

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

POTENCIAL ALELOPÁTICO DE *Cosmos*
***sulphureus* CAV.**

Bruna Pires da Silva
Engenheira Agrônoma

2017

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

**POTENCIAL ALELOPÁTICO DE *Cosmos
sulphureus* CAV.**

Bruna Pires da Silva

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

Coorientadoras: Prof. Dra. Rosa María Varela Montoya

Dra. Mariluce Pascoina Nepomuceno

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

2017

S586a Silva, Bruna Pires da
Potencial alelopático de *Cosmos sulphureus* Cav. /Bruna Pires da Silva. -- Jaboticabal, 2017
iii, 138 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017

Orientador: Pedro Luís da Costa Aguiar Alves

Coorientadoras: Rosa María Varela Montoya, Mariluce Pascoina Nepomuceno

Banca examinadora: Alberto José Cavalheiro, Davi Rodrigo Rossato, Leonardo Bianco de Carvalho, Sonia Cristina Juliano Gualtieri

Bibliografia

1. *Bidens sulphurea*. 2. Alelopatia. 3. Costunolido. 4. Reinosina. 5. Santamarina. 6. Herbicidas naturais. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.51:581.524.13

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: POTENCIAL ALELOPÁTICO DE *Cosmos sulphureus* CAV.

AUTORA: BRUNA PIRES DA SILVA

ORIENTADOR: PEDRO LUÍS DA COSTA AGUIAR ALVES

COORIENTADORA: ROSA MARIA VARELA MONTOYA

COORIENTADORA: MARILUCE PASCOINA NEPOMUCENO

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



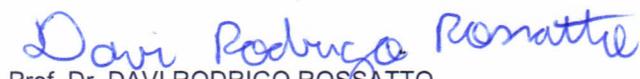
Prof. Dr. ALBERTO JOSÉ CAVALHEIRO
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química do Câmpus de Araraquara da UNESP



Prof. Dr. LEONARDO BIANCO DE CARVALHO
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. SÔNIA CRISTINA JULIANO GUALTIERI
Departamento de Botânica / UFSCar - São Carlos/SP



Prof. Dr. DAVI RODRIGO ROSSATTO
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 17 de abril de 2017.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

BRUNA PIRES DA SILVA – nascida em 05 de março de 1987, na cidade de Jaborandi, estado de São Paulo, filha de Marilza Brunozi Pires da Silva e João Paulo Pires da Silva. Graduiu-se em Engenharia Agrônômica pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Câmpus de Jaboticabal (UNESP/FCAV), no ano de 2010. No mesmo ano, ingressou no curso de Mestrado em Produção Vegetal, obtendo o título de Mestre em Agronomia (Produção Vegetal) no ano de 2012. Em 2013, iniciou o curso de Doutorado em Produção Vegetal, também da UNESP/FCAV. Em 2015, esteve em estágio de Doutorado Sanduíche na “Universidad de Cádiz”, Espanha, onde trabalhou junto ao Grupo de Alelopatia de Cádiz (GAC) na bioprospecção de novos compostos com potencial herbicida. Desde 2007, vem desenvolvendo pesquisas na área de Matologia, principalmente em biologia e manejo de plantas daninhas, interferência de plantas daninhas e alelopatia, junto ao Laboratório de Plantas Daninhas – LAPDA, participando de eventos científicos nacionais e internacionais da sua área de pesquisa, com publicação de artigos em revistas científicas nacionais e internacionais.

*“Não é sobre ter todas as pessoas do mundo pra si
É sobre saber que em algum lugar alguém zela por ti
É sobre cantar e poder escutar mais do que a própria voz
É sobre dançar na chuva de vida que cai sobre nós*

*É saber se sentir infinito num universo tão vasto e bonito
É saber sonhar e, então, fazer valer a pena cada verso daquele poema sobre
acreditar*

*Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu
É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu
É sobre ser abrigo e também ter morada em outros corações
E assim ter amigos contigo em todas as situações*

*A gente não pode ter tudo
Qual seria a graça do mundo se fosse assim?
Por isso, eu prefiro sorrisos
E os presentes que a vida trouxe pra perto de mim*

*Não é sobre tudo que o teu dinheiro é capaz de comprar
E sim sobre cada momento
Sorriso a se compartilhar
Também não é sobre correr contra o tempo pra ter sempre mais
Porque quando menos se espera
A vida já ficou pra trás*

*Segura teu filho no colo
Sorria e abrace teus pais
Enquanto estão aqui
Que a vida é trem-bala, parceiro
E a gente é só passageiro prestes a partir...”*

(“Trem Bala” – Ana Vilela)

À minha família - minha base, minha fortaleza,

minha fonte de amor,

Ao meu noivo Bruno Ducatti, pelo imenso amor,

apoio, carinho e parceria,

DEDICO

A todos que, de alguma forma,

contribuíram para a conclusão desta

etapa da minha vida, em especial à minha

mãe de coração – Mariluce Pascoina

Nepomuceno

OFEREÇO

AGRADEÇO,

A Deus por ter me proporcionado vida e saúde para que eu pudesse concretizar mais este sonho, e por ter me guiado em todos os momentos da minha vida. *O Senhor é meu pastor, nada me faltará (Salmo 22).*

Ao meu orientador e “pai”, Prof. Dr. Pedro Luís da Costa Aguiar Alves, pela dedicação, amizade, paciência, disponibilidade e principalmente pelos conselhos. *Prof. Pedro, muito obrigada por confiar em mim! Sem o seu apoio, nada disso seria possível. O senhor me deu a possibilidade de concretizar sonhos, e a minha gratidão por tudo é eterna!*

À minha coorientadora, amiga, mãe do coração e parceira, Mariluce Pascoina Nepomuceno, por todo ensinamento, generosidade, dedicação e disposição em me ajudar em todos os momentos. *Marilu, este trabalho é nosso! Obrigada por sempre estar ao meu lado com seu amor e sabedoria. Você é uma pessoa iluminada!*

À minha coorientadora Prof^a Dr^a Rosa María Varela Montoya, por me aceitar como sua aluna e me receber com tanto carinho no Departamento de Química Orgânica (Universidad de Cádiz – Espanha). *Muito obrigada pelos ensinamentos, orientação e risadas. Você me ensinou a amar o “mundo dos Químicos”. “Gracias, mi Rosita!”*

À Universidade Estadual Paulista – “Júlio de Mesquita Filho” – câmpus Jaboticabal e ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, pela oportunidade de cumprir mais esta etapa da minha vida. *Agradeço a todos os professores, tanto da Graduação quanto da Pós-graduação, por terem contribuído, de forma tão valiosa, para a minha formação acadêmica.*

Ao Prof. Dr. Silvano Bianco (banca de qualificação), ao Prof. Dagoberto Martins (banca de qualificação), à Prof^a Dr^a Sonia Cristina Juliano Gualtieri (banca de qualificação e defesa), ao Prof. Dr. Leonardo Bianco de Carvalho (banca de defesa), ao Prof. Dr. Davi Rodrigo Rossato (banca de defesa) e ao Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro (banca de defesa). *A todos, muito obrigada pelas correções e contribuições para a conclusão deste trabalho.*

Aos queridos professores do Grupo de Alelopatia de Cádiz, Prof. Dr. Francisco Antonio Macías, Prof. Dr. José M.G. Molinillo (Chema) e Prof^a Dr^a Ascencion Torres Martinez (Chon), por terem me ensinado tanto, e por me receberam tão bem. Agradeço também aos professores José Iguartuburu, Ana Simonet e à técnica Mayte, pelo imenso carinho. *“Muchas gracias por todo!”*

A todos os meus amigos de pós-graduação do LAPDA – Laboratório de Plantas Daninhas, que fazem parte da “família” que eu pude escolher. Allan, Ana, Andreísa, Anne, Arthur, Cárita, Fernanda, Isa Marcela, Izabela, Juciléia, Livia, Mono, Nelson, Neriane, Paulo, Pedro (Foca), Thiago, Willians e tantos outros: *Obrigada pelo apoio, incentivo, colaboração, amizade e pelos ótimos momentos de convivência e risadas, que jamais serão esquecidos. Eu os levarei para sempre em meu coração. Serei LAPDA para sempre, com muito orgulho!*

A todos os funcionários do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, em especial ao amigo José Valcir Fidelis Martins, que sempre esteve disposto a me ajudar em todos os momentos, fazendo do trabalho uma grande diversão. *Obrigada por tudo, Martins!*

A todos os alunos de graduação e estagiários do LAPDA, em especial à Amanda Rodrigues Gonzalez e Leandro Aparecido Chiconi, bolsistas de iniciação científica (CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Processo 447281/2014-3), pelo auxílio e colaboração que foram fundamentais para a conclusão deste trabalho. *Obrigada por me ajudarem tanto!*

Aos meus amigos e companheiros espanhóis, que fizeram do meu Doutorado Sanduíche na Espanha uma experiência linda e muito feliz: Álvaro, Antônio, Carlos, David, Elena, Inma, Ivonne (Colômbia), Javi, Javi (Colômbia), Javi (Orellana), Jesus, Juanma, Mayte, Nuria, e muitos outros. *“Muchas gracias, chicos!”*

A minha amiga inseparável Sandra García Durán, por me receber com tanto amor, e estar sempre presente na minha vida. *“Gracias, mi hermanita!” Você fez a minha vida na Espanha tão doce e tão leve...*

Aos meus “pais espanhóis”, José Maria Moreno e Rosa Abellán, que me acolheram como filha e sempre me trataram com tanto amor e carinho.

Obrigada pelos momentos tão especiais e felizes! Gratidão eterna! “Muchas gracias, mis papás de España”!

Aos meus amigos brasileiros que tive a honra de conhecer na Espanha: Gesiane Lima, Gabriel Franco, Rondinelle Xavier e Ludmila Aniceto. *Obrigada pelos momentos inesquecíveis que vivemos juntos!*

A toda minha família, em especial à minha mãe Marilza Brunozi, às minhas irmãs Cristiani Pires e Andréia Pires, meu cunhado Benedito Paro Filho e às minhas sobrinhas Letícia Simões, Eduarda Paro e Júlia Simões, por serem o meu porto seguro. *Família, eu amo vocês!*

Ao meu noivo, Bruno, pelo apoio incondicional em todos os momentos, pela paciência, pelo amor, pelo carinho, pela segurança e incentivo, enfim, por ser meu grande parceiro durante todos esses anos. *Obrigada, meu amor!*

À minha sogra Maria Eugênia Gagliardi Ducatti por sempre me incentivar e estar ao meu lado. *Obrigada, sogra querida!*

A todos os meus amigos mais que especiais, que mesmo distantes sempre me apoiaram e vibraram com as minhas conquistas. *Amigos do meu coração, muito obrigada!*

A todos os colegas da Bayer S/A, pelo apoio e confiança. *Muito obrigada!*

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Processo 2013-27140-7) e à CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Processo nº BEX 2425/15-7) pela concessão do auxílio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho (bolsa de doutorado e doutorado sanduíche), possibilitando que todos os objetivos propostos fossem cumpridos da melhor forma possível.

A todos aqueles aqui não nomeados, que colaboraram de forma direta ou indireta para a conclusão deste trabalho.

Muito obrigada de todo o meu coração!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Alelopatia: Histórico e Conceitos.....	3
2.2. Natureza dos Aleloquímicos.....	5
2.3. Mecanismos de Liberação dos Aleloquímicos no Ambiente	7
2.4. Aleloquímicos como “Herbicidas Naturais”.....	8
2.5. Isolamento e Purificação dos Aleloquímicos	11
2.6. <i>Cosmos sulphureus</i> Cav. – a espécie escolhida.....	12
3. OBJETIVOS.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1. Caracterização do potencial alelopático de <i>C. sulphureus</i> pelo método de liberação por decomposição	16
4.2. Caracterização do potencial alelopático de <i>C. sulphureus</i> por exsudação radicular (planta “in vivo”)	17
4.2.1. Utilização do Método Hidropônico	17
4.2.2. Utilização do Método de Garrafas Invertidas	19
4.3. Extração, fracionamento e identificação dos extratos ativos de <i>C. sulphureus</i> , monitorados por testes de atividade biológica.....	21
4.3.1. Folhas de <i>C. sulphureus</i>	22
4.3.2. Raízes de <i>C. sulphureus</i>	29
4.3.3. Bioensaios	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1. Caracterização do potencial alelopático de <i>C. sulphureus</i> pelo método de liberação por decomposição	36
5.2. Caracterização do potencial alelopático de <i>C. sulphureus</i> por exsudação radicular (planta “in vivo”)	46
5.2.1. Utilização do método hidropônico para a coleta dos exsudatos	46
5.2.2. Utilização do método de garrafas em posição invertida (efeito direto).	56
5.3. Fracionamento e identificação dos extratos ativos de <i>C. sulphureus</i> , monitorados por testes de atividade biológica	61
5.3.1. Resultados obtidos para as folhas	61
5.3.2. Resultados obtidos para as raízes.....	85
6. CONCLUSÕES.....	92
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
8. ANEXOS.....	114

POTENCIAL ALELOPÁTICO DE *Cosmos sulphureus* CAV.

RESUMO – *Cosmos sulphureus* Cav. é uma espécie que foi introduzida no Brasil como ornamental e hoje se comporta como uma planta daninha, apresentando elevado poder invasivo no ambiente, devido ao seu potencial alelopático, suprimindo inclusive o crescimento de outras plantas daninhas. Essa característica da planta a torna uma potencial candidata para obtenção de herbicidas naturais, os aleloquímicos, que uma vez isolados e caracterizados poderão ser utilizados diretamente como tal ou então para a semi-síntese de novos compostos. Em vista disso, objetivou-se avaliar e caracterizar o potencial alelopático de *C. sulphureus* e, também, extrair, fracionar e isolar os aleloquímicos promotores do efeito alelopático. Caracterizou-se o potencial alelopático de *C. sulphureus* pelo método de liberação por decomposição e por exsudação radicular (planta “in vivo”). A decomposição de plantas de *C. sulphureus* resultou em efeito alelopático inibitório sobre *Lactuca sativa*, *Amaranthus viridis* e *Panicum maximum*, principalmente na incorporação da maior quantidade de material vegetal. Exsudatos radiculares de *C. sulphureus* resultaram em efeito alelopático inibitório sobre *A. viridis* e *P. maximum*. Dentre os dois modos de liberação de aleloquímicos por *C. sulphureus* estudados, a exsudação radicular foi o mais ativo (planta “in vivo”). Também foi realizada a extração de folhas de *C. sulphureus* com água e solventes orgânicos e verificou-se a cito/fitotoxicidade dos extratos. Os extratos mais ativos foram fracionados utilizando-se de técnicas de cromatografia e as frações obtidas foram testadas por meio de bioensaios (isolamento biodirigido). As frações bioativas foram analisadas para identificação das substâncias presentes por meio de HPLC-UV-MS e ressonância magnética nuclear. O extrato diclorometânico de folhas e o acetônico de raízes proporcionaram inibição significativa no alongamento de coleótilos de trigo, e o primeiro apresentou-se mais fitotóxico às espécies receptoras (*Allium cepa*, *L. sativa*, *Lepidium sativum*, *Lycopersicum esculentum*, *A. viridis*, *Echinochloa crus-galli*, *Panicum maximum* e *Urochloa decumbens*). Foram isolados quinze compostos das folhas e cinco de raízes. Todos os compostos isolados das raízes, com exceção ao estigmasterol são fenilpropanóides, e foram isolados pela primeira vez na espécie *C. sulphureus*. Os compostos álcool 1',2'-epoxi-3',4-di-O-isobutiril-Z-coniferil e álcool 1',2'-dihidroxi-3',4-di-O-isobutirilconiferil, isolados das raízes, descrevem-se pela primeira vez na literatura. Os compostos majoritários isolados das folhas são lactonas sesquiterpênicas: costunolido, reinosina e santamarina. Os três compostos se descrevem pela primeira vez na planta *C. sulphureus*, com exceção do costunolido que já foi isolado anteriormente nesta planta. Santamarina e costunolido foram os mais ativos, seguidos por reinosina. *Amaranthus viridis* e *P. maximum* foram as espécies mais sensíveis à ação das lactonas. As lactonas sesquiterpênicas isoladas das folhas são uma fonte potencial para modelos de novos tipos estruturais de herbicidas.

Palavras-chave: *Bidens sulphurea*, alelopatia, costunolido, reinosina, santamarina, herbicidas naturais.

ALLELOPATHIC POTENTIAL OF *Cosmos sulphureus* CAV.

ABSTRACT – *Cosmos sulphureus* Cav. was introduced in Brazil as an ornamental plant and has become a problematic weed. This plant grows rapidly and it's a dominant species, probably due to its allelopathic activity, suppressing the growth of other weeds. This characteristic makes *C. sulphureus* a potential source of natural herbicides (allelochemicals). When isolated and characterized they can be directly used as such or used to synthesize new related compounds. The aim of this study was to evaluate and characterize the allelopathic potential of *C. sulphureus* and to extract, fractionate and isolate the allelochemical promoters of the allelopathic effect. The allelopathic potential of *C. sulphureus* was characterized by the decomposition release method and by root exudation ("in vivo" plant). The decomposition of *C. sulphureus* resulted in allelopathic inhibitory effect on *Lactuca sativa*, *Amaranthus viridis* and *Panicum maximum*, mainly in the incorporation of the greater amount of plant material. Root extracts of *C. sulphureus* resulted in allelopathic inhibitory effect on *A. viridis* and *P. maximum*. Based on the results of this work, the main release pathway presented by *C. sulphureus* is root exudation ("in vivo" plant). Extraction of *C. sulphureus* leaves with water and organic solvents was also performed and the cytotoxicity of the extracts was checked. The most active extracts were fractionated using appropriate chromatography techniques and the fractions were tested by means of bioassays (biodirigid isolation). Bioactive fractions were analyzed in order to identify substances through HPLC-UV-MS and nuclear magnetic resonance (NMR). Dichloromethane extract of leaves and acetone extract of roots showed significant inhibition in wheat coleoptile elongation, and the first one was more phytotoxic to the target species (*Allium cepa*, *L. sativa*, *Lepidium sativum*, *Lycopersicum esculentum*, *A. viridis*, *Echinochloa crus-galli*, *P. maximum* and *Urochloa decumbens*). Fifteen compounds were isolated from leaves and five from roots. All compounds isolated from roots, except stigmaterol, are phenylpropanoids and were first isolated in *C. sulphureus*. The compounds 1',2'-Epoxy-3',4-di-O-isobutyryl-Z-coniferyl alcohol and 1',2'-Dihydroxy-3',4-di-O-isobutyrylconiferyl alcohol, isolated from roots, have never been described in the literature before. The major compounds isolated from leaves are sesquiterpene lactones: costunolide, reynosin and santamarin. The three major components of leaves are described for the first time to *C. sulphureus*, except costunolide, which was isolated from this plant before. Santamarin and costunolide were the most active compounds followed by reynosin. *Amaranthus viridis* and *P. maximum* were the most sensitive species to the action of the lactones. Sesquiterpene lactones isolated from leaves are a potential source for new herbicide structural models.

Key-words: *Bidens sulphurea*, allelopathy, costunolide, reynosin, santamarin, natural herbicide.

1. INTRODUÇÃO

Há cerca de dez anos, um produtor rural da região de Franca nos procurou no Laboratório de Plantas Daninhas (LAPDA – FCAV – UNESP - Jaboticabal), trazendo a informação de que uma planta, uma “margaridinha”, era capaz de matar o capim-colonião que infestava seus cafezais. Ele havia observado que onde havia essa “margaridinha” não havia capim-colonião e que ele a estava utilizando como estratégia de manejo da planta daninha, por meio da semeadura a lanço nos cafezais, mas sem ter ainda qualquer resultado consistente.

De posse dessa informação prática, iniciou-se no LAPDA uma série de experimentos visando confirmar e esclarecer a ocorrência desse fenômeno biológico da “margaridinha”, denominado alelopatia. Segundo a Sociedade Internacional de Alelopatia (*International Allelopathy Society – IAS*) (2017), o termo alelopatia se refere ao impacto positivo (estímulo) ou negativo (inibição) das plantas sobre as plantas vizinhas e/ou sua microflora e/ou sua macroflora, pela produção de aleloquímicos.

A “margaridinha” foi identificada como sendo *Cosmos sulphureus* Cav. (sinonímia: *Bidens sulphurea* Sch. Bip.), pertencente ao gênero *Bidens* e à família Asteraceae, uma espécie intensamente disseminada e naturalizada no território brasileiro (SILVA, 2009). Segundo esta mesma autora, há relatos de sua atividade alelopática, com efeitos inibitórios sobre a germinação, estabelecimento, crescimento e desenvolvimento de outras plantas, inclusive algumas consideradas daninhas.

O fato de uma planta apresentar potencial ou efeito alelopático abre um vasto campo de pesquisa, tanto ligado à área de Ecologia/Matologia como à Fitoquímica em si, podendo essa estar direcionada a obtenção de fármacos e/ou produtos fitossanitários naturais.

Os herbicidas se enquadram na categoria de produtos fitossanitários, utilizados largamente na agricultura brasileira para o controle de plantas daninhas em pré ou em pós-emergência. Convém ressaltar que o controle de plantas daninhas em qualquer cultura comercial é imprescindível para viabilizar economicamente a produção, seja em termos quantitativos, seja em termos

qualitativos, passando o manejo das plantas daninhas a constituir o principal fator que onera a produção. Dentre as medidas de manejo adotadas pelos produtores, destaca-se o controle químico por meio do uso de herbicidas sintéticos, sobretudo por sua eficácia, operacionalização e custo. Contudo, o uso frequente de herbicidas pode acarretar em problemas agrônômicos e ambientais. Agrônômicos por induzir mudança de flora e seleção de espécies resistentes, principalmente quando se utiliza produtos com o mesmo modo de ação (CARVALHO, 2004). Ambientais por desequilibrar os ecossistemas, alterando as propriedades físicas e/ou químicas da água e do solo.

Em virtude desses problemas, a busca por alternativas ao controle de plantas daninhas com herbicidas sintéticos tem crescido, destacando-se o uso de aleloquímicos (OLIVEROS-BASTIDAS, 2008; BERTHOLDSSON, 2010), que são mais facilmente biodegradáveis do que os herbicidas sintéticos (RIZVI et al., 1980), possibilitando assim um manejo sustentável e ecológico da produção agrícola (JABRAN et al., 2015).

A maioria dos estudos em alelopátia até então realizados se concentra na detecção do potencial e/ou atividade alelopática de plantas, mas poucos objetivam isolar e caracterizar a substância responsável pelo fenômeno (NARWAL; HAOUALA, 2013). A obtenção desse tipo de substância permitirá não só o seu uso como um herbicida natural – como já acontece em fazendas orgânicas com o emprego de bialafós e ácido pelargônico – mas também proverá esqueletos estruturais para a síntese de herbicidas análogos, como é o caso do cinmethylin, glufosinato e dos tricetônicos (como sulcotrione e mesotrione), sendo estes últimos derivados de uma fitotoxina estruturalmente similar a leptospermona, um constituinte isolado de *Callistemon citrinus* (QASEM, 2013).

Por ser uma Asteraceae e por suas características etnobotânicas, acredita-se que *C. sulphureus* possua uma grande diversidade de substâncias responsáveis pela sua atividade alelopática e uma das estratégias para a escolha de possíveis candidatos a herbicidas naturais é justamente realizar o isolamento dessas substâncias, guiado por bioensaios.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Alelopatia: Histórico e Conceitos

O primeiro registro sobre a capacidade das plantas interferirem no desenvolvimento de plantas ocorreu no ano de 300 a.C., quando Theophrastus, um discípulo de Aristóteles, observou que plantas de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) não revigoravam o solo como outras plantas – pelo contrário, elas “exauriam” o solo, e interferiam no desenvolvimento de algumas plantas invasoras. Séculos depois, Plínio (1 d.C) relatou que o grão-de-bico, a cevada (*Hordeum vulgare* L.), a ervilha (*Vicia ervilia* (L.) Willd) e a noqueira europeia (*Juglans regia* L.), provavelmente causavam injúrias às plantas da vizinhança. (RICE, 1984).

De Candolle, em 1932, afirmou que o “cansaço” das terras, decorrente da monocultura durante anos seguidos, era ocasionado pelo acúmulo de algumas substâncias exsudadas pelas plantas, que passavam a afetar até seu próprio desenvolvimento (RICE, 1984).

Lee e Monsi (1963), citados por Almeida (1988), referem-se a um documento japonês de autoria de Banzan Kumazawa, escrito há cerca de 300 anos, que descreve que a chuva e o orvalho arrastavam para o solo produtos químicos contidos nas folhas de pinheiro (*Pinus densiflora* Siebold & Zucc), os quais prejudicavam as culturas localizadas embaixo da copa destas árvores.

Contudo, mesmo já havendo relatos sobre a capacidade das plantas interferirem no desenvolvimento de outras, o termo “Alelopatia” foi cunhado apenas no ano de 1937, pelo alemão Hans Molisch. Alelopatia é uma palavra que vem do grego (*allelon* + *pathos*), e significa *allelon* = de um para o outro, *pathos* = prejuízo (MOLISCH, 1937). O sentido literal da palavra “alelopatia” engloba apenas o efeito negativo que uma planta exerce sobre outra. Rice (1984), porém, praticamente meio século depois, redefiniu o termo alelopatia como sendo “o efeito de uma planta no crescimento e estabelecimento de outra (incluindo microrganismos), por meio da produção e liberação de compostos químicos no ambiente”, podendo ser este efeito positivo (estímulo) ou negativo (inibição).

Atualmente, um dos conceitos de alelopatia mais respeitados é o determinado pela Sociedade Internacional de Alelopatia (*International Allelopathy Society – IAS*) que foi criada em 1996, e define alelopatia como o “impacto positivo (estímulo) ou negativo (inibição) das plantas sobre as plantas vizinhas e/ou sua microflora e/ou sua macroflora, pela produção de aleloquímicos” (IAS, 2017).

Muitas substâncias químicas produzidas pelas plantas que afetam associações de plantas, também podem influenciar outros organismos, oferecendo uma perspectiva mais abrangente para o termo alelopatia. Na maioria dos casos, o fenômeno alelopático ocorre entre espécies distintas, ou seja, é interespecífico; mas, caso a planta doadora e a receptora pertençam à mesma espécie, a alelopatia será intraespecífica, e o termo a ser empregado é autotoxicidade (MILLER, 1996).

Outra consideração importante é que a alelopatia diferencia-se da competição entre plantas 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 (SOUZA et al., 2003; OLIVEIRA JR. et al., 2011). A competição e a alelopatia são fenômenos que podem ocorrer de forma simultânea no ambiente comum.

A alelopatia é um dos modos de interação entre plantas receptoras e doadoras, que pode exercer efeitos positivos, como por exemplo, promover o controle de plantas daninhas ou restabelecimento de planta em um ecossistema, ou efeitos negativos, como a autotoxicidade e a invasão biológica (CHENG; CHENG, 2015).

Os principais objetivos da investigação sobre a alelopatia incluem a aplicação dos efeitos alelopáticos observados à produção agrícola, à redução no consumo de agroquímicos (e sua consequente poluição ambiental), disponibilizando métodos eficazes para o desenvolvimento sustentável da produção agrícola e dos sistemas ecológicos (MACÍAS et al., 2003; LI et al., 2010; HAN et al., 2013; JABRAN et al., 2015).

As substâncias químicas liberadas no ambiente, que são produtos do metabolismo secundário das plantas, também são denominadas de substâncias alelopáticas, aleloquímicos, produtos secundários ou metabólitos secundários (CARVALHO, 1993).

2.2. Natureza dos Aleloquímicos

O conjunto de reações químicas que ocorre em uma planta constitui o seu metabolismo. A maior parte do carbono, nitrogênio e da energia destina-se a moléculas que são comuns a todas as células, e atuam diretamente no crescimento das plantas. Tratam-se de aminoácidos, açúcares, lipídeos e nucleotídeos, que são metabólitos primários, estão presentes em todas as plantas, e desempenham a mesma função. Entretanto, as plantas destinam uma quantidade significativa de carbono assimilado e de energia para a síntese de uma ampla variedade de moléculas orgânicas, que parecem não ter uma função direta nos processos fotossintéticos/respiratórios, na assimilação de nutrientes, no transporte de soluto, ou ainda, na síntese de proteínas, carboidratos e lipídios. São compostos oriundos do metabolismo secundário, que não estão diretamente ligados aos processos vitais das plantas (GARCÍA; CARRIL, 2009).

Os metabólitos secundários, além de não apresentarem uma função definida nos processos supracitados, diferem dos metabólitos primários por apresentarem uma distribuição restrita no reino vegetal, ou seja, nem todos os metabólitos secundários estão presentes em todos os grupos de plantas. Geralmente são sintetizados em pequenas quantidades e sua distribuição é restringida a um determinado gênero, família e espécies de plantas. A composição dos metabólitos secundários varia quanti e qualitativamente, dentro da mesma espécie e entre espécies (KROYMANN, 2011).

Estes compostos podem proteger a planta contra a herbivoria e infecção por patógenos, e agir como atrativos aos polinizadores e dispersores, além de atuarem na competição planta-planta e na alelopatia (OLIVEROS-BASTIDAS, 2008; RAVEN et al. 2010). As características bioquímicas e fisiológicas destes compostos estão fortemente relacionadas com a função que desempenham na planta (WINK, 2010).

A diversidade de metabólitos secundários das plantas é imensurável. Já foram identificados mais de 100.000 compostos secundários, porém isto é, provavelmente, apenas uma fração do que está presente na natureza (WINK, 2010).

Os metabólitos secundários dividem-se em três grandes classes de substâncias químicas: os compostos fenólicos, os compostos nitrogenados e os terpenos (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Os compostos fenólicos (ou fenóis) são sintetizados a partir do Acetil CoA (rota do ácido mevalônico) ou da fenilalanina (rota do ácido chiquímico) (SMITH 1976), que é a rota mais comum nos vegetais. Possuem um anel aromático com um grupo hidroxila agregado (WATERMAN; MOLE, 1994). Os derivados de ácido benzóico, ácido cafeico e outros fenilpropanóides simples, cumarinas, ligninas, taninos e flavonoides estão entre os compostos fenólicos mais importantes, sendo que alguns deles estão relacionados à atividade fitotóxica (EINHLLIG, 2004). Os taninos, hidrolisáveis ou condensados, podem ser alelopáticos e comumente inseticidas e repelentes, pois costumam formar complexos proteicos difíceis de serem digeridos por herbívoros (EINHELLIG, 2004; TAIZ; ZEIGER, 2013). Os flavonóides são a maior classe de compostos fenólicos existentes, e são categorizados em antocianinas (pigmentos), flavonas, flavonóis e isoflavonas. As flavonas e os flavonóis são descritos como alelopáticos mediadores da interação planta-bactérias simbiontes e do desenvolvimento de vegetais competidores (EINHELLIG, 2004).

Os compostos nitrogenados de metabolismo secundário são classificados em alcalóides, glicosídeos cianogênicos, glucosinolatos e aminoácidos não proteicos (TAIZ; ZEIGER, 2013). Destes, os alcalóides são comumente encontrados nos vegetais, e são sintetizados a partir de aminoácidos comuns (lisina, tiamina e triptofano, por exemplo), oriundos das rotas dos terpenos. Podem apresentar ação contra herbívoros, serem fármacos importantes (morfina, por exemplo), ou ainda podem ser alelopáticos (TAIZ; ZEIGER, 2013; BLUM, 2004). Os glucosinolatos liberam substâncias que agem como toxinas e repelentes contra herbívoros (THULER et al., 2007). Os glicosídeos cianogênicos protegem as plantas contra a predação (VETTER, 2000). Os aminoácidos não-proteicos estão presentes nos vegetais de forma livre, e podem exercer o papel de protetores contra o ataque de herbívoros, por serem altamente tóxicos (TAIZ; ZEIGER, 2013).

O maior grupo de compostos secundários é o dos terpenos, que podem ser sintetizados em diferentes partes e em diferentes períodos do desenvolvimento de plantas, atuando de diversas maneiras (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001), como, por exemplo, no crescimento e desenvolvimento vegetal (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Mais de 22.000 terpenos já foram isolados e identificados, sendo muitos deles importantes nas interações planta-planta, ocorrendo na maioria das famílias de

plantas (CHENG et al., 2007; ZWENGER; BASU, 2008). Os terpenos são substâncias geralmente hidrofóbicas, produzidas em tecidos vegetativos, flores e, ocasionalmente, em raízes. São sintetizados a partir do Acetil CoA (rota do ácido mevalônico) ou de moléculas glicosídicas como o piruvato e o 3-fosfoglicerato (rota do metirritol fosfato ou MEP) (DEWICK, 2002). Formam-se a partir da união de unidades de isopreno (C5), sendo subdivididos em monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30), tetraterpenos (C40) e politerpenos (ZWENGER; BASU, 2008).

Os terpenos estão envolvidos em vários processos ecológicos de plantas, dentre eles as interações alelopáticas com outras plantas (DUKE; OLIVA, 2004). Alguns autores destacam que diferentes categorias de terpenos podem promover a inibição da germinação e crescimento de outras plantas, particularmente de plantas daninhas, sendo promissores a serem utilizados como herbicidas naturais (ABDELGALEIL et al., 2009; MACÍAS et al., 2010; GRANÃ et al., 2013).

2.3. Mecanismos de Liberação dos Aleloquímicos no Ambiente

Segundo Callaway e Aschehoug (2000), a liberação de substâncias alelopáticas (aleloquímicos) é uma importante ferramenta para que as espécies invasoras exóticas se estabeleçam de forma rápida e eficiente em um determinado ambiente. Ainda, o poder competitivo de plantas que liberam substâncias alelopáticas pode ser potencializado, quando estas plantas também competem por recursos do meio (RIDENOUR; CALLAWAY, 2001; CALLAWAY; RIDENOUR, 2004). Nos diferentes ecossistemas, plantas utilizam a estratégia de liberar as substâncias produzidas pelo metabolismo secundário (aleloquímicos) para se proteger da competição exercida por outras plantas ao redor (INDERJIT et al., 1999; SCHNEIDER; CRUZ-SILVA, 2012), caracterizando assim uma resposta ao estresse biótico.

As formas de liberação dos aleloquímicos pelas plantas no ambiente são: decomposição, exsudação radicular, lixiviação e volatilização (MEDEIROS, 1990; RODRIGUES et al., 1992; DURIGAN; ALMEIDA, 1993).

Por meio do processo de decomposição, os constituintes químicos dos organismos são liberados para o ambiente e são, frequentemente, adicionados ao

solo. Nesse processo está envolvida a participação dos microrganismos presentes no solo, os quais agem sobre os polímeros presentes nos tecidos, levando a liberação dos compostos tóxicos (SOUZA FILHO; ALVES, 2002). Segundo Oliboneet al. (2006), os aleloquímicos liberados pelos resíduos vegetais, deixados em cobertura sobre a superfície do solo têm comportamento diferente quando comparado ao que ocorre quando o material é incorporado ao solo. Isto ocorre porque quando há incorporação do material vegetal, essas substâncias ficam diluídas no solo. Assim, a intensidade dos efeitos alelopáticos depende da concentração dos aleloquímicos, de forma que, para resíduos vegetais deixados em cobertura, há uma tendência para uma ação mais pronunciada destas substâncias. A decomposição de resíduos vegetais implica em uma função não ativa da planta, enquanto os processos de exsudação e volatilização envolvem a planta viva.

Os exsudados radiculares são constituídos por substâncias sintetizadas pelas plantas e liberadas no solo pelas raízes vivas das plantas. Esse termo tem sido usado para descrever todas as substâncias orgânicas exsudadas pelas raízes, por qualquer mecanismo (RICE, 1984). O fenômeno de exsudação radicular é muito importante, especialmente quando os aleloquímicos liberados pelas raízes associam-se à presença de microrganismos no solo, podendo ter efeito direto nas raízes de outras plantas ou simplesmente ficarem armazenados no solo (REIGOSA et al., 1999). É necessário que os aleloquímicos liberados no ambiente se acumulem em quantidades suficientes para afetarem outras plantas, e se mantenham por algum tempo, para que se possa verificar o efeito alelopático (ALMEIDA, 1988).

A lixiviação é a remoção de substâncias químicas de plantas vivas ou mortas, pela ação de chuvas, orvalhos e neblina (SOUZA FILHO; ALVES, 2002), ou seja, compreende sobretudo a remoção de substâncias hidrofílicas.

A volatilização é um processo comum nas plantas aromáticas, embora nem todas as plantas aromáticas estejam envolvidas no mecanismo de alelopatia (SOUZA FILHO; ALVES, 2002).

2.4. Aleloquímicos como “Herbicidas Naturais”

A convivência das plantas daninhas com as culturas agrícolas é um dos grandes problemas enfrentados pelos produtores, uma vez que as plantas daninhas são as principais responsáveis em elevar o custo de produção, dada a necessidade de manejá-las para, assim, eliminar ou minimizar a interferência que elas exercem. A interferência das plantas daninhas nas culturas ocorre, principalmente, devido à competição por água, luz, nutrientes e, também, pelo efeito alelopático, causando redução qualitativa e quantitativa na produção (BIANCHI, 1995).

O manejo das plantas daninhas vem sendo baseado principalmente no controle químico. O uso frequente de herbicidas, geralmente com o mesmo modo de ação, associado ao monocultivo, é uma das principais formas para seleção de plantas daninhas resistentes aos herbicidas. Os problemas de resistência de plantas daninhas aos herbicidas surgiram a partir dos anos 80, com o desenvolvimento e uso repetitivo, por vários anos, de produtos altamente eficientes e seletivos, contribuindo para a seleção de plantas daninhas resistentes aos mesmos (CARVALHO, 2004). Além dos problemas relacionados à resistência, quando utilizados inadequadamente, os herbicidas podem impactar o meio ambiente, afetando os ecossistemas por alterar as propriedades físicas e/ou químicas da água e do solo, ou seja, causando contaminação ambiental, além de apresentarem risco à saúde humana.

A ação dos aleloquímicos nas plantas pode, amplamente, ser dividida em ações diretas e indiretas. As ações indiretas podem incluir efeitos que promovem alterações nas propriedades do solo, sua situação nutricional, bem como, alterações na população e ou atividade de microorganismos, insetos, nematoides e outras. O modelo de ação direta envolve os efeitos dos aleloquímicos sobre vários aspectos do metabolismo e desenvolvimento das plantas (SOUZA FILHO; ALVES, 2002). Alguns dos efeitos específicos incluem modificação na estrutura e no transporte das membranas, alterações das características da morfologia celular, interferência no ciclo celular (replicação, síntese de proteínas, mitose, mecanismos celulares), modificação da atividade de fitohormônios, perturbação do metabolismo energético (respiração e fotossíntese), problemas no balanço de água e na função dos estômatos, inibição de síntese de pigmentos e bloqueio da função de numerosas enzimas (EINHELLIG, 1986; EINHELLIG, 2002).

Assim, a alelopatia, com estudos bioquímicos de interações planta-planta (incluindo efeitos positivos e negativos), tem sido proposta como possível alternativa para o manejo de plantas daninhas (MACÍAS, 1996). Os vegetais apresentam determinados compostos bioativos que fazem parte do seu sistema de defesa e que são de fato herbicidas naturais (MACÍAS et al., 2000). Esses produtos naturais bioativos evoluíram por um longo período de tempo e foram selecionados para atividades biológicas específicas. A relação existente entre a estrutura química de um composto produzido por uma planta e a atividade herbicida tem tornado os aleloquímicos candidatos potenciais para conduzir ao desenvolvimento de novos herbicidas (DUKE et al., 2001).

A descoberta de novos aleloquímicos é uma alternativa ao uso de herbicidas convencionais no controle de plantas daninhas, uma vez que o uso excessivo dos herbicidas comerciais tem provocado mudanças nas populações de espécies daninhas, que muitas vezes apresentam tolerância a esses compostos, além de aumentar o risco de contaminação ambiental. Ainda, dentre outras vantagens do uso de substâncias produzidas pelas próprias plantas no controle de plantas daninhas, destaca-se o fato de os produtos originados de fontes de plantas serem mais sistêmicos e mais facilmente biodegradáveis do que os produtos sintéticos (RIZVI et al. 1980). O interesse na exploração de compostos do metabolismo secundário das plantas também pode ser uma alternativa estratégica para o controle de insetos e de doenças (ALVES et al., 2003; CHENG;CHENG, 2015).

Diversos compostos biologicamente ativos de uso difundido em nossa sociedade tiveram sua gênese a partir de um produto natural de origem vegetal, animal ou microbiana (BARBOSA, 2002). Muitos compostos originários de plantas que inibem o crescimento vegetal têm sido descobertos, como por exemplo, artemisinina, um sesquiterpenóide produzido por *Artemisia annua* L. que é altamente fitotóxico (DUKE; ABBAS, 1996). Um outro exemplo de substância fitotóxica descoberta com estudos de interação planta-planta é o sorgoleone, um potente composto alelopático isolado de espécies de *Sorghum* (DUKE et al., 2000). Muitas outros aleloquímicos isolados apresentam grande potencial para uso no controle de plantas daninhas (CHUNG et al., 2001; SOUZA FILHO et al., 2005; BHADORIA, 2011; NARWAL; HAOUALA, 2013; QASEM, 2013; DAYAN; DUKE, 2014), sendo parcial ou totalmente solúveis em água e ativos em baixas concentrações, embora a

eficácia e especificidade de muitos aleloquímicos ainda necessitem ser estudadas. Com modificações químicas alguns metabólitos secundários de plantas com fitotoxicidade podem ser a base de novos herbicidas, auxiliando no manejo efetivo da produção agrícola.

2.5. Isolamento e Purificação dos Aleloquímicos

Na descoberta de novos aleloquímicos (bioprospecção), o isolamento biodirigido (ou isolamento bioguiado) é um dos métodos que pode ser utilizado para a pesquisa de novos compostos fitoquímicos, sobretudo quando associado a características etnobotânicas, etnofarmacológicas e quimiosistemáticas (CAVALHEIRO, 2012, informação pessoal). Neste método, é possível determinar as frações que possuem maior atividade biológica. Após a identificação da fração mais ativa, esta é fracionada novamente com o objetivo de purificar e identificar os compostos presentes nesta fração (MACÍAS et al., 1998). Por meio dos bioensaios, é possível avaliar o potencial alelopático das espécies em estudo e, assim, acompanhar a resposta biológica durante as fases de extração, fracionamento, purificação e identificação dos compostos (MORAES et al., 2016).

Para o isolamento biodirigido e purificação de produtos naturais ativos, os extratos e frações destes extratos devem ser submetidos a procedimentos cromatográficos e de caracterização estrutural (CECHINEL FILHO; YUNES, 2001).

Uma das primeiras etapas de fracionamento dos extratos é a cromatografia de coluna aberta, que possui, geralmente, sílica gel (de fase normal ou reversa) como fase estacionária, e é eluída com misturas de solventes determinadas em cromatografia de camada delgada (CDD). A CDD também servirá para reunir frações da coluna cromatográfica com aspecto semelhante. As frações podem ser então submetidas a novas colunas cromatográficas que refinem o isolamento dos compostos de interesse (NOVAES, 2011).

Após os fracionamentos em coluna, as frações ou sub-frações devem ser levadas a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que é um método muito sensível para detectar os componentes presentes na mistura. Os fracionamentos biodirigidos e o desenvolvimento de metodologias analíticas, como análises de ressonância magnética nuclear, espectrometria de massa e infravermelho trouxeram

novas ferramentas para o desenvolvimento de herbicidas de origem natural que permitem elucidar as estruturas químicas até mesmo em pequenas quantidades de material (MACÍAS et al., 2007).

2.6. *Cosmos sulphureus* Cav. – a espécie selecionada

Como selecionar espécies de plantas como fonte potencial de novos herbicidas, já que muitos compostos naturais têm atividade biológica, e há muitas plantas que ainda não foram estudadas adequadamente?

As características etnobotânicas fornecem o primeiro indício para uma bioprospecção, pois retratam as aplicações e os usos tradicionais dos vegetais pelo homem. Recentemente, uma planta designada popularmente como “margaridinha” foi relatada suprimindo o crescimento de capim-colonião (*Panicum maximum* L.) em cafezais na região de Franca, em São Paulo, e devido a essa propriedade estava sendo utilizada no manejo da gramínea, como uma cultura sufocante. Posteriormente, a “margaridinha” foi identificada com sendo *Cosmos sulphureus* Cav.

Cosmos sulphureus Cav. é uma planta herbácea anual, ereta, muito ramificada e florífera, de 0,80 – 1,60 m de altura, com flores amarelas ou alaranjadas, que propaga-se apenas por sementes. Originada da América do Norte é conhecida popularmente como cosmos, cosmo-amarelo, picão-grande e áster-do-méxico, e foi introduzida no Brasil como planta ornamental. Entretanto, *C. sulphureus* já é considerada como planta daninha, devido a sua capacidade de ocorrer espontaneamente, ao seu alto potencial de invasão, vigor de disseminação e crescimento, que propiciaram a infestação de terrenos baldios, beira de estradas, hortas e pastagens, principalmente da região Sudeste e Sul do país. Assim, é muito comum a presença da *C. sulphureus* em áreas urbanas e também em áreas agrícolas, sendo a espécie facilmente reconhecida pela coloração alaranjada de sua floração durante todo o verão (LORENZI, 2008).

O gênero *Bidens*, pertencente à família Asteraceae, compreende cerca de 230 espécies encontradas nas Américas, África, Polinésia, Europa e nordeste da Ásia, e apresenta uma grande importância econômica, uma vez que inclui espécies

com alto potencial de adaptação ambiental, sendo muitas delas classificadas como plantas daninhas. Até o momento foram encontrados poliacetilenos, chalconas, fenilpropanóides, flavonóis, derivados do tiofeno e auranas entre os constituintes químicos mais frequentes em espécies desse gênero (CHIANG et al., 2004; HUDSON et al., 1993; MARCHANT et al., 1984; TOBINADA et al., 2009). Extratos e frações de diversas espécies de *Bidens* apresentaram atividade anti-ulcerogênica, anti-oxidante, anti-inflamatória, imunomoduladora, anti-hipertensiva, antimicrobiana, anti-alérgica, antidiabética, antiviral, antimalárica e alelopática (DEBA et al., 2007; SILVA, 2009; SILVA JUNIOR, et al., 2012; 2013).

Segundo Venable e Levin (1983) a grande capacidade de dispersão, característica das plantas pertencentes à família Asteraceae, contribui para o seu sucesso biológico, principalmente pela presença de pápus plumosos, apêndices, estruturas de aderência e metabólitos secundários, sendo estes últimos intimamente relacionados à alelopatia.

Muitas espécies invasoras, como, por exemplo, *C. sulphureus*, demonstram maior capacidade competitiva do que as espécies nativas (QIN et al., 2013), o que contribui para o seu alto potencial invasivo sobre a composição, estrutura e função da comunidade dos ecossistemas invadidos. Embora a espécie *C. sulphureus* apresente inúmeras propriedades biológicas, é uma das espécies do gênero *Bidens* menos estudadas cientificamente, de forma que o maior número de estudos biológicos de extratos e frações concentra-se na espécie *B. pilosa*. A atividade alelopática desta espécie com efeitos inibitórios sobre a germinação, estabelecimento, crescimento e desenvolvimento de outras plantas, inclusive algumas consideradas daninhas é bem conhecida.

Avaliando o potencial alelopático de *B. pilosa* e de *B. alba* sobre o crescimento de plântulas de *Lactuca sativa* L., Lima et al. (2011) observaram que as duas espécies de *Bidens* inibiram o crescimento da radícula e do hipocótilo das plântulas de alface. Ainda, estes autores mencionaram que os resultados obtidos indicam que as duas espécies analisadas podem ser utilizadas na busca de novas moléculas herbicidas menos tóxicas ao meio ambiente e ao homem. Também, Rabelo et al. (2008) verificaram que extratos aquosos de *B. pilosa* reduziram e/ou inibiram a germinação de sementes e o crescimento inicial de todas as espécies cultivadas testadas, promovendo, ainda, severas anormalidades nas plântulas. Estes

resultados indicam a existência de potencial alelopático de *B. pilosa*, corroborando os resultados também observados por Gusman et al. (2011).

Assim como algumas espécies do gênero *Bidens*, *C. sulphureus* apresenta alta capacidade de formar populações densas e dominantes. É provável que alta agressividade inerente a *C. sulphureus*, que permite a invasão da espécie nas mais diversas áreas, seja propiciada pelo seu potencial alelopático, como uma das estratégias no estabelecimento dessas populações. Em alguns casos, a agressividade de uma planta daninha deve-se a sua elevada produção de biomassa, o que não é o caso da espécie *C. sulphureus*.

Até o momento, a maior parte dos estudos realizados com a espécie *C. sulphureus* objetivou determinar potenciais efeitos medicinais da planta (ARAÚJO NETO, 2011; SILVA, 2009; SILVA JUNIOR et al., 2012; 2013). Porém, pouco enfoque agrônômico foi dado a esta espécie até o momento, no sentido de desvendar o comportamento desta planta em uma comunidade, e determinar o potencial alelopático da mesma. Dessa forma, convém ressaltar a necessidade de se explorar a caracterização química/biológica da espécie em questão.

Geralmente, os estudos realizados apenas identificam potencialidades alelopáticas de determinadas plantas, sendo poucos os que tratam do isolamento, caracterização e quantificação de substâncias com potencial alelopático.

Assim, considerando que a espécie *C. sulphureus* apresenta uma alta capacidade infestante e se dissemina com grande facilidade mesmo em áreas já infestadas por plantas daninhas de elevada biomassa, terá esta espécie a capacidade de liberar substâncias alelopáticas que potencializem a sua agressividade? Como será a forma de liberação destas substâncias alelopáticas? Terão estas substâncias algum efeito herbicida sobre outras plantas?

3. OBJETIVOS

- Objetivo Geral:

- Avaliar e caracterizar o potencial alelopático da espécie *C. sulphureus*.

- Objetivos Específicos:

- Caracterizar o efeito alelopático de *C. sulphureus* pelo método de liberação por exsudação radicular (planta "in vivo") e por decomposição;
- Isolar frações e composto(s) responsável(is) pelo efeito alelopático;
- Avaliar o efeito alelopático de compostos extraídos de folhas de *C. sulphureus* sobre espécies receptoras;
- Procurar novos compostos de "Herbicidas Naturais", mais específicos e inócuos, que ajudem a proteção integral do meio ambiente;
- Gerar conhecimentos e subsídios em Matologia, que permitam auxiliar no manejo de plantas daninhas, racionalizando-o e tornando-o menos impactante ao ambiente.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Caracterização do potencial alelopático de *C. sulphureus* pelo método de liberação por decomposição

O experimento para a caracterização do potencial alelopático de *C. sulphureus* pelo método de decomposição foi conduzido utilizando-se a biomassa seca de plantas inteiras de *C. sulphureus* (caule, folhas, raízes e inflorescências), em pleno florescimento, recém-coletadas em áreas de infestação natural. As plantas foram secas à sombra, até atingirem massa constante, sendo, posteriormente, trituradas em moinho tipo Willey (tamanho máximo de partícula de 1,5 mm), acondicionadas em sacos de papel e armazenadas em câmara fria e seca até a sua utilização.

Com o objetivo de simular uma maior concentração no solo dos possíveis aleloquímicos liberados pela planta, reproduzindo situações observadas a campo, optou-se em trabalhar com a quantidade de biomassa que representa uma área de infestação natural de *C. sulphureus* (x), e outras duas quantidades maiores de biomassa (2x e 4x), que representaram o acúmulo destes compostos ao longo do tempo.

A quantidade “x” de material seco de *C. sulphureus* utilizada foi definida por meio da determinação da produção de biomassa por metro quadrado, em condições de infestação natural, em área localizada na FCAV-UNESP – Câmpus de Jaboticabal. Para isso, adotou-se um quadro amostral vazado de ferro, de 0,25 m², que foi lançado na área por quatro vezes. Com base nos dados obtidos de produção de biomassa/m², calculou-se a média (x), e as outras quantidades de biomassa estudadas no presente experimento (2x e 4x). Como testemunha adotou-se o substrato sem a deposição/incorporação da matéria seca de *C. sulphureus*.

Os efeitos alelopáticos de *C. sulphureus* foram avaliados por meio da decomposição do material vegetal, que foi incorporado ou depositado em cobertura, e as espécies indicadoras adotadas foram *Amaranthus viridis* (caruru-de-mancha), *Panicum maximum* (capim-colonião) e *Lactuca sativa* (alface). Nessas ocasiões, a

semeadura foi realizada depositando-se 20 sementes de alface e 30 sementes de cada espécie de planta daninha, distribuídas em duas linhas centrais em cada caixa.

O experimento foi conduzido em condições semi-controladas (sem restrição de água e nutrientes), em caixas plásticas com o fundo perfurado, com volume de 2 litros. Cada caixa representou uma parcela. O substrato utilizado foi um Latossolo Vermelho Escuro em mistura com areia de rio (3:1 v/v), que posteriormente foi submetido às análises química e física de rotina. Não foi necessário realizar correção de pH e fertilidade do substrato utilizado.

Realizou-se a contagem da emergência das plântulas diariamente, até a estabilização deste processo. Por meio das contagens, calculou-se a porcentagem de emergência, o índice de velocidade de emergência das plantas (IVE) e o tempo médio de emergência (TME), segundo Maguire (1962).

Ao final da condução, aos 30 dias após a semeadura, foram avaliadas: % de emergência, comprimento e biomassa seca de raiz e parte aérea. Para a retirada do solo das raízes, utilizou-se um conjunto de peneiras sobrepostas, de diferentes malhas, com o auxílio de um jato d'água e de uma espátula. Para a obtenção da biomassa seca de raízes e parte aérea, o material coletado foi acondicionado em sacos de papel, e colocado em estufa de circulação forçada de ar, em torno de 65° a 70°C, até atingir massa constante.

Para cada espécie indicadora, o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em quatro repetições, e os dados obtidos foram analisados por período de decomposição (esquema fatorial 2 x 3 + T, sendo 2 condições – incorporada/cobertura, três quantidades de biomassa seca, mais a testemunha). Todos os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F, com as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

4.2. Caracterização do potencial alelopático de *C. sulphureus* por exsudação radicular (planta “in vivo”)

4.2.1. Utilização do Método Hidropônico

Sementes de *C. sulphureus* foram colocadas para germinar em bandeja de poliestireno expandido, preenchida com areia de rio lavada. Aos 20 dias após a emergência, as plântulas foram transferidas para caixas plásticas com capacidade para 2 L, preenchidas com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), com $\frac{1}{4}$ da sua força. Cada plântula permaneceu suportada por uma tampa de isopor, colocada sobre a caixa plástica, e presa à mesma com o auxílio de um elástico, o que permitiu o contato das raízes com a solução nutritiva, criando um sistema hidropônico.

No decorrer do período experimental, realizou-se a reposição da solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), ajustando-a quinzenalmente, até atingir a concentração de 100%, para assim otimizar o crescimento e desenvolvimento das plantas.

Em três ocasiões (crescimento vegetativo, pleno florescimento e final do florescimento/senescência), as soluções foram recolhidas das caixas, armazenadas em frascos âmbar, e mantidas congeladas, até serem utilizadas em bioensaios de coleóptilo e de fitotoxicidade (germinação de sementes).

Visando obter apenas os exsudatos radiculares da solução recolhida, foi necessário fazer a eliminação dos restos de nutrientes, nas formas de sais, da solução nutritiva recolhida. As soluções coletadas (solução nutritiva + exsudatos radiculares) foram filtradas à vácuo, em coluna contendo resina Amberlite XAD-4, seguindo, na sequência descrita abaixo, o procedimento proposto pela equipe do Laboratório de Química Orgânica (Universidad de Cádiz – Espanha):

- a) Água (para ativação da resina)
- b) Exsudato radicular (para que os metabólitos liberados pela planta fiquem aderidos à resina)
- c) Água (para lavar a resina e retirar todos os sais minerais da solução nutritiva, permanecendo apenas os metabólitos aderidos à resina)
- d) Acetona (para retirar os metabólitos solúveis em acetona)
- e) Metanol (para retirar os metabólitos solúveis em metanol).

Ao final do processo de eliminação dos sais da solução nutritiva, foram obtidas duas frações de interesse (acetona e metanol), para cada exsudato, nas respectivas fases de desenvolvimento da planta (estádio vegetativo, de pleno florescimento e final do florescimento).

Realizou-se um bioensaio de alongamento de coleóptilo de trigo (*Triticum aestivum*) (FERNANDEZ, 2003). Neste, sementes de trigo foram germinadas em câmara de germinação por 72 horas, em condições de escuro completo, e os coleóptilos originados foram cortados em guilhotina, obtendo-se partes de 5 mm. Cinco fragmentos destes coleóptilos foram colocados em tubos de ensaio contendo as frações secas dos exsudatos de *C. sulphureus*, pré-dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) numa proporção de 5 μLmL^{-1} , e diluídas para as concentrações de 800, 400, 200, 100 e 50 ppm para cada fração testada. Os tubos foram mantidos em rotação dentro de câmara de germinação a 25°C por 24 horas. Avaliou-se, após o período de incubação, o tamanho final dos coleóptilos. Com os resultados obtidos neste bioensaio, realizou-se um bioensaio de germinação, para verificar a fitotoxicidade dos exsudatos radiculares.

Para a realização dos bioensaios de germinação, foram adotadas as mesmas concentrações testadas supracitadas. Foram utilizadas placas de Petri de 9 cm de diâmetro, forradas com folha de papel de filtro umedecidas com as frações dos exsudatos. As placas foram seladas com Parafilm e acondicionadas em câmaras de germinação a 25 °C \pm 2°C, na ausência de luz, onde permaneceram por 7 dias. Como plantas-teste foram utilizadas *A. viridis* (caruru-de-mancha), *P. maximum* (capim-colonião) e *L. sativa* (alface), com 20 sementes distribuídas equidistantemente pelas placas. Avaliou-se o número de plantas emergidas e o comprimento de radícula e hipocótilo (parte aérea).

Para os dois bioensaios realizados, adotou-se como controle (testemunha) apenas a solução de dimetilsulfóxido (DMSO) sem a adição das frações obtidas dos exsudatos radiculares.

O delineamento estatístico utilizado para os bioensaios foi o inteiramente casualizado, em quatro repetições. Todos os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F, com as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

4.2.2. Utilização do Método de Garrafas Invertidas

Realizou-se um experimento complementar, para caracterização do potencial alelopático de *C. sulphureus* por exsudação radicular. Para tanto, foram utilizadas

garrafas plásticas (pet) de 2 L (área útil de 90 mm de diâmetro e 270 mm de comprimento), com o fundo removido, pintadas externamente na cor prata. A tampa das garrafas foi furada, e neste orifício foi instalada uma mangueira de polietileno com 5 mm de diâmetro e 20 cm de comprimento. As garrafas foram apoiadas em posição invertida em um suporte, e preenchidas inicialmente com uma camada de brita (aproximadamente 5 cm de altura), e depois com areia de rio lavada.

O fundo removido das garrafas pet foi utilizado como um vaso, que também foi preenchido com areia, e então foi posicionado logo abaixo de cada garrafa invertida, de forma que toda a solução que passava pelas garrafas foi direcionada, por meio da mangueira de polietileno, diretamente para os vasos, compondo, assim, um sistema fechado (Figura 1).

Oito aquênios de *C. sulphureus* (planta doadora) foram colocados para germinar diretamente nas garrafas invertidas. Após o desbaste, foram deixadas seis plantas por garrafa. A irrigação foi feita com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) e água destilada (em dias intercalados) durante todo o período experimental, para garantir o bom desenvolvimento das plantas. Inicialmente, utilizou-se solução nutritiva a 25%, cuja concentração foi sendo aumentada quinzenalmente, até atingir a concentração de 100%.

Vinte dias após a emergência de *C. sulphureus*, foram semeadas 30 sementes de *Amaranthus viridis* ou *Panicum maximum* (espécies receptoras) nos vasos.



Figura 1. Sistema para avaliação do efeito direto da exsudação de *C. sulphureus* (planta doadora) sobre a emergência e crescimento inicial de *Amaranthus viridis* e *Panicum maximum* (espécies receptoras).

Uma vez que todos os exsudatos radiculares liberados pelas plantas de *C. sulphureus* foram direcionados aos vasos que continham as espécies receptoras, foi possível avaliar o efeito destes exsudatos diretamente sobre a emergência e crescimento inicial das espécies receptoras.

Como testemunha foram utilizadas garrafas sem plantas de *C. sulphureus*, ou seja, os vasos abaixo das garrafas recebiam apenas a solução nutritiva, que era aplicada de maneira uniforme em todos os tratamentos (com *C. sulphureus* e sem *C. sulphureus*), até atingirem o ponto de escoamento pela mangueira.

O efeito dos exsudatos foi avaliado em três estádios de desenvolvimento da *C. sulphureus*: vegetativo, pleno florescimento e final do florescimento, para *A. viridis* e em dois estádios, pleno florescimento e final do florescimento para *P. maximum* (devido a problemas na germinação desta planta daninha, na primeira fase do experimento).

Ao final de cada estágio de crescimento de *C. sulphureus*, as plantas de *A. viridis* e *P. maximum* foram cuidadosamente retiradas dos vasos e foram avaliados o comprimento de raiz e parte aérea e a biomassa seca destas partes. Em seguida, as espécies receptoras foram semeadas novamente no mesmo vaso, visando observar o efeito do acúmulo dos exsudatos liberados, ao longo do desenvolvimento de *C. sulphureus*.

Todo o sistema foi composto por 24 garrafas, de forma que cada garrafa constituiu uma unidade experimental. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 2 (para *A. viridis*) e 2 x 2 (para *P. maximum*), sendo 3 ou 2 estádios de crescimento avaliados e duas condições (com e sem plantas de *C. sulphureus*), em 6 repetições para cada espécie receptora.

4.3. Extração, fracionamento e identificação dos extratos ativos de *C. sulphureus*, monitorados por testes de atividade biológica

Folhas e raízes foram coletadas de plantas de *C. sulphureus* em pleno florescimento, na cidade de Araraquara, São Paulo, Brasil (21°48' a 21°50' S e 48°10' a 48°11'W), durante a estação chuvosa (novembro de 2013). O material-testemunho está depositado no Herbário JABOTI da Universidade Estadual Paulista/

FCAV, câmpus Jaboticabal (voucher J. V. F. Martins et al., n.01). Folhas e raízes de *C. sulphureus* foram colocadas para secar à sombra, separadamente, e posteriormente, foram trituradas em moinho tipo Willey (tamanho máximo de partícula de 1,5 mm), acondicionadas em sacos de papel e armazenadas em câmara fria e seca.

4.3.1. Folhas de *C. sulphureus*

Para otimização e direcionamento do processo de isolamento, realizou-se uma extração prévia, utilizando-se de menor quantidade de material vegetal. Para tanto, 120 g de pó seco de folhas de *C. sulphureus* foram extraídos inicialmente com água. Depois, para a eliminação de óleos, graxas e ceras (desengorduramento), utilizou-se o solvente hexano. O material desengordurado foi extraído, sequencialmente, com os solventes orgânicos em escala crescente de polaridade: diclorometano, acetato de etila, acetona e metanol. Para todas as extrações, adotou-se a técnica de extração por ultrassom (três ciclos de 15 minutos). Ao término do período de extração, cada extrato foi filtrado em funil de Büchner com papel de poro 0,22 µm acoplado a uma bomba à vácuo e depois evaporado em rotavapor, para eliminação do solvente. Todos os extratos brutos obtidos foram avaliados em bioensaios de coleóptilos de trigo e o extrato de diclorometano foi o mais ativo.

Um novo processo de extração utilizando maior quantidade do material vegetal (mesma origem) foi realizado, visando à obtenção do extrato bruto de diclorometano, para prosseguir com o fracionamento e purificação do mesmo. Para tanto, adotou-se a mesma técnica de extração supracitada, utilizando, desta vez, 480 g de pó seco de folha de *C. sulphureus*. Realizou-se, inicialmente, o desengorduramento do material vegetal com o hexano, e, posteriormente, a extração do material desengordurado com 2400 mL de diclorometano. As extrações foram realizadas em erlenmeyers de vidro de 500 mL, com porções de material vegetal de aproximadamente 100 g, em quadruplicatas. Após a remoção do solvente, obteve-se o extrato bruto de diclorometano - EBDCM (9,734 g). Uma vez que as clorofilas presentes no EBDCM não eram as substâncias de interesse e ainda poderiam dificultar o processo de isolamento, optou-se por eliminá-las, visando facilitar toda a técnica posterior de isolamento/identificação das substâncias

bioativas. Para tal eliminação, adotou-se uma coluna cromatográfica de fase reversa (preenchida com sílica RP-18), utilizando os solventes água e metanol, em diferentes polaridades (de 0 a 100%) e, ao final, diclorometano.

Com o auxílio da cromatografia de camada delgada (CCD), para verificar possíveis semelhanças entre as frações iniciais, e realizar, então, a união das mesmas, foram obtidas, ao final, quatro frações de interesse, mais a fração de diclorometano (última fração, na qual saíram as clorofilas): **Fração A** (100% água) – 258,6 mg; **Fração B** (20%, 40% e 60% metanol) – 1342,6 mg; **Fração C** (80% metanol) – 1566,6 mg; **Fração D** (100% metanol) - 2804,6 mg; **Fração DCM** – 3386,5 mg (fração de clorofilas). Após bioensaios de coleótilos e sementes, observou-se que as frações B, C e D foram as mais ativas.

O fracionamento das frações B, C e D foi realizado mediante cromatografia em coluna (CC), usando misturas de hexano/acetato em polaridade crescente (0 a 100%), até que fosse feita toda a substituição do hexano pelo acetato de etila, que correspondeu ao final da eluição. Ao término da eluição, foi feita a lavagem da coluna, passando-se 1,0 L de metanol. Durante todo o processo de separação por coluna cromatográfica, o aumento da polaridade do eluente foi direcionado pela cromatografia em camada delgada (CCD). Após separação por cromatografia em coluna, a fração B originou 12 subfrações (B1 – B12), a C originou 10 subfrações (C1 – C10), e a D originou 12 subfrações (D1 – D12). O fluxograma do processo de extração e fracionamento biodirigido, para a obtenção das frações e subfrações de B, C e D segue ilustrado na Figura 2.

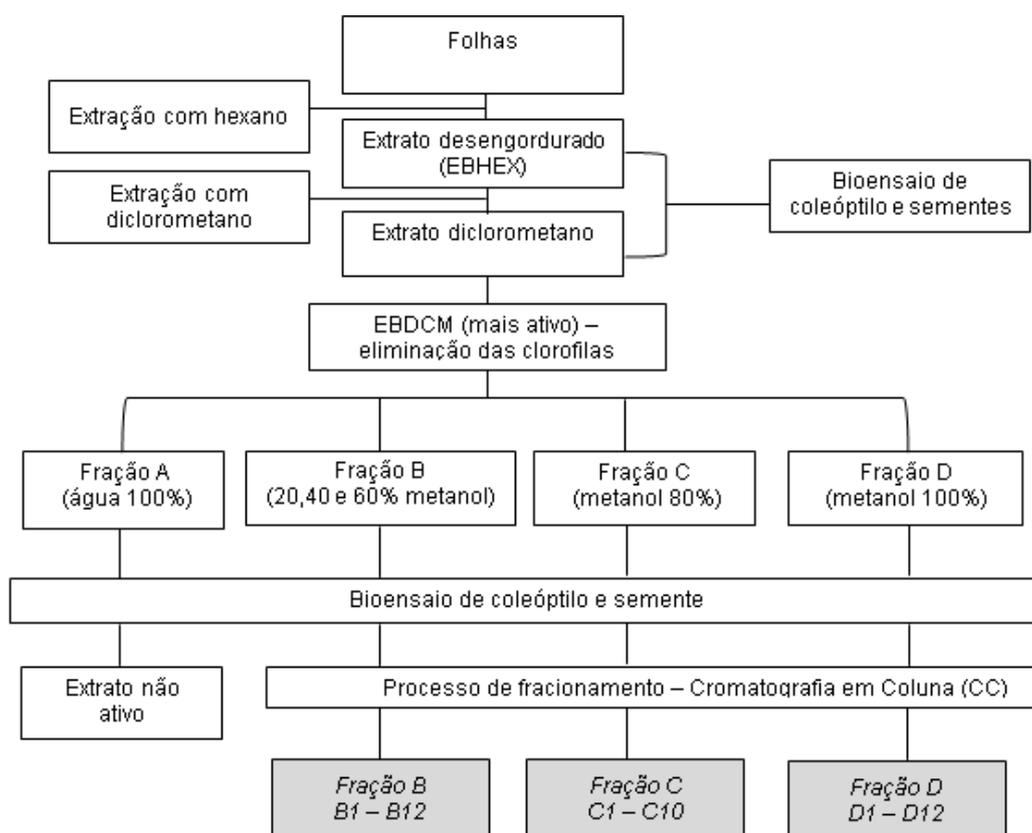


Figura 2. Fluxograma do processo de extração e fracionamento biodirigido, para a obtenção das frações/subfrações de **B** (20, 40 e 60% metanol), **C** (80% metanol) e **D** (100% metanol), de folhas de *C. sulphureus*.

Da fração B, os compostos majoritários **2** e **3** e os minoritários **4**, **5** e **6** foram isolados (Figura 3). A subfração B5 (16,8 mg) foi purificada por cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE (coluna semipreparativa), usando os solventes hexano/acetato de etila (60:40 v/v, fluxo 3 mL min⁻¹), obtendo-se seis subfrações (B5-1 – B5-6). Destas, purificou-se a subfração B5-5 (8,7 mg) por CLAE (coluna semipreparativa), com hexano/acetato de etila (75:25 v/v, fluxo 3 mL min⁻¹), para obtenção do composto **3** (4,0 mg, tempo de retenção de 27 minutos) e **4** (1,7 mg, 24 minutos). Da subfração B6 (15,7 mg), foram obtidas sete subfrações (B6-1 – B6-7), por meio do processo de separação por CLAE (coluna semipreparativa), com solventes hexano/acetato de etila (55:45 v/v, fluxo 3 mL min⁻¹). A subfração B6-6 (2,8 mg) foi purificada, utilizando-se CLAE (coluna analítica Phenomenex), com os solventes hexano/acetato de etila (70:30 v/v, fluxo 1 mL min⁻¹), obtendo-se os compostos **3** (0,8 mg, 24 minutos) e **5** (0,6 mg, 27 minutos). A separação da subfração B7 (35,3 mg) também ocorreu por meio de CLAE (coluna

semipreparativa), com os solventes hexano/acetato de etila (55:45 v/v, fluxo 3 mL/min), para a obtenção de sete subfrações (B7-1 – B7-7). Para purificar a subfração B7-5 (2,8 mg), também utilizou-se a coluna Phenomenex, com hexano/acetato de etila (70:30 v/v, fluxo 1 mL min⁻¹), para obtenção do composto **3** (2,5 mg, tempo de retenção de 25 minutos). Para a purificação da subfração B8 (57,7 mg), em CLAE (coluna semipreparativa), utilizou hexano/acetato de etila (60:40 v/v fluxo 3 mL/min), originando seis subfrações (B8-1 – B8-6), sendo a fração B8-4 correspondente ao composto **5** (9,8 mg, 33 minutos) e a B8-6, ao composto **2** (27 mg, 39 minutos). Das subfrações B10 (39,9 mg) e B11 (105,6 mg), foram obtidas três (B10-1 – B10-3) e duas (B11-1 – B11-2) subfrações, respectivamente, na separação por CLAE (coluna semipreparativa, hexano/acetona 65:35 v/v, fluxo 3 mL/min), sendo a fração B10-1 correspondente ao composto **4** (5,8 mg, 19 minutos). A subfração B11-1, foi purificada por CLAE (coluna semipreparativa, hexano/acetona 65:35 v/v, fluxo 3 mL min⁻¹), para a obtenção do composto **6** (3,8 mg, 29 minutos) (Figura 3).

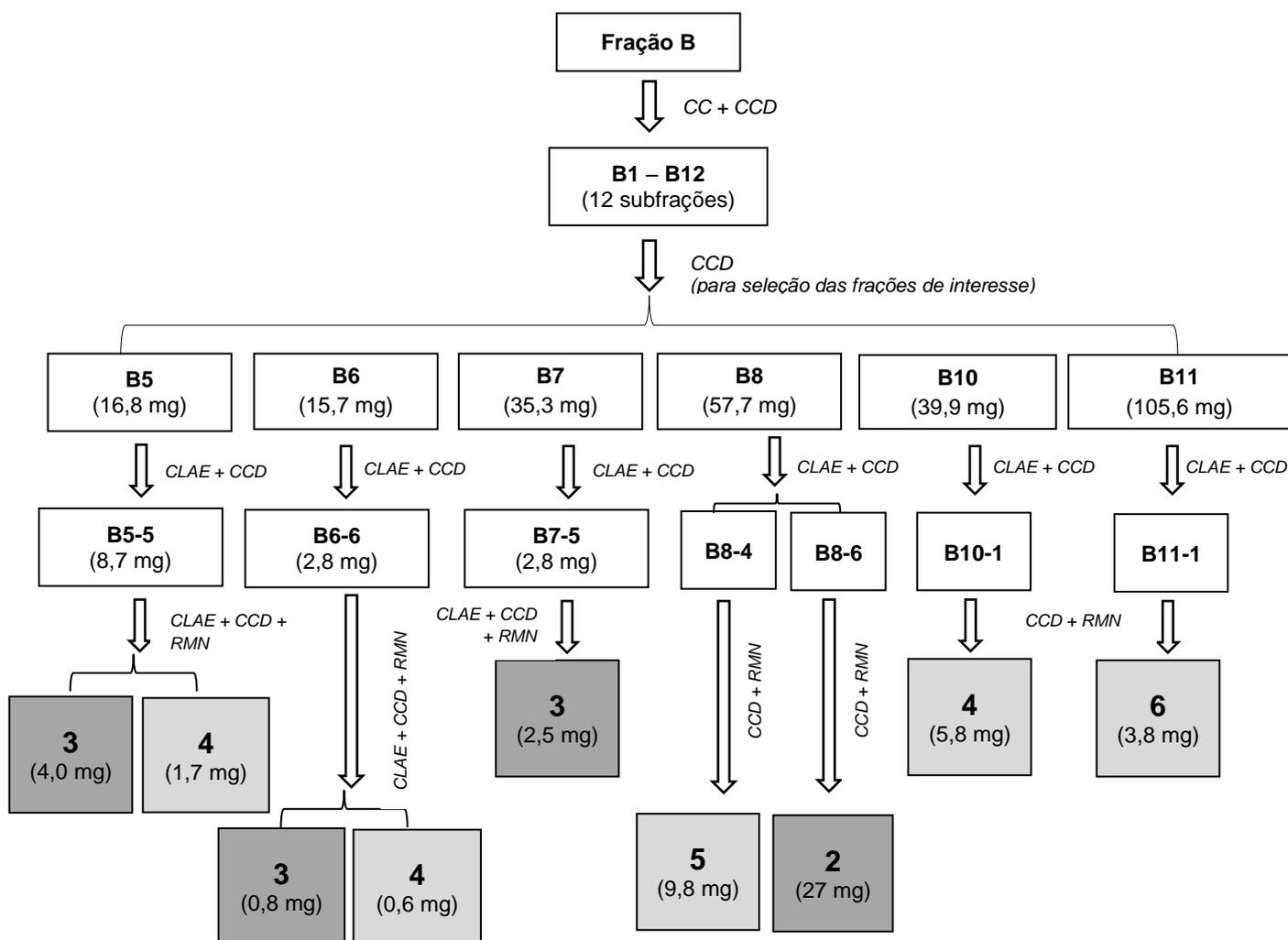


Figura 3. Fluxograma do processo de isolamento da **Fração B** (20, 40 e 60% metanol), para a obtenção de compostos secundários de folhas de *C. sulphureus*.(obs.: CCD – cromatografia de camada delgada, CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência, RMN – ressonância magnético nuclear).

Na fração C, isolaram-se os compostos majoritários **1**, **2** e **3**, e os minoritários **7**, **9** e **10** (Figura 4). No processo de separação por CC da fração C, foram obtidos 69 mg do composto **1** puro (correspondente à subfração C2), com a mistura de solventes hexano – acetato (80:20 v/v). A subfração C6 (76,8 mg), após separação por CLAE (coluna semipreparativa, hexano/acetona 85:15 v/v, fluxo 3 mL min⁻¹), originou 7 subfrações (C6-1 – C6-7), sendo C6-5 o composto **7** (10,9 mg, 24 minutos). As subfrações C6-4 (15,1 mg) e C6-6 (15,6 mg), após purificação (semipreparativa, hexano/acetato de etila 75:25 v/v, fluxo 3 mL min⁻¹) deram origem aos compostos **9** (2,7 mg, 27 minutos) e **10** (7,5 mg, 37 minutos). Com a

separação/purificação das subfrações C7 (157,3 mg) e C8 (140,3 mg), utilizando CLAE (coluna semipreparativa), com os solventes hexano/acetona (75:25 v/v, fluxo 3 mL min⁻¹), foram obtidas 4 subfrações para C7 (C7-1 – C7-4) e seis subfrações para C8 (C8-1 – C8-6). Destas, a subfração C7-2 (60 mg, tempo de retenção de 18 minutos), correspondeu ao composto **3**, e as frações C7-3 (39,4 mg), C7-4 (3,5 mg) e C8-3 (1,0 mg) corresponderam ao composto **2** (43,9 mg, tempo de retenção de 24 minutos) (Figura 4).

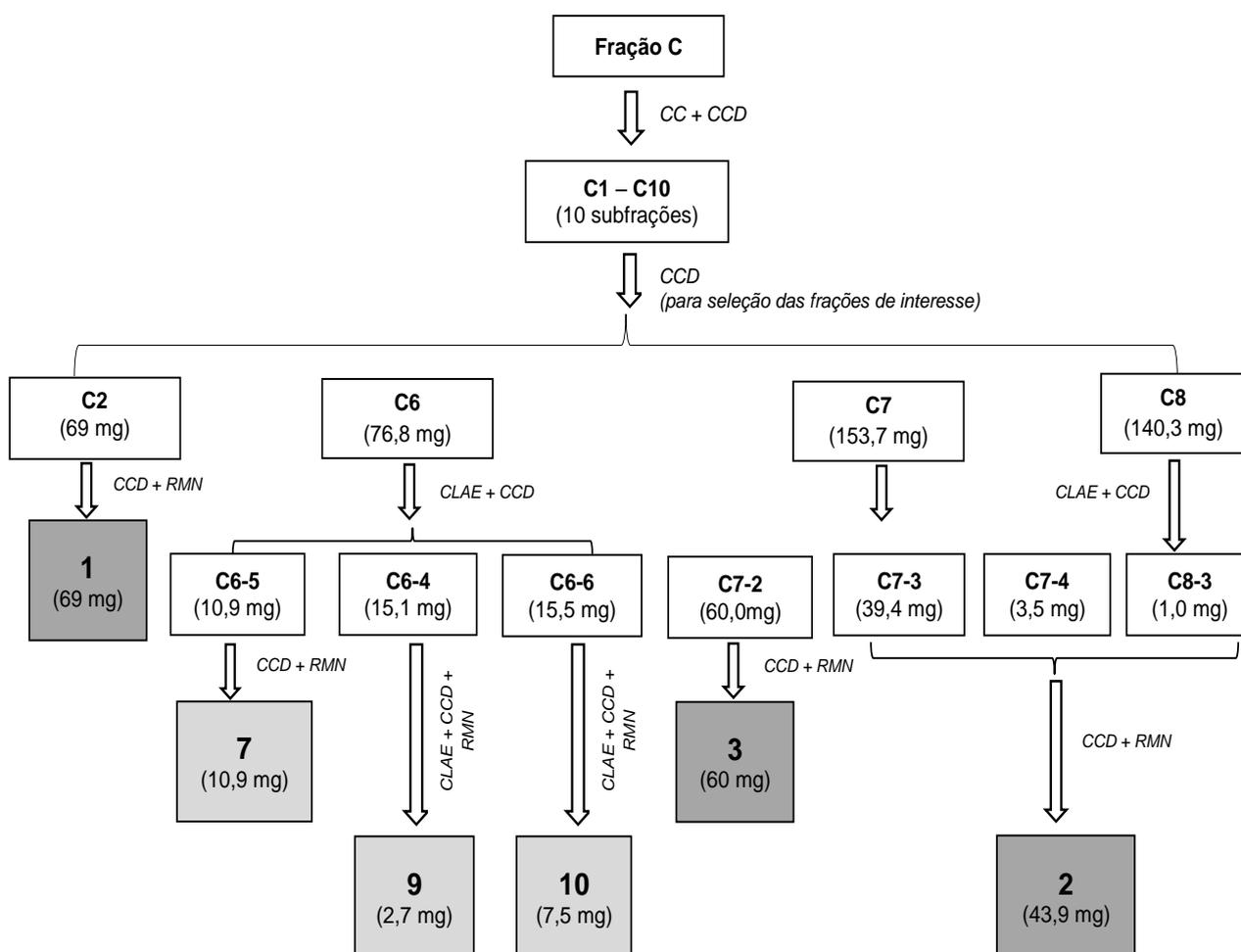


Figura 4. Fluxograma do processo de isolamento da **Fração C** (80% metanol), para a obtenção de compostos secundários de folhas de *C. sulphureus*. (obs.: CCD – cromatografia de camada delgada, CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência, RMN – ressonância magnético nuclear).

Da fração D, o composto majoritário **1** e os minoritários **8**, **11** - **14** foram isolados (Figura 5). Para a purificação da fração D, no processo de separação das subfrações D2 (56 mg) e D3 (35,5 mg), utilizando-se CLAE (coluna semipreparativa), com hexano/acetona (95:5 v/v, fluxo 3 mL min⁻¹), obteve-se composto majoritário **1**, que correspondeu à subfração D2-12 (8,1 mg, tempo de retenção de 35 minutos), e a subfração D2-15, composto minoritário **14** (3,5 mg, 46 minutos); D3-10 correspondeu aos compostos **11** (4,5 mg, 48 minutos) e **12** (3,1 mg, 57 minutos). D9 (50 mg), após separação por CLAE (coluna semipreparativa, hexano/acetona 70:30 v/v, fluxo 3 mL min⁻¹), originando 7 subfrações (D9-1 – D9-7), sendo D9-3 o composto **13** (1,0 mg, 10 minutos). Após purificação da subfração D9-5 (coluna analítica Phenomenex), hexano/acetona 80:20 v/v, fluxo 1 mL min⁻¹), obteve-se o composto **8** (3,2 mg, 25 minutos) (Figura 5). Na fração de clorofilas (DCM), isolou-se o composto **15** (14,3 mg).

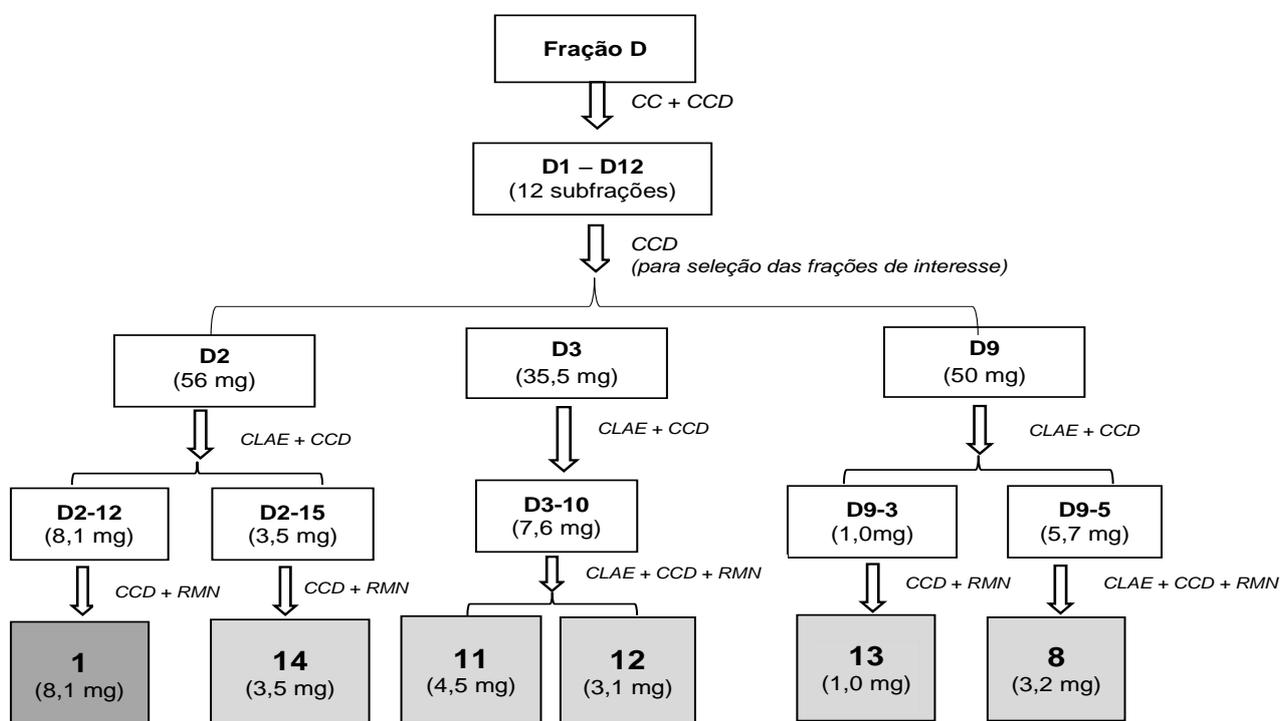


Figura 5. Fluxograma do processo de isolamento da **Fração D** (100% metanol), para a obtenção de compostos secundários de folhas de *C. sulphureus*. (obs.: CCD – cromatografia de camada delgada, CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência, RMN – ressonância magnético nuclear).

Os compostos majoritários isolados das folhas (**1**, **2** e **3**) foram avaliados em bioensaios de coleótilos de trigo e de sementes.

4.3.2. Raízes de *C. sulphureus*

Para a extração de compostos das raízes, utilizou-se banho ultrassônico, adotando-se a mesma metodologia supracitada. Para tanto, 150 g de pó seco de raiz foram extraídos em acetona, obtendo-se, após a remoção do solvente, o extrato bruto de acetona (3,8 g). O extrato bruto de acetona das raízes (fração) foi avaliado em bioensaios de coleótilos de trigo e sementes, e, então fracionado por coluna cromatográfica com gradientes de hexano/acetato de etila de 0 a 100%, com intervalos de 10%, e finalizado com 100% de metanol. Foram obtidas 7 subfrações (RA1 – RA7). Das raízes, foram isolados os compostos **15** – **19** (Figura 6).

A subfração RA2 (58 mg), após separação por CLAE (coluna semipreparativa, hexano/acetona 95:5 v/v, fluxo 3 mL/min), originou os compostos **15** (RA2-5) (5,1 mg, 56 minutos) e **16** (RA2-4) (11,2 mg, 63 minutos). As subfrações RA2-2 e RA2-3, após purificação (analítica Phenomenex, com hexano/acetona 90:10 v/v, fluxo 1 mL min⁻¹), originaram os compostos **18** (1,8 mg, 8 minutos) e **19** (1,5 mg, 10 minutos). As subfrações RA5 e RA6, após separação por CLAE (coluna semipreparativa, hexano/acetona 70:30 v/v, fluxo 3 mL min⁻¹) originaram o composto **17** (19,8 mg, 15 minutos) (Figura 6).

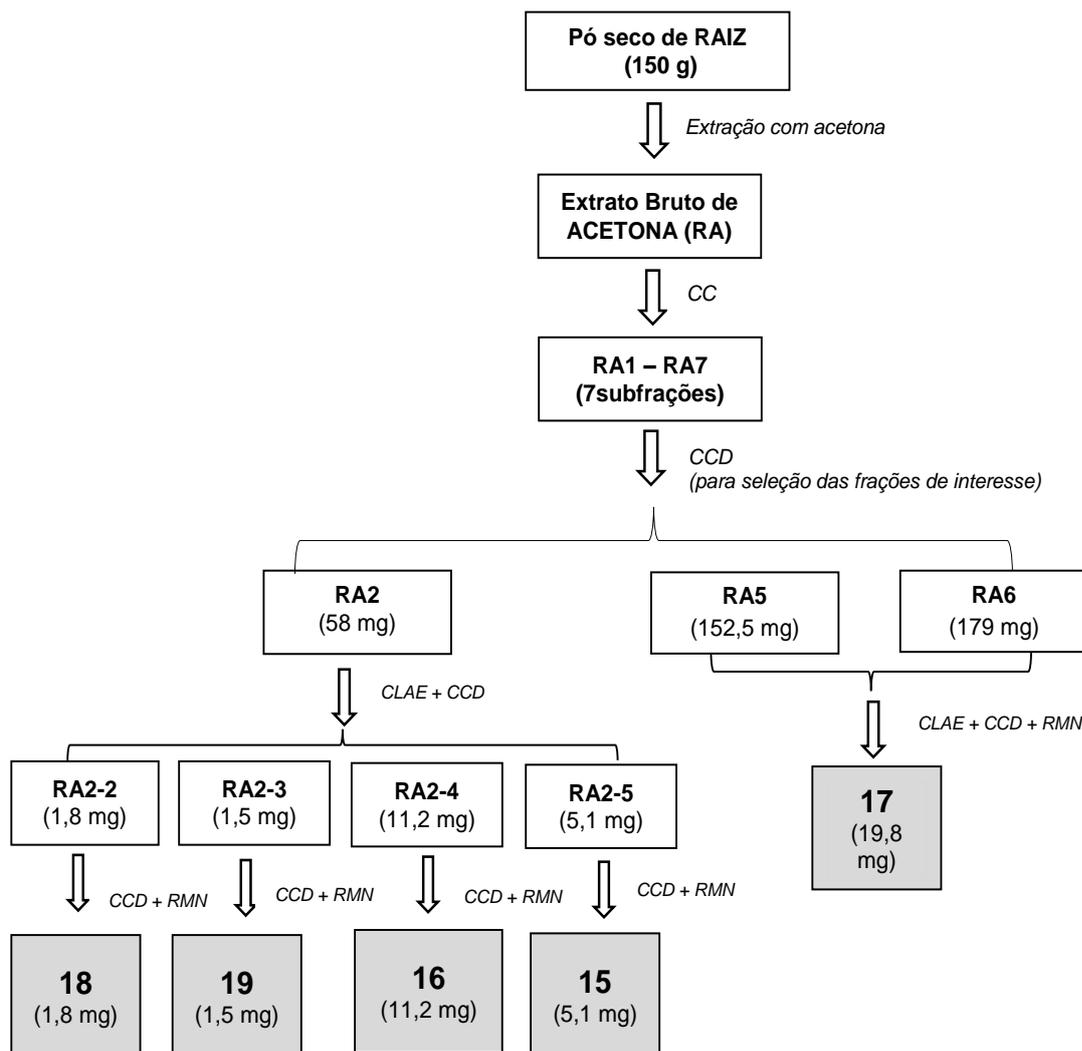


Figura 6. Fluxograma do processo de extração, fracionamento e isolamento biodirigido, para a obtenção dos compostos secundários majoritários da raízes de *C. sulphureus*.

4.3.3. Bioensaios

Bioensaio de coleóptilo de trigo

Sementes de trigo (*Triticum aestivum* cv. Duro) foram colocadas para germinar em placas de Petri, umedecidas com água, em câmara de germinação a ± 25 °C, em condições de escuro completo (HANCOCK; BARLOW; LACEY, 1964). Decorridas 72 horas, fragmentos de coleóptilos de quatro milímetros de comprimento foram cortados imediatamente após os primeiros dois milímetros do ápice do coleóptilo, em guilhotina Van der Weij, sendo todo o processo realizado sob luz de segurança verde (NITSCH; NITSCH, 1956). Os extratos brutos ou produtos puros testados foram pré-dissolvidos em dimetilsulfóxido (0,1%) e diluídos em

solução tampão citrato/fosfato pH 5,6, complementada com sacarose a 2% (NITSCH; NITSCH, 1956) e diluídos para as concentrações finais de 800, 400, 200 e 100 ppm para os extratos, e 1000, 300, 100, 30 e 10 μM para os compostos. Como controle, utilizou-se solução tampão pura acrescida de dimetilsulfóxido (controle negativo) e solução tampão contendo herbicida de referência – Logran® (0,6% triasulfurom) (controle positivo) (MACÍAS; CASTELLANO; MOLINILLO, 2000).

Cinco fragmentos de coleóptilos foram incubados em tubos de ensaio contendo 2 mL de solução (três tubos para cada diluição). Os tubos foram devidamente etiquetados, selados e incubados com agitação constante (6 rpm), em um rotor de cultivo *Stuart Scientific* tipo SC2, em condições de escuro, a uma temperatura de $25(\pm 1)$ °C durante 24 h. Transcorrido este período, avaliou-se o aumento em longitude do coleóptilo. Os coleóptilos foram colocados em uma planilha de fundo negro, dividida em células retangulares (40 x 20 mm), classificadas em função da sua diluição e repetição (NITSCH; NITSCH, 1956). Posteriormente, as células foram fotografadas, e as fotos digitalizadas, utilizando-se o programa Photomed® para realizar a medição dos coleóptilos. Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o teste de Welch (MARTÍN; LUNA, 1990). Os resultados se refletem em um gráfico de barras em que o “zero” representa a população do controle - testemunha. Os valores positivos, em relação ao “zero”, indicam estimulação do parâmetro medido e os negativos, inibição dos mesmos (NEPOMUCENO, 2011).

Para auxiliar no estudo das atividades dos compostos majoritários isolados das folhas (**1**, **2** e **3**), os parâmetros IC_{50} e Coeficiente de Partição Octanol/Água (P) foram calculados, utilizando os resultados do bioensaio de coleóptilos, que avaliaram a fitotoxicidade destes compostos.

O IC_{50} é um parâmetro estatístico que corresponde a concentração de um produto que promove 50% de inibição. Para o cálculo deste parâmetro é necessário utilizar curvas do tipo dose-resposta (padrão), definida por quatro parâmetros: a resposta mínima observada (Y_{min}), a resposta máxima medida (Y_{max}), a inclinação (tangente) da curva e a concentração do composto testado que provoca 50% de inibição. Para os cálculos destes parâmetros, utiliza-se o programa GraphPad Prism 4.0®, seleccionando uma equação sigmoideal dose-resposta de inclinação variável. No caso do presente estudo, como todos os perfis medidos são de caráter inibidor,

os dados se normalizaram em relação ao composto de maior atividade e a função limitou-se entre os valores de -100 (máximo de inibição) e 0 (nenhum efeito). A qualidade do ajuste dos dados é representada pelo coeficiente de determinação (R^2) - quadrado do coeficiente de correlação de *Pearson*, que indica a confiabilidade do ajuste (quanto mais próximo de 1, maior a confiabilidade).

O Coeficiente de Partição Octanol/Água (P) é uma medida da lipofilicidade de um composto e é definido como a razão da concentração do mesmo, no equilíbrio, após dissolução em um sistema duas fases, formadas por dois solventes imiscíveis, água e octanol (SILVA; FERREIRA, 2003). O cálculo do Coeficiente de Partição Octanol/Água (P), que representa a mobilidade dos compostos nas células, foi obtido pela fórmula abaixo, e calculados mediante logaritmos distintos: ALogPs (Tetko; Tanchuk, 2002) e MLogP (MORIGUCHI et al., 1994):

$$P = \frac{\text{Concentração em } n\text{-octanol}}{\text{Concentração em água}}$$

Adotou-se o *n*-octanol por apresentar propriedades similares às dos componentes das membranas celulares, no que se refere a parâmetros de solubilidade e características estruturais.

Bioensaio de fitotoxicidade

Para a realização deste bioensaio, sementes foram colocadas sobre papel Whatman nº1 (acondicionadas em placas de Petri com 50 mm de diâmetro) e umedecidas com 1,0 mL da solução teste tamponada (tampão de ácido 2-[N-morfolino]etanosulfônico – MES, 10 mM, com pH ajustado para 6,0). As diluições das frações/produtos, e os tratamentos controle foram os mesmos utilizados para o bioensaio de coleóptilos. Como plantas receptoras foram utilizadas STS (“*Standard Target Species*”) (MACÍAS; CASTELLANO; MOLINILLO, 2000) e plantas daninhas. Como STS foram utilizadas as dicotiledôneas *Lactuca sativa* L. (alface), *Lepidium sativum* L. (agrião), e *Lycopersicon esculentum* Mill. (tomate), e a monocotiledônea *Allium cepa* L. (cebola); e como plantas daninhas, as monocotiledôneas *Echinochloa crus-galli* L. (capim-arroz), *Panicum maximum* Jacq. (capim-colonião), *Urochloa decumbens* (Stapf) R. D. Webster (capim-braquiária) e a dicotiledônea *Amaranthus*

viridis L. (caruru-de-mancha), que são espécies de plantas mundialmente problemáticas (TALBERT; BURGOS, 2007; LORENZI, 2000; WILLIAMS; BARUCH, 2000). Foram depositadas 20 sementes por placa, em quadruplicatas, sendo que cada placa representou uma repetição.

Após a semeadura, as placas de Petri foram vedadas hermeticamente com Parafilm® e acondicionadas na câmara de germinação regulada para 25°C, em condição de obscuridade (com exceção da *U. decumbens* e *E. crus-galli*), onde foram mantidas por períodos que variaram com a espécie, a saber: *L. sativa* (6 dias), *L. sativum* (4 dias), e *L. esculentum* (6 dias), *A. cepa* (7 dias), *E. crus-galli* (8 dias), *Panicum maximum* (8 dias), *U. decumbens* (8 dias) e *A. viridis*. (6 dias). Ao término destes períodos, as placas foram transferidas para um congelador, que permaneceram por, no mínimo, 24 horas, para evitar o crescimento das plântulas e posteriormente favorecer a manipulação destas durante o processo de medida (CASTELLANO, 2002).

Para medir o comprimento da parte aérea e das raízes, as placas foram retiradas do congelador, as plântulas descongeladas foram esticadas sobre um filme plástico adaptado sobre a mesa digitalizadora do Fitomed® (CASTELLANO, 2002) e, com auxílio de uma caneta ótica, foram determinados os comprimentos. Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o teste de Welch (MARTÍN; LUNA, 1990), com significância fixada em 0,01 e 0,05. Os resultados também foram apresentados como porcentagens, em relação ao controle, sendo que “zero” representou o controle, valores positivos representaram estímulo, e negativos, inibição.

Bioensaio hidropônico com os compostos majoritários isolados de folhas de *C. sulphureus*

Na realização deste bioensaio, foram utilizadas plântulas de *A. viridis* e de *P. maximum*, produzidas previamente em vasos com capacidade de 3 L, preenchidos com areia de rio lavada. Aos quinze dias após a emergência das plântulas, a água do molhamento foi substituída por solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) com 1/3 da sua força para climatização das mudas, que foram transferidas, trinta dias após a emergência, para os recipientes contendo as soluções dos compostos avaliados, em suas respectivas concentrações.

Os compostos majoritários testados foram os obtidos das folhas de *C. sulphureus*, as lactonas costunolido (1), reinosina (2) e santamarina (3) (Figura 16), que foram inicialmente avaliados em um bioensaio de coleóptilos de trigo.

Os três produtos puros foram pré-dissolvidos em acetona (5,0%) e diluídos em solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) com 1/3 da sua força e solvidos para as concentrações finais de 1000, 300, 100, 30 e 10 μM . Como controle, utilizou-se solução de Hoagland e Arnon (1950) com 1/3 da sua força acrescida de acetona (5%).

Na confecção do experimento foram utilizados recipientes de vidro com 4,5 cm de diâmetro e 6,0 cm de altura, encapados externamente com papel alumínio. Como substrato adotou-se 40 gramas de esferas maciças de vidro de 3 mm de diâmetro, nas quais adicionou-se 20 mL de solução por recipiente. Cada recipiente com uma plântula representou uma parcela amostral. A condução do experimento deu-se por 15 dias em uma sala climatizada regulada para 26°C, e fotoperíodo de doze horas. O monitoramento, para se manter constante o nível da solução por recipiente, que foi demarcado no momento da instalação do bioensaio, ocorreu a cada dois dias adicionando-se a solução controle. A cada seis dias decorridos da instalação do experimento foi aumentada a força da solução nutritiva em 10% para ajustar as exigências de crescimento e desenvolvimento das plântulas.

Ao final da condução, quinze dias após a transferência das plântulas para os recipientes, estas foram esticadas em papel milimetrado para se medir o comprimento da parte aérea e das raízes, e para a obtenção da biomassa seca de raízes e parte aérea, o material coletado foi acondicionado em sacos de papel que foram colocados em estufa de circulação forçada de ar, em torno de 65° a 70°C, até atingir massa constante. Para *A. viridis* a característica área foliar foi estimada por meio de imagens digitais obtidas por escâner de mesa e processadas pelo software ImageJ sendo expressas em porcentagem de redução em relação ao controle.

Os dados gerados forneceram o IC_{50} para cada produto, que representa a concentração necessária para inibir em 50% o crescimento da área foliar. Para o seu cálculo, os dados obtidos para cada composto majoritário avaliado foram submetidos à análise de regressão, utilizando-se de um modelo sigmoidal de curva dose-resposta, para a adoção das curvas com melhores ajustes, segundo o coeficiente de determinação (R^2).

Para cada espécie, o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em quatro repetições. Todos os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F, com as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Os resultados foram apresentados como porcentagens, em relação ao controle, sendo que “zero” representou o controle, valores positivos representaram estímulo e, negativos, inibição.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização do potencial alelopático de *C. sulphureus* pelo método de liberação por decomposição

Determinou-se, inicialmente, após o lançamento dos quadros amostrais, que em condições de infestação natural, a produção de biomassa de *C. sulphureus* equivaleu a 476,0 g m⁻², sendo esta adotada como dose “X”. As doses de 2X e 4X foram equivalentes a 952,0 e 1094,0 g m⁻², respectivamente.

Tanto a porcentagem de emergência de alface (*L. sativa*) quanto o IVE foram afetados pela maior quantidade de biomassa (4X), apenas quando esta estava em cobertura, ou seja, o aumento na quantidade de biomassa de *C. sulphureus* sobre o substrato promoveu reduções na velocidade de emergência e no número de sementes emergidas, quando comparados aos resultados obtidos pelos outros tratamentos. O TME das sementes de alface foi maior, quando as doses de 2X e 4X foram depositadas em cobertura no substrato, uma vez que as sementes demoraram um pouco mais para emergir nestas condições (6,3 dias) (Tabela 1).

Em relação ao crescimento inicial de plântulas de alface, observou-se que o comprimento da parte aérea foi reduzido apenas pela maior quantidade de *C. sulphureus* incorporada, ou seja, mesmo que a condição de cobertura tenha afetado a parâmetros de emergência (%), IVE e TME), o crescimento da parte aérea não foi inibido por esta condição. O comprimento de raiz também foi afetado, ainda que sensivelmente, pela condição de incorporação da biomassa de *C. sulphureus*. A biomassa seca de parte aérea e raiz foram afetadas pelas maiores doses (2X e 4X), sendo a condição de incorporação também a que promoveu reduções mais acentuadas na produção de biomassa radicular, comparativamente à testemunha e aos demais tratamentos (Tabela 2).

Tabela 1. Porcentagem de emergência, índice de velocidade de emergência (IVE) e tempo médio de emergência (TME) de sementes de *Lactuca sativa* sob o efeito da decomposição de plantas inteiras de *Cosmos sulphureus* em diferentes quantidades e posições no substrato.

<i>Lactuca sativa</i>	% de emergência		IVE		TME (dias)	
	Incorp.**	Cobert.	Incorp.	Cobert.	Incorp.	Cobert.
X*	72,5 Aa	77,0 Aa	24,6 Aa	24,8 Aa	5,6 Aa	5,8 Ab
2 X	61,3 Aa	80,0 Aa	22,4 Aa	17,7 Aab	5,6 Ba	6,3 Aa
4 X	70,0 Aa	43,8 Bb	21,3 Aa	9,4 Bb	5,7 Ba	6,3 Aa
F _{Posição (P)}	0,02 ^{ns}		7,52*		38,95**	
F _{Dose (D)}	3,45 ^{ns}		6,58**		6,46**	
F _{PxD}	5,13*		3,82*		5,66**	
Média Fatorial	67,5		20,0		5,9	
Média Testemunha	66,3		24,1		5,5	
F _{Fat x Test.}	0,03ns		2,38ns		13,45**	
Desvio Padrão	14,4		4,9		0,2	
CV(%)	21,4		23,7		3,3	

Médias seguidas de letras maiúsculas idênticas na linha (Posição) e letras minúsculas na coluna (Doses) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. *Dose de matéria seca (D) equivalente à 476 g/m² (X), 952 g/m² (2X) e 1.904 g/m² (4X). ** Posição no Substrato (P): Incorp. = Incorporado; Cobert. = Cobertura.

Tabela 2. Comprimento e biomassa seca de parte aérea e raiz de *Lactuca sativa* sob o efeito da decomposição de plantas inteiras de *Cosmos sulphureus* em diferentes quantidades e posições no substrato.

<i>Lactuca sativa</i>	Comprimento PA (mm)		Comprimento Raiz (mm)		Biomassa seca PA (g)		Biomassa seca raiz (g)	
	Incorp.**	Cobert.	Incorp.	Cobert.	Incorp.	Cobert.	Incorp.	Cobert.
X*	73,7 Aa	66,4 Aa	48,4 Ba	51,4 Aa	0,69 Aa	0,52 Aa	0,069 Ba	0,098 Aa
2 X	65,3 Aa	56,0 Aa	34,5 Ba	48,1 Aa	0,42 Ab	0,33 Ab	0,052 Bb	0,067 Ab
4 X	36,9 Bb	54,5 Aa	45,5 Ba	45,9 Aa	0,37 Ab	0,28 Ab	0,053 Bb	0,057 Ab
F _{Posição (P)}	0,01 ^{ns}		4,56*		3,63 ^{ns}		6,95*	
F _{Dose (D)}	14,57**		2,64 ^{ns}		7,45**		9,02**	
F _{PxD}	5,44*		0,47 ^{ns}		0,13 ^{ns}		1,49 ^{ns}	
Média Fatorial	58,8		45,7		0,44		0,06	
Média Testemunha	54,9		95,8		0,56		0,11	
F _{Fat x Test.}	0,62 ^{ns}		217,65**		2,32 ^{ns}		35,32**	
Desvio Padrão	9,1		6,3		0,15		0,01	
CV(%)	15,6		11,9		33,7		20,0	

Médias seguidas de letras maiúsculas idênticas na linha (Posição) e letras minúsculas na coluna (Doses) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. *Dose de matéria seca (D) equivalente à 476 g/m² (X); 952 g/m² (2X) e 1.904 g/m² (4X). ** Posição no Substrato (P): Incorp. = Incorporado; Cobert. = Cobertura.

A porcentagem de emergência e IVE do caruru (*A. viridis*) apresentaram o mesmo comportamento – foram afetados negativamente pela incorporação na dose X e, na condição de cobertura, as maiores doses (2X e 4X) também afetaram estes parâmetros. As sementes demoraram mais tempo para emergir, quando havia a presença da maior quantidade de biomassa no substrato, seja incorporada (TME = 5,9 dias) ou em cobertura (TME = 6,6 dias) (Tabela 3). Não foram observados efeitos de inibição ou estímulo no comprimento da parte aérea do caruru, enquanto que a sua biomassa seca foi afetada pela incorporação de *C. sulphureus* ao substrato. O comprimento de raiz foi afetado pelas doses de 2X e 4X, principalmente pela condição de cobertura, com reduções superiores a 30%, quando comparado aos demais tratamentos. A incorporação de *C. sulphureus* tendeu a uma redução no acúmulo de biomassa pelas raízes (Tabela 4).

Tabela 3. Porcentagem de emergência, índice de velocidade de emergência (IVE) e tempo médio de emergência (TME) de sementes de *Amaranthus viridis* sob o efeito da decomposição de plantas inteiras de *Cosmos sulphureus* em diferentes quantidades e posições no substrato.

<i>Amaranthus viridis</i>	% de emergência		IVE		TME (dias)	
	Incorp.**	Cobert.	Incorp.	Cobert.	Incorp.	Cobert.
X*	18,3 Ba	39,0 Aa	11,5 Ba	22,8 Aa	5,6 Ab	5,5 Ab
2 X	15,0 Aa	23,0 Ab	8,0 Aa	12,3 Ab	5,6 Ab	5,7 Ab
4 X	11,7 Aa	10,0 Ab	6,3 Aa	3,8 Ab	5,9 Aa	6,6 Aa
F _{Posição (P)}	7,05*		4,15 ^{ns}		2,61 ^{ns}	
F _{Dose (D)}	6,99*		9,82**		9,41**	
F _{PxD}	4,22*		4,57*		2,42 ^{ns}	
Média Fatorial	19,7		10,8		5,8	
Média Testemunha	38,3		20,0		5,7	
F _{Fat x Test.}	15,65**		10,69**		0,53 ^{ns}	
Desvio Padrão	8,7		5,2		0,4	
CV(%)	38,9		43,1		6,3	

Médias seguidas de letras maiúsculas idênticas na linha (Posição) e letras minúsculas na coluna (Doses) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. *Dose de matéria seca (D) equivalente à 476 g/m² (X); 952 g/m² (2X) e 1.904 g/m² (4X). ** Posição no Substrato (P): Incorp. = Incorporado; Cobert. = Cobertura.

Tabela 4. Comprimento e biomassa seca de parte aérea e raiz de *Amaranthus viridis* sob o efeito da decomposição de plantas inteiras de *Cosmos sulphureus* em diferentes quantidades e posições no substrato.

<i>Amaranthus viridis</i>	Comprimento PA (mm)		Comprimento Raiz (mm)		Biomassa seca PA (g)		Biomassa seca raiz (g)	
	Incorp.**	Cobert.	Incorp.	Cobert.	Incorp.	Cobert.	Incorp.	Cobert.
X*	21,68 Aa	21,30 Aa	46,30 Aa	36,90 Ba	0,029 Ba	0,073 Aa	0,0037 Aa	0,0074 Aa
2 X	22,14 Aa	22,70 Aa	27,61 Ab	24,20 Bb	0,027 Ba	0,045 Aa	0,0032 Aa	0,0050 Aa
4 X	21,78 Aa	23,75 Aa	30,10 Ab	25,10 Bb	0,034 Ba	0,039 Aa	0,0036 Aa	0,0048 Aa
F _{Posição (P)}	0,32 ^{ns}		4,40*		7,02*		3,57 ^{ns}	
F _{Dose (D)}	0,32 ^{ns}		12,44**		1,30 ^{ns}		0,60 ^{ns}	
F _{PxD}	0,26 ^{ns}		0,38 ^{ns}		1,85 ^{ns}		0,35 ^{ns}	
Média Fatorial	22,2		31,7		0,0410		0,0047	
Média Testemunha	27,1		38,8		0,0680		0,0073	
F _{Fat x Test.}	7,77*		3,60 ^{ns}		5,71*		2,69 ^{ns}	
Desvio Padrão	3,20		6,92		0,02		0,002	
CV(%)	13,90		21,19		45,0		58,7	

Médias seguidas de letras maiúsculas idênticas na linha (Posição) e letras minúsculas na coluna (Doses) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. *Dose de matéria seca (D) equivalente à 476 g/m² (X); 952 g/m² (2X) e 1.904 g/m² (4X). ** Posição no Substrato (P): Incorp. = Incorporado; Cobert. = Cobertura.

Para o capim-colonião (*P. maximum*), o efeito promovido pelos tratamentos também foi o mesmo para a porcentagem de emergência e o IVE, destacando-se o efeito de estímulo observado na condição de incorporação, na dose de 4X, para estes dois parâmetros, em relação aos valores apresentados pelos outros tratamentos. O TME das sementes de capim-colonião foi de aproximadamente 6 dias, independentemente do tratamento avaliado (Tabela 5). Em relação aos parâmetros de crescimento inicial, a interação entre os fatores influenciou apenas o comprimento de raiz e parte aérea. Embora um maior número de sementes tenha germinado na presença da maior quantidade de biomassa seca de *C. sulphureus* (4X) incorporada, as plântulas de capim-colonião cresceram menos, uma vez que o comprimento de parte aérea e de raiz foram menores nesta condição. A biomassa seca da parte aérea do capim-colonião não foi afetada, enquanto a biomassa seca de raiz foi afetada negativamente pela maior dose, independentemente da sua posição (Tabela 6).

Tabela 5. Porcentagem de emergência, índice de velocidade de emergência (IVE) e tempo médio de emergência (TME) de sementes de *Panicum maximum* sob o efeito da decomposição de plantas inteiras de *Cosmos sulphureus* em diferentes quantidades e posições no substrato.

<i>Panicum maximum</i>	% de emergência		IVE		TME (dias)	
	Incorp.**	Cobert.	Incorp.	Cobert.	Incorp.	Cobert.
X*	35,8 Ab	52,5 Aa	13,1 Bb	22,6 Aa	6,2 Aa	5,9 Ba
2 X	45,8 Aab	40,8 Aa	16,8 Aab	15,4 Aa	6,2 Aa	6,1 Aa
4 X	63,3 Aa	40,8 Ba	27,1 Aa	15,6 Ba	5,9 Aa	6,1 Aa
F _{Posição (P)}	0,55 ^{ns}		0,19 ^{ns}		1,43 ^{ns}	
F _{Dose (D)}	1,31 ^{ns}		1,45 ^{ns}		1,26 ^{ns}	
F _{PxD}	5,42*		5,64*		4,01*	
Média Fatorial	46,5		18,4		6,1	
Média Testemunha	39,0		18,0		5,9	
F _{Fat x Test.}	1,31 ^{ns}		0,02 ^{ns}		4,67*	
Desvio Padrão	11,9		6,3		0,2	
CV(%)	26,2		34,1		3,1	

Médias seguidas de letras maiúsculas idênticas na linha (Posição) e letras minúsculas na coluna (Doses) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. *Dose de matéria seca (D) equivalente à 476 g/m² (X); 952 g/m² (2X) e 1.904 g/m² (4X). ** Posição no Substrato (P): Incorp. = Incorporado; Cobert. = Cobertura.

Tabela 6. Comprimento e biomassa seca de parte aérea e raiz de *Panicum maximum* sob o efeito da decomposição de plantas inteiras de *Cosmos sulphureus* em diferentes quantidades e posições no substrato.

<i>Panicum maximum</i>	Comprimento PA (mm)		Comprimento Raiz (mm)		Biomassa seca PA (g)		Biomassa seca raiz (g)	
	Incorp.**	Cobert.	Incorp.	Cobert.	Incorp.	Cobert.	Incorp.	Cobert.
X*	91,5 Aa	91 Ab	120,1 Aa	112,1 Aa	0,91 Aa	1,05 Aa	0,202 Aa	0,164 Aa
2 X	69,1 Bb	105,8 Aa	86,6 Bb	104,9 Aab	1,16 Aa	1,15 Aa	0,179 Aab	0,156 Aab
4 X	70,7 Bb	95,3 Aab	80,6 Bb	100,3 Ab	1,02 Aa	1,12 Aa	0,089 Ab	0,138 Ab
F _{Posição (P)}	50,47**		16,81**		0,55 ^{ns}		0,04 ^{ns}	
F _{Dose (D)}	2,78 ^{ns}		40,68**		1,02 ^{ns}		4,31*	
F _{PxD}	14,65**		12,61**		0,18 ^{ns}		1,95 ^{ns}	
Média Fatorial	87,2		100,9		1,07		0,15	
Média Testemunha	89,1		124,6		1,11		0,24	
F _{Fat x Test.}	0,24 ^{ns}		12,61**		0,18 ^{ns}		1,95 ^{ns}	
Desvio Padrão	7,0		6,1		0,2		0,05	
CV(%)	8,0		5,8		22,7		29,20	

Médias seguidas de letras maiúsculas idênticas na linha (Posição) e letras minúsculas na coluna (Doses) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. *Dose de matéria seca (D) equivalente à 476 g/m² (X); 952 g/m² (2X) e 1.904 g/m² (4X). ** Posição no Substrato (P): Incorp. = Incorporado; Cobert. = Cobertura.

O número final de sementes emergidas, geralmente, pode ser um parâmetro pouco sensível à presença de aleloquímicos (OLIVEIRA et al., 2012). Entretanto, no presente trabalho, observou-se que os parâmetros relacionados à emergência mostraram-se sensíveis ao efeito dos tratamentos (dose e condição) ou à interação entre eles. O tempo médio de emergência (TME) é um parâmetro que apresenta maior sensibilidade à presença de aleloquímicos, uma vez que muitos deles permitem que a semente germine e consiga emergir, mas com um pequeno atraso, (OLIVEIRA et al., 2004), e conseqüentemente, prejudicam o estabelecimento das espécies no ambiente, visto que o estágio de plântula é o período mais susceptível à influência de fatores externos (FENNER 2000; ADKINS et al. 2007). O índice de velocidade de emergência (IVE) também é uma variável importante para o estabelecimento das plântulas, pois é um indicativo da rapidez e da capacidade de emergência das mesmas. Sementes que demoram mais para emergir são mais propensas ao ataque de predadores, pragas e patógenos, por exemplo. Plantas com emergência atrasada podem apresentar menor crescimento do que as que emergirem precocemente e sofrer competição intra e interespecífica por recursos do meio (MEROTTO JR. et al., 1999; FLECK et al., 2002) ou podem ser excluídas da comunidade (RADOSEVICH et al., 1997).

Em relação ao efeito dos aleloquímicos no crescimento inicial das plântulas, quando estes são liberados pela planta doadora e não possuem concentração suficiente para promover efeito inibitório, eles podem ocasionar estímulo no crescimento e/ou desenvolvimento de outras plantas. Dependendo da concentração, os aleloquímicos podem causar inibição ou estímulo (CARVALHO, 1993). É importante lembrar que os efeitos benéficos de uma planta sobre outra não devem ser desvinculados do conceito de alelopatia, uma vez que um dado composto químico pode ter efeito inibitório ou estimulante, dependendo da concentração do mesmo no meio ambiente (RICE, 1979).

Observou-se no presente trabalho que, de uma forma geral, os parâmetros de crescimento avaliados, para as três plantas-teste, foram mais sensíveis à condição de incorporação de *C. sulphureus* ao substrato. A principal diferença entre manter uma biomassa vegetal em cobertura ou incorporá-la ao solo está associada à velocidade de decomposição deste material, que ocorre de forma mais lenta quanto este se encontra em cobertura (ALMEIDA, 1998), ou seja, a incorporação de *C.*

sulphureus, possivelmente, acelerou o processo de decomposição liberando aleloquímicos, que inibiram o crescimento inicial das plantas-teste.

Por outro lado, uma vez que a ação de aleloquímicos depende da concentração, a incorporação pode promover uma diluição destes aleloquímicos no volume do solo (REZENDE et al., 2003), ou seja, a decomposição do material em cobertura, por ser mais lenta, pode ser mais vantajosa dependendo da situação, uma vez que promove um maior período da ação alelopática, desde que seja atingido o nível crítico da concentração de aleloquímicos no solo.

Conforme já mencionado, no presente estudo, objetivou-se simular um efeito de acúmulo de aleloquímicos no solo ao longo do tempo. Para tanto, avaliou-se o efeito de maiores quantidades de biomassa seca de *C. sulphureus*, e, por consequência, maiores concentrações dos aleloquímicos liberados no ambiente. Para as três plantas receptoras, observou-se que a maior quantidade de material vegetal promoveu maior efeito inibitório, principalmente no crescimento inicial das espécies, corroborando o observado por Reigosa et al. (1999), que afirmaram haver evidências consideráveis de que alguns fenômenos alelopáticos somente podem ser explicados em termos de acumulação dos aleloquímicos no solo.

A decomposição de resíduos vegetais é a principal fonte de liberação dos aleloquímicos no solo. Durante o processo de decomposição microbiana ocorre a perda da integridade da membrana celular, o que permite a liberação de grande número de compostos que impõem toxicidade às plantas vizinhas (MARASCHIN-SILVA; ÁQUILA, 2006). Porém, a liberação de aleloquímicos no solo por meio da decomposição pode ser um processo mais lento (REZENDE et al., 2003), o que pode justificar a ausência de efeitos, sejam inibitórios ou estimulatórios, sobre alguns dos parâmetros avaliados. Provavelmente, pelo fato da decomposição ser um processo moroso, pode ser que os aleloquímicos não tenham atingido o nível crítico de ação em algumas das situações observadas. Além disso, o processo de liberação de aleloquímicos por decomposição não é uniforme, variando conforme o ecossistema (REIGOSA et al., 1999).

Geralmente, os efeitos causados tendem a ser dependentes da concentração dos aleloquímicos, ou seja, tendem a ser mais acentuados em concentrações mais altas, sendo essa tendência observada nos bioensaios de crescimento, por exemplo. Entretanto, Reigosa et al. (1999) afirmam que os efeitos alelopáticos podem escapar

deste padrão, já que os efeitos observados resultam do somatório de uma série de alterações moleculares. Esse comportamento inverso do efeito dose-dependente da concentração pode estar relacionado à dificuldade de absorção dos aleloquímicos presentes em altas concentrações. Já nas concentrações mais baixas a absorção dos aleloquímicos teria melhor eficiência e com isso, um maior efeito inibitório.

O efeito alelopático das substâncias após a liberação no solo é, geralmente, muito menor do que o impacto gerado em ensaios conduzidos em laboratório. Por exemplo, a concentração do éster de dehidromatricária (composto alelopático produzido por *Solidago altissima*) necessária para reduzir em 50% o desenvolvimento de plântulas de arroz foi 20 vezes maior no solo do que em meio de cultura com ágar (ITO et al., 1998). Também, extratos de folhas de *Trichostema lanceolatum*, muito fitotóxicos em ensaios em placas de petri, produziram pequeno efeito quando adicionados ao solo (HEISEY; DELWICHE, 1985). Adicionalmente, resultados positivos para alelopatia, obtidos em laboratório, podem não se repetir em condições naturais, devido à ocorrência simultânea de diversos fatores bióticos e abióticos que podem mascarar este fenômeno (MARASCHIN-SILVA; ÁQUILA, 2006).

As diferenças observadas entre situações de laboratório e de campo ocorrem porque, para que haja manifestação de alelopatia, primeiramente a substância deve ser liberada ou transformada e, posteriormente, acumulada em concentração que propicie o efeito inibitório. A liberação do aleloquímico não garante fitotoxicidade porque, a exemplo dos herbicidas, os aleloquímicos podem ser retidos, transformados pela biota, ou ainda, transportados para outros locais, por meio da percolação promovida pela chuva (CHEN, 1992), entre outros fatores que fazem deste processo extremamente complexo. Dentre estes processos, ainda que haja poucas informações sobre o comportamento dos aleloquímicos no solo, os fenômenos de degradação microbiana e adsorção ao solo assumem importância destacada.

Sabe-se que os microrganismos presentes no solo podem atuar degradando ou alterando os aleloquímicos liberados pela planta doadora, modificando, assim, a concentração e/ou atividade destas substâncias, afetando as interações alelopáticas entre as espécies (INDERJIT, 2005). A maior afinidade dos microrganismos com as substâncias alelopáticas e sua melhor distribuição no solo, capacita-os a metabolizá-

las mais rapidamente do que as raízes das plantas (BLUM, 1999; SCHMIDT; LEY, 1999). Desta forma, a maior recalcitrância dos compostos alelopáticos é altamente desejável para que ocorra a manifestação do fenômeno alelopático.

Neste experimento, utilizou-se como substrato um Latossolo Vermelho Escuro, com predominância da fração argila, o que pode ter influenciado na intensidade da atividade dos compostos alelopáticos. É conhecido que o efeito das substâncias inibidoras é mais pronunciado em solos arenosos do que naqueles ricos em matéria orgânica, pois a inativação e destruição dos aleloquímicos são mais lentas em solos pobres. Em geral, os compostos alelopáticos estão sujeitos à adsorção tanto às frações minerais quanto às frações da matéria orgânica dos solos (SCHMIDT; LEY, 1999). Solos com elevados teores de matéria orgânica ou de argila geralmente retêm mais compostos alelopáticos do que solos arenosos (DALTON et al., 1989; BARCIK, 1999). O tipo de argila e o teor de óxidos de ferro e alumínio podem influenciar a habilidade do solo em adsorver substâncias fenólicas (HUANG et al., 1977). Baseado nesses aspectos, é de se esperar maior influência alelopática em solos arenosos do que em solos ricos em minerais de argila, como o solo adotado neste estudo.

Conclui-se que provavelmente compostos alelopáticos são liberados na decomposição de plantas de *C. sulphureus*, uma vez que a biomassa seca da planta, quando em processo de decomposição, afetou alguns parâmetros de emergência e crescimento inicial das plantas receptoras (*L. sativa*, *A. viridis* e *Panicum maximum*), principalmente quando a maior quantidade de material vegetal encontrava-se incorporada ao substrato. Porém, apenas com os resultados obtidos, não é possível afirmar que esta seja a principal via de liberação dos aleloquímicos de *C. sulphureus*.

5.2. Caracterização do potencial alelopático de *C. sulphureus* por exsudação radicular (planta “in vivo”)

5.2.1. Utilização do método hidropônico para a coleta dos exsudatos

Para avaliar a toxicidade das frações acetônica (acetona) e metanólica (metanol), obtidas nos três estádios de desenvolvimento de plantas de *C. sulphureus*

(vegetativo, pleno florescimento e final do florescimento), adotou-se a metodologia de bioensaios de coleótilos de trigo, que é um teste rápido e sensível a uma ampla variedade de substâncias bioativas (CUTLER; HOAGLAND; CUTLER, 2000; NEPOMUCENO, 2011).

Observou-se que a fração metanol do exsudato coletado no estágio vegetativo propiciou maior redução no crescimento dos coleótilos de trigo, comparativamente ao efeito observado para a fração acetona. O crescimento dos coleótilos foi reduzido em 45% na concentração de 800 ppm da fração metanol, redução esta que se manteve em 40%, na concentração de 400 ppm. A partir da terceira concentração (200 ppm), observou-se uma tendência à queda do potencial citotóxico da fração. Não foram observadas reduções muito significativas, quando avaliado o efeito da fração acetona sobre o alongamento dos coleótilos de trigo (Figura 7).

As duas frações obtidas do exsudato coletado no estágio de pleno florescimento não apresentaram dados muito conclusivos, visto que não houve uma tendência de redução ou estímulo nos resultados obtidos. As maiores reduções observadas para as frações acetona (17%) e metanol (46%) ocorreram na concentração de 800 ppm (Figura 7).

Espera-se que os efeitos dos aleloquímicos presentes nas frações promovam inibições em altas concentrações e estímulos em baixas concentrações. Porém, muitas vezes os resultados obtidos não são predizíveis de acordo com a concentração. Reigosa et al. (1999) afirmam que são comuns esses efeitos oscilatórios nestes tipos de bioensaio e indicam que este comportamento pode ser devido ao modo de ação dos compostos alelopáticos. Os mesmos autores ressaltam que cada processo fisiológico tem resposta diferente a certas doses de cada aleloquímico. Tais compostos, mesmo em concentrações mínimas, podem agir diretamente sobre a constituição do organismo, ativando ou inibindo o crescimento, assim como fazem com as plantas vizinhas, quando liberados no ambiente (BLUM, 1999).

Os aleloquímicos presentes em uma planta variam em quantidade e qualidade dependendo de aspectos como idade e estágio de desenvolvimento da planta (BOURGAUD et al., 2001), sendo que a constância de concentrações de metabólitos secundários é praticamente uma exceção (GOBBO-NETO; LOPES,

2007), o que pode justificar a menor atividade apresentada pelo exsudato coletado do estágio de pleno florescimento. Como exemplo, tem-se o caso das lactonas sesquiterpênicas produzidas em *Arnica montana* – enquanto plantas jovens acumulam maioritariamente derivados da helenalina, a concentração destes compostos é reduzida a praticamente zero após aproximadamente seis semanas contadas a partir da formação das folhas; em contrapartida, os níveis de compostos do tipo diidrohelenalina aumentam muito, mantendo-se constantes por um longo período (SCHMIDT; BOMME; ALFERMANN, 1998).

Para o final do florescimento, novamente foram observadas reduções acentuadas, para as duas frações, principalmente nas duas primeiras concentrações (800 e 400 ppm), com a fração metanol sendo mais ativa que a fração acetona, com reduções semelhantes às obtidas no estágio vegetativo (Figura 7).

Verificou-se que o exsudato obtido na fração metanol, para os três estádios da planta, foi o mais citotóxico, proporcionando maior inibição no alongamento do coleóptilo de trigo, principalmente nas concentrações de 800 e 400 ppm. A fração metanol dos estádios vegetativo e final do florescimento proporcionou reduções de até 40%, mesmo na concentração de 400 ppm, o que caracteriza a fração como promissora na busca por compostos bioativos, segundo Macías et al. (2000).

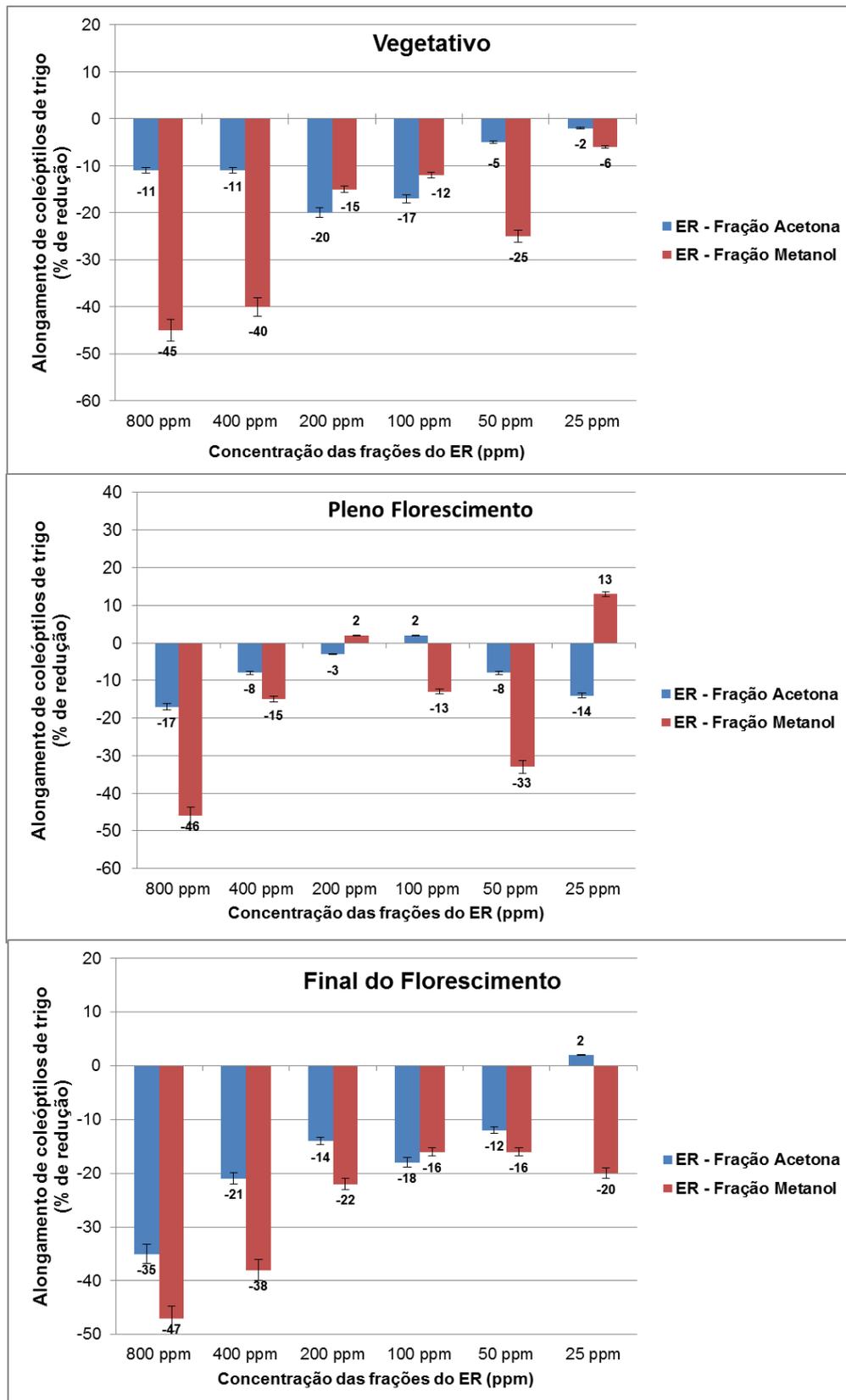


Figura 7. Alongamento de coleóptilos de trigo sob o efeito das frações acetona e metanol obtidas dos exsudatos radiculares (ER) de *Cosmos sulphureus*, coletado no estágio **vegetativo**, **pleno florescimento** e **final do florescimento** sobre o (Valores expressos como diferença percentual do controle).

O metanol é um solvente orgânico que assegura a extração de compostos de alta e média polaridade, devido a sua capacidade de formar pontes de hidrogênio (informação pessoal). Provavelmente, os aleloquímicos presentes nas frações com maior atividade são compostos com caráter mais polar, que podem estar atuando em sinergismo ou antagonismo. Um aleloquímico, geralmente, não é liberado pela planta no meio ambiente como um composto isolado, e a quantidade de aleloquímicos liberada é variável e dependente de fatores externos e fatores intrínsecos à espécie (CHENG; CHENG, 2015). Interações como sinergismo e antagonismo entre diferentes aleloquímicos ocorrem naturalmente (ALBUQUERQUE et al., 2011).

Com o bioensaio de coleótilos foi possível avaliar a bioatividade das frações, auxiliando, portanto, na seleção da fração mais ativa (fração metanol), que posteriormente foi submetida a bioensaios de fitotoxicidade, para avaliar a sua bioatividade na germinação e crescimento inicial de espécies receptoras.

Quando as frações avaliadas mostram atividade de estímulo/inibição, dependendo da concentração, estas podem conter compostos que estão relacionados à função natural de defesa da planta (alelopatia) no ambiente (MACÍAS et al., 1999).

Dessa forma, com base nos resultados supracitados, foram conduzidos bioensaios de fitotoxicidade (germinação) com as frações de metanol dos estádios vegetativo e final do florescimento, que foram as mais bioativas, e os resultados obtidos para as plantas receptoras *A. viridis*, *L. sativa* e *P. maximum* encontram-se apresentados nas Figuras 8, 9 e 10, respectivamente.

A fração metanol dos exsudatos vegetativo e final do florescimento foi altamente fitotóxica ao *A. viridis* na concentração de 800 ppm, reduzindo em praticamente 100% o número de plantas (número de sementes germinadas) e o comprimento de raiz e parte aérea, comparativamente aos valores apresentados pelo tratamento controle (testemunha). Na concentração de 400 ppm apenas a germinação e o crescimento da raiz foram afetados, de forma que o número de plantas foi reduzido em 70% quando submetidas ao efeito do exsudato de *C. sulphureus* no estágio vegetativo, e em 80%, no final do florescimento, enquanto o comprimento de raiz foi 55% e 45% menor que os valores apresentados pelo tratamento controle, para os estádios vegetativo e final do florescimento,

respectivamente. Na concentração de 200 ppm, observou-se efeito tóxico apenas do exsudato radicular de plantas de *C. sulphureus* no final do florescimento sobre a germinação e o comprimento de raiz, ainda que em menor intensidade, comparativamente às maiores concentrações avaliadas. Nas concentrações mais diluídas (100, 50 e 25 ppm), praticamente não foram observados efeitos dos exsudatos coletados nas duas épocas, sobre os parâmetros avaliados (Figura 8).

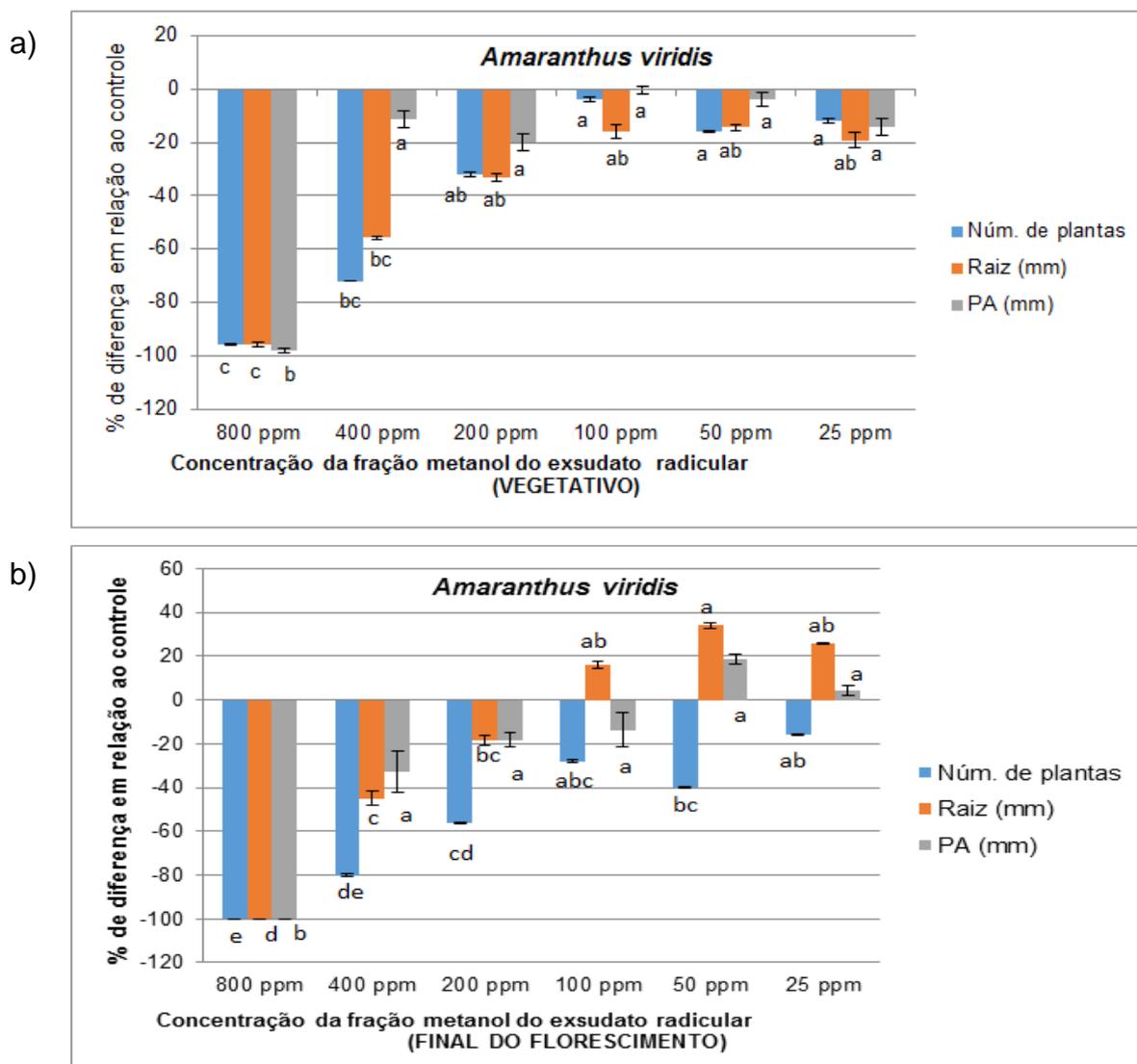


Figura 8. Germinação e crescimento inicial de *A. viridis* sob o efeito da fração metanol obtida do exsudato radicular (ER) de *Cosmos sulphureus*, **estádio vegetativo** (a) e **pleno florescimento** (b) (Obs.: Valores expressos como diferença percentual do controle; Médias seguidas de mesmas letras, dentro de cada parâmetro avaliado, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Médias seguidas por "a" não diferem do tratamento controle (testemunha) pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade).

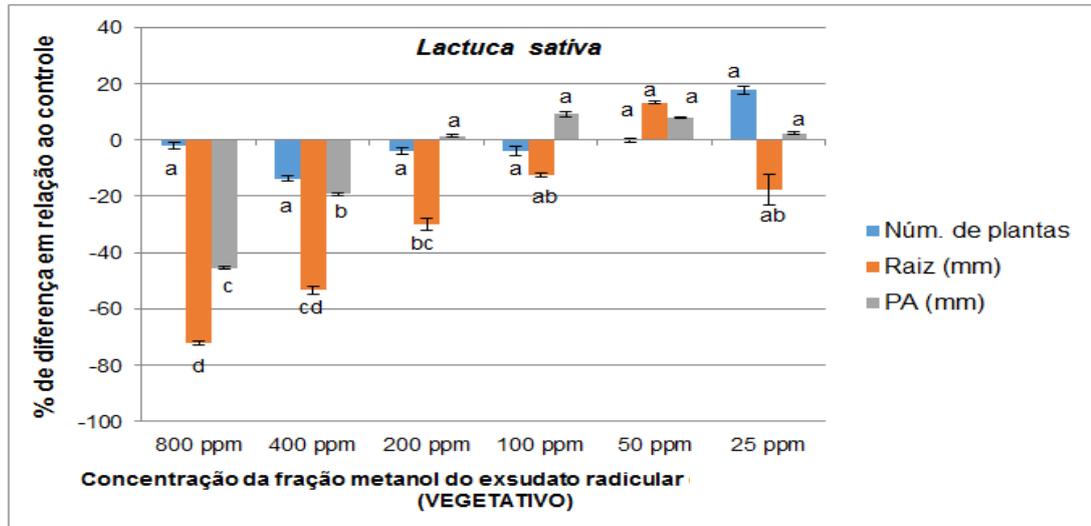
A fração metanol dos exsudatos coletados de plantas de *C. sulphureus* no estágio vegetativo não afetou o número de plantas de *L. sativa* emergidas, comparativamente ao controle. O crescimento da raiz foi o parâmetro mais inibido, com reduções de aproximadamente 70%, 57% e 30% nas concentrações de 800, 400 e 200 ppm, respectivamente. O comprimento de raiz foi reduzido em 42% e 20%, nas duas primeiras concentrações (800 e 400 ppm). A partir da concentração de 100 ppm não foram observados resultados que diferiram estatisticamente dos obtidos pela testemunha (Figura 9).

A germinação de *L. sativa* foi o único parâmetro afetado pela fração metanol do exsudato coletado no final do florescimento de *C. sulphureus*, resultado contrário ao observado para o efeito do exsudato vegetativo. As reduções observadas na germinação foram de 23%, em média, ressaltando-se estímulo deste parâmetro nas concentrações mais diluídas (50 e 25 ppm) (Figura 9).

Comparando estes resultados, um pressuposto é que as propriedades alelopáticas dos compostos presentes nos exsudato radicular dos estádios vegetativo e final do florescimento de *C. sulphureus* possam ser distintas. Uma vez que *C. sulphureus*, em fase de final de florescimento, encontrava-se mais próxima ao processo de encerramento de seu ciclo, é provável que as substâncias liberadas por ela tenham o efeito mais proeminente no sentido de inibir a germinação, e, portanto, o estabelecimento de plantas vizinhas, garantindo, assim, a perpetuação de sua espécie no ambiente.

Lactuca sativa é uma espécie amplamente utilizada como planta teste nos estudos de alelopatia (RIBEIRO et al., 2012) devido a sua sensibilidade a agentes químicos, rápida germinação, crescimento linear em ampla faixa de variação de pH e baixa sensibilidade aos potenciais osmóticos (ARAÚJO; MONTEIRO, 2005). O fato de *L. sativa* ter sido a espécie menos afetada pelos exsudatos de *C. sulphureus* pode ser atribuído ao fato desta planta também pertencer à família Asteraceae, assim como *C. sulphureus*, e ser mais tolerante à ação dos compostos secundários produzidos por esta. A maior tolerância de *L. sativa* ao efeito alelopático de *C. sulphureus* foi corroborado pelos resultados apresentados no item 5.3.1 deste trabalho.

a)



b)

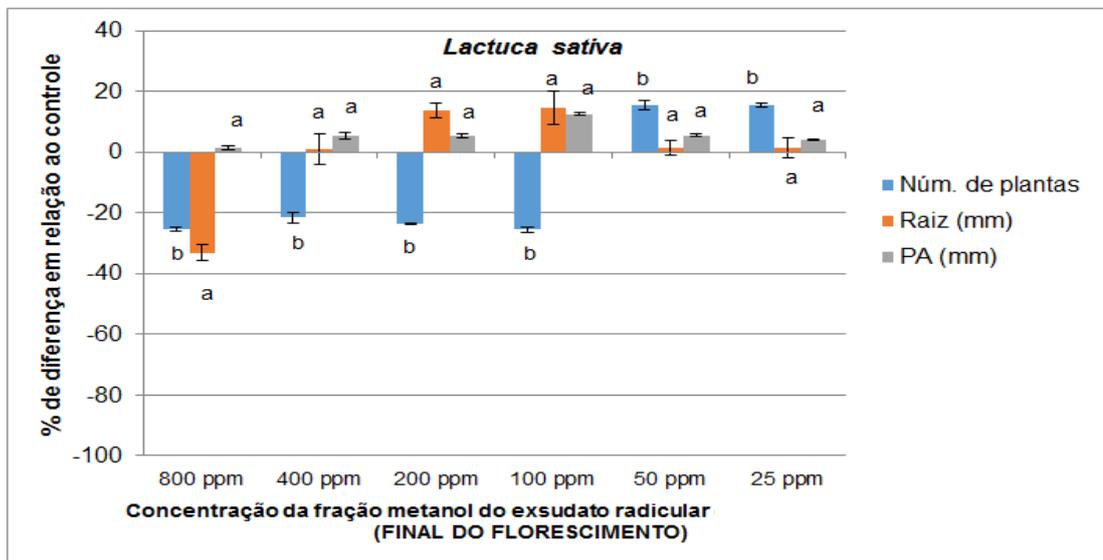


Figura 9. Germinação de crescimento inicial de *L. sativa* sob o efeito da fração metanol obtida do exsudato radicular (ER) de *Cosmos sulphureus*, **estádio vegetativo** (a) e **pleno florescimento** (b), sobre a (Obs.: Valores expressos como diferença percentual do controle; Médias seguidas de mesmas letras, dentro de cada parâmetro avaliado, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Médias seguidas por “a” não diferem do tratamento controle (testemunha) pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade).

O número de plantas germinadas de *P. maximum* foi o parâmetro mais afetado pelos compostos presentes nos exsudatos radiculares de *C. sulphureus*, tanto do estágio vegetativo quanto do final do florescimento. Este parâmetro foi

reduzido em mais de 45%, mesmo na concentração mais diluída (25 ppm), independentemente do estágio de crescimento de *B. sulphurea* (Figura 10).

O exsudato vegetativo de *C. sulphureus* teve efeito inibitório sobre o comprimento de parte aérea de *P. maximum* apenas na maior concentração (800 ppm), reduzindo em 50% este parâmetro comparativamente aos resultados observados na testemunha. Nas demais concentrações não houve efeito. Os resultados obtidos para o comprimento de raiz de *P. maximum* também não diferiram estatisticamente daqueles obtidos pela testemunha, ainda que o exsudato vegetativo de *C. sulphureus* tenha reduzido este parâmetro em 38%, na concentração de 800 ppm. Já o exsudato radicular de plantas de *C. sulphureus*, em final do florescimento, não foi tóxico ao crescimento de raiz e parte aérea de *P. maximum*, em nenhuma das concentrações avaliadas (Figura 10). Provavelmente, para esta espécie, pode ser que ou o nível crítico de ação dos aleloquímicos sobre o seu crescimento inicial não tenha sido atingido ou a composição dos compostos presentes neste exsudato radicular não foram fitotóxicos.

Os exsudatos radiculares, caracterizados por serem compostos de baixo peso molecular, representam um importante mecanismo de liberação de aleloquímicos na rizosfera, e o conhecimento da composição química destes compostos é de fundamental importância para a compreensão aprofundada das interações entre os sistemas radiculares da planta doadora e de outras plantas vizinhas. Entretanto, o conhecimento atual sobre a química da rizosfera das plantas é extremamente limitado. Uma das principais dificuldades encontradas na condução de pesquisas com exsudatos radiculares baseia-se no fato de que os compostos químicos de interesse estão geralmente presentes em concentrações extremamente baixas (TANG; YOUNG, 1981).

No presente trabalho observou-se que as substâncias liberadas por *C. sulphureus* via raiz apresentaram algum efeito fitotóxico sobre as espécies receptoras, principalmente sobre *A. viridis* e *P. maximum*, que foram as espécies mais sensíveis.

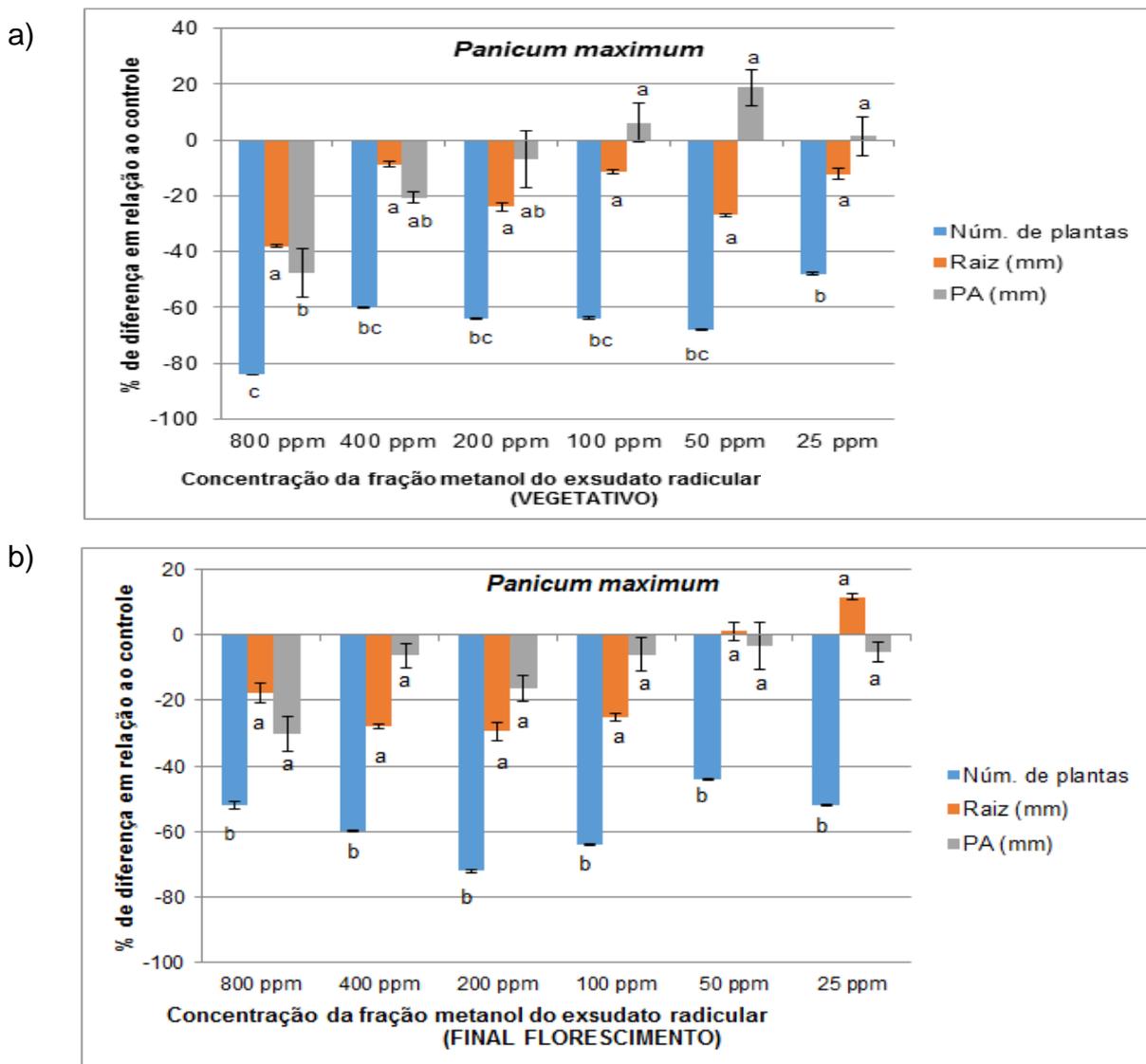


Figura 10. Germinação de crescimento inicial de *P. maximum* sob o efeito da fração metanol obtida do exsudato radicular (ER) de *Cosmos sulphureus*, **estádio vegetativo** (a) e **pleno florescimento** (b) (Obs.: Valores expressos como diferença percentual do controle; Médias seguidas de mesmas letras, dentro de cada parâmetro avaliado, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Médias seguidas por “a” não diferem do tratamento controle (testemunha) pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade).

A identificação dos compostos presentes no exsudato radicular está sendo realizada pela equipe do Laboratório de Química Orgânica (Universidad de Cádiz – Espanha), com a utilização de técnicas cromatográficas mais sensíveis e precisas. Porém, por meio de cromatografia de camada delgada (Figura 11), já foi possível detectar a presença das lactonas reinosina e santamarina no exsudato radicular e

relacionar, portanto, a atividade apresentada pelo exsudato radicular de *C. sulphureus* à presença destas lactonas sesquiterpênicas.



Figura 11. Detalhes da placa cromatográfica de camada delgada (CCD), representando o exsudato radicular (ER), e as lactonas sesquiterpênicas reinosina (R) e santamarina (SM) (apresentadas na Figura 16).

5.2.2. Utilização do método de garrafas em posição invertida (efeito direto)

Realizou-se um experimento complementar para a avaliação do efeito direto dos exsudatos de *C. sulphureus* sobre a emergência e crescimento inicial (incluindo a produção de biomassa seca) das espécies receptoras mais afetadas nos bioensaios de fitotoxicidade: *A. viridis* e *P. maximum* (resultados apresentados no item 5.2.1).

Para a planta receptora *A. viridis*, avaliou-se o efeito dos exsudatos radiculares de *C. sulphureus* em três estádios de desenvolvimento da planta (vegetativo, pleno florescimento e final do florescimento), sobre a sua emergência e o seu crescimento inicial. O número de sementes de *A. viridis* que germinou na presença de *C. sulphureus* foi afetado consideravelmente, de forma que o número final de plantas dos tratamentos que recebiam os exsudatos radiculares foi três vezes menor que o valor apresentado nos tratamentos sem *C. sulphureus* (testemunha), comportamento observado nos três estádios avaliados. Dentro de cada estádio fenológico observou-se que o número de plantas (sementes germinadas) de *A. viridis* foi diminuindo de acordo com o crescimento e desenvolvimento de *C. sulphureus* (Tabela 7). Provavelmente, este efeito foi

observado pelo aumento na produção e concentração dos aleloquímicos. Sabe-se que, com o desenvolvimento das plantas de *C. sulphureus*, começou a ocorrer uma competição intraespecífica (principalmente por espaço), o que pode ter promovido uma maior produção de aleloquímicos, uma vez que condições de estresse frequentemente aumentam a produção de aleloquímicos, aumentando o potencial de interferência alelopática (EINHELLIG, 1995).

O comprimento da parte aérea de *A. viridis* também foi afetado pelos exsudatos das plantas de *C. sulphureus* em todos os estádios avaliados, destacando-se o final do florescimento, no qual as plantas que recebiam os exsudatos radiculares de *C. sulphureus* diretamente cresceram três vezes menos que a testemunha. Ainda que o número de plantas que germinaram na testemunha tenha diminuído com o aumento da força da solução nutritiva, estas plantas cresceram mais, beneficiando-se, portanto, da maior quantidade de nutrientes no meio, uma vez que a salinidade da solução nutritiva afeta mais a germinação/emergência e menos o crescimento inicial das plantas (Tabela 7).

O mesmo efeito foi observado sobre o crescimento das raízes de *A. viridis*, ou seja, no final do florescimento, o comprimento das raízes de *A. viridis* que recebiam os exsudatos radiculares foi 42% menor que o comprimento observado plantas-testemunha, mesmo que as raízes das plantas-testemunha tenham crescido mais, por beneficiarem-se da maior quantidade de nutrientes oferecida pela solução nutritiva neste estádio de desenvolvimento (Tabela 7).

Os aleloquímicos liberados por *C. sulphureus* via exsudação radicular reduziram em mais de 94% a produção de biomassa seca da parte aérea de *A. viridis*. O acúmulo de biomassa seca de raiz de *A. viridis* também foi afetado pelos exsudatos liberados por *C. sulphureus*, com reduções de 66%, 83% e 80% nos estádios vegetativo, pleno florescimento e final do florescimento, respectivamente, em relação aos valores apresentados pelas testemunhas correspondentes (Tabela 7).

Para *P. maximum*, os efeitos dos exsudatos radiculares de *C. sulphureus* foram avaliados apenas em dois estádios fenológicos: pleno florescimento e final do florescimento (Tabela 8). Isto porque as sementes apresentaram problemas na germinação, mesmo nos tratamentos da testemunha.

O número de plantas germinadas não foi afetado pela presença de *C. sulphureus* em nenhum dos estádios fenológicos avaliados, não corroborando os resultados obtidos nos bioensaios de sementes conduzidos em laboratório, e descritos no item 5.2.1. Isto porque há a necessidade de se atingir o nível crítico de concentração de determinado aleloquímico para que ele tenha ação alelopática, o que provavelmente não ocorreu no presente experimento (Tabela 8).

Para os parâmetros de crescimento foram observados efeitos mais proeminentes que os obtidos nos bioensaios de fitotoxicidade. O comprimento de parte aérea de *P. maximum* foi reduzido em 50% quando as plantas foram submetidas aos exsudatos radiculares de *C. sulphureus* liberados em pleno e final do florescimento. Observou-se possível efeito da solução nutritiva na testemunha, porém com comportamento contrário ao observado para *A. viridis* (Tabela 8). As plantas de *P. maximum* da testemunha cresceram menos com o aumento da força da solução nutritiva, possivelmente por esta espécie ser mais sensível à salinidade, uma vez que as plantas cultivadas, de uma maneira geral, apresentam diferentes repostas à salinidade, variando desde sensíveis até tolerantes (MAAS; HOFFMAN, 1977). As raízes de *P. maximum*, quando em contato com os exsudatos, tenderam a crescer menos que as plantas da testemunha (Tabela 8).

Em condições ambientais, a aproximação espacial entre planta produtora do composto alelopático e planta receptora também otimiza o aproveitamento dos aleloquímicos antes que eles sejam inativados no solo. Por exemplo, o desenvolvimento de plantas de *Ambrosia dumosa* foi inibido quando as raízes de plantas diferentes se tocaram, mas não houve inibição quando houve contato entre raízes da mesma planta (MAHALL; CALLAWAY, 1992). Como muitas substâncias são rapidamente inativadas por microrganismos quando em contato com o solo, a chance de ocorrer interação alelopática aumenta quando aquelas são liberadas nas proximidades ou em contato com a planta receptora.

Observou-se efeito dos estádios fenológicos, de forma que os parâmetros avaliados foram mais afetados no final do florescimento em comparação com o estágio de pleno florescimento. A idade e o desenvolvimento da planta podem influenciar não só a quantidade total de metabólitos produzidos, mas também as proporções relativas dos componentes da mistura destes aleloquímicos (DOAN; ERVIN; FELTON, 2004).

O acúmulo de biomassa seca da parte aérea e raízes de *P. maximum* foi afetado na condição da presença de *C. sulphureus*, ou seja, os aleloquímicos liberados afetaram significativamente a produção de biomassa seca pelas plantas. As plantas acumularam menos biomassa seca no final do florescimento, provavelmente devido ao acúmulo dos aleloquímicos liberados e também ao aumento da quantidade de nutrientes.

Observou-se efeito alelopático dos exsudatos radiculares de *C. sulphureus* sobre a emergência, crescimento inicial e acúmulo de biomassa de *A. viridis* e *P. maximum*, e os efeitos observados no experimento cuja metodologia avaliou o efeito direto dos exsudatos radiculares (planta “in vivo”) mostraram-se mais acentuados que os obtidos no bioensaio de germinação de sementes, conduzido em laboratório.

Tabela 7. Emergência e crescimento inicial de *Amaranthus viridis* (caruru) sob o efeito direto da exsudação de *Cosmos sulphureus* nos estádios pleno florescimento e final do florescimento.

CARURU	Número de plantas		Compr. parte aérea (mm)		Compr. raiz (mm)		Biomassa seca parte aérea (g)		Biomassa seca raiz (g)		
	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	
	C.	C.	C.	C.	C.	C.	C.	C.	C.	C.	
	<i>sulphureus</i>	<i>sulphureus</i>	<i>sulphureus</i>	<i>sulphureus</i>	<i>sulphureus</i>	<i>sulphureus</i>	<i>sulphureus</i>	<i>sulphureus</i>	<i>sulphureus</i>	<i>sulphureus</i>	<i>sulphureus</i>
Vegetativo	7,0 Ba	22,2 Aa	14,1 Aa	17,0 Ab	45,640 Aa	44,220 Ab	0,004 Ba	0,126 Aa	0,008 Ba	0,024 Ab	
Pleno Florescimento	3,6 Bab	14,0 Ab	11,9 Ba	22,0 Ab	28,710 Ab	32,310 Ab	0,009 Ba	0,159 Aa	0,005 Ba	0,030 Ab	
Final do Florescimento	1,7 Bb	6,0 Ac	12,2 Ba	38,4 Aa	41,000 Bab	71,010 Aa	0,011 Ba	0,183 Aa	0,011 Ba	0,057 Aa	
F _{Estádio da planta (E)}	59,42**		13,33**		20,46**		0,27ns		7,43**		
F _{Condição (C)}	152,94**		61,65**		10,82**		57,73**		49,00**		
F _{ExC}	15,13**		17,14**		8,93**		2,12ns		4,83*		
Desvio Padrão	2,4		5,0		9,780		0,1		0,0		
CV(%)	26,7		26,0		22,3		60,8		55,5		

Médias seguidas de letras maiúsculas idênticas na linha (Condição: Com *C. sulphureus*/Sem *C. sulphureus*) e letras minúsculas na coluna (Estádio da planta: Vegetativo, Pleno Florescimento, Final do Florescimento) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 8. Emergência e crescimento inicial de *Panicum maximum* (capim-colonião) sob o efeito direto da exsudação de *Cosmos sulphureus* nos estádios pleno florescimento e final do florescimento.

CAPIM-COLONIÃO	Número de plantas		Compr. parte aérea (mm)		Compr. raiz (mm)		Biomassa seca parte aérea (g)		Biomassa seca raiz (g)	
	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem
	C.	C.	C.	C.	C.	C.	C.	C.	C.	C.
	<i>sulphureus</i>	<i>sulphureus</i>	<i>sulphureus</i>	<i>sulphureus</i>	<i>sulphureus</i>	<i>sulphureus</i>	<i>sulphureus</i>	<i>sulphureus</i>	<i>sulphureus</i>	<i>sulphureus</i>
Pleno Florescimento	12,2 Aa	13,6 Aa	27,3 Ba	52,2 Aa	67,360 Aa	86,360 Aa	0,132 Ba	0,685 Aa	0,046 Ba	0,152 Aa
Final do Florescimento	11,2 Aa	12,4 Aa	15,9 Bb	31,8 Ab	44,450 Ab	46,860 Ab	0,048 Aa	0,130 Ab	0,013 Aa	0,034 Ab
F _{Estádio da planta (E)}	0,52ns		13,63**		29,94**		34,87**		34,99**	
F _{Condição (C)}	0,73ns		22,31**		3,53ns		34,48**		25,41**	
F _{ExC}	0,00ns		1,10ns		2,12ns		18,94**		11,07**	
Desvio Padrão	3,4		9,6		12,740		0,1		0,0	
CV(%)	27,6		30,9		20,8		48,5		46,2	

Médias seguidas de letras maiúsculas idênticas na linha (Condição: Com *C. sulphureus*/Sem *C. sulphureus*) e letras minúsculas na coluna (Estádio da planta: Pleno Florescimento, Final do Florescimento) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

5.3. Fracionamento e identificação dos extratos ativos de *C. sulphureus*, monitorados por testes de atividade biológica

5.3.1. Resultados obtidos para as folhas

Bioensaios de coleótilos de trigo e fitotoxicidade

Folhas secas de *C. sulphureus* (60 g) foram extraídas inicialmente com água (rendimento de 27,7%). Depois de desengorduradas (retirada de óleos, ceras e graxas com hexano), as folhas foram extraídas com diclorometano (rendimento de 2,86%), acetato de etila (0,87%), acetona (0,84%) e metanol (6,78%). Os extratos, nas concentrações de 800, 400, 200 100 e 50 ppm foram testados em bioensaios de coleótilo de trigo (MACÍAS; CASTELLANO; MOLINILLO, 2000), que é um teste rápido e sensível a uma ampla variedade de substâncias bioativas (CUTLER; HOAGLAND; CUTLER, 2000). O extrato bruto de diclorometano foi o mais ativo, pelos níveis de inibição alcançados e, portanto, o escolhido para a continuação do estudo (Figura 12).

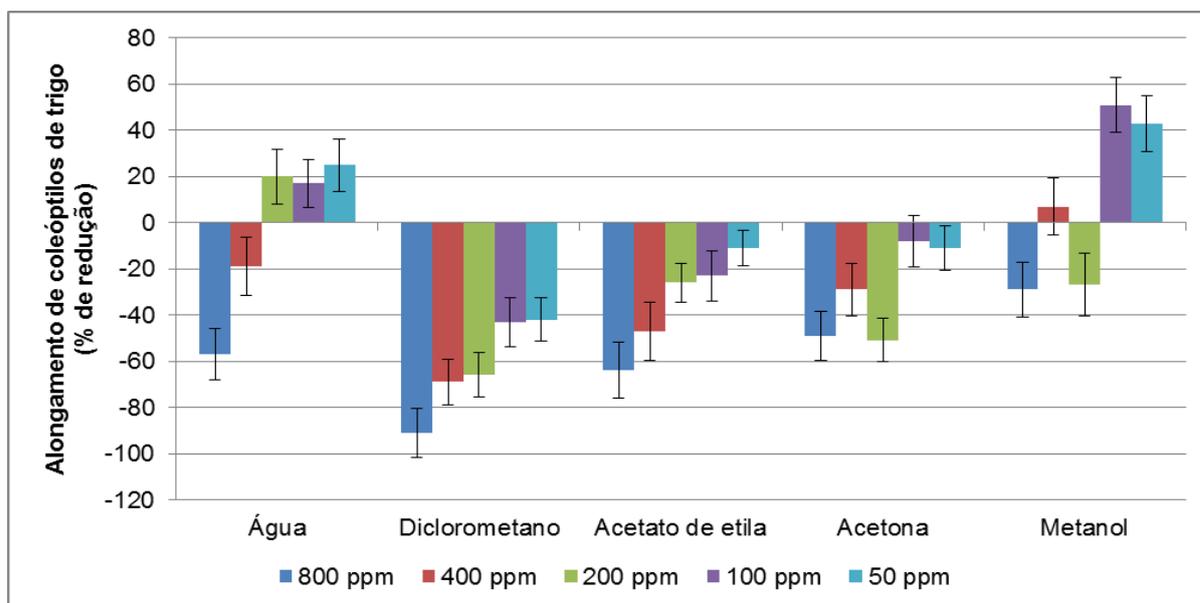


Figura 12. Alongamento de coleótilos de trigo sob o efeito dos cinco extratos brutos (aquoso, diclorometânico, acetato de etila, acetônico e metanólico) de folhas de *Cosmos sulphureus* (Valores expressos como diferença percentual do controle).

As clorofilas foram removidas do extrato bruto de diclorometano, e as frações A (258,6 mg), B (1342,6 mg), C (1566,6 mg) e D (2804,6 mg) obtidas também foram avaliadas em bioensaios de coleóptilo, nas mesmas concentrações supracitadas. As frações B, C e D foram as mais bioativas, conforme pode ser observado na Figura 13.

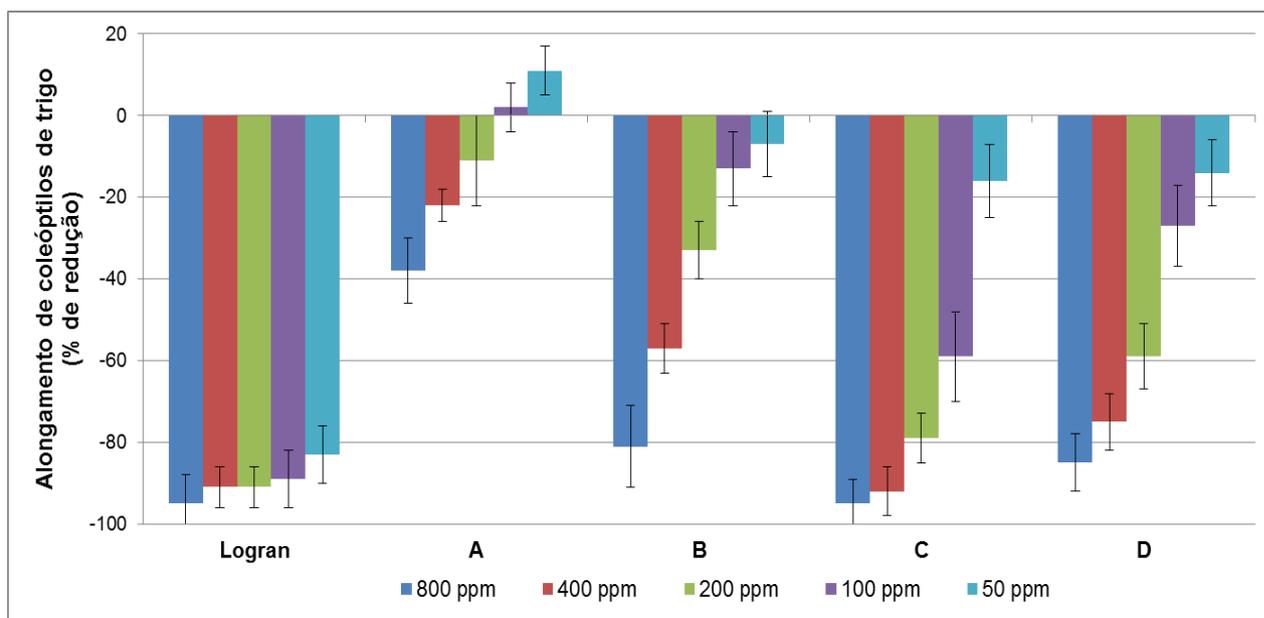


Figura 13. Alongamento de coleóptilos de trigo sob o efeito do herbicida triasulfuron (Logran®) e das quatro frações obtidas do extrato bruto de diclorometano (A, B, C e D) (Valores expressos como diferença percentual do controle).

A fração C (água-metanol a 80%) foi a mais ativa, com uma inibição de cerca de 60%, mesmo na quarta diluição (100 ppm). A fração D (metanol 100%) foi a segunda mais ativa, proporcionando inibição inferior a 30% na concentração de 100 ppm. A fração B (água – metanol a 20%, 40% e 60%) foi a terceira mais ativa, com atividade menos persistente com a diluição (cerca de 30% na concentração de 200 ppm) (Figura 13).

As três frações ativas nos bioensaios de coleóptilos de trigo apresentaram uma destacada atividade inibidora sobre as STS (*L. sativa* - alface, *L. sativum* - agrião, *S. lycopersicum* – tomate e *A. cepa* - cebola). A fração mais ativa foi a C, seguida da B e D. A espécie menos afetada foi *L. sativa*, sendo a fração B a única que apresentou atividade significativa sobre a sua germinação. Para *L. sativum*, as frações B e C apresentaram atividade inibidora similar, com valores superiores a 40% sobre a germinação e comprimento de raiz, e cerca de 60% sobre o

comprimento da parte aérea, na maior concentração. Para *A. cepa*, a inibição da parte aérea e raiz foi em torno de 70% na concentração de 800 ppm, e cerca de 50 – 60% na segunda concentração (400 ppm) para a fração C; as inibições promovidas pelas fração B e D foram em torno de 40%, na maior concentração (800 ppm). Já para *S. lycopersicum*, a atividade promovida pelas três frações, sobre os três parâmetros avaliados, foi em torno de 40% na concentração mais alta (Figura 14).

Para as espécies de plantas daninhas avaliadas, as três frações apresentaram forte atividade inibidora. A fração C foi a que apresentou maior atividade, com inibições de 60% ou superiores sobre o crescimento de raiz e parte aérea das quatro espécies avaliadas, com exceção da parte aérea da *E. crus-galli*. A planta daninha *A. viridis* foi a mais afetada, com cerca de 100% de inibição do crescimento de raiz e parte aérea na primeira concentração (800 ppm) das três frações, e também na segunda concentração (400 ppm) de C e D; ainda, na terceira concentração (200 ppm) da fração C, a atividade inibitória foi em torno de 70% (Figura 15).

Conclui-se que as três frações (C- água-metanol a 80%, D - metanol 100% e B - água – metanol a 20%, 40% e 60%) mostraram uma destacada atividade fitotóxica, sendo a fração a mais ativa, tanto com as STS quanto com as plantas daninhas (Figuras 14 e 15).

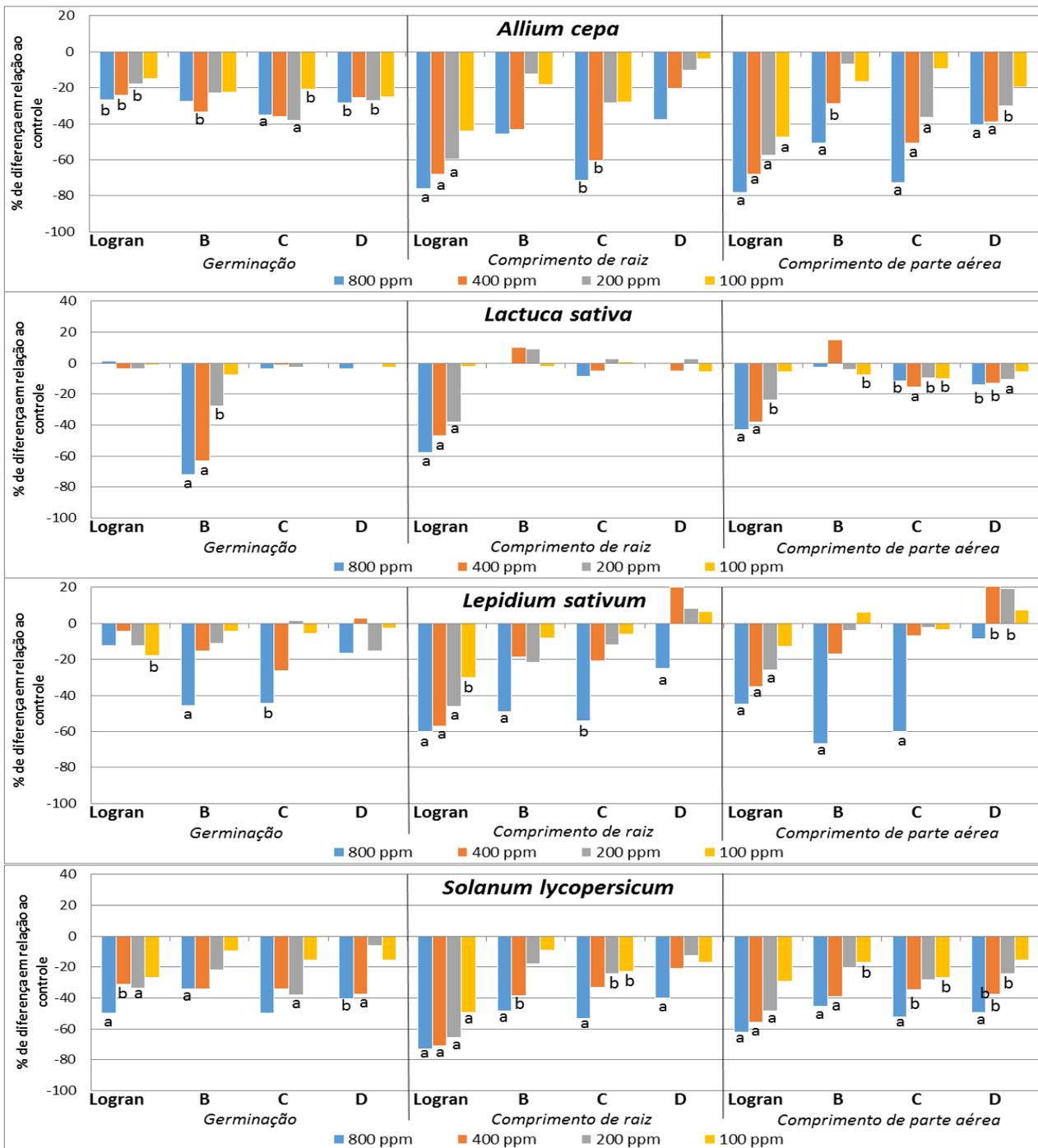


Figura 14. Germinação e o crescimento das STS sob o efeito do herbicida triasulfuron (Logran®) e das três frações iniciais ativas (B, C e D) obtidas do extrato bruto de diclorometano (Valores expressos como diferença percentual do controle. Níveis de significância $p < 0,01$ (a) ou $0,01 < p < 0,05$ (b)).

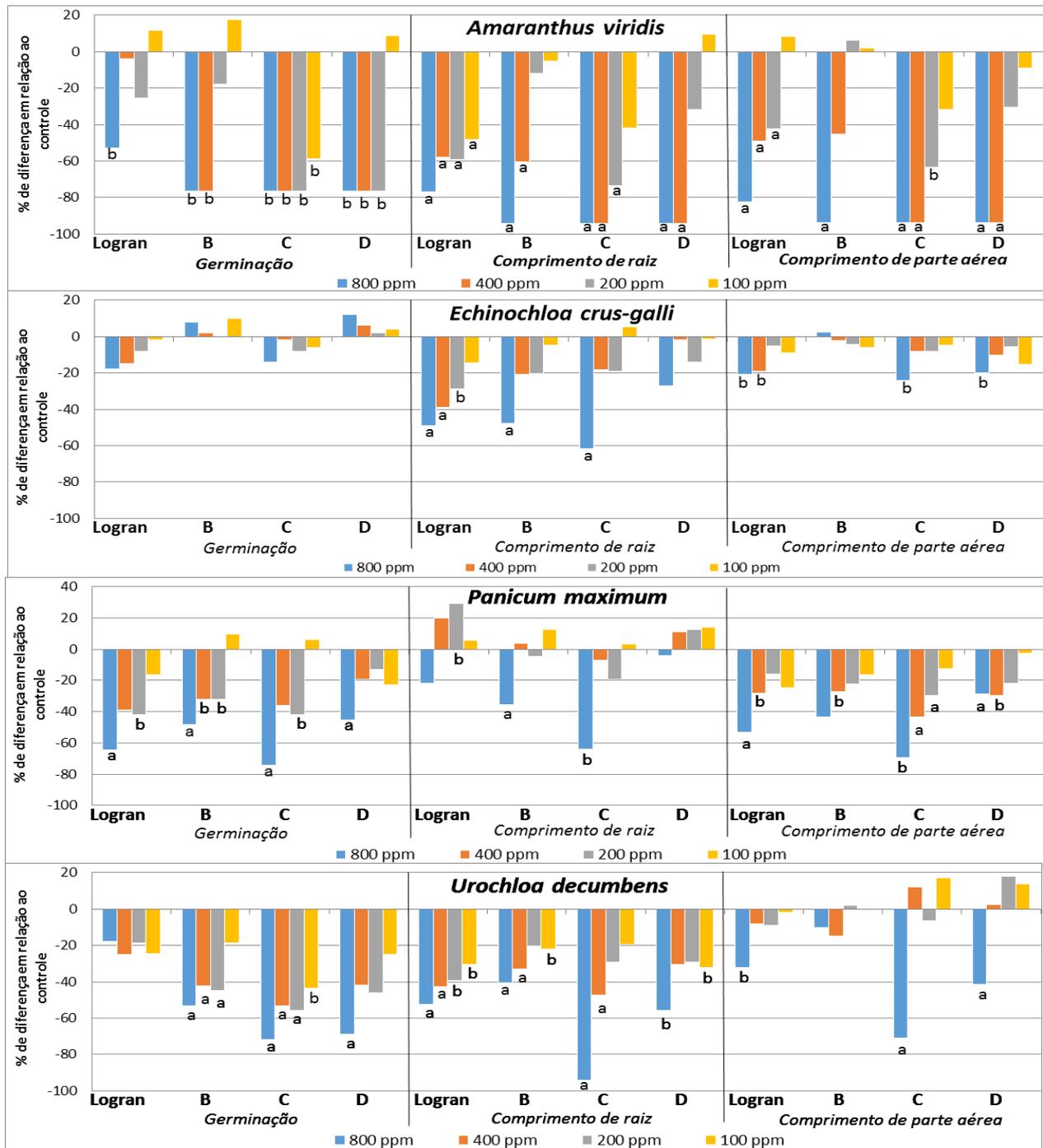


Figura 15. Germinação e o crescimento das plantas daninhas sob o efeito do herbicida triasulfuron (Logran®) e das três frações iniciais ativas (B, C e D) obtidas do extrato bruto de diclorometano (Valores expressos como diferença percentual do controle. Níveis de significância $p < 0,01$ (a) ou $0,01 < p < 0,05$ (b)).

Com base nos resultados obtidos, optou-se em realizar o isolamento biodirigido e a identificação dos compostos majoritários presentes nas frações B, C e D, e estudar a sua fitotoxicidade, no intuito de compreender o comportamento invasivo de *C. sulphureus* e utilizar estes compostos como modelos de herbicidas naturais no futuro.

O isolamento biodirigido é um processo estabelecido e relativamente automatizado no qual o avanço das tecnologias permite que durante a separação dos compostos, quando os picos dos extratos injetados são detectados por cromatografia líquida de alta eficiência, uma porção seja coletada para o bioensaio enquanto outra vá para a análise estrutural no espectrômetro de massas (CONSTANT; BEECHER, 1995) e ressonância magnética nuclear (RMN) (LINDON et al., 1996).

Com o processo de separação e purificação das frações B, C e D das folhas por cromatografia, foi possível isolar 15 compostos, entre eles **costunolido (1)** (HANSEL et al., 1980), **reinosina (2)** (YOSHIOKA et al., 1970) e **santamarina (3)** (YOSHIOKA et al., 1970), lactonas sesquiterpênicas maioritárias (Figura 16), que são compostos característicos de Asteraceae (SEAMAN, 1982). Os três compostos majoritários caracterizados se descrevem pela primeira vez na planta *C. sulphureus*, com exceção do costunolido que já foi isolado anteriormente desta planta (BOHLMANN, 1982). Os espectros de RMN (^1H -RMN, ^{13}C -RMN, ^1H - ^1H -COSY, HSQC e HMBC) dos compostos costunolido (1), reinosina (2) e santamarina (3) encontram-se nos anexos (Anexos 1 a 15).

Os demais compostos minoritários isolados das folhas foram: 11-epi-artesina (4) (MARCO, 1989), 11 α -13-dihidreinosina(5) (SANZ; CASTELLNO, MARCO, 1990), 1 β - 4 β -dihidroxiarbusculina (6) (JULIANTI et al., 2012), 1 β , 6 α -dihidroxi-4(5)-eudesmeno (7) (NAGASHIMA et al., 2005), clovane-2 β -9 α -diol (8) (HEYMANN et al., 1994), 10-hidroxi-15-oxo- α -cadinol (9) (ZHANG et al., 2003), 10-oxo-isodauc-3-en-15-al (10) (ZHANG et al., 2003), 10-hidroxi-6,10-epoxi-4(14)-isodaucano (11) (YUKAWA et al., 2005), Ácido α -dimorfecólico(12) (TSUBOI; MAEDA; TAKEDA, 1986), Ácido (9Z-12S-13E-15Z)-12-hidroxi-octadeca-9,13,15-trienoico(13) (KIKUCHI; YAOITA; KIKUCHI, 2008), ester metílico do ácido (9Z-12S-13E-15Z)-12-hidroxi-octadeca-9,13,15-trienoico (14) (KIKUCHI; YAOITA; KIKUCHI, 2008) e estigmaterol

(15) (GRECA; MONAKO; PREVITERA, 1990). A estrutura química de todos os compostos está ilustrada na Figura 17.

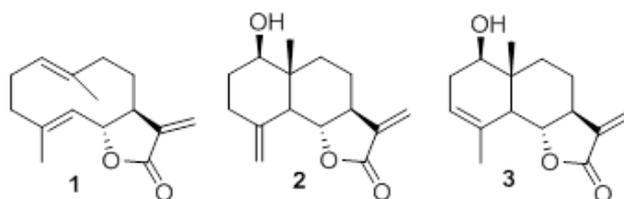


Figura 16. Três compostos majoritários isolados de folhas de *C. sulphureus*: costunolido (1), reinosina (2) e santamarina (3) – lactonas sesquiterpênicas.

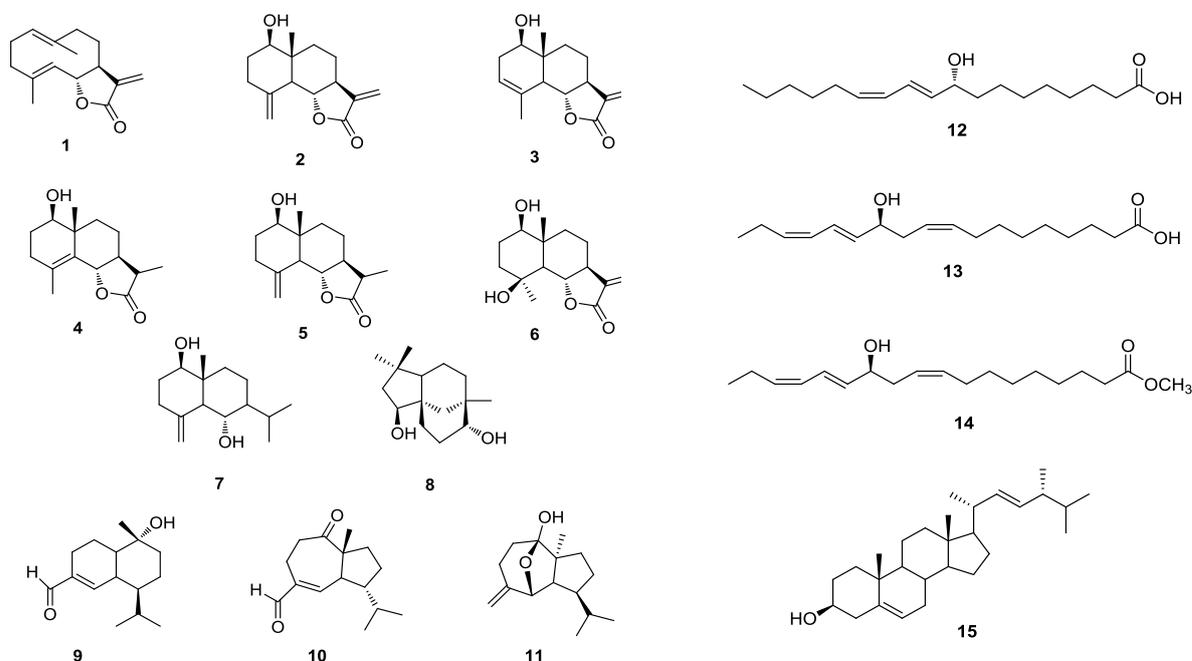


Figura 17. Outros compostos isolados de folhas de *C. sulphureus*. 11-epi-artesina (4), 11 α -13-dihidreinosina (5), 1 β - 4 β -dihidroxiarbusculina (6), 1 β , 6 α -dihidroxi-4(5)-eudesmeno (7), clovane-2 β -9 α -diol (8), 10-hidroxi-15-oxo- α -cadinol (9), 10-oxo-isodauc-3-en-15-al (10), 10-hidroxi-6,10-epoxi-4(14)-isodaucano (11), Ácido α -dimorfecólico (12), Ácido (9Z-12S-13E-15Z)-12-hidroxi-octadeca-9,13,15-trienoico(13), Ester metílico do ácido (9Z-12S-13E-15Z)-12-hidroxi-octadeca-9,13,15-trienoico(14) e estigmaterol (15).

Os três compostos majoritários obtidos das folhas de *C. sulphureus*, as lactonas costunolido (1), reinosina (2) e santamarina (3), foram primeiramente avaliados em um bioensaio de coleóptilos de trigo (Figura 18).

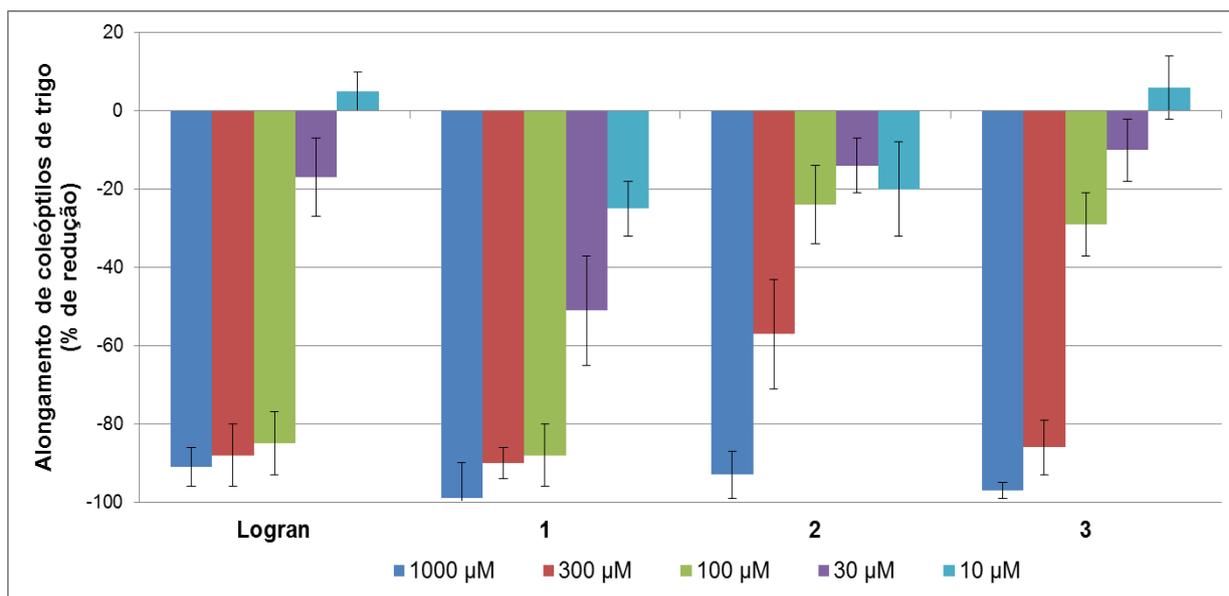


Figura 18. Alongamento de coleóptilos de trigo sob o efeito do herbicida triasulfuron (Logran®) e do costunolido (1), reinosina (2) e santamarina (3) (Valores expressos como diferença percentual do controle).

O costunolido (1) apresentou uma forte atividade inibidora sobre o crescimento dos coleóptilos, com valores superiores a 90% nas três maiores concentrações, e superiores a 50% a 30 µM, sendo, inclusive, superior àquela apresentada pelo herbicida Logran®.

De uma forma geral, as três lactonas maioritárias testadas foram ativas na maior concentração, 1000 µM, com valores em torno de 90 e 100% de inibição. Esta atividade foi decrescendo quando foram utilizadas menores concentrações, em especial para a reinosina (2), cuja atividade foi de 57% na segunda diluição, 300 µM. A inibição apresentada pela santamarina (3) diminuiu em menor intensidade, apresentando, na segunda diluição, uma atividade superior a 80% de inibição. Os resultados obtidos indicam que costunolido (1) é a lactona mais ativa, seguida por santamarina (3) e reinosina (2) (Figura 18).

Com os resultados do bioensaio de coleóptilos é possível calcular, para cada produto avaliado, o valor do parâmetro IC_{50} , que é o valor da concentração que inibe o crescimento em 50%. Assim, o menor valor de IC_{50} significa que o produto apresenta maior atividade. Para comparar os valores de IC_{50} dos compostos, utilizou-se de um modelo sigmoidal de curva dose-resposta. Os valores obtidos

foram: costunolido (**1**) – $IC_{50} = 24,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($R^2 = 0,9921$); reinosina (**2**) – $IC_{50} = 285,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($R^2 = 0,9638$); santamarina (**3**) – $IC_{50} = 139,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($R^2 = 0,9623$); Logran® – $IC_{50} = 39,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($R^2 = 0,9503$). Observou-se que os valores de IC_{50} corroboram a discussão sobre a atividade dos produtos. O valor mais baixo correspondeu ao costunolido (**1**), ou seja, menor quantidade deste composto é requerida para inibir o crescimento em 50%, e este valor é, inclusive, menor que o apresentado pelo herbicida comercial Logran®.

As lactonas sesquiterpênicas pertencem a um grande grupo de produtos naturais, os terpenos, e são encontradas em plantas de vários gêneros da família Asteraceae (VIEGAS JÚNIOR, 2003), com mais de 4000 lactonas sesquiterpênicas já identificadas nesta família (DE KRAKER et al., 2002). Também estão presentes em outras famílias como Acanthaceae, Anacardiaceae, Apiaceae, Euphorbiaceae, Lauraceae, Magnoliaceae, Menispermaceae, Rutaceae e Winteraceae (CHATURVEDI, 2011).

São compostos lipofílicos incolores (CHADWICK et al., 2013), encontrados principalmente nas folhas e nas inflorescências, podendo, às vezes, serem encontradas em outros tipos de órgãos das plantas. Geralmente as lactonas são produzidas em níveis elevados e, em algumas espécies podem ser armazenadas, por exemplo, em células como os tricomas (LORETO et al., 1996).

As lactonas sesquiterpênicas geralmente são responsáveis pelo sabor amargo e podem ser responsáveis pelas alergias de pele em humanos. São descritas como os princípios ativos de muitas plantas medicinais, usadas na medicina tradicional contra doenças inflamatórias. Há uma série de relatos na literatura em que estes compostos apresentam uma grande variedade de atividades biológicas e farmacológicas, entre elas: antibacteriana, antifúngica, antiinflamatória, antitumoral, antimicrobiana, e efeitos sobre os sistemas nervoso central e cardiovascular (LEE et al., 2001; MA; ZHAO, GAO, 2013; MATEJIC; SARAC, RANDELOVIC, 2010; MREMNER; HEINRICH, 2002). Estes compostos também podem atuar como aleloquímicos (MACÍAS et al., 1996; DE LUQUE, 2000; RIAL et al., 2013).

Uma lactona sesquiterpênica tem 15 átomos de carbono em seu esqueleto. Contém um anel lactônico, geralmente γ -butirolactona, situado nas posições 6,7 ou

7,8 do esqueleto base. Na maioria dos casos, contém um grupo α -metileno exocíclico. É frequente a presença de grupos hidroxilos, ésteres ou anéis oxiranos em diversas posições da molécula. É um grupo importante de componentes vegetais que tem uma origem biossintética comum. Todas as lactonas, ainda que com estruturas químicas muito distintas, procedem da condensação de três unidades de isopreno, que posteriormente sofrem ciclizações e oxidações (CHATUVERDI, 2011).

O grupo γ -lactona- α - β -insaturada, presente nas lactonas sesquiterpênicas, é considerado o responsável pela maior parte das atividades biológicas e farmacológicas, sendo essencial, por exemplo, para sua atividade citotóxica. Seu mecanismo de ação baseia-se em sua capacidade de sofrer reações de alquilação, causando alterações químicas que interferem no tipo de sua atividade biológica (CHADWICK, 2013).

São classificadas de acordo com seus esqueletos carbônicos, sendo as classes mais encontradas as de esqueleto guaianolídeo, germacranolídeo e eudesmanolídeo. Para estes três tipos de lactonas sesquiterpênicas, o costunolido geralmente é considerado o precursor comum (DE KRAKER et al., 2002). Geralmente uma mesma planta produz um ou vários tipos e esqueletos de lactona sesquiterpênica, como é o caso da *C. sulphureus*.

Analisando a estrutura química dos compostos, observa-se que pode haver uma relação entre estrutura e atividade, já que santamarina (**3**) e reinosina (**2**) são lactonas sesquiterpênicas do tipo eudesmanolídeo, enquanto costunolido (**1**) (mais ativo) possui esqueleto germacranolídeo. Comparando-se os compostos **2** (reinosina) e **3** (santamarina), a única diferença em suas estruturas é a posição da ligação dupla. Os valores de atividade indicam como a presença da dupla ligação exocíclica (exterior ao anel), apresentada pela reinosina (**2**) promove menor atividade inibidora em comparação com a ligação dupla endocíclica, presente na santamarina (**3**) (Figura 16).

Os germacranolídeos, como o costunolido (**1**), tem sido alvo de grande atenção na química orgânica moderna, devido a fatores estruturais, ocorrência na natureza e biossíntese de outros sesquiterpenos (MINNAARD et al., 1999).

A atividade apresentada pelos compostos sobre os coleóptilos correlacionou-se com a atividade obtida nas frações, no bioensaio de coleóptilos (Figuras 8 e 13).

Assim, o composto mais ativo foi o costunolido (1), seguido de santamarina (3) e de reinosina (2). A fração C, que foi a mais ativa, é a que continha o costunolido (1), reinosina (2) e santamarina (3) como compostos majoritários. As seguintes atividades foram das frações B e D. A fração D continha o costunolido (1), em menor concentração, junto com outros compostos minoritários, e a fração B tinha e sua composição reinosina (2) como composto majoritário e santamarina (3), além de outros compostos minoritários.

Costunolido foi primeiramente isolado em raízes de *Saussurea lappa*, uma Asteraceae, e atualmente já foi encontrado em várias espécies (ZHANG et al., 2012; SEAMAN, 1982). É amplamente estudado, não somente por ser o precursor das lactonas sesquiterpênicas, mas também por apresentar diversas formas de bioatividade (RUZISCKA, 1953; CORDELL, 1976; REN; ZHOU; YE, 2004; MICHALSKA et al., 2009; ZHANG et al., 2012)

Para conseguir uma atividade favorável na busca por novos fármacos ou novos agroquímicos, ou ainda, ter êxito em um bioensaio de coleóptilos, é necessário que o composto em avaliação possua propriedades físico-químicas adequadas. Este tipo de bioensaio implica em dois fenômenos: 1. Transporte através da membrana do citoplasma do coleóptilo e chegada ao sítio de ação; 2. Mecanismo implicado no sítio de ação. Na primeira etapa são importantes as características físico-químicas que regulam os fenômenos de absorção, transporte através das membranas celulares, tecidos, distribuição, transformação metabólica e excreção. É, portanto, essencial, realizar estudos sobre a relação estrutura e atividade (LIPINSKI et al., 2001).

A relação lipofilia/hidrofilia de qualquer molécula bioativa é um fator determinante na absorção e disponibilidade no interior da célula. Hansch, citado por Macías et al. (2005), estabeleceu um modelo matemático não linear que relaciona, para uma série de compostos estruturalmente relacionados, a dependência de fenômenos de transporte com a atividade intrínseca de um composto.

A capacidade de transporte de um composto se descreve em termos de lipofilia, e é medida mediante o coeficiente de partição octanol/água (P). No modelo de Hansch, este coeficiente se expressa em forma logarítmica (logP), e é definido como “a relação existente entre as concentrações de uma substância em equilíbrio

quando está dissolvida em um sistema bifásico de dois solventes altamente imiscíveis” (DANIELSSON; ZHANG, 1996). O coeficiente pode ser calculado empiricamente, mas devido a complexidade do cálculo, normalmente realiza-se uma estimativa utilizando diferentes algoritmos.

Valores elevados de lipofilia ($\log P > 4$) indicam um deslocamento limitado ou nulo no citoplasma da célula, e o contrário, compostos muito hidrofílicos ($\log P < 0$) têm dificuldade de penetrarem nas membranas. Portanto, espera-se que um composto com atividade apresente um valor de $\log P$ compreendido entre 0 e 4. Os valores de $\log P$ calculados para os três compostos majoritários, mediante logaritmos distintos, seguem descritos: composto 1 – $A\log P_s = 4,22$ e $M\log P = 3,36$; composto 2 – $A\log P_s = 1,89$ e $M\log P = 2,61$; composto 3 – $A\log P_s = 2,44$ e $M\log P = 2,61$. Os valores de $M\log P$ coincidiram entre as eudesmanolidas (**2** e **3**). Isso significa que, segundo este cálculo, a posição da ligação dupla não afeta a entrada da molécula até o sítio de ação. $A\log P_s$ varia de maneira contrária aos valores de IC_{50} . Geralmente, maiores valores de IC_{50} apresentam menores valores de $A\log P_s$, corroborando os resultados obtidos no presente trabalho.

Verificou-se, portanto, neste ensaio de toxicidade, maior atividade do costunolido (**1**) devido ao seu menor valor de IC_{50} e maiores valores de $M\log P$ e $A\log P_s$, em comparação com os obtidos para reinosina (**2**) e santamarina (**3**).

Os três compostos majoritários, que foram ativos no bioensaio de coleóptilos de trigo, foram também avaliados em bioensaio de sementes, sobre as quatro espécies de STS (Figura 19) e as quatro espécies de plantas daninhas (Figura 20).

Assim como os resultados observados anteriormente, os três compostos apresentaram alta atividade inibidora, sobretudo na concentração mais alta, 1000 μM , decrescendo esta inibição quando em menores concentrações do produto (Figuras 19 e 20).

Das quatro espécies de STS avaliadas, *L. sativa* foi a menos afetada, confirmando os resultados dos bioensaios realizados com as frações. As lactonas reinosina (**2**) e santamarina (**3**) foram as mais ativas sobre *L. sativum* e *S. lycopersicum*, com valores de inibição entre 70% e 80% sobre a raiz e a parte aérea, na primeira diluição, 1000 μM , corroborando os resultados obtidos por Macías et al. (1996), que verificaram o efeito inibitório de lactonas sesquiterpênicas sobre estas

espécies. Já para *A. cepa*, o composto mais ativo foi o costunolido (1), com valores de inibição de raiz/parte aérea de cerca de 60%, também na maior concentração (Figura 19).

É possível que *L. sativa* tenha sido a menos afetada porque, além de pertencer a mesma família que a espécie em estudo, os genes da enzima precursora do costunolido, a germacreno A sintetase (GAS), já foram isolados e caracterizados em alface (BENNETT et al., 2002), ou seja, o costunolido é um composto naturalmente produzido por esta planta, conforme já foi estudado por Kassuya et al. (2009). Uma planta não produziria um composto que fosse tóxico a ela mesma, justificando, assim, a ausência de fitotoxicidade. Como costunolido é precursor de outras lactonas sesquiterpênicas, provavelmente santamarina, reinosina e outras lactonas com esqueletos similares possam ser sintetizados naturalmente por esta planta. Ren, Zhou e Ye (2004) apresentam uma lista de algumas lactonas sesquiterpênicas já isoladas em alface.

Em estudo realizado por Cruz-Silva et al. (2015), que avaliaram a fitotoxicidade de extratos aquosos de folhas de *C. sulphureus* sobre a alface, foram obtidos resultados que confirmam a seletividade apresentada pela planta receptora. Neste estudo, verificou-se que os extratos não afetaram a porcentagem de germinação e o desenvolvimento de plântulas de alface. Outra resposta importante obtida foi que não houve apenas um efeito inibitório, mas em alguns casos, também o estímulo.

Alguns efeitos mistos são vistos dentro de plantas da família Asteraceae, como, por exemplo, algumas lactonas com esqueleto guaianolídeo estimulando o crescimento de *L. sativa*, enquanto outras lactonas inibem a sua germinação (MACÍAS et al., 1996).

Os resultados observados para as quatro espécies de plantas daninhas também indicaram forte poder inibitório das três lactonas. Na maioria dos casos, os compostos foram mais ativos que o herbicida de referência. A raiz foi o parâmetro mais afetado em todas as sementes testadas, com valores entre 60 e 80% de inibição na maior concentração, para todos os compostos avaliados.

A alta sensibilidade da raiz aos compostos pode ser explicada pelo fato das raízes serem a primeira parte da planta a emergir, entrando em contato direto com

os aleloquímicos, que podem ser absorvidos diretamente. Como consequência, as raízes são expostas a maiores concentrações dos compostos alelopáticos (MIRANDA et al., 2015; TANVEER, et al., 2012).

A parte aérea de *A. viridis* e *P. maximum* também foi afetada pelos três compostos; já a parte aérea de *U. decumbens* somente foi afetada pela santamarina (**3**), enquanto a parte aérea de *E. crus galli* praticamente não foi inibida por nem um dos três compostos (Figura 20).

A inibição do crescimento devido à presença de lactonas sesquiterpênicas foi verificada em *A. hypochondriacus* e *E. crus-galli*, por Calera et al. (1995), que avaliaram a fitotoxicidade de lactonas isoladas de *Ratibida mexicana* sobre estas espécies.

Ainda que todos os produtos inibiram o crescimento das plantas daninhas avaliadas, *A. viridis* e *P. maximum* foram as mais sensíveis, tanto pelos níveis de atividade inibitória alcançados, quanto pelo número de parâmetros afetados. Ainda, mesmo na segunda concentração, 300 µM, os compostos costunolido (**1**) e santamarina (**3**) mantiveram níveis de inibição do crescimento da raiz superiores a 40%, para estas espécies, sendo a parte aérea também inibida pelo costunolido (Figura 20).

Importante ressaltar que efeito alelopático de um composto envolve não somente a inibição, mas também o estímulo. As lactonas sesquiterpênicas santamarina e reinosina apresentaram efeito estimulador na germinação de *Striga asiatica*, uma das espécies de plantas daninhas de grande importância em lavoura de milho (LUQUE et al., 2000; GALINDO et al., 2004).

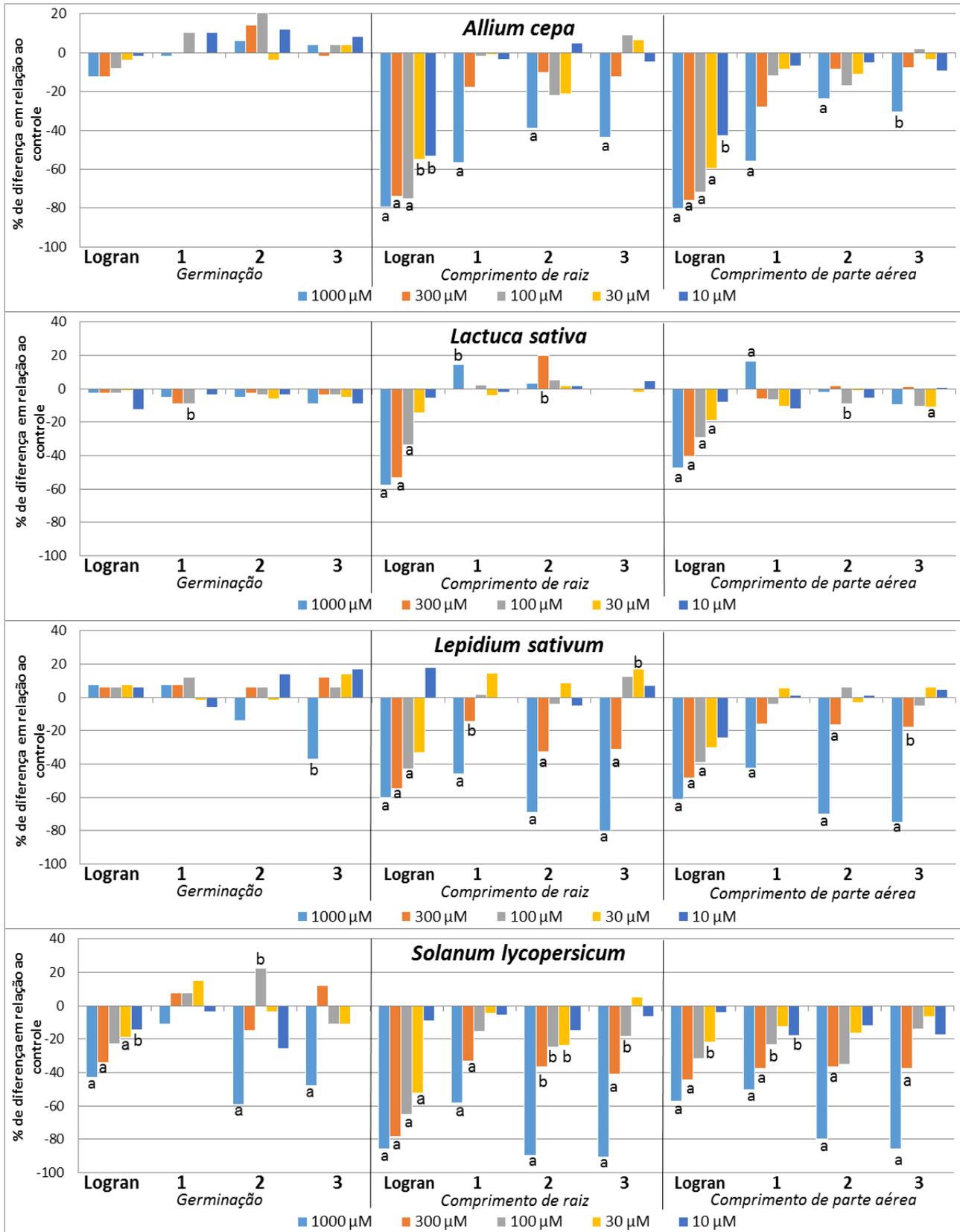


Figura 19. Germinação e o crescimento das STS sob o efeito do herbicida triasulfuron (Logran®) e do costunolido (1), reinosina (2) e santamaria (3) (Valores expressos como diferença percentual do controle. Níveis de significância $p < 0,01$ (a) ou $0,01 < p < 0,05$ (b)).

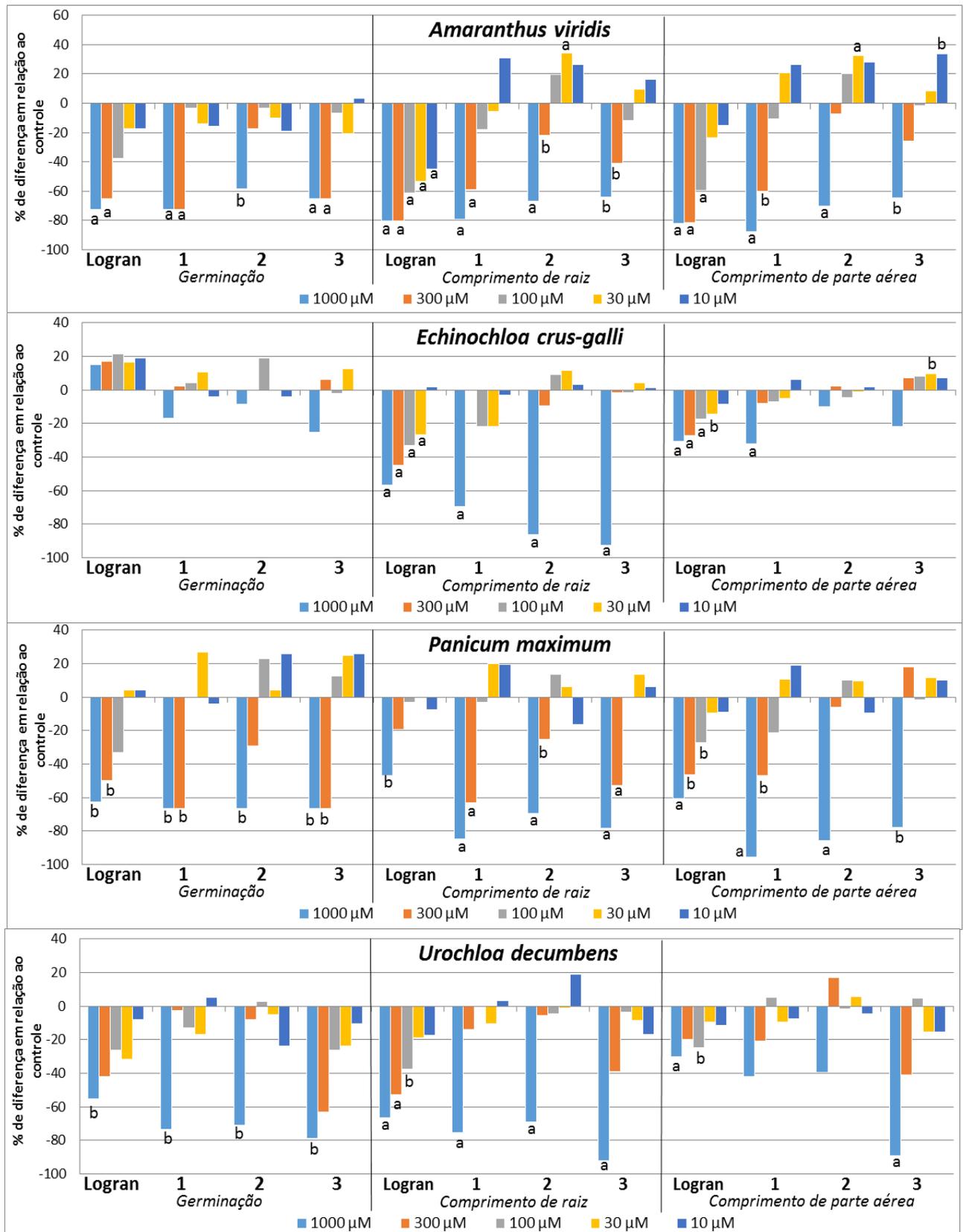


Figura 20. Germinação e o crescimento das plantas daninhas sob o efeito do herbicida triasulfuron (Logran®) e do costunolido (1), reinosina (2) e santamaria (3) (Valores expressos como diferença percentual do controle. Níveis de significância $p < 0,01$ (a) ou $0,01 < p < 0,05$ (b)).

Como a maioria das lactonas sesquiterpênicas, os três compostos isolados no presente trabalho (costunolido, reinosina e santamarina) são estudados por possuírem várias atividades biológicas, dentre elas, atividade anti-inflamatória (ZHENG et al., 2016), antibacteriana (FISCHER et al., 1998; ALAAGIB; AYOUB, 2015), anti-câncer (KOO et al., 2001; RASUL; PARVEEN, 2012; XU et al., 2015) e citotóxica (RIVIERO et al., 2003). No âmbito da alelopatia, que estuda os compostos secundários relacionados aos mecanismos de defesa das plantas, trabalhos têm sido realizados para avaliar as propriedades alelopáticas destas lactonas sesquiterpênicas (DUKE et al., 1987; FISCHER et al., 1990; CHEN; LEATHER, 1990; ABDELGALEIL; HASHINAGA et al., 2007; MAGIERO et al., 2009). Em alguns casos, um mesmo composto possui várias funções biológicas (POECKE; DICKE, 2003).

De uma forma geral, em um estudo de fitotoxicidade, quando as concentrações são escolhidas corretamente, os compostos apresentam um perfil de dose-resposta, ou seja, em altas concentrações agem como inibidores e a atividade diminui nas concentrações mais baixas, podendo, inclusive, apresentarem estímulo nas concentrações mais diluídas (MACÍAS et al., 1999), o que foi corroborado no presente trabalho.

Os resultados obtidos permitem demonstrar que a atividade inibitória apresentada pelo extrato de folhas de *C. sulphureus* é devida às três lactonas sesquiterpênicas majoritárias isoladas. Uma vez que costunolido (1), reinosina (2) e santamarina (3) são biossintetizados em grandes quantidades pela planta, e possuem efeito fitotóxico, é provável que estejam diretamente associadas ao potencial alelopático apresentado pela espécie em estudo, uma vez que, a planta não alocaria energia para a produção destes metabólitos, caso os mesmos não estivessem relacionados a mecanismos de defesa da espécie (RIAL et al., 2014), que garantem a sua disseminação no meio ambiente.

A identificação dos compostos e a avaliação de sua bioatividade promovem um melhor entendimento da habilidade invasiva e dominante da espécie (TONGMA et al., 1998) e ainda facilita a descoberta de novas ferramentas de proteção de plantas (MIRANDA et al., 2015), como a utilização de herbicidas naturais.

A descoberta de novos herbicidas naturais apresenta-se como uma ponte importante entre a agricultura tradicional e a orgânica, e grandes empresas agroquímicas que estão buscando e desenvolvendo novas ferramentas no manejo ecológico de plantas daninhas (DAYAN; DUKE, 2010; DAYAN et al., 2011).

Com base no exposto acima, conclui-se que lactonas sesquiterpênicas **costunolido**, **reinosina** e **santamarina**, que foram isoladas de folhas de *C. sulphureus*, apresentam efeito fitotóxico por inibirem o desenvolvimento da maioria as plantas receptoras testadas, e podem ser uma fonte potencial para modelos de novos tipos estruturais de herbicidas.

Bioensaio de cultivo hidropônico (plântulas)

Realizou-se um bioensaio de cultivo hidropônico, para avaliar o efeito das três lactonas sesquiterpênicas isoladas (costunolido, reinosina e santamarina) das folhas de *C. sulphureus* sobre o crescimento e desenvolvimento de plântulas de *P. maximum* (Figura 21) e *A. viridis* (Figura 23).

Observou-se que apenas a lactona santamarina (3) na maior concentração (1000 μM), promoveu a morte de 100% das plântulas de *P. maximum*. Nesta concentração, reinosina foi a segunda lactona mais ativa, seguida pelo costunolido (Figura 21). Na concentração de 300 μM , os níveis inibitórios alcançados pelas lactonas foram reduzidos, mas santamarina manteve a sua fitotoxicidade, e o acúmulo de biomassa, tanto de raiz quanto de parte aérea, foi o parâmetro mais afetado, com reduções que alcançaram, em média, 70% (Figuras 21c e 21d), comparativamente ao resultados obtidos pela testemunha. A partir da concentração de 100 μM , santamarina manteve-se como a mais bioativa, com inibições de biomassa de raiz e parte aérea de *P. maximum* em torno de 50%. Costunolido e reinosina, a partir da concentração de 50 μM , não se mostraram muito ativos sobre os parâmetros de crescimento de *P. maximum* que foram avaliados. Assim, considerando-se os parâmetros afetados e os níveis de inibição alcançados para *P. maximum*, santamarina foi a lactona mais fitotóxica, seguida por reinosina e costunolido. Os efeitos inibitórios das lactonas sesquiterpênicas sobre o crescimento e desenvolvimento das plântulas de *A. viridis* estão ilustrados na Figura 22

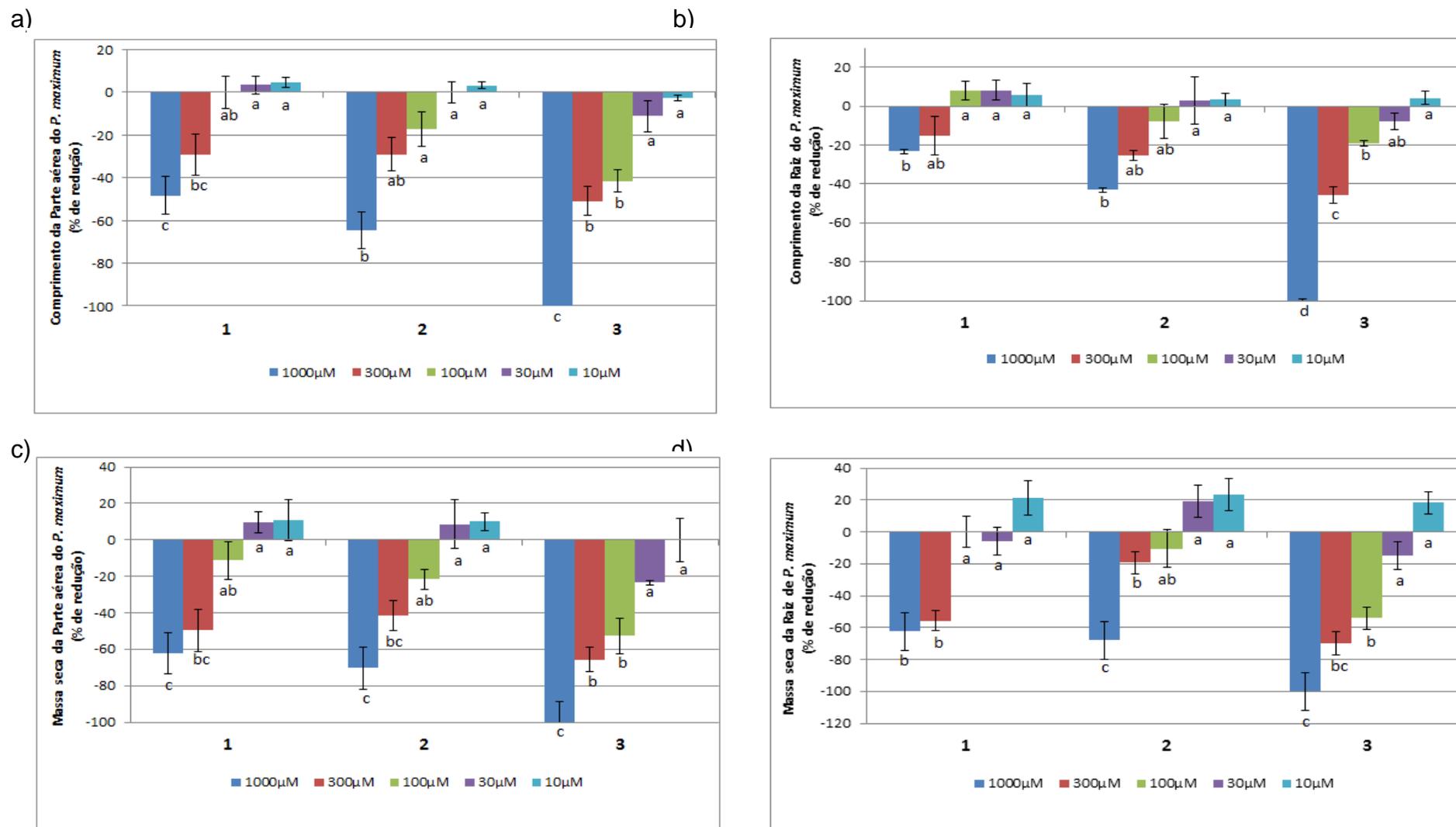


Figura 21. Comprimento da parte aérea (a), comprimento de raiz (b) massa seca da parte aérea (c) e massa seca de raiz (d) de plântulas de *Panicum maximum* sob o efeito do costunolido (1), reinosina (2) e santamarina (3). (Obs.: Valores expressos como diferença percentual do controle; Médias seguidas de mesmas letras, dentro de cada parâmetro avaliado, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Médias seguidas por “a” não diferem do tratamento controle (testemunha) pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade).

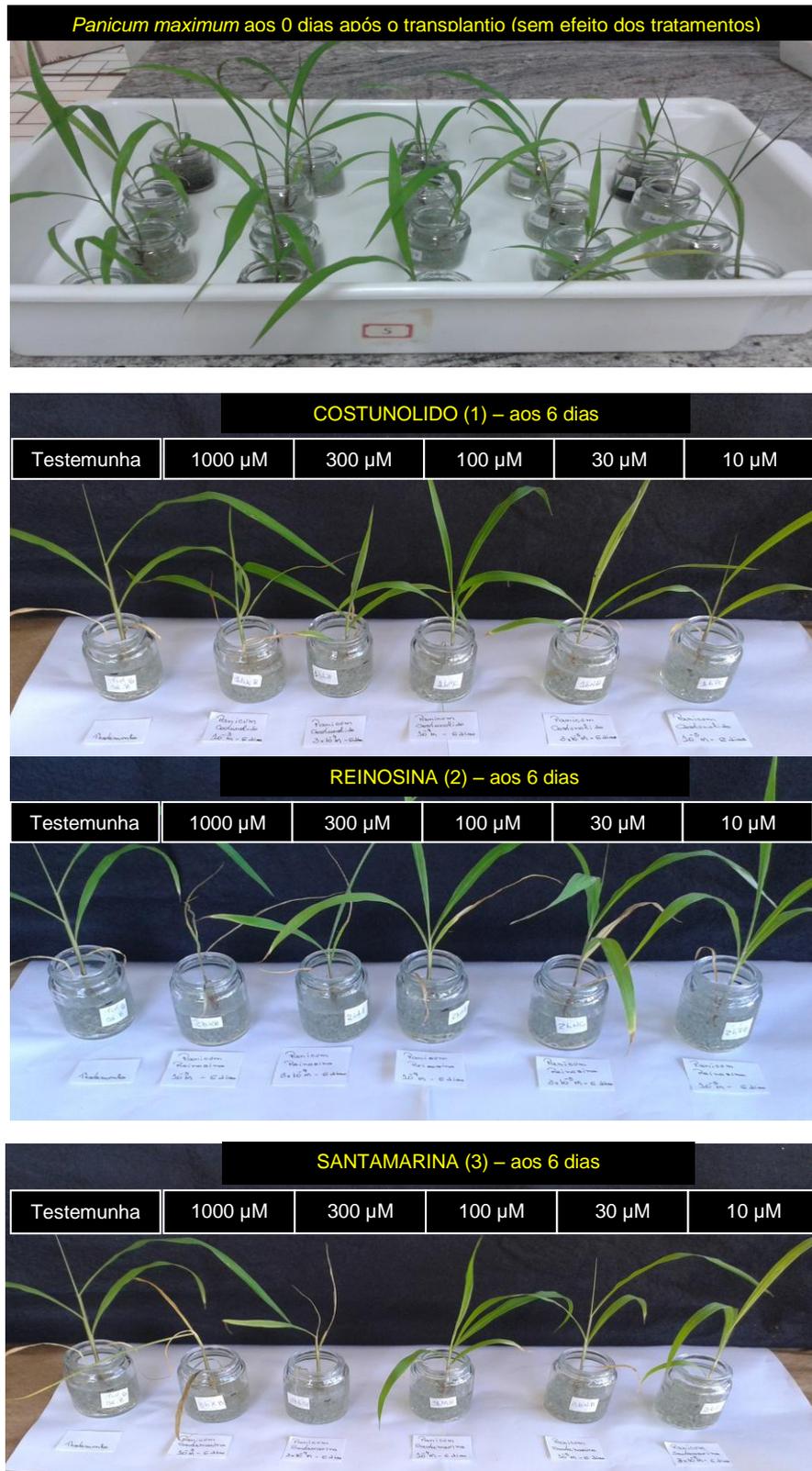


Figura 22. Desenvolvimento de plântulas de *P. maximum*, aos 6 dias após o transplântio sob o efeito fitotóxico das lactonas sesquiterpênicas costunolido (1), reinosina (2) e santamarina (3), nas concentrações de 1000, 300, 100, 30 e 10 μM , sobre o

Observou-se que as três lactonas na maior concentração (1000 μM), promoveram a morte das plântulas de *A. viridis* (Figura 23). Na segunda concentração (300 μM) foi possível observar que costunolido e santamarina foram os compostos mais fitotóxicos ao *A. viridis*, com reduções no comprimento da parte aérea de 50% e 79%, respectivamente (Figura 23a) e reduções superiores a 70% na produção de biomassa seca de parte aérea (Figura 23c). O comprimento de raiz de *A. viridis* também foi consideravelmente inibido na concentração de 300 μM , principalmente pelo costunolido e santamarina, ambos com reduções de 90% em relação aos valores apresentados pelas plantas da testemunha (Figura 23b); a biomassa seca das raízes também foi reduzida em mais de 80% por estas duas lactonas (Figura 23d). O comprimento de raízes mostrou-se sensível à ação das lactonas, mesmo na terceira concentração (100 μM), com santamarina e costunolido promovendo reduções superiores a 40%. 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). Com a diluição das concentrações dos compostos alelopáticos (30 μM e 10 μM) ocorreu a diminuição da atividade fitotóxica apresentado pelas lactonas, de forma que as reduções observadas, tanto na parte aérea quanto nas raízes de *A. viridis*, não ultrapassaram 20%. Os efeitos inibitórios das lactonas sesquiterpênicas sobre o crescimento e desenvolvimento das plântulas de *A. viridis* estão ilustrados na Figura 24.

Comparativamente à espécie *P. maximum*, *A. viridis* mostrou-se mais sensível à ação das lactonas sesquiterpênicas estudadas no presente trabalho, principalmente pelos níveis de reduções alcançados.

Este experimento corrobora parcialmente os resultados obtidos nos bioensaios que utilizaram sementes de *A. viridis*. No presente experimento, no qual foram utilizadas plântulas de *A. viridis*, costunolido e santamarina foram também as lactonas mais bioativas, porém a atividade da santamarina foi maior em comparação à apresentada pelo costunolido, principalmente pelo perfil de redução apresentado (Figura 23).

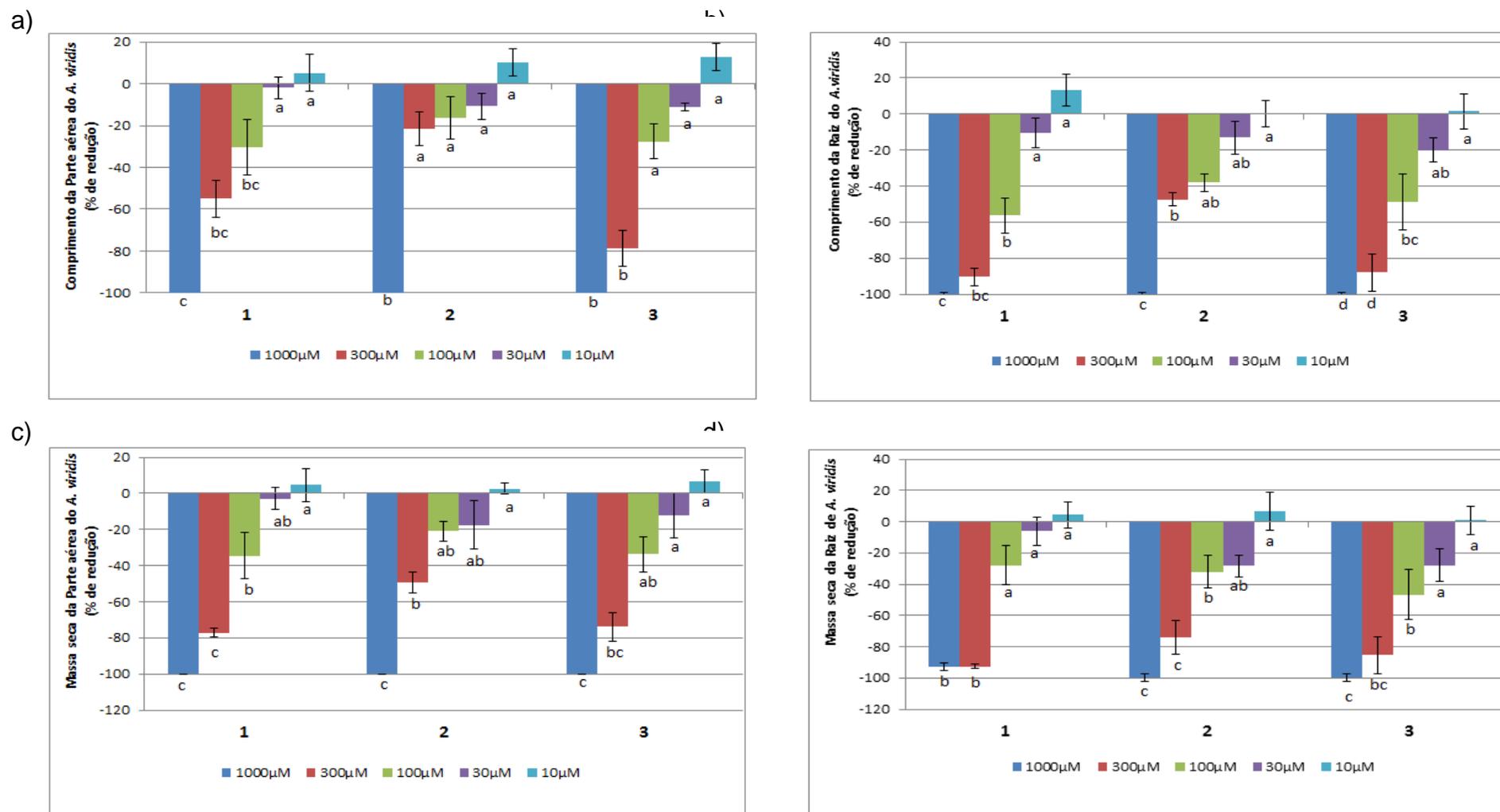


Figura 23. Comprimento da parte aérea (a), comprimento de raiz (b) massa seca da parte aérea (c) e massa seca de raiz (d) de plântulas de *Amaranthus viridis* sob o efeito do costunolido (1), reinosina (2) e santamarina (3). (Obs.: Valores expressos como diferença percentual do controle; Médias seguidas de mesmas letras, dentro de cada parâmetro avaliado, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Médias seguidas por “a” não diferem do tratamento controle (testemunha) pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade).

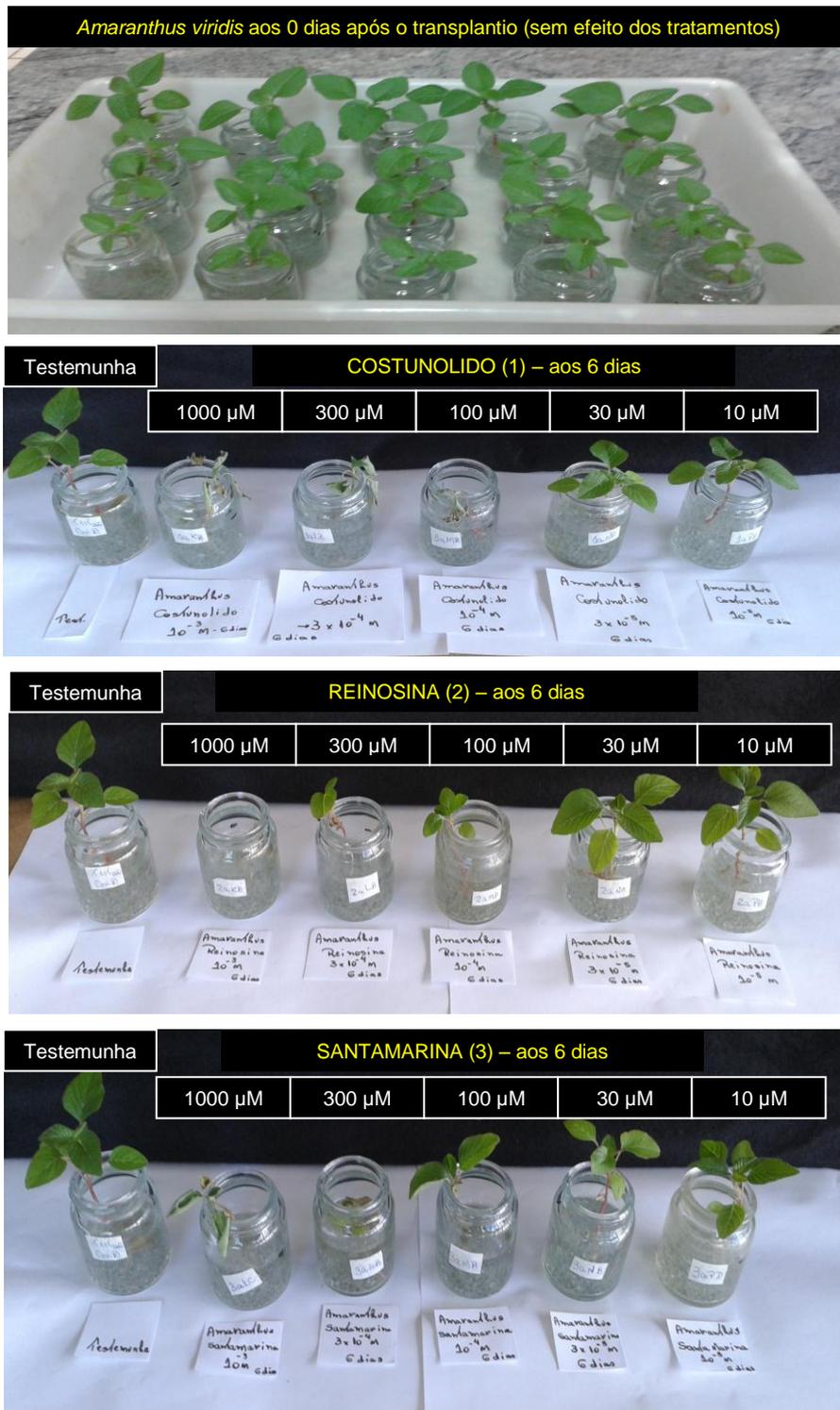


Figura 24. Desenvolvimento de plântulas de *A. viridis*, aos 6 dias após o transplante, sob o efeito fitotóxico das lactonas sesquiterpênicas costunolido (1), reinosina (2) e santamarina (3), nas concentrações de 1000, 300, 100, 30 e 10 μM ,

Complementarmente aos resultados deste bioensaio, avaliou-se a fitotoxicidade das três lactonas sobre a área foliar de *A. viridis*, sendo possível calcular, com base nos resultados obtidos, o IC_{50} de cada lactona. Analisando a Figura 25, é possível confirmar a maior atividade da santamarina sobre *A. viridis*, uma vez que esta apresentou menor valor de IC_{50} (132 μM), ou seja, uma menor quantidade deste produto é necessária para reduzir em 50% a área foliar de *A. viridis*. Costunolido foi a segunda lactona mais ativa ($IC_{50} = 172 \mu\text{M}$), seguida por reinosina ($IC_{50} = 244 \mu\text{M}$).

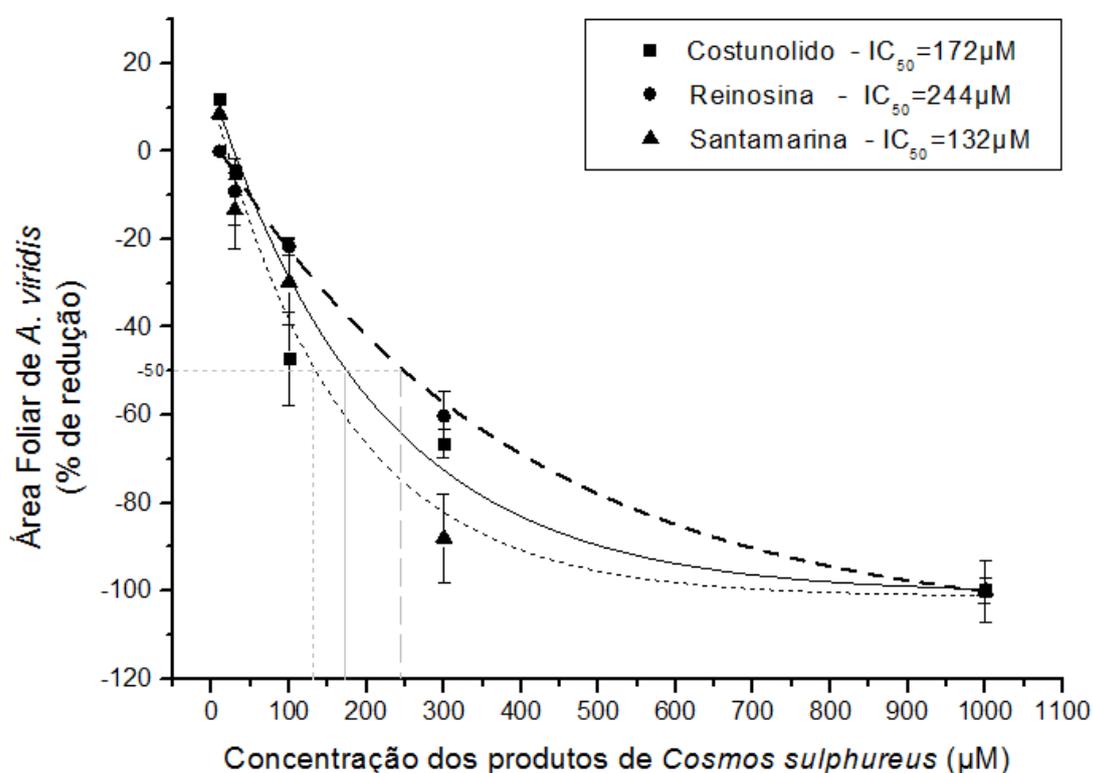


Figura 25. Área foliar de plântulas de *Amaranthus viridis* e valores de IC_{50} destas lactonas sob o efeito das lactonas sesquiterpênicas costunolido (1), reinosina (2) e santamarina (3) sobre a (*Valores expressos como diferença percentual do controle*).

Interessante ressaltar que o IC_{50} da santamarina foi muito semelhante ao obtido no bioensaio de coleótilos ($IC_{50} = 139,8 \mu\text{M}$) (item 5.3.1, página 70). Entretanto, no bioensaio de coleótilos de trigo, costunolido mostrou-se mais fitotóxico que santamarina. Isso significa que, dependendo da característica

avaliada, há exigências de concentrações distintas dos compostos, para a expressão de uma atividade inibitória. As características de crescimento, como as avaliadas no bioensaio de hidroponia, são mais bem definidas que às daquelas dos bioensaios de coleóptilos de trigo. Somado a isso, deve ser considerado, também, o modo de ação das lactonas, uma vez que cada processo fisiológico tem resposta diferente às várias doses de cada aleloquímico (REIGOSA et al., 1999).

Outra consideração importante é analisar a polaridade dos compostos que se mostraram mais bioativos: santamarina é mais polar que o costunolido e, conseqüentemente, mais solúvel em água, o que pode justificar a maior atividade da santamarina, quando avaliada isoladamente em bioensaios que utilizam plântulas. Ou seja, no meio ambiente, é provável que ocorra um sinergismo entre essas lactonas, costunolido, santamarina e reinosina e talvez a santamarina seja a principal lactona responsável pela atividade de *C. sulphureus* por ser a mais solúvel e, possivelmente, por estar mais disponível na solução do solo para a absorção das plantas vizinhas.

Além disso, conforme já calculado anteriormente, santamarina possui coeficiente de partição octanol-água mediano ($MLogP = 2,61$), que é um valor que confere a esta lactona características favoráveis quanto ao deslocamento no citoplasma da célula e à penetração nas membranas, uma vez que não é nem muito lipofílico, nem muito hidrofílico.

Da mesma forma que observado no bioensaio de fitotoxicidade (sementes), o bioensaio de hidroponia (plântulas) ratificou que as lactonas sesquiterpênicas costunolido, reinosina e santamarina apresentam efeito fitotóxico por inibirem o desenvolvimento de *P. maximum* e *A. viridis*, destacando-se a atividade inibitória apresentada pela **santamarina** sobre estas plantas daninhas.

5.3.2. Resultados obtidos para as raízes

Finalizado o estudo fitoquímico das folhas de *C. sulphureus*, procedeu-se o estudo das raízes. Devido à quantidade de material vegetal de raízes, em comparação com a de folhas, ser menor, optou-se em realizar a extração com acetona, que é um solvente que assegura a extração de todos os compostos de

baixa e média polaridade. A atividade do extrato bruto de acetona foi avaliada em um primeiro bioensaio de coleótilos de trigo (Figura 26). Os resultados mostraram que o extrato de raízes apresentou atividade inibidora do alongamento dos coleótilos, com um perfil que diminuía com a diluição. Os valores obtidos foram superiores a 70% de inibição na maior concentração avaliada (800 ppm), em torno de 55% para a segunda diluição (400 ppm) e 40% na terceira (200 ppm).

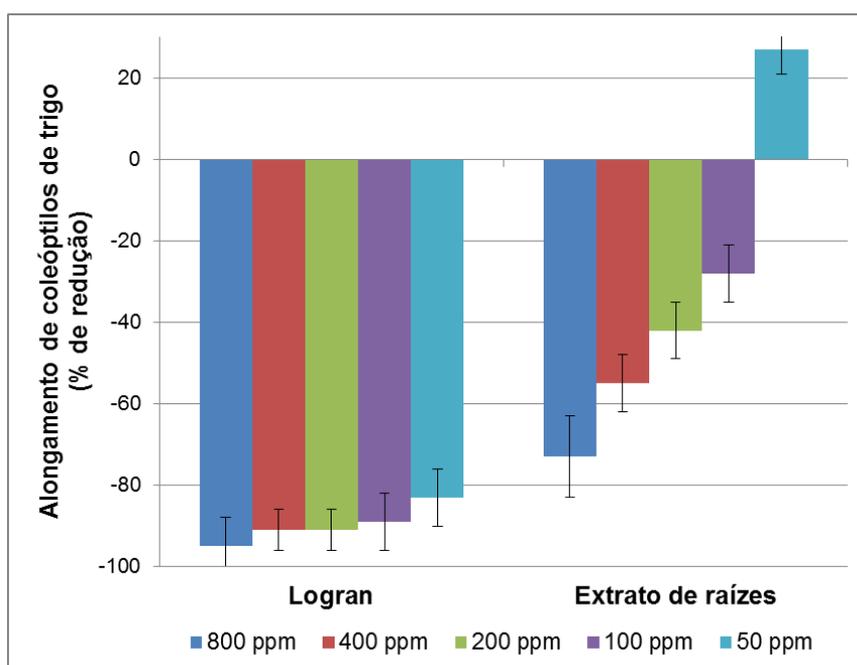


Figura 26. Efeito do herbicida triasulfuron (Logran®) e do extrato bruto de acetona de raízes de *Cosmos sulphureus* sobre o alongamento de coleótilos de trigo. (Valores expressos como diferença percentual do controle).

Uma vez que os resultados do extrato de raízes apresentaram atividade sobre os coleótilos, realizou-se um segundo bioensaio para avaliar a fitotoxicidade do extrato sobre as espécies de STS (Figura 27) e de plantas daninhas (Figura 28). O extrato de raízes não apresentou atividade fitotóxica para nenhuma das espécies avaliadas (Figuras 27 e 28).

Para determinar a composição química, realizou-se o isolamento e elucidação estrutural do extrato de raízes em acetona. Para tanto foi realizada uma separação inicial em cromatografia em coluna, utilizando como mistura de solventes hexano e acetona, com polaridade crescente, obtendo-se, ao final, sete frações.

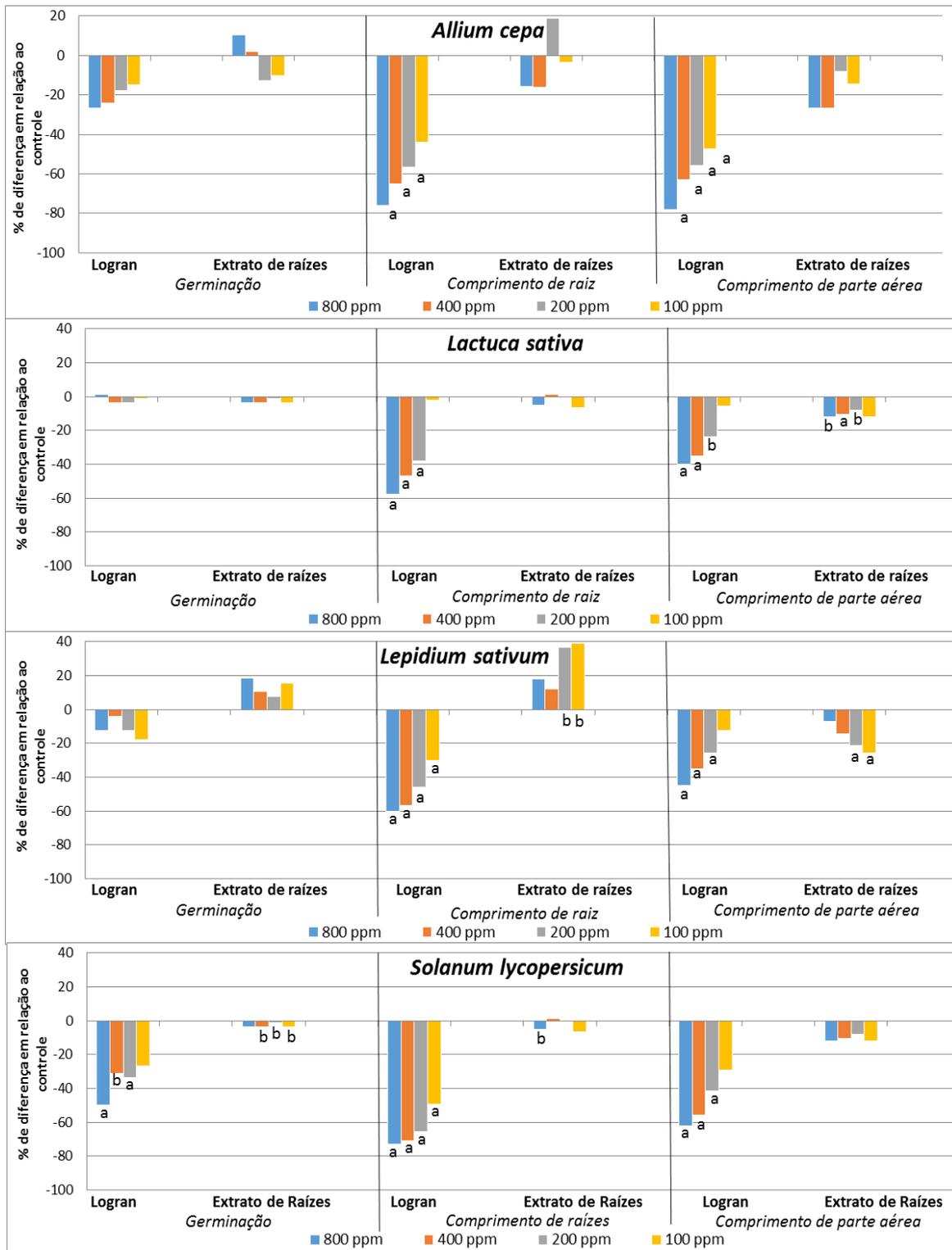


Figura 27. Efeito do herbicida triasulfuron (Logran®) e do extrato bruto de acetona (raízes) sobre a germinação e o crescimento das STS. (Valores expressos como diferença percentual do controle. Níveis de significância $p < 0,01$ (a) ou $0,01 < p < 0,05$ (b)).

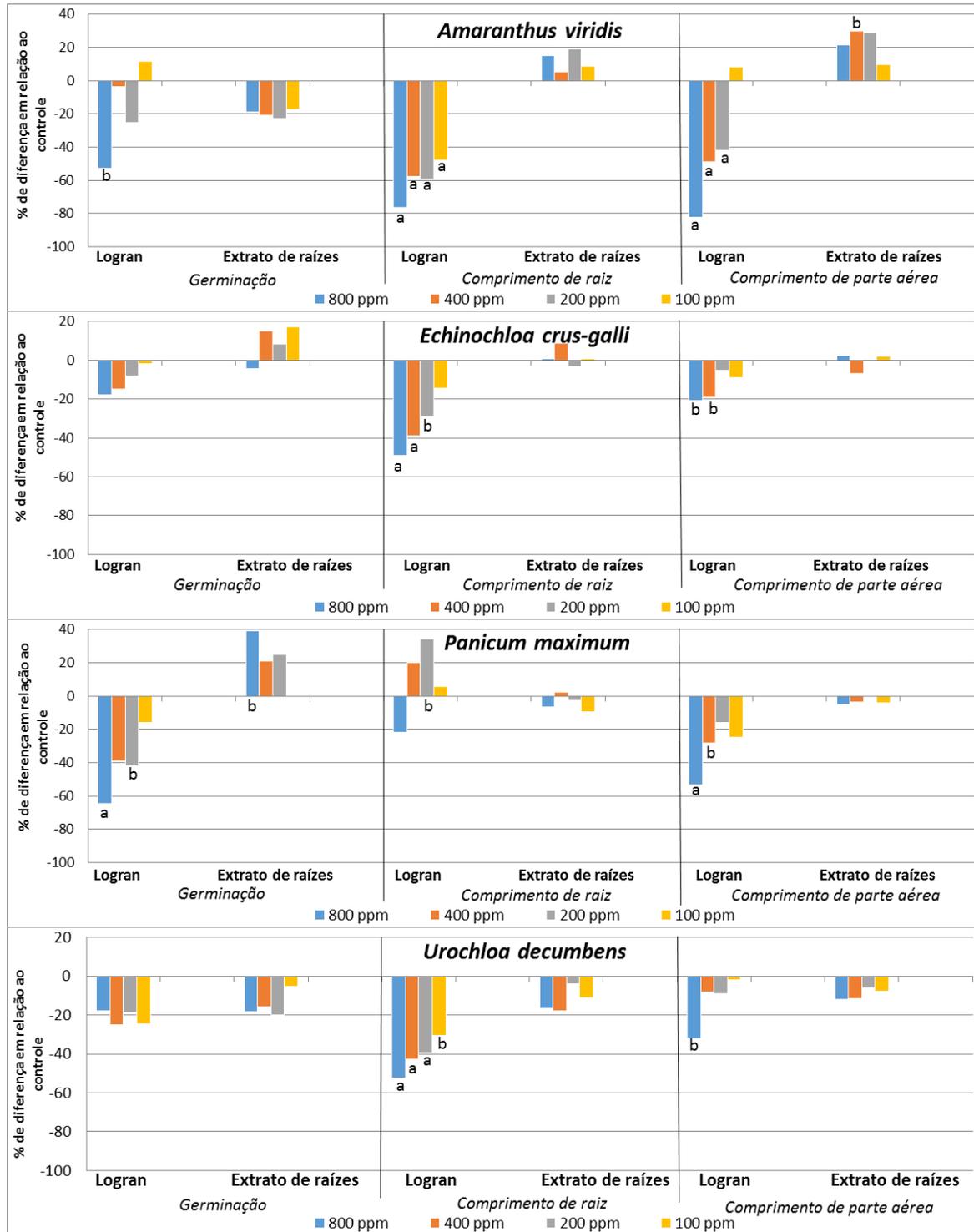


Figura 28. Efeito do herbicida triasulfuron (Logran®) e do extrato bruto de acetona (raízes) sobre a germinação e o crescimento das plantas daninhas. (Valores expressos como diferença percentual do controle. Níveis de significância $p < 0,01$ (a) ou $0,01 < p < 0,05$ (b)).

Como resultado deste estudo, foram isolados cinco compostos das raízes. Os dados espectroscópicos destes compostos coincidem com os descritos na bibliografia para: estigmaterol (**15**) (GRECA; MONACO; PREVITERA, 1990), Álcool 1',2'-epoxi-3',4-di-O-isobutiril-Z-coniferil (**16**) (THRON et al., 1989), 1',2'-Dihidroxi-3',4-di-O-isobutyrylconiferyl alcohol (**17**) (SUTARJADI et al., 1995), 1'-Acetoxi-4-O-isobutirileugenol (**18**) (SUTARJADI et al., 1995), Álcool 3'-O-Acetil-4--O-isobutiril-Z-coniferil (**19**) (SUTARJADI et al., 1995). A estrutura química dos compostos isolados nas raízes está ilustrada na Figura 29.

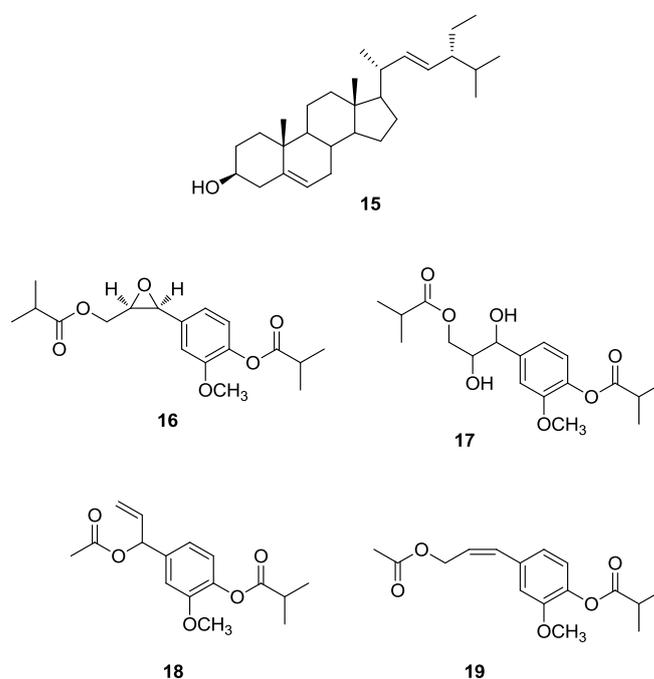


Figura 29. Compostos isolados de raízes de *C. sulphureus*: estigmaterol (**15**), Álcool 1',2'-epoxi-3',4-di-O-isobutiril-Z-coniferil (**16**), Álcool 1',2'-dihidroxi-3',4-di-O-isobutirilconiferil (**17**), 1'-Acetoxi-4-O-isobutirileugenol (**18**), Álcool 3'-O-Acetil-4--O-isobutiril-Z-coniferil (**19**).

Todos os compostos foram isolados pela primeira vez na espécie *C. sulphureus*. Os compostos **16** e **17** se descrevem pela primeira vez na literatura. Os espectros de $^1\text{H-RMN}$, $^{13}\text{C-RMN}$, $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$, HSQC e HMBC dos compostos

inéditos encontram-se anexos (Anexos 16 a 26). Os compostos isolados das raízes, com exceção do estigmasterol, são fenilpropanóides.

Os fenilpropanóides são compostos fenólicos, sintetizados via rota do ácido chiquímico, que é formado pela condensação de dois metabólitos da glicose (fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fosfato). O próximo passo dessa via é a formação do ácido corísmico, por meio da junção do ácido chiquímico e uma molécula de fosfoenolpiruvato. Os fenilpropanóides são um dos primeiros grupos formados a partir do ácido corísmico e são os precursores da lignina, já que esta nada mais é que um polímero de fenilpropanos, altamente ramificado (PERES, 2004). Já foram relatadas atividades anti-ulcerogênica, anti-tumoral (ITOKAWA et al., 1987) e anti-fúngica (SUTARJADI et al., 1995) para os fenilpropanóides. Ding et al. (2007) verificaram que os fenilpropanóides podem causar peroxidação e redução da atividade H⁺-ATPase da membrana celular, diminuindo a viabilidade radicular de plantas receptoras. Entretanto, neste estudo, nenhuma atividade foi verificada para as frações que continham os fenilpropanóides.

Diferenças entre o potencial alelopático de diferentes órgãos das plantas (folhas e raízes, por exemplo) também já foram reportados em *Medicago sativa* L. (CHON; KIM, 2002), *Eucalyptus* spp. (ZHANG; FU, 2010), *Euphorbia helioscopia* L. (TANVEER et al., 2010), *Aristolochia esperanza* (GATTI et al., 2004), *Alternanthera philoxeroides* e *A. sessilis* L. (MEHMOOD et al., 2014), nos quais os extratos de folhas mostraram-se mais potencialmente alelopáticos que extratos de raízes, caules, flores, frutos e sementes, corroborando os resultados obtidos no presente estudo.

Reichling, Horz e Ohlenmacher (1994) detectaram a presença de fenilpropanóides acumulados em raízes de *Coreopsis* spp., que não apresentaram efeito sobre a germinação de espécies receptoras, inibiram sensivelmente o comprimento de raiz e parte aérea nas concentrações mais altas e estimularam estes parâmetros nas concentrações mais diluídas.

Van Beek et al. (1990) detectaram o acúmulo de costunolido nas raízes de chicória (*Cichorium intybus* L.), planta também pertencente à família Asteraceae, o que não ocorreu no presente trabalho, uma vez que o costunolido só foi detectado nas folhas.

A distribuição dos aleloquímicos nos órgãos das plantas não é uniforme qualitativamente e quantitativamente (HARBORNE, 1972), ou seja, não estão necessariamente presentes nos mesmos órgãos. Os compostos aleloquímicos podem ser encontrados nas folhas, raízes, caules, grãos de pólen, frutos e sementes, variando em quantidade dependendo de aspectos como idade e estágio de desenvolvimento da planta (BOURGAUD et al., 2001). Ainda assim, as folhas parecem ser as fontes mais consistentes de compostos químicos envolvidos na fitotoxicidade (REINHARDT; BEZUIDENHOUT, 2001). Como a folha é o órgão vegetal mais metabolicamente ativo da planta, acredita-se que ela introduza uma maior diversidade de aleloquímicos no ambiente e, portanto, seja responsável pelos efeitos alelopáticos mais acentuados (RIBEIRO et al., 2009).

Como se pode observar, as três lactonas ativas maioritárias nas folhas não foram encontradas no extrato de raízes e os fenilpropanóides isolados das raízes não foram encontrados no estudo com os extratos das folhas.

Assim, verificou-se que os extratos de folhas e raízes estudados possuem composições químicas distintas. A ausência em sua composição das três lactonas ativas responsáveis pela atividade do extrato de folhas poderia explicar por que as raízes não mostraram atividade fitotóxica sobre as sementes testadas.

6. CONCLUSÕES

- *Cosmos sulphureus* apresenta potencial alelopático inibitório sobre a germinação e o crescimento inicial de *Lactuca sativa*, *Amaranthus viridis* e *Panicum maximum*.

- O potencial do efeito inibitório de *C. sulphureus* é dependente do modo de liberação dos aleloquímicos (decomposição da planta ou exsudação radicular), sendo a exsudação radicular o mais ativo.

- Fenilpropanóides e estigmasterol são compostos isolados das raízes de *C. sulphureus*, sendo os compostos Álcool 1',2'-epoxi-3',4-di-O-isobutiril-Z-coniferil (**16**), Álcool 1',2'-dihidroxi-3',4-di-O-isobutirilconiferil (**17**) descritos pela primeira vez na literatura.

- Os compostos majoritários isolados das folhas são lactonas sesquiterpênicas: costunolido (**1**), reinosina (**2**) e santamarina (**3**). Os três compostos majoritários caracterizados se descrevem pela primeira vez na planta *C. sulphureus*, com exceção do costunolido que já foi isolado anteriormente nesta planta.

- Dos compostos majoritários isolados das folhas, costunolido e santamarina foram os mais ativos, seguidos por reinosina. *Amaranthus viridis* e *P. maximum* foram as espécies mais sensíveis à ação das lactonas.

- As lactonas sesquiterpênicas isoladas das folhas são uma fonte potencial para modelos de novos tipos estruturais de herbicidas, que podem auxiliar no manejo de plantas daninhas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELGALEIL, S.A.M.; HASHINAGA, F. Allelopathic potential of two sesquiterpene lactones from *Magnolia grandiflora* L. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 11, 737-742, 2007.

ALAAGIB, R. M. O.; AYOUB, S. M. H. On the chemical composition and antibacterial activity of *Saussurea lappa* (Asteraceae). **The Pharma Innovation**, v. 4, n. 2, 73-76, 2015.

ALBUQUERQUE, M.B.; SANTOS, R.C.; LIMA, L.M.; MELO FILHO, P.D.A.; NOGUEIRA, R.J. M. C.; CÂMARA, C.A.G.; RAMOS, A. R.. Allelopathy, an alternative tool to improve cropping systems. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 31, n.2, 379–395., 2011.

ALMEIDA, F. S. **Alelopatia e as plantas**. Londrina: IAPAR, Circular 53, 68 p., 1988.

ALMEIDA, F.S. **Controle de plantas daninhas no plantio direto**. Londrina: IAPAR, Circular 67, 34 p., 1991.

ALVES, C. C. F.; ALVES, J. M.; SILVA, T. M. S. da; CARVALHO, M. G. de; JACOB NETO, J. Atividade Alelopática de Alcalóides Glicosilados de *Solanum crinitum* Lam. **Floresta e Ambiente**, Instituto de Floresta, UFRRJ, v. 10, n.1, p. 53-59, 2003.

ALVES, P.L.C.A. Perspectivas da utilização de aleloquímicos no manejo de plantas daninhas. In: POLTRONIERI, L.S. e ISHIDA, A.K.N. (eds.) **Métodos alternativos de controle de insetos-pragas, doenças e plantas daninhas: panorama atual e perspectivas na agricultura**. Bélem, EMBRAPA, p.25-58, 2008.

ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R. Plant bioassays to assess toxicity of textile sludge compost. **Scientia Agricola**, v. 62, n. 3, p. 286-290, 2005.

ARAÚJO NETO, A. D. ***Bidens sulphurea* (Sch. Bip.): efeitos fotodinâmico e antibiótico dos extratos etanólicos de suas flores.** 2011. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Exatas e da Terra) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

BASSO, S. M. S. Caracterização morfológica e fixação biológica de nitrogênio de espécies de *Adesmia DC.* e *Lótus L.* **(Tese doutorado)** Porto Alegre: UFRGS, 1999. 268 p.

BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A. Síntese e avaliação da atividade fitotóxica de lactonas derivadas do 2,4-dimetil-8-oxabicilo[3.2.1]-oct-6-em-3-ona. **Química Nova**, v.25, n.2, p. 203-208, 2002.

BARCIK, C. **Processos autoalelopáticos na cultura de alfafa (*Medicago sativa L.*) variedade crioula em solos de diferentes texturas.** 1999. 109 p. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) - Curitiba.

BERTHOLDSSON, N. O. Breeding spring wheat for improved allelopathic potential. **Weed Research**, v. 50, p. 49- 57, 2010.

BHADORIA, P. Allelopathy: a natural way towards weed management. **American Journal of Experimental Agriculture**,. V.1, p. 7–20, 2011.

BIANCHI, M.A. **Programa de difusão do manejo integrado de plantas daninhas em soja no Rio Grande do Sul:** 1994/1995. Cruz Alta: FUNDACEP FECOTRIGO, 31 p. 1995.

BENNETT, M.H.; MANSFIELD, J.W.; LEWIS M.J.; BEALE, M.H. Cloning and expression of sesquiterpene synthase genes from lettuce (*Lactuca sativa L.*). **Phytochemistry**, v. 60, n. 3, p. 255–261, 2002.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination. **Physiology and Biochemistry of Seeds**, Berlin, Springer-Verlag, v. 1, 359 p., 1978.

BLUM, M.S.. The importance of alkaloidal functions. 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, CRC Press, p. 163- 182, 2004.

BOHLMANN, F; BORNOWSKI, H; KÖHN, S. Die Polyine der Gattung Cosmos. **Chemische Berichte**, v. 97, 2583-2585, 1964.

BOURGAUD F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, v. 161, v. 5, p. 839-851, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 395p.

BREMNER P., HEINRICH M. J. "Natural products as targeted modulators of the nuclear factor- κ B pathway." **Pharmaceutical Pharmacology**, v. 54, n. 4, p. 453-472, 2002.

BULLETIN OF THE FACULTY OF PHARMACY (Cairo University), v. 40, n. 3, 189-199, 2002.

CALERA, M.R.; SOTO, F.; SANCHEZ, P.; BYE, R.; HERNANDEZ-BAUTISTA, B.; ANAYA, A.L.; LOTINA-HENNSEN, B.; MATA, R. Biochemically active sesquiterpene lactones from *Ratibida mexicana*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 2, p. 419–425, 1995.

CALLAWAY, R. M.; RIDENOUR, W. M. Novel weapons: invasive success and the evolution of increased competitive ability. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 2, n. 8, p. 436-443, 2004.

CALLAWAY, R. M.; ASCHEHOUG, E. T. Invasive plants versus their new and old neighbors: a mechanism for exotic invasion. **Science**, v. 290, p. 621-523, 2000.

CARVALHO, S. J. P., LÓPEZ-OVEREJO, R. F., MOYSÉS, T. C.; CHAMMA, H. M. C. P., CHRISTOFFOLETI, P. J. Identificação de biótipos de *Bidens* spp. resistentes aos inibidores da ALS através de teste germinativo. **Planta Daninha**, v. 22, n. 3, p. 411-417, 2004.

CARVALHO, S.I.C. **Caracterização dos efeitos alelopáticos de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu no estabelecimento das plantas de *Stylosanthes guianensis* var. *vulgaris* cv. Bandeirante**. 1993. 72 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1993.

CHADWICK, M.; TREWIN, H.; GAWTHROP, F.; WAGSTAFF, C. “Sesquiterpenoids Lactones: Benefits to Plants and People.” **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 6, 12780-12805, 2013.

CHATURVEDI, D. “Sesquiterpene lactones: Structural diversity and their biological activities”, en *Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry*. Vinod K. Tiwarii, Bhuwan BB. Mishra (editores), Research Signpost, Kerala (India), **2011**, 313-334.

CHEN, I. **A conceptual framework for assessing allelochemicals in soil environment**. In *Allelopathy: Basic and applied Aspects* (Rizvi, S. J.& Rizvi, V., eds.). Londres: Capman & Hall. p. 21-29, 1992.

CHENG, F; CHENG, Z. Research Progress on the use of Plant Allelopathy in Agriculture and the Physiological and Ecological Mechanisms of Allelopathy. **Frontiers in Plant Science**. 6, 1020. 2015.

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

CHON, S. U.; KIM, J. D. Biological activity and quantification of suspected allelochemicals from alfafa plant parts. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 188, n. 4, p. 281-285, 2002.

CHUNG, I.M.; AHN, L.K.; YUN, S.J. Assessment of allelopathic potential of barnyard grass (*Echinochloa crus-gall*) on rice (*Oriza sativa* L.) cultivars. **Crop Protection**, v. 20, p. 921-928. 2001.

CORREIA, N. M., DURIGAN, J. C.; KLINK, U P. Influência do tipo e da quantidade de resíduos vegetais na emergência de plantas daninhas. **Planta Daninha**, v. 24, n. 2, p. 245-253, 2006.

CONSTANT, H. L.; BEECHER, C. W. W. A method for the dereplication of natural product extracts using electrospray HPLC/MS. **Natural Product Letters**, v.6, n. 3, p. 193-196, 1995.

CORDELL, G.A. Biosynthesis of sesquiterpenes. **Chemical Reviews**. v. 76, p. 425–460, 1976.

CRUZ-SILVA, C. T. A; NASU, E. G. C.; PACHECO, F. P.; NOBREGA, L. H. P. Allelopathy of *Bidens sulphurea* L. aqueous extracts on lettuce development. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n.4, p. 679-684, 2015.

DAYAN, F. E.; DUKE, S. O. Natural products for weed management in organic farming in the USA. **Outlooks on Pest Management**, v. 21, n. 4, p. 156-160, 2010.

DAYAN, F. E.; HOWELL, J'L.; MARAIS, J. P.; FERREIRA, D.; KOIVUNEN, M. Manuka oil, a natural herbicide with preemergence activity. **Weed Science**, v. 59, n. 4, p. 464-469, 2011.

DEBA, F.; XUAN, T. D.; YASUDA, M.; TAWATA, S. Herbicidal and fungicidal activities and identification of potential phytotoxins from *Bidens pilosa* L. var. *radiata* Scherff. **Weed Biology and Management**, v. 7, p. 77-83, 2007.

DE KRAKER, J. W; FRANSSSEN, M. C. R.; JOERINK, M.; DE GROOT, A.; BOUWMEESTER, H. J. Biosynthesis of costunolide, dihydrocostunolide, and leucodin. Demonstration of cytochrome P450-catalyzed formation of the lactone ring present in sesquiterpene lactones of chicory. **Plant Physiology**, v. 129, p. 257–268, 2002.

DE LUQUE, A. P.; GALINDO, J. C. G.; MACÍAS, F. A.; JORRÍN, J. Sunflower Sesquiterpene lactone models induce orobanche cumana seed germination. **Phytochemistry**, v. 53, p. 45-50, 2000.

DOAN, A-T; ERVIN, G.; FELTON, G. Temporal effects on jasmonate induction of anti-herbivore defense in *Physalis angulata*: seasonal and ontogenetic gradients. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 32, n. 2, p. 117-126, 2004.

DUKE, S. O.; ABBAS, H. K. Natural products with potential use as herbicides. In: NARWAL, S.S. & TAURO, P. Allelopathy in pest management for sustainable agriculture. **Scientific publisher**. Jodhpur, India, 1996.

DUKE, S. O., SCHEFFLER, B. E., DAYAN, F. E. Allelochemicals as herbicides. **First European Allelopathy Symposium**. Vigo, Spain. p. 47-59, 2001.

DUKE, S. O., ROMAGNI, J. G., DAYAN, F. E. Natural product as source for new mechanisms of herbicidal action. **Crop Protection**. v. 19, p. 583-589, 2000.

DURIGAN, J. C.; ALMEIDA, F. S. **Noções sobre a alelopatia**. Jaboticabal: UNESP/FUNEP, 1993. 28 p. Boletim.

EINHELLIG, F.A. Mechanisms and modes of action of allelochemicals. In: PUTNAM, A.R. & TANG, C. S. **The Science of Allelopathy**. John Wiley and Sons, Inc., New York, p. 171-188, 1986.

EINHELLIG, F.A. Mode of 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, CRC Press, p. 217-238, 2004.

EINHELLIG, F. A. Plant x plant allelopathy: biosynthesis and mechanism of action. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 5., 1995, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, p. 59-74, 1995.

EINHELLIG, F. A. The physiology of allelochemical action: Clues and views. In: REIGOSA, M.; PEDROL, N. **Allelopathy from Molecules to Ecosystems**. Vigo, Universidade de Vigo. p. 1-23, 2002.

FERNANDEZ, A. L. Estudios Alelopáticos de Variedades Cultivadas de Girasol. SH-222 Y Stella. **Tese (Doutorado em Ciências Químicas)**. 483p. Universidad de Cádiz, Puerto Real, 2003.

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

GARCÍA, A. A; CARRIL, E. P. Metabolismo secundário de plantas. Reduca (Biología). **Serie Fisiología Vegetal**. v. 2, n. 3, p. 119-145, 2009.

GATTI, A.B.; PEREZ, S. C. J. G. A.; LIMA, M. I. S. Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze na germinação e no crescimento de

Lactuca sativa L. e *Raphanus sativus* L. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, p. 459-472, 2004.

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

GUSMAN, G. S.; YAMAGUSHI, M. Q.; VESTENA, S. Potencial alelopático de extratos aquosos de *Bidens pilosa* L., *Cyperus rotundus* L. e *Euphorbia heterophylla* L. **Iheringia**, Sér. Bot., Porto Alegre, v. 66, n. 1, p. 87 - 98, 2011.

HAN, X., CHENG, Z. H., MENG, H. W., YANG, X. L.; AHMAD, I. Allelopathic effect of decomposed garlic (*Allium sativum* L.) stalk on lettuce (*Lactuca sativa* var. *Crispa* L.). **Pakistan Journal of Botany**, v. 45, p. 225–233, 2013.

HANCOCK, C.; BARLOW, H.; LACEY, H. The east malling coleoptile straight growth test method. **Journal of Experimental Botany**, v. 15, 166-176, 1964.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical ecology**. Academic Press, London, 1972.

HANSEL, R.; KARTARAHARDJA, M.; HUANG, J-T, BOHLMANN, F. Sesquiterpenlacton- β -d-glucopyranoside sowie ein neues eudesmanolid aus *Taraxacum officinale*. **Phytochemistry**. v. 19, p. 857-861, 1980.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soils**. Berkeley: California Agricultural Experimental Station, 347p., 1950.

HUDSON, J. B.; GRAHAM, E. A.; ROSSI, R.; CARPITA, A.; NERI, D.; TOWERS, G. H. N. Biological activities of terthiophenes and polynes from Asteraceae. **Planta Medica**, v. 59, p. 447-450, 1993.

IAS – INTERNATIONAL ALLELOPATHY SOCIETY. What is Allelopathy?, 2017. Disponível em: <<http://allelopathy-society.osupytheas.fr/about/>>. Acesso em 07 de mai. 2017.

INDERJIT, DAKSHINI, K.M.M.; FOY, C.L. (Eds.). **Principles and practices in plant ecology: allelochemical interactions**. Boca Raton: CRC Press, Londres. 589p, 1999.

INDERJIT. Soil microorganisms: An important determinant of allelopathic activity. **Plant and Soil**, v. 4, p. 227-236, 2005.

IHSAN, M. Z.; KHALIQ, A., MAHMOOD, A., NAEEM, M., EL-NAKHLAWY, F., AND ALGHABARI, F. Field evaluation of allelopathic plant extracts alongside herbicides on weed management indices and weed-crop regression analysis in maize. **Weed Biology and Management**, n. 15, p. 78–86, 2015.

JABRAN, K., MAHAJAN, G., SARDANA, V., AND CHAUHAN, B. S. Allelopathy for weed control in agricultural systems. **Crop Protection**, n. 72, p. 57–65, 2015.

JACOBI, U. S.; FERREIRA, A. G. Efeitos alelopáticos de *Mimosa bimucronata* (DC) OK. sobre espécies cultivadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.26, p.935-943, 1991.

KASSUYA, C. A. L.; CREMONEZE, A.; BARROS, L. F. L.; SIMAS, A. S.; LAPA, F. R.; MELLO-SILVA, R.; STEFANELLO, M. E. A.; ZAMPONIO, A. R. Antipyretic and anti-inflammatory properties of the ethanolic extract, dichloromethane fraction and costunolide from *Magnolia ovata* (Magnoliaceae), **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, n. 3, p. 369 – 376, 2009.

KOO, T.H.; LEE, J.H.; PARK, Y.J.; HONG, Y. S.; KIM, H. S. et al. A sesquiterpene lactone, costunolide, from *Magnolia grandiflora* inhibits NF- κ B by targeting I κ B phosphorylation. **Planta Medica**, v. 67, p.103-107, 2001.

LABOURIAU, L. F. G. A germinação das sementes Departamento de Assuntos Científicos e Tecnológicos da Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos, Washington. **Série Biologia**, Monografia 24, 1983.

LABOURIAU, L. F. G.; AGUDO, M. On the physiology of seed germination in *Salvia hispânica* L. I. Temperatura effects. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 59 n. 1, p. 37-56, 1987.

LEE M. G., Lee K. T., Chi S. G., Park J. H. "Costunolide induces apoptosis by ROS-mediated mitochondrial permeability transition and cytochrome C release." **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, p. 303-306, 2001.

LI, Z. H.; WANG, Q.; RUAN, X.; PAN, C. D.; JIANG, D. A. Phenolics and plant allelopathy. **Molecules**, v. 15, p. 8933–8952, 2010.

LIMA, C. P.; CUNICO, M. M.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. Efeito dos extratos de duas plantas medicinais do gênero *Bidens* sobre o crescimento de plântulas de *Lactuca sativa* L. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 83-87, 2011.

LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K.; WILSON, I. D. The development and application of Coupled HPLC-NMR spectroscopy. **Advances in Chromatography**, New York, v. 36, p. 315-382, 1996.

LORENZI, H. Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 4. ed. Nova Odessa: **Plantarum**, 640p, 2008.

LORETO, F.; CICCIOLO, P.; BRANCALEONI, E.; CECINATO, A.; FRATTONI, M.; SHARKEY, T. D. Different sources of reduced carbon contribute to form three classes of terpenoid emitted by *Quercus ilex* L. Leaves. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 9966–9969, 1996.

MA, Y. Y.; ZHAO, D. G; GAO, K. Structural Investigation and Biological Activity of Sesquiterpene Lactones from the Traditional Chinese Herb *Inula racemose*. **Journal of Natural Products**, v. 76, p. 564-570, 2013.

MA Y.Y., ZHAO D.G.; GAO K. "Structural Investigation and Biological Activity of Sesquiterpene Lactones from the Traditional Chinese Herb *Inula racemose*." **Journal of Natural Products**, n. 76, p. 564-570, 2013.

MAAS, E. V.; HOFFMAN, G. J. Crop salt tolerance - Current assessment. **Journal of Irrigation and Drainage Division**, v.103, p.115-134, 1977.

MACÍAS, F.A.; TORRES, A.; MOLINILLO, J.G.; VARELA, R.M.; CASTELLANO, D. Potential allelopathic sesquiterpene lactones from sunflower leaves. **Phytochemistry**, v. 43, p. 1205–1215, 1996.

MACÍAS, F. A., MARIN, D., OLIVEROS-BASTIDAS, A., VARELA, R. M., SIMONET, A. M., CARRERA, C., et al. Allelopathy as a new strategy for sustainable ecosystems development. **Biological Sciences in Space**, n. 17, p. 18–23, 2003.

MACÍAS, F. A. Allelopathy in search for natural herbicide models. In: NARWAL, S.S. & TAURO, P. Allelopathy in Pest Management for Sustainable Agriculture. **Scientific publisher**. Jodhpur, India, p. 310-329, 1996.

MACÍAS, F.A.; GALINDO, J.C.G.; MOLINILLO, J.M.G. Plant biocommunicators: application of allelopathic studies. In: J.C. Luijendijk. **2000 years of natural products research past, present and future**. Phytoconsult: Teus, 2000.

MACÍAS, F. A., CASTELLANO, D., MOLINILLO, J. M. G. Search for a standart phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. **Journal Agricultural and Food Chemistry**. v. 48, n. 6, p. 2512-2521, 2000.

MACÍAS, F. A.; VARELA, R. M.; TORRES, A.; MOLINILLO, J. M. G. Heliaespirone A: the first member of a novel family of bioactive sesquiterpenes. **Tetrahedron Letters**, v. 39, p. 427-430. 1998.

MAGIERO, E.C.; ASSMANN, J.M.; MARCHESE, J.A.*; CAPELIN, D.; PALADINI M.V.; TREZZI, M.M. Efeito alelopático de *Artemisia annua* L. na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.) e leiteiro (*Euphorbia heterophylla* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 3, p. 317-324, 2009.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination: aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.

MAHALL, B. E; CALLAWAY, R. M. Root communication mechanisms and intracommunity distributions of two Mojave Desert shrubs. **Ecology**, v. 73, p. 2145–2151, 1992.

MALLIK, A. **Allelopathy: Advances, Challenges and Opportunities**. International Allelopathy Society. The Fourth World Congress on Allelopathy was held at Charles Sturt University in Wagga Wagga, NSW, Australia, August 2005. Disponível em <<http://www.regional.org.au/au/allelopathy/>>.

MARASCHIN-SILVA, F.; ÁQUILA, M. E. A. Potencial alelopático de espécies nativas na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 1, p. 61-69, 2006.

MARCHANT, Y. Y.; GANDERS, F. R.; WAT, C.; TOWERS, G. H. N. Polyacetylenes in Hawaiian *Bidens*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 12, p. 167-178, 1984.

MARTÍN, A.; LUNA, J. D. D. **Bioestadística para las ciencias de la salud**; Ediciones Norma: Madrid, Spain, 1990.

MEDEIROS, A. R. M. Alelopatia – importância e suas aplicações. **Horti Sul**, v. 1, n. 3, p. 27-32, 1990.

MEHMOOD , A.; TANVEER, A.; NADEEM, M. A.; ZAHIR, Z. A . Comparative allelopathic potential of metabolites of two *Alternanthera* species against germination and seedling growth of rice. **Planta Daninha**, v. 32, p. 1-10, 2014.

MICHALSKA, K.; STOJAKOWSKA, A.; MALARZ, J.; DOLEZALOVÁ, I.; LEBEDA, A.; KISIEL, W. Systematic implications of sesquiterpene lactones in *Lactuca* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, n. 37, p. 174-179, 2009.

MILLER, D.A. Allelopathy in forage crop systems. **Agronomy Journal**. v. 88, n. 6, p. 854-859, 1996.

MIRANDA, M. A. F. M.; VARELA, R. M.; TORRES, A.; MOLINILLO, J. M. G.; GUALTIERI, S. C. J.; MACIAS, F. A. Phytotoxins from *Tithonia diversifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 78, p. 1083-1092, 2015.

MOLISCH, H. **Der Einfluss Einer Pflanze Auf Die Andere-allelopathie**. Jena: Fischer, 1937.

MORIGUCHI, I.; HIRONO, S.; NAKAGOME, I.; HIRANO, H. Comparison of Reliability of log *P* Values for Drugs Calculated by Several Methods. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 42, n. 4, p. 976 - 978, 1994.

NARWAL, S. S.; HAOUALA, R. Role of allelopathy in weed management for sustainable agriculture. In: Cheema, Z. A.; Farooq, M.; Wahid, A. (Eds) **Allelopathy: current trends and future applications**, New York: Springer, p.217-250, 2013.

NEPOMUCENO, M. Intervalo de dessecação de *Urochloa ruziziensis* (R. German & Evrard) Crins e seu efeito alelopático na cultura da soja RR. **Tese de Doutorado**,

Programa de pós-graduação em Produção Vegetal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus Jaboticabal, 2011. 128p.

NITSCH, J. P.; NITSCH, C. Studies on the growth of coleoptile and first internode sections. A new, sensitive, straight-growth test for auxins. . **Plant Physiology**, v. 31, p. 94-111, 1956.

OLIBONE, D.; CALONEGO, J.C.; PAVINATO, P.S.; ROSOLEM, C.A. Crescimento inicial da soja sob o efeito de resíduos de sorgo. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 24, n. 2, p. 255-261, 2006.

OLIVEIRA, S. C. C.; GUALTIERI, S. C. J.; DOMÍNGUEZ, F. A. M.; MOLINILLO, J. M. G.; MONTOYA, R. V. Estudo fitoquímico de folhas de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil (Solanaceae) e sua aplicação na alelopatia. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 3, p. 607-618, 2012.

OLIVEIRA JR., R.S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M.H. (Ed.) **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Curitiba, PR: Omnipax, p.48p, 2011.

OLIVEROS-BASTIDAS, A.J. El fenómeno alelopático. El concepto, las estrategias de estudio y su aplicación en la búsqueda de herbicidas naturales. **Química Viva**. v. 7, n. 1, 2008.

PERES, Lázaro E. P. In: *Metabolismo secundário*. São Paulo: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2004.

POECKE, R. M. P. V.; DICKE, M. Signal transduction downstream of salicylic and jasmonic acid in Herbivory-induced parasitoid attraction by *Arabidopsis* is independent of JAR1 and NPR1. **Plant, Cell & Environment**., n. 26, p. 1541–1548, 2003.

QASEM, J.R. Applied allelopathy in weed management: an update. In: Cheema, Z. A.; Farooq, M.; Wahid, A. (Eds) **Allelopathy: current trends and future applications**, New York: Springer, p. 217-250, 2013.

RABELO, G. O.; FERREIRA, A. L. S.; YAMAGUSHI, M. Q.; VESTANA, S. Potencial alelopático de *Bidens pilosa* L. na germinação e no desenvolvimento de espécies cultivadas. **Revista Científica da Faminas**, v. 4, n. 1, 2008.

RAVEN, P.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S.E. *Biologia vegetal*. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

REIGOSA, M. J., SÁNCHEZ-MOREIRAS, A., GONZÁLES, L. Ecophysiological approach in allelopathy. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 18, p. 577-608, 1999.

REINHARDT, C. F.; BEZUIDENHOUT, S. R. Growth stage of *Cyperus esculentus* influences its allelopathic effect on ectomycorrhizal and higher plant species. In: KOHLI, R.K.; SINGH, H. P.; BATISH, D. R. (Eds.). *Allelopathy in agroecosystems*. **Food Products Press**, Binghamton, 2001.

REICHLING, J.; HORZ, K. H.; OHLENMACHER, U. *Coreopsis* spp: In vitro Culture and the Formation of Phenylpropanoids and Other Secondary Metabolites. In: BAJAJ, Y. P. S (ed). **Biotechnology in Agriculture and Forestry** : Medicinal and Aromatic Plants VI. Springer, vol. 26. p. 106-119, 1994.

REN, Y. L.; ZHOU, Y. W.; YE, Y. H. Chemical components of *Lactuca* and their bioactivities. **Yao Xue Xue Bao**, v. 39, p. 954–960, 2004.

REZENDE, C. P.; PINTO, J. C.; EVANGELISTA, A. R.; SANTOS, I. P. A. dos. Alelopatia e suas interações na formação e manejo de pastagens. **Boletim agropecuário**, n.54, p.1-55, 2003.

RIBEIRO, J.P.; MATSUMOTO, R. S.; TADAO, L. K.; VOLTARELLI, V. M.; LIMA, M. I. S. Efeitos alelopáticos de extratos aquosos de *Crinum americanum* L. **Brasilian Journal of Botany**, n. 32, p. 183-188, 2009.

RIAL C. “Estudio del potencial alelopático de *Cynara cardunculus*.” Dissertação de Mestrado, Universidad de Cádiz, **2013**.

RIBEIRO, L. O.; BARBOSA, S.; BALIEIRO, F. P.; BEIJO, L. A.; SANTOS, B. R.; GOUVEA, C. M. C. P.; PAIVA, L. V. Fitotoxicidade de extratos foliares de barbatimão [*Stryphnodendron adstringes*(Mart.) Coville] em bioensaio com alface. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v. 10, n. 2, p. 220-225. 2012

RICE, E.L. **Allelopathy**. 2nd ed., New York, Academic Press, 1984.

RIDENOUR, W. M.; CALLAWAY, R. M. The relative importance of allelopathy in interference: the effects of an invasive weed on a native bunchgrass. **Oecologia**, v. 126, p. 444-450, 2001.

RIVERO, A.; QUINTANA, J.; EIROA, J. L.; LÓPEZ, M.; TRIANA, J.; BERMEJO, J.; ESTÉVEZ, F. Potent induction of apoptosis by germacranolide sesquiterpene lactones on human myeloid leukemia cells. **European Journal of Pharmacology**, n. 482, p.77-84, 2003.

RIZVI, S. J. H.; PANDEY, S. K.; MUKERJI, D.; MATHUR, N. 1,3,7-trimethylxanthine, a new chemosterilant for stored grain pest, *Callosobrochus chinensis* (L.). **Zeitschrift für Angewandte Entomologie**, v. 90, p. 378–381, 1980.

ROLLWAGEN, D. G.; CARVALHO, R. I. N. Qualidade fisiológica de sementes de camomila [*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert] após envelhecimento acelerado e estresse salino. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.13, n.2, p.139-145. 2011.

RODRIGUES, L. R. A.; RODRIGUES, T. J. D.; REIS, R. A. **Alelopatia em plantas forrageiras**. Jaboticabal: UNESP/FUNEP, 1992. 18 p. Boletim.

RUZICKA, L. The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. **Cellular and Molecular Life Sciences**, n. 9, p. 357-367, 1953

SCHNEIDER, T. C.; CRUZ-SILVA, C. T. A. Potencial alelopático do nabo-forrageiro (*Raphanus sativus* L.) sobre o desenvolvimento do milho (*Zea mays* L.) e aveia-preta (*Avena strigosa* Schreb.) **Revista Thêma et Scientia**. v. 2, n. 1, p. 151-156, 2012.

SEAMAN, F.C. Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the *Asteraceae*. **Botanical Review**, n. 48, p. 121–595, 1982.

SCHMIDT, T. J.; BOMME, U.; ALFERMANN, A. W. Sesquiterpene Lactone Content in Leaves of *in vitro* and Field Cultivated *Arnica montana*. **Planta Medica**, v. 64, p. 268, 1998.

SILVA, D. B. Atividade antialérgica e estudos químicos das espécies *Bidens gardneri* Bak. e *Bidens sulphurea* Sch. Bip. (Asteraceae). **Tese (Doutorado)** – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

SILVA, L. R.; FERREIRA, M. M. C. Estudo do coeficiente e partição octanol-água de bifenilas policloradas (PCBs) utilizando parâmetros topológicos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 312-18, 2003.

SILVA JUNIOR, W. C.; NEPOMUCENO, M. P.; CARVALHO, J. E.; ALVES, P. L. C. A. Atividade antiproliferativa das frações das folhas de *Bidens sulphurea* Sch. Bip. em culturas de células tumorais humanas. In: **I Simpósio Iberoamericano de Investigação em Câncer**, 2013, Campinas. Publicações no âmbito da Rede Ribecancer, 2013.

SILVA JUNIOR, W. C.; CARVALHO, J. E.; NEPOMUCENO, M. P.; ALVES, P. L. C. A. Avaliação da atividade anticâncer dos extratos e frações obtidos de *Bidens sulphurea*. In: **XXIV Congresso de Iniciação Científica da Unesp**, 2012, Jaboticabal. XXIV Congresso de Iniciação Científica da Unesp. São Paulo: UNESP, v. 3, 2012.

SCHOW, M. K.; EINHELLIG, F. A. Allelopathic effects of cultivated sunflower on grain sorghum. **Botanical Gazette**, v. 143, p. 505-510, 1982.

SMITH, P.M. **The chemotaxonomy of plants**. Edward Arnold, Bristol, 1976.

SOUZA FILHO, A. P. S.; ALVES, S. M. Mecanismo de liberação e comportamento de aleloquímicos no ambiente. In: SOUZA FILHO, A. P. S.; ALVES, S. M. Alelopatia: Princípios Básicos e Aspectos Gerais. Belém: **EMBRAPA**, p.111-154. 2002.

SOUZA FILHO, A.P.S.; PEREIRA, A.A.G.; BAYMA, J.C. Aleloquímico produzido pela gramínea forrageira *Brachiaria humidicola*. **Planta Daninha**, v. 23, n. 1, p. 25-32, 2005.

SOUZA, L. S.; VELINI, E. D.; MAIOMONI-RODELLA, R. C. S. Efeito alelopático de plantas daninhas e concentrações de capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) no desenvolvimento inicial de eucalipto (*Eucalyptus grandis*). **Planta Daninha**, v. 21, n.3, p. 343-354, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5.ed. Porto Alegre:Artemed, 2013. 918 p.

TALBERT, R. E.; BURGOS, N. History and management of herbicide-resistant barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) in Arkansas rice. **Weed Technology**, v. 21, p. 324-331, 2007.

TANVEER, A.; REHMAN, A.; JAVAID, M. M.; ABBAS, R. N.; SIBTAIN, N.; AHMAD, A. U. H.; IBIN-I-ZAMIR, M. S.; CHAUDHARY, K. M.; AZIZ, A. Allelopathic potential of

Euphorbia helioscopia L. against wheat (*Triticum aestivum* L.), chickpea (*Cicer arietinum* L.) and lentil (*Lens culinaris* Medic.). **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 34, p. 75-81, 2010.

TANVEER, A.; JABBAR, M. K.; KAHLIQ, A.; MATLOOB, A.; ABBAS, R. N.; JAVAID, M. M. Efectos alelopáticos de fracciones acuosas y orgánicas de *Euphorbia dracunculoides* Lam. sobre la germinación y crecimiento de plántulas de garbanzo y trigo. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 72, p. 495-501, 2012.

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.

TETKO, V. I.; TANCHUK, V. Y. Application of Associative Neural Networks for Prediction of Lipophilicity in ALOGPS 2.1 Program. **Journal of Chemical Information and Computer Science**, v. 42, n. 5, p. 1136-1145, 2002.

TOBINAGA, S.; SHARMA, M. K.; AALBERSBERG, W. G. L.; WATANABE, K.; IGUCHI, K.; NARUI, K.; SASATSU, M.; WAKI, S. Isolation and identification of a potent antimalarial and antibacterial polyacetylene from *B. pilosa*. **Planta Medica**, v. 75, p. 624-628, 2009.

THULER, R.T.; DE BORTOLI, S.A.; HOFFMANN-CAMPO C.B. Classificação de cultivares de brássicas com relação à resistência à traça-das-crucíferas e à presença de glucosinolatos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 467-474, 2007.

VAN BEEK, T.A.; MAAS, P.; KING, B.M.; LECLERCQ, E.; VORAGEN, A. G. J. et al. Bitter sesquiterpene lactones from chicory roots. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 38, p. 1035–1038, 1990.

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

VETTER, J. Plant cyanogenic glycosides. **Toxicon**, v. 38, p. 11-36, 2000.

VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 390-400, 2003.

WATERMAN, P.G; MOLE, S. **Analysis of phenolic plant metabolites**. Blackwell Scientific Publications, London, 1994.

WILLIAMS, D.; BARUCH, Z. African grass invasion in the Americas: Ecosystem consequences and the role of ecophysiology. **Biological Invasions**, v. 2, p. 123-140, 2000.

XU, Y. Z.; GU, X. Y.; PENG, S. J.; FANG, J. G.; ZHANG, Y. M.; HUANG, D. J.; CHEN, J. J.; GAO, K. Design, synthesis and biological evaluation of novel sesquiterpene mustards as potencial anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 95, p. 284-297, 2015.

YOSHIOKA, H.; RENOLD, W.; FISCHER, N. H.; HIGO, A.; MABRY, T. J. Sesquiterpene lactones from *Ambrosia confertiflora* (Compositae). **Phytochemistry**, v. 9, p. 823–832, 1970.

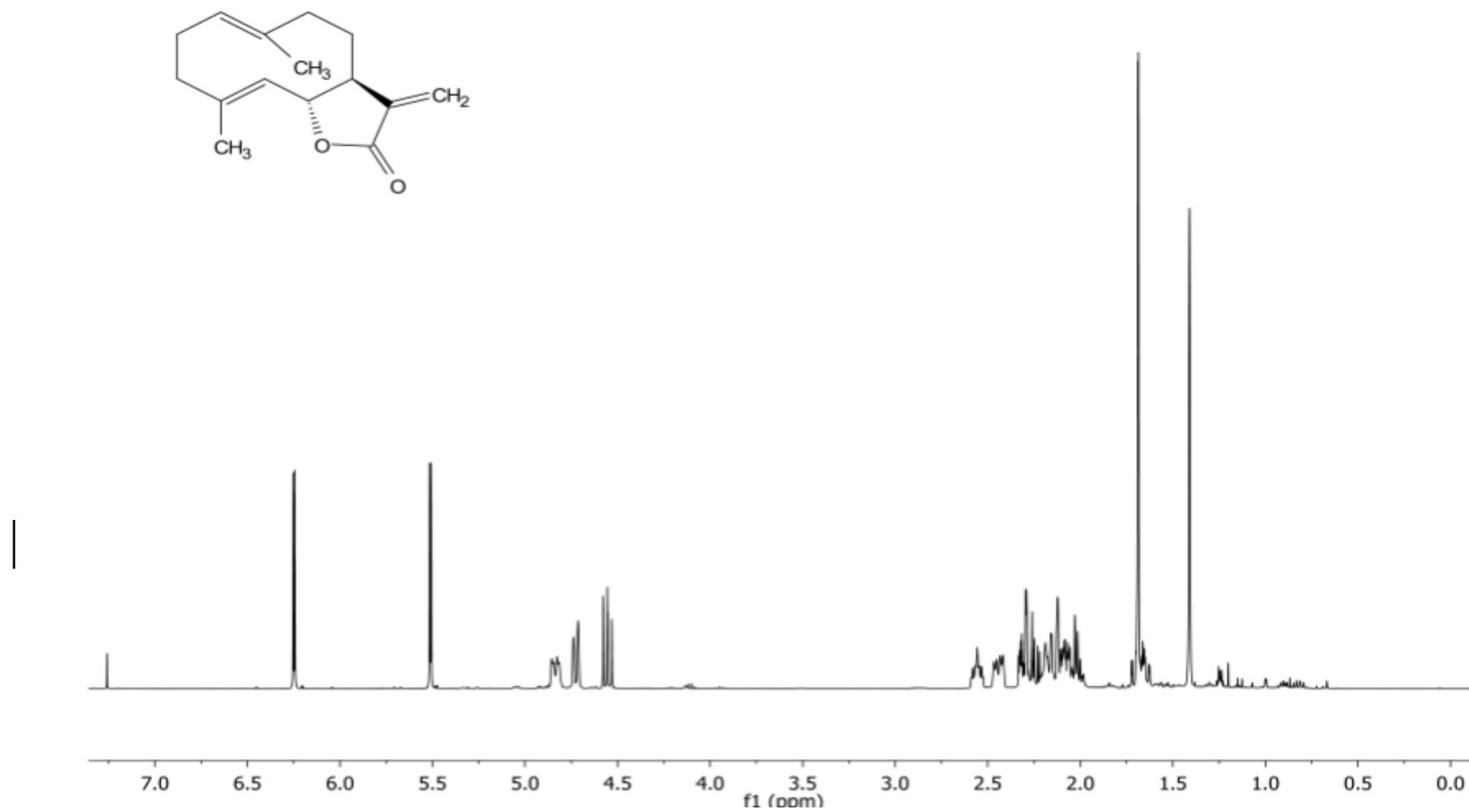
ZHANG, C; FU, S. Allelopathic effects of leaf litter and live roots exudates of *Eucalyptus* species on crops. **Allelopathy Journal**, v. 26, p. 91-100, 2010.

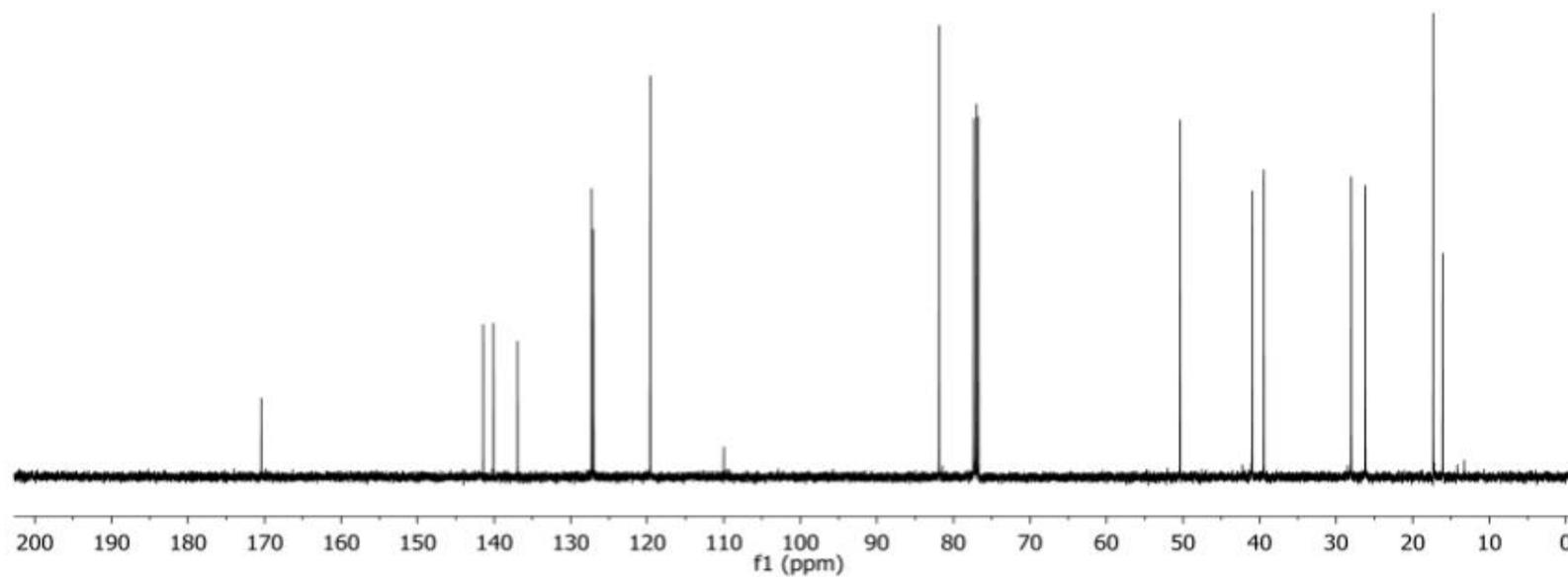
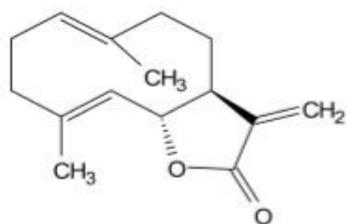
ZHANG, Z.; GAO, Z. H.; WEI, J. H.; XU, Y. H.; LI, Y.; YANG, Y.; MENG, H.; SUI, C.; WANG, M. X. The mechanical wound transcriptome of three-year-old *Aquilaria sinensis*. **Acta Pharmaceutica Sinica**, v. 47, p. 1106-1110, 2012.

ZHENG, H.; CHEN, Y.; ZHANG, J. WANG, L.; ZHAOXIANG, J.; HUANG, H.; MAN, S.; GAO, W. Evaluation of protective effects of costunolide and

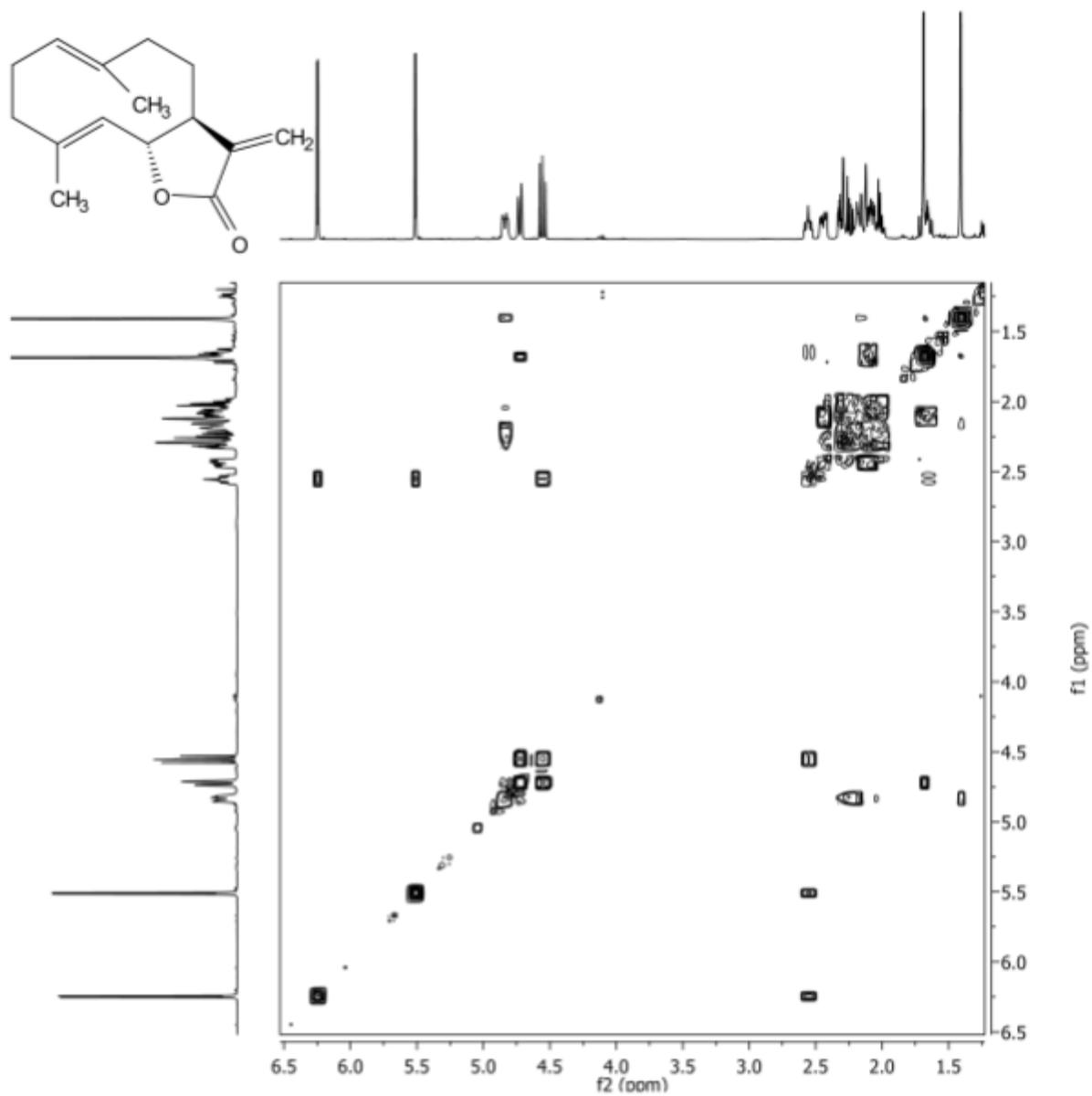
dehydrocostuslactone on ethanol-induced gastric ulcer in mice based on multi-athway regulation. **Chemico-Biological Interactions**, v. 250, p. 68-77, 2016.

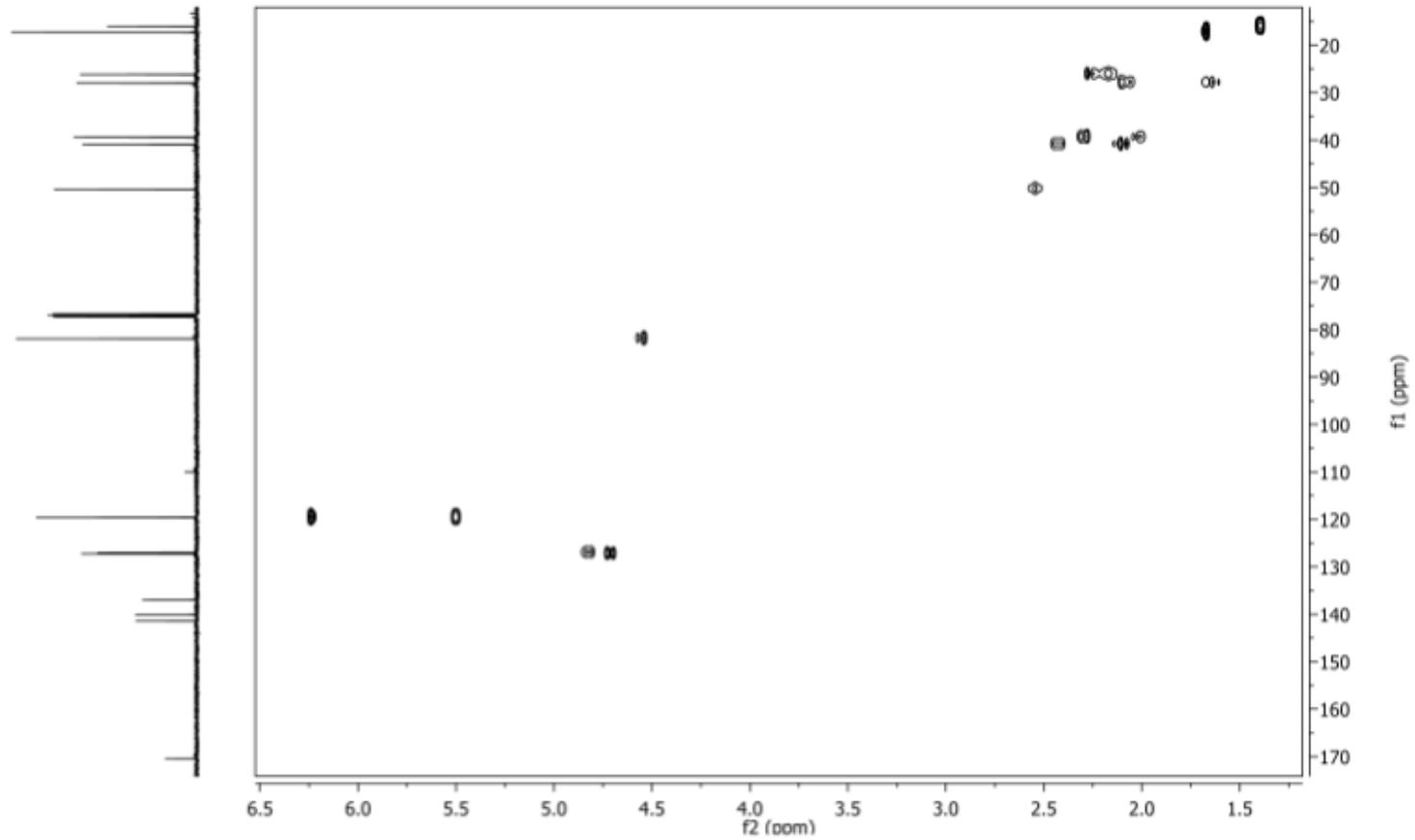
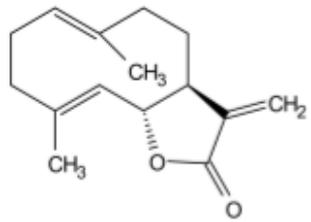
8. ANEXOS

Anexo 1. Espectro de ¹H-RMN del costunolido (1)

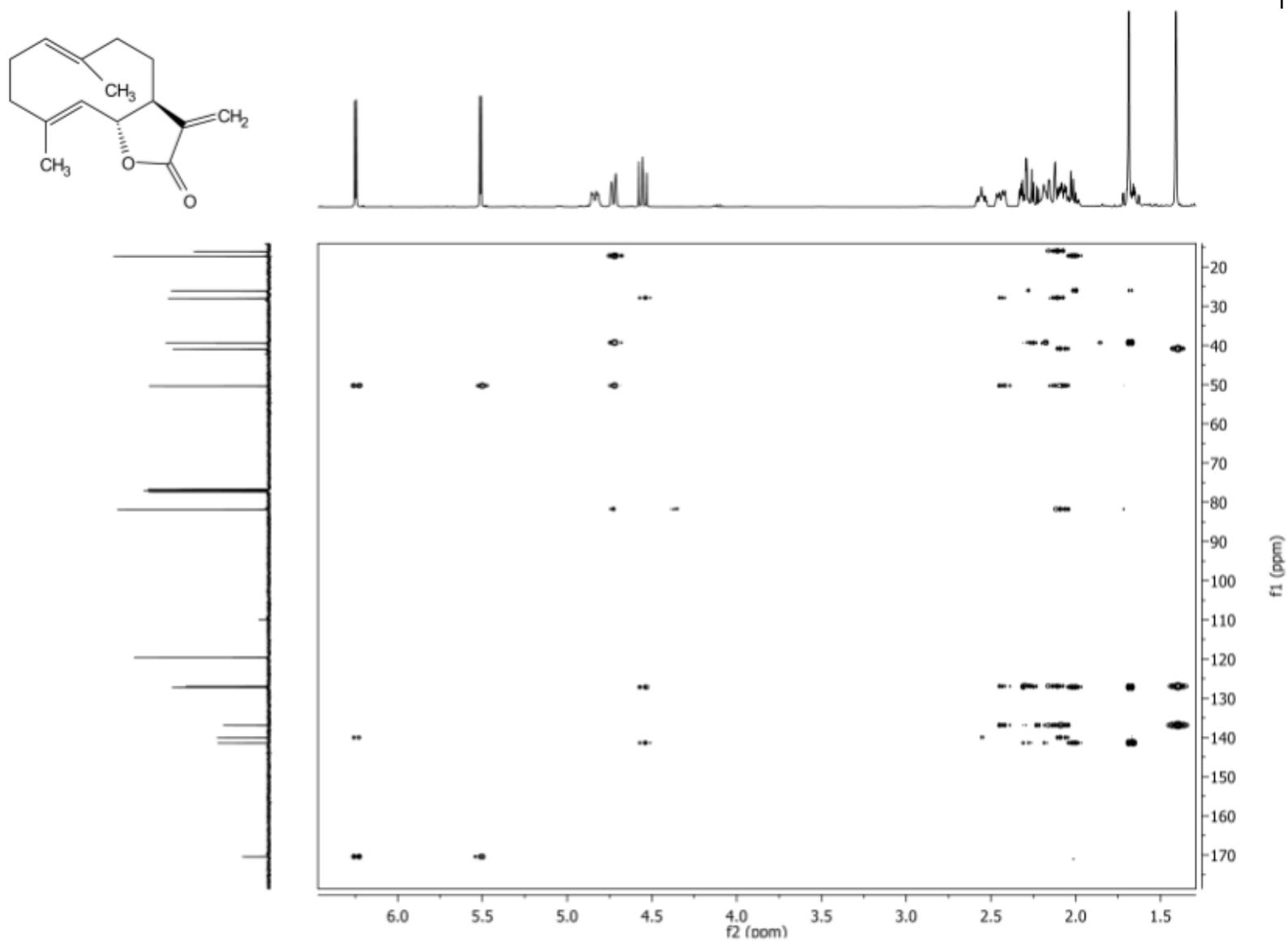


Anexo 2. Espectro de ^{13}C -RMN de costunolido (1)

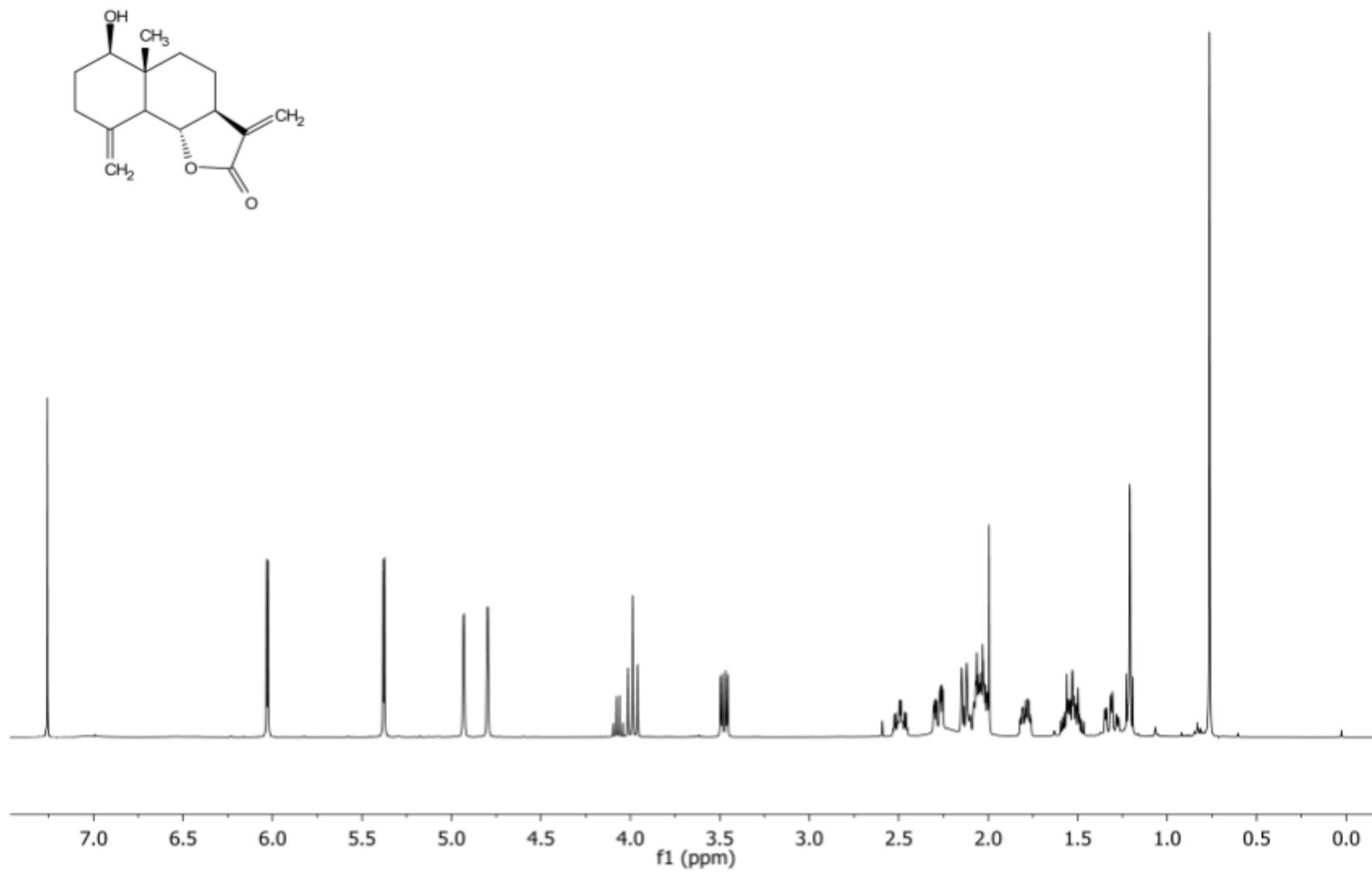
Anexo 3. Espectro de ^1H - ^1H -COSY de costunolido (1)



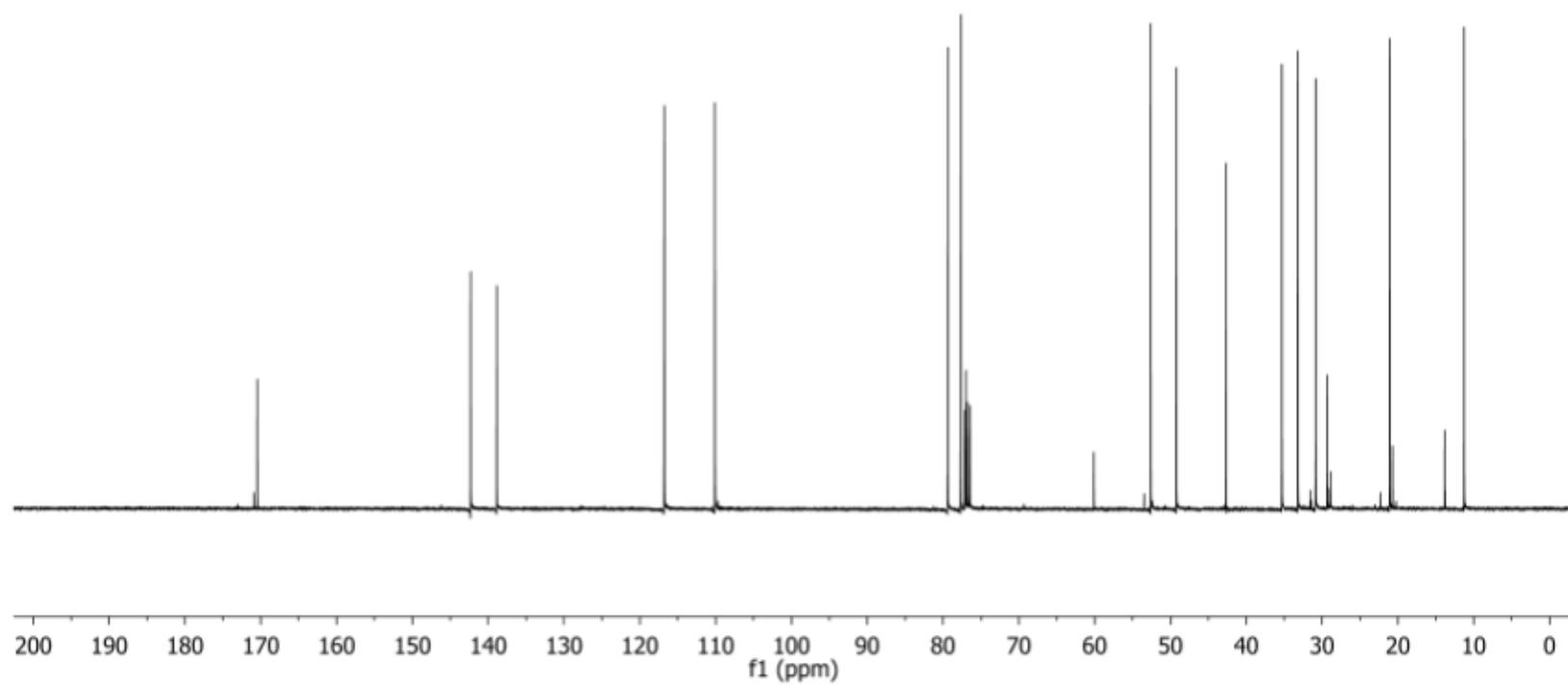
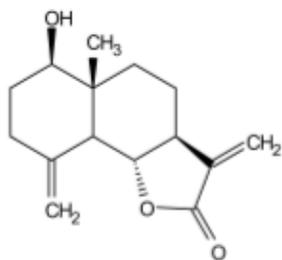
Anexo 4. Espectro de HSQC de costunolido (1)



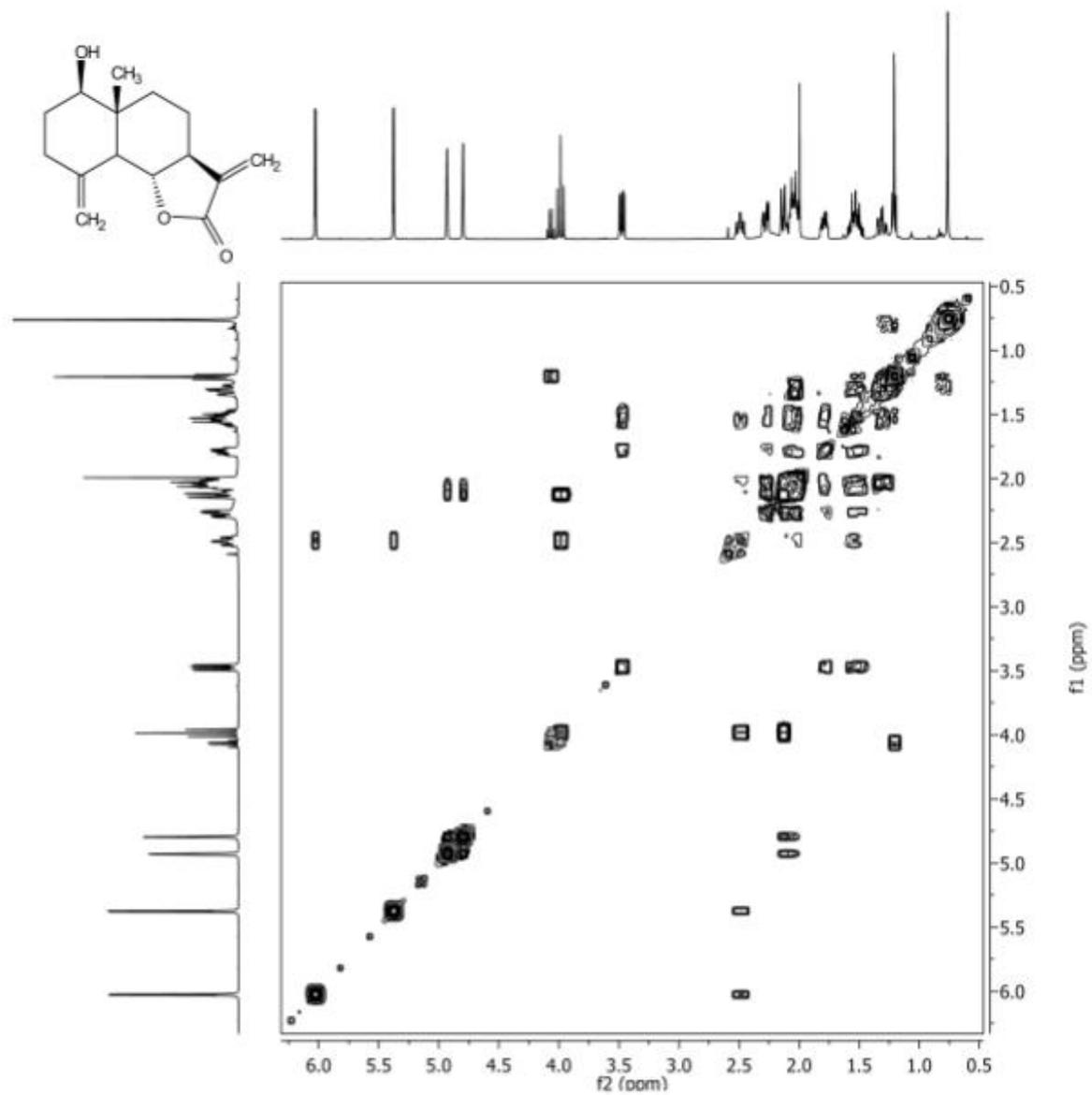
Anexo 5. Espectro de HMBC de costunolido (1)



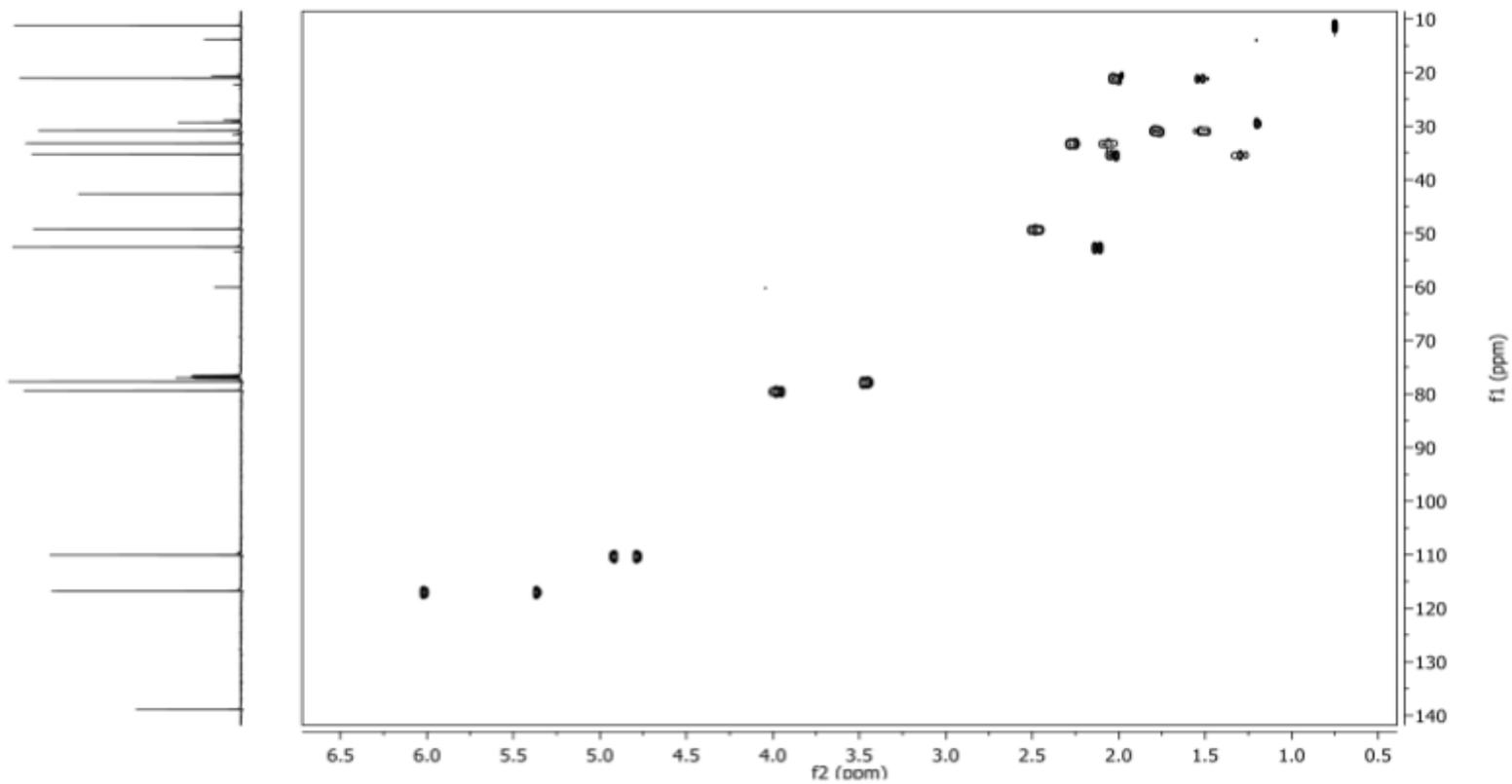
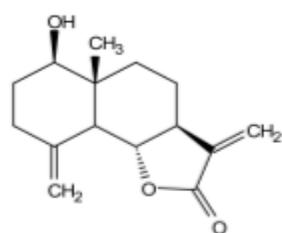
Anexo 6. Espectro de ¹H-RMN de reinosina (2)



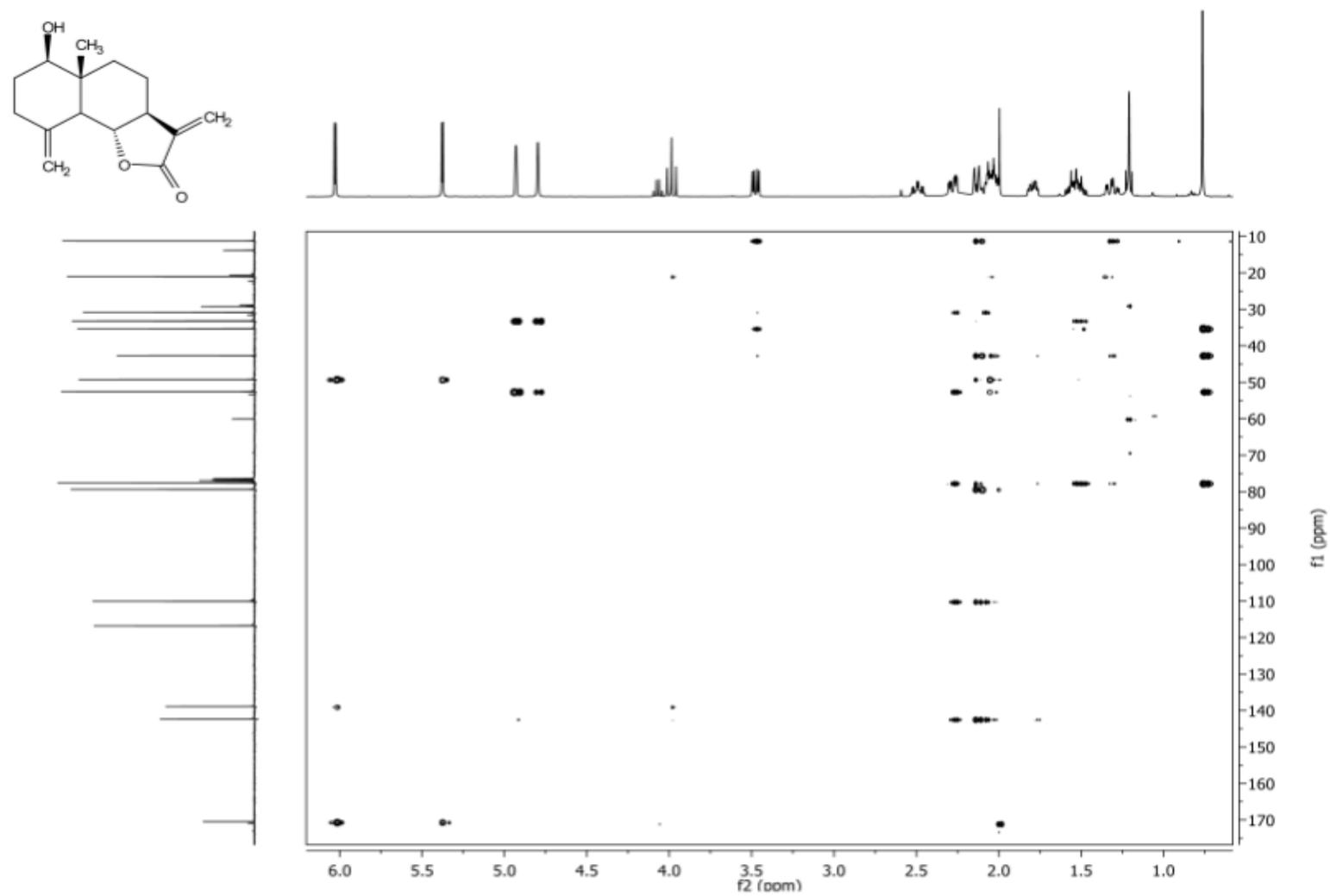
Anexo 7. Espectro de ¹³C-RMN de reinosina (2)



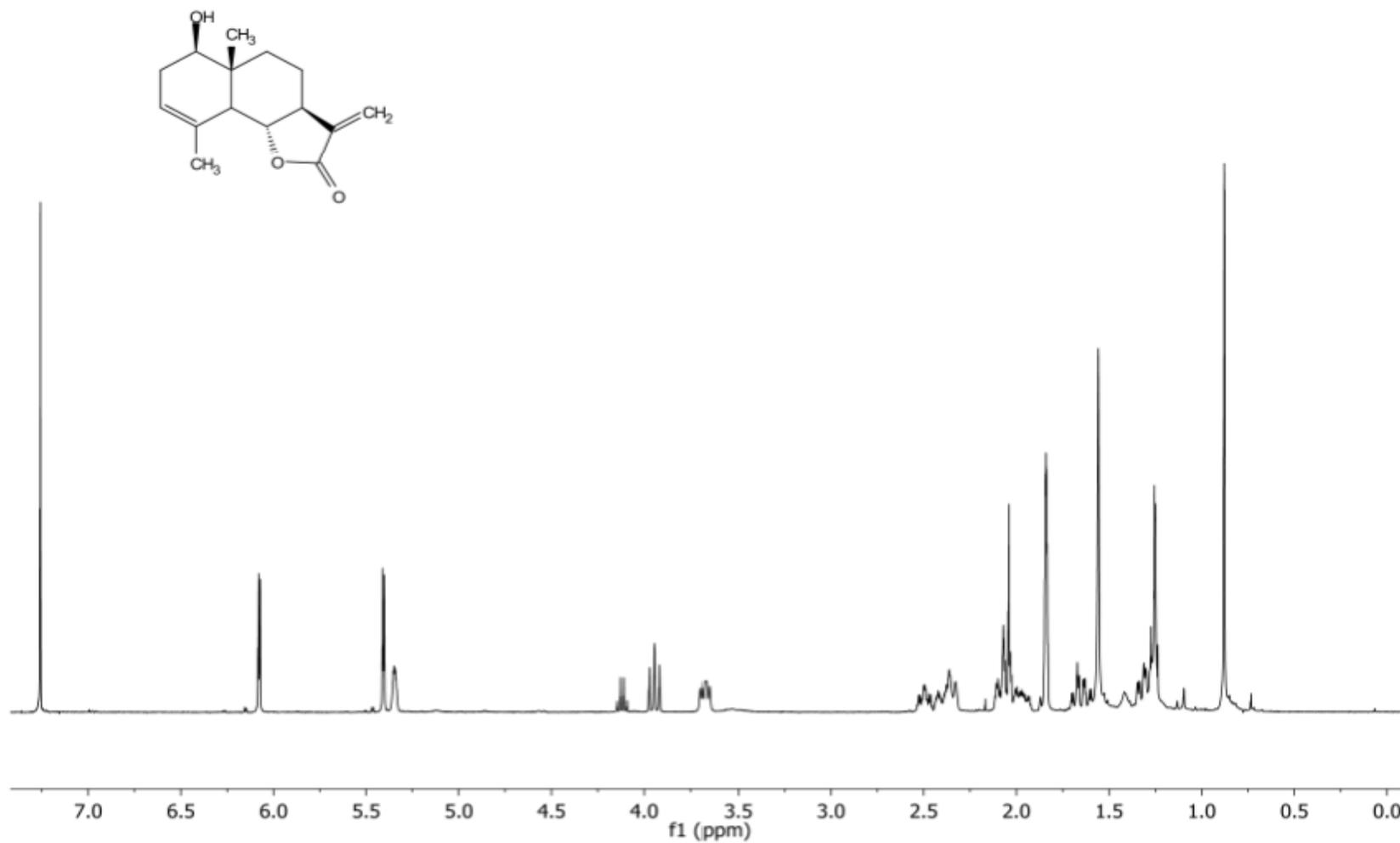
Anexo 8. Espectro de ^1H - ^1H -COSY de reinosina (2)



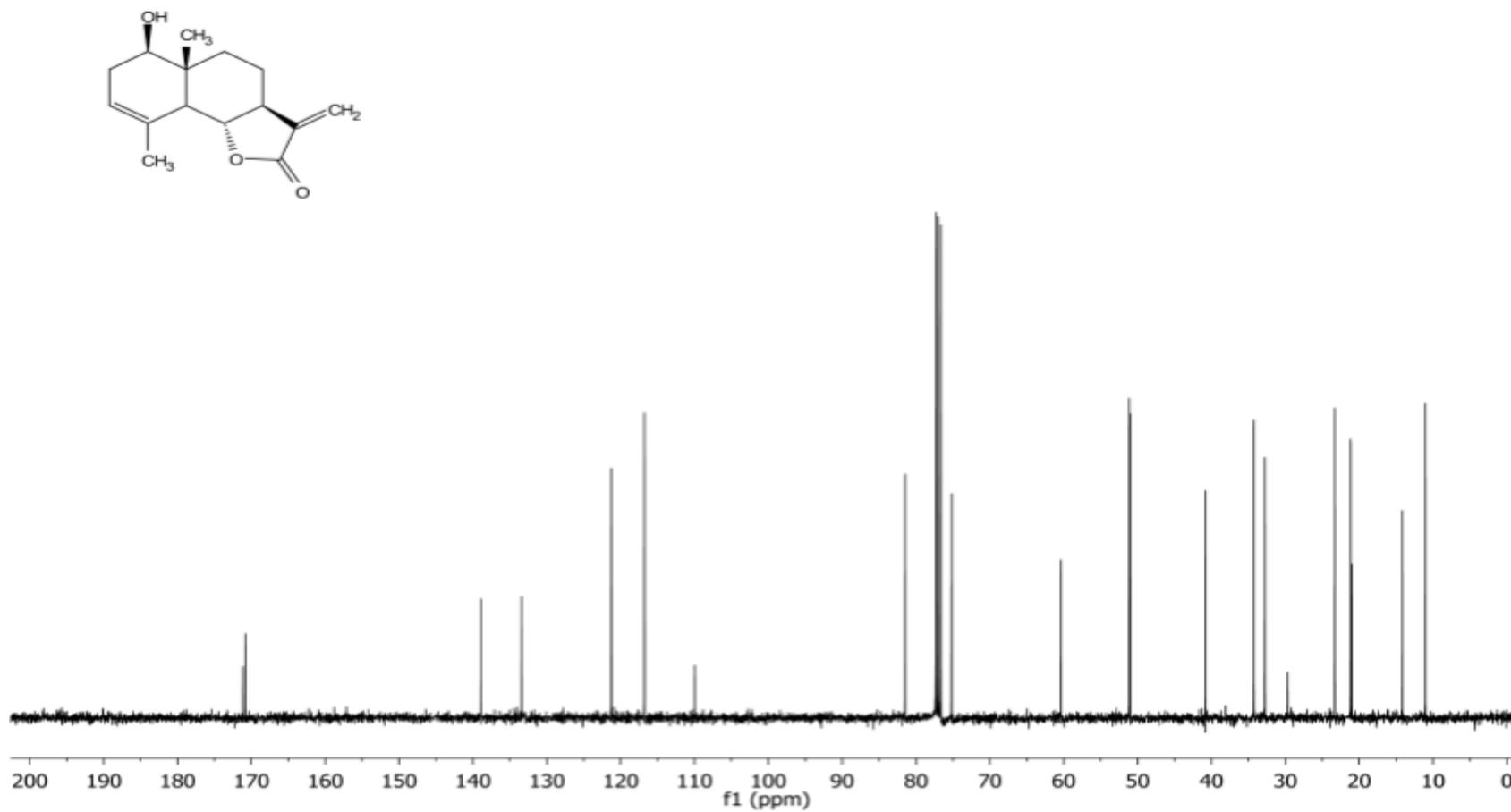
Anexo 9. Espectro de HSQC de reinosina (2)



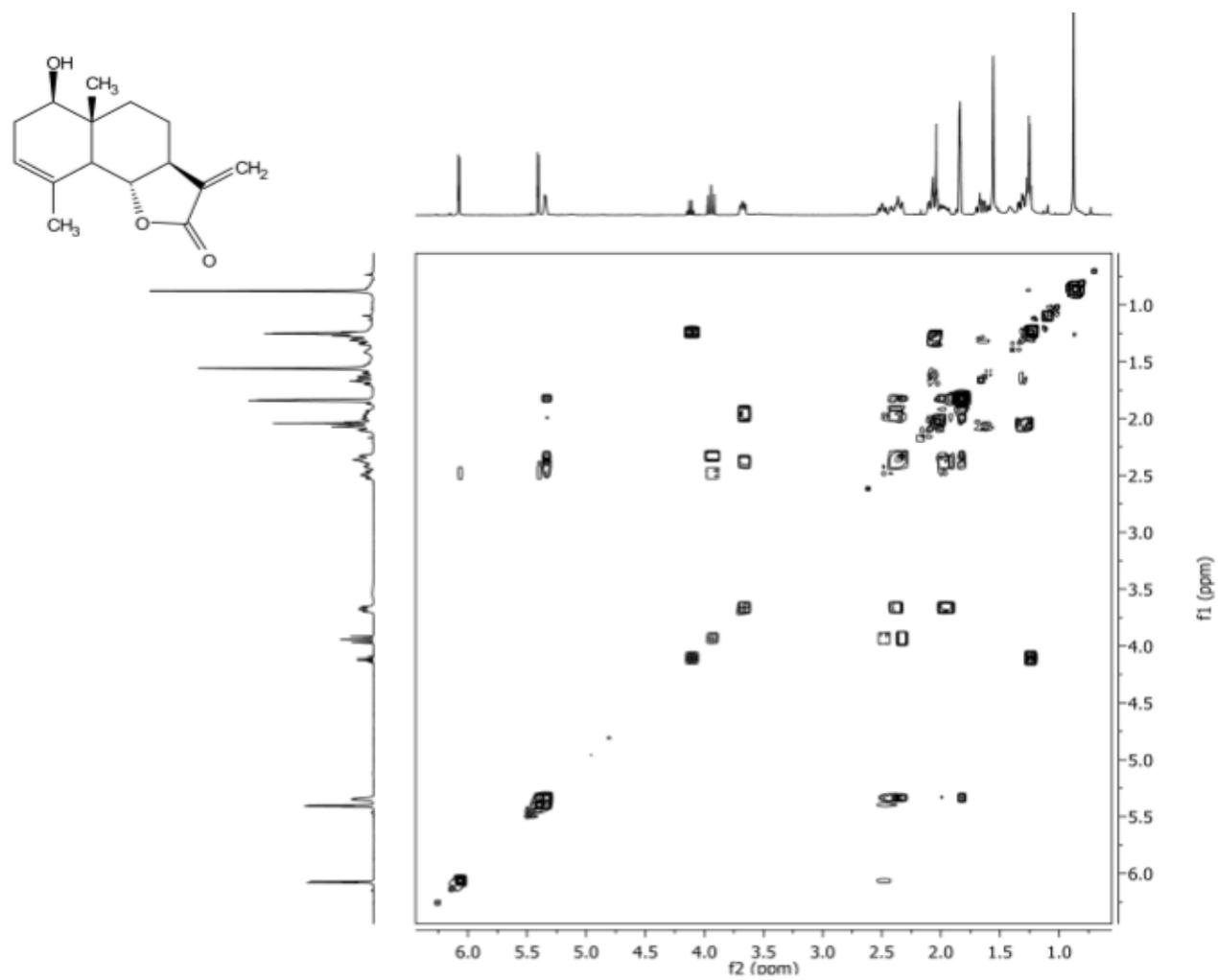
Anexo 10. Espectro de HMBC de reinosina (2)

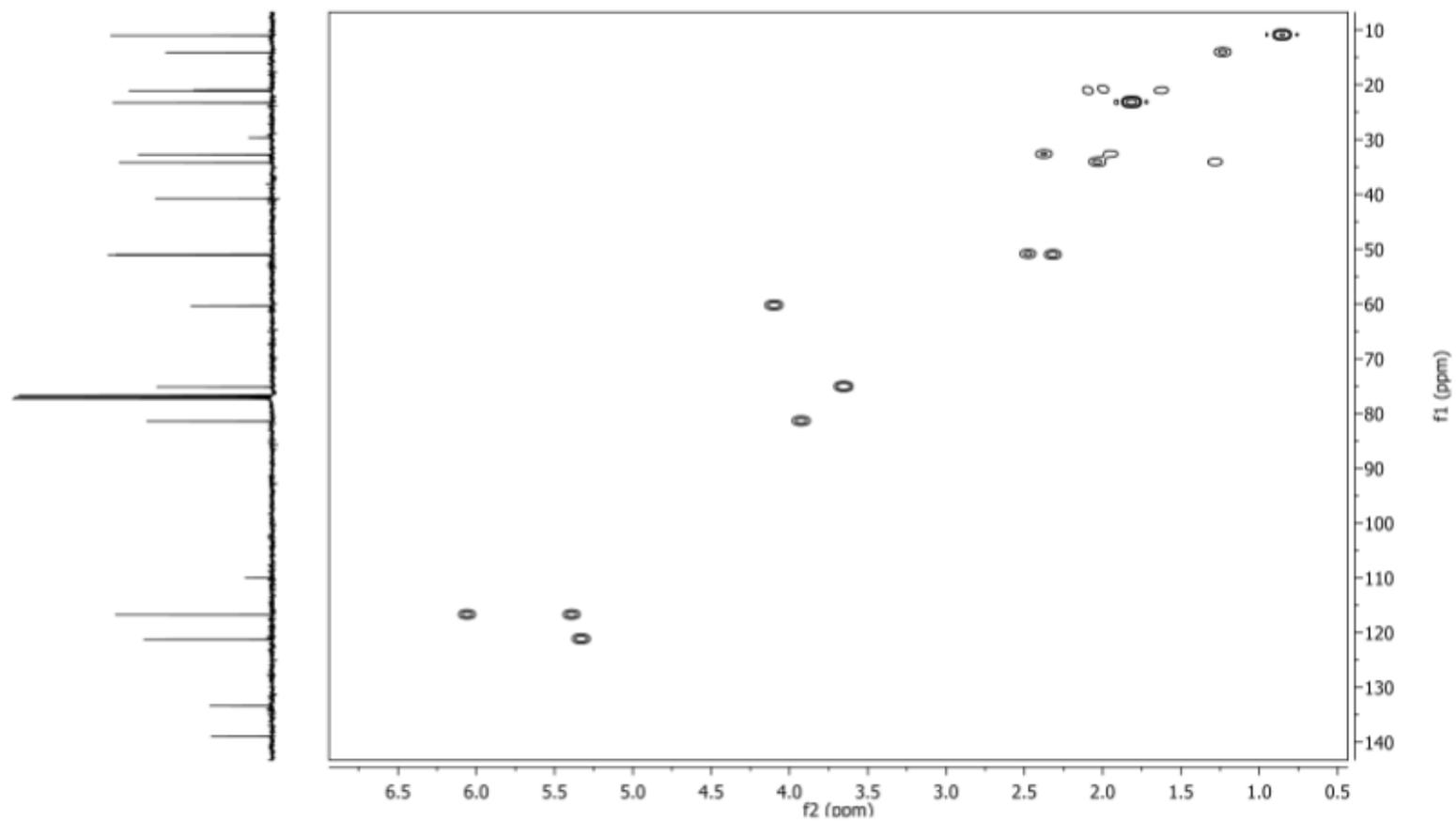
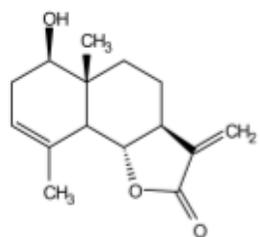


Anexo 11. Espectro de ¹H-RMN de santamarina (3)

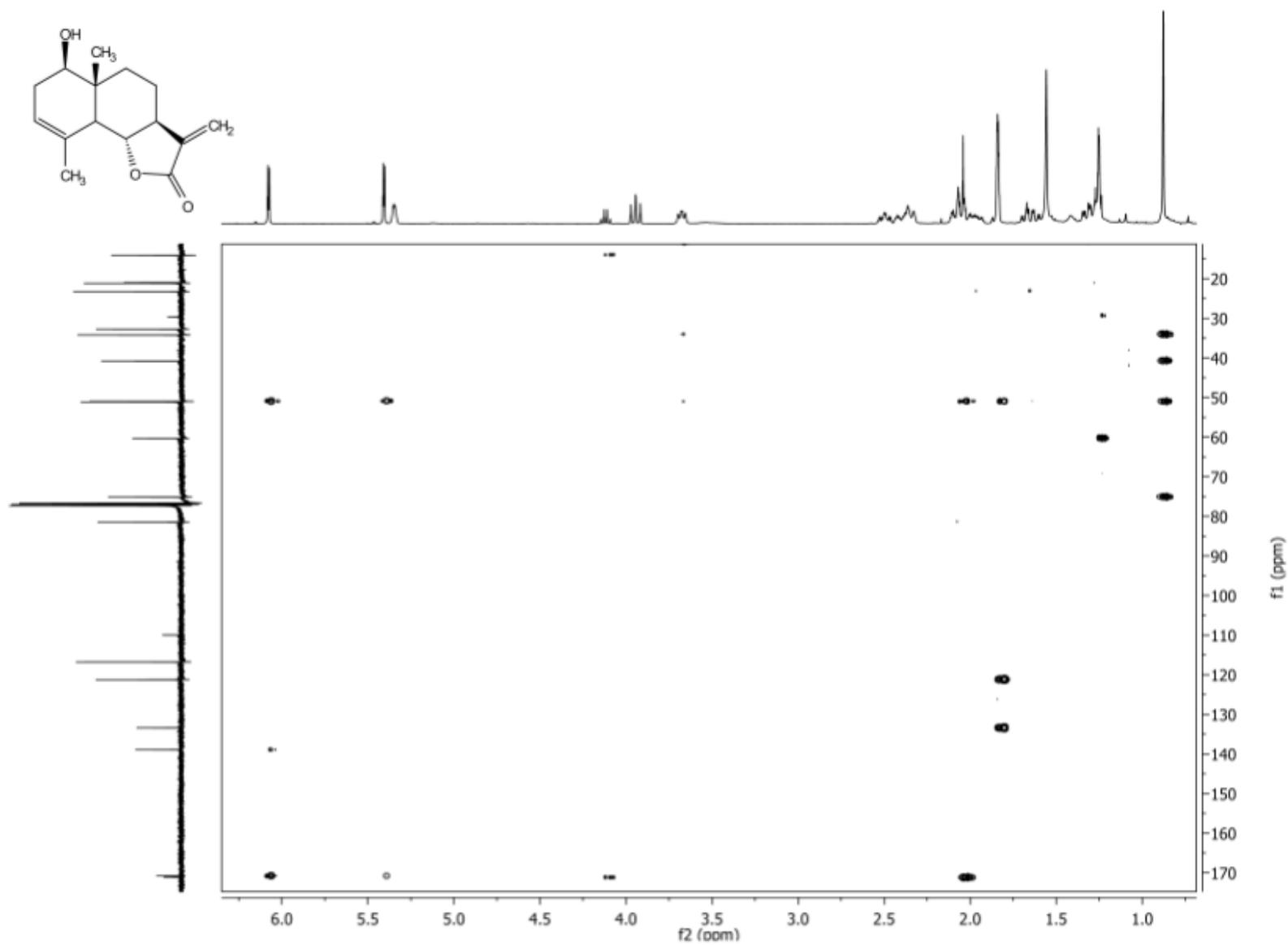


Anexo 12. Espectro de ¹³C-RMN del santamarina (3)

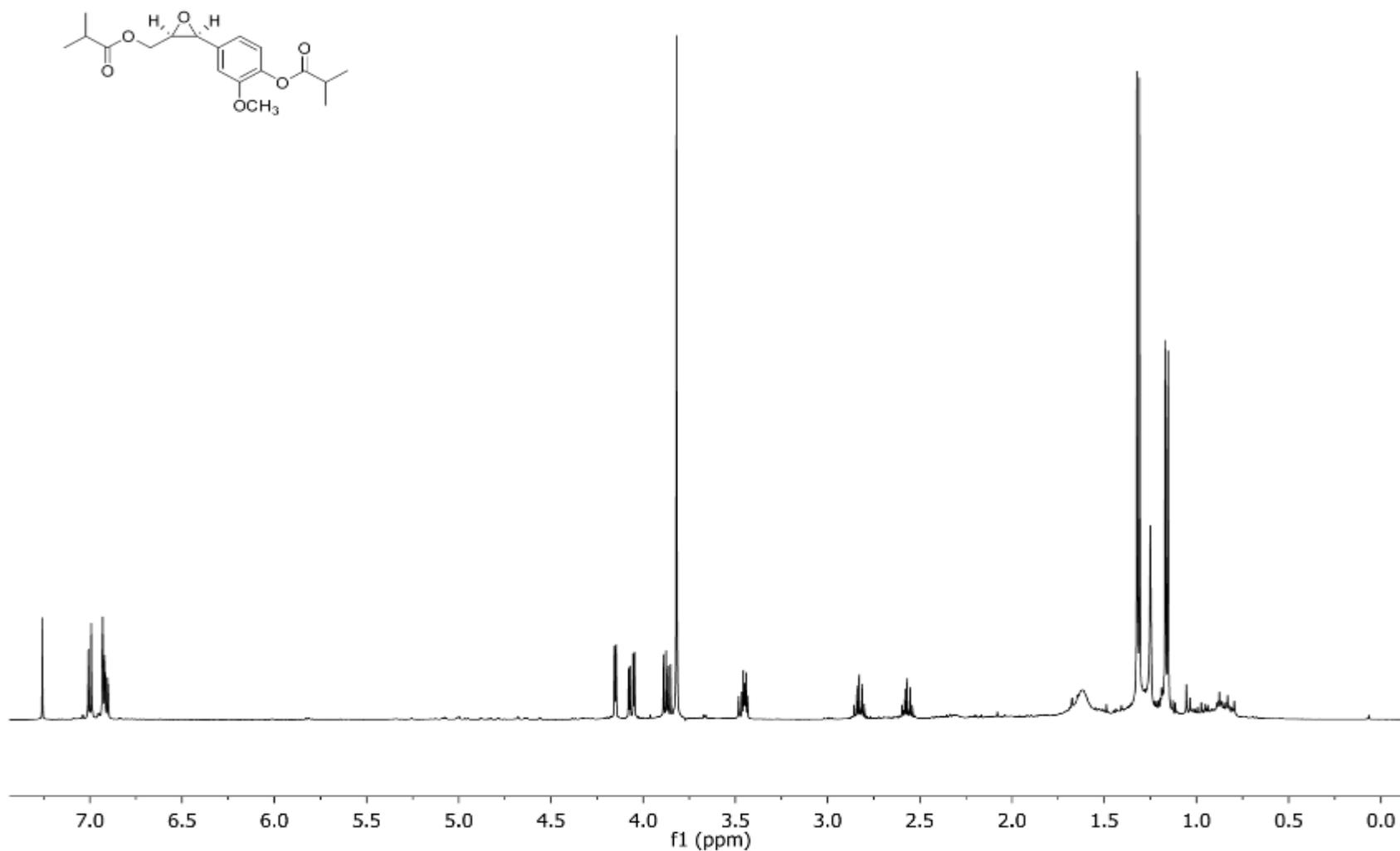
Anexo 13. Espectro de ^1H - ^1H -COSY de santamarina (3)



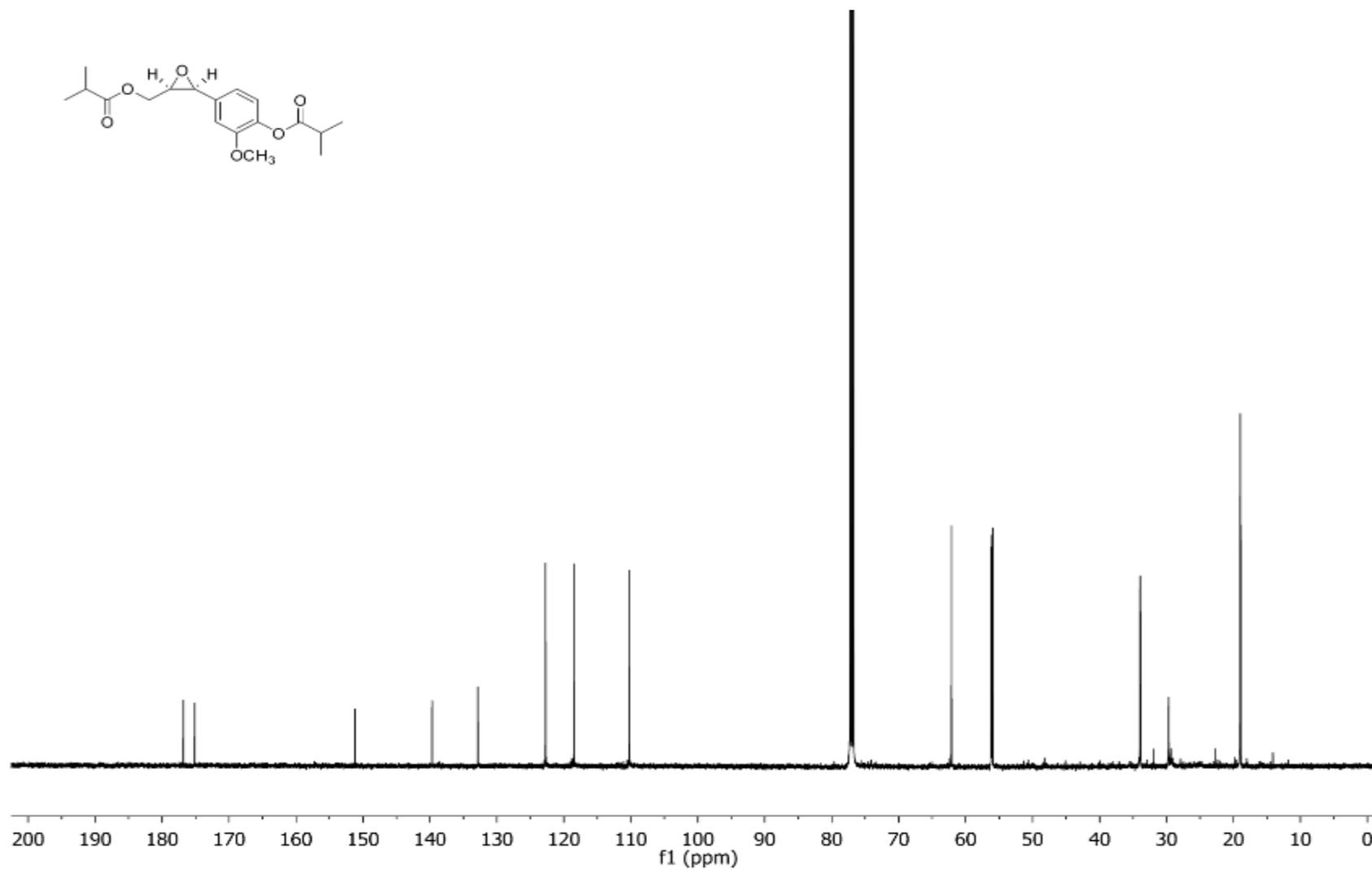
Anexo 14. Espectro de HSQC de santamarina (3)



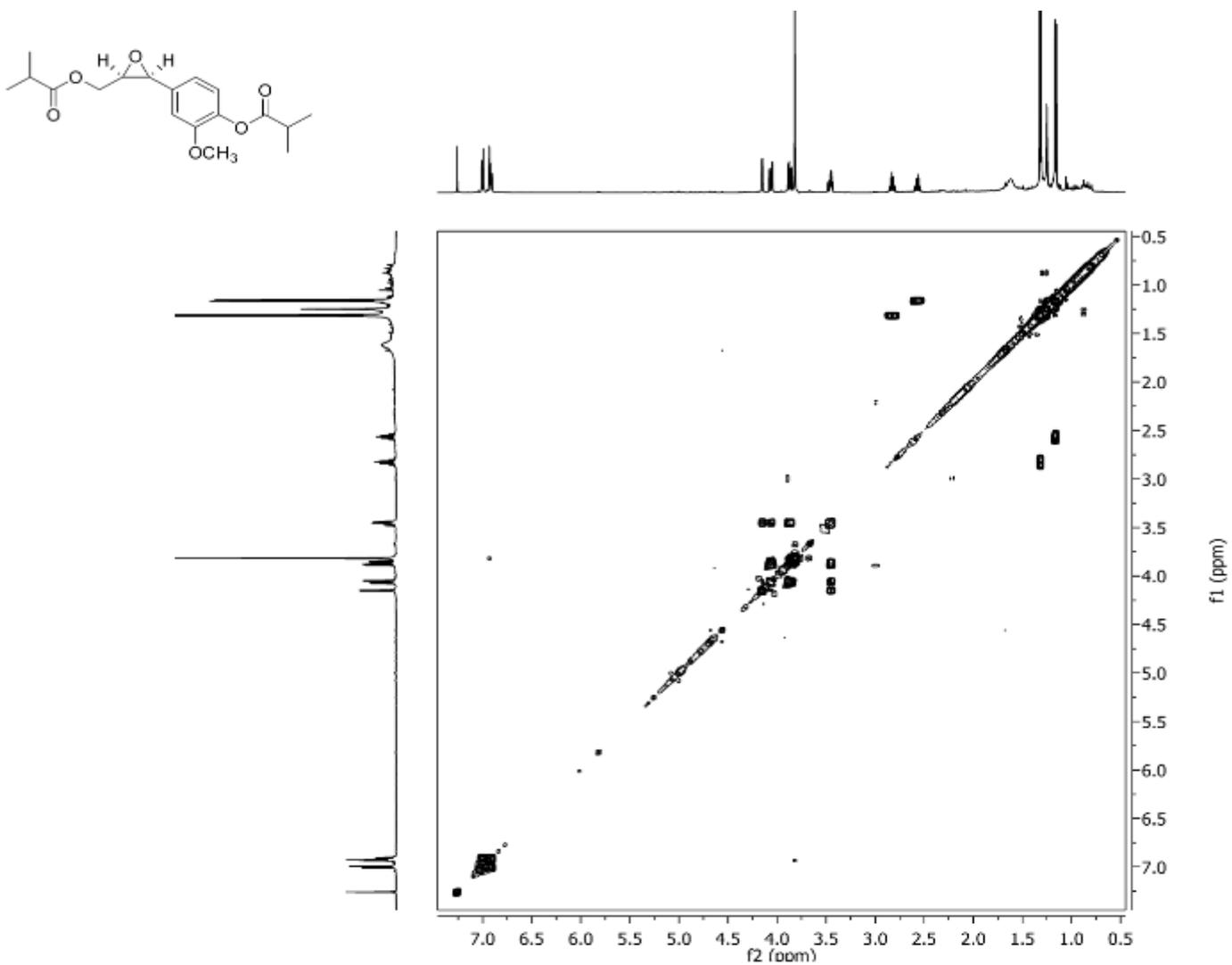
Anexo 15. Espectro de HMBC de santamarina (3)



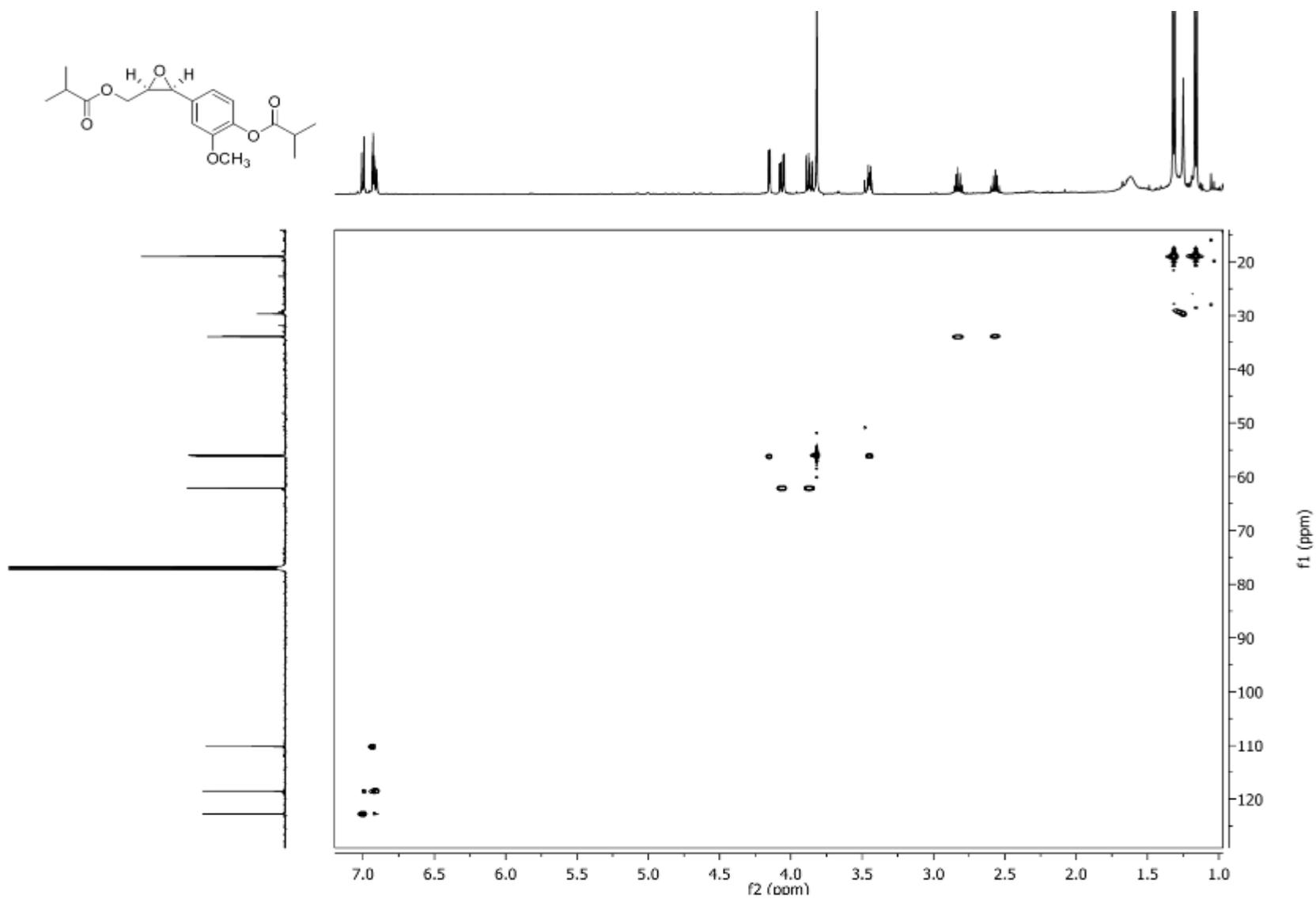
Anexo 16. Espectro de ¹H-RMN de Álcool 1',2'-epoxi-3',4-di-O-isobutiril-Z-coniferil (**16**)



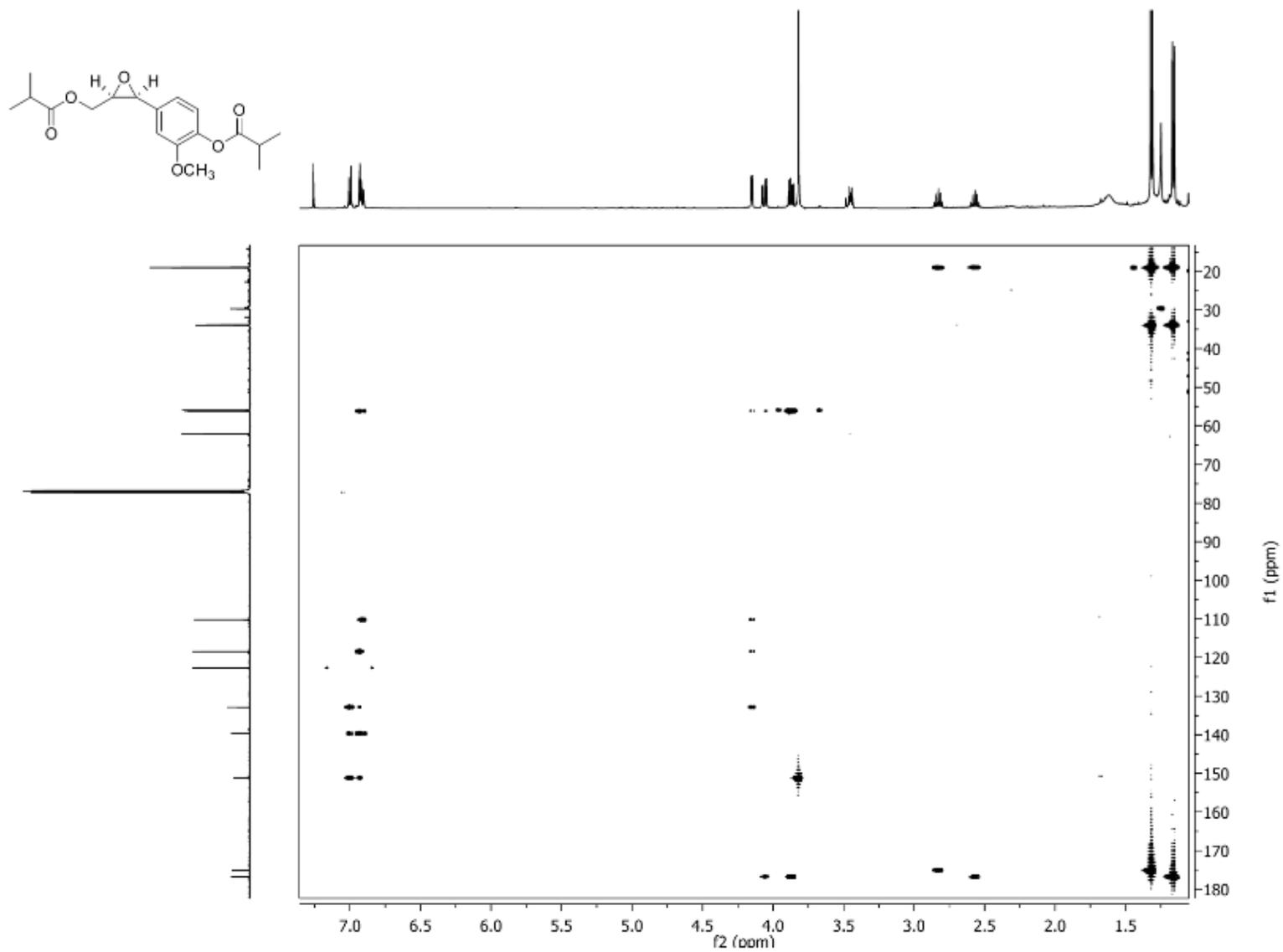
Anexo 17. Espectro de ¹³C-RMN de Álcool 1',2'-epoxi-3',4-di-O-isobutiril-Z-coniferil (**16**)



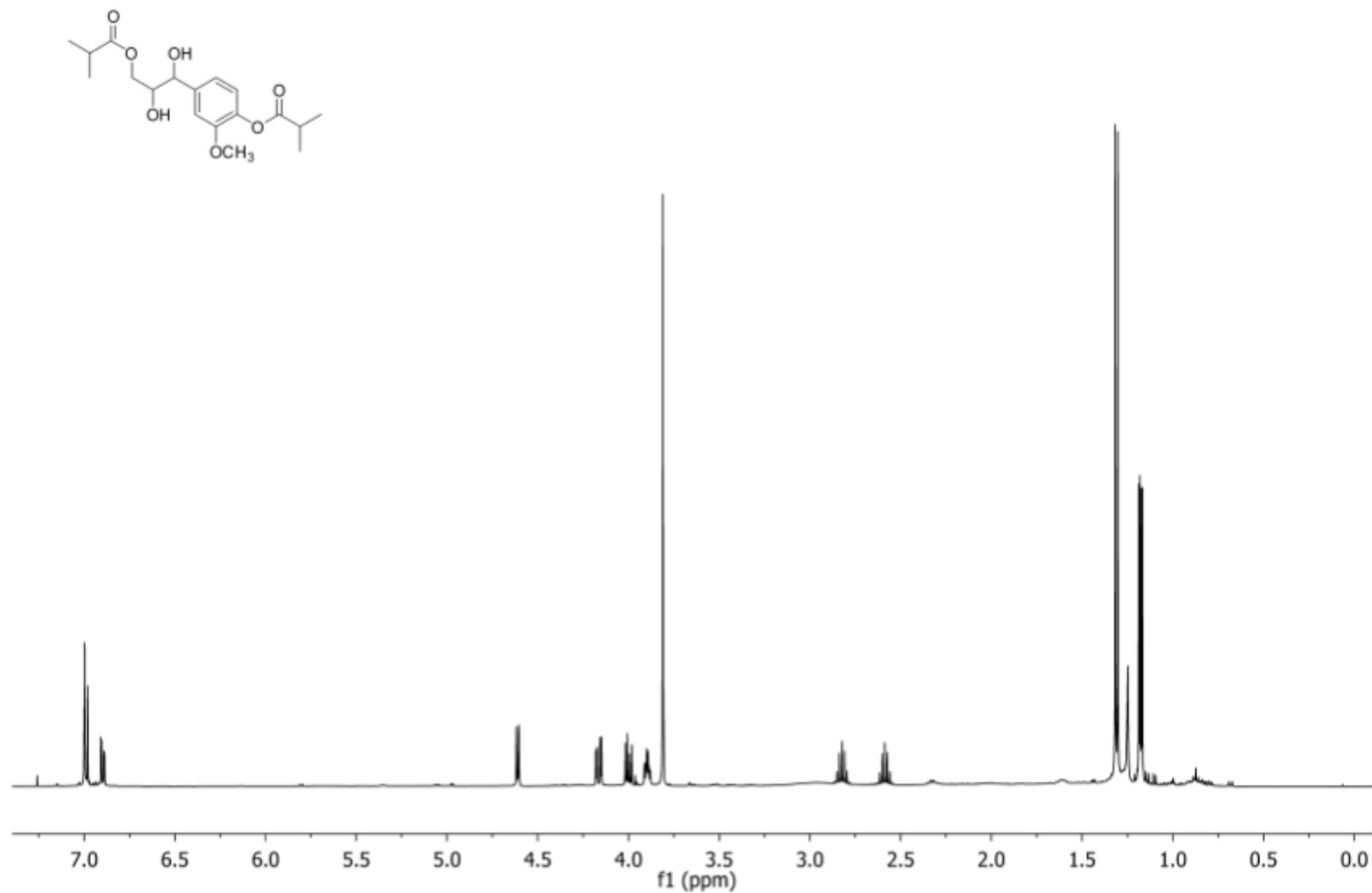
Anexo 18. Espectro de ^1H - ^1H -COSY de Álcool 1',2'-epoxi-3',4-di-O-isobutiril-Z-coniferil (**16**)



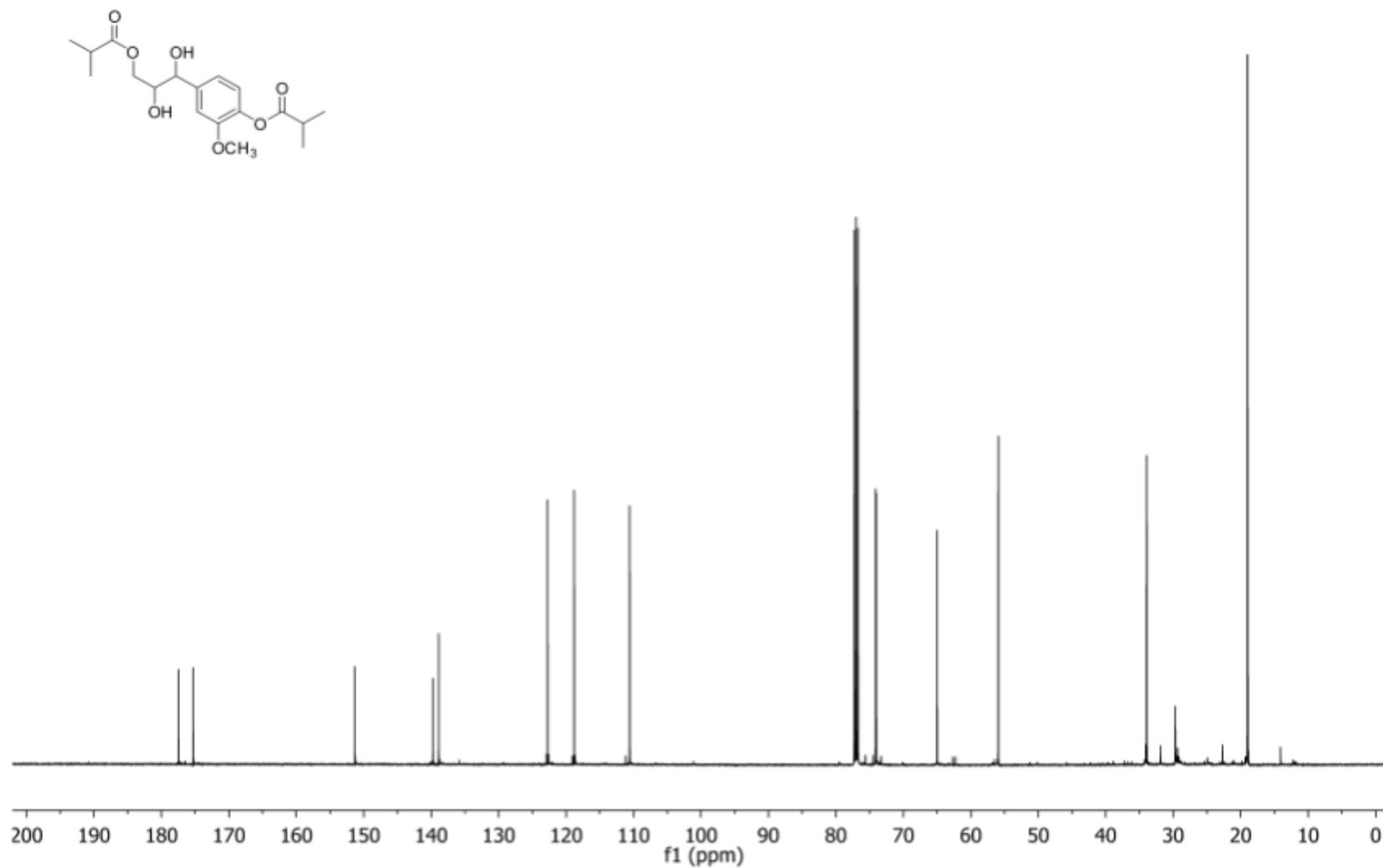
Anexo 19. Espectro de HSQC de Álcool 1',2'-epoxi-3',4-di-O-isobutiril-Z-coniferil (**16**)



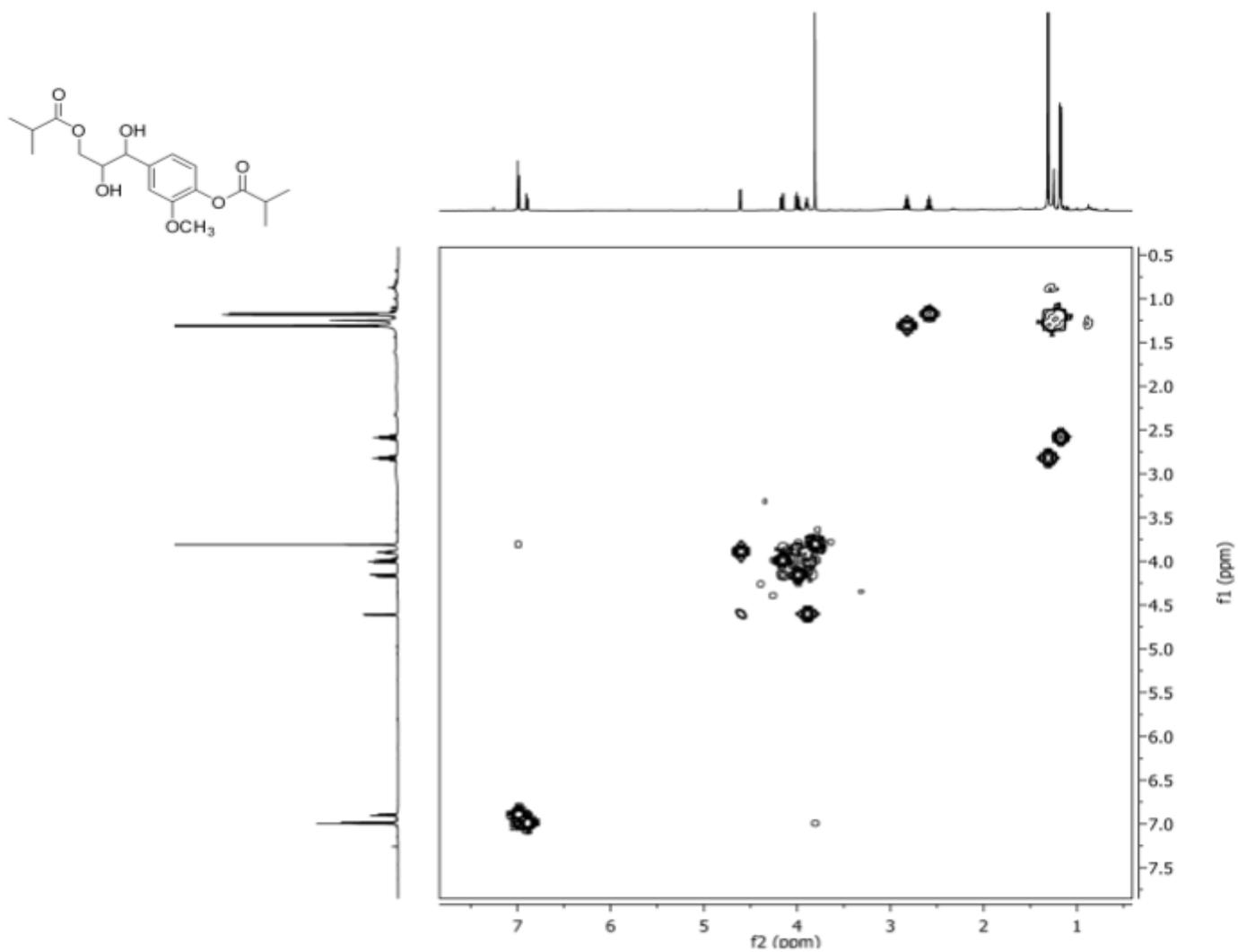
Anexo 20. Espectro de HMBC de Álcool 1',2'-epoxi-3',4-di-O-isobutiril-Z-coniferil (**16**)



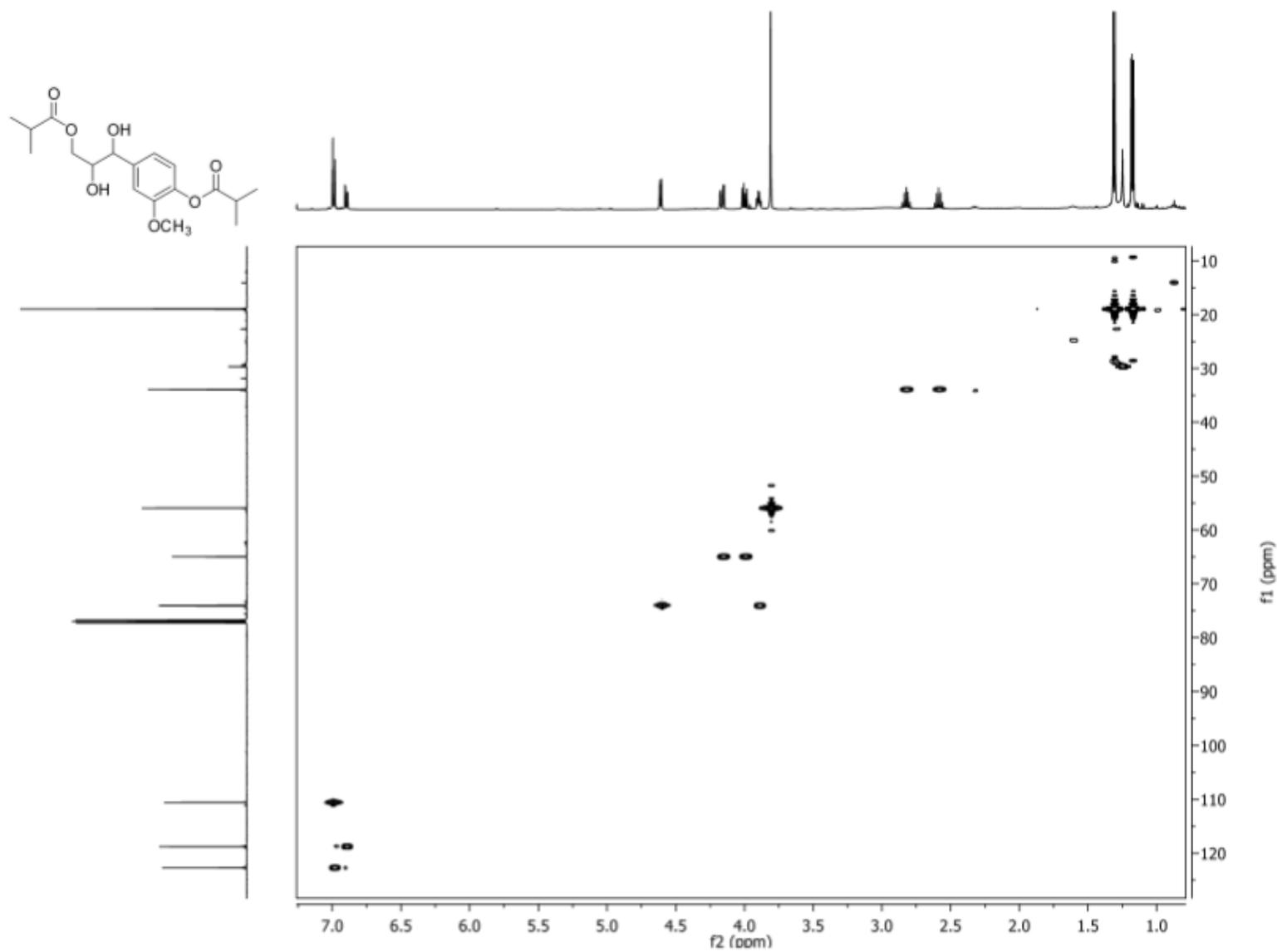
Anexo 21. Espectro de ¹H-RMN de 1',2'-dihydroxy-3',4-di-O-isobutyrylconiferyl alcohol (17)



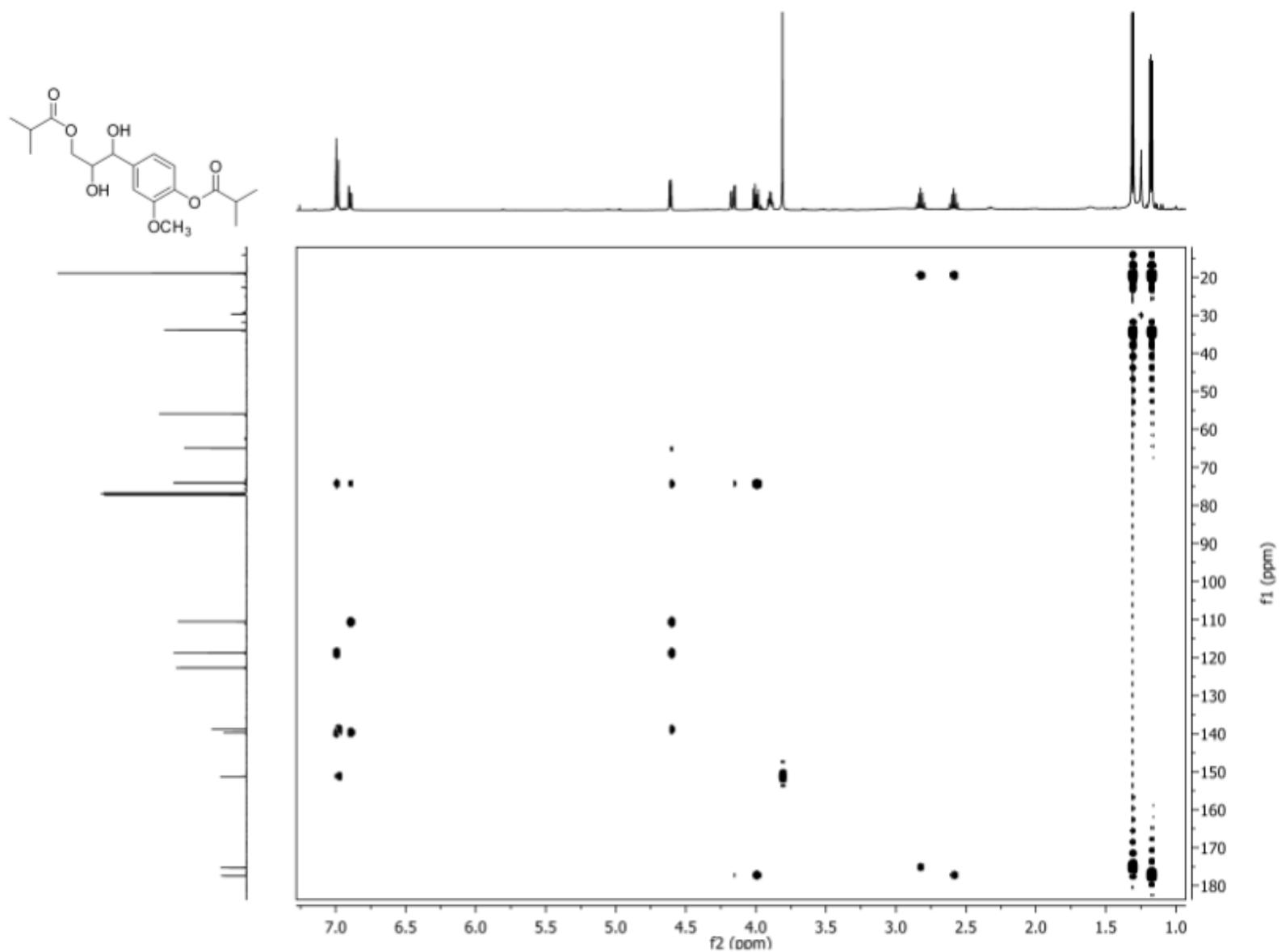
Anexo 22. Espectro de ^{13}C -RMN de 1,2'-dihidroxy-3',4-di-O-isobutyrylconiferyl alcohol (**17**)



Anexo 23. Espectro de ^1H - ^1H -COSY de 1',2'-dihydroxy-3',4-di-O-isobutyrylconiferyl alcohol (17)



Anexo 24. Espectro de HSQC de 1',2'-dihydroxy-3',4-di-O-isobutyrylconiferyl alcohol (**17**)



Anexo 25. Espectro de HMBC de 1',2'-dihydroxy-3',4-di-O-isobutyrylconiferyl alcohol (17).