

**Universidade Federal de São Carlos**  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos  
Naturais

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FITOTÓXICO DE FRAÇÕES E SUBFRAÇÕES DE  
FOLHAS, CASCAS DE CAULE E RAÍZES DE *Ocotea pulchella* E DOS COMPOSTOS  
SALICILATO DE BENZILA E BENZOATO DE BENZILA SOBRE ESPÉCIES  
INVASORAS**

Luis Felipe García Fuentes

**São Carlos – SP**

**2020**

LUIS FELIPE GARCIA FUENTES

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FITOTÓXICO DE FRAÇÕES E SUBFRAÇÕES DE  
FOLHAS, CASCAS DE CAULE E RAÍZES DE *Ocotea pulchella* E DOS COMPOSTOS  
SALICILATO DE BENZILA E BENZOATO DE BENZILA SOBRE ESPÉCIES  
INVASORAS

Orientadora: Profa.Dra. Sonia Cristina Juliano Gualtieri

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em  
Ecologia e Recursos Naturais do centro de Ciências  
Biológicas e da saúde da Universidade Federal de São  
Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do  
título de Doutor em Ciências.

São Carlos – SP

2020



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

---

### Folha de Aprovação

---

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Luis Felipe García Fuentes, realizada em 21/12/2020.

#### Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Sonia Cristina Juliano Gualtieri (UFSCar)

Profa. Dra. Paula Novaes (USP)

Profa. Dra. Silmara Cristina Fanti (UNICEP)

Profa. Dra. Simoni Anese (IFMT)

Profa. Dra. Sarah Christina Caldas Oliveira (UnB)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.  
O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais.

## AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Dra. Sonia Cristina Juliano Gualtieri por todas oportunidades que me concedeu, pelos conhecimentos, pela confiança, carinho e amizade.

Aos meus pais, Felipe e Ines e minhas irmãs, Lirio e Mara, pelo apoio, incentivo, suporte e por confiar em mim. Sem vocês eu jamais teria chego até aqui.

A todos os amigos do laboratório, que me ajudaram de alguma forma: Raissa Barcha Accarini, Edgar Oliveira Vicente, Viviane de Cassia Pereira Abdalla, Maristela Imatomi e Nádía Elisa Gonçalves, muito obrigado por tudo.

Ao professor Dr. Marcos Arduin, pela disponibilização do laboratório de Anatomia Vegetal.

As professoras que participaram na banca da minha qualificação e defesa: Dra. Luciana de Jesus Jatobá, Dra. Sarah Caroline Ribeiro de Souza, Dra. Maristela Imatomi, Dra. Paula Novaes, Dra. Silmara Cristina Fanti, Dra. Simoni Anese e Dra. Sarah Christina Caldas Oliveira. Muito obrigado por terem aceitado o convite e pelas sugestões e conselhos na melhoria deste trabalho de pesquisa.

Ao Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia (CONACYT), México, pela bolsa concedida.

Ao CNPq pelo suporte financeiro na compra de materiais.

À Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais (PPGERN), por me brindar a oportunidade de estudar nesta instituição e me formar como doutor.

E a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para realização dessa importante etapa da minha vida.

## RESUMO GERAL

As plantas sintetizam uma ampla variedade de substâncias químicas em resposta aos estresses bióticos e abióticos. Geralmente essas substâncias estão associadas com processos de defesa das plantas contra herbívoros e patógenos. Essas substâncias, provenientes do metabolismo secundário são conhecidas como aleloquímicos. As espécies da família Lauraceae possuem potencial na produção de metabolitos secundários com propriedades herbicida. Dessa maneira, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial fitotóxico de frações e subfrações da espécie *Ocotea pulchella*, assim como também dos compostos sintéticos salicilato de benzila e benzoato de benzila sobre espécies alvo. Para isso, foram realizados bioensaios com coleóptilos de *Triticum aestivum* e bioensaios de germinação e crescimento inicial de espécies invasoras de culturas agrícolas. As concentrações de 0,8 mg.mL<sup>-1</sup>, 0,4 mg.mL<sup>-1</sup> e 0,2 mg.mL<sup>-1</sup> foram utilizadas para as frações hexânicas, acetato etílicas e aquosas, de folhas, cascas de caule e raízes assim como também para as subfrações da fração acetato etílica de folhas da época chuvosa oriundas de *O. pulchella*. Para os compostos sintéticos foram utilizadas as concentrações de 10<sup>-3</sup> M, 3•10<sup>-4</sup> M, 10<sup>-4</sup> M, 3•10<sup>-5</sup> M e 10<sup>-5</sup> M nos bioensaios com coleóptilos de *T. aestivum*; enquanto que para os bioensaios de crescimento inicial foram usadas as concentrações de 10<sup>-3</sup> M, 10<sup>-4</sup> M e 10<sup>-5</sup> M. Todas as 18 frações de *O. pulchella* inibiram o crescimento dos coleóptilos de *T. aestivum* pelo menos na maior concentração testada. Em geral, o grupo de frações de acetato de etila (folhas, caule e raiz) de *O. pulchella* apresentaram a maior atividade fitotóxica nas espécies alvo. Os compostos salicilato de benzila e benzoato de benzila apresentaram forte atividade inibitória sobre o crescimento de coleóptilos de *T. aestivum*, sendo inclusive superiores ao herbicida principalmente nas concentrações 3•10<sup>-5</sup> M e 10<sup>-5</sup>. Estes compostos mostraram também efeito inibitório sobre as espécies bioindicadoras *Lactuca sativa*, *Solanum lycopersicum*, *Allium cepa* e *T. aestivum* e sobre as invasoras *Euphorbia heterophylla* e *Megathyrus maximus*. *E. heterophylla* foi a espécie mais afetada pela ação de ambos compostos em todos os parâmetros avaliados e em alguns parâmetros o efeito inibitório desses compostos foi igual a aquele exercido pelo herbicida, principalmente no sistema radicular. Todas as oito subfrações obtidas da fração acetato etílica de folhas da época chuvosa inibiram significativamente o crescimento de coleóptilos de *T. aestivum* na maior concentração (0,8 mg. mL<sup>-1</sup>) e sete destas o fizeram também nas outras duas concentrações (0,4 mg. mL<sup>-1</sup> e 0,2 mg. mL<sup>-1</sup>). Nos bioensaios de crescimento inicial quatro subfrações foram testadas (A1, A2, A3 e A4) onde as subfrações A1 e A2 exerceram os maiores valores de inibição no crescimento da raiz e parte aérea das espécies *E. heterophylla* e *M. maximus*. Além

disso, na espécie *E. heterophylla*, as subfrações A1 e A2 exerceram valores de inibição estatisticamente iguais aos exercidos pelo herbicida em todas as concentrações testadas tanto na parte aérea quanto no sistema radicular. Todavia, a maior concentração da subfração A1 nas raízes, foi superior a aquela observada pelo herbicida na mesma concentração. Foi feita uma cromatografia em camada delgada e foi comprovada a presença do salicilato de benzila e benzoato de benzila na subfração A1, tais compostos são relatados na literatura como compostos com potencial fitotóxico responsáveis pela atividade fitotóxica de *O. pulchella*. A redução no crescimento do sistema radicular das plântulas de *E. heterophylla* pode ter relação com a diminuição do alongamento das células do metaxilema submetidas as subfrações da fração de acetato de etila de folhas da espécie *O. pulchella*. Sendo assim é possível concluir que a espécie *O. pulchella* assim como os compostos sintéticos salicilato de benzila e benzoato de benzila apresentam potencial fitotóxico.

Palavras chave: Aleloquímicos, Cerrado, herbicidas naturais, espécies invasoras.

## GENERAL ABSTRACT

Plants synthesize a wide variety of chemicals in response to biotic and abiotic stresses. These substances are usually associated with plant defense processes against herbivores and pathogens. These substances, derived from secondary metabolism are known as allelochemicals. The species of the Lauraceae family have the potential to produce secondary metabolites with herbicidal properties. Thus, the objective of this work was to evaluate the phytotoxic potential of extracts and subfractions of the species *Ocotea pulchella*, as well as of the synthetic compounds benzyl salicylate and benzyl benzoate on target species. For this, bioassays were carried out with coleoptiles of *Triticum aestivum* and bioassays of germination and initial growth of invasive species of agricultural crops. The concentrations of 0.8 mg.mL<sup>-1</sup>, 0.4 mg.mL<sup>-1</sup> and 0.2 mg.mL<sup>-1</sup> were used for hexane extracts, ethyl and aqueous acetates, of leaves, stem barks and roots as well as for the subfractions of the ethyl acetate extract of rainy season leaves from *O. pulchella*. For the synthetic compounds, concentrations of 10<sup>-3</sup> M, 3•10<sup>-4</sup> M, 10<sup>-4</sup> M, 3•10<sup>-5</sup> M and 10<sup>-5</sup> M were used in bioassays with *T. aestivum* coleoptiles; whereas for the initial growth bioassays the concentrations of 10<sup>-3</sup> M, 10<sup>-4</sup> M e 10<sup>-5</sup> M were used. All 18 extracts of *O. pulchella* inhibited the growth of *T. aestivum* coleoptiles at least in the highest concentration tested. In general, the group of ethyl acetate extracts (leaves, stem and root) from *O. pulchella* showed the highest phytotoxic activity in the target species. The benzyl salicylate and benzyl benzoate compounds showed strong inhibitory activity on the growth of *T. aestivum* coleoptiles, being even superior to the herbicide mainly at concentrations 3•10<sup>-5</sup> M and 10<sup>-5</sup> M. These compounds also showed an inhibitory effect on the bioindicator species *Lactuca sativa*, *Solanum lycopersicum*, *Allium cepa* and *T. aestivum* and on the invasive species *Euphorbia heterophylla* and *Megathyrus maximus*. *E. heterophylla* was the species most affected by the action of both compounds in all evaluated parameters and in some parameters the inhibitory effect of these compounds was equal to that exerted by the herbicide, mainly in the root system. All eight subfractions obtained from the ethyl acetate extract of leaves from the rainy season significantly inhibited the growth of *T. aestivum* coleoptiles in the highest concentration (0.8 mg. ML<sup>-1</sup>) and seven of these also did in the other two concentrations (0, 4 mg. ML<sup>-1</sup> and 0.2 mg. ML<sup>-1</sup>). In the initial growth bioassays, four subfractions were tested (A1, A2, A3 and A4) where subfractions A1 and A2 exerted the highest values of inhibition in the growth of the root and aerial part of the species *E. heterophylla* and *M. maximus*. In addition, in the species *E. heterophylla*, subfractions A1 and A2 exerted inhibition values statistically equal to those exerted by the herbicide in all concentrations tested both in the aerial part and in

the root system. However, the highest concentration of subfraction A1 in the roots was higher than that observed by the herbicide at the same concentration. Thin layer chromatography was performed and the presence of benzyl salicylate and benzyl benzoate was verified in subfraction A1, such compounds are reported in the literature as compounds with phytotoxic potential responsible for the phytotoxic activity of *O. pulchella*. The reduction in the growth of the root system of *E. heterophylla* seedlings may be related to the decrease in the elongation of the metaxylem cells submitted to the subfractions of the ethyl acetate extract of leaves of the *O. pulchella* species. Therefore, it is possible to conclude that the *O. pulchella* species as well as the synthetic compounds benzyl salicylate and benzyl benzoate have phytotoxic potential.

Keywords: Allelochemicals, Brazilian savanna, natural herbicides, invasive species.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPITULO 1

- Figura 1. Funil de separação com as frações particionadas. (A) fração hexânica e (B) fração metanólico/aquosa, de folhas da época seca de *O. pulchella* (arquivo pessoal). ..... 47
- Figura 2. Fluxograma da obtenção das frações de folhas, cascas de caule e de raízes de *O. pulchella*, utilizando-se a extração líquido-líquido..... 47
- Figura 3. Coleóptilos de *T. aestivum* que foram submetidos aos tratamentos com as frações de *O. pulchella*, controle negativo e controle positivo, arquivo pessoal. .... 50
- Figura 4. Efeito das frações obtidas a partir de folhas, casca de caule e raízes de *O. pulchella* e do herbicida GOAL<sup>®</sup> sobre o crescimento de coleóptilos de *T. aestivum*. Os valores são expressos em porcentagem de inibição com relação ao controle negativo. (\*) Médias diferem significativamente do controle negativo pelo teste de tukey, a 0,05 de significância. HFS (fração hexânica de folhas época seca), HFC (fração hexânica de folhas época chuvosa), HCS (fração hexânica de casca de caule época seca), HRS (fração hexânica de raízes época seca), AFS (fração aquosa de folhas época seca), AFC (fração aquosa de folhas época chuvosa), ACS (fração aquosa de casca de caule época seca), ARS (fração aquosa de raízes época seca), AEFS (fração acetato etílica de folhas época seca), AEFC (fração acetato etílica de folhas época chuvosa), AECS (fração acetato etílica de casca de caule época seca), AERS (fração acetato etílica de raízes época seca), HCC (fração hexânica de casca de caule época chuvosa), HRC (fração hexânica de raízes época chuvosa), AECC (fração acetato etílica de casca de caule época chuvosa), AERC (fração acetato etílica de raízes época chuvosa), ACC (fração aquosa de casca de caule época chuvosa), ARC (fração aquosa de raízes época chuvosa). ..... 53
- Figura 5. Análise do comprimento de coleóptilos estiolados de *T. aestivum*, sob a ação das frações de *O. pulchella*. Relação de atividade entre as diferentes frações (A) e entre os diferentes órgãos vegetais (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. .... 54

Figura 6. Efeito do herbicida GOAL® e das frações de folhas, casca de caule e raízes de *O. pulchella* sobre o crescimento de plântulas de *M. maximus*. Os valores estão expressos em porcentagem de inibição em relação ao controle negativo. (\*) Médias diferem significativamente do controle pelo teste de tukey, a 0,05 de significância. HFS (fração hexânica de folhas época seca), HFC (fração hexânica de folhas época chuvosa), HCS (fração hexânica de casca de caule época seca), HRS (fração hexânica de raízes época seca), AFS (fração aquosa de folhas época seca), AFC (fração aquosa de folhas época chuvosa), ACS (fração aquosa de casca de caule época seca), ARS (fração aquosa de raízes época seca), AEFS (fração acetato etílica de folhas época seca), AEFC (fração acetato etílica de folhas época chuvosa), AECS (fração acetato etílica de casca de caule época seca), AERS (fração acetato etílica de raízes época seca)..... 62

Figura 7. Efeito do herbicida GOAL® e das frações de casca de caule e raízes de *O. pulchella* sobre o crescimento de plântulas de *M. maximus*. Os valores estão expressos em porcentagem de inibição em relação ao controle negativo. (\*) Médias diferem significativamente do controle pelo teste de tukey, a 0,05 de significância. HCC (fração hexânica de casca de caule época chuvosa), HRC (fração hexânica de raízes época chuvosa), ACC (fração aquosa de casca de caule época chuvosa), ARC (fração aquosa de raízes época chuvosa), AECC (fração acetato etílica de casca de caule época chuvosa), AERC (fração acetato etílica de raízes época chuvosa). ..... 63

Figura 8. Efeito do herbicida GOAL® e das frações de folhas, casca de caule e raízes de *O. pulchella* sobre o crescimento de plântulas de *E. heterophylla*. Os valores estão expressos em porcentagem de inibição em relação ao controle negativo. (\*) Médias diferem significativamente do controle pelo teste de tukey, a 0,05 de significância. HFS (fração hexânica de folhas época seca), HFC (fração hexânica de folhas época chuvosa), HCS (fração hexânica de casca de caule época seca), HRS (fração hexânica de raízes época seca), AFS (fração aquosa de folhas época seca), AFC (fração aquosa de folhas época chuvosa), ACS (fração aquosa de casca de caule época seca), ARS (fração aquosa de raízes época seca), AEFS (fração acetato etílica de folhas época seca), AEFC (fração acetato etílica de folhas época chuvosa), AECS (fração acetato etílica de casca de caule época seca), AERS (fração acetato etílica de raízes época seca)..... 64

Figura 9. Efeito do herbicida GOAL<sup>®</sup> e das frações de casca de caule e raízes de *O. pulchella* sobre o crescimento de plântulas de *E. heterophylla*. Os valores estão expressos em porcentagem de inibição em relação ao controle negativo. (\*) Médias diferem significativamente do controle pelo teste de tukey, a 0,05 de significância. HCC (fração hexânica de casca de caule época chuvosa), HRC (fração hexânica de raízes época chuvosa), ACC (fração aquosa de casca de caule época chuvosa), ARC (fração aquosa de raízes época chuvosa), AECC (fração acetato etílica de casca de caule época chuvosa), AERC (fração acetato etílica de raízes época chuvosa)..... 65

## CAPITULO 2

Figure 1. Percentage inhibition of benzyl salicylate, benzyl benzoate, and the herbicide GOAL<sup>®</sup> on the growth of *T. aestivum* coleoptiles. Values expressed as a percentage of inhibition compared to the negative control. (\*) Means differ significantly from the negative control by the Tukey test at 0.05 significance. Means followed by the same letter do not differ significantly from the positive control at the same concentration, by the Tukey test at 0.05. .... 89

Figure 2. Percentage of inhibition promoted by the action of benzyl salicylate, benzyl benzoate, and the herbicide GOAL<sup>®</sup> on the growth of roots and shoot of the bioindicator species *L. sativa* and *S. lycopersicum*. Values expressed as a percentage of inhibition / stimulus with respect to the negative control. (\*) Means differ significantly from the negative control by the Tukey test at 0.05 significance. Means followed by the same letter do not differ significantly from the positive control at the same concentration, by the Tukey test at 0.05. .... 90

Figure 3 Effect of benzyl salicylate, benzyl benzoate, and the herbicide GOAL<sup>®</sup> on the growth of roots and shoot of the bioindicator species *A. cepa* and *T. aestivum*. Values expressed as a percentage of inhibition / stimulus compared to the negative control. (\*) Means differ significantly from the negative control by the Tukey test at 0.05 significance. Means followed by the same letter do not differ significantly from the positive control at the same concentration, by the Tukey test at 0.05. .... 91

Figure 4. Effect of benzyl salicylate, benzyl benzoate, and the herbicide GOAL<sup>®</sup> on root and shoot growth of invasive species *E. heterophylla* and *M. maximus*. Values expressed as a percentage of inhibition / stimulus compared to the negative control. (\*) Means differ significantly from the negative control by the Tukey test at 0.05 significance. Means followed by the same letter do not differ significantly from the positive control at the same concentration, by the Tukey test at 0.05. .... 92

Figure 5. Effect of benzyl salicylate and benzyl benzoate compounds on the percentage of abnormalities in *S. lycopersicum*, *L. sativa*, *E. heterophylla*, *M. maximus*, *A. cepa*, and *T. aestivum* species. (\*) Means differ significantly from the negative control by the Dunn's test at 0.05 significance. .... 93

Figure 6. Percentage of abnormalities found, types of anomalies, and dead seedlings identified in treatments with benzyl salicylate and benzyl benzoate in the species *E. heterophylla*. RN (root necrosis), SN (shoot necrosis), GI (gravitropic inversion), PDMR (poorly developed main root), PDSR (poorly developed secondary root), WMR (without main root), WLR (without lateral root), HW (hypocotyl winding), STR (short and thick root) and DS (dead seedling). (\*) Means differ significantly from the negative control by the Dunn's test at 0.05 significance. 94

Figure 7. Types of abnormalities found in treatments with benzyl salicylate and benzyl benzoate in the species *E. heterophylla*. Root necrosis (A), gravitropic inversion (B), shoot necrosis (C) poorly developed main root (D), poorly developed secondary root (E), without main root (F), without lateral root (G), hypocotyl winding (E), short and thick root (C), and dead seedling (H). .... 94

Figure 8. Effect of the benzyl salicylate, benzyl benzoate and the herbicide GOAL<sup>®</sup> on the percentage of dead seedlings found in the species *S. lycopersicum*, *L. sativa*, *E. heterophylla*, and *M. maximus*. (\*) Means differ significantly from the negative control by the Dunn's test at 0.05 significance. .... 96

### CAPITULO 3

Figura 1. Efeito das subfrações oriundas da fração acetato etílica de folhas da época chuvosa da espécie *O. pulchella* e do herbicida GOAL<sup>®</sup>, sobre o crescimento de coleóptilos de *T. aestivum*. Os valores são expressos em porcentagem de inibição com relação ao controle negativo. (\*) Médias diferem significativamente do controle negativo pelo teste de tukey a 0,05 de significância. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente do herbicida na mesma concentração, pelo teste de tukey a 0,05 de significância. .... 122

Figura 2. Efeito das subfrações oriundas da fração acetato etílica de folhas da época chuvosa da espécie *O. pulchella* e do herbicida GOAL<sup>®</sup>, sobre o crescimento de plântulas de *E. heterophylla* e *M. maximus*. Os valores estão expressos em porcentagem de inibição em relação ao controle negativo. (\*) Médias diferem significativamente do controle pelo teste de tukey a 0,05 de significância. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente do herbicida na mesma concentração, pelo teste de tukey a 0,05 de significância. .... 123

Figura 3. Efeito das subfrações A1, A2, A3 e A4 sobre a porcentagem de anormalidades observadas em plântulas de *E. heterophylla*. Os valores estão expressos em porcentagem de inibição em relação ao controle negativo. (\*) Médias diferem significativamente do controle pelo teste de tukey, a 0,05 de significância. .... 124

Figura 4. Porcentagem de anormalidades, tipos de anomalias e plântulas mortas identificadas nos tratamentos com as subfrações A1, A2, A3 e A4 na espécie *E. heterophylla*. NR (necrose da raiz), NA (necrose da parte aérea), IG (inversão gravitópica), RPPD (raiz principal pouco desenvolvida), RSPD (raiz secundária pouco desenvolvida), SRP (sem raiz principal), SRL (sem raiz lateral), EH (enrolamento hipocótilo), CeG (raiz curta e grossa) e M (plântula morta). (\*) As médias diferem significativamente do controle negativo pelo teste de Dunn a 0,05 de significância. .... 125

Figura 5. Efeito das subfrações A1, A2, A3 e A4 e do herbicida GOAL<sup>®</sup>, sobre a porcentagem de plântulas mortas encontradas nas espécies *E. heterophylla* e *M. maximus*. (\*) As médias diferem significativamente do controle negativo pelo teste de Dunn a 0,05 de significância. .... 126

Figura 6. Tamanho médio das células do metaxilema radicular em plântulas de *E. heterophylla* crescidas em diferentes concentrações das subfrações A1 e A2 e do controle negativo. (\*) As médias diferem significativamente do controle negativo pelo teste tukey a 0,05 de significância.

..... 127

Figura 7. Comparação do tamanho das células do metaxilema radicular de plântulas de *E. heterophylla* entre os diferentes tratamentos das subfrações A1 e A2. (\*) As médias diferem significativamente do controle negativo pelo teste tukey a 0,05 de significância. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si na mesma concentração, pelo teste de tukey a 0,05 de significância..... 128

Figura 8. Histograma e fotomicrografia das células do metaxilema radicular de plântulas de *E. heterophylla*, crescidas no controle negativo (solução tampão e DMSO). As marcações equivalem à medida correspondente de 50 micrômetros. .... 129

Figura 9. Histograma e fotomicrografia das células do metaxilema radicular de plântulas de *E. heterophylla*, tratadas com diferentes concentrações da subfração A1. (A)  $0.8\text{mg.mL}^{-1}$ , (B)  $0.4\text{ mg.mL}^{-1}$  e (C)  $0.2\text{mg.mL}^{-1}$ . As marcações equivalem à medida correspondente a 50 micrômetros..... 130

Figura 10. Histograma e fotomicrografia das células do metaxilema radicular de plântulas de *E. heterophylla*, tratadas com diferentes concentrações da subfração A1. (A)  $0.8\text{mg.mL}^{-1}$ , (B)  $0.4\text{ mg.mL}^{-1}$  e (C)  $0.2\text{mg.mL}^{-1}$ . As marcações equivalem à medida correspondente a 50 micrômetros..... 131

## LISTA DE TABELAS

### CAPITULO 1

Tabela 1. Rendimentos das frações obtidas utilizando 100g de pó de folhas, casca de caule e raízes de *O. pulchella* coletados na época seca e chuvosa, pelo método de extração líquido-líquido (Otsuka, 2005). ..... 52

Tabela 2. Germinação de sementes de *M. maximus* submetidas a diferentes tratamentos (200, 400 e 800ppm) de frações oriundas de *O. pulchella*. (continua)..... 55

Tabela 3. Germinação de sementes de *M. maximus* submetidas a diferentes tratamentos (200, 400 e 800ppm) de frações oriundas de *O. pulchella*. (continuação)..... 56

Tabela 4. Germinação de sementes de *M. maximus* submetidas a diferentes tratamentos (200, 400 e 800ppm) de frações oriundas de *O. pulchella*. (continuação)..... 57

Tabela 5. Germinação de sementes de *E. heterophylla* submetidas a diferentes tratamentos (200, 400 e 800ppm) de frações oriundas de *O. pulchella*. ..... 58

Tabela 6. Germinação de sementes de *E. heterophylla* submetidas a diferentes tratamentos (200, 400 e 800ppm) de frações oriundas de *O. pulchella*. ..... 59

Tabela 7. Germinação de sementes de *E. heterophylla* submetidas a diferentes tratamentos (200, 400 e 800ppm) de frações oriundas de *O. pulchella*. ..... 60

### CAPITULO 2

Table 1. Percentage of anomalies and dead seedlings found in the species *M. maximus*, *L. sativa*, *S. lycopersicum*, *A. cepa*, and *T. aestivum* in treatments with benzyl salicylate and benzyl benzoate..... 95

Table 2. Percentage of growth inhibition of *T. aestivum* coleoptiles under the action of benzyl salicylate and benzyl benzoate compounds..... 98

### **CAPITULO 3**

Tabela 1. Rendimentos das subfrações oriundas da fração acetato etílica de folhas da época chuvosa de *Ocotea pulchella* obtidas no fracionamento com coluna. .... 121

Tabela 2 - Detecção dos compostos salicilato de benzila e benzoato de benzila nas subfrações A1 e A2 oriundas da fração acetato etílica de folhas da época chuvosa (AEFC) da espécie *O. pulchella* pelo método de cromatografia em camada delgada. .... 132

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACC - Fração aquosa de cascas de caule da época chuvosa

ACS - Fração aquosa de cascas de caule da época seca

AECC - Fração de acetato de etila de cascas de caule da época chuvosa

AECS - Fração de acetato de etila de cascas de caule da época seca

AEFC - Fração de acetato de etila de folhas da época chuvosa

AEFS - Fração de acetato de etila de folhas da época seca

AERC - Fração de acetato de etila de raízes da época chuvosa

AERS - Fração de acetato de etila de raízes da época seca

AFC - Fração aquosa de folhas da época chuvosa

AFS - Fração aquosa de folhas da época seca

ARC - Fração aquosa de raízes da época chuvosa

ARS - Fração aquosa de raízes da época seca

B.O.D. - Biochemical oxygen demand

CCD - Cromatografia em camada delgada

DMSO - Dimetilsulfóxido

HCC - Fração hexânica de cascas de caule da época chuvosa

HCS - Fração hexânica de cascas de caule da época seca

HFC - Fração hexânica de folhas da época chuvosa

HFS - Fração hexânica de folhas da época seca

HRC - Fração hexânica de raízes da época chuvosa

HRS - Fração hexânica de raízes da época seca

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	21
Alelopatia.....	21
Metabólitos secundários.....	22
O Cerrado.....	23
Família Lauraceae .....	24
O gênero <i>Ocotea</i> .....	25
<i>Ocotea pulchella</i> .....	25
Salicilato de benzila .....	26
Benzoato de benzila .....	27
Espécies-alvo utilizadas .....	27
Amendoim bravo .....	27
Capim colônia .....	27
Aleloquímicos como alternativa no controle de espécies invasoras de culturas agrícolas .....	28
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	30
CAPITULO 1 Avaliação do potencial fitotóxico de frações de folhas, cascas de caule e raízes de <i>Ocotea pulchella</i> Nees et Mart .....	39
RESUMO.....	40
ABSTRACT .....	41
1. INTRODUÇÃO .....	42
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	46
2.1 Coleta do material vegetal .....	46
2.2 Preparação das frações.....	46
2.3 Preparação das soluções .....	48

2.4. Bioensaios.....	49
2.4.1. Bioensaio de atividade geral (citotoxicidade) com coleóptilos de <i>T. aestivum</i> .....	49
2.4.2. Bioensaios de fitotoxicidade.....	50
2.4.2.1. Bioensaios de germinação de sementes.....	50
2.4.2.2. Bioensaios de crescimento inicial de plântulas.....	51
2.5. Análises estatísticas .....	51
3. RESULTADOS.....	52
4. DISCUSSÃO.....	66
5. CONCLUSÃO .....	70
6. BIBLIOGRAFIA .....	71
CAPITULO 2 Phytotoxic potential of benzyl salicylate and benzyl benzoate on bioindicator and invasive species.....	80
RESUMO.....	81
ABSTRACT .....	82
1. INTRODUCTION .....	83
2. MATERIALS AND METHODS.....	86
2.1. Preparation of solutions .....	86
2.2. Bioassays .....	86
2.2.1. General activity bioassay (cytotoxicity) with <i>T. aestivum</i> coleoptiles. ....	86
2.2.2. Phytotoxicity bioassays .....	87
2.2.2.1. Initial growth bioassays .....	87
2.3. Statistical analysis .....	88
3. RESULTS.....	89
4. DISCUSSION .....	97
5. CONCLUSIONS.....	102

6. REFERENCES.....	103
--------------------	-----

CAPITULO 3 Atividade fitotóxica de subfrações oriundas da fração acetato etílica de folhas de <i>Ocotea pulchella</i> Nees & Mart sobre espécies invasoras de culturas agrícolas .....	111
--	-----

RESUMO.....	112
-------------	-----

ABSTRACT .....	113
----------------	-----

1. INTRODUÇÃO .....	114
---------------------	-----

2. MATERIAL E MÉTODOS.....	117
----------------------------	-----

2.1. Fracionamento cromatográfico da fração acetato etílica .....	117
---	-----

2.2. Preparo das soluções.....	117
--------------------------------	-----

2.3. Bioensaios.....	118
----------------------	-----

2.3.1. Bioensaio de atividade geral (citotoxicidade) com coleóptilos de <i>T. aestivum</i> .....	118
--	-----

2.3.2. Bioensaios de fitotoxicidade.....	118
--	-----

2.3.2.1. Bioensaios de crescimento inicial de plântulas .....	118
---	-----

2.3.2.2. Bioensaio de crescimento de células do metaxilema de <i>E. heterophylla</i> ..	119
---	-----

2.4. Cromatografia em Camada Delgada (CCD) das subfrações A1 e A2.....	120
--	-----

2.5. Análises estatísticas .....	120
----------------------------------	-----

3. RESULTADOS.....	121
--------------------	-----

4. DISCUSSÃO.....	133
-------------------	-----

5. CONCLUSÃO .....	136
--------------------	-----

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	137
-------------------------------------	-----

CONCLUSÃO GERAL.....	144
----------------------	-----

## **INTRODUÇÃO GERAL**

No ambiente natural, as plantas estão expostas a diferentes fatores bióticos e abióticos e a falta de mobilidade destas, fez com que tiveram que desenvolver importantes estratégias evolutivas para garantir sua sobrevivência (Callaway, 2002) e minimizar os danos ocasionados pela competição com plantas vizinhas e pela predação. Dentre as estratégias desenvolvidas, está a defesa do tipo química, que é caracterizada pela produção de metabólitos secundários que são responsáveis pela comunicação das plantas com seu entorno (interações planta-planta, planta-insetos e planta-microrganismos) (Oliveros-Bastidas, 2008).

### **Alelopatia**

Rice (1984) define que a alelopatia compreende a liberação de substâncias químicas no ambiente por um organismo, tais substâncias interagem com outro organismo que está presente no mesmo ambiente, tendo como consequência a inibição ou estímulo do crescimento e/ou seu desenvolvimento. Além disso o autor afirma também que a alelopatia pode manifestar-se também entre microrganismos, entre microrganismos e plantas, entre plantas cultivadas de interesse humano, ocorre também entre plantas invasoras de culturas agrícolas e entre plantas cultivadas e plantas invasoras.

Outra definição descreve que a alelopatia refere-se ao impacto de plantas sobre plantas vizinhas e/ou sua microflora e/ou macrofauna mediada por biomoléculas conhecidas como aleloquímicos; frequentemente, esses aleloquímicos interferem no crescimento da planta, mas também podem resultar na estimulação do crescimento (International Allelopathy Society - IAS, 2020). Os aleloquímicos podem ter efeitos positivos ou negativos e esse efeito depende da concentração, dinâmica, persistência e destino dos mesmos no ambiente, bem como a sensibilidade que apresentam as espécies alvo (Callaway & Ridenour, 2004).

Segundo Chou (1999) a alelopatia desempenha um papel importante na dominância, na sucessão e na formação das comunidades vegetais nos ambientes naturais, sendo também uma estratégia de colonização que muitas plantas exóticas tem sobre a comunidade natural (Hierro & Callaway 2003). Existe uma grande variedade de agentes alelopáticos os quais são sintetizados e armazenados em diferentes células das plantas, podendo ser em sua forma livre ou unidos com outras moléculas, e que posteriormente são liberados no ambiente como resposta a estresse biótico e abiótico (Inderjit & Nielsen 2003). Esses compostos químicos com atividade

biológica liberados pelos organismos no ambiente são conhecidos como substâncias alelopáticas, fitotoxinas, aleloquímicos ou produtos secundários (Pires & Oliveira 2011).

### **Metabólitos secundários**

As plantas produzem uma grande e ampla ordem de componentes orgânicos que são divididos em metabólitos primários e secundários. Os primários tem a função de responder pela sobrevivência da planta, participando nos processos de fotossíntese, respiração e assimilação de nutrientes enquanto os metabólitos secundários, também conhecidos como produtos secundários ou produtos naturais, teoricamente não possuem relação no crescimento e desenvolvimento da planta, estando associados a estratégias de defesa nas plantas (Taiz et al., 2017). Estes diferem dos metabólitos primários, por estarem presentes em concentrações baixas e por serem seletivos para alguns grupos de plantas (Berg & Lubert, 2008), onde desempenham diversas funções ecológicas (Taiz et al., 2017).

O reino vegetal tem contribuído de maneira significativa para o fornecimento de metabólitos secundários. Muitos destes são de grande importância devido a sua utilização como medicamentos, alimentos, cosméticos e agroquímicos como inseticidas, fungicidas, etc. (Phillipson & Anderson, 1998; Taiz et al., 2017). Segundo Souza Filho & Alves (2002), todas as plantas, teoricamente são capazes de sintetizar metabólitos secundários, porém essa característica é mais comum entre plantas selvagens que desenvolveram mecanismos de adaptação para competição por recursos com outras plantas, garantindo dessa maneira sua sobrevivência. Ferreira e Aquila (2000), mencionam que a tolerância ou resistência a estes compostos pode ser específica, podendo haver espécies mais sensíveis que outras.

Os metabólitos secundários têm funções ecológicas importantes nas plantas como: proteção as plantas contra herbívoros e patógenos; servem como atraentes para polinizadores (aroma, cor, sabor); tem a função de agentes de competição entre plantas e simbiose entre plantas e os microrganismos (Taiz et al., 2017). A síntese dos metabólitos secundários se determina pelas condições ambientais como a temperatura, umidade, salinidade e nutrientes minerais (Kutchan, 2001). Essas condições influenciam a síntese de diferentes metabólitos secundários, que promove tolerância a estresses bióticos e abióticos (Ramakrishna & Ravishankar, 2011).

De forma geral, todos os tecidos da planta apresentam potencial para armazenar metabólitos secundários; raízes, rizomas, caules, folhas, flores, frutos e sementes (Parvez et al., 2004). Dessa forma, as atividades biológicas diferem de acordo com órgão em que são armazenados, mas as folhas e raízes são as principais fontes de metabólitos secundários (Wu et al., 2009).

Diferente dos metabólitos primários, os metabólitos secundários se apresentam em concentrações baixas e em determinados grupos de plantas, geralmente tem uma estrutura complexa, são de baixo peso molecular e possuem atividades biológicas notáveis (Berg & Lubert, 2008).

Os metabólitos secundários identificados em espécies vegetais são distribuídos em três grupos: terpenos ou terpenóides, compostos fenólicos ou fenóis e os compostos nitrogenados (Delbone & Lando, 2010). Os terpenos ou terpenóides são a classe de metabólitos secundários mais abundante, com uma maior variedade estrutural e funcional nas plantas. A maioria deles são apolares, solúveis em solventes orgânicos e insolúveis em água (Oliveira, 2003; Chang et al., 2010). Zwenger & Basu, 2008 mencionam que os terpenos desempenham um papel importante nas interações planta-planta, podendo ser: alelopáticos (Barreto et al., 2011; Imatomi et al., 2013), planta-inseto: repelentes contra insetos (Viegas Júnior, 2003) e planta-patógeno: agentes contra infecções de patógenos (Yang et al., 2006).

Os compostos fenólicos estão caracterizados por ter em sua estrutura química ao menos um anel aromático com um grupo hidroxila (Ramalho & Jorge, 2006). Estes podem ocorrer na sua forma livre ou ligados a açúcares e proteínas. Alguns exemplos de substâncias fenólicas são: ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, quinonas, fenilpropanoides, taninos e ligninas (Rezende et al., 2016).

Os compostos nitrogenados são moléculas que apresentam em sua constituição pelo menos um átomo de nitrogênio. As classes mais importantes são: os alcaloides, glicosídeos cianogênicos, betalainas e glucosinolatos (Rezende et al., 2016). Em sua maioria os alcaloides são de caráter alcalino, essa classe de compostos é conhecida pela presença de substâncias que possuem efeito no sistema nervoso (Vizzotto et al., 2010). Seu uso vai desde ações contra herbívoros: nicotina e estricnina, como a elaboração de fármacos importantes (morfina, cocaína, codeína, escopolamina) e alelopáticos (Blua et al., 1998; Blum, 2004).

### **O Cerrado**

O Cerrado é o segundo maior bioma da América do Sul e uma das mais extensas formações vegetais brasileiras, com aproximadamente 2.036.448 km<sup>2</sup>, ocupando cerca de 22% do território brasileiro, este se estende sobre os estados de Bahia, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Piauí, Rondônia, São Paulo, Tocantins, e além dos enclaves no Amapá, Roraima e Amazonas, (Ministério do Meio Ambiente, 2018). O cerrado apresenta uma elevada riqueza de espécies de flora, com 12.356

espécies dentre plantas herbáceas, arbustivas e arbóreas (Mendonça et al., 2008) sendo 44% espécies endêmicas.

Apresenta duas estações bem marcadas, sendo um período chuvoso (outubro a março), e seguido por um período seco (de abril a setembro). O solo é avaliado como de savana tropical, sendo deficiente em nutrientes, rico em ferro e alumínio, tem plantas de aparência seca, entre arbustos esparsos, gramíneas e o cerrado (Klink & Machado, 2005). Diversos fatores ambientais como estresse hídrico e altas temperaturas são comumente encontrados no Cerrado, a maioria dos solos no cerrado são os Latossolos, que cobrem cerca de 46%, estes são ácidos (relacionado ao alumínio tóxico) e pobres em nutrientes (Lepsch, 2011). Esses fatores podem aumentar a produção de compostos secundários nas plantas (Einhellig, 1996).

Nas condições de solos pobres do cerrado que as plantas crescem, repor as folhas que são predadas, representa um elevado custo para as plantas (Fine et al., 2006), somando que existe uma grande competição pelos nutrientes. Em consequência disso, as plantas do Cerrado apresentam alguns mecanismos de defesa como a produção de folhas durante períodos propícios, folhas coriáceas, quantidades elevadas de compostos fenólicos e baixos níveis de nitrogênio e água (Marquis et al., 2002).

A presença de aleloquímicos que tem atividade fitotóxica já foi relatada em estudos realizados com algumas espécies vegetais do Cerrado (Grisi et al., 2012; Imatomi et al., 2013; Anese et al., 2015, Pereira et al., 2015, Candido et al., 2016, Grisi et al., 2016; Jatobá et al., 2016) sugerindo que a alelopatia tem uma função importante na ecologia do Cerrado. Nesse cenário, o uso de espécies vegetais do Cerrado em estudos que envolvem alelopatia, se mostra como uma necessidade de apresentar novas alternativas ao manejo integrado de pragas agrícolas, mediante a descoberta de compostos com potencial fitotóxico e o desenvolvimento de agroquímicos naturais, que são mais específicos e menos prejudiciais para o ambiente.

### **Família Lauraceae**

A família Lauraceae compreende 55 gêneros e um aproximado de 2.500 - 3.000 espécies de árvores. Em todo o mundo tendo a sua distribuição de espécies em regiões com clima tropical e subtropical principalmente na América, Ásia tropical, Austrália e Madagascar (Werff & Richter, 1996). Esta família tem considerável importância econômica, pois é utilizada como fonte de madeira (*Nectandra*, *Ocotea*, *Persea* spp., *Mezilaurus itauba*), como cultura (*Persea americana*), uso medicinal (*Cinamomum camphora*), e para obter sabores para a indústria

alimentícia, perfumaria e medicamentos (*Cinnamomum zeylanicum*, *Cinnamomum cassia*, *Laurus nobilis*, *Aniba rosaeodora*), entre outros (Christoffoleti et al., 2008; Alcântara, 2009)

### **O gênero *Ocotea***

O gênero *Ocotea* é o maior gênero Neotropical da família Lauraceae e é constituído por um aproximado de 350 espécies que estão distribuídas na América tropical e subtropical, desde o México e sul da florida até a Argentina (Rohwer, 1993), sendo que 168 destas espécies (108 endêmicas) ocorrem no Brasil (Brotto et al., 2013; Quinet et al., 2015).

Este gênero está entre os mais diversos da flora brasileira e é um dos mais representativos em número de indivíduos quanto na riqueza de táxons nas florestas pluviais (Forzza et al., 2010). O gênero é caracterizado por ter árvores e arbustos com folhas de modo geral em forma alternada, flores unissexuadas ou bissexuadas, uma inflorescência tirsóide-paniculada ou racemiforme, fruto de tipo baga com cúpula (Baitello et al., 2003).

O grande número de espécies do gênero *Ocotea* tem despertado o interesse dos fitoquímicos brasileiros, algumas espécies deste gênero são utilizadas na medicina popular para o tratamento de diarreia (*Ocotea quixos*), cólicas menstruais (*Ocotea nicaraguensis*), infecções, picada de cobra (*Ocotea caparrapi*), dor de cabeça (*Ocotea bullata*), (Napralert, 2009), como “antiparasita” (*Ocotea lancifolia*) (Camargo et al., 2013), entre outras. A família Lauraceae contém altos níveis de óleos essenciais que estão presentes nas folhas e com diversas atividades biológicas relatadas (Chaverri et al., 2011). Estes óleos mostraram atividade herbicida tendo efeitos inibitórios que foram observados na germinação, crescimento e concentração de clorofila nas espécies alvo das plantas estudadas (Carmo et al., 2007).

Espécies deste gênero são reconhecidas fitoquimicamente pela síntese de uma ampla variedade de substâncias como são monoterpenos, alcaloides isoquinolínicos, lignanas, neolignanas e óleos essenciais sendo os principais metabólitos sintetizados (Pabon & Cuca, 2010; Silveira et al., 2011; Yamaguchi, 2011), flavonoides, polipropanóides, esteroides, sesquiterpenos (Zanin & Lordello, 2007).

### ***Ocotea pulchella***

A espécie *Ocotea pulchella* é conhecida popularmente como canela-amarela, canela-do-brejo, canela-do-cerrado, canela-lageana, canela-laranja, canela layana, canela miudera, canela-pimenta, canela-prego, canela-preta, caneleira, canelinha, lageana, laurel (Grandtner & Chevrette, 2013). Sua distribuição é na América do Sul nos países de Argentina, Paraguai, Uruguai e Brasil. No Brasil, essa espécie ocorre em cerrado típico e cerradão, nos estados de

Tocantins, Goiás, Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Quinet et al. 2015).

O hábito desta espécie pode variar de arbustivo a arbóreo, podendo atingir 25 - 30 m de altura, (Brotto et al., 2010), o tronco com diâmetro de 50-80 cm, folhas simples, face superior glabra e inferior ferrugíneo-pubescente (Lorenzi, 2002). Se caracteriza pelo tronco cinzento pontilhado por lenticelas e os frutos do tipo drupa ovalado ou elipsoide e de cor negro quando estão maduros (Bauer et al., 2014). Inflorescências axilares; panícula ou racemo, áureo-pubérula e flores unissexuadas (Brotto et al., 2010). Floresce no período de fevereiro a maio e em novembro e frutifica nos meses de maio, julho, agosto e setembro (Souza & Affonso, 2017). Diversas atividades biológicas como herbicida, bactericida, anticancerígena e inseticida já foram identificadas para essa espécie (Marques, 2001; Yamaguchi, 2011, Araújo, 2012; Candido et al; 2016).

Candido et al, (2016), avaliaram a atividade fitotóxica de extratos de acetato de etila e de metanol de folhas, caules e raízes da espécie *O. pulchella* Nees, sobre coleótilos de *T. aestivum*. Do extrato acetato etílico de folhas foram isolados e caracterizados um total de 11 compostos, dos quais os compostos espatulenol, salicilato de benzila e benzoato de benzila exibiram as maiores atividades inibitórias sobre a espécie bioindicadora *S. lycopersicum*, dessa maneira, esses autores concluíram que estes compostos podem ser os responsáveis pela atividade fitotóxica exibida na espécie *O. pulchella*.

Desses três compostos, o salicilato de benzila e o benzoato de benzila são produzidos de forma sintética e amplamente comercializados. Ambos compostos tem uma ampla variedade de usos entre os que destacam seu uso na área de fragrâncias, cosméticos e na indústria farmacêutica (Lapczynski et al., 2007; Charles & Darbre, 2009; Salavastru et al., 2017a; Salavastru et al., 2017b)

### **Salicilato de benzila**

O salicilato de benzila (C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>) é um éster benzílico do ácido salicílico usado como fixador de fragrâncias, na área cosmética, de higiene pessoal e limpeza doméstica (Lapczynski et al., 2007). Além disso, tem sido utilizado na indústria alimentícia como fixador de sabor (Sivakumar et al., 2002). Este composto é encontrado de forma natural, em plantas como *Dianthus caryophyllus* L. (Anonis, 1993), *Polianthes tuberosa* L. (IFRA, 2009) e *Ocotea pulchella* Nees e Mart. (Candido et al., 2016).

### **Benzoato de benzila**

O benzoato de benzila ( $C_{14}H_{12}O_2$ ) é um éster benzílico do ácido benzóico frequentemente aplicado na indústria farmacêutica como princípio ativo de medicamentos para tratamento da escabiose (Salavastru., et al 2017a) e pediculose (Salavastru., et al 2017b). Além disso, este composto é utilizado como repelente de insetos (Knowles, 1991), usado na indústria alimentícia (Tang e LI, 2004), como solvente, na indústria de perfumaria e cosméticos (Pybus & Sell, 2006) e na composição de pesticidas (Johnson et al., 2017). O benzoato de benzila pode ser encontrado naturalmente em espécies de plantas tais como *Citharexylum spinosum* L. (El Ayeb-Zakhama et al., 2017), *Magnolia champaca* L. (Sá et al., 2017) e *O. pulchella* (Candido et al., 2016).

### **Espécies-alvo utilizadas**

#### **Amendoim bravo**

O amendoim-bravo ou leiteiro (*Euphorbia heterophylla*) é uma planta daninha pertencente à família Euphorbiaceae. Esta se caracteriza por ter uma alta capacidade de competição por recursos como água, luz, nutrientes, CO<sub>2</sub> e oxigênio (Oliveira Jr. et al., 2011), ocasionando perdas na qualidade e produtividade de sistemas agrícolas, como a soja (Carvalho et al., 2010, Lopes Ovejero et al., 2013), milho (Cury et al., 2012), cana-de-açúcar (Marques et al., 2012) algodão (Beltrão, 2004), feijão (Cury et al., 2011; Machado et al., 2015).

É uma planta daninha nativa das regiões tropicais e subtropicais das Américas (Cronquist, 1981), apresenta ciclo anual, um rápido acúmulo de biomassa e uma elevada produção de sementes (Kissmann & Groth, 1999). Essa espécie é considerada de difícil controle, já que apresenta resistência múltipla aos herbicidas inibidores da enzima protoporfirinogênio oxidase – Protox, acetolactato sintase - ALS (Trezzi et al., 2011; Xavier et al., 2018) e recentemente foi relatada como resistente ao herbicida glifosato (inibidor da enzima 5-enolpiruvato- chiquimato-3-fosfato sintase - EPSPS) (Adegas et al., 2020). Sendo assim, a busca de herbicidas que tenham novos mecanismos de ação, assim como melhorias na aplicação, são fundamentais para controlar de maneira satisfatória esta planta daninha (Grigolli et al., 2011).

#### **Capim colônia**

O capim-colônia (*Megathyrsus maximus*), é uma gramínea que interfere em cultivos agrícolas, se destaca por ser uma planta vigorosa e com uma grande capacidade de ocupar ambientes rapidamente, devido a sua agressividade e pela intensa capacidade na produção e longevidade de sementes (Costa et al., 2002), sendo considerada como uma planta daninha altamente competitiva (Lorenzi, 2008). A presença desta espécie é comum em lavouras de cana-planta sendo considerada como infestante devido a supressão produzida pela palha (Correia et

al., 2012), a sua interferência nas culturas contribui para a redução na produtividade. Kuva et al. (2003) observaram redução de até 40% da produtividade de colmos na cultura de cana-de-açúcar, numa comunidade infestante de plantas invasoras, com espécies como capim colônia (*Megathyrsus maximus*) e braquiária (*Brachiaria decumbens*).

### **Aleloquímicos como alternativa no controle de espécies invasoras de culturas agrícolas**

A resistência das plantas invasoras de culturas agrícolas aos herbicidas é um grande problema na agricultura atual (Agostinetti & Vargas, 2014). Devido à sua alta eficácia e ao baixo custo, o controle de plantas invasoras mediante a aplicação de herbicidas é uma prática muito frequente nas áreas agrícolas. Porém, nem sempre os agricultores utilizam essa ferramenta de maneira adequada (Melo et al., 2019; Morota et al., 2020).

O mau uso do manejo integrado de plantas invasoras tem provocado uma série de desvantagens ao meio ambiente, provocam mudanças no agroecossistema, além de serem nocivos à saúde do ser humano (Castro et al., 2016). Algumas práticas culturais como o uso recorrente de herbicidas com o mesmo mecanismo de ação na mesma área agrícola, monocultivo por vários anos sucessivos, assim como a pouca utilização de outros métodos de controle podem facilitar a seleção de populações resistentes a herbicidas de certos grupos químicos. Como consequência, isto gera falhas no controle eficiente das espécies invasoras de culturas agrícolas, gerando perdas na produtividade e prejuízos para o agricultor (Vidal et al., 2010; Inoue & Oliveira Jr, 2011; Vasconcelos et al., 2012).

Uma alternativa ao uso dos herbicidas convencionais no controle das plantas invasoras é a descoberta de aleloquímicos. Os herbicidas atuais provocam mudanças nas populações de plantas invasoras além do risco de contaminação ambiental e o aumento de espécies de plantas invasoras mais resistentes aos herbicidas (Verdeguer et al., 2011). Isto torna os estudos envolvendo o potencial fitotóxico de espécies vegetais uma ferramenta importante para identificar plantas que apresentam compostos bioativos a partir dos quais se podem produzir herbicidas naturais, sendo mais específicos e menos prejudiciais para o ambiente (Bertholdsson 2010; Imatomi et al., 2013).

Alguns autores já relataram a possibilidade de controlar espécies invasoras de culturas agrícolas através do uso de aleloquímicos (Matsumoto et al., 2010; Oliveira et al., 2014)

Existem poucos trabalhos publicados sobre a pesquisa do potencial de *O. pulchella* e de seus metabólitos secundários, particularmente no que concerne às ações herbicida, diante do exposto, o presente trabalho teve o objetivo de obter informações sobre o potencial fitotóxico

de frações e subfrações oriundas da espécie *O. pulchella*, assim como também dos compostos sintéticos salicilato de benzila e benzoato de benzila e para isso, procurou-se responder as seguintes perguntas:

1. Frações e subfrações de *O. pulchella* possuem efeito fitotóxico sobre as espécies alvo selecionadas?
2. Dentre os órgãos vegetais de *O. pulchella*, qual fração apresenta maior atividade no controle de plantas invasoras de culturas agrícolas?
3. Os compostos sintéticos salicilato de benzila e benzoato de benzila possuem atividade fitotóxica sobre espécies bioindicadoras e espécies invasoras de culturas agrícolas?
4. Podem, os compostos salicilato de benzila e benzoato de benzila exercer efeitos inibitórios similares ao herbicida Goal<sup>®</sup> nas espécies alvo selecionadas?

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Adegas, F. S., Gazziero, D. L. P., Oliveira JR, R. S., Mendes, R. R., & Rodrigues L. J. *Euphorbia heterophylla*: um novo caso de resistência ao glifosato no Brasil. Embrapa soja. Comunicado técnico 98, Londrina, PR. 5p, 2020.

Alcântara, J. M. Bioprospecção de espécies amazônicas da família Lauraceae com potencial aromático e medicinal. 2009. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 139p, 2009.

Anese, S; Jatobá, L. J; Grisi, P. U; Gualtieri, S. C. J; Santos, M. F. C; Berlinck, R. G. S. Bioherbicidal activity of drimane sesquiterpenes from *Drimys brasiliensis* Miers roots. *Industrial Crops and Products*. v.74, p. 28–35, 2015.

Araújo, A. C. R. Estudo fitoquímico e avaliação das atividades alelopática, antioxidantes, antilarvicidas e citotoxicidade das folhas de *Ocotea pulchella* Mart. (lauraceae). Dissertação. Universidade Federal do Paraná. p.118, 2012.

Baitello, J. B., Hernandez, F. L., Moraes, P. L. R., Esteves, R., Marcovino, J. R. Lauraceae. In: Maria das Graças Lapa Wanderley; George John Shepherd; Therezinha Sant'Ana Melhem; Ana Maria Giulietti; Mizué Kirizawa. (Org.). Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo – v. 3. RiMa/Fapesp. São Paulo, 2003.

Barreto, B. C. P.; Santos, R. F.; Viecelli, C. A.; Três, S. P.; Oliveira, M. C. Interferência alelopática de extrato da soja sobre sementes de canola e crambe. *Cultivando o Saber, Cascavel*, v. 4, n. 2, p. 188-198, 2011.

Bauer, D.; Müller, A.; Goetz, M. N. B.; Schmitt, J. L. Fenologia de *Ocotea pulchella*, *Myrcia brasiliensis* e *Psidium cattleianum*, em floresta semidecídua do sul do Brasil. *floresta, Curitiba, PR*, v. 44, n. 4, p. 657 – 668. 2014.

Beltrão, N. E. de M. Manejo de plantas daninhas em algodão. In: Vargas, L.; Roman, E. S. Manual de manejo e controle de plantas daninhas. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, p. 215-250, 2004.

Berg, J. M. T.; Lubert, J. Bioquímica. 6.Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 545 p, 2008.

Bertholdsson, N. O. Breeding spring wheat for improved allelopathic potential. *Weed Research* 50: 49-57. 2010.

- Blua, M. J.; Hanscom, Z.; Collier, B. D. Glucocapparin variability among four populations of *Isomeris arborea* Nutt. *Journal of Chemical Ecology*, v.14, p.623-33, 1998.
- Blum, U. Fate of phenolic allelochemicals in soils – the role of soil and rhizosphere microorganisms. In:Macías, F. A., Galindo, J. C. G., Molinillo, J. M. G., Cuttler, H. G. (eds) *Allelopathy chemistry and mode of action of allelochemics*. CRC Press, Boca Raton, FL, p.57–76, 2004.
- Brotto, M. L. Estudo taxonômico do gênero *Ocotea* aubl. (Lauraceae) na floresta ombrófila densa no estado do Paraná. 92 f. (Mestrado), Universidade Federal do Paraná), 2010.
- Brotto, M. L.; Santos, E. P.; Cervi, A. C. O gênero *Ocotea* (Lauraceae) no estado do Paraná, Brasil. *Rodriguésia*, Rio de Janeiro, v. 64, n. 3, p. 495-525, 2013.
- Callaway, R. M. The Detection of Neighbors by Plants. *Trends Ecology Evolution*, v. 17, p. 104-105, 2002.
- Callaway, R. M.; Ridenour, W. M. Novel weapons: invasive success and the evolution of increased competitive ability. *Frontiers in Ecology and the Environment*, vol. 2, p. 436 – 443, 2004.
- Camargo, M. J.; Miranda, M. L. D.; Kagamida, C. M.; Rodrigues, E. D.; Garcez, F. R.; Garcez, W. S. Sesquiterpenos de *Ocotea lancifolia* (Lauraceae) *Química Nova*. vol.36 no.7 São Paulo. 1008 – 1013. 2013.
- Candido, L. P.; Varela, R. M.; Torres, A.; Molinillo, J. M. G.; Gualtieri, S. C. J.; Macías, F. A. Evaluation of the Allelopathic Potential of Leaf, Stem, and Root Extracts of *Ocotea pulchella* Nees et Mart. *Chemistry & Biodiversity*. 13. p1058 – 1067, 2016.
- Carmo, F. M. S.; Borges, E. E. L.; Takaki, M. Alelopatia de extratos aquosos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer). *Acta Botânica Brasilica*, vol. 21 (3), p. 697-705, 2007.
- Carvalho, L. B.; Bianco, S.; Guzzo, C. D. Interferência de *Euphorbia heterophylla* no crescimento e acúmulo de macronutrientes da soja. *Planta Daninha*, v. 28, p. 33-39, 2010.
- Castro, Y. O.; Cavalieri, S. D.; Santos, M. P.; Golynski, A.; Nascimento, A. R. Manejo integrado de plantas daninhas na cultura do tomate para processamento industrial e para consumo in natura. *Scientific Electronic Archives* 5: 11-17, 2016.

Chang, T. H.; Hsieh, F. L.; Ko, T. P.; Teng, K. H.; Liang, P. H.; Wang, A. H. J. Structure of a heterotetrameric geranyl pyrophosphate synthase from mint (*Mentha piperita*) reveals intersubunit regulation. *The Plant Cell Online*, v. 22, n. 2, p. 454–467, 2010.

Charles, A. K.; Darbre, P. D. Oestrogenic activity of benzyl salicylate, benzyl benzoate and butylphenylmethylpropional (Lilial) in MCF7 human breast cancer cells in vitro. *J Appl Toxicol.* 29(5):422-434, 2009.

Chaverri, C.; Díaz, C.; Cicció, J. F.; Chemical Analysis of Essential Oils from *Ocotea gomezii* W.C. Burger and *Ocotea morae* Gómez-Laur. (Lauraceae) Collected at “Reserva Biológica Alberto M. Brenes” in Costa Rica and their Cytotoxic Activity on Tumor Cell Lines. *J. Braz. Chem. Soc.* 22(4), 741-745. 2011.

Chou, C. H. Roles of allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18:5, p. 609-636, 1999.

Christoffoleti, P. J.; Lopez-Ovejero, R. F.; Nicolai, M.; Vargas, L.; Carvalho, S. P. C.; Caetano, A. C.; Carvalho, C. C.; Moreira, M. S. Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas 3ª edição, atual e rev., Piracicaba, Brazil, 2008.

Costa, E. A. D.; Matallo, M. B.; Carvalho, J. C.; Rozanski, A. Eficiência de nova formulação do herbicida oxyfluorfen no controle de plantas daninhas em área de *Pinus caribaea* morelet var. hondurensis barr. et Golf. *Revista Árvore*, v. 26, p. 683-689, 2002.

Correia, N. M.; Gomes, L. P.; Perussi, F. J. Control of *Brachiaria decumbens* and *Panicum maximum* by S-metolachlor as influenced by the occurrence of rain and amount of sugarcane straw on the soil. *Acta Sci., Agron.* vol.34 no.4, 2012.

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

Cury, J. P.; Santos, J. B.; Valadão Silva, D.; Carvalho, F. P.; Braga, R. R.; Byrro, E. C. M.; & Ferreira, E. A. Produção e partição de matéria seca de cultivares de feijão em competição com plantas daninhas. *Planta Daninha*, v. 29, n. 1, p. 149-158, 2011.

Cury, J. P.; Santos, J. B.; Silva, E. B.; Byrro, E. C. M.; Braga, R. R.; Carvalho, F. P.; Valadão Silva, D. Acúmulo e partição de nutrientes de cultivares de milho em competição com plantas daninhas. *Planta Daninha*, Viçosa-MG, v. 30, n. 2, p. 287-296, 2012.

Delbone, C. A. C.; Lando, R. L. Importância ecológica e evolutiva dos principais grupos de metabólitos secundários nas espécies vegetais. Congresso de Educação do Norte Pioneiro. 10ª edição. UENP-CCNE-CLACampus Jacarezinho. 2010. ISSN-1808-3579.

Einhellig, F. A. Interactions involving allelopathy in cropping systems. *Agronomy Journal*, Madison, v. 88, n. 6, p. 886-893, 1996.

Ferreira, A. G.; Áquila, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 12, Edição Especial, p. 175-204, 2000.

Fine, P. V. A.; Miller, Z. J.; Mesones, I.; Irazuzta, S.; Appel, H. M.; Stevens, M. H. H.; Sääksjärvi, I.; Schultz, J. C.; Coley P. D. The growth-defense trade-off and habitat specialization by plants in Amazonian forests. *Ecology*, vol. 87 p. 150–162, 2006.

Forzza, R. C.; Baumgratz, J. F. A.; Bicudo, C. E. M.; Canhos, D. A. L.; Carvalho Jr., A. A.; Costa, A. F.; Costa, D. P.; Hopkins, M.; Leitman, P. M.; Lohmann, L. G.; Maia, L. C.; Martinelli, G.; Menezes, M.; Morim, M. P.; Nadruz-Coelho, M. A.; Peixoto, A. L.; Pirani, J. R.; Prado, J.; Queiroz, L. P.; Souza, V. C.; Stehmann, J. R.; Sylvestre, L.; Walter, B. M. T. & Zappi, D. (eds.). *Catálogo de plantas e fungos do Brasil*. 2 vols. Andrea Jakobsson Estúdio / Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 1699p, 2010.

Grandtner, M. M.; Chevrette, J. *Dictionary of Trees. South America. Nomenclature, Taxonomy and Ecology. Volume 2*. Academic Press (Elsevier), USA. 2013.

Grigolli, J. F. J.; Pereira, F. C. M.; Peñaherrera, L. C.; Santos, E. A. & Ferreira, M. C. Controle de *Euphorbia heterophylla* com mesotrione e óleos para diferentes pontas de pulverização. *Revista Brasileira de Herbicidas*, [S.l.], v. 10, n. 3, p. 266-276, 2011.

Grisi, P. U.; Ranal, M. A.; Gualtieri, S. C. J.; Santana, D. G. Allelopathic potential of *Sapindus saponaria* L. leaves in the control of weeds. *Acta Science Agronomy*. v.34, p.1-9, 2012.

Grisi, P. U.; Imatomi, M.; Pereira, V. C.; Anese, S.; Gualtieri, S. C. J. Influence of *Serjania lethalis* A. St.-Hil. (Sapindaceae) leaf and stem crude extracts on diaspores and seedlings of different cultivated species. *South African Journal of Botany*, vol. 105, p 97-105, 2016.

Hierro, J. L.; Callaway, R. M. Allelopathy and exotic plant invasion. *Plant and Soil*, 256, p. 29–39, 2003.

IAS – International Allelopathy Society. (2020). Acessado em Janeiro 12, 2020, disponível em: <https://allelopathy-society.osupytheas.fr/about/>.

Imatomi, M.; Novaes, P.; Matos, A. P.; Gualtieri, S. C. J.; Molinillo, J. M. G.; Lacret, R.; Varela, R. M. & Macías, F. A. Phytotoxic effect of bioactive compounds isolated from *Myrcia tomentosa* (Myrtaceae) leaves. *Biochemical Systematics and Ecology*, 46:29-35, 2013.

Inderjit; Nilsen, E. T. Bioassays and field studies for allelopathy in terrestrial plants: progress and problems. *Critical Reviews in Plant Sciences*, vol. 22:3-4, p. 221–238, 2003.

Inoue, M. H.; Oliveira Jr, R. S. Resistência de plantas daninhas a herbicidas. In: Oliveira Jr, R. S.; Constantin, J.; Inoue, M. H. (Eds.). *Biologia e manejo de plantas daninhas*. Curitiba: Omnipax, p. 193-213, 2011.

Jatobá, L. J.; Varela, R. M.; Molinillo, J. M. G.; Din, Z. U.; Gualtieri, S. C. J.; Rodrigues Filho, E.; Macías, F. A. Allelopathy of Bracken Fern (*Pteridium arachnoideum*): New Evidence from Green Fronds, Litter, and Soil. *PLoS ONE* 11(8), p 1-16, 2016.

Kissmann, K. G.; Groth, D. *Plantas infestantes e nocivas*. 2.ed. São Bernardo do Campo: Basf. p. 152-156, 278-284, 1999.

Klink, C. A. & Machado, R. B. A. A conservação do Cerrado brasileiro. *Megadiversidade*, vol. 1(1) p147-155. 2005.

Kutchan, T. M. Ecological Arsenal and Developmental Dispatcher. The Paradigm of Secondary Metabolism. *Plant Physiology*. v. 125, p. 58-60, 2001.

Kuva, M. A.; Gravena, R.; Pitelli, R. A.; Christoffoleti, P. J.; Alves, P. L. C. A. Períodos de interferência das plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar: III - capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) e capim-colonião (*Panicum maximum*). *Planta Daninha*, Viçosa, v.21, n.1, p.37-44, 2003.

Lepsch, I. F. 19 lições de pedologia. São Paulo: Oficina de textos; 2011.

Lopes Ovejero, R. F.; Soares, D. J.; Oliveira, W. S.; Fonseca, L. B.; Berger, G. U.; Soteres, J. K.; Christoffoleti, P. J. Residual herbicides in weed management for glyphosate-resistant soybean in Brazil. *Planta daninha* vol.31 no.4, 2013.

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

Machado, A. B.; Trezzi, M. M. I.; Vidal, R. A.; Patel, F.; Cieslik, L. F.; Debastiani, F. Rendimento de grãos de feijão e nível de dano econômico sob dois períodos de competição com *Euphorbia heterophylla*. Planta daninha vol.33 no.1, 2015.

Marques, C. A. Importância econômica da família Lauraceae lindl. Floresta e Ambiente. v. 8, n.1, p.195 - 206, 2001.

Marques, R. P., Martins, D., Costa, S. I. A., Vitorino, H. S. Densidades de palha e condições de luminosidade na germinação de sementes de *Euphorbia heterophylla*. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 33, n. 3, p. 867-872, 2012.

Marquis, R. J.; Morais, H. C.; Diniz, I. R. Interactions among cerrado plants and their herbivores: unique or typical? In: Oliveira PS, Marquis RJ (eds.) The cerrados of Brazil. Columbia University Press, New York, 306-328 pp, 2002.

Melo, M. S. C.; Rocha, L. J. F. N.; Brunharo, C. A. C. G.; Nicolai, M.; Tornisiello, V. L.; Nissen, S. J.; Christoffoleti, P. J. Sourgrass Resistance Mechanism to the Herbicide Glyphosate. Planta Daninha, v. 37, p. 1-10, 2019.

Mendonça, R. C.; Felfili, J. M.; Walter, B. M. T.; Silva Junior, M. C.; Filgueiras, T. S.; Nogueira, P. E. & Fagg, C. W. Flora vascular do bioma Cerrado: checklist com 12.356 espécies. Pp. 423-442. In: S.M. Sano; Almeida, S.P. & J.F. Ribeiro (eds.). Cerrado: ecologia e flora. v. 2. Brasília, Embrapa Informação e Tecnologia. 2008.

Ministério do meio ambiente. O bioma cerrado. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>. Acesso em setembro 2018.

Morota, F. K.; Mendes, R. R.; Mattiuzzi, M. D.; Biffe, D. F.; Raimondi, R. T.; Padovese, L. M.; Martoneto, J. V. S. Manejo de plantas daninhas em frutíferas tropicais: abacaxizeiro, bananeira, coqueiro, mamoeiro e maracujazeiro. Revista Brasileira de Herbicidas, v.19, n. 1. 2020.

Napralert. Natural Products Alert, University of the Illinois, Chicago, 2009.

Oliveira, S. H.; Lukacs, N. W. The role of chemokines and chemokine receptors in eosinophil activation during inflammatory allergic reactions. Brazillian Journal of Medical and Biological Research. v. 36, p. 1455-1463, 2003.

Oliveros-Bastidas, A.J. El fenómeno alelopático. El concepto, las estrategias de estudio y su aplicación en la búsqueda de herbicidas naturales. QuímicaViva, ano 7, n.1, p. 1-34, 2008.

- Oliveira JR, R. S.; Carneiro, J. C.; Constantin, J.; Santos, G.; Martini, P. E.; Francischini, A. C.; Osipe, J. B. Aplicações isoladas ou associadas de diuron, oxyfluorfen e prometryne para o controle de *Euphorbia heterophylla*. *Planta Daninha*, Viçosa, vol. 29, n. 3, p. 635-645, 2011.
- Pabon, C. L.; Cuca, L. E. Aporphine alkaloids from *Ocotea macrophylla* (Lauraceae). *Química Nova*, v. 33, n. 4, p.875-879, 2010.
- Parvez, S.; Parvez, M.; Fujii, Y.; Gemma, H. Differential allelopathic expression of bark and seed of *Tamarindus indica* L. *Plant Growth Regulation*. v. 42, 245-252, 2004.
- Pereira, V. C.; Rodrigues-Filho, E.; Canedo, E. M.; Santos, A. C. A.; Grisi, P. U.; Imatomi, M.; Gualtieri, S. C. J. Phytotoxic potential of *Serjania lethalis* A. St.-Hil. *Journal of Allelochemical Interactions*, vol. 2, p 17-24, 2015.
- Phillipson, G. W.; Anderson, A. C.; J. *Ethnopharmacol*, 25, p. 61-65, 1998.
- Pires, N. M.; Oliveira, V. R. Alelopatia. In: Oliveira JR, R. S.; Constantin, J.; Inoue, M. H. *Biologia e Manejo de Plantas Daninhas*. Curitiba PR: Omnipax, p. 95 – 123. 2011.
- Quinet, A.; Baitello, J.B.; Moraes, P. L. R.; Assis, L.; Alves, F. M. Lauraceae. In: *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB8440> (acesso em 10-Jan-2019).
- Ramakrishna, A.; Ravishankar, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*, v.6, p. 1720-1731, 2011.
- Ramalho, V. C.; Jorge, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Revista Química Nova*, vol. 29, nº4, p. 755-760, 2006.
- Rezende, F. M.; Rosado, D.; Moreira, F. A.; Carvalho, W. R. S. Vias de síntese de metabólitos secundários em plantas. *VI Botânica no Inverno*. 1ed.São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, vol. 1, p. 93-105, 2016.
- Rice, E. L. *Allelopathy*. 2nd ed., New York, Academic Press, 1984.
- Rohwer, J. G. Lauraceae. In: Kubitzki, K.; Rohwer, J. G.; Bittrich, V. (Ed.). *The families and genera of vascular plants: volume 2*. Amsterdam: Springer, p. 366-391. 1993.
- Silveira, L. M. S; Moraes, D. C.; Olea, R. S. G.; Cruz, A. L. N.; Mendes, J. C.; Moraes, L. S. Atividade antibacteriana de duas espécies vegetais do gênero *Ocotea*. *Revista Florence*. n.1, 2011.

- Souza Filho, A. P. S.; Alves, S. M. Alelopatia - princípios básicos e aspectos gerais. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 260 p, 2002.
- Souza, H. B. Z.; Affonso, P. *Ocotea Aubl.* (Lauraceae) no Núcleo Curucutu, Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo, SP, Brasil. *Hoehnea*, v. 44, n. 1, p. 111-122, 2017.
- Taiz, L.; Zeiger, E.; Moller, I.; & Murphy, A. Fisiologia e desenvolvimento vegetal. (6.ed.). Porto Alegre: Artmed. 888 p, 2017.
- Trezzi, M. M., Xavier, E., Vidal, R. A., Portes, E. D. S., Vottri, M., & Lamego, F. P. Teste rápido de imersão foliar de *Euphorbia heterophylla* para confirmação de resistência a herbicidas inibidores da Protox e da ALS. *Planta Daninha*, 29:901-12, 2011.
- Verdeguer, M.; García-Rellán, D.; Boira, H.; Pérez, E.; Gandolfo, S.; Blázquez, M. A. Herbicidal Activity of *Peumus boldus* and *Drimys winterii* Essential Oils from Chile. *Molecules*, v. 16, p. 403-411, 2011.
- Vidal, R. A.; Raineiro, H. P.; Kalsing, A.; Trezzi, M. M. Prospección de las combinaciones de herbicidas para prevenir malezas tolerantes y resistentes al glifosato. *Planta Daninha*, Viçosa, v.28, n.1, p.159-165, 2010.
- Viegas Júnior, C. Terpenes with insecticidal activity: an alternative to chemical control of insects. *Química Nova*, v. 26, n. 3, p. 390-400, 2003.
- Vizzotto, M.; Krolow, A. C.; Weber, G. E. B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 16 p, 2010.
- Werff, H. V. D. & Richter, H. G. Toward and improved classification of Lauraceae. In: *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v. 8, p. 419 – 432, 1996.
- Wu, A.; Yu, H.; Gao, S.; Huang, C.; He, W.; Miao, S.; Dong, M. Differential belowground allelopathic effects of leaf and root of *Mikania micrantha*. *Trees*, Heidelberg. v. 23, p.11-17, 2009.
- Xavier, E., Trezzi, M. M., Oliveira, M. C., Vidal, R. A., & Brusamarelo, A. P. Activity of Antioxidant Enzymes in *Euphorbia heterophylla* Biotypes and their Relation to Cross Resistance to ALS and Protox Inhibitors. *Planta Daninha*, v. 36, p. 1-14, 2018.

Yamaguchi, K. K. L. Estudos biológicos dos extratos e composição química dos óleos essenciais de espécies da família Lauraceae. 2011. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal Do Amazonas, Manaus, 2011.

Yang, X.; Downes, M.; Ruth, T.Y.; Bookout, A.L.; He, W.; Straume, M.; Evans, R. M. Nuclear receptor expression links the circadian clock to metabolism. *Cell*, v.126, n.4, p.801-810, 2006.

Zanin, S. M. W.; Lordello, A. L. L.; Alcalóides aporfínóides do gênero *Ocotea* (Lauraceae). *Química Nova*, Vol. 30, No. 01, Pp. 92-98, 2007.

Zwenger, S.; Basu, C. Plant terpenoids: applications and future potentials. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*. v. 3, p. 1-7, 2008.

## CAPITULO 1

**Avaliação do potencial fitotóxico de frações de folhas, cascas de caule e raízes de *Ocotea pulchella* Nees et Mart**

## RESUMO

Alelopatia pode ser definida como qualquer processo envolvendo metabólitos secundários produzidos pelas plantas e microrganismos, que influenciam o crescimento e desenvolvimento de sistemas naturais e cultiváveis. Essas substâncias podem ser utilizadas na elaboração de produtos de uso agrícola, como alternativa para o uso de agroquímicos. O presente estudo teve como objetivo testar o potencial fitotóxico de frações de folhas, casca de caule e raiz da espécie *Ocotea pulchella*, sobre o crescimento de coleótilos de *Triticum aestivum* e na germinação e crescimento inicial das espécies invasoras *Euphorbia heterophylla* e *Megathyrsus maximus*. Todas as 18 frações inibiram significativamente o crescimento de coleótilos de *T. aestivum* na maior concentração (0,8 mg. mL<sup>-1</sup>) e oito destes o fizeram também nas outras duas concentrações (0,4 mg. mL<sup>-1</sup> e 0,2 mg. mL<sup>-1</sup>). Nas invasoras, os parâmetros porcentagem de germinação, tempo médio de germinação e velocidade média de germinação não foram afetados pela ação das frações. Nos bioensaios de crescimento inicial, *M. maximus* foi a espécie que apresentou uma resposta mais variada, sendo observada inibição e em alguns casos estímulo nas raízes; já na parte aérea, 14 frações inibiram significativamente o crescimento pelo menos na maior concentração testada. Para *E. heterophylla*, as plântulas apresentaram uma resposta mais uniforme, 16 frações inibiram o crescimento das raízes e 18 inibiram significativamente a parte aérea, em pelo menos a maior concentração testada. Pelos resultados obtidos é possível concluir que *O. pulchella* apresenta potencial fitotóxico, principalmente nas frações foliares de acetato de etila, esse efeito foi mais evidente na invasora *E. heterophylla*.

Palavras chave: aleloquímicos, espécies invasoras, fitotoxicidade, *Ocotea pulchella*.

## ABSTRACT

Allelopathy can be defined as any process involving secondary metabolites, produced by plants and microorganisms, which influence the growth and development of natural cultivable systems. These substances can be used in the preparation of products for agricultural use, as an alternative to the use of agrochemicals. The present study aimed to test the phytotoxic potential of leaf, stem bark and root extracts of the species *Ocotea pulchella*, on the growth of wheat coleoptiles and on the germination and initial growth of *Euphorbia heterophylla* e *Megathyrsus maximus* species. All 18 extracts significantly inhibited the growth of wheat coleoptiles at the highest concentration ( $0.8 \text{ mg. mL}^{-1}$ ) and eight of these did so at the other two concentrations ( $0.4 \text{ mg. mL}^{-1}$  and  $0.2 \text{ mg. mL}^{-1}$ ). In the invasive species, the parameters germination percentage, average germination time and average germination speed were not affected by the action of the extracts. In the initial growth bioassays, the *M. maximus* was the species that presented a more varied response, with inhibition and in some cases stimulating the roots being observed; in the shoot, 14 extracts significantly inhibited growth at least at the highest concentration tested. For *E. heterophylla*, the seedlings showed a more uniform response, 16 extracts inhibited the growth of the roots and 18 significantly inhibited the shoot, in at least the highest concentration tested. From the results obtained, it is possible to conclude that *O. pulchella* has phytotoxic potential, especially in leaf extracts of ethyl acetate, this effect was more evident in the invasive peanut.

Keywords: allelochemicals, invasive species, phytotoxicity, *Ocotea pulchella*.

## 1. INTRODUÇÃO

Uma grande preocupação da agricultura atual são os prejuízos causados por plantas invasoras em lavouras, estas plantas se destacam pela elevada capacidade de competição por recursos naturais como água, luz, nutrientes e espaço físico, com as culturas de interesse econômico (Ferreira et al., 2011; Vasconcelos et al., 2012). As plantas invasoras se beneficiam no processo de competição por apresentam características como alta rusticidade e incidência, resistência a pragas e doenças, habilidade de produzir um grande número de sementes, facilidade de dispersão das sementes, rápida passagem da fase vegetativa para a reprodutiva e sobretudo, pela elevada dificuldade de controle, mesmo com o uso de herbicidas. Estas características proporcionam vantagens as plantas invasoras o que resulta em perdas de produtividade e prejuízos ao agricultor (Vasconcelos et al., 2012; Pacheco et al., 2016).

A necessidade de descobrir novos compostos com potencial herbicida aumenta à medida que os casos de resistência a herbicidas surgem. A resistência das plantas invasoras de culturas agrícolas aos herbicidas é um problema de grande importância na agricultura atual (Agostinetto & Vargas, 2014). Isto, devido às más práticas agrícolas como o uso inadequado de herbicidas com o mesmo mecanismo de ação na mesma área, que pode levar a seleção de biótipos de uma população com capacidade de sobreviver a herbicidas que os controlariam em condições normais de aplicação (Christoffoleti et al., 2016). O Brasil é o quinto país com maior número de casos de espécies resistentes a herbicidas, com 50 casos em 28 espécies de plantas invasoras (Heap, 2020).

Dentre as plantas invasoras de culturas agrícolas no Brasil, temos o amendoim-bravo ou leiteiro (*Euphorbia heterophylla*) é uma planta daninha pertencente à família Euphorbiaceae. Esta é uma planta invasora de difícil controle que apresenta desenvolvimento inicial rápido e uma grande variabilidade genética (Trezzi et al., 2014), se caracteriza por ter uma alta capacidade de competição por recursos como água, luz, nutrientes, CO<sub>2</sub> e oxigênio (Oliveira Jr. et al., 2011), ocasionando perdas na qualidade e produtividade de sistemas agrícolas, como a soja (Carvalho et al., 2010, Lopes Ovejero et al., 2013), milho (Cury et al., 2012), cana-de-açúcar (Marques et al., 2012) algodão (Beltrão, 2004), feijão (Cury et al., 2011; Machado et al., 2015).

Além disso, devido as características de mutação que apresenta a enzima acetolactato sintase (ALS) esta espécie apresenta resistência múltipla aos herbicidas inibidores da enzima protoporfirinogênio oxidase – Protox, acetolactato sintase - ALS (Trezzi et al., 2011; Xavier et al., 2018) e recentemente foi relatada como resistente ao herbicida glifosato (inibidor da enzima

5-enolpiruvato- chiquimato-3-fosfato sintase - EPSPS) (Adegas et al., 2020), dificultando assim o controle desta espécie nas lavouras agrícolas.

O capim-colonião (*Megathyrsus maximus*), é uma gramínea que interfere em cultivos agrícolas, se destaca por ser uma planta vigorosa e com uma grande capacidade de ocupar ambientes rapidamente, devido a sua agressividade e pela intensa capacidade na produção e longevidade de sementes (Costa et al., 2002), sendo considerada como uma planta daninha altamente competitiva (Lorenzi, 2008). A presença desta espécie é comum em lavouras de cana-planta sendo considerada como infestante devido a supressão produzida pela palha (Correia et al., 2012), a sua interferência nas culturas contribui para a redução na produtividade. Kuva et al. (2003) observaram redução de até 40% da produtividade de colmos na cultura de cana-de-açúcar, numa comunidade infestante de plantas invasoras, com espécies como *M. maximus* e *Brachiaria decumbens*.

Uma alternativa ao uso dos herbicidas convencionais no controle das plantas invasoras é a descoberta de novos aleloquímicos. Os herbicidas atuais provocam mudanças nas populações de plantas invasoras além do risco de contaminação ambiental e o aumento de espécies de plantas invasoras resistentes aos herbicidas (Verdeguer et al., 2011), isto torna os estudos alelopáticos uma ferramenta importante para identificar plantas que apresentam compostos bioativos a partir dos quais se podem produzir herbicidas naturais, sendo mais específicos e menos prejudiciais para o ambiente (Bertholdsson 2010; Imatomi et al., 2013). Sendo assim, a busca de compostos com efeito fitotóxico que tenham novos mecanismos de ação, assim como melhorias na aplicação, são fundamentais para controlar de maneira satisfatória espécies de plantas invasoras (Grigolli et al., 2011).

Muitas plantas são amplamente utilizadas pelos metabólitos secundários que desenvolvem, estes apresentam grande importância devido ao seu uso na composição de diversos produtos, incluindo medicamentos, alimentos, cosméticos e produtos fitossanitários como inseticidas, fungicidas, herbicidas etc. (Phillipson & Anderson, 1998; Rezende et al., 2016). Os metabólitos secundários têm funções ecológicas importantes nas plantas como proteção contra herbívoros e patógenos, servem como atraentes para polinizadores (aroma, cor, sabor), tem a função de agentes de competição entre plantas e simbiose entre plantas e microrganismos (Taiz et al., 2017). Estes compostos são distribuídos em três grupos principais: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (Taiz et al., 2017). Esses compostos químicos que possuem atividade fitotóxica são chamados aleloquímicos, substâncias alelopáticas, fitotoxinas ou metabólitos secundários (Bethke et al., 2013) e podem ser usados como herbicidas naturais,

uma vez que atuam inibindo processos como germinação, crescimento de plântulas e atuam também a nível celular (Grisi et al., 2013).

Os aleloquímicos podem estar presentes em diversos órgãos a planta como são as folhas, raízes, caules, flores e frutos (Weir et al., 2004). Dessa forma, as atividades biológicas diferem de acordo com órgão em que são armazenados, mas as folhas e raízes são as principais fontes de metabolitos secundários (Wu et al., 2009). Sendo assim, todos os órgãos vegetais têm o potencial para armazenar aleloquímicos, não obstante, o acúmulo destes metabólitos secundários é feito em estruturas especializadas o que evita que a planta produtora se prejudique pela toxidez destas substâncias (Friedman, 1995).

A presença de aleloquímicos que tem atividade fitotóxica já foi relatada em estudos realizados com algumas espécies vegetais do Cerrado (Grisi et al., 2012; Imatomi et al., 2013; Anese et al., 2015, Pereira et al., 2015, Candido et al., 2016, Grisi et al., 2016; Jatobá et al., 2016) sugerindo que a alelopátia tem uma função importante na ecologia do cerrado. Nesse cenário, o uso de espécies vegetais do Cerrado em estudos que envolvem alelopátia, se mostra como uma necessidade de apresentar novas alternativas ao manejo integrado de pragas agrícolas, mediante o desenvolvimento de agroquímicos naturais (Imatomi et al., 2013).

O Cerrado brasileiro é uma das mais extensas formações vegetais brasileiras, com uma área total de 204,7 milhões de hectares (Sano et al., 2010), tornando-se uma fonte inesgotável de exploração na busca de compostos bioativos. O cerrado apresenta duas estações definidas, a estação de chuva (de outubro a abril) e a estação de seca (de maio a setembro). O solo é ácido, pobre em nutrientes minerais e com uma alta concentração de alumínio (Santos & Novak, 2013). Além disso durante a estação seca que é caracterizada por altas temperaturas, o solo está sujeito a um déficit hídrico nas camadas mais superficiais, motivo pelo qual esta época representa um período de estresse para as plantas (Franco, 2002). Esses fatores fazem com que exista uma grande competição por recursos entre as plantas deste bioma o que pode ser determinante na produção e liberação de aleloquímicos (Imatomi et al., 2013). Diante desse cenário, o uso de espécies do Cerrado em estudos envolvendo atividade fitotóxica se mostra promissora.

Espécies do gênero *Ocotea* são reconhecidas fitoquimicamente pela síntese de uma ampla variedade de substâncias como são monoterpenos, alcaloides isoquinolínicos, lignanas, neolignanas, óleos essenciais (Pabon & Cuca, 2010; Silveira et al., 2011; Yamaguchi, 2011), flavonoides, polipropanóides, esteroides e sesquiterpenos (Zanin & Lordello, 2007). A espécie

*Ocotea pulchella* é conhecida popularmente como canela-amarela, canela-do-brejo, canela-do-cerrado, canelinha (Grandtner & Chevrette, 2013). Nesta espécie, diversas atividades biológicas como herbicida, bactericida, anticancerígena e inseticida já foram identificadas (Yamaguchi, 2011, Araújo, 2012; Candido et al; 2016) mas ainda que existam alguns estudos relatando a importância desta espécie em diversas áreas, estudos sobre o seu potencial fitotóxico em espécies vegetais ainda são insuficientes.

Devido à importância do gênero *Ocotea* e aos escassos estudos feitos com a espécie *O. pulchella* (Nees) Mez, o presente trabalho teve o objetivo de testar o potencial fitotóxico de frações de folhas, cascas de caule e raiz da espécie *O. pulchella*, sobre o crescimento de coleótilos de trigo (*T. aestivum*) e na germinação e crescimento inicial das espécies invasoras de culturas agrícolas *E. heterophylla* e *M. maximus*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Coleta do material vegetal

O material vegetal utilizado foram folhas maduras, casca de caule e raízes de *O. pulchella* (Nees.) Mez. O material vegetal foi coletado de 10 indivíduos diferentes, na área de cerrado sensu stricto pertencente ao campus da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), localizado na cidade de São Carlos, SP (21°58' a 22° 00' S e 47° 51' a 47° 52' W). Os 10 indivíduos foram selecionados com uma distância mínima de 25 metros entre eles. As folhas da época chuvosa foram coletadas no período de março de 2017, o caule e raiz da época chuvosa no período de março de 2018, as folhas da época seca no período de agosto de 2012, e o caule e raiz da época seca no período de setembro de 2014.

Após triagem, o material vegetal foi lavado, posteriormente foi seco em estufa de circulação forçada de ar a 40°C durante 72 h e depois foi triturado em moinho elétrico. O pó resultante foi pesado, etiquetado e embalado a vácuo, foi mantido sob refrigeração e então utilizado na obtenção das frações de folhas, cascas de caule e raiz de *O. pulchella*.

### 2.2 Preparação das frações

Foram utilizados 100g de pó de cada material vegetal coletado (folhas coletadas na época chuvosa e folhas, caule e raízes coletadas na época seca de *O. pulchella*). O pó de cada material vegetal coletado foi submetido à extração com 600 mL da mescla Diclorometano/Metanol (1:1 v/v) em banho de ultrassom por 30 minutos. Depois, essa mistura foi filtrada à vácuo para obter o extrato bruto. Este processo foi repetido um total de 6 vezes e foi utilizado o mesmo pó de cada material vegetal, até que o filtrado exibisse uma coloração mais clara no final da extração.

Posteriormente o extrato bruto foi seco e depois foi diluído em 600 mL da solução MeOH/H<sub>2</sub>O destilada (95:5 v/v) e posteriormente foi particionado em um funil de separação com 600 mL de hexano. Com as mesclas dentro do funil tampado, o mesmo foi agitado em movimentos de rotação, com o objetivo de que os solventes se misturassem o suficiente para garantir uma extração eficiente, em seguida deixou-se repousar o funil de separação uns minutos até que os solventes ficassem separados e posteriormente estes foram colocados em béquer, novamente a mesma solução de MeOH/H<sub>2</sub>O destilada (95:5 v/v) foi colocada ao funil de separação e foi particionada com 600 mL de hexano novamente, este processo foi repetido um total de 3 vezes. Após a separação dos solventes no funil, foram originadas as frações: hexânica (1) e metanólico-aquosa (Figura 1).

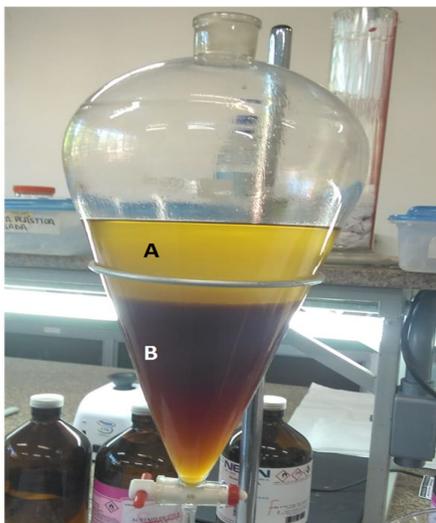


Figura 1. Funil de separação com as frações particionadas. (A) fração hexânica e (B) fração metanólico/aquosa, de folhas da época seca de *O. pulchella* (arquivo pessoal).

Por fim, a fração metanólico-aquosa foi seca em evaporador rotativo, ressuspensa em 600mL água destilada e particionada em funil de separação com 600mL de acetato de etila, (processo repetido um total de três vezes utilizando-se a mesma solução de água destilada) dando origem as frações acetato etílica (2) e aquosa (3) (Figura 2), para cada material coletado (folhas, caule e raiz coletados na época seca e na época chuvosa).

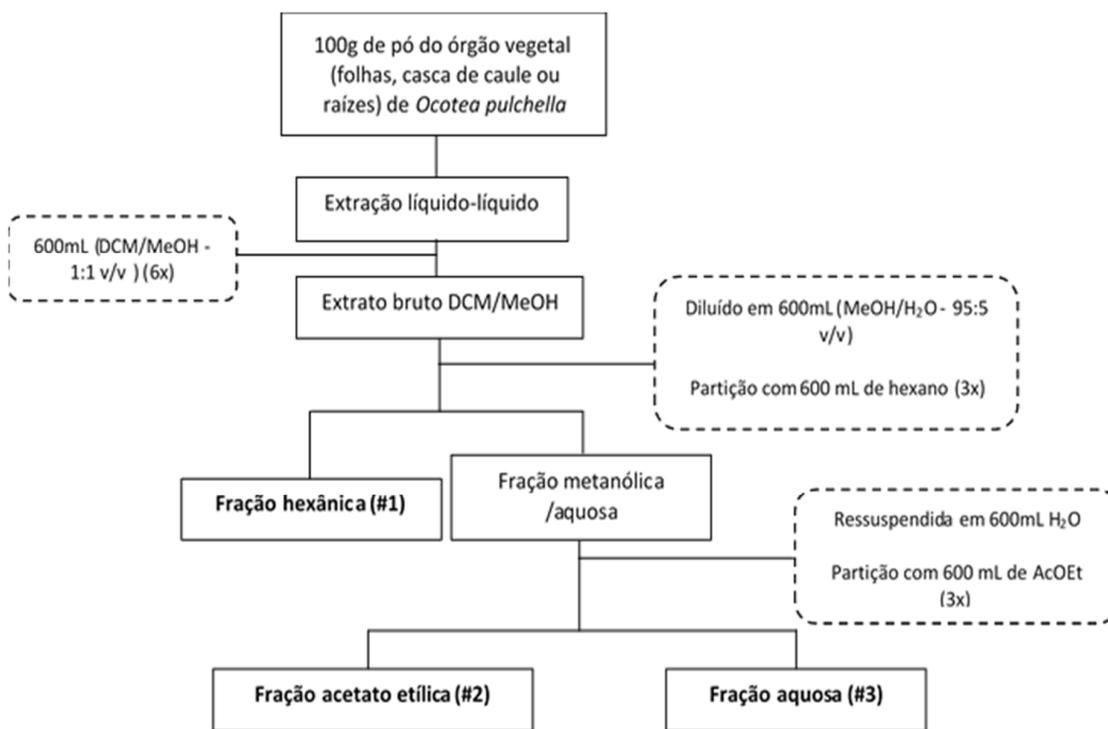


Figura 2. Fluxograma da obtenção das frações de folhas, cascas de caule e de raízes de *O. pulchella*, utilizando-se a extração líquido-líquido.

Obtendo assim 18 frações, cujo nome de identificação foi composto de acordo ao solvente utilizado na partição (Hexano, Acetato de Etila e Água (aquoso), da parte da planta coletada (Folhas, Cascas de caule ou Raízes) e da época de coleta do material (Seca ou Chuvosa). Sendo assim a primeira letra refere-se ao solvente utilizado (H para hexano, AE para acetato de etila e A para água), seguida da parte da planta à qual a fração pertence (F para folhas, C para cascas de caule e R para raízes) e finalmente a época de coleta do material (S para a época seca e C para a época chuvosa).

Dessa maneira as frações foram nomeadas da seguinte forma: 1.- HFS (fração hexânica de folhas da época seca), 2.- HFC (fração hexânica de folhas da época chuvosa), 3.- HCS (fração hexânica de casca de caule da época seca), 4.- HCC (fração hexânica de casca de caule da época chuvosa), 5.- HRS (fração hexânica de raízes da época seca), 6.- HRC (fração hexânica de raízes da época chuvosa), 7.- AFS (fração aquosa de folhas da época seca), 8.- AFC (fração aquosa de folhas da época chuvosa), 9.- ACS (fração aquosa de casca de caule da época seca), 10.- ACC (fração aquosa de casca de caule da época chuvosa), 11.- ARS (fração aquosa de raízes da época seca), 12.- ARC (fração aquosa de raízes da época chuvosa), 13.- AEFS (fração de acetato de etila de folhas da época seca), 14.- AEFC (fração de acetato de etila de folhas da época chuvosa), 15.- AECS (fração de acetato de etila de casca de caule da época seca), 16.- AECC (fração de acetato de etila de casca de caule da época chuvosa), 17.- AERS (fração de acetato de etila de raízes da época seca), 18.- AERC (fração de acetato de etila de raízes da época chuvosa).

### 2.3 Preparação das soluções

As frações foram pré-solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) numa concentração de  $5 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$  e diluídas em solução tampão (pH=5,6) contendo ácido cítrico monohidratado (1,05 g/L), hidrogenofosfato de potássio tri-hidratado (2,9 g/L) e 2% sacarose (Macías et al., 2010). Foram utilizadas as concentrações de 0,8; 0,4 e 0,2 mg.  $\text{mL}^{-1}$  (800, 400 e 200ppm) e foram realizados dois controles: um controle negativo com solução tampão e DMSO ( $5 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) e um controle positivo com o herbicida comercial GOAL<sup>®</sup> (i.a. oxyfluorfen 240 g/L), esse último também nas concentrações de 0,8; 0,4 e 0,2 mg.  $\text{mL}^{-1}$ .

As soluções a  $0,8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  foram preparadas utilizando 10 mg de cada fração diluídas em 60  $\mu\text{L}$  de DMSO e 12 mL de solução tampão. Posteriormente as diluições para  $0,4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  foram feitas adicionando 6 mL de solução tampão e 30  $\mu\text{L}$  de DMSO e finalmente adicionando mais 6 mL da solução tampão e 30  $\mu\text{L}$  de DMSO para a concentração de  $0,2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

## 2.4. Bioensaios

### 2.4.1. Bioensaio de atividade geral (citotoxicidade) com coleóptilos de *T. aestivum*

Este tipo de bioensaios apresentam a vantagem de ser rápidos e são amplamente utilizados por mostrar que são capazes de avaliar sua inibição ou estímulo de crescimento quando estão em contato com substâncias fitotóxicas (Nepomuceno, 2011; Accarini, 2016). No presente estudo, estes bioensaios foram utilizados para avaliar a atividade fitotóxica das frações oriundas da espécie *O. pulchella*.

Para estes bioensaios, sementes de *T. aestivum* L., (cultivar BRS 264) foram pré-geminadas em caixas gerbox (11 x 11 x 3,5 cm) contendo duas folhas de papel filtro, umedecidas com água destilada (12 mL) e introduzidas em câmara tipo B.O.D. durante 72 horas no escuro a temperatura de  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ . Após as 72 horas no escuro, os coleóptilos foram retirados da câmara B.O.D., colocados em uma guilhotina de Van der Weij e a parte apical destes (2 mm) foi cortada e descartada (Hancock et al., 1964), então os coleóptilos foram cortados em segmentos de 4 mm e posteriormente usados nos bioensaios (Macías et al., 2010).

A montagem dos bioensaios foram realizadas em quarto fechado sob luz verde (Nitsch & Nitsch, 1956). Foram utilizadas três repetições para cada tratamento e cada repetição continha cinco fragmentos de coleóptilos de *T. aestivum* e 2 mL de cada solução dos tratamentos utilizados (0,8; 0,4; 0,2  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  e controle negativo) colocados em tubos de ensaio que foram tampados e mantidos em câmara de B.O.D. a  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , no escuro, sob rotação constante de 1.4 rpm durante 24 h e após esse período os coleóptilos foram removidos, colocados numa planilha (Figura 3), fotografados e seus comprimentos foram medidos utilizando o software ImageJ® 1.8.0 (adaptado de Macías et al., 2010).

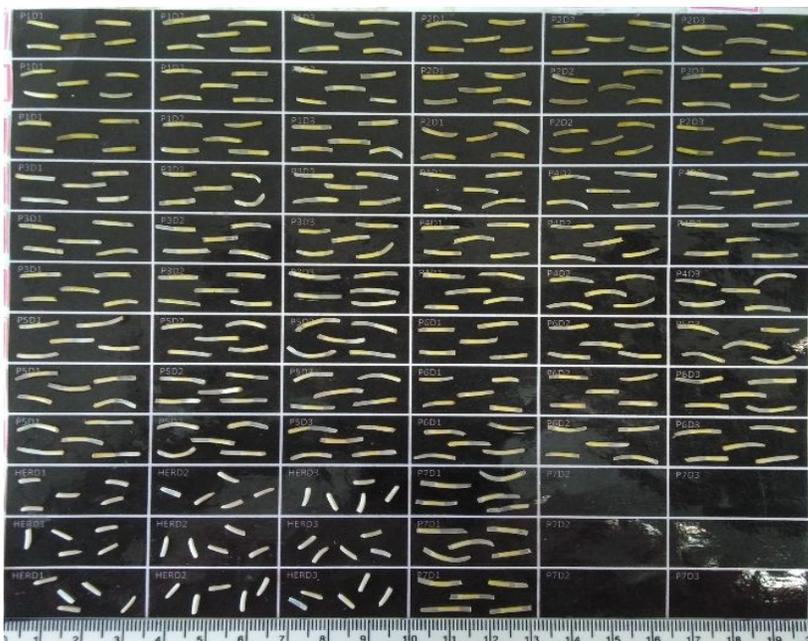


Figura 3. Coleóptilos de *T. aestivum* que foram submetidos aos tratamentos com as frações de *O. pulchella*, controle negativo e controle positivo, arquivo pessoal.

## 2.4.2. Bioensaios de fitotoxicidade

### 2.4.2.1. Bioensaios de germinação de sementes

Foram utilizadas as 18 frações de *O. pulchella* para avaliar seu efeito fitotóxico sobre a germinação das espécies infestantes *M. maximus* e *E. heterophylla*. As sementes foram colocadas em caixas plásticas transparentes (10,5 x 6 x 4,5 cm) contendo duas folhas de papel filtro, posteriormente umedecidas com 6 mL das frações nas concentrações (0,8; 0,4 e 0,2 mg. mL<sup>-1</sup>). Foram realizados dois controles, um com solução tampão e DMSO (controle negativo) e um controle positivo com o herbicida comercial GOAL<sup>®</sup> (i.a. oxyfluorfen 240 g/L), este último, nas mesmas concentrações (0,8; 0,4 e 0,2 mg. mL<sup>-1</sup>). Cada tratamento continha quatro repetições e em cada repetição foram colocadas dez sementes das espécies-alvo, as caixas foram tampadas e mantidas em câmara de germinação a 27 ± 1°C, sob fotoperíodo de 12 h/12 h luz/escuro (Inoue et al., 2010).

Foram realizadas leituras a cada 24h, até a germinação ser nula por dois dias consecutivos. Como critério de germinação foi adotado a protrusão de no mínimo 2mm de raiz primária e gravitropismo positivo (Brasil, 2009). Os parâmetros avaliados foram a porcentagem de germinação (%), o tempo médio para germinação (TMG) e a velocidade média de germinação (VMG) das sementes (Ranal & Santana, 2006).

#### 2.4.2.2. Bioensaios de crescimento inicial de plântulas

As sementes das espécies alvo foram colocadas para germinar em caixas gerbox (11 x 11 x 3,5 cm) com duas folhas de papel filtro, umedecidas com água destilada (12 mL) e colocadas em câmara tipo B.O.D. a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , sob fotoperíodo de 12 /12 h luz/escuro. As plântulas, logo após atingir um comprimento de 2 mm da raiz, foram transferidas para caixas de plástico transparente (10,5 x 6 x 4,5 cm). Cada caixa continha duas folhas de papel filtro umedecidas com 6 mL da solução de cada fração nas concentrações (0,8; 0,4 e 0,2 mg. mL<sup>-1</sup>).

Foram realizados dois controles, um com solução tampão e DMSO (controle negativo) e um controle positivo com o herbicida comercial GOAL<sup>®</sup>, este último, nas mesmas concentrações (0,8; 0,4 e 0,2 mg. mL<sup>-1</sup>). Cada tratamento continha quatro repetições e em cada repetição foram colocadas dez plântulas das espécies alvo, posteriormente as caixas foram tampadas e mantidas em câmara de germinação a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , sob fotoperíodo de 12 h/12 h luz/escuro (Inoue et al., 2010) até cada uma cumprir 8 dias, posteriormente estas foram retiradas da câmara de germinação e foi medido o comprimento da parte aérea e o comprimento da raiz principal com a ajuda do software ImageJ<sup>®</sup> 1.8.0.

Cabe mencionar que os bioensaios de coleótilos de *T. aestivum*, os bioensaios de germinação e os bioensaios de crescimento inicial de plântulas infestantes (*E. heterophylla* e *M. maximus*) foram feitos em três etapas devido ao número de frações (18), primeiro foram feitos os bioensaios com seis frações (HFS, HFC, HCS, HRS, AFS e AFC), posteriormente foram feitas outras seis frações (ACS, ARS, AEFS, AEFC, AECS e AERS) e finalmente realizados os mesmos bioensaios com as últimas seis frações (HCC, HRC, ACC, ARC, AECC e AERC).

#### 2.5. Análises estatísticas

Considerando os parâmetros avaliados, os dados obtidos em cada bioensaio foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade dos dados com ajuda do software Past<sup>®</sup> v.2.17c (Hammer et al., 2001). Os dados normais foram submetidos a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste tukey a 5% de significância com auxílio do software Sisvar<sup>®</sup> v.5.7 (Ferreira, 2011).

### 3. RESULTADOS

Os rendimentos obtidos das frações de folhas, casca de caule e raízes de *O. pulchella* estão expressos na tabela 1. Os maiores rendimentos foram alcançados com a fração aquosa de folhas coletadas na época seca e na época chuvosa sendo 13,20g e 12,38g respectivamente.

Tabela 1. Rendimentos das frações obtidas utilizando 100g de pó de folhas, casca de caule e raízes de *O. pulchella* coletados na época seca e chuvosa, pelo método de extração líquido-líquido (Otsuka, 2005).

Frações	Rendimento (g)					
	Época seca			Época chuvosa		
	Folha	Casca de caule	Raiz	Folha	Casca de caule	Raiz
Hexano	4,00	0,38	1,21	3,58	0,43	2,18
Acetato de etila	3,70	1,29	1,30	4,47	1,07	1,65
Aquoso	13,20	5,40	4,09	12,38	6,01	4,65

Os resultados obtidos no bioensaio de crescimento de coleóptilos de *T. aestivum*, mostraram que todos as 18 frações inibiram significativamente o crescimento destes na maior concentração (0,8 mg. mL<sup>-1</sup>) e oito dessas frações (ACS, AEFS, AEFC, HFC, AECS, AECC, HFS e ARS) o fizeram também nas outras duas concentrações testadas (0,4 mg. mL<sup>-1</sup> e 0,2 mg. mL<sup>-1</sup>) em relação ao controle negativo. O herbicida exerceu os maiores valores de inibição em todas as concentrações testada (Figura 4).

Dentre as 18 frações, AEFC e AECC de *O. pulchella* foram as que produziram a maior porcentagem inibição no crescimento dos coleóptilos de *T. aestivum* com 47% na maior concentração testada (Figura 4). O grupo de frações de acetato de etila (AEFS, AEFC, AECS, AERS, AECC e AERC) foram os que ocasionaram os maiores valores de porcentagem de inibição, sendo que destes, as frações AERS e AERC não ocasionaram inibição significativa apenas na menor concentração testada (Figura 4).

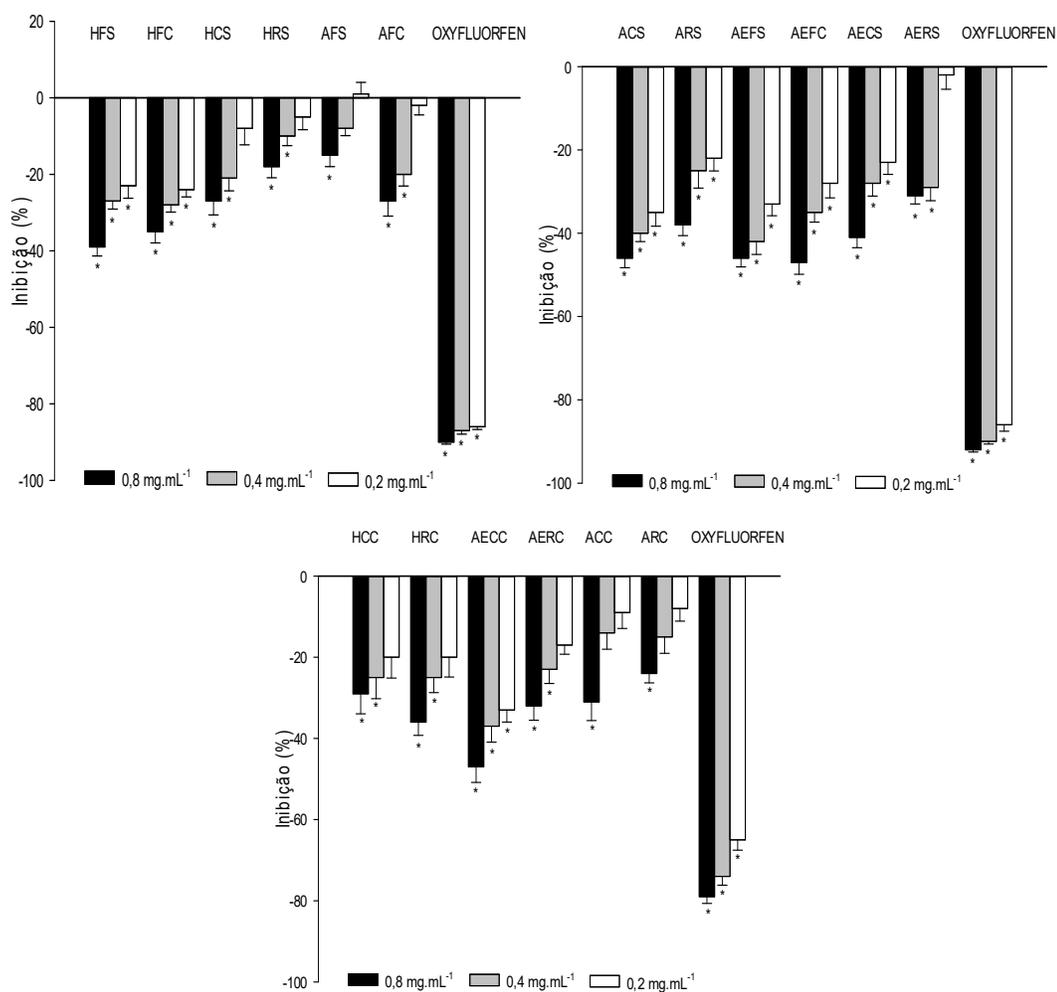


Figura 4. Efeito das frações obtidas a partir de folhas, casca de caule e raízes de *O. pulchella* e do herbicida GOAL<sup>®</sup> sobre o crescimento de coleótilos de *T. aestivum*. Os valores são expressos em porcentagem de inibição com relação ao controle negativo. (\*) Médias diferem significativamente do controle negativo pelo teste de tukey, a 0,05 de significância. HFS (fração hexânica de folhas época seca), HFC (fração hexânica de folhas época chuvosa), HCS (fração hexânica de casca de caule época seca), HRS (fração hexânica de raízes época seca), AFS (fração aquosa de folhas época seca), AFC (fração aquosa de folhas época chuvosa), ACS (fração aquosa de casca de caule época seca), ARS (fração aquosa de raízes época seca), AEFS (fração acetato etílica de folhas época seca), AEFC (fração acetato etílica de folhas época chuvosa), AECS (fração acetato etílica de casca de caule época seca), AERS (fração acetato etílica de raízes época seca), HCC (fração hexânica de casca de caule época chuvosa), HRC (fração hexânica de raízes época chuvosa), AECC (fração acetato etílica de casca de caule época chuvosa), AERC (fração acetato etílica de raízes época chuvosa), ACC (fração aquosa de casca de caule época chuvosa), ARC (fração aquosa de raízes época chuvosa).

Foi feita uma análise conjunta para relacionar a atividade de inibição do crescimento de coleótilos em função do órgão vegetal e do tipo de extrato. O efeito no crescimento dos coleótilos de *T. aestivum* não diferiu significativamente entre os diferentes órgãos vegetais de *O. pulchella*. Entretanto, foi verificada diferença estatística no comprimento dos coleótilos

entre as frações dos órgãos vegetais e o controle negativo (Figura 5). Da mesma forma, não foi encontrada diferença estatística entre os diferentes tipos de frações utilizadas, mas quando comparados ao controle negativo, os três diferentes tipos de Frações mostraram diferença estatística significativa do controle negativo (Figura 5).

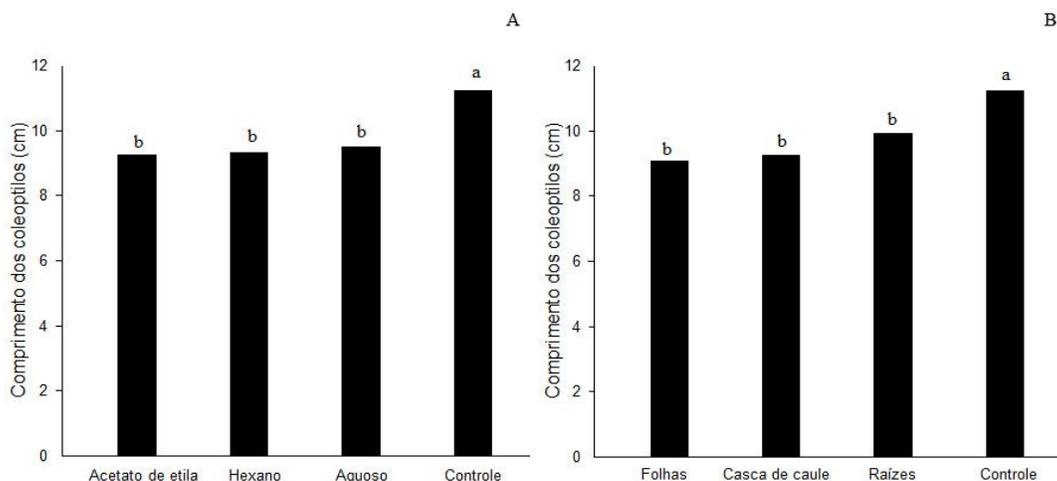


Figura 5. Análise do comprimento de coleóptilos estiolados de *T. aestivum*, sob a ação das frações de *O. pulchella*. Relação de atividade entre as diferentes frações (A) e entre os diferentes órgãos vegetais (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Os resultados obtidos nos bioensaios de germinação com a espécie *M. maximus* mostraram que, apenas duas frações exerceram diferença significativa em dois parâmetros avaliados: as frações AECS e AECC diferiram significativamente sobre o tempo médio de germinação TMG (d) e sobre a velocidade média de germinação VMG (d) (Tabela 5). As demais frações não mostraram diferença significativa nos parâmetros avaliados (G %, TMG e VMG) em relação ao controle negativo (Tabelas 2, 3 e 4).

Já para a espécie *E. heterophylla*, todas as 18 frações de *O. pulchella* não apresentaram efeito inibitório sobre a porcentagem de germinação G (%), tempo médio de germinação TMG (d) e velocidade de germinação VMG (d), não diferindo significativamente ( $p > 0,05$ ) do controle negativo (Tabelas 5, 6 e 7).

Tabela 2. Germinação de sementes de *M. maximus* submetidas a diferentes tratamentos (200, 400 e 800ppm) de frações oriundas de *O. pulchella*.  
(continua)

Variáveis	Concentrações (ppm)				Estatística F(p)
	0	200	400	800	
<b>HFS</b>					
G (%)	75 ± 6,45 a	87,50 ± 4,78 a	80 ± 4,08 a	85 ± 6,45 a	1,000 (0,4262)
TMG (d)	2,93 ± 0,16 a	2,76 ± 0,15 a	2,69 ± 0,18 a	3 ± 0,21 a	0,613 (0,6193)
VMG (d)	0,34 ± 0,02 a	0,36 ± 0,02 a	0,37 ± 0,02 a	0,33 ± 0,02 a	0,620 (0,6151)
<b>HFC</b>					
G (%)	75 ± 6,45 a	77,50 ± 4,78 a	82,50 ± 6,29 a	75 ± 6,45 a	0,343 (0,7949)
TMG (d)	2,93 ± 0,16 a	2,89 ± 0,22 a	2,99 ± 0,07 a	2,77 ± 0,07 a	0,372 (0,7745)
VMG (d)	0,34 ± 0,02 a	0,35 ± 0,02 a	0,33 ± 0,01 a	0,36 ± 0,01 a	0,347 (0,7922)
<b>HCS</b>					
G (%)	75 ± 6,45 a	90 ± 4,08 a	92,50 ± 4,78 a	72,50 ± 4,78 a	4,000 (0,3046)
TMG (d)	2,93 ± 0,16 a	3,10 ± 0,07 a	3,25 ± 0,25 a	3,26 ± 0,04 a	1,010 (0,422)
VMG (d)	0,34 ± 0,02 a	0,32 ± 0,01 a	0,31 ± 0,02 a	0,30 ± 0,00 a	0,920 (0,4604)
<b>HRS</b>					
G (%)	75 ± 6,45 a	82,50 ± 6,29 a	75 ± 6,45 a	85 ± 6,45 a	0,646 (0,6005)
TMG (d)	2,93 ± 0,16 a	2,79 ± 0,08 a	3,12 ± 0,08 a	2,90 ± 0,10 a	1,322 (0,3129)
VMG (d)	0,34 ± 0,02 a	0,35 ± 0,01 a	0,32 ± 0,01 a	0,34 ± 0,01 a	1,188 (0,3556)
<b>AFS</b>					
G (%)	75 ± 6,45 a	67,50 ± 6,29 a	65 ± 6,45 a	82,50 ± 8,53 a	1,277 (0,3267)
TMG (d)	2,93 ± 0,16 a	2,65 ± 0,12 a	3,08 ± 0,09 a	3,13 ± 0,22 a	1,815 (0,1981)
VMG (d)	0,34 ± 0,02 a	0,37 ± 0,01 a	0,32 ± 0,01 a	0,32 ± 0,02 a	1,753 (0,2094)
<b>AFC</b>					
G (%)	75 ± 6,45 a	65 ± 6,45 a	75 ± 6,45 a	75 ± 6,45 a	0,600 (0,6272)
TMG (d)	2,93 ± 0,16 a	2,95 ± 0,15 a	2,78 ± 0,07 a	3,02 ± 0,24 a	0,355 (0,7867)
VMG (d)	0,34 ± 0,02 a	0,34 ± 0,01 a	0,36 ± 0,01 a	0,33 ± 0,02 a	0,308 (0,8194)

Medias seguidas por letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste tukey a 5% de probabilidade. G: porcentagem de germinação, TMG: tempo médio de germinação, VMG: velocidade média de germinação, HFS (fração hexânica de folhas época seca), HFC (fração hexânica de folhas época chuvosa), HCS (fração hexânica de casca de caule época seca), HRS (fração hexânica de raízes época seca), AFS (fração aquosa de folhas época seca), AFC (fração aquosa de folhas época chuvosa), F: estatística do teste F.

Tabela 3. Germinação de sementes de *M. maximus* submetidas a diferentes tratamentos (200, 400 e 800ppm) de frações oriundas de *O. pulchella*.  
(continuação)

Variáveis	Concentrações (ppm)				Estatística F(p)
	0	200	400	800	
<b>ACS</b>					
G (%)	75 ± 6,45 a	82,50 ± 4,78 a	80 ± 4,08 a	87,50 ± 4,78 a	1.040 (0.4100)
TMG (d)	2,73 ± 0,04 a	3,13 ± 0,16 a	2,87 ± 0,05 a	2,90 ± 0,13 a	2,204 (0,1404)
VMG (d)	0,36 ± 0,01 a	0,32 ± 0,01 a	0,34 ± 0,01 a	0,34 ± 0,01 a	1,865 (0,1893)
<b>ARS</b>					
G (%)	75 ± 6,45 a	87,50 ± 6,29 a	72,50 ± 4,78 a	80 ± 7,07 a	1,135 (0,3741)
TMG (d)	2,73 ± 0,04 a	3 ± 0,20 a	3,05 ± 0,17 a	2,88 ± 0,16 a	0,797 (0,5188)
VMG (d)	0,36 ± 0,01 a	0,33 ± 0,02 a	0,33 ± 0,02 a	0,35 ± 0,01 a	0,819 (0,5081)
<b>AEFS</b>					
G (%)	75 ± 6,45 a	62,50 ± 6,29 a	80 ± 4,08 a	80 ± 4,08 a	2,382 (0,1206)
TMG (d)	2,73 ± 0,04 a	3,19 ± 0,14 a	2,84 ± 0,22 a	3,26 ± 0,24 a	1,991 (0,1691)
VMG (d)	0,36 ± 0,01 a	0,31 ± 0,01 a	0,35 ± 0,02 a	0,31 ± 0,02 a	2,812 (0,0845)
<b>AEFC</b>					
G (%)	75 ± 6,45 a	75 ± 6,45 a	87,50 ± 4,78 a	77,50 ± 4,78 a	1,097 (0,3882)
TMG (d)	2,73 ± 0,04 a	2,94 ± 0,09 a	3,07 ± 0,17 a	2,88 ± 0,27 a	0,671 (0,5860)
VMG (d)	0,36 ± 0,01 a	0,34 ± 0,01 a	0,33 ± 0,01 a	0,35 ± 0,03 a	0,731 (0,5533)
<b>AECS</b>					
G (%)	75 ± 6,45 ab	65 ± 6,45 a	67,50 ± 7,50 ab	92,50 ± 4,78 b	3,795 (0,0400)
TMG (d)	2,73 ± 0,04 a	2,83 ± 0,13 ab	3,25 ± 0,24 ab	3,47 ± 0,16 b	<b>4,544 (0,0238)</b>
VMG (d)	0,36 ± 0,01 a	0,35 ± 0,01 ab	0,31 ± 0,02 ab	0,29 ± 0,01 b	<b>5,384 (0,0140)</b>
<b>AERS</b>					
G (%)	75 ± 6,45 a	77,50 ± 4,78 a	77,50 ± 7,50 ab	60 ± 7,07 a	1,659 (0,2284)
TMG (d)	2,73 ± 0,04 a	3,41 ± 0,27 a	2,97 ± 0,13 a	2,96 ± 0,22 a	2,164 (0,1454)
VMG (d)	0,36 ± 0,01 a	0,29 ± 0,02 a	0,33 ± 0,01 a	0,34 ± 0,02 a	2,038 (0,1623)

Medias seguidas por letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste tukey a 5% de probabilidade. G: porcentagem de germinação, TMG: tempo médio de germinação, VMG: velocidade média de germinação, ACS (fração aquosa de casca de caule época seca), ARS (fração aquosa de raízes época seca), AEFS (fração acetato etílica de folhas época seca), AEFC (fração acetato etílica de folhas época chuvosa), AECS (fração acetato etílica de casca de caule época seca), AERS (fração acetato etílica de raízes época seca), F: estatística do teste F, os valores em negrito mostram diferença significativa entre as concentrações (p<0,05).

Tabela 4. Germinação de sementes de *M. maximus* submetidas a diferentes tratamentos (200, 400 e 800ppm) de frações oriundas de *O. pulchella*.  
(continuação)

Variáveis	Concentrações (ppm)				Estatística F(p)
	0	200	400	800	
<b>HCC</b>					
G (%)	77,5±6,29a	80±4,08a	77,5±4,78a	82,5±4,78a	0.224 0.8776
TMG (d)	2,66±0,05a	3,02±0,15ab	2,89±0,03ab	3,04±0,12ab	4.499 0.6246
VMG (d)	0,37±0,01b	0,36±0,01ab	0,35±0,004ab	0,33±0,01ab	5.139 0.5163
<b>HRC</b>					
G (%)	77,5±6,29a	82,5±4,79a	72,5±4,79a	80±4,08 <sup>a</sup>	0.714 0.5621
TMG (d)	2,66±0,05a	2,99±0,20a	3,02±0,21a	2,95±0,16a	0.944 0.4502
VMG (d)	0,37±0,01a	0,34±0,02a	0,34±0,03a	0,34±0,02a	0.879 0.4793
<b>ACC</b>					
G (%)	77,5±6,29a	77,5±4,79a	72,5±4,79a	80±4,08 <sup>a</sup>	0.388 0.7639
TMG (d)	2,66±0,05a	2,93±0,19ab	3,19±0,24ab	3,18±0,13ab	4.170 0.5307
VMG (d)	0,37±0,01b	0,34±0,02ab	0,32±0,02ab	0,33±0,01ab	4.944 0.6184
<b>ARC</b>					
G (%)	77,5±6,29a	80±4,08a	77,5±4,79a	72,5±4,79a	0.388 0.7639
TMG (d)	2,66±0,05a	3,16±0,25ab	3,03±0,12ab	3,22±0,11ab	3.889 0.5374
VMG (d)	0,37±0,01b	0,30±0,02ab	0,33±0,01ab	0,34±0,01ab	4.594 0.6231
<b>AECC</b>					
G (%)	77,5±6,29a	72,5±4,79a	80±4,08a	77,5±4,79a	0.388 0.7639
TMG (d)	2,66±0,05a	3,03±0,08ab	2,87±0,19ab	3,33±0,21b	<b>3.519 0.0489</b>
VMG (d)	0,37±0,01b	0,33±0,01ab	0,35±0,02ab	0,30±0,02a	<b>3.933 0.0363</b>
<b>AERC</b>					
G (%)	77,5±6,29a	80±4,08a	82,5±4,79a	80±4,08 <sup>a</sup>	0.174 0.9120
TMG (d)	2,66±0,05a	2,87±0,05a	2,94±0,19a	2,91±0,26a	0.552 0.6563
VMG (d)	0,37±0,01a	0,35±0,01a	0,34±0,02a	0,35±0,03a	0.565 0.6487

Medias seguidas por letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste tukey a 5% de probabilidade. G: porcentagem de germinação, TMG: tempo médio de germinação, VMG: velocidade média de germinação, HCC (fração hexânica de casca de caule época chuvosa), HRC (fração hexânica de raízes época chuvosa), AECC (fração acetato etílica de casca de caule época chuvosa), AERC (fração acetato etílica de raízes época chuvosa), ACC (fração aquosa de casca de caule época chuvosa), ARC (fração aquosa de raízes época chuvosa), F:estatística do teste F, valores em negrito mostram diferença significativa entre as concentrações ( $p < 0,05$ ).

Tabela 5. Germinação de sementes de *E. heterophylla* submetidas a diferentes tratamentos (200, 400 e 800ppm) de frações oriundas de *O. pulchella*.  
(continua)

Variáveis	Concentrações (ppm)				Estatística F(p)
	0	200	400	800	
<b>HFS</b>					
G (%)	72,50 ± 4,78 a	70 ± 7,07 a	67,50 ± 7,50 a	72,50 ± 4,78 a	0,151 (0,9273)
TMG (d)	1,89 ± 0,22 a	2,15 ± 0,23 a	1,98 ± 0,09 a	2,39 ± 0,34 a	0,929 (0,4568)
VMG (d)	0,53 ± 0,04 a	0,53 ± 0,05 a	0,48 ± 0,02 a	0,44 ± 0,06 a	0,566 (0,6478)
<b>HFC</b>					
G (%)	72,50 ± 4,78 a	72,55 ± 4,78 a	70 ± 4,08 a	70 ± 7,07 a	0,074 (0,9729)
TMG (d)	1,89 ± 0,22 a	1,79 ± 0,07 a	1,70 ± 0,11 a	1,74 ± 0,07 a	0,665 (0,5896)
VMG (d)	0,53 ± 0,04 a	0,56 ± 0,02 a	0,59 ± 0,03 a	0,58 ± 0,02 a	0,671 (0,5858)
<b>HCS</b>					
G (%)	72,50 ± 4,78 a	67,55 ± 6,29 a	82,55 ± 4,78 a	72,50 ± 4,78 a	1,462 (0,2743)
TMG (d)	1,89 ± 0,22 a	1,83 ± 0,01 a	1,78 ± 0,07 a	2,08 ± 0,38 a	0,352 (0,7887)
VMG (d)	0,53 ± 0,04 a	0,55 ± 0,04 a	0,56 ± 0,02 a	0,53 ± 0,08 a	0,102 (0,9575)
<b>HRS</b>					
G (%)	72,50 ± 4,78 a	60 ± 4,08 a	77,50 ± 4,78 a	75 ± 6,45 a	2,320 (0,1271)
TMG (d)	1,89 ± 0,22 a	1,92 ± 0,25 a	1,82 ± 0,12 a	1,53 ± 0,12 a	1,123 (0,3786)
VMG (d)	0,53 ± 0,04 a	0,54 ± 0,05 a	0,55 ± 0,03 a	0,66 ± 0,04 a	1,752 (0,2096)
<b>AFS</b>					
G (%)	72,50 ± 4,78 a	70 ± 4,08 a	55 ± 6,45 a	72,50 ± 4,78 a	2,720 (0,0910)
TMG (d)	1,89 ± 0,22 a	2,16 ± 0,14 a	2,01 ± 0,12 a	1,79 ± 0,17 a	1,141 (0,3718)
VMG (d)	0,53 ± 0,04 a	0,47 ± 0,03 a	0,50 ± 0,03 a	0,57 ± 0,05 a	1,141 (0,3718)
<b>AFC</b>					
G (%)	72,50 ± 4,78 a	70 ± 4,08 a	70 ± 4,08 a	70 ± 4,08 a	0,086 (0,9666)
TMG (d)	1,89 ± 0,22 a	2,16 ± 0,29 a	1,86 ± 0,22 a	1,60 ± 0,14 a	1,187 (0,3558)
VMG (d)	0,53 ± 0,04 a	0,48 ± 0,05 a	0,55 ± 0,06 a	0,64 ± 0,05 a	1,495 (0,2658)

Medias seguidas por letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste tukey a 5% de probabilidade. G: porcentagem de germinação, TMG: tempo médio de germinação, VMG: velocidade média de germinação, HFS (fração hexânica de folhas época seca), HFC (fração hexânica de folhas época chuvosa), HCS (fração hexânica de casca de caule época seca), HRS (fração hexânica de raízes época seca), AFS (fração aquosa de folhas época seca), AFC (fração aquosa de folhas época chuvosa), F: estatística do teste F.

Tabela 6. Germinação de sementes de *E. heterophylla* submetidas a diferentes tratamentos (200, 400 e 800ppm) de frações oriundas de *O. pulchella*.  
(continuação)

Variáveis	Concentrações (ppm)				Estatística F(p)
	0	200	400	800	
<b>ACS</b>					
G (%)	65,50 ± 6,45 a	60 ± 4,08 a	60 ± 7,07 a	70 ± 4,08 a	0,733 (0,5519)
TMG (d)	1,76 ± 0,13 a	1,81 ± 0,08 a	2,19 ± 0,27 a	2,29 ± 0,32 a	1,349 (0,3050)
VMG (d)	0,57 ± 0,04 a	0,55 ± 0,02 a	0,48 ± 0,07 a	0,46 ± 0,06 a	0,926 (0,4579)
<b>ARS</b>					
G (%)	65,50 ± 6,45 a	67,50 ± 6,29 a	67,50 ± 7,50 a	65 ± 6,45 a	0,047 (0,9861)
TMG (d)	1,76 ± 0,13 a	1,85 ± 0,14 a	1,79 ± 0,17 a	1,84 ± 0,06 a	0,094 (0,9619)
VMG (d)	0,57 ± 0,04 a	0,55 ± 0,03 a	0,57 ± 0,04 a	0,54 ± 0,01 a	0,226 (0,8765)
<b>AEFS</b>					
G (%)	65,50 ± 6,45 a	60 ± 4,08 a	70 ± 4,08 a	62,50 ± 4,78 a	0,745 (0,5459)
TMG (d)	1,76 ± 0,13 a	1,77 ± 0,13 a	1,67 ± 0,14 a	1,94 ± 0,30 a	0,337 (0,7991)
VMG (d)	0,57 ± 0,04 a	0,57 ± 0,04 a	0,61 ± 0,05 a	0,55 ± 0,08 a	0,164 (0,9188)
<b>AEFC</b>					
G (%)	65,50 ± 6,45 ab	77,50 ± 4,78 b	60 ± 4,08 ab	52,50 ± 4,78 a	4,240 (0,0293)
TMG (d)	1,76 ± 0,13 a	1,57 ± 0,13 a	1,69 ± 0,10 a	1,92 ± 0,21 a	0,858 (0,4890)
VMG (d)	0,57 ± 0,04 a	0,64 ± 0,05 a	0,59 ± 0,03 a	0,54 ± 0,06 a	0,712 (0,5631)
<b>AECS</b>					
G (%)	65,50 ± 6,45 a	72,50 ± 4,78 a	77,50 ± 4,78 a	60 ± 4,08 a	2,320 (0,1271)
TMG (d)	1,76 ± 0,13 a	1,98 ± 0,21 a	2 ± 0,19 a	2,16 ± 0,06 a	0,967 (0,4399)
VMG (d)	0,57 ± 0,04 a	0,52 ± 0,06 a	0,51 ± 0,05 a	0,46 ± 0,01 a	0,928 (0,4570)
<b>AERS</b>					
G (%)	65,50 ± 6,45 a	75 ± 6,45 a	62,50 ± 6,29 a	75 ± 6,45 a	1,051 (0,4058)
TMG (d)	1,76 ± 0,13 a	2,04 ± 0,14 a	1,94 ± 0,29 a	1,79 ± 0,15 a	0,453 (0,7200)
VMG (d)	0,57 ± 0,04 a	0,49 ± 0,03 a	0,55 ± 0,06 a	0,57 ± 0,05 a	0,506 (0,6857)

Medias seguidas por letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste tukey a 5% de probabilidade. G: porcentagem de germinação, TMG: tempo médio de germinação, VMG: velocidade média de germinação, ACS (fração aquosa de casca de caule época seca), ARS (fração aquosa de raízes época seca), AEFS (fração acetato etílica de folhas época seca), AEFC (fração acetato etílica de folhas época chuvosa), AECS (fração acetato etílica de casca de caule época seca), AERS (fração acetato etílica de raízes época seca), F:estatística do teste F.

Tabela 7. Germinação de sementes de *E. heterophylla* submetidas a diferentes tratamentos (200, 400 e 800ppm) de frações oriundas de *O. pulchella*.  
(continuação)

Variáveis	Concentrações (ppm)				Estatística F(p)
	0	200	400	800	
<b>HCC</b>					
G (%)	70±4,08a	62,5±4,79a	67,5±4,79a	70±4,08a	0.632 (0.6086)
TMG (d)	1,85±0,17a	1,86±0,09a	2,33±0,17a	2,29±0,33a	1.592 (0.2430)
VMG (d)	0,55±0,05a	0,54±0,03a	0,44±0,04a	0,47±0,07a	1.430 (0.2826)
<b>HRC</b>					
G (%)	70±4,08a	70±4,08a	67,5±7,5a	67,5±4,79a	0.074 (0.9729)
TMG (d)	1,85±0,17a	1,91±0,15a	1,8±0,18a	1,9±0,07a	0.116 0.9488
VMG (d)	0,55±0,05a	0,53±0,04a	0,57±0,05a	0,53±0,02a	0.215 0.8843
<b>ACC</b>					
G (%)	70±4,08a	75±6,45 <sup>a</sup>	80±4,08a	62,5±4,78a	2.277 0.1319
TMG (d)	1,85±0,17a	1,94±0,19 <sup>a</sup>	2,05±0,17a	2,22±0,09a	0.972 0.4378
VMG (d)	0,55±0,05a	0,53±0,06 <sup>a</sup>	0,49±0,04a	0,45±0,01a	0.903 0.4684
<b>ARC</b>					
G (%)	70±4,08a	77,5±4,78 <sup>a</sup>	67,5±4,78a	77,5±4,78a	1.244 0.3370
TMG (d)	1,85±0,17a	2,09±0,11 <sup>a</sup>	1,95±0,30a	1,83±0,16a	0.346 0.7928
VMG (d)	0,55±0,05a	0,48±0,02 <sup>a</sup>	0,54±0,06a	0,55±0,05a	0.459 0.7158
<b>AECC</b>					
G (%)	70±4,08a	67,5±4,79a	70±4,08a	62,5±4,78a	0.632 0.6086
TMG (d)	1,85±0,17a	1,80±0,15a	1,74±0,18a	1,91±0,27a	0.121 0.9459
VMG (d)	0,55±0,05a	0,56±0,05a	0,59±0,06a	0,55±0,08a	0.077 0.9711
<b>AERC</b>					
G (%)	70±4,08ab	70±4,08b	62,5±4,78ab	60±4,08a	4.429 0.6258
TMG (d)	1,85±0,17a	1,63±0,09a	1,74±0,08a	1,78±0,18a	0.416 0.7444
VMG (d)	0,55±0,05a	0,61±0,03a	0,57±0,02a	0,57±0,05a	0.397 0.7576

Medias seguidas por letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste tukey a 5% de probabilidade. G: porcentagem de germinação, TMG: tempo médio de germinação, VMG: velocidade média de germinação, HCC (fração hexânica de casca de caule época chuvosa), HRC (fração hexânica de raízes época chuvosa), AECC (fração acetato etílica de casca de caule época chuvosa), AERC (fração acetato etílica de raízes época chuvosa), ACC (fração aquosa de casca de caule época chuvosa), ARC (fração aquosa de raízes época chuvosa), F:estatística do teste F.

Os bioensaios de crescimento de plântulas de *M. maximus* e *E. heterophylla* mostraram atividades variadas das frações de *O. pulchella* sobre o desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular. O herbicida exerceu os maiores valores de porcentagem de inibição em todas as concentrações testadas, tanto para a parte aérea quanto para o sistema radicular de ambas espécies (Figura 6, 7, 8 e 9). *M. maximus* foi a espécie que apresentou uma resposta mais variada com a aplicação das frações testadas. HFS, HCS, HRS, HCC, HRC e AERC foram as frações que inibiram significativamente o crescimento das raízes apenas na maior concentração testada ( $0,8 \text{ mg. mL}^{-1}$ ) e a fração AECC inibiu o crescimento do sistema radicular nas concentrações  $0,8 \text{ mg. mL}^{-1}$  e  $0,4 \text{ mg. mL}^{-1}$ . Já as frações AFS, ACS, ARS e ACC estimularam significativamente o crescimento do sistema radicular desta espécie (Figuras 6 e 7).

Na parte aérea, observou-se uma resposta mais homogênea com 14 frações (HFS, HFC, HCS, HRS, AEFS, AEFC, AECS, AERS, HCC, HRC, ACC, ARC, AECC e AERC) inibindo significativamente o crescimento pelo menos na maior concentração testada. O grupo de frações de acetato de etila (AEFS, AEFC, AECS, AERS, AECC e AERC) destacou-se por ser o grupo que exerceu uma resposta mais uniforme na inibição deste parâmetro (apenas a menor concentração da fração AECS não apresentou inibição significativa) em comparação com os grupos de frações hexânicas e aquosas (Figuras 6 e 7).

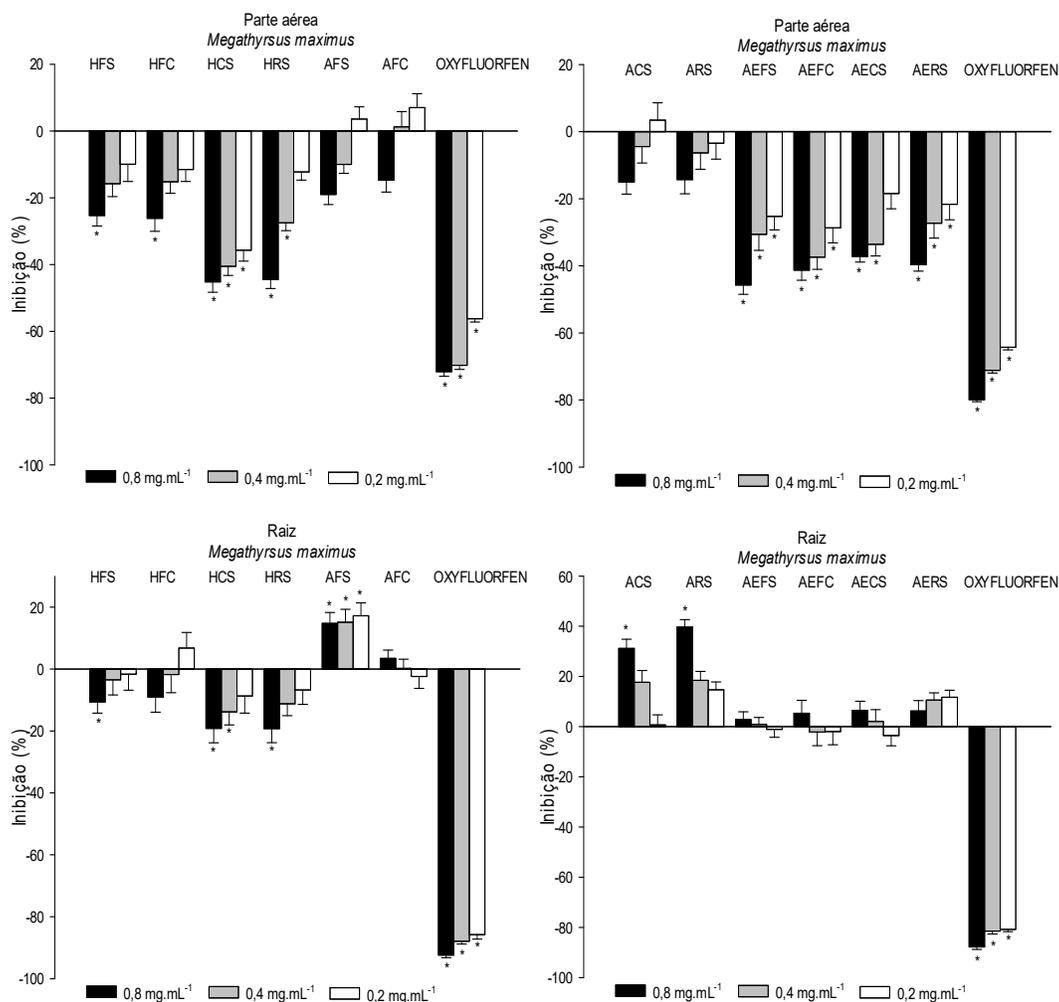


Figura 6. Efeito do herbicida GOAL<sup>®</sup> e das frações de folhas, casca de caule e raízes de *O. pulchella* sobre o crescimento de plântulas de *M. maximus*. Os valores estão expressos em porcentagem de inibição em relação ao controle negativo. (\*) Médias diferem significativamente do controle pelo teste de tukey, a 0,05 de significância. HFS (fração hexânica de folhas época seca), HFC (fração hexânica de folhas época chuvosa), HCS (fração hexânica de casca de caule época seca), HRS (fração hexânica de raízes época seca), AFS (fração aquosa de folhas época seca), AFC (fração aquosa de folhas época chuvosa), ACS (fração aquosa de casca de caule época seca), ARS (fração aquosa de raízes época seca), AEFS (fração acetato etílica de folhas época seca), AEFC (fração acetato etílica de folhas época chuvosa), AECS (fração acetato etílica de casca de caule época seca), AERS (fração acetato etílica de raízes época seca).

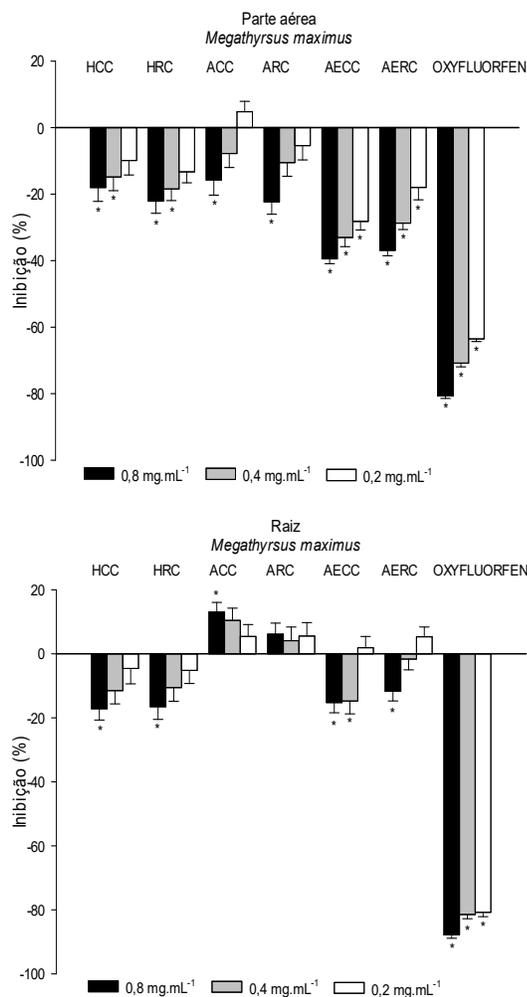


Figura 7. Efeito do herbicida GOAL<sup>®</sup> e das frações de casca de caule e raízes de *O. pulchella* sobre o crescimento de plântulas de *M. maximus*. Os valores estão expressos em porcentagem de inibição em relação ao controle negativo. (\*) Médias diferem significativamente do controle pelo teste de tukey, a 0,05 de significância. HCC (fração hexânica de casca de caule época chuvosa), HRC (fração hexânica de raízes época chuvosa), ACC (fração aquosa de casca de caule época chuvosa), ARC (fração aquosa de raízes época chuvosa), AECC (fração acetato etílica de casca de caule época chuvosa), AERC (fração acetato etílica de raízes época chuvosa).

Enquanto que para *E. heterophylla*, as plântulas apresentaram uma resposta mais uniforme, no sistema radicular apenas as frações HRS e HRC não inibiram significativamente o crescimento em nenhuma das concentrações testadas, as 16 frações restantes, inibiram significativamente o crescimento pelo menos na maior concentração aplicada (Figuras 8 e 9). Nesta espécie, novamente o grupo de frações de acetato de etila mostrou o melhor perfil nos valores de porcentagem de inibição. Já na parte aérea, todas as 18 frações testadas apresentaram inibição significativa em pelo menos a maior dose testada (Figuras 8 e 9).

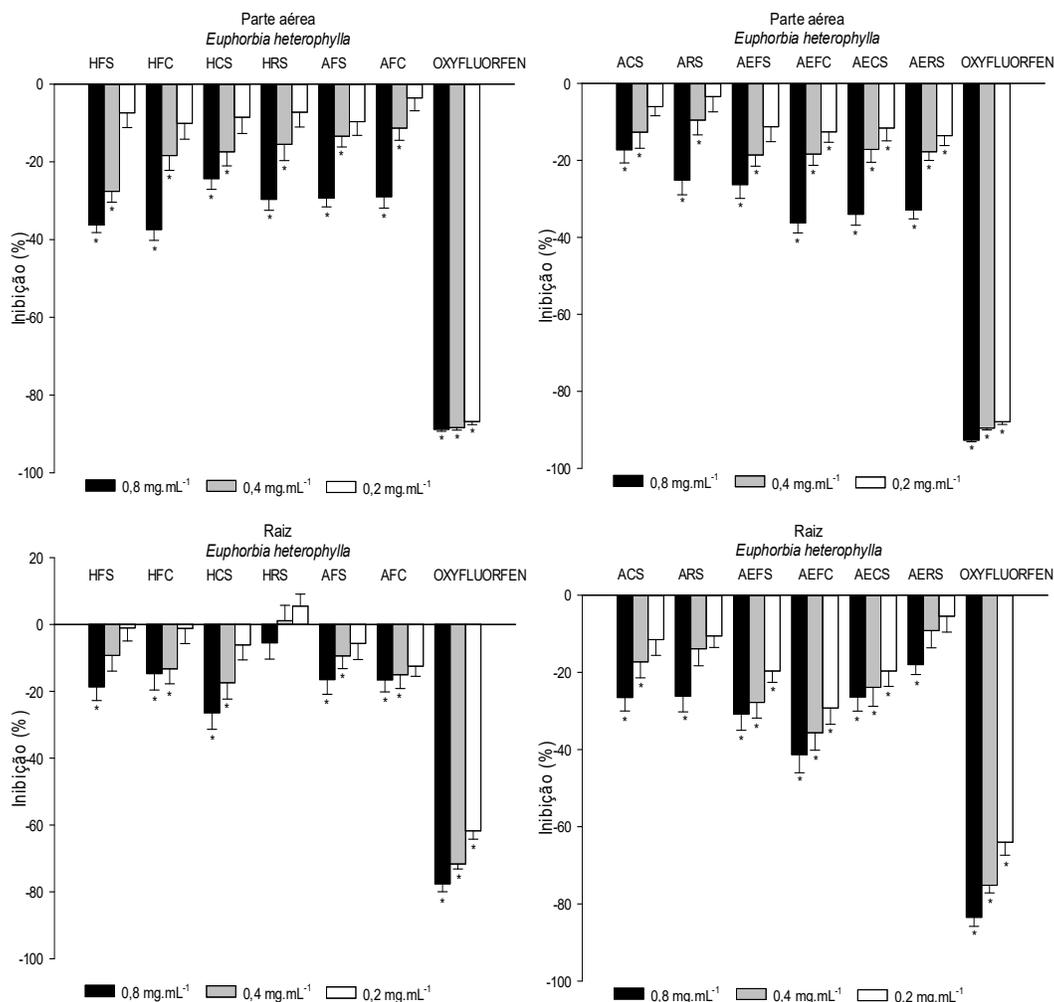


Figura 8. Efeito do herbicida GOAL<sup>®</sup> e das frações de folhas, casca de caule e raízes de *O. pulchella* sobre o crescimento de plântulas de *E. heterophylla*. Os valores estão expressos em porcentagem de inibição em relação ao controle negativo. (\*) Médias diferem significativamente do controle pelo teste de tukey, a 0,05 de significância. HFS (fração hexânica de folhas época seca), HFC (fração hexânica de folhas época chuvosa), HCS (fração hexânica de casca de caule época seca), HRS (fração hexânica de raízes época seca), AFS (fração aquosa de folhas época seca), AFC (fração aquosa de folhas época chuvosa), ACS (fração aquosa de casca de caule época seca), ARS (fração aquosa de raízes época seca), AEFS (fração acetato etílica de folhas época seca), AEFC (fração acetato etílica de folhas época chuvosa), AECS (fração acetato etílica de casca de caule época seca), AERS (fração acetato etílica de raízes época seca).

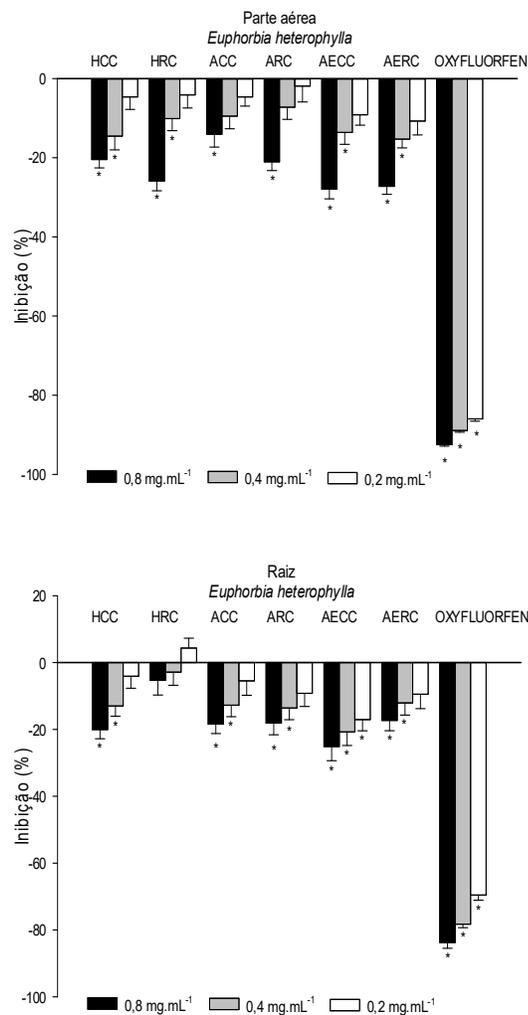


Figura 9. Efeito do herbicida GOAL<sup>®</sup> e das frações de casca de caule e raízes de *O. pulchella* sobre o crescimento de plântulas de *E. heterophylla*. Os valores estão expressos em porcentagem de inibição em relação ao controle negativo. (\*) Médias diferem significativamente do controle pelo teste de tukey, a 0,05 de significância. HCC (fração hexânica de casca de caule época chuvosa), HRC (fração hexânica de raízes época chuvosa), ACC (fração aquosa de casca de caule época chuvosa), ARC (fração aquosa de raízes época chuvosa), AECC (fração acetato etílica de casca de caule época chuvosa), AERC (fração acetato etílica de raízes época chuvosa).

#### 4. DISCUSSÃO

Os estudos na área da alelopatia vem se tornando uma ferramenta importante na identificação de espécies vegetais que produzem aleloquímicos, que possam ser utilizadas como herbicidas naturais, específicos e sendo menos prejudiciais para o ambiente (Imatomi et al., 2013). Devido as características encontradas no Cerrado (solos com baixa disponibilidade nutricional, ácidos, com altos níveis de alumínio, e variação sazonal de disponibilidade hídrica; situações que podem ser determinantes para a produção e liberação de aleloquímicos), este é um importante foco de estudos para a busca de metabolitos secundários (Imatomi et al., 2013).

Os metabolitos secundários são um grupo de compostos, geralmente possuem estrutura complexa, com baixo peso molecular, possuem diversas atividades biológicas (Pereira & Cardoso, 2012; Lima Neto et al., 2015). Alguns metabolitos secundários desempenham um papel importante na interação das plantas com o meio ambiente podendo atuar como aleloquímicos na interferência com outras espécies vegetais (Kroymann, 2011). No presente trabalho foi verificado o efeito fitotóxico das frações de folhas, cascas de caule e raízes da espécie *O. pulchella*. Em total 18 frações desta espécie foram testadas, as frações de folha foram as que apresentaram a maior inibição sobre o crescimento dos coleóptilos de *T. aestivum* corroborando com os resultados de Candido (2016) que testou extratos foliares, de caule e de raízes de *O. pulchella* e relatou que os extratos foliares foram os que apresentaram maior atividade sobre o crescimento de coleóptilos de *T. aestivum*.

As plantas durante todo seu ciclo de vida, possuem a capacidade de sintetizar aleloquímicos, essas substâncias estão presentes em todos os órgãos da planta como raízes, rizomas, caules, folhas, flores, frutos e sementes (Gusman et al., 2012). A quantidade produzida varia de varia de um órgão para o outro e de espécie para espécie (Ferreira e Áquila, 2000) e sua produção está influenciada por diversos fatores como temperatura, umidade, precipitação, radiação e variação sazonal (Pelegrini & Cruz-Silva, 2012). O suprimento limitado de compostos de defesa está concentrado onde é mais necessário para maximizar a adequação ao ambiente. Metabolicamente ativas, as folhas sintetizam substancias químicas, que atuam na defesa contra predadores. Por esse motivo as concentrações de metabolitos secundários devem ser maiores nas folhas (Borella & Pastorini, 2010; Novaes, 2011), principalmente em folhas jovens em desenvolvimento do que em folhas mais velhas (Taiz et al., 2017).

Em estudos envolvendo atividade fitotóxica, as folhas são o órgão mais frequentemente utilizado (Grisi et al., 2013; Novaes et al., 2013; Pereira et al., 2014). Diversos autores que já

trabalharam com espécies vegetais do cerrado relataram atividade fitotóxica de extratos foliares sobre o crescimento de coleóptilos de *T. aestivum* (Novaes, 2011; Moraes et al., 2014; Accarini, 2016; Habermann et al., 2016; Jatobá et al., 2016). Confirmando que os bioensaios de crescimento de coleóptilos de *T. aestivum* são um método clássico e eficiente para avaliar a atividade fitotóxica de compostos pertencentes ao metabolismo secundário (Habermann et al., 2015).

Nos bioensaios de germinação, nas sementes de *M. maximus*, apenas duas frações exerceram diferença significativa sobre o tempo medio de germinação e sobre a velocidade media de germinação. Enquanto que, para as sementes de *E. heterophylla*, nenhuma das 18 frações exerceram diferença estatística significativa nos tres parametros avaliados. Diferindo dos resultados de Candido (2016), que relatou que sementes de *M. maximus* tiveram inibida sua porcentagem de germinação pela influência dos extratos foliares de hexano, acetato de etila e aquoso de *O. pulchella* e o extrato foliar acetonico desta espécie doadora também exerceu atividade inibitória sobre a porcentagem de germinação de sementes de *E. heterophylla*. O mesmo autor também relatou que os parâmetros tempo medio de germinação e velocidade media de germinação foram os parametros mais afetados nas sementes de *E. heterophylla* e *M. maximus*.

Frequentemente o efeito alelopático dos aleloquimicos não é manifestado na porcentagem final de germinação das sementes, mas sobre outros parâmetros dos processos de germinação (Ferreira, 2004) e crescimento da planta (Grisi et al., 2012). O crescimento inicial de plântulas é caracterizado por uma alta atividade metabólica e sensibilidade a fatores de estresse ambiental, sendo, portanto, um processo mais sensível que a germinação (Ferreira & Aquila, 2000).

Além disso, os aleloquimicos podem afetar processos fisiológicos e bioquímicos como são a fotossíntese, absorção de nutrientes, a expansão foliar, o metabolismo dos aminoácidos, síntese proteica, respiração mitocondrial (Guidotti et al., 2013), divisão e diferenciação celular, metabolismo de fitormônios entre outros (Oliveira et al., 2012). O efeito fitotóxico dos aleloquimicos pode ser observado em processos como a diminuição do comprimento da raiz primária (Ferreira & Borghetti, 2004; Weston & Mathesius, 2013), a redução do crescimento inicial de plântulas (Silveira, 2010), assim como também no aparecimento de plântulas anormais (Omena et al., 2020).

Nos bioensaios de crescimento inicial, as plântulas de *M. maximus* se mostraram menos sensíveis a ação das frações de *O. pulchella*. O sistema radicular foi o parâmetro menos afetado, sendo observado estímulo em alguns casos. Alguns aleloquímicos dependendo da sua concentração no ambiente podem atuar como estimulantes de crescimento, promovendo o aumento do comprimento na parte aérea e no sistema radicular (Oliveira et al., 2014).

Já a parte aérea mostrou uma resposta mais uniforme na inibição com a aplicação das frações e não foi observado estímulo no crescimento. Corroborando com os resultados de Candido (2016), quem também encontrou resultados similares, a inibição da parte aérea foi o parâmetro que apresentou melhor uniformidade já que os extratos de *O. pulchella* não promoveram estímulo no crescimento desta espécie alvo. Enquanto que no sistema radicular, metade dos extratos utilizados por este autor promoveram estímulo no crescimento das plântulas de *M. maximus*, efeito similar aos resultados encontrados no presente trabalho.

Nas plântulas de *E. heterophylla*, todas as 18 frações promoveram inibição significativa tanto da parte aérea como do sistema radicular desta espécie (apenas a fração HRS não provocou inibição nem estímulo no crescimento do sistema radicular) com o maior valor de inibição obtido no sistema radicular. Corroborando com os resultados de Candido (2016) que constatou que plântulas de *E. heterophylla* foram susceptíveis a aplicação de extratos de *O. pulchella*. O mesmo autor ainda mencionou que a redução do comprimento de raízes de *E. heterophylla*, provocados pelos extratos foliares de *O. pulchella* está associado com a diminuição no alongamento de células do metaxilema.

Outros trabalhos na literatura observaram efeito inibitório de extratos de diversas espécies vegetais do cerrado sobre o crescimento de plântulas de *E. heterophylla*, sendo o sistema radicular o mais afetado pela ação destes (Grisi et al., 2013; Anese et al., 2015; Habermann et al., 2015). Os aleloquímicos quando estão em contato com o sistema radicular, podem afetar diretamente o seu crescimento ou provocar modificações morfológicas que comprometeram o desenvolvimento das plântulas (Teerarak et al., 2012). Plântulas com tamanho reduzido podem estar mais suscetíveis a fatores de estresse e ter menor chance na competição de recursos com outras espécies vegetais (Gatti et al., 2007).

Os aleloquímicos podem provocar uma menor absorção de água e minerais pelas as raízes, devido que a ação destes exerce um efeito mais visível no sistema radicular, já que existe contato direto destas com a solução dos aleloquímicos (Lupini et al, 2010), sendo assim, as raízes das plantas apresentam maior sensibilidade à aleloquímicos em comparação com outras

estruturas das plantas (Carvalho et al., 2014). Também estes compostos podem inibir o alongamento das células, isto está associado com alterações na concentração de hormônios vegetais responsáveis pelo crescimento como citocininas e auxinas e quando estas são inibidas, interferem no seu desenvolvimento normal, dando como resultado, redução do alongamento de raízes e caules das plântulas (Grisi et al., 2013; Kenany & Darier, 2013).

Os maiores valores inibição exercida pelas frações de *O. pulchella* nos bioensaios de crescimento de coleóptilos de *T. aestivum* e crescimento inicial das espécies infestantes foram observados sobretudo na maior concentração testada (0,8 mg. mL<sup>-1</sup>) corroborando com informações da literatura que confirmam que, a atividade fitotóxica é acentuada com o aumento na concentração dos extratos (Mendes et al., 2013; Borella et al., 2012). De forma geral, as frações que exerceram maior atividade inibitória no crescimento inicial em ambas espécies alvo foram as frações de acetato de etila, corroborando com os resultados de Candido (2016) que relatou que, dentre os extratos analisados, o extrato acetato de etila de folhas de *O. pulchella* foi o mais ativo ao inibir significativamente tanto o crescimento de parte aérea quanto o sistema radicular de *M. maximus* e *E. heterophylla*. Cabe ressaltar que esse efeito também foi observado no teste com coleóptilos de *T. aestivum*, onde este grupo de frações foram as que ocasionaram os maiores valores de porcentagem de inibição.

Accarini, 2016, relatou resultados similares, extratos foliares de acetato de etila da espécie *Piptocarpha rotundifolia* foram os que mais inibiram tanto o crescimento dos coleóptilos de *T. aestivum*, como a parte aérea e raízes das plântulas das espécies invasoras de culturas agrícolas *M. maximus* e *E. heterophylla*. O solvente acetato de etila (CH<sub>3</sub>COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) é comumente utilizado na obtenção de extratos com compostos fenólicos (Imatomi et al., 2013), mencionados na literatura como compostos fitotóxicos (Li et al., 2010; Weston & Mathesius, 2013; Lopes, 2014).

Nos bioensaios de crescimento inicial de plântulas, *E. heterophylla* foi a espécie que se mostrou mais sensível a ação das frações que o *M. maximus*, esta diferença observada na sensibilidade pode ser devida as diferenças fisiológicas e bioquímicas das espécies utilizadas, já que uma delas é uma monocotiledônea (*M. maximus*) e a outra, uma eudicotiledônea (*E. heterophylla*). Isto demonstra que a resistência ou a tolerância aos metabolitos secundários é uma característica espécie-específica (Ferreira & Aquila, 2000), já que algumas espécies podem apresentar maior sensibilidade a determinados compostos que outras. É importante mencionar também que, as vezes um composto que é tóxico para uma espécie pode não ser para outra (Oliveira et al., 2014) ou até mesmo pode atuar estimulando o seu desenvolvimento (Moraes et al., 2012).

A atividade estimulatória observada nos resultados de crescimento inicial do presente trabalho, principalmente quando aplicadas as frações aquosas pode ser explicada pela maior concentração de açúcares, neste grupo de frações. Em frações aquosas podem ser encontradas substâncias com elevada polaridade como açúcares, que podem estimular processos de crescimento vegetal como a divisão e o alongamento celular (Aloni et al., 2006; Accarini, 2016). Informações sobre o modo de ação dos aleloquímicos são escassas, uma vez que estas substâncias afetam várias funções e provocam efeitos colaterais tornando-os difíceis de identificar dos principais (Goldfarb, 2009).

## 5. CONCLUSÃO

A traves dos resultados obtidos é possível concluir que as frações de *O. Pulchella* apresentam potencial fitotóxico, principalmente nas frações foliares de acetato de etila. Isto devido a estes que foram capazes de inibir o crescimento dos coleótilos de *T. aestivum* e o crescimento inicial das espécies invasoras de culturas agrícolas *M. maximus* e *E. heterophylla*. Esse potencial fitotóxico foi mais evidente na invasora *E. heterophylla* devido a que foi a espécie mais afetada nos parâmetros avaliados. Confirmando assim o potencial fitotóxico de frações oriundas da espécie *O. Pulchella*.

## 6. BIBLIOGRAFIA

Accarini, R. B. Atividade fitotóxica de extratos foliares de *Piptocarpha rotundifolia* (candeia) (Less.) Baker – Asteraceae. (Dissertação de mestrado, Universidade Federal de São Carlos, Brasil), 2016.

Adegas, F. S., Gazziero, D. L. P., Oliveira JR, R. S., Mendes, R. R., & Rodrigues L. J. *Euphorbia heterophylla*: um novo caso de resistência ao glifosato no Brasil. Embrapa soja. Comunicado técnico 98, Londrina, PR. 5p, 2020.

Agostinetto, D. & Vargas, L. Resistência de plantas daninhas a herbicidas. In: Agostinetto, D.; Vargas, L. (Ed.). Resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil. Pelotas: Editora UFPel, p. 9-32, 2014.

Aloni, R.; Aloni, E.; Langhans, M.; Ullrich, C.I. role of cytokin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Annals of Botany*, v.97, p.883-893, 2006.

Anese, S; Jatobá, L. J; Grisi, P. U; Gualtieri, S. C. J; Santos, M. F. C; Berlinck, R. G. S. Bioherbicidal activity of drimane sesquiterpenes from *Drimys brasiliensis* Miers roots. *Industrial Crops and Products*. v.74, p. 28–35, 2015.

Araújo, A. C. R. Estudo fitoquímico e avaliação das atividades alelopática, antioxidantes, antilarvicidas e citotoxicidade das folhas de *Ocotea pulchella* Mart. (Lauraceae). Dissertação. Universidade Federal do Paraná. p.118, 2012.

Beltrão, N. E. M. Manejo de plantas daninhas em algodão. In: Vargas, L.; Roman, E. S. Manual de manejo e controle de plantas daninhas. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, p. 215-250, 2004.

Bertholdsson, N. O. Breeding spring wheat for improved allelopathic potential. *Weed Research* 50: 49-57. 2010.

Bethke, R. K.; Molin, W. T.; Sprague, C.; Penner, D. Evaluation of the interaction between Glyphosate and Glufosinate. *Weed Science*.v.61, p.41-47, 2013.

Borella, J. & Pastorini, L. H. Efeito alelopático de frutos de umbu (*Phytolacca dioica* L.) sobre a germinação e crescimento inicial de alface e picão-preto. *Ciência e Agrotecnologia*, 35(5): 1129-1135, 2010.

Borella, J.; Martinazzo, E. G.; Aumonde, T. Z.; Amarante, L.; Moraes, D. M.; Villela, F. A. Respostas na germinação e no crescimento inicial de rabanete sob ação de extrato aquoso de *Piper mikanianum* (Kunth) Steudel. *Acta Botanica Brasílica*, Belo Horizonte, v. 26, n. 2, p. 415-420, 2012.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Regras para análise de sementes. Brasília, 395 p 2009.

Candido, L. P.; Varela, R. M.; Torres, A.; Molinillo, J. M. G.; Gualtieri, S. C. J.; Macías, F. A. Evaluation of the Allelopathic Potential of Leaf, Stem, and Root Extracts of *Ocotea pulchella* Nees et Mart. *Chemistry & Biodiversity*. 13. p1058 – 1067, 2016.

Carvalho, L. B.; Bianco, S.; Guzzo, C. D. Interferência de *Euphorbia heterophylla* no crescimento e acúmulo de macronutrientes da soja. *Planta Daninha*, v. 28, p. 33-39, 2010.

Carvalho, W. P., Carvalho, G. J., Abbade Neto, D. O., & Teixeira, L. G. V. Alelopatia de extratos de adubos verdes sobre a germinação e crescimento inicial de alface. *Bioscience Journal*, vol. 30, p. 1-11, 2014.

Christoffoleti, P. J.; Nicolai, M.; López-Ovejero R. F.; Borgato E. A.; Golçasves Netto, A.; Melo, M. S. C. Resistência das plantas daninhas a herbicida: termos e definições importantes. In: Christoffoleti, P. J.; Nicolai, M. (Coord.). Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas. 4.ed. Piracicaba: HRAC-BR, p. 11-31, 2016.

Correia, N. M.; Gomes, L. P.; Perussi, F. J. Control of *Brachiaria decumbens* and *Panicum maximum* by S-metolachlor as influenced by the occurrence of rain and amount of sugarcane straw on the soil. *Acta Sci. Agron.* vol.34 no.4 Maringá, 2012.

Costa, E. A. D.; Matallo, M. B.; Carvalho, J. C.; Rozanski, A. Eficiência de nova formulação do herbicida oxyfluorfen no controle de plantas daninhas em área de *Pinus caribaea* morelet var. hondurensis barr. et Golf. *Revista Árvore*, v. 26, p. 683-689, 2002.

Cury, J. P.; Santos, J. B.; Valadão Silva, D.; Carvalho, F. P.; Braga, R. R.; Byrro, E. C. M.; Ferreira, E. A. Produção e partição de matéria seca de cultivares de feijão em competição com plantas daninhas. *Planta Daninha*, v. 29, n. 1, p. 149-158, 2011.

Cury, J. P.; Santos, J. B.; Silva, E. B.; Byrro, E. C. M.; Braga, R. R.; Carvalho, F. P.; Valadão Silva, D. Acúmulo e partição de nutrientes de cultivares de milho em competição com plantas daninhas. *Planta Daninha*, Viçosa-MG, v. 30, n. 2, p. 287-296, 2012.

- Ferreira, A. G.; Aqüila, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 12, p. 175-204, 2000.
- Ferreira, A. G.; Borghetti, F. Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre, Artmed, 323p, 2004.
- Ferreira, A. G. Interferência: competição e alelopatia. p. 251-262. *In*: Ferreira, A. G.; Borghetti, F. (Orgs). Germinação do básico ao aplicado, Porto Alegre: Artmed. 323p, 2004.
- Ferreira, E. A.; Aspiazú, I., A.; Galon, L. L.; Concenço, G. C.; Silva, A. F.; Reis, L. A. C.; Carvalho, F. P. Características fisiológicas da soja em relação a espécies de plantas daninhas. *Revista Trópica Ciências Agrárias e Biológicas*, v. 5, n. 1, p. 39, 2011.
- Ferreira, D. F. SISVAR: A computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35(6), p.1039-1042, 2011.
- Franco, A. C. Ecophysiology of woody plants. In Oliveira, PS. and Marquis, RJ. The cerrado of Brazil: ecology and natural history of a Neotropical savanna. New York: Columbia University Press. p. 178-197, 2002.
- Friedman, J. Allelopathy, autotoxicity, and germination. Pp. 629-644. In: J. kegel & G. Galili (eds.). Seed development and germination. Marcel Dekker Inc., New York. 1995.
- Gatti, A. B.; Perez, S. C. J. G. A.; Ferreira, A. G. Avaliação da atividade alelopática de extratos aquosos de folhas de espécies de cerrado. *Revista Brasileira Biociencia*. v.5, p.174–176, 2007.
- Goldfarb, M., Pimentel, L. W., & Pimentel, N. W. Alelopatia: relações nos agroecossistemas. *Tecnol. & Ciên. Agropec.*, João Pessoa, v.3, n.1, p.23-28, 2009.
- Grandtner, M. M.; Chevrette, J. Dictionary of Trees. South America. Nomenclature, Taxonomy and Ecology. Volume 2. Academic Press (Elsevier), USA. 2013.
- Grigolli, J. F. J.; Pereira, F. C. M.; Peñaherrera, L. C.; Santos, E. A. & Ferreira, M. C. Controle de *Euphorbia heterophylla* com mesotrione e óleos para diferentes pontas de pulverização. *Revista Brasileira de Herbicidas*, S.l., v. 10, n. 3, p. 266-276, 2011.
- Grisi, P. U.; Ranal, M. A.; Gualtieri, S. C. J.; Santana, D. G. Allelopathic potential of *Sapindus saponaria* L. leaves in the control of weeds. *Acta Scientiarum. Agronomy*. V.34, n. 2, p.: 1-9, 2012.

Grisi, P.U; Gualtieri, S. C. J.; Ranal, M. A.; Santana, D. G. Phytotoxic activity of crude aqueous extracts and fractions of young leaves of *Sapindus saponaria* L. Sapindaceae. *Acta Botanica Brasilica*, Feira de Santana, v. 27, p. 62-70, 2013.

Grisi, P. U.; Imatomi, M.; Pereira, V. C.; Anese, S.; Gualtieri, S. C. J. Influence of *Serjania lethalis* A. St.-Hil. (Sapindaceae) leaf and stem crude extracts on diaspores and seedlings of different cultivated species. *South African Journal of Botany*, vol. 105, p 97-105, 2016.

Guidotti, B. B.; Gomes, B. R.; Siqueira-Soares, R. C.; Soares, A. R.; Ferrarese-Filho, O. The effects of dopamine on root growth and enzyme activity in soybean seedlings. *Plant Signaling & Behavior*. V.8, n. 9, p.: 1-7, 2013.

Gusman, G. S.; Vieira, L. R.; Vestena, S. Alelopatia de espécies vegetais com importância farmacêutica para espécies cultivadas; *Revista Biotemas*, Florianópolis, SC, v. 4, n. 25, p. 37-48, 2012.

Habermann, E.; Imatomi, M.; Pereira, V. C.; Pontes, F. C.; Gualtieri, S. C. J. Atividade fitotóxica de cascas do caule e folhas de *Blepharocalyx salicifolius* Kuth O. Berg (Myrtaceae) sobre espécies infestantes. *Acta Biologica Colombiana*, vol. 20, nº. 1, pp. 153-162, 2015.

Habermann, E.; Pontes, F. C.; Pereira, V. C.; Imatomi, M.; Gualtieri, S. C. J. Phytotoxic potential of young leaves from *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg (Myrtaceae). *Braz J Biol*. 76:531–538, 2016.

Hammer, O., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. Past: Paleontological Statistic software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica* 4 (1): 1-9, 2001.

Hancock, C. R.; Barlow, H. W.; Lacey, H. J. The east malling coleoptile straight growth test method. *Journal of Experimental Botany*, vol. 15, no. 1, pp. 166-176, 1964.

Heap, I. The International Herbicide-Resistant Weed Database, 2020. Acessado em março 04, 2020 disponível em: <http://www.weedscience.org/Pages/GeoChart.aspx>.

Imatomi, M.; Novaes, P.; Matos, A. P.; Gualtieri, S. C. J.; Molinillo, J. M. G.; Lacret, R.; Varela, R. M.; Macías, F. A. Phytotoxic effect of bioactive compounds isolated from *Myrcia tomentosa* (Myrtaceae) leaves. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 46, p. 29-35, 2013.

- Inoue, M. H.; Santana, D. C.; Vilhena, K. S. S.; Souza Filho, A. P. S.; Guilhon, G. M. S. P.; Possamai, A. C. S.; Silva, L. E.; Dallacort, R. Avaliação do potencial alelopático de substâncias isoladas em sementes de araticum (*Annona crassiflora*). *Planta Daninha*. v. 28, p. 735-741, 2010.
- Jatobá, L. J.; Varela, R. M.; Molinillo, J. M. G.; Din, Z. U.; Gualtieri, S. C. J.; Rodrigues Filho, E.; Macías, F. A. Allelopathy of Bracken Fern (*Pteridium arachnoideum*): New Evidence from Green Fronds, Litter, and Soil. *PLoS ONE* 11(8), p 1-16, 2016.
- Kenany, E. T. & Darier, S. M. Suppression effects of *Lantana camara* L. aqueous extracts on germination efficiency of *Phalaris minor* Retz. and *Sorghum bicolor* L. (Moench). *Journal of Taibah University for Science*, [S.l.], v. 7, n. 2, p. 64-71, 2013.
- Kroymann, J. Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 14, p. 246-251, 2011.
- Kuva, M. A.; Gravena, R.; Pitelli, R. A.; Christoffoleti, P. J.; Alves, P. L. C. A. Períodos de interferência das plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar: III - capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) e capim-colonião (*Panicum maximum*). *Planta Daninha*, Viçosa, v.21, n.1, p.37-44, 2003.
- Lima Neto, G. A.; Kaffashi S.; Luiz, W. T.; Ferreira, W. R.; Dias Da Silva, Y. S. A.; Pazin, G. V.; Violante, I. M. P. Quantificação de metabólitos secundários e avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de algumas plantas selecionadas do Cerrado de Mato Grosso. *Rev. bras. plantas med.* vol.17, n.4, suppl.3, pp.1069-1077. 2015.
- Li, Z. H.; Wang, Q.; Ruan, X.; Pan, C.; Jiang, D. H. Phenolics and Plant Allelopathy. *Molecules*, v. 15, p. 8933-8952, 2010.
- Lopes, M. O. *Litchi chinensis* Sonn.: estudos microbiológicos e fitoquímicos. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 100 f, 2014.
- Lopes Ovejero, R. F.; Soares, D. J.; Oliveira, W. S.; Fonseca, L. B.; Berger, G. U.; Soteris, J. K.; Christoffoleti, P. J. Residual herbicides in weed management for glyphosate-resistant soybean in Brazil. *Planta daninha* vol.31 no.4, 2013.
- Lorenzi, H. *Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas*. 4. ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 640 p, 2008.

- Lupini, A., Sorgonà, A., Miller, A. J., & Abenavoli, M. R. Short-term effects of coumarin along the maize primary root axis. *Plant Signaling & Behavior*, v. 5, p. 1395-1400, 2010.
- Macías, F. A., Lacret, R., Varela, R. M., Nogueiras, C., Molinillo, J. M. G. Isolation and phytotoxicity of terpenes from *Tectona grandis*. *Journal of Chemical Ecology*. v.36, p.396–404, 2010.
- Machado, A. B.; Trezzi, M. M. I.; Vidal, R. A.; Patel, F.; Cieslik, L. F.; Debastiani, F. Rendimento de grãos de feijão e nível de dano econômico sob dois períodos de competição com *Euphorbia heterophylla*. *Planta daninha* vol.33 no.1 Viçosa, 2015.
- Marques, R. P.; Martins, D.; Costa, S. I. A.; Vitorino, H. S. Densidades de palha e condições de luminosidade na germinação de sementes de *Euphorbia heterophylla*. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 33, n. 3, p. 867-872, 2012.
- Mendes, C. E.; Casarin, F.; Sperandio, S. L.; Moura, N. F.; Denardin, R. B. N. Avaliação do potencial fitotóxico de *Persea venosa* Nees & Mart. (Lauraceae) sobre sementes e plântulas de diferentes espécies cultivadas. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 15, n. 3, p. 337-346, 2013.
- Moraes, P. V. D.; Agostinetti, D.; Panozzo, L. E.; Galon, L.; Oliveira, C.; Magro, T. D. Potencial alelopático de extratos aquosos de culturas de cobertura de solo na germinação e desenvolvimento inicial de *Bidens pilosa*. *Semina: Ciências Agrárias*. Londrina, v. 33, n. 4, p. 1299-1314, 2012.
- Moraes, L. P. S.; Gualtieri, S. C. J.; Lima, M. I. S.; Gatti, A. B.; Pereira, V. C.; Miranda, M. A. F. M. Efeitos alelopáticos de *Lafoensia glyptocarpa* Koehne sobre *Sesamum indicum* L. e sobre o crescimento de coleóptilos de *Triticum aestivum* L. *Iheringia. Série Botânica* 69(1):37-48, 2014.
- Nepomuceno, M. Intervalo de dessecação de *Urochloa ruzizensis* (R. German & Evrard) Crins e seu efeito alelopático na cultura da soja RR (Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, Brasil), 2011.
- 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.
- Novaes, P. Alelopatia e bioprospeção de *Rapanea ferruginea* e de *Rapanea umbellate*. Dissertação. Pos-graduação em Ecologia e Recursos Naturais - UFSCar, 2011.

Novaes, P.; Molinillo, J. M. G.; Varela, R. M.; Macías, F. A. Ecological phytochemistry of Cerrado (Brazilian savana) plants. *Phytochemistry Reviews*, Boston, v. 12, n. 4, p. 839-855, 2013.

Oliveira JR, R. S.; Carneiro, J. C.; Constantin, J.; Santos, G.; Martini, P. E.; Francischini, A. C.; & Osipe, J. B. Aplicações isoladas ou associadas de diuron, oxyfluorfen e prometryne para o controle de *Euphorbia heterophylla*. *Planta Daninha*, Viçosa, vol. 29, n. 3, p. 635-645, 2011.

Oliveira, S. C. C.; Gualtieri, S. C. J.; Dominguez, F. A. M.; Molinillo, J. M. G.; Montoya, R. V. Efeito fitoquímico de folhas de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil (Solanaceae) e sua aplicação na alelopatia. *Acta Botânica Brasilica*. V.26, n. 3, p.:607 618, 2012.

Oliveira, A. K. M; Pereira, K. C. L; Muller, J. A. I; Matias, R. Análise fitoquímica e potencial alelopático das cascas de *Pouteria ramiflora* na germinação de alface. *Horticultura Brasileira*. v.32, p.41-47, 2014.

Omena, W. E. C.; Franco, S. P. B; Sousa, J. S.; Morilla, D. P. Fracionamento biodirecionado da atividade alelopática da planta *mimosa tenuiflora* e identificação de seus compostos fenólicos. *EDUCTE: Revista Científica do Instituto Federal de Alagoas*, v. 9, n. 1, p. 1075-1086, 2020.

Pabon, C. L.; Cuca, L. E. Aporphine alkaloids from *Ocotea macrophylla* (lauraceae). *Quimica Nova*, v. 33, n. 4, p.875-879, 2010.

Pacheco, L. P.; Petter, F. A.; Soares, L. S.; Silva, R. F.; Oliveira, J. B. S. Sistemas de produção no controle de plantas daninhas em culturas anuais no Cerrado Piauiense. *Revista Ciência Agronômica*, v.47, n.3, p.500-508, 2016.

Pelegri, L. L.; Cruz Silva, C. T. A. Variação sazonal na alelopatia de extratos aquosos de *Coleus barbatus* (A.) Benth. sobre a germinação e o desenvolvimento de *Lactuca sativa* L. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 14, p. 376-382, 2012.

Pereira, R. J.; Cardoso, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

Pereira, V. C.; Grisi, P. U.; Dodonov, P.; Anese, S.; Toffano, L.; Gualtieri, S. C. J. Atividade fitotóxica de *Serjania lethalis* sobre a germinação e crescimento de *Panicum maximum*. *Biotemas*, Florianópolis, v. 27, n. 1, p. 29-35, 2014.

Phillipson, G. W. & Anderson, A. C.; *J. Ethnopharmacol*, 25, p. 61-65, 1998.

Ranal, M. A.; Santana, D. G. How and why to measure the germination process? *Revista Brasileira de Botânica*. v. 29, p. 1-11, 2006.

Rezende, F. M.; Rosado, D.; Moreira, F. A.; Carvalho, W. R. S. Vias de síntese de metabólitos secundários em plantas. VI Botânica no Inverno. 1ed. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, v. 1, p. 93-105, 2016.

Roymann, J. Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*. v. 14, p. 246-251, 2011.

Sano, E. E.; Rosa, R.; Brito, J. L. S.; & Ferreira L. G. Land cover mapping of the tropical savanna region in Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment*. v. 166, n. 1-4, p. 113-124, 2010.

Santos, C. F.; Novak, E. Plantas nativas do Cerrado e possibilidades em fitorremediação. *Revista de Ciências Ambientais*, v. 7, n. 1, p. 67-78, 2013.

Silveira, P. F. Efeito alelopático do extrato aquoso da jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* (Wild.) Poir.) sobre a germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L). Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), Universidade Federal Rural do Semi-Árido Mossoró, RN, 48f, 2010.

Silveira, L. M. S; Moraes, D. C.; Olea, R. S. G.; Cruz, A. L. N.; Mendes, J. C.; Moraes, L.S. Atividade antibacteriana de duas espécies vegetais do gênero *Ocotea*. *Revista Florence*. n.1, 2011.

Taiz, L.; Zeiger, E.; Moller, I.; & Murphy, A. *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. (6.ed.). Porto Alegre: Artmed. 888 p, 2017.

Teerarak, M.; Laosinwattana, C.; Charoenying, P.; Katonoguchi, H. Allelopathic activities of *Jasminum officinale* f. var. *grandiflorum* (Linn.) Kob.: Inhibition effects on germination, seed imbibition, and  $\alpha$ -amylase activity induction of *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. *African Journal of Biotechnology*, vol. 11, p. 7850-7854, 2012.

Trezzi, M. M.; Xavier, E.; Vidal, R. A.; Portes, E. D. S.; Vottri, M.; & Lamego, F. P. Teste rápido de imersão foliar de *Euphorbia heterophylla* para confirmação de resistência a herbicidas inibidores da Protoc e da ALS. *Planta Daninha*, 29:901-12, 2011.

Trezzi, M. M.; Machado, A. B.; & Xavier, E. Soja: Impacto do leiteiro e estratégias de manejo. *Cultivar*, n. 183, p. 8-10, 2014.

Vasconcelos, M. C. C.; Silva, A. F. A.; Lima, R. S. Interferência de plantas daninhas sobre plantas cultivadas. *Revista Agropecuária Científica no SemiÁrido, Campos de Patos-PB*, v. 8, p. 1-6, 2012.

Verdeguer, M.; García-Rellán, D.; Boira, H.; Pérez, E.; Gandolfo, S.; Blázquez, M. A. Herbicidal Activity of *Peumus boldus* and *Drimys winterii* Essential Oils from Chile. *Molecules*, v. 16, p. 403-411, 2011.

Weir, T. L.; Park, S. W.; Vivanco, J. M. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 7:4, p. 472-479, 2004.

Weston, L. A.; Mathesius, U. Flavonoids: their structure, biosynthesis and role in the rhizosphere, including allelopathy. *Journal of Chemical Ecology*. V. 39, p.: 283- 297, 2013.

Wu, A.; Yu, H.; Gao, S.; Huang, C.; He, W.; Miao, S.; Dong, M. Differential belowground allelopathic effects of leaf and root of *Mikania micrantha*. *Trees, Heidelberg*. v. 23, p.11-17, 2009.

Xavier, E., Trezzi, M. M., Oliveira, M. C., Vidal, R. A., & Brusamarello, A. P. Activity of Antioxidant Enzymes in *Euphorbia heterophylla* Biotypes and their Relation to Cross Resistance to ALS and Protox Inhibitors. *Planta Daninha*, v. 36, p. 1-14, 2018.

Yamaguchi, K. K. de L. Estudos biológicos dos extratos e composição química dos óleos essenciais de espécies da família Lauraceae. 2011. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal Do Amazonas, Manaus, 2011.

Zanin, S. M. W.; Lordello, A. L. L.; Alcalóides aporfinóides do gênero *Ocotea* (Lauraceae). *Química Nova*, Vol. 30, No. 01, Pp. 92-98, 2007.

## CAPITULO 2

### **Phytotoxic potential of benzyl salicylate and benzyl benzoate on bioindicator and invasive species**

Potencial fitotóxico de salicilato de benzila e benzoato de benzila sobre espécies bioindicadoras e invasoras

**RESUMO**

O crescente número de espécies invasoras nas áreas agrícolas reduz a produtividade e resulta em perdas de produção. A necessidade de descobrir novos compostos com atividade herbicida aumenta à medida que aumentam os casos de resistência de plantas invasoras aos herbicidas. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial fitotóxico do salicilato de benzila e do benzoato de benzila sobre o crescimento de coleótilos de *Triticum aestivum* e sobre o crescimento inicial de *Lactuca sativa*, *Solanum lycopersicum*, *Allium cepa*, *T. aestivum*, *Euphorbia heterophylla* e *Megathyrus maximus*. Para os bioensaios com coleótilos de *T. aestivum*, os tratamentos usaram as concentrações de  $10^{-3}$  M,  $3 \cdot 10^{-4}$  M,  $10^{-4}$  M,  $3 \cdot 10^{-5}$  M e  $10^{-5}$  M; enquanto que para os bioensaios de crescimento inicial foram usadas as concentrações de  $10^{-3}$  M,  $10^{-4}$  M e  $10^{-5}$  M. Ambos os compostos apresentaram um mínimo de 89% de inibição no crescimento dos coleótilos de *T. aestivum* em todas as concentrações. Ambos os compostos inibiram o crescimento do sistema radicular e da parte aérea de *A. cepa* e *E. heterophylla* em todas as concentrações. A espécie mais afetada por ambos os compostos em todos os parâmetros avaliados foi *E. heterophylla*. Para o benzoato de benzila, a inibição das raízes de *E. heterophylla* foi estatisticamente igual às obtidas com o herbicida. Com relação ao salicilato de benzila, a inibição radicular nesta espécie, nos tratamentos  $10^{-4}$  M e  $10^{-5}$  M não diferiu estatisticamente do herbicida nas mesmas concentrações. Salicilato de benzila e benzoato de benzila são compostos que apresentam atividade fitotóxica sobre *E. heterophylla* e pela primeira vez é relatado o efeito fitotóxico desses compostos em espécies invasoras.

Palavras-chave: aleloquímicos, fitotoxicidade, compostos secundários.

## ABSTRACT

The growing number of invasive species in agricultural areas reduces productivity and results in production losses. The need to discover new compounds with herbicidal activity increases as cases of resistance of invasive plants to herbicides rise. The aim of this study was to evaluate the phytotoxic potential of benzyl salicylate and benzyl benzoate upon the growth of *Triticum aestivum* coleoptiles and on the initial growth of *Lactuca sativa*, *Solanum lycopersicum*, *Euphorbia heterophylla*, and *Megathyrus maximus*. For the *T. aestivum* coleoptile bioassays, the treatments used the concentrations of  $10^{-3}$  M,  $3 \cdot 10^{-4}$  M,  $10^{-4}$  M,  $3 \cdot 10^{-5}$  M, and  $10^{-5}$  M; while for the initial growth bioassays the concentrations of  $10^{-3}$  M,  $10^{-4}$  M, and  $10^{-5}$  M were used. Both compounds presented a minimum of 89% growth inhibition on *T. aestivum* coleoptiles in all concentrations. Both compounds inhibited the growth of the root system and shoot of *A. cepa* and *E. heterophylla* at all concentrations. The species most affected by both compounds in all evaluated parameters was *E. heterophylla*. For the benzyl benzoate, the inhibition of the roots of *E. heterophylla* were statistically equivalent to those obtained with the herbicide. Regarding benzyl salicylate, the root inhibition in this species in the  $10^{-4}$  M and  $10^{-5}$  M treatments did not differ statistically from the herbicide in the same concentrations. Benzyl salicylate and benzyl benzoate are compounds that presented phytotoxic activity on *E. heterophylla* and for the first time the phytotoxic effect of these compounds on invasive species is reported.

**Keywords:** allelochemicals, phytotoxicity, secondary compounds.

## 1. INTRODUCTION

The increase in the number of invasive species in agricultural areas causes a reduction in the productivity of agricultural crops resulting in economic losses (Lamego et al., 2013). These plants, besides competing for space with the crop, also compete for nutrients, water, light (Galon et al., 2018), and may also host pests and diseases common to the crop (Alvino et al., 2011; Vasconcelos, Silva & Lima, 2012). The need to discover the herbicidal potential of new compounds increases as cases of resistance to commercial products rise. Brazil is the fifth country with the largest number of herbicide-resistant species, with 50 plant species, behind the United States (165), Australia (95), Canada (68), and France (55) (Heap, 2020). These numbers increase more and more due to bad agricultural practices such as the recurrent use of the same herbicide or herbicides with the same mechanism of action in the same agricultural area. This leads to the selection of herbicide-resistant invasive plant biotypes for a particular mechanism of action.

Guinea grass (*M. maximus*) (Jacq.) B. K. Simon and S. W. L. Jacobs is a Poaceae with intense seed production and high dispersion capacity (Costa, Matallo, Carvalho & Rozanski, 2002). This species is highly invasive and is considered one of the most aggressive species in Brazil (Mantoani & Torezan, 2016), being difficult to control (Aimar & Durigan, 2001) and frequently found in sugarcane crops, causing reduced productivity (Correia, Gomes & Perussi, 2012).

Another species that impairs agricultural production is wild poinsettia (*E. heterophylla* L.), a Euphorbiaceae characterized by high competitive capacity (Oliveira Jr et al., 2011). This species causing losses in quality and productivity in agricultural systems (Kern et al., 2009). *E. heterophylla* can occur in several crops of agricultural importance, including soybean (Carvalho, Bianco & Guzzo, 2010, Lopes Ovejero et al., 2013), corn (Cury et al., 2012), sugar cane (Marques, Martins, Costa, & Vitorino, 2012), and beans (Cury et al., 2011; Machado et al., 2015). It is a hard to control invasive plant, presenting a fast-initial development and great genetic variability (Trezzi, Machado & Xavier, 2014). In addition, due to mutations in the gene that codes the acetolactate synthase (ALS) enzyme, this is a multi-resistant herbicide species. It inhibits the enzyme protoporphyrinogen oxidase - Protox, acetolactate synthase - ALS (Trezzi et al., 2011; Xavier, Trezzi, Oliveira, Vidal & Brusamarello, 2018), being recently reported as resistant to the herbicide glyphosate (inhibitor of the enzyme 5-enolpyruvate-chiquimate-3-phosphate synthase - EPSPS) (Adegas, Gazziero, Oliveira Jr, Mendes & Rodrigues, 2020).

Thus, the search for compounds that have new mechanisms of action, as well as improvements in their application, are essential for the control of invasive plants (Grigolli, Pereira, Peñaherrera, Santos & Ferreira, 2011). An alternative is the use of compounds from the secondary metabolism of plants, which are called allelochemicals, and are associated with plant defense strategies. When released into the environment these compounds may positively or negatively affect the development of other plant species, in the process known as allelopathy (International Allelopathy Society - IAS, 2020; Alves, Medeiros Filho, Innecco & Torres, 2004).

Essential oils are secondary metabolites from different parts of plants that have a complex chemical composition (Oussalah, Caillet, Saucier & Lacroix, 2007). Due to their volatility, they can be used to emit chemical communication signals and as defense mechanisms (Saito & Scramin, 2000). Its effects have been studied mainly due to phytotoxic properties, and uses such as bactericides (Hussain, Anwar, Sherazi & Przybylski, 2008), insecticides (Coitinho, Oliveira, Gondim Júnior & Câmara, 2010), herbicides (Souza Filho, Guilhon & Santos, 2010), and fungicides (Guimarães, Cardoso, Sousa, Andrade & Vieira, 2011).

Among the variety of compounds with these characteristics that can be extracted from plants, the aromatic esters benzyl salicylate (C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>) and benzyl benzoate (C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>) deserve to be highlighted because they have part of their unexplored potential. Benzyl salicylate is a benzyl ester of salicylic acid widely used in industry, being used as a fragrance fixer in the cosmetic, personal hygiene, and household cleaning areas (Lapczynski et al., 2007). This compound is found naturally in plants such as *Polianthes tuberosa* L. (International Fragrance Association - IFRA, 2009) and *Ocotea pulchella* Nees and Mart (Candido et al., 2016).

Benzyl benzoate is a compound frequently used in the pharmaceutical industry as an active ingredient for medicines used in the treatment of scabies (Salavastru, Chosidow, Boffa, Janierv & Tiplica, 2017) and pediculosis (Salavastru, Chosidow, Janierv & Tiplica, 2017). In addition, it is used as an insect repellent (Knowles, 1991), solvent, in the perfumery and cosmetics industry (Pybus & Sell, 2006), as well as in the composition of pesticides (Johnson et al., 2017). This compound can be found naturally in the plants *Citharexylum spinosum* L. (El Ayeb-Zakhama, Sakka-Rouis, Flamini, Jannet & Harzallah-Skhiri, 2017), *Magnolia champaca* L. (Sá, Meneses, Araújo & Oliveira, 2017), and *O. pulchella* (Candido et al., 2016).

Although there are studies reporting the importance of these compounds in several areas, studies on the phytotoxic potential of benzyl salicylate and benzyl benzoate in plant species are still

insufficient. Highlighting the need for studies on their properties and mode of action, in invasive and cultivated plants. Candido et al. (2016), isolated these two compounds from *O. pulchella* plants and evaluated their phytotoxic activity on *T. aestivum* coleoptiles and on the germination and initial growth of *S. lycopersicum* seedlings, verifying its phytotoxic potential. Thus, the potential of these compounds as growth inhibiting agents for some plant species is emphasized. Therefore, this work aimed to evaluate the phytotoxic potential of these compounds on the initial growth of the bioindicator species *L. sativa*, *S. lycopersicum*, *A. cepa*, and *T. aestivum* and of the invasive species *E. heterophylla* and *M. maximus* in order to evaluate if any of these compounds have greater phytotoxicity than the herbicide (a.i. oxyfluorfen).

## 2. MATERIALS AND METHODS

The work was developed at the Laboratory of Ecophysiology of Reproduction and Phytochemical Studies, Department of Botany, Center for Biological and Health Sciences - CCBS, at the Federal University of São Carlos, in the city of São Carlos-SP, Brazil. Both compounds are commercial products that were purchased from a local supplier (benzyl salicylate 98% from Sigma-Aldrich and benzyl benzoate 99% from Neon Commercial Ltda). All experiments were carried out in a climate-controlled chamber type B.O.D under controlled conditions.

### 2.1. Preparation of solutions

The pure benzyl salicylate and benzyl benzoate compounds were pre-solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO) with a concentration of 5  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  and diluted in a buffer solution (pH = 5.6) containing citric acid monohydrate (1.05 g.L), potassium hydrogen phosphate trihydrate (2.9 g.L), and 2% sucrose according to the recommendations of Macías, Lacret, Varela, Nogueiras & Molinillo (2010).

In all bioassays three compounds were evaluated: benzyl salicylate, benzyl benzoate, and positive control, commercial Goal<sup>®</sup> herbicide (a.i. oxyfluorfen 240 g.L<sup>-1</sup>). In the *T. aestivum* coleoptile bioassay, five concentrations were used for each compound: 10<sup>-3</sup> M (treatment 1), 3•10<sup>-4</sup> M (treatment 2), 10<sup>-4</sup> M (treatment 3), 3•10<sup>-5</sup> M (treatment 4), and 10<sup>-5</sup> M (treatment 5), totaling 15 treatments. In the initial seedling growth bioassays, three concentrations were used for each compound: 10<sup>-3</sup> M (treatment 1), 10<sup>-4</sup> M (treatment 2), and 10<sup>-5</sup> M (treatment 3), totaling nine treatments. In addition, in each bioassay, one negative control was performed with buffer solution and DMSO (5  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

### 2.2. Bioassays

#### 2.2.1. General activity bioassay (cytotoxicity) with *T. aestivum* coleoptiles.

The bioassays were performed with wheat diaspores (*T. aestivum* L: Poaceae), BRS 264 cultivar, pre-tinned in plastic boxes covered with 2 sheets of filter paper, moistened with distilled water ( $\pm$  12 mL) and stored in a B.O.D. for 72 hours at 24  $\pm$  1 °C in the absence of light.

After the time spent in the B.O.D. chamber, the coleoptiles were cut in a Van der Weij guillotine and the apical part (2 mm) was discarded as recommended by Hancock, Barlow & Lacey (1964). After this stage, the coleoptiles were cut into 4 mm segments and used in bioassays

(Macías et al., 2010). The assembly of this experiment was carried out in a closed environment with green safety light (Nitsch & Nitsch, 1956).

Three repetitions were used in each treatment, each one being composed of five coleoptiles of *T. aestivum*, kept in test tubes containing 2 mL of solution. The samples, properly identified, were kept at  $24 \pm 1$  °C, in the dark, and with a constant rotation of 1.4 rpm for 24 h, in order to guarantee the homogeneity of the contact between the plant material and the solution. After that period the coleoptiles were removed, photographed, and measured using the ImageJ<sup>®</sup> 1.8.0 software (Macías et al., 2010).

## **2.2.2. Phytotoxicity bioassays**

### **2.2.2.1. Initial growth bioassays**

To evaluate the effect of the compounds on the initial growth of invasive plants, two invasive target species were used: the eudicotyledon wild poinsettia (*E. heterophylla* L. Euphorbiaceae) and the monocotyledon guinea grass (*M. maximus* J. Poaceae). In addition, four target bioindicator species were also employed, two eudicotyledons, lettuce (*L. sativa* L. Asteraceae) and tomato (*S. lycopersicum* L. Solanaceae); and two monocotyledons, wheat (*T. aestivum* L. Poaceae) and onion (*A. cepa* L. Amaryllidaceae). These species are considered indicators of phytotoxic activity because they present important characteristics such as rapid and uniform germination and sensitivity to phytotoxic substances even in low concentrations (Ferreira & Áquila, 2000; Souza Filho et al., 2010).

The diaspores were placed in plastic boxes for germination and moistened with distilled water. After the emergence of the primary root (2 mm) and the identification of positive gravitropism, the diaspores were considered germinated (Brazil, 2009). Then, the diaspores that germinated were transferred to transparent plastic boxes (10.5 x 6 x 4.5 cm) containing two sheets of filter paper moistened with 6 mL of each solution.

Each treatment contained four replicates with ten seedlings of the target species. The boxes with the respective treatments were identified, closed, and kept in a germination chamber at  $27 \pm 1$  °C, under a 12-hour photoperiod, according to Inoue et al. (2010). After eight days, the material was removed from the germination chamber, and measurements were taken of the length of the shoot and the main root (for eudicotyledons *L. sativa*, *S. lycopersicum*, and *E. heterophylla*) and of the shoot and the longest root (for monocotyledons *T. aestivum*, *A. cepa*, and *M. maximus*).

This step was performed with the aid of the ImageJ<sup>®</sup> 1.8.0 software. In addition, in the presence of abnormalities, they were photographed, counted, and characterized as described by Brazil, (2009).

### **2.3. Statistical analysis**

The data obtained were submitted to the Shapiro-Wilk normality test using the Past<sup>®</sup> v.2.17c software (Hammer, Harper & Ryan, 2001). Normal data were subjected to Analysis of Variance (ANOVA), followed by the Tukey test at 5% significance with the aid of the Sisvar<sup>®</sup> v.5.7 software (Ferreira, 2011). Non-normal data were submitted to the Kruskal-Wallis non-parametric test followed by the Dunn test at 5% significance with the aid of the Past<sup>®</sup> v.2.17c software.

### 3. RESULTS

Strong inhibitory activity was observed for both compounds on the growth of *T. aestivum* coleoptiles in all tested concentrations. These results were statistically equivalent to the data obtained with the herbicide in treatments at concentrations of  $10^{-3}$  M,  $3 \cdot 10^{-4}$  M, and  $10^{-4}$  M. In the five concentrations tested for both evaluated compounds ( $10^{-3}$  M,  $3 \cdot 10^{-4}$  M,  $10^{-4}$  M,  $3 \cdot 10^{-5}$  M, and  $10^{-5}$  M), coleoptile growth was inhibited compared to the negative control. The herbicide presented a greater decrease in the inhibition of coleoptile growth especially at concentrations of  $3 \cdot 10^{-5}$  M and  $10^{-5}$  M (54% and 51%, respectively), differing significantly from the treatments with benzyl salicylate and benzyl benzoate, while the same compounds showed no reduction in phytotoxic activity at the five concentrations tested (Figure 1).

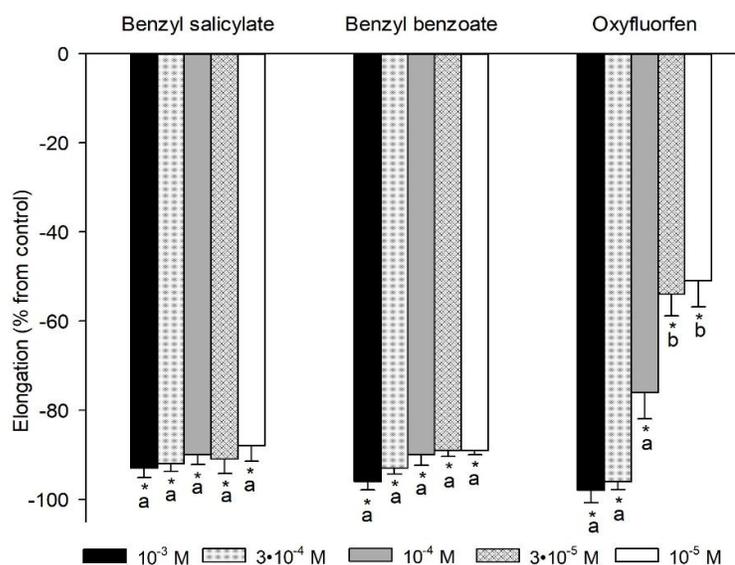


Figure 1. Percentage inhibition of benzyl salicylate, benzyl benzoate, and the herbicide GOAL<sup>®</sup> on the growth of *T. aestivum* coleoptiles. Values expressed as a percentage of inhibition compared to the negative control. (\*) Means differ significantly from the negative control by the Tukey test at 0.05 significance. Means followed by the same letter do not differ significantly from the positive control at the same concentration, by the Tukey test at 0.05.

The results obtained in the initial growth bioassay for the bioindicator species *L. sativa* showed a significant inhibitory activity of benzyl salicylate in the plant shoot and root, at the three concentrations tested. However, the treatments with benzyl benzoate resulted in shoot inhibition at  $10^{-3}$  M and  $10^{-4}$  M concentrations. For the root system there was no significant difference in any of the tested concentrations compared to the negative control in this species. Regarding the root system, all the inhibition values obtained with both compounds in this species were lower than those obtained with the herbicide. However, in the shoot, the  $10^{-5}$  M treatment with benzyl

salicylate was not statistically different from the treatment with the herbicide at the same concentration (Figure 2).

For the bioindicator species *S. lycopersicum*, treatments with benzyl salicylate showed no significant difference from the negative control in the shoot at the three concentrations tested. On the other hand, treatments with this compound resulted in a decrease in root growth, at the three concentrations. However, treatments with benzyl benzoate significantly inhibited the growth of the shoot of this species at concentrations  $10^{-3}$  M, and  $10^{-4}$  M. In the roots showed reduced growth in all treatments tested compared to the negative control (Figure 2).

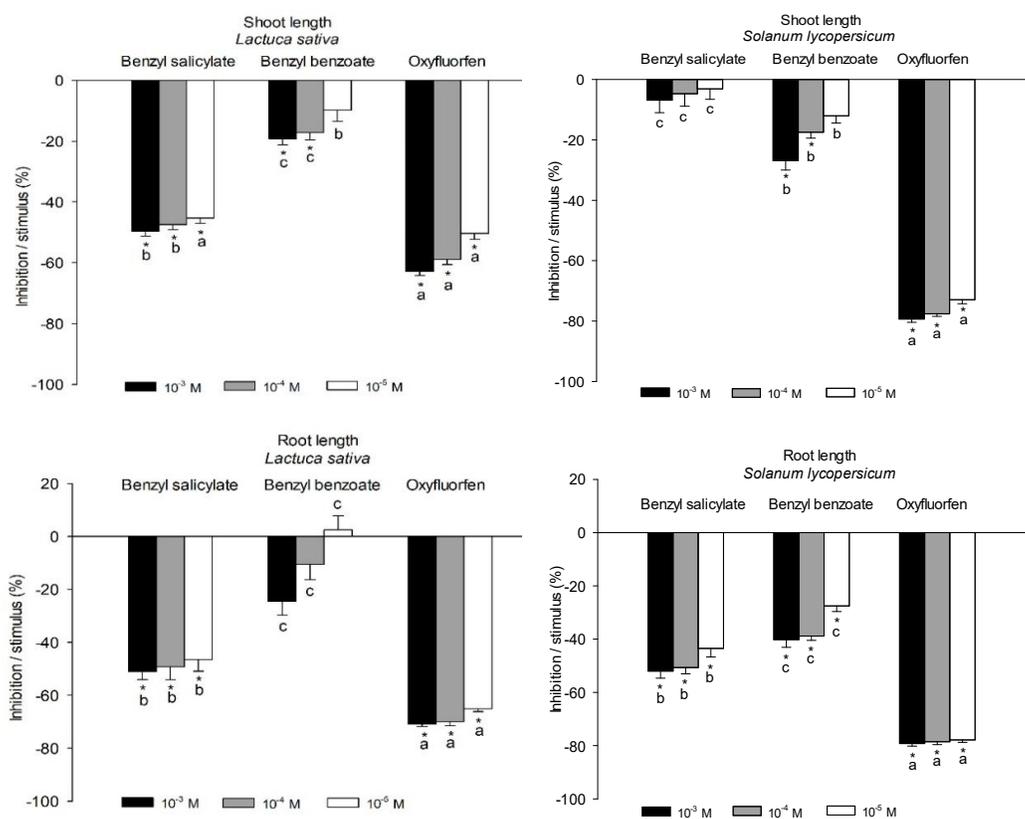


Figure 2. Percentage of inhibition promoted by the action of benzyl salicylate, benzyl benzoate, and the herbicide GOAL<sup>®</sup> on the growth of roots and shoot of the bioindicator species *L. sativa* and *S. lycopersicum*. Values expressed as a percentage of inhibition / stimulus with respect to the negative control. (\*) Means differ significantly from the negative control by the Tukey test at 0.05 significance. Means followed by the same letter do not differ significantly from the positive control at the same concentration, by the Tukey test at 0.05.

In the bioindicator species *A. cepa*, a significant percentage of inhibition was observed compared to the negative control both in the shoot and in the root with all treatments of both

compounds. In this species, all the values of root and shoot inhibition using both compounds were statistically different from those obtained with the herbicide (Figure 3).

For the bioindicator species *T. aestivum*, significant root inhibition was observed with the treatments with both compounds at the concentrations of  $10^{-3}$  M and  $10^{-4}$  M compared to the negative control. When compared to the herbicide, the treatments of both compounds were statistically different. In the shoot, the application of both compounds significantly inhibited the growth at all concentrations compared to the negative control. Regarding the positive control, all the treatments with both compounds showed significant statistical difference from the herbicide (Figure 3).

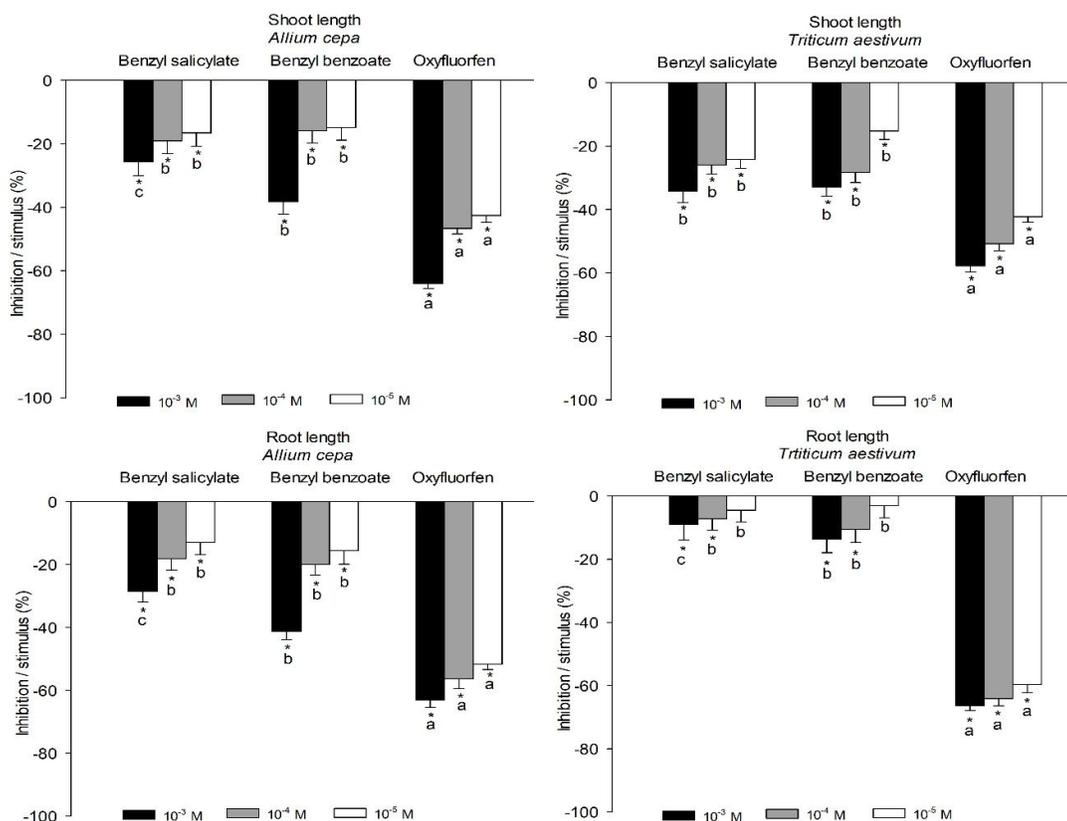


Figure 3 Effect of benzyl salicylate, benzyl benzoate, and the herbicide GOAL<sup>®</sup> on the growth of roots and shoot of the bioindicator species *A. cepa* and *T. aestivum*. Values expressed as a percentage of inhibition / stimulus compared to the negative control. (\*) Means differ significantly from the negative control by the Tukey test at 0.05 significance. Means followed by the same letter do not differ significantly from the positive control at the same concentration, by the Tukey test at 0.05.

For the invasive species *E. heterophylla*, the application of both compounds had a significant inhibitory effect on the growth of the shoot and roots at all concentrations compared to the

negative control. In the shoot, the three compounds significantly inhibited growth at all concentrations tested. For the root system, all treatments with benzyl benzoate were not statistically different from the treatments with the herbicide at the same concentrations. For benzyl salicylate, the treatments  $10^{-4}$  M and  $10^{-5}$  M did not differ statistically from the herbicide treatments at the same concentrations (Figure 4).

Benzyl salicylate significantly reduced the shoot growth of *M. maximus* at the highest concentration ( $10^{-3}$  M). This compound also reduced the root growth at the three concentrations compared to the negative control. On the other hand, treatments with benzyl benzoate significantly reduced the shoot growth of this species at concentrations of  $10^{-3}$  M and  $10^{-4}$  M. For the root part, there was a significant reduction in growth only when the treatment with the highest concentration was applied, compared to the negative control. All the inhibition values of the shoot and the root obtained with the application of both compounds in this species proved to be statistically inferior to those obtained with the herbicide (Figure 4).

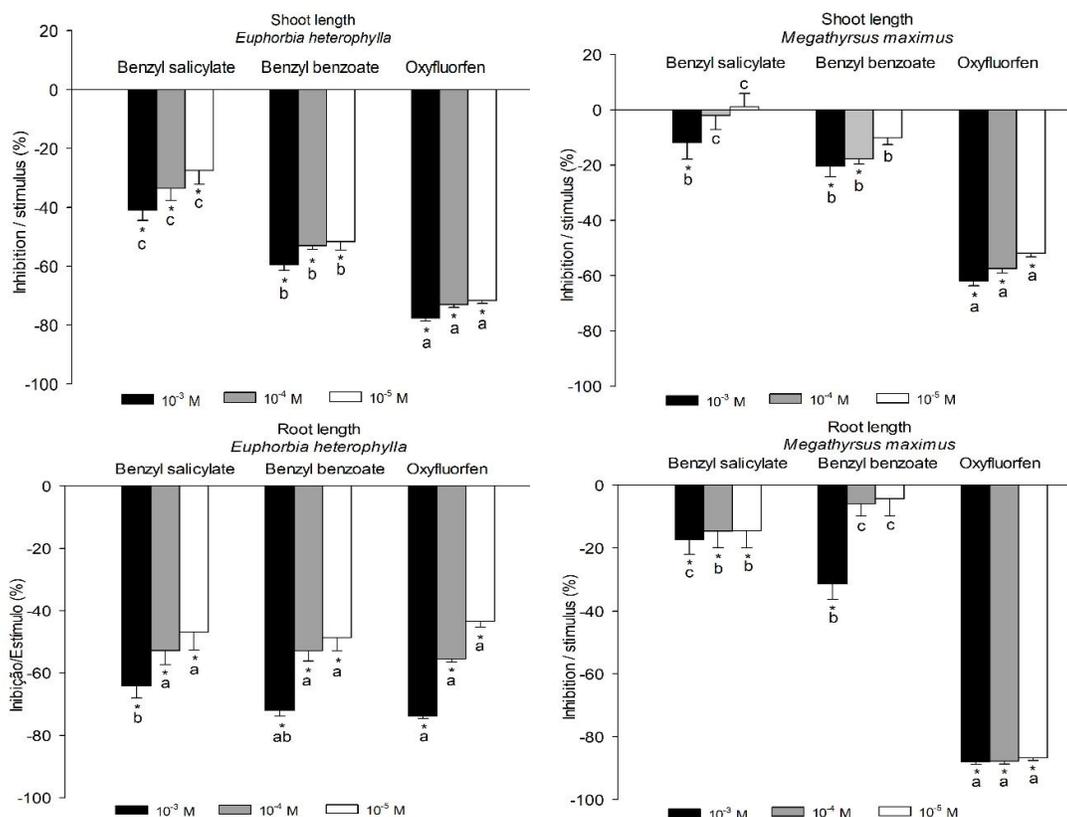


Figure 4. Effect of benzyl salicylate, benzyl benzoate, and the herbicide GOAL<sup>®</sup> on root and shoot growth of invasive species *E. heterophylla* and *M. maximus*. Values expressed as a percentage of inhibition / stimulus compared to the negative control. (\*) Means differ

significantly from the negative control by the Tukey test at 0.05 significance. Means followed by the same letter do not differ significantly from the positive control at the same concentration, by the Tukey test at 0.05.

*E. heterophylla* was the species that presented the highest percentage of abnormalities with the application of both compounds at all tested concentrations (Figure 5). In this species, the application of both compounds showed a statistical difference in all concentrations in relation to the negative control. However, only treatments with the highest concentration of benzyl benzoate showed a significant difference in the species *S. lycopersicum*, *L. sativa* and *M. maximus* (Figure 5). It should be noted that in treatments with the herbicide, there were no abnormalities in the target species due to the high percentage of recorded dead seedlings.

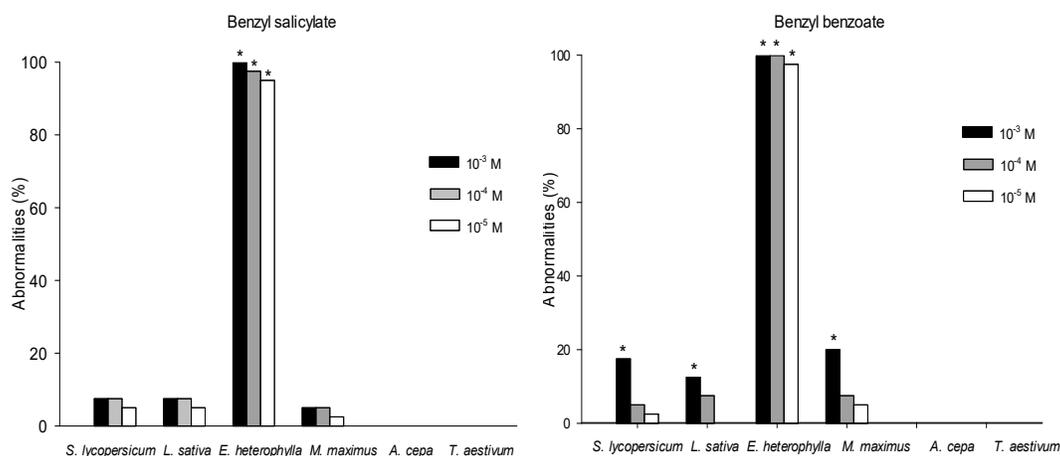


Figure 5. Effect of benzyl salicylate and benzyl benzoate compounds on the percentage of abnormalities in *S. lycopersicum*, *L. sativa*, *E. heterophylla*, *M. maximus*, *A. cepa*, and *T. aestivum* species. (\*) Means differ significantly from the negative control by the Dunn's test at 0.05 significance.

As for the characterization of the abnormalities, *E. heterophylla* was the most affected species. This phenomenon was observed with the application of both compounds. When treatments with benzyl salicylate were used nine abnormalities were verified. Of these, root necrosis (RN), hypocotyl winding (HW), and the poorly developed main root (PDMR) may be highlighted (Figures 6 and 7). Treatments with benzyl benzoate resulted in seven different abnormal parameters, among these the poorly developed main root (PDMR) and hypocotyl winding (HW) stand out (Figures 6 and 7).

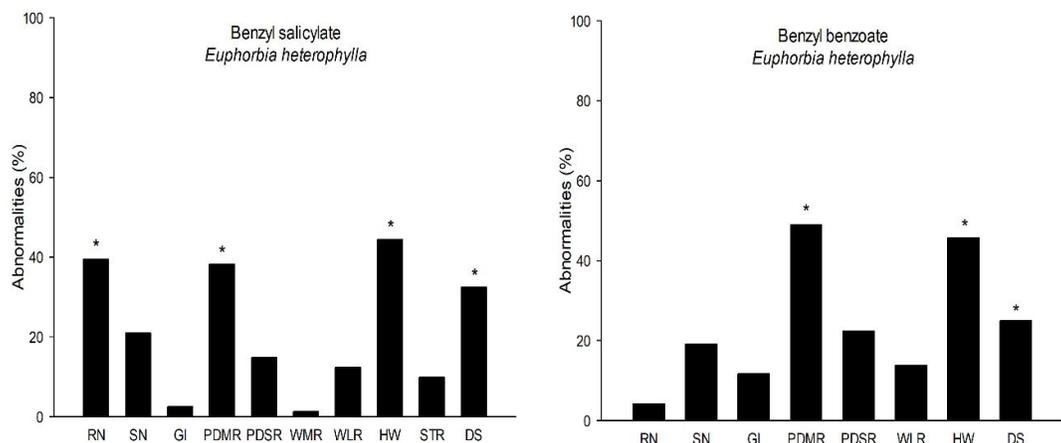


Figure 6. Percentage of abnormalities found, types of anomalies, and dead seedlings identified in treatments with benzyl salicylate and benzyl benzoate in the species *E. heterophylla*. RN (root necrosis), SN (shoot necrosis), GI (gravitropic inversion), PDMR (poorly developed main root), PDSR (poorly developed secondary root), WMR (without main root), WLR (without lateral root), HW (hypocotyl winding), STR (short and thick root) and DS (dead seedling). (\*) Means differ significantly from the negative control by the Dunn's test at 0.05 significance.

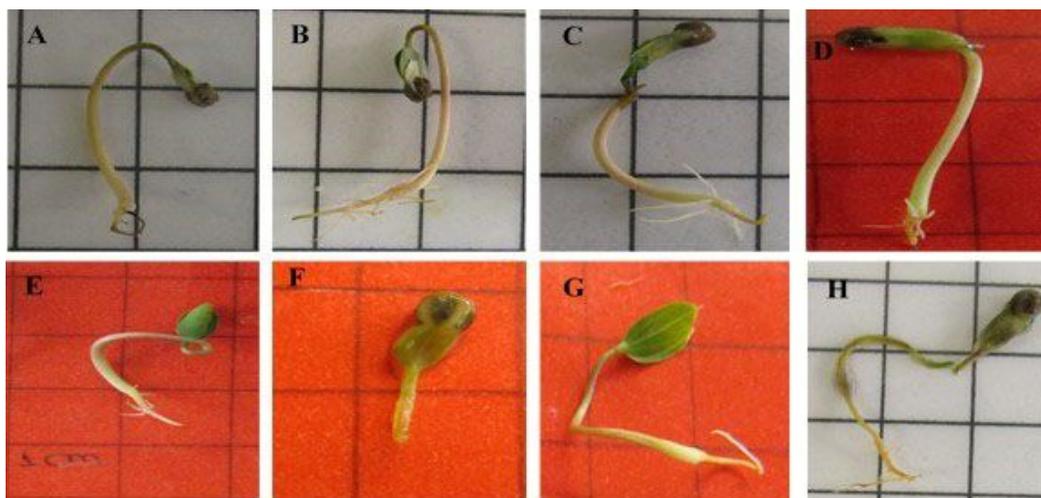


Figure 7. Types of abnormalities found in treatments with benzyl salicylate and benzyl benzoate in the species *E. heterophylla*. Root necrosis (A), gravitropic inversion (B), shoot necrosis (C), poorly developed main root (D), poorly developed secondary root (E), without main root (F), without lateral root (G), hypocotyl winding (H), short and thick root (I), and dead seedling (J).

Among the evaluated species, the bioindicator species and the invasive species *M. maximus* were more tolerant to the compounds used, presenting the lowest percentages of abnormalities and dead seedlings (Table 1).

Table 1. Percentage of anomalies and dead seedlings found in the species *M. maximus*, *L. sativa*, *S. lycopersicum*, *A. cepa*, and *T. aestivum* in treatments with benzyl salicylate and benzyl benzoate.

Anomalies and dead seedlings (%)								
Compound	species	RN	AN	GI	PDMR	WMR	HW	DS
Benzyl salicylate	<i>M. maximus</i>	-	0.92	1.83	-	0.92	0.92	9.17
	<i>L. sativa</i>	6.67	-	2.5	-	-	-	-
	<i>S. lycopersicum</i>	3.48	1.74	-	1.74	-	-	4.17
	<i>A. cepa</i>	-	-	-	-	-	-	1.6
	<i>T. aestivum</i>	-	-	-	-	-	-	-
Benzyl benzoate	<i>M. maximus</i>	-	1.67	-	3.33	5.83	-	-
	<i>L. sativa</i>	6.67	-	-	-	-	-	-
	<i>S. lycopersicum</i>	-	4.35	-	2.61	-	1.74	-
	<i>A. cepa</i>	-	-	-	-	-	-	4.16
	<i>T. aestivum</i>	-	-	-	-	-	-	-

Note: RN (root necrosis), AN (aerial necrosis), GI (gravitropic inversion), PDMR (poorly developed main root), WMR (without main root) HW (hypocotyl winding), and DS (dead seedling).

For the percentage of dead seedlings, in the species *E. heterophylla* the treatments with benzyl salicylate in concentrations  $10^{-3}$  M and  $10^{-4}$  M showed a statistical difference from the negative control. In the *M. maximus* species, only the application of the highest concentration of this compound showed a statistically significant difference (Figure 8).

However, when the tests were performed with benzyl benzoate, the application of the  $10^{-3}$  M and  $10^{-5}$  M treatments showed a significant difference from the negative control only in the species *E. heterophylla* (Figure 8). Finally, in the treatments with the herbicide, only the application of the lowest concentration showed no statistical difference in the species *T. aestivum* (Figure 8).

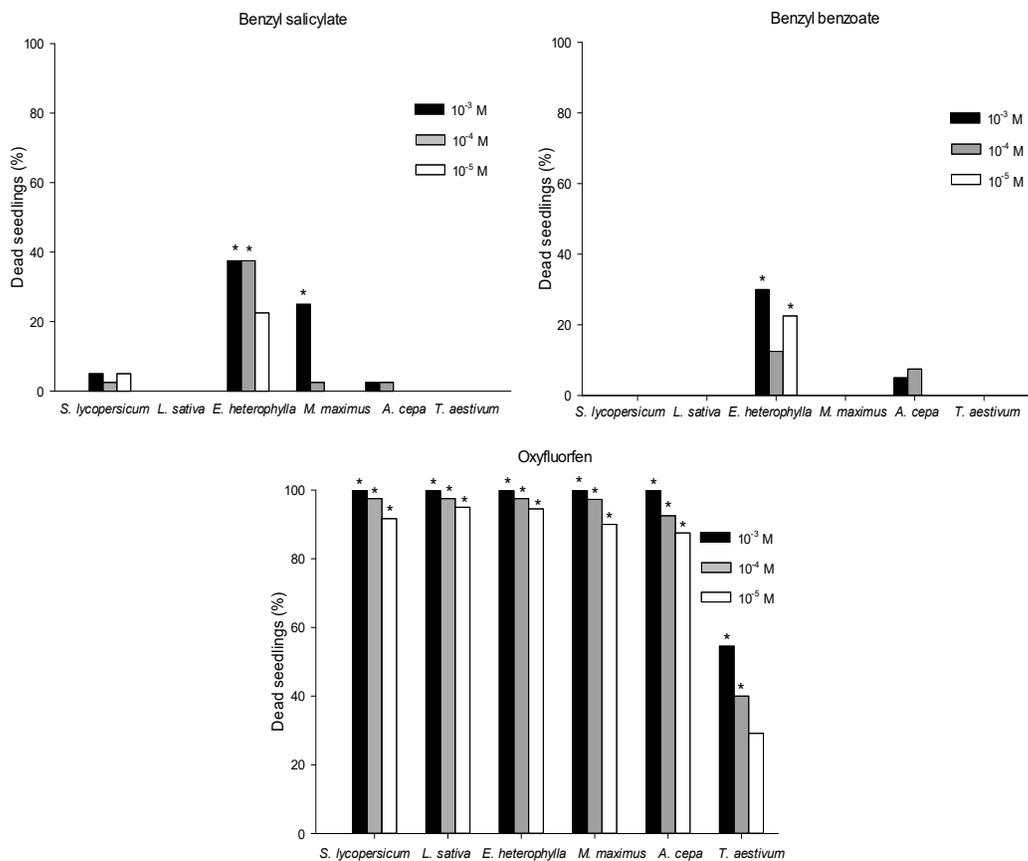


Figure 8. Effect of the benzyl salicylate, benzyl benzoate and the herbicide GOAL<sup>®</sup> on the percentage of dead seedlings found in the species *S. lycopersicum*, *L. sativa*, *E. heterophylla*, and *M. maximus*. (\*) Means differ significantly from the negative control by the Dunn's test at 0.05 significance.

#### 4. DISCUSSION

Some secondary metabolites are important for plant-environment interaction, for instance, allelochemicals may interfere with other plants (Kroymann, 2011). Essential oils have their phytotoxic potential often associated with the content of monoterpenes. This because they affect the growth of plants, causing morphological and physiological changes (Miranda et al., 2014). Inserted in this group of secondary metabolites, esters are characterized by acting as active ingredients with a phytotoxic nature (Tello, 2014).

In the present work, the phytotoxic effect of the esters benzyl salicylate and benzyl benzoate on the development of *T. aestivum* coleoptiles was observed. For the first time its phytotoxic effect on the initial growth of invasive species is reported. Positive results were obtained mainly in the species *E. heterophylla*. These compounds can be potential selective herbicides, since they more effectively inhibited the growth of the species *E. heterophylla*, an invasive species that presents multiple resistance to Protox, ALS, and EPSPS inhibiting herbicides (Trezzi et al., 2011; Xavier et al., 2018; Adegas et al., 2020). This makes this plant an invasive species that is difficult to control, resulting in significant in productivity losses in agricultural systems (Kern et al., 2009).

In the bioassays with *T. aestivum* coleoptiles, the results of the present study showed better uniformity in the inhibition values. This mainly in the lower concentrations ( $3 \cdot 10^{-5}$  M and  $10^{-5}$  M), when compared to the results of Candido et al. (2016), who evaluated the phytotoxic effect of these compounds on the growth of *T. aestivum* coleoptiles (Table 2). This difference may be attributed to the fact that these authors worked with compounds extracted from *O. pulchella*, ignoring their level of purity. Or due to the decrease in the activity of the compounds along the chromatographic fractionations. This may also take place due to the chemical modification or degradation of the active compounds (Dayan & Duke, 2006). In contrast, the compounds used in this work are synthetic compounds with a purity level above 98%.

Table 2. Percentage of growth inhibition of *T. aestivum* coleoptiles under the action of benzyl salicylate and benzyl benzoate compounds.

Concentration	1*	2*
$10^{-3}$ M and $3 \cdot 10^{-4}$ M	>90%	$\geq 93\%$
$10^{-4}$ M	>80%	$\geq 90\%$
$3 \cdot 10^{-5}$ M and $10^{-5}$ M	<40%	$\geq 89\%$

Note: 1 \* values reported in the literature (Candido et al., 2016) and 2 \* values obtained in the present study.

Other authors used pure compounds extracted from different plant species and found their phytotoxic effects on the growth of *T. aestivum* coleoptiles (Anese, Jatobá, Grisi, Gualtieri, Santos, & Berlinck, 2015; Miranda et al., 2015; Jatobá et al., 2016; Silva et al., 2017). Thus, they confirmed that the initial growth bioassays of *T. aestivum* coleoptiles are a classic and efficient method to evaluate the phytotoxic activity of compounds belonging to the secondary plant metabolism (Hancock et al., 1964). Bioassays using *T. aestivum* coleoptiles have the advantage of being fast and sensitive to a wide variety of bioactive substances (Nepomuceno, 2011). In addition, they are widely used because they have proved to be able to evaluate the inhibition or growth stimulus when exposed to phytotoxic substances (Accarini, 2016).

In the initial growth bioassays of *S. lycopersicum* both compounds inhibited root growth at all concentrations. While shoot growth was significantly inhibited only by benzyl benzoate at concentrations of  $10^{-3}$  M and  $10^{-4}$  M. These results corroborated those of Candido et al. (2016) who tested the same compounds and observed root and shoot inhibition of this species at the highest concentration ( $10^{-3}$  M). However, the data of these authors presented a notable decrease in root growth inhibition as the concentrations decreased, as well as stimulation of shoot growth. While the results of the present work remained uniform over the different concentrations.

In general, the four bioindicator species showed uniform inhibition values between treatments with the application of the same compound, even at the lowest concentrations. Corroborating data from the literature that tested different pure compounds from plant extracts. The authors used these bioindicator species and reported root and shoot inhibition mainly at the highest concentration tested. They also reported that there was a rapid decrease in inhibition when the

compounds used were diluted, and in some cases, growth stimulus was observed (Miranda et al., 2015; Silva et al., 2017).

This may emphasize what was previously mentioned. The high purity of the compounds used in this work has interfered in this observed difference, since the data in the literature are related to compounds isolated from plant species. The methods employed to isolate these compounds may leave them with impurities (Leite, 2009). Compared to a synthetic compound with a high degree of purity, such as the ones employed in this study. Other factors may have contributed to the differences observed, such as the variety of the species used, the temperature at which the experiments were conducted, the length of the experiments, as well as the type of compound used. This shows that the response of the plant to secondary metabolites is a species-specific characteristic, in which some species being more sensitive to certain compounds or molecules than others (Ferreira & Áquila, 2000).

Among the invasive species, *M. maximus* was the least affected by both compounds, with the roots being the most affected parameter, in accordance with the results of Candido (2016). Nevertheless, this author, who used leaf extracts of *O. pulchella* containing benzyl salicylate and benzyl benzoate in their composition, observed a greater susceptibility of the *M. maximus* roots to these extracts. On the other hand, *E. heterophylla* obtained a high percentage of inhibition both in the root and in the shoot, being as efficient as the herbicide mainly in the root system. Confirming the results of Candido (2016), who observed the same inhibitory effect on this plant species, mainly in shoot.

In addition, the same author mentioned that the length reduction of *E. heterophylla* roots caused by leaf extracts of *O. pulchella* is due to the decrease in the elongation of metaxylem cells. The presence of benzyl salicylate and benzyl benzoate may have resulted in a lower absorption of water and minerals by the roots. Since the action of the allelochemicals is more evident on these structures, because they have a direct contact with the solution of allelochemicals (Lupini, Sorgonà, Miller & Abenavoli, 2010). However, Carvalho, Carvalho, Abbade Neto & Teixeira (2014) highlighted that this condition makes plants more sensitive, since their elongation depends on cell divisions. Once inhibited they affect the normal development of the plant, resulting in a reduction of the roots and stems of the seedlings (Bogatek, Gniazdowska, Zakrzewska, Oracz & Gawronski, 2005; Kenany & Darier, 2013).

Compounds with phytotoxic activity can inhibit cell elongation. This might be associated with changes in the concentration of plant hormones such as cytokinins and auxins, since these are

of vital importance in the development of roots, vascular differentiation, and in the gravitropism of plants (Gatti, Ferreira, Arduin & Perez, 2010; Grisi, Gualtieri, Anese, Pereira & Forim, 2013).

Cell growth in plants is dependent on the mitotic process. When cell divisions are compromised during germination, most seedlings die or present abnormalities (Imatomi, Novaes & Gualtieri, 2013). Some allelochemicals, besides affecting seedling growth, can completely inhibit the formation of normal seedlings (Juchem, Lauxen, Silva, Denardin & Sobral, 2013). Causing morphological changes such as root atrophy (Formigheiri et al., 2018), little or no root development, necrotic apices, and hypocotyl winding, which can impair the emergence of the seedlings from the soil (Denardin et al., 2018).

The compounds benzyl salicylate and benzyl benzoate induced the appearance of several abnormalities and dead seedlings in the species tested with a higher incidence in *E. heterophylla*. Corroborating the results obtained by Candido (2016), who observed several abnormalities in this species, with the highest percentage of anomalies found in the root system, using *O. pulchella* leaf extracts.

Allelochemicals can cause changes in the plant growth and development such as cellular alterations, changes in the enzymatic activities of the phenylpropanoid pathway, reduction of leaf expansion and root elongation, reduction of the photosynthetic rate, disintegration of the cap, increase in the diameter of the vascular cylinder, and premature lignification of the metaxylem and cell wall. This may impair the nutrient absorption ability, the expansion of cells, and the ability to sustain plant growth (Soltys et al., 2011; Granã et al., 2013; Ferro et al., 2015; Bido et al., 2018).

The high percentage of abnormalities found in *E. heterophylla* in the present study, mainly in the root system, may reveal the action of both compounds on this species. Also, some of the abnormalities observed may seriously compromise the development of the plant. The growth of the root system is characterized by a high metabolic activity and for this reason, the roots are particularly more susceptible to stress by allelochemicals. Some studies have indicated that the impairment of root system growth by the action of allelochemicals is associated with premature lignification of cell walls (Politycka & Mielcarz, 2007; Bubhna et al., 2011).

Abnormal seedlings are those with a damaged or absent primordial structure, that present fragile development or are so deteriorated that their normal development is compromised (Brazil,

2009). The evaluation of abnormalities in seedlings is a fundamental parameter in detecting the phytotoxic effects of allelochemicals. Since they can induce the appearance of abnormalities, thus inhibiting their normal development (Ferreira & Aquila, 2000).

In general, the four bioindicator species and the invasive *M. maximus* presented a low percentage of abnormalities, as well as a low or zero percentage of dead seedlings, as a result of the compounds used. No pattern was observed regarding the presence of abnormalities between monocots and eudicots, with *E. heterophylla* being the species most sensitive to treatments with both compounds.

Candido (2016) found abnormalities in the seedlings of *M. maximus* and *E. heterophylla*, when subjected to the action of *O. Pulchella* extracts. Favaretto (2018) described some abnormalities such as root necrosis, absence of secondary roots, and short and thick roots in *L. sativa* seedlings, when treated with different concentrations of catechin, caffeic acid, and vanillic acid. Likewise, Melo et al. (2017) found abnormalities in this species when treated with different concentrations of *Curcuma zedoaria* essential oil. However, the same authors reported that *S. lycopersicum* seedlings did not show changes in the percentage of abnormal seedlings when exposed to the same treatments with this essential oil. This information shows that tolerance or resistance to secondary metabolites is a species-specific characteristic, in which some species are more sensitive to certain compounds or molecules than others (Ferreira & Áquila, 2000), as observed in the results of the present study.

Information on the mode of action of some allelochemicals on plants is scarce. Since these substances affect several functions and cause many side effects, making them difficult to distinguish from other effects (Goldfarb, Pimentel & Pimentel, 2009). Phytotoxic substances may or may not inhibit germination, besides inducing the appearance of abnormal seedlings. Therefore, the evaluation of seedling abnormalities is an important tool for the identification of phytotoxic substances (Ferreira & Áquila, 2000; Alves, Oliveira, França, Alves & Pereira, 2011).

Oliveira Jr, Pereira, Muller & Matias (2014), mentioned that some compounds may be toxic for one species and not have the same effect on another one, even acting as a stimulant (Almeida, 1988). It is important to mention that results obtained in the laboratory involving phytotoxic activity may be different under natural conditions, since the simultaneous occurrence of biotic and abiotic factors may interfere with the results (Formagio et al., 2010).

## 5. CONCLUSIONS

This study provided knowledge on the effect of the tested compounds upon plant species, reporting for the first time their effect on invasive species. The results obtained showed that the benzyl salicylate and benzyl benzoate compounds have phytotoxic potential. This effect was more evident in *E. heterophylla* since it was the most affected species according to all the evaluated parameters, and in some parameters, the inhibitory effects of both compounds have proved to be as efficient as the herbicide, therefore confirming the phytotoxic potential of both compounds.

## 6. REFERENCES

Accarini, R. B. Atividade fitotóxica de extratos foliares de *Piptocarpha rotundifolia* (candeia) (Less.) Baker – Asteraceae. (Master's thesis, Universidade Federal de São Carlos, Brasil), 2016.

Adegas, F. S., Gazziero, D. L. P., Oliveira Jr, R. S., Mendes, R. R., & Rodrigues L. J. *Euphorbia heterophylla*: um novo caso de resistência ao glifosato no Brasil. Embrapa soja. Comunicado técnico 98, Londrina, PR. 5p, 2020.

Aimar, F. F. P. J., & Durigan, J. C. Controle de capim-colonião na cultura da cana-de-açúcar com herbicidas aplicados em pré-emergência. Revista Brasileira de Herbicidas, vol.2, n.3, p.125-132, 2001.

Almeida, F.S. (1988). Alelopatia e as plantas. Londrina: IAPAR, 68p. (Circular, 53), 1988.

Alves, M. C. S., Medeiros Filho, S., Innecco, R., & Torres, S. B. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.39, n.11, p.1083-1086, 2004.

Alves, L. L., Oliveira, P. V. A., França, S. C., Alves, P. L. C., & Pereira, P. S. Atividade alelopática de extratos aquosos de plantas medicinais na germinação de *Lactuca sativa* L. e *Bidens pilosa* L. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu, v.13, n.3, p.328-336, 2011.

Alvino, C. A., Gricio, L. H., Sampaio F. A., Giroto, M., Felipe, A. L. S., Junior, C. E. I., ... Lima, F. C. C. Interferência e controle de plantas daninhas nas culturas agrícolas. Revista Científica Eletrônica de Agronomia, n.20, 2011.

Anese, S., Jatobá, L. J., Grisi, P. U., Gualtieri, S. C. J., Santos, M. F. C., & Berlinck, R. G. S. Bioherbicide activity of drimane sesquiterpenes from *Drimys brasiliensis* Miers roots. Industrial and Products, 74, 28-35, 2015.

Bido, G. S.; Silva, H. A.; Bortolo, T. S. C.; Maldonado, M. R.; Marchiosi, R.; dos Santos, W. D.; & Ferrarese-Filho, O. Comparative effects of L-DOPA and velvet bean seed extract on soybean lignification. Plant Signaling & Behavior, 13(4), e1451705, 2018.

Bogatek, R., Gniazdowska, A., Zakrzewska, W., Oracz, K., & Gawronski, S. W. Allelopathic effects of sunflower extracts on mustard seed germination and seedling growth. Biologia Plantarum, v. 50, n. 1, p. 156-158, 2005.

Brazil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria da Defesa Agropecuária. Regras para a análise de sementes. Brasília, 395p, 2009.

Bubna, G. A.; Lima, R. B.; Zanardo, D. Y. L.; dos Santos, W. D.; Ferrarese, M. L. L.; & Ferrarese-Filho, O. Exogenous caffeic acid inhibits the growth and enhances the lignification of the roots of soybean (*Glycine max*). *Journal of Plant Physiology*, 168(14), 1627–1633, 2011.

Candido, L. P. Busca de extratos e compostos ativos com potencial herbicida e inseticida nas espécies *Davilla elliptica* St. Hill e *Ocotea pulchella* Nees & Mart (Doctoral dissertation), 2016.

Candido, L. P., Varela, R. M., Torres, A., Molinillo, J. M. G., Gualtieri, S. C. J., & Macías, F. A. Evaluation of the Allelopathic Potential of Leaf, Stem, and Root Extracts of *Ocotea pulchella* Nees et Mart. *Chemistry & Biodiversity*. 13. p1058 – 1067, 2016.

Carvalho, L. B., Bianco, S., & Guzzo, C. D. Interferência de *Euphorbia heterophylla* no crescimento e acúmulo de macronutrientes da soja. *Planta Daninha*, v. 28, p. 33-39, 2010.

Carvalho, W. P., Carvalho, G. J., Abbade Neto, D. O., & Teixeira, L. G. V. Alelopatia de extratos de adubos verdes sobre a germinação e crescimento inicial de alface. *Bioscience Journal*, vol. 30, p. 1-11, 2014.

Coitinho, R. L. B. C., Oliveira, J. V., Gondim Júnior, M. G., & Câmara, C. A. G. Persistência de óleos essenciais em milho armazenado, submetido à infestação de gorgulho do milho. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 40, n. 7, p. 1492-1496, 2010.

Correia, N. M., Gomes, L. P., & Perussi, F. J. Control of *Brachiaria decumbens* and *Panicum maximum* by S-metolachlor as influenced by the occurrence of rain and amount of sugarcane straw on the soil. *Acta Sci. Agron. Maringá*, vol.34 no.4, 2012.

Costa, E. A. D., Matallo, M. B., Carvalho, J. C., & Rozanski, A. Eficiência de nova formulação do herbicida oxyfluorfen no controle de plantas daninhas em área de *Pinus caribea* morelet var. hondurensis barr. et Golf. *Revista Árvore*, v. 26, p. 683-689, 2002.

Cury, J. P., Santos, J. B., Silva, D. V., Carvalho, F. P., Braga, R. R., Byrro, E. C. M., & Ferreira, E. A. Produção e partição de matéria seca de cultivares de feijão em competição com plantas daninhas. *Planta Daninha*, v. 29, n. 1, p. 149-158, 2011.

Cury, J. P., Santos, J. B., Silva, E. B., Byrro, E. C. M., Braga, R. R., Carvalho, F. P., & Silva, D. V. Acúmulo e partição de nutrientes de cultivares de milho em competição com plantas daninhas. *Planta Daninha*, Viçosa-MG, v. 30, n. 2, p. 287-296, 2012.

Dayan, F. E.; & Duke, S. O. Clues in the search for new herbicides. In: reigosa, M. J.; Pedrol, N.; González, L. (Eds.). *Allelopathy – A Physiological Process With Ecological Implications*. Netherlands, Springer, p. 63-83, 2006.

Denardin, R. B. N., Kraemer, A, Corona, J. M., Bernardi, D., Sobral, L. S., & Moura, N. F. Potencial alelopático de extratos de folhas e frutos verdes de feijão de porco (*Canavalia ensiformis* (L.) DC.). In: X Congresso Brasileiro de Agroecologia. Anais, Brasília. Vol. 13, Nº 1, 2018.

El Ayeub-Zakhama, A., Sakka-Rouis, L., Flamini, G., Jannet, H. B., & Harzallah-Skhiri, F. Chemical composition and allelopathic potential of essential oils from *Citharexylum spinosum* L. grown in Tunisia. *Chem Biodivers* 14(4):e1600225, 2017.

Favaretto, A. Identificação e avaliação de compostos bioativos de capim-annoni em plantas daninhas. (Doctoral dissertation), 2018.

Ferreira, G. A., & Áquila, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Campinas, v. 12, p.175- 204, Edição Especial, 2000.

Ferreira, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039- 1042, 2011.

Ferro, A. P.; Marchiosi, R.; Siqueira-Soares, R. C.; Bonini, E. A.; Ferrarese, M. L. L.; & Ferrarese-Filho, O. Effects of cinnamic and ferulic acids on growth and lignification of maize roots. *J Allel Inter.* 1:29 – 38, 2015.

Formagio, A. S. N., Masetto, T. E., Baldivia, D. S., Vieira, M. C., Zárate, N. A. H., & Pereira, Z. V. Potencial alelopático de cinco espécies da família Annonaceae. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v. 8, n. 4, p. 349-354, 2010.

Formigheiri, F. B., Bonome, L. T. S., Bittencourt, H. V. H., Leite, K., Reginatto, M., & Giovanetti, L. K. (Alelopatia de *Ambrosia artemisiifolia* na germinação e no crescimento de plântulas de milho e soja. *Revista de Ciências Agrárias*, Lisboa, v. 41, n. 3, p. 729-739, 2018.

- Galon, L., Santin, C. O., Andres, A., Basso, F. J. M., Nonemacher, F., Agazzi, L. R., ... Fernandes, F. F. Competitive Interaction Between Sweet Sorghum with Weeds. *Planta Daninha*, v.36, p.1-13, 2018.
- Gatti, A. B., Ferreira, A. G., Arduin, M., & Perez, S. C. G. A. Allelopathic effects of aqueous extracts of *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze on development of *Sesamum indicum* L. seedlings. *Acta Botânica Brasílica*, v. 24, p. 454-461, 2010.
- Goldfarb, M., Pimentel, L. W., & Pimentel, N. W. Alelopatia: relações nos agroecossistemas. *Tecnol. & Ciên. Agropec.*, João Pessoa, v.3, n.1, p.23-28,2009.
- Graña, E., Sotelo, T., Díaz-Tielas, C., Araniti, F., Krasuska, U., Bogatek, R., Reigosa, M.J., & Sánchez-Moreiras, A. M. Citral induces auxin and ethylene-mediated malformations and arrests cell division in *Arabidopsis thaliana* roots. *Journal Chemical Ecology*, v. 39, p. 271-282, 2013.
- Grisi, P. U., Gualtieri, S. C. J., Anese, S., Pereira, V. C., & Forim, M. R. Efeito do extrato etanólico de *Serjania lethalis* no controle de plantas daninhas. *Planta Daninha*.31(2):239-248, 2013.
- Grigolli, J. F. J., Pereira, F. C. M., Peñaherrera, L. C., Santos, E. A., & Ferreira, M. C. Controle de *Euphorbia heterophylla* com mesotrione e óleos para diferentes pontas de pulverização. *Revista Brasileira de Herbicidas*, S.l., v. 10, n. 3, p. 266-276, 2011.
- Guimarães, L. G. L., Cardoso, M. G., Sousa, P. E., Andrade, J., & Vieira, S. S. Atividade antioxidante e antifúngica do óleo essencial da capim-limão e citral. *Revista Ciência Agronômica*, Fortaleza, v. 42, n. 2, p. 464-472, 2011.
- Hammer, O., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. Past: Paleontological Statistic software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica* 4 (1): 1-9, 2001.
- Hancock, C. R., Barlow, H. W. B., & Lacey, H. J. The east malling coleoptile straight growth test method. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v.15, n.1, p.166-17., 1964
- Heap, I. The International Herbicide-Resistant Weed Database. Accessed March 04, 2020, available at: <http://www.weedscience.org/Pages/GeoChart.aspx>.
- Hussain, A. I., Anwar, F., Sherazi, S. H. T., & Przybylski, R. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry*, Oxford, v. 108, n. 3, p. 986-995, 2008.

IFRA - International Fragrance Association. Standards, including amendments as of October 14<sup>th</sup>. International Fragrance Association, Brussels, 2009.

Imatomi, M., Novaes, P., & Gualtieri, S. C. J. Interspecific variation in the allelopathic potential of the family Myrtaceae. *Acta Botanica Brasilica* 27:54-61, 2013.

IAS – International Allelopathy Society. 2020. Accessed January 12, 2020, available at: <https://allelopathy-society.osupytheas.fr/about/>.

Jatobá, L. J., Varela, R. M., González, J. M., Din, Z. U., Gualtieri, S. C. J., Rodrigues-Filho, E., & Macías, F. A. Allelopathy of Bracken Fern (*Pteridium arachnoideum*): New Evidence from Green Fronds, Litter, and Soil. *Plos One*, v. 11, p. e0161670, 2016.

Johnson, W., Bergfeld, W. F., Belsito, D. V., Hill, R. A., Klaassen, C. D., Liebler, D. C., ... Andersen, F. A. Safety Assessment of Benzyl Alcohol, Benzoic Acid and its Salts, and Benzyl Benzoate. *International journal of toxicology*, v. 36, n. 3 suppl, p. 5S-30S, 2017.

Juchem, F., Lauxen, G. A., Silva, F. B., Denardin, R. B. N., & Sobral, L. S. Potencial alelopático de diferentes extratos de frutos de adubos verdes sobre a germinação de sementes de couve. *Cadernos de Agroecologia*, v. 8, n. 2, 2013.

Kenany, E. T., & Darier, S. M. Suppression effects of *Lantana camara* L. aqueous extracts on germination efficiency of *Phalaris minor* Retz. and *Sorghum bicolor* L. (Moench). *Journal of Taibah University for Science*, v. 7, n. 2, p. 64-71, 2013.

Kern, K. A., Pergo, E. M., Kagami, F. L., Arraes, L. S., Sert, M. A., & Ishii-Iwamoto, E. L. The phytotoxic effect of exogenous ethanol on *Euphorbia heterophylla* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.47, n.2, p. 1095 – 1101, 2009.

Knowles, C. O. Benzyl Benzoate. In Hayes, Jr. W. J., Laws, Jr. E. R. *Handbook of Pesticide Toxicology, Volume 3: Classes of Pesticides*. Academic Press, 1991.

Kroymann, J. Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*. v. 14, p. 246-251, 2011.

Lamego, F. P., Ruchel, Q., Kaspary, T. E., Gallon, M., Basso, C. J., & Santi, A.L. Habilidade competitiva de cultivares de trigo com plantas daninhas. *Planta daninha, Viçosa*, v. 31, n. 3, p. 521-531, 2013.

Lapczynski, A., McGinty, D., Jones, L., Bhatia, S., Letizia, C. S., & Letizia, A. M. Fragrance material review on benzyl salicylate. *Food and Chemical Toxicology*, 45, S362–S380, 2007.

Leite, F. Impurezas de degradação. *Scientia Chromatographica*, v.1, n. 2, p. 63- 72, 2009.

Lopes Ovejero, R. F., Soares, D. J., Oliveira, W. S., Fonseca, L. B., Berger, G. U., Soteris, J., & Christoffoleti, P. J. Residual herbicides in weed management for glyphosate-resistant soybean in Brazil. *Planta daninha*, vol. 31 nº4, 2013.

Lupini, A., Sorgonà, A., Miller, A. J., & Abenavoli, M. R. Short-term effects of coumarin along the maize primary root axis. *Plant Signaling & Behavior*, v. 5, p. 1395-1400, 2010.

Machado, A. B., Trezzi, M. M. I., Vidal, R. A., Patel, F., Cieslik, L. F., & Debastiani, F. Rendimento de grãos de feijão e nível de dano econômico sob dois períodos de competição com *Euphorbia heterophylla*. *Planta daninha*, vol. 33 no.1, 2015.

Macías, F. A., Lacret, R., Varela, R. M., Nogueiras, C., & Molinillo, J. M. G. Isolation and phytotoxicity of terpenes from *Tectona grandis*. *Journal of Chemical Ecology*, v.36, n.4, p. 396-404, 2010.

Mantoani, M. C., & Torezan, J. M. D. Regeneration response of Brazilian Atlantic Forest woody species to four years of *Megathyrus maximus* removal. *Forest Ecology and Management*. 359: 141–146p, 2016.

Marques, R. P., Martins, D., Costa, S. I. A., & Vitorino, H. S. Densidades de palha e condições de luminosidade na germinação de sementes de *Euphorbia heterophylla*. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 33, n. 3, p. 867-872, 2012.

Melo, S. C., Sa, L. E. C., Oliveira, H. L. M., Trettel, J. R., Silva, P. S., Goncalves, J., ... Magalhaes, H. M. Chemical constitution and allelopathic effects of *Curcuma zedoaria* essential oil on lettuce achenes and tomato seeds. *Australian Journal of Crop Science*, Vol. 11, No. 7, 906-916, 2017.

Miranda, C. A. S. F., Cardoso, M. G., Carvalho, M. L. M., Figueiredo, A. C. S., Nelson, D. L. N., Oliveira, C. M., ... Albuquerque, L. R. M. Chemical composition and allelopathic activity of *Parthenium hysterophorus* and *Ambrosia polystachya* weeds essential oils. *American Journal of Plant Sciences*, Irvine, v. 5, n. 9, p. 1248-1257, 2014.

- Miranda, M. A., Varela, R. M., Torres, A., Molinillo, J. M., Gualtieri, S. C. J., & Macías, F. A. Phytotoxins from *Tithonia diversifolia*. *J. Nat. Prod.* 78, 1083–1092, 2015.
- Nepomuceno, M. (2011). Intervalo de dessecação de *Urochloa ruziziensis* (R. German & Evrard) Crins e seu efeito alelopático na cultura da soja RR (Doctoral dissertation), 2011.
- Nitsch, J. P., & Nitsch, C. Studies on the growth of coleoptiles and first internod sections. A new, sensitive, straight-growth test for auxins. *Plant Physiology*, v. 31, n. 2, p. 94-111, 1956.
- Oliveira Jr, R. S., Carneiro, J. C., Constantin, J., Santos, G., Martini, P. E., Francischini, A. C., & Osipe, J. B. Aplicações isoladas ou associadas de diuron, oxyfluorfen e prometryne para o controle de *Euphorbia heterophylla*. *Planta Daninha, Viçosa*, vol. 29, n. 3, p. 635-645, 2011.
- Oliveira, A. K. M., Pereira, K. C. L., Muller, J. A. I., & Matias, R. Análise fitoquímica e potencial alelopático das cascas de *Pouteria ramiflora* na germinação de alface. *Horticultura Brasileira*, vol. 32: 41-47, 2014.
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., & Lacroix, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, v. 18, n. 5, p. 414-420, 2007.
- Politycka, B.; & Mielcarz, B. Involvement of ethylene in growth inhibition of cucumber roots by ferulic and p-coumaric acids. *Allelopathy Journal*. 19:451–460, 2007.
- Pybus, D. H., & Sell, C. S. *The Chemistry of Fragrances. From Perfumer to Consumer* (2nd ed.). RSC Publishing, London, 2006.
- Sá, A. G. A., Meneses, A. C., Araújo, P. H. H., & Oliveira, D. A review on enzymatic synthesis of aromatic esters used as flavor ingredients for food, cosmetics and pharmaceuticals industries. *Trends in Food Science & Technology*, p. 95-105, 2017.
- Saito, M. L., & Scramin, S. *Plantas aromáticas e seu uso na agricultura*. Jaguariúna: EMPRABA, 48 p. Embrapa meio ambiente. Documentos, 20, 2000.
- Salavastru, C. M., Chosidow, O., Boffa, M. J., Janier, M., & Tiplica, G. S. European guideline for the management of scabies. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 31(8):1248-53, 2017.
- Salavastru, C. M., Chosidow, O., Janier, M., & Tiplica, G. S. European guideline for the management of pediculosis pubis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. Sep;31 (9):1425-1428, 2017.

- Silva, B. P., Nepomuceno, M. P., Varela, R. M., Torres, A., Molinillo, J. M. G., Alves, P. L. C. A., & Macías F. A. Phytotoxicity Study on *Bidens sulphurea* Sch. Bip. as a Preliminary Approach for Weed Control. *J. Agric. Food Chem.* 65, 5161–5172, 2017.
- Soltys, D., Rudzińska-Langwald, A., Kurek, W., Gniazdowska, A. Sliwinska, E., & Bogatek, R. Cyanamide mode of action during inhibition of onion (*Allium cepa* L.) root growth involves disturbances in cell division and cytoskeleton formation. *Planta*, v. 234, p. 609-621, 2011.
- Souza Filho, A. P. S., Guilhon, G. M. S. P., & Santos, L. S. Metodologias empregadas em estudos de avaliação da atividade alelopática em condições de laboratório: revisão crítica. *Planta Daninha, Viçosa*, v. 28, n. 3, p. 689-697, 2010.
- Taiz, L., Zeiger, E., Moller, I., & Murphy, A. *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. (6.ed.). Porto Alegre: Artmed. 888 p, 2017.
- Tello, C. C. *Las Plantas alelopáticas*. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Ciencias de la Vida, p.202, 2014.
- Trezzi, M. M., Xavier, E., Vidal, R. A., Portes, E. D. S., Vottri, M., & Lamego, F. P. Teste rápido de imersão foliar de *Euphorbia heterophylla* para confirmação de resistência a herbicidas inibidores da Protox e da ALS. *Planta Daninha*, 29:901-12, 2011.
- Trezzi, M. M., Machado, A. B. & Xavier, E. Soja: Impacto do leiteiro e estratégias de manejo. *Cultivar*, n. 183, p. 8-10, 2014.
- Vasconcelos, M. C. C., Silva, A. F. A., & Lima, R. S. Interferência de plantas daninhas sobre plantas cultivadas. *Agropecuária científica no semiárido*. v.8, n.1, p. 01-06, 2012.
- Xavier, E., Trezzi, M. M., Oliveira, M. C., Vidal, R. A., & Brusamarelo, A. P. Activity of Antioxidant Enzymes in *Euphorbia heterophylla* Biotypes and their Relation to Cross Resistance to ALS and Protox Inhibitors. *Planta Daninha*, v. 36, p. 1-14, 2018.

### CAPITULO 3

**Atividade fitotóxica de subfrações oriundas da fração acetato  
etílica de folhas de *Ocotea pulchella* Nees & Mart sobre espécies  
invasoras de culturas agrícolas**

## RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial fitotóxico de subfrações oriundas da fração acetato etílica de folhas da espécie *Ocotea pulchella*, sobre o crescimento de coleóptilos de *Triticum aestivum*, no crescimento inicial das espécies invasoras *Euphorbia heterophylla* e *Megathyrus maximus* e no alongamento das células do metaxilema radicular de *E. heterophylla*. Todas as oito subfrações inibiram significativamente o crescimento de coleóptilos de *T. aestivum* na maior concentração e sete destas o fizeram também nas outras duas concentrações. As subfrações A1, A2, A3 e A4 foram selecionadas para continuar os experimentos de crescimento, onde ambas espécies-alvo se mostraram suscetíveis a ação das subfrações tanto na parte aérea como nas raízes. Em ambas espécies, todos os tratamentos das subfrações A1 e A2 exerceram os maiores valores de inibição no crescimento da raiz e parte aérea. Na espécie *E. heterophylla*, as subfrações A1 e A2 exerceram valores de inibição estatisticamente iguais aos exercidos pelo herbicida em todas as concentrações. As quatro subfrações promoveram o aparecimento de anormalidades e plântulas mortas em *E. heterophylla*, mas os maiores valores foram observados quando aplicados os tratamentos das subfrações A1 e A2. A cromatografia em camada delgada revelou que na fração A1 estão presentes os compostos fitotóxicos salicilato de benzila e benzoato de benzila. A redução no crescimento radicular das plântulas de *E. heterophylla* pode estar relacionada com a diminuição no alongamento das células do metaxilema. Com base nos resultados obtidos, conclui-se que subfrações da espécie *O. pulchella* possuem atividade fitotóxica.

Palavras chave: Fitotoxinas, subfracionamento, plantas invasoras.

## ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the phytotoxic potential of subfractions from the ethyl acetate extract of leaves of the species *Ocotea pulchella*, on the growth of coleoptiles of *Triticum aestivum*, on the initial growth of invasive species *Euphorbia heterophylla* and *Megathyrus maximus* and on the elongation of *E. heterophylla* root metaxylem cells. All eight subfractions significantly inhibited the growth of *T. aestivum* coleoptiles in the highest concentration (0.8 mg. ML-1) and seven of these also did in the other two concentrations (0.4 mg. ML-1 and 0.2 mg ml-1). Subfractions A1, A2, A3 and A4 were selected to continue the growth experiments, where both target species were susceptible to the action of subfractions both in the aerial part and in the roots. In both species, all treatments of subfractions A1 and A2 exerted the highest values of inhibition on root and shoot growth. Subfractions A1 and A2 exerted inhibition values statistically equal to those exerted by the herbicide in all tested concentrations. The four subfractions promoted the appearance of abnormalities and dead seedlings in *E. heterophylla*, but the highest values were again observed when the treatments of subfractions A1 and A2 were applied. Thin layer chromatography revealed that fraction A1 contains the phytotoxic compounds benzyl salicylate and benzyl benzoate. The reduction in root growth of *E. heterophylla* seedlings may be related to the decrease in the elongation of metaxylem cells. Based on the results obtained, it is concluded that subfractions of the *O. pulchella* species have phytotoxic activity.

Keywords: Phytotoxins, subfractionation, weeds.

## 1. INTRODUÇÃO

Nas plantas, o desenvolvimento de rotas biossintéticas, a partir do metabolismo primário, foi determinante na produção de compostos secundários com funções fisiológicas diversas. A ação dessas substâncias representa uma adaptação evolutiva dos vegetais, em resposta aos estresses bióticos e abióticos (Moraes et al., 2014) como proteção contra herbívoros e patógenos (Riffel & costa, 2015), também servem como atraentes de polinizadores (aroma, cor, sabor), tem a função de agentes de competição entre plantas, simbiose entre plantas e microrganismos (Taiz et al., 2017) e podem estar envolvidos também em diversas funções ecológicas (Bertin et al., 2003). Essas substâncias, provenientes do metabolismo secundário são conhecidas como aleloquímicos, substâncias alelopáticas, fitotoxinas ou produtos secundários (Pires & Oliveira, 2011; Silva et al., 2011).

A presença de compostos secundários ou aleloquímicos tem sido verificada em todos os órgãos vegetais, havendo tendência de acúmulo nas folhas (Borella & Pastorini, 2010). A folha é o órgão da planta metabolicamente mais ativo, sendo assim, as concentrações de metabólitos secundários assim como a maior diversidade destes, devem ser maiores nas folhas (Borella & Pastorini, 2010; Tur et al., 2010; Novaes, 2011). Os aleloquímicos, podem ser liberados no ambiente por meio da lixiviação, volatilização, exsudação radicular e decomposição dos resíduos vegetais (Rice, 1984; Reigosa et al., 2013). Quando liberados no ambiente, podem influenciar de forma positiva ou negativa o desenvolvimento de outras espécies vegetais no processo conhecido como alelopatia (International Allelopathy Society - IAS, 2020).

O uso dos aleloquímicos surge como uma alternativa para o controle de plantas invasoras de culturas agrícolas que tem sido um problema desde o começo da agricultura. Os aleloquímicos com potencial fitotóxico fornecem alternativas aos herbicidas comerciais já que apresentam vantagens com relação a estes. Os herbicidas usados atualmente provocam mudanças nas populações de plantas invasoras além do risco de contaminação ambiental (Verdeguer et al., 2011). Pelo fato dos aleloquímicos serem de origem natural, estes podem ser usados junto a outros métodos de controle sem ocasionar contaminações no solo e água, já que os resíduos se degradam mais rápido (Oliveira et al., 2015).

Os aleloquímicos são substâncias que podem ou não, apresentar potencial fitotóxico no desenvolvimento de espécies de plantas invasoras (Linhares Neto et al., 2014). Isto é devido a que a tolerância ou resistência à metabólitos secundários é uma característica espécie-específica, onde algumas espécies apresentam maior sensibilidade a determinados compostos

ou moléculas que outras (Ferreira & Aquila, 2000). Devido a características como ausência de moléculas halogenadas, meia-vida reduzida, maior solubilidade em água e por serem biodegradáveis (Duke et al., 2000), os aleloquímicos são identificados como herbicidas naturais, que estão livres dos efeitos prejudiciais provocados pelos herbicidas sintéticos (Gonçalves et al., 2016).

Outro motivo importante para a descoberta de aleloquímicos está no aumento de espécies de plantas invasoras resistentes aos herbicidas comerciais que é um problema de grande importância na agricultura atual (Agostinetto & Vargas, 2014). O Brasil é o quinto país com maior número de casos de espécies resistentes a herbicidas, com 50 casos de resistência relatados em 28 espécies de plantas invasoras (Heap, 2020). Isto torna os estudos envolvendo a alelopatia uma importante ferramenta na identificação de espécies vegetais que apresentam compostos com efeito fitotóxico com novos mecanismos de ação a partir dos quais se podem produzir herbicidas naturais, mais específicos e menos prejudiciais para o ambiente (Bertholdsson 2010; Imatomi et al., 2013), para controlar de maneira satisfatória espécies de plantas invasoras (Grigolli et al., 2011).

Dentre as espécies invasoras de culturas agrícolas do Brasil, tem-se o amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*) é uma planta invasora de difícil controle, se caracteriza por ter uma alta capacidade de competição por recursos (Oliveira Jr. et al., 2011). Esta espécie apresenta um desenvolvimento inicial rápido e uma grande variabilidade genética (Trezzi et al., 2014). A presença desta espécie em lavouras agrícolas ocasiona perdas na qualidade e produtividade em culturas como a soja (Carvalho et al., 2010, Lopes Ovejero et al., 2013), milho (Cury et al., 2012), cana-de-açúcar (Marques et al., 2012) e feijão (Cury et al., 2011; Machado et al., 2015).

Além disso, essa espécie apresenta resistência múltipla aos herbicidas inibidores da enzima protoporfirinogênio oxidase – Protox, acetolactato sintase - ALS (Trezzi et al., 2011; Xavier et al., 2018) e recentemente foi relatada como resistente ao herbicida glifosato (inibidor da enzima 5-enolpiruvato- chiquimato-3-fosfato sintase - EPSPS) (Adegas et al., 2020), dificultando ainda mais o controle eficiente desta espécie nas lavouras agrícolas.

O capim-colonião (*Megathyrsus maximus*), é uma gramínea que é encontrada frequentemente em cultivos agrícolas. Esta espécie se destaca por ser uma planta vigorosa e com uma grande capacidade de ocupar ambientes rapidamente, devido a sua agressividade e pela intensa capacidade na produção de sementes (Costa et al., 2002). É considerada como uma planta invasora altamente competitiva (Lorenzi, 2008). A presença desta espécie é comum em lavouras

de cana-planta sendo considerada como infestante (Correia et al., 2012), a sua interferência nas culturas contribui para a redução na produtividade (Kuva et al., (2003).

Dentre as pesquisas sobre o potencial alelopático de extratos de uma espécie, além da identificação de suas potencialidades, é de vital importância também o isolamento, a identificação e quantificação das substâncias que ocasionam tal efeito, assim como também compreender o fenômeno biológico (Souza Filho et al., 2010). Sendo assim, o isolamento biodirigido é uma das principais técnicas utilizadas para a busca de novos compostos químicos. Esta técnica consiste no fracionamento sucessivo dos extratos, com a identificação das frações com maior atividade, para identificar os compostos presentes (Macías et al., 2010; Oliveira et al., 2012). Diante disso, objetivou-se fracionar a fração acetato etílica de folhas da época chuvosa da espécie *O. pulchella* e avaliar o potencial fitotóxico das subfrações sobre o crescimento de coleótilos de *T. aestivum*, no crescimento inicial de duas espécies invasoras de culturas agrícolas (*E. heterophylla* e *M. maximus*), bem como a avaliação do crescimento das células do metaxilema radicular de *E. heterophylla*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Ecofisiologia da Reprodução e Estudos Fitoquímicos, do Departamento de Botânica, pertencente ao Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – CCBS, da Universidade Federal de São Carlos, no município de São Carlos, Brasil. Todos os experimentos foram realizados em câmara climatizada tipo B.O.D sob condições controladas.

### 2.1. Fracionamento cromatográfico da fração acetato etílica

Após a identificação da fração acetato etílica de folhas da época chuvosa como a mais fitotóxica (capítulo 1), procedeu-se a realizar o seu fracionamento. A massa da fração (3,37 g) foi aplicada em uma coluna de 6 cm de diâmetro e 60 cm de altura, contendo sílica gel (0,06 – 0,02 mm) como fase estacionária em pressão atmosférica. Utilizou-se uma série de eluentes, em ordem crescente de polaridade para a fase móvel: hexano/ acetona 70/30, 50/50 e 30/70%, acetona 100%, acetona/ metanol 70/30, 50/50 e 30/70% e metanol 100%. O volume das soluções utilizadas na fase móvel foi de 500 ml, sendo 70% correspondente a 350 ml, 50% equivalente a 250 ml, 30% correspondente a 150 ml e 100% igual a 500 ml de cada solvente. Este procedimento rendeu oito subfrações (A1 à A8) que posteriormente foram submetidas aos bioensaios de fitotoxicidade.

### 2.2. Preparo das soluções

As subfrações foram pré-solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 5  $\mu\text{L.mL}^{-1}$  e diluídos em solução tampão (pH=5,6) contendo ácido cítrico monohidratado (1,05 g.L), hidrogenofosfato de potássio tri-hidratado (2,9 g.L) e sacarose a 2% de acordo com recomendações de Macías e colaboradores (2010).

Os tratamentos consistiram em diferentes concentrações de cada subfração. Desse modo, nos bioensaios com coleótilos de *T. aestivum* e crescimento inicial de espécies invasoras de culturas agrícolas foram utilizados 3 tratamentos com cada uma das subfrações e um controle positivo com 3 tratamentos com o herbicida comercial Goal<sup>®</sup> (i.a. oxyfluorfen 240 g.L). Sendo assim, os tratamentos das subfrações e do herbicida ficaram da seguinte forma, no tratamento 1 foi utilizada a concentração de 0,8  $\text{mg.mL}^{-1}$ , no tratamento 2, 0,4  $\text{mg.mL}^{-1}$  e no tratamento 3, 0,2  $\text{mg.mL}^{-1}$ , além disso, em cada bioensaio foi realizado 1 controle negativo com solução tampão e DMSO (5  $\mu\text{L.mL}^{-1}$ ).

## **2.3. Bioensaios**

### **2.3.1. Bioensaio de atividade geral (citotoxicidade) com coleóptilos de *T. aestivum***

Os bioensaios foram realizados com diásporos de trigo (*T. aestivum* L: Poaceae), cultivar BRS 264, pré-geminados em caixas gerbox (11 x 11 x 3,5 cm) com 2 folhas de papel de filtro, umedecidos com água destilada ( $\pm 12$  mL) e armazenados em câmara de germinação tipo B.O.D. durante 72 horas a  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  sem a presença de luz. Após o tempo decorrido na câmara de germinação B.O.D., os coleóptilos foram cortados em guilhotina de Van der Weij sendo descartada a parte apical (2 mm) como recomendado por Hancock e colaboradores (1964). Após esta etapa, os coleóptilos foram cortados em segmentos de 4 mm e usados nos bioensaios (Macías et al., 2010). A montagem deste experimento foi realizada em ambiente fechado com luz de segurança verde (Nitsch & Nitsch, 1956).

Foram utilizadas três repetições em cada tratamento, cada repetição foi composta por cinco coleóptilos de *T. aestivum*, que foram mantidos em tubos de ensaio contendo 2 mL de solução. As amostras, devidamente identificadas foram mantidas a  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , no escuro e com rotação constante de 1.4 rpm durante 24 h, visando garantir a homogeneidade do contato entre o material vegetal e a solução (Macías et al., 2010). Após esse período os coleóptilos foram retirados, fotografados e medidos utilizando o software ImageJ<sup>®</sup> 1.8.0.

### **2.3.2. Bioensaios de fitotoxicidade**

#### **2.3.2.1. Bioensaios de crescimento inicial de plântulas**

Para avaliar o efeito das subfrações sobre o crescimento inicial de plantas invasoras, foram realizados bioensaios com duas espécies invasoras de culturas agrícolas, *E. heterophylla* e *M. maximus*. Os diásporos foram colocados em caixas gerbox (11 x 11 x 3,5 cm) para germinação e umedecidos com água destilada. Após o surgimento da raiz primária (2 mm) e da identificação do gravitropismo positivo, os diásporos foram considerados germinados (Brasil, 2009). Em seguida, os diásporos que germinaram foram transferidos para caixas plásticas transparentes de 10,5 x 6 x 4,5 cm (10 diásporos por caixa) contendo duas folhas de papel filtro e umedecidos com 6 mL de cada solução.

Cada tratamento continha quatro repetições com 10 plântulas das espécies-alvo. As caixas com os tratamentos foram identificadas, fechadas e mantidas em câmara de germinação tipo B.O.D. a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , sob fotoperíodo de 12 h (Inoue et al., 2010). Após oito dias, o material foi retirado da câmara de germinação, sendo realizadas as medidas de comprimento da parte aérea e da raiz principal (para a eudicotiledônea *E. heterophylla*) e da parte aérea e da raiz mais longa (para a

monocotiledônea *M. maximus*). Esta etapa foi realizada com o auxílio do software ImageJ® 1.8.0.

Alguns aleloquímicos podem agir induzindo o aparecimento de plântulas anormais, diante disso, a avaliação de anormalidades das plântulas é uma ferramenta importante para a identificação de substâncias com efeito fitotóxico (Ferreira & Áquila, 2000; Alves et al., 2011). Com base nisso, na presença de plântulas com anormalidades ou plântulas mortas, estas foram fotografadas, contabilizadas e caracterizadas como descrito por Brasil (2009).

### **2.3.2.2. Bioensaio de crescimento de células do metaxilema de *E. heterophylla***

A anatomia interna das eudicotiledôneas favorece a visualização das células do metaxilema radicular em microscópico óptico. Desta maneira, o teste de crescimento de células do metaxilema radicular foi desenvolvido na espécie *E. heterophylla*. As raízes utilizadas neste experimento foram as raízes do bioensaio de crescimento inicial, que foram submetidas aos tratamentos com as concentrações de 0,8 mg.mL<sup>-1</sup>, 0,4 mg.mL<sup>-1</sup> e 0,2 mg.mL<sup>-1</sup>. Foram utilizadas as raízes onde as subfrações exerceram maior atividade inibitória (A1 e A2) assim como também foram utilizadas as raízes do controle negativo (Solução tampão e DMSO). Para cada tratamento foram utilizadas quatro raízes primárias crescidas nos diferentes tratamentos das subfrações A1 e A2 e do controle negativo.

Após ter finalizado o experimento de crescimento inicial, as plântulas foram retiradas das caixas e com auxílio de um estilete foi separado o segmento da raiz primária e colocado em álcool 70% durante sete dias. Após decorrido esse tempo, as raízes foram lavadas com água destilada e colocadas em solução de hidróxido de sódio 25%, em estufa a 40°C durante 48 h, período em que foi observada a clarificação do material. A coloração do material foi a partir do método de Fuchs modificado (Kraus & Arduin, 1997). O material vegetal foi corado com corante Lacmóide a 25%, durante 24 h a temperatura ambiente, posteriormente as raízes foram lavadas com água destilada. Após o procedimento de coloração, o material foi lavado novamente e colocado em lâminas de vidro, fixado com xarope Apathy e lamínula e deixado em repouso durante sete dias para secagem.

A observação do material foi feita em microscópio óptico (Olympus-BX41) acoplado com câmera fotográfica (Sony CCD-IRIS). Com auxílio do microscópio óptico, de cada raiz foi fotografado 50% do seu comprimento total, partindo da região central em direção ao colo e o aumento utilizado foi de 20 vezes (Grissi et al., 2013). As células do metaxilema, (10 por fotografia, 40 em total), foram medidas utilizando o programa ImageJ® 1.8.0.

#### **2.4. Cromatografia em Camada Delgada (CCD) das subfrações A1 e A2**

A CCD foi realizada para identificação dos compostos salicilato de benzila e benzoato de benzila nas subfrações com maior atividade fitotóxica (A1 e A2). A técnica de cromatografia em camada delgada foi realizada mediante a diferença das forças de adsorção dos compostos presentes nas subfrações, entre a solubilidade da fase móvel e da fase estacionária sendo a placa de sílica (fase normal). Para a fase móvel foi utilizada a mescla dos solventes hexano e acetona na proporção de 70/30%. Como fase estacionária foram utilizadas placas simples de sílica de 4 x 5 cm.

Ambas subfrações (A1 e A2) assim como os compostos salicilato de benzila e benzoato de benzila foram solubilizados em acetato de etila para aplicação nas placas. Em cada cromatoplaça de sílica foram colocados quatro pontos, sendo dois pontos correspondentes as duas frações e os outros dois pontos para os compostos salicilato de benzila e benzoato de benzila, formando manchas semelhantes e regulares, este procedimento foi feito com ajuda de tubos capilares de vidro. As cromatoplaças foram analisadas sob luz ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm e o revelador utilizado foi Oleum (solução de 10 mL de ácido sulfúrico, 40 mL de água destilada e 200 mL de ácido acético), posteriormente as cromatoplaças foram aquecidas a 150°C e os resultados foram registrados.

#### **2.5. Análises estatísticas**

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk por meio do software Past<sup>®</sup> v.2.17c (Hammer et al., 2001). Dados normais foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), seguidos do teste Tukey a 5% de significância com auxílio do software Sisvar<sup>®</sup> v.5.7 (Ferreira, 2011). Dados não normais foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn a 5% de significância com o auxílio do software Past<sup>®</sup> v.2.17c.

### 3. RESULTADOS

Os rendimentos obtidos a partir da fração acetato etílica de folhas da época chuvosa da espécie *O. pulchella* estão expressos na Tabela 1. Os maiores rendimentos foram alcançados com as subfrações A4 e A3 com 1,8833g e 0,9303g respectivamente.

Tabela 1. Rendimentos das subfrações oriundas da fração acetato etílica de folhas da época chuvosa de *Ocotea pulchella* obtidas no fracionamento com coluna.

Subfrações	Rendimento (g)	Rendimento (%)
A1	0,2717	6,07
A2	0,1714	3,83
A3	0,9303	20,81
A4	1,8833	42,13
A5	0,4913	10,99
A6	0,0699	1,56
A7	0,1677	3,75
A8	0,0376	0,84

Os resultados obtidos no bioensaio de crescimento de coleóptilos de trigo, mostraram que todas as 8 subfrações inibiram significativamente o crescimento dos coleóptilos pelo menos na maior concentração testada ( $0,8 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) e sete destas (A1, A2, A3, A4, A5, A6 e A8) o fizeram também nas outras duas concentrações testadas ( $0,4 \text{ mg. mL}^{-1}$  e  $0,2 \text{ mg. mL}^{-1}$ ) em relação ao controle negativo (solução tampão e DMSO). A subfração A1 exerceu o mesmo efeito inibitório nos coleóptilos de trigo que aquele observado pelo herbicida, sendo os tratamentos da mesma concentração iguais estatisticamente. Esse mesmo resultado foi observado na subfração A2, nos tratamentos com as concentrações  $0,8 \text{ mg.mL}^{-1}$  e  $0,4 \text{ mg.mL}^{-1}$  (Figura 1).

Os coleóptilos de trigo mostraram maior suscetibilidade quando foram submetidos às maiores concentrações ( $0,8 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) para todas as subfrações testadas. As subfrações A1, A2, A3 e A4 foram as que ocasionaram os maiores valores de porcentagem de inibição, sendo assim, estas foram escolhidas para a realização dos bioensaios de crescimento inicial de plântulas de espécies infestantes.

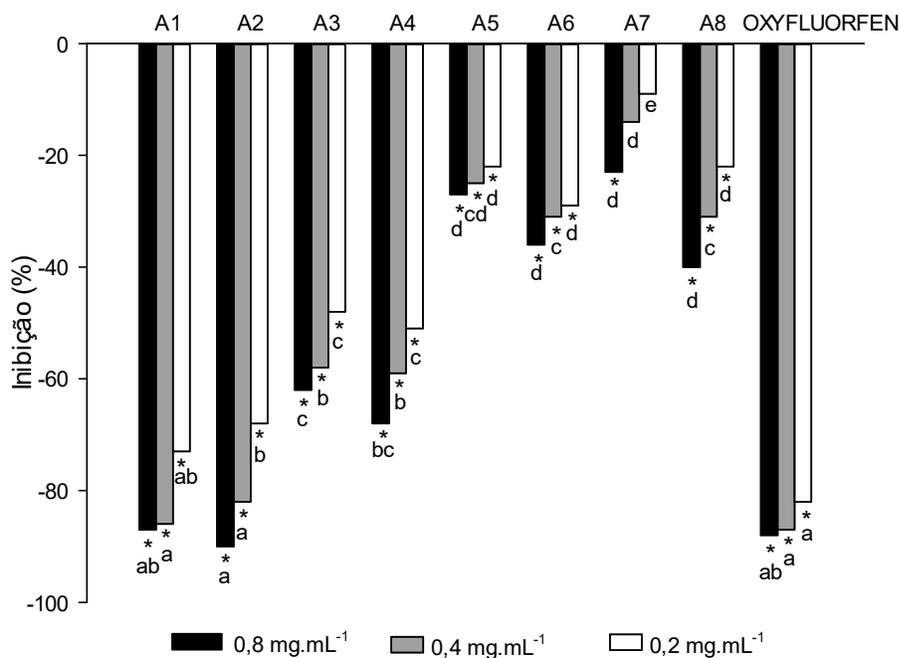


Figura 1. Efeito das subfrações oriundas da fração acetato etílica de folhas da época chuvosa da espécie *O. pulchella* e do herbicida GOAL<sup>®</sup>, sobre o crescimento de coleótilos de *T. aestivum*. Os valores são expressos em porcentagem de inibição com relação ao controle negativo. (\*) Médias diferem significativamente do controle negativo pelo teste de tukey a 0,05 de significância. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente do herbicida na mesma concentração, pelo teste de tukey a 0,05 de significância.

No bioensaio de crescimento inicial de espécies invasoras de culturas agrícolas, a espécie *E. heterophylla* foi a espécie mais afetada pela ação das subfrações testadas. No sistema radicular, as subfrações A1, A2 e A3 inibiram significativamente o crescimento em todas as concentrações testadas; enquanto que a subfração A4 inibiu significativamente o crescimento das raízes nas concentrações 0,8 mg.mL<sup>-1</sup> e 0,4 mg.mL<sup>-1</sup> em relação ao controle negativo (Figura 2). É importante destacar que a subfração A1, na maior concentração testada (0,8 mg.mL<sup>-1</sup>) mostrou ser superior estatisticamente que o herbicida na mesma concentração, exercendo o maior valor de porcentagem de inibição observado (-75,86%). Já as outras duas concentrações da subfração A1 foram iguais estatisticamente aos tratamentos da mesma concentração do herbicida. Enquanto que todos os tratamentos da subfração A2 foram estatisticamente iguais aos tratamentos da mesma concentração do herbicida (Figura 2).

Para a parte aérea foi observado que todas as concentrações das quatro subfrações promoveram inibição significativa em relação ao controle negativo. Neste parâmetro a subfração A2 novamente mostrou ser igual estatisticamente que os tratamentos da mesma concentração do herbicida (Figura 2). Resposta semelhante foi observada nos tratamentos 0,8 mg.mL<sup>-1</sup> e 0,2

mg.mL<sup>-1</sup> da subfração A1 e 0,8 mg.mL<sup>-1</sup> da subfração A3 que não mostraram diferença estatística dos tratamentos nas mesmas concentrações do herbicida (Figura 2).

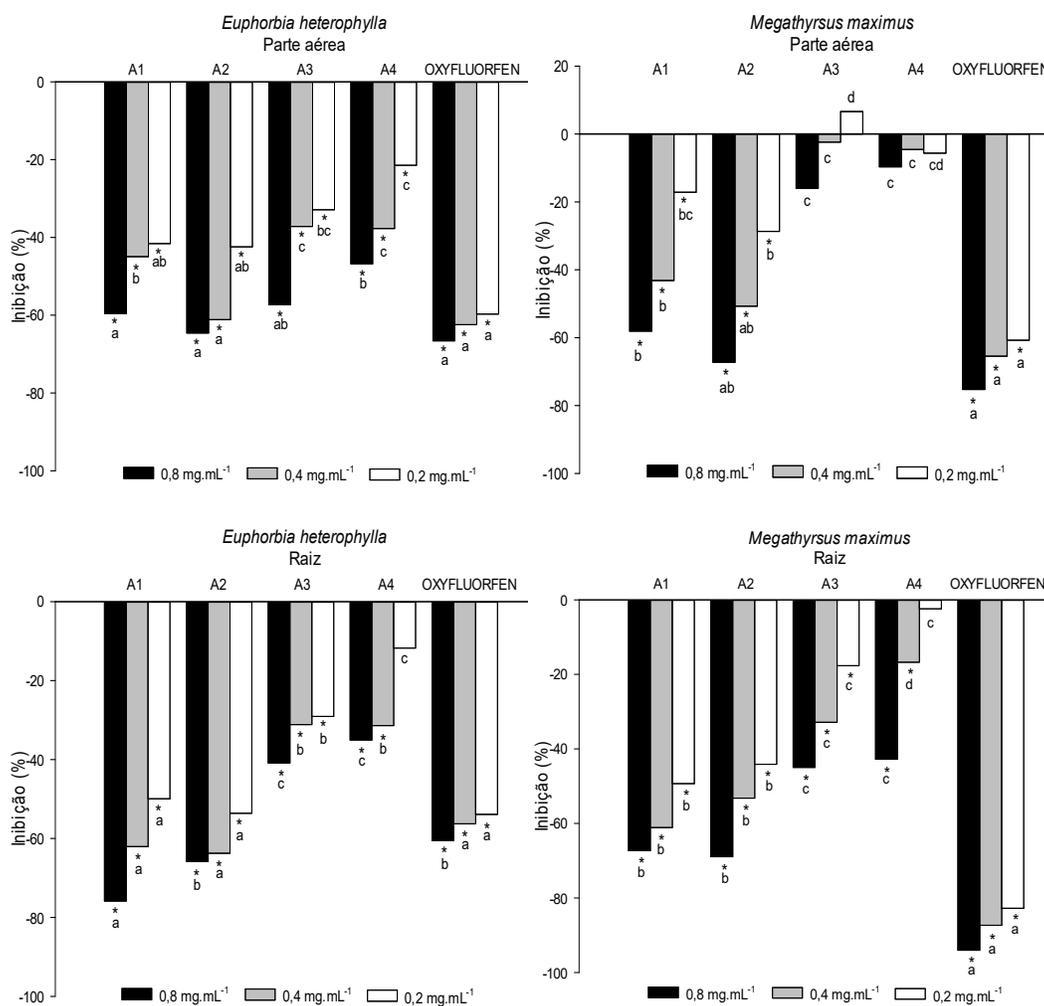


Figura 2. Efeito das subfrações oriundas da fração acetato etílica de folhas da época chuvosa da espécie *O. pulchella* e do herbicida GOAL<sup>®</sup>, sobre o crescimento de plântulas de *E. heterophylla* e *M. maximus*. Os valores estão expressos em porcentagem de inibição em relação ao controle negativo. (\*) Médias diferem significativamente do controle pelo teste de tukey a 0,05 de significância. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente do herbicida na mesma concentração, pelo teste de tukey a 0,05 de significância.

Já para a espécie *M. Maximus* o sistema radicular foi o parâmetro mais afetado pela ação dos tratamentos aplicados. As subfrações A1, A2 e A3 inibiram significativamente o crescimento das raízes em todas as concentrações testadas (Figura 2). Em relação a parte aérea, apenas as subfrações A1 e A2 inibiram significativamente o crescimento deste parâmetro em todas as concentrações testadas com relação ao controle negativo. Além disso, os tratamentos 0,8 mg.mL<sup>-1</sup> e 0,4 mg.mL<sup>-1</sup> da subfração A2 não mostraram diferença estatística dos tratamentos com o herbicida na mesma concentração (Figura 2). Nesta espécie, as subfrações A1 e A2 foram

também as que mostraram maior atividade inibitória das subfrações testadas, esse efeito ao igual que na espécie *E. heterophylla*, foi mais visível no sistema radicular.

No bioensaio de crescimento, a porcentagem de plântulas anormais e mortas variaram de acordo com a espécie avaliada. A espécie *M. maximus* não apresentou anormalidades em nenhum dos tratamentos aplicados. Por outro lado, a espécie *E. heterophylla* apresentou uma alta porcentagem de anormalidades com a aplicação dos tratamentos das quatro subfrações em todas as concentrações testadas (Figura 3). Cabe ressaltar que nos tratamentos com o herbicida não foram observadas anormalidades, isto devido a elevada porcentagem de plântulas mortas encontradas.

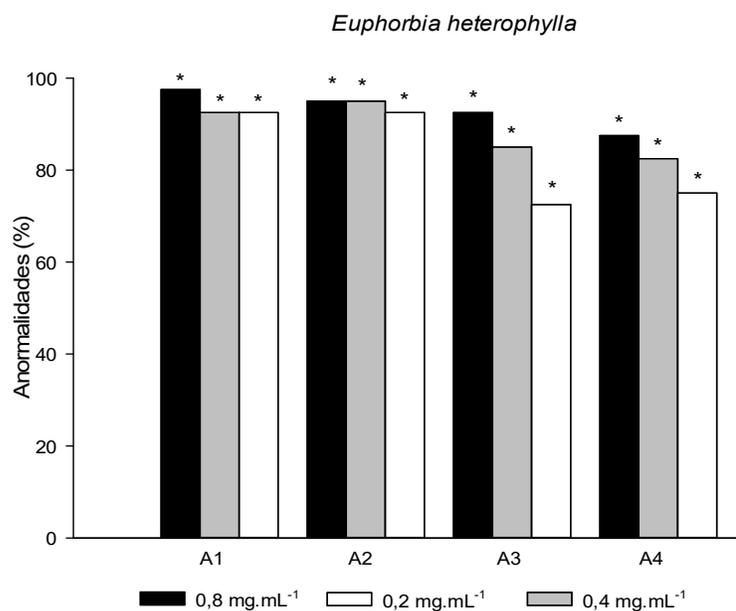


Figura 3. Efeito das subfrações A1, A2, A3 e A4 sobre a porcentagem de anormalidades observadas em plântulas de *E. heterophylla*. Os valores estão expressos em porcentagem de inibição em relação ao controle negativo. (\*) Médias diferem significativamente do controle pelo teste de tukey, a 0,05 de significância.

Com relação as anormalidades, nove destas foram encontradas sendo a raiz principal pouco desenvolvida (RPPD), o enrolamento do hipocótilo (EH) e a necrose da raiz (NR) as principais (Figura 4). De forma geral, os tratamentos 0,8 mg.mL<sup>-1</sup> de todas as subfrações proporcionaram os maiores valores de porcentagem de anormalidades.

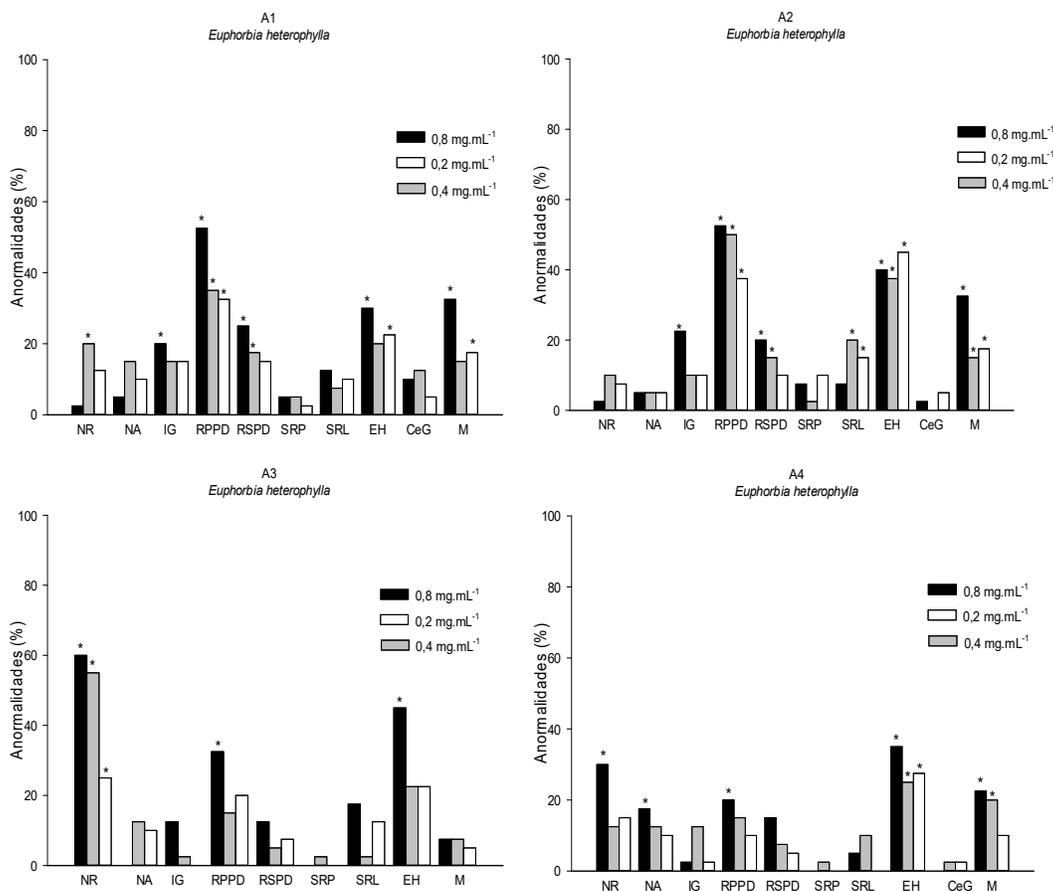


Figura 4. Porcentagem de anormalidades, tipos de anomalias e plântulas mortas identificadas nos tratamentos com as subfrações A1, A2, A3 e A4 na espécie *E. heterophylla*. NR (necrose da raiz), NA (necrose da parte aérea), IG (inversão gravitópica), RPPD (raiz principal pouco desenvolvida), RSPD (raiz secundária pouco desenvolvida), SRP (sem raiz principal), SRL (sem raiz lateral), EH (enrolamento hipocótilo), CeG (raiz curta e grossa) e M (plântula morta). (\*) As médias diferem significativamente do controle negativo pelo teste de Dunn a 0,05 de significância.

Com relação a porcentagem de plântulas mortas, *E. heterophylla* foi a espécie mais afetada, sendo este parâmetro afetado por três das quatro subfrações utilizadas neste bioensaio (Figura 5). Enquanto que a espécie *M. maximus*, apenas a aplicação do tratamento 0,8 mg.mL<sup>-1</sup> da subfração A2 mostrou diferença estatística do controle negativo. Já os tratamentos com o herbicida mostraram uma alta porcentagem de plântulas mortas em ambas espécies, 100%, 97,5% e 95% para *E. heterophylla* e 97,5%, 92,5% e 90% para *M. maximus* (Figura 5).

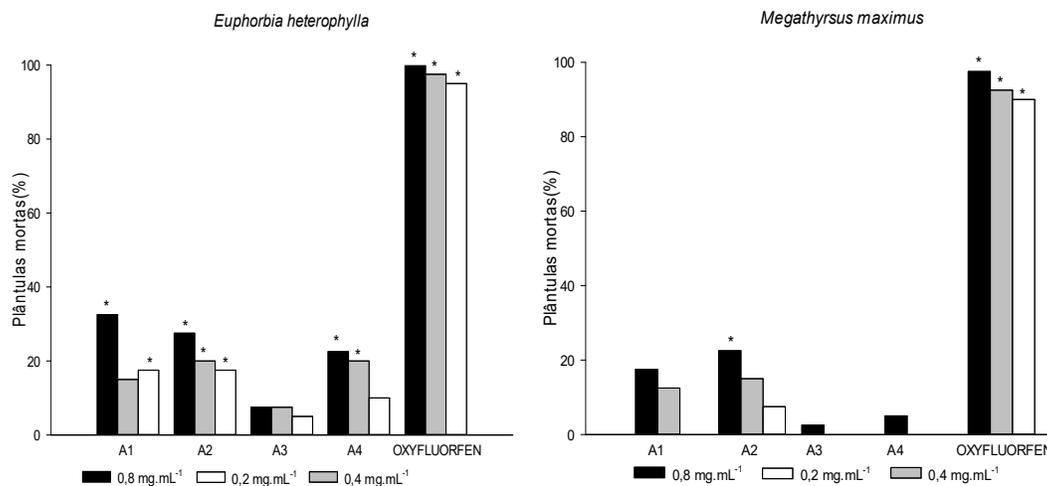


Figura 5. Efeito das subfrações A1, A2, A3 e A4 e do herbicida GOAL<sup>®</sup>, sobre a porcentagem de plântulas mortas encontradas nas espécies *E. heterophylla* e *M. maximus*. (\*) As médias diferem significativamente do controle negativo pelo teste de Dunn a 0,05 de significância.

Com relação aos resultados do bioensaio de crescimento inicial, foi possível observar que as subfrações A1 e A2 foram as que promoveram os melhores resultados de inibição no sistema radicular de *E. heterophylla*. Sendo assim, o estudo da anatomia do sistema radicular desta espécie permitiu visualizar um dos modos de ação dessas subfrações a nível celular (Figura 6). Ambas subfrações inibiram significativamente o crescimento das células do metaxilema em todas as concentrações testadas, com relação ao controle negativo.

O tamanho médio das células do metaxilema no controle negativo (127,73  $\mu\text{m}$ ) foi cinco vezes maior que o tamanho médio observado nas células da subfração A1 na concentração 0,8 mg.mL<sup>-1</sup> (25,34  $\mu\text{m}$ ). Com relação a subfração A2, o tamanho médio das células do metaxilema do controle foi quatro vezes maior que o tamanho médio observado nesta subfração (30,64  $\mu\text{m}$ ) na mesma concentração (Figura 6). O efeito das subfrações A1 e A2 sobre o crescimento das células do metaxilema foi dependente da concentração. O menor comprimento das células foi observado quando aplicada a maior concentração em ambas subfrações (Figura 6).

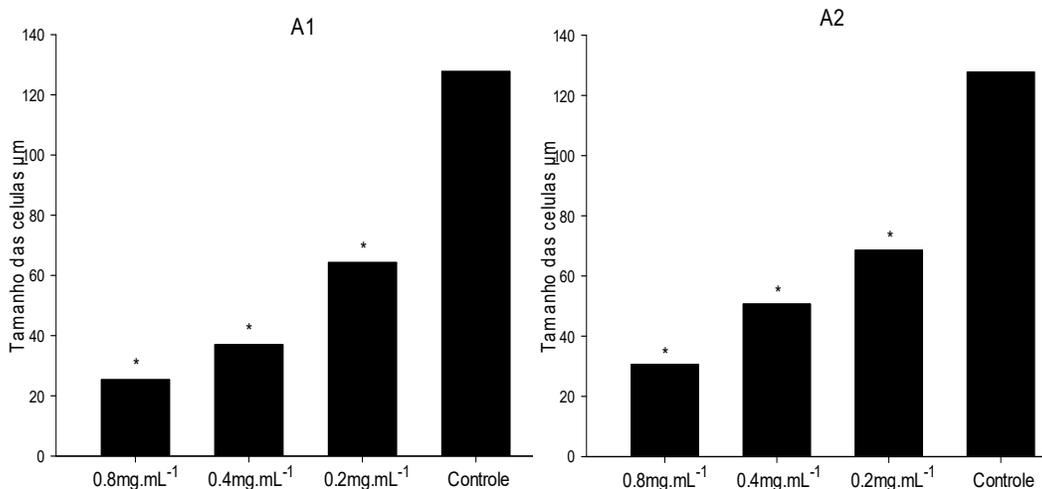


Figura 6. Tamanho médio das células do metaxilema radicular em plântulas de *E. heterophylla* crescidas em diferentes concentrações das subfrações A1 e A2 e do controle negativo. (\*) As médias diferem significativamente do controle negativo pelo teste tukey a 0,05 de significância.

Foi realizada uma comparação dos resultados obtidos no bioensaio do crescimento das células do metaxilema radicular de *E. heterophylla* entre as duas subfrações (A1 e A2). Foi possível observar que o tamanho médio das células da subfração A1, na maior concentração testada (0,8 mg.mL<sup>-1</sup>) diferiu estatisticamente do tamanho médio das células obtidas com a aplicação da mesma concentração da subfração A2 (Figura 7). Enquanto que os outros dois tratamentos (0,4 mg.mL<sup>-1</sup> e 0,2 mg.mL<sup>-1</sup>) não mostraram diferença estatística entre si na mesma concentração aplicada (Figura 7). Efeito similar ao observado no bioensaio de crescimento inicial desta espécie, onde o tratamento (0,8 mg.mL<sup>-1</sup>) da subfração A1 exerceu o maior valor de inibição de crescimento mostrando diferença estatística da subfração A2 na mesma concentração. Enquanto que os outros dois tratamentos (0,4 mg.mL<sup>-1</sup> e 0,2 mg.mL<sup>-1</sup>) não diferiram estatisticamente entre si nas mesmas concentrações (Figura 2).

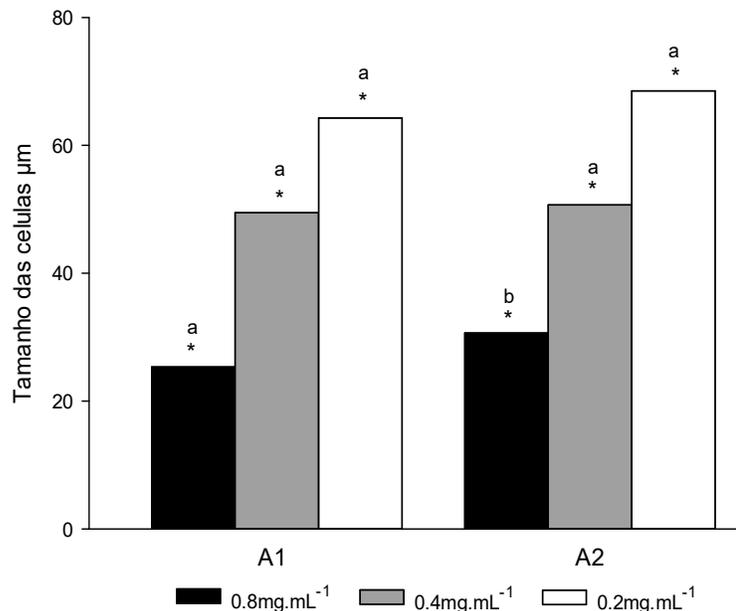


Figura 7. Comparação do tamanho das células do metaxilema radicular de plântulas de *E. heterophylla* entre os diferentes tratamentos das subfrações A1 e A2. (\*) As médias diferem significativamente do controle negativo pelo teste tukey a 0,05 de significância. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si na mesma concentração, pelo teste de tukey a 0,05 de significância.

No controle negativo, células com tamanhos entre 85 a 175  $\mu\text{m}$  foram observadas, com um maior número de observações (25%) para células com tamanho entre 115 a 130  $\mu\text{m}$  (Figura 8). As raízes que cresceram sob a influência do tratamento 0,8  $\text{mg.mL}^{-1}$  da subfração A1 apresentaram valores médios de tamanho das células entre 15 e 40  $\mu\text{m}$ , com maior ocorrência (40%) para as células com tamanho entre 20 a 25  $\mu\text{m}$  (Figura 9A). Já para o tratamento com a concentração 0,4  $\text{mg.mL}^{-1}$  foram observados valores médios do tamanho das células entre 25 a 100  $\mu\text{m}$ , com predomínio (47,5%) para células com tamanho entre 40 a 55  $\mu\text{m}$  (Figura 9B). Enquanto que no tratamento 0,2  $\text{mg.mL}^{-1}$ , células com tamanho médio entre 40 a 100  $\mu\text{m}$  foram observadas, com maior incidência (40%) nas células com tamanho entre 40-55  $\mu\text{m}$  (Figura 9C).

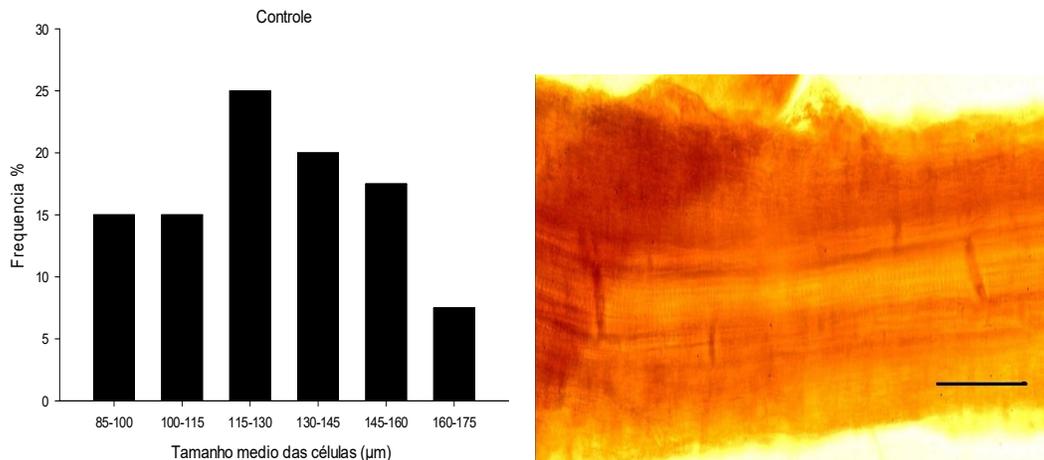


Figura 8. Histograma e fotomicrografia das células do metaxilema radicular de plântulas de *E. heterophylla*, crescidas no controle negativo (solução tampão e DMSO). As marcações equivalem à medida correspondente de 50 micrômetros.

Com relação a subfração A2, o tratamento  $0,8 \text{ mg.mL}^{-1}$  inibiu o crescimento das células do metaxilema, apresentando estes valores médios entre 20 e 45  $\mu\text{m}$ ; com maior ocorrência (42,5%) para as células com tamanho entre 25 a 30  $\mu\text{m}$  (Figura 10A). Quando aplicado o tratamento  $0,4 \text{ mg.mL}^{-1}$  desta subfração, foram obtidas células com valores médios entre 25 e 85  $\mu\text{m}$  e o maior predomínio (35%) foi para as células com tamanho entre 55 a 70  $\mu\text{m}$  (Figura 10B). Finalmente com a aplicação do tratamento  $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$  foram observadas células com tamanho médio entre 40 a 130  $\mu\text{m}$ , com maior incidência para as células com tamanho entre 55 a 70  $\mu\text{m}$  (Figura 10C).

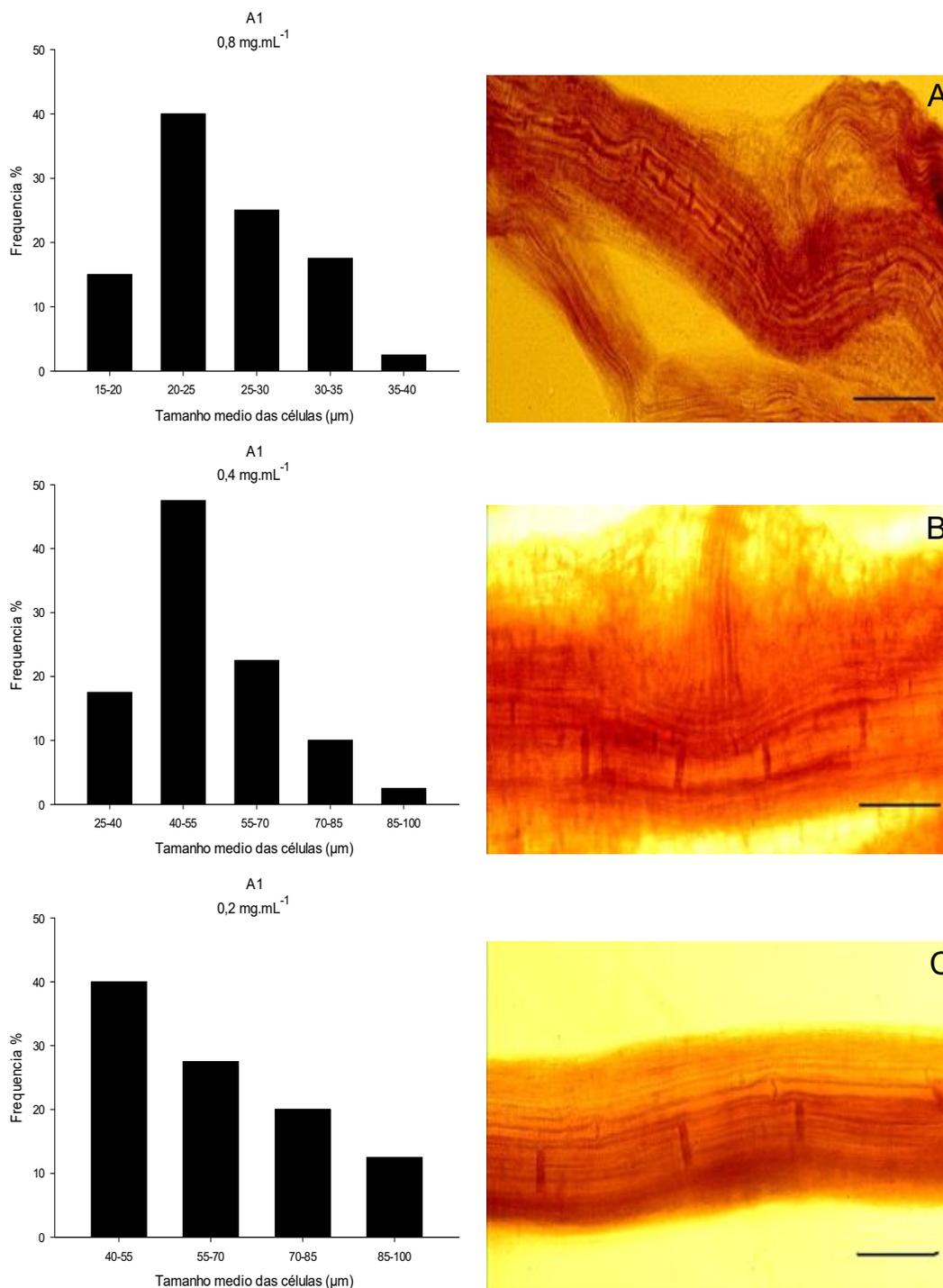


Figura 9. Histograma e fotomicrografia das células do metaxilema radicular de plântulas de *E. heterophylla*, tratadas com diferentes concentrações da subfração A1. (A) 0.8mg.mL<sup>-1</sup>, (B) 0.4 mg.mL<sup>-1</sup> e (C) 0.2mg.mL<sup>-1</sup>. As marcações equivalem à medida correspondente a 50 micrômetros.

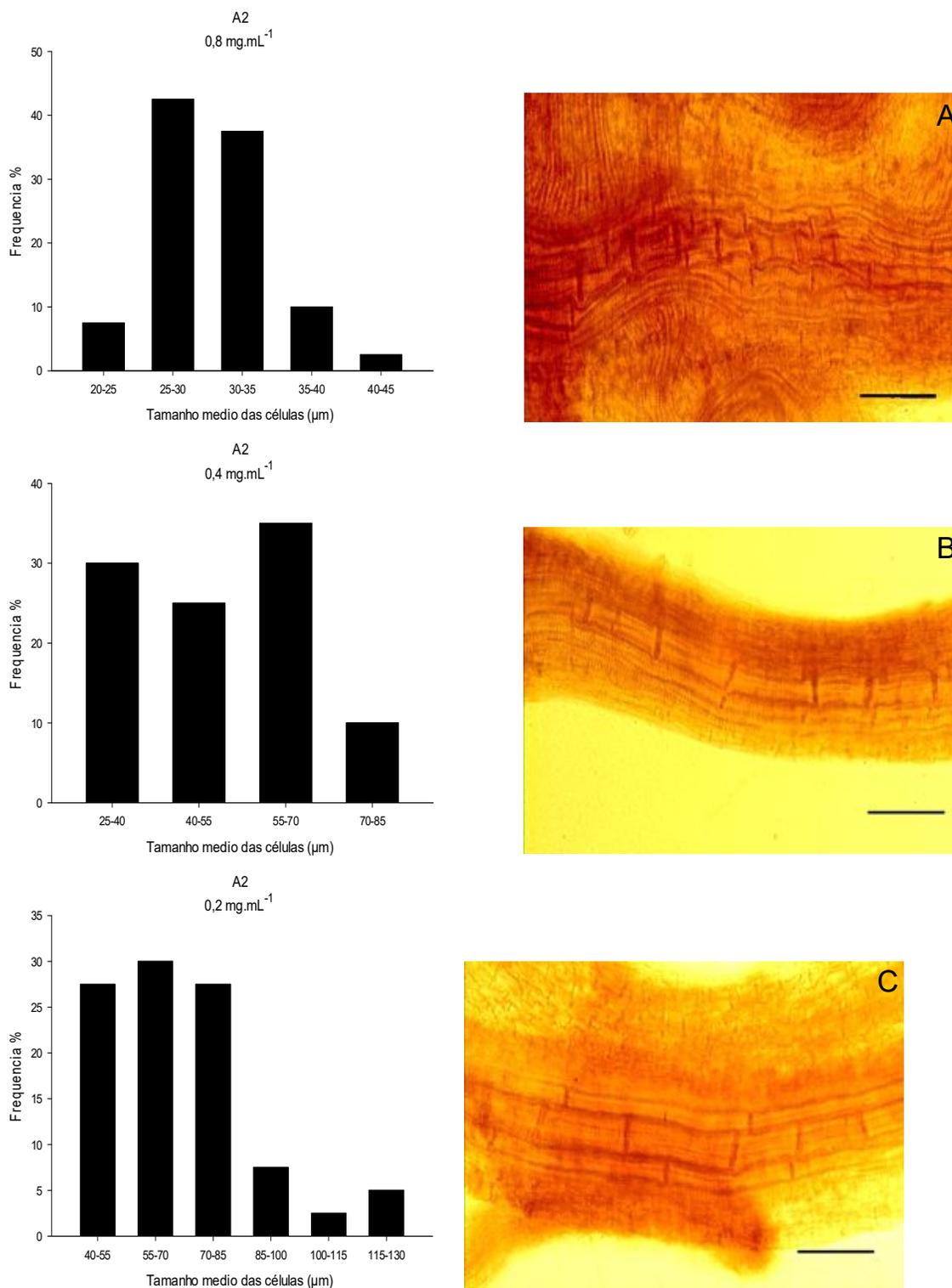


Figura 10. Histograma e fotomicrografia das células do metaxilema radicular de plântulas de *E. heterophylla*, tratadas com diferentes concentrações da subfração A1. (A) 0.8mg.mL<sup>-1</sup>, (B) 0.4 mg.mL<sup>-1</sup> e (C) 0.2mg.mL<sup>-1</sup>. As marcações equivalem à medida correspondente a 50 micrômetros.

Os resultados obtidos na cromatografia em camada delgada podem ser observados na Tabela 2. Aqui, o objetivo foi verificar a presença ou não dos compostos salicilato de benzila e benzoato de benzila nas subfrações A1 e A2, que foram as subfrações que apresentaram maior atividade fitotóxica em todos os bioensaios realizados. Pelos resultados obtidos, é possível observar que tanto o salicilato de benzila como o benzoato de benzila podem ser encontrados na subfração A1.

Tabela 2 - Detecção dos compostos salicilato de benzila e benzoato de benzila nas subfrações A1 e A2 oriundas da fração acetato etílica de folhas da época chuvosa (AEFC) da espécie *O. pulchella* pelo método de cromatografia em camada delgada.

Compostos	Subfrações	
	A1	A2
Salicilato de benzila	+	-
Benzoato de benzila	+	-

+ (positivo); - (negativo).

#### 4. DISCUSSÃO

No presente trabalho foi verificado o efeito fitotóxico das subfrações oriundas do estrato acetato etílico de folhas da época chuvosa da espécie *O. pulchella*. Em total oito subfrações dessa fração foram testadas sobre o crescimento dos coleóptilos de trigo. As subfrações A1 e A2 foram as que apresentaram os maiores valores de porcentagem de inibição sobre os coleóptilos de trigo. Resultados semelhantes foram encontrados por Moraes et al. (2014); Habermann et al. (2015); Miranda et al. (2015) e Candido et al. (2016) que relataram que extratos de acetato de etila exerceram forte inibição sobre o crescimento de coleóptilos de *T. aestivum*.

Além disso, dados de Candido et al. (2016) que trabalhou com extratos da mesma espécie aqui citada, mencionam que esse autor também realizou o fracionamento do extrato acetato de etila de folhas. O mesmo autor citou ainda que devido a polaridade do solvente acetato de etila, os metabolitos mais ativos desta espécie têm uma polaridade media.

Os principais grupos de aleloquímicos que possuem uma polaridade intermediária pertencem ao grupo de alcaloides, flavonóides, fenóis e terpenóides (Kim et al., 2005; Habermann et al., 2015). Inseridos nestes grupos estão os compostos espatulenol, salicilato de benzila e benzoato de benzila, que segundo Candido et al., (2016) são os responsáveis pela atividade fitotóxica da espécie *O. pulchella*. Desses três compostos, foi avaliado e constatado o potencial fitotóxico do salicilato de benzila e benzoato de benzila no capítulo 2.

Na extração de metabolitos secundários é possível utilizar diferentes métodos de extração para garantir uma extração eficiente. Além do método utilizado, a escolha do solvente é de vital importância, já que esses fatores irão influenciar significativamente no conteúdo de metabolitos secundários, influenciando na composição final do extrato obtido (Tiwari et al., 2011; Karabegović et al., 2014). Solventes como hexano, acetato de etila e etanol tem a capacidade de extrair compostos fenólicos, flavonoides e terpenos (Patel et al., 2016).

Bioensaios com coleóptilos de *T. aestivum* são amplamente utilizados em experimentos envolvendo atividade fitotóxica devido a serem rápidos (24 horas) e também por mostrar uma alta sensibilidade aos aleloquímicos. Além disso, este bioensaio permite selecionar entre extratos/frações com ou sem atividade, para posteriormente serem submetidos a outros bioensaios mais específicos (Nepomuceno, 2011; Accarini, 2016). Esse método foi proposto por Hancock et al. (1964), sendo considerado como um bioensaio padrão na avaliação da bioatividade de extratos vegetais.

Nos bioensaios de crescimento inicial, as subfrações A1 e A2 exerceram os maiores valores de inibição tanto na parte aérea quanto no sistema radicular de ambas espécies, sendo o crescimento do sistema radicular o parâmetro mais afetado. Os valores de inibição obtidos por estas subfrações na espécie *E. heterophylla* são semelhantes aos valores de inibição obtidos no capítulo 2, onde foi avaliado e comprovado o potencial fitotóxico dos compostos sintéticos salicilato de benzila e benzoato de benzila. Tais compostos já foram isolados da mesma espécie vegetal aqui utilizada (*O. pulchella*), por Candido et al. (2016) que mencionaram estes compostos junto a espatulenol como os responsáveis pela atividade fitotóxica desta espécie. Nos resultados da cromatografia em camada delgada realizados com as subfrações A1 e A2 e com os compostos salicilato de benzila e benzoato de benzila, foi possível comprovar a presença de ambos compostos na subfração A1. Sendo assim sugere-se que esses compostos são os responsáveis pela atividade fitotóxica mostrada pela espécie *O. pulchella*.

Com relação a espécie *M. maximus*, no capítulo 2 foram observados valores de inibição entre 12 e 20% para a parte aérea nos tratamentos com salicilato de benzila e benzoato de benzila; valores de inibição menores dos que foram observados neste capítulo com a aplicação principalmente dos tratamentos das subfrações A1 e A2 (entre 17% e 68%). Enquanto que no sistema radicular, parâmetro que foi mais afetado, no capítulo 2 foi observada uma inibição entre 25% e 40% nos tratamentos com salicilato de benzila e benzoato de benzila, inferior a inibição entre 44% 69% observada nos tratamentos com as subfrações A1 e A2. Isto pode sugerir que exista sinergismo entre os compostos salicilato de benzila e benzoato de benzila (presentes na subfração A1) na inibição do crescimento de *M. maximus*. Também se sugere que esse efeito observado seja produzido pelo composto espatulenol, que pode estar presente em uma ou em ambas subfrações, já que não pode ser realizada a cromatografia em camada delgada para sua detecção devido a que não é produzido sinteticamente, dificultando assim obter informações deste composto, que também é mencionado como um dos responsáveis pela atividade fitotóxica da espécie *O. pulchella*.

Além de afetar o crescimento de plântulas, alguns aleloquímicos podem inibir por completo a formação de plântulas normais (Juchem et al., 2013), provocando anormalidades como: atrofia da raiz, pouco ou nenhum desenvolvimento das raízes, partes necrosadas, enrolamento do hipocótilo, que pode impedir a emergência da plântula do solo (Ferreira & Áquila, 2000; Denardin et al., 2018; Formigheiri et al., 2018), todas essas anormalidades foram encontradas quando aplicados os tratamentos com as subfrações A1, A2, A3 e A4 no presente estudo.

*E. heterophylla* foi a espécie mais afetada quanto a porcentagem de anormalidades sendo encontrados valores entre 72,5% e 97,5% de anormalidades quando aplicados os tratamentos das quatro subfrações. A raiz principal pouco desenvolvida, necrose da raiz e o enrolamento do hipocótilo foram as anormalidades com maior incidência. O sistema radicular foi o parâmetro mais afetado, sendo encontradas seis diferentes tipos de anormalidades e três para a parte aérea. Os aleloquímicos exercem efeitos mais visíveis no sistema radicular das plantas, devido a que existe contato direto destas com a solução dos aleloquímicos (Lupini et al., 2010), esse efeito foi corroborado nos resultados do presente trabalho, onde o sistema radicular foi o parâmetro mais afetado pela ação das subfrações testadas. Esta condição torna as plantas mais sensíveis a ação dos aleloquímicos, uma vez que seu alongamento depende de divisões celulares e quando estas são inibidas, interferem no seu desenvolvimento normal, influenciando o aparecimento de anormalidades (Carvalho et al., 2014).

Alguns aleloquímicos podem agir inibindo processos como a germinação, além de serem capazes de induzir o aparecimento de plântulas anormais, diante disso, a avaliação das anormalidades de plântulas é uma ferramenta importante na identificação de substâncias alelopáticas (Ferreira & Áquila, 2000; Alves et al., 2011). Além disso, o efeito visível que exercem os aleloquímicos sobre processos como o crescimento de plântulas é apenas uma manifestação secundária, de algum processo que já ocorreu a nível molecular e celular (Ferreira & Áquila, 2000; Magiero et al., 2009).

A redução no crescimento das plântulas de *E. heterophylla* tratadas com as subfrações de *O. pulchella* pode ter relação com a diminuição no alongamento das células do metaxilema radicular, como foi observado no presente estudo. Isto sugere uma provável interferência dos aleloquímicos no equilíbrio entre os diferentes fitormônios, principalmente os fitormônios responsáveis pelo crescimento da planta (Gatti et al., 2010). Estes resultados corroboram com os resultados de Candido (2016) quem mencionou que a redução do comprimento de raízes de *E. heterophylla*, provocados por extratos foliares de *O. pulchella* tem relação com a diminuição no alongamento das células do metaxilema.

Os aleloquímicos podem afetar processos como a absorção de água e minerais pelas raízes, comprometendo assim a membrana plasmática e por conseguinte, a síntese de proteínas, a respiração e a fotossíntese, exercendo dessa maneira inibição no alongamento de raízes e caules (Bogatek et al., 2005; Kenany & Darier, 2013). Estes compostos podem interferir na inibição do alongamento das células, o que pode ter relação com mudanças na concentração de alguns fitormônios vegetais como as auxinas e citocininas, já que estes são considerados de vital

importância em processos como divisão celular, crescimento celular e diferenciação celular em distintas zonas do sistema radicular, diferenciação vascular e no gravitropismo das plantas (Ding & Friml, 2010; Gatti et al., 2010; Grisi et al., 2013; Takatsuka & Umeda, 2014).

O herbicida comercial Goal<sup>®</sup> utilizado como controle positivo nos bioensaios realizados é um herbicida que possui ação seletiva. É indicado no controle de monocotiledôneas e eudicotiledôneas, sua aplicação é em pré-emergência ou pós-emergência inicial (Rodrigues & Almeida, 2011). Desse modo, este herbicida controlou de maneira eficiente as espécies-alvo utilizadas, inibindo o crescimento das plântulas, em todas concentrações testadas, apresentando também alta porcentagem de plântulas mortas em ambas espécies-alvo.

## 5. CONCLUSÃO

As subfrações oriundas da fração acetato etílica de folhas da época chuvosa da espécie *O. pulchella* foram capazes de inibir o crescimento de coleótilos de *T. aestivum* e de plântulas das espécies invasoras de culturas agrícolas *E. heterophylla* e *M. maximus*. As subfrações A1 e A2 foram as que apresentaram os maiores valores de inibição em todos os parâmetros avaliados em ambas espécies-alvo. O efeito fitotóxico destas subfrações foi mais visível na espécie *E. heterophylla*, uma vez que os valores de inibição observados tanto na parte aérea como no sistema radicular não mostraram diferença estatística com o controle positivo (herbicida). Desta maneira, o efeito inibitório da maior concentração da subfração A1 foi maior que o mostrado pela ação do herbicida. É importante ressaltar que na subfração A1, os resultados da cromatografia em camada delgada mostraram a presença do salicilato de benzila e benzoato de benzila, compostos relatados na literatura como compostos com atividade fitotóxica. A redução no crescimento radicular das plântulas de *E. heterophylla* pode estar relacionada com a diminuição no alongamento das células do metaxilema. Isto pode indicar a interferência dos aleloquímicos presentes nas subfrações no equilíbrio hormonal, uma vez que estes são de vital importância em diversos processos nas plantas. Dessa maneira foi comprovado o potencial fitotóxico das subfrações oriundas da fração acetato etílica de folhas da época chuvosa da espécie *O. pulchella*.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Adegas, F. S., Gazziero, D. L. P., Oliveira JR, R. S., Mendes, R. R., & Rodrigues L. J. *Euphorbia heterophylla*: um novo caso de resistência ao glifosato no Brasil. Embrapa soja. Comunicado técnico 98, Londrina, PR. 5p, 2020.

Agostinetto, D. & Vargas, L. Resistência de plantas daninhas a herbicidas. In: Agostinetto, D.; Vargas, L. (Ed.). Resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil. Pelotas: Editora UFPel, p. 9-32, 2014.

Alves, L. L.; Oliveira, P. V. A.; França, S. C.; Alves, P. L. C.; Pereira, P. S. Atividade alelopática de extratos aquosos de plantas medicinais na germinação de *Lactuca sativa* L. e *Bidens pilosa* L. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu, v.13, n.3, p.328-336, 2011.

Bertholdsson, N. O. Breeding spring wheat for improved allelopathic potential. Weed Research 50: 49-57. 2010.

Bertin C., Yang X.H., Weston L.A. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. Plant and Soil, 256: 67–83, 2003.

Bogatek, R.; Gniazdowska, A.; Zakrzewska, W.; Oracz, K.; Gawronski, S. W. Allelopathic effects of sunflower extracts on mustard seed germination and seedling growth. Biologia Plantarum, v. 50, n. 1, p. 156-158, 2005.

Borella, J.; Pastorini, I. L. H. Efeito alelopático de frutos de umbu (*Phytolacca dioica* L.) sobre a germinação e crescimento inicial de alface e picão-preto. Ciências e Agrotecnologia. v.34, n.4, 1120, 2010.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Regras para análise de sementes. Brasília, 395 p 2009.

Candido, L. P. Busca de extratos e compostos ativos com potencial herbicida e inseticida nas espécies *Davilla elliptica* St. Hill e *Ocotea pulchella* Nees & Mart. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2016.

Candido, L. P.; Varela, R. M.; Torres, A.; Molinillo, J. M. G.; Gualtieri, S. C. J.; Macías, F. A. Evaluation of the Allelopathic Potential of Leaf, Stem, and Root Extracts of *Ocotea pulchella* Nees et Mart. Chemistry & Biodiversity. 13. p1058 – 1067, 2016.

- Carvalho, L. B.; Bianco, S.; Guzzo, C. D. Interferência de *Euphorbia heterophylla* no crescimento e acúmulo de macronutrientes da soja. *Planta Daninha*, v. 28, p. 33-39, 2010.
- Carvalho, W. P., Carvalho, G. J., Abbade Neto, D. O., & Teixeira, L. G. V. Alelopatia de extratos de adubos verdes sobre a germinação e crescimento inicial de alface. *Bioscience Journal*, 30, 1-11, 2014.
- Correia, N. M.; Gomes, L. P.; Perussi, F. J. Control of *Brachiaria decumbens* and *Panicum maximum* by S-metolachlor as influenced by the occurrence of rain and amount of sugarcane straw on the soil. *Acta Sci. Agron.* vol.34 no.4 Maringá, 2012.
- Costa, E. A. D.; Matallo, M. B.; Carvalho, J. C.; Rozanski, A. Eficiência de nova formulação do herbicida oxyfluorfen no controle de plantas daninhas em área de *Pinus caribaea* morelet var. hondurensis barr. et Golf. *Revista Árvore*, v. 26, p. 683-689, 2002.
- Cury, J. P.; Santos, J. B.; Valadão Silva, D.; Carvalho, F. P.; Braga, R. R.; Byrro, E. C. M.; Ferreira, E. A. Produção e partição de matéria seca de cultivares de feijão em competição com plantas daninhas. *Planta Daninha*, v. 29, n. 1, p. 149-158, 2011.
- Cury, J. P.; Santos, J. B.; Silva, E. B.; Byrro, E. C. M.; Braga, R. R.; Carvalho, F. P.; Valadão Silva, D. Acúmulo e partição de nutrientes de cultivares de milho em competição com plantas daninhas. *Planta Daninha*, Viçosa-MG, v. 30, n. 2, p. 287-296, 2012.
- Denardin, R. B. N.; Kraemer, A.; Corona, J. M.; Bernardi, D.; Sobral, L. S.; Moura, N. F. Potencial alelopático de extratos de folhas e frutos verdes de feijão de porco (*Canavalia ensiformis* (L.) DC.). In: X Congresso Brasileiro de Agroecologia. Anais, Brasília. Vol. 13, N° 1, 2018.
- Ding, Z.; Friml, J. Auxin regulates distal stem cell differentiation in *Arabidopsis* roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 107, p. 12046-12051, 2010.
- Duke, S. O.; Dayan, F. E.; Ramafnani, J.G.; RIMADO, A.M. Natural products as sources of herbicides: current status and future trends. *Weed Research*, vol. 40, p.499-505, 2000.
- Ferreira, G. A., & Áquila, M. E. A. Alelopatia: Uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 12, 175-204, Edição Especial, 2010.
- Ferreira, D. F. SISVAR: A computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35(6), p.1039-1042, 2011.

Formigheiri, F. B. Alelopatia de *Ambrosia artemisiifolia* na germinação e no crescimento de plântulas de milho e soja. *Revista de Ciências Agrárias*, Lisboa, v. 41, n. 3, p. 729-739, 2018.

Gatti, A. B., Ferreira, A. G., Arduin, M., & Perez, S. C. G. A. Allelopathic effects of aqueous extracts of *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze on development of *Sesamum indicum* L. seedlings. *Acta Botânica Brasílica*, 24, 454-461, 2010.

Gonçalves, V. D.; Coelho, M. F. B.; Camili, E. C.; Valentini C. M. A.; Azevedo, R. A. B.; Piton, L. P. Allelopathic activity of *alibertia edulis* Rich. leaf extract. *Journal of Global Biosciences*, v. 5, p. 4166-4171, 2016.

Grigolli, J. F. J.; Pereira, F. C. M.; Peñaherrera, L. C.; Santos, E. A. & Ferreira, M. C. Controle de *Euphorbia heterophylla* com mesotrione e óleos para diferentes pontas de pulverização. *Revista Brasileira de Herbicidas*, v. 10, n. 3, p. 266-276, 2011.

Grisi, P. U., Gualtieri, S. C. J., Anese, S., Pereira, V. C., & Forim, M. R. Efeito do extrato etanólico de *Serjania lethalis* no controle de plantas daninhas. *Planta Daninha*, 31(2), 239-248, 2013.

Habermann, E.; Pereira, V. C.; Imatomi, M.; Pontes, F. C.; Gualtieri, S. C. J. Fitotoxicidade e fracionamento biodirigido dos extratos de cascas de *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg (Myrtaceae). *Biotemas* 28:37-44, 2015.

Hammer, O.; Harper, D. A. T.; & Ryan, P. D. Past: Paleontological Statistic software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica*, 4(1), 1-9, 2001.

Hancock, C. R., Barlow, H. W. B., & Lacey, H. J. The east malling coleoptile straight growth test method. *Journal of Experimental Botany*, 15(1), 166-17, 1964.

HEAP, I. The International Herbicide-Resistant Weed Database, 2020. Acessado em Março 04, 2020 disponível em: <http://www.weedscience.org/Pages/GeoChart.aspx>.

IAS – International Allelopathy Society. (2020). Acessado em Janeiro 12, 2020, disponível em: <https://allelopathy-society.osupytheas.fr/about/>.

Imatomi, M.; Novaes, P.; Matos, A. P.; Gualtieri, S. C. J.; Molinillo, J. M. G.; Lacret, R.; Varela, R. M.; Macías, F. A. Phytotoxic effect of bioactive compounds isolated from *Myrcia tomentosa* (Myrtaceae) leaves. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 46, p. 29-35, 2013.

Inoue, M. H.; Santana, D. C.; Vilhena, K. S. S.; Souza Filho, A. P. S.; Guilhon, G. M. S. P.; Possamai, A. C. S.; Silva, L. E.; Dallacort, R. Avaliação do potencial alelopático de substâncias isoladas em sementes de araticum (*Annona crassiflora*). *Planta Daninha*. v. 28, p. 735-741, 2010.

Juchem, F.; Lauxen, G. A.; Silva, F. B.; Denardin, R. B. N.; Sobral, L. S. Potencial alelopático de diferentes extratos de frutos de adubos verdes sobre a germinação de sementes de couve. *Cadernos de Agroecologia*, v. 8, n. 2, dez. 2013.

Karabegović, I. T.; Stojicevic', S. S.; Velickovic', D. T.; Todorovic', Z. B.; Nikolic', N. C.; Lazic', M. L. The effect of different extraction techniques on the composition and antioxidant activity of cherry laurel (*Prunus laurocerasus*) leaf and fruit extracts. *Industrial Crops and Products*, v.54, p.142-148, 2014.

Kenany, E. T. & Darier, S. M. Suppression effects of *Lantana camara* L. aqueous extracts on germination efficiency of *Phalaris minor* Retz. and *Sorghum bicolor* L. (Moench). *Journal of Taibah University for Science*, [S.l.], v. 7, n. 2, p. 64-71, 2013.

Kim, Y. O.; Johnson, J. D.; Lee, E. J. Phytotoxic effects and chemical analysis of leaf extracts from three *Phytolaccaceae* species in South Korea. *Journal of Chemical Ecology*. New York, v. 31, n. 5, p. 1175-1186, 2005.

Kraus, J. E. & Arduin, M. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Rio de Janeiro, Seropédica. Editora Universitária Rural, Rio de Janeiro, p. 198, 1997.

Kuva, M. A.; Gravena, R.; Pitelli, R. A.; Christoffoleti, P. J.; Alves, P. L. C. A. Períodos de interferência das plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar: III - capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) e capim-colonião (*Panicum maximum*). *Planta Daninha*, Viçosa, v.21, n.1, p.37-44, 2003.

Linhares Neto, M. V.; Santana, F. S.; Malheiros, R. S. P.; Machado, L. L.; Mapeli, A. M. Avaliação alelopática de extratos etanólicos de *Copaifera sabulicola* sobre o desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa*, *Lycopersicum esculentum* e *Zea mays*. *Biotemas*. v.27, n.3, p.23-32, p.2175-7925, 2014.

Lopes Ovejero, R. F.; Soares, D. J.; Oliveira, W. S.; Fonseca, L. B.; Berger, G. U.; Soteris, J. K.; Christoffoleti, P. J. Residual herbicides in weed management for glyphosate-resistant soybean in Brazil. *Planta daninha* vol.31 no.4, 2013.

- Lorenzi, H. Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 4. ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 640 p, 2008.
- Lupini, A., Sorgonà, A., Miller, A. J., & Abenavoli, M. R. Short-term effects of coumarin along the maize primary root axis. *Plant Signaling & Behavior*, 5, 1395-1400, 2010.
- Machado, A. B.; Trezzi, M. M. I.; Vidal, R. A.; Patel, F.; Cieslik, L. F.; Debastiani, F. Rendimento de grãos de feijão e nível de dano econômico sob dois períodos de competição com *Euphorbia heterophylla*. *Planta daninha* vol.33 no.1 Viçosa, 2015.
- Macías, F. A., Molinillo, J. M. G., Varela, R. M., Galindo, J. C. G. Allelopathy –a natural alternative for weed control. *Pest Management Science*, 63: 327-348, 2010.
- Magiero, E. C.; Assmann, L. M.; Marchese, J. A.; Capelin, D.; Paladin, M. V.; Trezzi, M. M. Allelopathic effect of *Artemisia annua* L. on the germination and initial development of lettuce (*Lactuca sativa* L.) and wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla* L.) seedlings. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu*, v.11, n.3, p.317-324, 2009.
- Marques, R. P.; Martins, D.; Costa, S. I. A.; Vitorino, H. S. Densidades de palha e condições de luminosidade na germinação de sementes de *Euphorbia heterophylla*. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 33, n. 3, p. 867-872, 2012.
- Miranda, M. A. F. M.; Varela, R. M.; Torres, A.; Molinillo, J. M. G., Gualtieri, S. C. J.; Macías, F. A. Phytotoxins from *Tithonia diversifolia*. *Journal of Natural Products*. v.14, p.1-10, 2015.
- Moraes, L. P. S.; Gualtieri, S. C. J.; Lima, M. I. S.; Gatti, A. B.; Pereira, V. C.; Miranda, M. A. F. M. Efeitos alelopáticos de *Lafoensia glyptocarpa* Koehne sobre *Sesamum indicum* L. e sobre o crescimento de coleótilos de *Triticum aestivum* L. *IHERINGIA, Porto Alegre*, v. 69, n. 1, p. 37-48, 2014.
- Novaes, P. Alelopatia e bioprospecção de *Rapanea ferruginea* e de *Rapanea umbellate*. Dissertação. Pos-graduação em Ecologia e Recursos Naturais - UFSCar, 2011.
- Oliveira JR, R. S.; Carneiro, J. C.; Constantin, J.; Santos, G.; Martini, P. E.; Francischini, A. C.; & Osipe, J. B. Aplicações isoladas ou associadas de diuron, oxyfluorfen e prometryne para o controle de *Euphorbia heterophylla*. *Planta Daninha, Viçosa*, vol. 29, n. 3, p. 635-645, 2011.
- 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* 26(3): 607-618. 2012.

- Oliveira, J. S.; Peixoto, C. P.; Poelking, V. G. C.; Almeida, A. T. Avaliação de extratos das espécies *Helianthus annuus*, *Brachiaria brizantha* e *Sorghum bicolor* com potencial alelopático para uso como herbicida natural. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Campinas, v.17, n.3, p.379-384, 2015.
- Patel, S. M.; Venkata, K. C. N.; Bhattacharyya, P.; Sethi, G.; Bishayee, A. Potential of neem (*Azadirachta indica* L.) for prevention and treatment of oncologic diseases. *Seminars in Cancer Biology*, Elsevier, 2016.
- Pires, N. M. & Oliveira, V. R. Alelopatia. In: Oliveira Jr, R. S.; Constantin, J.; Inoue, M. H. *Biologia de Plantas Daninhas*. cap. 5. 2011.
- Reigosa, M.; Gomes, A. S.; Ferreira, A. G.; Borghetti, F. Allelopathic research in Brazil. *Acta Botanica Brasilica*, São Paulo, v. 27, n. 4, p. 629-646, 2013.
- Rice, E.L. *Allelopathy*. 2nd ed., New York, Academic Press, 1984
- Riffel, A.; & Costa, J. G. Os voláteis de plantas e o seu potencial para a agricultura. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 48 p, 2015.
- Rodrigues, B. N.; Almeida, F. S. *Guia de herbicidas*. 6.ed. Londrina: IAPAR, 697 p, 2011.
- Silva, J.; Fortes, A. M. T.; Gomes, F. M.; Pinto, T. T.; Bonamigo, T. & Boiago, N. P. Alelopatia de *Camelina sativa* Boiss. (Brassicaceae) sobre a germinação e desenvolvimento inicial de *Bidens pilosa* (L.) e *Glycine max* (L.) Merr. *Biotemas* 24(4):17-24, 2011.
- Souza Filho, A. P. S.; Guilhon, G. M. S. P.; Santos, L. S. Metodologias empregadas em estudos de avaliação da atividade alelopática em condições de laboratório: revisão crítica. *Planta Daninha*, Viçosa, v. 28, n. 3, p. 698-697, 2010.
- Taiz, L.; Zeiger, E.; Moller, I.; & Murphy, A. *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. (6.ed.). Porto Alegre: Artmed. 888 p, 2017.
- Takatsuka, H.; Umeda, M. Hormonal control of cell division and elongation along differentiation trajectories in roots. *Journal of Experimental Botany*, v. 65, p. 2633- 2643, 2014.
- Tiwari, P.; Kumar, B.; Kaur, M.; Kaur, G.; Kaur, H. Phytochemical screening and Extraction: A Review, *Int. Pharmaceutica Scientia*,1(1):98-106, 2011.

Trezzi, M. M., Xavier, E., Vidal, R. A., Portes, E. D. S., Vottri, M., & Lamego, F. P. Teste rápido de imersão foliar de *Euphorbia heterophylla* para confirmação de resistência a herbicidas inibidores da Protox e da ALS. *Planta Daninha*, 29:901-12, 2011.

Trezzi, M. M., Machado, A. B. & Xavier, E. Soja: Impacto do leiteiro e estratégias de manejo. *Cultivar*, n. 183, p. 8-10, 2014.

Tur, C. M.; Borella, J.; Pastorini, L. H. Alelopatia de extratos aquosos de *Duranta repens* sobre a germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* e *Lycopersicon esculentum*. *Revista Biotemas*, v.2, n.23, p.13-22, 2010.

Xavier, E., Trezzi, M. M., Oliveira, M. C., Vidal, R. A., & Brusamarelo, A. P. Activity of Antioxidant Enzymes in *Euphorbia heterophylla* Biotypes and their Relation to Cross Resistance to ALS and Protox Inhibitors. *Planta Daninha*, v. 36, p. 1-14, 2018.

## CONCLUSÃO GERAL

Através dos resultados obtidos no presente estudo, é possível concluir que as frações, principalmente as frações foliares de acetato de etila e subfrações de *O. pulchella* possuem aleloquímicos com atividade herbicida. Na subfração A1 foi detectada a presença dos compostos salicilato de benzila e benzoato de benzila. Da mesma forma, foi testada e comprovada a atividade fitotóxica dos compostos sintéticos salicilato de benzila e benzoato de benzila, mencionados na literatura como os responsáveis pela atividade fitotóxica exibida por *O. pulchella*. Estes compostos exerceram em alguns casos, inibição estatisticamente igual a aquela exercida pelo herbicida Goal<sup>®</sup> (i.a. Oxyfluorfen), especialmente na espécie *E. heterophylla*. Comprovando assim o potencial fitotóxico da espécie *O. pulchella* e dos compostos sintéticos salicilato de benzila e benzoato de benzila.