo companheirismo e por toda a ajuda prestada durante a condução das análises, contribuição valiosa neste trabalho.

Ao amigo Ricardo, pela colaboração e ajuda em análises fitoquímicas.

Aos membros da banca da defesa, Profa. Dra. Sonia Cristina Juliano Gualtieri, Prof. Dr. Dagoberto Martins, Prof. Dr. Ricardo Victória Filho e Dra. Mariluce Pascoina Nepomuceno, pelas discussões, conselhos, incentivos e momentos valiosos.

Ao José Valcir, Sônia, Eliane, Jamil e Rosy, pela amizade, dedicação, competência profissional, carinho e disposição em ajudar na condução dos experimentos e realização das análises.

À Angélica, Mário, Valtinho e Luís, pelo carinho e imensa ajuda prestada durante a minha estadia no laboratório de Farmacognosia (FCFRP-USP), conversando, explicando e esclarecendo as minhas dúvidas.

Aos funcionários da FCAV-UNESP e da FCFRP-USP.

Aos amigos Alexandre, Aline, Camila, Carina, Dani, Fezinha, Guilherme, Jonas, Juliano, Marcos, Mirela, Paulo, Rafael e Rodrigo pela amizade sincera, pelas conversas, inúmeros conselhos, encontros tão agradáveis e carinho de sempre.

A todos aqueles que não foram citados aqui, mas que direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS E HIPÓTESE.....	5
2.1. Objetivos específicos	5
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	6
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1. Fracionamento	15
4.1.1. Coleta do material vegetal	15
4.1.2. Obtenção dos extratos e frações.....	15
4.1.3. Bioensaio de germinação	17
4.1.4. Delineamento experimental e análise estatística	18
4.1.5. Perfis químicos dos extratos e frações.....	18
4.2. Estresse.....	19
4.2.1. Disponibilidade hídrica	19
4.2.2. Tipos de solo	20
4.2.3. Intensidade luminosa.....	22
4.2.4. Concentrações de alumínio.....	23
4.2.5. Bioensaio de germinação	24
4.2.6. Delineamento experimental e análise estatística	25
4.3. Análise metabolômica.....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1. Fracionamento	27
5.2. Teste de germinação	66
5.2.1. Disponibilidade hídrica	66
5.2.2. Tipos de solo	76
5.2.3. Intensidade luminosa.....	87
5.2.4. Concentrações de alumínio.....	98
5.2.5. Frequência da atividade alelopática dos testes de germinação	107
5.3. Análise metabolômica.....	109
5.3.1. Disponibilidade hídrica	112
5.3.2. Tipos de solo	114
5.3.3. Intensidade luminosa.....	115

5.3.4. Concentrações de alumínio.....	118
6. CONCLUSÃO	121
7. REFERÊNCIAS.....	122

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Vernonia ferruginea*: ABORDAGENS ALELOPÁTICAS E METABOLÔMICAS

RESUMO - As condições ambientais, assim como o contraste sazonal nas fitofisionomias do Cerrado entre a época seca e úmida colaboram para a diversificada síntese e seleção de metabólitos secundários em plantas. Os metabólitos secundários atuam como uma interface química entre plantas e o meio, desta forma a sua síntese pode ser comumente alterada pelas condições ambientais. Fatores como temperatura, disponibilidade hídrica, luminosidade, características do solo, nutrientes e poluição atuam diretamente sobre a produção e liberação desses compostos. Os microrganismos do solo podem transformar os compostos tóxicos liberados, desativando-os ou dando origem a compostos ainda mais tóxicos, assim como esses compostos podem alterar as características e atributos do solo quando presentes em quantidades adequadas. Dentre as plantas nativas do Cerrado destaca-se a espécie *Vernonia ferruginea*, uma agressiva infestante de pastagem, que possui indícios de produção de compostos com potencial tóxico. Desta forma, esta pesquisa foi desenvolvida para verificar a atividade tóxica de *V. ferruginea* e se a mudança de algumas características como disponibilidade hídrica, tipo de solo, condições de luminosidade e concentração de alumínio no solo influenciam a produção desses compostos. Para tal, plantas de *V. ferruginea* foram desenvolvidas sobre diferentes condições para posterior extração e/ou fracionamento do material vegetal para verificação de atividade biológica por meio de bioensaios e identificação de grupos químicos. Considerando os resultados dos parâmetros de germinabilidade e de desenvolvimento das espécies testadas é possível indagar sobre a possibilidade de *V. ferruginea* ter a capacidade de liberar substâncias tóxicas, uma vez que, consequências diretas da presença desses compostos nos extratos foram verificadas no bioensaio, como: a inibição/redução da germinação de sementes, injúria ou necrose no sistema radicular e redução do desenvolvimento e do acúmulo de massa seca das plântulas. Os resultados também dão base para constatar que algumas interações da espécie com as alterações nas suas condições de desenvolvimento causam desvios de rotas biossintética de metabólitos modificando e/ou potencializando sua capacidade fitotóxica.

Palavras-chave: atividade biológica, compostos secundários, ecologia funcional, ecologia química, extratos vegetais, planta daninha

PHYTOCHEMICAL STUDY OF *Vernonia ferruginea*: ALELOPATHIC AND METABOLOMIC APPROACHES

ABSTRACT - The environmental conditions, as well as the seasonal contrast in the Cerrado phytophysionomies between the dry and wet seasons, contribute to the diversified synthesis and selection of secondary metabolites in plants. Secondary metabolites act as a chemical interface between plants and the environment, so their synthesis can be commonly altered by environmental conditions. Factors such as temperature, water availability, luminosity, soil characteristics, nutrients and pollution act directly on the production and release of these compounds. Soil microorganisms can transform the released toxic compounds, deactivating them or giving rise to even more toxic compounds, as these compounds can alter the characteristics and attributes of the soil when present in adequate amounts. Among the native plants of the Cerrado, the species *Vernonia ferruginea*, an aggressive pasture weed, stands out, with indications of production of compounds with toxic potential. Thus, this research was developed to verify the toxic activity of *V. ferruginea* and if the change of some characteristics such as water availability, soil type, light conditions and aluminum concentration in the soil influence the production of these compounds. For this, plants of *V. ferruginea* were developed on different conditions for later extraction and / or fractionation of the vegetal material for verification of biological activity by means of bioassays and identification of chemical groups. Considering the results of the parameters of germinability and development of the tested species it is possible to inquire about the possibility of *V. ferruginea* being able to release toxic substances, since direct consequences of the presence of these compounds in the extracts were verified in the bioassay, such as: The inhibition / reduction of seed germination, injury or necrosis in the root system and reduction of the development and accumulation of dry mass of the seedlings. The results also provide evidence that some interactions of the species with changes in their developmental conditions cause biosynthetic pathway deviations of metabolites modifying and / or potentiating their phytotoxic capacity.

Keywords: biological activity, secondary compounds, functional ecology, chemical ecology, plant extracts, weed

1. INTRODUÇÃO

Muitos relatos indicam que a agressividade das plantas daninhas em ecossistemas agrícolas tem sido classificada como um efeito da "competição". Entretanto, algumas evidências apontam que essa característica pode ser consequência não apenas da competição, mas também da liberação de substâncias químicas produzidas pelo metabolismo secundário das plantas, ou de ambos (DEL FABBRO; PRATI, 2015).

Acredita-se que muitas espécies sejam capazes de sintetizar metabólitos de defesa permitindo que um indivíduo obtenha vantagem competitiva sobre o outro.

Esses metabólitos podem ser acumulados em resposta a vários fatores que causam estresse na planta e podem constituir uma das principais razões para o estabelecimento ou não de uma espécie em determinado ambiente.

A baixa de mobilidade no reino vegetal resultou no desenvolvimento de estratégias de defesa alternativa em muitas espécies, como a produção de metabólitos secundários para superar as situações de estresse e adaptar-se a ambientes em mudança (MAQBOOL et al., 2013).

Os metabólitos secundários podem alterar a fisiologia da germinação, do crescimento e do desenvolvimento das espécies alvo, modificando assim a composição das plantas vizinhas e a microbiota do solo, e consequentemente o processo de sucessão ecológica (HABERMANN et al., 2016). As interações químicas mediadas por metabólitos secundários são conhecidas como alelopatia e a síntese desses metabólitos faz parte das diversas estratégias de defesa selecionadas ao longo da evolução, podendo ou não ser o principal mecanismo de resistência de um determinado indivíduo.

Estudos dessas substâncias, conhecidas como aleloquímicos, tem experimentado grande crescimento por caracterizar os processos bioquímicos encarregados da modificação da estrutura de comunidades de plantas, definindo a produtividade e o desenvolvimento agrícola e florestal, e esclarecendo comportamentos invasivos de alguns indivíduos (CIPOLLINI et al., 2012).

A alelopatia é um fenômeno muito complexo e a composição ou a localização das substâncias aleloquímicas na planta é influenciada por fatores inerentes a espécie, assim como por fatores ambientais (SCOGNAMIGLIO et al., 2015).

Em ecossistemas naturais ou agrícolas as plantas estão expostas a fatores bióticos e abióticos que exercem forças seletivas ao longo do processo evolutivo e induzem o aparecimento de vias biossintéticas de produção de substâncias secundárias, responsáveis por desempenharem importantes funções nas complexas interações ecológicas entre indivíduos (CIPOLLINI et al., 2012).

Os compostos químicos produzidos pelo metabolismo secundário das plantas estão presentes em todos os tecidos, incluindo raízes, rizomas, caules, colmos, cascas, folhas, sementes, flores e frutos e até mesmo grãos de pólen ou tricomas (TEIXEIRA DA SILVA et al., 2015).

Espécies com alta plasticidade fenotípica como *Vernonia ferruginea* Less., *Vernonia polyanthes* Less., *Bidens sulphurea* (Cav.) Sch. Bip., *Synedrellopsis grisebachii* Hieron. & Kuntze, *Wedelia paludosa* DC., *Trifolium repens* L., *Lotus corniculatus* L. e *Eragrostis plana* Nees, encontram-se em ecossistemas agrícolas como infestantes agressivas, e com grande capacidade de formar populações densas e dominantes.

Muitas espécies beneficiam-se da associação entre agressividade competitiva e produção de substâncias alelopáticas para suprimir o desenvolvimento de outras espécies, sejam elas culturas agrícolas ou espécies silvestres, favorecendo o estabelecimento de suas populações (WANDSCHEER et al., 2011). Tais constatações evidenciam a necessidade de investigações alelopáticas para a elucidação dos processos envolvidos durante a ocupação dessas espécies, não somente como fenômeno biológico, mas também para descobrir substâncias com potencialidade de uso como herbicidas ou outro defensivo agrícola. O conhecimento das plantas com atividade fitotóxica é uma estratégia altamente viável para a descoberta de herbicida (TABAN; SAHARKHIZ, 2015).

Aliado aos conhecimentos do potencial alelopático da espécie, o conhecimento aprofundado da biologia, ecologia e processos bioquímicos das culturas e plantas daninhas torna-se indispensável como base de informações para o desenvolvimento

de estratégias adequadas de manejo das espécies daninhas, bem como sua potencial exploração comercial.

Apesar dos primeiros relatos remeterem os efeitos de fitotoxidade a Theophrastus, 300 a.C, os estudos para descrever os mecanismos bioquímicos relacionados a alelopatia só foram intensificados nos últimos anos (CIPOLLINI et al., 2012). Poucos estudos foram realizados com os milhares de compostos naturais existentes, dada a complexidade bioquímica e ao comportamento biológico entre espécies, ainda pouco compreendido (FERREIRA; AQUILA, 2000; REIGOSA et al., 2013). Adicionalmente a isso, atualmente, o contexto de alelopatia atrelado as plantas daninhas receberam maior atenção no cenário ecológico, visto que estas podem alterar a estrutura e função de ecossistemas inteiros e também influenciar na biodiversidade de sistemas (DEL FABBRO; PRATI, 2015) indicando a necessidade de mais informações sobre essas espécies invasoras, visto que muitas das informações já consolidadas são baseadas em mera especulação e pouca evidência científica (CIPOLLINI; SCHRADIN, 2011).

Alguns pesquisadores relatam a necessidade de estudos da influência de compostos alelopáticos liberados por plantas nativas sobre o crescimento de outras plantas (RIZZI et al., 2016). Enquanto algumas pesquisas descrevem que a possibilidade de algumas plantas obter vantagens competitivas devido à liberação de metabólitos no meio é um novo desafio para estudos com plantas nativas (MIRANDA et al., 2015).

Conforme mencionado, algumas espécies vegetais são capazes de produzir substâncias químicas com propriedades tóxicas. Tais substâncias são provenientes do metabolismo secundário e, quando liberadas no meio, podem interferir no desenvolvimento e no crescimento de outras espécies vegetais.

A produção de metabólitos secundários com propriedades tóxicas é uma característica inata de algumas espécies, mas muitos estresses ambientais são capazes de romper sua homeostase metabólica, aumentando a produção desses metabólitos (SHULAEV et al., 2008), o que pode ser acompanhado por estudos metabolômicos. A homeostase bioquímica é muito complexa e envolve todas as reações do metabolismo, uma vez que representa os ajustes metabólicos necessários para que o indivíduo possa permanecer funcional (PRISCO; GOMES FILHO, 2010).

Entender e controlar a produção de certos metabólitos impulsiona uma gama de novas possibilidades para a gestão agrícola e, conseqüentemente, a descobertas tecnológicas, propostas, modelos ou estratégias geradas a partir desse conhecimento podem promover uma agricultura viável e economicamente competitiva (GRAÑA et al., 2016).

Os estudos metabólicos situam-se, neste contexto, entre as grandes plataformas tecnológicas e analíticas que permitem estudar o perfil dos principais metabólitos secundários de um dado organismo (HALL, 2006; BRAZ-FILHO, 2010).

A análise metabolômica destaca-se entre as ferramentas que auxiliam a compreensão da relação entre fenótipo e genótipo (TIKUNOV et al., 2005), visto que o metaboloma é um conjunto de metabólitos produzidos pelas células, dessa maneira, representa o produto final da expressão gênica, capaz de determinar o fenótipo químico da célula ou do tecido em modificações do meio ambiente ou genéticas (VILLAS-BÔAS et al., 2005). Sendo assim, constitui em uma importante ferramenta para o conhecimento sobre os produtos químicos com propriedades alelopáticas e seus mecanismos de síntese (SHULAEV et al., 2008; DEY et al., 2012), além de contribuir de forma significativa para o estudo da biologia de estresse em plantas, identificando subprodutos do metabolismo sobre estresse (SHULAEV et al., 2008).

A metabolômica é uma ferramenta poderosa para o monitoramento das mudanças de uma espécie em resposta aos vários estímulos ambientais, e seus resultados fornecem uma idéia do funcionamento das plantas sob condições especificadas revelando os mecanismos moleculares subjacentes às respostas aos estresses (RODZIEWICZ et al., 2014).

Deste modo, os estudos metabolômicos podem ser uma importante ferramenta no reconhecimento de compostos que sinalizam a percepção de estresses (SHULAEV et al., 2008). O conhecimento do perfil metabólico das espécies pode auxiliar na identificação de produtos bioativos que possibilitem a descoberta de novos agroquímicos, os quais possuem interesse econômico indiscutível. O estudo de metabólitos envolvidos na resistência de plantas a estresses abióticos permite a incorporação de técnicas modernas para a criação de variedades melhor adaptadas às condições ambientais e é fundamental para o desenvolvimento de sistemas mais produtivos e sustentáveis.

2. OBJETIVOS E HIPÓTESE

Baseado na hipótese de que muitas espécies daninhas pertencentes à família Asteraceae apresentam ampla distribuição geográfica, elevado potencial invasivo e competitivo, incluindo na região dos cerrados (Brasil central e regiões periféricas), que podem ser atribuídos à produção de substâncias químicas tóxicas que são liberados no meio e que são capazes de interferir no desenvolvimento das culturas agrícolas, de acordo com as condições ambientais, os objetivos deste projeto são: a) avaliar se *Vernonia ferruginea* interfere na germinação e no crescimento inicial de plantas teste; b) verificar se estresses ambientais (abióticos) em *V. ferruginea* são condicionantes do grau dessa interferência; c) investigar se a interferência imposta por *V. ferruginea* possui contribuição alelopática; d) investigar a plasticidade metabólica de *V. ferruginea* frente à estresses abióticos.

2.1. Objetivos específicos

Ampliar os conhecimentos sobre a ação inibitória de *V. ferruginea*, sobre a germinação e desenvolvimento inicial de seis plantas teste e confirmar a seguinte hipótese: *V. ferruginea* libera substâncias químicas que favorecem o seu estabelecimento no Cerrado e em sistemas agrícolas.

Avaliar se o crescimento inicial de plantas de *V. ferruginea* submetidas a diferentes disponibilidades hídrica, condições de luminosidade, concentrações de alumínio no solo ou tipos de solo podem alterar a produção de metabólitos secundários e modificar o potencial fitotóxico do extrato hidroetanólico das folhas e das raízes da planta doadora, *V. ferruginea*, sobre a germinação e crescimento inicial de *Urochloa brizantha*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

Durante a evolução algumas espécies desenvolveram mecanismos agressivos sobre outras espécies e aperfeiçoaram seus mecanismos de sobrevivência para assegurar sua existência ainda que em situações adversas. Alta produção de sementes e uma eficiente dispersão define bem a agressividade de uma espécie em termos de ocupação de novas áreas.

Além disso, a adaptação aos estresses climáticos, fisiográficos e bióticos também estão ligados ao sucesso na competitividade pelos recursos do meio (NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, 1971). Tais fatores associados a ecologia química explicam as interações alelopáticas e a competição observada nos ecossistemas naturais ou manejados (MONQUERO, 2014).

Estudos mostram o potencial tóxico de algumas plantas daninhas sobre as plantas cultivadas e proporcionam evidências convincentes da sua importância para a sua maior habilidade competitiva (SILVA et al., 2016).

A alelopatia é um processo químico ecológico em que os metabólitos secundários, liberados por uma planta, afetam a germinação e o desenvolvimento de outras plantas num mesmo ambiente (SALMAN et al., 2017), favorecendo maior adaptação evolutiva. Esse fenômeno é conceituado como um efeito inibitório ou benéfico, que pode ocorrer direta ou indiretamente de uma planta sobre outra, via produção de compostos químicos que são liberados no ambiente (SANTOS et al., 2015).

Em um ecossistema, as plantas competem dentro da sua espécie e com outras espécies da comunidade pelos recursos do meio e por espaço (MAQBOOL et al., 2013). Os aleloquímicos são produzidos como ferramentas que pode auxiliar a sobrevivência de algumas espécies em ecossistemas naturais ou manejados (MAQBOOL et al., 2013).

A alelopatia tem como uma das principais funções eliminar a competição por recursos mediante a liberação de compostos aleloquímicos (RIZZI et al., 2016). A alelopatia diferencia da competição pelo fato de que na primeira a interferência ocorre pela liberação de compostos no meio, enquanto na segunda é devido a remoção ou

redução de fatores essenciais ao desenvolvimento, tais como água, luz, nutrientes (REIGOSA et al., 2013).

A alelopatia está envolvida em interações intra e interespecíficas que podem afetar a estabilização e a manutenção de inúmeras formas de vida no ambiente (SANTOS et al., 2015).

Os aleloquímicos desempenham um papel significativo na formação de padrões vegetacionais, bem como a formação de comunidades (SANDERSON et al., 2013). Os mecanismos de produção e liberação de substâncias fitotóxicas foram adquiridos pelas espécies ao longo do curso da evolução, assim como a sua influência direta e indiretamente nas plantas adjacentes (SANTOS et al., 2015).

Essas substâncias químicas afetam tanto os ecossistemas naturais como os agrícolas, alterando mecanismo ecológico da vegetação, incluindo sua ocorrência, crescimento, sucessão, formação climax, e também a estrutura das comunidades, influenciando na dominância de espécies, (SANDERSON et al., 2013; MIRANDA et al., 2015), abundância e a diversidade, assim como o manejo e a produtividade de culturas (TEIXEIRA DA SILVA et al., 2015), e tem potencial de causar enormes danos econômicos ou ambientais (CIPOLLINI; SCHRADIN, 2011). Tais substâncias também são as principais responsáveis pelo fracasso do estabelecimento e a persistência de algumas espécies vegetais, funcionando, muitas vezes, como um mecanismo de controle (SANTOS et al., 2015).

As substâncias tóxicas liberadas por algumas espécies também podem causar grande impacto em plantações comerciais devido a sua ação na degradação do solo e na redução da produção e da biodiversidade (TEIXEIRA DA SILVA et al., 2015).

Apesar da importância do conhecimento sobre as espécies invasoras, poucos são os estudos que relacionam a síntese de compostos aleloquímicos presentes em uma planta com a sua capacidade de invadir e se estabelecer em diferentes ambientes (CIPRIANI et al., 2014).

Nos diferentes ecossistemas, plantas utilizam a estratégia de liberar esses compostos produzidos pelo metabolismo secundário para se proteger da competição exercida por outras plantas ao redor (MAQBOOL et al., 2013). A liberação pode ser a partir de folhas, raízes e serrapilheira em decomposição (MIRANDA et al., 2014).

É importante destacar que a vegetação de uma certa área pode ter um padrão de sucessão condicionado às espécies pré-existentes e aos compostos químicos que estas liberam no meio ambiente, e desta maneira, o impacto, em um determinado ecossistema, de uma planta daninha pode ser avaliado por meio de análises químico-ecológicas (CIPRIANI et al., 2014).

Os aleloquímicos variam na planta em composição, concentração e localização, podendo ser excretados para o meio, solo ou ar, de forma ativa ou simplesmente lixiviados (GRISI et al., 2016; HABERMANN et al., 2016). Grande parte dos aleloquímicos são liberados pela exsudação radicular (MORAES et al., 2012; DEL FABBRO; PRATI, 2015; GULZAR; SIDDIQUI, 2015), afetando de forma direta ou indireta a ação de microorganismos e as interações planta/planta (MORAES et al., 2012; GULZAR; SIDDIQUI, 2015).

Após a liberação no ambiente, os aleloquímicos podem ser responsáveis por uma grande variedade de efeitos nas plantas (MORAES et al., 2012; GULZAR; SIDDIQUI, 2015). Esses efeitos incluem a alteração da densidade populacional e do desenvolvimento das plantas (SOUZA et al., 2006), atraso ou inibição completa da germinação de sementes, paralisação do crescimento, injúria no sistema radicular, clorose, murcha e morte das plantas (MORAES et al., 2012), alterações nas propriedades do solo e de suas condições nutricionais, mudanças nas populações e/ou atividade dos microorganismos (CIPOLLINI et al., 2012; MORAES et al., 2012; DEL FABBRO; PRATI, 2015; GRISI et al., 2016; HABERMANN et al., 2016) e também podem afetar a dinâmica do nitrogênio no solo, alterando as relações entre o nitrogênio livre, a fixação de nitrogênio e a adição de matéria orgânica (SOUZA et al., 2006).

Depois de absorvidos pela planta, os aleloquímicos podem afetar as estruturas citológicas e ultra-estruturais; os hormônios, considerando alterações nas concentrações e no balanço entre os diferentes hormônios; membranas e sua permeabilidade; absorção de minerais; movimento dos estômatos, síntese de pigmentos e fotossíntese; respiração; síntese de proteínas; atividade enzimática; relações hídricas e condução; material genético, induzindo alterações no DNA e RNA (GRISI et al., 2016; HABERMANN et al., 2016; ANDRADE et al., 2017); e a germinação, conservação e dormência de sementes (SANTOS et al., 2015). Desta

forma, os aleloquímicos possuem vários mecanismos de ação, sendo que uma substância pode ainda ter mais de um sítio de ação (REIGOSA et al., 2006).

O efeito alelopático pode ser potencializado por meio da união entre as condições ambientais e o efeito dos metabólitos secundários em si (KOBAYASHI, 2004; IGANCI et al., 2006). Alterações ambientais que causem algum tipo de estresse à planta (biótico ou abiótico) podem provocar alterações nos níveis de produção de aleloquímicos (SILVA et al., 2014).

A resposta das plantas aos estresses é um fenômeno muito complexo e apresentam características individualizadas entre as espécies (RODZIEWICZ et al., 2014). A qualidade e quantidade de metabólitos secundários produzidos pelas plantas variam de acordo com as espécies, a localização geográfica, o clima e as estações do ano (TABAN; SAHARKHIZ, 2015).

Diversos fatores abióticos, como pH e características nutricionais dos solos, condições hídricas, temperatura e radiação solar podem ser considerados fatores estressantes para muitas espécies (IMATOMI et al., 2013). Tais fatores exercem efeitos diretos sobre a produção, intensidade e liberação de compostos alelopáticos (GATTI et al., 2014) e podem desencadear relações sinérgicas modificando os níveis de aleloquímicos nas plantas (SANDERSON et al., 2013). As condições de estresse frequentemente aumentam a produção de aleloquímicos, aumentando o potencial de interferência alelopática (MAQBOOL et al., 2013).

As alterações na produção do aleloquímico, embora muitas vezes pontuais, podem mudar rotas inteiras, com pequenas modificações nos processos, visto que o metabolismo consiste numa série de reações com vários controles do tipo “*feedback*” (MAQBOOL et al., 2013).

Os grupos de substâncias com potencial alelopático incluem compostos fenólicos, flavonóides, alcalóides, terpenóides, glicosídeos cianogênicos, compostos derivados de acetatos, quinonas, saponinas, dentre outros (REIGOSA et al., 2006).

Várias espécies de Asteraceae são estudadas pela sua composição química e possível fonte de substâncias alelopáticas, tais como: *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (MIRANDA et al., 2015), *Heterothalamus psiadioides* Less (LAZAROTTO et al., 2014), *Baccharis patens* Baker (SILVA et al., 2014), *Parthenium hysterophorus* L. (MIRANDA et al., 2014; SHEHZAD et al., 2016), *Mikania scandens* (L.) Willd. (DEY et

al., 2012), *Ageratum conyzoides* L. (IDU, 2014), *Eclipta alba* (L.) Hassk. (GULZAR; SIDDIQUI, 2015), *Achillea millifolium* (ALIPOUR et al., 2012), *Conyza cannadensis* (QUEIROZ et al., 2012), *Erigeron annuus* (L.) Pers. (TUNAITIENÉ et al., 2017), *Tagetes patula* L. (KUMAR et al., 2017), *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (SILVA et al., 2016), *Ophryosporus charua* (Griseb.) Hieron. (BRAVETTI et al., 2017), dentre outras. Os estudos com Asteraceae têm evidenciado a existência de lactonas sesquiterpênicas (MIRANDA et al., 2015), ácidos clorogênicos, flavonóides (IGUAL et al., 2013), terpenos (OTUSANYA; ILORI, 2012; MIRANDA et al., 2014), esteroides, saponinas, taninos (ABEYSIRI et al., 2013), lignóides, carotenóides (ZANON et al., 2008), e alcalóides (ALIPOUR et al., 2012; DEY et al., 2012; OTUSANYA; ILORI, 2012).

O gênero *Vernonia* Schreb pertence à família Asteraceae, tribo Vernonieae, subtribo Vernoniinae e possui uma grande diversidade de espécies (IGUAL et al., 2013), e tem distribuição Panropical (MARTUCCI et al., 2014); caracterizada quimicamente pela presença de flavonóides e terpenóides (IGUAL et al., 2013), é pouco exigente em relação ao tipo de solo e muito competitiva em solos de Cerrado (YAMASHITA; ALBERGUINI, 2011). No Cerrado, o gênero *Vernonia* encontra-se entre os mais abundantes, com aproximadamente 158 espécies distribuídas pelas diferentes fisionomias desse mosaico de biomas (MELO; PEREIRA, 2014/2015).

A espécie *Vernonia ferruginea* é típica do Cerrado (OLIVEIRA et al., 2015b), ocorre no Peru, Bolívia, Paraguai e está amplamente distribuída no Brasil, exceto na região sul, com presença em campo sujo seco e transição cerrado sentido restrito - vereda (HATTORI; NAKAJIMA, 2011). Esta espécie também se desenvolve em beiras de estradas e áreas não agriculturáveis, onde conseguem propagar-se facilmente, infestando lavouras, por meio de sementes transportadas pelo vento. A espécie é popularmente conhecida como assa-peixe ou matapasto, destaca-se como uma das mais importantes plantas daninhas em ecossistemas de pastagens (NEVES NETO et al., 2013).

Em pastagens, muitas plantas daninhas possuem maior habilidade no recrutamento de recursos do meio quando comparadas as plantas forrageiras. Esta característica proporciona a sobrevivência das plantas daninhas em ambientes expostos aos mais variados tipos e intensidades de limitações e gera vantagens

competitivas com a consequente ocupação de espaços significativos nas áreas, além da redução da capacidade de lotação das pastagens (YAMASHITA; ALBERGUINI, 2011).

Um dos maiores problemas encontrados na condução de um sistema agrícola economicamente importante, como a pastagem, é a elevada infestação de plantas daninhas. Segundo Kremer et al. (2016), a presença de plantas daninhas em pastagens é uma das principais dificuldades enfrentadas atualmente por pecuaristas e agricultores.

A distribuição e a população de muitas espécies de plantas daninhas tem apresentado um aumento alarmante em diversas culturas, uma vez que possuem colonização mais rápida e sobrevivem bem em situações adversas (ALI et al., 2017).

Elevadas infestação de plantas daninhas aumentam o custo de produção e causam reduções acentuadas na produtividade, quer pela competição direta por fatores de produção ou pela liberação de metabólitos secundários no meio (MENDONÇA et al., 2016).

Muitas destas plantas daninhas produzem substâncias alelopáticas e desta forma interferem no desenvolvimento normal de algumas culturas, provocando modificações na população das demais plantas (KREMER et al., 2016).

Estudos sobre a dinâmica da regeneração natural em fragmentos perturbados e em áreas degradadas demonstram que *V. ferruginea* destaca-se entre as principais espécies encontradas (FERREIRA et al., 2009).

Um fato que merece destaque é o relato de produtores e agrônomos de que essa espécie vem se dispersando rapidamente em áreas de cultivo de soja na região do cerrado, fato esse que pode estar associado à tolerância ou à resistência a herbicidas, como acontece com outras Asteraceae (p.e. *Conyza* spp. e *Tridax procumbens*), ou até mesmo ao seu efeito alelopático. Ou ainda, como observado para outras plantas daninhas, devido a abundância da sua ocorrência, causada essencialmente pela baixa regulação das espécies concorrentes (ALI et al., 2017).

Contudo, apesar da crescente importância dessa espécie, até então não foi quantificado o seu grau de interferência em culturas de interesse agrônomo.

Desde a década de 60 a vegetação do cerrado vem sendo substituída, principalmente por plantios de soja e pastagens (SOUZA; HABERMANN, 2012), em

função da eminente necessidade de se aumentar a produção de alimentos, visto a demanda com aumento da população. Devido ao seu elevado potencial de dispersão anemocórico, esta espécie possui elevado potencial para recolonizar os cerrados substituídos por culturas agrícolas, infestando essas áreas. Dessa forma, esta espécie é considerada uma importante planta infestante de pastagens, beiras de estradas e terrenos baldios, acarretando prejuízo aos produtores e demais segmentos da sociedade. Em experimento com capim-tanzânia (*Panicum maximum* Jacq.), conduzido na divisa dos municípios de Astorga e Maringá, no Noroeste do Estado do Paraná, Brasil, na altura de manejo do pasto de 20 cm, verificou a presença de *V. ferruginea* (CANTO et al., 2008). Apesar de ser considerada uma espécie daninha, *V. ferruginea* é amplamente utilizada na medicina popular e estudos pré-clínicos tem mostrado atividade antiulcerogênica (OLIVEIRA et al., 2012) e também possui potencial apícola (RIBEIRO et al., 2008).

Devido a sua ampla distribuição e agressividade, *V. ferruginea* é considerada uma espécie daninha muito além dos cerrados, sendo considerada uma espécie invasora em culturas anuais e perenes. Alguns pesquisadores acreditam que o aumento da ocorrência dessa espécie em pastagens esteja relacionado à alta viabilidade das sementes depositadas nos bancos de sementes e a sua elevada capacidade de recrutamento em clareiras formadas no meio das pastagens (FERREIRA et al., 2007), mas também por apresentar alguns indícios de efeito alelopático. Além de competir com as pastagens cultivadas, acredita-se que *V. ferruginea* seja capaz de competir com outras gramíneas mais agressivas, facilitando sua dispersão e recrutamento.

No complexo Pantanal, *V. ferruginea* invade e cresce de forma agressiva, dominando e modificando habitats naturais perturbados (ALHO et al., 2011). Plantas daninhas afetam a estabilidade de monoculturas, alteram a estrutura de comunidades e ecossistemas, e destacam-se como a segunda principal causa de redução da biodiversidade global seguida apenas pela fragmentação de habitat (MIRANDA et al., 2015).

Em pesquisas com alelopatia, torna-se cada vez mais necessário o conhecimento da composição dos extratos e associação aos efeitos encontrados em

bioensaios, identificando as substâncias tóxicas (INDERJIT; DEL MORAL, 1997) ou benéficas (MACÍAS et al., 1997) às plantas.

A produção dos metabolitos pode ter influência de diversos fatores ambientais como, estresse hídrico, deficiência de nutrientes, quantidades excessivas de alumínio no solo, variações na temperatura e na radiação solar, situações comumente encontradas em áreas de cerrados (IMATOMI et al., 2013; HABERMANN et al., 2016).

A metabolômica está diretamente relacionada ao genótipo de um indivíduo, a sua fisiologia e a fatores ambientais, o que permite fazer a correlação entre as características fenótipo e genótipo do indivíduo (TYAGI et al., 2010).

Os estudos metabolômicos contribuem para a elucidação dos efeitos causados por estresses bioquímicos e ambientais sobre as plantas (SCOGNAMIGLIO et al., 2015). Esta abordagem pode ser aplicada como uma ferramenta promissora na elucidação de estresses causados em algumas plantas daninhas com alterações de fatores abióticos. A ecometabolômica ou metabolômica ambiental aborda as vantagens do estudo da interação dos fatores bióticos e abióticos entre os organismos e o ambiente e também o conhecimento funcional desses organismos e suas adaptações a nível molecular (SCOGNAMIGLIO et al., 2015).

Estresses ambientais (p. e. alterações nas características do solo, disponibilidade hídrica, luz, espaço, etc.) podem interferir no desenvolvimento vegetal, sendo necessário um ajustamento das vias metabólicas dessa espécie à situação ambiental vigente (SHULAEV et al., 2008).

O IPCC (2013) mostra que devido as mudanças climáticas, o regime de chuvas tem se modificado ao longo dos anos, comprometendo a produção agrícola brasileira devido a secas e inundações irregulares. Dessa forma, é importante se atentar a possibilidade de estresses abióticos causados às culturas e principalmente às plantas daninhas pelas variações pluviométricas, uma vez que a água dos solos, provenientes das chuvas, é considerada um dos principais fatores de acidificação do solo, podendo baixar o pH do solo para valores não ideais para sua exploração agrônômica, elevando a disponibilidade de Al^{+3} e, em situações extremas, proporcionar alagamento das raízes (ROBSON, 1989), o que acarretaria severas alterações metabólicas capazes de potencializar a produção e liberação de substâncias alelopáticas no meio ambiente. Baseado neste cenário futuro, muitas espécies invasoras como *V. ferruginea*, que

atualmente causam danos econômicos moderados, podem despontar como espécies altamente problemáticas.

No Cerrado, as espécies crescem em solos com baixa disponibilidade nutricional, ácidos, com altos níveis de alumínio, e variação sazonal de disponibilidade hídrica, situações que podem ser determinantes na produção e liberação de metabólitos (IMATOMI et al., 2013).

Em muitas espécies nativas crescendo em ambiente natural, como é o caso de algumas espécies de cerrado, a síntese de compostos alelopáticos pode variar nas diferentes estações do ano, com a deficiência e/ou toxicidade de minerais, ou ainda em função dos níveis irradiância, sugerindo uma adaptação do sistema de defesa às flutuações ambientais.

Os estudos dos principais metabólitos envolvidos no crescimento ou desenvolvimento de plantas em resposta a variadas condições de estresse e a interpretação adequada desses dados permitem a identificação de biomarcadores potenciais ligados à tolerância a fatores ambientais adversos e são importantes para a introdução de características biologicamente desejáveis as espécies agrícolas (RODZIEWICZ et al., 2014).

A prospecção de substâncias aleloquímicas produzidas por diversas espécies vegetais encontram-se entre as possibilidades de ferramentas para controle e manejo de plantas daninhas (MENDONÇA et al., 2016).

As pesquisas sobre alelopatia também são de grande importância ecológica e agrícola, permitindo a compreensão dos mecanismos envolvidos na produção e liberação de compostos tóxicos, que podem sofrer variações de acordo com os fatores genéticos, climáticos ou antropogênicos.

Os avanços no conhecimento da influência de fatores ambientais na produção e liberação de compostos alelopáticos podem levar a uma manipulação vantajosa da planta (GHERSHENZON, 1984) e contribuir para o controle de espécies indesejáveis, resultando em sistemas mais equilibrados, com efeitos positivos sobre a produtividade e longevidade das espécies cultivadas (SANTOS et al., 2015). E as substâncias naturais com atividade biológica são importantes fontes de novas moléculas que podem ser utilizadas no desenvolvimento de produtos com potencial fitotóxico (IMATOMI et al., 2013).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Fracionamento

4.1.1. Coleta do material vegetal

Folhas completamente expandidas e raízes de uma população de *V. ferruginea* em plena fase vegetativa, desenvolvidas nas dependências do Departamento de Biologia Aplicada a Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP), no município de Jaboticabal, São Paulo, foram coletadas de plantas com cerca de 210 dias após a emergência. Após a coleta, o material foi transferido para uma estufa de circulação forçada de ar com temperatura máxima de 40°C, por 120 horas. O material previamente seco foi moído em micro-moinho tipo Wiley (Marconi, TE-840, Brasil), equipado com peneira malha 60 mesh.

4.1.2. Obtenção dos extratos e frações

As folhas e raízes moídas de *V. ferruginea* pesando, separadamente, 1000 g foram maceradas por 72 horas em 5 L de uma mistura etanol/água (7:3, v/v), com troca de solvente a cada 24 horas. A fração hidroetanólica de cada extrato foi evaporada sob pressão reduzida e o sobrenadante liofilizado, obtendo-se assim o extrato hidroetanólico das folhas (EF) e das raízes (ER) de *Vernonia ferruginea*. Após a completa evaporação dos solventes, o rendimento foi determinado considerando-se a massa dos extratos das folhas e das raízes obtida em cada extração. O rendimento total do extrato hidroetanólico da folha foi de 183,9 g e do extrato hidroetanólico da raiz foi de 199,4 g.

Os extratos hidroetanólicos (EF e ER) foram submetidos a cromatografia líquida a vácuo (CLV), cuja metodologia foi baseada no trabalho de Coll e Bowden (1986). Foi utilizada sílica 60 H (Merck) na proporção de 2:1 (300 g de sílica e 150 g da fração) em uma coluna de vidro, com placa sinterizada e 16 cm de diâmetro interno, acoplada a uma bomba a vácuo.

O fracionamento originou 5 frações do extrato das folhas e 6 frações do extrato das raízes, utilizando, como eluentes, n-hexano (Hx), diclorometano (DCM), acetato de etila (ACOEt), metanol (MeOH), água e a mistura binária metanol-água (apenas para o extrato da raiz), com volume gasto para cada eluente de 2000 mL, com exceção da mistura binária metanol-água que utilizou 1000 mL. Após o fracionamento, todas as frações obtidas na CLV foram rotaevaporadas e/ou liofilizadas e mantidas em freezer para uso posterior.

Na Tabela 1 está representado a quantidade das frações das folhas (F) e das raízes (R) de *V. ferruginea* em grama e o rendimento em porcentagem em relação à quantidade dos extratos hidroetanólicos das folhas e das raízes submetidos a cromatografia líquida a vácuo (CLV).

Tabela 1. CLV da fase hidroetanólica do extrato de maceração radicular (R) e foliar (F) e rendimento em gramas das frações obtidas do extrato hidroetanólico de folhas e raízes secas de *V. ferruginea* na extração com solventes orgânicos: n-hexano (Hx), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e água.

Eluente	Volume (mL)	Fração	Massa (g)	Rendimento (%)
Hx	2000	R1	15,3472	10,23
DCM	2000	R2	17,9637	11,98
AcOEt	2000	R3	7,7414	5,16
MeOH	2000	R4	39,4759	26,32
MeOH:Água (1:1)	1000	R5	23,7353	15,82
Água	2000	R6	32,6528	21,77
Eluente	Volume (mL)	Fração	Massa (g)	Rendimento (%)
Hx	2000	F1	9,2653	6,18
DCM	2000	F2	7,8351	5,22
AcOEt	2000	F3	5,9164	3,98
MeOH	2000	F4	24,2897	16,19
MeOH:Água (1:1)	--	--	--	--
Água	2000	F5	20,1583	13,44

As frações aquosas e metanólicas tiveram maior rendimento, quando comparados as demais frações, devido à afinidade de polaridade desses solventes com açúcares e produtos glicosilados presentes nos materiais vegetais. As frações de

n-hexano e diclorometano tanto para extrato hidroetanólico da folha como da raiz apresentaram rendimento intermediário e a fração proveniente de acetato de etila obteve rendimento reduzido em relação às demais.

4.1.3. Bioensaio de germinação

Os extratos EF e ER e as 11 frações obtidas da CLV foram diluídos em oito concentrações (0, 12,5, 25, 50, 100, 200, 400 e 800 ppm). Após o preparo, os extratos foram caracterizados quanto a osmolalidade (osmômetro Wescor, modelo 5500), pH (pHmetro Portátil Digital PM602 PLUS Completo) e condutividade elétrica (condutivímetro de Bancada Digital C708 PLUS Completo). Como a osmolalidade dos extratos encontravam-se em uma faixa de 93 a 101 mmol/Kg não foi necessário adicionar um controle relativo Polietilenoglicol (PEG).

Como controle negativo (0 ppm) foi utilizado um tratamento com água destilada e como controle positivo, uma solução contendo herbicida sintético oxifluorfen, nas mesmas concentrações e com o mesmo número de repetições que as soluções com os extratos. O pH dos controles foi ajustado de acordo com os resultados obtidos nas determinações dos extratos.

Os biotestes foram feitos com diásporos do mesmo lote de *Helianthus annuus* (girassol) híbrido Aguará 4, *Lactuca sativa* L. cv. Crespa Mônica (FELTRIN) (alface), *Raphanus sativus* cv. Crimson Gigante (FELTRIN) (rabanete), *Sorghum bicolor* (sorgo) híbrido CVSW 80007, *Triticum aestivum* (trigo) cv. Cortex e *Urochloa brizantha* cv. Marandu (braquiária).

Os testes de germinação foram feitos utilizando 20 diásporos distribuídas em cada placa de Petri (9 cm de diâmetro) forradas com papel filtro Whatman Nº2 e umedecidas com 6 mL de solução nas diferentes concentrações de cada extrato. Nos grupos controle negativo e positivo também foram utilizados 6 mL de água destilada e da solução de herbicida, respectivamente. Os bioensaios foram conduzidos em câmara de germinação, a 25°C, e fotoperíodo de 12 horas.

Ao término das avaliações, segundo adaptações de Brasil (2009), foi contabilizado o número de diásporos germinados para a determinação da porcentagem de germinação e mensurados, com auxílio de papel milimetrado, o

comprimento das raízes e do hipocótilo das plântulas. As raízes e partes aéreas foram armazenadas separadamente em sacos de papel e secos em estufa de circulação de ar (40 °C) para determinação da massa seca.

4.1.4. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento empregado foi o inteiramente casualizado, com seis repetições. Os dados germinabilidade foram submetidos primeiramente às pressuposições da análise de variância, quando foi verificada a normalidade dos dados pelo teste de Shapiro Wilk e homogeneidade de variância pelo teste de Bartlett, ambos ao nível de 5% de probabilidade. Posteriormente, foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. O comprimento e a massa seca da parte aérea e da raiz foram analisados através de regressão polinomial. A escolha dos modelos foi feita com base no coeficiente de determinação relativo aos tratamentos e na análise de resíduos. Os dados de comprimento e massa seca da parte aérea e das raízes das plântulas foram calculados em porcentagens de inibição/estímulo em relação ao controle negativo, onde zero indica o mesmo valor do controle negativo, valores positivos indicam estímulo, e valores negativos inibição. E os dados de porcentagem de germinação, comprimento e massa seca da parte aérea e raiz das plântulas também foram utilizados para verificar a frequência de atividade alelopática proporcionada pelos extratos e pelas frações na concentração de 100 ppm em relação ao controle negativo, sendo que 1 indicava a presença e 0 a ausência de atividade alelopática, considerando os resultados obtidos por meio de análise de variância.

4.1.5. Perfis químicos dos extratos e frações

Após o “*screening*” biológico, os extratos e as frações foram analisados por espectrometria de massas, na qual foi utilizada a fonte de ionização e electrospray (ESI) para a determinação do perfil químico dos extratos e das frações. As aquisições foram realizadas no modo positivo e negativo, para determinar com esta ferramenta as massas moleculares dos metabólitos secundários produzidos por *V. ferruginea*,

com o intuito de submete-los a um estudo de desreplicação e também realizar uma comparação entre os perfis e a diversidade metabólica dessas frações.

Os extratos e as frações foram diluídos em acetonitrilo: água (1:1 v:v) + 0,05% de ácido fórmico e filtrados utilizando uma membrana de 0,22 µm. A concentração final dos extratos e das frações foram de 1 mg mL⁻¹. Para a injeção em UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS, Orbitrap (Thermo™), com uma coluna Kinetex xb-C18 (Phenomenex™), utilizou-se um método de gradiente. O eluente "A" foi composto por água ultrapura com 0,05% de ácido fórmico (v: v) e o eluente "B" foi composto por acetonitrila (grau LC-MS) com 0,05% de ácido fórmico (v: v). O volume de injeção foi de 4 µL. Para a aquisição de dados de massa, realizou-se uma varredura completa nos modos positivo e negativo usando a tensão de pulverização em 3,6 e 3,2 Kvolts (modos positivo e negativo respectivamente), temperatura do aquecedor de 300°C, temperatura capilar a 320°C, (Unidade arbitrária) e gás auxiliar 11 (unidade arbitrária) (ambos os modos positivo e negativo) (dados não publicados de Rosa, A.L.).

4.2. Estresse

4.2.1. Disponibilidade hídrica

Aquênios de *Vernonia ferruginea* coletados no município de Jabaticabal-SP foram colocados para germinar em recipientes com capacidade de 7 L, nas dependências do Departamento de Biologia Aplicada a Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP), no Câmpus de Jaboticabal, São Paulo. Quando as plântulas de *V. ferruginea*, semeadas previamente, encontravam-se com uma média de 5,4 cm de altura, 13 folhas e 0,36 cm de diâmetro do caule foram transplantadas uma plântula por unidade experimental e submetidas a cinco tratamentos de disponibilidade hídrica, simulando precipitações correspondendo a 100, 200, 300, 400 e 500 mm distribuídos no mês, com um controle sem restrição hídrica (1000 mm), por 120 dias.

Cada unidade experimental foi constituída por recipientes com capacidade de 3 L, preenchido com solo e areia na proporção de 3:1 (v/v). Após o preenchimento dos vasos coletou-se amostra composta do substrato (solo-areia) para caracterização

química e física de rotina (Tabela 2) segundo os procedimentos para análise de solos de EMBRAPA (1997).

Tabela 2. Propriedades físicas e químicas do solo utilizado no experimento de disponibilidade hídrica. Jaboticabal - São Paulo.

Parâmetro do solo									
pH	MO	P _{resina}	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	H+Al ³⁺	SB	T	V
(CaCl ₂)	MO (g dm ⁻³)	(mg dm ⁻³)			(mMol _c dm ⁻³)				(%)
6,2	15,0	96,0	5,7	54,0	23,0	10,0	82,7	92,7	89,0
	Argila	Limo		Areia fina		Areia grossa		Textura	
	379	101		187		333		Argilosa	

Soma de Bases (SB) = K⁺ + Ca²⁺ + Mg²⁺; Acidez total a pH 7 = H+Al³⁺; Capacidade de troca de cátions total a pH 7 (T) = SB + H+Al³⁺; Saturação por bases (V) = (100 * SB) / T. Tamanho dos componentes da fase sólida do solo: Argila: < 0,002 mm ou 2 µ; Limo: 0,02 a 0,002 mm; Areia fina: 0,2 a 0,02 mm; Areia grossa: 2 a 0,2 mm.

Ao término do período experimental foi realizada a coleta das folhas e das raízes das plantas. As amostras foliares e radiculares foram colocadas em sacos de papel e submetidas à temperatura de 40°C em estufa de secagem com ventilação forçada durante 120 h. As folhas e raízes de *V. ferruginea*, após a secagem, foram moídas em micro-moinho tipo Wiley (Marconi, TE-840, Brasil), equipado com peneira malha 60 mesh.

A umidade dos substratos decorrente dessa simulação foi monitorada por meio de sensor Hidro Farm (HFM2030 - Falker) instalado nos vasos. No decorrer do experimento também foram monitorados a radiação solar, a temperatura (°C) e a umidade relativa do ar (%) com um Data Logger, e a temperatura do solo (°C), com o auxílio de termômetro eletrônico digital (Salvterm 700).

Foram confeccionadas 6 repetições por volume de precipitação, que foram dispostas no esquema inteiramente casualizado.

4.2.2. Tipos de solo

Plântulas de *V. ferruginea* desenvolvidas de acordo com o item 4.2.1, quando alcançaram aproximadamente 2 cm de altura, 5 folhas e 0,20 cm de diâmetro do caule foram transplantadas, uma por unidade experimental, e irrigadas diariamente com

aproximadamente 80% da capacidade de campo, determinada com o auxílio do sensor Hidro Farm (HFM2030 - Falker) instalado nos vasos, por 120 dias.

Os substratos utilizados no desenvolvimento de *V. ferruginea* foram coletados de diferentes áreas com o propósito de verificar se as características químicas destas áreas podem afetar a atividade fitotóxica da espécie. As áreas de coleta do substrato apresentaram as seguintes características:

Agrícola (Agr): este substrato foi retirado da camada arável (0-0,20 m), de Latossolo Vermelho Eutrófico, de uma área utilizada em rotação (ano a ano) com a cultura de milho e soja, por mais de 10 anos, no município de Jaboticabal, localizada na porção centro-norte do Estado de São Paulo, na Bacia Hidrográfica do Córrego Rico. A área encontra-se na província geomórfica V - Planalto Ocidental do Estado de São Paulo e a constituição geológica originária de rochas efusivas básicas da Formação Serra Geral.

Pastagem (Pas): substrato coletado de área classificada como Latossolo Vermelho Eutrófico com pastos recobertos por *Urochloa brizantha* cv. marandu (braquiária) desde 1997, no município de Jaboticabal - SP.

Mata (Mat): o substrato foi coletado de um Latossolo Vermelho, em uma área com mata nativa, não alterada pelo homem e caracterizada pela presença de sub-bosque rico em arbustos, no município de Jaboticabal - SP.

Itirapina (Iti): o substrato foi coletado de um Latossolo Vermelho Distrófico de remanescentes do Cerrado, em um fragmento de cerrado denso, subtipo mais denso e alto da fisionomia cerrado stricto sensu, na Estação Ecológica e Experimental de Itirapina, Instituto Florestal do Estado de São Paulo, localizada no município de Itirapina, SP, inserida na Bacia Hidrográfica do Lobo, com relevo pouco acidentado, fazendo parte da província geomorfológica denominada Cuestas Basálticas, localizada entre o Planalto e a Depressão Periférica.

Ituiutaba (Itu): o substrato foi retirado do Latossolo Vermelho Eutrófico corresponde a um fragmento de Cerrado *sensu stricto*, com paisagem composta por um estrato herbáceo dominado principalmente por gramíneas, e um estrato de árvores e arbustos tortuosos, com ramificações irregulares e retorcida, localizado no município de Ituiutaba, na mesorregião geográfica do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, estado de Minas Gerais, que faz parte da Bacia Sedimentar do Paraná, inserido no Grupo

Bauru com Formação Vale do Rio do Peixe, Formação Marília e Formação Serra Geral.

Os dados da Tabela 3 apresentam as propriedades químicas e físicas dos substratos utilizados como tratamentos.

Tabela 3. Propriedades físicas e químicas do solo utilizado no experimento. Jaboticabal - São Paulo. Agr: Agrícola; Pas: pastagem; Mat: Mata; Iti: Itirapina; Itu: Ituiutaba.

Parâmetros	Agr	Pas	Mat	Iti	Itu
pH (CaCl ₂)	6,2 ± 0,06	5,1 ± 0,06	6,3 ± 0,10	3,4 ± 0,06	6,1 ± 0,06
MO (g dm ⁻³)	15,7 ± 0,58	23,7 ± 1,53	71,7 ± 2,08	42,0 ± 2,00	46,0 ± 1,00
P (mg dm ⁻³)	94,3 ± 1,53	12,0 ± 2,00	66,7 ± 1,53	9,3 ± 1,53	6,3 ± 0,58
K (mmolc dm ⁻³)	5,6 ± 0,12	1,1 ± 0,10	3,2 ± 0,15	0,8 ± 0,06	3,8 ± 0,10
Ca (mmolc dm ⁻³)	54,7 ± 0,58	17,0 ± 0,00	417,3 ± 2,52	3,7 ± 0,58	125,8 ± 1,15
Mg (mmolc dm ⁻³)	23,0 ± 1,00	13,7 ± 0,58	83,7 ± 0,58	2,0 ± 0,00	37,8 ± 1,15
H+Al (mmolc dm ⁻³)	10,7 ± 0,58	26,7 ± 0,58	13,0 ± 1,00	103,0 ± 2,00	16,0 ± 1,00
SB (mmolc dm ⁻³)	83,3 ± 1,04	31,8 ± 0,49	504,2 ± 1,85	6,5 ± 0,61	167,1 ± 1,16
T (mmolc dm ⁻³)	93,9 ± 1,42	58,4 ± 0,49	517,2 ± 1,59	109,5 ± 1,47	183,1 ± 2,06
V (%)	88,6 ± 0,50	54,4 ± 0,83	97,5 ± 0,19	5,9 ± 0,62	91,3 ± 0,45
Argila (%)	37,8 ± 1,35	29,4 ± 0,85	43,8 ± 0,55	8,3 ± 0,87	25,8 ± 1,05
Silte (%)	10,7 ± 1,44	6,0 ± 0,74	24,8 ± 1,60	4,8 ± 0,69	10,3 ± 1,36
Areia fina (%)	18,3 ± 1,25	33,4 ± 1,39	12,9 ± 1,46	28,9 ± 1,59	18,8 ± 1,78
Areia grossa(%)	33,2 ± 1,20	31,1 ± 1,53	18,6 ± 1,17	57,9 ± 1,48	45,0 ± 1,55
Textura	Argilosa	Média	Argilosa	Arenosa	Média

Os substratos foram colocados para secar em condições ambientais e posteriormente foram peneirados e transferidos para recipientes com capacidade de 3 L.

As plantas foram coletadas 120 dias após o transplante. O material foi lavado com água deionizada e separado em folhas e raízes, e colocado para secar em estufa a 40°C por um período de 120 horas. Após a secagem o material foi moído em micro-moinho tipo Wiley (Marconi, TE-840, Brasil), equipado com peneira malha 60 mesh para ser analisado em laboratório.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com seis repetições. Os tratamentos constituíram dos diferentes tipos de substratos (Agrícola, Pastagem, Mata, Ituiutaba e Itirapina).

4.2.3. Intensidade luminosa

Plântulas de *V. ferruginea* desenvolvidas de acordo com o item 4.2.1, quando atingiram em média 2,6 cm de altura, 6 folhas e 0,24 cm de diâmetro do caule foram

transplantadas, uma plântula por unidade experimental com capacidade de 3 L, preenchido com solo e areia na proporção de 3:1 (v/v), cujas características químicas e físicas encontram-se na Tabela 2.

Os recipientes contendo as plântulas foram divididos em quatro grupos, em função da retenção de luminosidade. Os grupos consistiram nas diferentes condições de luminosidade: 0 (pleno sol), 30%, 50% e 70% de retenção de luz solar, sendo obtidos a partir de telados de polietileno de cor preta, conhecido como sombrites, colocadas sobre as faces superior e laterais de um suporte de madeira com 80 cm de altura.

As doze horas, a cada 7 dias, durante o período experimental, a radiação que incidia sobre as plantas de cada tratamento foi monitorada, encontrado ao final do período experimental, uma média de $1186 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $924 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $681 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e $318 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para os tratamentos 0 (pleno sol), 30%, 50% e 70%.

Todos os tratamentos foram irrigados diariamente, pela manhã, até aproximadamente 80% da capacidade de campo, determinada com o auxílio do sensor Hidro Farm (HFM2030 - Falker) instalado nos vasos, por 120 dias.

Ao término do período experimental, o material vegetal de *V. ferruginea* foi coletado, lavado e separado em folhas e raízes. As amostras foliares e radiculares foram colocadas em sacos de papel e submetidas à temperatura de 40°C em estufa de secagem com ventilação forçada durante 120 h. Após a secagem o material foi moído em micro-moinho tipo Wiley (Marconi, TE-840, Brasil), equipado com peneira malha 60 mesh para ser analisado em laboratório.

O delineamento experimental adotado para o ensaio foi o de blocos ao acaso e sob cada telado foram colocadas 6 repetições de cada unidade experimental dispostas em duas linhas com 50 cm de espaçamento entre plantas.

4.2.4. Concentrações de alumínio

Plântulas de *V. ferruginea*, desenvolvidas conforme descrito no item 4.2.1, quando atingiram aproximadamente 1,9 cm de altura, 3 folhas e 0,19 cm de diâmetro foram transplantadas para recipiente com capacidade de 500 mL, preenchido com

solo coletado na região de Itirapina de acordo com item 4.2.2, cujas características químicas e físicas encontram-se na Tabela 3.

Os tratamentos consistiram na irrigação com solução contendo 0, 50, 100, 200, 400, 800 e 1600 μmol de alumínio proveniente de cloreto de alumínio ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), formando assim os sete tratamentos.

A irrigação foi realizada diariamente, durante todo o período do experimento, mantendo a umidade do solo próxima a 80% da capacidade de campo, pelo método gravimétrico (DOBRIYAL et al., 2012).

Ao término do período experimental, sessenta dias após o transplante das plântulas, o material vegetal de *V. ferruginea* foi coletado, lavado e separado em folhas e raízes. As amostras foliares e radiculares foram colocadas em sacos de papel e submetidas à temperatura de 40°C em estufa de secagem com ventilação forçada durante 120 h. E as folhas e raízes de *V. ferruginea* secas foram moídas em moinho tipo Wiley (Marconi, TE-840, Brasil), equipado com peneira malha 60 mesh.

O delineamento experimental adotado para o ensaio foi inteiramente ao acaso, com sete tratamentos em 10 repetições.

4.2.5. Bioensaio de germinação

As folhas secas e moídas de *V. ferruginea*, dos quatro experimentos descritos acima, pesando 40 g, por tratamento, foram maceradas por 72 horas em 200 mL de uma mistura etanol/água (7:3, v/v), com troca de solvente a cada 24 horas. A fração hidroetanólica de cada extrato foi evaporada sob pressão reduzida e o sobrenadante liofilizado, obtendo-se assim o extrato das folhas de cada tratamento: Experimento 1: disponibilidade hídrica: 100 mm (5,3952 g), 200 mm (5,8104 g), 300 mm (5,5351 g), 400 mm (5,7936 g), 500 mm (5,9817 g) e 1000 mm (6,1362 g); Experimento 2: tipos de solo: Agrícola (Agr: 4,9265 g), Pastagem (Pat: 5,2457 g), Mata (Mat: 5,9386 g), Ituiutaba (Itu: 5,5621 g) e Itirapina (Iti: 5,7352 g); Experimento 3: intensidade luminosa: Pleno Sol (4,7283 g), 30% (5,0159 g), 50% (5,5096 g) e 70% (5,8236 g); Experimento 4: concentrações de alumínio: 0 μmol (7,2237 g), 50 μmol (7,0597 g), 100 μmol (6,8219 g), 200 μmol (6,4423 g), 400 μmol (5,7238 g), 800 μmol (5,8689 g) e 1600 μmol (5,7793 g).

Os extratos resultantes da extração hidroetanólica dos diferentes tratamentos descritos acima foram diluídos em oito concentrações (0, 12,5, 25, 50, 100, 200, 400 e 800 ppm). Após o preparo, os extratos foram caracterizados quanto a osmolalidade (osmômetro Wescor, modelo 5500), pH (pHmetro Portátil Digital PM602 PLUS Completo) e condutividade elétrica (condutivímetro de Bancada Digital C708 PLUS Completo). Como a osmolalidade dos extratos encontravam-se em uma faixa de 77 a 104 mmol/Kg não foi necessário adicionar um controle relativo Polietilenoglicol (PEG). Como controle (0 ppm) foi utilizado um tratamento com água deionizada, com pH ajustados de acordo com os resultados obtidos nas determinações dos extratos.

Os biotestes foram realizados com sementes de *Urochloa brizantha* cv. Marandu (braquiária). Os testes de germinação foram feitos utilizando 20 diasporos distribuídas em cada placa de Petri (9 cm de diâmetro) forradas com papel filtro Whatman N°2 e umedecidas com 6 mL de solução nas diferentes concentrações de cada extrato. Foram utilizados 6 mL de água destilada no grupo controle. Os bioensaios foram conduzidos em câmara de germinação, a 25°C, e fotoperíodo de 12 horas.

Ao término das avaliações, segundo adaptações de Brasil (2009), foi medido, com auxílio de papel milimetrado, o comprimento das raízes e da parte aérea de todas as plântulas. As raízes e partes aéreas foram armazenadas separadamente em sacos de papel e secos em estufa de circulação de ar (40 °C) para determinação da massa seca.

4.2.6. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento empregado foi o inteiramente casualizado, com seis repetições. Os dados germinabilidade, comprimento e massa seca da parte aérea e da raiz foram submetidos primeiramente às pressuposições da análise de variância, quando foi verificada a normalidade dos dados pelo teste de Shapiro Wilk e homogeneidade de variância pelo teste de Bartlett, ambos ao nível de 5% de probabilidade. Posteriormente, foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade por concentração do extrato para comparação da variação do potencial inibitório em função dos tratamentos. Para a

representação desses dados de comprimento e massa seca da parte aérea e da raiz foram realizados gráficos de box-plot.

4.3. Análise metabolômica

Ao término dos experimentos de disponibilidade hídrica, tipos de solo, intensidade luminosa e concentrações de alumínio foi realizada a coleta de amostras folhas e raízes e armazenadas em freezer (-80°C) para a confecção dos extratos e análises metabolômicas. Os extratos foram confeccionados e avaliados segundo protocolos desenvolvidos pelo grupo AsterBioChem (www.asterbiochem.org) do Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP), sob supervisão do Prof. Dr. Fernando Batista da Costa, conforme descrito no item 4.1.5.

Os cromatogramas e dados de tempos de retenção e de espectrometria de massas (EM) de cada pico cromatográfico foram extraídos do software e em seguida visualizados, lidos e alinhados utilizando as rotinas pré-programadas. E os dados, após o tratamento, foram submetidos a análises estatísticas multivariadas não-supervisionadas e supervisionadas, visando a discriminação ou formação de grupos metabolicamente semelhantes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Fracionamento

Os resultados do bioensaio indicam que os extratos hidroetanólicos tem efeito tóxico sobre a germinação e o desenvolvimento inicial das espécies testadas, mesmo nas concentrações mais baixas. O aumento na concentração dos extratos hidroetanólicos de folhas e raízes ocasionaram uma redução da porcentagem de germinação nas seis plantas teste (Tabela 4).

Tabela 4. Germinação (%) de diásporos de *H. annuus*, *L. sativa*, *R. sativus*, *S. bicolor*, *T. aestivum* e *U. brizantha* submetidas a diferentes concentrações extratos hidroetanólicos de folhas (EF) e raízes (ER) de *V. ferruginea*.

Concentrações (ppm)	<i>H. annuus</i> EF	<i>L. sativa</i> EF	<i>R. sativus</i> EF	<i>S. bicolor</i> EF	<i>T. aestivum</i> EF	<i>U. brizantha</i> EF
0	85 a	100 a	100 a	74 a	100 a	83 a
12,5	71 b	93 ab	100 a	76 a	100 a	83 a
25	64 bc	86 bc	98 ab	70 a	100 a	83 a
50	58 bcd	78 cde	87 bc	68 ab	100 a	78 ab
100	57 cd	80 cd	85 c	68 ab	100 a	77 ab
200	49 de	76 de	72 d	68 ab	91 a	75 ab
400	47 de	76 de	65 d	66 ab	78 b	69 b
800	41 e	71 e	38 e	58 b	52 c	50 c
F	**	**	**	**	**	**
CV (%)	12,75	5,40	7,40	9,07	6,05	7,93
DMS	13,99	8,28	11,08	11,55	10,14	11,02
Trat. (ppm)	<i>H. annuus</i> ER	<i>L. sativa</i> ER	<i>R. sativus</i> ER	<i>S. bicolor</i> ER	<i>T. aestivum</i> ER	<i>U. brizantha</i> ER
0	83 a	100 a	100 a	78 a	100 a	85 a
12,5	74 ab	89 b	97 a	76 a	100 a	85 a
25	69 bc	86 b	84 b	72 ab	100 a	81 a
50	64 bc	83 bc	82 b	71 ab	100 a	77 a
100	67 bc	73 cd	52 c	73 a	99 a	66 b
200	59 cd	74 cd	38 d	71 ab	98 a	62 b
400	58 cd	64 de	33 d	69 ab	71 c	52 c
800	48 d	60 e	32 d	63 b	46 d	37 d
F	**	**	**	*	**	**
CV (%)	9,58	7,39	8,46	7,71	4,34	7,48
DMS	11,66	10,81	10,17	10,27	7,20	9,44

ns, Não significativo a 5%, * Significativo a 5%, **Significativo a 1% pelo teste de Tukey; CV (%): Coeficiente de variação; DMS: diferença mínima significativa. Médias seguidas pelas mesmas letras para os extratos não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Alguns pesquisadores relatam que frequentemente ocorrem falhas ou atrasos na germinação de algumas espécies dificultando a análise e impossibilitando a verificação de que as diferenças na germinabilidade (%) não foram em decorrência

deste fator (TRIGO et al., 1999). No entanto, as sementes colocadas para germinar foram selecionadas em função da sua alta qualidade, homogeneizadas e separadas nos diferentes tratamentos ao acaso e as sementes não germinadas foram submetidas ao teste de tetrazólio (ISTA, 2017), constatando-se viáveis.

Quanto à espécie *L. sativa*, a análise de germinabilidade e os dados de desenvolvimento sugerem interferências nas reações metabólicas que culminam em alterações na germinação e no crescimento. Os aquênios de *L. sativa* são frequentemente utilizados em bioteste devido a rapidez e uniformidade no seu processo de germinação, e também, em função de sua sensibilidade aos compostos alelopáticos presente nos extratos (RIZZI et al., 2016).

No teste de germinação, além de *L. sativa*, as espécies de *H. annuus*, e *R. sativus* mostraram-se bastante sensíveis aos compostos presente nos extratos. O efeito fitotóxico de uma espécie somente é presenciado quando a quantidade crítica de compostos químicos chegam a planta alvo, pois os principais órgãos das plantas têm potencial para armazenar certas quantidades desses compostos (FRIEDMAN, 1995). No entanto, alguns pesquisadores relatam que, mesmo em concentrações muito pequenas, os compostos fitotóxicos podem afetar o processo de germinação (FAROOQ et al., 2012) comprometendo o desenvolvimento e a produtividade de uma espécie.

A resistência ou tolerância aos metabólitos secundários são mais ou menos específicos, e assim diferentes espécies podem apresentar diferentes respostas quando na sua presença (FERREIRA; AQUILA 2000).

Embora o efeito fitotóxico apresente diferença quanto a resposta em relação à concentração ele não foi seletivo ou específico entre as espécies. As seis espécies testadas foram afetadas pelos extratos hidroetanólicos das folhas e das raízes, sendo que houve efeito significativo linear negativo do extrato de *V. ferruginea* tanto para o comprimento quanto para a massa seca da parte aérea e da raiz ($p < 0,05$), o aumento da concentração do extrato influenciou as variáveis (Figura 1).

Tanto na parte aérea quanto na raiz foram evidenciadas reduções, embora muitas pesquisas revelam efeito mais acentuado sobre as raízes devido ao contato mais íntimo destas com os compostos fitotóxicos e a alta permeabilidade dos tecidos radiculares (SALMAN et al., 2017).

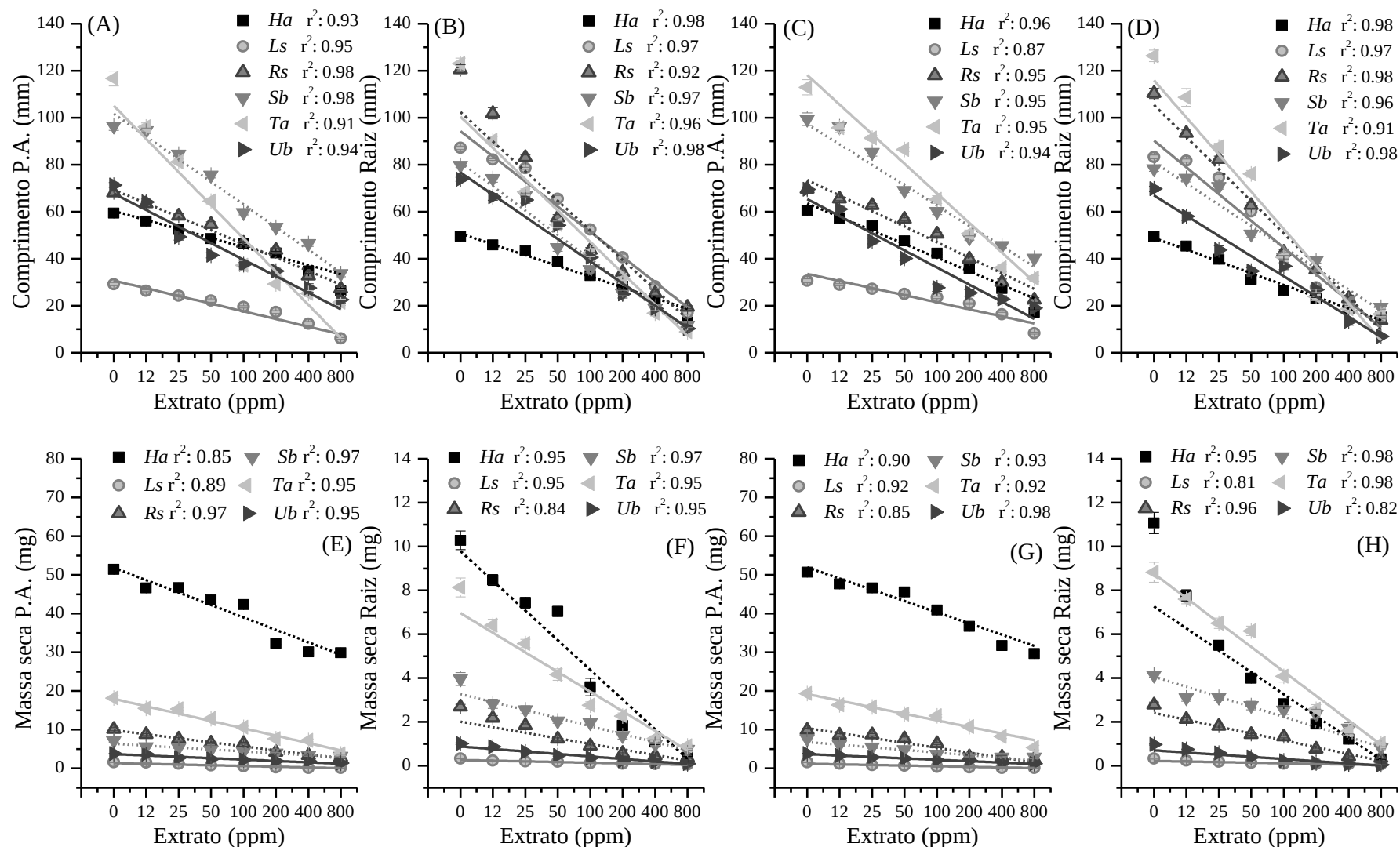


Figura 1. Efeito da concentração dos extratos bruto das folhas (A, B, E e F) e das raízes (C, D, G e H) de *V. ferruginea* sobre o comprimento (mm) e a massa seca (mg) da parte aérea (P.A.) e da raiz de seis plantas teste (*H. annuus* (Ha), *L. sativa* (Ls), *R. sativus* (Rs), *S. bicolor* (Sb), *T. aestivum* (Ta) e *U. brizantha* (Ub)).

Quanto às frações dos extratos foi observado um comportamento diferenciado. Não foram observadas diferenças significativas para a variável porcentagem de germinação de *H. annuus* nas frações diclorometânica (R2) e acetoetílica (R3) das raízes; *L. sativa* nas frações hexânica (F1), diclorometânica (F2), acetoetílica (F3) e metanólica (F4) das folhas e metanólica (R4), metano:água (R5) e aquosa (R6) para as raízes; *R. sativus* nas frações hexânica (F1) e diclorometânica (F2) das folhas e metano:água (R5) para as raízes; *S. bicolor* nas frações hexânica (F1), diclorometânica (F2), acetoetílica (F3) e aquosa (F5) das folhas e diclorometânica (R2), acetoetílica (R3), metanólica (R4), metano:água (R5) e aquosa (R6) para as raízes; em *T. aestivum* nas frações hexânica (F1), acetoetílica (F3) e aquosa (F5) para as folhas e metanólica (R4), metano:água (R5) e aquosa (R6) para as raízes; e para *U. brizantha* apenas nas frações metanólica (F4) e aquosa (F5) das folhas. Porém ocorreu diferença significativa para a mesma variável nos demais tratamentos.

A porcentagem de germinação das plantas teste não foi afetada na mesma proporção para as diferentes frações de folha e raiz (Tabela 5). As diferenças de sensibilidade entre as plantas teste são comuns na alelopatia e pode ser explicada pela variação os mecanismos de absorção e pela translocação e sítios ação das fitotoxinas entre espécies (GRISI et al., 2016).

Ainda em relação a porcentagem de germinação, notou-se que apenas a fração hexânica da raiz apresentou diferença significativa do controle para esse parâmetro nas seis espécies testadas, em função do aumento da concentração do extrato. A inibição da porcentagem de germinação pode estar associada a altas concentrações de compostos alelopáticos no extrato. Segundo Ali et al. (2017), o efeito máximo da supressão alelopática pode ser evidenciado quando os aleloquímicos interferem nos estádios iniciais de crescimento da planta.

A germinação, o crescimento, o desenvolvimento e a sobrevivência das plântulas são eventos fundamentais para a manutenção do estande e para a alta produtividade da cultura. E esses eventos dependem essencialmente de boa e uniforme germinação, e rápido estabelecimento das plântulas que podem ser afetados quando em convivência ou semeadas em áreas anteriormente infestadas pela espécie *V. ferruginea*.

Tabela 5. Germinação (%) de diaporos de *H. annuus* (Ha), *L. sativa* (Ls), *R. sativus* (Rs), *S. bicolor* (Sb), *T. aestivum* (Ta) e *U. brizantha* (Ub) submetidas a diferentes concentrações de extrato do fracionamento de folhas (F) e raízes (R) de *V. ferruginea*.

Ha	F1	F2	F3	F4	F5	R1	R2	R3	R4	R5	R6
0***	79 a	86 a	81 a	83 a	84 a	79 a	82	79	83 a	88 a	83 a
12,5	78 a	83 ab	80 a	83 a	81 a	78 ab	80	80	83 a	88 a	83 a
25	79 a	80 ab	79 a	79 ab	81 a	78 ab	76	78	82 a	87 a	81 a
50	76 ab	79 ab	80 a	80 ab	80 a	77 ab	79	79	75 ab	82 ab	82 a
100	78 ab	73 b	78 a	77 abc	77 a	75 ab	76	81	73 ab	79 ab	74 a
200	76 ab	72 b	76 a	78 ab	76 a	76 ab	78	77	67 bc	73 b	61 b
400	74 ab	57 c	64 b	72 bc	63 b	73 ab	77	79	58 cd	58 c	60 b
800	71 b	51 c	39 c	68 c	52 c	71 b	79	78	54 d	51 c	56 b
F	*	**	**	**	**	*	ns	ns	**	**	**
CV (%)	5,22	8,08	8,10	5,85	7,59	5,33	4,40	6,50	8,39	7,74	7,56
DMS	7,41	10,89	10,87	8,43	10,48	7,51	6,42	9,55	11,21	10,85	10,18
Ls	F1	F2	F3	F4	F5	R1	R2	R3	R4	R5	R6
0	100	100	100	100	100 a	100 a	100 a	100 a	100	100	100
12,5	100	100	100	100	100 a	100 a	100 a	100 a	100	100	100
25	100	100	100	100	100 a	100 a	98 ab	100 a	100	100	100
50	100	100	100	100	100 a	100 a	97 abc	99 ab	100	100	100
100	100	100	100	100	98 a	100 a	91 c	100 a	100	100	100
200	100	100	100	99	98 a	99 a	93 bc	99 ab	100	100	100
400	100	100	99	100	95 a	98 a	91 c	98 ab	100	100	100
800	100	100	98	98	89 b	94 b	84 d	97 b	99	100	100
F	ns	ns	ns	ns	**	**	**	*	ns	ns	ns
CV (%)	0	0	1,18	1,19	2,86	1,78	3,59	1,69	0,72	0	0
DMS	0	0	2,22	2,21	5,19	3,27	6,29	3,11	1,34	0	0
Rs	F1	F2	F3	F4	F5	R1	R2	R3	R4	R5	R6
0	100	100	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100	100 a
12,5	100	100	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	99 a	100	100 a
25	100	98	100 a	100 a	99 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100	100 a
50	100	100	99 a	100 a	99 a	98 ab	100 a	100 a	100 a	100	100 a
100	100	98	99 a	100 a	98 a	98 ab	98 ab	99 ab	99 a	99	100 a
200	100	98	98 a	99 ab	95 a	97 ab	96 ab	98 ab	98 ab	100	98 ab
400	98	100	97 ab	98 ab	94 ab	93 b	93 bc	94 bc	98 ab	99	98 ab
800	99	99	93 b	97 b	88 b	83 c	89 c	91 c	95 b	100	96 b
F	ns	ns	*	*	**	**	**	**	**	ns	*
CV (%)	1,11	1,70	3,10	1,57	4,00	3,69	3,33	3,19	1,94	1,04	1,96
DMS	2,07	3,14	5,88	2,90	7,19	6,59	6,02	5,79	3,57	1,93	3,60
Sb	F1	F2	F3	F4	F5	R1	R2	R3	R4	R5	R6
0	71	72	72	73 ab	73	71 ab	71	75	70	73	74
12,5	73	73	74	72 ab	73	72 a	73	73	73	74	73
25	70	73	73	76 a	71	73 a	70	74	71	71	72
50	72	70	70	72 ab	73	72 a	71	73	68	74	73
100	72	73	69	71 ab	69	73 a	73	73	69	74	73
200	73	70	71	68 abc	70	69 ab	69	72	73	73	70
400	70	71	70	67 bc	72	68 ab	69	71	69	72	74
800	69	71	71	62 c	72	63 b	68	72	70	73	73
F	ns	ns	ns	**	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns
CV (%)	5,67	6,02	6,04	6,15	6,00	5,84	6,09	6,52	5,91	6,52	5,58
DMS	7,51	8,01	7,99	8,00	7,98	7,62	7,96	8,82	7,72	8,85	7,54

Continuação da Tabela 5.

Ta	F1	F2	F3	F4	F5	R1	R2	R3	R4	R5	R6
0	100	100 a	100	100 a	100	100 a	100 a	100 a	100	100	100
12,5	100	100 a	100	100 a	100	100 a	100 a	100 a	100	100	100
25	100	100 a	100	100 a	100	100 a	100 a	100 a	100	100	100
50	100	100 a	100	100 a	100	100 a	98 ab	100 a	100	100	100
100	99	100 a	100	100 a	100	100 a	96 ab	96 ab	100	100	100
200	98	100 a	100	99 a	100	100 a	96 ab	94 bc	100	100	100
400	99	98 ab	100	98 a	100	94 b	94 ab	93 bc	100	100	100
800	98	97 b	100	88 b	100	89 c	91 b	90 c	100	100	100
F	ns	*	ns	**	ns	**	**	**	ns	ns	ns
CV (%)	1,67	1,74	0	2,51	0	2,73	3,78	2,55	0	0	0
	3,08	3,32	0	4,58	0	4,97	6,80	4,58	0	0	0
Ub	F1	F2	F3	F4	F5	R1	R2	R3	R4	R5	R6
0	85 a	83 a	83 a	81	81	85 a	82 a	80 a	83 a	83 a	83 ab
12,5	83 a	81 a	84 a	80	79	81 a	80 a	76 ab	82 a	82 ab	83 a
25	81 ab	78 a	82 a	81	81	81 a	77 ab	74 abc	80 a	83 ab	83 a
50	80 ab	75 a	78 a	78	80	80 a	74 abc	73 abc	80 a	81 ab	82 ab
100	76 abc	74 a	75 a	77	79	78 ab	71 abc	71 abc	79 a	78 abc	82 ab
200	69 bc	57 b	56 b	74	79	68 b	65 bcd	69 bc	79 a	77 abc	80 ab
400	65 cd	49 bc	55 b	74	78	54 c	63 cd	68 bc	76 a	73 bc	79 ab
800	55 d	45 c	53 b	73	76	34 d	58 d	65 c	63 b	71 c	74 b
F	**	**	**	ns	ns	**	**	**	**	**	*
CV (%)	8,65	9,21	9,28	6,51	5,51	7,80	9,11	6,86	6,56	6,41	5,75
DMS	11,93	11,61	12,21	9,34	8,12	10,16	12,06	9,18	9,46	9,34	8,63

ns, Não significativo a 5%, * Significativo a 5%, **Significativo a 1% pelo teste de Tukey; CV (%): Coeficiente de variação; DMS: diferença mínima significativa. Médias seguidas pelas mesmas letras para os extratos não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). *** Primeira coluna: concentração dos extratos em ppm. F1 e R1: n-hexano; F2 e R2: diclorometano; F3 e R3: acetato de etila; F4 e R4: metanol; R5: metanol:água; F5 e R6: água.

O comprimento da parte aérea para *H. annuus*, nos extratos diclorometânico (R2) e acetoetílico (R3) das raízes; *L. sativa* nas frações hexânica (F1) e metanólica (F4) das folhas, e metanólica (R4) e metano:água (R5) das raízes; *R. sativus* em frações diclorometânica (F2) e metanólica (F4) das folhas, e acetoetílica (R3) e metano:água (R5) das raízes; *S. bicolor* nas frações diclorometânica (R2) e metanólica (R4) das raízes; e *U. brizantha* em frações aquosa das folhas e das raízes (F5 e R6) não houve diferença significativa ($p > 0,05$) e nenhuma equação de regressão se adaptou ao comportamento observado. Para *H. annuus*, nos extratos hexânico (F1), diclorometânico (F2), acetoetílico (F3) e metanólica (F4) das folhas e metano:água (R5) das raízes; *L. sativa* em frações aquosa (F5) das folhas e acetoetílica (R3) das raízes; *R. sativus* em frações aquosa (F5) das folhas e diclorometânica (R2) das raízes; *S. bicolor* em fração R3; *T. aestivum* em frações hexânica (R1) e aquosa (R6) das raízes; e *U. brizantha* em fração metanólica (R4) das raízes a curva mais ajustada para a regressão entre as concentrações dos extratos o comprimento foi a polinomial de 2º grau; e nos demais, a análise de

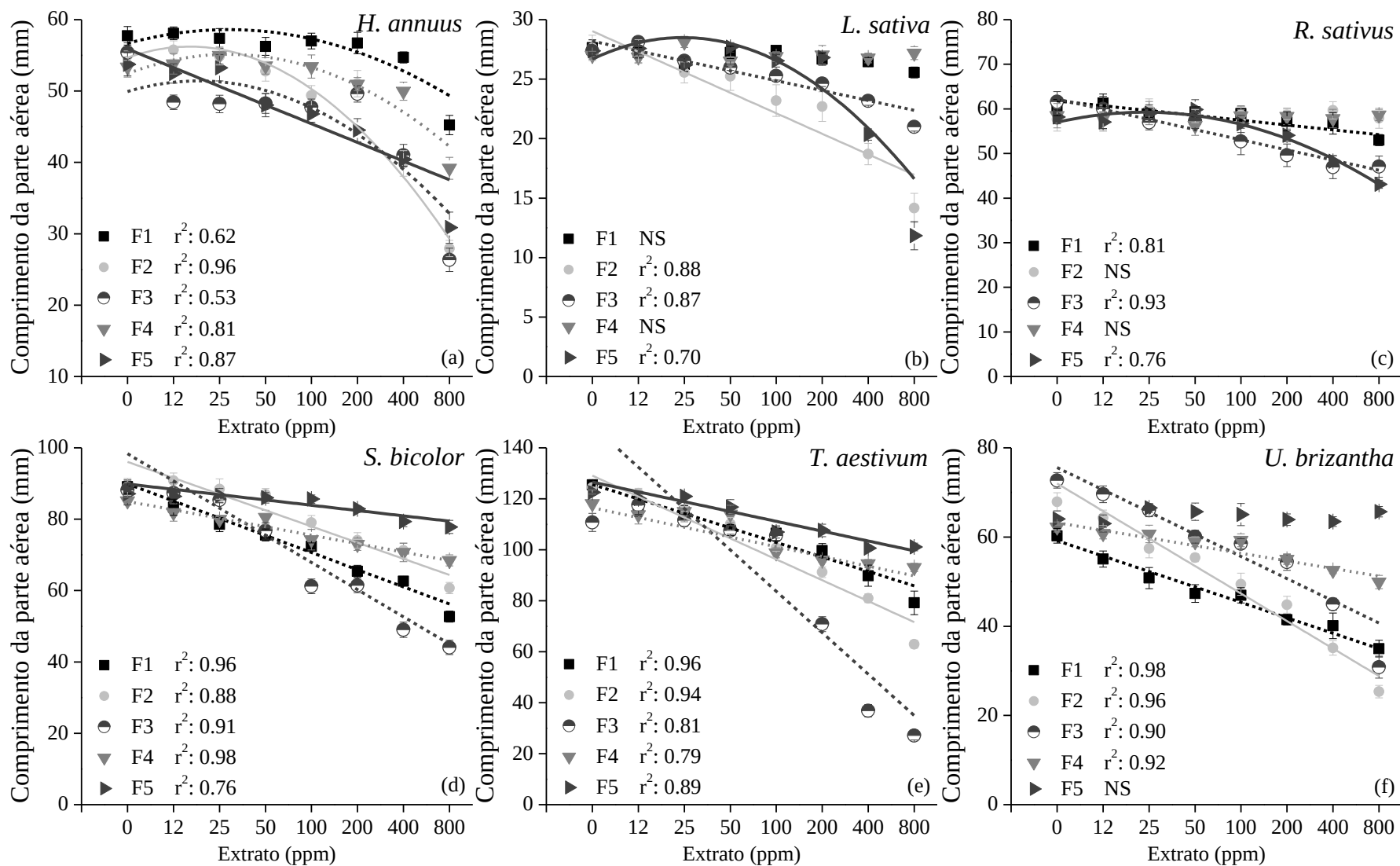
regressão polinomial revelou redução linear do crescimento da parte aérea das plantas, em função da concentração dos extratos, com redução de até 75,49% para a espécie mais sensível (*T. aestivum*) no extrato acetoeílico (F3) (Figura 2). Embora as substâncias tóxicas, em certas concentrações, possam exercer forte efeito inibitório sobre o crescimento de uma espécie, existem espécies que esse efeito pode ser menor ou até mesmo nulo (TABAN; SAHARKHIZ, 2015).

Vale ressaltar que o tamanho reduzido de algumas espécies pode estar relacionado a germinação mais lenta que conduzirá a uma maior suscetibilidade ao estresse e a menores chances na concorrência por recursos naturais (GATTI et al., 2014).

O comprimento da raiz das plantas alvo variou em função da espécie, do extrato e da concentração dos extratos (Figura 3). A curva ajustada para a regressão polinomial entre o comprimento da raiz e a concentração dos extratos em relação aos controles seguiu o modelo quadrático para *H. annuus*, nos extratos F3, F5 e R3; *L. sativa*, em F5, R1, R3 e R4; para *R. sativus*, em F3, F4, R2 R3 e R6; em *T. aestivum*, no extrato R1; e para *U. brizantha*, em F4 e R6; nos demais os dados adequaram-se a regressão polinomial linear, com exceção dos extratos F1 e R2, para *H. annuus*; R5, em *L. sativa*; F1, F2 e R5, para *R. sativus*; R4, em *S. bicolor*; e F5, para *U. brizantha*, nos quais não houve diferença significativa ($p > 0,05$).

Os resultados obtidos da planta teste *T. aestivum*, independentemente do extrato, indicaram relação inversa entre a concentração do extrato e o do comprimento ou da massa seca da parte aérea e da raiz, sendo as reduções mais intensas obtidas nos extratos diclorometânico e acetoeílico, tanto para a parte aérea (Figura 2 E), como das raízes (Figura 3 E), com exceção do comprimento da parte aérea no extrato aquoso (R6), que embora significativa ($p < 0,05$), o coeficiente de determinação foi baixo (R^2 : 57,78), demonstrando que com o aumento da concentração do extrato, não proporcionou a respectiva redução do comprimento da parte aérea.

De modo geral, as plântulas submetidas as frações de folhas e de raízes, apresentaram menor crescimento de parte aérea. As relações aleloquímicas podem debilitar o sistema radicular reduzindo o acúmulo de biomassa em plantas (CLEMENTS; DITOMMASO, 2011).



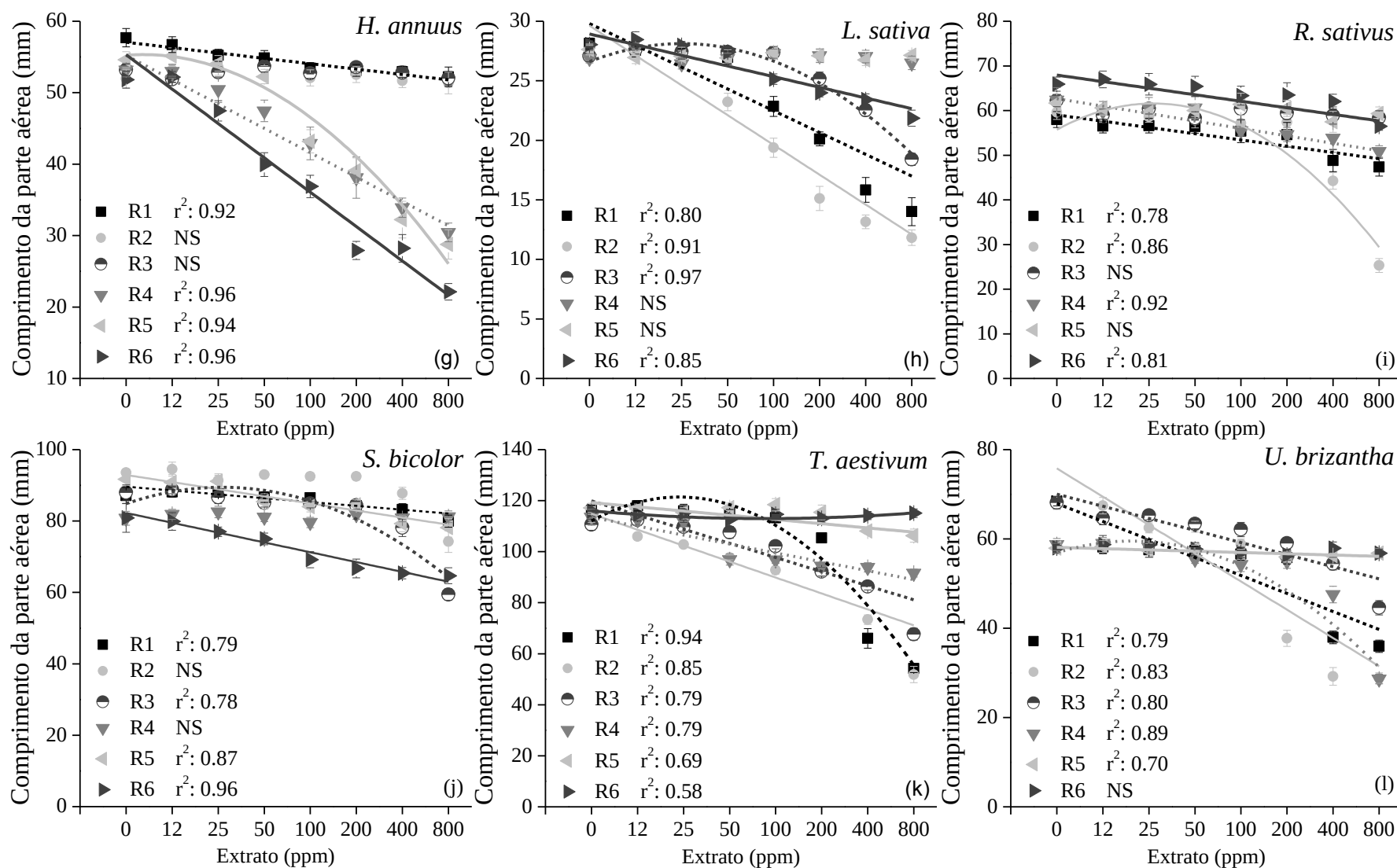
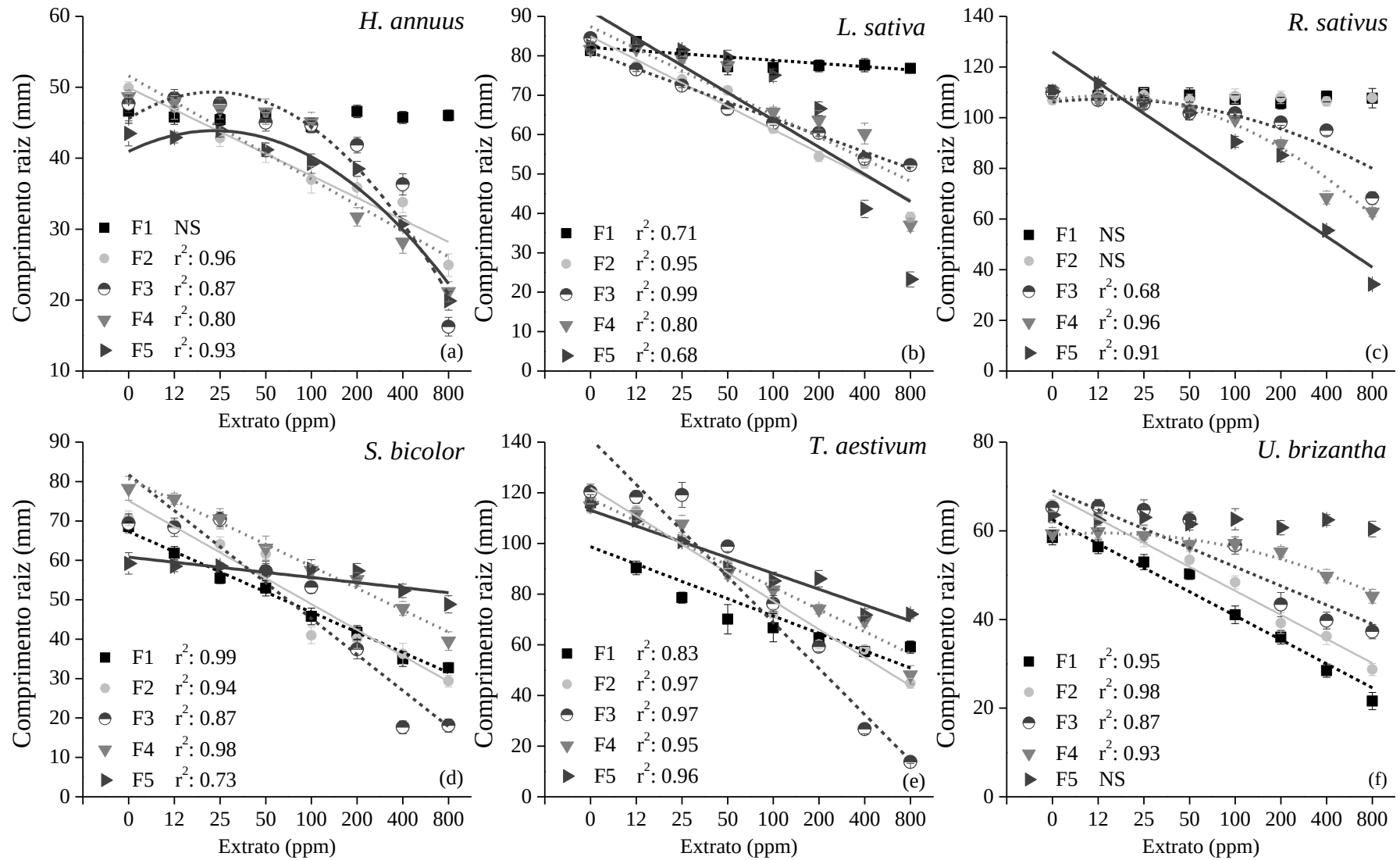


Figura 2. Efeito da concentração dos extratos das folhas (F) e das raízes (R) de *V. ferruginea* sobre o comprimento (mm) da parte aérea (P.A.) de seis plantas teste. F1 e R1: n-hexano; F2 e R2: diclorometano; F3 e R3: acetato de etila; F4 e R4: metanol; R5: metanol:água; F5 e R6: água.



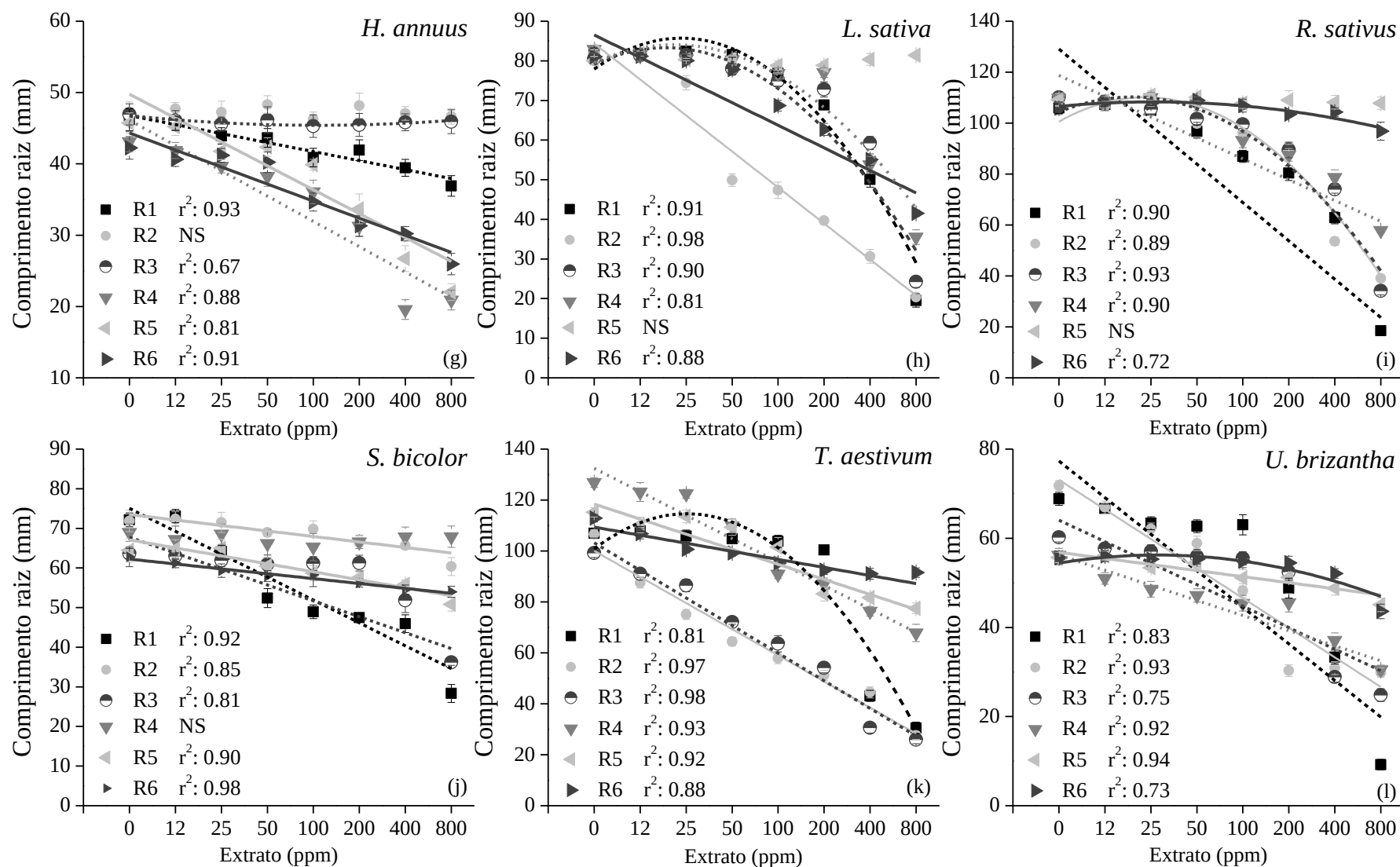


Figura 3. Efeito da concentração dos extratos das folhas (F) e das raízes (R) de *V. ferruginea* sobre o comprimento (mm) da raiz de seis plantas teste. F1 e R1: n-hexano; F2 e R2: diclorometano; F3 e R3: acetato de etila; F4 e R4: metanol; R5: metanol:água; F5 e R6: água.

O comprimento da parte aérea e da raiz, assim como para a massa seca da parte aérea, da maior parte das plantas teste diferiram do controle principalmente em função do aumento da precipitação. Neste sentido, vale ressaltar que embora os meristemas primários radiculares estejam protegidos pela coifa, após a germinação, são os primeiros tecidos disponíveis as características ecofisiológicas absorvíveis que os expõem à ação de compostos fitotóxicos (REIGOSA et al., 2006).

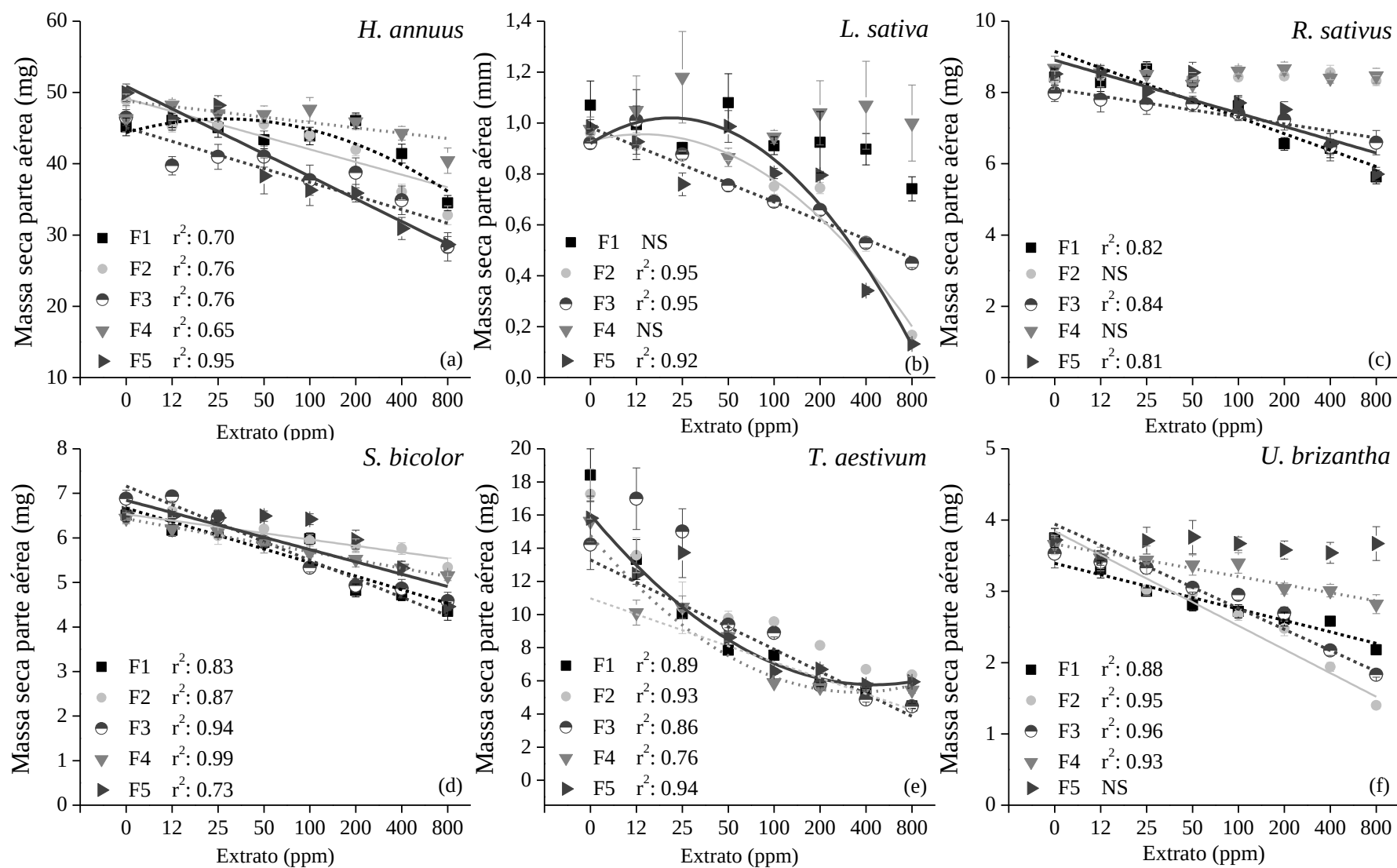
Para a massa seca da parte aérea de *H. annuus*, nos extratos R2 e R3; *L. sativa* em F1, F4, R4 e R5; *R. sativus*, nos extratos F2, F4 e R3; e *U. brizantha* em F5, R5 e R6, a análise de regressão polinomial não foi significativa sobre o aumento das concentrações ($p>0,05$), indicando que esses extratos não afetam o desenvolvimento das respectivas plantas teste, ou ainda, que as concentrações utilizadas não foram suficientes para prejudicar essas plantas (Figura 4).

Para as demais avaliações, as análises de regressões polinomiais linear ou quadrática foram significativas entre as concentrações e as massas. Com estes resultados, observa-se que estas espécies respondem negativamente em termos de massa seca, quando aumenta a concentração dos extratos. Desta forma, nota-se que o grau de inibição promovido por determinado aleloquímico presente nos extratos é dependente da sua concentração.

A redução do acúmulo de massa seca pode estar associada a ação dos extratos na mudança da atividade das enzimas hidrolíticas (SILVA et al., 2016).

No entanto, as substâncias químicas liberadas pelas plantas no ambiente podem inibir ou promover a germinação das sementes e/ou desenvolvimento de outras espécies em função da sua concentração (TABAN; SAHARKHIZ, 2015).

A massa seca da raiz para *R. sativus*, nos extratos F1, F2 e R5; *S. bicolor* em R4; e *U. brizantha* em F5 não apresentou diferença significativa ($p>0,05$), para os demais a regressão polinomial evidencia um coeficiente de determinação alto, demonstrando que com aumento das concentrações dos extratos houve diminuição da massa seca (Figura 5). Alguns pesquisadores relatam que as espécies podem reagir de diferentes formas a presença de substâncias fitotóxicas e a sensibilidade a estas toxinas dependem de características fisiológicas e bioquímicas de cada espécie (TABAN; SAHARKHIZ, 2015).



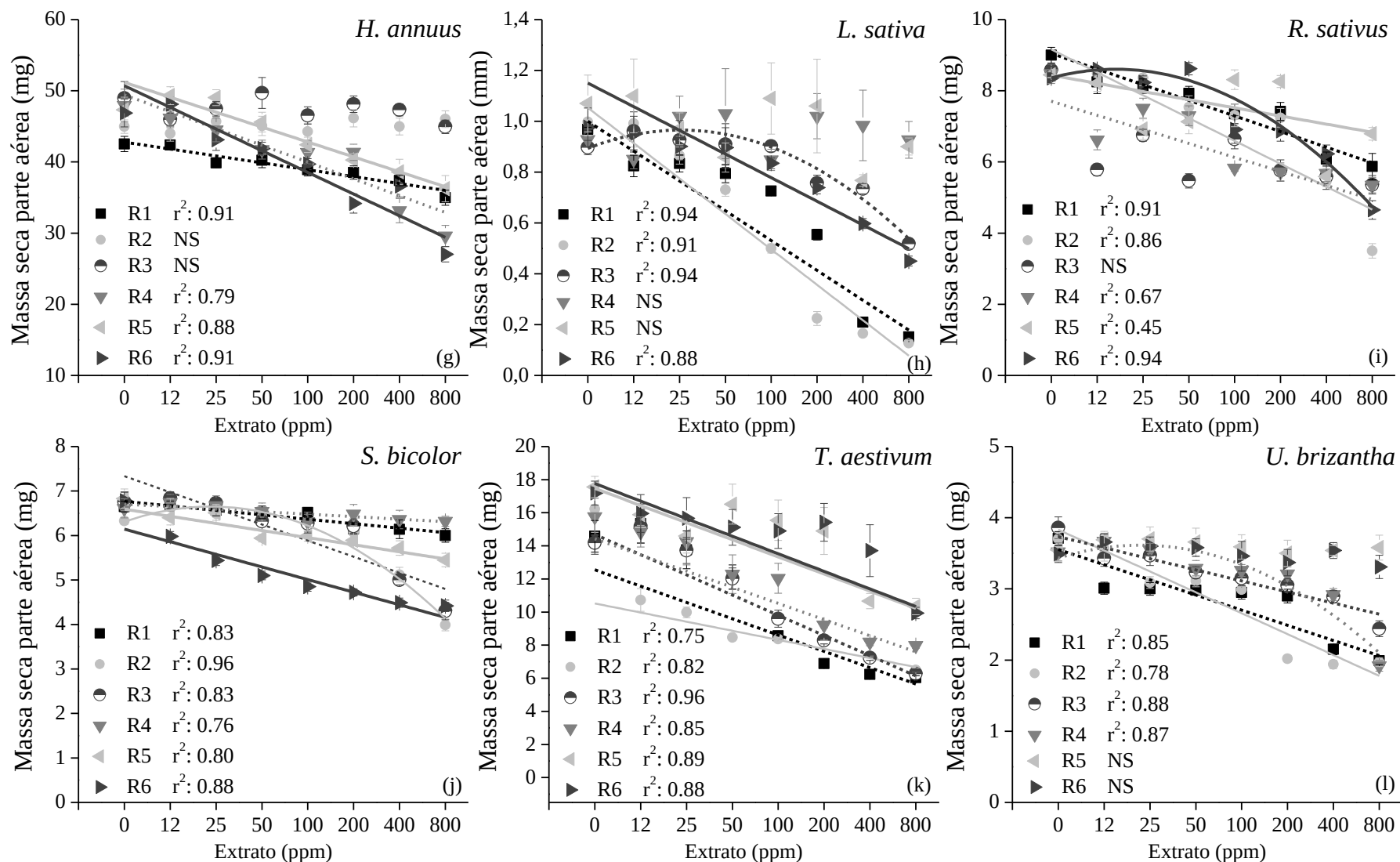
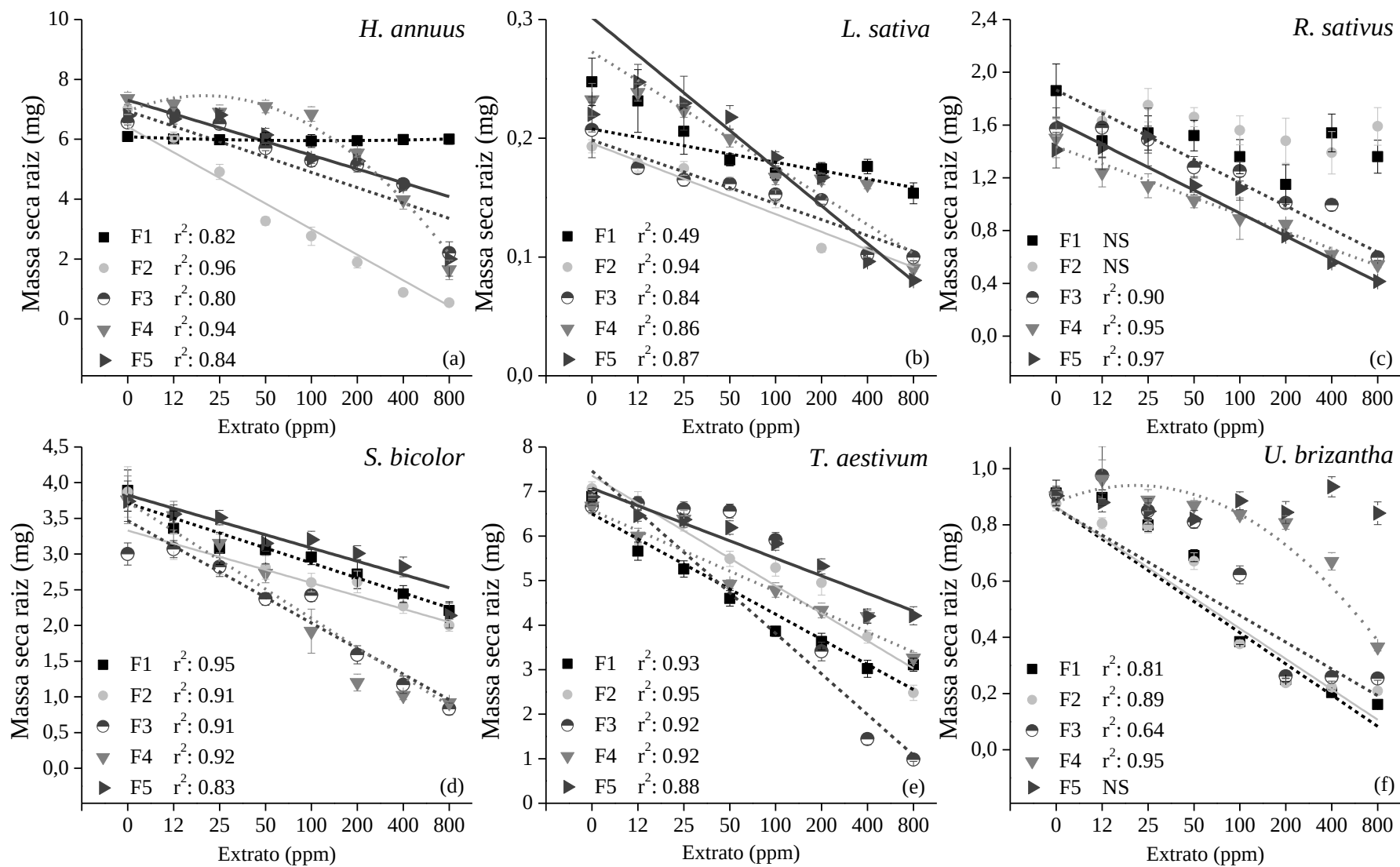


Figura 4. Efeito da concentração dos extratos das folhas (F) e das raízes (R) de *V. ferruginea* sobre a massa seca (mg) da parte aérea (P.A.) de seis plantas teste. F1 e R1: n-hexano; F2 e R2: diclorometano; F3 e R3: acetato de etila; F4 e R4: metanol; R5: metanol:água; F5 e R6: água.



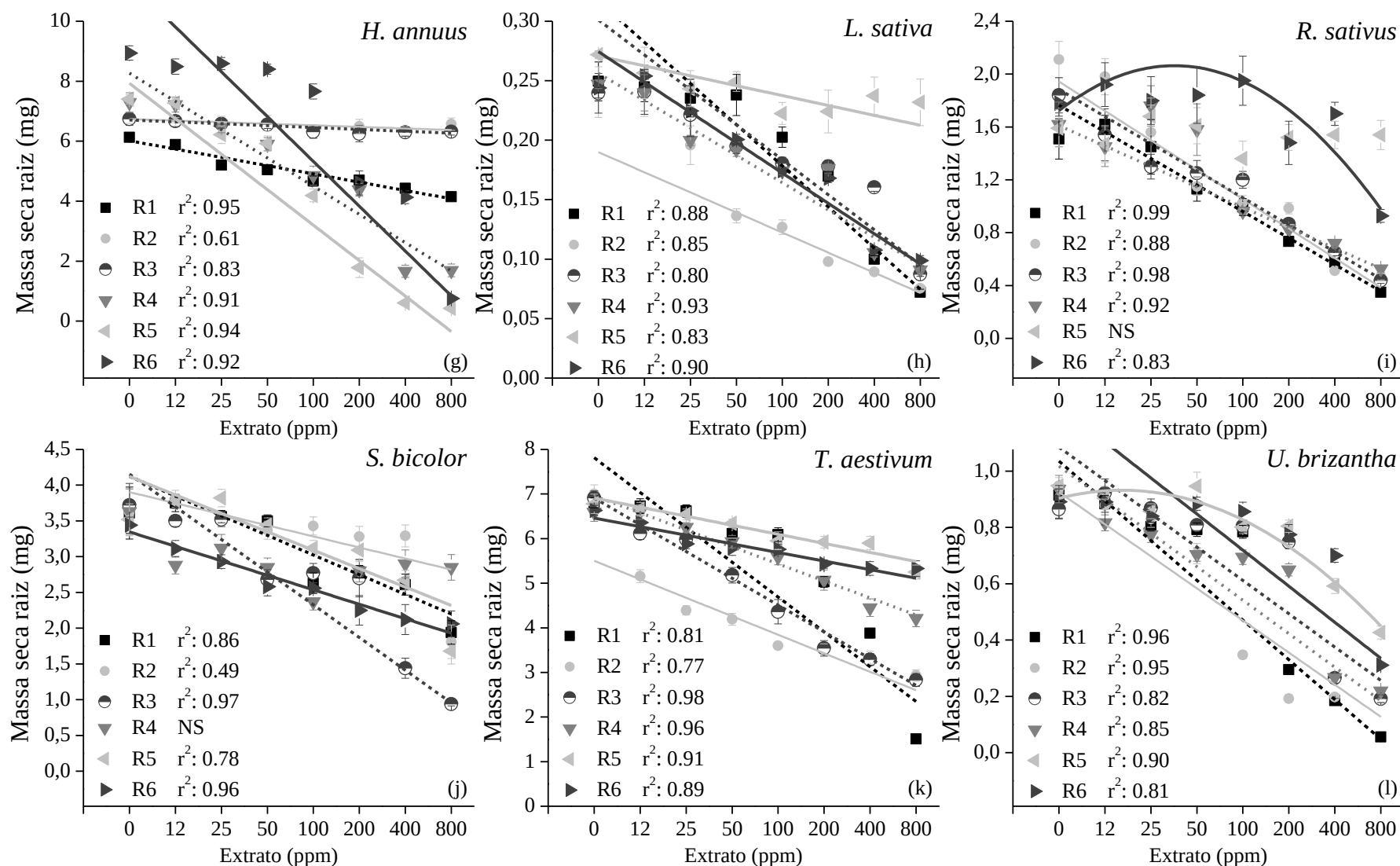


Figura 5. Efeito da concentração dos extratos das folhas (F) e das raízes (R) de *V. ferruginea* sobre a massa seca (mg) da raiz de seis plantas teste. F1 e R1: n-hexano; F2 e R2: diclorometano; F3 e R3: acetato de etila; F4 e R4: metanol; R5: metanol:água; F5 e R6: água.

A análise de regressão polinomial revelou efeito ($p < 0,05$) negativo e linear das concentrações na massa seca em todos os extratos das plantas *L. sativa*, *R. sativus* e *T. aestivum*. Para *T. aestivum*, no extrato acetoeílico (F3) das folhas, tratamento que causou a maior redução percentual. De acordo com o modelo obtido, as plantas reduziram, teoricamente, numa taxa de 0,0009119 mg por unidade de extrato (ppm) da solução irrigada. Essa redução por aumento unitário de extrato contribuiu significativamente na massa seca das plantas com redução chegando a atingir 85,27%, em relação ao controle.

As frações acetoeílica (F3) das folhas e hexânica (R1) das raízes foram significativas em todas as plantas teste tanto para o comprimento quanto para a massa seca, ajustando-se ao modelo polinomial linear ou quadrático de regressão.

A análise de variância do comprimento e da massa seca de *T. aestivum* revelou diferenças significativas ($p < 0,05$) para todos os extratos. A análise de regressão polinomial para as concentrações acusou efeito linear ou quadrático significativo também em todos os extratos, expresso pelas equações expressas na Tabela 6, onde Y representa o comprimento (mm) ou a massa seca (g), e X, a concentração do extrato (ppm); tendo de 69 a 75% da variação total sido explicada pelo modelo de regressão. A espécie *T. aestivum* foi a mais sensível aos compostos fitotóxicos, uma vez que, todos os extratos e frações afetaram tanto o comprimento quanto a massa seca.

As frações diclorometânica e acetoeílica, tanto para folhas como raízes, exibiram forte fitotoxicidade, indicando que estas frações acumularam maior concentração de substâncias com atividade fitotóxica. Contudo, Sticher (2008) afirma que a extração inicial do material vegetal com solventes de baixa polaridade agrega uma maior quantidade de componentes lipofílicos, enquanto solventes mais polares propiciam a obtenção de materiais num largo espectro de polaridades.

Embora a concentração seja um fator importante na verificação de efeitos inibitórios, nesta pesquisa observou-se que apenas 16% das análises apresentaram estímulo nas concentrações mais baixas e ainda assim ocorreu inibição do desenvolvimento das plântulas com o aumento da concentração dos extratos. De acordo com Rigon et al. (2016), o estímulo está diretamente relacionado a produção fitohormonal da planta teste, ou ao incremento na sensibilidade de seus tecidos.

Tabela 6. Resultados da análise de regressão para as concentrações dos extratos e das frações de folhas (F) e raízes (R) para as variáveis comprimento (mm) da parte aérea e da raiz e da massa seca (mg) da parte aérea e da raiz das plantas teste.

Trat.	H. annuus	L. sativa	R. sativus	S. bicolor	T. aestivum	U. brizantha
Comprimento parte aérea						
EF	-3,840x +64,164	-3,266x +33,967	-5,759x +75,122	-9,644x +111,33	-14,13x +119,27	-7,037x +74,811
ER	-5,782x +69,368	-3,015x +36,565	-6,629x +80,173	-8,671x +106,00	-12,59x +130,81	-7,289x +72,705
F1	-0,401x ² +2,566x+54,503	NS	-1,080x +62,859	-4,813x +94,720	-5,685x +131,31	-3,459x +62,651
F2	-0,845x ² +3,973x+51,549	-1,727x +30,766	NS	-4,528x +100,60	-8,208x +137,29	-6,167x +78,168
F3	-0,624x ² +3,178x+47,367	-0,830x +29,027	-2,278x +64,473	-7,619x +105,95	-16,24x +164,92	-4,977x +80,541
F4	-0,560x ² +3,590x+49,390	NS	NS	-2,369x +87,368	-3,815x +120,28	-1,710x +64,917
F5	-2,620x +58,522	-0,469x ² +2,785x+24,357	-0,624x ² +3,634x+53,967	-1,488x +91,347	-3,855x +130,43	NS
R1	-0,753x +57,820	-1,830x +31,635	-1,401x +60,419	-1,075x +90,697	-2,551x ² +14,87x+99,728	-4,032x +71,976
R2	NS	-2,505x +32,138	-1,338x ² +8,289x+48,749	NS	-6,246x +121,10	-6,328x +82,113
R3	NS	-0,372x ² +2,245x+24,735	NS	-1,050x ² +6,500x+79,403	-5,542x +125,45	-2,709x +72,744
R4	-3,407x +58,632	NS	-1,664x +64,327	NS	-3,494x +117,00	-0,983x ² +5,185x+52,688
R5	-0,664x ² +1,815x+54,092	NS	NS	-1,987x +94,871	-1,652x +120,87	-0,285x +58,394
R6	-4,810x +60,123	-0,896x +29,827	-1,466x +69,411	-2,752x +85,017	0,212x ² -2,022x+117,79	NS
Comprimento raiz						
EF	-4,579x +55,293	-10,71x +105,01	-12,60x +115,05	-10,30x +91,438	-13,32x +113,80	-9,445x +86,159
ER	-5,013x +53,907	-11,38x +101,67	-13,66x +119,16	-9,028x +90,086	-15,80x +131,74	-8,610x +75,575
F1	NS	-0,812x +82,932	NS	-5,114x +72,431	-6,840x +105,55	-5,416x +67,918
F2	-3,107x +53,058	-5,920x +90,859	NS	-6,553x +81,666	-11,17x +133,12	-5,426x +73,575
F3	-1,082x ² +6,202x+40,451	-4,221x +85,166	-0,810x ² +3,547x+103,46	-9,130x +90,865	-18,15x +159,58	-4,298x +73,363
F4	-3,645x +55,258	-5,606x +93,008	-1,363x ² +5,786x+102,46	-5,563x +86,299	-8,743x +126,38	-0,385x ² +1,615x+57,801
F5	-0,824x ² +4,756x+37,020	-6,908x +98,257	-12,14x +138,11	-1,288x +62,097	-6,238x +119,35	NS
R1	-1,261x +48,031	-2,177x ² +12,62x+67,454	-15,06x +144,15	-5,779x +80,815	-3,395x ² +20,49x+83,678	-8,207x +85,535
R2	NS	-9,087x +93,481	-2,684x ² +15,49x+87,774	-1,386x +74,882	-10,25x +110,33	-6,639x +79,752
R3	0,081x ² -0,828x+47,520	-1,725x ² +8,811x+72,059	-2,339x ² +12,15x+94,483	-4,016x +71,793	-10,83x +114,06	-4,824x +68,884
R4	-3,547x +49,670	-1,497x ² +8,217x+72,807	-8,191x +126,92	NS	-9,2x +141,63	-3,390x +59,621
R5	-3,350x +53,125	NS	NS	-2,015x +69,104	-5,917x +124,34	-1,361x +58,195
R6	-2,391x +46,730	-5,701x +92,249	-0,414x ² +2,535x+104,44	-1,232x +63,468	-3,168x +112,54	-0,394x ² +2,474x+52,350

Continuação da Tabela 6.

Trat.	H. annuus	L. sativa	R. sativus	S. bicolor	T. aestivum	U. brizantha
Massa seca parte aérea						
EF	-3,214x +55,087	-0,187x +1,562	-1,043x +10,889	-0,496x +6,8840	-1,902x +19,866	-0,353x +4,0510
ER	-2,898x +54,851	-0,162x +1,383	-1,267x +11,676	-0,678x +7,4990	-1,702x +20,919	-0,363x +4,0505
F1	-0,428x ² +2,68x+42,1	NS	-0,461x +9,61	-0,305x +6,98	-0,960x +11,94	-0,160x +3,56
F2	-1,78x +50,92	-0,021x ² +0,093x+0,856	NS	-0,141x +6,67	-1,06x +14,63	-0,331x +4,17
F3	-1,91x +46,98	-0,073x +1,06	-0,195x +8,29	-0,415x +7,58	-1,35x +14,65	-0,294x +4,23
F4	-0,755x +49,56	NS	NS	-0,185x +6,62	0,281x ² -3,83x+18,32	-0,113x +3,78
F5	-3,16x +54,04	-0,032x ² +0,179x+0,772	-0,372x +9,28	-0,276x +7,12	0,268x ² -3,86x+19,62	NS
R1	-0,969x +43,76	-0,117x +1,12	-0,438x +9,49	-0,099x +6,86	-0,984x +13,54	-0,214x +3,77
R2	NS	-0,139x +1,19	-0,642x +9,81	-0,096x ² +0,555x+5,85	-0,549x +11,07	-0,293x +4,13
R3	NS	-0,017x ² +0,105x+0,805	NS	-0,362x +7,7	-1,22x +15,91	-0,155x +3,89
R4	-2,36x +51,78	NS	-0,394x +8,1	-0,056x +6,76	-0,977x +15,41	-0,056x ² +0,315x+3,17
R5	-2,09x +53,27	NS	-0,228x +8,66	-0,160x +6,75	-1,04x +18,51	NS
R6	-3,04x +53,75	-0,093x +1,24	-0,122x ² +0,586x+7,9	-0,000x +6,43	-1,06x +18,82	NS
Massa seca raiz						
EF	-1,353x +11,144	-0,031x +0,2987	-0,253x +2,268	-0,366x +3,6398	-0,895x +7,8622	-0,113x +0,9922
ER	-1,000x +8,268	-0,026x +0,2496	-0,312x +2,7259	-0,458x +4,5257	-1,114x +9,8776	-0,099x +0,8063
F1	0,007x ² -0,075x+6,15	-0,007x +0,2148	NS	-0,209x +3,92	-0,562x +7,06	-0,111x +0,9714
F2	-0,854x +7,27	-0,014x +0,2105	NS	-0,182x +3,51	-0,619x +7,98	-0,108x +0,9724
F3	-0,512x +7,46	-0,013x +0,2119	-0,175x +2,04	-0,358x +3,83	-0,911x +8,37	-0,095x +0,953
F4	-0,186x ² +0,997x+6,12	-0,024x +0,2970	-0,129x +1,57	-0,408x +4,14	-0,455x +7,03	-0,019x ² +0,108x+0,791
F5	-0,459x +7,76	-0,031x +0,3335	-0,173x +1,8	-0,184x +4,01	-0,394x +7,47	NS
R1	-0,275x +6,29	-0,034x +0,3515	-0,200x +1,96	-0,274x +4,4	-0,781x +8,6	-0,141x +1,18
R2	-0,051x +6,79	-0,016x +0,2067	-0,222x +2,16	-0,154x +4,06	-0,414x +5,92	-0,113x +1,04
R3	-0,061x +6,77	-0,029x +0,3304	-0,204x +2,09	-0,457x +4,61	-0,600x +7,51	-0,118x +1,2
R4	-0,942x +9,21	-0,022x +0,2792	-0,154x +1,77	NS	-0,380x +7,33	-0,118x +1,14
R5	-1,18x +9,12	-0,008x +0,2791	NS	-0,257x +4,38	-0,202x +7,11	-0,015x ² +0,072x+0,846
R6	-1,5x +12,8	-0,025x +0,2999	-0,053x ² +0,378x+1,4	-0,202x +3,55	-0,191x +6,65	-0,128x +1,36

F1 e R1: n-hexano; F2 e R2: diclorometano; F3 e R3: acetato de etila; F4 e R4: metanol; R5: metanol:água; F5 e R6: água.

As variáveis que apresentaram significância para os efeitos da interação concentrações com o comprimento ou a massa seca ($p < 0,05$), as equações de regressão polinomiais da interação encontram-se na Tabela 6, tendo sido obtida resposta linear ou quadrática para as concentrações nos comprimentos e massas testadas.

A presença de aleloquímicos no extrato, assim como o aumento de suas concentrações promoveram um ambiente estressante aos diásporos das plantas teste, tendo resultado na inibição da maioria dos parâmetros testados.

A redução da porcentagem de germinação, do comprimento ou da massa seca pode ser consequência de danos ou inativação de vias do sistema metabólico. As substâncias alelopáticas podem afetar a fluidez da bicamada fosfolipídica do sistema de membranas celulares, ocasionar mudanças em nível hormonal e fotossintético ou ainda proporcionar o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) (SILVA et al., 2016).

Os parâmetros da espécie teste *U. brizantha*, assim sua resposta aos extratos e frações da planta doadora merecem destaque, uma vez que elas possuem estreita relação em ecossistemas agrícolas. Desta forma, vale ressaltar que a germinação de *U. brizantha* mostrou-se sensível, com valores que diferiram do controle em muitas frações. Essa interferência constatada na porcentagem de germinação, indica que a *V. ferrugínea* pode proporcionara atraso na germinação, mesmo em condições naturais, visto que, uma das frações que proporcionaram redução desse parâmetro foi a aquosa da raiz.

As informações sobre germinabilidade de *U. brizantha* também podem ser úteis ao analisar pastagens degradadas com grande infestação de *V. ferrugínea*. Uma vez que, levantamentos de banco de sementes de amostras de solo coletadas nos primeiros 10 cm de profundidade, em área com pastagem degradada de *U. brizantha* cv. Marandu possuem 380 sementes puras viáveis por m² (EMBRAPA, 1991).

Estudos com a parte aérea, a raiz e semente de uma espécie do mesmo gênero, *Vernonia polyanthes* Less., proporcionaram inibição sobre a germinação de sementes e desenvolvimento da radícula de plântulas de *Urochloa brizantha*, *Urochloa decumbens* e *Urochloa humidicola* (SOUZA FILHO et al., 1996).

O sucesso da invasão e estabelecimento de plantas perenes como *V. ferruginea*, em pastagens de espécies do gênero *Urochloa* pode estar relacionado as interações alelopáticas. A invasão ou a sucessão da vegetação de uma determinada área pode estar condicionada às plantas pré-existentes no banco de sementes e às substâncias químicas que estas liberam no meio ambiente durante o seu desenvolvimento (RIZVI; RIZVI, 1992; GRISI et al., 2016).

Alguns extratos e frações de *V. ferruginea* levaram ao surgimento de anomalias nas espécies-alvo, demonstrando sinais de necrose, desestruturação e modificação no conteúdo celular, em função do aumento da presença de extrato. Estes resultados evidenciaram o acentuado efeito fitotóxico dos extratos e frações de *V. ferruginea* e seu potencial uso na elaboração de novos produtos fitossanitários.

As frações resultantes do fracionamento do extrato hidroetanólico das folhas e raízes de *V. ferruginea* foram ranqueadas quanto a atividade alelopática, baseando-se no somatório da presença e ausência dos dados de germinabilidade, comprimento e massa seca da parte aérea e da raiz nos extratos a 100 ppm, em relação ao controle (Tabela 7). As frações com maior atividade sobre a germinação, comprimento e massa seca foram os extratos da fração de diclorometano e acetato de etila da folha, o que confere a estas frações forte presença de compostos com potencial alelopático quando comparado as demais. A polaridade dos solventes encontra-se entre os fatores que podem afetar na extração das substâncias bioativas de espécies vegetais, de modo que extratos preparados a partir de diferentes solventes, de um mesmo indivíduo, podem apresentar atividade alelopática diferente.

Dessa forma, é possível sugerir que as substâncias com maior atividade fitotóxica possam estar solúveis em solventes de baixa ou de média polaridade. E quando comparadas, as frações diclorometânicas e acetoetílicas aos extratos hidroetanólicos das folhas, é possível verificar que as substâncias dos extratos atuam de modo sinérgico colaborando para o alto potencial alelopático dos mesmos.

Ainda considerando a frequência de atividade alelopática, observou-se que a espécie alvo mais sensível aos testes de germinação foi *T. aestivum* com uma somatória da frequência de atividade alelopática de 39, seguida da espécie *U. brizantha* com 32, enquanto *R. sativus* foi a espécie menos sensível a presença dos extratos, com apenas 20 na somatória da frequência.

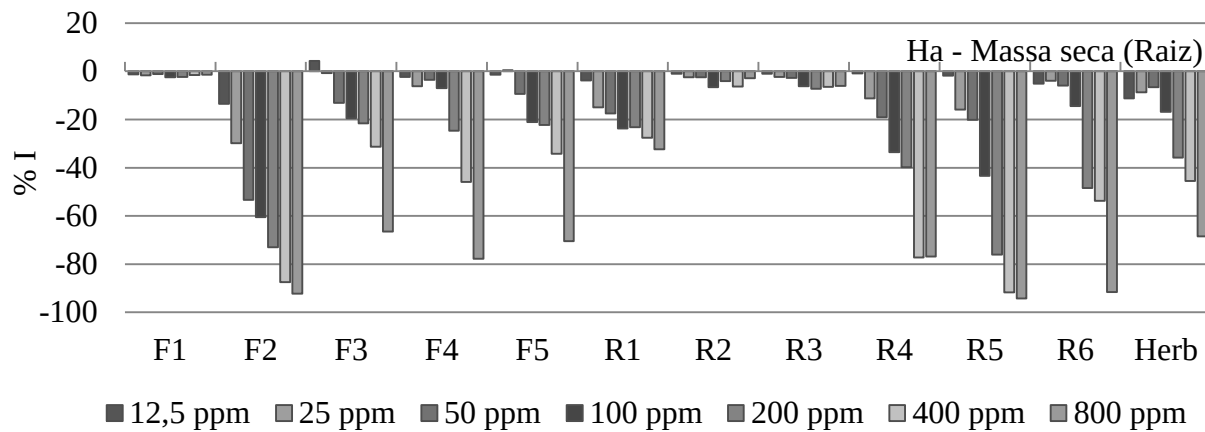
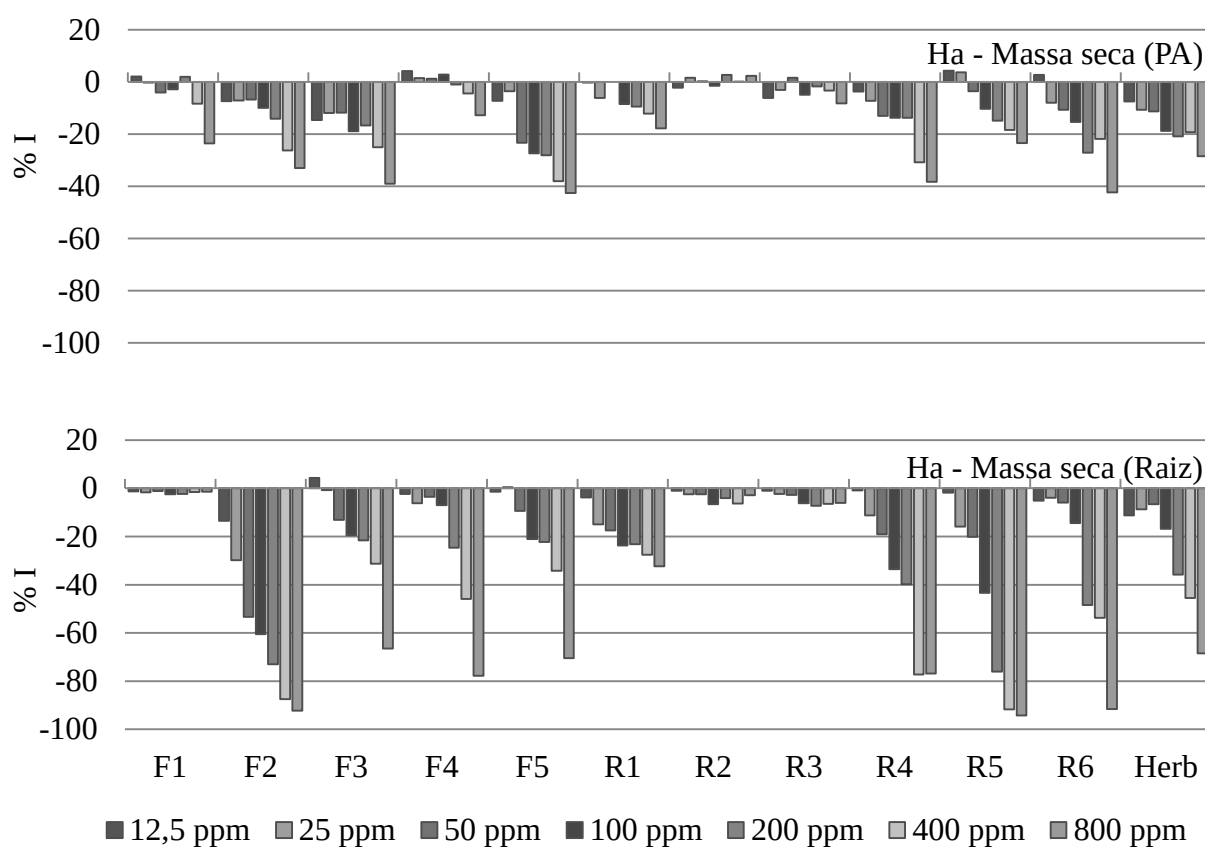
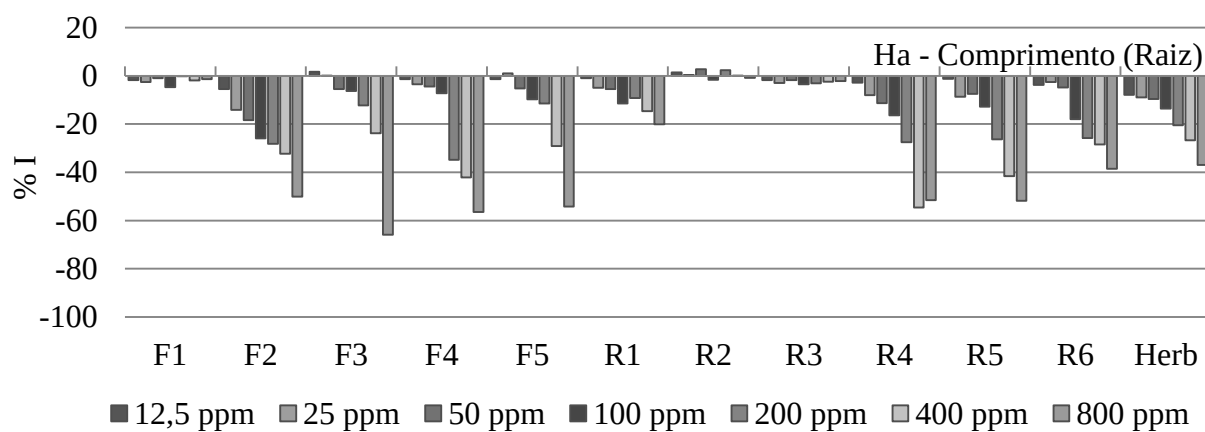
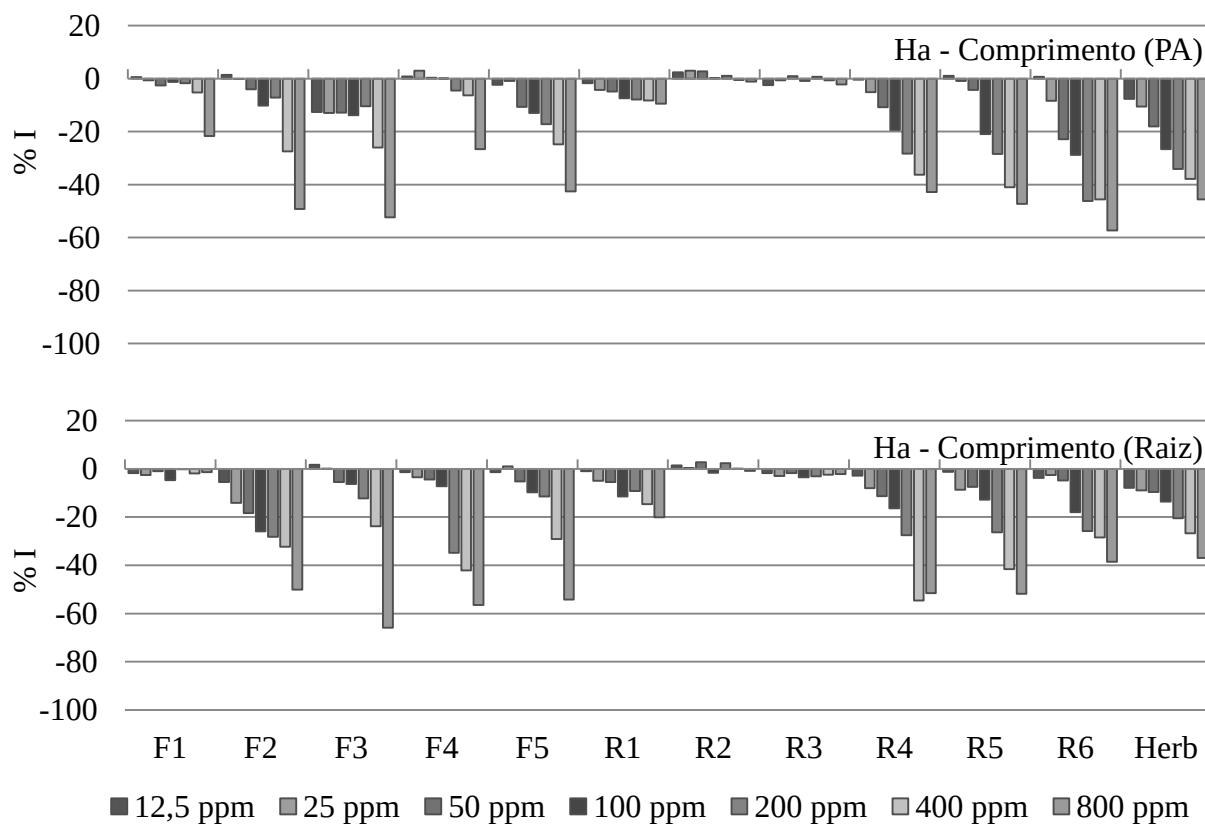
Tabela 7. Frêquencia de atividade alelopática proporcionada pelos extratos das frações de hexano (Hx), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e água das folhas (F) e da raiz (R) de *V. ferruginea*. Presença (1) e ausência (0) de atividade alelopática nos extratos a 100 ppm, em relação ao controle, nos diásporos e plântulas de *H. annuus* (Ha), *L. sativa* (Ls), *R. sativus* (Rs), *S. bicolor* (Sb), *T. aestivum* (Ta) e *U. brizantha* (Ub) para a porcentagem de germinação (G), comprimento e massa seca da parte aérea e raiz das plântulas.

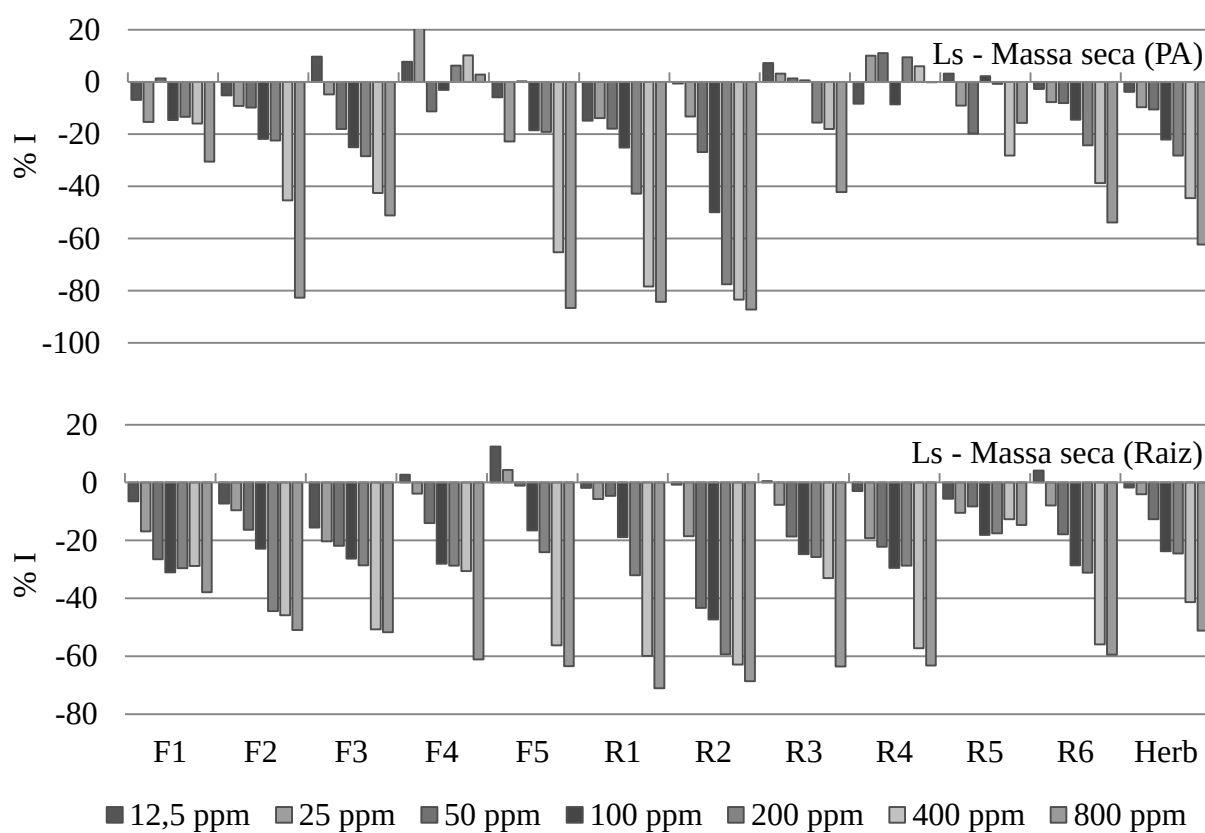
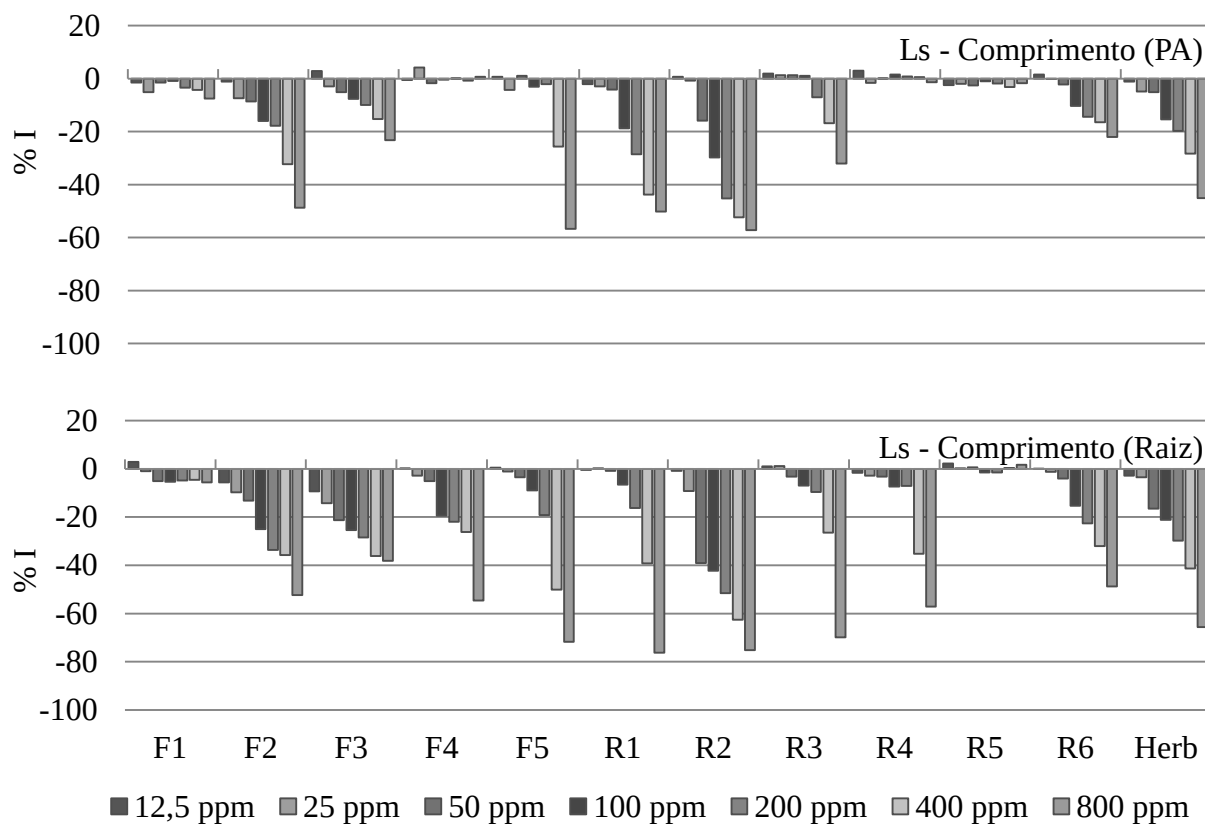
Variáveis		Comprimento																								Massa seca											
		G						Parte aérea						Raiz						Parte aérea						Raiz											
Fração/ espécie	Ha	Ls	Rs	Sb	Ta	Ub	Ha	Ls	Rs	Sb	Ta	Ub	Ha	Ls	Rs	Sb	Ta	Ub	Ha	Ls	Rs	Sb	Ta	Ub	Ha	Ls	Rs	Sb	Ta	Ub	Total						
F	Hx	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	14						
	DCM	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	22						
	AcOEt	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	21						
	MeOH	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	14						
	Água	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	12					
R	Hx	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	19					
	DCM	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	19					
	AcOEt	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	15					
	MeOH	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	18					
	MeOH:água	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	10					
	Água	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	14					
Total		5	1	0	0	2	6	7	5	2	6	7	6	5	9	7	5	10	6	7	5	6	6	9	6	7	11	5	8	11	8						

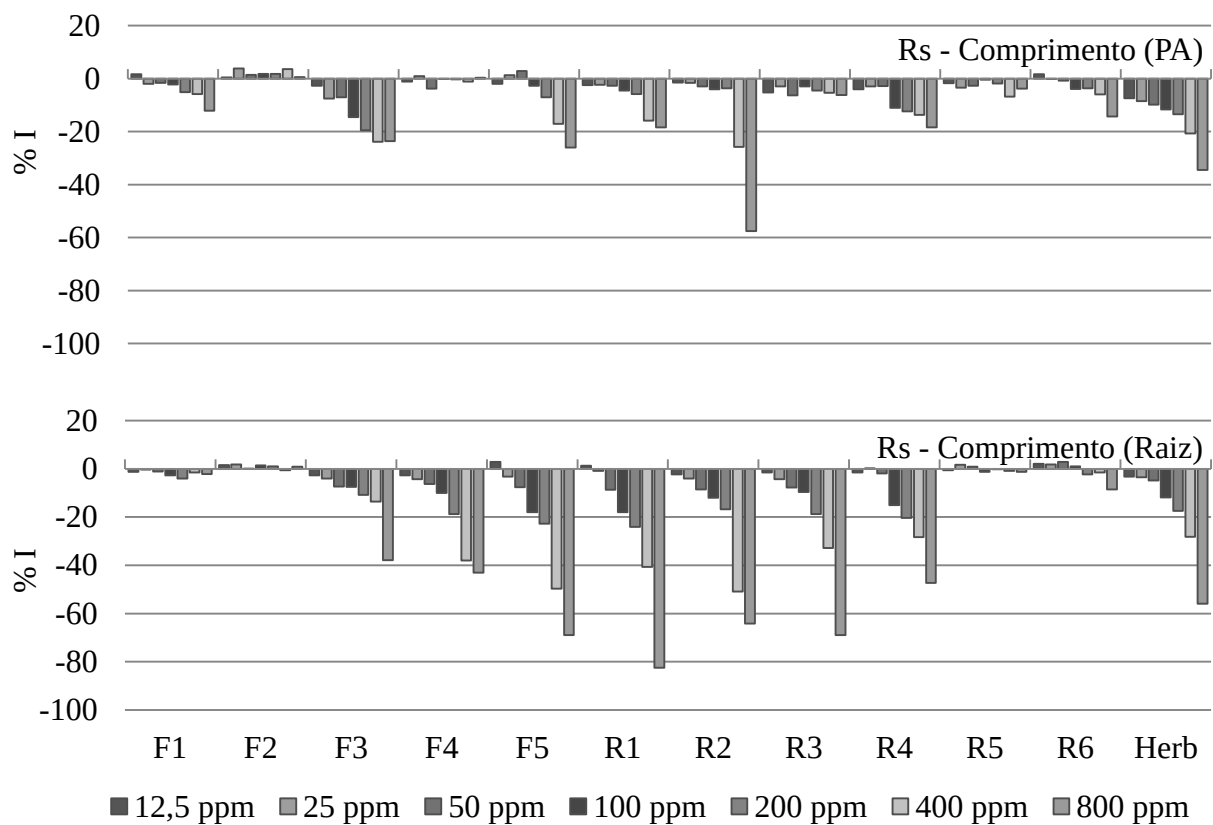
A análise da porcentagem de inibição/estímulo do comprimento e massa seca da parte aérea e da raiz das plântulas, em relação ao controle são pontos de partida para a investigação de efeitos da alelopatia entre as espécies vegetais. Embora os compostos com potencial alelopáticos extraídos por meio de solventes orgânicos não obrigatoriamente são os mesmos liberados pelas plantas ao meio, visto que tal extração não reproduz o processo natural de solubilização de aleloquímicos em seu ambiente natural, onde as condições de síntese e liberação de metabólitos são reguladas pelas interações ecológicas determinada pelas condições ambientais (REIGOSA et al., 2013), é interessante ressaltar que os estudos preliminares das respostas de espécies teste a presença de extratos com potencial alelopático é de fundamental importância na investigação das substâncias envolvidas em tais interações.

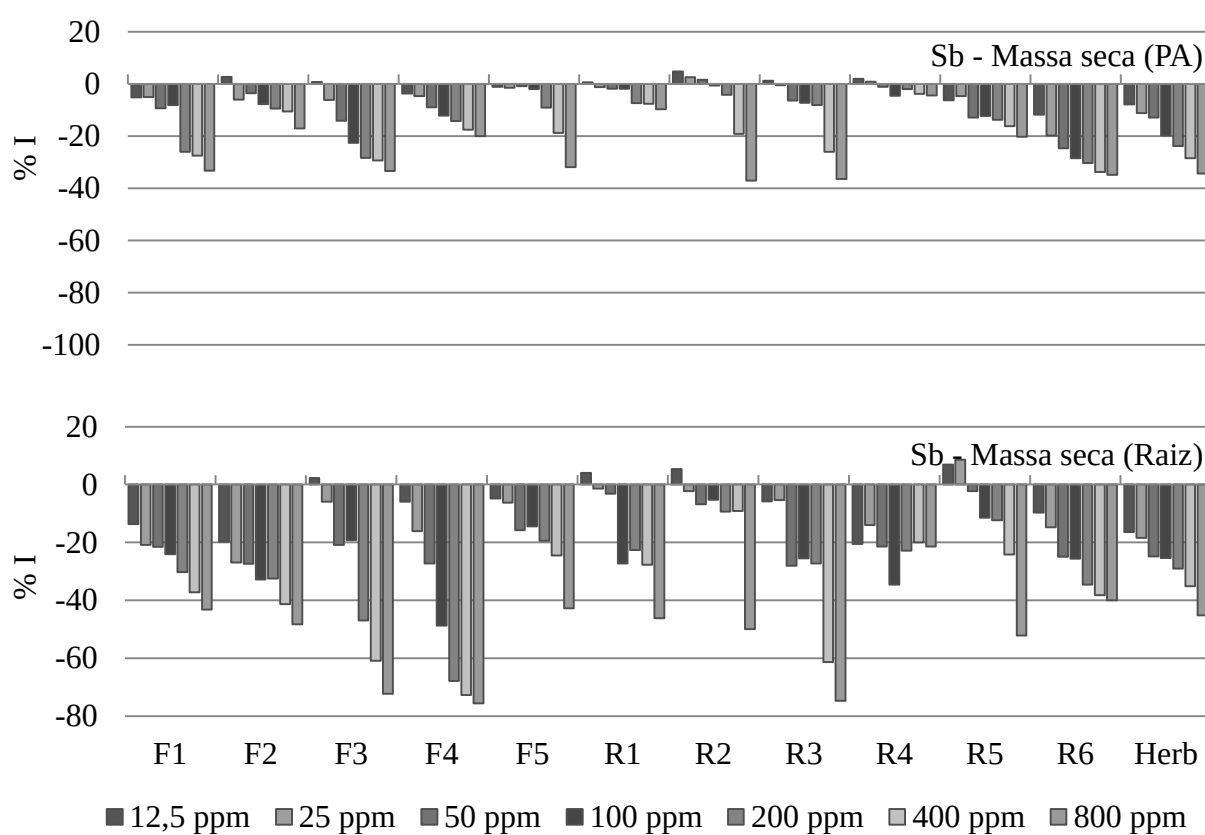
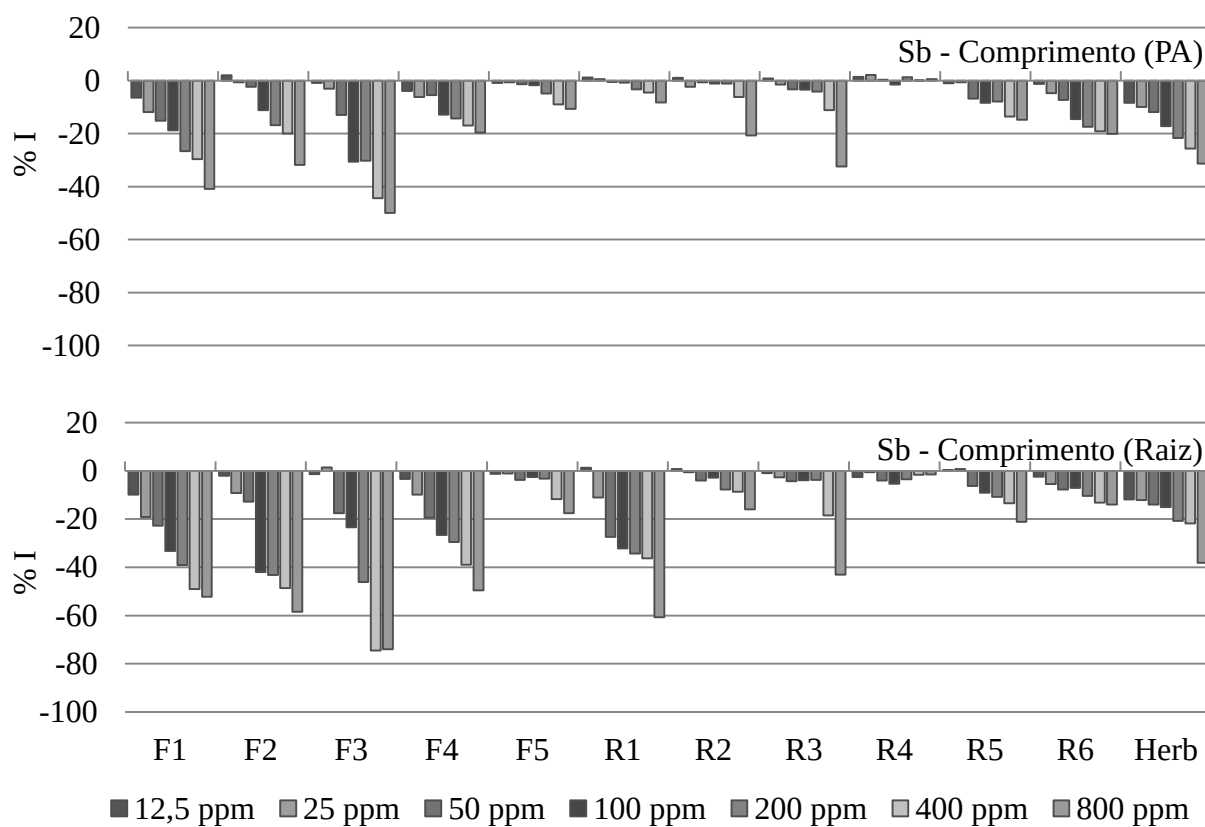
De maneira geral, os extratos das folhas provenientes de n-hexano, diclorometano e acetato de etila proporcionaram as maiores porcentagens de inibição sobre o crescimento e a massa seca das plantas teste (Figura 6). Quanto aos extratos das raízes, além das três frações citadas acima, a fração extraída com metanol também se destacou entre as frações que proporcionaram maior inibição. E também, foi observada uma relação dose-dependente, visto que, quanto maior a concentração do extrato, maiores inibições ocorreram no comprimento e na massa seca. Os extratos mais ativos, como por exemplo, o diclorometano, manteve os níveis de atividade fitotóxica nas menores concentrações, indicando potencial para um estudo mais aprofundado da fração. Alguns extratos foram tão, e até mais inibitório que a solução herbicida, quando comparados na mesma concentração.

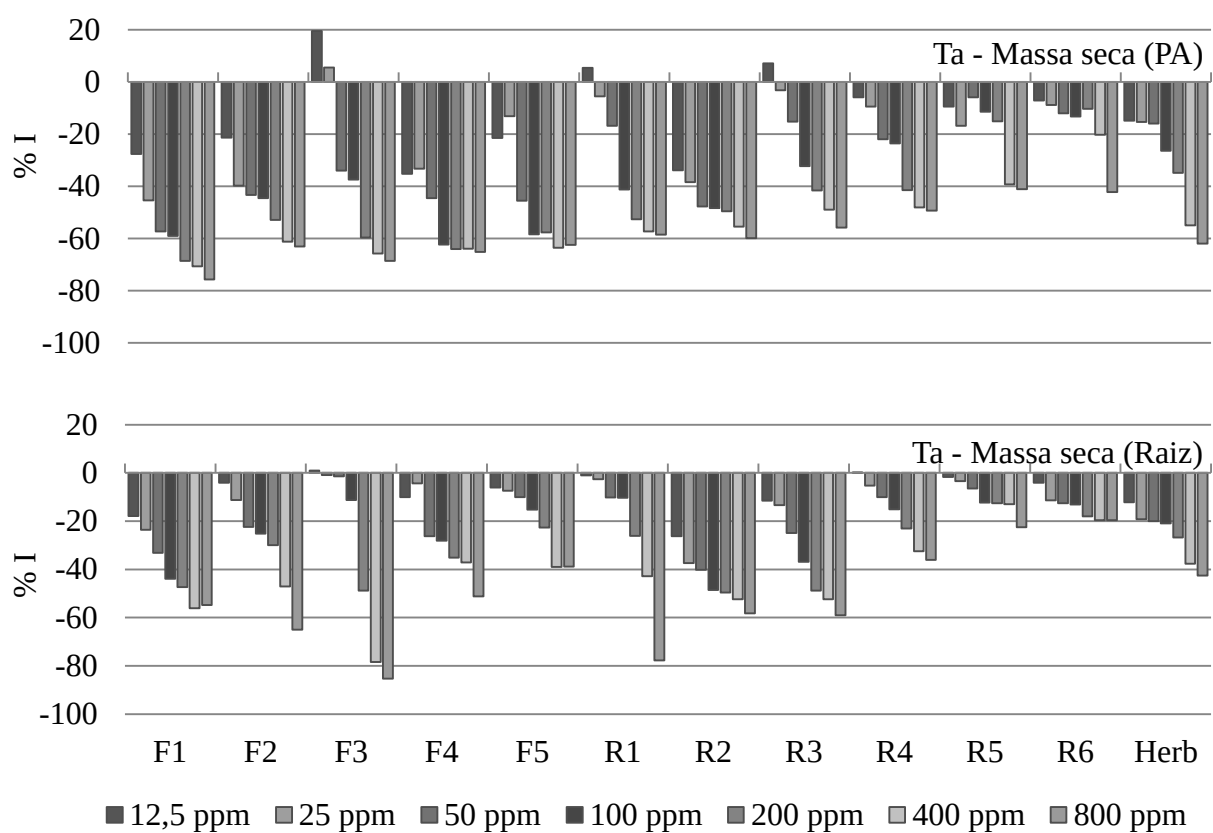
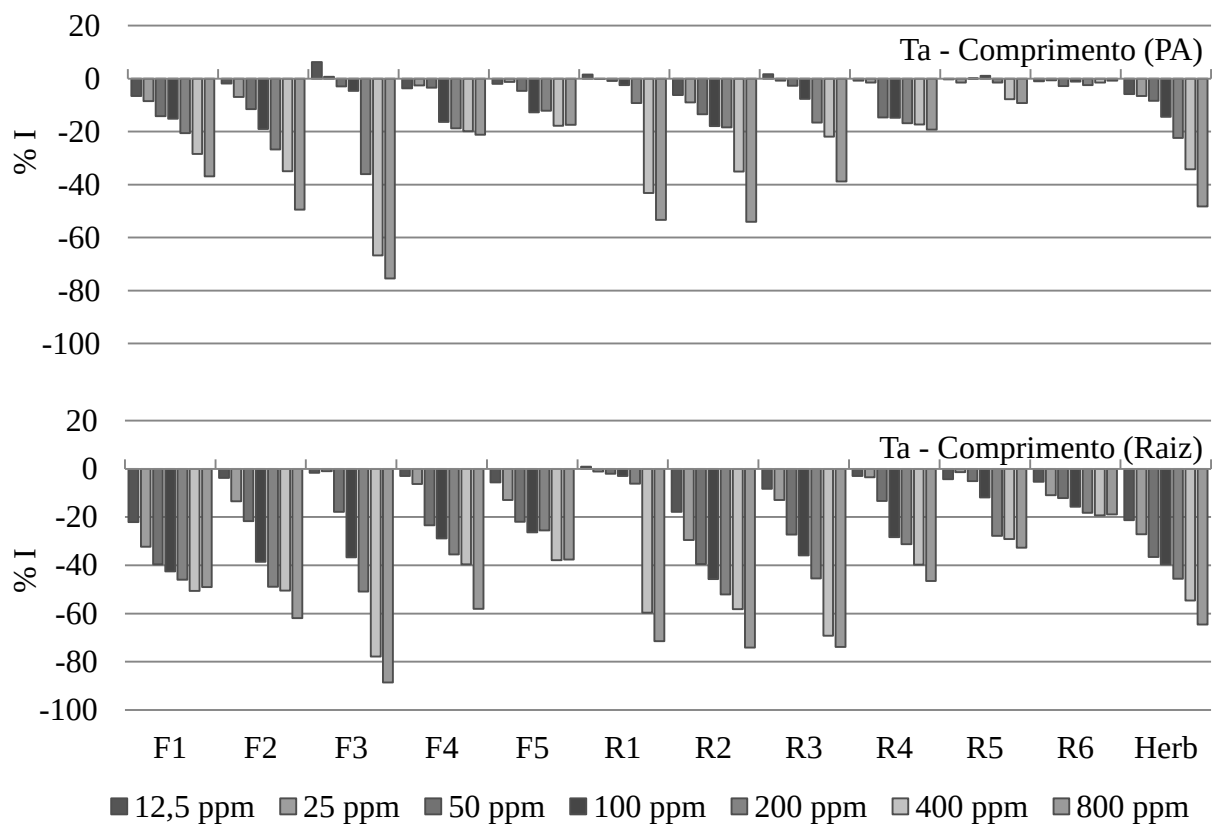
O estímulo do comprimento ou da massa seca, quando ocorreu, foi observado apenas em baixas concentrações dos extratos. O maior estímulo foi constatado para a massa seca da parte aérea na espécie teste *L. sativa*, no extrato da folha na fração metanol a 25 ppm (20,6%), seguido do extrato da folha na fração com acetato de etila a 12,5 ppm (19,4%), também constatado para a massa seca da parte aérea. Esse tipo de resposta estimulatória que algumas espécies apresentam quando expostas a baixas concentrações de extratos vegetais com potencial alelopático é de ampla ocorrência e pode estar relacionado a diversos mecanismos em nível celular (WEIR et al., 2004).











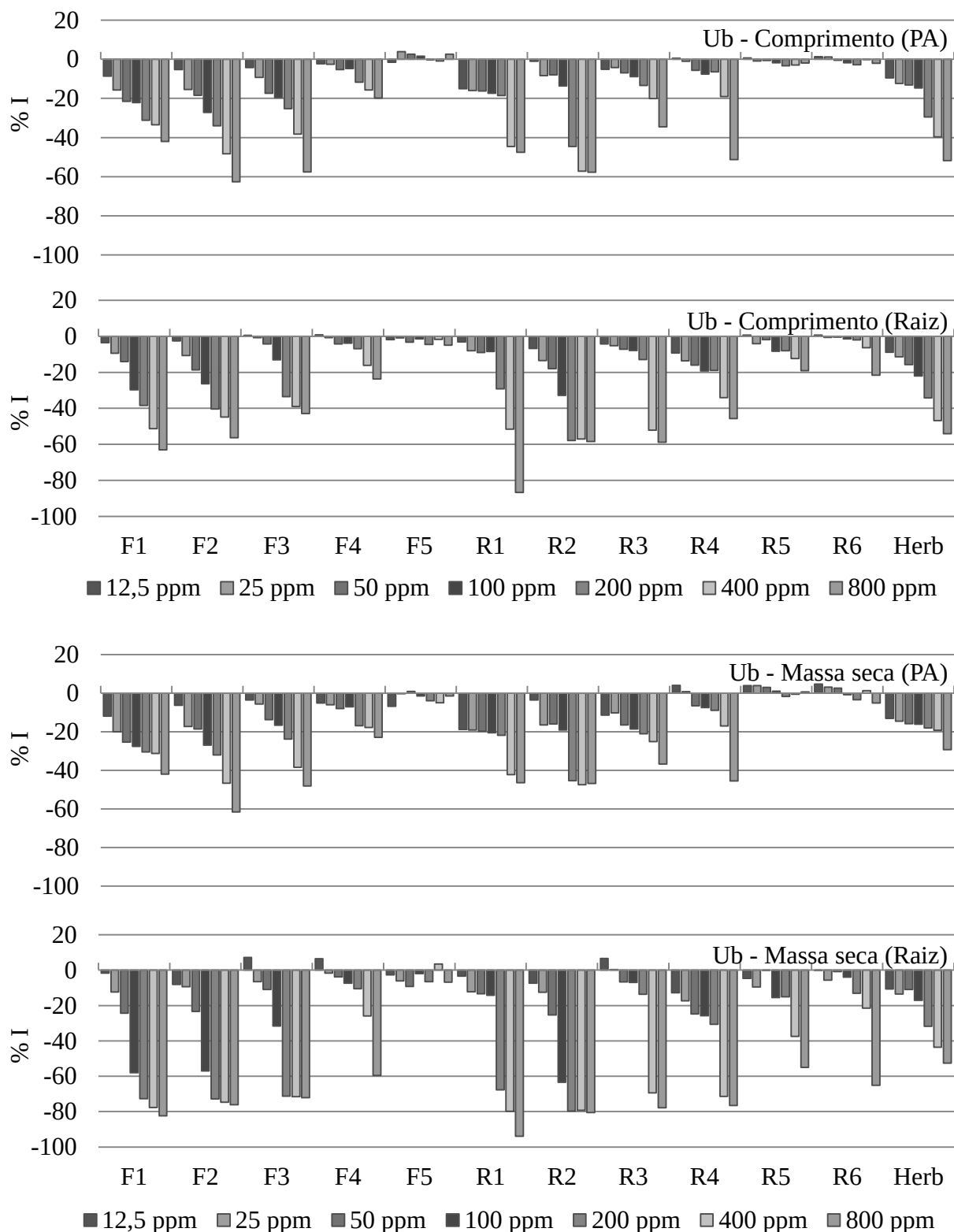


Figura 6. Inibição/estímulo (%) do comprimento e massa seca da parte aérea e da raiz, em relação ao controle, das plantas teste, proporcionado pelas frações de folhas (F) e raízes (R) de *V. ferruginea*. Ha: *H. annuus*, Ls: *L. sativa*, Rs: *R. sativus*, Sb: *S. bicolor*, Ta: *T. aestivum*, Ub: *U. brizantha*. F1 e R1: n-hexano; F2 e R2: diclorometano; F3 e R3: acetato de etila; F4 e R4: metanol; R5: metanol:água; F5 e R6: água; Herb: herbicida.

Os bioensaios mostraram que os extratos hidroetanólicos e as frações de folhas e raízes de *V. ferruginea* interferiram no funcionamento fisiológico das espécies testadas, pois houve alteração na germinabilidade, no comprimento e na massa seca foliar e radicular.

A porcentagem de germinação apresentou menor variação em relação aos controles, quando comparada a redução do crescimento e do acúmulo de massa seca, sendo observados estímulos moderados em baixas concentrações apenas para algumas das espécies teste. O grau de inibição foi em grande parte dependente da concentração dos extratos testados, uma vez que, nas maiores concentrações dos extratos foram observados os efeitos inibitórios mais intensos.

Assim, fez-se necessário uma identificação detalhada dos compostos presentes nos extratos e frações de *V. ferruginea* para a possível obtenção de estruturas químicas que possam auxiliar a compreensão das interações química entre os vegetais, como na utilização dessas substâncias para obtenção de moléculas sintetizadas mais ativa, seletiva ou persistente como alternativas aos de emprego comercial, assim reduzindo custos, além de evitar riscos de contaminação ambiental.

O estudo fitoquímico das folhas e das raízes de *V. ferruginea* possibilitou a identificação dos compostos majoritários de interesse. A desreplicação dos extratos hidroetanólicos e das frações possibilitou a identificação de dezoito substâncias por comparação com os bancos de dados AsterDB, DNP e MZedDB, sendo que os principais metabólitos reportados pertencem as classes flavonóides e terpenóides (Tabela 8). Dentre os terpenóides, cabe ressaltar a ocorrência das lactonas sesquiterpênicas, presentes em todas as frações das folhas e das raízes. O ácido quínico (um cicloexanopoliol (ciclitol) carboxilado) e o ácido cafeico (um ácido fenólico hidroxicinâmico) também foram encontrados nas frações das folhas e das raízes sob a forma livre e esterificada, formando os ácidos clorogênicos.

A atividade alelopática observado no estudo pode estar relacionada a uma ou a um conjunto de substâncias das diferentes classes dos aleloquímicos identificados. No entanto, a observação da ação dos aleloquímicos nos bioensaios podem expor uma dificuldade na separação entre a causa e o efeito, uma vez que várias reações fisiológicas de uma planta podem ser desencadeadas por mais de um aleloquímico (RIZZI et al., 2016).

Tabela 8. Constituintes químicos identificados nas frações de hexano (Hx), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcEt), metanol (MeOH) e água das folhas e das raízes de *V. ferruginea* com correspondentes tempos de retenção (tR), dados de espectrometria de massas obtidos a partir das análises por UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS.

#	tR (min)	Substância	Ionização Negativa	Negativa MS/MS	Ionização Positiva	Positiva MS/MS	Folhas					Raízes						Informação adicional
			TIC ions (m/z)		TIC ions (m/z)		Hex	DCM	AcEt	MeOH	Agua	Hex	DCM	AcEt	MeOH	Me:Ag	Agua	
1	1,12	Quinic acid	[M - H] ⁻ 191.05537	-	-	-	ok	ok	ok	ok	ok	-	-	-	ok	ok	ok	ref. substance
2	4,80	5-O-(E)-caffeoylquinic acid*	[M - H] ⁻ 353.08798	353.08716, 191.05540bp	[M + H] ⁺ 355.10236bp	-	ok	ok	ok	ok	ok	-	ok	ok	ok	ok	ok	ref. substance
3	5,41	Caffeic acid	[M - H] ⁻ 179.03403	179.03426, 134.03627bp, 99.92455	-	-	ok	ok	ok	ok	ok	-	ok	ok	ok	ok	ok	ref. substance
4	6,50	5-O-(E)-feruloylquinic acid	[M - H] ⁻ 367.10370	367.10373, 191.05563bp, 173.04492	-	-	ok	ok	ok	ok	ok	-	-	ok	ok	ok	ok	HRMS, MS/MS chemotaxo
5	8,58	3,5-di-O-(E)- caffeoylquinic acid	[M - H] ⁻ 515.11841	515.11847, 353.08749, 191.05515bp, 179.03391, 173.04454	[M + H] ⁺ 517.13416bp [(M+H) - H2O] ⁺ 499.12332	-	ok	ok	ok	ok	ok	-	-	ok	ok	ok	ok	HRMS, MS/MS chemotaxo
6	9,07	4,5-di-O-(E)- caffeoylquinic acid*	[M - H] ⁻ 515.11920	515.11975, 353.08810, 191.05540, 179.03413bp, 173.04474	[M + H] ⁺ 517.13446bp [(M+H) - H2O] ⁺ 499.12372	-	ok	ok	ok	ok	ok	-	-	ok	ok	ok	ok	ref. substance
7	9,70	3,8-dihydroxy-13- methoxy-4(15),10(14)- guaiadien-12,6-olide 3-O- glucoside	[M - H] ⁻ 455.19189	455.19281, 229.12326, 89.02313bp	[(M + H) - CO - H•] ⁺ 428.22757	428.22699, 231.13763, 185.13225bp, 128.06201, 91.05453	-	-	-	-	-	-	-	ok	ok	ok	ok	HRMS, MS/MS
8	9,76	3,4-O-(E)- caffeoylferuloylquinic acid	[M - H] ⁻ 529.13525	529.13556, 367.10370, 191.05553bp	[M + H] ⁺ 531.15021bp, [(M+H) - H2O] ⁺ 513.13953	-	ok	ok	ok	ok	ok	-	-	-	-	-	-	HRMS, MS/MS chemotaxo
9	10,21	3,4-O-(E)- feruloylcaffeoylquinic acid	[M - H] ⁻ 529.13538	529.13568, 367.10370, 353.08813, 191.05554, 173.04475bp	[M + H] ⁺ 531.15002	-	ok	ok	ok	ok	ok	-	-	-	-	-	-	HRMS, MS/MS chemotaxo

Continuação da Tabela 8.

#	tR (min)	Substância	Ionização Negativa	Negativa MS/MS	Ionização Positiva	Positiva MS/MS	Folhas					Raízes						Informação adicional
			TIC ions (m/z)		TIC ions (m/z)		Hex	DCM	AcEt	MeOH	Agua	Hex	DCM	AcEt	MeOH	Me:Ag	Agua	
10	11,20	3,5-Dimethoxy-4-hydroxycinnamaldehyde	[M - H]- 207.06549	207.06581, 161.02342, 133.02837bp	[M + H]+ 209.08081 [(M + H) - QA]+ 163.03895	-	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	HRMS, MS/MS chemotaxo
11	11,89	Hypochoeroside F	[M - H]- 569.20264	569.20300, 179.03412, 161.02341bp	[M + H]+ 571.21729, [(M+H) - H2O]+ 553.20673	325.09125, 163.03868bp	-	-	-	-	-	ok	ok	ok	ok	ok	ok	HRMS, MS/MS chemotaxo
12	12,20	8-(4-Hydroxytigloyloxy)-hirsutinolide	[M - H]- 393.15585, [M + Cl]- 429.13190, [M + FA]- 439.16107	-	[M + Na]+ 417.15173	417.15179, 83.04958bp	ok	ok	ok	ok	ok	-	-	-	-	-	-	HRMS, MS/MS chemotaxo
13	12,69	Hispidulin	[M - H]- 299.05594	299.05624, 284.03268bp, 256.03766	[M + H]+ 301.07034	-	ok	ok	ok	ok	ok	-	ok	ok	-	-	-	HRMS, MS/MS chemotaxo
14	14,00	Piptocarphin A	[M - H]- 421.15057, [M + Cl]- 457.12750, [M + FA]- 467.15567	-	[M + H]+ 423.16446, [M + Na]+ 445.14648, [(M+H) - H2O]+ 405.15390	445.14676, 359.10989, 88.07612bp	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	HRMS, MS/MS chemotaxo
15	14,29	Chrysoeriol	[M - H]- 299.05603	299.05637, 284.03271bp, 256.03784	[M + H]+ 301.07056	-	ok	ok	ok	ok	ok	-	ok	-	-	-	-	HRMS, MS/MS chemotaxo
16	15,16	Piptocarphin B	[M - H]- 435.16611, [M + Cl]- 471.14288, [M + FA]- 481.17136	-	[M + H]+ 437.18011, [M + Na]+ 459.16196, [(M+H) - H2O]+ 419.16946	459.16232, 83.04954bp	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	HRMS, MS/MS chemotaxo
17	16,11	Acacetin	[M - H]- 283.06116	283.06143, 268.03778bp, 239.03491	[M + H]+ 285.07544	-	ok	ok	ok	ok	ok	-	ok	ok	-	-	-	HRMS, MS/MS chemotaxo
8	16,39	3',4'-dimethoxyluteolin	[M - H]- 313.07162	313.07193, 298.04819, 283.02481, 255.02972bp	[M + H]+ 315.08591	-	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	-	-	HRMS, MS/MS chemotaxo

Quanto as análises por UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS (Tabela 8), foi possível observar que as frações das folhas e das raízes de *V. ferruginea* diferiram em relação a composição química de alguns de seus metabólitos secundários, uma vez que, os ácidos clorogênicos 3,4-O-(E)-caffeoylferuloylquinic acid (**8**) e 3,4-O-(E)-feruloylcaffeoylquinic acid (**9**) e a lactonas sesquiterpênicas do subtipo hirsutinolido 8-(4-Hydroxytigloyloxy)-hirsutinolide (**12**) foram identificados apenas nas folhas, enquanto, a lactonas sesquiterpênicas 3,8-dihydroxy-13-methoxy-4(15),10(14)-guaiadien-12,6-olide 3-O-glucoside (**7**) e Hypochoeroside F (**11**) foram identificadas apenas nas raízes.

As Figuras 7 a 10 apresentam os cromatogramas de íons totais (TIC) do extrato hidroetanólico e das frações das folhas e das raízes da espécie *V. ferruginea* obtidos nos modos negativo e positivo.

Com base nos perfis cromatográficos, a análise comparativa demonstrou-se que alguns dos extratos ou frações, tanto das folhas como das raízes, apresentam diferenças quanto a sua composição química. Quando uma amostra não produz um pico no mesmo tempo de retenção que uma determinada substância pode-se considerar que a substância em questão está ausente, ou a sua presença ocorre em níveis de concentração abaixo do limite de detecção do equipamento (HOLLER et al., 2009).

Os compostos identificados já foram descritos na literatura com atividade fitotóxica, sugerindo que tais substâncias podem ser, ao menos em parte, responsáveis por causar tal inibição observada.

O ácido cafeico, presente nas amostras de folhas e raízes de *V. ferruginea*, é um dos hidroxicinâmicos mais comumente encontrado e isolado em plantas cultivadas, assim como, em resíduo de plantas daninhas (BATISH et al., 2008). Esta substância foi identificada nos extratos de *Vernonia ferruginea*, assim como é normalmente encontrada nas plantas, ou seja, na forma de ésteres, a exemplo do ácido clorogênico, éster do ácido quínico, cuja molécula é constituída pelo ácido quínico esterificado ao ácido cafeico e, algumas vezes, como ácidos livres (CRAWLEY, 1989; DURÁN; PADILLA, 1993).

O ácido cafeico, sintetizado na via dos fenilpropenóides, envolvido na formação da lignina é estruturalmente similar ao cafeoil álcool (monolignol do p-hidroxifenil), está relacionado a uma grande variedade de interações, incluindo a alelopática (BATISH et al., 2008).

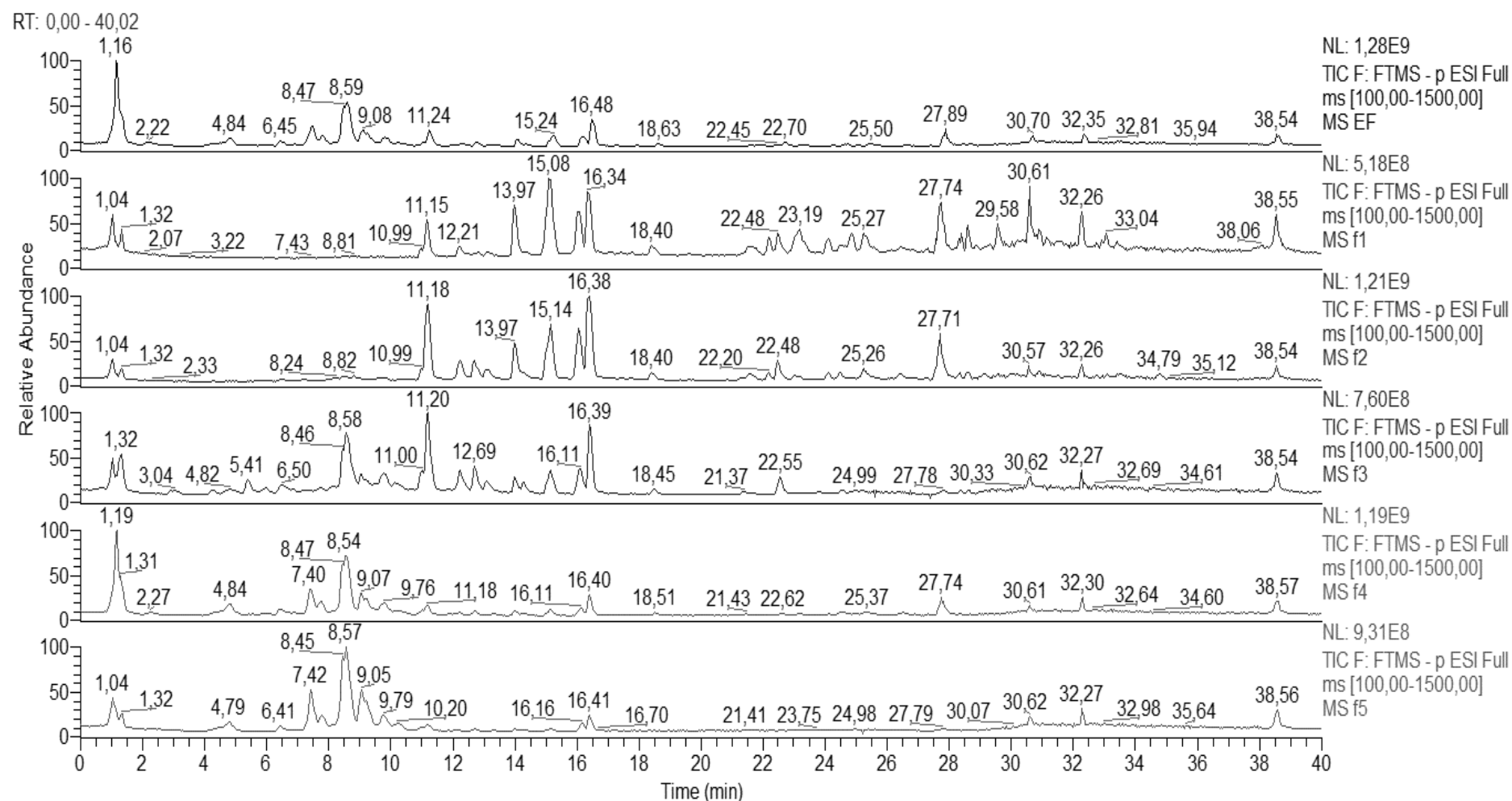


Figura 7. Cromatogramas de íons totais (TIC) do extrato hidroetanólico (ef), e das frações de hexano (f1), diclorometano (f2), acetato de etila (f3), metanol (f4) e água (f5) das folhas de *V. ferruginea* obtidos a partir das análises por UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS no modo de ionização negativo.

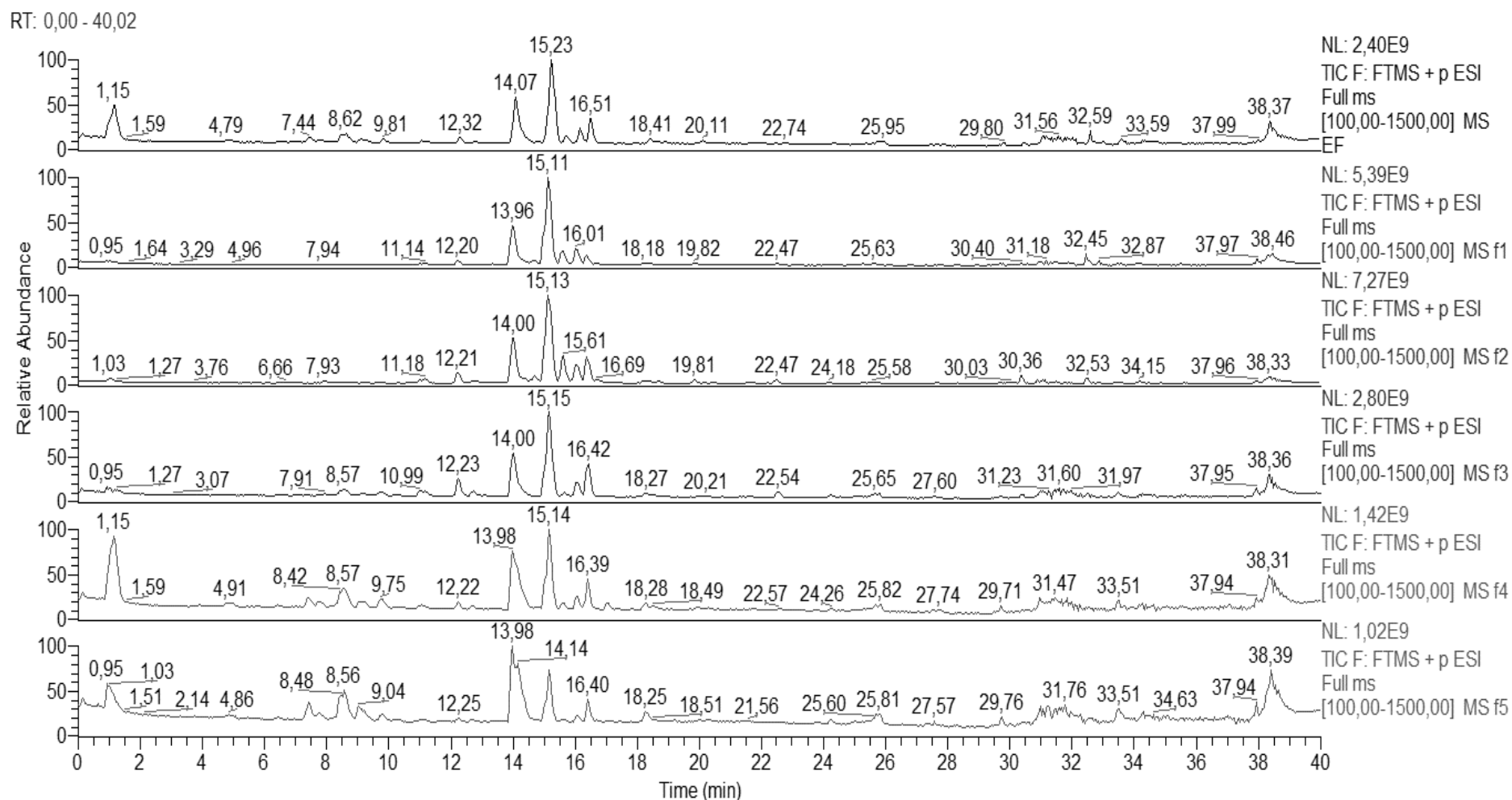


Figura 8. Cromatogramas de íons totais (TIC) do extrato hidroetanólico (ef), e das frações de hexano (f1), diclorometano (f2), acetato de etila (f3), metanol (f4) e água (f5) das folhas de *V. ferruginea* obtidos a partir das análises por UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS no modo de ionização positivo (b).

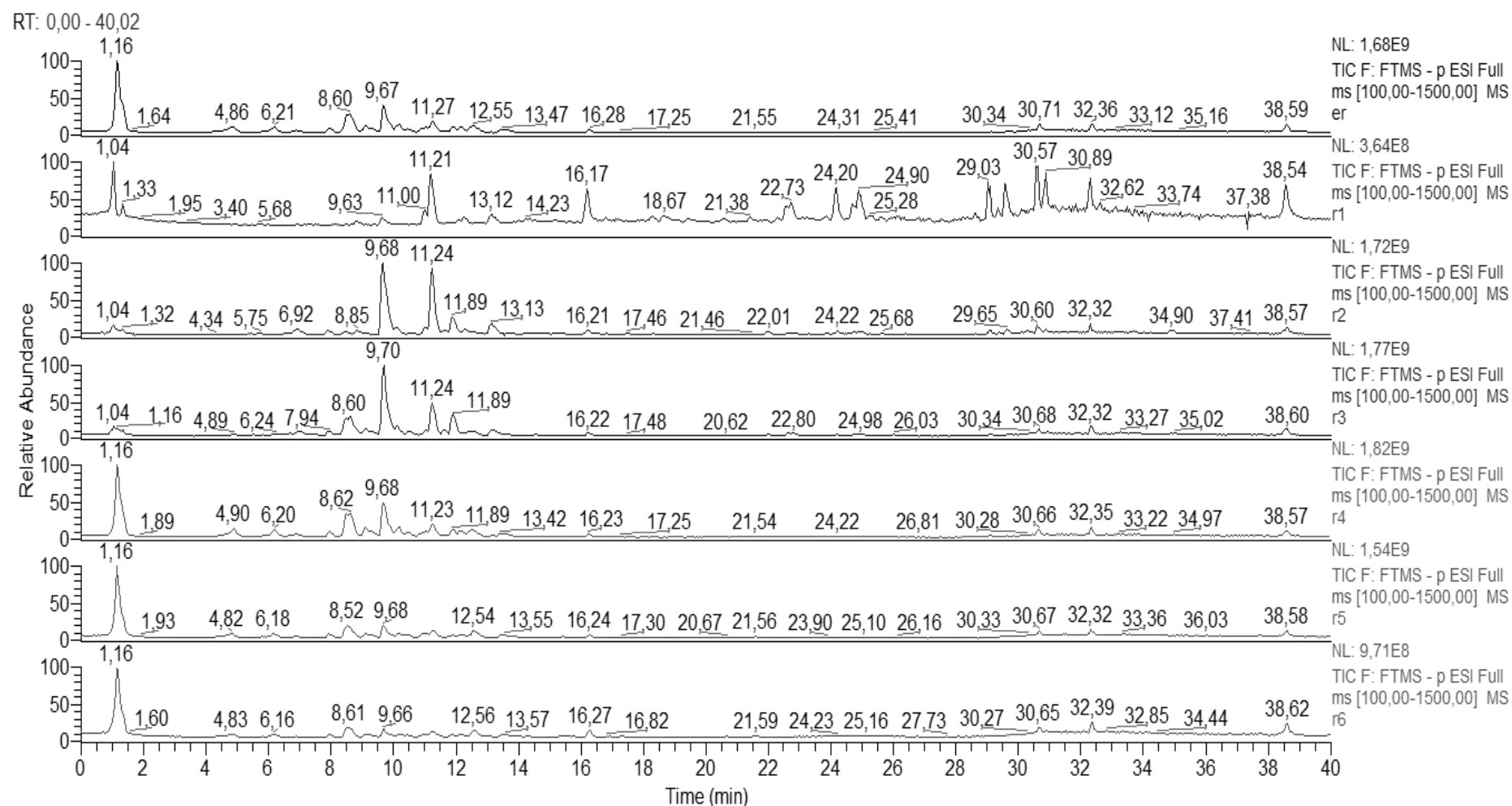


Figura 9. Cromatogramas de íons totais (TIC) do extrato hidroetanólico (er), e das frações de hexano (r1), diclorometano (r2), acetato de etila (r3), metanol (r4), metanol/água (r5) e água (r6) das raízes de *V. ferruginea* obtidos a partir das análises por UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS no modo de ionização negativo.

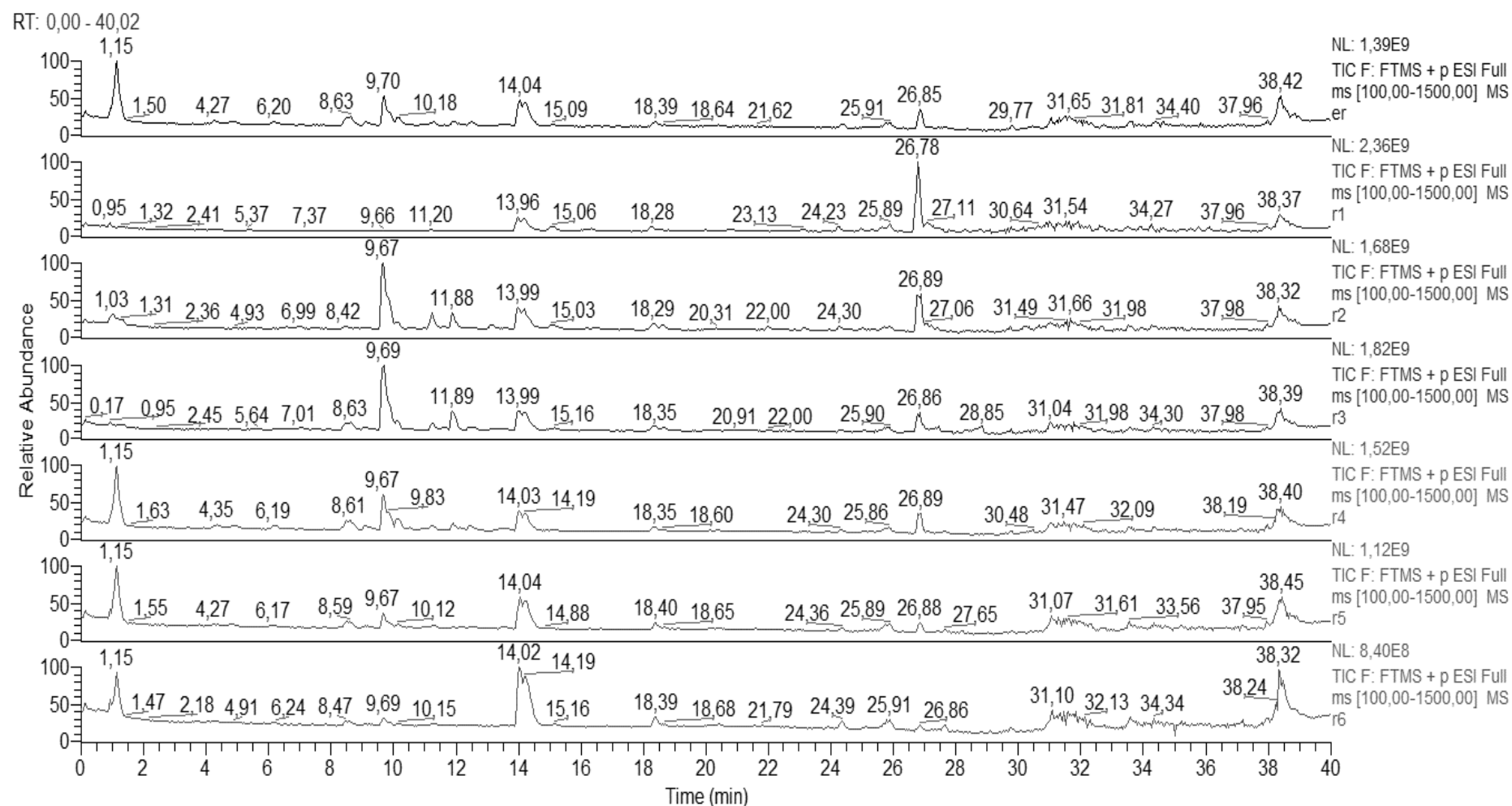


Figura 10. Cromatogramas de íons totais (TIC) do extrato hidroetanólico (er), e das frações de hexano (r1), diclorometano (r2), acetato de etila (r3), metanol (r4), metanol/água (r5) e água (r6) das raízes de *V. ferruginea* obtidos a partir das análises por UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS no modo de ionização positivo (b).

A sua toxicidade inclui modificações na absorção mineral, emergência das plântulas, desenvolvimento e crescimento da raiz, balanço hídrico e fotossíntese, evapotranspiração e expansão da folha, rizogênese e enzimas relacionadas e formação de raízes adventícias (BATISH et al., 2008).

Este ácido é capaz de atuar como inibidores endógenos da germinação, uma vez que o acúmulo desses compostos proporciona a perda da viabilidade da semente (SATHIYAMOORTHY, 1990), mas também, possuem efeitos antioxidantes, provavelmente relacionados a ligação de íons metálicos, a varredura de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou seus precursores, a regulação endógena de enzimas antioxidantes ou ao reparo de danos oxidativos em biomoléculas (URSINI et al., 1999).

Por meio da desreplicação dos extratos e frações também foi possível verificar a produção de ácidos clorogênicos. Estes ácidos constituem um conjunto de substâncias fenólicas e seus isômeros, formados, principalmente, pela esterificação do ácido quínico com derivados de ácido cafeico, cinâmico, ferúlico ou p-cumárico (MARIA; MOREIRA, 2004). Os principais grupos de isômeros de ácidos clorogênicos encontrados na espécie estudada foram os ácidos cafeoilquínicos, os ácidos dicafeoilquínicos e os ácidos feruloilquínicos. Embora o grupo do éster do ácido cafeico com o ácido quínico, representado pelos ácidos cafeoilquínicos (ACQ) (isômeros 3-, 4-, 5-) encontrem-se entre os ácidos clorogênicos mais abundante na natureza (MARIA; MOREIRA, 2004), só foi possível identificar um dentre os ácidos clorogênicos presentes nas amostras.

Muitas funções nas plantas tem sido relacionadas, ao longo dos anos, à presença de ácidos clorogênicos. Dentre elas, destacam-se evidências de que os ácidos cafeoilquínicos podem inibir a atividade das enzimas ácido indol acético oxidase e fosforilase, relacionadas ao fim do estágio de dormência e ao início do processo de desenvolvimento da planta (MARIA; MOREIRA, 2004). Tais evidências, se comprovadas, podem explicar o comportamento da germinação na presença dessas substâncias em testes de potencial aleloquímico.

Os flavonoides, também encontrados nas amostras das folhas e raízes de *V. ferruginea*, são compostos fenólicos considerados potentes inibidores da germinação das sementes, crescimento e alongamento de raízes (RIZZI et al., 2016). A síntese desses compostos podem ser estimulada por diversos

estresses ambientais. Rodziewicz et al. (2014) verificaram que tanto o estresse hídrico como encharcamento alteram os níveis de produções de flavonóides.

Muitos compostos flavonoidicos, em condições naturais, mostram propriedades tóxicas e seus efeitos em plantas incluem diminuição da entrada de oxigênio nas mitocôndrias e, nos cloroplastos, inibição do transporte de elétron e redução da eficiência do fotossistema II, comprometendo a fotossíntese (MORELAND; NOVITZKY, 1988). Estas inúmeras atividades proporcionam um amplo espectro de fitotoxicidade (EINHELLIG, 2004) ou, dependendo da concentração dos flavonóides, estimulam o desenvolvimento do sistema radicular (YANG et al., 1998).

E nas lactonas sesquiterpênicas podem ser observados diferentes efeitos na promoção ou inibição da germinação de sementes de diferentes espécies ou cultivares em função dos grupos funcionais presentes no esqueleto sesquiterpênico (FISCHER, 1989).

A análise por UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS, dos extratos e frações de folhas e raízes de *V. ferruginea* permitiram a identificação de 18 substâncias entre ácidos clorogênicos, flavonóides e lactonas sesquiterpenicas. As folhas de *V. ferruginea* apresentaram 16 destas substâncias, enquanto raízes apresentaram 15 das 18 substâncias. Tais classes químicas identificadas em ambos os extratos (de folhas e raízes), são investigadas em pesquisas voltadas para estudos fitoquímicos, sendo assim, possivelmente os compostos responsáveis pelos efeitos inibitórios sobre os processos de germinação e proliferação celular das plantas teste, indicando atividade fitotóxica.

Pode-se inferir que a diferença na composição química entre frações de *V. ferruginea*, provavelmente foi a causa para diferente performance nos testes de germinação. E ainda, pode-se concluir que extratos ou frações com perfil químico semelhante podem propiciar respostas alelopáticas diferentes, devido a correlação entre a tolerância da espécie testada e a estrutura e/ou a concentração das substâncias.

Além disso, há indícios de existência de sinergismo entre diferentes substâncias aleloquímicas encontradas na espécie doadora, uma vez que foi observada uma leve redução na atividade fitotóxica nos tratamentos com as frações em comparação aos extratos hidroetanólicos das folhas e das raízes.

5.2. Teste de germinação

5.2.1. Disponibilidade hídrica

As plantas sintetizam um grande número de metabólitos secundários, e alguns desempenham funções importantes nas relações entre as plantas e o meio ambiente, onde podem exercer, entre outros, o papel de aleloquímicos na interferência com outras plantas (KROYMANN, 2011).

A disponibilidade hídrica atua sobre a capacidade de algumas espécies em produzir e liberar compostos químicos que influenciam a germinação, o crescimento e o desenvolvimento de outras plantas.

A germinação das sementes de *U. brizantha* submetidos à ação dos extratos foliares dos seis tratamentos de disponibilidade hídrica não mostrou diferença significativa entre as concentrações 12,5 ppm a 50 ppm em relação ao tratamento controle (Tabela 9). O efeito mais acentuado foi causado pelo extrato 1000 mm, que diferiu do controle desde a concentração 100 ppm. A partir da concentração de 400 ppm todas os extratos promoveram inibições na germinação de sementes quando comparados ao controle, observando-se um gradiente de inibição que variou de 15% para os tratamentos nas menores concentrações até 58%, o obtido na maior concentração de 1000 mm.

Tabela 9. Germinação (%) de *U. brizantha* submetidos aos extratos hidroetanólicos de folhas de *V. ferruginea* em seis disponibilidade hídrica (100, 200, 300, 400, 500 e 1000 mm distribuídos ao mês).

Disponibilidade hídrica	Germinação (%) - Extrato hidroetanólico das folhas						
	12,5 ppm	25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm	400 ppm	800 ppm
Controle	84,2	83,3	82,5	83,8 a	83,3 a	84,2 a	84,2 a
100 mm	80,0	81,7	81,7	76,7 ab	79,2 ab	69,2 b	60,0 b
200 mm	81,7	82,5	82,5	78,3 ab	77,5 ab	70,0 b	61,7 b
300 mm	80,0	80,8	81,7	77,5 ab	75,8 ab	70,8 b	60,8 b
400 mm	82,2	82,5	82,5	76,7 ab	77,5 ab	67,5 b	60,8 b
500 mm	80,8	85,0	80,8	76,7 ab	79,2 ab	68,3 b	59,2 bc
1000 mm	82,5	81,7	79,2	70,8 b	69,2 b	61,7 b	49,2 c
F	0,54 ns	0,41 ns	0,32 ns	3,06 *	3,43 *	7,45 **	20,63 **
CV (%)	6,12	6,30	6,46	6,90	7,38	8,73	9,16
DMS	9,02	9,38	9,51	9,61	10,31	11,07	10,29

ns, Não significativo a 5%, * Significativo a 5%, **Significativo a 1% pelo teste de Tukey; CV (%): Coeficiente de variação; DMS: diferença mínima significativa. Médias seguidas pelas mesmas letras para as concentrações dos extratos não diferem entre si pelo teste de Tukey (p > 0,05).

O comprimento da parte aérea apresentou diferença estatística nos tratamentos 400, 500 e 1000 mm nas concentrações acima de 100 ppm e nos tratamentos 100, 200 e 300 mm em concentrações a partir de 200 ppm (Figura 11 a). A inibição do crescimento da parte aérea chegou a ser de aproximadamente 33%, na maior concentração do tratamento 1000 mm em relação ao controle. O efeito fitotóxico dos extratos das folhas foi mais pronunciado sobre o crescimento das plântulas que sobre a germinação das sementes de *U. brizantha*, sendo tal fato comumente relatado na literatura (OLIVEIRA et al., 2016).

O comprimento das raízes demonstrou comportamento semelhante ao da parte aérea. Os menores valores comprimento da raiz foram observados no extrato 1000 mm (Figura 11 b). As plântulas submetidas aos extratos 100, 200, 300, 400 e 500 mm apresentaram comprimento da raiz significativamente diferentes ao do controle a partir da concentração de 100 ppm.

As mudanças na disponibilidade hídrica durante o desenvolvimento de um indivíduo afetam fatores fisiológicos críticos para seu crescimento, estabelecimento ou sobrevivência. Tais fatores como fotossíntese, comportamento estomatal, mobilização de reservas, expansão foliar e crescimento, podem ser alterados em função da disponibilidade hídrica e, conseqüentemente, levar a alterações no metabolismo secundário (GOBBONETO; LOPES, 2007) que podem resultar em desvios na rota de síntese de metabólitos proporcionando diferentes níveis de inibição e modificando o potencial alelopático de uma espécie.

Os efeitos fitotóxicos sobre o crescimento das plântulas de *U. brizantha* variaram quanto à sua intensidade, visto que, a ação das substâncias inibidoras pode estar condicionada a mudanças da disponibilidade hídrica. Os efeitos fitotóxicos também tendem a ser dependentes da concentração dessas substâncias nos extratos e, desta forma, tendem a ser mais acentuados em concentrações mais altas, sendo essa tendência observada na avaliação dos parâmetros de crescimento. O efeito de um extrato sobre a germinação e desenvolvimento inicial da planta teste dependem concentração dos aleloquímicos e esses frequentemente atuam promovendo a ativação de processos de inibição em baixas concentração e a inibição em altas concentrações (ANDRADE et al., 2017).

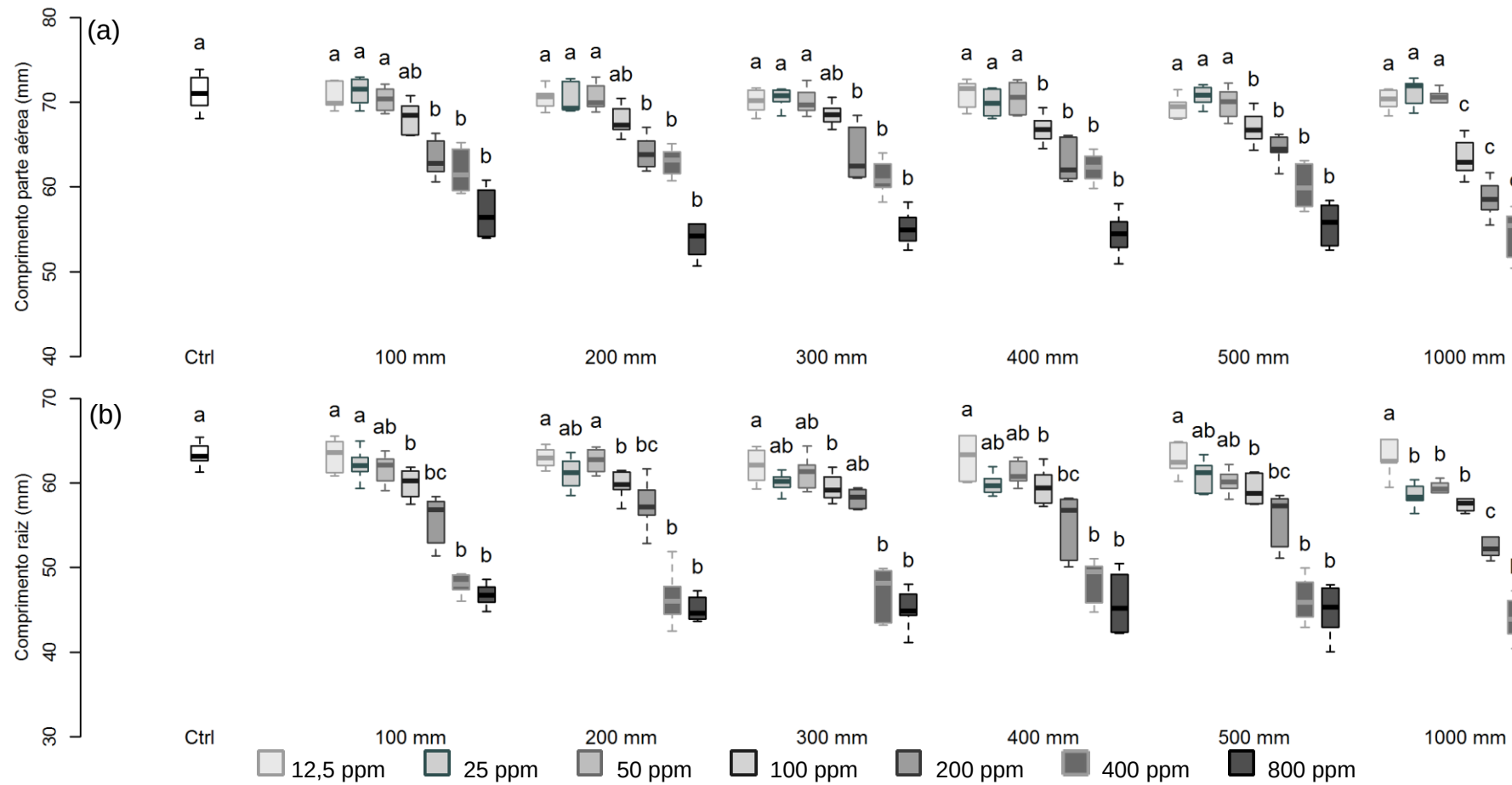


Figura 11. Análise box-plot de comprimento (mm) da parte aérea (a) e da raiz (b) de *U. brizantha* submetidos aos extratos hidroetanólicos de folhas de *V. ferruginea* em seis disponibilidade hídrica (100, 200, 300, 400, 500 e 1000 mm distribuídos ao mês). *Ctrl: controle. Médias seguidas pelas mesmas letras para as concentrações dos extratos não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

A ação fitotóxica de substâncias alelopáticas presentes nos extratos também foi constatada no acúmulo de massa seca da parte aérea das plântulas (Figura 12 a).

Assim como para os parâmetros germinação e comprimento, 1000 mm foi o tratamento que apresentou maior atividade tóxica, com a maior redução no acúmulo de massa seca. A massa seca da parte aérea no tratamento 1000 mm não foi diferente significativamente do controle apenas nas menores concentrações 12,5, 25 e 50 ppm.

A inibição do acúmulo de massa seca está associada, em parte, ao efeito dos aleloquímicos sobre os processos fisio-metabólicos decorrentes da ação dessas substâncias sobre o mecanismo enzimático hidrolítico das sementes e das plântulas (SILVA et al., 2016).

As enzimas hidrolíticas atuam na degradação do amido formando esqueletos carbônicos utilizados na retomada do crescimento do embrião e a alteração ou o colapso do sistema hidrolítico afeta o desenvolvimento das plântulas, influência negativamente à translocação e alocação de assimilados, e pode, indiretamente, inibir a síntese de ácido giberélico (AUMONDE et al., 2013).

O acúmulo de massa seca da raiz foi mais sensível às substâncias presentes nos extratos em comparação à parte aérea. Todos os extratos das folhas mostraram ação fitotóxica sobre a massa seca da raiz de *U. brizantha* a partir da concentração de 100 ppm (Figura 12 b). As plântulas expostas aos extratos dos tratamentos de 100 a 500 mm atingiram 77%, 76%, 75%, 76% e 75% da média da massa seca das raízes das plântulas no controle, respectivamente, enquanto o extrato 1000 mm atingiu apenas 45%.

As substâncias fitotóxicas quando em contato com a raiz, podem afetar diretamente o seu desenvolvimento e o acúmulo de massa seca, visto que interferem na divisão celular, na permeabilidade das membranas, e na atividade de enzimas (TEERARAK et al., 2012).

Os ensaios biológicos com os extratos das folhas de *V. ferruginea* submetida a diferentes disponibilidades hídrica sugerem que a espécie pode sintetizar compostos aleloquímicos em possíveis interações alelopáticas, que podem ser responsáveis pela sua predominância e/ou sobrevivência em algumas regiões.

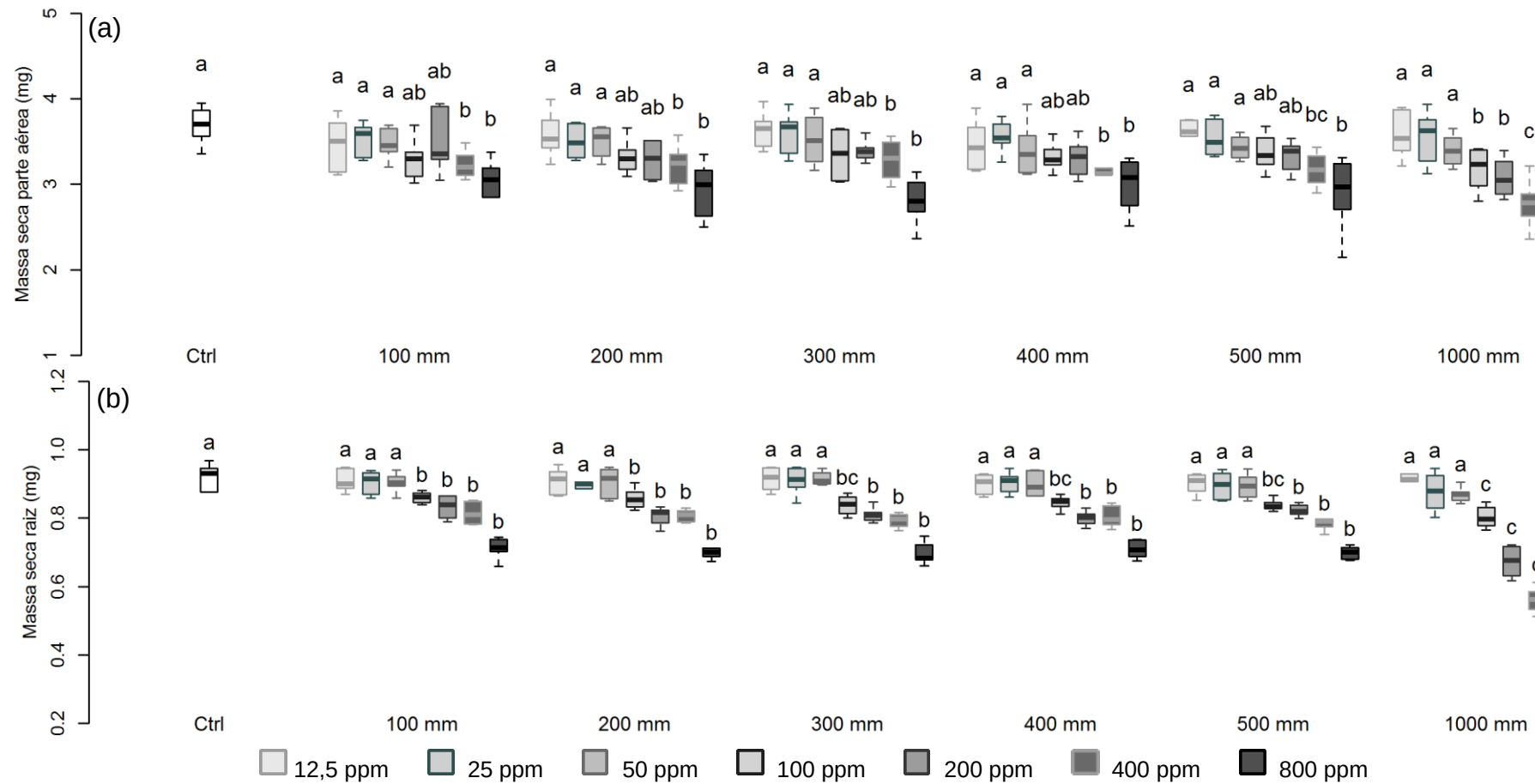


Figura 12. Análise box-plot de massa seca (mg) da parte aérea (a) e da raiz (b) de *U. brizantha* submetidos aos extratos hidroetanólicos de folhas de *V. ferruginea* em seis disponibilidade hídrica (100, 200, 300, 400, 500 e 1000 mm distribuídos ao mês). *Ctrl: controle. Médias seguidas pelas mesmas letras para as concentrações dos extratos não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Todos os extratos das folhas reduziram significativamente os parâmetros de crescimento das plântulas de *U. brizantha*. No entanto, os extratos do tratamento 1000 mm geraram ainda severas alterações morfológicas nas radículas. Além da redução da germinação, inibição do crescimento e do acúmulo de massa seca, o extrato 1000 mm promoveu aumento de diâmetro das raízes, apresentando severas atrofias, ausência de tricomas radiculares e necrose nas extremidades.

Em condições de estresse formecida pela ação de aleloquímicos, muitas plântulas tendem a desenvolver respostas morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, por meio de vários metabólitos secundários na tentativa de sobrevivência à nova condição de meio ambiente (SILVA et al., 2016).

Os extratos hidroetanólico das raízes de *V. ferruginea* apresentaram maior variação no efeito fitotóxico sobre o crescimento das plântulas, geralmente com efeito inibitório mais expressivo em função dos tratamentos com maior disponibilidade hídrica, reforçando a hipótese levantada para os extratos das folhas, que indicam uma variação do metabolismo da espécie estudada em função da disponibilidade hídrica.

Os extratos testados não afetaram a porcentagem de germinação nas menores concentrações (12,5 a 100 ppm) (Tabela 10).

Tabela 10. Germinação (%) de *U. brizantha* submetidos aos extratos hidroetanólicos de raízes de *V. ferruginea* em seis disponibilidade hídrica (100, 200, 300, 400, 500 e 1000 mm distribuídos ao mês).

Concentrações de alumínio	Germinação (%) - Extrato hidroetanólico das raízes						
	12,5 ppm	25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm	400 ppm	800 ppm
Controle	84,2	88,3	86,7	82,5	85,0 a	90,0 A	85,8 a
100 mm	86,7	87,5	85,8	83,3	85,0 a	80,8 Ab	73,3 ab
200 mm	84,2	85,0	85,0	82,5	83,3 a	80,0 Ab	67,5 bc
300 mm	85,0	84,2	84,2	83,3	84,2 a	75,8 Bc	67,5 bc
400 mm	85,8	85,0	85,8	83,3	80,0 ab	69,2 Bc	65,8 bc
500 mm	85,0	85,8	82,5	75,8	70,8 bc	66,7 C	60,0 c
1000 mm	85,8	86,7	84,2	74,2	65,0 c	64,2 C	56,7 c
F	0,10 ns	0,32 ns	0,34 ns	2,31 ns	8,47 **	10,61 **	11,31 **
CV (%)	8,57	7,60	6,91	7,88	8,49	9,17	10,18
DMS	13,18	11,80	10,59	11,48	12,11	12,46	12,52

ns, Não significativo a 5%, * Significativo a 5%, **Significativo a 1% pelo teste de Tukey; CV (%): Coeficiente de variação; DMS: diferença mínima significativa. Médias seguidas pelas mesmas letras para as concentrações dos extratos não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

A germinabilidade de *U. brizantha* apresentou redução, nos tratamentos com maior disponibilidade hídrica, com o aumento da concentração do extrato de *V. ferruginea*. Tal fato pode ser explicado pela menor sensibilidade do processo germinativo aos aleloquímicos ou ainda pela baixa toxidez dos compostos, comparativamente ao crescimento inicial (AUMONDE et al., 2013).

A porcentagem de germinação de *U. brizantha* foi alta, no entanto o aumento da concentração proporcionou diferença significativa entre os tratamentos. Em extratos com concentrações mais elevadas ocorre também o aumento dos níveis das substâncias tóxicas que podem interferir na divisão e na permeabilidade da membrana, assim como na ativação de enzima (RIZZI et al., 2016).

Os extratos hidroetanólicos das raízes apresentaram efeito inibitório significativo sobre o crescimento da parte aérea da planta teste. Este efeito foi ainda mais efetivo com os extratos dos tratamentos 500 e 1000 mm, que afetou tanto parte aérea (Figura 13 a) quanto a radícula (Figura 13 b), tendo reduzido em até 28% (500 mm) e 37% (1000 mm) o crescimento total das plântulas em relação ao controle.

Diferentemente do observado nos extratos das folhas, os extratos das raízes dos tratamentos 100, 200 e 300 mm, as menores concentrações, apresentaram uma tendência de indução sobre o crescimento da radícula e leve aumento do comprimento das plântulas, contudo não diferiram significativamente nessas concentrações (Figura 13).

Aparentemente, os compostos presentes nos tratamentos 100, 200 e 300 mm são inibitórios apenas quando em altas concentrações, e são estimulantes em menores concentrações. Embora não encontrado nos demais tratamentos de experimentos com estresse, o estímulo do crescimento de plantas teste é rotineiramente descrito em trabalhos relacionados à alelopatia (BORELLA et al., 2012). Esse fenômeno é conhecido por hormesis e compreende a um processo de dose-resposta que se caracteriza por estimulação do crescimento da plântula em doses baixas e de inibição em doses elevadas (CALABRESE; BLAIN, 2011). Este processo pode estar associado à influência do extrato sobre a produção fitormonal da planta teste ou ao aumento na sensibilidade de seus tecidos (BORELLA et al., 2012).

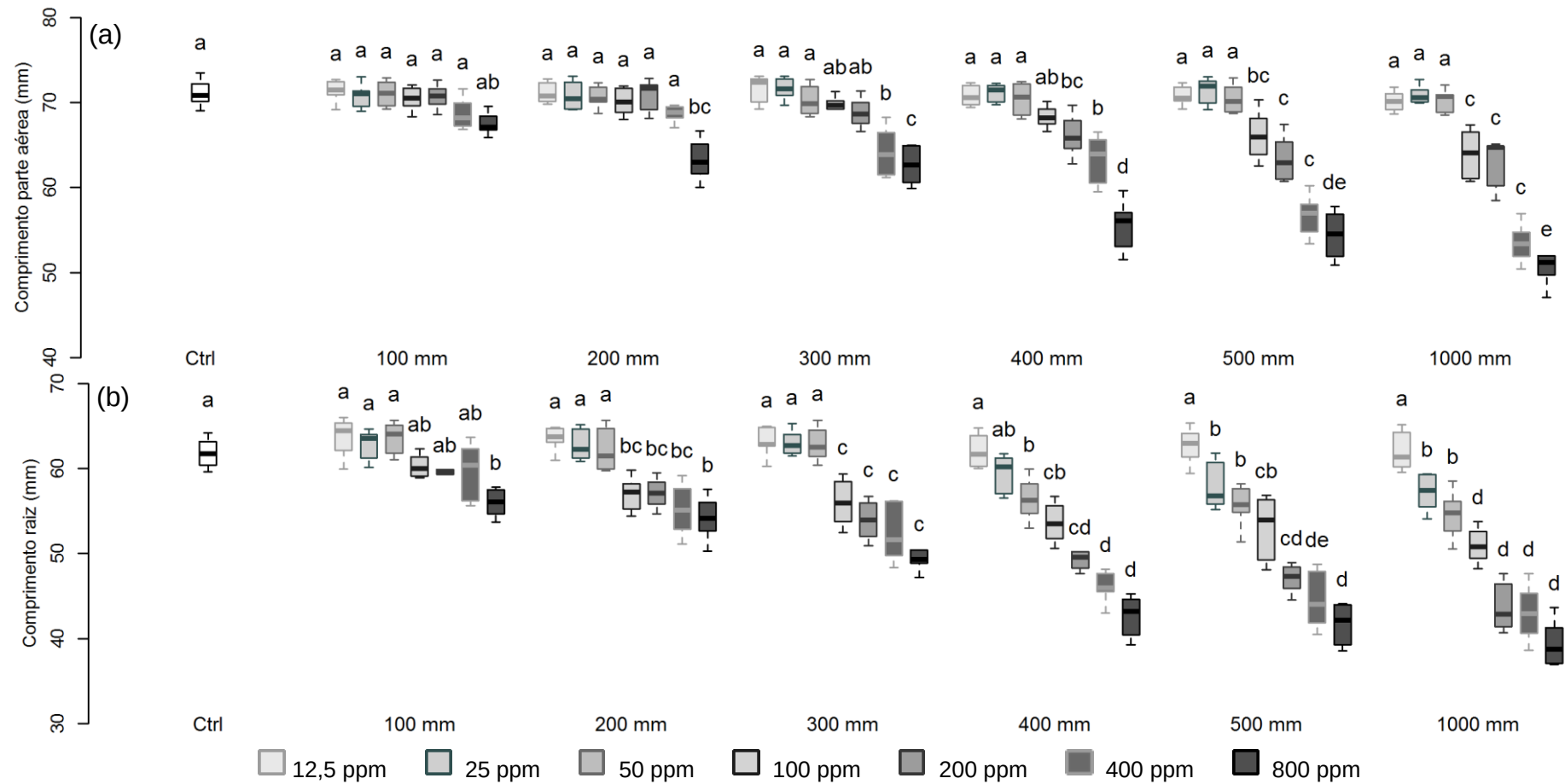


Figura 13. Análise box-plot de comprimento (mm) da parte aérea (a) e da raiz (b) de *U. brizantha* submetidos aos extratos hidroetanólicos de raízes de *V. ferruginea* em seis disponibilidade hídrica (100, 200, 300, 400, 500 e 1000 mm distribuídos ao mês). *Ctrl: controle. Médias seguidas pelas mesmas letras para as concentrações dos extratos não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

As características de acúmulo de massa seca da parte aérea e da raiz foram afetadas pelos extratos, quanto maiores as concentrações, menores os valores dessas variáveis (Figura 14 a e b).

Nas concentrações de 12,5 a 50 ppm, não foram observadas diferenças significativas entre as médias de massa seca da parte aérea para os diferentes extratos, ou seja, nessas concentrações, todos os tratamentos apresentaram o mesmo acúmulo de massa seca. Para as demais concentrações, principalmente nas maiores disponibilidades hídrica, as médias de massa seca dos tratamentos foram significativamente diferentes.

A massa seca da raiz foi o parâmetro mais sensível e apresentou redução mais expressiva que a parte aérea quando comparado ao controle, chegando a atingir reduções de até 60% na maior concentração. O efeito fitotóxico dos extratos foram mais pronunciados sobre o acúmulo de massa seca das plântulas que sobre a germinação das sementes ou desenvolvimento inicial das plântulas de *U. brizantha*.

A redução da massa seca da parte aérea e da raiz das plântulas de *U. brizantha* foi proporcionada em parte, pelo menor comprimento desses órgãos e possivelmente esteja associada ao dano celular ocasionado por alterações na permeabilidade e na seletividade de membranas celulares ou à modificação no balanço hormonal do vegetal ou ainda pela interferência no processo fotossintético (AUMONDE et al., 2013).

Os resultados obtidos com os extratos oriundos de raízes de *V. ferruginea* submetida às diferentes disponibilidades hídrica mostraram baixas taxas de inibição sobre a germinação e o crescimento de *U. brizantha* nos tratamentos 100, 200 e 300 mm. No entanto, os demais tratamentos (400, 500 e 1000 mm) do extrato das raízes conferiram uma ação biológica expressiva.

Nota-se também, um efeito fitotóxico mais pronunciado do tratamento 1000 mm, tanto nos extratos das folhas como das raízes, alcançando maior potenciação da atividade biológica. A alteração de fatores climáticos, como a mudança nos padrões de precipitação, com o aumento dos episódios de seca ou inundações, durante o desenvolvimento de uma espécie, podem influenciar seriamente os níveis de produção de metabolitos secundários, como uma ferramenta para superar o estresse e adaptar-se ao ambiente em mudança (MAQBOOL et al., 2013).

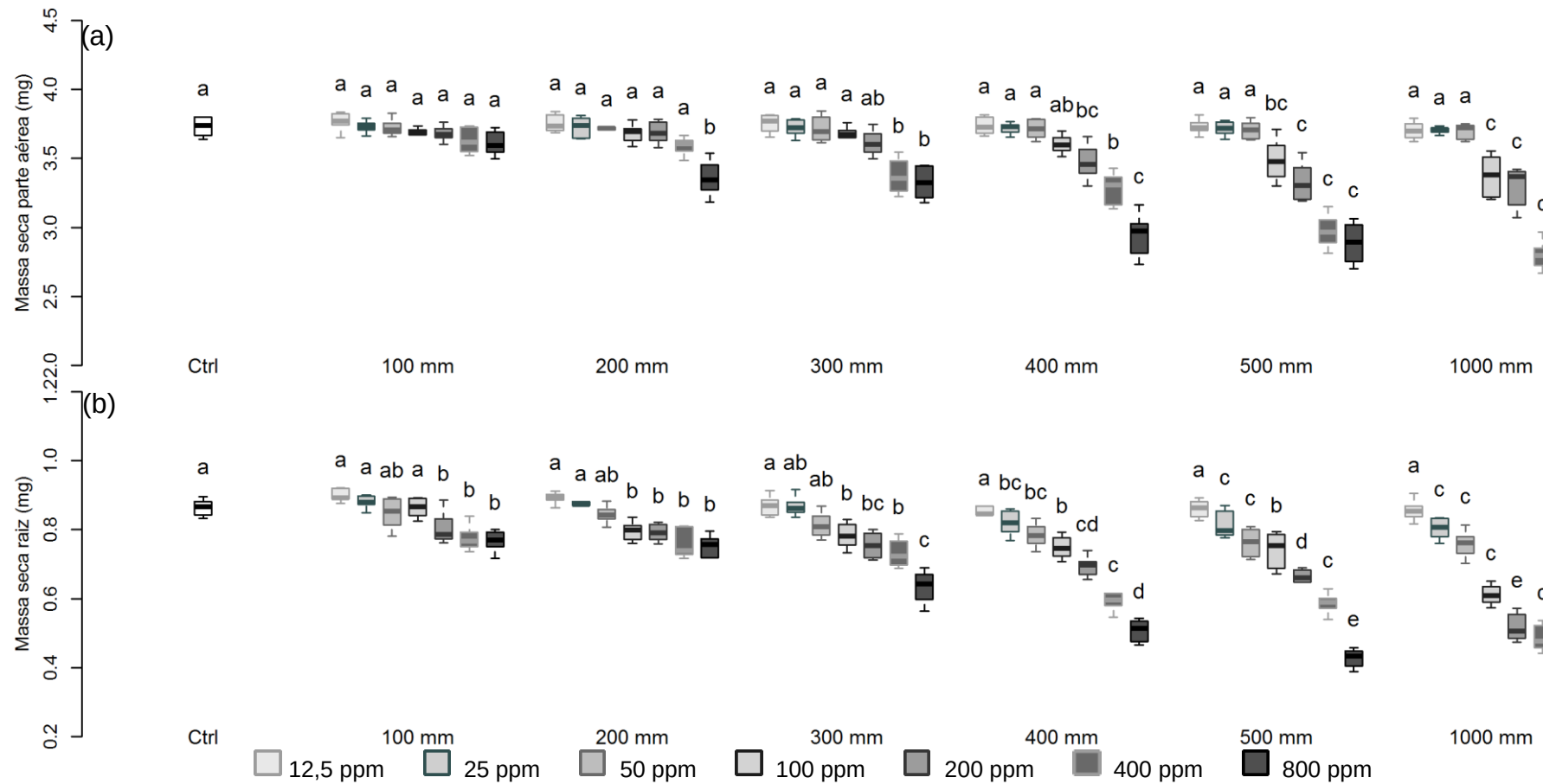


Figura 14. Análise box-plot de massa seca (mg) da parte aérea (a) e da raiz (b) de *U. brizantha* submetidos aos extratos hidroetanólicos de raízes de *V. ferruginea* em seis disponibilidade hídrica (100, 200, 300, 400, 500 e 1000 mm distribuídos ao mês). *Ctrl: controle. Médias seguidas pelas mesmas letras para as concentrações dos extratos não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

O percentual de plântulas anormais também aumentou em função do aumento da disponibilidade hídrica, possivelmente estes resultados devem-se a maior produção de compostos aleloquímicos de *V. ferruginea* nestas condições. As plântulas de *U. brizantha* apresentaram inibição do crescimento da parte aérea e da raiz, mas também ausência de pelos absorventes e necrose da radícula, que apontam a ação de substâncias tóxicas presentes nos extratos. Vários estudos deparam com tal efeito sobre as raízes, uma vez que essas anomalias são comuns quando se avalia o efeito de extratos com potencial fitotóxico sobre plantas teste (BICH; KATO-NOGUCHI, 2012; REIGOSA et al., 2013).

5.2.2. Tipos de solo

Apesar da existência de um controle genético, o conteúdo e as proporções de metabólitos secundários produzidos por uma planta podem variar ao longo do tempo e do espaço (GOUVEA et al., 2012). Ambientes com condições estressantes podem restringir o crescimento das plantas devido a mudanças na razão fotossintética e no acúmulo de carboidratos não-estruturais, o que também pode contribuir para o aumento da produção do metabolismo secundário (GATTI et al., 2014).

A disponibilidade e o comportamento dos compostos fitotóxicos podem ser influenciados pela variação nas características abióticas como a textura do solo, as concentrações de íons, pelas comunidades bióticas presentes na rizosfera (KAUR et al., 2014) e pela proporção dos nutrientes presentes no solo (TEIXEIRA DA SILVA et al., 2015).

Em relação a porcentagem de germinação das sementes de *U. brizantha* observou-se que os extratos provenientes das folhas de *V. ferruginea* submetida ao desenvolvimento em cinco diferentes tipos de solo causaram reduções significativas quando comparados ao controle (Tabela 11), com exceção do tratamento Mat que não diferiu do controle nem na maior concentração do extrato (800 ppm). Nota-se ainda que os menores valores de porcentagem de germinação foram obtidos com o uso de extrato do tratamento Agr. Este fato pode ser explicado devido a ação de substâncias fitotóxicas produzidas por *V. ferruginea*, que atuam de forma direta, ou na sinalização de processos de

degradação celular, por meio da produção e acúmulo de espécies reativas de oxigênio, resultando em estresse oxidativo celular das plântulas (AUMONDE et al., 2013).

Tabela 11. Germinação (%) de *U. brizantha* submetidos aos extratos hidroetanólicos de folhas de *V. ferruginea* desenvolvidos nos diferentes solos (Agr, Pas, Mat, Iti e Itu).

Tipo de solo	Germinação (%) - Extrato hidroetanólico das folhas						
	12,5 ppm	25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm	400 ppm	800 ppm
Controle	84,2	85,0	84,2	85,0	87,5 a	85,8 a	84,2 a
Agr	82,5	78,3	79,2	75,0	70,8 b	64,2 c	57,5 c
Pas	83,3	80,8	82,5	80,8	77,5 ab	72,5 bc	70,0 bc
Mat	83,3	80,8	80,8	82,5	81,7 a	80,0 ab	79,2 ab
Iti	85,0	81,7	80,8	80,8	79,2 ab	72,5 bc	69,2 bc
Itu	82,5	78,3	81,7	78,3	78,3 ab	73,3 bc	70,0 bc
F	0,17 ns	1,59 ns	0,86 ns	1,92 ns	5,44 *	7,60 **	8,74 **
CV	6,96	5,94	5,50	7,57	7,23	8,81	10,66
DMS	10,20	8,43	7,88	10,70	10,06	11,56	13,42

ns, Não significativo a 5%, * Significativo a 5%, **Significativo a 1% pelo teste de Tukey; CV (%): Coeficiente de variação; DMS: diferença mínima significativa. Médias seguidas pelas mesmas letras para as concentrações dos extratos não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

O extrato foliar de *V. ferruginea* também influenciou o crescimento inicial da planta teste, afetando significativamente o crescimento tanto da parte aérea quanto da radícula. Em geral observou-se um padrão de redução do crescimento dose-dependente, ou seja, redução do crescimento conforme o aumento da concentração do extrato foliar.

Os resultados obtidos do comprimento da parte aérea, assim como das raízes demonstraram que as substâncias presentes nos extratos foliares possuem ação fitotóxica, visto que esse parâmetro foi afetado mesmo em baixas concentrações, com maior efeito para o tratamento Agr (Figura 15). Algumas substâncias alelopáticas induzem o aumento da atividade de enzimas oxidativas, resultando na mudança da permeabilidade da membrana e na formação de lignina, reduzindo o crescimento radicular (FERRARESE et al., 2000).

As condições de um ambiente laboratorial favorecem a germinação e o crescimento das espécies vegetais e provavelmente, beneficiam a absorção e a translocação das substâncias aleloquímicas presentes no extrato para os diferentes órgãos da plântula resultando na redução drástica de parte aérea e de raiz nestas circunstâncias (AUMONDE et al., 2013).

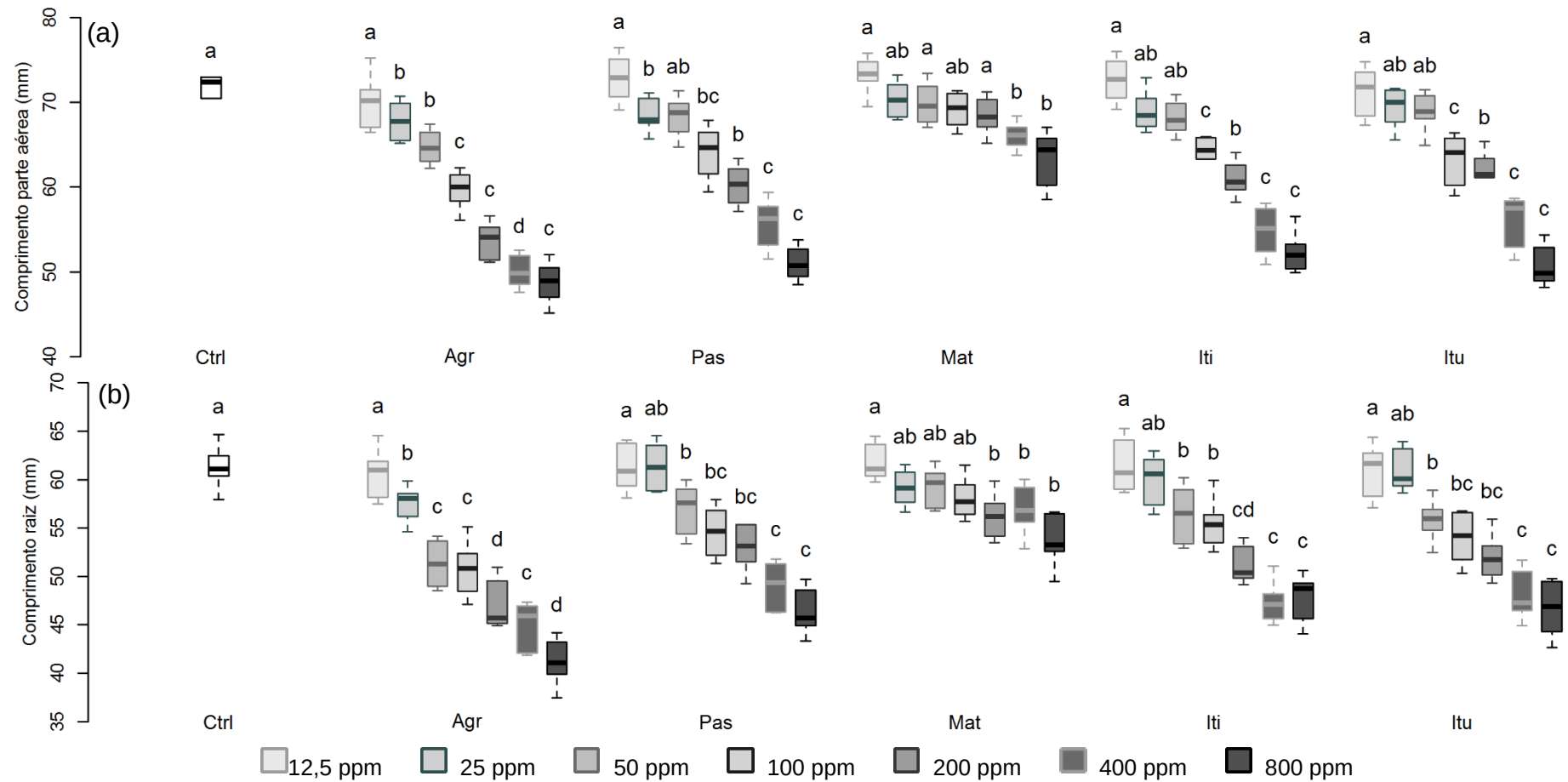


Figura 15. Análise box-plot de comprimento (mm) da parte aérea (a) e da raiz (b) de *brizantha* submetidos aos extratos hidroetanólicos de folhas de *V. ferruginea* desenvolvidos nos diferentes solos (Agr, Pas, Mat, Iti e Itu). *Ctrl: controle. Médias seguidas pelas mesmas letras para as concentrações dos extratos não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Todos os extratos das folhas apresentaram atividade inibitória no alongamento das raízes, assim como no acúmulo da massa seca (Figura 16).

A aplicação do extrato Mat afetou significativamente a massa seca da parte aérea apenas nas maiores concentrações (400 e 800 ppm). Enquanto o extrato obtido do tratamento Agr inibiu o acúmulo de massa seca da parte aérea a partir da concentração 100 ppm e os tratamentos Pas, Iti e Itu diferiram do controle a partir da concentração 200 ppm. As plantas produzem metabólitos secundários em diferentes níveis de concentração e essa característica é determinada por processos genéticos de cada espécie e pelas condições ambientais em que são encontradas (REIGOSA et al., 2013). Mudanças na biota, assim como na composição físico-químicas do solo, podem afetar não apenas a produção dos metabólitos, como também a estrutura química e grau de atividade das substâncias liberadas pelas plantas (REIGOSA et al., 2013).

O aumento das concentrações dos extratos das folhas acarretou na redução progressiva da massa seca da raiz da planta teste, indicando grande potencial fitotóxico de *V. ferruginea* sobre o desenvolvimento de *U. brizantha*. A partir da concentração 50 ppm todos os tratamentos proporcionaram redução do acúmulo de massa seca das raízes das plântulas de *U. brizantha*. O efeito tóxico de algumas substâncias sintetizadas pelo metabolismo secundário de espécies vegetais pode ocorrer sobre a fotossíntese, por meio de alterações no teor de clorofila ou pela redução na absorção de fótons, refletindo no acúmulo de massa seca (SILVA et al., 2016).

Muitas vezes, o efeito fitotóxico não é observado na porcentagem de germinação, como verificado para o extrato Mat (Tabela 11), no entanto, o mesmo não foi verificado para os demais parâmetros avaliados. Todos extratos das folhas afetaram, em diferentes intensidades, o crescimento inicial de *U. brizantha*. Nota-se também que, independente do parâmetro avaliado, o extrato Agr causou a maior redução quando comparado ao controle, e essa redução foi dependente das concentrações, com supressão de até 83% da massa seca da raiz na concentração de 800 ppm.

De acordo com Pires et al. (2001), a redução do desenvolvimento da radícula é um dos principais indicadores do potencial alelopático de extratos vegetais, sendo que este parâmetro, normalmente, é o mais sensível a presença de um aleloquímico no meio.

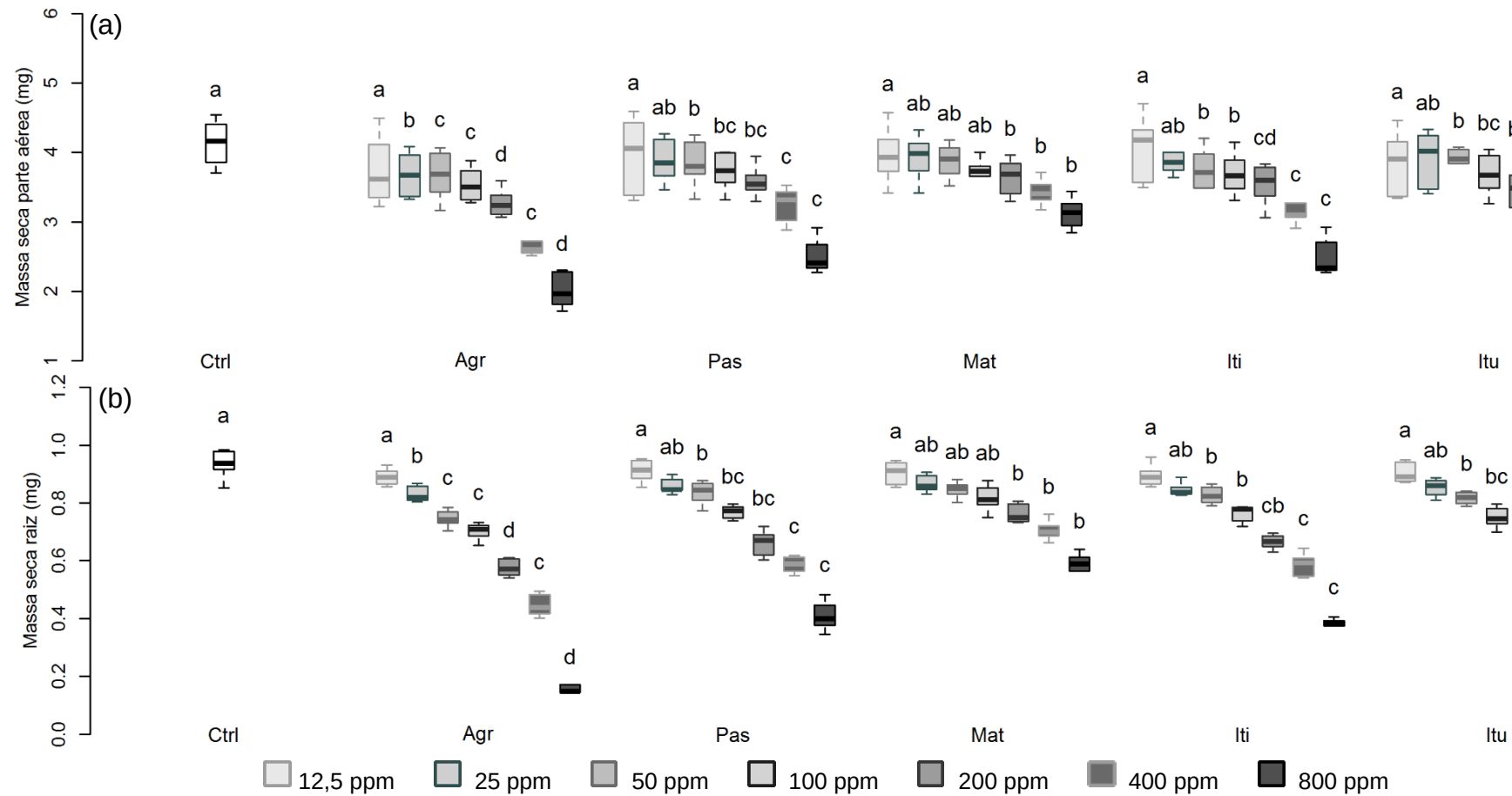


Figura 16. Análise box-plot de massa seca (mg) da parte aérea (a) e da raiz (b) de *brizantha* submetidos aos extratos hidroetanólicos de folhas de *V. ferruginea* desenvolvidos nos diferentes solos (Agr, Pas, Mat, Iti e Itu). *Ctrl: controle. Médias seguidas pelas mesmas letras para as concentrações dos extratos não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Outro efeito observado com a presença de substâncias aleloquímicas em extratos é o aparecimento de plântulas anormais, sendo a necrose da radícula um dos sintomas mais comuns (CIPRIANI et al., 2014; PESSOA DA SILVA et al., 2014).

As plântulas de *U. brizantha* submetidas aos extratos das folhas da espécie doadora apresentaram desenvolvimento anormal nas maiores concentrações dos tratamentos Agr, Pas, Iti e Itu. Foram observados atrofia severas nas raízes de 6, 10, 30 e 37% nas concentrações 100, 200, 400 e 800 ppm de Agr; de 12, 19 e 29% nas concentrações de 200, 400 e 800 ppm para Pas; de 7, 16 e 28% nas concentrações de 200, 400 e 800 ppm para Iti; e de 11, 15 e 19% nas concentrações de 200, 400 e 800 ppm para Itu; 12% de plântulas com enrolamento do hipocótilo na concentração 800 ppm do tratamento Agr; e necrose das raízes de 12, 17,27 e 32% as concentrações de 100, 200, 400 e 800 ppm de Agr; de 13, 20 e 27% nas concentrações de 200, 400 e 800 ppm para Pas; de 8, 13 e 25% nas concentrações de 200, 400 e 800 ppm para Iti; e de 14, 18 e 23% nas concentrações de 200, 400 e 800 ppm para Itu.

As alterações que as plantas daninhas podem promover no sistema radicular de uma espécie cultivada por meio da liberação de aleloquímicos possuem um aspecto ecológico importante, uma vez que, a inibição do desenvolvimento ou o aparecimento de necrose ou anomalias no sistema radicular pode levar a uma redução na pressão competitiva entre as espécies vegetais, resultando no favorecimento das espécies indesejáveis, que pode assim se estabelecer causando severos danos econômicos (PESSOA DA SILVA et al., 2014).

Os resultados obtidos pelos extratos das raízes de *V. ferruginea* reforçam a hipótese que a mudança nas condições de desenvolvimento pode afetar a produção de substâncias fitotóxicas de uma espécie.

A espécie doadora evidenciou potencial fitotóxico sobre a germinação e desenvolvimento da planta alvo, no entanto, a inibição dos extratos de raízes variou de acordo com a fonte (tipo de solo) e a concentração do extrato. A porcentagem de germinação foi inferior ao do controle apenas nos extratos provenientes dos tratamentos Agr e Itu, a partir da concentração de 200 ppm. Para os demais tratamentos, nas diferentes concentrações, não houve diferença significativa entre as médias de porcentagem de germinação (Tabela 12).

Tabela 12. Germinação (%) de *U. brizantha* submetidos aos extratos hidroetanólicos de raízes de *V. ferruginea* desenvolvidos nos diferentes solos (Agr, Pas, Mat, Iti e Itu).

Tipo de solo	Germinação (%) - Extrato hidroetanólico das raízes						
	12,5 ppm	25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm	400 ppm	800 ppm
Controle	85,0	85,8	83,3	84,2	84,2 a	86,7 a	82,5 a
Agr	86,7	84,2	80,0	78,3	72,5 b	73,3 b	61,7 c
Pas	86,7	84,2	82,5	81,7	79,2 ab	77,5 ab	74,2 ab
Mat	82,5	87,5	83,3	83,3	84,2 a	82,5 ab	83,3 a
Iti	84,2	82,5	78,3	76,7	78,3 ab	76,7 ab	75,8 ab
Itu	85,8	84,2	82,5	78,3	70,0 b	73,3 b	69,2 bc
F	0,63 ns	0,96 ns	0,86 ns	1,90 ns	5,46 *	4,18 *	8,88 **
CV	5,86	5,09	6,61	6,76	7,87	8,10	9,07
DMS	8,76	7,58	9,49	9,55	10,80	11,15	11,86

ns, Não significativo a 5%, * Significativo a 5%, **Significativo a 1% pelo teste de Tukey; CV (%): Coeficiente de variação; DMS: diferença mínima significativa. Médias seguidas pelas mesmas letras para as concentrações dos extratos não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

O efeito dos compostos fitotóxicos sobre a germinação da planta receptora são manifestações secundárias de eventos ocorridos inicialmente a nível celular e molecular como resposta a uma sinalização secundária de mudanças ocorridas anteriormente com a planta doadora (PESSOA DA SILVA et al., 2014).

O comprimento da parte aérea e da raiz das plântulas de *U. brizantha* foram afetados negativamente pela concentração dos extratos, observando-se que, quanto maior a concentração maior o efeito inibitório manifestado (Figura 17 a e b). Tanto para o comprimento da parte aérea quanto da raiz, o efeito fitotóxico foi mais acentuado nos tratamentos Agr e Itu. A diferença de intensidade de fitotoxidez de extratos de uma mesma espécie vegetal pode ser explicada pelas divergências entre as composições químicas dos mesmos, em decorrência a mudanças nas condições de crescimento (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Apesar dos extratos Pas e Iti não terem influenciado o parâmetro porcentagem de germinação, independentemente da concentração dos extratos, foi observado para esses tratamentos redução significativa em relação ao controle para o comprimento da parte aérea a partir de 50 ppm e o comprimento da raiz a partir de 25 ppm.

Os resultados obtidos com extratos de raízes submetidas a crescimento em diferentes tipos de solo mostraram altas taxas de inibição sobre o crescimento radicular de *U. brizantha* (Figura 17 b).

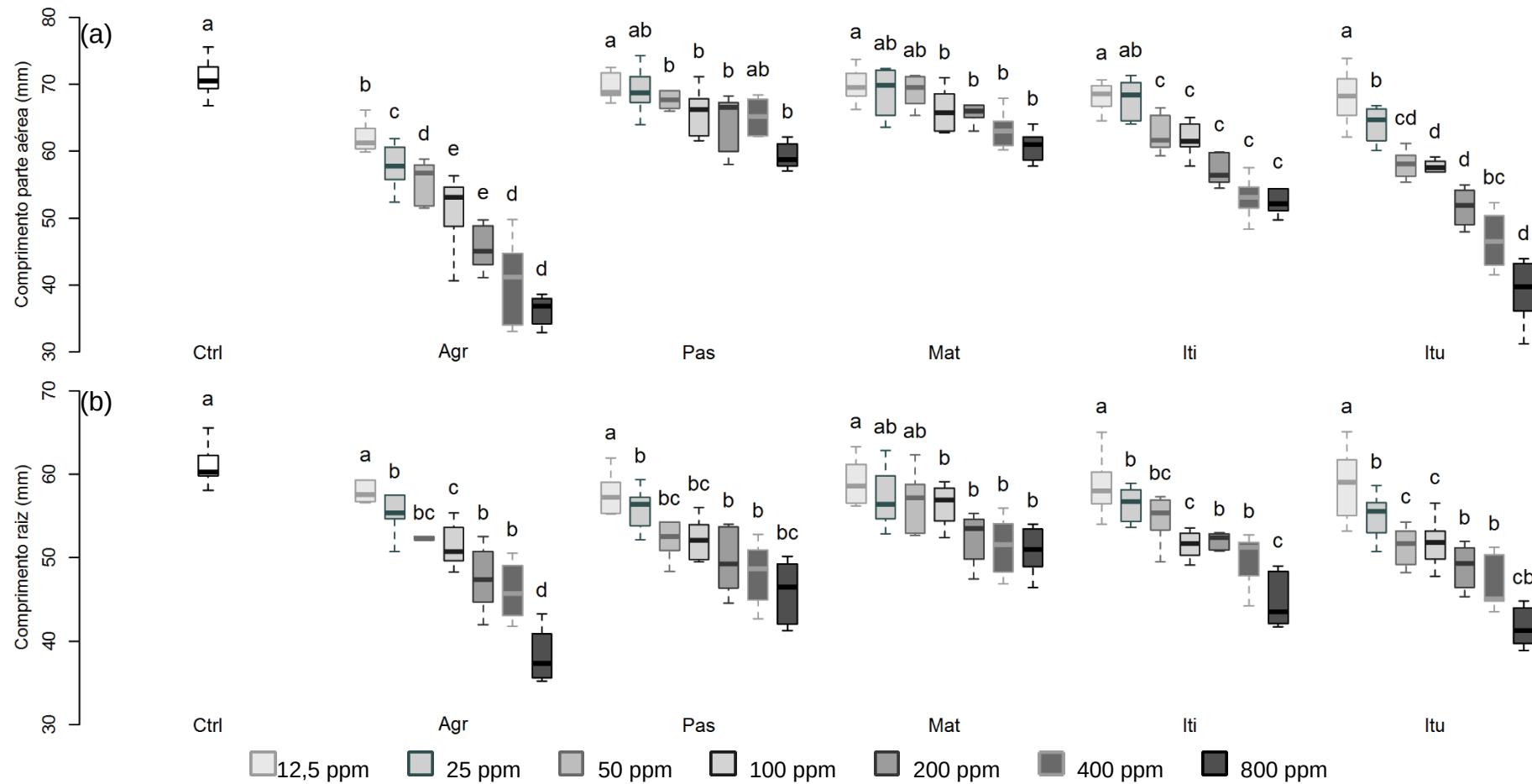


Figura 17. Análise box-plot de comprimento (mm) da parte aérea (a) e da raiz (b) de *U. brizantha* submetidos aos extratos hidroetanólicos de raízes de *V. ferruginea* desenvolvidos nos diferentes solos (Agr, Pas, Mat, Iti e Itu). *Ctrl: controle. Médias seguidas pelas mesmas letras para as concentrações dos extratos não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Quanto ao comprimento da raiz, apenas as médias dos tratamentos na menor concentração (12,5 ppm) não diferiram entre si e do controle. Para o emprego de extratos com concentrações a partir de 100 ppm, foram observadas médias significativamente diferentes do controle para todos os tratamentos, sendo que as raízes de menor comprimento foram observadas para as maiores concentrações do tratamento Agr, confirmando a tendência apresentada pelos demais parâmetros.

Em relação à massa seca verificou-se que os extratos causaram redução desse parâmetro nas maiores concentrações e em diferentes intensidades (Figura 18 a e b), e desta forma, foi verificado que quanto maior a concentração dos extratos, menor foi o a massa seca da parte aérea e da raiz das plântulas.

As plântulas desenvolvidas sobre o extrato Agr apresentaram o acúmulo de massa seca radicular muito reduzido, mesmo em baixas concentrações, indicando forte ação fitotóxica dos extratos. Enquanto, o extrato Itu demonstrou grandes reduções desse parâmetro apenas quando em altas concentrações, isso apesar dos extratos das raízes dos tratamentos Agr e Itu apresentarem muita semelhança no perfil metabólico (Figura 30 b). Observou-se também, que o extrato proveniente do tratamento Mat afetou a massa seca da parte aérea apenas na maior concentração (800 ppm). O mesmo não foi observado para a massa seca da raiz que diferiu significativamente do controle a partir da concentração de 400 ppm. A planta teste foi mais sensível, quanto ao acúmulo de massa, para ambas as partes, quando submetidas ao extrato do tratamento Agr que diferiu significativamente do controle, a partir da concentração 100 ppm para a massa seca da parte aérea (Figura 18 a) e 50 ppm para a raiz (Figura 18 b). Independentemente da fonte do extrato (raízes de *V. ferruginea* oriundas de diferentes solos) o indicador desenvolvimento da parte aérea e raiz foram mais sensíveis as substâncias fitotóxicas do que a germinação das sementes.

Os extratos das raízes de *V. ferruginea* submetidos ao desenvolvimento nos diferentes solos apresentou potencialidade alelopática semelhante aos das folhas, contrariando os relatos de Pessoa da Silva et al. (2014), em que os extratos das folhas apresentaram efeito inibitório superior, uma vez que, segundo os autores, a folha é a parte da planta metabolicamente mais ativa, e desta maneira, é natural que a mesma apresente uma maior diversidade de aleloquímicos e consequentemente maior efeito fitotóxico.

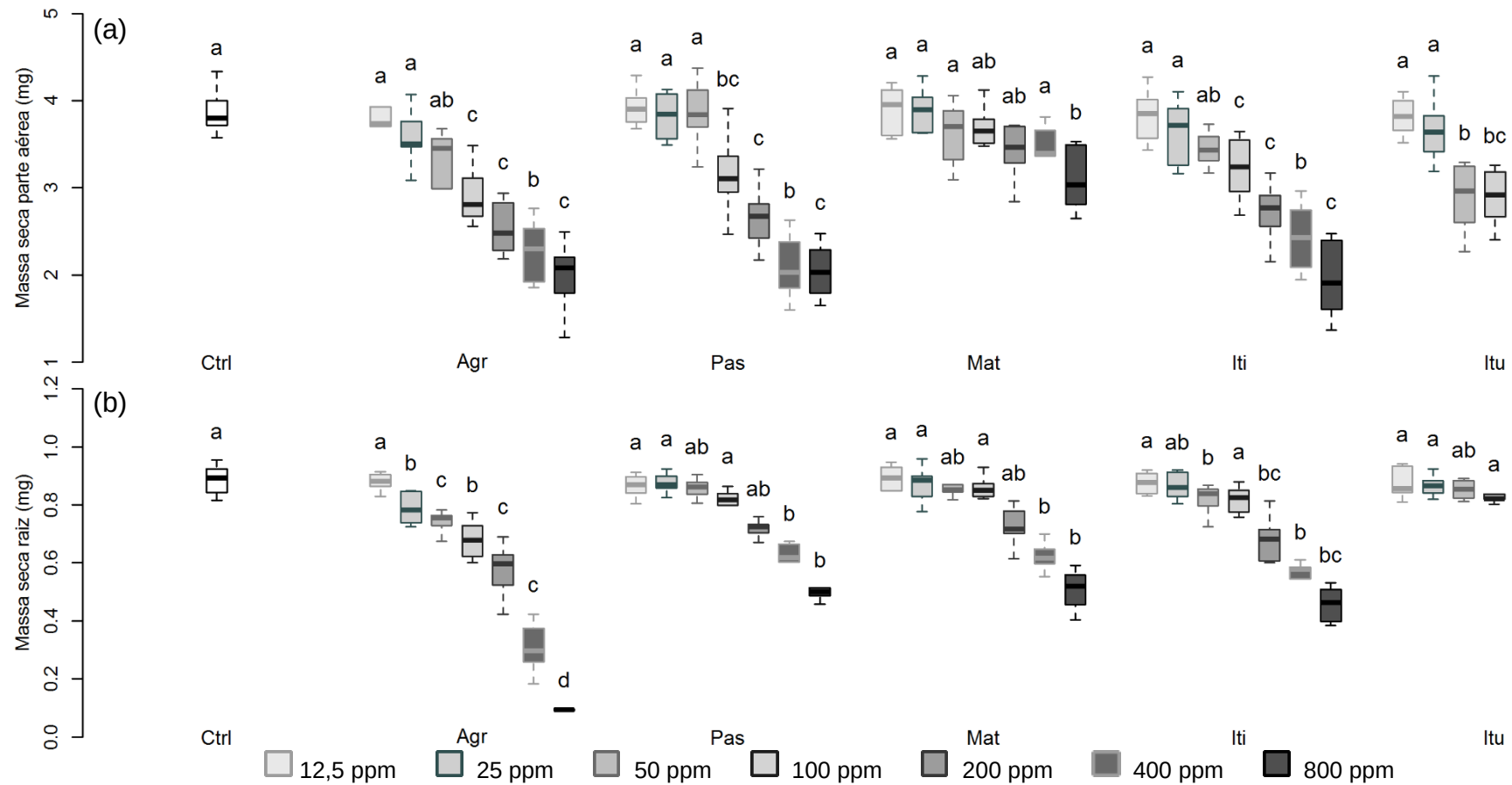


Figura 18. Análise box-plot de massa seca (mg) da parte aérea (a) e da raiz (b) de *U. brizantha* submetidos aos extratos hidroetanólicos de raízes de *V. ferruginea* desenvolvidos nos diferentes solos (Agr, Pas, Mat, Iti e Itu). *Ctrl: controle. Médias seguidas pelas mesmas letras para as concentrações dos extratos não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Enquanto pesquisadores como Kremer et al. (2016), relatam que os extratos de raízes normalmente apresentam grande quantidade de metabólitos secundários com forte poder inibitório. Segundo estes autores, o alto potencial alelopático das raízes de plantas doadoras em detrimento aos demais órgãos ocorre, pois, a raiz é o principal local de entrada de nutrientes e água e, por se encontrar no solo, estão mais suscetíveis ao ataque de microorganismos, que podem induzir a produção de metabólitos a fim de buscar condições apropriadas para seu desenvolvimento, estabelecimento ou sobrevivência.

Nas maiores concentrações (200, 400 e 800 ppm) dos extratos provenientes dos tratamentos Agr, Pas e Itu de *V. ferruginea*, ocorreram radículas engrossadas (5,8%, 6,7% e 12,5% para Agr, 8,3%, 14,2% e 19,2% para Pas e 0,8%, 4,2% e 9,2% para Itu) e necrosadas (18,3, 23,3 e 32,5% para Agr, 10,8%, 20,0% e 27,5% para Pas e 5,0%, 12,5% e 11,7% para It) nas plântulas de *U. brizantha*, caracterizando efeito fitotóxico. As folhas de 31,7% das plântulas submetidas ao extrato Itu e 9,2% de Agr, na concentração de 800 ppm, encontravam-se cloróticas, sendo que dentre as cloróticas em Itu, 5,8% apresentavam necrose nas extremidades.

A potencialização na produção de metabólitos secundários pode ser atribuída à necessidade da planta em garantir a perpetuação da espécie quando deparada com condições ambientais estressantes ao seu desenvolvimento (SOUZA FILHO et al., 2002).

A resposta diferenciada a esses tipos de solo é um indicativo de que a espécie está bem adaptada a algumas condições usualmente consideradas estressantes, não respondendo a um estímulo para o qual é, originalmente, ambientada. Desta forma, o que seria alto nível de estresses para algumas espécies, como por exemplo, baixos valores de pH, para *V. ferruginea*, esses estímulos foram tão baixos que não proporcionaram grandes efeitos sobre as suas potencialidades fitotóxicas. No entanto, esse resultado também pode ocorrer pois algumas espécies mostram que nem todas as substâncias alelopáticas têm a sua produção aumentada em resposta a um estímulo externo (SOUZA FILHO et al., 2002).

As plantas foram desenvolvidas sobre as mesmas condições de temperatura, umidade, intensidade, qualidade e duração de luz, assim a diferença observada nos resultados do potencial fitotóxico pode ser devido à

exposição da espécie *V. ferruginea* a características do solo diferentes das frequentemente encontradas em seu ambiente de maior ocorrência. A mudança desses fatores pode ter proporcionado aumento do nível de estresse na planta o que induziu maior produção de aleloquímicos.

Segundo Ali et al. (2017) a alta concentração de aleloquímicos em uma espécie pode estar associada ao estresse que essa planta foi submetida. Esses autores também relataram que o estresse aumenta a produção de metabólitos secundários que podem potencializar a ação fitotóxica de uma espécie.

Os resultados obtidos apontam para a presença de compostos com atividade inibidora nas folhas e raízes de *V. ferruginea* revelando potencial fitotóxico sobre as plântulas de *U. brizantha*. No entanto, o extrato oriundo do tratamento Agr apresentou maior efeito fitotóxico, indicando que este solo provavelmente induza a produção de compostos aleloquímicos em concentração superior as existentes nos demais solos, ou ainda, que alguma característica desse solo induza a produção de uma substância diferente das produzidas pelos demais tratamentos.

5.2.3. Intensidade luminosa

A análise dos dados indicou que houve efeito dos extratos da planta de *V. ferruginea* sobre a germinação das sementes e o crescimento das plântulas de *U. brizantha* nos quatro extratos testados. Apesar disso, o padrão de resposta, tanto em relação à parte da planta utilizada (folhas ou raízes) quanto às suas concentrações, mostrou-se diferente entre eles.

Os extratos das folhas de *V. ferruginea* submetida a diferentes condições de luminosidade não apresentaram diferença significativa entre si e com o controle nas concentrações de 12,5 a 100 ppm no parâmetro porcentagem de germinação, o que sugere que esses extratos tenham promovido inibição com a mesma intensidade nessas concentrações (Tabela 13).

A porcentagem de germinação de *U. brizantha* foi significativamente menor que o controle quando submetida a extratos foliares do tratamento pleno sol a partir da concentração 200 ppm e aos extratos de 30% e 50% somente na concentração 800 ppm, enquanto o extrato de 70% não diferiu do controle nem mesmo na maior concentração (Tabela 13).

Tabela 13. Germinação (%) de *U. brizantha* submetidos aos extratos hidroetanólicos de folhas de *V. ferruginea* desenvolvidos em quatro condições de luminosidade (pleno sol, 30%, 50% e 70%).

Condições de luminosidade	Germinação (%) - Extrato hidroetanólico das folhas						
	12,5 ppm	25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm	400 ppm	800 ppm
Controle	84,2	85,0	85,0	85,8	88,3 a	85,8 a	85,0 a
Pleno Sol	86,7	85,8	85,8	79,2	59,2 b	60,0 b	56,7 c
30%	84,2	85,8	85,8	82,5	81,7 a	74,2 a	73,3 b
50%	85,0	84,2	85,8	81,7	82,5 a	75,0 a	70,0 b
70%	85,0	83,3	85,0	83,3	80,8 a	80,0 a	76,7 ab
F	0,37 ns	0,40 ns	0,08 ns	1,49 ns	21,01 **	8,67 **	14,06 **
CV (%)	4,85	4,98	4,75	5,92	7,63	10,64	9,38
DMS	6,99	7,16	6,89	8,28	10,15	13,53	11,50

ns, Não significativo a 5%, **Significativo a 1% pelo teste de Tukey; CV (%): Coeficiente de variação; DMS: diferença mínima significativa. Médias seguidas pelas mesmas letras para as concentrações dos extratos não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

De modo geral, a porcentagem de germinação não foi fortemente afetada pelos extratos dos tratamentos de condições de luminosidade, sendo observadas, inclusive, suaves estímulos, principalmente no tratamento de Pleno Sol, nas menores concentrações.

O crescimento e desenvolvimento de *U. brizantha* foram inibidos pelos extratos das folhas de *V. ferruginea* em diferentes intensidades, e essa diferença no efeito fitotóxico pode ser atribuída principalmente a alterações na produção de metabólitos em função da mudança das condições de desenvolvimento da planta. A retenção da irradiância alterou a temperatura do ar no desenvolvimento da planta doadora, formando um microambiente diferenciado para os tratamentos, sendo que o tratamento pleno sol apresentou em média 33,7°C, as 10 h, e os tratamentos 30%, 50% e 70% apresentaram 26,4°C, 25,8°C e 24,2°C, respectivamente. As alterações da temperatura modulam a produção e a eficácia dos aleloquímicos. Baixas temperaturas aumentaram o total de ácidos clorogênicos em folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) (MAQBOOL et al., 2013).

O comprimento da parte aérea das plântulas, quando submetida aos extratos das folhas, tiveram seus valores reduzidos com o aumento da concentração, com maior efeito para o extrato de pleno sol (Figura 19 a). Para o comprimento da raiz, assim como observado para comprimento da parte aérea, o aumento da concentração de todos os extratos provocou o aumento da porcentagem de inibição, com redução significativamente diferente do controle (Figura 19 b).

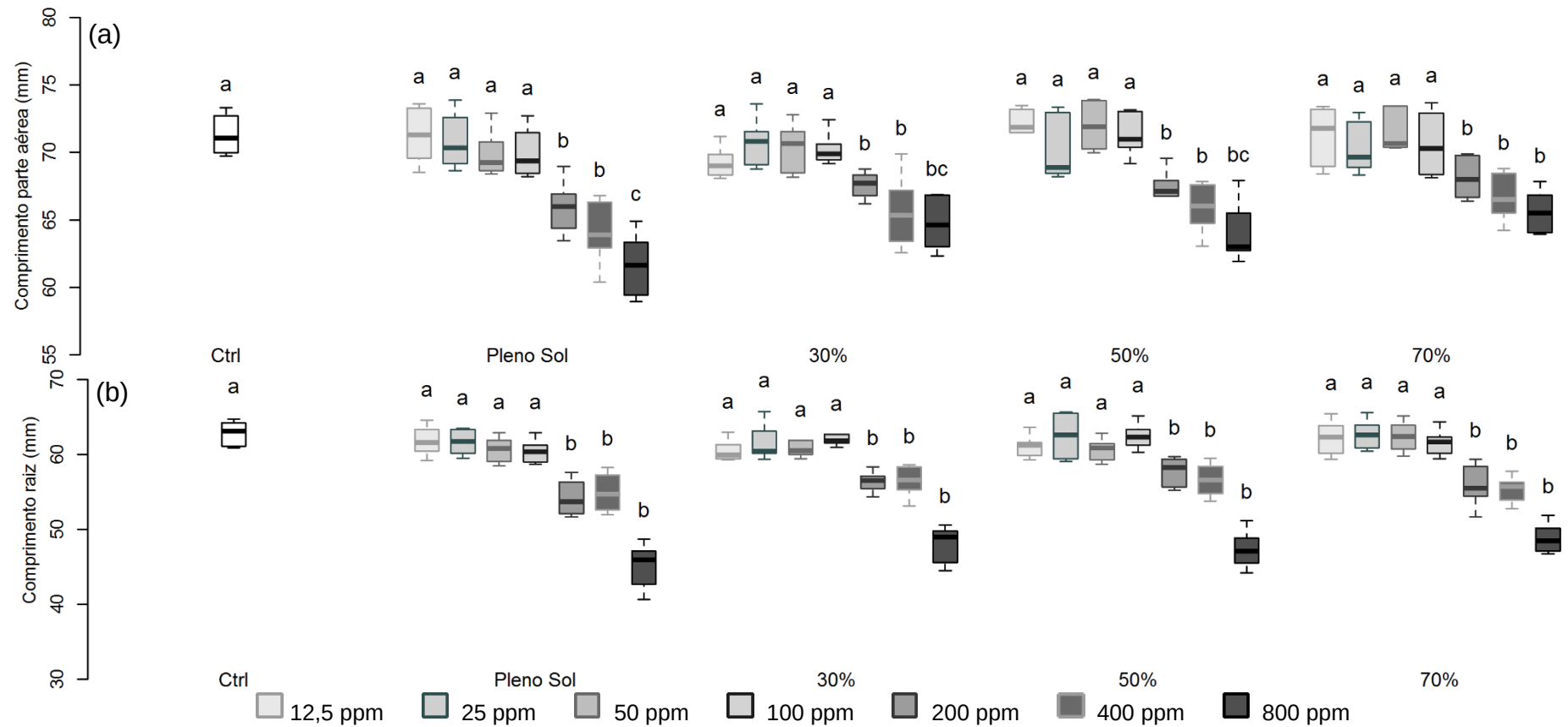


Figura 19. Análise box-plot de comprimento (mm) da parte aérea (a) e da raiz (b) de *U. brizantha* submetidos aos extratos hidroetanólicos de folhas de *V. ferruginea* desenvolvidos em quatro condições de luminosidade (pleno sol, 30%, 50% e 70%). *Ctrl: controle. Médias seguidas pelas mesmas letras para as concentrações dos extratos não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

De maneira geral, a análise do acúmulo de massa seca de plântulas de *U. brizantha* evidenciou o potencial alelopático inibitório dos extratos de folhas de *V. ferruginea*. Os extratos apresentaram efeito significativo para a variável massa seca da parte aérea pelo teste Tukey da análise de variância (Figura 20 a), indicando que houve a produção de compostos fitotóxicos na espécie doadora.

A massa seca da raiz submetida aos extratos das folhas causou redução desta variável a partir da concentração 100 ppm (Figura 20 b).

As alterações no desenvolvimento normal do sistema radicular de uma planta podem comprometer todo o seu ciclo de vida, visto que as espécies vegetais dependem do bom desenvolvimento das raízes para sua fixação ao solo e principalmente para absorção de água e nutrientes (OLIVEIRA et al., 2015a). E, segundo esses autores, muitas vezes, o efeito alelopático é mais acentuado sobre as raízes, por ser a primeira estrutura a aparecer após a germinação, as raízes ficam mais expostas aos efeitos dos aleloquímicos.

Observou-se o efeito da espécie dentro dos extratos. O extrato na condição de 70% de retenção de luminosidade proporcionou a menor redução da massa seca, enquanto os extratos de 30% e 50% tiveram uma redução intermediária e o extrato de pleno sol proporcionou a maior redução de massa seca das plântulas, sendo que esses extratos diferiram do controle e entre si, indicando diferença entre os tratamentos utilizados e um desempenho diferenciado da espécie dentro dos tratamentos.

A massa seca é um dos principais parâmetros utilizados para avaliar o efeito alelopático da planta teste. Os resultados de acúmulo da massa seca da parte aérea e da raiz possibilitam inferir que a redução deste parâmetro representa um importante aspecto ecológico, pois proporciona uma menor pressão competitiva da planta receptora e favorece o estabelecimento e a dominância da espécie doadora.

Nos extratos das folhas de *Vernonia ferruginea* foi possível observar alterações nas plântulas de *U. brizantha* devido a ação substâncias alelopáticas, que possivelmente afetaram a permeabilidade da membrana, a transcrição e tradução do DNA, o funcionamento dos mensageiros secundários, da respiração, por seqüestro de oxigênio, alteração na conformação de enzimas, ou ainda, da combinação de todos estes fatores (OLIVEIRA et al., 2015a).

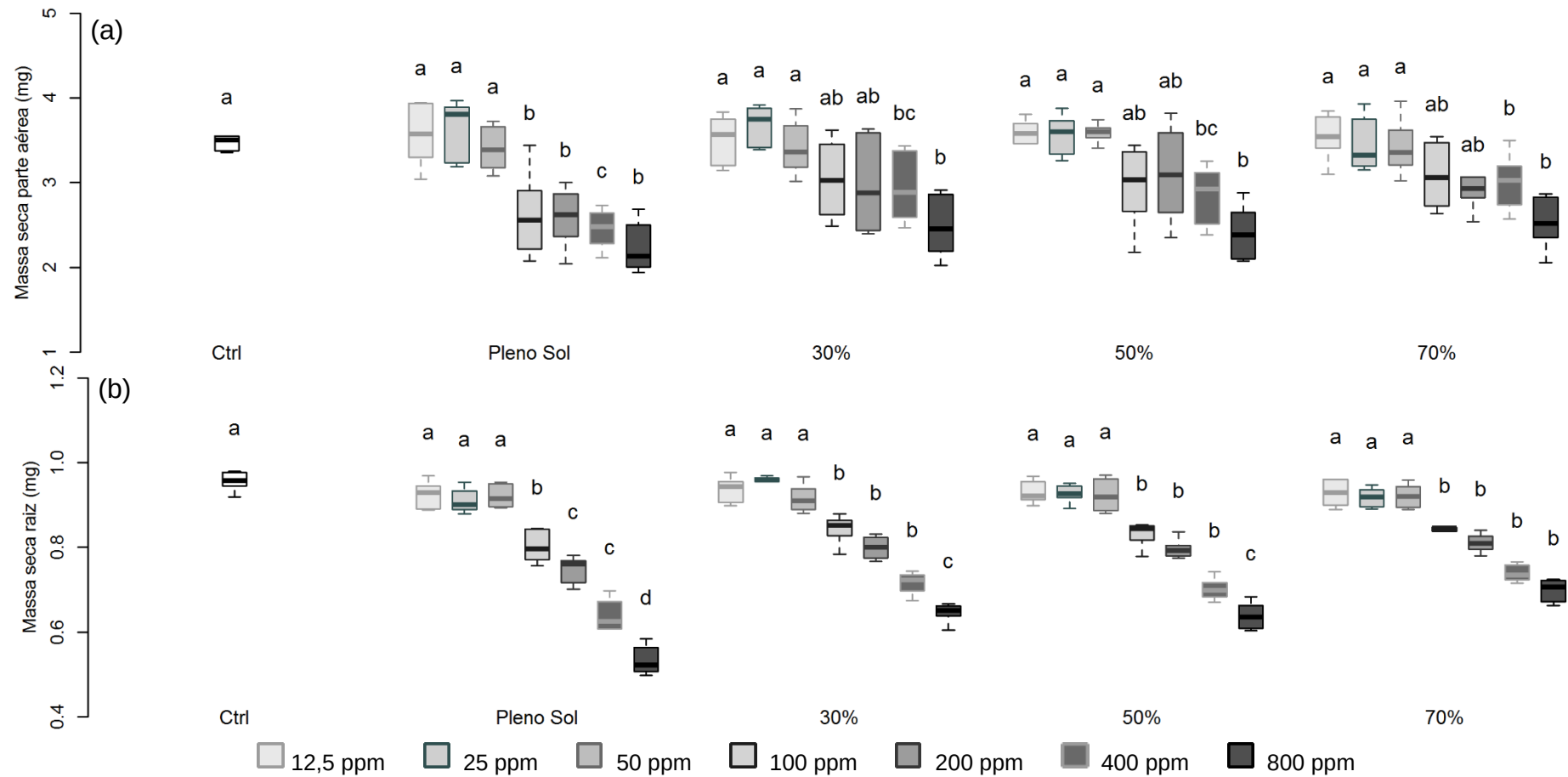


Figura 20. Análise box-plot de massa seca (mg) da parte aérea (a) e da raiz (b) de *U. brizantha* submetidos aos extratos hidroetanólicos de folhas de *V. ferruginea* desenvolvidos em quatro condições de luminosidade (pleno sol, 30%, 50% e 70%). *Ctrl: controle. Médias seguidas pelas mesmas letras para as concentrações dos extratos não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Os tratamentos de pleno sol e 30% de retenção de luminosidade proporcionaram 27 e 11% de plântulas germinadas com raízes necrosadas, respectivamente, na maior concentração, 800 ppm. Diversas anomalias anatômicas e ultraestruturais são descritas em estudos de potencial alelopático, as quais ocorrem devido, provavelmente, às mudanças no material genético, na síntese de proteína e de lipídios, na permeabilidade membrana celular e em atividades enzimáticas e na respiração mitocondrial (GUSMAN et al., 2015).

Os resultados obtidos nos bioensaios com extratos hidroetanólicos de raízes de *V. ferruginea* demonstraram alterações na germinação das sementes de *U. brizantha* (Tabela 14).

Tabela 14. Germinação (%) de *U. brizantha* submetidos aos extratos hidroetanólicos de raízes de *V. ferruginea* desenvolvidos em quatro condições de luminosidade (pleno sol, 30%, 50% e 70%).

Condições de luminosidade	Germinação (%) - Extrato hidroetanólico das raízes							
	12,5 ppm	25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm	400 ppm	800 ppm	
Controle	85,0	86,7	87,5	84,2	85,8 a	85,0 a	86,7 a	
Pleno sol	85,0	84,2	83,3	77,5	73,3 b	71,7 b	54,2 c	
30%	85,8	85,8	82,5	80,8	77,5 ab	76,7 ab	68,3 b	
50%	85,0	83,3	83,3	79,2	75,8 ab	75,0 ab	71,7 b	
70%	83,3	84,2	84,2	80,0	76,7 ab	75,8 ab	69,2 b	
F	0,25 ns	0,66 ns	1,24 ns	2,04 ns	3,07 *	3,53 *	22,49 **	
CV (%)	5,29	4,88	5,11	5,28	8,51	8,38	8,53	
DMS	7,62	7,03	7,30	7,20	11,23	10,93	10,13	

ns, Não significativo a 5%, * Significativo a 5%, **Significativo a 1% pelo teste de Tukey; CV (%): Coeficiente de variação; DMS: diferença mínima significativa. Médias seguidas pelas mesmas letras para as concentrações dos extratos não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Os efeitos dos extratos das raízes foram significativos apenas nas maiores concentrações. Muitas vezes, o efeito tóxico provocado pelos metabólitos secundários sintetizados pela planta se manifesta muito mais sobre os parâmetros de desenvolvimento ou sobre o acúmulo de massa seca do que sobre a porcentagem de germinação. Alterações no processo germinativo são muito importantes para a sobrevivência das plântulas, refletindo no desenvolvimento destas. Mesmo não reduzindo porcentagem de germinação, as substâncias alelopáticas pode causar atrasos no processo germinativo e os diásporos que germinam mais lentamente podem dar origem a plântulas com tamanho reduzido e podem consequentemente ser mais suscetíveis a estresses e predação, havendo menor chance na competição por recursos (KREMER et

al., 2016). Ainda em relação a porcentagem de germinação, verificou-se diferença significativa no tratamento de pleno sol em relação ao controle a partir da concentração 200 ppm. Quando analisado os demais tratamentos nota-se que, embora tenha havido tendência de redução nesse parâmetro, apenas a maior concentração (800 ppm) foi significativa em relação ao controle. A redução da germinação das sementes ao elevar a concentração do extrato hidroalcólico demonstra ação negativa do extrato sobre o processo germinativo e pode ser atribuído ao acúmulo de formas reativas de oxigênio e ao aumento na peroxidação lipídica com maior extravasamento de eletrólitos (AUMONDE et al., 2012).

O comprimento da parte aérea foi similar para as plântulas em todas as concentrações dos extratos de *V. ferruginea* cultivadas sob sombreamento, e foi reduzida no tratamento de pleno sol diferindo significativamente do controle e desse grupo de amostras sombreadas (Figura 21 a). Tais constatações indicam que as amostras de raízes de plantas sombreadas possuem grande semelhança na produção de metabolitos.

Os extratos de folhas também provocaram alterações no comprimento das raízes das plântulas. O comprimento da raiz diminuiu à medida que houve incremento nas concentrações (Figura 21 b). A redução média foi de 22% em relação ao controle, chegando a 34% de redução na concentração de 800 ppm.

As inibições no desenvolvimento da raiz representam um dos principais fatores que indica sensibilidade da planta teste aos efeitos das possíveis fitotoxinas dos extratos com potencial alelopático (SOUZA FILHO; DUARTE, 2007). Em testes de germinação, o efeito fitotóxico ocorre com maior frequência nas raízes, quando comparados com a parte aérea, devido a absorção dos aleloquímicos pelas raízes, que ficam em contato físico com a solução contendo dos extratos (HABERMANN et al., 2016; SALMAN et al., 2017). Também existe indícios de que essa maior inibição ocorre nas raízes primárias, pois a sua superfície é mais permeável a substâncias fitotóxicas do que às superfícies da parte aérea, devido a presença de uma camada de cutícula protetora menos pronunciada sobre a raiz primária, o que pode resultar na maior penetração destes compostos e conseqüentemente na maior concentração de substâncias fitotóxicas dentro dos tecidos da raiz (YOSHIMURA et al., 2011).

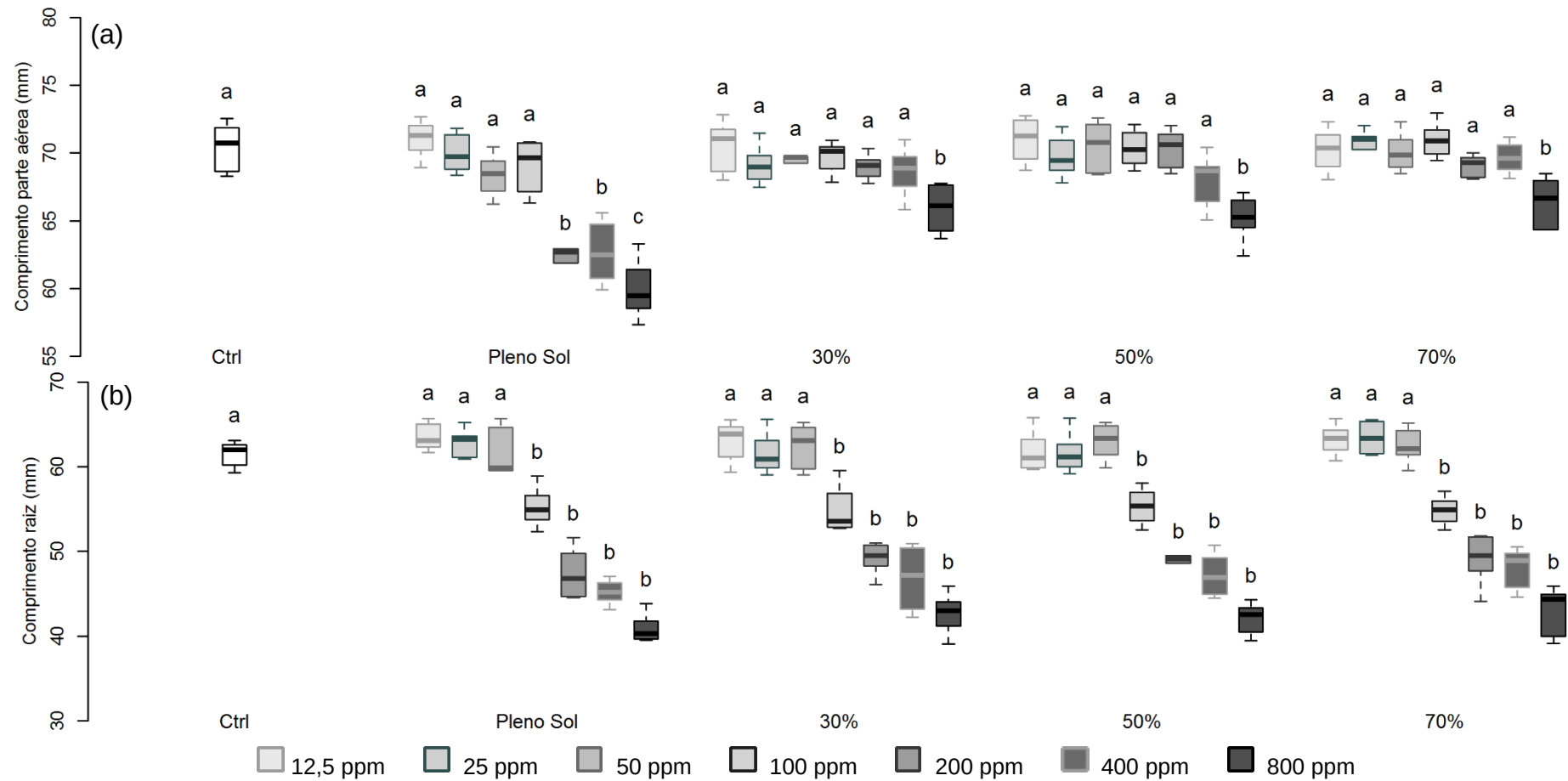


Figura 21. Análise box-plot de comprimento (mm) da parte aérea (a) e da raiz (b) de *U. brizantha* submetidos aos extratos hidroetanólicos de raízes de *V. ferruginea* desenvolvidos em quatro condições de luminosidade (pleno sol, 30%, 50% e 70%). *Ctrl: controle. Médias seguidas pelas mesmas letras para as concentrações dos extratos não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Os extratos das raízes não influenciaram na massa seca da parte aérea até a concentração 200 ppm, a partir dessa concentração, os quatro extratos testados proporcionaram reduções significativas em relação ao controle (Figura 22 a).

Os resultados obtidos mostram que as inibições das médias de massa seca da parte aérea das plântulas de *U. brizantha* promovidas pelos extratos das raízes de *V. ferruginea* não variaram em função da condição de luminosidade, sendo que as inibições potencialmente alelopáticas promovidas pelo extrato das raízes foi semelhante para as quatro condições de luminosidade.

O metabolismo da plântula de *U. brizantha* foi alterado quando submetido aos extratos de condições de luminosidade e os agentes dessas mudanças podem ter afetado adversamente a atividade respiratória, o processo fotossintético e a atividade de enzimas, sendo o efeito danoso o acúmulo de massa seca da planta receptora.

A massa seca da raiz também não diferiu do controle quando utilizados extratos das raízes nas menores concentrações, no entanto, a partir da concentração de 100 ppm todos os tratamentos apresentaram diferença significativa, atingindo reduções de 33% em relação ao controle (Figura 22 b).

A massa seca da raiz apresentou comportamento diferenciado em relação a condição de luminosidade. Para as maiores concentrações o tratamento pleno sol apresentou diferença significativa na atividade alelopática em relação ao controle e aos demais tratamentos. Esses dados indicam que o fator radiação solar é determinante nos resultados e que os compostos com atividade alelopática variam com as condições de luminosidade, de forma independente, sendo o potencial de inibição mais intenso no tratamento pleno sol.

Apesar dos extratos das folhas e das raízes de *V. ferruginea* submetidas a diferentes intensidades de luz não apresentarem desempenho semelhantes, os resultados obtidos indicam a capacidade da espécie de produzir substâncias com potencial fitotóxico e a existência de interações da planta com as condições de desenvolvimento. A mudança da condição de luminosidade pode aumentar ou limitar a ação fitotóxica dessas substâncias, confirmando que os metabólitos secundários de determinado grupo de planta representem um papel importante na adaptação do indivíduo aos seus ambientes. Alterações nos níveis de radiação provoca desvios de rotas biossintéticas de metabólitos secundários.

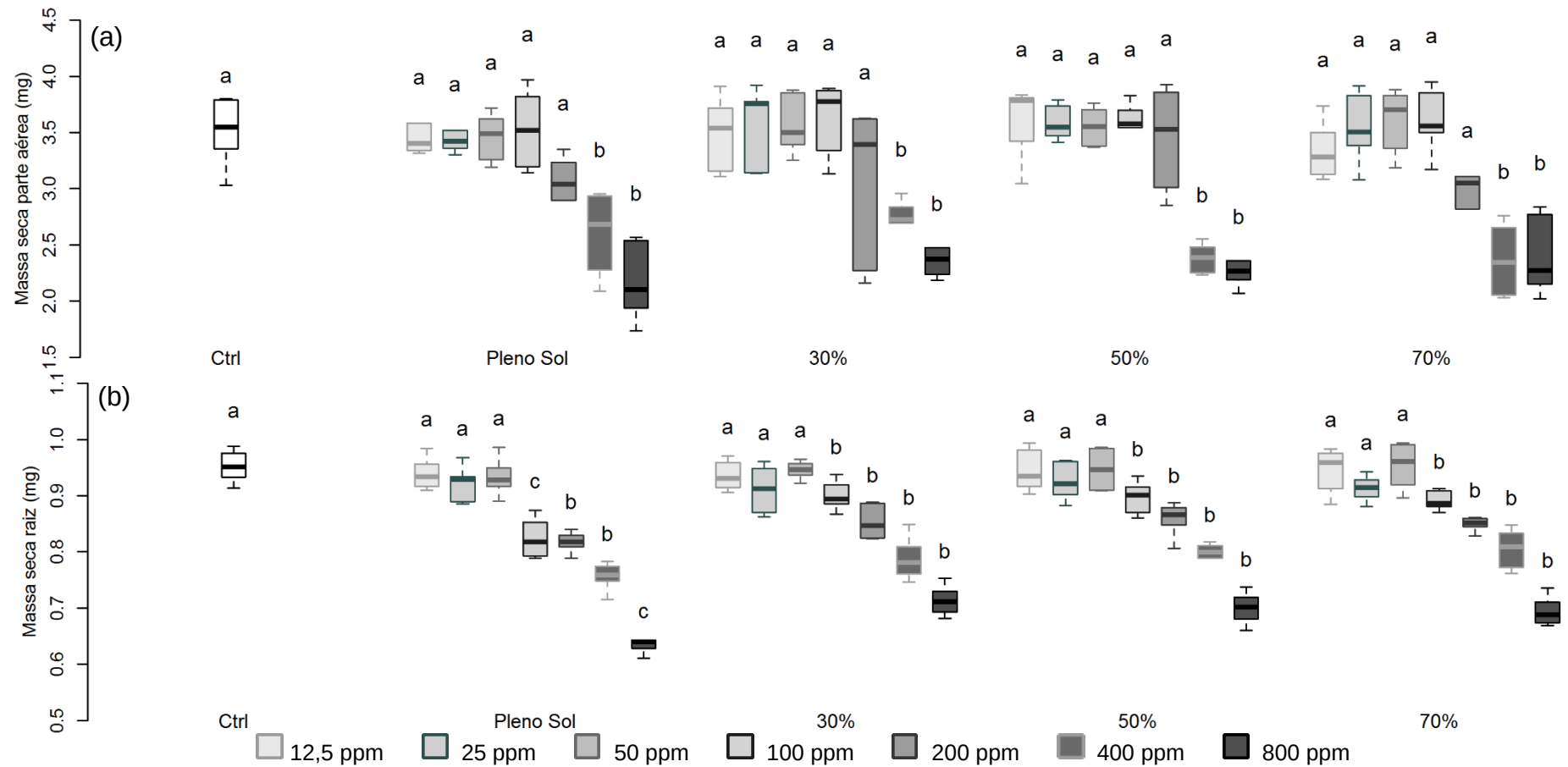


Figura 22. Análise box-plot de massa seca (mg) da parte aérea (a) e da raiz (b) de *U. brizantha* submetidos aos extratos hidroetanólicos de raízes de *V. ferruginea* desenvolvidos em quatro condições de luminosidade (pleno sol, 30%, 50% e 70%). *Ctrl: controle. Médias seguidas pelas mesmas letras para as concentrações dos extratos não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

As das raízes de 17 e 34% das plântulas de *U. brizantha*, na concentração de 800 ppm, quando sobre influência de extratos das raízes de *V. ferruginea*, no tratamento pleno sol, nas concentrações 400 e 800 ppm, respectivamente, apresentaram-se oxidadas ou escurecidas. Ainda no tratamento de pleno sol, em 6, 13 e 22% das plântulas de *U. brizantha* verificou-se engrossamento das raízes nas concentrações de 200, 400 e 800 ppm, respectivamente. Algumas substâncias fitotóxicas podem promover, além da redução do comprimento e do acúmulo de massa seca, a redução no número de raízes, o inchaço ou a necrose de pontas da raiz, e a ausência de pêlos radiculares, podendo reduzir assim a capacidade de sobrevivência da plântula (ELISANTE et al, 2013).

Pode-se inferir que o extrato das folhas e das raízes de *V. ferruginea* apresentam efeitos fitotóxico ao interferir nos parâmetros de desenvolvimento com predomínio de efeitos inibitórios sobre a raiz da planta teste que levaram a diminuição do crescimento da mesma. A maior ou menor atividade alelopática dos extratos de *V. ferruginea* submetido a diferentes condições de luminosidade está associada a alguma especificidade em relação a intensidade da de radiação solar.

A quantidade de radiação solar a qual as plantas de *V. ferruginea* foram expostas interferiu na produção e no acúmulo de substâncias alelopáticas. As plantas possuem a habilidade de sintetizar uma grande quantidade de metabólitos secundários com atividade biológica, para diferentes propósitos, que incluem a proteção contra a radiação UV (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

A exposição do tecido vegetal fisiologicamente ativo a radiação UV eleva o nível de espécies reativas de oxigênio, tais como oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroxila (OH) e pode causar danos oxidativos à proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, além de afetar a atividade enzimática e a expressão gênica, o que poderia proporcionar dano celular e morte celular programada (MACKERNESS et al., 2001). Com isso, plantas desenvolvem mecanismos de defesa incluindo antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos e produção de metabólitos secundários para neutralizar o efeito destrutivo de espécies reativas de oxigênio (JANSEN et al., 2008). Ao ser detectado um incremento no nível de espécies reativas de oxigênio o sistema de sinalização da planta promove a ativação de mensageiros levando a síntese de compostos fitotóxicos, através do metabolismo secundário.

5.2.4. Concentrações de alumínio

A porcentagem de germinação de *U. brizantha* foi diferente entre os tratamentos avaliados. Os resultados obtidos demonstram que a de germinação das sementes foi reduzida significativamente em relação ao controle quando utilizado extratos de folhas dos tratamentos 400, 800 e 1600 μmol nas concentrações 100, 200, 400 e 800 ppm e extratos de folhas 200 μmol nas concentrações 400 e 800 ppm, sendo os efeitos proporcionais ao aumento da concentração (Tabela 15).

Tabela 15. Germinação (%) de *U. brizantha* submetidos aos extratos hidroetanólicos de folhas de *V. ferruginea* desenvolvidos em sete concentrações de alumínio no solo (0, 50, 100, 200, 400, 800 e 1600 μmol).

Concentrações de alumínio	Germinação (%) - Extrato hidroetanólico das folhas						
	12,5 ppm	25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm	400 ppm	800 ppm
Controle	85,8	85,8	86,7	86,7 a	86,7 a	85,8 a	85,0 a
0 μmol	85,8	84,2	84,2	84,2 a	85,0 a	85,8 a	80,8 ab
50 μmol	84,2	81,7	83,3	85,0 a	87,5 a	85,0 a	80,0 ab
100 μmol	85,8	82,5	83,3	85,8 a	85,0 a	84,2 ab	81,7 ab
200 μmol	83,3	85,8	85,0	85,0 a	82,5 a	75,0 bc	73,3 b
400 μmol	82,5	84,2	85,8	74,2 b	73,3 b	68,3 ca	60,0 c
800 μmol	84,2	82,5	83,3	72,5 b	72,5 b	66,7 ca	61,7 c
1600 μmol	85,0	85,8	86,7	73,3 b	70,0 b	65,8 ca	57,5 c
F	0,49 ns	0,97 ns	0,78 ns	9,27 **	12,50 **	19,00 **	20,34 **
CV (%)	5,20	5,02	4,78	6,24	6,16	6,65	8,33
DMS	8,13	7,79	7,49	9,31	9,13	9,46	11,15

ns, Não significativo a 5%, **Significativo a 1% pelo teste de Tukey; CV (%): Coeficiente de variação; DMS: diferença mínima significativa. Médias seguidas pelas mesmas letras para as concentrações dos extratos não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Os resultados do comprimento da parte aérea encontrados no bioensaio no qual a planta teste cresceu na presença de extrato das folhas diferem quando comparado com os resultados encontrados no controle a partir da concentração 100 ppm para os tratamentos 400 a 1600 μmol e para os demais tratamentos, a partir da concentração 200 ppm. As plântulas de *U. brizantha* expostas aos extratos das folhas apresentaram comportamento semelhante com relação aos comprimentos da raiz, quanto maior a concentração dos extratos, menores os comprimentos das raízes das plântulas (Figura 23). No entanto, os tratamentos 0, 50 e 100 μmol não diferiram significativamente do controle.

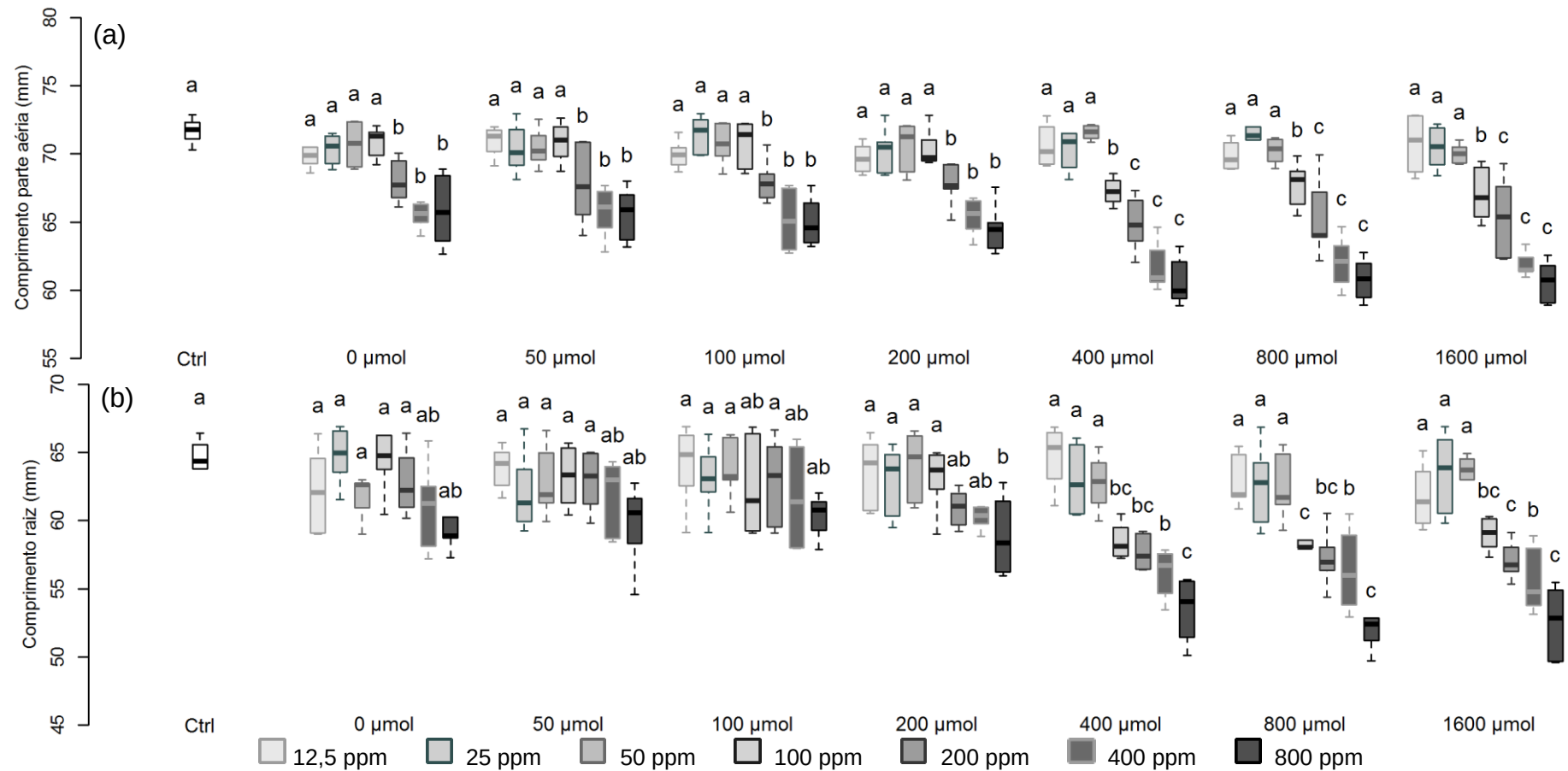


Figura 23. Análise box-plot de comprimento (mm) da parte aérea (a) e da raiz (b) de *U. brizantha* submetidos aos extratos hidroetanólicos de folhas de *V. ferruginea* desenvolvidos em sete concentrações de alumínio no solo (0, 50, 100, 200, 400, 800 e 1600 µmol). *Ctrl: controle. Médias seguidas pelas mesmas letras para as concentrações dos extratos não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

A massa seca da parte aérea foi reduzida com o aumento da concentração dos extratos das folhas. O incremento da concentração do extrato de folha de 0 ppm para 800 ppm do tratamento 1600 μ mol ocasionou inibição da massa seca da parte aérea de 50 pontos percentuais (Figura 24 a).

Tal ocorrência pode estar relacionada ao fato de compostos alelopáticos interferirem na fotossíntese, pela alteração no teor de clorofila em processos envolvendo enzimas clorofilases, por influenciar negativamente a eficiência do fotossistema II reduzido a absorção de fótons pelo sistema antena ou ainda pela inibição da síntese de precursores da porfirina, um constituinte da clorofila (AUMONDE et al., 2013).

A redução da massa seca das plântulas também pode ser evidenciada em decorrência da interferência das substâncias alelopáticas no metabolismo das plântulas, reduzindo a oferta de energia e, conseqüentemente, impedindo o desenvolvimento normal desses organismos (GUSMAN et al., 2015).

Os extratos obtidos das folhas de *V. ferruginea* apresentaram comportamentos diferenciados sobre a massa seca das raízes (Figura 24 b), sugerindo que o potencial alelopático não está relacionado apenas aos aspectos genéticos, mas também as condições de desenvolvimento do indivíduo.

A massa seca da raiz foi mais sensível aos efeitos fitotóxicos dos compostos em baixas concentrações do que a germinação ou o crescimento da parte aérea. No entanto, em concentrações moderadas, ocorreu também o atraso da germinação e a redução do crescimento e, em concentrações altas, além de reduções expressivas no acúmulo de massa seca, ocorreu a inibição da germinação e redução significativa tanto no comprimento da parte aérea quanto na radícula.

Andrade et al. (2017) relatam que algumas substâncias aleloquímicas afetam diferentes processos fisiológicos da planta teste em função da sua concentração, mas também da sua forma de translocação.

No estágio de plântula, o sistema radicular encontra-se mais sensível a ação de substâncias alelopáticas, uma vez que as raízes são as estruturas que primeiro mantêm contato com o substrato e o seu alongamento depende das divisões celulares, que, se inibidas, comprometem o seu desenvolvimento normal dos demais órgãos da planta (GUSMAN et al., 2015).

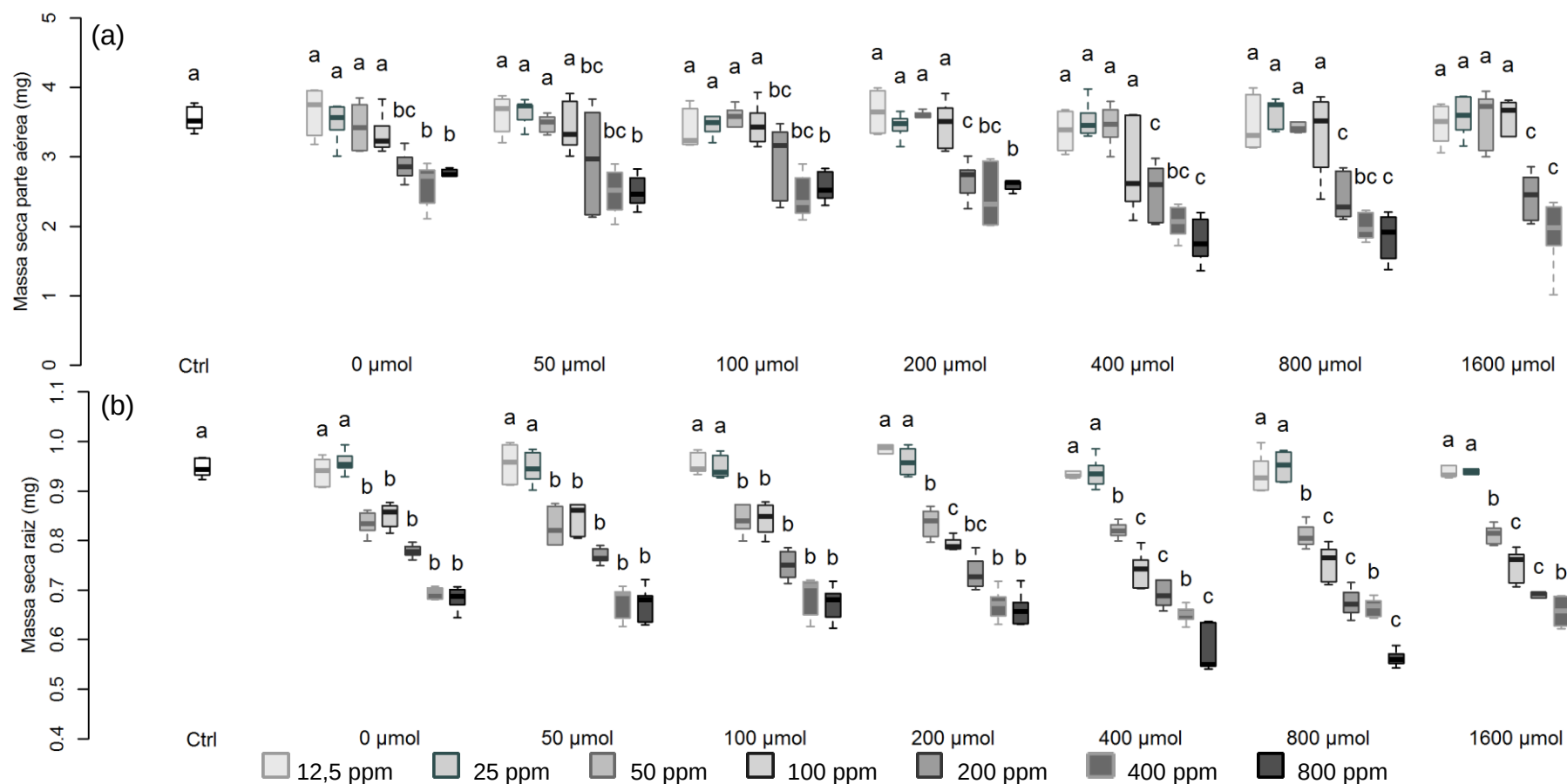


Figura 24. Análise box-plot de massa seca (mg) da parte aérea (a) e da raiz (b) de *U. brizantha* submetidos aos extratos hidroetanólicos de folhas de *V. ferruginea* desenvolvidos em sete concentrações de alumínio no solo (0, 50, 100, 200, 400, 800 e 1600 μmol). *Ctrl: controle. Médias seguidas pelas mesmas letras para as concentrações dos extratos não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

As análises dos dados de germinabilidade mostraram diferentes efeitos dos extratos das raízes sobre o processo de germinação das sementes e de crescimento das plântulas de *U. brizantha* (Tabela 16). A intensidade dos efeitos alelopáticos depende da concentração de substâncias presentes no o extrato, e essa concentração pode ser alterada a partir de interações complexas entre fatores genéticos e ambientais e a capacidade de produção de aleloquímicos de cada órgão de uma determonada espécie (SANDERSON et al., 2013).

Tabela 16. Germinação (%) de *U. brizantha* submetidos aos extratos hidroetanólicos de raízes de *V. ferruginea* desenvolvidos em sete concentrações de alumínio no solo (0, 50, 100, 200, 400, 800 e 1600 μmol).

Concentrações de alumínio	Germinação (%) - Extrato hidroetanólico das raízes						
	12 ppm	25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm	400 ppm	800 ppm
Controle	85,0	85,0	85,0	86,7	87,5 a	85,0 a	87,5 a
0 μmol	83,3	86,7	87,5	85,8	81,7 a	84,2 a	85,0 a
50 μmol	85,0	86,7	83,3	86,7	85,0 a	85,0 a	87,5 a
100 μmol	85,0	82,5	85,0	85,0	85,8 a	85,8 a	85,0 a
200 μmol	85,8	84,2	84,2	84,2	84,2 a	84,2 a	85,0 a
400 μmol	84,2	83,3	85,8	85,8	85,8 a	83,3 a	80,8 a
800 μmol	87,5	85,0	85,8	83,3	84,2 a	84,2 a	84,2 a
1600 μmol	85,8	85,0	86,7	80,0	67,5 b	56,7 b	52,5 b
F	0,54 ns	0,92 ns	0,60 ns	1,56 ns	12,32 **	33,45 **	43,41 **
CV (%)	4,85	4,41	4,96	5,16	5,38	5,16	5,36
DMS	7,63	6,90	7,81	8,06	8,21	7,72	8,02

ns, Não significativo a 5%, * Significativo a 5%, **Significativo a 1% pelo teste de Tukey; CV (%): Coeficiente de variação; DMS: diferença mínima significativa. Médias seguidas pelas mesmas letras para as concentrações dos extratos não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Entre os sete extratos das raízes testados, apenas o extrato 1600 μmol teve forte atividade fitotóxica sobre a taxa final de germinação das sementes de *U. brizantha* (Tabela 16). Os extratos deste tratamento apresentaram atividade fitotóxica geralmente maior em relação as altas concentrações de alumínio no solo. O tratamento 1600 μmol apresentou os menores valores de germinação, ou seja, sementes de *U. brizantha* submetidos a este tratamento requereram um tempo maior para completarem o processo de germinação, ou ainda, não iniciam o processo. Nas concentrações de 200, 400 e 800 ppm, o tratamento 1600 μmol proporcionou redução de 23, 33 e 40% na porcentagem de germinação, respectivamente, em relação ao controle. Esses resultados indicam que as sementes de *U. brizantha* foram mais sensíveis aos aleloquímicos presentes no

extrato do tratamento 1600 μmol . Os tratamentos controle e com soluções de alumínio nas concentrações de 0 μmol a 800 μmol não diferiram na porcentagem de germinação.

Comparando os órgãos folhas com as raízes, as folhas ocasionaram maior redução da porcentagem de germinação das sementes independente das concentrações. Alguns extratos ou concentrações podem não inibir a germinação, mas podem dificultar o processo de germinação levando a uma redução tanto no alongamento como no acúmulo de massa e ainda causar danos as estruturas das plântulas (RIGON et al., 2016).

Os menores valores de comprimento da parte aérea e da raiz e foram encontrados nas plântulas expostas aos extratos confeccionados com plantas de *V. ferruginea* oriundas do tratamento 1600 μmol (Figura 25).

A variação da disponibilidade de alumínio no solo proporcionou mudança no potencial alelopático dos extratos da raiz de *V. ferruginea*. Os distúrbios induzidos pelo aumento da concentração de alumínio na solução do solo em rotas metabólicas ainda são pouco conhecidos, assim como a relação desses distúrbios com as mudanças nas concentrações de alguns compostos em resposta a tolerância ao alumínio (RAMPIM; LANA, 2013). Ainda assim, vários trabalhos reportam correlações entre a síntese de compostos fenólicos e a presença do alumínio na solução do solo (KID et al., 2001; HARTWIG et al., 2007; RAMPIM; LANA, 2013).

A interface raiz-solo é um ambiente constantemente expostos a uma vasta quantidade de interações que podem afetar a produção e liberação de metabólitos secundários (BAIS et al., 2006). A quantidade e composição de metabólitos sintetizados pelas raízes são fortemente influenciadas por muitos fatores como estresse bióticos e abióticos incluindo as características do solo, seu estado nutricional ou a disponibilidade de metais (LESUFFLEUR et al., 2007).

As plantas perenes como muitas do gênero *Vernonia*, que apresentam potencial alelopático, tem maiores condições de manter os altos níveis fitotóxicos de suas substâncias alelopáticas mesmo com a degradação microbiana, uma vez que elas mantem uma reposição constante e periódica dos compostos aleloquímicos no solo, ou produzem compostos resistentes a degradação microbiana (INDERJIT, 2005).

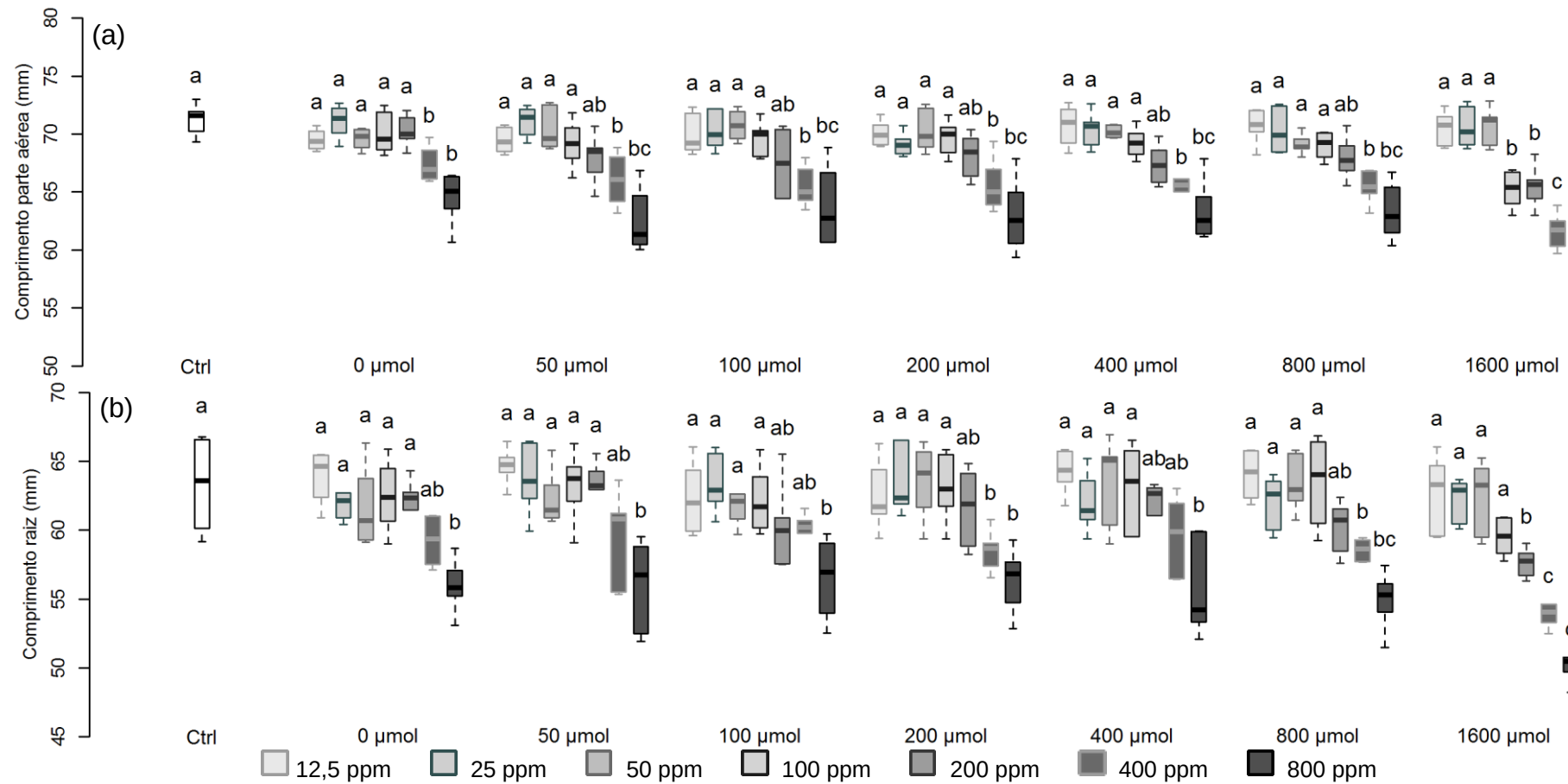


Figura 25. Análise box-plot de comprimento (mm) da parte aérea (a) e da raiz (b) de *U. brizantha* submetidos aos extratos hidroetanólicos de raízes de *V. ferruginea* desenvolvidos em sete concentrações de alumínio no solo (0, 50, 100, 200, 400, 800 e 1600 µmol). *Ctrl: controle. Médias seguidas pelas mesmas letras para as concentrações dos extratos não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Os metabólitos secundários liberados pelas raízes de muitas espécies desempenham um papel direto como fitotoxinas na mediação da competição entre diferentes espécies e tem o potencial de influenciar dois mecanismos de interferência que podem levar a interações negativas entre as plantas: interferência química; e competição indireta por recursos, alterando a química do solo, processos do solo, e as populações microbianas (BAIS et al., 2006).

Tanto o comprimento da parte aérea quanto o da raiz apresentaram inibição em todos os extratos, no entanto apenas nas maiores concentrações dos extratos.

O desenvolvimento de plântulas em extratos contendo substâncias alelopáticas proporciona correlações negativas entre as taxas de crescimento e de investimento em defesa. Os sistemas de defesa ativados na presença de aleloquímicos pode apresentar um alto custo para as plântulas, resultando em uma taxa de crescimento mais lenta. As plântulas realizam a fotossíntese a fim de converter energia luminosa em energia química na forma de carboidratos, e estes, em seguida, são alocados para o crescimento e desenvolvimento, ou quando em condições estressantes, revertidos em defesas para a planta (HUOT et al., 2014).

As plântulas expostas aos extratos de raízes dos tratamentos 50 a 1600 μmol tiveram a massa seca da parte aérea reduzida a partir da concentração 200 ppm, enquanto o extrato 0 μmol proporcionou diferença significativa do controle apenas nas concentrações 400 ppm e 800 ppm (Figura 26 a).

Independente do tratamento dos extratos de raiz testado e contrariando o observado com o processo germinativo, a massa seca da raiz se mostrou uma variável que confirma a presença de compostos fitotóxicos na espécie doadora (Figura 26 b), uma vez que foi observado redução significativa do parâmetro com aumento das concentrações utilizadas, a partir da concentração de 50 ppm, quando comparado ao controle. De forma geral, as raízes mostraram-se mais sensíveis à ação das substâncias fitotóxicas quando comparadas com a parte aérea.

Várias pesquisas apontam que uma maior disponibilidade de alumínio na solução do solo proporciona o aumento da síntese de compostos com potencial alelopáticos e ainda, relacionam o aumento dos compostos aleloquímicos a tolerância da planta doadora ao alumínio.

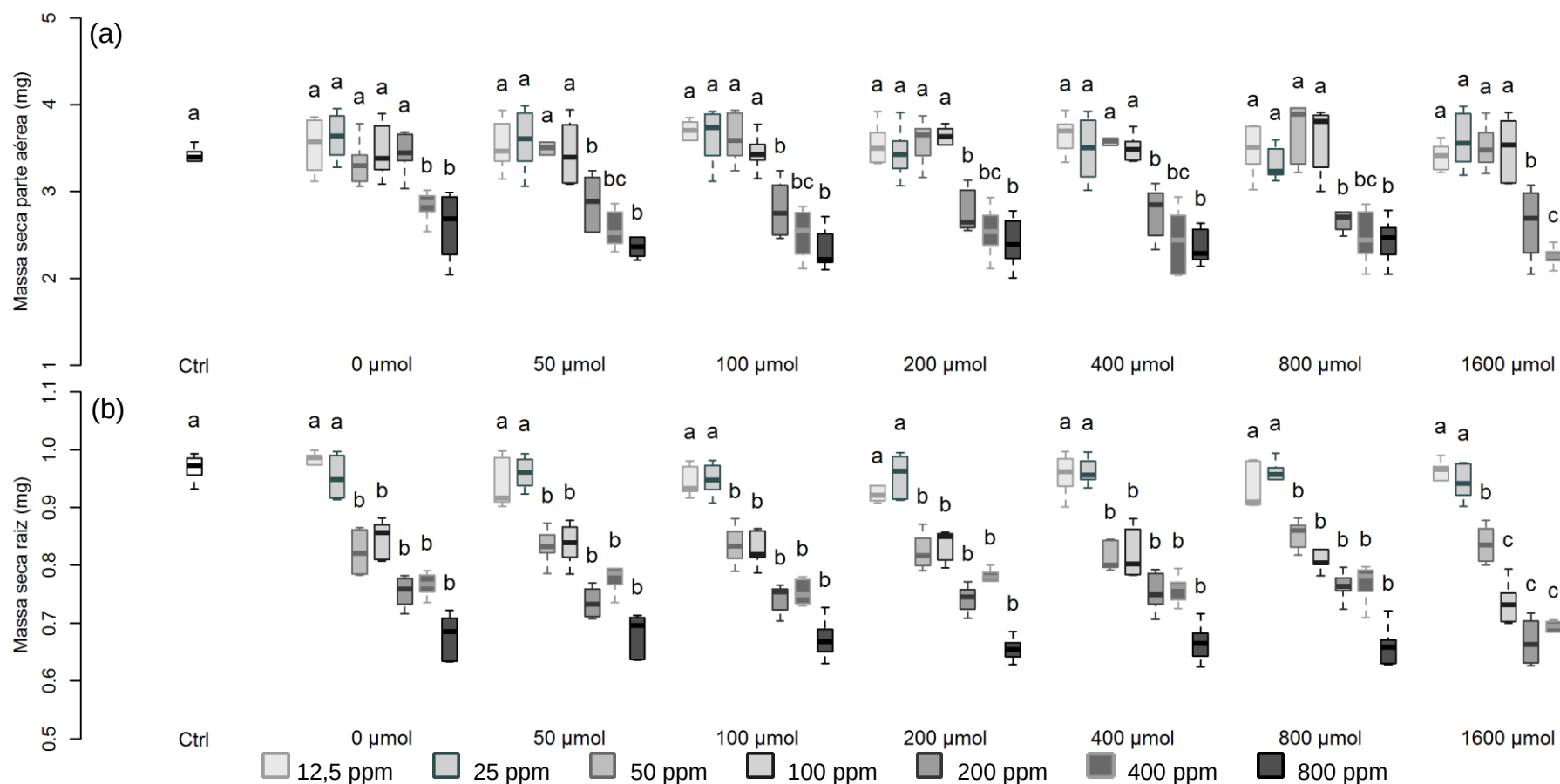


Figura 26. Análise box-plot de massa seca (mg) da parte aérea (a) e da raiz (b) de *U. brizantha* submetidos aos extratos hidroetanólicos de raízes de *V. ferruginea* desenvolvidos em sete concentrações de alumínio no solo (0, 50, 100, 200, 400, 800 e 1600 µmol). *Ctrl: controle. Médias seguidas pelas mesmas letras para as concentrações dos extratos não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Hartwig et al. (2007) e Rampim e Lana (2013) reportam correlações entre exsudação de flavonóides e a presença do alumínio na solução do solo e sugerem que a síntese dessas substâncias pelas plantas doadoras provavelmente tenham um importante papel na desintoxicação do alumínio na rizosfera que circunda o ápice radicular.

O efeito fitotóxico foi acompanhado por alterações morfológicas conspícuas nas raízes, tais como: engrossamento, escurecimento e ausência da zona de absorção e coifa. Essas alterações foram especialmente notadas nas plântulas tratadas com os extratos de folhas 400, 800 e 1600 μmol e apenas com o extrato 1600 μmol das raízes.

Dos sete tratamentos de extrato de raízes estudados, um diminuiu a porcentagem de germinação e, todos reduziram o comprimento e o acúmulo da massa seca da parte aérea e da raiz, mas em diferentes proporções, confirmando que, em geral, a interferência alelopática pode variar dependendo das condições de desenvolvimento do indivíduo doador.

Tanto os extratos das folhas como das raízes apresentaram maior efeito fitotóxico no tratamento com a maior concentração de alumínio, indicando que a espécie possui grande tolerância e/ou adaptação a presença de altas concentrações de alumínio no solo. A produção de substâncias aleloquímicas depende da fase de desenvolvimento e da sensibilidade da planta aos estresses, mas também das condições ambientais prevalentes (MAQBOOL et al., 2013).

5.2.5. Frequência da atividade alelopática dos testes de germinação

Os resultados das análises dos extratos comprovam o potencial alelopático das folhas e das raízes de *V. ferruginea* sobre a germinação de sementes e o desenvolvimento de plântulas de *U. brizantha*, os quais variam em função das concentrações e das condições de desenvolvimento da espécie doadora, indicando possíveis alterações no metabolismo vegetal em função da variação da concentração de alumínio do solo.

Os extratos resultantes dos tratamentos de estresse foram ranqueados quanto a atividade alelopática, baseando-se no somatório da presença e ausência dos dados de germinabilidade, comprimento e massa seca da parte aérea e da raiz nos extratos a 100 ppm, em relação ao controle (Tabela 17).

Tabela 17. Frequência de atividade alelopática proporcionada pelos extratos de folhas e de raízes de *V. ferruginea* para disponibilidade hídrica (DH), tipos de solo (TS), intensidade luminosa (IL) e concentração de alumínio (C Al). Presença (1) e ausência (0) de atividade alelopática nos extratos a 100 ppm, em relação ao controle, nos diásporos e plântulas de *U. brizantha* para a porcentagem de germinação (G), comprimento parte aérea (CPA) e raiz (CR) e massa seca da parte aérea (MSPA) e raiz (MSR) das plântulas.

Extrato folhas							Extrato raiz						
DH	G	CPA	CR	MSPA	MSR	Total	DH	G	CPA	CR	MSPA	MSR	Total
100 mm	1	1	1	1	1	5	100 mm	0	0	0	1	0	1
200 mm	0	1	1	1	1	4	200 mm	0	0	1	0	1	2
300 mm	0	1	1	1	1	4	300 mm	0	0	1	1	1	3
400 mm	1	1	1	1	1	5	400 mm	0	1	1	1	1	4
500 mm	1	1	1	1	1	5	500 mm	1	1	1	1	1	5
1000 mm	1	1	1	1	1	5	1000 mm	1	1	1	1	1	5
28							20						
TS	G	CPA	CR	MSPA	MSR	Total	TS	G	CPA	CR	MSPA	MSR	Total
Agr	1	1	1	1	1	5	Agr	1	1	1	1	1	5
Pas	0	1	1	1	1	4	Pas	0	1	1	1	1	4
Mat	0	1	1	1	1	4	Mat	0	1	1	0	0	2
Iti	0	1	1	1	1	4	Iti	1	1	1	1	0	4
Itu	1	1	1	1	1	5	Itu	1	1	1	1	1	5
22							20						
IL	G	CPA	CR	MSPA	MSR	Total	IL	G	CPA	CR	MSPA	MSR	Total
PS	0	0	1	1	1	3	PS	1	0	1	0	1	3
30%	0	0	0	1	1	2	30%	1	0	1	0	1	3
50%	0	0	0	1	1	2	50%	1	0	1	0	1	3
70%	0	0	0	1	1	2	70%	1	0	1	0	1	3
9							12						
C Al	G	CPA	CR	MSPA	MSR	Total	C Al	G	CPA	CR	MSPA	MSR	Total
0 µmol	0	1	1	1	0	3	0 µmol	0	0	1	0	0	1
50 µmol	0	0	1	1	1	3	50 µmol	0	0	1	0	0	1
100 µmol	0	0	0	1	0	1	100 µmol	0	0	0	1	0	1
200 µmol	0	0	0	0	0	0	200 µmol	0	0	0	0	0	0
400 µmol	1	0	0	0	1	2	400 µmol	0	0	0	0	1	1
800 µmol	1	1	0	0	1	3	800 µmol	0	1	0	0	1	2
1600 µmol	1	1	1	0	1	4	1600 µmol	0	1	1	0	1	3
16							9						

Os testes de germinação revelaram efeito fitotóxico sobre as plântulas nos extratos de folhas e de raízes de *V. ferruginea*. Os extratos de folha apresentaram maior atividade de inibição. Embora, as substâncias fitotóxicas possam ser sintetizados nos diferentes órgãos de uma planta, a sua quantidade e qualidade podem variar de um órgão para o outro em função de diversos

fatores (WESTON; DUKE, 2003; PARVEZ et al., 2004). A folha é o órgão vegetal mais ativo metabolicamente e assim produz diversos compostos químicos, que atuam como respostas a estresse ou na defesa contra predadores e por essas e outras razões acumulam vários metabólitos secundários com diferentes atividades biológicas (BORELLA; PASTORINI, 2010).

5.3. Análise metabolômica

As análises e processamento de dados de 132 extratos por UHPLC-DAD-(ESI) geraram 2204 e 934 picos no modo positivo e negativo, respectivamente. Os resultados do modo negativo foram utilizados para propor a formação de grupos para a análise da variação dos metabólitos de *V. ferruginea*.

Os dados espectrais de alta resolução de MS foram submetidos a análise multivariada, permitindo a separação e formação de grupos que podem explicar a relação entre os metabólitos produzidos sob diferentes condições e a atividade fitotóxica.

Os parâmetros de qualidade para os modelos PCA e OPLS-DA foram altos para R^2 (variando de 0,7 a 0,9) e satisfatórios para Q^2 (variando de 0,5 a 0,9). Quanto aos valores dos parâmetros de qualidade dos modelos a orientação geral para a avaliação dos coeficientes supõe que os valores de $R^2 > 0,7$ (70 %) e $Q^2 > 0,4$ (40 %) são aceitáveis na análise de dados de origem biológica (JIMÉNEZ-CONTRERAS et al, 2009). Desta forma, os critérios observados para as análises de discriminação das amostras de folhas e raízes submetidas a alterações de condições de desenvolvimento determinam que a separação das amostras é confiável, ou seja, os tratamentos apresentam agrupamentos em relação a proximidade do seu conteúdo metabólico.

O modelo efetuado pela PCA, para folhas e raízes de *Vernonia* submetida a diferentes tratamentos (Figura 27), demonstrou a formação de dois grupos bem definidos, um para as amostras das folhas e outro para as amostras das raízes.

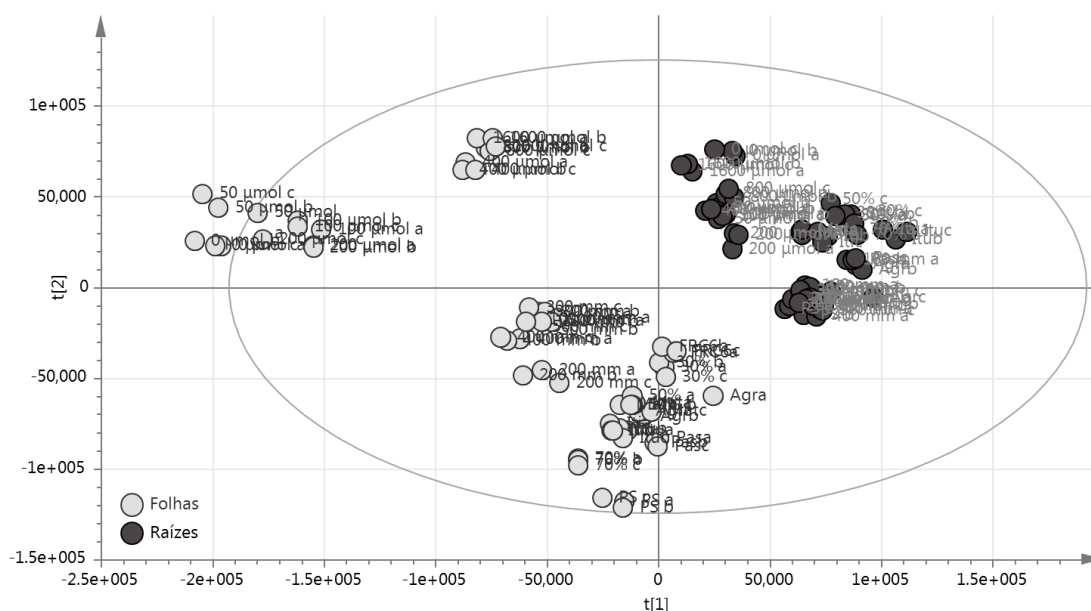


Figura 27. Análise multivariada por PCA referente aos dados de UHPLC-MS de amostras de folhas e raízes de *V. ferruginea* desenvolvidas em seis disponibilidade hídrica (100, 200, 300, 400, 500 e 1000 mm distribuídos ao mês) em cinco solos (Agr, Pas, Mat, Iti e Itu), quatro condições de luminosidade (PS, 30%, 50% e 70%) e em sete concentrações de alumínio no solo (0, 50, 100, 200, 400, 800 e 1600 μmol). O círculo representa a elipse de confiança um nível de 95%.

Na Figura 28 a, nota-se que as amostras de folhas das plantas submetidas ao desenvolvimento em diferentes concentrações de alumínio no solo apresentaram comportamento discrepante das demais. Enquanto as amostras dos experimentos disponibilidade hídrica, tipos de solo e intensidade luminosa formam um grupo com leve tendência de separação.

Através do gráfico de scores (Figura 28 a) com os componentes principais foi possível observar clara discriminação das amostras de folhas das plantas submetidas ao desenvolvimento em diferentes concentrações de alumínio no solo.

Para as folhas desenvolvidas no experimento de disponibilidade hídrica também foi possível evidenciar discriminação no perfil metabólico, formando o segundo grupo. Enquanto as amostras dos tratamentos de luminosidade e tipos de solo não puderam ser diferenciadas e apresentaram algumas amostras sobrepostas, formando o terceiro grupo.

O diagrama de scores das amostras de raízes (Figura 28 b) mostra comportamento semelhante ao das folhas, com a formação de três grupos.

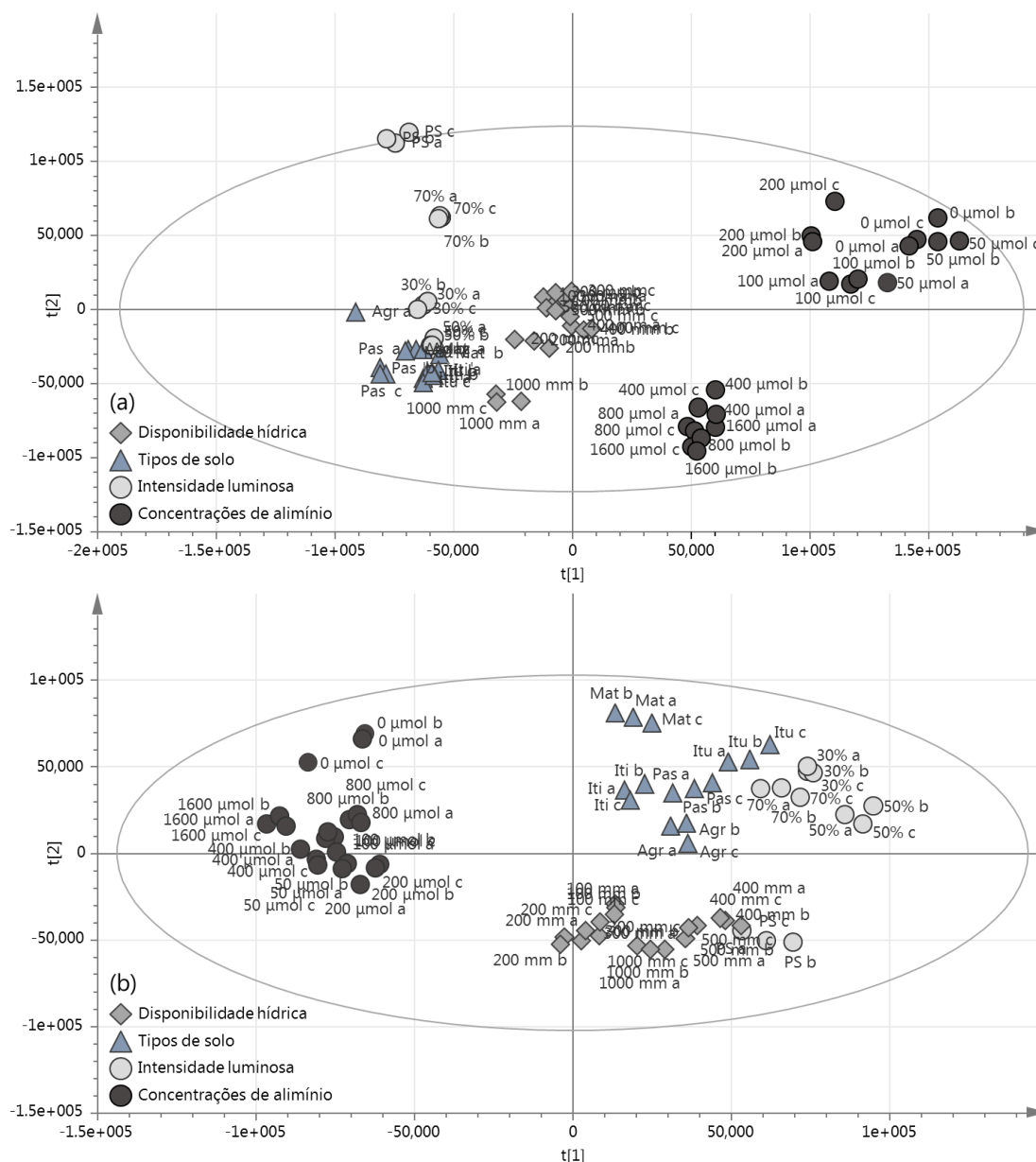


Figura 28. Análise multivariada por PCA referente aos dados de UHPLC-MS de amostras de folhas (a) e raízes (b) de *V. ferruginea* desenvolvidas em seis disponibilidades hídricas (100, 200, 300, 400, 500 e 1000 mm distribuídos ao mês) em cinco solos (Agr, Pas, Mat, Iti e Itu), quatro condições de luminosidade (PS, 30%, 50% e 70%) e em sete concentrações de alumínio no solo (0, 50, 100, 200, 400, 800 e 1600 μmol). O círculo representa a elipse de confiança um nível de 95%.

A Figura 28 b mostra o gráfico de scores para PC1 versus PC2 das raízes comparando os experimentos (disponibilidade hídrica, tipo de solo, intensidade luminosa e concentrações de alumínio) e apresenta a formação de três grupos principais com relação a sua proximidade. O modelo construído com os dados obtidos por UHPLC-MS apresenta uma separação bastante clara das amostras Al, e RC, formado grupo 1 e 2, além da formação de um terceiro grupo

composto por amostras de S e L, o qual demonstra uma leve tendência de separação entre eles. Analisando-se o componente principal 1 (PC1) observa-se a separação do grupo 1 no quadrante com valores negativos, enquanto as amostras referentes ao grupo 2 e 3 estão do lado positivo.

5.3.1. Disponibilidade hídrica

Para as amostras de folhas de *V. ferrugínea* submetida a seis disponibilidades hídricas, o gráfico de scores revelou a separação das amostras em dois grupos, confirmando um perfil diferente das folhas dos indivíduos submetido a maior disponibilidade hídrica (Figura 29 a).

As amostras do tratamento 1000 mm foram separadas das demais amostras formando um grupo isolado nos valores negativos na primeira componente principal. E as amostras 100 mm, 200 mm, 300 mm, 400 mm e 500 mm formam o outro grupo, evidenciado pela similaridade do perfil de metabólitos dos indivíduos desse grupo. Com isto, verificou-se que a planta apresentou modificação em seus compostos, principalmente quando submetida a alta disponibilidade hídrica.

Conforme mencionado na literatura, o estresse hídrico apresenta consequências significantes nas concentrações de metabólitos secundários em plantas, levando a um aumento na produção de vários tipos de metabólitos, como cianogênicos, glicosídeos e glucosinolatos, além de alguns terpenóides, antocianinas e alcalóides (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). No entanto, os dados apresentados sobre o potencial alelopático das plantas de *V. ferrugínea* exibem resultados conflitantes que parecem estabelecer uma correlação evidente, mas oposta em função da disponibilidade hídrica. Outros relatos salientam que nem sempre há mudanças no acúmulo de metabólitos decorrentes de variações hídricas (GOBBO-NETO; LOPES, 2007), o que também contraria o observado para esta planta, visto que tanto as amostras das folhas quanto as amostras das raízes (Figura 29) apresentaram discriminação e quando correlacionado com as informações do bioensaio de germinação verifica-se que essa separação ocorreu em função do aumento da disponibilidade hídrica e não do déficit.

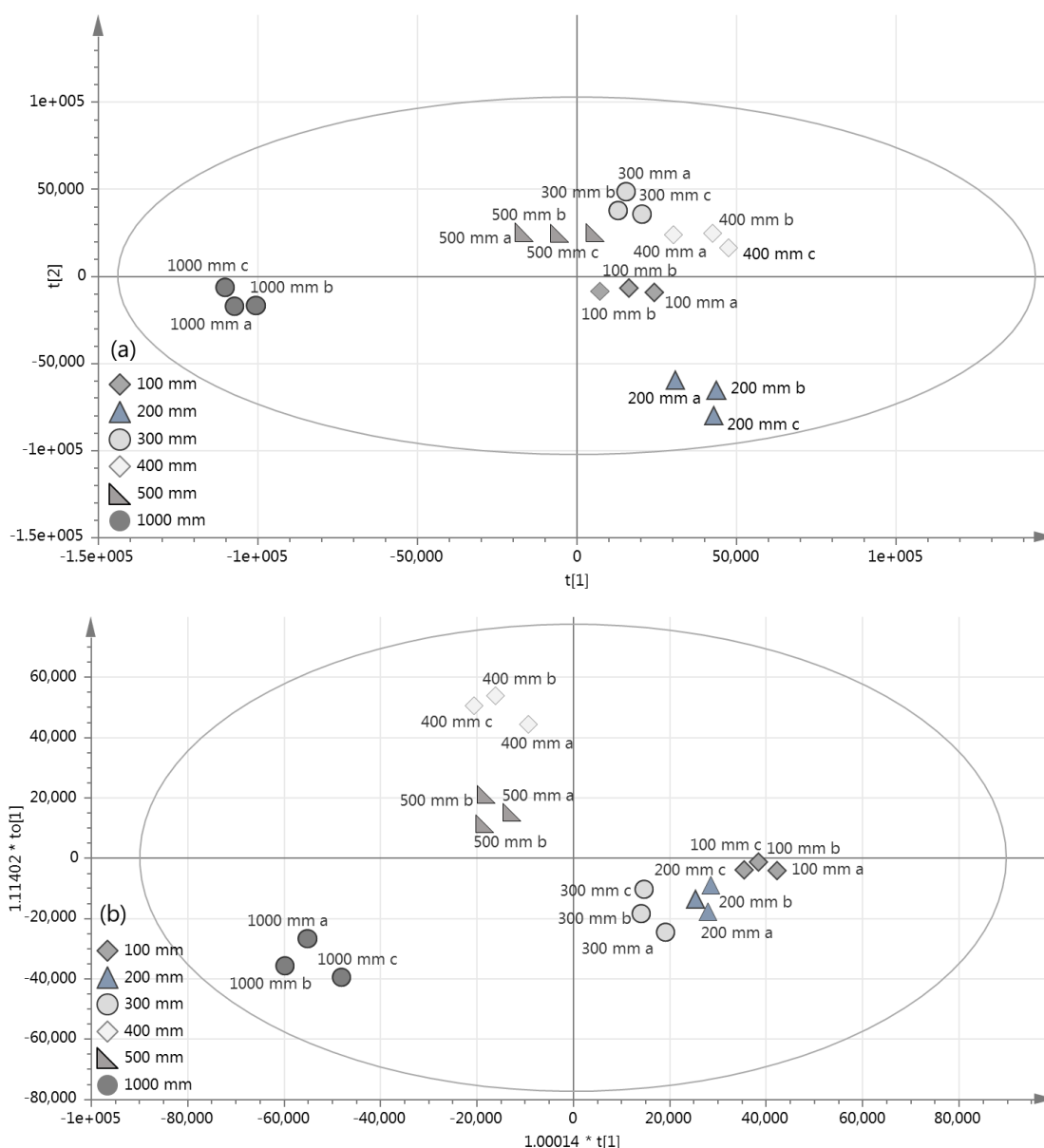


Figura 29. Análise multivariada por PCA, para as amostras de folhas (a) e OPLS-DA, para as amostras de raízes (b), referente aos dados de UHPLC-MS de amostras de folhas (A) e raízes (B) de *V. ferruginea* desenvolvidas em seis disponibilidade hídrica (100, 200, 300, 400, 500 e 1000 mm distribuídos ao mês). O círculo representa a elipse de confiança um nível de 95%.

A análise das amostras das raízes do experimento de disponibilidade hídrica por PCA mostraram discriminação muito baixa, em função disto, essa análise foi realizada utilizando o método OPLS-DA, buscando aumentar a significância de variações em sinais menos intensos, os quais muitas vezes correspondem a substância que proporcionara o aumento do potencial fitotóxico do tratamento. Desta forma, observou-se diferenças no gráfico obtido pelo método de OPLS-DA, além da melhora na discriminação entre os grupos quando

comparado a análise dessas amostras por PCA. A Figura 29 b apresenta o gráfico de scores das duas primeiras variáveis latentes (LV1 x LV2). Pela Figura 29 b é possível observar que existem três grupos bem definidos, estando o grupo contendo as amostras de 100, 200 e 300 mm associado valores positivos da LV1, enquanto o grupo formado por 400 e 500 mm e o grupo formado por 1000 mm associado valores negativos de LV1.

O perfil metabólico de uma mesma espécie pode ser alterado por diversos fatores ambientais como a distribuição sazonal da precipitação, situação comumente encontrada no ambiente da planta em estudo.

5.3.2. Tipos de solo

Para as amostras de folhas em diferentes tipos de solo, o modelo não supervisionado (PCA) não obteve sucesso, desta forma, utilizou-se OPLS-DA para avaliar se houve separação entre os tratamentos (Figura 30 a). Os métodos supervisionados como OPLS-DA procuram encontrar componentes que separem as observações levando em consideração as classes previamente conhecidas. O modelo de OPLS-DA, construídos com os dados obtidos por UHPLC-MS (Figura 30 a), apresentou uma separação bastante clara entre os grupos Agr e Mat, e a formação de um terceiro grupo composto pelos tratamentos Pas, Itu e Iti, o qual demonstra uma leve tendência de separação entre eles.

O modelo construído com os dados obtidos com as amostras de raízes mostra uma separação bem evidente e a formação de quatro grupos (Figura 30 b), cada um correspondendo as amostras de um dos tratamentos, com exceção de um grupo, que é formado por dois tratamentos, o Agr e o Itu, e que se encontram em valores positivos da primeira componente principal, enquanto os grupos que contém as amostras de Pas, Mat e Iti em valores negativos da primeira componente principal. Observa-se similaridade entre as repetições e distinção entre as condições de solo, reforçando que a planta sofre modificações com a mudanças nas condições de desenvolvimento. Nota-se também maior proximidade entre o grupo Pas e o grupo Iti, indicando maior similaridade entre os perfis metabólicos.

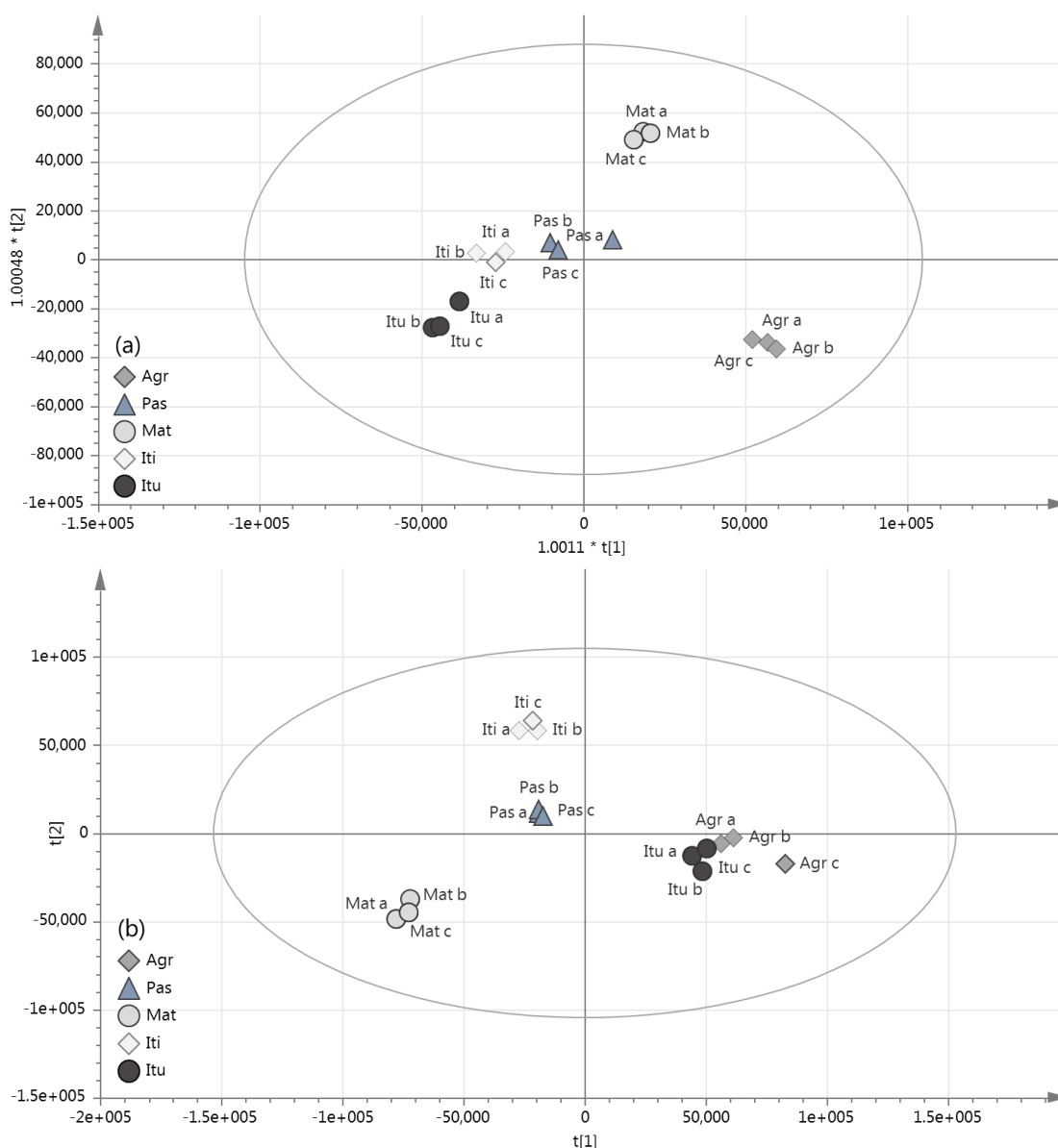


Figura 30. Análise multivariada por OPLS-DA, para as amostras de folhas (a), e PCA para as amostras de raízes (b), referente aos dados de UHPLC-MS de *V. ferruginea* desenvolvidas em cinco tipos de solos (Agr, Pas, Mat, Iti e Itu). O círculo representa a elipse de confiança um nível de 95%.

5.3.3. Intensidade luminosa

A detecção e resposta a um significativo desvio das condições ótimas de desenvolvimento de uma planta envolve mecanismos complexos e é o principal fator ambiental que afeta o crescimento e o desenvolvimento das plantas (GRAÑA et al., 2016), assim como a síntese de metabólitos secundários.

Em condições de crescimento adversas, o rendimento potencial de uma espécie pode ser reduzida até cerca de dois terços (BAJAJ et al., 1999). Nessas

situações, ocorrem correlações negativas entre as taxas de crescimento e de investimento em defesa, conhecidas como trade-offs (BAZZAZ, et al., 1987; IWASA, 2000). A alocação de parte dos recursos energéticos para o aumento dos níveis de defesa de uma planta influencia a produção e a disponibilidade de metabólitos secundários.

A análise do gráfico de score das amostras das folhas submetidas a quatro condições de luminosidade (Figura 31a), assim como, dos dados experimentais germinativos (item 5.2.3) evidencia que mudanças simples, como a alteração da intensidade luminosa, são capazes de interferir em vias de síntese de metabólitos potencializando, reduzindo, ou simplesmente alterando o efeito de substâncias fitotóxicas.

A partir das análises de projeção dos componentes principais (PCA) foi possível observar a variação entre os perfis químicos das amostras de folhas (Figura 31 a) e raízes (Figura 31 b) de *V. ferruginea* submetidas a quatro condições de luminosidades.

O diagrama de scores das amostras de folhas (Figura 31 a), evidencia a separação de três grupos, deixando no lado inferior esquerdo do diagrama apenas as amostras com 70% de sombreamento, no lado superior direito as amostras de pleno sol e no lado superior esquerdo o grupo das amostras com 30% e 50% de sombreamento.

A diferença entre as amostras de 30% e 50% de sombreamento são muito menores que as diferenças entre este grupo e as amostras de pleno sol e 70% de sombreamento. Esta separação era esperada visto que estes grupos apresentaram diferentes potências de inibição no bioensaio com planta teste.

A análise comparativa dos perfis de metabólitos mostrou que as amostras da mesma espécie submetidas a diferentes condições ambientais podem apresentar diferenças qualitativas e/ou quantitativas entre os aleloquímicos.

O diagrama de scores das amostras de raízes (Figura 31 b) mostra a formação de dois grupos, sendo que aos valores positivos na primeira componente principal estão relacionados os tratamentos com sombreamento, enquanto as amostras das plantas que se desenvolveram em pleno sol encontram-se, isoladas, em valores negativos da primeira componente principal. O primeiro grupo, formado por amostras submetidas a 30%, 50% e 70% de sombreamento apresenta uma leve tendência de separação.

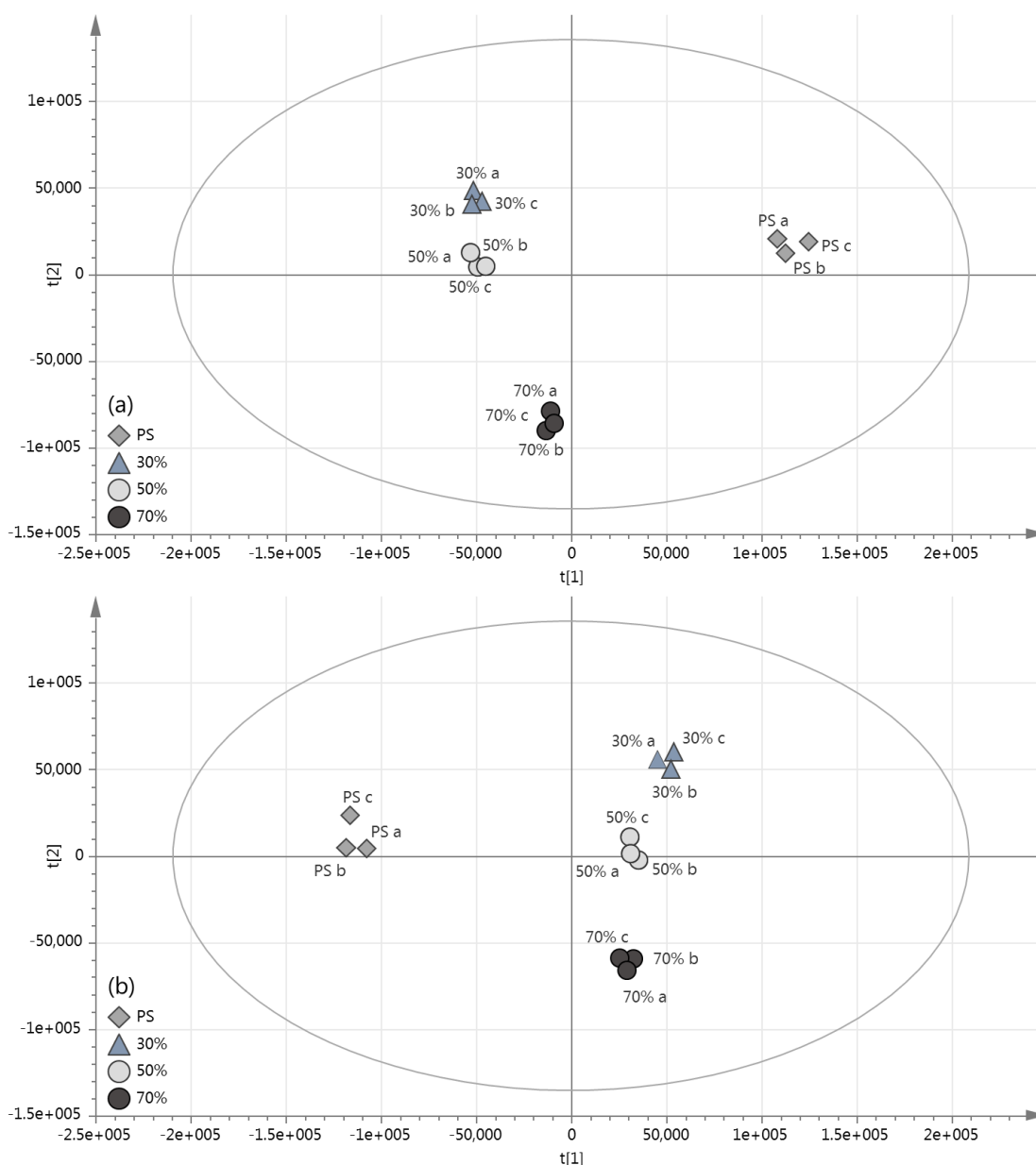


Figura 31. Análise multivariada por PCA referente aos dados de UHPLC-MS de amostras de folhas (a) e raízes (b) de *V. ferruginea* desenvolvidas quatro condições de luminosidade (PS, 30%, 50% e 70%). O círculo representa a elipse de confiança um nível de 95%.

Observando os gráficos de PCA das amostras das folhas e das raízes (Figura 31 a e b) percebe-se que não há sobreposição entre as amostras de diferentes tratamentos do grupo de plantas sombreadas. Nota-se também, a partir dos gráficos, que as repetições estão próximas em todas condições de luminosidade. Estes resultados corroboraram os obtidos precedentemente sobre a existência de uma correlação entre os metabólitos produzidos sobre diferentes condições de luminosidade e o potencial fitotóxico das amostras.

5.3.4. Concentrações de alumínio

A resolução da análise por PCA para a separação das amostras de folhas e raízes de *V. ferruginea* submetida ao desenvolvimento com diferentes concentrações de alumínio no solo foi bastante satisfatória, indicando ser um método de análise robusto quando se trata de diferenciar as amostras que apresentaram alterações no perfil metabólico em função de mudanças nas condições de desenvolvimento da planta.

O gráfico de score das duas primeiras componentes principais revelou o agrupamento das amostras de folhas em três grupos distintos (Figura 32 a). O primeiro grupo apresenta sobreposição entre as amostras 50 μmol e 100 μmol e uma forte tendência de separação para as amostras 0 μmol . O segundo grupo conta com as repetições apenas das amostras 200 μmol . E o terceiro grupo mostra uma forte sobreposição entre as amostras 800 μmol e 1600 μmol e uma leve tendência de separação da amostra 400 μmol . A análise do gráfico de score das folhas permitiu observar que as amostras 200 μmol estão bem separadas, formando um grupo isolado. Algumas das amostras dos tratamentos 50 μmol e 100 μmol estão sobrepostas, assim como as amostras de 800 μmol e 1600 μmol . Tais observações demonstram grande similaridade nos compostos das folhas dessa planta quando submetidas a essas concentrações de alumínio.

O gráfico de scores obtido com a PC1 e PC2 mostrou que as amostras de raízes das plantas de *Vernonia* desenvolvidas com as concentrações de alumínio de 50 μmol , 100 μmol e 400 μmol possuem perfis metabólicos bem similares, formando, juntamente com as amostras 200 μmol e 800 μmol , o primeiro grupo. As amostras das raízes desenvolvidas com a concentração de 0 μmol e as amostras com a maior concentração de 1600 μmol , separam-se entre si e das amostras do primeiro grupo, formando, desta forma, o segundo e terceiro grupo (Figura 32 b). A separação das amostras em três grupos corrobora os resultados encontrados no teste de germinação com as mesmas amostras, visto que os extratos proporcionam a formação de três níveis de inibição (baixa, intermediária e alta), sendo que o tratamento com maior concentração de alumínio apresentou maior inibição. Os níveis das condições de estresse modulam substancialmente os níveis de concentração e a composição química na síntese de aleloquímicos (MAQBOOL et al., 2013).

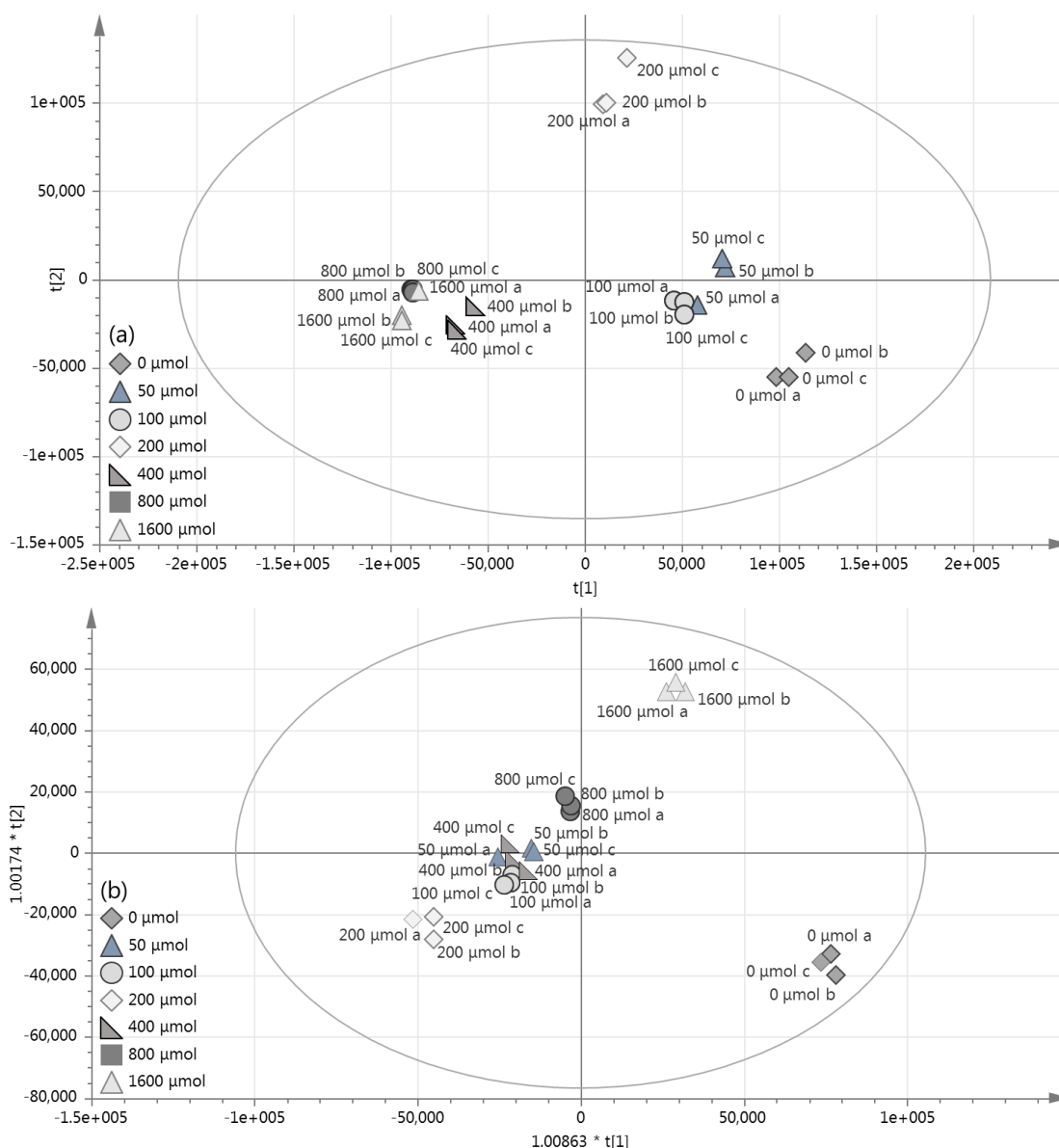


Figura 32. Análise multivariada por PCA referente aos dados de UHPLC-MS de amostras de folhas (a) e raízes (b) de *V. ferruginea* desenvolvidas em sete concentrações de alumínio no solo (0, 50, 100, 200, 400, 800 e 1600 μmol). O círculo representa a elipse de confiança um nível de 95%.

O uso de métodos estatísticos não supervisionados (PCA) e supervisionados (OPLS-DA) possibilitou a discriminação de diferentes grupos, a identificação de *outliers* e a determinação, com confiança estatística, de variáveis que influenciaram essa discriminação. A aplicação dos métodos PCA e OPLS-DA forneceram uma boa taxa de classificação, sensibilidade e especificidade. Com estes métodos foi possível constatar que existem diferenças metabolômicas entre as partes dos indivíduos (folhas e raízes), assim como entre as diferentes condições de desenvolvimento (intensidade lunisosa, tipo de

solo, disponibilidade hídrica e alumínio) com variação na intensidade de cada uma dessas condições.

A partir dos resultados do teste de atividade biológica, constatou-se que alguns tratamentos possuem elevada atividade fitotóxica, apresentando-se como uma boa alternativa para o uso como bioherbicida. Os dados de PCA e OPLS-DA mostraram que muitos dos tratamentos podem ser agrupados de acordo com o potencial da atividade inibitória, da mesma forma, que essas análises demonstrou a associação entre a composição química e a atividade fitotóxica das amostras.

Esses resultados apoiam a hipótese de que determinados metabólitos podem ser alterados com a mudança das condições de desenvolvimento da espécie e que algumas dessas mudanças podem afetar, potencializando ou reduzindo, a atividade fitotóxica das substâncias.

6. CONCLUSÃO

A espécie *V. ferruginea* mostrou atividade fitotóxica dentro dos parâmetros testados. O uso de solventes orgânicos permitiu a caracterização preliminar da composição da espécie, assim como o estudo de sua toxicidade. Os resultados revelaram a existência de compostos que inibem tanto a germinação como o crescimento de plantas teste. As classes de metabólitos secundários encontrados, como ácidos clorogênicos, flavonóides e lactonas sesquiterpênicas são responsáveis pelos efeitos inibitórios observado.

Os resultados dos ensaios biológicos, assim como a análise do perfil metabolômico de *V. ferruginea* submetida a diferentes estresses sugerem que tanto as suas folhas como as suas raízes podem ser responsáveis pela produção de aleloquímicos em possíveis interações alelopáticas no seu ambiente natural.

Os testes de germinação, assim como do perfil de metabólitos também permitiram constatar que pequenas mudanças nas condições de desenvolvimento da espécie afetam significativamente a produção de compostos tóxicos e podem modificar e/ou potencializar a atividade desses compostos.

Também foi possível concluir que a utilização de extratos com perfil químico semelhante pode proporcionar respostas alelopáticas diferentes devido a concentração dos extratos e em função da correlação entre as condições de desenvolvimento da planta doadora e a síntese de metabólitos secundários.

7. REFERÊNCIAS

- ABEYSIRI, G. R. P. I.; DHARMADASA, R. M.; ABEYSINGHEA, D. C.; SAMARASINGHE, K. Screening of phytochemical, physico-chemical and bioactivity of different parts of *Acmella oleraceae* Murr. (Asteraceae), a natural remedy for toothache. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 852-856, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.043>>.
- ALHO, C. J. R.; MAMEDE, S.; BITENCOURT, K.; BENITES, M. Introduced species in the Pantanal: implications for conservation. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 71, n. 1, p. 321-325, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1519-69842011000200011>>.
- ALI, J. S.; HAQ, I.; ALI, A.; AHMED, M.; ZIA, M. Onosma bracteatum Wall and Commiphora stocksiana Engl extracts generate oxidative stress in Brassica napus: An allelopathic perspective. **Cogent Biology**, v. 3, p. 1-10, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/23312025.2017.1283875>>.
- ALIPOUR, S.; FARSHADFAR, E.; BINESH, S. Allelopathic effects of Yarrow (*Achilla millefolium*) on the weeds of corn (*Zea mays* L.). **European Journal of Experimental Biology**, v. 2, n. 6, p. 2493-2498, 2012.
- ANDRADE, A. O.; SILVA, M. A. P.; OLIVEIRA, A. H.; SANTOS, M. A. F.; VANDESMET, L. C. S.; GENERINO, M. E. M.; COELHO, H. K. R. C.; LANDIM, H. S.; MENDONÇA, A. C. A. M.; COSTA, N. C. Allelopathic Effects of *Psychotria viridis* Ruiz & Pavon on the Germination and Initial Growth of *Lactuca sativa* L. **Journal of Agricultural Science**, v. 9, n. 1, p. 204-217, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5539/jas.v9n1p204>>.
- AUMONDE, T. Z.; MARTINAZZO, E. G.; BORELLA, J.; PEDÓ, T.; AMARANTE, L.; VILLELA, F. A.; MORAES, D. M. Alterações fisiológicas em sementes e metabolismo antioxidativo de plântulas de alface expostas à ação do extrato das folhas de *Zantedeschia aethiopica* Spreng. **Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal**, v. 37, n. 11, 2012.
- AUMONDE, T. Z.; MARTINAZZO, E. G.; PEDÓ, T.; BORELLA, J.; AMARANTE, L.; VILLELA, F. A.; MORAES, D. M. Respostas fisiológicas de sementes e plântulas de alface submetidas ao extrato de *Philodendron bipinnatifidum*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 6, s. 1, p. 3181-3192, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2013v34n6Supl1p3181>>.
- BAIS, H. P.; WEIR, T. L.; PERRY, L. G.; GILROY, S.; VIVANCO, J. M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, v. 57, p. 233-266, 2006. 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159>.
- BAJAJ, S.; TARGOLLI, J.; LIU, L. F.; HO, T. H. D.; WU, R. Transgenic approaches to increase dehydration- stress tolerance in plants. **Molecular Breeding**, v. 5, n. 6, p. 493-503, 1999. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1023/A:1009660413133>>.

BATISH, D. R.; SINGH, H. P.; KAUR, S.; KOHLI, R. K.; YADAV, S. S. Caffeic acid affects early growth, and morphogenetic response of hypocotyl cuttings of mung bean (*Phaseolus aureus*). **Journal of Plant Physiology**, v. 165, n. 3, p. 297-305, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2007.05.003>>.

BAZZAZ, F. A.; CHIARIELLO, N. R.; COLEY, P. D.; PITELKA, L. F. Allocating resources to reproduction and defense. *BioScience*, v. 37, n. 1, p. 58-67, 1987. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2307/1310178>>.

BICH, T. T. N.; KATO-NOGUCHI, H. Allelopathic potential of two aquatic plants, duckweed (*Lemna minor* L.) and water lettuce (*Pistia stratiotes* L.), on terrestrial plant species. **Aquatic Botany**, v. 103, p. 30-36, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquabot.2012.05.007>>.

BORELLA, J.; MARTINAZZO, E. G.; AUMONDE, T. Z.; AMARANTE, L.; MORAES, D. M.; VILLELA, F. A. Respostas na germinação e no crescimento inicial de rabanete sob ação de extrato aquoso de *Piper mikanianum* (Kunth) Steudel. **Acta Botanica Brasilica**, Belo Horizonte, v. 26, n. 2, p. 415-420, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062012000200017>>.

BORELLA, J.; PASTORINI, L. H. Efeito alelopático de frutos de umbu (*Phytolacca dioica* L.) sobre a germinação e crescimento inicial de alface e picão-preto. **Ciência agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 5, p. 1129-1135, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542010000500008>>.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399 p.

BRAVETTI, M. M. M.; VICO, R. V.; CARPINELLA, M. C.; FERRAYOLI, C. C.; PALACIOS, S. M. Phytotoxic phenylpropanoids isolated from *Ophryosporus charua* (Griseb.) Hieron. **Phytochemistry**, v. 6, p. 2-17, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.02.025>>.

BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 29-239, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000100040>>.

CALABRESE, E. J.; BLAIN, R. B. The hormesis database: the occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 61, n. 1, p. 73-81, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2011.06.003>>.

CANTO, M. W.; JOBIM, C. C.; GASPARINO, E.; HOESCHL, A. R. Características do pasto e acúmulo de forragem em capim-tanzânia submetido a alturas de manejo do pasto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 3, p. 429-435, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2008000300019>>.

CIPOLLINI, D.; RIGSBY, C. M.; BARTO, E. K. Microbes as target and mediators of allelopathy in plants. **Journal of Chemical Ecology**, Gainesville, v. 38, n. 6, p. 714-727, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10886-012-0133-7>>.

CIPOLLINI, K. A.; SCHRADIN, K. D. Guilty in the court of public opinion: testing presumptive impacts and allelopathic potential of *Ranunculus ficaria*. **The American Midland Naturalist**, v. 166, n. 1, p. 63-74, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1674/0003-0031-166.1.63>>.

CIPRIANI, F. A.; KAPLAN, M. A. C.; ISAIAS, R. M. S.; SOARES, G. L. G. Avaliação da fitotoxidez de *Tecoma stans* (L.) Kunth. **Floresta Ambient**, v. 21, n. 1, p. 1-7, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4322/floram.2014.003>>.

CLEMENTS, D. R.; DITOMMASO, A. Climate change and weed adaptation: can evolution of invasive plants lead to greater range expansion than forecasted? *Weed Research*, v. 51, n. 3, p. 227-240, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3180.2011.00850.x>>.

COLL, J. C.; BOWDEN, B. F. The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixtures. **Journal of Natural Products**, v. 49, n. 5, p. 934-936, 1986. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/np50047a033>>.

CRAWLEY, M.J. (Ed.). **Plant Ecology**. Oxford: Blackwell Scientific Publications., 1973. 496 p.

DEL FABBRO, C.; PRATI, D. The relative importance of immediate allelopathy and allelopathic legacy in invasive plant species. **Basic and Applied Ecology**, v. 16, n. 1, p. 28-35, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.baae.2014.10.007>>.

DEY, P.; CHANDRA, S.; CHATTERJEE, P.; BHATTACHARYA, S. Allelopathic potential of aerial parts from *Mikania scandens* (L.) Willd. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 8, n. 2, p. 203-207, 2012.

DOBRIYAL, P.; QURESHI, A.; BADOLA, R.; HUSSAIN, S.A. A review of the methods available for estimating soil moisture and its implications for water resource management. **Journal of Hydrology**, v. 458-459, p. 110-117, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhydrol.2012.06.021>>.

DURÁN, R. M.; PADILLA, R. B. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v. 44, n. 2, p. 101-106, 1993. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3989/gya.1993.v44.i2.1105>>.

EINHELLIG, F. A. Mode of allelochemical action of phenolic compounds. In: MACÍAS, F. A.; GALINDO, J. C. G. MOLINILLO, J. M. G.; CUTLER, H. G. (Ed.). **Allelopathy: Chemistry and mode of action of allelochemicals**. Boca Raton, FL, CRC Press LLC, 2004. cap 11, p. 217-233. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1201/9780203492789.ch11>>.

ELISANTE, F.; TARIMO, M. T.; NDAKIDEMI, P. A. Allelopathic effect of seed and leaf aqueous extracts of *Datura stramonium* on leaf chlorophyll content, shoot and root elongation of *Cenchrus ciliaris* and *Neonotonia wightii*. **American Journal of Plant Sciences**, v. 4, n. 12, p. 2332-2339, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2013.412289>>.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de métodos de análises de solo**. 2. ed. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Centro Nacional de Pesquisa de Solos, 1997. 212 p.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Renovação de pastagens pela rotação com culturas anuais**. Campo Grande: Embrapa - CNPGC, 1991. (Projeto de Pesquisa).

FAROOQ, M.; JABRAN, K.; CHEEMA, Z. A.; WAHID, A.; SIDDIQUE, K. H. The role of allelopathy in agricultural pest management. **Pest Management Science**, v. 67, n. 5, p. 493-506, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/ps.2091>>.

FERRARESE, M. L. L.; FERRARESE-FILHO, O. RODRIGUES, J. D. Ferulic acid uptake by soybean root in nutrient culture. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 22, n. 2, p. 121-124, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11738-000-0065-7>>.

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

FERREIRA, M. J.; FERREIRA, W. C.; BOTELHO, S. A. Avaliação da regeneração natural do entorno de uma nascente como estratégia para sua recuperação. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 1, p. 573-575, 2007.

FERREIRA, M. J.; PEREIRA, I. M.; BOTELHO, S. A.; MELLO, C. R. Avaliação da regeneração natural em nascentes perturbadas no município de Lavras, MG. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 19, n. 2, p. 109-129, 2009.

FISCHER, N. H.; WEIDENHAMER, J. D. AND BRADOW, J. M. Inhibition and Promotion of germination by several sesquiterpenes, **Journal of Chemical Ecology**, Gainesville, v. 15, n. 6, p. 1785-1791, 1989. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/BF01012266>>.

FRIEDMAN, J. Allelopathy, autotoxicity, and germination. In: KIGEL, J.; GALILI, G. **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 629-644.

GATTI, A. B.; TAKAO, L. K.; PEREIRA, V. C.; FERREIRA, A. G.; LIMA, M. I. S.; GUALTIERI, S. C. J. Seasonality effect on the allelopathy of cerrado species. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 74, n. 3, p. 64-69, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.21512>>.

GHERSHENZON, J. Changes in levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. In: TIMMERMAN, B. N.; STEELIN, C.; LOEWUS, F. A. (Ed.). **Recent advances in phytochemistry**: Phytochemical adaptations to stress. New York: Plenum Press, 1984. p. 273-220.

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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>>.

GOUVEA, D. R.; GOBBO-NETO, L.; SAKAMOTO, H. T.; LOPES, N. P.; LOPES, J. L. C. Seasonal variation of the major secondary metabolites present in the extract of *Eremanthus mattogrossensis* Less (Asteraceae: Vernoniaeae) leaves. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 11, p. 2139-2145, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422012001100007>>.

GRAÑA, E.; DÍAZ-TIELAS, C.; LÓPEZ-GONZÁLEZ, D.; MARTÍNEZ-PEÑALVER, A.; REIGOSA, M. J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A. M. The plant secondary metabolite citral alters water status and prevents seed formation in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Biology**, v. 18, n. 3, p. 423-432, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/plb.12418>>.

GRISI, P. U.; IMATOMI, M.; PEREIRA, V. C.; ANESE, S.; GUALTIERI, S. C. J. Influence of *Serjania lethalis* A. St.-Hil. (Sapindaceae) leaf and stem crude extracts on diaspores and seedlings of different cultivated species. **South African Journal of Botany**, v. 105, p. 97-105, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2015.12.008>>.

GULZAR, A.; SIDDIQUI, M. B. Allelopathic effect of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. on growth and antioxidant activity of *Brassica oleracea* var. botrytis. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jssas.2015.12.003>>.

GUSMAN, G. S.; YAMAGUSHI, M. Q.; VESTENA, S. Potencial alelopático de *Pilocarpus pennatifolius* Lemaire sobre a germinação de sementes e crescimento inicial de plântulas de espécies cultivadas. **Acta Ambiental Catarinense**, v. 12, n. 1/2, p. 1-11, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.24021/raac.v12i1/2.3223>>.

HABERMANN, E.; PONTES, F. C.; PEREIRA, V. C.; IMATOMI, M.; GUALTIERI, S. C. J. Phytotoxic potential of young leaves from *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg (Myrtaceae). **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 76, n. 2, p. 531-538, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.24114>>.

HALL, R. D. Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. **New Phytologist**, v. 169, n. 3, p. 453-468, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01632.x>>.

HARTWIG, I.; OLIVEIRA, A. C.; CARVALHO, F. I. F.; BERTAN, I.; SILVA, J. A. G.; SCHMIDT, D. A. M.; VALÉRIO, I. P.; MAIA, L. C.; FONSECA, D. A. R.; REIS, C. E. S. Mecanismos associados à tolerância ao alumínio em plantas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 219-228, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2007v28n2p219>>.

HATTORI, E. K. O.; NAKAJIMA, J. N. A família Asteraceae na Reserva Ecológica do Panga, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. **Hoehnea**, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 165-214, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S2236-89062011000200002>>.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman (SBQ). 2009. 1056 p.

HUOT, B.; YAO, J.; MONTGOMERY, B. L.; HE, S. Y. Growth–defense tradeoffs in plants: a balancing act to optimize fitness. **Molecular plant**, v. 7, n. 8, p. 1267-1287, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/mp/ssu049>>.

IDU, M. Studies on the allelopathic effect of aqueous extract of *Ageratum conyzoides* Asteraceae L. on seedling growth of *Sorghum bicolor* Linn. (Poaceae). **Academia Journal of Agricultural Research**, v. 2, n. 3, p. 74-79, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.15413/ajar.2013.0174>>.

IGANCI, J. R. V.; BOBROWSKI, V. L.; HEIDEN, G.; STEIN, V. C.; ROCHA, B. H. G. Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies de boldo sobre a germinação e índice mitótico de *Allium cepa* L. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 1, p. 79-82, 2006.

IGUAL, M. O.; MARTUCCI, M. E. P.; COSTA, F. B. C.; GOBBO-NETO, L. Sesquiterpene lactones, chlorogenic acids and flavonoids from leaves of *Vernonia polyanthes* Less (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, p. 51, p. 94-97, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2013.08.018>>.

IMATOMI, M.; NOVAES, P.; MATOS, A. P.; GUALTIERI, S. C. J.; MOLINILLO, J. M. G.; LACRET, R.; VARELA, R. M.; MACÍAS, F. A. Phytotoxic effect of bioactive compounds isolated from *Myrcia tomentosa* (Myrtaceae) leaves. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 46, p. 29-35, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2012.09.005>>.

INDERJIT. Soil microorganisms: an important determinant of allelopathic activity. **Plant and Soil**, v. 274, n. 1-2, p. 227-236, 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/1-4020-4099-7_12>.

INDERJIT; DEL MORAL, R. Is separating resource competition from allelopathy realistic? **Botanical Review**, v. 63, n. 3, p. 221-230, 1997. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/BF02857949>>.

IPCC. INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. **Climate Change 2013**: The physical science basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 2013. Disponível em <<http://www.ipcc.ch/report/ar5/wg1>>. Acesso em: 15 dez. 2016.

ISTA. The topographical tetrazolium test. In: ISTA - International Seed Testing Association. **International rules for seed testing**. Zürichstrasse 50, CH-8303 Bassersdorf, Switzerland, 2017. cap. 6, p. i-6-26(26). Disponível em <<http://doi.org/10.15258/istarules.2017.06>>.

IWASA, Y. Dynamic optimization of plant growth. **Evolutionary Ecology Research**, v. 2, n. 4, p. 437-455, 2000.

JANSEN, M. A. K.; HECTORS, K.; O'BRIEN, N. M.; GUISEZ, Y.; Potters, G. Plant stress and human health: Do human consumers benefit from UV-B acclimated crops?. **Plant Science**, v. 175, n. 4, p. 449-458, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.04.010>>.

JIMÉNEZ-CONTRERAS, E.; TORRES-SALINAS, D.; MORENO, R. B.; BAÑOS, R. R.; LÓPEZ-CÓZAR, E. D. Response Surface Methodology and its application in evaluating scientific activity. **Scientometrics**, v. 79, n. 1, p. 201-218, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11192-009-0413-3>>.

KAUR, R.; CALLAWAY, R. M.; INDERJIT. Soils and the conditional allelopathic effects of a tropical invader. **Soil Biology & Biochemistry**, Exeter, v. 78, p. 316-325, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.08.017>>.

KOBAYASHI, K. Factors affecting phytotoxic activity of allelochemicals in soil. **Weed Biology and Management**, v. 4, n. 1, p. 1-7, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1445-6664.2003.00112.x>>.

KREMER, T. C. B.; YAMASHITA, O. M.; FELITO, R. A.; FERREIRA, A. C. T.; ARAÚJO, C. F. Atividade alelopática de extrato aquoso de *Croton glandulosus* L. na germinação e no desenvolvimento inicial de alface. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 14, n. 1, p. 890-898, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5892/ruvrd.v14i1.2628>>.

KROYMANN, J. Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, n. 3, p. 246-251, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2011.03.021>>.

KUMAR, A.; CHAHAL, K. K.; KATARIA, D. Comparison of chemical composition of root and rhizosphere soil extracts of *Tagetes patula* L.: GC-MS analysis. **Asian Journal of Chemistry**, Ghaziabad, v. 29, n. 4, p. 797-800, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.14233/ajchem.2017.20307>>.

LAZAROTTO, C. L.; PAWLOWSKI, A.; SILVA, E. R.; SCHWAMBACH, J.; SOARES, G. L. G. Phytotoxic effects of *Heterothalamus psiadioides* (Asteraceae) essential oil on adventitious rooting. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 36, n. 12, p. 3163-3171, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11738-014-1682-x>>.

LESUFFLEUR, F.; PAYNEL, F.; BATAILLE, M. P.; LE DEUNFF, E.; CLIQUET, J. B. Root amino acid exudation: measurement of high efflux rates of glycine and serine from six different plant species. *Plant and Soil*, v. 294, n. 1, p. 235-246, 2007. 10.1007/s11104-007-9249-x>.

MACÍAS, F. A.; MOLINILLO, J. M. G.; TORRES, A.; VARELA, R. M.; CASTELLANO, D. Bioactive flavonoids from *Helianthus annuus* cultivars. **Phytochemistry**, v. 45, n. 4, p. 683-687, 1997. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00011-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00011-3)>.

MACKERNESS, S. A. H.; JOHN, C. F.; JORDAN, B.; THOMAS, B. Early signaling components in ultraviolet-B responses: Distinct roles for different

reactive oxygen species and nitric oxide. **FEBS Letters**, v. 489, n. 2-3, p. 237-242, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02103-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02103-2)>.

MAQBOOL, N.; WAHID, A.; FAROOQ, M.; CHEEMA, Z. A.; SIDDIQUE, K. H. M. Allelopathy and abiotic stress interaction in crop plants. In: CHEEMA, Z. A.; FAROOQ, M.; WAHID, A. (Org.). **Allelopathy** - Current trends and future applications. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013. cap.19, p. 451-468. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-30595-5_19>.

MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Métodos para análise de ácido clorogênico. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 586-592, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422004000400013>>.

MARTUCCI, M. E. P.; DE VOS, R. C. H.; CAROLLO, C. A.; GOBBO-NETO, L. Metabolomics as a potential chemotaxonomical tool: Application in the genus *Vernonia* Schreb. **Plos one**, v. 9, n. 4, e93149; 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0093149>>.

MELO, M. R. C. S.; PEREIRA, R. C. A. Revisao histórica da tribo Vernonieae Cass. (família Asteraceae) para o Brasil. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 11/12, p.172-192, 2014/2015.

MENDONÇA, K. D. R.; VIEIRA, B. S.; SOUSA, L. A. Controle em pós-emergência de *Conyza canadensis* e *Conyza bonariensis* com extratos de *Canavalia ensiformis*. **Revista Ciência Agrícola**, v. 14, n. 1, p. 51-58, 2016.

MIRANDA, C. A. S. F.; CARDOSO, M. G.; CARVALHO, M. L. M.; FIGUEIREDO, A. C. S.; NELSON, D. L.; OLIVEIRA, C. M.; GOMES, M. S.; ANDRADE, J.; SOUZA, J. A.; ALBUQUERQUE, L. R. M. Chemical composition and allelopathic activity of *Parthenium hysterophorus* and *Ambrosia polystachya* weeds essential oils. **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, n. 9, p. 1248-1257, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2014.59137>>.

MIRANDA, M. A. F. M.; VARELA, R. M.; TORRES, A.; MOLINILLO, J. M. G.; GUALTIERI, S. C. J.; MACÍAS, F. A. Phytotoxins from *Tithonia diversifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 5, p. 1083-1092, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00040>>.

MONQUERO, P. A. **Aspectos da biologia e manejo das plantas daninhas**. Ed. Rima, São Carlos, 2014. 430 p.

MORAES, P. V. D.; PANOZZO, L. E.; VIGNOLO, G. K.; SANTOS, L. S.; BRANDOLT, R. R. Efeito alelopático de trevo-vesiculoso no crescimento inicial de milho e plantas daninhas. **Revista Agrarian**, v. 5, n. 16, p. 99-105, 2012.

MORELAND, D. E.; NOVITZKY, W. P. Interference by flavone and flavonols with chloroplast-mediated electron transport and phosphorylation. **Phytochemistry**, v. 27, n. 11, p. 3359-3366, 1988. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)80732-5](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422(88)80732-5)>.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. **Principles of the plants and animal pest control**. volume 2, weed control. Washington: Printing and Publishing Office of the National Academy of Science. 1971. 471 p.

NEVES NETO, D. N.; SANTOS, A. C.; SANTOS, P. M.; MELO, J. C.; SANTOS, J. S. Análise espacial de atributos do solo e cobertura vegetal em diferentes condições de pastagem. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 9, p. 995-1004, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662013000900013>>.

OLIVEIRA, A. K.; COELHO, M. F. B.; TORRES, S. B.; DIÓGENES, E. P. Allelopathy by extracts of Caatinga species on melon seeds Alelopatia de extratos de espécies da caatinga sobre sementes de meloeiro. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 2, p. 557-566, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n2p557>>.

OLIVEIRA, E. M. S.; FREITAS, S. L.; MARTINS, F. S.; COUTO, R. O.; PINTO, M. V.; PAULA, J. R.; CONCEIÇÃO, E. C.; BARA, M. T. F. Isolation and quantitative HPLC-PDA analysis of lupeol in phytopharmaceutical intermediate products from *Vernonanthura ferruginea* (Less.) H. Rob. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 5, p. 1041-1045, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422012000500032>>.

OLIVEIRA, J. S.; PEIXOTO, C. P.; POELKING, V. G. C.; ALMEIDA, A. T. Avaliação de extratos das espécies *Helianthus annuus*, *Brachiaria brizanthae* *Sorghum bicolor* com potencial alelopático para uso como herbicida natural. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v.17, n. 3, p. 379-384, 2015a. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/13_040>.

OLIVEIRA, R. C.; VASCONCELOS FILHO, S. C.; BASTOS, A. V. S.; VASCONCELOS, J. M.; RODRIGUES, A. A. Anatomical and histochemical analysis of vegetative organs of *Vernonia ferruginea* Less. (Asteraceae). **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 38, p. 2734-2739, 2015b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5897/AJB2015.14934>>.

OTUSANYA, O. O.; ILORI, O. Phytochemical screening and the phytotoxic effects of aqueous extracts of *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray. **International Journal of Biology**, v. 4, n. 3, p. 97-101, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5539/ijb.v4n3p97>>.

PARVEZ, S.; PARVEZ, M.; FUJII, Y.; GEMMA, H. Differential allelopathic expression of bark and seed of *Tamarindus indica* L. **Plant Growth Regulation**, v. 42, n. 3, p. 245-252, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1023/B:GROW.0000026493.95805.a5>>.

PESSOA DA SILVA, M. A.; MEDEIROS FILHO, S.; DUARTE, A. E.; MOREIRA, F. J. C. Potencial alelopático de *Caryocar coriaceum* Wittm na germinação e crescimento inicial de plântulas de alface. **Caderno de Cultura e Ciência**, Crato, v. 13, n. 1, p. 16-24, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.14295/cad.cult.cienc.v13i1.819>>.

PRISCO, J. T.; GOMES FILHO, E. Fisiologia e bioquímica do estresse salino em plantas. In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. DA S.; LACERDA, C. F. (Ed.). **Manejo da salinidade na agricultura**: Estudos básicos e aplicados. Fortaleza: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Salinidade (INCTSal), 2010. cap.10, p.143-159.

QUEIROZ, S. C. N.; CANTRELL, C. L.; DUKE, S. O.; NANDULA, V.; MORAES, R. M.; CERDEIRA, A. L. Bioassay-directed isolation and identification of phytotoxic terpenoids from horseweed (*Conyza canadensis*). **Planta Medica**, v. 78, n. 1, p. 48, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1055/s-0032-1307556>>.

RAMPIM, L.; LANA, M. C. Mecanismo de tolerância interna das plantas ao alumínio. **Colloquium Agrariae**, v. 9, n. 2, p. 72-89, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5747/ca.2013.v09.n2.a092>>.

REIGOSA, M. J.; PEDROL, N.; GONZÁLES, L. **Allelopathy**: A physiological process with ecological implications. Springer: Dordrecht, 2006. 637 p. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/1-4020-4280-9>>.

REIGOSA, M.; GOMES, A. S.; FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. Allelopathic research in Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, Belo Horizonte, v. 27, n. 4, p. 629-646, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062013000400001>>.

RIBEIRO, M. C.; MOREIRA, R. F. A.; MARIA, C. A. B. Volatile profile of the headspace fraction of “assa-peixe” (*Vernonia* sp.) honeys. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 169-171, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612008000100024>>.

RIGON, C. A. G.; SALAMONI, A. T.; CUTTI, L.; AGUIAR, A. C. M. Germination and initial development of canola and radish submitted to castor leaves aqueous extracts. **Comunicata Scientiae**, Bom Jesus, v. 7, n. 1, p. 104-111, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.14295/CS.v7i1.423>>.

RIZVI, S. J. H.; RIZVI, V. (Ed.) **Allelopathy**: basic and applied aspects. London: Chapman & Hall, 1992. 480 p. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/978-94-011-2376-1>>.

RIZZI, E. S.; PEREIRA, K. C. L.; ABREU, C. A. A.; SILVA, B. C. F. L.; FERNANDES, R. M.; OLIVEIRA, A. K. M.; MATIAS, R. Allelopathic potential and phytochemistry of cambarazinho (*Vochysia haenkeana* (Spreng.) Mart.) leaves in the germination and development of lettuce and tomato. *Biosci. J.*, Uberlândia, v. 32, n. 1, p. 98-107, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.14393/BJ-v32n1a2016-29614>>.

ROBSON, A. D. **Soil acidity and plant growth**. Academic Press, Sydney. 1989. 306 p.

RODZIEWICZ, P.; SWARCEWICZ, B.; CHMIELEWSKA, K.; WOJAKOWSKA, A.; STOBIECKI, M. Influence of abiotic stresses on plant proteome and metabolome

changes. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 36, n. 1, p. 1-19, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11738-013-1402-y>>.

SALMAN, M.; SALAMEH, N.; ABU-ROMMAN, S. Germination and seedling growth of barley as affected by *Artemisia annua* water extract. **Plant Omics Journal**, v.10, n. 1, p. 1-6, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.21475/poj.10.01.17.241>>.

SANDERSON, K.; BARICCATTI, R. A.; PRIMIERI, C.; VIANA, O. H.; VIECELLI, C. A.; BLEIL JUNIOR, H. G. Allelopathic influence of the aqueous extract of jatropha on lettuce (*Lactuca sativa* var. Grand Rapids) germination and development. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v.11, n. 1, p. 641-643, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

SANTOS, M. A. F.; SILVA, M. A. P.; SANTOS, A. C. B.; ALENCAR, S. R.; TORQUATO, I. H. S.; ANDRADE, A. O.; COSTA, N. C.; GENERINO, M. E. M.; LANDIM, H. S.; OLIVEIRA, A. H. Allelopathy of *Miconia* spp. (Melastomataceae) in *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). **Journal of Agricultural Science**, v. 7, n. 12, p. 151-164, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5539/jas.v7n12p151>>.

SATHIYAMOORTHY, P. Identification of vanillic acid and p-coumaric acid as endogenous inhibitors of soybean seeds and their inhibitory effect on germination. **Journal of Plant Physiology**, v. 136, n. 1, p. 120-121, 1990. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81625-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81625-1)>.

SCOGNAMIGLIO, M.; D'ABROSCA, B.; ESPOSITO, A.; FIORENTINO, A. Metabolomics: an unexplored tool for allelopathy studies. **Journal of Allelochemical Interactions**, v. 1, n. 1, p. 9-23, 2015.

SHEHZAD, M.;HUSSAIN, S.; MUBEEN, K.; SHOAIB, M.; SARWAR, N.; JAVEED, H. M. R.; AHMAD, A.; KHALID, S. Allelopathic effect of santa maria (*Parthenium hysterophrous*) mulch on growth and yield of soybean (*Glycine max*). **Planta daninha**, Viçosa, v. 34, n. 4, p. 631-638, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s0100-83582016340400002>>.

SHULAEV, V.; CORTES, D.; MILLER, G.; MITTLER, R. Metabolomics for plant stress response. **Physiologia Plantarum**, v. 132, n. 2, p. 199-208, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.01025.x>>.

SILVA, E. R.; OVERBECK, G. E.; SOARES, G. L. G. Phytotoxicity of volatiles from fresh and dry leaves of two Asteraceae shrubs: Evaluation of seasonal effects. **South African Journal of Botany**, v. 93, p. 14-18, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2014.03.006>>.

SILVA, T. A.; DELIAS, D.; PEDÓ, T.; ABREU, E. S.; VILLELA, F. A.; AUMONDE, T. Z. Fitotoxicidade do extrato de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist no desempenho fisiológico de sementes e plântulas de alface. **Iheringia, Série Botânica**, Porto Alegre, v. 71, n. 3, p. 213-221, 2016.

SOUZA FILHO, A. P. S.; ALVES, S. M.; DUTRA, S. Estádio de desenvolvimento e estresse hídrico e as potencialidades alelopáticas do capim-marandu. **Planta**

daninha, Viçosa, v. 20, n. 1, p. 25-31, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582002000100004>>.

SOUZA FILHO, A. P. S.; DUARTE, M. L. R. Atividade alelopática do filtrado de cultura produzido por *Fusarium solani*. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 25, n. 1, p. 227-230, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582007000100026>>.

SOUZA FILHO, A. P. S.; RODRIGUES, L. R. A.; RODRIGUES, T. J. D. Efeitos de extratos aquosos de assa-peixe sobre a germinação de três espécies de braquiária. **Planta daninha**, Viçosa, v. 14, n. 2, p. 93-101, 1996. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83581996000200002>>.

SOUZA, L. S.; VELINI, E. D.; MARTINS, D.; ROSOLEM, C. A. Efeito alelopático de capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) sobre o crescimento inicial de sete espécies de plantas cultivadas. **Planta daninha**, Viçosa, v. 24, n. 4, p. 657-668, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582006000400006>>.

SOUZA, M. C.; HABERMANN, G. Towards a New Ecophysiological Approach to Understand Citrus Crop Yield Under Abiotic Stresses Mirroring in the Brazilian Savanna Genetic Resources. In: RAHMAN, I. M. M.; HASEGAWA, H. (Org.). **Water Stress**. (1 Ed.) Rijeka: InTech, 2012. cap. 7, p. 152-164. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5772/31271>>.

STICHER, O. Natural product isolation. **Natural Product Reports**, v. 25, n. 3, p. 517-554, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/b700306b>>.

TABAN, A.; SAHARKHIZ, M.J. Natural phytotoxic activity of water extracts and dried leaf powders of three *Satureja* species. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 594-602, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2015.09.003>>.

TEERARAK, M.; CHAROENYING, P.; LAOSINWATTANA, C. Physiological and cellular mechanisms of natural herbicide resource from *Aglaia odorata* Lour. on bioassay plants. **Acta physiologiae plantarum**, v. 34, n. 4, p. 1277-1285, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11738-011-0923-5>>.

TEIXEIRA DA SILVA, J.A.; KARIMI, J.; MOHSENZADEH, S.; DOBRÁNSZKI, J. Allelopathic potential of select gymnospermous trees. **Journal of Forest and Environmental Science**, v. 31, n. 2, p. 109-118, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.7747/JFES.2015.31.2.109>>.

TIKUNOV, Y.; LOMMEN, A.; DE VOS, C. H.; VERHOEVEN, H. A.; BINO, R. J.; HALL, R. D.; BOVY, A. G. A novel approach for nontargeted data analysis for metabolomics. Large-scale profiling of tomato fruit volatiles. **Plant Physiology**, v. 139, n. 3, p. 1125-37, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1104/pp.105.068130>>.

TRIGO, M. F. O. O.; NEDEL, J. L.; TRIGO, L. F. N. Condicionamento osmótico em sementes de cebola: I. Efeitos sobre a germinação. **Scientia Agricola**, v. 56, n. 4, p. 1059-1067, 1999. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90161999000500007>>.

TUNAITIENĖ, V.; PATAMSYTĖ, J.; NAUGŽEMYS, D.; KLEIZAITĖ V.; ČESNIENĖ, T.; RANČELIS, V.; ŽVINGILA, D. Genetic and allelopathic differences between populations of daisy fleabane *Erigeron annuus* (L.) Pers. (Asteraceae) from disturbed and stable habitats. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 70, p. 294-303, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2016.12.015>>.

TYAGI, S.; RAGHVENDRA; SINGH, U.; KALRA, T.; MUNJAL, K. Applications of metabolomics - A systematic study of the unique chemical fingerprints: an overview. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 3, n. 1, p. 83-86, 2010.

URSINI, F.; TUBARO, F.; RONG, J.; SEVANI, A. Optimization of nutrition: polyphenols and vascular protection. **Nutrition Review**, v. 57, n. 2, p. 241-249, 1999. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1753-4887.1999.tb06951.x>>.

VILLAS-BÔAS, S. G.; MAS, S.; AKESSON, M.; SMEDSGAARD, J.; NIELSEN, J. Mass spectrometry in metabolome analysis. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 24, n. 5, p. 613-46, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/mas.20032>>.

WANDSCHEER, A. C. D.; BORELLA, J.; BONATTI, L. C.; PASTORINI, L. H. Atividade alelopática de folhas e pseudofrutos de *Hovenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae) sobre a germinação de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). **Acta Botanica Brasilica**, Belo Horizonte, v. 25, n. 1, p. 25-30, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062011000100005>>.

WEIR, T. L.; PARK, S. W.; VIVANCO, J. M. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, n. 4, p. 472-479, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2004.05.007>>.

WESTON L. A.; DUKE, S. O. Weed and crop allelopathy. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 22, n. 3&4, p. 367-389, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/713610861>>.

YAMASHITA, O. M.; ALBERGUINI, A. L. Germinação de *Vernonia ferruginea* em função da quebra de dormência, luminosidade e temperatura. **Comunicata Scientiae**, Bom Jesus, v. 2, n. 3, p. 142-148, 2011.

YANG, D. H.; WEBSTER, J.; ADAM, Z.; LINDAHL, M.; ANDERSSON, B. Induction of acclimative proteolysis of the light-harvesting chlorophyll a/b Protein of photosystem II in response to elevated light intensities. **Plant Physiology**, v. 118, n. 3, p. 827-834, 1998.

YOSHIMURA, H.; SAWAI, Y.; TAMOTSU, S.; SAKAI, A. 1, 8-cineole inhibits both proliferation and elongation of BY-2 cultured tobacco cells. **Journal of Chemical Ecology**, Gainesville, v. 37, n. 3, p. 320-328, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10886-011-9919-2>>.

ZANON, R. B.; PEREIRA, D. F.; BOSCHETTI, T. F.; SANTOS, M.; ATHAYDE, M. L. Fitoconstituintes isolados da fração em diclorometano das folhas de *Vernonia tweediana* Baker. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.

18, n. 2, p. 226-229, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2008000200015>>.