

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS

**Fracionamento de extratos bioativos de *Drimys brasiliensis*
Miers e identificação de compostos com atividade
fitotóxica e inseticida**

Simoni Anese

São Carlos, fevereiro de 2014.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS

**Fracionamento de extratos bioativos de *Drimys brasiliensis*
Miers e identificação de compostos com atividade
fitotóxica e inseticida**

Doutoranda: Simoni Anese
Orientadora: 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 obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração Ecologia e Recursos Naturais.

São Carlos, fevereiro de 2014.

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

A579fe Anese, Simoni.
Fracionamento de extratos bioativos de *Drimys
brasiliensis* Miers e identificação de compostos com
atividade fitotóxica e inseticida / Simoni Anese. -- São Carlos
: UFSCar, 2014.
122 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
2014.

1. Ecologia vegetal. 2. Alelopatia. 3. Sesquiterpenos. 4.
Fitotoxicidade. 5. Plantas daninhas. 6. Afídeos. I. Título.

CDD: 581.5 (20^a)

SIMONI ANESE

Tese apresentada à Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada em 21 de fevereiro de 2014

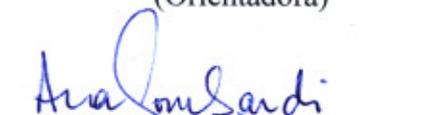
BANCA EXAMINADORA

Presidente



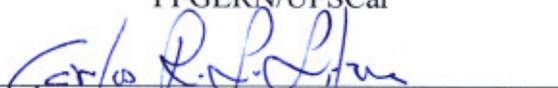
Prof. Dra. Sonia Cristina Juliano Gualtieri
(Orientadora)

1º Examinador



Prof. Dra. Ana Teresa Lombardi
PPGERN/UFSCar

2º Examinador



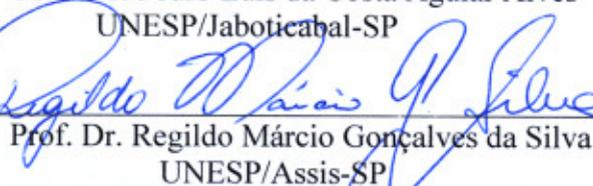
Prof. Dr. Carlos Roberto Sousa e Silva
PPGERN/UFSCar

3º Examinador



Prof. Dr. Pedro Luís da Costa Aguiar Alves
UNESP/Jaboticabal-SP

4º Examinador



Prof. Dr. Regildo Márcio Gonçalves da Silva
UNESP/Assis-SP

Mas, a despeito da pedra, as plantas continuam a nascer, crescer, florescer...

Rubem Alves.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meus caminhos e proporcionar muitas bênçãos em minha vida, não de acordo com a minha vontade, mas ao seu tempo. Hoje, eu percebo que tudo acontece no momento certo!

Aos meus pais queridos, Roseni Antonio e Cecília, por serem meu porto seguro e por sempre apoiarem minhas decisões. Obrigada pelo total e irrestrito amor que vocês têm por mim, e por proporcionarem, com muito esforço ao longo de todos esses anos, o que julgamos serem as maiores heranças, o estudo e o conhecimento!

Agradeço também aos meus irmãos, Luis Paulo e Tiago, às minhas cunhadas, Tatiane e Francieli e, ao meu pequeno sobrinho, Érick Luis, pelo carinho, amizade e apoio em todos os sentidos. Eu amo muito vocês!

À professora Dra. Sonia Cristina Juliano Gualtieri, não só pela orientação acadêmica, mas pelo apoio incondicional e, principalmente, pela confiança, amizade e liberdade que me foram dadas desde o início.

Ao professor Dr. Roberto Gomes Souza Berlinck, do Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP), pela co-orientação, dicas no desenvolvimento do estudo fitoquímico e, principalmente, por disponibilizar espaço, equipamentos e material para a realização do trabalho.

Ao biotecnólogo Carlos Casali pela amizade, ajuda nas coletas de campo, dicas e auxílio nas atividades no laboratório de ecofisiologia de sementes.

Às tecnólogas do Laboratório de Produtos Naturais do IQSC-USP, Karin e Fabiana, por terem sido muito solícitas sempre e, com muita paciência, auxiliarem nos experimentos do estudo fitoquímico. Vocês foram fundamentais na realização desta etapa do trabalho!

Ao Sr. Ademir, pela ajuda nas coletas de campo.

Às professoras que compuseram a banca de qualificação, Dra. Silmara Fanti, Dra. Maria Inês Salgueiro Lima e Dra. Andréia Pereira, pelas sugestões que contribuíram com o desenvolvimento do trabalho.

A todos os colegas do laboratório de ecofisiologia de sementes pela sincera amizade, alegre convivência, conhecimentos compartilhados e parceria na realização de trabalhos. Muito obrigada, não em ordem de importância, e sim pela ordem com que chegaram em minha vida: Luciana Jatobá, Maristela Imatomi, Paula Novaes, Patricia Umeda, Viviane Pereira, Leandro Takao, Maria Augusta Machado e Laffayette Pereira.

Ao prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira e aos funcionários do Laboratório de RMN do Departamento de Química da UFSCar, pelas análises espectroscópicas de RMN.

À Wanessa Gambarra pelas ideias, auxílio no desenvolvimento dos experimentos da atividade inseticida e identificação do pulgão-preto dos citros (*Toxoptera citricidus* Kilkaldy).

Aos alunos de pós-graduação do laboratório de produtos naturais do IQSQ-USP, que direta ou indiretamente contribuíram para realização do estudo fitoquímico. Particularmente, devo agradecer ao Mário Ferreira, pelas dicas e auxílio valiosos.

Agradeço aos amigos tão especiais que Deus colocou em meu caminho: Aline Garcia, Eliziane Scariot, Azize Nassr, Frederico Yuri, Danilo Spatti, Karla Freitas, Lidiane Silva, Ricardo Angélico, Ricardo Bazan, Dayne Almeida, Joanna Santos, Angela Fushita e tantos outros, sem vocês os quatro anos de doutorado não teriam sido tão divertidos e enriquecedor. Vocês marcaram a minha vida em São Carlos.

Às meninas que moraram comigo, Eliziane Scariot, Josiane Ribolli, Beatriz Scariot e, na etapa final do doutorado, Andréia Nasser, Aline Zaffani, Ranata Vilar, Cássia Vilela e Maria Clara Fava pela agradável convivência, conversas e por suprirem, em muitos momentos, a ausência da minha família em São Carlos.

A todos os colegas, professores e funcionários do PPG-ERN (UFSCar) que, de alguma forma, contribuíram com a minha trajetória acadêmica durante o doutorado.

À CAPES (bolsa de estudo) e ao CNPq e a FAPESP (suporte financeiro).

Muito obrigada!!!

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	1
ABSTRACT	2
INTRODUÇÃO GERAL	3
REFERÊNCIAS	11
CAPÍTULO 1	19
RESUMO	20
INTRODUÇÃO	21
MATERIAL E MÉTODOS	23
<i>Coleta do material vegetal e preparo dos extratos</i>	23
<i>Potencial osmótico e pH dos extratos</i>	25
<i>Bioensaios de germinação</i>	25
<i>Bioensaios de Crescimento</i>	26
<i>Análise estatística</i>	26
RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS	39
CAPÍTULO 2	46
RESUMO	47
INTRODUÇÃO	48
MATERIAL E MÉTODOS	49
<i>Material vegetal</i>	49
<i>Preparo das frações químicas</i>	49
<i>Bioensaios de Fitotoxicidade</i>	50
<i>Análises estatísticas</i>	52
RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	63
CAPÍTULO 3	69

RESUMO	70
INTRODUÇÃO	70
MATERIAL E MÉTODOS	73
<i>Material vegetal</i>	73
<i>Estudo fitoquímico</i>	73
<i>Bioensaios</i>	76
<i>Análises estatísticas</i>	78
RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS	89
CAPÍTULO 4.	97
RESUMO	98
INTRODUÇÃO	99
MATERIAL E METÓDOS	101
<i>Obtenção do material vegetal</i>	101
<i>Obtenção da fração hexânica e do composto poligodial</i>	101
<i>Preparo das soluções</i>	102
<i>Obtenção dos adultos e ninfas de T. citricidus</i>	102
<i>Bioensaios de mortalidade</i>	103
<i>Análise dos dados</i>	103
RESULTADOS E DISCUSSÃO	104
CONCLUSÃO	110
REFERÊNCIAS	110
CONCLUSÃO GERAL DA TESE	114
ANEXOS	116

SUMÁRIO DE FIGURAS

Figura 1.1 - Esqueleto básico drimano (A) e rearranjo drimano (B).....	8
Figura 1.2 - <i>Drimys brasiliensis</i> Miers subsp. <i>brasiliensis</i> : aspecto geral da planta adulta, em estágio de floração	10
Figura 1.1 - Valores médios mensais da precipitação (barras) e temperatura (símbolos) de janeiro a dezembro de 2010 no município de São Carlos, SP (Fonte: INMET – OMM: 83726). As coletas foram realizadas ao final dos meses de abril e agosto de 2010 (setas).....	24
Figura 1.2 - Porcentagem de Germinação (G %), Tempo Médio de Germinação (TMG), Índice de Velocidade de Germinação de Maguire (IVG), crescimento radicular e da parte aérea de gergelim, submetido à ação do extrato de folhas de <i>D. brasiliensis</i> , coletadas ao final da estação chuvosa e seca.....	28
Figura 1.3 - Porcentagem de Germinação (G %), Tempo Médio de Germinação (TMG), Índice de Velocidade de Germinação de Maguire (IVG), crescimento radicular e da parte aérea de trigo e rabanete, submetidos à ação do extrato de folhas de <i>D. brasiliensis</i> Miers, em diferentes concentrações.....	32
Figura 1.4 - Porcentagem de Germinação (G %), Tempo Médio de Germinação (TMG), Índice de Velocidade de Germinação de Maguire (IVG), crescimento radicular e da parte aérea de trigo e rabanete, submetidos à ação do extrato de cascas de <i>D. brasiliensis</i> Miers, em diferentes concentrações.....	34
Figura 1.5 - Porcentagem de Germinação (G %), Tempo Médio de Germinação (TMG), Índice de Velocidade de Germinação de Maguire (IVG), crescimento radicular e da parte aérea de trigo e rabanete, submetidos à ação do extrato de raízes de <i>D. brasiliensis</i> Miers, em diferentes concentrações.....	35
Figura 1.6 - Germinação (A), Tempo Médio de Germinação (B) e crescimento radicular (C) de trigo e rabanete, sob a ação do extrato de diferentes órgãos de <i>D. brasiliensis</i> Miers.....	37
Figura 2.1 - Germinação e crescimento de plântulas de capim-colonião submetidas aos efeitos das frações hexânica (◆; ___y') e AcOEt (□; ---y) de raízes de <i>D. brasiliensis</i> , em diferentes concentrações.....	53
Figura 2.2 - Germinação e crescimento de plântulas de capim-colonião submetidas ao efeito das frações hexânica (◆; ___y') e AcOEt (○; ---y) de folhas de <i>D. brasiliensis</i> , em diferentes concentrações.....	54

- Figura 2.3** - Germinação e crescimento de plântulas de amendoim-bravo submetidas ao efeito das frações hexânica (♦; ___'y) e AcOEt (□; ---y) de raízes de *D. brasiliensis*, em diferentes concentrações..... 56
- Figura 2.4** - Crescimento de plântulas de amendoim-bravo submetido ao efeito das frações hexânica (♦; —y') e AcOEt (○; ---y) de folhas de *D. brasiliensis*, em diferentes concentrações.....57
- Figura 2.5** - Tamanho médio das células do metaxilema de raízes de plântulas de amendoim-bravo crescidas em diferentes concentrações das frações hexânicas e AcOEt de folhas e raízes de *D. brasiliensis*, e do controle.....60
- Figura 2.6** - Fotomicrografias de células do metaxilema em raízes de plântulas de amendoim-bravo crescidas no controle (A), e na concentração de $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ das frações AcOEt das folhas (B), hexânica das folhas (C), AcOEt das raízes (D) e hexânica das raízes (E) de *D. brasiliensis*. Escala = $50 \mu\text{m}$61
- Figura 2.7** - Comprimento da raiz (A) e parte área (B) de plântulas de amendoim-bravo e capim-colônia submetidas à ação das frações hexânicas e AcOEt de folhas e raízes de *D. brasiliensis*, e do herbicida oxyfluorfen.....62
- Figura 3.1** - Efeitos das frações hexânica, AcOEt e aquosa do extrato das raízes de *D. brasiliensis* e do herbicida oxyfluorfen sobre o crescimento de coleótilos de trigo.. 79
- Figura 3.2** - Estruturas químicas dos compostos 1-4 isolados a partir das frações hexânica e AcOEt das raízes de *D. brasiliensis*..... 80
- Figura 3.3** - Efeito de diferentes concentrações do poligodial (1), poligodial 12 α -acetal (2), mistura dos compostos dendocarbin L e (+) fuegin (3) e do herbicida oxyfluorfen sobre o crescimento de coleótilos de trigo..... 81
- Figura 3.4** - Efeito do composto poligodial sobre crescimento (mm) radicular (A), da parte aérea (B) e percentual de germinação (C), das espécies *E. crus-galli*, *I. grandifolia* e *B. verna*, em diferentes concentrações.. 84
- Figura 3.5** - Tamanho das células do metaxilema (μm) de raízes de plântulas de *I. grandifolia* sobre efeito de diferentes concentrações do composto poligodial..... 85

- Figura 3.6** - Fotomicrografias das células do metaxilema de raízes de plântulas de *I. grandifolia* que cresceram na presença do controle (A) e nas concentrações de 30 μ M (B) e 300 μ M (C) do composto poligodial..... 86
- Figura 3.7** - Frequências relativas das classes de tamanho (μ m) das células do metaxilema de raízes de plântulas de *I. grandifolia* que cresceram no controle e na presença de soluções de diferentes concentrações do composto poligodial. 87
- Figura 4.1** - Mortalidade de adultos e ninfas de *T. citricidus* submetidos a aplicações de diferentes concentrações da fração hexânica de *D. brasiliensis* sobre o inseto (A) e sobre o ramo caulinar jovem do hospedeiro (B), após 48 horas de exposição..... 104
- Figura 4.2** - Mortalidade (%) de ninfas e adultos de *T. citricidus* após 24 e 48 horas de exposição às soluções da fração hexânica de raízes de *D. brasiliensis*, por meio de aplicações diretas sobre o inseto (AD) e aplicações sobre o ramo do hospedeiro (AH)..... 107
- Figura 4.3** - Mortalidade de adultos e ninfas de *T. citricidus* submetidos a aplicação direta de diferentes concentrações do poligodial, isolado de raízes de *D. brasiliensis*, após 48 horas de exposição.. 108

SUMÁRIO DE TABELAS

- Tabela 1.1** - Teste-F para comparar os coeficientes angulares das regressões lineares, oriundas do teste de germinação e crescimento inicial de gergelim submetida à ação de extratos de folhas de *D. brasiliensis*, coletadas ao final da estação chuvosa e seca..... 30
- Tabela 2.1** - Germinação de sementes e morfologia de plântulas de capim-colônia submetidas à ação de diferentes frações do extrato das folhas de *D. brasiliensis*, em diferentes concentrações. 55
- Tabela 2.2** - Germinação de sementes e morfologia de plântulas de amendoim-bravo submetidas à ação de diferentes frações do extrato das folhas e raízes de *D. brasiliensis*, em diferentes concentrações. 55
- Tabela 4.1** - Coeficiente angular, concentração letal (CL_{50} , em mg/mL) e intervalo de confiança após 48 horas de exposição da fração hexânica de raízes *D. brasiliensis*

sobre adultos e ninfas de *T.citricidus*, por meio de aplicação direta sobre o inseto e aplicação no hospedeiro.105

Tabela 4.2 - Coeficiente angular, concentração letal (CL_{50} , em $\mu\text{g/mL}$) e intervalo de confiança após 48 horas de exposição de soluções do composto poligodial, isolado de raízes *D. brasiliensis*, sobre adultos e ninfas de *T.citricidus*, por meio de aplicações direta no inseto.109

RESUMO GERAL

Ao longo do seu processo evolutivo, as plantas desenvolveram rotas de biossíntese, através das quais sintetizam e acumulam uma ampla variedade de metabólitos secundários, que respondem às características do meio onde se encontram. Os estudos realizados sobre os efeitos desses compostos em organismos próximos constituem o campo da alelopatia. A alelopatia representa um importante fenômeno dentro da ecologia química de plantas e envolve a síntese de metabólitos secundários, a partir dos quais se pode produzir pesticidas naturais, mais específicos, menos prejudiciais ao ambiente e aplicáveis a um modelo de agricultura de base ecológica. A espécie *Drimys brasiliensis* Miers ocorre na Mata Atlântica e no domínio do bioma Cerrado. Fitoquimicamente é caracterizada pela presença de monoterpenos, sesquiterpenos e flavonóides com grande potencial de uso na indústria farmacológica. São poucos os trabalhos publicados que tratam de investigações do potencial de *D. brasiliensis* e de seus metabólitos secundários para atuarem como pesticidas naturais, principalmente no que concerne às ações herbicida e inseticida. Nesse sentido, no primeiro capítulo foram realizadas investigações sobre o potencial fitotóxico de extratos aquosos de *D. brasiliensis* em função da sazonalidade e de diferentes órgãos da planta. O efeito fitotóxico de *D. brasiliensis* foi influenciado pela época de coleta, com atividade mais evidente em folhas coletadas na estação seca. Extratos aquosos de folhas, raízes e cascas do caule de *D. brasiliensis* apresentaram atividade inibitória sobre plantas cultivadas, e todos os órgãos constituem uma fonte promissora para a busca de compostos fitotóxicos. No segundo capítulo, foi investigado o potencial fitotóxico de frações do extrato bruto de folhas e raízes de *D. brasiliensis* sobre as plantas infestantes *Panicum maximum* Jacq e *Euphorbia heterophylla* L. As inibições no crescimento inicial, decorrentes da aplicação da fração hexânica das raízes, foram similares ao efeito produzido pelo herbicida oxyfluorfen, indicando a eficiência de *D. brasiliensis* para o controle das espécies infestantes estudadas. No terceiro capítulo, foi realizado o isolamento biomonitorado de compostos presentes em raízes de *D. brasiliensis*. Foram isolados quatro drimanos sesquiterpenos das frações bioativas de raízes, determinados como poligodial, poligodial 12 α -acetal, dendocarbin L e (+) fuegin. O poligodial exerceu efeitos fitotóxicos sobre coleóptilos de trigo e sobre duas espécies infestantes e uma cultivada avaliadas. No último capítulo, o efeito da fração hexânica e do poligodial obtidos de raízes de *D. brasiliensis* foi avaliado sobre *Toxoptera citricidus* Kirkaldy (pulgão-preto dos citros), e ambos causaram toxicidade, provocando elevada mortalidade nas fases de ninfas e adultos deste afídeo. O poligodial, isolado pela primeira vez nas raízes de *D. brasiliensis*, pode ser o principal responsável pelas atividades biológicas registradas neste estudo. Os resultados obtidos permitem a indicação deste composto como um potencial biopesticida.

Palavras-chave: alelopatia, sazonalidade, sesquiterpenos, fitotoxicidade, plantas invasoras, pulgão-preto dos citros.

ABSTRACT

Along its evolutionary history, plants have developed biosynthetic routes to synthesize and accumulate a wide variety of secondary metabolites, which respond to the environment characteristics where they occur. The studies about these compounds effects on nearby organisms constitute the field of allelopathy. Allelopathy is an important phenomenon in plant chemical ecology that involves bioactive compounds, from which one can produce natural pesticides that would be more specific, less harmful to the environment and applied to a model of sustainable agriculture. *Drimys brasiliensis* Miers is found in the Atlantic Forest and in the Cerrado domain. It's chemically characterized by the presence of monoterpenes, sesquiterpenes and flavonoids, with great use potential in the pharmaceutical industry. There are few studies about the allelopathic potential of *D.brasiliensis* and its secondary metabolites to act as natural pesticides, specially as herbicide or insecticide. Thus, in the first chapter we studied the phytotoxic potential of aqueous extracts of *D.brasiliensis* according to the seasonality and different plant organs. The phytotoxic effect of *D.brasiliensis* is influenced by the period of collection, with more evident activity in leaves collected in the dry season. Aqueous extracts from leaves, roots and stems of *D.brasiliensis* showed activity on crop plants, and all organs are a promising source in the search of phytotoxic compounds. In the second chapter, we investigated the phytotoxic potential of crude extract fractions from *D. brasiliensis* roots and leaves on weeds. The inhibitory effects of the root hexane fraction on seedling growth was similar to the herbicide, indicating that *D. brasiliensis* is a possible alternative form of control for the weed species examined. In chapter three, was carried a bioassay-guided isolation of bioactive compounds present in *D.brasiliensis* roots. Four drimanes sesquiterpenes were isolated from bioactive fractions of roots, determined as polygodial, polygodial 12 α -acetal, dendocarbin L and (+) fuegin. The polygodial caused phytotoxic effects on wheat coleoptile and on crop and weed species. In the last chapter, the effect of the hexane fraction and polygodial obtained from *D.brasiliensis* roots was evaluated on *Toxoptera citricidus* Kirkaldy (black citrus aphid), and both caused toxicity, with high mortality on nymphs and adults stages of this aphid. The polygodial, isolated for the first time in the roots of *D. brasiliensis*, may be the primarily responsible for the biological activities detected in this study. The herein presented data allow the indication of this compound as a potential biopesticide.

Keywords: allelopathy, seasonality, sesquiterpenes, phytotoxicity, weed, black citrus aphid.

INTRODUÇÃO GERAL

Na natureza, as plantas estão expostas a fatores bióticos e abióticos com os quais tiveram que evoluir para garantir a sua sobrevivência. Ao longo do processo evolutivo, as plantas desenvolveram rotas de biossíntese, através das quais sintetizam e acumulam uma ampla variedade de metabólitos secundários (CALLAWAY, 2002). Muitos destes produtos naturais desempenham um papel importante na interação das plantas com o meio ambiente e, em particular, com o seu ambiente biótico, onde eles podem servir como atrativos para polinizadores ou dispersores de sementes, na defesa contra inimigos naturais, ou agem como aleloquímicos na competição com outras plantas (KROYMANN, 2011).

O termo alelopátia foi cunhado pela primeira vez pelo pesquisador alemão Hans Molisch (1937), derivado da união de duas palavras gregas "allelon" e "pathos", as quais significam: “mútuo” e “prejuízo”, respectivamente. Esta definição foi ampliada posteriormente por Rice (1984) para incluir tanto os efeitos inibitórios como os estimulatórios de uma planta sobre a outra por mediação de um composto químico ou aleloquímico. Este termo sofreu diversas modificações até a aceitação atual, que o define como a “ciência que estuda qualquer processo que implique metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos que influenciam o crescimento e desenvolvimento de sistemas cultivados e biológicos” (IAS, 2011).

Os efeitos ocasionados pelos aleloquímicos podem ser positivos ou negativos, dependendo da concentração, dinâmica, persistência e destino dos mesmos no ambiente, bem como a sensibilidade de espécies alvo. Estes compostos desempenham papel importante nas interações ecológicas entre plantas e o seu ambiente natural circundante, bem como nos ecossistemas agrícolas. Além disso, têm sido sugeridos como novas armas químicas que favorecem as invasões biológicas e, também, podem ser usados como pesticidas naturais, no futuro (ANAYA, 1999; VYVYAN, 2002; CALLAWAY & RIDENOUR, 2004).

Metabólitos secundários com propriedades alelopáticas podem estar presentes em todos os tecidos das plantas, incluindo folhas, flores, frutos, raízes, rizomas, caules e sementes, mas a quantidade e o caminho pelos quais são liberados diferem de espécie para espécie (FRIEDMAN, 1995; PARVEZ et al., 2004). Por isso, as espécies apresentam diferentes atividades alelopáticas em seus órgãos, como já constataram Wu et al., (2009)

em *Mikania micrantha*, Sodaeizadeh et al. (2009) em *Peganum harmala*, Gatti et al. (2010) em *Aristolochia esperanzae* e Souza Filho et al. (2010) em *Copaifera duckei*, *Copaifera martii* e *Copaifera reticulata*. Cada órgão da planta pode contribuir com os efeitos alelopáticos, mas as folhas e raízes são as principais fontes de compostos (WU et al., 2009). De acordo com Dorning & Cipollini (2006) e Batish et al. (2007), as diferenças na intensidade de efeitos alelopáticos observadas em folhas e raízes pode ser resultado de diferenças na concentração de aleloquímicos difusíveis, composição química ou alcalinidade diferenciada entre extratos obtidos a partir destes órgãos.

Segundo Gobbo-Neto & Lopes (2007), além dos diferentes órgãos, as variações ambientais e estágio de desenvolvimento da planta também são de considerável importância e podem influenciar não só a quantidade total de metabólitos produzidos, mas também as proporções relativas dos componentes da mistura. Os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o meio ambiente e, portanto, a sua síntese é frequentemente afetada por condições ambientais (KUTCHAN et al., 2001), tais como temperatura, salinidade, condições de umidade e nutrientes minerais. Desta forma, a síntese de diferentes classes de metabólitos secundários, em resposta a estas condições, é parte de uma estratégia adaptativa das plantas que leva à tolerância a estresses abióticos e bióticos (RAMAKRISHNA & RAVISHANKAR, 2011). Variações climáticas que ocorrem ao longo do ano tem sido o foco de muitas investigações, na tentativa de identificar o momento mais adequado do ano para obtenções de melhores extrações, em termos de rendimento e/ou concentração de metabólitos secundários (CASTELO et al., 2012).

Metabólitos secundários são conhecidos por apresentarem mais do que um modo de ação sobre o metabolismo de espécies alvo, e é especificamente a combinação dos diferentes efeitos, em diferentes níveis, que torna a ação destas substâncias eficaz no controle de outras espécies e, ao mesmo, torna-se difícil estabelecer com precisão seus diferentes modos de ação (MORRISSEY, 2009). Em plantas, alguns autores afirmam que eles interferem em processos tais como respiração, fotossíntese, atividade enzimática, abertura dos estômatos, níveis de hormônios, divisão e alongação celular, estrutura e a permeabilidade de membranas e paredes celulares, conseqüentemente, afetam negativamente a germinação e o crescimento (GNIAZDOWSKA & BOGATEK, 2005; SINGH et al., 2009, TEERACK et al., 2010). Quando as espécies-alvo referem-se a insetos, os metabólitos secundários promovem diversos efeitos, tais como repelência,

inibição de oviposição e da alimentação, alterações no sistema hormonal, causando distúrbios no desenvolvimento, deformações, infertilidade e mortalidade nas diversas fases do ciclo biológico (ROEL, 2001).

O controle de pragas agrícolas sempre foi uma importante área de estudo, devido à influência negativa que as espécies-praga têm sobre a produtividade das culturas. Devido à expansão agrícola, o Brasil se tornou o maior consumidor de agrotóxicos no mundo e responde por 87 % do uso desses produtos em toda América Latina (AZEVEDO, 2010). Segundo Carneiro et al. (2012), a utilização de agrotóxicos nas lavouras do País saltou de 599,5 milhões de litros no ano de 2002 para 852,8 milhões de litros em 2011. Existe uma concentração do mercado de agrotóxicos em determinadas categorias de produtos. Os herbicidas, por exemplo, representaram 45 % das vendas, os fungicidas 14 % e os inseticidas 12 % (ANVISA & UFPR, 2012). Porém, o uso excessivo destes produtos tem resultado no aumento da contaminação do solo e da água, perda da biodiversidade e no aparecimento de muitas espécies resistentes (JABRAN et al., 2010), o que torna o controle destas pragas ainda mais difícil. Em função disso, pesquisas com o objetivo de encontrar novas fontes de pesticidas naturais que não apresentem os inconvenientes dos pesticidas sintéticos são de extrema importância.

De acordo com Dayan et al. (2009), umas das estratégias para reduzir a dependência do uso dos herbicidas sintéticos, por exemplo, é a utilização de plantas com propriedades fitotóxicas. A biodiversidade vegetal pode proporcionar uma excelente fonte de materiais biologicamente ativos para uso na proteção de cultivos agrícolas. Produtos à base de plantas podem ser usados na forma de extratos, contendo uma mistura de compostos ativos de natureza química diversa; ou como aleloquímicos puros, os quais podem exibir diferentes mecanismos de inibição no desenvolvimento de pragas (KOUL & WALIA, 2009). A vantagem dos compostos naturais derivados de plantas é que geralmente exibem bioatividade em baixas concentrações, são biodegradáveis, raramente contêm átomos halogenados e tem baixa ou nenhuma toxicidade sobre espécies não-alvo (FAROOQ et al., 2011).

Espécies com propriedades alelopáticas podem ser utilizadas de diferentes maneiras para o manejo ecológico de pragas agrícolas. Plantas alelopáticas podem suprimir o desenvolvimento de plantas daninhas quando aplicadas em rotação de culturas (PETERS et al., 2003), como culturas de cobertura (KOBAYASHI et al., 2004) e como resíduos vegetais ou cobertura morta (XUAN et al., 2005). Aleloquímicos presentes em tecidos

vegetais podem ser extraídos com água e serem utilizados com sucesso, na forma de extratos aquosos, para o manejo de plantas daninhas (JAMIL et al., 2009; JABRAN et al., 2010) e insetos pragas (GONZAGA et al., 2008). Ainda, frações semipurificadas (ZAPATA et al., 2011; ARANITI et al., 2013) ou aleloquímicos puros isolados de plantas (MACIAS et al., 2005; DAYAN et al., 2009; BARTON et al., 2010; KATO-NOGUCHI et al., 2011) são relatados como promissores para serem utilizados diretamente no controle de plantas daninhas ou para a formulação de herbicidas naturais.

Na busca de novas fitotoxinas naturais, alguns métodos podem ser usados para pesquisar os novos compostos, tais como o isolamento biodirigido. Este método consiste em realizar bioensaios em cada uma das etapas de isolamento, determinando a (s) fração (ões) testada (s) que apresenta (m) maior atividade biológica. A fração mais ativa é fracionada novamente até a purificação e identificação dos compostos aí presentes, responsáveis pela atividade detectada (MACÍAS et al., 2000). Em alguns casos, a atividade pode ser perdida durante o fracionamento por modificações químicas ou degradação e outro evento, não menos importante, o papel do sinergismo de frações e produtos ativos (DUKE et al., 2002). Outro aspecto importante na busca por metabólitos bioativos é a escolha da polaridade do solvente a ser utilizado para extração dos compostos. Por exemplo, o solvente acetato-de-etila é comumente utilizado para obtenção de frações enriquecidas com compostos fenólicos (AN et al., 2001; IMATOMI et al., 2013), referidos na literatura como aleloquímicos potenciais (LI et al., 2010). Dentro de frações obtidas com o solvente n-hexano, compostos apolares, tais como monoterpenos e, muitas vezes, sesquiterpenos, considerados moléculas bioativas em estudos com alelopatia, podem ser incluídos (LÓPEZ et al., 2008; ZAPATA et al., 2009; 2011)

A diversidade estrutural de metabólitos secundários que ocorre nas plantas superiores é imensa. Mais de cem mil estruturas já foram descritas. Por exemplo, 21 mil alcalóides, 22 mil terpenóides e cinco mil flavonóides e taninos são conhecidos. Contudo, esta é provavelmente apenas uma fração do que está presente na natureza (WINK, 2010). A composição dos metabólitos secundários em plantas normalmente varia qualitativa e quantitativamente dentro e entre espécies (KROYMANN, 2011), sendo que as características bioquímicas e fisiológicas destes produtos naturais estão fortemente relacionadas com a função que desempenham na planta (WINK, 2010).

Os terpenos representam a classe de metabólitos secundários mais abundante e estruturalmente diversa em plantas superiores. Mais de 22.000 estruturas individuais já

foram identificadas e, muitas delas, são relatadas por apresentarem um papel importante nas interações planta-inseto, planta-patógeno e planta-planta (CHENG et al., 2007; ZWENGER & BASU, 2008). A síntese de terpenos ocorre a partir do Acetil CoA (rota do ácido mevalônico) ou de moléculas glicosídicas como o piruvato e o 3-fosfoglicerato (rota do metirritol fosfato ou MEP) (DEWICK, 2002). São formados a partir da união de unidades de isopreno (C_5) e, portanto, classificados pelas unidades de C_5 que apresentam. São subdivididos em monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), triterpenos (C_{30}), tetraterpenos (C_{40}) e politerpenos (ZWENGER & BASU, 2008). Os terpenos ocorrem na maioria das famílias de plantas; geralmente são substâncias hidrofóbicas, produzidas em tecidos vegetativos, flores e, ocasionalmente, em raízes. São armazenados em dutos de resina, células oleaginosas e tricomas glandulares (WINK, 2010; DUDAREVA et al., 2004).

Os terpenos estão envolvidos em vários processos ecológicos de plantas, tais como defesa contra herbívoros e patógenos, aspectos da reprodução (ZWENGER & BASU, 2008) e interações alelopáticas com outras plantas (DUKE & OLIVA, 2004). O efeito exógeno de terpenóides sobre o metabolismo de plantas pode incluir efeitos benéficos ou prejudiciais, dependendo de sua concentração nos tecidos. Em relação aos efeitos benéficos, por exemplo, podem induzir termotolerância (DELFINE et al., 2000), resistência contra patógenos (GODARD et al., 2008) ou, em baixas concentrações, podem liberar a dormência (RENTZSCH et al., 2012). Em relação aos efeitos deletérios, eles podem atuar em processos fisiológicos e celulares, causando inibição da fotossíntese (POONPAIBOONPIPAT et al., 2013), inibição da divisão celular, espessamento da parede celular, redução da comunicação intracelular, inibição da formação de raízes laterais (GRANÃ et al., 2013a), peroxidação e perda de integridade de membranas (CHOWHAN et al., 2013), interferência na ação de fitormônios (RAHMAN et al., 2001), danos ultraestruturais em células de raízes (YANG et al., 2011). Trabalhos recentes destacam que diferentes categorias de terpenos podem inibir a germinação e crescimento de outras plantas, particularmente plantas daninhas e, assim, apresentam-se promissores para serem usados como herbicidas naturais (DAYAN et al., 2009; ABDELGALEIL, et al., 2009; MACÍAS et al., 2010; GRANÃ et al., 2013b).

Os sesquiterpenos compõem uma classe de mais de 5.000 compostos que possuem uma ampla gama de efeitos biológicos e desempenham um papel importante em mecanismos de defesa das plantas (FRAGA, 1998). Em relação a esta classe, o grupo dos

compostos com esqueleto drimano são bastante encontrados na natureza. Eles já foram isolados de esponjas (PAUL et al., 1997), de fungos (AYER & TRIFONOV, 1992) e de várias famílias de plantas superiores, incluindo Polygonaceae (FUKUYAMA et al., 1982), Taxaceae (KIYOTA et al., 2002), Canellaceae (WUBE et al., 2005) e em diversas espécies da família Winteraceae (RODRÍGUEZ et al., 2005; MALHEIROS et al., 2005; ALLOUCHE et al., 2009). Os sesquiterpenos drimanos são conhecidos pela ampla variedade de atividades biológicas, incluindo bactericida, fungicida, inseticida, citotóxica, piscicida, moluscicida, reguladores do crescimento de plantas e propriedades fitotóxicas (JANSEN & GROOT, 2004).

O nome drimano foi proposto para o hidrocarboneto saturado, com a numeração do esqueleto carbônico, estrutura e configuração absoluta demonstrado na figura I.1 A (APPEL et al., 1959; JANSEN & GROOT, 2004). Os átomos de carbonos 11 e 12 são frequentemente oxidados, mas a oxidação em outras posições também pode ser observada. Alguns tipos de rearranjos drimanos são conhecidos (Figura I.1 B), no qual ocorre a migração de um grupo metila do carbono C-4 para o C-3 e a ligação dupla exocíclica permanece no C-4 (JANSEN & GROOT, 2004).

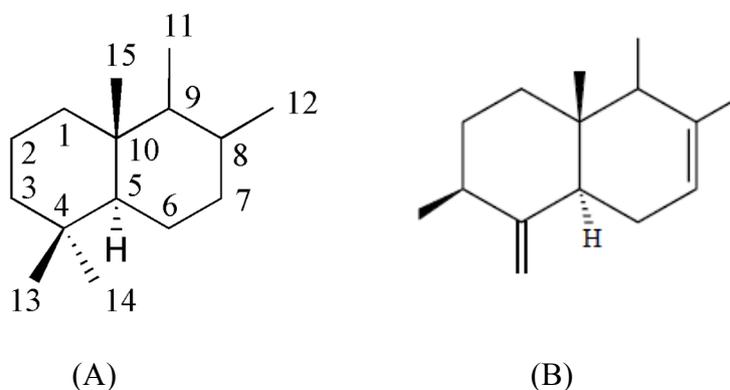


Figura I.1 - Esqueleto básico drimano (A) e rearranjo drimano (B) (Fonte: Jansen & Groot, 2004).

A família Winteraceae compreende cinco gêneros (*Drimys*, *Pseudowintera*, *Takhtajania*, *Tasmannia* e *Zygogynum*) e 79 espécies distribuídas pela Austrália, Tasmânia, Borneo, Célebes, Nova Guiné, Nova Zelândia, Filipinas, Madagascar, América Central e do Sul. A família pertence à ordem Canellales, juntamente com Canellaceae, compondo um grupo monofilético (APG II, 2003; MARQUÍNEZ et al., 2009).

O gênero *Drimys* inclui atualmente sete espécies distribuídas desde o Sul do México até o Estreito de Magalhães (EHRENDORFER et al., 1979; RODRÍGUEZ; QUEZADA, 2001). No Brasil ocorrem três espécies, *Drimys angustifolia* Miers, *D. brasiliensis* Miers e *D. roraimensis* (A.C.Sm.) Ehrend. & Gottsb. As duas primeiras tem abrangência geográfica nas regiões central e sul do país e a última na Amazônia (EHRENDORFER et al., 1979). Estas plantas são conhecidas popularmente como casca-de-anta, cataia ou pau-pra-tudo e possuem valor de uso na medicina popular brasileira. Principalmente a casca é utilizada como antiinflamatória, antiespasmódica, no tratamento de bronquite, dores, alergias e malária (TRINTA & SANTOS, 1997).

A espécie *Drimys brasiliensis* Miers (Figura I.2) ocorre na Mata Atlântica, desde o Sul da Bahia até o Rio Grande do Sul, e no domínio do bioma Cerrado (MELLO-SILVA, 2013). Apresenta crescimento variável, podendo ser encontrada em forma de arbusto, arvoreta ou árvore. Seu tronco é de sessão cilíndrica a irregular, reto a levemente tortuoso com base fracamente canaliculada. Sua casca tem textura arenosa e pode medir até 10 mm de espessura (CARVALHO, 2008). Possui folhas simples, glabras, de coloração verde mais clara na face inferior, com 8 a 12 cm de largura. Inflorescências em panículas terminais, com flores brancas. Floresce intensamente de julho a agosto, e os frutos amadurecem de outubro a novembro (LORENZI, 2002). Segundo Carvalho (2008), a espécie possui grande valor sócio-econômico. Suas folhas e cascas são usadas como condimentos, de suas flores são extraídos óleos essenciais usados em perfumaria, sua madeira pode ser usada para celulose e papel, como lenha e carvão devido seu potencial energético. É indicada para o paisagismo e recuperação de áreas degradadas, além de ter amplo uso medicinal. Em *D. brasiliensis*, diferenciações eco-geográficas levaram ao reconhecimento das sub-espécies *sylvatica* (A.St.-Hil) Ehrend. & Gottsb., *subalpina* Ehrend. & Gottsb. e *brasiliensis* (EHRENDORFER et al., 1979; MELLO-SILVA, 2013).



Figura I.2 - *Drimys brasiliensis* Miers subsp. *brasiliensis*: aspecto geral da planta adulta, em estágio de floração (Fonte: Simoni Anese, 2010).

Fitoquimicamente, *D. brasiliensis* é caracterizada pela presença de monoterpenos, sesquiterpenos e flavonóides (MALHEIROS et al., 2005; LAGO et al., 2010; MECCHI & LAGO, 2013). Dentre os principais compostos isolados estão os sesquiterpenos drimanos poligodial, drimianial e 1- β -(p-metoxicinamil)-poligodial (MENDES et al., 1998; CECHINEL FILHO et al., 1998; MALHEIROS et al., 2001; 2005). Trabalhos científicos comprovaram que *D. brasiliensis* apresenta grande potencial para ser utilizada na indústria farmacológica, devido às suas propriedades antibacteriana, antileishmanicida, antifúngica, antiinflamatória, antiiperalgésica e antinociceptiva. Estes efeitos foram relacionados particularmente à presença do poligodial, um sesquiterpeno drimano que é considerado o principal constituinte químico da planta (MENDES et al., 1998; EL SAYAH, et al., 2000; MALHEIROS et al., 2001; 2005; CORRÊA et al., 2011; SILVEIRA et al., 2012).

São poucos os trabalhos publicados que tratam de investigações do potencial de *D. brasiliensis* e de seus metabólitos secundários para atuarem como potenciais pesticidas naturais, particularmente no que concerne às ações herbicida e inseticida. Diante deste contexto, os objetivos desta tese foram:

(1) Estudar a variação do potencial fitotóxico de *D. brasiliensis* subsp. *brasiliensis* em função da sazonalidade e de diferentes órgãos da planta, através de bioensaios de germinação e crescimento em laboratório com espécies cultivadas.

(2) Avaliar o potencial fitotóxico das frações químicas do extrato de raízes e folhas de *D. brasiliensis* subsp. *brasiliensis* sobre a germinação e crescimento de plântulas de espécies daninhas de culturas agrícolas.

(3) Isolar os compostos bioativos presentes nas raízes da espécie, por meio de bioensaios com coleótilos de trigo, assim como avaliar o efeito do composto mais ativo sobre a germinação e crescimento inicial de plantas receptoras.

(4) Investigar a atividade inseticida da fração hexânica e do composto mais ativo obtido a partir das raízes de *D. brasiliensis* subsp. *brasiliensis* sobre a mortalidade de adultos e ninfas de *Toxoptera citricidus* Kirkaldy (pulgão-preto dos citros).

REFERÊNCIAS

- ABDELGALEIL, S.A.M., ABDEL-RAZEEK, N., SOLIMAN, S.A. Herbicidal Activity of Three Sesquiterpene Lactones on Wild Oat (*Avena fatua*) and Their Possible Mode of Action. **Weed Science**, v. 57, p. 6-9, 2009.
- ALLOUCHE, N.; APEL, C.; MARTIN, M.; DUMONTET, V.; GUÉRITTE, F.; LITAUDON, M. Cytotoxic sesquiterpenoids from Winteraceae of Caledonian rainforest. **Phytochemistry**, v. 70, p. 546-553, 2009.
- AN, M.; HAIG, T.; PRATLEY, J. E. Phytotoxicity of *Vulpia* residues: II. Separation, identification and quantitation of allelochemicals from *Vulpia myuros*. **Journal Chemical Ecology**, v. 26, p.1465-1476, 2000.
- ANAYA, A.L. Allelopathy as a tool in the management of biotic resources in agroecosystems. **Critical Reviews in Plant Sciences**. v. 18, p. 697-739, 1999.
- ANVISA & UFPR. **Seminário de mercado de agrotóxico e regulação**. ANVISA, Brasília, 11 abril de 2012.
- APPEL, H. H.; BROOKS, C. J. W.; OVERTON, C. H. The constitution and stereochemistry of drimenol, a novel bicyclic sesquiterpenoid. **Journal Chemical Society**, v. 0, p. 3322-3332, 1959.
- APG II. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APGII. **Botanic Journal of Linnean Society**, v.141, p. 399-436, 2003.

- AZEVEDO, M. F. A. Abordagem inicial no atendimento ambulatorial em distúrbios neurotoxicológicos. Parte II – agrotóxicos. **Revista Brasileira de Neurologia**, v. 46, p. 21-28, 2010.
- ARANITI, F.; LUPINI, A.; MERCATI, F.; STATTI, G. F.; ABENAVOLI, M. R. *Calamintha nepeta* L. (Savi) as source of phytotoxic compounds: bio-guided fractionation in identifying biological active molecules. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, p. 1979-1988, 2013.
- AYER, W. A.; TRIFONOV, L. S. Drimane sesquiterpene lactones from *Peniophora polygonia*. **Journal Natural Products**, v. 55, p. 1454–1461, 1992.
- BARTON, A. F. M.; DELL, B.; KNIGHT, A. R. Herbicidal activity of cineole derivatives. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 58, p.10147-10155, 2010.
- BATISH, D.; LAVANYA, K.; SINGH, H.; KOHLI, R. Phenolic allelochemicals released by *Chenopodium murale* affect the growth, nodulation and macromolecule content in chickpea and pea. **Plant Growth Regulation**, v. 51, p.119-128, 2007.
- CALLAWAY, R. M. The Detection of Neighbors by Plants. **Trends Ecology Evolution**, v. 17, p. 104-105, 2002.
- CALLAWAY, R.M.; RIDENOUR, W.M. Novelweapons: invasive success and the evolution of increased competitive ability. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 2, p. 436 – 443, 2004.
- CARNEIRO, F. F.; PIGNATI, W.; RIGOTTO, R.M; AUGUSTO, L.G.S.; RIZOLLO, A. **Dossiê ABRASCO** - Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. ABRASCO, Rio de Janeiro, abril de 2012. 1ª Parte. 98p.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2008, v.3.
- CASTELO, A.V.M.; DEL MENEZZI, C.H.S.; RESCK, I.S. Seasonal Variation in the yield and the chemical composition of essential oils from two brasilian natives arbustive species. **Journal of Applied science**, v.12, p.753-760, 2012.
- CECHINEL FILHO, V., SCHLEMPER, V., SANTOS, A. R. S., PINHEIRO, T. R., YUNES, R. A., MENDES, J. L., CALIXTO, J. B., MONACHE, F. D. Isolation and identification of active compounds from *Drimys winteri* barks. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, p. 223-227, 1998.
- CHENG, A., LOU, Y., MAO, Y., LU, S., WANG, L., CHEN, X. Plant Terpenoids: Biosynthesis and Ecological Functions. **Journal of Integrative Plant Biology**. v. 49, p. 179-186, 2007.
- CHOWHAN, N.; SINGH, H. P.; BATISH, E. R.; KAUR, S.; AHUJA, N.; KOHLI, R.K. β -Pinene inhibited germination and early growth involves membrane peroxidation. **Protoplasma**, v. 250, p. 691-700, 2013.

- CORRÊA, D.S.; TEMPONE, A.G.; REIMÃO, J.Q.; TANIWAKI, N.N.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O.F.; SARTORELLI, P.; MECCH, M.C.; LAGO, H.G. Anti-leishmanial and anti-trypanosomal potential of polygodial isolated from stem barks of *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae). **Parasitol Research**, v. 109, p. 231-236, 2011.
- DAYAN, F. E.; CANTRELL, C. L.; DUKE, S. O. Natural products in crop protection. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 4022–4034, 2009.
- DELFINE, S.; CSIKY, O.; SEUFERT, G.; LORETO, F. Fumigation with exogenous monoterpenes of a non-isoprenoidemitting oak (*Quercus suber*): monoterpene acquisition translocation, and effect of the photosynthetic properties at high temperatures. **New Phytology**, v. 146, p. 27-36, 2000.
- DUKE, S. O.; DAYAN, F. E.; RIMANDO, A. M.; SCHRADER, K. K.; ALIOTTA, Q., OLIVA, A.; ROMAGNI, J. G. Chemicals from nature for weed management. **Weed. Science**, v. 50, p. 138-151, 2002.
- DEWICK, P. M. The mevalonate and deoxyxylulose phosphate pathways: Terpenoids and steroids. Pp. 167-231. **Medicinal Natural Products**. John Wiley & Sons, Ltd. 2002. University of Nottingham, UK.
- DORNING, M.; CIPOLLINI, D. Leaf and root extracts of the invasive shrub, *Lonicera maackii*, inhibit seed germination of three herbs with no autotoxic effects. **Plant Ecology**, v. 184, p. 287-296, 2006.
- DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. Biochemistry of plant volatiles. **Plant Physiology**, v. 135, 1893-1902, 2004.
- DUKE, S. O.; OLIVA, A. 2004. Mode of action of phytotoxic terpenoids. Pp. 201-216. In: MACÍAS, F. A., GALINDO, J. C. G.; MOLINILLO, J. M. G.; CUTLER, H. G. (Ed.). Allelopathy: Chemistry and mode of action of allelochemicals. Boca Raton, CRC Press.
- EHRENDORFER, F., GOTTSBERGER, I. S., GOTTSBERGER, G. Variation on the population, racial, and species level in the primitive relic angiosperm genus *Drimys* (Winteraceae) in South America. **Plant Systematics and Evolution**, v. 132, p. 53-83, 1979.
- EL SAYAH, M.; MALHEIROS, A.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Action of polygodial on agonist-induced contractions of the rat portal vein in vitro. **Journal Cardiovascular Pharmacology**, v. 35, p. 670-675, 2000.
- FAROOQ, M.; ZAHID, K. J.; CHEEMA, A.; WAHID, A.; SIDDIQUE, K. H. M. The role of allelopathy in agricultural pest management. **Pest Management Science**, v. 67, p. 493-506, 2011.

- FRAGA, B. Natural sesquiterpenoids. **Natural Product Reports**, v.15, p. 73-92, 1998.
- 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.
- FUKUYAMA, Y.; SATO, T.; ASAKAWA, Y.; TAKEMOTO, T. A potent cytotoxic warburganal and related drimane-type sesquiterpenoids from *Polygonum hydropiper*. **Phytochemistry**, v. 21, p. 2895-2898, 1982
- 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.
- INTERNATIONAL ALLELOPATHY SOCIETY [Online]; 2011. <http://www.international-allelopathy-society.org> (Acessado em 01 de Novembro de 2011).
- 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, 2013a
- GRAÑA, E.; SOTELO, T.; DÍAZ-TIELAS, C.; REIGOSA, M.J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.M. The Phytotoxic Potential of the Terpenoid Citral on Seedlings and Adult Plants. **Weed Science**, v. 61, p. 469-481, 2013b.
- GODARD, K. A.; WHITE, R.; BOHLMANN, J. Monoterpene induced molecular responses in *Arabidopsis thaliana*. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1838-1849, 2008.
- GONZAGA, A. D.; GARCIA, M.V. B.; SOUSA, S. G. A.; PY-DANIEL, V., CORREA, R. S., RIBEIRO, J. D. Toxicidade de manipueira de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e erva-de-rato (*Palicourea marcgravii* St. Hill) em adultos de *Toxoptera citricida* Kirkaldy (Homoptera: Aphididae). **Acta Amazônica**, v. 38, p. 101-106, 2008.
- JABRAN, K.; FAROOQ, M.; HUSSAIN, M.; REHMAN, H.; ALI, M.A. Wild oat (*Avena fatua* L.) and canary grass (*Phalaris minor* Ritz.) management through allelopathy. **Journal of Plant Protection Research**, v. 50, p. 41-45, 2010.
- JAMIL, M.; CHEEMA, Z. A.; MUSHTAQ, M. N.; FAROOQ, M.; CHEEMA, M. A. Alternative control of wild oat and canary grass in wheat fields by allelopathic plant water extracts. **Agronomy Sustainable Development**, v. 29, p. 475-482, 2009.
- JANSEN, B.; GROOT, A. Occurrence, biological activity and synthesis of drimane sesquiterpenoids. **Natural Product Report**, v. 21, p. 449-477, 2004.

- LAGO, G.H.G.; CARVALHO, L.A.C.; da SILVA, F.S.; TOYAMA, D.O.; FÁVERO, O.A.; ROMOFF, P. Chemical Composition and Anti-Inflammatory Evaluation of Essential Oils from Leaves and Stem Barks from *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 1760-1765, 2010.
- LI, Z-L.; WANG, Q.; RUAN, X.; PAN, C.; JIANG, D.H. Phenolics and Plant Allelopathy. **Molecules**, v. 15, p. 8933-8952, 2010.
- LOPES, M. L.; BONZANI, N.E.; ZYGADLO, J.A. Allelopathic potential of *Tagetes minuta* terpenes by a chemical, anatomical and phytotoxic approach. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, p. 882-890, 2008.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**, v. 1. 4 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 368 p.
- KATO-NOGUCHI, H.; SALAM, M. A.; SUENAGA, K. Isolation and identification of potent allelopathic substances in a traditional Bangladeshi rice cultivar Kartikshail. **Plant Production Science**, v. 14, p. 128-134, 2011.
- KIYOTA, H.; SHI, Q.W.; ORITANI, T. A new drimane from the heartwood of the Japanese yew, *Taxus cuspidata*. **Nat. Prod. Lett.** v.16, p. 21-24, 2002.
- KOBAYASHI H.; MIURA, S.; OYANAGI, A. Effects of winter barley as a cover crop on the weed vegetation in a no-tillage soybean. **Weed Biology Management**, v. 4, p. 195-205, 2004.
- KOUL, O.; WALIA, S. Comparing impacts of plant extracts and pure allelochemicals and implications for pest control. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 4, p. 1-30, 2009.
- KROYMANN, J. Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, p. 246-251, 2011.
- KUTCHAN, T. M. Ecological Arsenal and Developmental Dispatcher. The Paradigm of Secondary Metabolism. **Plant Physiology**, v. 125, p. 58-60, 2001.
- MACIAS, F. A.; CASTELLANO, D.; MOLINILLO, J. M. Search for a standard phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 2512-2522, 2000.
- MACIAS, F. A.; MARIN, D.; OLIVEROS-BASTIDAS, A.; CASTELLANO, D.; SIMONET, A. M.; MOLINILLO, J. M.G. Structure-activity relationships (SAR) studies of benzoxazinoids, their degradation products and analogues. Phytotoxicity on standard target species (STS). **Journal Agricultural Food Chemistry**. v. 53, p. 538-548, 2005.

- MACÍAS, F. A.; LACRET, R.; VARELA, R.; NOGUEIRAS, C.; MOLINILLO, J. M. G. Isolation and phytotoxicity of terpenes from *Tectona grandis*. **Journal Chemical Ecology**, v. 36, p. 396-404, 2010.
- MALHEIROS, A.; CECHINEL FILHO, V.; SCHMITT, C.B.; YUNES, R.A.; ESCALANTE, A.; SVETAZ, L.; ZACCHINO, S.; MONACHE, F.D. Antifungal activity of drimane sesquiterpenes from *Drimys brasiliensis* using bioassayguided fractionation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8, p. 335-339, 2005.
- MALHEIROS, A.; CECHINEL, V.; SCHMITT, C.; SANTOS, A.; SCHEIDT, C.; CALIXTO, J.; MONACHE, F.; YUNES, R. A sesquiterpene drimane with antinociceptive activity from *Drimys winteri* bark. **Phytochemistry**, v. 57, p. 103-107, 2001.
- MARQUÍNEZ, X.; LOHMANN, L.G.; SALATINO, M.; SALATINO, A.; GONZÁLEZ, F. Generic relationships and dating of lineages in Winteraceae based on nuclear (ITS) and plastid (rpS16 and psbA-trnH) sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 53, p. 435-449, 2009.
- MECCHI, M.C., LAGO, J.H.G. Chemical constituents derived from *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae). **Natural Product Research**, v. 27, Ahead of Print, 2013.
- MENDES, G., SANTOS, A., CAMPOS, M., TRATSK, K., YUNES, R., CECHINEL, V., CALIXTO, J. Anti-hyperalgesic properties of the extract and of the main sesquiterpene polygodial isolated from the barks of *Drimys winteri* (Winteraceae). **Life Science**, v. 63, p. 369-381, 1998.
- MELLO-SILVA, R. *Winteraceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim botânico do Rio de Janeiro, 2013. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB15325>).
- MOLISCH, H. Der Einfluss einer Pflanze auf die andere Allelopathie. **Jena**, Fischer. 1937.
- MORRISSEY, J.P., 2009. **Biological Activity of Defence-Related Plant Secondary Metabolites** (cap.13), in Plant-derived Natural Products. Osbourn, A.E., Lanzotti, V. (Eds.), Springer.
- 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.
- PAUL, V.J.; SEO, Y.; CHO, K.W.; RHO, J. R.; BERGQUIST, P. R. Sesquiterpenoids of the drimane class from a sponge of the genus *Dysidea*. **Journal Natural Products**, v. 60, p. 1115-1120, 1997.
- PETERS, R. D; STURZ, A.V.; CARTER, M. R.; SANDERSON, J.B. Developing disease suppressive soils through crop rotation and tillage management practices. **Soil Tillage Research**, v. 72, p.181-192, 2003.

- POONPAIBOONPIPAT, T.; PANGNAKORN, U.; SUVUNNAMEK, U.; TEERARAK, M.; CHAROENYING, P.; LAOSINWATTANA, C. Phytotoxic effects of essential oil from *Cymbopogon citratus* and its physiological mechanisms on barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). **Industrial Crops and Products**, v. 41, p. 403-407, 2013.
- RAHMAN, A.; AHAMED, A.; AMAKAWA, T.; GOTO, N.; TSURUMI, S. Chromosaponin I specifically interacts with AUX1 protein in regulating the gravitropic response of Arabidopsis roots. **Plant Physiology**, v.125, p.990-1000, 2001.
- RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v.6, p. 1720-1731, 2011.
- RENTZSCH, S.; PODZIMSKA, D.; VOEGELE, A.; IMBECK, M.; MÜLLER, K.; LINKIES, A.; LEUBNER-METZGER, G. Dose- and tissue-specific interaction of monoterpenes with the gibberellin-mediated release of potato tuber bud dormancy, sprout growth and induction of α -amylases and β -amylases. **Planta**, v. 235, p. 137-151, 2012.
- RICE, E. L. In **Allelopathy**: Academic Press: Orlando, USA, 1984; Vol. 2. Edição, p. 368.
- RODRÍGUEZ, R.A., QUEZADA, M. Winteraceae. In: Marticorena, C., Rodríguez R.A. (Eds.). Flora de Chile, vol. 2. Fasc. 1. (**Winteraceae-Ranunculaceae**) Ed. Univ. Concepción, Concepción, Chile. pp. 2-7, 2001.
- RODRÍGUEZ, B., ZAPATA, N., MEDINA, P., VINUELA, E., 2005. A complete ^1H and ^{13}C NMR data assignment for four drimane sesquiterpenoids isolated from *Drimys winterii*. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 43, 82-84, 2005.
- ROEL, A.R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável. **Revista Internacional de Desenvolvimento Local**, v.1, p.43-50, 2001.
- SILVEIRA, A. C. O.; CLAUDINO, V. D.; YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V.; MALHEIROS, A.; CORDOVA, C. M. M.; BELLA CRUZ, A. Antibacterial Activity and Toxicity of *Drimys brasiliensis*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 31, p. 935-40, 2012.
- SODAEIZADEH, H.; RAFIEIOLHOSSAINI, M.; HAVLI'K, J.; VAN DAMME, P. Allelopathic activity of different plant parts of *Peganum harmala* L. and identification of their growth inhibitors substances. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 59, p. 227-236, 2009.
- SOUZA FILHO, A. P. S.; GURGEL, E. S. C.; QUEIROZ, M. S. M.; SANTOS, J. U. M. Atividade alelopática de extratos brutos de três espécies de *Copaifera* (Leguminosae-Caesalpinioideae). **Planta Daninha**, Viçosa, v. 28, p. 743-751, 2010.

- TRINTA, E. F.; SANTOS, E. **Winteráceae**. Flora Ilustrada Catarinense, Itajaí, 1997.
- VYVYAN, J.R. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals, **Tetrahedron** v. 58, p.1631-1646, 2002.
- WINK, M. Biochemistry, physiology and ecological functions of secondary metabolites: In **Annual Plant Reviews: Biochemistry of Plant Secondary Metabolism**, 2 ed. Edited by Wink M. Wiley-Blackwell, v. 40, p.1-19, 2010.
- 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.
- WUBE, A. A.; BUCAR, F.; GIBBONS, S.; ASRES, K. Sesquiterpenes from *Warburgia ugandensis* and their antimycobacterial activity. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2309-2315, 2005.
- XUAN T. D.; TAWATA, S.; KHANH, T. D.; CHUNG, I. M. Decomposition of allelopathic plants in soil. **Journal Agronomy Crop Science**, v. 191, p. 162-171, 2005.
- ZAPATA, N.; BUDIA, F.; VINUELA, E.; MEDINA, P. Antifeedant and growth inhibitory effects of extracts and drimanes of *Drimys winteri* stem bark against *Spodoptera littoralis* (Lep., Noctuidae). **Industrial Crops and Products**, v. 30, p. 119-125, 2009.
- ZAPATA, N.; VARGAS, M.; MEDINA, P. Actividad fitotóxica de un extracto n-hexano obtenido de la corteza de *Drimys winteri* sobre cuatro especies de malezas. **Planta Daninha**, v. 29, p. 323-331, 2011.
- ZWENGER, S.; BASU, C. Plant terpenoids: applications and future potentials. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 3, p. 1-7, 2008.
- YANG, G-Q.; WAN, F-H.; GUO, J-Y.; LIU, W-X. Cellular and ultrastructural changes in the seedling roots of upland rice (*Oryza sativa*) under the stress of two allelochemicals from *Ageratina adenophora*. **Weed Biology and Management**, v. 11, p. 152-159, 2011.

CAPÍTULO 1

Variação no potencial fitotóxico de *Drimys brasiliensis* Miers em função da sazonalidade e de órgãos da planta

VARIAÇÃO NO POTENCIAL FITOTÓXICO DE *Drimys brasiliensis* Miers EM FUNÇÃO DA SAZONALIDADE E DE ÓRGÃOS DA PLANTA

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial fitotóxico de *Drimys brasiliensis* Miers em função de duas épocas de coletas e de diferentes órgãos da planta. O efeito dos extratos de folhas maduras, coletadas ao final das estações seca e chuvosa, foi avaliado sobre a espécie receptora *Sesamun indicum* L. (gergelim), enquanto o efeito dos extratos obtidos de folhas maduras, cascas do caule e raízes foi investigado sobre as espécies receptoras *Triticum aestivum* L. (trigo) e *Raphanus sativus* L. (rabanete). De cada órgão foram preparados extratos-tratamentos, na proporção de 10 g de pó dissolvidos em 100 mL de água destilada. As soluções resultantes (extratos 10 %) foram diluídas para as concentrações de 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 %. Foi utilizada água destilada como testemunha (0 %). Bioensaios de germinação de diásporos e crescimento de plântulas foram desenvolvidos em condições controladas de laboratório. Os extratos de folhas de *D. brasiliensis* apresentaram fitotoxicidade sobre gergelim, com atividade mais evidente das folhas coletadas ao final da estação seca. Os diferentes órgãos de *D. brasiliensis* exerceram efeitos inibitórios sobre o processo de germinação e crescimento inicial de trigo e rabanete, porém o extrato obtido a partir das folhas foi mais eficiente na inibição do processo de germinação do rabanete. Todos os órgãos avaliados de *D. brasiliensis* podem constituir uma fonte promissora na busca de compostos capazes de atuar como fitotoxinas naturais.

Palavras-chave: fitotoxicidade; casca-de-anta; sazonalidade; germinação; crescimento.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the phytotoxic potential of *Drimys brasiliensis* Miers based on two collecting periods and different plant organs. The effect of the mature leaves, collected in the end of the dry and rainy seasons, was evaluated on the target species *Sesamun indicum* L. (sesame), while the effect of the different organs (mature leaves, stem bark and roots) was investigated on the target species *Triticum aestivum* L. (wheat) and *Raphanus sativus* L. (radish). The aqueous extract was prepared in a proportion of 10 g of plant powder, dissolved in 100 mL of distilled water, resulting in a 10 % extract concentrate. Dilutions were made with distilled water to 2.5, 5.0, e 7.5 % and 0

% (control). Germination and seedling growth bioassays were carried out under controlled laboratory conditions. The leaves extracts of *D.brasiliensis* showed phytotoxicity on sesame, with a more evident activity of leaves collected at the end of the dry season. The different organs exerted inhibitory effects on germination and early growth of wheat and radish. All organs of *D. brasiliensis* may constitute a promising source in the search for compounds capable of acting as natural phytotoxins.

Keywords: phytotoxicity, casca-de-anta, seasonality, germination, growth.

INTRODUÇÃO

As plantas sintetizam um vasto número de metabólitos secundários, assim denominados por não estarem diretamente envolvidos em processos primários básicos do seu crescimento e desenvolvimento. Muitos destes produtos naturais desempenham um papel importante na interação das plantas com o meio ambiente e, em particular, com o seu ambiente biótico, onde eles podem atuar como atrativos para polinizadores ou dispersores de sementes, na defesa contra inimigos naturais, ou como aleloquímicos na interferência com outras plantas (KROYMANN, 2011).

A produção de metabólitos secundários pode variar entre espécies, órgão da planta, estágio de desenvolvimento e é fortemente influenciada por fatores ambientais (GOBBONETO & NETO, 2007). O geoclima local, as mudanças sazonais, as condições externas, tais como luz, temperatura, umidade e níveis de nutrientes podem afetar a composição e acúmulo desses compostos. A síntese de diferentes classes de metabólitos secundários, em resposta a fatores ambientais, é parte de uma estratégia adaptativa que leva à tolerância a estresses abióticos e bióticos (RAMAKRISHNA & RAVISHANKAR, 2011). Vários estudos têm apontado alterações na quantidade e composição de metabólitos secundários de plantas, bem como na expressão de suas atividades biológicas, associadas com as variações sazonais (LOPES et al., 1997, COSTA et al., 2009; CASTELO et al., 2012; JEMÂA et al., 2012; CHAVES et al., 2013). A identificação destas variações é muito importante, pois permite definir a época em que alguns constituintes estão em maior proporção na planta, podendo estar relacionados com diferentes demandas fisiológicas associadas a defesas contra inimigos e reprodução (DARROW & BOWERS, 1997), além

de contribuir com a expansão do conhecimento sobre as interações ecológicas que ocorrem entre plantas e o ambiente circundante (PAVARINI et al., 2012).

Os metabólitos secundários são produzidos por todos os órgãos vegetais, como raízes, rizomas, folhas, cascas e sementes. Contudo, numa mesma planta, a quantidade pode variar de um órgão para o outro, como destacado por Gatti et al. (2010) em *Aristolochia esperanzae*, Souza Filho et al. (2010) em três espécies de *Copaifera* e por Wu et al. (2009) em *Mikania micrantha*. Esses compostos podem ser considerados alelopáticos dependendo de sua ação fitotóxica, concentração bioativa, persistência e destino no entorno em que são liberados (INDERJIT & DUKE, 2003). Quando as sementes de espécies sensíveis são expostas aos aleloquímicos, a germinação pode ser inibida e, se esta ocorrer, as plântulas podem apresentar crescimento, desenvolvimento ou metabolismo anormal. Os efeitos mais comumente observados são o atraso no tempo de germinação, atrofia e espessamento da raiz, redução do crescimento ou ausência da raiz primária, redução do número de raízes secundárias e redução do crescimento do hipocótilo (GATTI et al., 2010; GUSMAN et al., 2011; GRISI et al., 2012; SILVESTRE et al., 2013).

A alelopatia, como ciência que estuda as interações entre as plantas e os organismos de seu entorno mediada por agentes químicos, se constitui uma valiosa fonte de produtos naturais com potencial para serem utilizados na indústria agroquímica (MACÍAS et al., 2008). Estudos relatam que extratos e compostos naturais derivados de plantas apresentam elevada atividade inseticida (PAVELA, 2010), fungicida (MALHEIROS et al., 2005) e herbicida (KATO-NOGUCHI et al., 2011; GRISI et al., 2013a). Investigações nesta área tem imensa importância para otimizar os sistemas de produção que sejam ambientalmente corretos e econômicos, por meio da redução das aplicações de pesticidas agrícolas sintéticos (HAIG et al., 2009). A identificação de plantas com propriedades alelopáticas e de seus metabólitos secundários poderá contribuir com a ampliação do conhecimento científico dentro do âmbito de uma agricultura mais sustentável, que respeita o meio ambiente e valoriza a biodiversidade.

O gênero *Drimys* (Winteraceae), árvores conhecidas no Brasil como casca-de-anta, pau-para-tudo ou cataia, inclui atualmente sete espécies distribuídas desde o Sul do México até o Estreito de Magalhães (EHRENDORFER et al., 1979). As espécies do gênero possuem valor de uso na medicina popular brasileira. Principalmente a casca é utilizada como antiinflamatória, astiespamódica, no tratamento de bronquite, dores, alergias e malária (TRINTA & SANTOS, 1997). A espécie *Drimys brasiliensis* Miers apresenta-se

como um arbusto ou árvore, floresce mais intensamente de julho a agosto (LORENZI, 2002), ocorre na Mata Atlântica, desde o Sul da Bahia até o Rio Grande do Sul, e no domínio do bioma Cerrado (MELLO-SILVA, 2013). Para esta espécie, variações eco-geográficas levaram ao reconhecimento das sub-espécies *sylvatica* (A.St.-Hil) Ehrend. & Gottsb., *subalpina* Ehrend. & Gottsb. e *brasiliensis*, sendo esta última comumente encontrada ao longo de matas de galerias do Cerrado (EHRENDORFER et al., 1979; MELLO-SILVA, 2013). Das folhas e cascas do caule de *D. brasiliensis* já foram isolados compostos sesquiterpenos drimanos, sesquiterpenos aromadendranos, monoterpenos e flavonóides. Os estudos sobre as atividades biológicas destes constituintes têm sido concentrados, especificamente, em propriedades farmacológicas (CECHINEL-FILHO et al., 1998; MALHEIROS et al., 2001; 2005; CLAUDINO et al., 2013; LIEMBERGER et al., 2007; SILVEIRA et al., 2012; MECCHI; LAGO et al., 2013).

Neste contexto, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de estudar o potencial fitotóxico de *Drimys brasiliensis* subsp. *brasiliensis*, utilizando bioensaios de germinação e crescimento de plântulas de espécies cultivadas em laboratório. Para tanto, foram realizados (1) a investigação da variação do efeito fitotóxico de extratos de folhas em função de sazonalidade; e (2) a variação do efeito fitotóxico em função de diferentes órgãos da planta.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do material vegetal e preparo dos extratos aquosos

Diferentes órgãos de *D. brasiliensis* subsp. *brasiliensis* foram coletados de indivíduos ocorrentes na área de reserva de cerrado “*sensu strictu*” pertencente a Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), estado de São Paulo (22°02’ S e 47° 52’ W). A região é caracterizada pelo tipo climático Aw, segundo sistema de classificação de Köppen (1948), considerado tropical de altitude com inverno seco (abril a setembro) e verão chuvoso (outubro a março). Um voucher da espécie foi depositado no herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos, com o número de registro HUFSCar 8339. Foram coletadas folhas maduras nos meses de abril e agosto de 2010 e raízes inteiras e cascas do caule em agosto de 2010. Por ocasião das épocas de coleta, nos meses de abril (final da estação chuvosa) e agosto (final da estação seca), as

plantas encontravam-se em estágio vegetativo e reprodutivo (final da floração), respectivamente. Os dados meteorológicos de temperatura e precipitação média, referentes ao ano de 2010, foram obtidos a partir da estação de São Carlos número 83729, e disponível para consulta na base de dados históricos do INMET (Instituto Nacional de Meteorologia). Em abril e agosto de 2010, meses em que foram realizadas as coletas, os valores médios de precipitação foram de 120 e 0 mm, respectivamente (Figura 1.1).

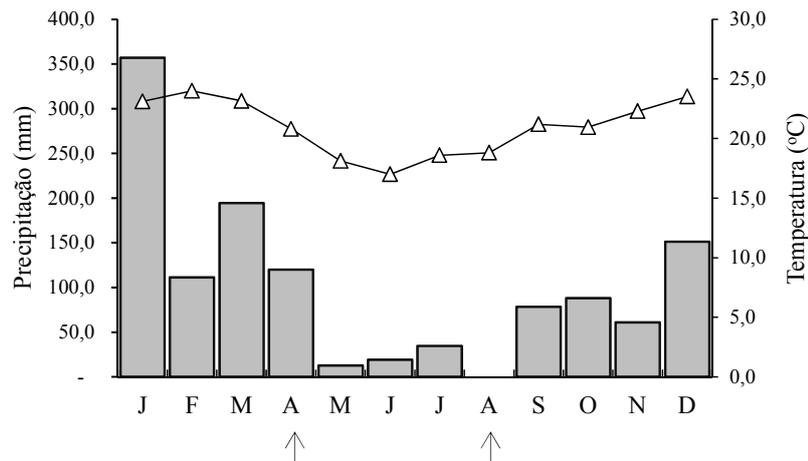


Figura 1.1- Valores médios mensais da precipitação (barras) e temperatura (símbolos) de janeiro a dezembro de 2010 no município de São Carlos, SP (Fonte: INMET – OMM: 83726). As coletas foram realizadas ao final dos meses de abril e agosto de 2010 (setas).

Após as coletas, os materiais vegetais foram secos em estufa de circulação forçada de ar a 40 °C, durante 72 h para folhas e cascas e, durante 120 h para as raízes. Posteriormente, foram triturados em moinho industrial, pesados, embalados a vácuo em sacos plásticos e armazenados a ± 4 °C de temperatura, até a realização dos experimentos.

A partir do material vegetal seco (pó) de cada material vegetal foram produzidos extratos-tratamentos, que consistiram em água destilada e pó na proporção de 10 % de massa/volume (g/mL). Os extratos permaneceram em repouso no escuro, durante 24 h a 4 °C e, em seguida, foram filtrados à vácuo, utilizando-se uma bomba elétrica acoplada a um funil de Buchner forrado internamente com papel-filtro (GATTI et al., 2004). As soluções resultantes obtidas (extratos 10 %) foram utilizadas no preparo das diluições. As concentrações utilizadas foram: 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 %, empregando-se água destilada como testemunha (0 %).

Os efeitos fitotóxicos foram avaliados por meio de bioensaios de germinação de diásporos e crescimento inicial de plântulas. Para verificação dos efeitos em função das

épocas de coleta, os extratos foram obtidos a partir do pó de folhas coletadas de indivíduos adultos de *D. brasiliensis*, nos meses de abril (final da estação chuvosa) e agosto (final da estação seca). Como planta bioindicadora foi utilizado o gergelim (*Sesamum indicum* L., Pedaliaceae).

Para verificação da variação do efeito fitotóxico em função dos diferentes órgãos de *D. brasiliensis*, coletados em agosto de 2010, foram selecionadas duas espécies cultivadas: trigo (*Triticum aestivum* L., cultivar BRS 264, Poaceae) e rabanete (*Raphanus sativus* L., variedade Vip Crimson, Brassicaceae).

Potencial osmótico e pH dos extratos

O pH dos extratos foi medido com o peagâmetro Analion, modelo PM608. Essa medição foi realizada com os extratos dos diferentes órgãos de *D. brasiliensis* em sua maior concentração (10 %), sendo mantidos a 25 °C.

A medição da concentração molar, expressa em mOsm/Kg, foi realizada com um osmômetro automático (μ Osmotte, modelo 5004), utilizando-se 50 μ L de cada extrato concentrado (10 %) mantidos à temperatura de 25 °C. Os valores da concentração molar foram convertidos para pressão osmótica (25 °C) pela conversão de mOsm/Kg para MPa, de acordo com Larcher (2000).

Bioensaios de germinação

Foram conduzidos em placas de Petri de 90 mm de diâmetro, contendo duas folhas de papel de germinação ao fundo, umedecidas com água destilada (controle) ou com as concentrações dos extratos obtidos com o pó das cascas, raízes e folhas de *D. brasiliensis*. Cada placa recebeu 25 diásporos das espécies-alvo, com quatro repetições para cada extrato, sendo, depois, tampadas e seladas com filme plástico. Os experimentos foram instalados em câmara de germinação a 25 °C, sob fotoperíodo de 12 h luz/12 h escuro. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. As leituras foram realizadas a cada 12 h, durante os sete primeiros dias, e em intervalos de 24 h, até a germinação ser nula por três dias consecutivos, adotando-se a protrusão de qualquer parte do embrião como critério de germinação. Foram avaliados a porcentagem de germinação, o tempo

médio de germinação (TMG) e o índice de velocidade de germinação de Maguire (IVG) (RANAL & SANTANA, 2006).

Para avaliar o efeito osmótico dos extratos obtidos de cada órgão, foi realizado um bioensaio de germinação com os diásporos das três espécies receptoras utilizadas nos bioensaios em soluções de polietilenoglicol 6000 (PEG 6000) a -0,26, -0,14 e -0,08 MPa, concentrações osmóticas obtidas para o extrato de 10 % da folha, cascas do caule e raiz de *D. brasiliensis*, respectivamente, calculados de acordo com Michel & Kaufmann (1973), além do controle (0 MPa). O experimento foi feito adotando-se a mesma metodologia descrita para o bioensaio de germinação.

Bioensaios de Crescimento

Para padronizar o tamanho das plântulas a serem testadas com os extratos no bioensaio de crescimento, cerca de 50 diásporos das espécies-alvo foram colocadas para germinar em placas de Petri de 15 mm de diâmetro, forradas ao fundo com papel germinação e umedecidas com água destilada. Em seguida, foram tampadas, envolvidas com filme plástico e mantidas na câmara de germinação, nas mesmas condições descritas para o bioensaio de germinação. Posteriormente, após a emissão da raiz primária com cerca de 3 mm de comprimento, as unidades de dispersão foram transplantadas para caixas plásticas transparentes (15 x 10 x 5 cm). As caixas foram forradas com duas camadas de papel filtro e umedecidas com 8 mL das diferentes concentrações dos extratos obtidos com os diferentes órgãos de *D. brasiliensis* e água destilada (controle), totalizando 10 plântulas por caixa, com 4 repetições para cada tratamento. Posteriormente, foram tampadas e incubadas em câmara de germinação, nas mesmas condições citadas para o bioensaio de germinação. Após sete dias, o comprimento da parte aérea (do colo ao meristema apical caulinar) e das raízes (do colo ao meristema radicular) foi medido com auxílio de um paquímetro digital.

Análise estatística

Os dados obtidos para cada uma das características avaliadas foram submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade (Levene). Foi aplicada a análise de variância (ANOVA). Procedeu-se à regressão linear ou quadrática quando o resultado da ANOVA foi significativo. O ajuste do modelo foi testado a 0,05 de probabilidade e avaliado pelo seu coeficiente de determinação (R^2). As variáveis que não apresentaram

diferenças significativas entre os tratamentos foram representadas nas figuras com os valores médios e seus respectivos desvios-padrão.

Para comparar os efeitos das épocas de coleta, as equações das regressões lineares foram submetidas ao teste do paralelismo (teste F) para testar a hipótese de nulidade de que as inclinações das equações são estatisticamente iguais, conforme descrito por Sokal & Rohlf (1997).

Para comparação dos efeitos ocasionados pelos diferentes órgãos de *D. brasiliensis*, foi realizada análise conjunta para as características em que a razão entre o maior e o menor quadrado médio residual não foi superior a sete (PIMENTEL-GOMES, 1990).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos obtidos de folhas *D. brasiliensis* coletadas nas estações chuvosa e seca exerceram efeitos inibitórios significativos sobre o processo de germinação e de crescimento de gergelim. Sob o efeito de folhas coletadas na estação chuvosa, houve decréscimo linear na germinação (0,188 % para cada adição de 1% de extrato), aumento linear no tempo médio (0,0177 dias para cada adição de 1% de extrato) e declínio no índice de velocidade de germinação (0,056 sementes hora⁻¹ para cada 1% de extrato adicionado). Da mesma forma, sob efeito das folhas coletadas na estação seca, também foi observado diminuição linear na germinação (3,84 % para cada 1% de extrato adicionado), aumento no tempo médio (0,031 dias para cada 1% de extrato adicionado) e consequente redução no índice de velocidade (0,0068 horas para cada adição de 1% de extrato) (Figura 1.2).

Em ambas as épocas de coleta, todas as variáveis do processo de germinação de gergelim foram afetadas pelos extratos foliares de *D. brasiliensis*. Muitas vezes, o efeito alelopático não é apenas sobre a porcentagem de germinação, mas também sobre a velocidade de germinação ou outras características do processo, o que evidencia a influência de fitotoxinas alelopáticas no metabolismo das sementes (FERREIRA & AQUILA, 2000). Trabalhos prévios evidenciaram que a germinação de sementes de gergelim não foi afetada por extratos aquosos foliares de plantas doadoras, tais como *Jatropha curcas* (REJILA; VIJAYAKUMAR, 2011) e *Aristolochia esperanzae* (GATTI et al., 2010). Ao contrário destes estudos, os extratos de *D. brasiliensis* afetaram a germinação de gergelim, o que indica que a espécie pode conter compostos com elevado potencial fitotóxico em suas folhas.

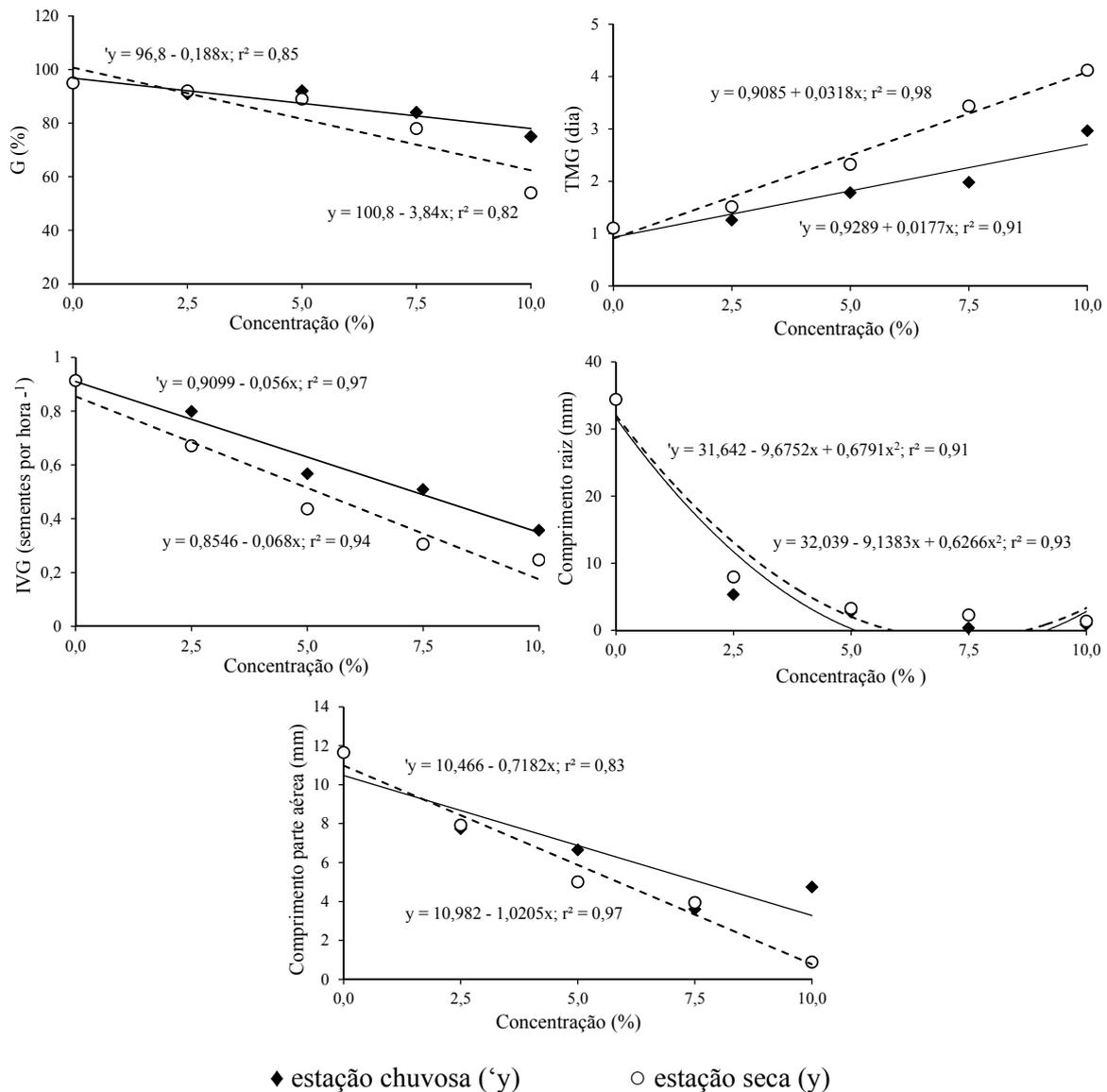


Figura 1.2 - Porcentagem de Germinação (G %), Tempo Médio de Germinação (TMG), Índice de Velocidade de Germinação de Maguire (IVG), crescimento radicular e da parte aérea de gergelim, submetido à ação do extrato de folhas de *D. brasiliensis*, coletadas ao final da estação chuvosa e seca.

Na análise do crescimento das plântulas de gergelim, o comprimento radicular foi expressivamente inibido pelos extratos foliares, com valores nulos a partir das concentrações estimadas de 7,2 e 3,6 %, respectivamente, para a estação chuvosa e seca. Quanto à parte aérea, observou-se decréscimo linear no comprimento de 0,718 e 1,02 mm para cada adição de 1% de extrato foliar das estações chuvosa e seca, respectivamente (Figura 1.2). Extratos aquosos de folhas provenientes de outras plantas doadoras também afetaram o crescimento de plântulas de gergelim, reduzindo principalmente o crescimento radicular, com efeito dependente da concentração dos extratos (OLIVEIRA et al., 2004; GATTI et al., 2010; REJILA & VIJAYAKUMAR, 2011).

Souza Filho & Duarte (2007) discutem que as inibições produzidas no desenvolvimento da raiz são um dos principais fatores que indicam sensibilidade da planta aos efeitos das fitotoxinas alelopáticas. Correa et al. (2005) sugerem que, em experimentos em placas de petri, a inibição radicular por essas substâncias ocorre com mais frequência em comparação com a parte aérea, pois a absorção e concentração dos aleloquímicos pelas raízes são favorecidos pelo contato físico com o papel de filtro. Além disso, as superfícies de raízes primárias são mais permeáveis a fitotoxinas em comparação às superfícies do hipocótilo devido à presença de uma camada de cutícula protetora menos pronunciada sobre a raiz primária, o que pode resultar numa maior penetração e concentração destes compostos dentro dos tecidos da raiz (YOSHIMURA et al., 2011). Uma vez em contato com a raiz, os compostos alelopáticos podem influenciar diretamente no seu crescimento, pois interferem na divisão celular, na permeabilidade de membranas e na atividade de enzimas (SINGH et al., 2006; TEERARAK et al., 2012).

Comparando as linhas de tendências das regressões lineares a partir do teste F, observou-se que o índice de velocidade de germinação das sementes de gergelim apresentou as mesmas taxas de declínio em ambas as estações de coleta, enquanto a germinação, o tempo médio de germinação e o crescimento da parte aérea foram mais influenciados significativamente pelo extrato foliar obtido da coleta na estação seca (Tabela 1.1).

Desse modo, pode-se inferir que houve uma variação na fitotoxicidade dos extratos de *D. brasiliensis* relacionada com a estação do ano, com atividade mais evidente nas folhas coletadas ao final da estação seca. Em concordância com o presente estudo Ramakrishna & Ravishankar (2011) e Gouvea et al. (2012) afirmam que a produção de metabólitos secundários (aleloquímicos) nos vegetais é influenciada por diversos fatores como fenologia, ritmo circadiano, minerais no solo, temperatura, radiação UV, estresse osmótico (seca e salinidade) e variação sazonal. De acordo com Taiz & Zeiger (2006), variação na fitotoxicidade de extratos vegetais em função da sazonalidade pode ser devido a desvios nas rotas biossintéticas de metabólitos primários e secundários. Esses estudos foram posteriormente confirmados por Jemma et al. (2012), Castelo et al. (2012) e Sahoo et al. (2012), que também mostraram acúmulo de fitotoxinas e expressão de atividades biológicas na estação seca.

Tabela 1.1 - Teste-*F* para comparar os coeficientes angulares das regressões lineares, oriundas do teste de germinação e crescimento inicial de gergelim submetida à ação de extratos de folhas de *D. brasiliensis*, coletadas ao final das estações chuvosa e seca.

Variáveis (unidades)	Equação ¹	F _{calculado}
Germinação (%)	'y = 96,8 - 0,188x y = 100,8 - 3,84x	9,42 *
TMG (dia)	'y = 0,9289 + 0,0177x y = 0,9085 + 0,0318x	31,27 *
IVG (sementes hora ⁻¹)	'y = 0,9099 - 0,056x y = 0,8546 - 0,068x	3,74 ^{ns}
Comprimento da parte aérea (mm)	'y = 10,466 - 0,7182x y = 10,982 - 1,0205x	6,10 *

¹H₀: $\beta_1 - \beta_2 = 0$, onde β_1 e β_2 são os parâmetros dos coeficientes angulares das equações. 'y: estação chuvosa; y: estação seca. ^{ns}: coeficientes angulares para as duas épocas de coleta não diferem significativamente. * coeficientes angulares para as duas épocas de coleta diferem significativamente (F_{calculado} > F_{tabulado}).

A acumulação de metabólitos secundários ocorre frequentemente em plantas submetidas a estresses bióticos e abióticos (RAMAKRISHNA & RAVISHANKAR, 2012). No Cerrado, tipo de vegetação onde *D. brasiliensis* foi coletada, os déficits hídricos sazonais presentes nas camadas superficiais de seus solos oligotróficos (HARIDASAN, 2001) poderiam resultar em uma maior quantidade de aleloquímicos. Castelo et al. (2012) demonstraram que a estação seca do Cerrado levou a um aumento na produção de óleo essencial nas espécies *Blepharocalyx salicifolius* e *Psidium myrsinites*. Folhas de *Rapanea ferruginea* e *Rapanea umbellata*, colhidas na estação seca, condicionaram extratos com maior atividade alelopática sobre variáveis germinativas de plantas cultivadas (NOVAES, 2011). Porém, outros trabalhos afirmam que os efeitos da sazonalidade podem ser dependentes da espécie. Em folhas de *Eremanthus mattogrossensis*, Gouvea et al. (2012) encontraram uma correlação significativa entre maiores concentrações de ácido cafeoilquínicos e flavonóides e a estação chuvosa do Cerrado.

O estágio fenológico da planta doadora também exerce influência na indução da produção dos aleloquímicos e seu custo para a planta (ÇIRAK et al., 2008). O período vegetativo de *D. brasiliensis* ocorre na estação chuvosa, enquanto a fase reprodutiva coincide com a estação seca do Cerrado. O investimento energético para produção de metabólitos de proteção de diásporos pode ser mais alto nos períodos reprodutivos, para garantir o sucesso da reprodução. Muitos autores observaram que o estágio do desenvolvimento influencia a biossíntese de metabólitos secundários, havendo um aumento durante a floração das plantas (ÇIRAK et al, 2008; FILLIPINI et al., 2010; HOSNI et al.,

2011; JAKOVLJEVIĆ et al., 2013). O conhecimento destas variações é muito importante, pois permite definir a época em que alguns constituintes estão em maior proporção, podendo estar relacionados com aumento de resistência ou susceptibilidade a ataques por microrganismos ou insetos herbívoros, além de períodos de germinação de espécies competidoras (DARROW & BOWERS, 1997; GOBBO-NETO & LOPES, 2007). Além das variações sazonais e estágio de desenvolvimento da planta, os diferentes órgãos vegetais também são de considerável importância e podem influenciar não só a quantidade total de metabólitos produzidos, mas também as proporções relativas dos componentes da mistura (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Os efeitos fitotóxicos de diferentes órgãos de *D. brasiliensis* foram investigados sobre trigo e rabanete. Os extratos aquosos de folhas de *D. brasiliensis* inibiram significativamente a germinação e crescimento inicial das duas espécies. Para a germinação de cariopses do trigo houve redução linear de 1,16 % para cada 1% de extrato foliar adicionado; enquanto a germinação do rabanete atingiu valor nulo na concentração de 10 %. O tempo médio de germinação das sementes do rabanete atingiu o valor máximo (80,88 h) na concentração de 10 %, e o índice de velocidade de germinação foi nulo a partir da concentração estimada de 8,23 %. Para as cariopses de trigo foram registrados aumento linear no tempo médio (1,647 h) e, conseqüentemente, redução linear no índice de velocidade de germinação ($0,029$ cariopses h^{-1}) para cada adição de 1% de extrato foliar (Figura 1.3). Os valores mínimos no crescimento radicular do trigo (42 mm) e rabanete (28 mm) foram observados nas concentrações estimadas de 7,60 e 8,5 %, respectivamente. O crescimento da parte aérea do rabanete sofreu decréscimo linear de 1,34 mm para cada adição de 1% de extrato foliar; para o trigo, o menor comprimento (9 mm) ocorreu na concentração estimada de 7,36 % (Figura 1.3).

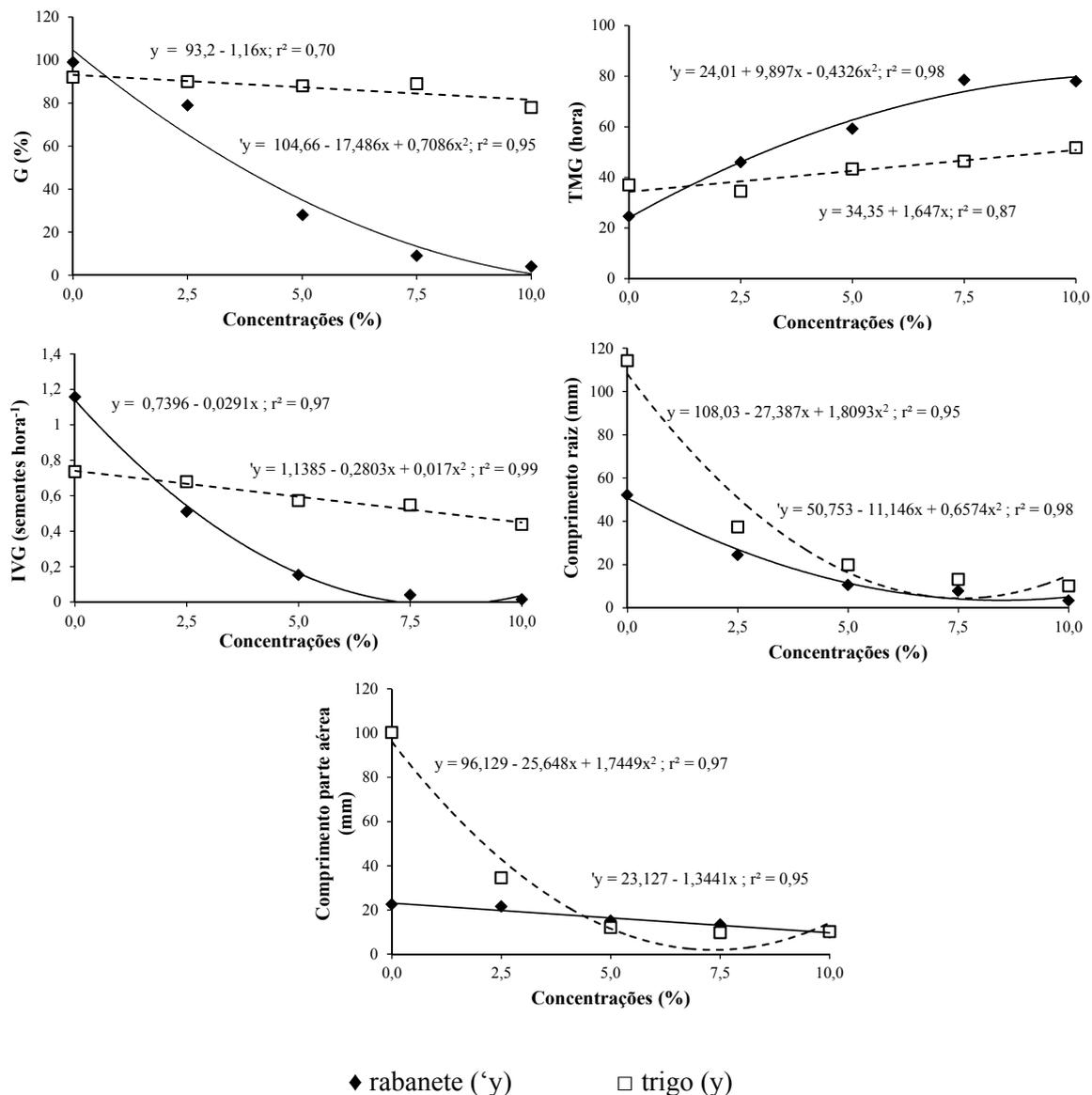


Figura 1.3 - Porcentagem de Germinação (G %), Tempo Médio de Germinação (TMG), Índice de Velocidade de Germinação de Maguire (IVG), crescimento radicular e da parte aérea de trigo e rabanete, submetidos à ação do extrato de folhas de *D. brasiliensis* Miers, em diferentes concentrações.

Resultados similares de inibição no processo de germinação e crescimento inicial de rabanete já foram registrados com a utilização de extratos aquosos de folhas de *Andira humilis* (PERIOTTO et al., 2004), *Cyperus rotundus* (ANDRADE et al., 2009) e *Solanum americanum* (BORELLA et al., 2012). Para as cariopses de trigo submetidas aos efeitos dos extratos aquosos de folhas de *Fumaria indica* e *Polygonum plebejum* também houve inibição do processo de germinação e crescimento de plântulas (ULLAH et al., 2013). Em contrapartida, os extratos foliares de *Jatropha curcas* (REICHEL et al., 2013) e *Euphorfia*

dracunculoides (TANVEER et al., 2012) foram capazes de interferir no crescimento de trigo, mas sem qualquer efeito sobre o processo de germinação. Todas as plantas são capazes de produzirem metabólitos secundários; porém, estes variam em quantidade e qualidade de espécie para espécie. A tolerância ou resistência a estes compostos também pode ser específica, havendo espécies mais sensíveis que outras (FERREIRA & AQUILA, 2000).

Os extratos aquosos das cascas de *D. brasiliensis* também inibiram significativamente as características avaliadas em trigo e rabanete. Observou-se redução linear na germinação (1,08 % para o trigo e 2,28 % para o rabanete, para cada 1% de extrato) e aumento linear no tempo médio (1,91 e 2,37 horas para cada 1% de extrato, em trigo e rabanete, respectivamente). Para o índice de velocidade germinação em trigo, foi observado decréscimo linear de 0,021 cariopses hora⁻¹ para cada 1% de extrato adicionado, e para rabanete valor mínimo de 0,43 sementes hora⁻¹ na concentração de 10 % (Figura 1.4). Os valores mínimos no crescimento radicular do trigo (9,61 mm) e rabanete (12,03 mm) foram observados nas concentrações estimadas de 7,9 e 12,03 %, respectivamente. A aplicação do extrato das cascas não afetou significativamente o crescimento de parte aérea do rabanete; porém, foi efetivo sobre o trigo, onde o menor comprimento (21,88 mm) foi observado na concentração estimada de 9,15 % (Figura 1.4).

As cascas do caule de *D. brasiliensis* têm grande valor de uso na medicina popular brasileira, sendo utilizadas como antifúngica, bactericida, antiinflamatória, antialérgica, no tratamento de dores e no tratamento da malária, e diversos trabalhos científicos comprovaram estas propriedades (CECHINEL FILHO et al., 1998; MALHEIROS et al., 2001; 2005; SILVEIRA et al., 2012; CLAUDINO et al., 2013); além disso, exerceram efeitos fitotóxicos sobre a germinação e crescimento de plântulas de trigo e rabanete. Das cascas da espécie já se isolaram diversos sesquiterpenos, compostos relacionados com as propriedades medicinais descritas para a planta (MALHEIROS et al., 2001) e, que poderiam estar associados também aos efeitos fitotóxicos observados para a espécie. Extratos oriundos de cascas do caule de plantas constituíram-se em uma importante fonte de substâncias alelopáticas na inibição do crescimento de plântulas de alface (VIRTUOSO & MIGUEL, 2005) e também para controle de plantas daninhas (SOUZA FILHO & ALVES, 2000).

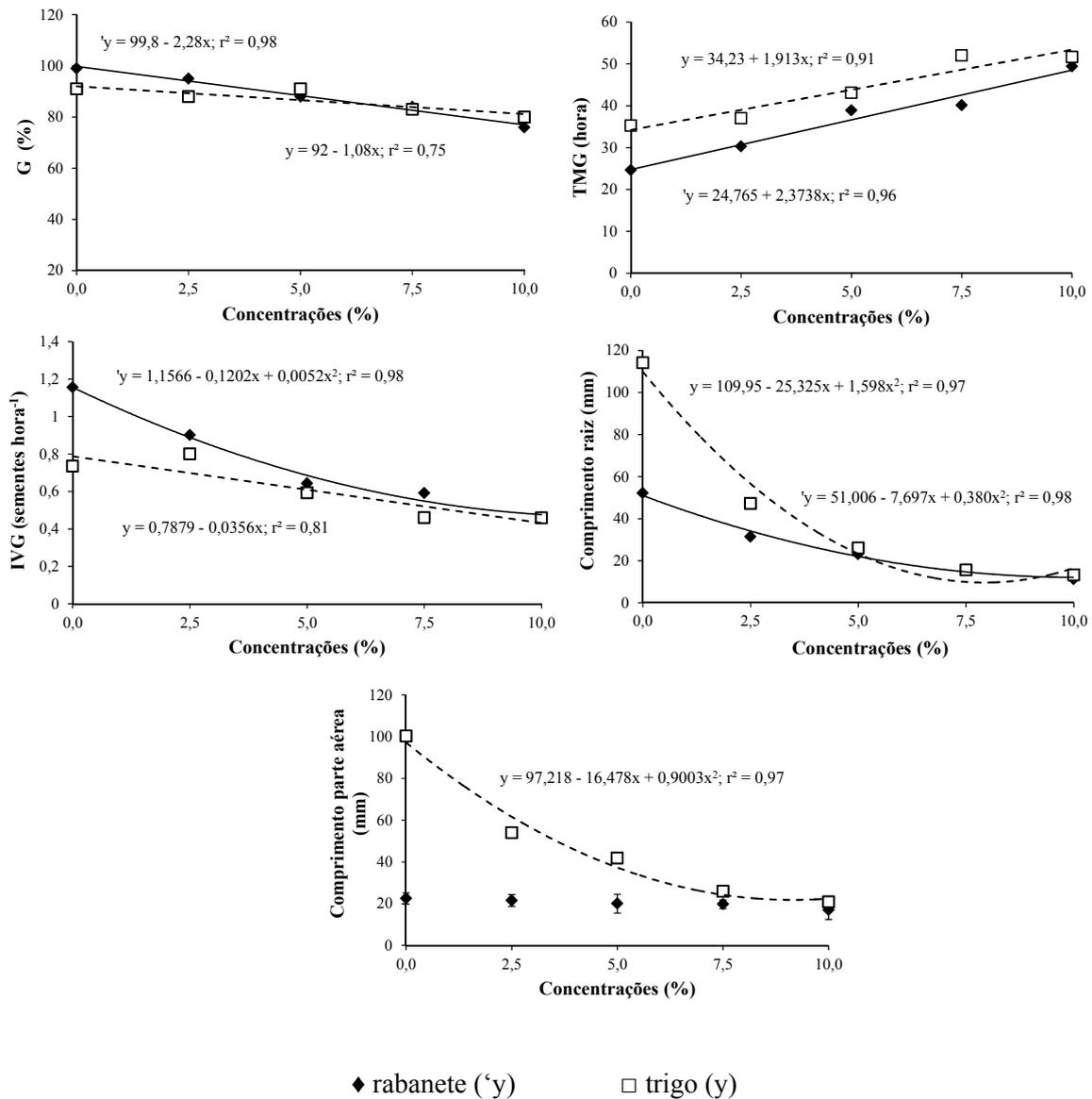


Figura 1.4 - Porcentagem de Germinação (G %), Tempo Médio de Germinação (TMG), Índice de Velocidade de Germinação de Maguire (IVG), crescimento radicular e da parte aérea de trigo e rabanete, submetidos à ação do extrato de cascas de *D. brasiliensis* Miers, em diferentes concentrações.

Os extratos aquosos das raízes de *D. brasiliensis* também apresentaram efeito fitotóxico sobre o trigo e o rabanete, para a maioria das variáveis analisadas. Para o rabanete, houve decréscimo linear na germinação de 2,6 % para cada 1% de extrato adicionado, ao passo que para as cariopses de trigo não foi registrado efeito significativo das concentrações do extrato das raízes. Observou-se aumento linear no tempo médio de germinação (1,11 horas para o trigo e 1,52 horas para o rabanete, para cada 1% de extrato). O índice de velocidade de germinação de rabanete sofreu declínio linear de 0,058 sementes

hora⁻¹ para cada adição de 1% de extrato, enquanto o índice de velocidade para as cariopses de trigo não foi influenciado pelas diferentes concentrações do extrato (Figura 1.5). O crescimento radicular de ambas as espécies foi fortemente inibido pelo extrato das raízes. O comprimento das raízes do trigo foi mínimo (10,09 mm) na concentração estimada de 7,68 % e, o do rabanete (5,6 mm) na concentração de 8,49 %. Em relação ao crescimento da parte aérea, somente o comprimento do trigo foi influenciado pelo extrato das raízes, com valor mínimo (20,42 mm) observado na concentração estimada de 8,10 % (Figura 1.5).

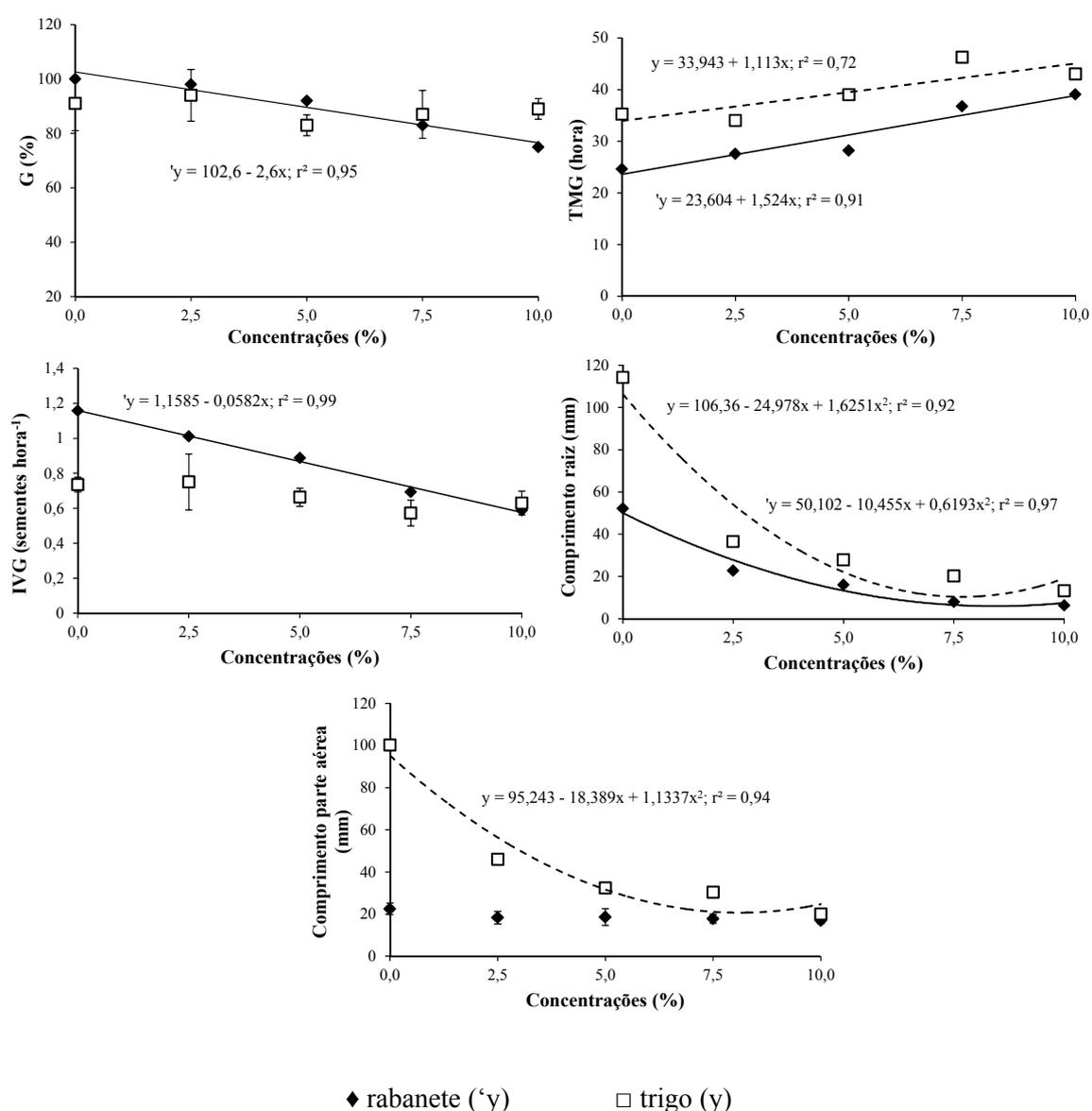


Figura 1.5 – Porcentagem de Germinação (G %), Tempo Médio de Germinação (TMG), Índice de Velocidade de Germinação de Maguire (IVG), crescimento radicular e da parte aérea de trigo e rabanete, submetidos à ação do extrato de raízes de *D. brasiliensis* Miers, em diferentes concentrações.

Por meio de suas raízes, as plantas exudam para o ambiente uma complexa variedade de compostos de baixo peso molecular. Algumas das interações físicas, químicas e biológicas mais complexas vivenciadas por plantas terrestre correspondem àquelas que acontecem entre as raízes e seu ambiente circundante no solo, a rizosfera (BAIS et al., 2006). O papel biológico dos exsudados pode ser a chave para compreender a dinâmica das populações e o papel da alelopatia nesse processo (OLIVEROS-BASTIDAS et al., 2009).

Os extratos radiculares apresentam grande quantidade de substâncias inibitórias, pois a raiz é uma das principais entradas de nutrientes e água e, por se encontrar no solo, está mais suscetível ao ataque de microorganismos e aleloquímicos de outras plantas vizinhas que estão se defendendo ou até mesmo atacando, em busca de melhores condições para seu desenvolvimento (REZENDE et al., 2011). Devido à especificidade de produzir metabólitos que são exsudados diretamente no ambiente, muitos compostos com atividades biológicas relevantes têm sido localizados quase de maneira exclusiva em raízes (OLIVEROS-BASTIDAS et al., 2009). Extratos e fitoxinas alelopáticas oriundos de raízes são relatados por interferirem em vários processos do desenvolvimento de plantas, tais como a germinação (SANTOS et al., 2007), crescimento radicular, crescimento da parte aérea, índice de plântulas normais (LIU et al., 2011; GRISI et al., 2013b), crescimento de células do metaxilema (GATTI et al., 2010), fotossíntese, respiração e no transporte de membrana (DAYAN et al., 2009). Não foram encontrados registros de atividades biológicas de raízes de *D. brasiliensis* na literatura, o que abre perspectivas para mais investigações sobre as propriedades fitotóxicas deste órgão.

Por meio da análise conjunta foi possível comparar os resultados obtidos a partir dos diferentes órgãos de *D. brasiliensis*. Para a germinação e tempo médio de germinação do trigo, todos os órgãos exerceram efeitos inibitórios similares, não havendo diferença significativa entre eles. No entanto, o extrato aquoso das folhas de *D. brasiliensis* apresentou maior potencial para aumentar o tempo médio e reduzir o percentual de germinação de sementes do rabanete, demonstrando a maior eficiência do extrato foliar na inibição do processo de germinação desta espécie, em comparação aos demais órgãos avaliados (Figura 1.6 A e B). Em relação ao crescimento radicular, todos os órgãos foram igualmente eficientes para inibir este parâmetro nas duas espécies (Figura 1.6 C).

Metabólitos secundários com potencial fitotóxico são produzidos em diferentes órgãos das plantas, incluindo folhas, caules, cascas, raízes e frutos; contudo, a quantidade de substâncias varia de um órgão para o outro (WESTON & DUKE, 2003; PARVEZ et al.,

2004). No presente trabalho, folhas, cascas e raízes de *D. brasiliensis* apresentaram efeitos fitotóxicos sobre ambas às espécies receptoras investigadas. Vários estudos tem mostrado que os extratos preparados a partir de diferentes órgãos de plantas alelopáticas são capazes de suprimir a germinação ou crescimento de plantas testes. Sodaeizadeh et al. (2009) observaram que todas as partes de *Pegamum harmala* apresentaram potencial fitotóxico sobre a germinação e o crescimento de plantas daninhas. De forma similar, os extratos de folhas, cascas e vagens de *Caesalpinia ferrea* exerceram atividade alelopática sobre desenvolvimento de plântulas de alface (OLIVEIRA et al., 2012). Contudo, extratos aquosos de folhas de *Mikania micrantha* foram mais fitotóxicos do que os extratos de raízes sobre o processo de germinação e crescimento de parte aérea de espécies arbóreas, enquanto os extratos aquosos das raízes afetaram mais o crescimento radicular das mesmas espécies (WU et al., 2009).

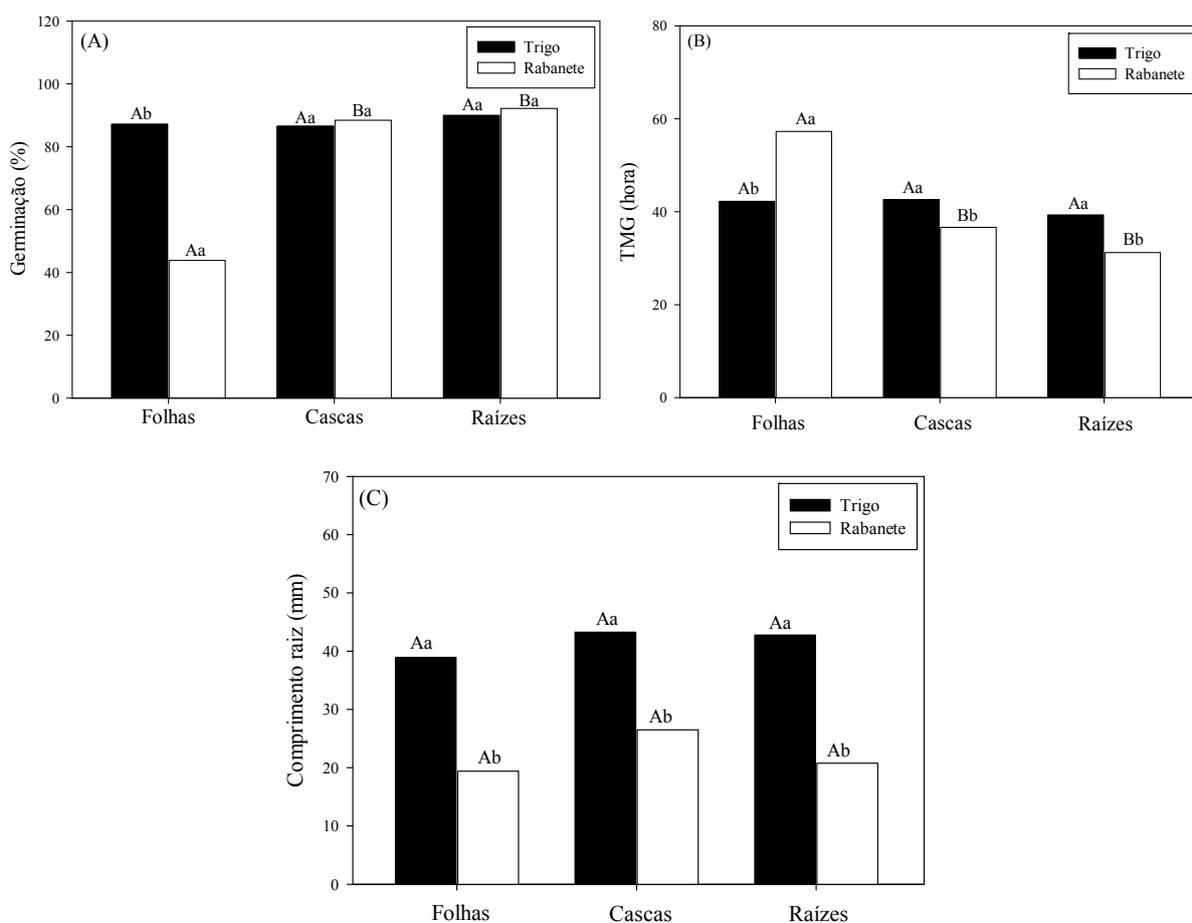


Figura 1.6 - Germinação (A), Tempo Médio de Germinação (B) e crescimento radicular (C) de trigo e rabanete, sob a ação do extrato de diferentes órgãos de *D. brasiliensis* Miers. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas para espécies e maiúscula para órgãos, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 0,05 de probabilidade.

No presente trabalho, observou-se que extratos aquosos de folhas de *D. brasiliensis* foram mais eficientes na inibição do processo de germinação de rabanete, em comparação aos outros órgãos; todavia, o mesmo resultado não foi observado para o processo de germinação de trigo (Figura 1.6 A e B). A sensibilidade diferenciada das espécies receptoras aos efeitos de substâncias inibitórias depende de características fisiológicas, bioquímicas e de diferenças evolucionárias na tolerância aos compostos, específicas para cada espécie alvo (HUNTER & MANGERS, 2002; KOBAYASHI, 2004). Compostos alelopáticos que exibem efeito negativo sobre o desenvolvimento de uma planta receptora a certas concentrações podem causar menos ou nenhuma inibição no desenvolvimento de outra (XUAN et al., 2005). No presente estudo, a superioridade dos efeitos alelopáticos ocasionados pelas folhas de *D. brasiliensis* sobre o rabanete também pode ter resultado de diferenças na concentração dos aleloquímicos ou composição química diferenciada entre as folhas e os demais órgãos da espécie. Todavia, o isolamento e caracterização de compostos alelopáticos em folhas, caule e raízes de *D. brasiliensis* são necessários para esclarecer os dados obtidos.

Os extratos aquosos de folhas, cascas e raízes apresentaram valores de pH de 4,18, 4,33 e 4,78, respectivamente. Estes valores variaram dentro do limite de tolerância para plantas (LARCHER, 2000), dessa forma, os valores de pH encontrados para os extratos de cada um dos órgãos de *D. brasiliensis* provavelmente não interferiram nas características avaliadas. Os valores de potenciais osmóticos dos extratos aquosos de folhas, cascas e raízes foram, respectivamente, de -0,25, -0,14 e -0,08 MPa. Em soluções de PEG-6000 com potenciais de -0,14 e -0,08 MPa, a germinação de rabanete foi de 86 e 88 % e de trigo de 92 e 90 %, respectivamente. No potencial de -0,25 MPa, as sementes de gergelim, rabanete e trigo tiveram germinação acima de 90 %. Estes dados não diferiram daqueles obtidos para o grupo controle de cada uma das espécies receptoras avaliadas. Considerando que esses potenciais osmóticos não interferiam no processo de germinação das três espécies, pode-se afirmar que os efeitos inibitórios observados sobre a germinação tenham acontecido, principalmente, devido a presença de fitotoxinas alelopáticas nos diferentes órgãos de *D. brasiliensis*. Sesquiterpenos drimanos, sesquiterpenos aromadendranos, monoterpenos e flavonóides são classes de metabólitos secundários relatados em folhas e cascas do caule de *D. brasiliensis* (MALHEIROS et al., 2005; LIEMBERGER et al., 2007;

SILVEIRA et al., 2012; MECCHI & LAGO et al., 2013) e, estes podem estar envolvidos com o atividade fitotóxica observada para a espécie.

CONCLUSÕES

Os extratos aquosos obtidos de folhas *D. brasiliensis* coletadas na estação chuvosa e seca exerceram efeitos fitotóxicos sobre o processo germinação e crescimento de plântulas de gergelim, com atividade mais evidente das folhas coletadas ao final da estação seca.

Os diferentes órgãos de *D. brasiliensis* exerceram efeitos inibitórios sobre o processo de germinação e crescimento de plântulas de trigo e rabanete, porém o extrato das folhas foi mais inibitório sobre a germinação de rabanete.

Todos os órgãos de *D. brasiliensis* constituem uma fonte promissora na busca de fitotoxinas naturais.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, E. M.; BITTENCOURT, A. H. C.; VESTENA, S. Potencial alelopático de *Cyperus rotundus* L. sobre espécies cultivadas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, p. 1984-1990, 2009.
- BAIS, H. P.; WEIR, T. L.; PERRY, L.G.; GILROY, S.; VIVANCO, J.G The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 233-266, 2006.
- BORELLA, J.; WANDSCHEER, A. C. D.; PASTORINI, L. H. Efeito alelopático de extratos de folhas de *Solanum americanum* sobre o vigor do rabanete. **Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas**, São Luís, v. 6, p. 44-51, 2012.
- CASTELO, A.V.M.; DEL MENEZZI, C.H.S.; RESCK, I.S. Seasonal Variation in the yield and the chemical composition of essential oils from two brasilian natives arbustive species. **Journal of Applied science**, v.12, p.753-760, 2012.
- CECHINEL FILHO, V., SCHLEMPER, V., SANTOS, A. R. S., PINHEIRO, T. R., YUNES, R. A., MENDES, J. L., CALIXTO, J. B., MONACHE, F. D. Isolation and identification of active compounds from *Drimys winteri* barks. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, p. 223-227, 1998.

- CHAVES, T. P.; SANTANA, C. P.; VÉRAS, G.; BRANDÃO, D. O.; FELISMINO, D. C.; MEDEIROS, A. C. D.; TROVÃO, D. M. B. Seasonal variation in the production of secondary metabolites and antimicrobial activity of two plant species used in Brazilian traditional medicine. **African Journal of Biotechnology**, v.12, p. 847-853, 2013.
- ÇIRAK, C.; RADUSIENE, J.; CAMASS, N. Pseudohypericin and hyperforin in two Turkish *Hypericum* species: variation among plant parts and phenological stages. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, p. 377-382, 2008.
- CLAUDINO, V. D.; DA SILVA, K. C.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A.; DELLE MONACHE, F.; GIMÉNEZ, A.; SALAMANCA, E.; GUTIERREZ-YAPU, D.; MALHEIROS, A. Drimanes from *Drimys brasiliensis* with leishmanicidal and antimalarial activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 140-4, 2013.
- CORREIA, N. M.; CENTURION, M. A. P. C.; ALVES, P. L. C. A. Influência de extratos aquosos de sorgo sobre a germinação e desenvolvimento de plântulas de soja. **Ciência Rural**, v. 35, p. 498-503, 2005.
- COSTA, D. P.; SANTOS, S. C.; SERAPHIN, J. C.; FERRI, P. H. Seasonal variability of Essential Oils of *Eugenia uniflora* leaves. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 1287-1293, 2009.
- DARROW, K.; BOWERS, M.D. Phenological and population variation in iridoid glycosides of *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 25, p. 1-11, 1997.
- DAYAN, F. E.; HOWELL, J'L.; WEIDENHAMER, J. D. Dynamic root exudation of sorgoleone and its in planta mechanism of action. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p. 2107-2117, 2009.
- EHRENDORFER, F., GOTTSBERGER, I. S., GOTTSBERGER, G. Variation on the population, racial, and species level in the primitive relic angiosperm genus *Drimys* (Winteraceae) in South America. **Plant Systematics and Evolution**, v. 132, p. 53-83, 1979.
- FILIPPINI, R.; PIOVAN, A.; BORSARINI, A.; CANIATO, R. Study of dynamic accumulation of secondary metabolites in three subspecies of *Hypericum perforatum*. **Fitoterapia**, v. 81, p. 115-119, 2010.
- FERREIRA, A. G.; ÁQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 175-204, 2000.
- GATTI, A. B.; FERREIRA, A. G.; ARDUIN, M.; PEREZ, S. C. J. 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.

- GRISI, P.U.; GUALTIERI, S.C.J.; ANESE, S.; PEREIRA, V.C.; FORIM, M.R. Effect of *Serjania lethalis* ethanolic extract on weed control. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 31, n. 2, p. 239-248, 2013a.
- GRISI; P. U.; GUALTIERI; S .C. J.; RANAL, M. A.; SANTANA, D. G. Influência alelopática do extrato aquoso de raiz de *Sapindus saponaria* L. sobre capim-arroz e corda-de-viola. **Bioscience Journal**, v. 29, p. 760-766, 2013b.
- 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, p. 1-9, 2012.
- GOUVEA, D. R.; GOBBO-NETO, L. B.; SAKAMOTO, H.T.; LOPES, N.P.; LOPES, J.L.C.; MELONI, F.; AMARAL, G.J. Seasonal variation of the major secondary metabolites present in the extract of *Eremanthus mattogrossensis* Less (Asteraceae: Vernonieae) leaves. **Química Nova**, v. 35, p. 2139-2145, 2012
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p. 374-381, 2007.
- GUSMAN, G.S.; YAMAGUSHI, M.Q.; VESTENA, S. Potencial alelopático de extratos aquosos de *Bidens pilosa* L., *Cyperus rotundus* L. e *Euphorbia heterophylla* L. **Iheringia, Sér. Bot.**, v. 66, p. 87 - 98, 2011.
- HAIG, T. J.; HAIG, T. J.; SEAL, A. N.; PRATLEY, J. E.; AN, M.; WU, H. Lavender as a source of novel plant compounds for the development of a natural herbicide. **Journal Chemical Ecology**, v. 35, p. 1129-1136, 2009.
- HARIDASAN, M. Nutrient cycling as a function of landscape and biotic characteristics in the Cerrado of central of central Brazil. pp. 68-83. In: MCCLAIN, M.E.; VICTORIA, R.L.; RICHEY, J.E. (ed). **Biogeochemistry of the Amazon basin and its role in a changing world**. New York, Oxford University Press, 2001.
- HOSNI, K.; MSAADA, K.; TAARIT, M. B.; MARZOUK, B. Phenological variations of secondary metabolites from *Hypericum triquetrifolium* Turra. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.39, p. 43-50, 2011.
- HUNTER, M.E.; MENGES, E.S. Allelopathic effects and root distribution of *Ceratiola ericoides* (Empetraceae) on seven rosemary scrub species. **American Journal Botany**, v. 89, p.1113-1118, 2002.
- INDERJIT, DUKE, S.O. Ecophysiological aspects of allelopathy. **Planta**, v. 217, n. 4, p. 529-539, 2003.
- JAKOVLJEVIĆ, Z. D.; STANKOVIĆ, S. M., TOPUZOVIĆ, D. M. Seasonal variability of *Chelidonium majus* L. secondary metabolites content and antioxidant activity. **EXCLI Journal**, v. 12, p. 260-268, 2013.

- JEMÂA, J. M. B.; HAOUEL, S.; BOUAZIZ, M.; KHOUJA, M. L. Seasonal variations in chemical composition and fumigant activity of five *Eucalyptus* essential oils against three moth pests of stored dates in Tunisia. **Journal of Stored Products Research**, v. 48, p. 61-67, 2012.
- LARCHER, W. *Ecofisiologia vegetal*. São Carlos. Rima Artes e Textos, 2000.
- LIMBERGER, R.P., SCOPEL, R., SOBRAL, M., HENRIQUES, A.T. Comparative analysis of volatiles from *Drimys brasiliensis* Miers and *D. angustifolia* Miers (Winteraceae) from Southern Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 130-137, 2007.
- LIU, Y.; ZHANG, C.; WEI, S.; CUI, H.; HUANG, H. Compounds from the subterranean part of Johnsongrass and their allelopathic potential. **Weed Biology and Management**, v. 11, p. 160-166, 2011.
- LOPES, N. F.; KATO, M. J.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S.; YOSHIDA, M. Circadian and seasonal variation in the essential oil from *Virola surinamensis* leaves **Phytochemistry**, v. 46, p. 689-693, 1997.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**, v. 1. 4 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 368 p.
- KATO-NOGUCHI, H.; SALAM, M.A.; SUENAGA, K. Isolation and identification of potent allelopathic substances in a traditional Bangladeshi rice cultivar Kartikshail. **Plant Production Science**, v. 14, p. 128-134, 2011.
- KROYMANN, J. Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, p. 246-251, 2011.
- KOBAYASHI, K. Factors affecting phytotoxic activity of allelochemicals in soil. **Weed Biology and Management**, v. 4, p. 1-7, 2004.
- KÖPPEN, W. **Climatologia**: com um estúdio de los climas de la tierra. México: Fondo de Cultura Econômica, 1948.
- MACÍAS, F. A.; OLIVEROS-BATIDAS, A.; MARÍN, D.; CARRERA, C.; CHINCHILLA, N.; MOLINILLO, J.M.G. Plant biocommunicators: their phytotoxicity, degradation studies and potential use as herbicide models. **Phytochemistry Review**, v. 7, p. 179-194, 2008.
- MALHEIROS, A.; CECHINEL FILHO, V.; SCHMITT, C.B.; YUNES, R.A.; ESCALANTE, A.; SVETAZ, L.; ZACCHINO, S.; MONACHE, F. D. Antifungal activity of drimane sesquiterpenes from *Drimys brasiliensis* using bioassayguided fractionation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8, p. 335-339, 2005.
- MALHEIROS, A.; CECHINEL, V.; SCHMITT, C.; SANTOS, A.; SCHEIDT, C.; CALIXTO, J.; MONACHE, F.; YUNES, R. A sesquiterpene drimane with

- antinociceptive activity from *Drimys winteri* bark. **Phytochemistry**, v. 57, p. 103-107, 2001.
- MECCHI, M.C., LAGO, J.H.G. Chemical constituents derived from *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae). **Natural Product Research**, v. 27, Ahead of Print, 2013.
- MELLO-SILVA, R. *Winteraceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim botânico do Rio de Janeiro, 2013. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB15325>).
- MICHEL, B.E.; KAUFMANN, M.R. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. **Plant Physiology**, v. 51, p. 914-916, 1973.
- NOVAES, P. **Alelopatia e bioprospecção de *Rapanea ferruginea* e de *Rapanea umbellata***. 112 f. Tese (doutorado). Curso de pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.
- OLIVEIRA, A. K.; COELHO, M. F. B.; MAIA, S. S. S.; DIÓGENES, F. E. P. Atividade alelopática de extratos de diferentes órgãos de *Caesalpinia ferrea* na germinação de alface. **Ciência Rural**, v. 42, p. 1397-1403, 2012.
- OLIVEIRA, S. C. C.; FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. Efeito alelopático de folhas de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil. (Solanaceae) na germinação e crescimento de *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae) sob diferentes temperaturas. **Acta Botanica Brasílica**, v.18, p. 401-406, 2004.
- OLIVEROS-BASTIDAS, A. J.; MACÍAS, F. A.; FERNÁNDEZ, C. C.; MARÍN, D.; MOLINILLO, J. M. G. Exudados dela raiz y su relevancia actual en las interacciones alelopaticas. **Química nova**, v. 32, p. 198-213, 2009.
- PERIOTTO, F.; PEREZ, S. C. J. G. A.; LIMA, M. I. S. Efeito alelopático de *Andira humilis* Mart. ex Benth na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L.). **Acta botânica brasílica**, v. 18, p. 425-430, 2004
- 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.
- PAVARINI, D. P.; PAVARINI, S. P.; NIEHUES, M.; LOPES, N. P. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, p. 5-16, 2012.
- PAVELA, R. Antifeedant activity of plant extracts on *Leptinotarsa decemlineata* Say. and *Spodoptera littoralis* Bois. larvae. **Industrial Crop and Products**, v. 32, p. 213-219, 2010.
- PIMENTEL-GOMES, F. P. Curso de estatística experimental. 13.ed. Piracicaba: Nobel, 1990. 477p.

- RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v.6, p. 1720-1731, 2011.
- RANAL, M. A.; SANTANA, D. G. How and why to measure the germination process? **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, p. 1-11, 2006.
- REICHEL, T.; BARAZETTI, J. F.; STEFANELLO, S. F.; PAULERT, R.; ZONETTI, P. C. Allelopathy of leaf extracts of jatropha (*Jatropha curcas* L.) in the initial development of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Idesia**, v.31, p. 45-52, 2013.
- REJILA, S.; VIJAYAKUMAR, N. Allelopathic Effect of *Jatropha curcas* on Selected Intercropping Plants (Green Chilli and Sesame). **Journal of Phytology**, v. 3, p. 01-03, 2011.
- REZENDE, G. A. A.; TERRONES, M. G. H.; REZENDE, D. M. L. C. Estudo do potencial alelopático do extrato metanólico de raiz e caule de *Caryocar brasiliense* Camb. (pequi). **Bioscience Journal**, v. 27, p. 460-472, 2011.
- SAHOO, K. P.; KASERA, P. K.; MOHAMMED, S. Secondary metabolites produced during different seasons in some arid medicinal plants. **Asian Journal of Plant Science and Research**, v. 2, p. 650-652, 2012.
- SANTOS, S.; MORAES, M. L. L.; REZENDE, M. O. O. Allelopathic potential and systematic evaluation of secondary compounds in extracts from roots of *Canavalia ensiformis* by capillary electrophoresis. **Eclética Química**, v. 32, p. 13-18, 2007.
- SILVEIRA, A. C. O.; CLAUDINO, V. D.; YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V.; MALHEIROS, A.; CORDOVA, C. M. M.; BELLA CRUZ, A. Antibacterial Activity and Toxicity of *Drimys brasiliensis*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 31, p. 935-40, 2012.
- SILVESTRE, D.M.; KOLB, R.M.; FREI, F.; SANTOS, C. Phytotoxicity of organic extracts of *Turnera ulmifolia* L. and *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. in cucumber seeds. **Acta Botanica Brasilica**, v. 27, p. 476-482, 2013.
- SINGH, S. P; BATISH, D. R; KAUR, S.; ARORA, K.; KOHLI, R. K. α -Pinene inhibits growth and induces oxidative stress in roots. **Annal of Botany**, v. 98, 1261-1269, 2006.
- SODAEIZADEH, H.; RAFIEIOLHOSSAINI, M.; HAVLI'K, J.; VAN DAMME, P. Allelopathic activity of different plant parts of *Peganum harmala* L. and identification of their growth inhibitors substances. **Plant Growth Regulation**, v. 59, p. 227-236, 2009.
- SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometry**: the principles and practice of statistics in biological research. New York: W. H. Freeman, 1997.

- SOUZA FILHO, A. P. S.; GURGEL, E. S. C.; QUEIROZ, M. S. M.; SANTOS, J. U. M. Atividade alelopática de extratos brutos de três espécies de *Copaifera* (Leguminosae-Caesalpinioideae). **Planta Daninha**, v. 28, p. 743-751, 2010.
- SOUZA FILHO, A. P. S.; DUARTE, M. L. R. Atividade alelopática do filtrado de cultura produzido por *Fusarium solani*. **Planta Daninha**, v. 25, p. 227-230, 2007.
- SOUZA FILHO, A.P.S.; ALVES, S.M. Potencial alelopático de plantas de acapu (*Vouacapoua americana*): efeitos sobre plantas daninhas de pastagens. **Planta Daninha**, v.18, p.435-441, 2000.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 719p.
- TANVEER, A.; JABBAR, M. K., KAHLIQ, A.; MATLOOB, A.; ABBAS, R. N.; JAVAID, M. M. Allelopathic effects of aqueous and organic fractions of *Euphorbia dracunculoides* Lam. on germination and seedling growth of chickpea and wheat. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 72, p. 495-501, 2012.
- TEERARAK, M.; LAOSINWATTANA, C.; CHAROENYING, P.; KATO-NOGUCHI, H. Allelopathic activities of *Jasminum officinale* f. var. *grandiflorum* (Linn.) Kob.: Inhibition effects on germination, seed imbibition, and α -amylase activity induction of *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 7850-7854, 2012.
- TRINTA, E. F.; SANTOS, E. **Winteráceae**. Flora Ilustrada Catarinense, Itajaí, 1997.
- ULLAH, R.; TANVEER, A.; KHALIQ, A.; HUSSAIN, S. Comparative allelopathic potential of *Fumaria indica* L. and *Polygonum plebejum* L. against field crops. **Pakistan Journal Weed Science Research**, v. 19, p. 5-29, 2013.
- VIRTUOSO, S.; MIGUEL, O.G. Estudo fitoquímico e biológico de cascas de *Erythrina velutina* Willd. - Fabaceae (Leguminosae Papilionoideae). **Visão acadêmica**, v. 6, p. 89-90, 2005.
- WESTON L. A.; DUKE, S. O. Weed and crop allelopathy. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, p.367-389, 2003.
- 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**, v. 23, p.11-17, 2009.
- XUAN, T.D.; SHINKICHI, T.; KHANH, T.D.; CHUNG, I.M. Biological control of weeds and plant pathogens in paddy rice by exploiting plant allelopathy: an overview. **Crop Protection**, v. 24, p.197-206, 2005.
- YOSHIMURA, H., SAWA, Y., TAMOTSU, S., SAKAI, A. 1,8-cineole inhibits both proliferation and elongation of by-2 cultured tobacco cells. **Journal Chemical Ecology**, v. 37, p. 320-328, 2011.

CAPÍTULO 2

**Fitotoxicidade de frações do extrato de raízes e
folhas de *Drimys brasiliensis* Miers sobre espécies
infestantes de culturas agrícolas**

FITOTOXICIDADE DE FRAÇÕES DO EXTRATO DE RAÍZES E FOLHAS DE *Drimys brasiliensis* Miers SOBRE ESPÉCIES INFESTANTES DE CULTURAS AGRÍCOLAS

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito fitotóxico de frações do extrato bruto de folhas e raízes de *Drimys brasiliensis* Miers sobre a germinação e o crescimento de plântulas de *Panicum maximum* Jacq e *Euphorbia heterophylla* L., assim como a influência sobre as células do metaxilema da última espécie. Os extratos brutos de folhas e raízes foram fracionados por cromatografia de partição e as frações hexânica e de acetato de etila obtidas de cada órgão foram avaliadas nos bioensaios, em diferentes concentrações. No teste de crescimento, comparou-se o efeito das soluções com o herbicida oxyfluorfen. A fração hexânica das raízes apresentou grande potencial para inibir a germinação e crescimento das plantas daninhas e ocasionou redução em mais de 50 % no tamanho das células do metaxilema de *E. heterophylla*. As inibições no crescimento das plântulas, decorrentes da aplicação da fração hexânica das raízes, foram similares ao efeito produzido pelo herbicida comercial, indicando a eficiência de *D. brasiliensis* para o controle das espécies estudadas.

Palavras-chave: alelopatia, inibição, germinação, crescimento, plantas daninhas.

ABSTRACT

This study aims to evaluate the phytotoxicity potential of leaf and root extracts of *Drimys brasiliensis* on the germination and seedling growth of *Panicum maximum* and *Euphorbia heterophylla* and its influence on metaxylem cell size in the seedling roots of the latter specie. The leaf and root extracts were fractionated by partition chromatography, and the hexane and ethyl acetate fractions obtained from each organ were evaluated at different concentrations for phytotoxic activity in several bioassays. In seedling growth tests, we compared the effects of these fractions with the herbicide oxyfluorfen. The hexane fraction of the root extracts showed a higher inhibitory potential on the germination and growth of weeds and reduced the average size of the metaxylem cells of *E. heterophylla* roots by more than 50 %. The inhibitory effects of the root hexane fraction on seedling growth was similar to the herbicide, indicating that *D. brasiliensis* is a possible alternative form of control for the weed species examined.

Keywords: allelopathy, inhibition, germination, growth, weeds.

INTRODUÇÃO

Plantas são capazes de produzir metabólitos secundários que afetam a germinação e crescimento de outras plantas. Este processo de interação entre espécies vegetais tem sido definido como alelopatia (WEIR et al., 2004; INDERJIT et al., 2011). Esta interação biológica, que pode ser positiva ou negativa, ocorre através da produção de metabólitos secundários (aleloquímicos) liberados para o ambiente por diferentes mecanismos, tais como volatilização, lixiviação foliar ou exsudação radicular (WEIR et al., 2004). Em plantas, as folhas e raízes constituem-se na maior fonte de aleloquímicos (WU et al., 2009). No entanto, devido à especificidade de produzir metabólitos que são exsudados diretamente no ambiente, muitos compostos com atividades biológicas relevantes têm sido localizados quase de maneira exclusiva em raízes (OLIVEROS-BASTIDAS et al., 2009).

As plantas daninhas exibem grande adaptabilidade em diferentes ambientes, aproveitam as condições favoráveis ocorrentes nos sistemas agrícolas e competem com as plantas cultivadas. O uso intensivo de agroquímicos sintéticos tem contribuído para o aumento da resistência de plantas daninhas, além de conduzir a problemas de saúde e contaminação dos recursos naturais (VERDEGUER et al., 2011). Metabólitos secundários derivados de plantas podem oferecer possibilidades para o controle natural dessas espécies infestantes. Aleloquímicos geralmente apresentam diversidades de sítios de ação, são biodegradáveis, raramente contém átomos halogenados e tem baixa ou nenhuma toxicidade sobre espécies não-alvo (FAROOQ et al., 2011).

Muitos metabólitos secundários derivados de plantas, como os sesquiterpenos drimanos presentes em espécies do gênero *Drimys*, apresentam ampla variedade de atividades biológicas, incluindo leishmanicida (CÔRREA et al., 2011), herbicida e inseticida (ZAPATA et al., 2011; 2009), propriedades fitotóxicas e reguladoras do crescimento de plantas (JANSEN & GROOT, 2004). Assim, espécies do gênero *Drimys* apresentam-se como promissoras na busca de fitoquímicos capazes de atuar como herbicidas naturais.

Drimys brasiliensis Miers, ou casca-de-anta, como é popularmente conhecida, pertence à família Winteraceae, é encontrada na Mata Atlântica e em matas de galerias no domínio do Cerrado (EHRENDORFER et al., 1979). Estudos anteriores revelaram seu potencial fungicida (MALHEIROS et al., 2005), anti-inflamatório (LAGO et al., 2010) e

bactericida (SILVEIRA et al., 2012). No entanto, são poucos os trabalhos que investigaram seu potencial fitotóxico, particularmente sobre plantas infestantes de culturas agrícolas.

Panicum maximum Jacq. (capim-colonião) é uma gramínea conhecida como uma das plantas daninhas mais importantes em áreas canavieiras e de reflorestamentos, principalmente devido a sua elevada agressividade, intensa capacidade de produção e longevidade de sementes (da COSTA et al., 2002). Igualmente, *Euphorbia heterophylla* L. (amendoim-bravo) é uma planta daninha conhecida por causar consideráveis perdas na produtividade de sistemas agrícolas, como tem sido verificado para cultura de soja (CARVALHO et al., 2010). Além disso, é considerada de difícil controle, sendo resistente a herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS) e a protoporfirinogênio oxidase (Protox) (TREZZI et al., 2009).

Neste contexto, o objetivo do estudo foi avaliar o potencial fitotóxico de frações do extrato bruto de raízes e folhas de *D. brasiliensis* sobre a germinação e crescimento de plântulas de capim-colonião e amendoim-bravo, assim como a influência sobre o crescimento das células do metaxilema em raízes de plântulas de amendoim-bravo.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Raízes e folhas de *Drimys brasiliensis* subsp. *brasiliensis* foram coletadas de indivíduos ocorrentes na área de reserva de cerrado “*sensu strictu*” pertencente à Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), estado de São Paulo (21° 58' a 22°00' S e 47°51' a 47°52' W), em agosto de 2010. Um voucher da espécie está depositado no herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos, com o número de registro 8339. Após a coleta, as raízes foram lavadas em água corrente, para eliminação de impurezas, e secas em estufa de circulação forçada de ar a 40 °C, por 120 horas. As folhas foram secas em estufa de circulação, por 72 horas. Após secagem, os materiais foram triturados em moinho industrial, pesados, embalados a vácuo em sacos plásticos e armazenados a 4 °C de temperatura, até a realização dos experimentos.

Preparo das frações químicas

A extração e partição inicial das substâncias presentes em raízes de *D. brasiliensis* foram realizadas com base na metodologia proposta por Rangel et al. (2001). Inicialmente, 50 g de pó das raízes e folhas, separadamente, foram submetidos à extração exaustiva com Diclorometano (CH_2Cl_2)/Metanol (MeOH) (1:1) (5 x 200 mL). O extrato resultante, de cada órgão, foi filtrado a vácuo, utilizando-se papel de filtro em funil de Buchner, reunido e concentrado. Cada extrato bruto concentrado foi suspenso em MeOH 95 % (200 mL) e particionado com n-hexano (3 x 200 mL), resultando nas frações metanólica e hexânica. A fração metanólica foi concentrada, suspensa em água destilada (200 mL) e submetida a partição com acetato de etila (3 x 200 mL), obtendo-se duas frações: acetato de etila (AcOEt) e a aquosa. Ao final, as frações aquosas, de ambos os órgãos, foram descartadas e as frações hexânicas e AcOEt foram evaporadas até a secura, pesadas e submetidas aos bioensaios de fitotoxicidade.

Bioensaios de Fitotoxicidade

Em cada bioensaio foram utilizados 40 mg de cada fração das folhas e raízes (hexânica e AcOEt), solubilizadas em 40 mL de solução tampão (10 mM de ácido 2-[N-morfolino] etanossulfônico (MES) e 1M de NaOH, pH = 6) e dimetilsulfóxido (DMSO) (5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de tampão), resultando na concentração inicial de 1 mg mL^{-1} . A partir desta solução, foram feitas diluições para as concentrações de 0,125; 0,25 e 0,5 mg mL^{-1} , mantendo-se sempre constante a proporção de DMSO. Para cada teste também foi realizado um controle com solução tampão e DMSO (5 $\mu\text{L mL}^{-1}$) (MACÍAS et al., 2010, modificado)

Bioensaios de germinação - Sementes das espécies infestantes foram distribuídas em placas de Petri de 90 mm de diâmetro, contendo duas folhas de papel filtro qualitativo (80 g/m^2), umedecidas com 5 mL das soluções das frações e com o controle, separadamente. O delineamento experimental foi totalmente casualizado, com 4 repetições de 25 sementes das espécies-alvo por tratamento. O experimento foi instalado em câmara de germinação tipo BOD, com alternância de temperatura de 20-30 °C e fotoperíodo de 16-8 h (TOMAZ et al., 2010) para capim-colonião, e a 25 °C e fotoperíodo de 12 h para amendoim-bravo (INOUE et al., 2010). O registro do número de sementes germinadas foi realizado diariamente, com eliminação das sementes germinadas, sendo o critério da avaliação a protrusão de qualquer parte do embrião. Ao final, foram avaliados a

germinabilidade, o tempo médio e a sincronia de germinação, de acordo com Ranal & Santana (2006).

Bioensaios de crescimento - Sementes de cada uma das espécies-alvo foram pré-germinadas, em água destilada, nas mesmas condições citadas para o bioensaio de germinação. Quatro repetições de 10 sementes pré germinadas (com radícula entre 2 e 4 mm de comprimento), foram transferidas para caixas plásticas transparentes (8 x 12 x 3 cm), contendo duas folhas de papel de filtro, umedecidas com 5 mL de cada solução e o controle. Especificamente para este teste, foi realizado um bioensaio com o herbicida comercial oxyfluorfen (240 g L^{-1}), nas mesmas concentrações que as soluções das frações químicas. As caixas foram mantidas em câmara B.O.D, nas mesmas condições de luz e temperaturas adotadas para o teste de germinação, em delineamento experimental totalmente casualizado. Decorridos sete dias do transplante, foram avaliados o comprimento da parte aérea, da raiz primária, e a presença de anomalias (GRISI et al., 2011). As plântulas foram classificadas em normais e anormais, de acordo com Brasil (2009).

Efeito sobre células do metaxilema - Plântulas de amendoim-bravo cresceram nas soluções das frações de folhas e raízes de *D. brasiliensis* e no controle, nas mesmas condições adotadas para o bioensaio de crescimento. Foram testadas as concentrações até $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$. Decorridos cinco dias da instalação do experimento, as plântulas foram retiradas das caixas e, com auxílio de um estilete, foi removido o segmento da raiz primária que foi imerso, imediatamente, em álcool 70 %.

A coloração foi realizada de acordo com o método de Fuchs modificado (KRAUS & ARDUIN, 1997). As raízes ficaram imersas em álcool (70 %) durante cinco dias, sendo depois colocadas em solução de soda cáustica (NaOH a 25 %), em estufa regulada a $60 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 48 horas, período em que foi observada a clarificação do material.

Em seguida, o material clarificado foi colocado em um recipiente contendo safranina ($\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{C}_1$) e soda cáustica (NaOH a 10 %), e transferidas para estufa, a $60 \text{ }^\circ\text{C}$, por 24 horas. Após a coloração, o material foi fixado em lâminas de vidro com xarope Apathy para observação em microscópio óptico (Olympus-BX41), acoplado com câmara fotográfica (Sony CCD-IRIS). Foram utilizadas quatro repetições de raízes primárias crescidas na diferentes concentrações das soluções das frações químicas de folhas e raízes de *D. brasiliensis*, e no controle. De cada raiz foi fotografado 50 % de seu comprimento total, da região central em direção ao colo (GATTI et al., 2010), no aumento de 20 vezes.

De cada fotografia foram medidas até 10 células centrais do metaxilema, utilizando-se o programa Image Pro-Plus 5.0.

Análises estatísticas

Os dados obtidos para os parâmetros avaliados em cada bioensaio foram submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade (Levene). Quando essas duas pressuposições foram atendidas, foi aplicada a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey ou Dunnett, a 0,05 de probabilidade. A falta de normalidade ou homogeneidade (ou ambas) levou à realização do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Para os bioensaios de germinação e crescimento, quando o resultado da ANOVA foi significativo, procedeu-se à regressão linear ou quadrática. O ajuste do modelo foi testado a 0,05 de significância e avaliado pelo seu coeficiente de determinação (R^2). No entanto, nos casos onde não foi possível o ajuste dos modelos (R^2 inferior a 0,70 %) ou quando os resultados não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos, os valores foram apresentados em tabela.

Foi realizada análise conjunta dos dados de crescimento inicial das plântulas submetidas aos efeitos das frações de folhas e raízes de *D. brasiliensis* e do herbicida comercial, uma vez que a razão entre o maior e o menor quadrado médio residual não foi superior a sete (PIMENTEL-GOMES, 1990).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Bioensaios de germinação e crescimento

As frações hexânica e AcOEt de raízes de *D. brasiliensis* exerceram efeito inibitório significativo em todos os parâmetros de germinação e crescimento avaliados em capim-colonião. As diferentes concentrações da fração AcOEt promoveram decréscimo linear na germinabilidade de 17 %, aumento linear no tempo médio de germinação de 1,57 dias e decréscimo linear na sincronia de germinação de 0,157 para cada 1 mg mL⁻¹ de solução adicionada. Sob a ação da fração hexânica, houve acréscimo linear no tempo médio de germinação de 2,56 dias para cada adição de 1 mg mL⁻¹ de solução e, as sementes atingiram valores mínimos de germinação (13,9 %) e sincronia (0,06) nas concentrações estimadas de 0,75 e 0,69 mg mL⁻¹, respectivamente (Figura 2.1).

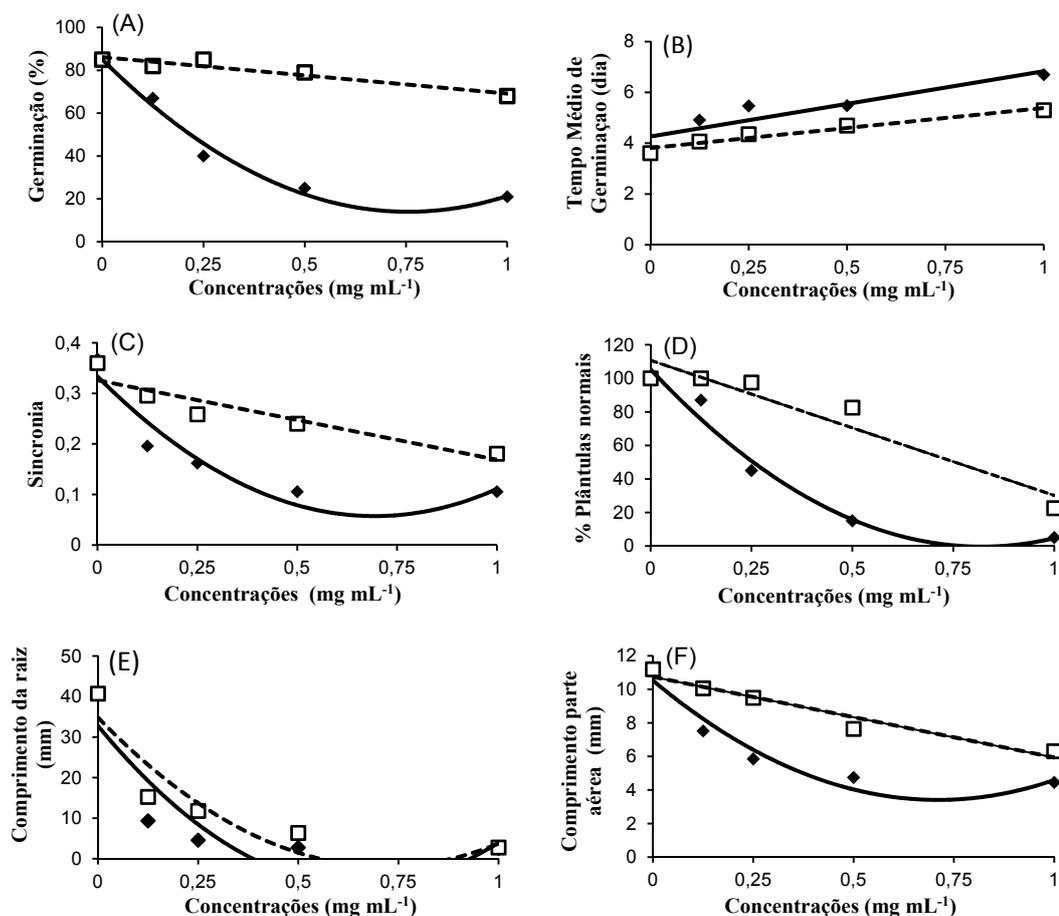


Figura 2.1- Germinação e crescimento de plântulas de capim-colônião submetidas aos efeitos das frações hexânica (♦; ___y) e AcOEt (□; ---y) de raízes de *D. brasiliensis*, em diferentes concentrações. Equações obtidas na análise de regressão: (A) $y = 86,17 - 17x$, $R^2 = 0,90$; $y = 85,09 - 0,188x + 0,0001x^2$, $R^2 = 0,99$; (B) $y = 3,80 + 1,575x$, $R^2 = 0,94$; $y = 4,26 + 2,56x$, $R^2 = 0,82$; (C) $y = 0,325 - 0,157x$, $R^2 = 0,87$; $y = 0,3336 - 0,7966x + 0,574x^2$, $R^2 = 0,91$; (D) $y = 110,599 - 80,5x$, $R^2 = 0,91$; $y = 105,35 - 257,85x - 157,14x^2$, $R^2 = 0,97$; (E) $y = 34,81 - 102,26x + 71,20x^2$, $R^2 = 0,85$; $y = 32,79 - 120,17x + 91,37x^2$, $R^2 = 0,78$; (F) $y = 10,74 - 4,805x$, $R^2 = 0,94$; $y = 10,52 - 20,04x + 14,10x^2$, $R^2 = 0,94$.

As frações do extrato de raízes foram eficientes para inibir o crescimento e alterar a morfologia de plântulas de capim-colônião. A porcentagem de plântulas normais sofreu redução linear de 80,5 % para cada 1 mg mL⁻¹ de solução da fração AcOEt adicionada e, sob o efeito da fração hexânica, a porcentagem foi nula a partir da concentração estimada de 0,81 mg mL⁻¹. O crescimento da raiz de plântulas submetidas aos efeitos da fração hexânica e AcOEt foi nulo a partir das concentrações estimadas de 0,65 e 0,71 mg mL⁻¹, respectivamente. Para o crescimento da parte aérea, observou-se decréscimo linear de 4,80 mm para cada adição de 1 mg mL⁻¹ de solução da fração AcOEt, e comprimento mínimo (3,40) sob a ação da concentração estimada de 0,71 mg mL⁻¹ de solução da fração hexânica (Figura 2.1).

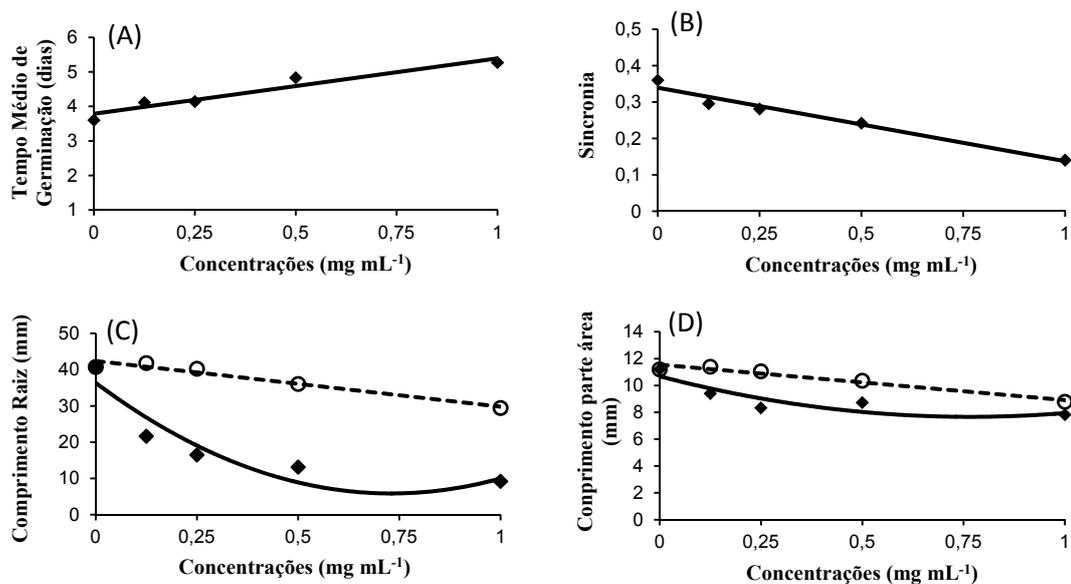


Figura 2.2 - Germinação e crescimento de plântulas de capim-colonião submetidas ao efeito das frações hexânica (◆; —y') e AcOEt (○; ---y) de folhas de *D. brasiliensis*, em diferentes concentrações. Equações obtidas na análise de regressão: (A) $y = 3,788 - 1,604x$, $R^2 = 0,92$; (B) $y = 0,3394 - 0,2017x$, $R^2 = 0,96$; (C) $y = 42,351 - 12,57x$, $R^2 = 0,95$; $y = 36,34 - 83,45x + 57,11x^2$, $R^2 = 0,88$; (D) $y = 11,544 - 2,636x$, $R^2 = 0,95$; $y = 10,685 - 7,8851x + 5,146x^2$, $R^2 = 0,79$.

Quando se avaliou os efeitos das frações hexânica e AcOEt provenientes do extrato bruto das folhas de *D. brasiliensis* na germinação e crescimento das espécies-alvo, observou-se inibição significativa somente para algumas características avaliadas em capim-colonião. As variáveis referentes ao processo de germinação das sementes submetidas aos efeitos de ambas as frações não apresentaram diferenças significativas entre as concentrações (Tabela 2.1), exceção feita ao tempo médio e sincronia de germinação de sementes submetidas aos efeitos da fração hexânica, em que houve aumento linear no tempo médio de 1,60 dias e decréscimo linear na sincronia de 0,2017 para cada 1 mg mL⁻¹ de solução adicionada (Figura 2.2).

O crescimento de capim-colonião foi sensível às frações do extrato da folha (Figura 2.2). Sob efeito da fração AcOEt, houve redução linear de 12,57 e 2,63 mm no crescimento radicular e da parte aérea, respectivamente, para cada adição de 1 mg mL⁻¹ de solução. Para a fração hexânica, o comprimento da parte aérea foi mínimo (7,65 mm) na concentração 0,76 mg mL⁻¹, enquanto para raiz o menor comprimento (5,86 mm) foi registrado na concentração estimada de 0,73 mg mL⁻¹. A porcentagem de plântulas normais não foi afetada significativamente pelas frações do extrato da folha (Tabela 2.1).

Tabela 2.1- Germinação de sementes e morfologia de plântulas de capim-colonião submetidas a ação de diferentes frações do extrato das folhas de *D. brasiliensis*, em diferentes concentrações.

Variáveis (unidades)	Concentrações (mg mL ⁻¹)					Estatística	
	0	0,125	0,25	0,5	1	F (P)	H (P)
Fração Hexânica das folhas							
G (%)	85 ± 7,5 a	78 ± 9,5 a	78 ± 9,5 a	80 ± 8,64 a	79 ± 4,6 a	0,487 (0,745)	
PN (%)	100 ± 0 a	97 ± 5 a	80 ± 7 a	77 ± 11 a	75 ± 10 a		11,39 (0,062)
Fração AcOEt das folhas							
G (%)	85 ± 7,57 a	81 ± 6,83 a	84 ± 4,61 a	84 ± 3,26 a	79 ± 8,24 a	0,618 (0,657)	
TMG (d)	3,6 ± 0,18 a	3,5 ± 0,25 a	3,72 ± 0,34 a	3,87 ± 0,37 a	3,88 ± 0,24 a	0,931 (0,472)	
Z	0,36 ± 0,02 a	0,43 ± 0,09 a	0,34 ± 0,08 a	0,34 ± 0,31 a	0,31 ± 0,08 a	0,897 (0,490)	
PN (%)	100 ± 0 a	100 ± 0 a	97,5 ± 5 a	95 ± 5,7 a	92,5 ± 7 a		3,875 (0,423)

Médias seguidas por letras iguais na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade; G: germinabilidade; TMG: tempo médio de germinação; Z: sincronia; PN: plântulas normais; F: estatística do teste F – valores não indicaram diferenças significativas entre as concentrações (ANOVA; P > 0,05); H: estatística do teste de Kruskal-Wallis – valores não indicaram diferença significativa entre as concentrações (P > 0,05); P: probabilidade.

As frações do extrato de raízes de *D. brasiliensis* não afetaram significativamente os parâmetros de germinação avaliados para as sementes de amendoim-bravo, com exceção da porcentagem de germinação sob a influência da fração hexânica, para qual foi observado percentual mínimo de germinação (32,6 %) na concentração estimada de 0,64 mg mL⁻¹ (Figura 2.3), e sobre o tempo médio de germinação na presença da fração AcOEt, em que não houve ajuste nos modelos de regressão; porém, na concentração de 1 mg mL⁻¹ foi observado o maior valor de tempo médio (2,02 dias) (Tabela 2.2).

Tabela 2.2- Germinação de sementes e morfologia de plântulas de amendoim-bravo submetidas a ação de diferentes frações do extrato das folhas e raízes de *D. brasiliensis*, em diferentes concentrações.

Variáveis (unidades)	Concentrações (mg mL ⁻¹)					Estatística	
	0	0,125	0,25	0,5	1	F (P)	H (P)
Fração Hexânica das Raízes							
TMG (d)	1,54 ± 0,14 a	1,65 ± 0,12 a	1,75 ± 0,25 a	1,81 ± 0,16 a	1,96 ± 0,16 a	2,051 (0,138)	
Z	0,46 ± 0,12 a	0,40 ± 0,03 a	0,40 ± 0,13 a	0,42 ± 0,18 a	0,37 ± 0,13 a	0,246 (0,907)	
Fração AcOEt das Raízes							
G (%)	53 ± 7,57 a	44 ± 8,64 a	50 ± 9,52 a	49 ± 3,83 a	43 ± 5,03 a	1,348 (0,298)	
TMG (d)	1,54 ± 0,28 a	1,75 ± 0,11 ab	1,83 ± 0,15 ab	1,89 ± 0,18 ab	2,02 ± 0,15 b	3,669 (0,028)	
Z	0,46 ± 0,12 a	0,33 ± 0,05 a	0,34 ± 0,05 a	0,37 ± 0,33 a	0,30 ± 0,08 a	2,492 (0,070)	
Fração Hexânica das Folhas							
G (%)	53 ± 7,57 a	52 ± 12,64 a	44 ± 6,53 a	56 ± 9,79 a	47 ± 13,21 a	0,878 (0,500)	
TMG (d)	1,54 ± 0,28 a	1,81 ± 0,16 a	1,77 ± 0,03 a	1,88 ± 0,19 a	1,93 ± 0,24 a	2,214 (0,117)	
Z	0,46 ± 0,12 a	0,34 ± 0,04 a	0,35 ± 0,03 a	0,37 ± 0,08 a	0,32 ± 0,06 a	1,976 (0,150)	
Fração AcOEt das Folhas							
G (%)	53 ± 7,57 a	49 ± 8,4 a	51 ± 16,97 a	40 ± 14,69 a	41 ± 12,80 a		3,731 (0,444)
TMG (d)	1,51 ± 0,28 a	1,66 ± 0,21 a	1,59 ± 0,02 a	1,64 ± 0,13 a	1,65 ± 0,03 a		1,758 (0,780)
Z	0,46 ± 0,12 a	0,44 ± 0,07 a	0,44 ± 0,05 a	0,36 ± 0,02 a	0,47 ± 0,06 a	1,260 (0,329)	
PN (%)	95 ± 5,77 a	77,5 ± 5 a	65 ± 10 a	65 ± 8 a	72,2 ± 7 a	2,827 (0,062)	

Médias seguidas por letras iguais na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade; G: germinabilidade; Z: sincronia; TMG: tempo médio de germinação; PN: plântulas normais; F: estatística do teste F – valores em negrito indicam diferença significativa entre as concentrações (ANOVA; P < 0,05); H: estatística do teste de Kruskal-Wallis; P: probabilidade.

No entanto, as frações do extrato das raízes exerceram forte efeito fitotóxico sobre a morfologia e crescimento das plântulas de amendoim-bravo. As plântulas apresentaram valores mínimos no comprimento da raiz (0 e 2,01 mm) nas concentrações estimadas de 0,66 e 0,79 mg mL⁻¹ das frações hexânica e AcOEt, respectivamente. Para o comprimento da parte aérea, na presença da AcOEt, o menor valor (23,39 mm) foi registrado na concentração estimada de 0,73 mg mL⁻¹; enquanto na presença da fração hexânica o menor comprimento (7,83 mm) foi encontrado na concentração estimada de 0,75 mg mL⁻¹. As plântulas normais de amendoim-bravo variaram de 95 % (controle) para 0 %, a partir das concentrações estimadas de 0,68 e 0,89 mg mL⁻¹ da fração hexânica e AcOEt, respectivamente (Figura 2.3).

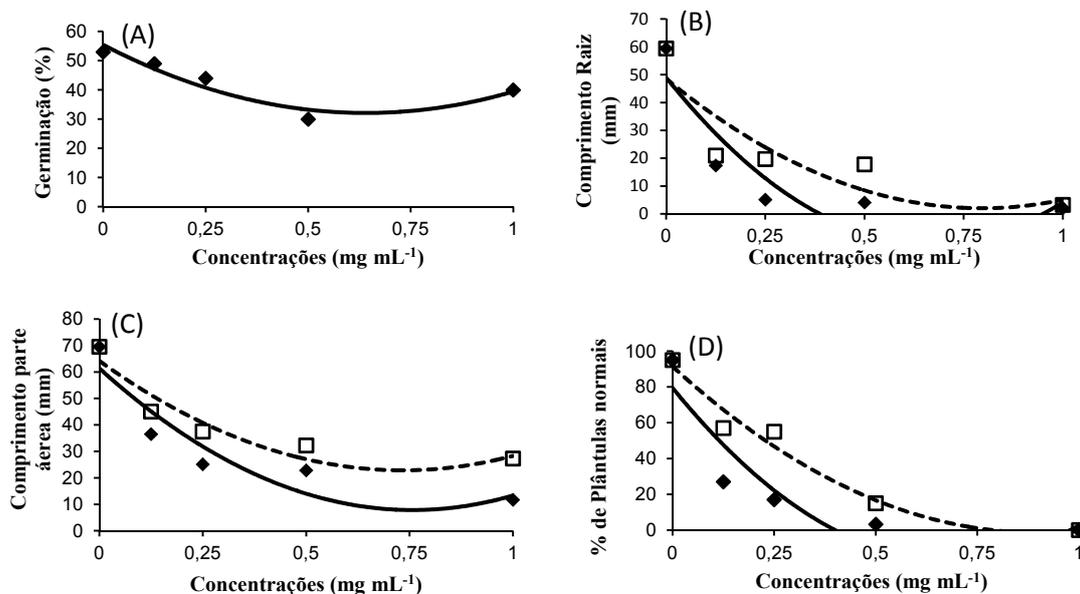


Figura 2.3 - Germinação e crescimento de plântulas de amendoim-bravo submetidas ao efeito das frações hexânica (◆; —y) e AcOEt (□; ---y) de raízes de *D. brasiliensis*, em diferentes concentrações. Equações obtidas na análise de regressão: (A) $y = 55,4 - 72,74x + 56,77x^2$, $R^2 = 0,90$; (B) $y = 48,55 - 116,95x + 73,488x^2$, $R^2 = 0,75$; $y = 49,002 - 177,97x + 133,08x^2$, $R^2 = 0,81$ (C) $y = 64,195 - 112,75x + 76,874x^2$, $R^2 = 0,90$; $y = 61,35 - 141,39x + 93,378x^2$, $R^2 = 0,80$; (D) $y = 91,35 - 0,207x + 0,0001x^2$, $R^2 = 0,96$; $y = 79,65 - 0,2823x + 0,0002x^2$, $R^2 = 0,85$.

As variáveis de germinação avaliadas em sementes de amendoim-bravo submetidas aos efeitos das frações do extrato das folhas de *D. brasiliensis* não apresentaram diferenças significativas entre as concentrações. Pode-se afirmar, então, que o extrato das folhas não apresentou efeito fitotóxico sobre a germinação dessa espécie (Tabela 2.2).

O crescimento de plântulas de amendoim-bravo, por sua vez, foi significativamente influenciado pelas frações das folhas. As frações hexânica e AcOEt ocasionaram valores mínimos de comprimento da parte aérea de 32,9 e 35,7 mm nas concentrações estimadas de 0,87 e 0,73 mg mL⁻¹, respectivamente. Para o comprimento radicular, sob a influência da fração hexânica, foi observado decréscimo linear de 48,26 mm para cada adição de 1 mg mL⁻¹ de solução e, para a fração AcOEt, o comprimento mínimo (25,15 mm) foi observado na concentração estimada de 0,71 mg mL⁻¹. Na avaliação morfológica das plântulas, observou-se efeito somente da fração hexânica, com redução linear de 59,9 % de plântulas normais para cada 1 mg mL⁻¹ de solução adicionada (Figura 2.4).

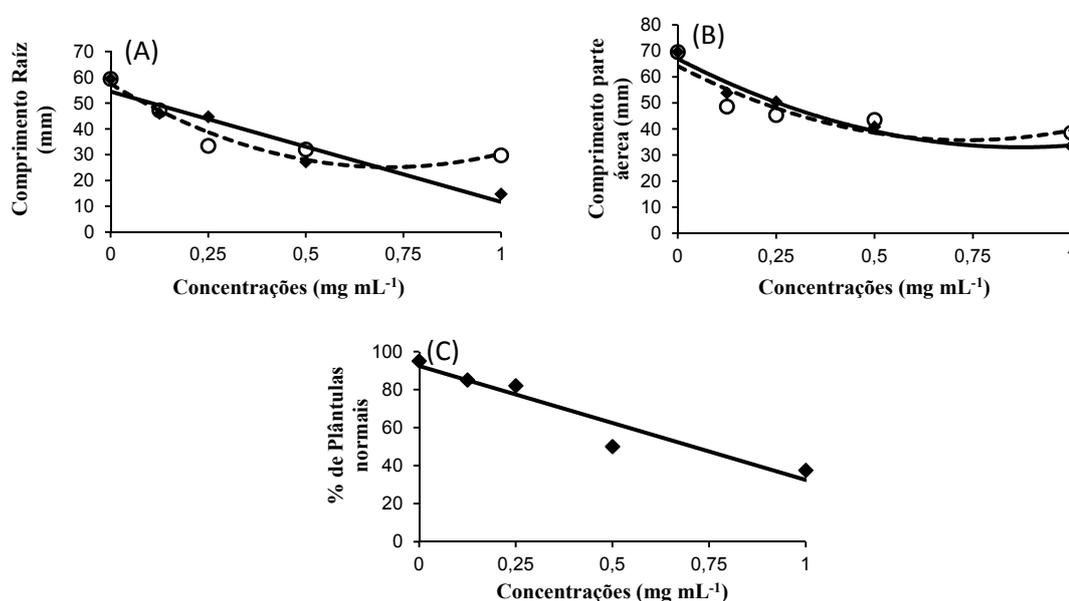


Figura 2.4 - Crescimento de plantulas de amendoim-bravo submetido ao efeito das frações hexânica (◆; —y') e AcOEt (○; ---y) de folhas de *D. brasiliensis*, em diferentes concentrações. Equações obtidas na análise de regressão: (A) $y = 57,46 - 90,68x + 63,63x^2$, $R^2 = 0,92$; $y = 54,467 - 42,826x$, $R^2 = 0,93$; (B) $y = 64,157 - 77,79x + 53,165x^2$, $R^2 = 0,81$; $y = 66,937 - 77,826x + 44,59x^2$, $R^2 = 0,96$ (C) $y = 92,363 - 59,9x$, $R^2 = 0,91$.

As frações dos extratos de raízes e folhas de *D. brasiliensis* apresentaram potencial alelopático sobre capim-colonião e amendoim-bravo para a maioria das características avaliadas, com resultados de inibição associados positivamente com aumento da concentração. O efeito alelopático depende da concentração dos extratos, das espécies alvo, e dos tecidos da planta de onde os aleloquímicos foram extraídos (SOUZA FILHO et al., 2010; HAO et al., 2007; GNIAZDOWSKA & BOGATEK, 2005). Em termos de concentrações efetivas de extratos de plantas para o controle de espécies invasoras de

sistemas agrícolas, estudos prévios tem apontado concentrações que variam de 0,1 até 100 mg mL⁻¹ (GRISI et al., 2012; TEERARAK et al., 2012; ZAPATA et al., 2011). Para as características avaliadas nas duas espécies de plantas daninhas sob a ação das frações dos extratos de *D. brasiliensis*, as reduções máximas ocorreram em concentrações estimadas de até 1 mg mL⁻¹. Assim, levando em consideração os resultados destes estudos anteriores, as concentrações efetivas avaliadas no presente trabalho podem ser consideradas baixas, o que indica o potencial de *D. brasiliensis* como espécie doadora de compostos com alto potencial fitotóxico para as espécies estudadas.

As frações dos extratos de folhas e raízes de *D. brasiliensis* mostraram maior especificidade para inibir o crescimento das plântulas do que a germinação das sementes das espécies infestantes. Em geral, espécies com sementes pequenas são mais sensíveis aos compostos alelopáticos do que espécies com sementes grandes (BURGOS & TALBERT, 2000). Plantas daninhas com sementes grandes tendem a serem menos sensíveis à ação de aleloquímicos, como o sorgoleone, porque essas plantas podem evitar o efeito fitotóxico devido a uma menor absorção e translocação ou degradação mais rápida das fitotoxinas (DAYAN, 2006).

Neste trabalho, observou-se que a germinação de sementes de amendoim-bravo foi menos sensíveis aos efeitos das frações de *D. brasiliensis* do que as sementes de capim-colonião. As sementes de amendoim-bravo são maiores que as de capim-colonião e, assim, pode-se inferir que as sementes dessa espécie são mais tolerantes aos aleloquímicos do que as sementes da gramínea. O tamanho das sementes por si só não explica a tolerância de algumas espécies aos aleloquímicos, uma vez que, da mesma forma que ocorre com os herbicidas comerciais, a capacidade diferencial de uma espécie para desintoxicar o composto pode contribuir para a sua tolerância (BURGOS et al., 2004). A tolerância de sementes de amendoim-bravo aos efeitos alelopáticos de plantas já foi observada por Inoue et al. (2010), que verificaram que esteróides glicosilados provenientes das sementes de *Annona crassiflora* não proporcionaram inibição na germinação desta espécie. Da mesma forma, Kern et al. (2009) apontam que sementes de amendoim-bravo exibiram resistência a alguns aleloquímicos conhecidos, tais como quercetina, cumarina, ácido ferúlico, ácido vanílico e eucaliptol.

As frações químicas de *D. brasiliensis* ocasionaram forte efeito inibitório sobre o crescimento das plântulas de amendoim-bravo e capim-colonião. Em geral, a raiz das espécies alvo foi o órgão mais sensível aos efeitos inibitórios das frações, conforme já

registrado previamente em outros trabalhos (INOUE et al., 2010; SOUZA FILHO et al., 2010, GATTI et al., 2010; GRISI et al., 2012; TEERARAK et al., 2012). Souza Filho e Duarte (2007) discutem que, independente da espécie receptora e da concentração, as inibições promovidas sobre o desenvolvimento da raiz são um dos principais fatores que indicam sensibilidade da planta aos efeitos dos aleloquímicos, principalmente durante o desenvolvimento inicial da plântula, que é caracterizado por alto metabolismo e sensibilidade ao estresse ambiental (CRUZ-ORTEGA et al., 1998).

Autores como Gniazdowska e Bogatek (2005) e Lupini et al. (2010), sugerem um efeito mais visível sobre as raízes devido ao contato mais íntimo destas com a solução de aleloquímicos do solo. Além disso, o efeito observado sobre o desenvolvimento da raiz pode indicar um aspecto ecológico importante, uma vez que permite redução competitiva da planta invasora, favorecendo e permitindo a dominância das espécies vizinhas (PERES et al., 2004). As diferentes frações de *D. brasiliensis* induziram o aparecimento de anomalias no sistema radicular das espécies alvo, o que resultou em baixo percentual de plântulas normais, para a maioria dos tratamentos. Modificações no crescimento e desenvolvimento radicular de plântulas em resposta a aleloquímicos podem ser explicadas por alterações na estrutura e ciclo celular, desintegração da coifa, aumento de diâmetro do cilindro vascular, antecipação da lignificação do metaxilema e da parede celular (SANTOS et al., 2008; SOLTYS et al., 2011).

Efeitos sobre as células do metaxilema em plântulas de amendoim-bravo

O estudo anatômico em raízes de plântulas de amendoim-bravo possibilitou uma melhor visualização dos efeitos fitotóxicos das diferentes frações em nível celular. As raízes de plântulas de amendoim-bravo que cresceram na presença das frações hexânica e AcOEt do extrato das raízes de *D. brasiliensis* apresentaram reduções mais expressivas no tamanho médio das células do metaxilema, quando comparadas com as que cresceram sob a influência das frações do extrato das folhas e do controle (Figuras 2.5 e 2.6).

O tamanho médio das células que cresceram na presença do controle foi de 445,64 μm . Já as plântulas que cresceram na presença das frações do extrato das raízes apresentaram valores médios no tamanho das células 50 % menores do que as células expostas ao controle. O tamanho médio mínimo das células (100,20 μm) foi observado para a concentração de 0,25 mg mL^{-1} da fração hexânica do extrato das raízes. Não foi possível realizar as medições na concentração de 0,5 mg mL^{-1} da fração hexânica das raízes, uma vez

que não ocorreu crescimento da raiz e nem formação do metaxilema nessa condição (Figura 2.5).

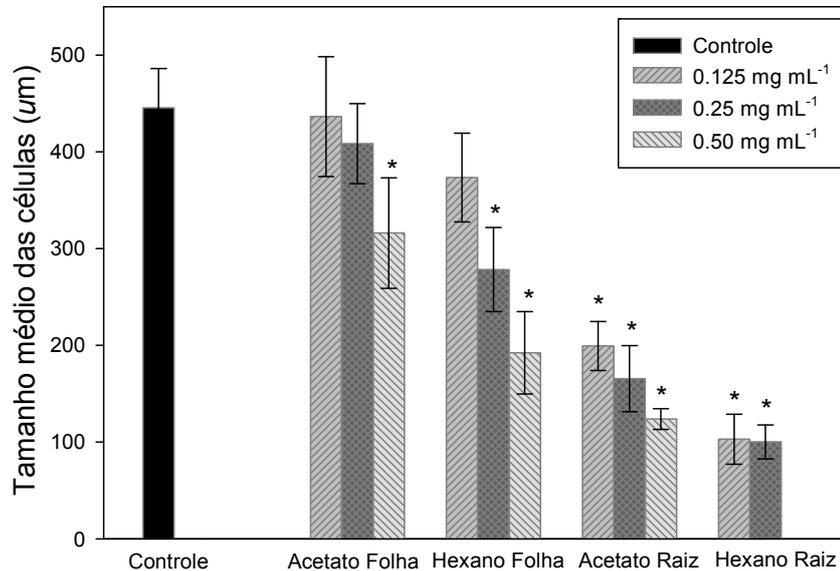


Figura 2.5 - Tamanho médio das células do metaxilema de raízes de plântulas de amendoim-bravo crescidas em diferentes concentrações das frações hexânicas e AcOEt de folhas e raízes de *D. brasiliensis*, e do controle. (*) Média difere significativamente do controle pelo teste de Dunnet, a 0,05 de probabilidade.

Assim, a fração hexânica das raízes de *D. brasiliensis* inibiu o crescimento das raízes de plântulas de amendoim-bravo com maior intensidade, indicando que esta inibição pode estar associada com a diminuição no alongamento das células do metaxilema. Este resultado está de acordo com o apresentado por Gatti et al. (2010), que investigaram o efeito de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* sobre o desenvolvimento das células do metaxilema em raízes de plântulas de gergelim. Os autores discutem que a provável interferência de aleloquímicos na redução do tamanho das células pode estar associada a alterações na concentração de fitormônios.

A auxina é o principal fitormônio que controla a divisão, a expansão e a diferenciação de células (PERROT-RECHENMANN, 2010), e tem uma profunda influência em aspectos da morfologia e crescimento da raiz (STRADER et al., 2010), assim como no controle da diferenciação e crescimento dos tecidos vasculares primários da raiz, o proto e o metaxilema (ALONI et al., 2006). Assim, as alterações no crescimento celular provocadas pela ação de um aleloquímico podem ser resultado da interferência na ação desse hormônio.

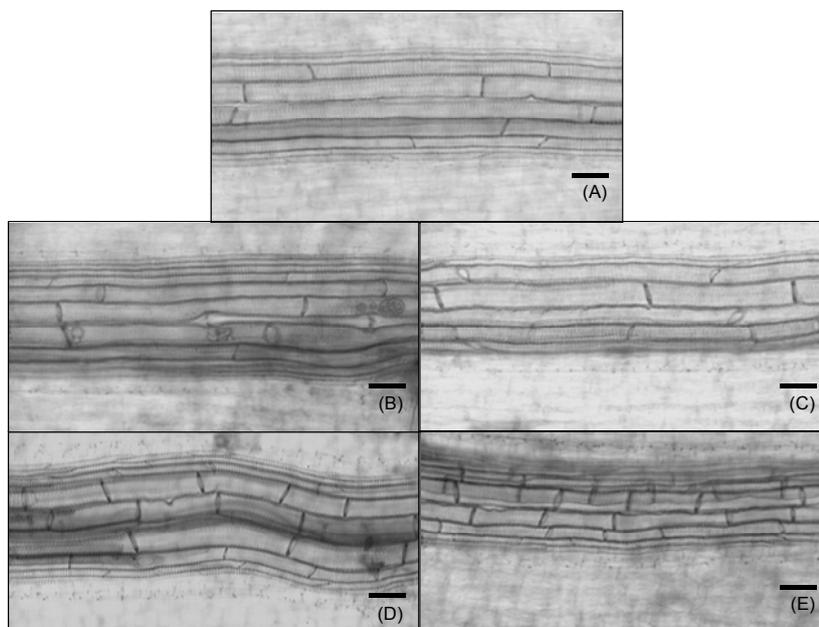


Figura 2.6 - Fotomicrografias de células do metaxilema em raízes de plântulas de amendoim-bravo crescidas no controle (A), e na concentração de $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ das frações AcOEt das folhas (B), hexânica das folhas (C), AcOEt das raízes (D) e hexânica das raízes (E) de *D. brasiliensis*. Escala = $50 \mu\text{m}$.

Análise conjunta para os dados de crescimento

Por meio da análise conjunta foi possível comparar os resultados de crescimento obtidos a partir das frações químicas dos dois órgãos de *D. brasiliensis*, e do herbicida. Para o amendoim-bravo, observou-se que a fração hexânica e AcOEt das raízes foram igualmente eficientes para inibir o crescimento radicular, apresentando maior atividade do que a observada para o herbicida comercial ou para as frações de folhas. Da mesma forma, para o capim-colonião, as frações das raízes ocasionaram efeitos inibitórios similares sobre o crescimento radicular; porém, a fração hexânica não diferiu estatisticamente do herbicida comercial, demonstrando a eficiência da mesma no controle de crescimento das espécies infestantes (Figura 2.7 A). Na avaliação do crescimento da parte aérea das duas espécies infestantes, o herbicida comercial exerceu maior efeito fitotóxico em comparação às frações químicas. No entanto, entre as frações, a hexânica das raízes apresentou o maior potencial inibitório para ambas as espécies (Figura 2.7 B).

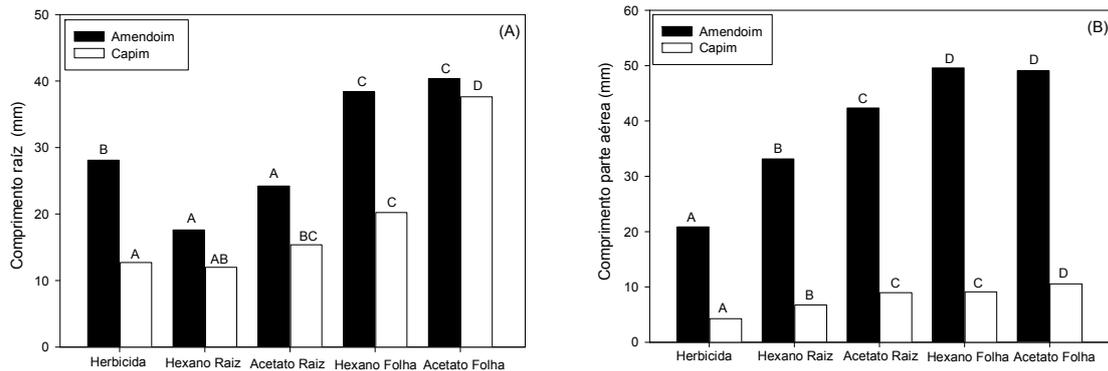


Figura 2.7 - Comprimento da raiz (A) e parte aérea (B) de plântulas de amendoim-bravo e capim-colonião submetidas à ação das frações hexânicas e AcOEt de folhas e raízes de *D. brasiliensis*, e do herbicida oxyfluorfen. Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, dentro de cada espécie, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 0,05 de probabilidade.

Assim, as frações provenientes do extrato bruto das raízes de *D. brasiliensis*, especialmente a fração hexânica, apresentaram maior atividade fitotóxica sobre o crescimento das espécies alvo do que as frações provenientes das folhas. Esse resultado corrobora outros estudos que demonstraram que o nível de toxicidade varia em função do órgão da planta a partir do qual os aleloquímicos são extraídos. As raízes constituíram-se a principal fonte de fitotoxinas nas espécies *Bauhinia guianensis* e *Parkia pendula* (MOURÃO-JUNIOR & SOUZA FILHO, 2010). Ao contrário, *Eragrostis plana* (FAVARETTO et al., 2011) e *Eucalyptus sp.* (ZHANG et al., 2010) mostraram maior atividade nas folhas. Diferenças nos efeitos alelopáticos dos extratos de folhas e raízes podem resultar de diferenças na concentração dos aleloquímicos, composição química ou alcalinidade diferenciada (DORNING & CIPOLLINI, 2006). Muitos compostos são sintetizados diretamente nas raízes e exsudados diretamente no ambiente, sem serem detectados nas partes aéreas. Devido essa especificidade de síntese, muitos compostos com atividades biológicas promissoras têm sido isolados quase de maneira exclusiva em raízes (OLIVEROS-BASTIDAS et al., 2009).

Por meio da análise conjunta e dos resultados de anatomia, pôde-se observar variações na atividade fitotóxica das frações de *D. brasiliensis* em função da polaridade dos solventes utilizados na extração. Para ambos os órgãos, as frações obtidas com o solvente n-hexano apresentaram maior atividade inibitória, o que demonstra que as substâncias com potencial alelopático presentes em *D. brasiliensis* são apolares. Em três espécies do gênero *Copaifera*, Souza Filho et al. (2010) encontraram diferenças na

intensidade dos efeitos fitotóxicos em função da polaridade das substâncias envolvidas, sendo as apolares com alta expressão sobre o desenvolvimento radicular de plantas infestantes.

Classes de compostos com baixa polaridade, oriundos da extração com n-hexano, como os monoterpenos, monoterpenos oxigenados e sesquiterpenos são relatadas pela alta atividade biológica (NISHIDA et al., 2005; ZAPATA et al., 2009; DURAI PANDIYAN et al., 2012). Entre os compostos com baixa polaridade mais abundantes em espécies do gênero *Drimys* destacam-se os sesquiterpenos do grupo drimanos (MALHEIROS et al., 2005; RODRÍGUES et al., 2005, ZAPATA et al., 2009). Essa classe de compostos possui um amplo espectro de atividades biológicas, e parecem desempenhar um importante papel no mecanismo de defesa das plantas (JANSEN & GROOT, 2004).

Contudo, a presença de sesquiterpenos, particularmente em raízes de *D. brasiliensis*, ainda precisa ser determinada. Diante do alto potencial bioherbicida de *D. brasiliensis*, observado no presente trabalho, acreditamos que compostos sesquiterpenos possam estar envolvidos. Nesse sentido, a presente pesquisa constitui num ponto de partida para purificação e caracterização dos compostos responsáveis pelas atividades fitotóxicas ocasionadas pela fração hexânica das raízes de *D. brasiliensis*. A identificação dessas fitotoxinas poderá contribuir para um melhor entendimento do potencial alelopático de *D. Brasiliensis*, além de oferecer possibilidades interessantes para o controle de espécies infestantes em condições de campo, baseado em produtos naturais.

CONCLUSÕES

D. brasiliensis apresentou atividade fitotóxica sobre amendoim-bravo e capim-colonião. A fração hexânica das raízes apresentou grande potencial para inibir todas as características avaliadas, especialmente o crescimento radicular das espécies alvo.

As células do metaxilema de raízes de plântulas de amendoim-bravo expostas as frações das raízes foram 50 % menores do que as células expostas ao controle.

A inibição do crescimento inicial na presença da fração hexânica de raízes foi similar ao efeito produzido pelo herbicida oxyfluorfen, indicando o potencial de *D. brasiliensis* para o controle das espécies infestantes estudadas.

REFERÊNCIAS

- ALONI, R. ALONI, E.; LANGHANS, M.; ULLRICH, C.I. Role of cytokinin 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.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399 p.
- BURGOS, N. R.; TALBERT, R. E.; KIM, K. S.; KUK, Y. I. Growth inhibition and root ultrastructure of cucumber seedlings exposed to allelochemicals from rye (*Secale cereale*). **Journal of Chemical Ecology**, v. 30, p. 671-689, 2004.
- BURGOS, N. R.; TALBERT, R. E. Differential activity of allelochemicals from *Secale cereal* in seedling bioassays. **Weed Science**, v. 48, p. 302-310, 2000.
- 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.
- CORRÊA, D.S.; TEMPONE, A.G.; REIMÃO, J.Q.; TANIWAKI, N.N.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O.F.; SARTORELLI, P.; MECCH, M.C.; LAGO, H.G. Anti-leishmanial and anti-trypanosomal potential of polygodial isolated from stem barks of *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae). **Parasitol Research**, v. 109, p. 231-236, 2011.
- CRUZ-ORTEGA, R.; ANAYA, A. L.; HERNANDEZ-BAUTISTA, B. E. & LAGUNA-HERNANDEZ, G. Effects of allelochemical stress produced by on seedling root ultrastructure of *Phaseolus vulgaris* and *Cucurbita ficifolia*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 24, p. 2039-2057, 1998.
- da 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.
- DAYAN, F. E. Factors modulating the levels of the allelochemical sorgoleone in *Sorghum bicolor*. **Planta**, v. 224, p. 339-346, 2006.
- DORNING, M.; CIPOLLINI, D. Leaf and root extracts of the invasive shrub, *Lonicera maackii*, inhibit seed germination of three herbs with no autotoxic effects. **Plant Ecology**, v. 184, p. 287-296, 2006.
- DURAI PANDIYAN, V.; AL-HARBI, N. A.; IGNACIMUTHU, S.; MUTHUKUMAR, C. Antimicrobial activity of sesquiterpene lactones isolated from traditional

medicinal plant, *Costus speciosus* (Koen ex. Retz.) Sm. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, p. 1-6, 2012.

EHRENDORFER, F., GOTTSBERGER, I. S., GOTTSBERGER, G. Variation on the population, racial, and species level in the primitive relic angiosperm genus *Drimys* (Winteraceae) in South America. **Plant Systematics and Evolution**, v. 132, p. 53-83, 1979.

FAROOQ, M.; ZAHID, K. J.; CHEEMA, A.; WAHID, A.; SIDDIQUE, K. H. M. The role of allelopathy in agricultural pest management. **Pest Management Science**, v. 67, p. 493-506, 2011.

FAVARETTO, F.; SCHEFFER-BASSO, S. M.; FELINI, V.; ZOCH, A. N.; CARNEIRO, C. M. Growth of white clover seedlings treated with aqueous extracts of leaf and root of tough lovegrass. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 40, p. 1168-1172, 2011.

GATTI, A. B.; FERREIRA, A. G.; ARDUIN, M.; PEREZ, S. C. J. G. A. Allelopathic effects of aqueous extracts of *Aristolochia esperanzae* O.Kuntze on development of *Sesamum indicum* L. seedlings. **Acta Botânica Brasileira**, v. 24, p. 454-461, 2010.

GNIAZDOWSKA, A.; BOGATEK, R. Allelopathic interactions between plants. Multi site action of allelochemicals. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 27, p. 395-407, 2005.

GRISI, P. U.; GUALTIERI, S. C. J.; RANAL, M. A.; SANTANA, D. G. Efeito alelopático do fruto de *Sapindus saponaria* na germinação e na morfologia de plântulas daninhas e de hortaliças. **Planta Daninha**, v. 29, p. 311-322, 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, p. 1-9, 2012.

HAO, Z. P.; WANG, Q.; CHRISTIE, P.; LI, X. L. Allelopathic potencial of watermelon tissues and root exudates. **Scientia Horticulturae**, v. 112, p. 315-320, 2007.

INDERJIT; WARDLE, D. A.; KARBAN, R.; CALLAWAY, R. M. The ecosystem and evolutionary contexts of allelopathy. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 26, p. 655-662, 2011.

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.

JANSEN, B.; GROOT, A. Occurrence, biological activity and synthesis of drimane sesquiterpenoids. **Natural Product Report**, v. 21, p. 449-477, 2004.

- LAGO, G.H.G.; CARVALHO, L.A.C.; da SILVA, F.S.; TOYAMA, D.O.; FÁVERO, O.A.; ROMOFF, P. Chemical Composition and Anti-Inflammatory Evaluation of Essential Oils from Leaves and Stem Barks from *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 1760-1765, 2010.
- 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.
- KERN, K. A.; PERGO, E. M.; KAGAMI, F. L.; ARRAES, L. S.; SERT, M. A.; ISHII-IWAMOTO, L. The phytotoxic effect of exogenous ethanol on *Euphorbia heterophylla* L. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, p. 1095-1101, 2009.
- KRAUS, J. E. & ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropedica, EDUR, 1997.
- MACÍAS, F. A.; LACRET, R.; VARELA, R.; NOGUEIRAS, C.; MOLINILLO, J. M. G. Isolation and phytotoxicity of terpenes from *Tectona grandis*. **Journal Chemical Ecology**, v. 36, p. 396-404, 2010.
- MALHEIROS, A.; CECHINEL FILHO, V.; SCHMITT, C.B.; YUNES, R.A.; ESCALANTE, A.; SVETAZ, L.; ZACCHINO, S.; MONACHE, F.D. Antifungal activity of drimane sesquiterpenes from *Drimys brasiliensis* using bioassayguided fractionation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8, p. 335-339, 2005.
- MOURÃO JÚNIOR, M.; SOUZA FILHO, A. P. S. Diferenças no padrão da atividade alelopática em espécies da família leguminosae. **Planta Daninha**, v. 28, p. 939-951, 2010.
- NISHIDA, N.; TAMOTSU, S.; NAGATA, N.; SAITO, C.; SAKAI, A. Allelopathic effects of volatile monoterpenoids produced by *Salvia leucophylla*: Inhibition of cell proliferation and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* seedlings. **Journal Chemical Ecology**, v. 31, p. 1187-2030, 2005
- OLIVEROS-BASTIDAS, A. J.; MACÍAS, F.A.; FERNÁNDEZ, C.C.; MARÍN, D.; MOLINILLO, J.M.G. Exudados dela raiz y su relevancia actual en las interacciones alelopáticas. **Química nova**, v. 32, n. 1, p. 198-213, 2009.
- PERES, M. T. L. P.; SILVA, L. B.; FACCENDA, O.; HESS, S. C. Potencial alelopático de espécies de Pteridaceae (Pteridophyta). **Acta Botanica Brasílica**, v. 18, p. 723-730, 2004.
- PERROT-RECHENMANN, C. Cellular Responses to Auxin: Division versus Expansion. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, p. 1-15, 2010.
- PIMENTEL-GOMES, F. P. **Curso de estatística experimental**. 13. ed. Piracicaba: Nobel, 1990.

- RANAL, M. A.; SANTANA, D. G. How and why to measure the germination process? **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, p. 1-11, 2006.
- RANGEL, M.; SANCTIS, B.; FREITAS, J.C.; POLATTO, J.M.; GRANATO, A.C.; BERLINCK, R.J.S.; HAJDU, R. Cytotoxic and neurotoxic activities in extracts of marine sponges Porifera from southeastern Brazilian coast. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 262, p. 31-40, 2001.
- RODRÍGUEZ, B.; ZAPATA, N.; MEDINA, P.; VINUELA, E. A complete ^1H and ^{13}C NMR data assignment for four drimane sesquiterpenoids isolated from *Drimys winterii*. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 43, p. 82-84, 2005.
- SANTOS, W. D.; FERRARESE, M. L. L.; NAKAMURA, C. C.; MOURÃO, K. S. M.; MANGOLIN, C. A.; FERRARESE-FILHO, O. Soybean (*Glycine max*) Root Lignification Induced by Ferulic Acid: The Possible Mode of Action. **Journal Chemical Ecology**, v. 34, p. 1230-1241, 2008.
- SILVEIRA, A. C. O.; CLAUDINO, V. D.; YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V.; MALHEIROS, A.; CORDOVA, C. M. M.; BELLA CRUZ, A. Antibacterial Activity and Toxicity of *Drimys brasiliensis*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 31, p. 935-40, 2012.
- 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.; GURGEL, E. S. C.; QUEIROZ, M. S. M.; SANTOS, J. U. M. Atividade alelopática de extratos brutos de três espécies de *Copaifera* (Leguminosae caesalpinioideae). **Planta Daninha**, v. 28, p. 743-751, 2010.
- SOUZA FILHO, A. P. S.; DUARTE, M. L. R. Atividade alelopática do filtrado de cultura produzido por *Fusarium solani*. **Planta Daninha**, v. 25, p. 227-230, 2007.
- STRADER, L. C.; CHEN, G. L.; BARTE, B. Ethylene directs auxin to control root cell expansion. **The Plant Journal**, v. 64, p. 874-884, 2010.
- TEERARAK, M.; LAOSINWATTANA, C.; CHAROENYING, P.; KATO-NOGUCHI, H. Allelopathic activities of *Jasminum officinale* f. var. *grandiflorum* (Linn.) Kob.: Inhibition effects on germination, seed imbibition, and α -amylase activity induction of *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 7850-7854, 2012.
- TOMAZ, C. A.; MARTINS, C. C.; CARVALHO, L. C.; NAKAGAWA, J. Duração do teste de germinação do capim-tanzânia. **Revista brasileira de Sementes**, v. 32, p. 80-87, 2010.
- TREZZI, M. M.; PORTES, E. D. S.; SILVA, H. L.; GUSTMAN, M. S.; DA SILVA, R. P.; FRANCHIN, E. Características morfofisiológicas de biótipos de *Euphorbia*

- heterophylla* com resistência a diferentes mecanismos de ação herbicida. **Planta Daninha**, v. 27, p. 1075-1082, 2009.
- 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.
- ZHANG, C.; FU, S. Allelopathic effects of leaf litter and live roots exudates of *Eucalyptus* species on crops. **Allelopathy Journal**, v. 26, p. 91-100, 2010.
- ZAPATA, N.; BUDIA, F.; VINUELA, E.; MEDINA, P. Antifeedant and growth inhibitory effects of extracts and drimanes of *Drimys winteri* stem bark against *Spodoptera littoralis* (Lep., Noctuidae). **Industrial Crops and Products**, v. 30, p. 119-125, 2009.
- ZAPATA, N.; VARGAS, M.; MEDINA, P. Actividad fitotóxica de un extracto n-hexano obtenido de la corteza de *Drimys winteri* sobre cuatro especies de malezas. **Planta Daninha**, v. 29, p. 323-331, 2011.
- WEIR, T. L.; PARK, S. W.; VIVANCO, J. M. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, p. 472-479, 2004.
- 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**, v. 23, p. 11-17, 2009.

CAPÍTULO 3

**Potencial herbicida de compostos bioativos
isolados de raíces de *Drimys brasiliensis* Miers**

POTENCIAL HERBICIDA DE COMPOSTOS BIOATIVOS ISOLADOS DE RAÍZES DE *Drimys brasiliensis* Miers

RESUMO

O objetivo deste estudo foi realizar o isolamento biomonitorado de compostos bioativos presentes nas raízes de *Drimys brasiliensis* Miers por meio de bioensaios com coleótilos de trigo, bem como a avaliar o efeito do composto mais ativo sobre a germinação e crescimento inicial das espécies *Barbarea verna* (Mill.), *Echinochloa crus-galli* (L.) e *Ipomoea grandifolia* (Dammer) O'Donell. Foram isolados quatro sesquiterpenos drimanos das frações bioativas de raízes de *D. brasiliensis*. A partir das análises de RMN de ^1H e ^{13}C e por comparação com dados espectrocópicos da literatura, os compostos foram determinados como poligodial, poligodial 12 α -acetal, dendocarbin L e (+) fuegin. Os quatro compostos isolados apresentaram atividade fitotóxica sobre coleótilos de trigo, na maior concentração avaliada (1 mM). Dentre estes, o poligodial manteve níveis elevados de atividade mesmo nas menores concentrações. O poligodial exerceu efeito fitotóxico sobre as espécies receptoras avaliadas, com maior especificidade para inibir o crescimento de plântulas, especialmente as raízes. A inibição ocasionada foi observada em nível celular nas raízes de *I. grandifolia*, com redução significativa no tamanho das células do metaxilema em todas as concentrações avaliadas. O poligodial, isolado pela primeira vez nas raízes de *D. brasiliensis*, pode ser o principal responsável pela atividade fitotóxica desta planta. Os resultados obtidos neste trabalho permitem a indicação deste composto como um potencial bioherbicida.

Palavras-chave: alelopatia, fitoxidade, sesquiterpenos drimanos, plantas daninhas.

ABSTRACT

The aim of this study was to perform the bioassay-guided isolation of bioactive compounds present in *D. brasiliensis* roots using wheat coleoptile bioassays, as well as assessing the effect of the most active compound on the germination and early growth of *Barbarea verna* (Mill.), *Echinochloa crus-galli* (L.) and *Ipomoea grandifolia* (Dammer) O'Donell. Four drimanes sesquiterpenes were isolated of bioactive fractions from roots of *D. brasiliensis*. Based on ^1H and ^{13}C NMR analysis and comparison with literature spectroscopic data, the compounds were determined as polygodial, polygodial 12 α -acetal,

dendocarbin L and (+) fuegin. The four isolated compounds showed phytotoxicity on wheat coleoptile, at the highest concentration (1mM). Among these, polygodial was active even at low concentrations. The polygodial caused phytotoxic effect on the target species evaluated, with greater specificity to inhibit root growth. The inhibition could be observed at the cellular level in *I. grandifolia* roots, with a significant reduction of the metaxylem cells size at all tested concentrations. The polygodial, isolated for the first time in *D. brasiliensis* roots, may be the primarily responsible for this plant phytotoxic activity. The results obtained in this study allow the indication of this compound as a potential bioherbicide

Keywords: allelopathy; phytotoxicity; drimanes sesquiterpenes, weeds, metaxylem.

INTRODUÇÃO

Como consequência de sua condição estática, as plantas desenvolveram estratégias evolutivas para enfrentar estresses bióticos e abióticos. Em particular, foi criado um complexo sistema de comunicação baseado em compostos químicos que, uma vez liberados no meio ambiente, são capazes de modificar direta ou indiretamente o crescimento e desenvolvimento de outras plantas, sendo este fenômeno conhecido como alelopatia (SCOGNAMIGLIO et al., 2012). Estes compostos são geralmente sintetizados nas plantas como metabólitos secundários, que além de atuarem como um fator ecológico regulador da composição e da dinâmica de comunidades vegetais, podem ser utilizados diretamente no controle de plantas daninhas, como fonte potencial para a formulação de herbicidas naturais (MACÍAS et al., 2008; KOUL & WALIA, 2009; ENS et al., 2009).

As plantas daninhas constituem um grande obstáculo para a produtividade de diferentes culturas agrícolas (KALINOVA et al., 2011), o que faz dos herbicidas sintéticos a classe de pesticidas mais utilizada (JARDIM et al., 2009). Porém, a utilização em larga escala tem trazido uma série de problemas ambientais, risco à saúde humana e indução de resistência de plantas infestantes (JABRAN et al., 2010). Fitotoxinas naturais derivadas de plantas podem representar uma alternativa ao uso de herbicidas sintéticos, com a vantagem de serem biodegradáveis, exibirem diversidade e complexidade estrutural, não apresentarem átomos halogenados, representarem menores riscos para organismos não-

alvo, apresentarem diversidade de sítios de ação e interações mais específicas com as plantas daninhas (KOUL & WALIA, 2009; FAROOK et al., 2011). Assim, a identificação de espécies vegetais com elevado potencial alelopático e, a caracterização de seus efeitos nocivos contra plantas daninhas é necessária para um melhor manejo dessas espécies dentro dos princípios da agricultura de base ecológica (KHALIQ et al., 2013).

Compostos naturais derivados de plantas são conhecidos por apresentarem diferentes modos de ação sobre o metabolismo de plantas receptoras e, é especificamente a combinação dos diferentes efeitos, em diferentes níveis, que torna a ação destas substâncias eficaz no controle de outras espécies (MORRISSEY, 2009). Modificações no crescimento e desenvolvimento de plantas em resposta aos aleloquímicos podem ser explicadas por modificações celulares, assim como por alterações em processos fisiológicos e bioquímicos. Por exemplo, as ações dos aleloquímicos ocasionam redução da expansão foliar e alongação radicular, reduzem taxas de fotossíntese e absorção de nutrientes, induzem peroxidação lipídica, afetam a atividade de certas enzimas, causam despolarização de membranas, alteram processos de lignificação da parede celular e níveis de hormônios (WEIR et al., 2004; SANTOS et al., 2008; GRANÃ et al., 2013).

O gênero *Drimys* (Winteraceae), atualmente inclui sete espécies distribuídas desde o estreito de Magalhães até o Sul do México (RODRÍGUEZ & QUEZADA, 2001). No Brasil ocorrem três espécies, *Drimys angustifolia* Miers, *D. brasiliensis* Miers e *D. roraimensis* (A.C.Sm.) Ehrend. & Gottsb. As duas primeiras têm abrangência geográfica nas regiões central e sul do País e a última na Amazônia (EHRENDORFER et al., 1979). Fitoquimicamente, as espécies do gênero *Drimys* são caracterizadas pela presença de mono e sesquiterpenóides (RODRÍGUES et al., 2005; LIMBERGER, et al., 2007; BRITO et al., 2008; MECCHI & LAGO, 2013). Os terpenóides constituem o grupo mais abundante e estruturalmente diverso de metabólitos secundários em plantas e desempenham um papel importante nas interações planta-inseto, planta-patógeno e planta-planta (CHENG et al., 2007).

A espécie *D. brasiliensis*, conhecida popularmente como casca-de-anta, ocorrente na mata Atlântica e também no domínio do Cerrado ao longo de florestas de galerias (EHRENDORFER et al., 1979), apresenta metabólitos secundários com diversas propriedades farmacológicas comprovadas cientificamente, incluindo antileishmanicida, antibacteriana, antifúngica, antiperalgésica e antinociceptiva. Entre os principais compostos isolados das cascas da espécie, responsáveis pelas atividades observadas, estão

os sesquiterpenos drimanos poligodial, drimaniol e 1- β -(p-metoxicinamil)-poligodial (MENDES et al., 1998; CECHINEL FILHO et al., 1998; MALHEIROS et al., 2005; SILVEIRA et al., 2012; CLAUDINO et al., 2013). Adicionalmente, o óleo essencial das folhas e cascas da espécie, composto principalmente por monoterpenos e sesquiterpenos, mostrou atividade acaricida e anti-inflamatória (RIBEIRO et al., 2008; LAGO et al., 2010). Em nossos estudos prévios, a fração hexânica das raízes de *D. brasiliensis* inibiu completamente o crescimento radicular das plantas daninhas *Euphorbia heterophylla* e *Panicum maximum*, na concentração de 1 mg mL⁻¹ (ANESE et al., 2013). Este resultado sugere que *D. brasiliensis* apresenta uma ou mais fitotoxinas naturais em suas raízes com elevado potencial fitotóxico o que, até então, não havia sido relatado para a espécie.

O presente trabalho foi realizado com objetivo de identificar metabólitos secundários em raízes de *D. brasiliensis* com potencial para atuar como herbicidas naturais. Para tanto, foram realizados (1) o isolamento biomonitorado de compostos bioativos presentes nas raízes da espécie, por meio de bioensaios com coleóptilos de trigo; e (2) a avaliação do efeito do composto mais ativo sobre a germinação e crescimento de plântulas das espécies *Barbarea verna* (Mill.), *Echinochloa crus-galli* (L.) e *Ipomoea grandifolia* (Dammer) O'Donell.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Material vegetal

Raízes de *Drimys brasiliensis* subsp. *brasiliensis* foram coletadas de indivíduos ocorrentes na área de reserva de cerrado “*sensu strictu*” pertencente à Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), estado de São Paulo (21° 58' a 22°00' S e 47°51' a 47°52' W), em agosto de 2010. Um voucher da espécie foi depositado no herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos, com o número de registro HUFSCar 8339. Após a coleta, as raízes inteiras foram lavadas em água corrente, para eliminação de impurezas, e secas em estufa de circulação forçada de ar a 40 °C, durante 120 h. Após secagem, foram trituradas em moinho industrial e, o pó resultante, foi embalado a vácuo, armazenado, até a realização dos experimentos.

2. Estudo fitoquímico

2.1 Extração inicial

Inicialmente, 100 g de pó das raízes foram submetidos à extração exaustiva com diclorometano (CH_2Cl_2)/metanol (MeOH) (1:1) (5 x 400 mL), durante 24 h, em temperatura de ambiente de laboratório. O extrato resultante, foi filtrado a vácuo, reunido e concentrado. O extrato bruto concentrado foi suspenso em MeOH 95 % (400 mL) e particionado com n-hexano (3 x 400 mL), resultando nas frações metanólica e hexânica. A fração metanólica foi concentrada, suspensa em água deionizada (400 mL) e submetida a partição com acetato de etila (3 x 400 mL), obtendo-se duas frações: acetato de etila (AcOEt) e a aquosa (adaptado de RANGEL et al., 2001; GALDOLFI et al., 2010). As frações hexânica (4,35 g) e acetato de etila (5,9 g) foram concentradas em baixa pressão, a 37 °C, em rotaevaporador e a fração aquosa (12,35 g) foi evaporada em sistema de centrífuga a vácuo Savant modelo Speedvac[®] Plus SC 210, até *secura*. Ao final, as três frações foram utilizadas em bioensaios com coleóptilos de trigo.

2.2 Purificação dos compostos bioativos da fração hexânica

Para o estudo da fração hexânica, 1 g de amostra foi submetido à separação cromatográfica em coluna pré-empacotada de sílica gel (10 g, Phenomenex[®] Strata[™]), eluída em gradiente de hexano/acetona (9,5:0,5; 9:1; 8,5:1,5; 8:2; 7:3; 6:4 v/v), acetona, acetona/metanol (1:1 v/v) e metanol. Foram coletadas 90 frações de 10 mL cada e, após análise e reunião monitorada com base no perfil de cromatografia de camada delgada (CCD), nove sub-frações (A-I) foram obtidas e suas atividades biológicas foram avaliadas sobre coleóptilos de trigo. A fração D (hexano/acetona, 9:1 v/v, 160 mg), apresentou elevada atividade inibitória e foi selecionada para purificação em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-UV) (coluna: Inertsil ODS-3, 250 x 4,6 mm, 5 μm ; eluente: gradiente de MeOH/MeCN (1:1) em H_2O ; fluxo: 1 mL/min; detecção: UV 204 nm), obtendo-se sete amostras (D1-D7). Após análises por RMN ^1H e ^{13}C e comparação com dados da literatura, as amostras D3 (86,4 mg) e D6 (11,3 mg) foram identificadas como os compostos **1** e **2**, respectivamente, e suas atividades biológicas foram investigadas em bioensaios de fitotoxicidade em coleóptilos de trigo e germinação e crescimento de diferentes espécies receptoras.

2.3 Purificações dos compostos bioativos da fração AcOEt

Parte da fração AcOEt (1g) foi aplicada em uma coluna cromatográfica (θ i 4,14 cm), empacotada com 30 g de sílica flash e eluída em gradiente de hexano/acetona (9,5:0,5; 9:1; 8,5:1,5; 8:2; 7:3; 6:4; 1:1; 2:8 v/v), acetona, acetona/metanol (8:2; 1:1 v/v) e metanol. Foram coletadas 60 frações de 20 mL cada. As frações que apresentaram similaridade a partir de análise em CCD foram reunidas, resultando em oito sub-frações (A-H). Estas sub-frações foram avaliadas em bioensaios com coleóptilos de trigo. A fração E (hexano/acetona, 6:4 v/v, 194 mg) mostrou efeito inibitório e apresentava um composto majoritário ainda impuro, sendo assim selecionada para purificação em CLAE-UV (coluna: Delta Pak, 300 x 7,8 mm, 15 μ m; eluente: gradiente de MeOH/MeCN (1:1) em H₂O; fluxo: 1,5 mL/min; detecção: UV 204 e 235 nm). Foram obtidas oito amostras (E1-E8). Após análises por RMN ¹H e ¹³C e comparação com dados da literatura, a amostra E2 (29,1 mg) foi identificada como uma mistura dos compostos **3** e **4** e avaliada quanto a bioatividade em coleóptilos de trigo.

2.4 Procedimentos experimentais gerais

As análises por CCD foram realizadas com placas de Silica gel Aldrich[®] (25 μ m, 60 Å, Sigma-Aldrich). As manchas foram visualizadas sob luz UV a 254 e 365 nm e reveladas com aplicação de solução etílica de ácido fosfomolibídico seguida de aquecimento a 120°C durante 5min.

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV) foi realizada utilizando-se equipamento Waters[®], modelo Controller 600, com bomba modelo 600 conectado a detector de UV-visível modelo 2487, em dois comprimentos de onda e, colunas de sílica gel derivatizadas com grupo octadecilcilano (C₁₈).

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram obtidos utilizando-se espectrômetro Bruker DRX 400 (9,4 Tesla), operando a 400 MHz na frequência do hidrogênio (¹H) e a 100 MHz na frequência do carbono (¹³C). O deslocamento químico é apresentado em ppm relativo ao sinal residual de ¹H e ¹³C do solvente utilizado (CDCl₃), utilizando-se como padrão de referência interna o tetrametilsilano (TMS). As análises de RMN foram realizadas em parceria com o Laboratório de RMN do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, sob a coordenação do Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira.

3. Bioensaios

3.1 Bioensaios com coleótilos de trigo

Aproximadamente 100 cariopses de trigo (*Triticum aestivum* L., cv. BRS 264) foram distribuídas em caixas gerbox, forradas com duas folhas de papel filtro e umedecidas com 10 mL de água destilada. As caixas foram acondicionadas em câmara de germinação B.O.D. durante 72 h, a $24 \pm 1^\circ\text{C}$, no escuro. Após este período, coleótilos das plântulas estioladas foram cortados em fragmentos de 4 mm, com a ajuda de uma guilhotina de Van der Veij, sob luz verde de segurança, para a utilização nos bioensaios (MACÍAS et al., 2010).

As frações e os compostos puros foram pré-solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) 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 2% de sacarose. As soluções contendo as frações foram testadas nas concentrações de 0,2, 0,4 e 0,8 mg/mL e, as soluções com os compostos isolados, em concentrações de 10 μM , 30 μM , 100 μM , 300 μM e 1mM. Foram mantidas concentração constantes de 5 $\mu\text{L/mL}$ de DMSO em cada concentração avaliada (MACÍAS et al., 2010). Cada tratamento foi testado em triplicata, com adição de 2 mL de cada solução em tubos de ensaio e cinco fragmentos de coleótilos de trigo em cada tubo. Dois controles foram realizados, um negativo com solução tampão e DMSO (5 $\mu\text{L/mL}$) e um positivo com o herbicida comercial GOAL[®] (ingrediente ativo oxyfluorfen = 240 g/L) solubilizado em solução tampão, nas mesmas concentrações avaliadas para as frações e compostos, e DMSO (5 $\mu\text{L/mL}$). Os tubos de ensaio foram tampados e mantidos em câmara B.O.D., a $24 \pm 1^\circ\text{C}$, no escuro, sob rotação constante (0,25 rpm). Após 24 h, os coleótilos foram retirados dos tubos, fotografados e medidos (MACÍAS et al., 2010; LACRET et al., 2011), utilizando o software Image-Pro Plus[®] 5.0.

3.2 Bioensaios de germinação e crescimento

Nestes experimentos, o composto **1** foi submetido à avaliação de atividade fitotóxica em três espécies receptoras, sendo duas infestantes de sistemas agrícolas: corda-de-viola (*Ipomoea grandifolia*, Convolvulaceae) e capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*, Poaceae); e uma considerada indicadora de efeitos alelopáticos: agrião-da-terra (*Barbarea verna*, Brassicaceae) (MACÍAS et al., 2000). O composto foi solubilizado em solução tampão (10 mM de ácido 2-[N-morfolino] etanossulfônico (MES) e 1M de NaOH, pH = 6)

e dimetilsulfóxido (DMSO) (5 µL/mL de tampão), em quantidades suficientes para obter as concentrações de 10 µM, 30 µM, 100 µM, 300 µM e 1mM. Também foi realizado um controle com solução tampão e DMSO (5 µL/mL) (MACÍAS et al., 2010; LACRET et al., 2011).

No bioensaio de germinação, diásporos das espécies receptoras foram distribuídas em placas de Petri de 4 cm de diâmetro, contendo uma folha de papel filtro qualitativo, umedecida com 1 mL das soluções do composto e com o controle, separadamente. As sementes da espécie *I. grandifolia* foram previamente escarificadas em uma solução concentrada de ácido sulfúrico, durante cinco minutos, e lavadas exaustivamente em água destilada (VOLL et al., 2010).

O delineamento experimental foi totalmente casualizado, com 4 repetições de 20 sementes por tratamento. O experimento foi instalado em câmara de germinação tipo B.O.D, a 25 °C e fotoperíodo de 12 h durante sete dias, para todas as espécies (GRISI et al., 2011; 2012). O critério de avaliação da germinação foi a protrusão de qualquer parte do embrião. Ao final, foi avaliada a germinabilidade, de acordo com Ranal e Santana (2006).

Para o bioensaio de crescimento, diásporos de cada uma das plantas receptoras foram pré-germinados, em água destilada, nas mesmas condições citadas para o bioensaio de germinação. Quatro repetições de 8 diásporos pré-germinados (raiz com 3 mm de comprimento), foram transferidos para placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo 1 folha de papel de filtro qualitativo, umedecida com 4 mL de cada concentração do composto e do controle, separadamente. As placas foram seladas e mantidas em câmara B.O.D, nas mesmas condições de luz e temperatura adotadas para o teste de germinação, em delineamento experimental totalmente casualizado. Decorridos cinco dias do transplante, foram avaliados o crescimento da parte aérea e da raiz primária.

Para avaliação de células do metaxilema, plântulas da espécie invasora *I. grandifolia*, selecionada para o teste, cresceram na presença do composto **1** e do controle, nas mesmas condições adotadas para o bioensaio de crescimento. Foram avaliadas concentrações desde 10 até 300 µM. Decorridos cinco dias da instalação do experimento, as plântulas foram retiradas das placas e, com auxílio de um estilete, foi removido o segmento da raiz primária que foi imerso, imediatamente, em álcool 70 %.

A coloração foi realizada de acordo com o método de Fuchs modificado (KRAUS & ARDUIN, 1997). As raízes ficaram imersas em álcool (70 %) durante cinco dias, sendo

depois colocadas em solução de soda cáustica (NaOH a 25 %), em estufa regulada a 60 °C, durante 48 h, período em que foi observado a clarificação do material.

O material clarificado foi colocado em um recipiente contendo safranina (C₂₀H₁₉N₄C₁) e soda cáustica (NaOH a 10 %), e transferido para estufa, a 60 °C, durante 24 h. Após a coloração, o material foi fixado em lâminas de vidro com xarope Apathy para observação em microscópio óptico (Olympus-BX41), acoplado com câmara fotográfica (Sony CCD-IRIS). Foram utilizadas quatro repetições de raízes primárias crescidas na diferentes concentrações das soluções do composto isolado e no controle. De cada raiz foi fotografado 50 % de seu comprimento total, da região central em direção ao colo, no aumento de 20 vezes. De cada fotografia foram medidas até 10 células centrais do metaxilema utilizando-se o programa Image Pro-Plus 5.0. (GATTI et al., 2010; ANESE et al., 2013).

4. *Análise estatística*

Os dados obtidos para os parâmetros biológicos avaliados foram submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade (Levene). Foi aplicada a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey (dados do metaxilema) e teste de Dunnett (demais parâmetros), ambos a 0,05 de probabilidade. Os dados são apresentados como porcentagem de inibição ou estímulo do crescimento e germinação em relação ao controle. Zero representa o controle, valores positivos implicam no estímulo do parâmetro analisado, e os negativos na inibição.

Os valores de CI₅₀ foram obtidos após o ajuste dos dados de fitotoxicidade das concentrações (escala logaritma) para uma curva dose-resposta sigmoideal, definida pela equação:

$$Y = Y_{\min} + \frac{Y_{\max} - Y_{\min}}{1 + 10^{\log EC_{50} - X}}$$

Onde X indica a logaritmo da concentração, Y indica a resposta (fitotoxicidade), e Y_{\max} e Y_{\min} são os valores máximos e mínimos da resposta, respectivamente. A qualidade do ajuste é descrita pelo coeficiente de determinação (r^2). O ajuste e os valores de r^2 foram obtidos com uso do programa GraphPad Prism 4.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As frações hexânica e AcOEt obtidas do extrato das raízes de *D. brasiliensis* apresentaram efeito sobre o crescimento dos coleóptilos estiolados de trigo (Figura 3.1). Os valores de inibição em relação ao controle, observados na concentração de 0,8 mg/mL, foram de -98 %, -90 % e -91 % para a fração hexânica, AcOEt e para o herbicida oxyfluorfen, respectivamente. O nível de atividade manteve-se elevado nas concentrações mais baixas avaliadas, para ambas as frações; no entanto, o mesmo não foi verificado para o herbicida. Não foi observado efeito inibitório da fração aquosa sobre os coleóptilos (Figura 3.1).

O bioteste com coleóptilos de trigo apresenta a vantagem de ser rápido e sensível a uma grande variedade de substâncias bioativas (CUTLER et al., 2000), incluindo reguladoras de crescimento de plantas e herbicidas (CUTLER et al., 1984). A elevada atividade ocasionada pelas frações hexânica e AcOEt sobre os coleóptilos de trigo sugere que ambas as frações apresentam compostos com propriedades fitotóxicas, o que comprova a habilidade de ambos os solventes em extrair substâncias bioativas em *D. brasiliensis*. As frações hexânica e AcOEt testadas constituem uma mistura de substâncias apolares ou relativamente polares, que podem exercer efeitos inibitórios aditivos ou em sinergismo; assim, a análise de cada composto isolado é importante (TIGRE et al., 2012). Quando um único composto responsável pela atividade alelopática de uma planta é isolado e identificado, pode representar um avanço para o desenvolvimento de um bioherbicida (XUAN et al., 2005).

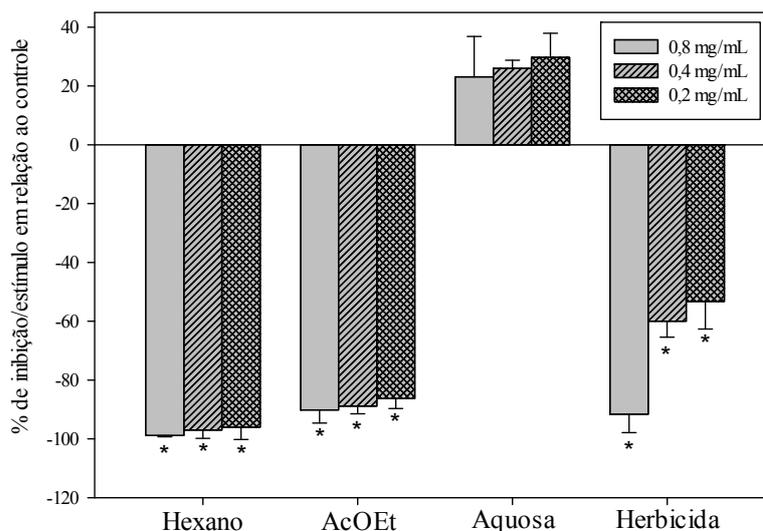


Figura 3.1 - Efeitos das frações hexânica, AcOEt e aquosa do extrato das raízes de *D. brasiliensis* e do herbicida oxyfluorfen sobre o crescimento de coleóptilos de trigo. Barras verticais representam o desvio padrão. (*) Médias diferem significativamente do controle, pelo teste de Dunnet, a 0,05 de probabilidade.

O estudo fitoquímico das frações hexânica e AcOEt do extrato das raízes de *D. brasiliensis* levou ao isolamento de quatro compostos sesquiterpenos do grupo drimanos (Figura 3.2). Os dados espectroscópicos de ^1H e ^{13}C (Anexos) para os compostos correspondem aqueles previamente registrados para (1) poligodial (KIOY et al., 1990; RODRÍGUEZ et al., 2005), (2) poligodial 12 α -acetal (FUKUYAMA et al., 1985; YING et al., 1990) e uma mistura dos isômeros (3) dendocarbin L (SULTANA et al., 2011) e (4) (+) fuegin (APPEL et al., 1962; SULTANA et al., 2011). O poligodial já foi isolado previamente das cascas do caule da espécie (CECHINEL FILHO et al., 1998; MALHEIROS et al., 2001; 2005; CORREA et al., 2011). Contudo, este trabalho faz o primeiro registro de sua presença nas raízes da planta. Os demais sesquiterpenos relatados aqui foram isolados pela primeira vez em *D. brasiliensis*.

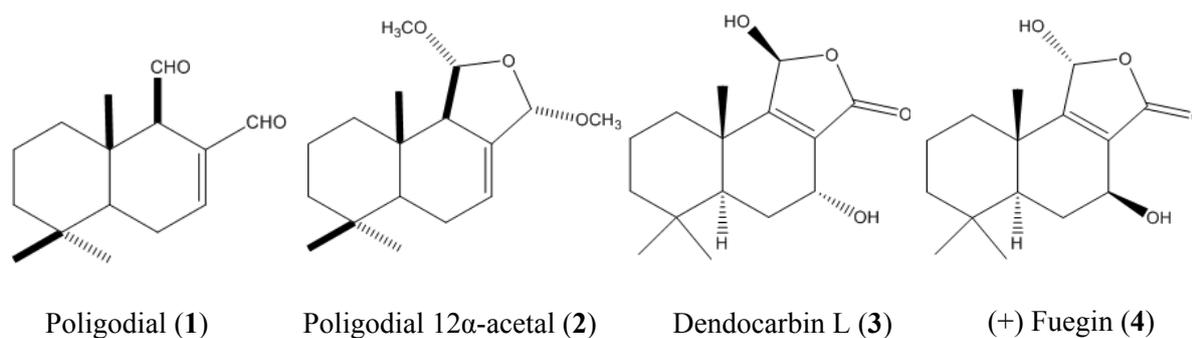


Figura 3.2- Estruturas químicas dos compostos 1-4 isolados a partir das frações hexânica e AcOEt das raízes de *D. brasiliensis*.

Os sesquiterpenos são compostos abundantes em espécies do gênero *Drimys* (JANSEN & GROOT, 2004). Estes compostos representam um grupo expressivo, conhecido pela ampla variedade de atividades biológicas, e desempenham um importante papel em mecanismos de defesa das plantas (FRAGA, 2002). Os principais sesquiterpenos já relatados em *Drimys* pertencem ao grupo dos drimanos (BROWN, 1994; RODRÍGUEZ et al., 2005; MALHEIROS et al., 2001; MECCHI & LAGO, 2013). Em relação a este grupo, o poligodial é considerado o principal constituinte químico e princípio ativo presente nestas espécies (RODRÍGUEZ et al., 2005; CECHINEL FILHO et al., 1998; MENDES et al., 1998). Para os drimanos sesquiterpenos, isolados anteriormente na espécie *D. brasiliensis*, já foram registradas atividades fungicida (MALHEIROS et al., 2005), anti-leishmanicida e anti-malarial (CLAUDINO et al., 2013; CORRÊA et al., 2011), bactericida (SILVEIRA et al., 2012) e propriedades farmacológicas diversas

(MENDES al., 1998; MALHEIROS et al., 2001; LAGO et al., 2010). Contudo, não foram encontrados na literatura investigações sobre o potencial fitotóxico de compostos presentes em *D. brasiliensis*.

A bioatividade dos sesquiterpenos isolados das raízes de *D. brasiliensis* foi avaliada sobre coleóptilos de trigo e todos os compostos inibiram em mais de 80 % o crescimento destes, na concentração de 1mM (Figura 3.3). Esta inibição foi similar a ocasionada pelo herbicida oxyfluorfen na mesma concentração. Particularmente, o poligodial destacou-se pela alta atividade em todas as concentrações avaliadas, com valores de inibição -96, -95, -85, -80 e -76 %, respectivamente, nas concentrações de 1mM, 300, 100, 30 e 10 μ M. Para os compostos **2**, **3** e para o herbicida o nível de atividade decresceu consideravelmente com a diluição das soluções (Figura 3.3). Através dos valores de CI_{50} foi possível ordenar os compostos de acordo com a intensidade do efeito fitotóxico: poligodial ($CI_{50}=2,97 \mu$ M, $r^2 = 0,98$) > poligodial 12 α -acetal ($CI_{50}=19,44 \mu$ M, $r^2 = 0,98$) > herbicida comercial ($CI_{50}=314,7 \mu$ M, $r^2 = 0,96$) > misturas dos compostos dendocarbin L e (+) fuegin ($CI_{50}=502 \mu$ M, $r^2 = 0,96$).

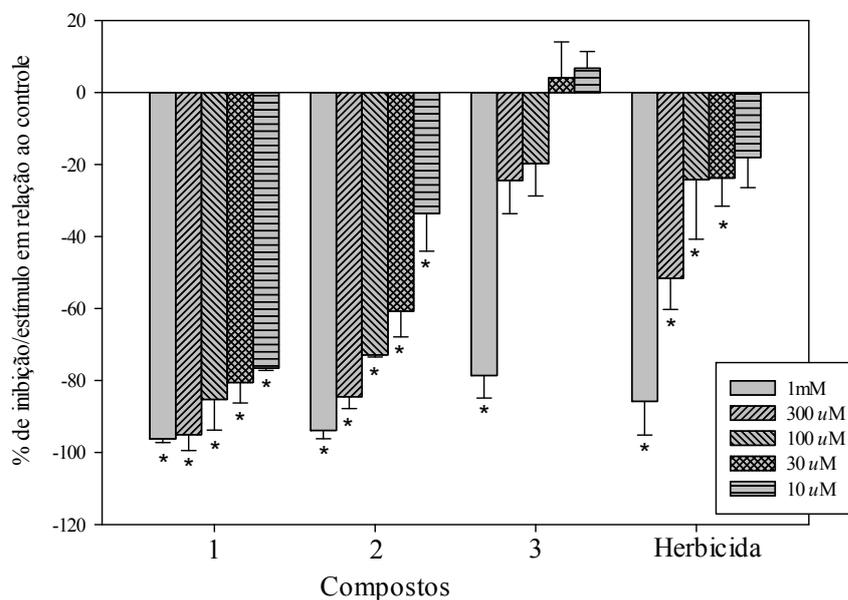


Figura 3.3 - Efeito de diferentes concentrações do poligodial (1), poligodial 12 α -acetal (2), mistura dos compostos dendocarbin L e (+) fuegin (3) e do herbicida oxyfluorfen sobre o crescimento de coleóptilos de trigo. Barras verticais representam o desvio padrão. (*) Médias diferem significativamente do controle, pelo teste de Dunnet, a 0,05 de probabilidade.

Diversas atividades biológicas já foram descritas para o poligodial (EL SAYAH et al., 1998; MATSUDA et al., 2002; FUJITA & KUBO, 2005; ZAPATA et al., 2009;

CORREA et al., 2011; SILVEIRA et al., 2012). Particularmente, o composto destaca-se pela potente atividade antimicrobiana. A ação fungicida e bactericida do poligodial vem da sua capacidade de agir como um surfactante que inespecificamente interrompe a interface de proteínas integrais e lipídios, desnaturando a conformação funcional das membranas e consequente inibição das funções celulares (KUBO et al., 2005; FUJITA & KUBO, 2005).

Em relação às propriedades reguladoras do crescimento de plantas, há poucos relatos sobre o potencial fitotóxico do poligodial. Fujita & Kubo (2003) constataram que o composto apresentou potencial de inibição sobre crescimento de raízes de *Lactuca sativa*, mas somente atuando em sinergismo com o ácido trans-cinâmico. Por outro lado, Jansen & Groot (2004) citam que o composto ocasionou danos morfológicos em *Lactuca sativa* e *Setaria italica*, com um IC₅₀ de 10 µM. Da mesma forma, o drimano poligodial 12 α-acetal, também é reportado por ocasionar efeito fitotóxico em *Lemma minor* (YING et al., 1995), assim como efeito gastroprotetor em ratos (MATSUDA et al., 2002). No entanto, para os compostos dendocarbin (L) e fuegin, não foram encontrados registros sobre atividades biológicas.

Alguns autores descrevem que a presença do grupamento 1,4 - dialdeído insaturado na estrutura molecular do poligodial está fortemente relacionado às suas atividades biológicas. Este grupo é quimicamente muito reativo e rapidamente reage com grupos nucleofílicos biologicamente importantes, tais como sulfidrila, amino ou hidroxila (KUBO et al., 2005; MORENO-OSORIO et al., 2008). Matsuda et al. (2002) isolaram os compostos poligodial, poligodial 12 α-acetal e metil isodrimeninol de folhas de *Tasmannea laceolata*. Dentre eles, o poligodial mostrou-se mais eficiente na inibição de úlcera gástrica induzida por etanol em ratos, seguido pelo poligodial 12 α-acetal. Os autores sugerem que a presença do grupamento aldeído e acetal são importantes na ação gastroprotetora destes compostos. No presente trabalho, o poligodial produziu maior inibição do crescimento dos coleótilos de trigo em comparação aos demais compostos isolados das raízes de *D. brasiliensis*, o que estabelece perspectivas para investigações de sua aplicação como um herbicida natural.

O poligodial inibiu significativamente o crescimento de plântulas das três espécies receptoras avaliadas no presente trabalho. Houve inibição de -99, -86 e -96 % no crescimento da radícula e de -90, -55 e -59 % no crescimento da parte aérea, respectivamente, para as espécies *B. verna*, *E. cruz-galli* e *I. grandifolia*, na concentração de 1mM. Contudo, o efeito inibitório sobre o crescimento da parte aérea foi menos

persistente com a diluição das concentrações (Figuras 3.4 A e B). Para *B. verna*, *E. cruz-galli* e *I. grandifolia* foram observados, respectivamente, valores de CI_{50} de 34,6 μM ($r^2 = 0,98$), 61,42 μM ($r^2 = 0,98$) e 28,18 μM ($r^2 = 0,99$) para as raízes e de 18,11 μM ($r^2 = 0,94$), 747,9 μM ($r^2 = 0,99$) e 998 μM ($r^2 = 0,96$) para o crescimento da parte aérea das plântulas. Em relação aos efeitos sobre a germinação, a espécie mais sensível foi *B. verna*, com -97 % de inibição na concentração de 1 mM. No entanto, houve redução significativa do efeito inibitório ao longo das diluições, com estímulo da germinação nas concentrações de 10 e 30 μM . O valor de CI_{50} observado para a germinação foi de 473,7 μM ($r^2 = 0,90$). O efeito do poligodial foi pouco significativo sobre a germinação das plantas daninhas. Os valores máximos de inibição foram de -26 e -35 % para *E. cruz-galli* e *I. grandifolia*, respectivamente, na maior concentração avaliada (Figura 3.4 C).

Poligodial apresentou potencial fitotóxico sobre as espécies estudadas, com maior especificidade para inibir o crescimento das plântulas do que a germinação dos diásporos. Este resultado é consistente com o observado para as frações hexânica e AcOEt dos extratos de folhas e raízes de *D. brasiliensis* sobre plantas daninhas (ANESE et al., 2013) e também com outros trabalhos que enfatizam a menor sensibilidade da germinação de sementes aos efeitos fitotóxicos de compostos naturais derivados de plantas (ARANITI et al., 2013; TIGRE et al., 2012; INOUE et al., 2010). A influência de compostos alelopáticos sobre a germinação depende do tamanho das sementes e da permeabilidade do tegumento (HANLEY & WHITING, 2005). Plantas daninhas com sementes grandes tendem a serem menos sensíveis à ação de aleloquímicos importantes, como o sorgoleone, porque essas plantas podem evitar o efeito fitotóxico devido a uma menor absorção e translocação ou degradação mais rápida das fitotoxinas (DAYAN, 2006).

No presente trabalho, o efeito inibitório do poligodial foi mais evidente sobre o crescimento da raiz primária do que sobre a parte aérea de plântulas das espécies receptoras. Superfícies de raízes primárias são mais permeáveis à fitotoxinas em comparação às superfícies do hipocótilo devido a presença de uma camada de cutícula protetora menos pronunciada sobre a raiz primária, o que pode resultar numa maior penetração e concentração destes compostos dentro dos tecidos da raiz (BESSIRE et al., 2007; YOSHIMURA et al., 2011). A forte atividade inibitória do poligodial, particularmente sobre o crescimento radicular, corrobora estudos anteriores que investigaram o efeito inibitório de compostos sesquiterpenos sobre o crescimento inicial de plantas (ABDELGALEIL et al., 2009; YANG et al., 2011).

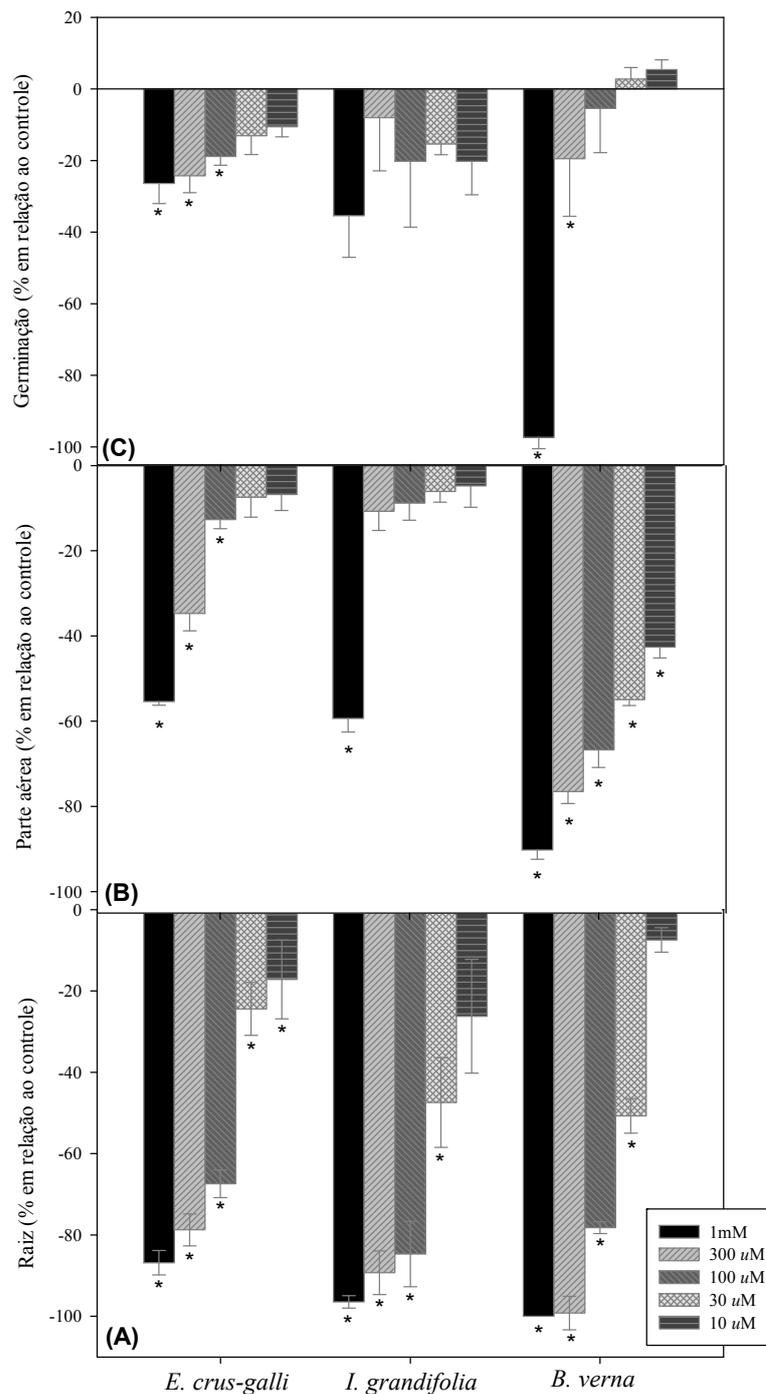


Figura 3.4 - Efeito do composto poligodial sobre crescimento (mm) radicular (A), da parte aérea (B) e percentual de germinação (C), das espécies *E. crus-galli*, *I. grandifolia* e *B. verna*, em diferentes concentrações. Valores são expressos em porcentagem de inibição/estímulo em relação ao controle. Barras verticais representam o desvio padrão. (*) Médias diferem significativamente do controle, pelo teste de Dunnet, a 0,05 de probabilidade.

Em nível celular, as fitotoxinas alelopáticas alteram o ciclo celular, induzem a perda da integridade e peroxidação de membranas, interferem em aspectos da ultraestrutura

celular, alteram os níveis de fitormônios, modificando os processos de divisão, expansão celular, morfologia e crescimento da raiz (YOSHIMURA et al., 2011; YANG et al., 2011; SOLTYS et al., 2012; CHOWHAN et al., 2013; GRAÑA et al., 2013).

No presente trabalho, o estudo anatômico em raízes de plântulas da planta daninha *I. grandifolia* possibilitou uma melhor visualização dos efeitos do poligodial em nível celular. A escolha de *I. grandifolia* foi devido ao elevado efeito do poligodial sobre o crescimento das raízes da espécie, assim como possibilitar o estabelecimento de futuras estratégias de aplicação deste composto no controle de plantas daninhas. O tamanho médio das células do metaxilema de raízes de plântulas que cresceram na presença do controle foi de 204 μm . As plântulas que cresceram na presença das diferentes concentrações do poligodial apresentaram menores comprimentos no tamanho das células do metaxilema do que o grupo controle. Os menores valores foram observados para as concentrações de 100 μM (83 μm) e 300 μM (72 μm) (Figuras 3.5 e 3.6). Não foi possível realizar as medições na concentração de 1 mM, uma vez que houve inibição de 96 % do crescimento da raiz nessa condição (Figura 3.4).

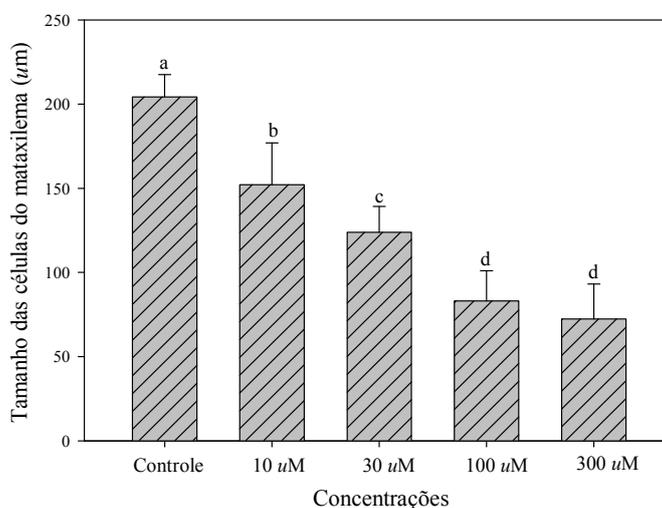


Figura 3.5 - Tamanho das células do metaxilema (μm) de raízes de plântulas de *I. grandifolia* sobre efeito de diferentes concentrações do composto poligodial. Tratamentos com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 0,05 de probabilidade.

A partir dos dados de porcentagem de células distribuídas em classes de tamanho observou-se que no grupo controle houve uma distribuição homogênea do tamanho celular, com o maior percentual encontrado (30 %) para células pertencentes a tamanhos entre 160-200 μm (Figura 3.7). Não foram registradas células menores que 80 μm no grupo controle.

As células do metaxilema de plântulas que cresceram sobre a influência das concentrações de 10 e 30 μM do poligodial apresentaram predominância de tamanho entre 120-160 μm , enquanto aquelas que cresceram nas concentrações de 100 e 300 μM , tem tamanho celular predominante entre 40-80 μm . Não foram encontradas células maiores que 160 μm na maior concentração avaliada (Figura 3.7).

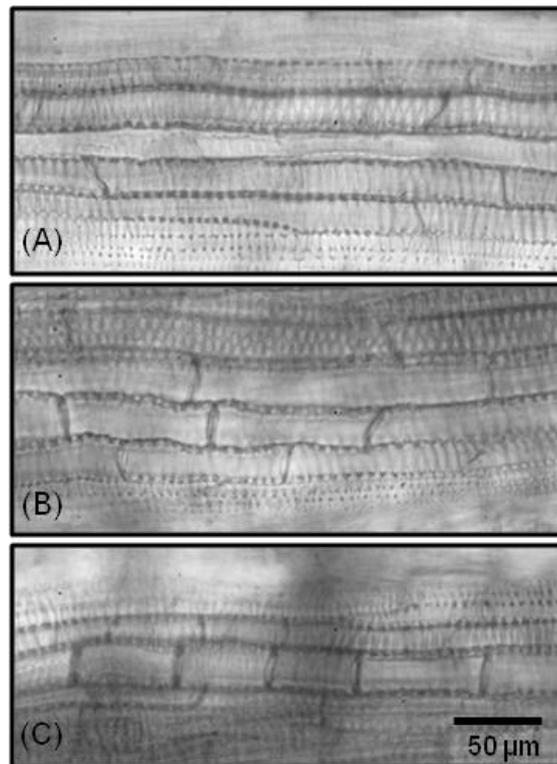


Figura 3.6 - Fotomicrografias das células do metaxilema de raízes de plântulas de *I. grandifolia* que cresceram na presença do controle (A) e nas concentrações de 30 μM (B) e 300 μM (C) do composto poligodial.

A redução do crescimento das raízes de *I. grandifolia* ocasionada pelo poligodial pode estar associada com a inibição do alongamento celular, como constatado aqui para as células do metaxilema, o que sugere uma possível interferência deste composto no balanço da concentração de fitormônios, tais como auxina, etileno e citocininas. A interação sinérgica destes hormônios é fundamental na regulação da elongação das células da radícula, formação de raízes laterais, diferenciação dos tecidos vasculares primários e crescimento da raiz (ALONI et al., 2006; ; STEPANOVA et al., 2007; GRANÃ et al., 2013).

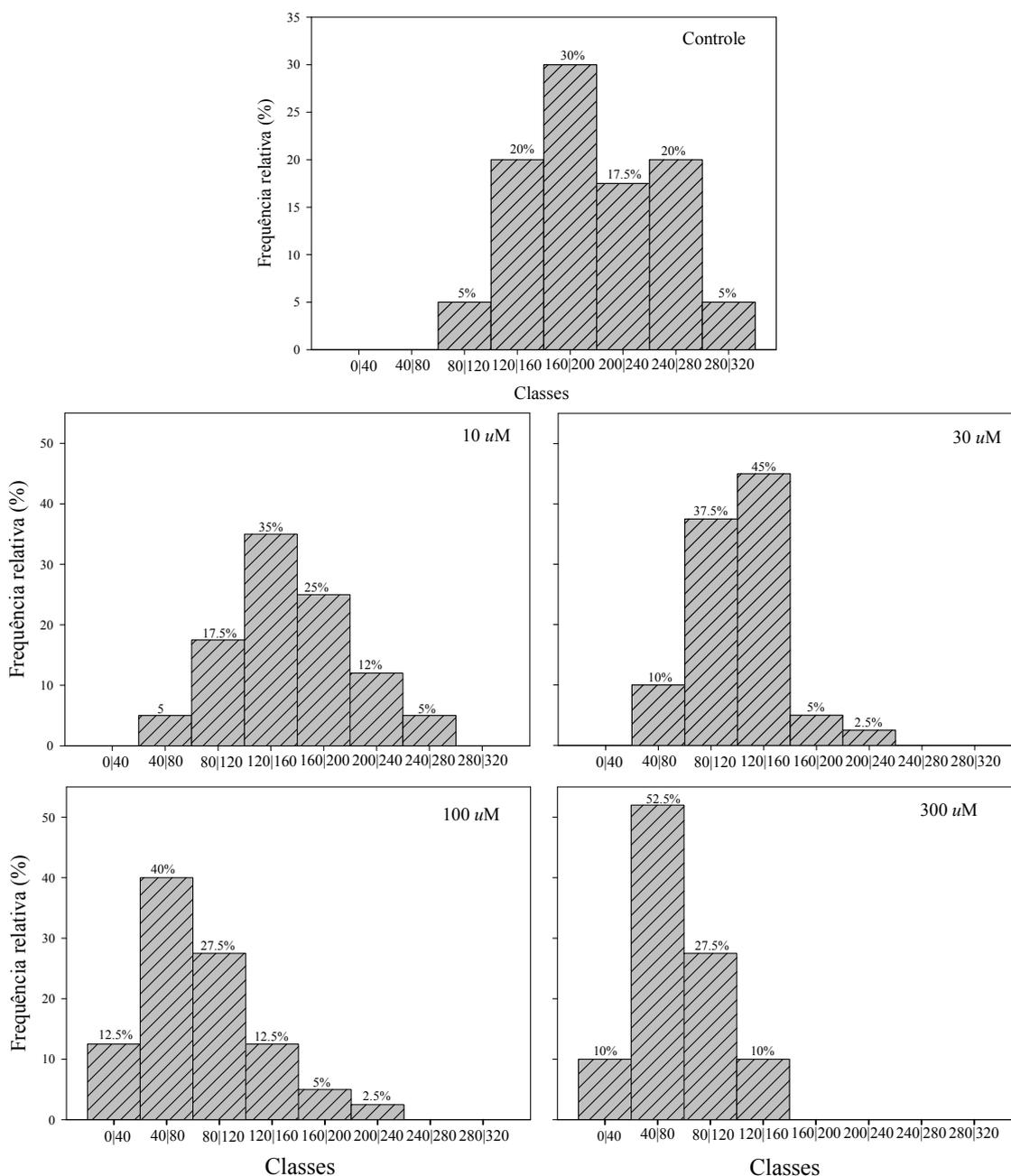


Figura 3.7 - Frequências relativas das classes de tamanho (μm) das células do metaxilema de raízes de plântulas de *I. grandifolia* que cresceram no controle e na presença de soluções de diferentes concentrações do composto poligodial.

É conhecido que compostos naturais derivados de plantas podem interferir na atividade de enzimas envolvidas na rota biossintética da auxina e suas proteínas específicas de transporte, como demonstrado em Prasad e Subhashini (1994) e Rahman et al. (2001). A auxina tem influência marcante em aspectos da morfologia e crescimento da raiz (STRADER et al., 2010). Desta forma, as alterações em processos celulares provocadas

pela ação de um composto com potencial alelopático podem resultar da sua interferência na concentração deste hormônio. Contudo, são necessárias futuras investigações para quantificar o conteúdo de auxina em raízes tratadas com o poligodial e, assim, estabelecer bases para uma melhor compreensão do mecanismo de ação deste sesquiterpeno na inibição do crescimento radicular de espécies vegetais.

Os resultados apresentados no presente trabalho apresentam o poligodial, isolado a partir de raízes de *D. brasiliensis*, como inibidor eficiente do crescimento das espécies receptoras avaliadas neste trabalho e sobre o alongamento das células do metaxilema em *I. grandifolia*, confirmando e ampliando nossas observações prévias obtidas com a fração hexânica das raízes de *D. brasiliensis* (ANESE et al., 2013). Esta constatação é importante do ponto de vista ecológico, uma vez que o poligodial é considerado o principal constituinte químico e princípio ativo de *D. brasiliensis* (MENDES et al., 1998; MALHEIROS et al., 2001) e a comprovação do seu efeito fitotóxico permite sua indicação como uma substância promissora para atuar como um herbicida natural.

A descoberta de novas fitotoxinas naturais pode constituir uma alternativa ao uso de herbicidas convencionais no controle de plantas daninhas (MACÍAS et al., 2008; VYVYAN, 2002). Investigações nesta área têm imensa importância para otimizar os sistemas de produção que sejam ambientalmente corretos e econômicos, por meio da redução das aplicações de herbicidas agrícolas sintéticos (HAIG et al., 2009). Aleloquímicos geralmente exibem bioatividade em baixas concentrações, são biodegradáveis, raramente contêm átomos halogenados e têm baixa ou nenhuma toxicidade sobre espécies não-alvo (FAROOQ et al., 2011). Das centenas de aleloquímicos identificados, o modo de ação é conhecido para poucos, mas muitos deles agem de forma diferente em relação aos herbicidas sintéticos, abrindo novas possibilidades, principalmente no controle de espécies de plantas daninhas resistentes a estes produtos (VYVYAN, 2002).

Muitos trabalhos recentes têm focado o isolamento e caracterização de compostos naturais derivados de plantas com potencial fitotóxico para o controle de plantas daninhas (KATO-NOGUCHI et al., 2011; BARATELLI et al., 2012; RIPARDO FILHO et al., 2012). Contudo, os efeitos fisiológicos e bioquímicos de aleloquímicos têm sido determinados somente em alguns poucos casos, a exemplo de alguns compostos, tais como juglona, (\pm)-catequina, sorgoleone e cianamida (HEJL & KOSTER, 2004; CHOBOT et al., 2009; DAYAN et al., 2009; SOLTYS et al., 2011). Dessa forma, novos estudos poderão

ser realizados para uma melhor compreensão dos mecanismos de ação do poligodial durante a inibição do crescimento e germinação de espécies de plantas daninhas. Estas informações serão úteis para a utilização deste composto natural como uma opção sustentável de manejo de plantas daninhas, dentro do contexto de agricultura de base ecológica.

CONCLUSÕES

O isolamento biomonitorado das frações bioativas de raízes de *D. brasiliensis* resultou na identificação de quatro compostos sesquiterpenos do grupo drimanos.

A presença do composto poligodial foi registrada pela primeira vez nas raízes de *D. brasiliensis*.

Os compostos poligodial 12 a-acetal, dendocarbin L e (+) fuegin foram isolados pela primeira vez em *D. brasiliensis*.

Todos os compostos inibiram o crescimento de coleótilos de trigo. No entanto, somente o poligodial manteve elevada atividade com a diluição das concentrações.

O poligodial exerceu efeito fitotóxico sobre as espécies *B. verna*, *E. crus-galli* e *I. grandifolia*, com maior especificidade para inibir o crescimento radicular.

O poligodial produziu redução significativa no tamanho das células do metaxilema de raízes de *I. grandifolia*, em todas as concentrações avaliadas.

REFERÊNCIAS

- ABDELGALEIL, S.A.M., ABDEL-RAZEEK, N., SOLIMAN, S.A. Herbicidal Activity of Three Sesquiterpene Lactones on Wild Oat (*Avena fatua*) and Their Possible Mode of Action. **Weed Science**, v. 57, p. 6-9, 2009.
- ALONI, R., ALONI, E., LANGHANS, M., ULLRICH, C.I. Role of cytokinin 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., GUALTIERI, S.C.J., GRISI, P.U., JATOBA, L.J., ARDUIN, M. Phytotoxic potential of *Drimys brasiliensis* Miers for use in weed control. **Acta Scientiarum. Agronomy**, 2013. (Artigo aceito para publicação).
- APPEL, H.H., BOND, R.P.M., OVERTON, K.H. Sesquiterpenoids III - The constitution and stereochemistry of valdiviolide, fuegin, winterin and futronolide. **Tetrahedron**, v. 19, p. 635-641, 1964.
- ARANITI, F., LUPINI, A., MERCATI, F., STATTI, G.F., ABENAVOLI, M.R. *Calamintha nepeta* L. (Savi) as source of phytotoxic compounds: bio-guided fractionation in identifying biological active molecules. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, p. 1979-1988, 2013.
- BARATELLI, T.G., GOMES, A.C.C., WESSJOHANN, L.A., KUSTER, R.M., SIMAS, N.K. Phytochemical and allelopathic studies of *Terminalia catappa*. **Biochemical systematic and ecology**, v. 41, p. 119-125, 2012.
- BESSIRE, M., CHASSOT, C., JACQUAT, A.C., HUMPHRY, M., BOREL, S., PETÉTOT, J. M.C., MÉTRAUX, J.P., NAWRATH, C. A permeable cuticle in *Arabidopsis* leads to a strong resistance to *Botrytis cinerea*. **EMBO Journal**, v. 26, 2158-2168, 2007
- BRITO, I., CÁRDENAS, A., ZÁRRAGA, M., PAZ, C., PÉREZ, C., LÓPEZ-RODRÍGUEZ, M.L. X-Ray crystallographic structural study on a cinnamolide-class sesquiterpene lactone from *Drimys winteri* Forst. var. *Chilensis*. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 53, p. 1732-1733, 2008.
- BROWN, G.D. DRIMENDIOL, a sesquiterpene from *Drymis winteri*. **Phytochemistry**, v. 35, p. 975-977, 1994.
- CECHINEL FILHO, V., SCHLEMPER, V., SANTOS, A.R.S., PINHEIRO, T.R., YUNES, R.A., MENDES, J.L., CALIXTO, J.B., MONACHE, F.D. Isolation and identification of active compounds from *Drimys winteri* barks. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, p. 223-227, 1998.
- CHOBOT V., HUBER C., TRETTEHNAHN G., HADACEK F. (±)-Catechin: chemical weapon, antioxidant, or stress regulator? **Journal Chemical Ecology**, v. 35, p. 980-996, 2009.
- CHENG, A., LOU, Y., MAO, Y., LU, S., WANG, L., CHEN, X. Plant Terpenoids: Biosynthesis and Ecological Functions. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 49, p. 179-186, 2007.
- CHOWHAN, N., SINGH, H.P., BATISH, E.R, KAUR, S., AHUJA, N., KOHLI, R.K. β -Pinene inhibited germination and early growth involves membrane peroxidation. **Protoplasma**, v. 250, p. 691-700, 2013.
- CLAUDINO, V.D., DA SILVA, K.C., CECHINEL FILHO, V., YUNES, R.A., DELLE MONACHE, F., GIMÉNEZ, A., SALAMANCA, E., GUTIERREZ-YAPU, D.,

- MALHEIROS, A., 2013. Drimanes from *Drimys brasiliensis* with leishmanicidal and antimalarial activity. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 140-4, 2013.
- CORRÊA, D.S., TEMPONE, A.G., REIMÃO, J.Q., TANIWAKI, N.N., ROMOFF, P., FÁVERO, O.F., SARTORELLI, P., MECCH, M.C., LAGO, H.G. Anti-leishmanial and anti-trypanosomal potential of polygodial isolated from stem barks of *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae). **Parasitol Research**, v.109, p. 231-236, 2011.
- CUTLER, H. G. Fresh look at the wheat coleoptile bioassay, pp. 1-9, in Proceedings of the 11th Annual Meeting of the Plant Growth Regulator Society of America, PGRSA, Boston, MS, USA, 1984.
- CUTLER, S.J., HOAGLAND, R.E., CUTLER, H.G. 2000. Evaluation of selected pharmaceuticals as potential herbicides: Bridging the gap between agrochemicals and pharmaceuticals, pp. 129–137, in Narwal, S.S., Hoagland, R.E., Dilday, R.H., Reigosa Roger, M.J. (eds.), Allelopathy in Ecological Agriculture and Forestry, Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- DAYAN, F. E. Factors modulating the levels of the allelochemical sorgoleone in *Sorghum bicolor*. **Planta**, v. p. 224, 339-346, 2006.
- DAYAN, F. E., RIMANDO, A.M., PAN, Z., BAERSON, S.R., GIMSING, A.L., DUKE, S.O. Sorgoleone. **Phytochemistry**, v. 71, p. 1031-1039, 2009.
- EL SAYAH, M., CECHINEL FILHO, V., YUNES, E.A., PINHEIRO, T., CALIXTO, J.B., 1998. Action of polygodial, a sesquiterpene isolated from *Drymis winteri*, in the guinea-pig ileum and trachea in vitro. **European Journal of Pharmacology**, v. 344, p. 215-221, 1998.
- ENS E.J., FRENCH, K., BREMNER, J.B. Evidence for allelopathy as a mechanism of community composition change by an invasive exotic shrub, *Chrysanthemoides monilifera* spp. *rotundata*. **Plant Soil**, v. 316, p. 125-137, 2009.
- EHRENDORFER, F., GOTTSBERGER, I. S., GOTTSBERGER, G., 1979. Variation on the population, racial, and species level in the primitive relic angiosperm genus *Drimys* (Winteraceae) in South America. **Plant Systematics and Evolution**, v.132, p. 53-83, 1979.
- FAROOQ, M.; ZAHID, K. J.; CHEEMA, A.; WAHID, A.; SIDDIQUE, K. H. M., 2011. The role of allelopathy in agricultural pest management. **Pest Management Science**. v. 67, p. 493-506, 2011.
- FRAGA, B. Natural sesquiterpenoids. **Natural Product Reports**. v.19, p. 650-672, 2002.
- FUKUYAMA, Y., SATO, T., MIURA, I., ASAKAWA, Y. Drimane-type sesqui- and norsesquiterpenoids from *Polygonum hidropiper*. **Phytochemistry**. v. 24, p. 1521-1524, 1985.

- FUJITA, K., KUBO, I. 2005. Multifunctional action of antifungal polygodial against *Saccharomyces cerevisiae*: Involvement of pyrrole formation on cell surface in antifungal action. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 6742–6747, 2005.
- FUJITA, K., KUBO, I. Synergism of polygodial and *trans*-cinnamic acid on inhibition of root elongation in lettuce seedling growth bioassays. **Journal of Chemical Ecology**, v. 29, p. 1253-1262, 2003.
- GANDOLFI, R.C., MEDINA, M.B., BERLINCK, R.G.S., LIRA, S.P., GALETTI, F.C.S., SILVA, C.L. Metabólitos secundários das esponjas *Aplysina fistularis* e *dysidea* sp. e atividade antituberculose da 11-Cetofistularina-3. **Química Nova**, v. 33, p. 1853-1858, 2010.
- GATTI, A.B.; FERREIRA, A.G.; ARDUIN, M.; PEREZ, S.C. J.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.
- 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., RANAL, M. A., SANTANA, D. G., 2011. Efeito alelopático do fruto de *Sapindus saponaria* na germinação e na morfologia de plântulas daninhas e de hortaliças. **Planta Daninha**, v. 29, p. 311-322, 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, p. 1-9, 2012.
- HAIG, T.J., HAIG, T.J., SEAL, A.N., PRATLEY, J.E., AN, M., WU, H. Lavender as a source of novel plant compounds for the development of a natural herbicide. **Journal Chemical Ecology**, v. 35, p. 1129-1136, 2009.
- HANLEY, M.E., WHITING, M.D. Insecticides and Arable Weeds: effects on germination and seedling growth. **Ecotoxicology**, v. 14, p. 483–490, 2005.
- HEJL, A.M., KOSTER, K.L. Juglone disrupts root plasma membrane H⁺-ATPase activity and impairs water uptake, root respiration, and growth in soybean (*Glycine max*) and corn (*Zea mays*). **Journal Chemical Ecology**. v. 30, p. 453-471, 2004.
- 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.
- JABRAN, K., FAROOQ, M., HUSSAIN, M., REHMAN, H., ALI, M.A. Wild oat (*Avena fatua* L.) and canary grass (*Phalaris minor* Ritz.) management through allelopathy. **Journal of Plant Protection Research**. v. 50, p. 41-45, 2010.

- JANSEN, B., GROOT, A. Occurrence, biological activity and synthesis of drimane sesquiterpenoids. **Natural Product Report**, v. 21, p. 449-477, 2004.
- JARDIM, I.C.S.F., ANDRADE, J.A., QUEIROZ, S.C.N. Residues of pesticides in food: A global environmental preoccupation – focussing on apples. **Quimica Nova**, v. 32, 996-1012, 2009.
- KALINOVA, J., TRISKA, J., VRCHOTOVA, N. Occurrence of eugenol, coniferyl alcohol and 3,4,5- trimethoxyphenol in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) and their biological activity. **Acta Physiology Plant**, v. 33, p. 1679-1685, 2011.
- KATO-NOGUCHI, H., THI, H.L., TERUYA, T., SUENAGA, K. Two potent allelopathic substances in cucumber plants. **Scientia Horticulturae**, v. 129, p. 894-897, 2011.
- KHALIQ, A., MATLOOB, A., KHAN, M.B., TANVEER, A. Differential suppression of rice weeds by allelopathic plant aqueous extracts. **Planta Daninha**, v. 31, p. 21-28, 2013.
- KOUL, O., WALIA, S. Comparing impacts of plant extracts and pure allelochemicals and implications for pest control. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 4, p. 1-30, 2009.
- KIOY, D., GRAY, A.I., WATERMAN, P.G. A comparative study of the stem-bark drimane sesquiterpenes and leaf volatile oils of *Warburgia ugandensis* And *W. Stuhlmannii*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 3535-3538, 1990.
- KRAUS, J. E., ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropedica, EDUR, 1997.
- KUBO, I., FUJITA, K., LEE, S.H., HA, T.J. Antibacterial activity of polygodial. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 1013-1017, 2005a.
- LAGO, G.H.G., CARVALHO, L.A.C., SILVA, F.S., TOYAMA, D.O., FÁVERO, O.A., ROMOFF, P., Chemical Composition and Anti-Inflammatory Evaluation of Essential Oils from Leaves and Stem Barks from *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 1760-1765, 2010.
- LACRET, R., VARELA, R.M., MOLINILLO, J.M., NOGUEIRAS C., MACÍAS, F.A. Anthractone and naphthotectone, two quinones from bioactive extracts of *Tectona grandis*. **Journal Chemical Ecology**, v. 37, p.1341-1348, 2011.
- LIMBERGER, R.P., SCOPEL, R., SOBRAL, M., HENRIQUES, A.T. Comparative analysis of volatiles from *Drimys brasiliensis* Miers and *D. angustifolia* Miers (Winteraceae) from Southern Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 130-137, 2007.

- MACIAS, F. A.; CASTELLANO, D.; MOLINILLO, J. M. Search for a standard phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 2512-2522, 2000.
- MACÍAS, F. A., LACRET, R., VARELA, R., NOGUEIRAS, C., MOLINILLO, J.M.G. Isolation and phytotoxicity of terpenes from *Tectona grandis*. **Journal Chemical Ecology**, v. 36, p. 396-404, 2010.
- MACÍAS, F.A., OLIVEROS-BATIDAS, A., MARÍN, D., CARRERA, C., CHINCHILLA, N., MOLINILLO, J.M.G. Plant biocommunicators: their phytotoxicity, degradation studies and potential use as herbicide models. **Phytochemistry Review**, v. 7, p. 179-194, 2008.
- MALHEIROS, A., CECHINEL FILHO, V., SCHMITT, C.B., YUNES, R.A., ESCALANTE, A., SVETAZ, L., ZACCHINO, S., MONACHE, F.D. Antifungal activity of drimane sesquiterpenes from *Drimys brasiliensis* using bioassayguided fractionation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8, p. 335-339, 2005.
- MALHEIROS, A., CECHINEL FILHO, V., SCHMITT, C.B., SANTOS, A.R.S., CALIXTO, J.B., DELLE MONACHE, F., YUNES, R.A. A sesquiterpene drimane with antinociceptive activity from *Drimys winteri* barks. **Phytochemistry**, v. 57, p. 103-7, 2001.
- MATSUDA, H., PONGPIRIYADACHA, Y., MORIKAWA, T., KASHIMA, Y., NAKANO, K., YOSHIKAWA, M. Protective effects of polygodial and related compounds on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats: structural requirements and mode of action. **Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters**, v.12, p. 477-482, 2002.
- MECCHI, M.C., LAGO, J.H.G. Chemical constituents derived from *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae). **Natural Product Research**, v. 27, Ahead of Print, 2013.
- MENDES, G., SANTOS, A., CAMPOS, M., TRATSK, K., YUNES, R., CECHINEL, V., CALIXTO, J., 1998. Anti-hyperalgesic properties of the extract and of the main sesquiterpene polygodial isolated from the barks of *Drimys winteri* (Winteraceae). **Life Science**, v.63, p. 369-381, 1998.
- MORENO-OSORIO, L., CORTE, M., ARMSTRONG, V., BAILÉN, M., GONZÁLEZ-COLOMAC, A. Antifeedant Activity of Some Polygodial Derivatives. **Z. Naturforsch**, v. 63, p. 215-220, 2008.
- MORRISSEY, J.P. **Biological Activity of Defence-Related Plant Secondary Metabolites** (cap.13), in Plant-derived Natural Products. Osbourn, A.E., Lanzotti, V. (Eds.), Springer, 2009.
- PRASAD, M. N.V., SUBHASHINI, P. Mimosine-inhibited seed germination, seedling growth, and enzymes of *Oryza sativa* L. **Journal Chemical Ecology**, v. 20, p. 1689-1696, 1994.

- RAHMAN, A., AHAMED, A., AMAKAWA, T., GOTO, N., TSURUMI, S. Chromosaponin I specifically interacts with AUX1 protein in regulating the gravitropic response of Arabidopsis roots. **Plant Physiology**, v. 125, p. 990-1000, 2001.
- RANAL, M.A., SANTANA, D.G. How and why to measure the germination process? **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, p. 1-11, 2006.
- RANGEL, M., SANCTIS, B., FREITAS, J.C., POLATTO, J.M., GRANATO, A.C., BERLINCK, R.J.S., HAJDU, R. Cytotoxic and neurotoxic activities in extracts of marine sponges Porifera from southeastern Brazilian coast. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 262, p. 31-40, 2001.
- RIBEIRO, V.L.S., ROLIM, V., BORDIGNON, S., HENRIQUES, A.T., DORNELES, G.G., LIMBERGER R.P., POSER, G.V. Chemical composition and larvicidal properties of the essential oils from *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasitol Research**, v. 102, p. 531-535, 2008.
- RIPARDO FILHO, H.S., PACHECO, L.C., SOUZA FILHO, A.P.S., GUILHON, G.M.S.P., ARRUDA, M.S.P., SANTOS, L.S. Bioensaios de atividade alelopática dos esteroides espinasterol, espinasterona e glicopiranosil espinasterol. **Planta Daninha**. v. 30, p. 705-712, 2012.
- RODRÍGUEZ, R.A., QUEZADA, M., 2001. Winteraceae. In: Marticorena, C., Rodríguez R.A. (Eds.). Flora de Chile, vol. 2. Fasc. 1. (**Winteraceae-Ranunculaceae**) Ed. Univ. Concepción, Concepción, Chile. pp. 2-7.
- RODRÍGUEZ, B., ZAPATA, N., MEDINA, P., VINUELA, E. A complete ¹H and ¹³C NMR data assignment for four drimane sesquiterpenoids isolated from *Drimys winterii*. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 43, p. 82-84, 2005.
- SANTOS, W. D.; FERRARESE, M. L. L.; NAKAMURA, C. C.; MOURÃO, K. S. M.; MANGOLIN, C. A.; FERRARESE-FILHO, O. Soybean (*Glycine max*) Root Lignification Induced by Ferulic Acid: The Possible Mode of Action. **Journal Chemical Ecology**, v. 34, p. 1230-1241, 2008.
- SCOGNAMIGLIO, M., ESPOSITO, M., D'ABROSCA, B., PACIFICO, S., FIUMANO, V., TSAFANTAKIS, N., MONACO, P., FIORENTINO, A. Isolation, distribution and allelopathic effect of caffeic acid derivatives from *Bellis perennis* L. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 43, p. 108-103, 2012.
- SILVEIRA, A.C.O., CLAUDINO, V.D., YUNES, R.A., CECHINEL-FILHO, V., MALHEIROS, A., CORDOVA, C.M.M., BELLA CRUZ, A. Antibacterial Activity and Toxicity of *Drimys brasiliensis*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 31, p. 935-40, 2012.
- 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.
- SULTANA, R., HOSSAIN, R., ADHIKARI, A., ALI, Z., YOUSUF, S., CHOUDHARY, M.I., ALI, M.Y., ZAMAN, M.S. Drimane-type sesquiterpenes from *Polygonum hydropiper*. **Planta Medica**, v. 77, p. 1848-51, 2011.
- STEPANOVA, A. N., YUN, J., LIKHACHEVA, A. V., ALONSO, J. M., 2007. Multilevel interactions between ethylene and auxin in *Arabidopsis* roots. **Plant Cell**, v. 19, p. 2169-2185, 2007.
- TIGRE, R.C., SILVA, N.H., SANTOS, M.G., HONDA, N.K., FALCÃO, E.P.S., PEREIRA, E.C. Allelopathic and bioherbicidal potential of *Cladonia verticillaris* on the germination and growth of *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 84, 125-132, 2012.
- TRINTA, E.F., SANTOS, E. Winteráceae. Flora Ilustrada Catarinense, Itajaí, 1997.
- VOLL, E.; GAZZIERO, D. L. P.; ADEGAS, F. S. Aconitic acid on seeds of weed species from different locations. **Planta Daninha**, v. 28, p. 13-22, 2010.
- VYVYAN, J. R. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. **Tetrahedron**, v. 58, p. 1631-1646, 2002.
- XUAN, T. D., SHINKICHI, T., KHANH, T.D., MIN, C. Biological control of weeds and plant pathogens in paddy fields by exploiting plant allelopathy: an overview. **Crop Protection**, v. 24, p.197-206, 2005.
- WEIR, T. L.; PARK, S. W., VIVANCO, J. M. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, p. 472-479, 2004.
- YANG, G-Q., WAN, F-H., GUO, J-Y., LIU, W-X. Cellular and ultrastructural changes in the seedling roots of upland rice (*Oryza sativa*) under the stress of two allelochemicals from *Ageratina adenophora*. **Weed Biology and Management**, v. 11, p. 52–159, 2011.
- YING, B.P., PEISER, G., JI, Y.Y., MATHIAS, K., TUTKO, D., HWANG, Y.S. Phytotoxic sesquiterpenoids from *Canella winterana*. **Phytochemistry**. v. 84, p. 909-915, 1994.
- YOSHIMURA, H., SAWA, Y., TAMOTSU, S., SAKAI, A., 2011. 1,8-cineole inhibits both proliferation and elongation of by-2 cultured tobacco cells. **Journal Chemical Ecology**, v. 37, p. 320–328, 2011.
- ZAPATA, N., BUDIA, F., VINUELA, E., MEDINA, P. Antifeedant and growth inhibitory effects of extracts and drimanes of *Drimys winteri* stem bark against *Spodoptera littoralis* (Lep., Noctuidae). **Industrial Crops and Products**. v. 30, p. 119-125, 2009.

CAPÍTULO 4

Atividade inseticida da fração hexânica e do composto poligodial obtidos de raízes de *Drimys brasiliensis* Miers sobre *Toxoptera citricidus* Kirkaldy (Homoptera: Aphididae).

**ATIVIDADE INSETICIDA DA FRAÇÃO HEXÂNICA E DO COMPOSTO
POLIGODIAL OBTIDOS DE RAÍZES DE *Drimys brasiliensis* Miers SOBRE
Toxoptera citricidus Kirkaldy (HOMOPTERA: APHIDIDAE)**

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade inseticida da fração hexânica e do composto poligodial obtidos de raízes de *Drimys brasiliensis* Miers sobre a mortalidade de adultos e ninfas de um dia de *Toxoptera citricidus* Kirkaldy (pulgão-preto dos citros). Para a fração hexânica foram preparadas soluções nas concentrações de 0,12; 0,25; 0,50; 1,0 e 2,0 mg/mL e, para o composto isolado, concentrações de 62,5, 125; 250 e 500 µg/mL. Também foi realizado um controle com água e dimetilsulfóxido (5 µL/mL). Foram testadas duas formas de aplicações das soluções contendo a fração hexânica: pulverizações sobre o inseto e pulverizações sobre o ramo caulinar jovem de *Citrus limon* L., o qual serviu como hospedeiro para os pulgões. A avaliação da mortalidade dos adultos e de ninfas foi realizada após 24 e 48 horas da aplicação das soluções. A fração hexânica do extrato bruto de raízes de *D. brasiliensis* ocasionou elevada mortalidade sobre ninfas e adultos de *T. citricidus*. O menor valor de CL₅₀ (0,301 mg/mL) foi registrado sobre as ninfas, quando as soluções foram aplicadas diretamente sobre o inseto. O composto poligodial, isolado da fração hexânica, e aplicado sobre *T. citricidus*, aumentou significativamente a mortalidade nas fases de adultos e ninfas, com valores de CL₅₀ de 293,8 e 176,77 µg/mL, respectivamente. A atividade inseticida observada para *D. brasiliensis* pode ser devida a presença deste composto.

Palavras-chave: pulgão-preto dos citros, adulto, ninfa, inseticidas botânicos, mortalidade.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the insecticidal activity of the hexane fraction and poligodial compound obtained from *Drimys brasiliensis* Miers roots on the mortality of adults and nymphs of *Toxoptera citricidus* Kirkaldy (black citrus aphid). For the hexane fraction, solutions at 0.12, 0.25, 0.50, 1.0 and 2.0 mg/mL were prepared, and for the compound, solutions at 62.5, 125, 250 and 500 µg/mL were prepared. A control with water and dimethylsulfoxide (5 µL/mL) was performed. Two applications methods of the hexane fraction solutions were evaluated: spraying on the insect and spraying on the young stem of *Citrus limon* L., which served as harborer for the aphids. The nymphs and adults mortality

assessment were performed at 24 and 48 hours after solutions application. The hexane fraction from *D.brasiliensis* roots extract caused high mortality on nymphs and adults of *T.citricidus*. The lowest LC₅₀ value (0.301 mg/mL) was recorded on nymphs, when the solutions were applied directly on the insect. The polygodial compound, isolated from hexane fraction, and applied on *T.citricidus*, significantly increased the mortality in adults and nymphs stages, with LC₅₀ values of 293.8 and 176.77 µg/mL, respectively. The insecticidal activity observed for *D.brasiliensis* may be due to the presence of this compound.

Keywords: black citrus aphid, adult, nymph, botanical insecticides, mortality.

INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se como grande produtor de citros. Atualmente, detém mais da metade da produção mundial de suco de laranja e exporta 98 % da sua produção. Essa posição coloca a citricultura como uma das principais atividades agrícolas do país (NEVES et al., 2010). Dentre os insetos que ocorrem nos citros, os afídeos (Hemiptera: Aphididae) têm grande importância como vetores de vírus fitopatogênicos, sendo as formas aladas as mais eficientes (CARRERA & CERMELI, 2003; TOLEDO et al., 2006). Dentre os principais afídeos encontrados colonizando plantas cítricas está o *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy), conhecido como o pulgão-preto dos citros (BALFOUR & KHAN, 2012). Embora possa causar sérios danos à cultura diretamente pela sucção contínua da seiva em brotações, causando o encarquilhamento das folhas, a maior importância deste afídeo se deve ao fato de ser o vetor mais eficiente do vírus da tristeza dos citros (HALBERT & BROWN, 1996; GALLO et al., 2002).

Ao longo das últimas décadas, os pesticidas sintéticos constituem o mecanismo mais eficiente para o controle de insetos pragas. Contudo, a contínua utilização destes produtos, pode causar desequilíbrios mediante a eliminação de insetos benéficos, explosões populacionais de pragas e, principalmente, a perda de eficácia de inseticidas mediante a seleção natural de linhagens de insetos resistentes a esses compostos químicos. Acrescenta-se ainda aspectos negativos relativos à contaminação do meio ambiente, danos acidentais ocasionados pela má utilização de agrotóxicos e elevados custos (MARANGONI et al., 2012). Atualmente, os produtos naturais derivados de plantas têm sido considerados uma

das fontes alternativas mais promissoras de produtos bioracionais, com novos modos de ação para o manejo de insetos pragas (ISMAN, 2006; RATTAN, 2010). Um grande número de metabólitos secundários sintetizados por plantas são relatados por suas propriedades inseticidas, deterrentes ou repelentes de insetos, incluindo terpenos, flavonóides, alcalóides, fenóis e outros compostos relacionados (ADEYEMI, 2010), com a vantagem de serem frequentemente mais seletivos, degradados em produtos não tóxicos para o ambiente e, muitas vezes, sem efeito nocivo sobre organismos não-alvos (DANG et al., 2010).

Os inseticidas botânicos são produtos derivados de plantas, ou de partes de plantas, podendo ser o próprio material vegetal, normalmente moído até ser reduzido a pó, ou seus produtos derivados por extração aquosa ou solventes orgânicos (WIESBROOK, 2004). Os extratos obtidos com solventes orgânicos contêm complexa mistura de compostos ativos. Se a concentração letal baixa é detectada, o extrato pode ser fracionado para extrair o componente químico responsável pelo efeito (SHAALAN et al., 2005). No entanto, alguns compostos, quando testados de forma isolada, apresentam baixa eficácia, sugerindo efeito sinérgico entre os metabólitos secundários presentes no extrato, indicando que a associação destes compostos é a responsável pela mortalidade obtida nos testes realizados (CHOCKALINGAM et al., 1990; SHAALAN et al., 2005). Os efeitos deletérios dos produtos naturais derivados de plantas podem se manifestar de diversas maneiras, incluindo repelência, inibição de oviposição e da alimentação, alterações no sistema hormonal, bloqueio da neurotransmissão, causando distúrbios no desenvolvimento, deformações, infertilidade e mortalidade nas diversas fases do inseto (ROEL, 2001; MACIEL et al., 2010).

Drimys brasiliensis Miers, ou casca-de-anta, como é popularmente conhecida, pertence à família Winteraceae, é encontrada na Mata Atlântica, desde o sul da Bahia até o Rio Grande do Sul, ocorrendo também ao longo de florestas de galerias do domínio Cerrado (EHRENDORFER et al., 1979). Espécies pertencentes ao gênero *Drimys* são conhecidas por apresentarem compostos sesquiterpenos do grupo drimanos, os quais possuem ampla variedade de atividades biológicas, incluindo elevado potencial inseticida (JANSEN & GROOT, 2004). Exemplos de drimanos isolados da espécie *D. brasiliensis* incluem o poligodial, 1- β -(p-methoxycinnamoyl)-polygodial e o drimaniol (MALHEIROS et al., 2005). O poligodial foi isolado como composto majoritário na planta e relatado pelo

seu potencial bactericida (SILVEIRA et al., 2012), leishmanicida (CÔRREA et al., 2011), acaricida (RIBEIRO et al., 2008) e antifúngico (MALHEIROS et al., 2005).

Não foram encontrados dados na literatura no que concerne às ações de *D. brasiliensis* no controle de insetos-praga. Assim, o estudo teve por objetivo avaliar o efeito inseticida da fração hexânica e do composto poligodial isolado de raízes de *D. brasiliensis* sobre a mortalidade de adultos e ninfas de *Toxoptera citricidus* Kirkaldy (Homoptera: Aphididae) (pulgão-preto dos citros).

MATERIAL E METÓDOS

Obtenção do material vegetal

A coleta do material biológico foi realizada em indivíduos de *Drimys brasiliensis* subsp. *brasiliensis*, ocorrentes na área de reserva de cerrado “*sensu strictu*” pertencente à Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), estado de São Paulo (21° 58' a 22°00' S e 47°51' a 47°52' W), em agosto de 2010. Após a coleta, as raízes foram lavadas com água, para eliminação de impurezas e secas em estufa de circulação forçada de ar, a 40 °C, por 120 horas. Após secagem, o material foi triturado em moinho industrial, pesado, embalado a vácuo em sacos plásticos e armazenado a 4°C de temperatura, até o início do experimento.

Obtenção da fração hexânica e do composto poligodial

Inicialmente, 100 g do pó das raízes foi submetido a extração exaustiva com diclorometano (CH₂Cl₂)/metanol (MeOH) (1:1) (5 x 400 mL). O extrato resultante foi filtrado sob vácuo, reunido e concentrado. O extrato bruto concentrado foi ressuspensionado em metanol 95 % (400 mL) e particionado com n-hexano (400 mL, procedimento repetido por três vezes), resultando nas frações metanólica e hexânica (RANGEL et al., 2001). Ao final, a fração hexânica foi concentrada e utilizada para o preparo das concentrações a serem testadas no bioensaio. A fração hexânica de *D. brasiliensis* foi escolhida devido a alta atividade biológica observada em testes preliminares.

Para purificação do composto poligodial, 1 g de amostra da fração hexânica foi submetido à separação cromatográfica em coluna pré-empacotada de sílica gel (10 g, Phenomenex® Strata™), eluída em gradiente de hexano/acetona (9,5:0,5; 9:1; 8,5:1,5; 8:2;

7:3; 6:4 v/v), acetona, acetona/metanol (1:1 v/v) e metanol. Foram coletadas 90 frações de 10 mL cada e, após análise e reunião monitorada com base no perfil de cromatografia de camada delgada (CCD), nove sub-frações (A-I) foram obtidas. A fração D (hexano/acetona, 9:1 v/v, 160 mg), foi selecionada para purificação em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV) (coluna: Inertsil ODS-3, 250 x 4,6 mm, 5 μ m; eluente: gradiente de MeOH/MeCN (1:1) em H₂O; fluxo: 1 mL/min; detecção: UV 204 nm), obtendo-se sete amostras (D1-D7). Após análises por RMN ¹H e ¹³C (Anexo) e comparação com dados da literatura, a amostra D3 (86,4 mg) foi identificada como o composto poligodial (KIOY et al., 1990; RODRÍGUEZ et al., 2005), e sua atividade biológica foi investigada nos bioensaios com os insetos.

Preparo das soluções

A fração hexânica e o composto poligodial, separadamente, foram pré-solubilizados em DMSO (Dimetilfulfóxido, 5 μ L/mL) e diluídos em água MilliQ. Para a fração hexânica foram preparadas soluções nas concentrações de 0,12; 0,25; 0,50; 1,0 e 2,0 mg/mL e, para o composto isolado, concentrações de 62,5, 125; 250 e 500 μ g/mL. Foi realizado um controle com água e DMSO (5 μ L/mL). Foram mantidas concentrações constantes de 5 μ L/mL de DMSO em cada concentração avaliada. Previamente a realização do bioensaio, testou-se o efeito do DMSO diluído em água MilliQ (5 μ L/mL) sobre as ninfas e adultos, de forma que o mesmo mostrou-se seguro, não provocando alterações ou mortalidade.

*Obtenção dos adultos e ninfas de *T. citricidus**

Adultos de *T. citricidus* foram coletados em plantas de *Citrus limon* (L.), localizadas no campus da Universidade Federal de São Carlos, na Rodovia Washington Luís, km 235, SP-310, São Carlos, SP, Brasil. Posteriormente, foram levados ao Laboratório de Entomologia Econômica do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva para confirmação específica e, em seguida, dispostos em ramos caulinares jovens do mesmo hospedeiro. Os ramos foram individualizados em um eppendorf contendo água, e o conjunto formado foi mantido em uma manga de vidro com uma das extremidades vedada com tecido voil. Esses adultos e as suas crias, ninfas de um dia, foram utilizados nos bioensaios.

Bioensaios de toxicidade

O experimento foi desenvolvido em ambiente de laboratório com temperatura média de 27,5 °C e UR de 60 ± 10 %. Foram avaliados dois métodos de aplicação das soluções da fração hexânica sobre adultos e ninfas de um dia de *T. citricidus*, separadamente: pulverização direta sobre o inseto e pulverização sobre o ramo caulinar jovem de *C. limon*, o qual serviu como hospedeiro para o inseto. Para o poligodial, foram realizadas somente pulverizações diretas sobre ninfas e adultos.

As pulverizações diretas sobre as ninfas e adultos, que estavam dispostos em placa de Petri (15 cm de diâmetro), foram realizadas com o auxílio de um frasco pulverizador, aplicando-se 2 mL por repetição. Posteriormente, os insetos foram transferidos com o auxílio de um pincel entomológico para o conjunto manga de vidro e voil, contendo os ramos jovens que não tiveram contato com as soluções.

Nas pulverizações sobre o ramo de caule jovem, 10 mL de solução foi colocado numa placa de Petri (15 cm diâmetro), formando uma camada residual, na qual foi mergulhado o ramo, por 20 segundos, e depois deixado secar. Em seguida, os insetos, sem contato com o extrato, foram dispostos sobre o ramo e este foi transferido para o conjunto manga de vidro e voil, onde foi mantido durante todo o experimento.

A avaliação da mortalidade dos adultos e mortalidade de ninfas de um dia foi realizada após 24 e 48 horas da aplicação das soluções, considerando-se mortos aqueles insetos que não respondiam ao toque de um pincel entomológico.

Nos bioensaios com a fração e com o composto, separadamente, para cada método de aplicação, foi realizado um delineamento experimental inteiramente casualizado. Para cada tratamento, foram feitas cinco repetições (conjunto manga e voil), contendo cinco insetos (adultos ou ninfas) cada.

Análise dos dados

Os dados de mortalidade média, após 48 h de exposição às soluções, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott Knott, a 0,05% de probabilidade. As concentrações letais medianas (CL₅₀) foram estimadas pela análise de Probit (Finney, 1971), com o auxílio do programa POLO-PC (LeOra Software, 1987).

Para comparar a mortalidade média em função do tempo decorrido após as pulverizações (24 e 48 h), foi realizada a análise conjunta dos dados, uma vez que a razão entre o maior e o menor quadrado médio residual não foi superior a sete (PIMENTEL-GOMES, 1990). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Sisvar® (FERREIRA, 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo revelou uma forte atividade inseticida da fração hexânica do extrato das raízes de *D. brasiliensis* sobre o pulgão-preto dos citros. Foi observado aumento significativo das taxas de mortalidade de ninfas e adultos associadas positivamente com o aumento da concentração da solução da fração hexânica, nas duas formas de aplicação investigadas. Quando as soluções foram aplicadas sobre o inseto, os percentuais máximos de mortalidade para adultos (96 %) e ninfas (100 %) foram observados nas concentrações de 2,0 e 1,0 mg/mL, respectivamente (Figura 4.1 A). De forma semelhante, nas pulverizações realizadas sobre o ramo caulinar do hospedeiro, foram observados 86 % e 76% de mortalidade nos insetos adultos e ninfas, respectivamente, na concentração de 2,0 mg/mL (Figura 4.1 B).

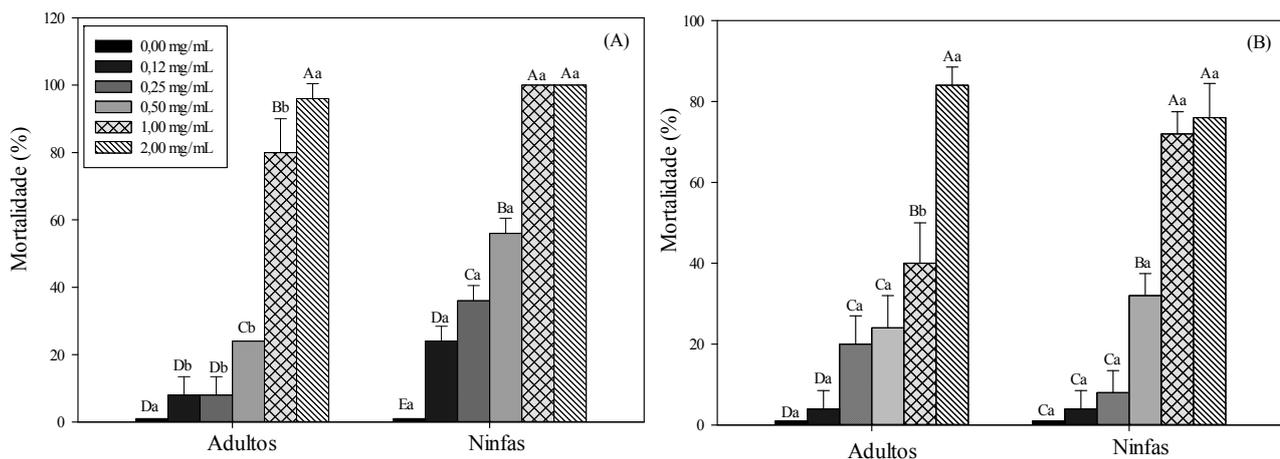


Figura 4.1 - Mortalidade de adultos e ninfas de *T. citricidus* submetidos a aplicações de concentrações da fração hexânica de *D. brasiliensis* sobre o inseto (A) e sobre o ramo caulinar jovem do hospedeiro (B), após 48 horas de exposição. Letras maiúsculas comparam as concentrações dentro de cada estágio de desenvolvimento, e minúsculas cada concentração entre os estágios. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 0,05%.

Quando comparou-se a sensibilidade de adultos e ninfas ao efeito da fração hexânica aplicada sobre o inseto, constatou-se que as ninfas foram mais sensíveis à atividade tóxica em todas as concentrações da fração, com exceção da maior (2 mg/mL). No entanto, quando a aplicação foi realizada no hospedeiro, com exceção da concentração de 1 mg/mL, não foi verificada diferença significativa de sensibilidade entre os dois estágios de desenvolvimento do afídeo (Figuras 4.1 A e 4.1 B).

A fração hexânica aplicada sobre o inseto e sobre o ramo do hospedeiro apresentou, respectivamente, valores de concentração letal mediana (CL₅₀) de 0,620 e 0,932 mg/mL em adultos, e de 0,301 e 0,783 mg/mL em ninfas (Tabela 4.1). Pode-se observar que os valores CL₅₀ da solução aplicada sobre o inseto foram menores do que os registrados para as pulverizações aplicadas sobre o ramo do hospedeiro. A toxicidade via contato direto (tópico) é uma das principais formas de modo de ação de derivados de plantas, tais como óleos essenciais (KNAAK & FIUZA, 2010). Por meio de contato direto, os derivados botânicos podem interagir com o tegumento do inseto, além de atuar em enzimas digestivas e neurológicas (ISMAN, 2006), levando a morte do mesmo.

Tabela 4.1- Coeficiente angular, concentração letal (CL₅₀, em mg/mL) e intervalo de confiança após 48 horas de exposição da fração hexânica de raízes *D. brasiliensis* sobre adultos e ninfas de *T. citricidus*, por meio de aplicação direta sobre o inseto e aplicação no hospedeiro.

Estágio	Coeficiente angular (\pm EP) ^a	CL ₅₀ (IC) ^b	X ² (^c)
Aplicação direta			
Adultos	2,96 \pm 0,42	0,620 (0,471-0,836)	30,62
Ninfas	2,68 \pm 0,42	0,301 (0,231-0,383)	10,32
Aplicação no hospedeiro			
Adultos	1,98 \pm 0,34	0,932 (0,691-1,390)	18,54
Ninfas	2,32 \pm 0,36	0,783 (0,602-0,990)	16,26

^aEP: erro padrão da média. ^bIC: Intervalo de confiança, a 95% de probabilidade do erro. ^cX²: valor de qui-quadrado calculado.

Através dos valores CL₅₀ pode-se observar também que, para ambas as formas de aplicações das soluções, os afídeos no estágio de ninfas foram mais sensíveis à atividade tóxica da fração hexânica de *D. brasiliensis* do que os adultos. Koul (1999) constatou que o extrato de sementes de nim, *Azadirachta indica*, foi tóxico para pulgões ninfas e adultos,

embora a taxa de sobrevivência dos adultos tratados tenha sido maior em comparação as ninfas. De forma semelhante, Tang et al. (2002) registraram maiores valores de concentração letal mediana do inseticida comercial obtido de sementes de nim (Neemix. 4,5% azadirachtin, AZ) para os adultos (30,37 ppm) em comparação as ninfas (3,9 ppm) de *T. citricidus*, após 4 dias de exposição ao produto.

Dentre os principais efeitos fisiológicos em resposta às aplicações de derivados de plantas estão a redução no crescimento, aumento da mortalidade e atraso nas ecdises dos insetos. Estes efeitos estão relacionados com distúrbios do sistema endócrino, como o bloqueio da síntese e liberação de ecdisteróides (MORDUE E NISBET, 2000). Derivados de plantas, como a Azaractina (princípio ativo do nim), causam efeitos severos sobre insetos por interferirem nas ecdises (SANTOS et al., 2004). Ninfas de afídeos podem ser severamente afetadas, uma vez que dependem deste processo para seu desenvolvimento e crescimento. Ecdises podem ser interrompidas, causando uma elevada mortalidade do inseto ainda no estágio de ninfas ou período de pupa (MARTINEZ et al., 2002).

Em termos de concentrações efetivas de extratos botânicos para o controle de espécies de insetos-pragas, estudos prévios apontam concentrações letais medianas (CL_{50}), em mg/mL, variando de 0,45 a 20 (SILVA et al., 2007; GONZAGA et al., 2008; CRUZ-ESTRADA et al., 2013; MUNGENGE, et al., 2014). No presente trabalho, concentrações letais medianas para adultos e ninfas sob o efeito das aplicações da fração hexânica de raízes de *D. brasiliensis* foram observadas em valores de até 0,93 mg/mL. Dessa forma, as efetivas concentrações avaliadas no presente estudo podem ser consideradas baixas, o que indica o potencial de *D. brasiliensis* como espécie doadora de compostos com potencial inseticida.

Através da análise conjunta dos valores de mortalidade média de adultos e ninfas de *T. citricidus* em função do tempo decorrido após as aplicações das soluções da fração hexânica, observou-se que as ninfas foram mais sensíveis as duas formas de aplicação das soluções nas primeiras 24 horas de exposição. Ao final deste período, o percentual máximo de mortalidade (42 %) foi observado para as ninfas que receberam aplicações diretas das soluções. Ao contrário, para os afídeos adultos, a mortalidade foi mais pronunciada ao final das 48 horas de exposição (Figura 4.2). A morte dos insetos em um curto período de tempo demonstra o efeito imediato da fração hexânica de *D. brasiliensis*, particularmente sobre as ninfas de *T. citricidus* e, isso indica um aspecto importante devido à possibilidade de perda

do produto pela ação da chuva após a aplicação, conforme destacado por Gonzaga et al., (2008).

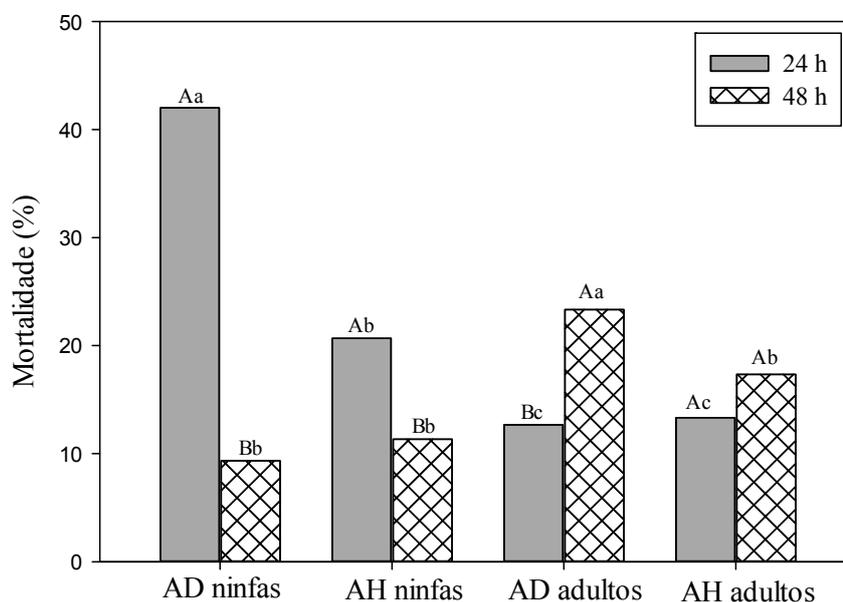


Figura 4.2 - Mortalidade (%) de ninfas e adultos de *T. citricidus* após 24 e 48 horas de exposição às soluções da fração hexânica de raízes de *D. brasiliensis*, por meio de aplicações diretas sobre o inseto (AD) e aplicações sobre o ramo do hospedeiro (AH). Letras maiúsculas comparam os tempos de exposição dentro de cada tratamento e minúsculas comparam cada tempo entre os tratamentos. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 0,05%.

Adultos e ninfas de *T. citricidus* apresentaram grande sensibilidade aos efeitos da fração hexânica de raízes de *D. brasiliensis* quando esta foi pulverizada diretamente sobre os mesmos, embora as aplicações sobre os ramos do hospedeiro também tenham ocasionado elevados percentuais de mortalidade. Desta forma, os resultados do presente trabalho comprovam a elevada atividade inseticida da fração hexânica de raízes de *D. brasiliensis*. Ações inseticidas também foram descritas para outras espécies do gênero *Drimys* (ZAPATA et al., 2009; BOHM et al., 2009; ZAPATA et al., 2010). A significativa atividade da fração hexânica sobre a mortalidade *T. citricidus* pode ser explicada pela presença de compostos sesquiterpenos do grupo drimanos. Em estudos prévios, o fracionamento do extrato hexânico do caule de *D. brasiliensis* permitiu a identificação de substâncias desta classe de compostos, destacando-se a presença do poligodial (MALHEIROS et al., 2005; LAGO et al., 2010; CÔRREA et al., 2011). Compostos drimanos isolados de plantas são relatados pela grande variedade de atividades biológicas, com destaque para potencial deterrente e inseticida contra herbívoros (JANSEN & GROOT, 2004).

No presente trabalho, o fracionamento da fração hexânica das raízes de *D. brasiliensis* levou ao isolamento do composto poligodial, reportado pela primeira vez em raízes da espécie. O composto apresentou elevado efeito inseticida sobre adultos e ninfas de *T. citricidus*. O percentual de mortalidade aumentou significativamente com o aumento das concentrações do composto. Na maior concentração testada (500 $\mu\text{g/mL}$), foram observados os percentuais máximos de mortalidade para ninfas (96 %) e adultos (76 %). De forma semelhante ao efeito observado na aplicação da fração hexânica, o estágio de desenvolvimento de ninfas foi mais sensível ao efeito das diferentes concentrações do composto poligodial, quando comparados aos adultos (Figura 4.3).

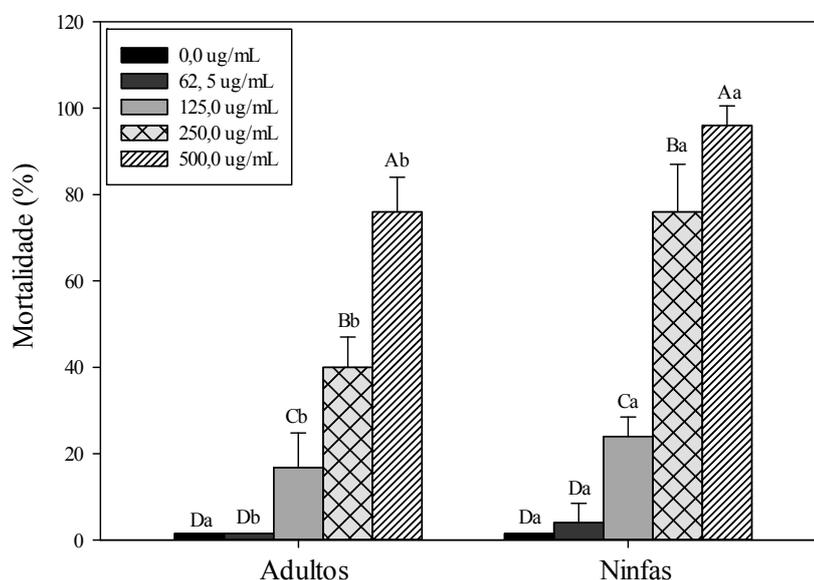


Figura 4.3 - Mortalidade de adultos e ninfas de *T. citricidus* submetidos a aplicação direta de diferentes concentrações do poligodial, isolado de raízes de *D. brasiliensis*, após 48 horas de exposição. Letras maiúsculas comparam as concentrações dentro de cada estágio de desenvolvimento, e minúsculas cada concentração entre os estágios. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 0,05 %.

Os valores de concentrações letais medianas (CL_{50}) com o poligodial foram de 293,8 e 176,77 $\mu\text{g/mL}$ para adultos e ninfas de *T. citricidus*, respectivamente (Tabela 4.2), comprovando seu potencial inseticida para o controle deste afídeo. Em estudo prévio, Montenegro et al. (2013) também demonstraram que o composto ocasionou mortalidade em larvas de *Drosophila melanogaster*, com uma CL_{50} de 60 mg/L .

O poligodial é relatado por ser um potente inibidor alimentar em diferentes espécies de insetos, incluindo *Spodoptera littoralis* (Lepdoptera: Noctuidae) (ZAPATA et al., 2009), *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) (GOLS et al., 1996),

Bemisia tabaci (Hemiptera: Aleyrodidae) (PROTA et al., 2013) e *Nasonovia ribisnigri* (Homoptera: Aphididae) (ZAPATA et al., 2010). A atividade de inibição da alimentação ocasionada por compostos do grupo drimanos, incluindo o poligodial, está relacionada aos seus efeitos sobre quimiorreceptores (SCHOONHOVEN & FU-SHUN, 1989; MORENO-OSÓRIO et al., 2008). Embora o poligodial atue principalmente por inibição da alimentação, alguns autores relatam que, quando ingerido, o composto pode afetar a locomoção e prejudicar a utilização dos alimentos ingeridos, o que indica um efeito tóxico pós-ingestão, resultando na redução do crescimento e/ou mortalidade do inseto (MESSCHENDORP et al., 2000; ZAPATA et al., 2009).

Tabela 4.2 - Coeficiente angular, concentração letal (CL₅₀, em µg/mL) e intervalo de confiança após 48 horas de exposição de soluções do composto poligodial, isolado de raízes *D. brasiliensis*, sobre adultos e ninfas de *T. citricidus*, por meio de aplicações direta no inseto.

Estágio	Coeficiente angular (± EP) ^a	CL ₅₀ (IC) ^b	X ² (^c)
Adultos	3,15 ± 0,58	293,86 (234,9-388,9)	10,87
Ninfas	4,07 ± 0,64	176,77 (145,6-214,6)	16,07

^aEP: erro padrão da média. ^bIC: Intervalo de confiança, a 95% de probabilidade do erro. ^cX²: valor de qui-quadrado calculado.

A fração hexânica e o poligodial oriundos das raízes de *D. brasiliensis* causaram toxicidade sobre *T. citricidus*, provocando elevada mortalidade nas fases de ninfas e adultos, após 48 horas de exposição às soluções. Estes resultados comprovam que o efeito inseticida do extrato hexânico de raízes de *D. brasiliensis* se deve, provavelmente, a presença do poligodial. No entanto, mesmo que se tenha demonstrado que a toxicidade de *D. brasiliensis* sobre *T. citricidus* pode ser devida a presença deste drimano, é importante destacar que, do ponto de vista econômico e agroecológico, a utilização de extratos de plantas brutos ou semipurificados pode ser mais conveniente. Não se pode excluir a possibilidade que os sesquiterpenos são capazes de interagir com outras classes de metabólitos e a sinergia contribua para o aumento da atividade (ZAPATA et al., 2009). Além disso, a utilização de extratos, com uma grande variedade de metabólitos, ajuda a retardar os problemas de resistência de pragas agrícolas (CHAPMAN, 2003; ISMAN, 2006), e constituem-se uma alternativa viável pela possibilidade de serem preparados na propriedade e utilizados, sobretudo, por pequenos produtores rurais (SANTA CECILIA et al., 2010). Diante dos resultados obtidos neste estudo, *D. brasiliensis* pode ser considerada

uma espécie promissora para o desenvolvimento de inseticidas botânicos úteis no manejo integrado do pulgão-preto dos citros, dentro do contexto de produção agrícola que adota práticas mais sustentáveis.

CONCLUSÃO

A fração hexânica do extrato bruto de raízes de *D. brasiliensis* ocasionou elevada mortalidade sobre ninfas e adultos de *T. citricidus*. Os menores valores de CL₅₀ foram registrados sobre as ninfas, quando as soluções foram aplicadas diretamente sobre o inseto.

O composto poligodial isolado da fração hexânica aumentou significativamente a mortalidade de *T. citricidus*, em concentração dose-dependente. A atividade inseticida observada para *D. brasiliensis* pode ser devida a presença deste composto.

REFERÊNCIAS

- ADEYEMI, M.M.H. The potential of secondary metabolites in plant material as deterrents against insect pests: A review. **African Journal of Pure and Applied Chemistry**, v. 4, p. 243-246, 2010.
- BALFOUR A., KHAN, A. Effects of *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas on *Toxoptera citricida* Kirkaldy (Homoptera: Aphididae) and its Parasitoid *Lysiphlebus testaceipes* Cresson (Hymenoptera: Braconidae). **Plant Protection Science**, v. 48, p. 123–130, 2012.
- BOHM, L.; ARISMENDI, N.; CIAMPI, L. Nematicidal activity of leaves of common shrub and tree species from Southern Chile against *Meloidogyne hapla*. **Ciencia Investigación Agraria**, v. 36, p. 249-258, 2009.
- CARRERA, A.; CERMELLI, M. Inventario y fluctuación de áfidos alados en Caribe, Venezuela. **Manejo Integrado de Plagas y Agroecología**, v. 69, p. 58-61, 2003.
- CHAPMAN, R., 2003. Contact chemoreception in feeding by phytophagous insects. **Annual Review of Entomology**, v. 48, p. 455-484, 2003.
- CHOCKALINGAM, S.; THENMOZHI, S.; SUNDARI, M.S.N. Larvicidal activity of different products against mosquito larvae. **Journal Environmental Biology**, v. 11, p. 101-104, 1990.

- CORRÊA, D. S.; TEMPONE, A. G.; REIMÃO, J. Q.; TANIWAKI, N. N.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O. F.; SARTORELLI, P.; MECCH, M. C.; LAGO, H. G. Anti-leishmanial and anti-trypanosomal potential of polygodial isolated from stem barks of *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae). **Parasitol Research**, v. 109, p. 231-236, 2011.
- CRUZ-ESTRADA, A.; GAMBOA-ANGULO, M.; BORGES-ARGÁEZ, R.; SÁNCHEZ, E.R. Insecticidal effects of plant extracts on immature whitefly *Bemisia tabaci* Genn. (Hemiptera: Aleyroideae). **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, p. 1-9, 2013.
- DANG, Q. L.; LEE, L. G.; CHOI, Y. H.; , CHOI, G. J.; JANG, K. S.; PARK, M. S.; SOH, H. S.; HAN, Y. H.; LIM, C. H.; KIM, J. C. Insecticidal activities of crude extracts and phospholipids from *Chenopodium ficifolium* against melon and cotton aphid, *Aphis gossypii* **Crop Protection**, v. 29, p. 1124-1129, 2010.
- EHRENDORFER, F., GOTTSBERGER, I.S., GOTTSBERGER, G. Variation on the population, racial, and species level in the primitive relic angiosperm genus *Drimys* (Winteraceae) in South America. **Plant Systematics and Evolution**, v. 132, p. 53-83, 1979.
- FERREIRA, D.F. **Sisvar**: versão 4.2. Lavras: UFLA, 2003.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Manual de Entomologia Agrícola**. Piracicaba: Fealq. 2002. 920pp.
- GOLS, G., VAN LOON, J., MESSCHENDORP, L. Antifeedant and toxic effects of drimanes on Colorado potato beetle larvae. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. v. 79, p. 69-76, 1996.
- GONZAGA, A. D.; GARCIA, M. V. B.; SOUSA, S. G. A.; PY-DANIEL, V.; CORREA, R. S.; RIBEIRO, J.D. Toxicidade de manipueira de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e erva-de-rato (*Palicourea marcgravii* St. Hill) a adultos de *Toxoptera citricida* Kirkaldy (Homoptera: Aphididae). **Acta Amazônica**, v. 38, p. 101-106, 2008.
- HALBERT, S. E.; BROWN, L.G. *Toxoptera citricida* (Kirkaldy), brown citrus aphid - identification, biology and management strategies. Fla. Dept. Agric. & Cons. Serv., Div. Plant Industry, Entomol. Cir. n. 374, 1996.
- ISMAN, M. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, v. 51, p. 45-66, 2006.
- JANSEN, B.; GROOT, A. Occurrence, biological activity and synthesis of drimane sesquiterpenoids. **Natural Product Report**, v. 21, p. 449-477, 2004.

- KIOY, D., GRAY, A.I., WATERMAN, P.G. A comparative study of the stem-bark drimane sesquiterpenes and leaf volatile oils of *Warburgia ugandensis* And *W. Stuhlmannii*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 3535-3538, 1990.
- KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 5, p. 120-132, 2010.
- KOUL, O. Insect growth regulating and antifeedant effects of neem extracts and azadirachtin on two aphid species of ornamental plants. **Journal of Biosciences**, v. 24, p. 85-90, 1999.
- LAGO, G. H. G.; CARVALHO, L. A.C.; SILVA, F. S.; TOYAMA, D. O.; FÁVERO, O. A.; ROMOFF, P. Chemical Composition and Anti-Inflammatory Evaluation of Essential Oils from Leaves and Stem Barks from *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, p.1760 -1765, 2010.
- MALHEIROS, A.; CECHINEL FILHO, V.; SCHMITT, C. B.; YUNES, R. A.; ESCALANTE, A.; SVETAZ, L.; ZACCHINO, S.; MONACHE, F. D. Antifungal activity of drimane sesquiterpenes from *Drimys brasiliensis* using bioassayguided fractionation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8, p. 335–339, 2005.
- MARANGONI, C.; MOURA, N.F.; GARCIA, F.R.M. Utilização de óleos essenciais e extratos de plantas no controle de insetos. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 6, p. 95-112, 2012.
- MACIEL, M.V.; MORAIS, S.M.; BEVILAQUA, C.M.L.; AMÓRA, S.S.A. Extratos vegetais usados no controle de dípteros vetores de zoonoses. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, p. 105-112, 2010.
- MARTINEZ, S. Ação do nim sobre os insetos. In: MARTINEZ, S.S. (Ed.). **O nim - *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção**. Londrina: Iapar, 2002. p. 59-64.
- MESSCHENDORP, L.; GOLS, G.; VAN LOON, J. Behavioral observations of *Pieris brassicae* larvae indicate multiple mechanisms of action of analogous drimane antifeedants. **Entomol. Exp. Appl.**, v. 95, p. 217-227, 2000.
- MORDUE, A. J.; NISBET, A. J. Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its actions against insects. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 29, p. 615-632, 2000.
- MORENO-OSORIO, L.; CORTE, M.; ARMSTRONG, V.; BAILEN, M.; GONZALEZ-COLOMA, A. Antifeedant Activity of Some Polygodial Derivatives. **Z. Naturforsch.**, v. 63, p. 215-220, 2008.
- MONTENEGRO, I.; PINO, L.; WERNER, L.; MADRID, A.; ESPINOZA, L.; MORENO, L.; VILLENA, J.; CUELLAR, M. Comparative Study on the Larvicidal Activity of

Drimane Sesquiterpenes and Nordrimane Compounds against *Drosophila melanogaster* til-til. **Molecules**, v. 18, p. 4192-4208, 2013.

MUNGENGE, C.; ZIMUDZI C.; ZIMBA, M.; NHIWATIWA, T. Phytochemical Screening, Cytotoxicity and Insecticidal Activity of the Fish Poison Plant *Synaptolepis alternifolia* Oliv. (Thymelaeaceae). **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 2, p. 15-19, 2014.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; PEREIRA, F. C; KALAKI, R. B. **O Retrato da Citricultura Brasileira**. Editora Marcos Fava Neves, Ribeirão Preto, SP, 2010, 137 p.

PROTA, N.; BOUWMEESTER, H.J.; JONGSMA, M.A. Comparative antifeedant activities of polygodial and pyrethrins against whiteflies (*Bemisia tabaci*) and aphids (*Myzus persicae*). **Pest Management Science**, 2013.

RANGEL, M.; SANCTIS, B.; FREITAS, J.C.; POLATTO, J.M.; GRANATO, A.C.; BERLINCK, R.J.S.; HAJDU, R. Cytotoxic and neurotoxic activities in extracts of marine sponges Porifera from southeastern Brazilian coast. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 262, p. 31-40, 2001.

RATTAN, R.S. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. **Crop Protection**, v. 29, p. 913-920, 2010.

RIBEIRO, V. L. S.; ROLIM, V.; BORDIGNON, S.; HENRIQUES, A.T.; DORNELES, G. G.; LIMBERGER, R. P.; POSER, G. V. Chemical composition and larvicidal properties of the essential oils from *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasitol Research**, v. 102, p. 531-535, 2008.

RODRÍGUEZ, B., ZAPATA, N., MEDINA, P., VINUELA, E. A complete ¹H and ¹³C NMR data assignment for four drimane sesquiterpenoids isolated from *Drimys winterii*. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 43, p. 82-84, 2005.

ROEL, A.R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável. **Revista Internacional de Desenvolvimento Local**, v. 1, p. 43-50, 2001.

SANTA-CECÍLIA, L.V.C.; SANTA-CECÍLIA, F.V.; PEDROSO, E.C.; SOUSA, M.C.; ABREU6, F.A.; OLIVEIRA, D.F.; CARVALHO, G.A. Extratos de plantas no controle de *Planococcus citri* (Risso, 1813) (Hemiptera: Pseudococcidae) em cafeeiro. **Coffee Science**, v. 5, p. 283-293, 2010.

SANTOS, T. M.; COSTA, N.V.; TORRES, A.L.; JÚNIOR, A. L. B. Effect of neem extract on the cotton aphid. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 1071-1076, 2004.

- SHAALAN, E.A.S.; CANYON, D.; YOUNE, M.W.; ABDEL-WAHAB, H.; MANSOUR, A.H. A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. **Environment International**, v. 31, p. 1149-66, 2005.
- SCHOONHOVEN, L., FU-SHUN, Y. Interference with normal chemoreceptor activity by some sesquiterpenoid antifeedants in an herbivorous insect *Pieris brassicae*. **Journal Insect Physiology**, v. 35, p. 725-728, 1989.
- SILVA, W.C.; RIBEIRO, J.D.; SOUZA, H.M.E.; CORRÊA, R.S. Atividade inseticida de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) sobre *Aetalion* sp. (Hemiptera: Aetalionidae), praga de importância econômica no Amazonas. **Acta Amazônica**, v. 37, p. 293-298, 2007.
- SILVEIRA, A. C. O.; CLAUDINO, V. D.; YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V.; MALHEIROS, A.; CORDOVA, C. M. M.; BELLA CRUZ, A. Antibacterial Activity and Toxicity of *Drimys brasiliensis*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 31, p. 935-40, 2012.
- TANG, Y. Q.; A. A. WEATHERSBEE, A. A.; MAYER, R. T. Effect of Neem Seed Extract on the Brown Citrus Aphid (Homoptera: Aphididae) and its Parasitoid *Lysiphlebus testaceipes* (Hymenoptera: Aphidiidae). **Environmental Entomology**, v. 31, p. 172-176, 2001.
- TOLEDO, F. R.; BARBOSA, J. C.; YAMAMOTO, P. T. Distribuição espacial de *Toxoptera citricida* (Kirkaldy) (Hemiptera: Aphididae) na cultura de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, p. 194-198, 2006.
- WIESBROOK, M.L. Natural indeed: are natural insecticides safer and better than conventional insecticides? **Illinois Pesticide Review**, v. 17, p. 1-3, 2004.
- ZAPATA, N.; BUDIA, F.; VINUELA, E.; MEDINA, P. Antifeedant and growth inhibitory effects of extracts and drimanes of *Drimys winteri* stem bark against *Spodoptera littoralis* (Lep., Noctuidae). **Industrial Crops and Products**, v. 30, p. 119-125, 2009.
- ZAPATA, N.; VARGAS, M.; MEDINA, P.; VIÑUELA, E.; BENJAMÍN RODRÍGUEZ, B.; FERERES, A. The activity of a selected extract of *Drimys winteri* bark and polygodial on settling and probing behavior of the lettuce aphid *Nasonovia ribisnigri*. **Phytoparasitica**, v. 38, p. 191-199, 2010.

CONCLUSÃO GERAL DA TESE

O efeito fitotóxico de *Drimys brasiliensis* é influenciado pela época de coleta, com atividade mais pronunciada em folhas coletadas na estação seca.

Extratos aquosos de diferentes órgãos de *D. brasiliensis* apresentaram atividade inibitória sobre as espécies cultivadas *Triticum aestivum* e *Raphanus sativus*, o que demonstra que todos os órgãos da espécie constituem uma fonte promissora na busca de compostos fitotóxicos.

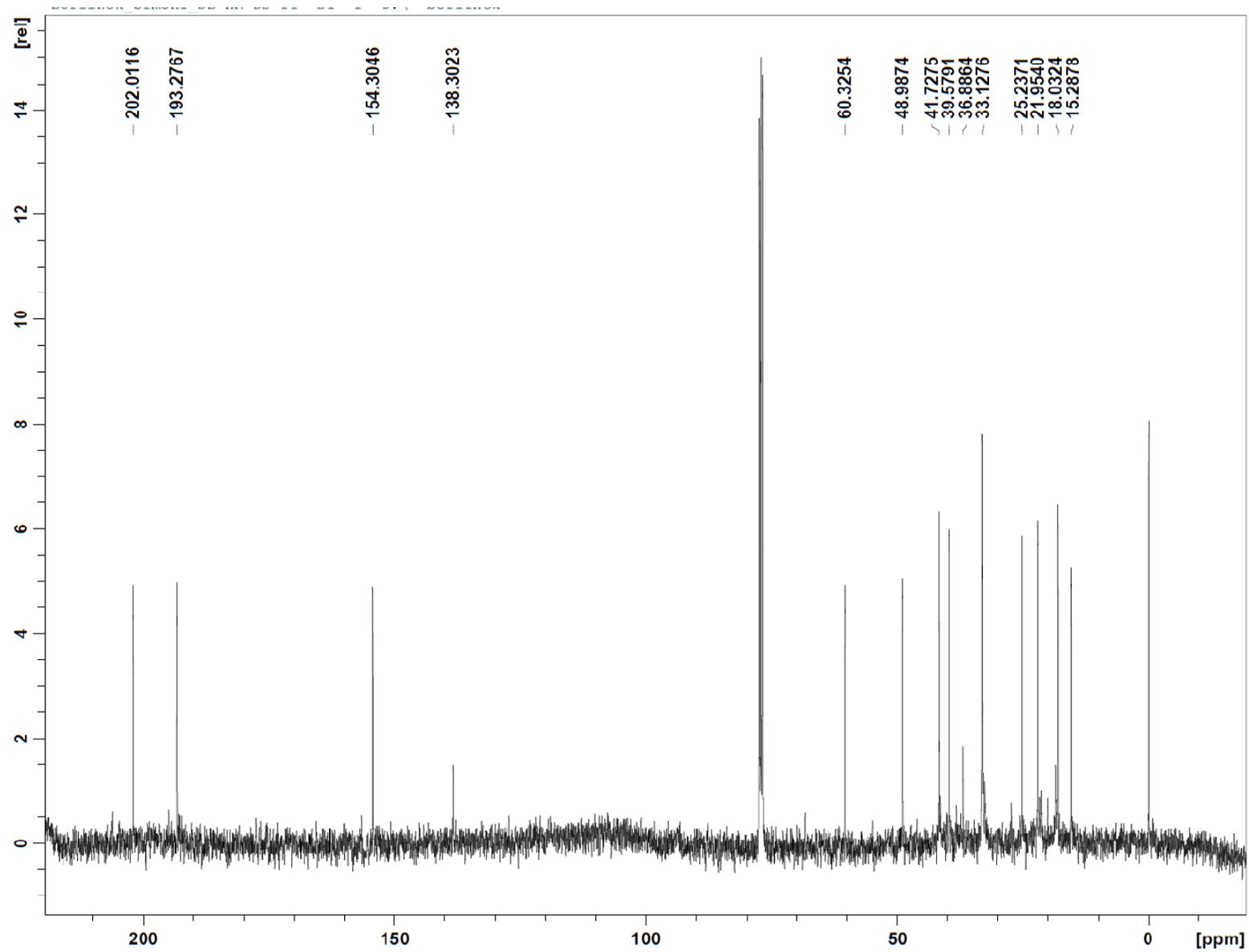
A fração hexânica das raízes de *D. brasiliensis* apresentou grande potencial para inibir parâmetros de germinação e crescimento de plântulas das espécies infestantes *Euphorbia heterophylla* e *Panicum maximum*.

O estudo biomonitorado das frações hexânica e acetato de etila de raízes de *D. brasiliensis* resultou no isolamento de quatro compostos sesquiterpenos: poligodial, poligodial 12 α -acetal, dendocarbin L e (+) fuegin.

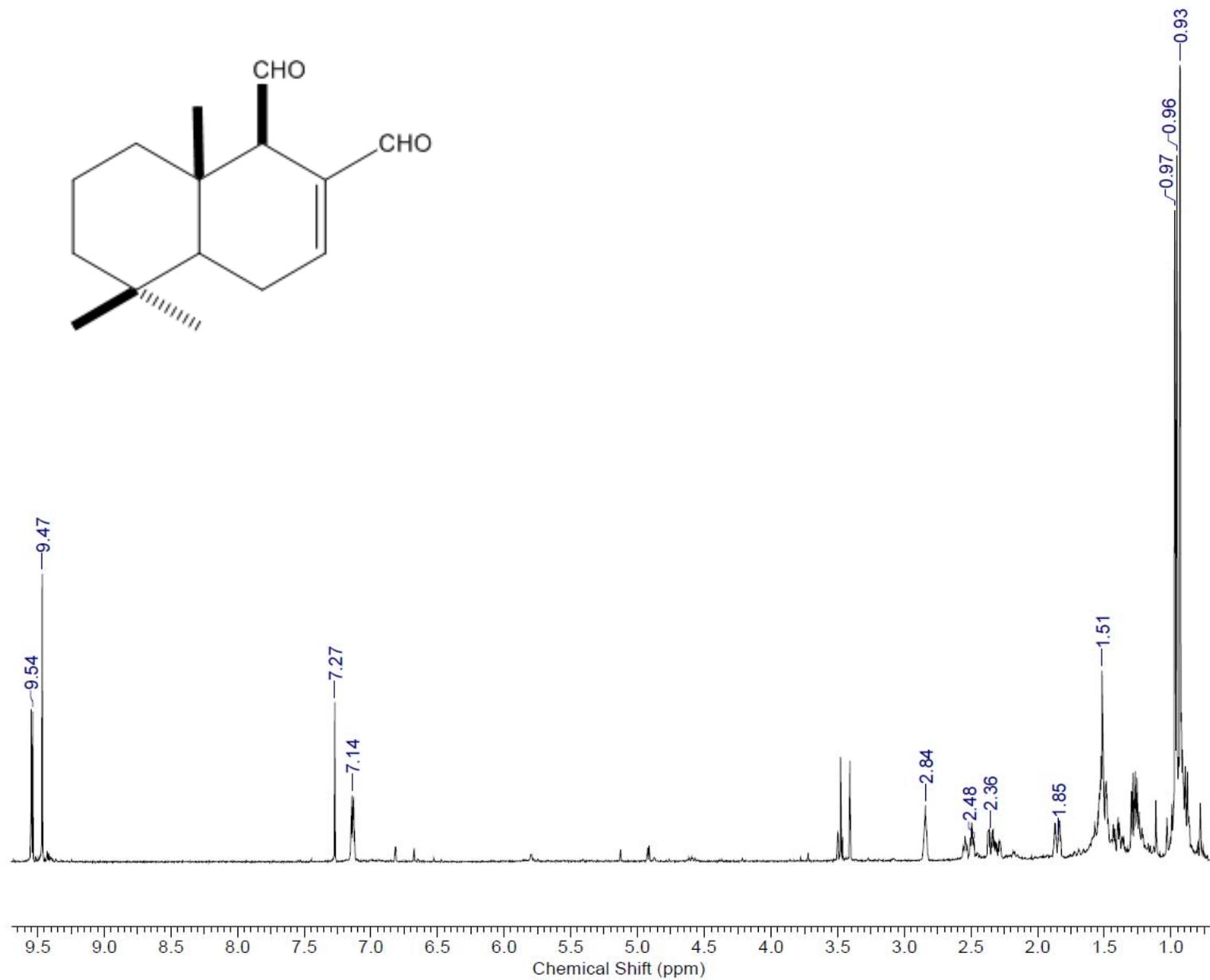
O poligodial, relatado pela primeira vez nas raízes de *D. brasiliensis*, apresenta-se como promissor para ser utilizado como um herbicida de origem natural.

A fração hexânica e o poligodial obtidos de raízes de *D. brasiliensis* apresentaram atividade inseticida sobre *T. citricida*, e oferecem possibilidades para o controle de insetos pragas, baseado em produtos naturais.

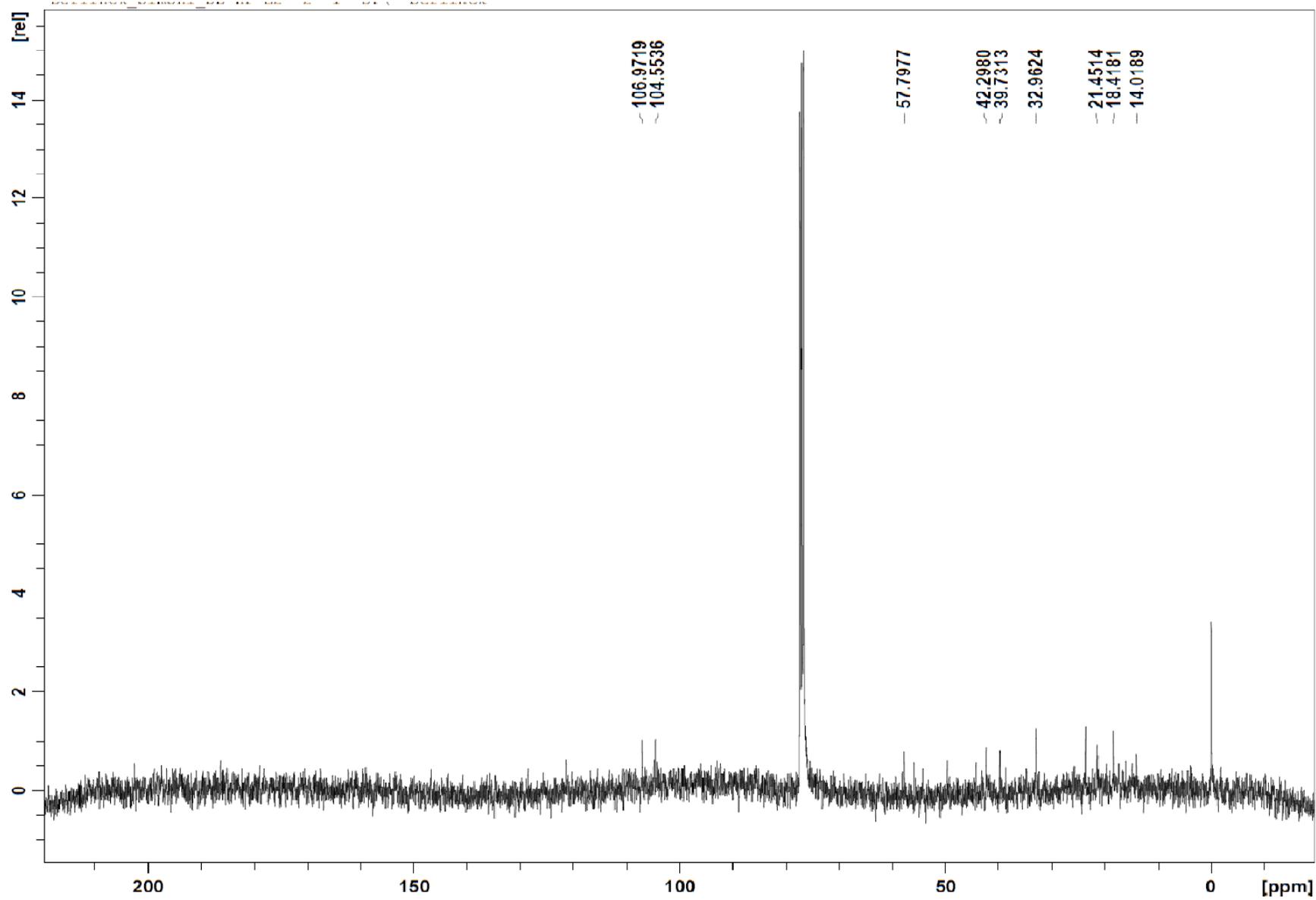
ANEXOS



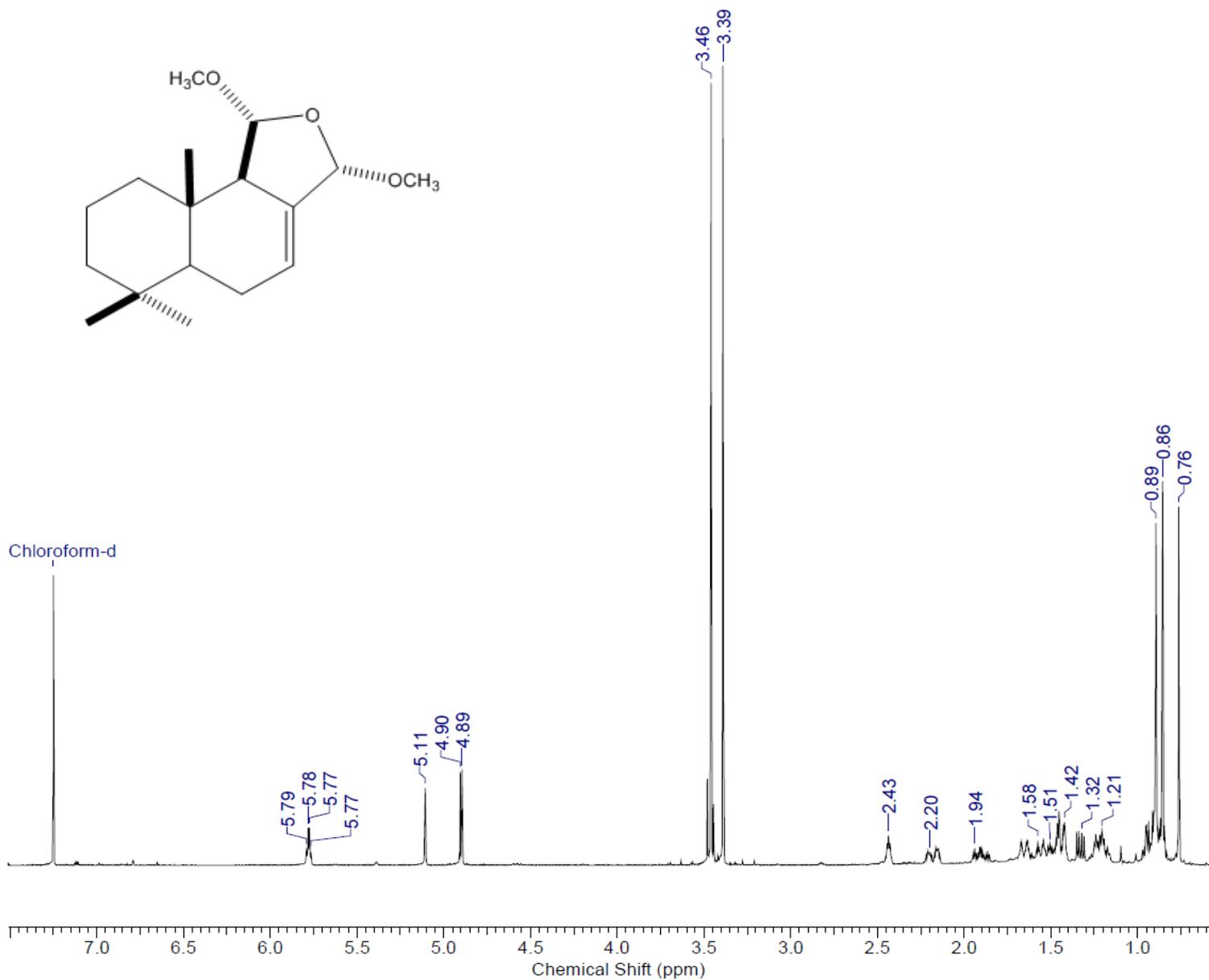
Anexo 1 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do poligodial.

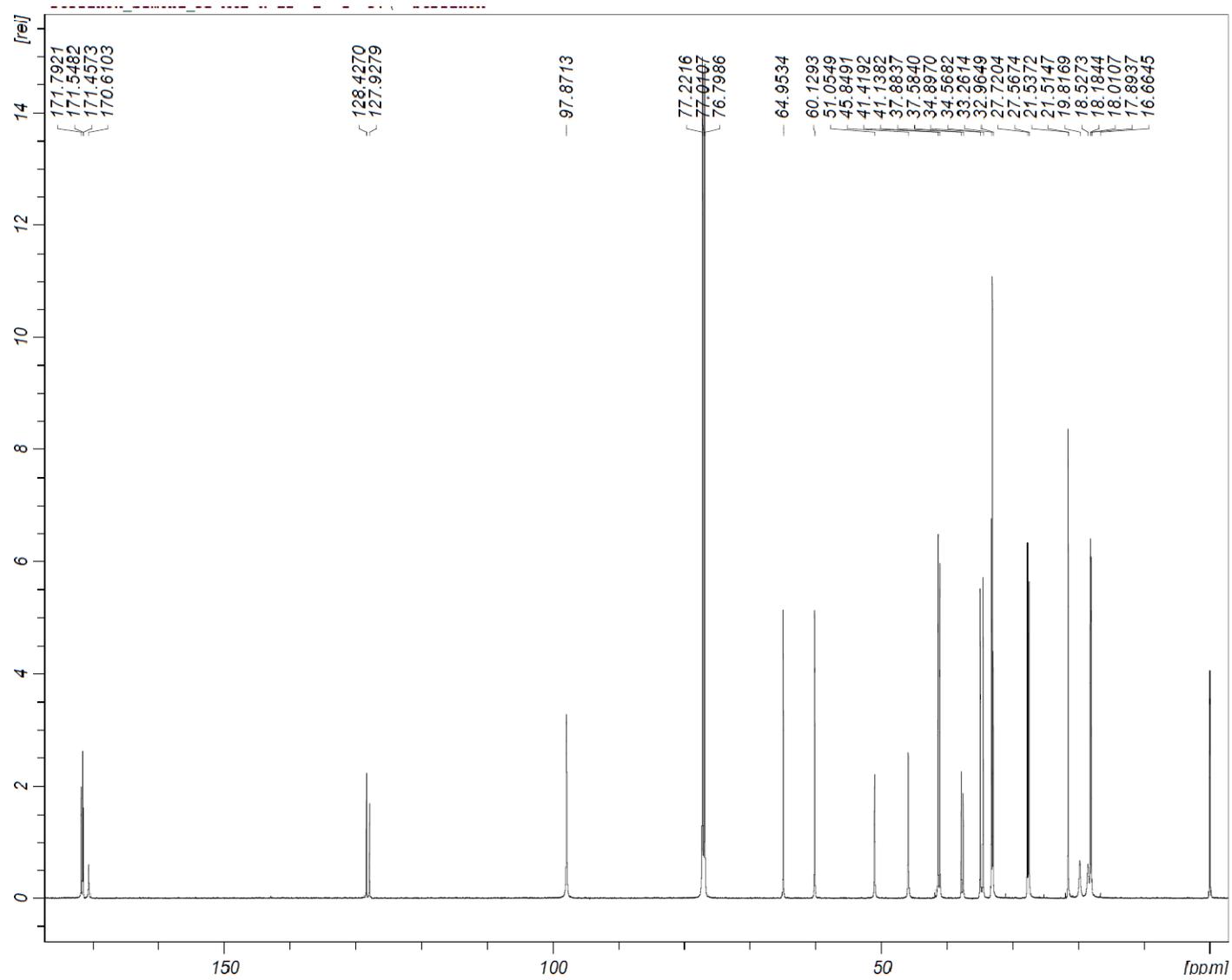


Anexo 2 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do poligodial.

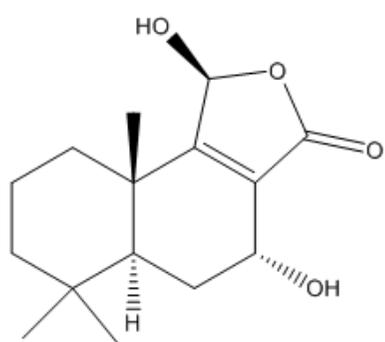


Anexo 3- Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do poligodial 12 α -acetal.

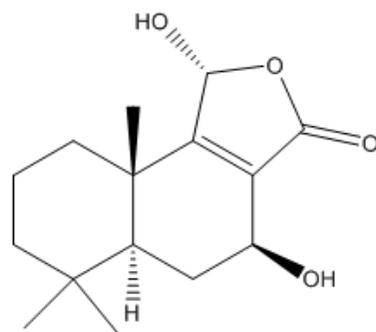
Anexo 4 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do poligodial 12 α -acetal



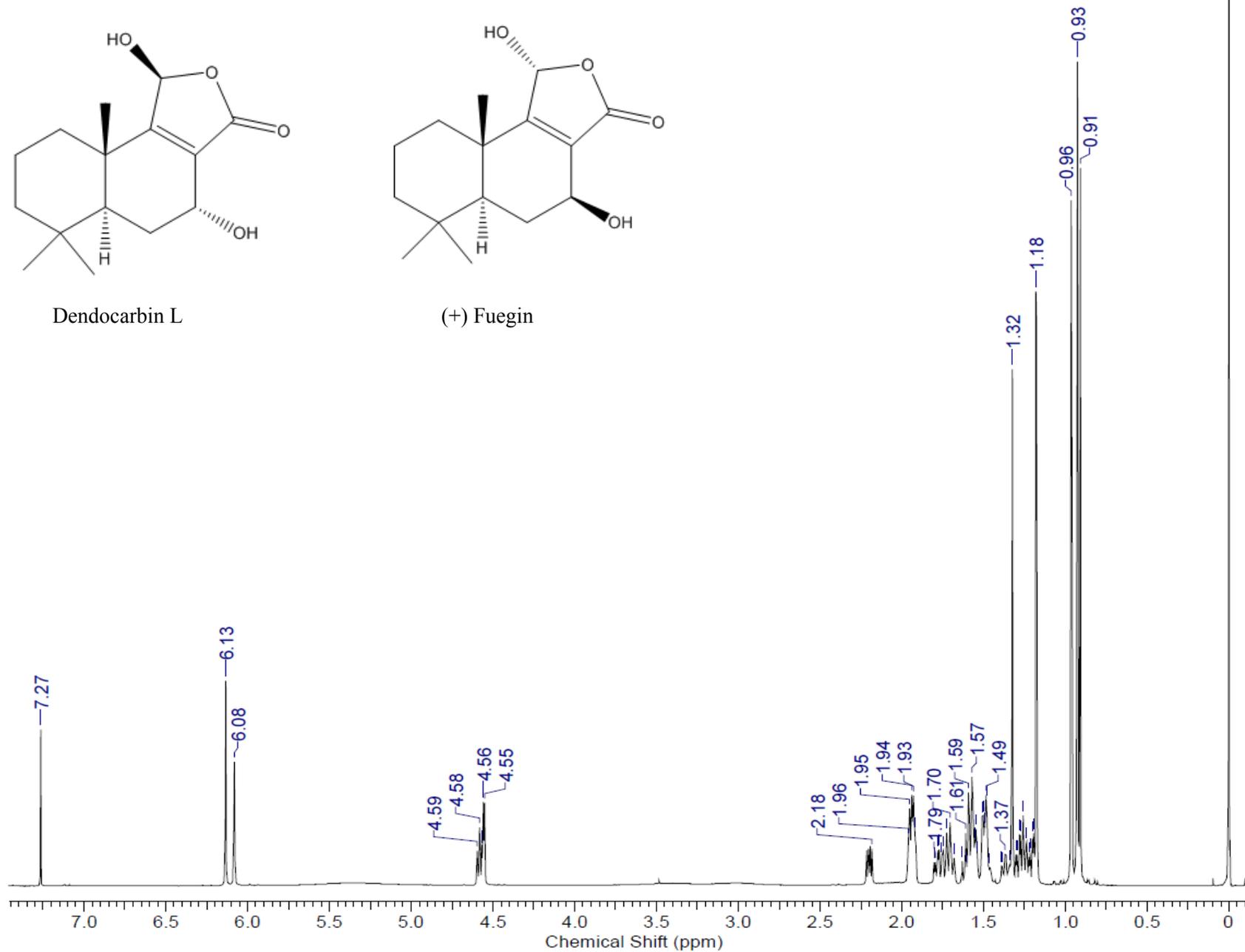
Anexo 5- Espectro de RMN ¹³C (600 MHz, CDCl₃) do dendocarbin L e (+) fuegin.



Dendocarbin L



(+) Fuegin

Anexo 6- Espectro de RMN¹H (400 MHz, CDCl₃) do dendocarbin L e (+) fuegin.