

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

FLÁVIA CEVITHEREZA PONTES

**Potencial fitotóxico, antifúngico e antioxidante de extratos foliares de
Myrcia splendens (Sw.) DC. (Myrtaceae).**

**São Carlos –SP
Brasil
2015**

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

FLÁVIA CEVITHEREZA PONTES

**Potencial fitotóxico, antifúngico e antioxidante de extratos foliares de
Myrcia splendens (Sw) DC. (Myrtaceae).**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências
Biológicas e da Saúde da Universidade
Federal de São Carlos, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre
em Ecologia e Recursos Naturais.

**São Carlos –SP
Brasil
2015**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P814p Pontes, Flávia Cevithereza
Potencial fitotóxico, antifúngico e antioxidante
de extratos foliares de *Myrcia splendens* (Sw) DC.
(Myrtaceae) / Flávia Cevithereza Pontes. -- São
Carlos : UFSCar, 2016.
88 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de
São Carlos, 2015.

1. Myrtaceae. 2. Extração química. 3. Miricitrina.
4. Flavonóides glicosilados. 5. *Alternaria alternata*.
I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Flávia Cevithereza Pontes, realizada em 27/03/2015:

Sonia Gualtieri

Profa. Dra. Sonia Cristliha Juliano Gualtieri
UFSCar

Maristela Imatomi

Profa. Dra. Maristela Imatomi
UFSCar

Alberto José Cavalheiro

Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro
UNESP

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meus caminhos e proporcionar muitas bênçãos em minha vida.

Ao meu pai, José Maria, por todo apoio. Agradeço por todo amor e por todas as conversas, dicas, livros e por todo conhecimento que me passou. Obrigada por me proporcionar condições para que eu pudesse chegar até aqui.

A minha mãe, por todo amor e puxões de orelha. Pela preocupação e pelos ensinamentos que me foram tão importantes.

Às minhas avós tão queridas, por todo amor, orações, atenção e cuidado comigo.

Agradeço ao meu tio Neneco, pelos conselhos que me são tão preciosos e também a toda minha família, que são meu porto seguro.

Ao Edu por todos os anos de boa convivência, pela paciência sem fim, carinho e companheirismo. Por todo suporte que me deu e por toda ajuda quando eu levava trabalho pra casa!

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

Ao professor Dr. Alberto José Cavalheiro, do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, por toda ajuda no desenvolvimento do estudo fitoquímico e, especialmente, por disponibilizar espaço, equipamentos e material para a realização do trabalho.

À técnica do Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais do IQ da UNESP-Araraquara, Dra. Juliana Rodrigues, por ter sido muito atenciosa sempre e, com muita paciência, entender minhas limitações e me auxiliar nos experimentos do estudo fitoquímico.

Ao Dr. Nivaldo Boralle e Dra. Lucinéia Vizotto do Laboratório II de RMN do IQ da UNESP de Araraquara por toda paciência e atenção que tiveram comigo e pela ajuda com as análises espectroscópicas de RMN.

Ao José Luis por ter sido tão solícito em me ajudar com as análises dos espectros de RMN, pelas dicas e ajuda com a bibliografia e por tirar minhas infinitas dúvidas.

Às professoras que compuseram a banca de qualificação, Dra. Silmara Fanti, Dra. Maristela Imatomi e Dra. Paula Novaes, pelas sugestões valiosas.

A todos os colegas do laboratório de ecofisiologia de sementes, pela sincera amizade que cultivamos, pela convivência, e conhecimentos compartilhados. Muito brigada por toda parceria!

À Dra. Maristela por todas as dicas muito importantes. Ao Eduardo pela ajuda com os antioxidantes. Ao Leandro e Guta por me ajudarem com os fungos. À Vivi pela amizade, desabafos e conhecimentos compartilhados.

Aos técnicos Carlos Casali e José Roberto Sanches por toda ajuda no laboratório.

Agradeço também aos amigos especiais de Monte Santo, por toda amizade e por estarem sempre ao meu lado, permitindo que meus momentos de folga tenham sido tão divertidos. Vocês são demais!

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

Ao CNPq pela bolsa de estudos e suporte financeiro.

RESUMO GERAL

Ao longo do seu processo evolutivo, as plantas desenvolveram rotas biossintéticas pelas quais produzem e acumulam uma imensa variedade de compostos secundários, que recebem este nome por não estarem diretamente envolvidos nos processos primários de crescimento e desenvolvimento vegetal. Muitos desses compostos secundários são responsáveis pela defesa química das plantas contra patógenos, herbívoros, plantas competidoras, radiação ultravioleta e outros estresses ambientais. A produção de metabólitos secundários pode variar quantitativa e qualitativamente entre indivíduos de uma mesma espécie, entre plantas de espécies diferentes, entre órgãos, entre estágios do desenvolvimento vegetal e sobre influências de fatores ambientais. Os estudos realizados sobre os efeitos biológicos destes compostos representam uma importante ferramenta para o desenvolvimento de agroquímicos naturais mais específicos e menos prejudiciais ao ambiente, bem como de medicamentos e conservantes naturais para a indústria alimentícia. *Myrcia splendens* (Sw.) DC. é uma espécie arbórea encontrada no cerrado brasileiro e existem poucos os trabalhos publicados que tratam de investigações do potencial desta espécie e de seus metabólitos secundários para atuarem como pesticidas naturais, antioxidantes e antifúngicos. A metodologia empregada para a extração de metabólitos secundários pode determinar a constituição e rendimento dos extratos e influenciar a atividade dos mesmos. Nesse sentido, no primeiro capítulo deste trabalho foram realizadas investigações sobre o potencial fitotóxico de extratos de folhas jovens de *M. splendens* oriundos de duas metodologias de extração diferentes. O extrato 2C teve a maior atividade fitotóxica geral, se mostrando promissor na busca de substâncias fitotóxicas. No segundo capítulo, foi investigado o potencial fitotóxico de extratos e frações de folhas maduras de *M. splendens* das duas metodologias de extração realizadas e foi identificado um dos metabólitos secundários possivelmente associado à fitotoxicidade das frações mais ativas. A fração 2B apresentou a maior atividade inibitória total e por isso foi fracionada, resultando em 14 frações, que também foram testadas em coleóptilos de trigo. As frações FM8 e FM9, que possuíam atividade inibitória e rendimento suficiente, foram submetidas a CLAE para isolamento do composto majoritário. A identificação foi feita por espectros de RMN e revelou que o composto majoritário é a miricitrina (miricetina-3-O-ramnosídeo). No último capítulo, os extratos de folhas maduras de *M. splendens* foram testadas quanto ao seu potencial antioxidante baseado habilidade de reagir com o radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) e antifúngico usando como espécie-alvo o fungo fitopatogênico *Alternaria*

alternata. A maior parte dos extratos apresentaram atividade antioxidante muito forte, especialmente aqueles extraídos com solventes mais polares. Por outro lado, apenas um dos extratos (2B) apresentou atividade inibitória no crescimento micelial do fitopatógeno testado.

Palavras-chave: Myrtaceae, extração química, miricitrina, flavonóides glicosilados, *Alternaria alternata*.

ABSTRACT

During its evolutionary process, plants have developed biosynthetic pathways by which they produce and accumulate a wide variety of secondary compounds that receive this name because they are not directly involved in the primary processes of plant growth and development. Many of these secondary compounds are responsible for chemical protection of plants against pathogens, herbivores, competing plants, ultraviolet radiation and other environmental stresses. The production of secondary metabolites can vary quantitatively and qualitatively between individuals of the same species, between plants of different species, between organs, between stages of plant development and are under influences of environmental factors. Studies of the biological effects of these compounds represent an important tool for the development of more specific and natural pesticides that are less harmful to the environment, as well as drugs and natural preservatives for food. *Myrcia splendens* (Sw.) DC. is a tree species found in the Brazilian cerrado and there are few published papers dealing with this species and its secondary metabolites to act as potential natural pesticides, antioxidant and antifungal. The methodology for the extraction of secondary metabolites can determine the composition of extracts and influence the activity of them. In this sense, in the first chapter of this work investigations were carried out on the phytotoxic potential of extracts of *M. splendens* young leaves from two different extraction methodologies. The 2C extract had the highest overall phytotoxic activity, showing promise in the search phytotoxic substances. In the second chapter, we investigate the phytotoxic potential of extracts and fractions of mature leaves of *M. splendens* from the two extraction methods carried out and was identified one of the secondary metabolites possibly associated with the phytotoxicity of the most active fractions. 2B fraction had the highest total inhibitory activity and so was fractionated, resulting in 14 fractions, which were also tested in wheat coleoptile. The FM8 and FM9 fractions, which had inhibitory activity and sufficient income, were subjected to HPLC for isolation of major compound. Identification by NMR spectra revealed that the major compound is miricitrin (myricetin-3-O-rhamnoside). In the last chapter, the extracts of mature leaves of *M. splendens* were tested for their antioxidant potential based on their ability to react with the free radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil) and antifungal potential using the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata* as the target species. Most of the extracts showed a strong antioxidant activity, especially those

extracted with more polar solvents. On the other hand, only one of the extracts (2B) showed inhibitory activity on mycelial growth of the phytopathogenic fungus tested.

Key words: Myrtaceae, chemical extraction, miricitrin, flavonoid glycosides, *Alternaria alternata*.

LISTA DE FIGURAS

Introdução Geral

- Figura 1. Funções ecológicas e fisiológicas dos metabólitos secundários de plantas (WINK, 2010, adaptado)..... 2
- Figura 2. Fatores que influenciam a produção de metabólitos secundários vegetais (GOBBONETO & LOPES, 2007, modificado).3
- Figura 3. Área destacada: extensão do cerrado no Brasil (NOVAES et al., 2013).5
- Figura 4. Fotos de *Myrcia splendens* (IMATOMI, 2004): Indivíduo de fotografado na reserva de cerrado da UFSCar. B: Frutos em diferentes fases de maturação. C: Detalhe do caule. D: Flores. E: Folhas.6

Capítulo I

- Figura 1.1. Fluxograma da obtenção dos extratos de folhas jovens de *Myrcia splendens* por meio das duas metodologias de extração empregadas e os solventes utilizados. (*) Extrato 1C não foi utilizado nos bioensaios.....20
- Figura 1.2. Efeito dos extratos de folhas jovens *Myrcia splendens* sobre o comprimento de coleótilos de trigo (*Triticum aestivum*). (*) indica tratamento que apresenta diferença significativa quando comparado com o controle negativo. (↑) indica tratamento com efeito igual ao do controle positivo na mesma concentração. O controle positivo foi feito com herbicida comercial cujo princípio ativo é o oxifluorfem.....23
- Figura 1.3. Efeito dos extratos de folhas jovens de *Myrcia splendens* sobre o crescimento inicial de plântulas de amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*) e capim-colônia (*Megathyrsus maximus*) em diferentes concentrações. (*) indicam os extratos nas

concentrações que apresentaram diferença significativa quando comparado com o controle negativo. O controle positivo foi feito com herbicida comercial cujo princípio ativo é o oxifluorfem..... 24

Figura 1.4. Anormalidades apresentadas pelas espécies-alvo tratadas com extratos de folha jovem de *Myrcia splendens*. Amendoim-bravo: A- controle; B e C- necrose e atrofia de raiz e inversão gravitrópica; D- enromalento de hipocótilo e atrofia de raiz. Capim-colonião: E- controle; F- inversão gravitrópica; G- necrose e atrofia de raiz; H- necrose e atrofia severa de parte aérea..... 26

Capítulo II

Figura 2.1. Fluxograma da obtenção dos extratos, frações e subfrações de folhas maduras de *Myrcia splendens* por meio das duas metodologias de extração empregadas. (*) Extrato 1A não foi utilizado nos bioensaios 41

Figura 2.2. Esquema de preparo das amostras para realização de CLAE analítica e preparativa, resultando nas subfrações S8a, S8b, S9a e S9b.42

Figura 2.3. Efeito dos extratos de folhas maduras de *Myrcia splendens* sobre o comprimento de coleótilos de trigo (*Triticum aestivum*). (*) indica tratamento que apresenta diferença significativa quando comparado ao controle negativo. O controle positivo foi feito com herbicida comercial cujo princípio ativo é o Oxifluorfem. 46

Figura 2.4. Efeito dos extratos de folhas maduras de *Myrcia splendens* sobre o crescimento inicial de plântulas de amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*) e capim-colonião (*Megathyrus maximus*) em diferentes concentrações. (*) indicam os extratos nas concentrações que apresentaram diferença significativa quando comparado com o controle negativo. O controle positivo foi feito com herbicida comercial cujo princípio ativo é o oxifluorfem. 47

Figura 2.5. Anormalidades apresentadas pelas espécies-alvo tratadas com extratos de folha madura de *Myrcia splendens*. Amendoim-bravo: A- controle; B- necrose e acrofia de raiz; C-

necrose; atrofia de raiz e enrolamento de hipocótilo; D- atrofia de raiz e inversão gravitrópica. Capim-colonião: E- controle; F- inversão gravitrópica; G- necrose e atrofia de raiz; H- necrose e atrofia de parte aérea.50

Figura 2.6. Fotomicrografias de células do metaxilema de amendoim-bravo crescidas com o extrato 2B (acetato etílico) nas concentrações 2,0 mg.mL⁻¹ (A), 1,5 mg.mL⁻¹ (B), 1,25 mg.mL⁻¹ (C), 1,0 mg.mL⁻¹ (D) e o controle negativo (E).52

Figura 2.7 . Variação do comprimento de células de metaxilema radicular de amendoim-bravo em diferentes concentrações do extrato 2B.52

Figura 2.8. Efeito das frações obtidas do extrato 2B (acetato etílico) de folhas maduras de *Myrcia splendens* sobre o comprimento de coleótilos de trigo (*Triticum aestivum*). (*) indica tratamento que apresenta diferença significativa quando comparado ao controle negativo. O controle positivo foi feito com herbicida comercial cujo princípio ativo é o Oxifluorfem.....54

Figura 2.9. Cromatogramas das subfrações obtidas das frações FM8 e FM9 por CLAE analítico utilizando método isocrático (40% de MeOH e H₂O). 55

Figura 2.10. Estrutura da miricetina-3-O-ramnosídeo (miricitrina). 55

Capítulo III

Figura 3.1. Doenças causadas pelo fungo *Alternaria alternata* em citros (KIMATI et al., 2005). A- Mancha marrom de *Alternaria*. B- Mancha foliar de *Alternaria*. C- Podridão negra. 69

Figura 3.2. Fluxograma da obtenção dos extratos de folhas maduras de *Myrcia splendens* por meio das duas metodologias de extração empregadas. (*) Extrato 1A não foi utilizado nos bioensaios. 72

Figura 3.3. Descoramento da solução de DPPH em contato a diferentes concentrações de antioxidante. 75

ANEXOS

ANEXO A – Cromatograma do composto isolado miricitrina com método isocrático MeOH 40% em H ₂ O.	83
ANEXO B – Espectros de ¹ H-RMN referente ao composto isolado.....	84
ANEXO C – Espectro de RMN TOCSY 1D referente ao composto isolado.....	85
ANEXO D – Espectro de ¹³ C-RMN referente ao composto isolado.....	86
ANEXO E- Espectro de RMN HSQC do composto isolado.....	87
ANEXO F- Espectro de RMN HMBC do composto isolado.	88

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1.1 – Rendimentos dos extratos de folhas jovens de *Myrcia splendens*..... 22

Tabela 1.2. Porcentual de plântulas de amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*) crescidas sob o efeito dos extratos 2C (diclorometânico), 3C (acetato etílico), 4C (acetônico), 5C (metanólico), 1D (hexânico), 2D (acetato etílico) e 3D (aquoso) de folhas jovens de *Myrcia splendens* em diferentes concentrações e as anomalias encontradas em cada tratamento: N- necrose; A- atrofia severa; IG- inversão gravitrópica e EH- enrolamento de hipocótilo..... 27

Tabela 1.3. Porcentual de plântulas de capim-colonião (*Megathyrsus maximus*) crescidas sob efeito dos extratos 2C (diclorometânico), 3C (acetato etílico), 4C (acetônico), 5C (metanólico), 1D (hexânico), 2D (acetato etílico) e 3D (aquoso) de folhas jovens de *Myrcia splendens* em diferentes concentrações e as anomalias encontradas em cada tratamento: N- necrose; A- atrofia severa; IG- inversão gravitrópica e EH- enrolamento de hipocótilo..... 27

Tabela 1.4. Ordem decrescente da atividade fitotóxica causada pelos extratos de folhas jovens de *Myrcia splendens* dada pela quantidade de tratamentos com atividade inibitória em relação ao controle negativo. (*) Ocorrência de pelo menos um tratamento com atividade igual ao do herbicida. 28

Capítulo II

Tabela 2.1. Porcentual de plântulas de amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*) crescidas sob efeito dos extratos 2A (diclorometânico), 3A (acetato etílico), 4A (acetônico), 5A (metanólico), 1B (hexânico), 2B (acetato etílico) e 3B (aquoso) de folhas maduras de *Myrcia splendens* em diferentes concentrações e as anomalias encontradas em cada

tratamento: N- necrose; A- atrofia severa; IG- inversão gravitropica e EH- enrolamento de hipocótilo..... 48

Tabela 2.2. Porcentual de plântulas de capim-colonião (*Megathyrsus maximus*) crescidas sob efeito dos extratos 2A (diclorometânico), 3A (acetato etílico), 4A (acetônico), 5A (metanólico), 1B (hexânico), 2B (acetato etílico) e 3B (aquoso) de folhas maduras de *Myrcia splendens* em diferentes concentrações e as anomalias encontradas em cada tratamento: N- necrose; A- atrofia severa; IG- inversão gravitropica e EH- enrolamento de hipocótilo..... 49

Tabela 2.3. Ordem decrescente da atividade fitotóxica causada pelos extratos de folhas maduras de *Myrcia splendens* dada pela quantidade de tratamentos com atividade inibitória em relação ao controle negativo..... 51

Tabela 2.4 – Rendimentos dos extratos de folhas maduras de *Myrcia splendens*.....51

Tabela 2.5. Resultado do fracionamento do extrato 2B contendo o rendimento de cada fração e a polaridade aproximada dos solventes utilizados para obtê-las..... 53

Tabela 2.6. Tabela comparando os dados obtidos pela RMN do composto isolado e dos dados encontrados na bibliografia consultada para miricetina-3-O-ramnosídeo..... 56

Capítulo III

Tabela 3.1. Atividade antioxidante dos extratos de folhas maduras de *Myrcia splendens*. O controle positivo foi feito com o composto puro quercetina. R²- coeficiente de linearidade de cada uma das repetições (I, II e III). IC₅₀- concentração média na qual o tratamento apresenta 50% de inibição. IAA±DP- média do índice de atividade antioxidante ± o desvio padrão. Médias seguidas por letras iguais na coluna não diferem entre si (P<0,05). O poder antioxidante foi determinado de acordo com Sherer e Godoy (2009).....75

Tabela 3.2. Porcentagem de inibição ou estímulo do crescimento micelial do fungo *Alternaria alternata* tratado com os extratos de folhas maduras de *Myrcia splendens* em cada dia de

medição. Valores negativos indicam inibição e valores positivos indicam estímulo. (*) na mesma coluna indicam tratamentos com diferença significativa em relação ao controle negativo em cada dia.....77

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	8
CAPÍTULO I	14
Atividade fitotóxica de extratos de folhas jovens de <i>Myrcia splendens</i> DC.	
RESUMO	15
ABSTRACT	16
Introdução	17
Materiais e Métodos	19
Resultados e Discussão	22
Conclusões	28
Referências.....	29
CAPÍTULO II	35
Estudo fitoquímico e atividade fitotóxica de extratos e frações de folhas maduras de <i>Myrcia splendens</i> (Sw.)DC .	
RESUMO	36
ABSTRACT	37
Introdução	38
Materiais e Métodos	40
Resultados e Discussão	45
Conclusões	57
Referências	57
CAPÍTULO III	66
Atividade antifúngica e antioxidante de folhas maduras de <i>Myrcia splendens</i> (Sw.)DC.	
RESUMO	67
ABSTRACT	68
Introdução	69
Materiais e Métodos	71
Resultados e Discussão	72

Conclusões	78
Referências	78
CONCLUSÕES GERAIS	84

INTRODUÇÃO GERAL

As plantas produzem uma imensa variedade de compostos secundários, que recebem este nome por não estarem diretamente envolvidos nos processos primários de crescimento e desenvolvimento vegetal (KROYMANN, 2011). As plantas são usadas pelas populações humanas há muito tempo, sendo utilizados como extratos ou mesmo na forma de planta fresca ou seca como tinturas, saborizantes, fragrâncias, estimulantes, alucinógenos, inseticidas, venenos e como agentes terapêuticos. Atualmente existem mais de 100.000 substâncias identificadas, que são divididas em três classes principais: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (TAIZ & ZAIGER, 2006; WINK, 2010).

Muitos desses metabólitos desempenham funções importantes para a proteção vegetal contra patógenos (vírus, bactérias e fungos), plantas competidoras e contra herbívoros. Além disso, também podem atuar como sinalizadores para atrair agentes polinizadores e dispersores de sementes. Alguns metabólitos secundários ainda podem ter funções fisiológicas, por exemplo, eles podem atuar como protetores contra a radiação ultravioleta ou como compostos armazenadores de nitrogênio (Fig.1) (CIPOLLINI & LEVEY, 1997; WINK, 2010).

Os tipos e a quantidade de metabólitos secundários podem variar entre indivíduos de uma mesma espécie, entre plantas de espécies diferentes, entre órgãos e também entre estágios de desenvolvimento e é fortemente influenciada por fatores ambientais (WINDSOR et al., 2005; GOBBO-NETO & NETO, 2007; KROYMANN, 2011).

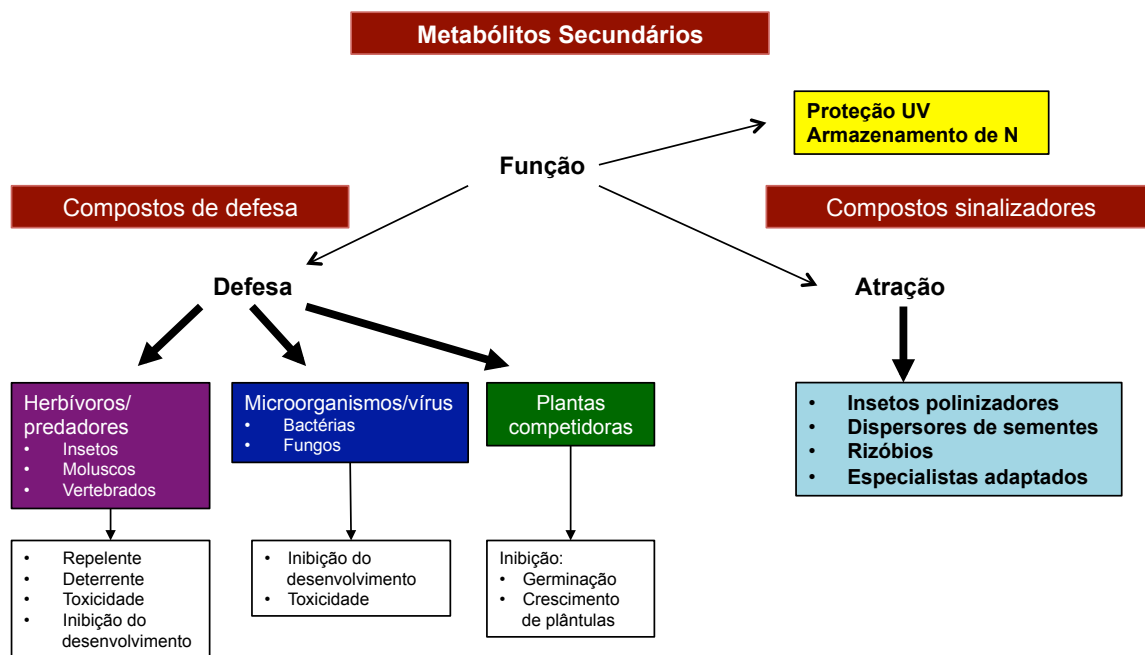


Figura 1. Funções ecológicas e fisiológicas dos metabólitos secundários de plantas (WINK, 2010, adaptado).

Os metabólitos secundários podem estar presentes em diferentes órgãos e estruturas de uma planta incluindo folhas, flores, raízes, frutos, cascas, sementes e grãos de pólen, mas são as folhas e as raízes as principais fontes destes compostos em grande parte das espécies (ALVES; ARRUDA; SOUZA FILHO, 2002; MURPHY, 2003; WU et al., 2009). Estes compostos são liberados diretamente no ambiente por meio da exsudação radicular, volatilização, lixiviação ou ainda, por decomposição do material vegetal (CIPOLLINI; RIGSBY; BARTO, 2012) e a sua produção faz parte de uma estratégia adaptativa das plantas que resulta em uma tolerância a estresses bióticos e abióticos e, portanto, pode ser influenciada pelo estágio de desenvolvimento da planta e por variações ambientais, como variação na temperatura, ritmo circadiano, altitude, índice pluviométrico, radiação ultravioleta, ataques de herbívoros ou patógenos, entre outros, como mostra a Figura 2 (GOBBONETO & LOPES, 2007; RAMAKRISHNA & RAVISHANKAR, 2011).

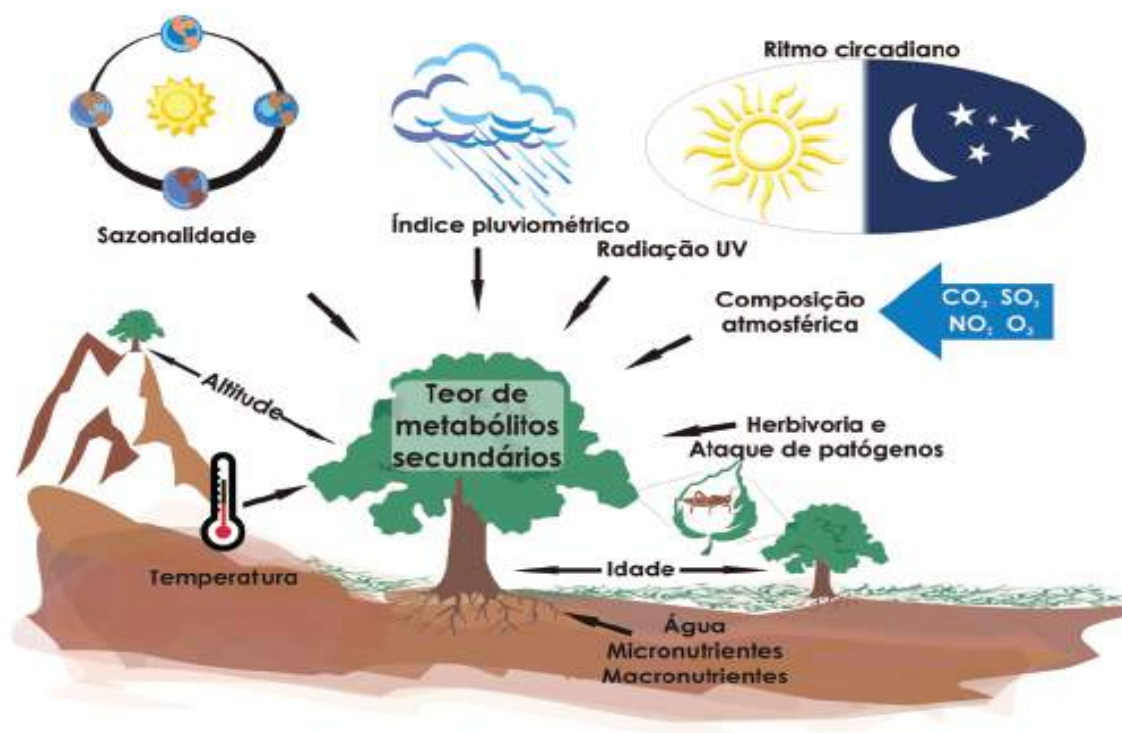


Figura 2. Fatores que influenciam a produção de metabólitos secundários vegetais (GOBBO-NETO & LOPES, 2007, modificado).

Atualmente, o processo produtivo agrícola está cada vez mais dependente dos agrotóxicos e fertilizantes. Segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), no ano de 2008 o Brasil ultrapassou os Estados Unidos e assumiu o posto de maior mercado mundial de agrotóxicos, sendo que os herbicidas representaram 45% do total de agrotóxicos comercializados no mercado nacional, seguido pelos fungicidas (14%), os inseticidas (12%) e as demais categorias juntas (29%) (ANVISA & UFPR, 2012). A ampla utilização de agrotóxicos pode acarretar em efeitos nocivos à saúde humana, como intoxicações, e também uma série de problemas ambientais, seja através da contaminação das comunidades de seres vivos, ou através da sua acumulação nos segmentos bióticos e abióticos dos ecossistemas (PERES & MOREIRA, 2007).

Segundo Wink (2010), como muitas das substâncias do metabolismo secundário vegetal possuem atividade inseticida, fungicida e fitotóxica, elas podem atuar como pesticidas naturais, menos prejudiciais ao ambiente, visto que os compostos naturais não possuem moléculas halogenadas, apresentam menor meia vida e muitos aleloquímicos apresentam mais de um modo de ação na espécie receptora (DUKE et al., 2000; RIMANDO & DUKE, 2006; REIGOSA et al., 2013), o que pode dificultar processos de resistência aos

seus efeitos. Neste contexto, estudos na área de alelopatia são importantes para identificar espécies que possuam compostos com atividades biológicas variadas, entre elas fitotóxica, fungicida, bactericida, inseticida e acaricida, e estes compostos isolados podem ser usados na produção dos biopesticidas (COPPING & DUKE, 2007, OLIVEROS-BASTIDAS, 2008).

Outra atividade biológica que alguns compostos do metabolismo secundário vegetal podem apresentar é a atividade antioxidante. Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) tais como na forma de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$) e ânion superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$) são frequentemente gerados como subprodutos do metabolismo celular regular, mas podem também ser produzidos induzidos por estímulos ambientais (MITTLER, 2002; SOARES & MACHADO, 2007). Nas plantas, a produção de EROs pode ser aumentada por causa de fatores ambientais de estresse como a exposição a níveis elevados de luminosidade, seca, metais pesados, alta concentração de sais, extremos de temperatura, radiação ultra-violeta, poluição do ar, uso de herbicidas e por ataque de patógenos e herbívoros (MALLICK & RAÍ, 1999).

Segundo Soares e Machado (2007), algumas EROs são classificadas como radicais livres por apresentarem elétrons desemparelhados na sua estrutura fazendo com que reajam com biomoléculas como proteínas, DNA e lipídeos, podendo alterar suas funções. Os antioxidantes podem retardar, inibir ou evitar a oxidação dessas moléculas biológicas por meio da eliminação dos radicais livres e diminuição do estresse oxidativo (DURACKOVÁ, 2010;. REUTER et al., 2010). Assim, plantas que apresentam atividade antioxidante são de grande interesse, pois a presença de radicais livres pode estar associada ao desenvolvimento de doenças como o câncer, diabetes, aterosclerose, processos inflamatórios e envelhecimento (FINKEL & HOLBROOK, 2000). Além disso, o estresse oxidativo também é um problema para a indústria alimentícia, modificando o cheiro, sabor e valor nutricional dos alimentos (KRING & BERGER, 2001).

A preocupação dos consumidores a respeito dos conservantes e aditivos químicos adicionados aos alimentos tem levado a um aumento da procura por produtos contendo ingredientes orgânicos e/ou naturais (BREWER & PRESTAT, 2002; JOPPEN, 2006; ROJAS & BREWER, 2008), além da procura por produtos menos agressivos, forçando a indústria de alimentos a procurar alternativas nesta direção (BERGER, 2009).

O Brasil possui uma abundante riqueza de espécies vegetais, tornando-se uma fonte quase inesgotável de exploração na procura por novos compostos bioativos em sua flora nativa (OLIVEIRA, 2009), sendo o cerrado uma de suas mais extensas formações vegetais ocupando cerca de 22% do território nacional (2.036.448 km²) e constituído por três biomas:

campos tropicais, savanas e florestas estacionais (BATALHA, 2011; BRASIL, 2015). Recentes estudos indicam que a flora do cerrado apresenta uma elevada riqueza de espécies, com plantas vasculares e avasculares, totalizando 12.070 espécies de plantas terrestres que ocorrem espontaneamente e uma flora vascular nativa (pteridófitas e fanerógamas) somando 11.627 espécies (FORZZA et al., 2010; MENDONÇA et al., 2008). Devido a esta riqueza, o cerrado passou a ser considerado um dos dois *hotspots* brasileiros, juntamente com a Mata Atlântica (MITTERMEIER et al., 2004).

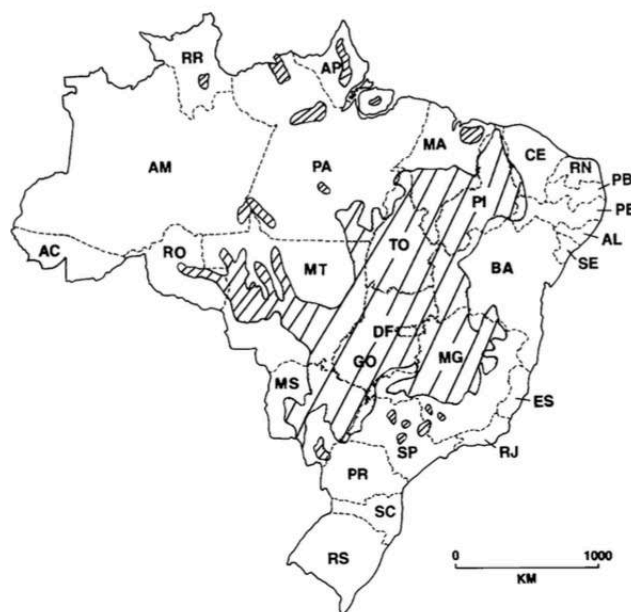


Figura 3. Área destacada: extensão do cerrado no Brasil (NOVAES et al., 2013).

O cerrado possui solos pobres, ácidos e com altos níveis de alumínio (HARIDASAN, 2008), com o clima sazonalmente dividido, com seca de abril a setembro e úmido de outubro a março (KLINK & MACHADO, 2005). Muitas espécies do cerrado são adaptadas ao fogo, pois a ocorrência de incêndios na estação chuvosa é comum e facilita a germinação de algumas sementes, acelera a ciclagem de nutrientes, induz brotamento de gemas laterais e subterrâneas e permite sincronicidade da floração em algumas espécies (COUTINHO, 2002; NOVAES et al., 2013). As espécies vegetais encontradas no cerrado podem ser promissoras na busca de compostos do metabolismo secundário com alguma atividade biológica, pois, de acordo com Chaves e Escudero (1999), compostos bioativos são produzidos em grandes quantidades por plantas submetidas a estresses bióticos ou abióticos.

Myrcia splendens (Sw.) DC. é uma espécie pertencente à família Myrtaceae (Fig.4) encontrada no cerrado e popularmente conhecida como guamirim e folha-miúda. Trata-se de uma espécie arbórea, ocorrendo do México ao sul do Brasil (OLIVEIRA-FILHO & FONTES, 2000; MORAIS & LOMBARDI, 2006). Segundo Oliveira-Filho (2006),

algumas sinónimias desta espécie são *Myrcia acutata* DC., *Myrcia rostrata* DC. e *Myrcia communis* Berg. e *Myrcia fallax* (Rich.) DC.

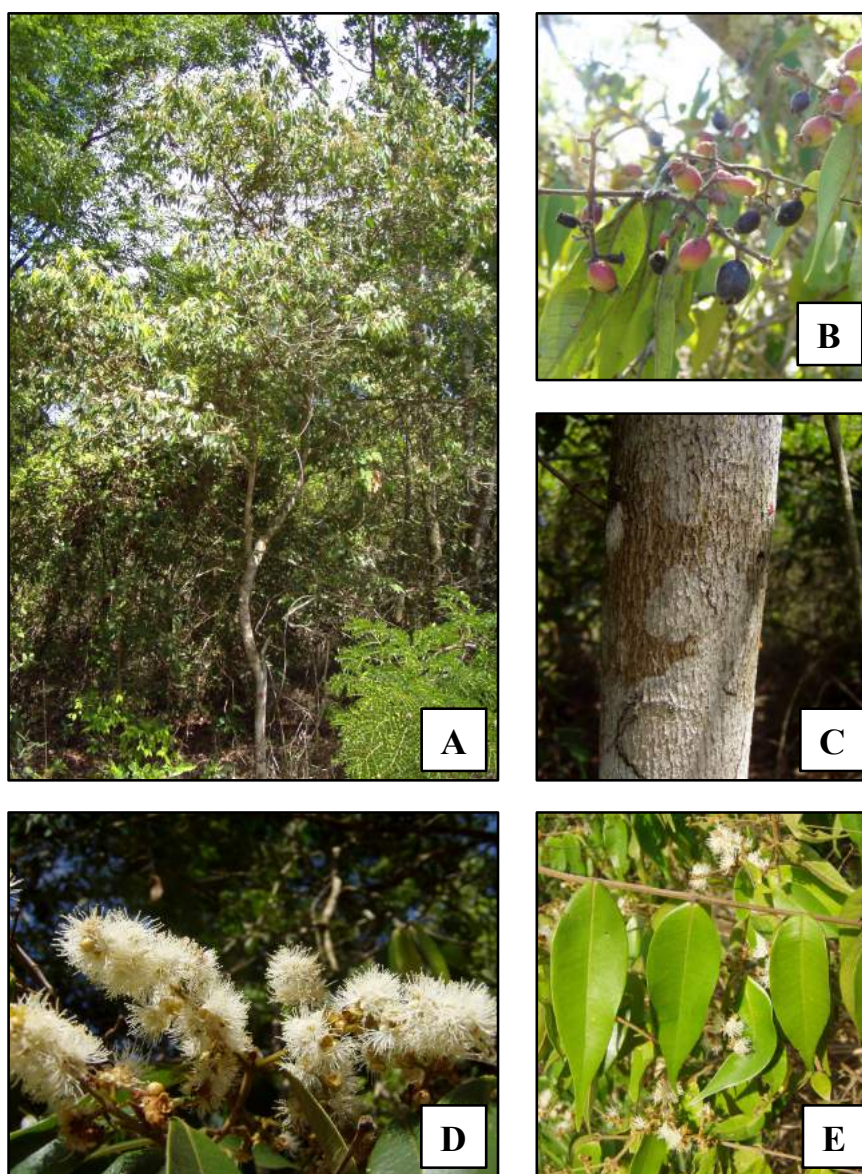


Figura 4. Fotos de *Myrcia splendens* (IMATOMI, 2004): Indivíduo de fotografado na reserva de cerrado da UFSCar. B: Frutos em diferentes estádios de maturação. C: Detalhe do caule. D: Flores. E: Folhas.

Existem poucos trabalhos sobre a fitoquímica e atividades biológicas de *M. splendens*. Em um estudo fitoquímico, Cole, Haber e Setzer (2008) determinaram a composição do óleo essencial de folhas de *M. splendens* coletadas em Monteverde na Costa Rica, identificando um total de 26 compostos, sendo principalmente hidrocarbonetos sesquiterpênicos (55,7%) e sesquiterpenos oxigenados (31,8%).

Recentemente, em um estudo avaliando a atividade antioxidante de extratos *Myrcia splendens* e *Myrcia paulustris*, Moresco e colaboradores (2014) identificaram miricitrina (3-O-ramnosídeo da miricetina) como o composto majoritário no extrato acetato

etílico de *M. splendens*, além de uma alta atividade antioxidante baseada na habilidade de reagir com o radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) nos extratos mais polares desta espécie (acetato etílico e butanólico). Extratos metanólicos de *M. splendens* também apresentaram elevada atividade antioxidante ($IC_{50} \leq 3\mu\text{g/mL}$) estando entre as mais ativas dentre os extratos de 70 espécies vegetais testadas por Scio e colaboradores (2012). Neste mesmo trabalho, o extrato de *M. splendens* também apresentou uma atividade antimicrobiana baixa contra a bactéria *Bacillus cereus*.

Em um estudo com 15 espécies da família Myrtaceae, Imatomi, Novaes e Gualtieri (2013) observaram que o extrato aquoso de folhas de *Myrcia splendens* apresentou efeito inibitório da germinação e crescimento inicial de alface (*Lactuca sativa*), cebola (*Allium cepa*) e tomate (*Solanum lycopersicum*).

Para a extração de substâncias do metabolismo secundário podem ser utilizados métodos de extração química. A extração é uma etapa importante, pois a escolha da metodologia empregada pode determinar a constituição e rendimento dos extratos (HINNEBURG & NEUBERT, 2005), podendo influenciar a atividade dos mesmos. Portanto, quando não se conhece a composição do material vegetal estudado, aconselha-se submetê-lo a sucessivas extrações, com solventes de polaridade crescente, em que os diferentes extratos obtidos contenham compostos também de polaridade crescente (SIMÕES et al., 2004; FALKENBERG; DOS SANTOS; SIMÕES, 2007). Além disso, o uso de mais de um método de extração é recomendado para a determinação do perfil fitoquímico de uma planta, pois dependendo da seletividade dos solventes utilizados na extração a composição química dos extratos pode variar qualitativa e quantitativamente (FALKENBERG; DOS SANTOS; SIMÕES, 2007; MARTINS et al., 2013)

Diante deste contexto, os objetivos desta dissertação foram:

- 1) Avaliar o potencial fitotóxico de extratos de folhas jovens e maduras de *M. splendens* por meio de bioensaios com coleótilos de trigo e de crescimento de plântulas de espécies daninhas de culturas agrícolas;
- 2) Comparar duas metodologias de extração em relação ao rendimento e às bioatividades dos extratos obtidos.
- 3) Realizar o fracionamento biodirigido e o isolamento e identificação de compostos biotivos presentes nas follhas maduras de *M. splendens*.
- 4) Avaliar as atividades antifúngica e antioxidante de extratos de folhas maduras de *M. splendens*.

REFERÊNCIAS

- ALVES, S.M.; ARRUDA, M.S.P. & SOUZA FILHO, A.P.S.. Biossíntese e Distribuição de Substâncias alelopáticas. In: SOUZA FILHO, A. P.S. ALVES, S.M. (Ed.). **Alelopatia: Princípios básicos e aspectos gerais**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2002.
- ANVISA & UFPR. **Seminário de mercado de agrotóxico e regulação**. ANVISA, Brasília, 11 abril de 2012.
- BATALHA, M.A. O cerrado não é um bioma. **Biota Neotropica**, v.11, n.1, 2011.
- BERGER, R.G. Biotechnology of flavours-the next generation. **Biotechnology Letters**, v.31(11), p.1651–9, 2009.
- BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **O Bioma Cerrado**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>> Acesso: Março, 2015.
- BREWER, M.S.; PRESTAT, C. Consumer attitudes towards issues in food safety. **Journal of Food Safety**, v.22(2), p.67–85, 2002.
- CHAVES, N.; ESCUDERO, J.C. Variation of flavonoid synthesis induced by ecological factors. In: Inderjit, Dakshini, K.M.M.; Foy C.L. (eds) **Principles and practices in plant ecology**. Boca Raton: CRC Press, pp 267–285. 1999.
- CIPOLLINI, M.L. & LEVEY, D.J. Secondary metabolites of fleshy vertebrate- dispersed fruits: adaptive hypotheses and implications for seed dispersal. **American Naturalist**, v.150, p. 346–73, 1997.
- CIPOLLINI, D.; RIGSBY, C.M.; BARTO, E.K. Microbes as target and mediators of allelopathy in plants. **Journal of chemical ecology**, v.38(6), p. 714-727, 2012.
- COLE, R.A.; HABER, W.A.; SETZER, W.N. The leaf oil composition of *Myrcia splendens* from Monteverde, Costa Rica. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v.11(1), p. 41-44, 2008.

COPPING L.G. & DUKE S.O. Natural products that have been used commercially as crop protection agents. **Pest Management Science**, v.63, p. 524-554, 2007.

COUTINHO, L.M. O bioma do cerrado. In: Klein, A.L. (Org.) **Eugen Warming e o cerrado brasileiro: um século depois**. São Paulo: Editora da Unesp, 2002.

DUKE, S. O.; DAYAN, F.E.; ROMAGNI J.G.; RIMANDO A.M. Natural products as sources of herbicides: current status and future trends. **Weed Research**, v.40, p.99-111, 2000.

DURACKOVÁ, Z. (2010). Some Current Insights into Oxidative Stress. **Physiological Research**, v.59, n.4, pp. 459-469, 2009.

FALKEMBERG, M. B.; DOS SANTOS, R. I. ; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: de planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.

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

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v.480, p.239-47, 2000.

FORZZA, R.C. et al. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil** [online]. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. Introdução: síntese da diversidade brasileira, p. 19-42. Vol. 1. Disponível em: <<http://books.scielo.org/id/z3529/pdf/forzza-9788560035083-04.pdf>>.

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

HARIDASAN, M. Nutritional adaptations of native plants of the cerrado biome in acid soils. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.20(3), p.183-195, 2008.

HINNEBURG, I.; NEUBERT, R.H.H. Influence of extraction parameters on the

phytochemical characteristics of extracts from buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) Herb. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.53; p.3-7, 2005.

IMATOMI, M.; NOVAES, P. & GUALTIERI, S.C.J. Interspecific variation in allelopathic potencial of the Myrtaceae Family. **Acta Botanica Brasilica**, v.24, p.54-61, 2013.

INTERNATIONAL ALLELOPATHY SOCIETY. [Online] Disponível em:
<<http://www.international-allelopathy-society.org>> Acesso: Dezembro, 2013.

JOPPEN, L.. Taking out the chemistry. *Food Engineering & Ingredients*, v. 31(2), p.38–9, 2006.

KLINK, C.A. & MACHADO R.B. A conservação do cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, p 147-155, 2005.

KRING, U. & BERGER, R.G. Antioxidant activity of some roasted foods. **Journal Food Chemistry**, vol. 72, no. 2, p. 223-229, 2001.

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

MALLICK, N. & RAI, L.C. Response of the antioxidant systems of the nitrogen fixing cyanobacterium *Anabaena doliolum* to the copper. **Journal of Plant Physiology**, v. 155, p. 146-149, 1999.

MARTINS, F.S.; BORGES, L.L.; PAULA, J.R.; CONCEIÇÃO, E.C. Impact of different extraction methods on the quality of *Dipteryx alata* extracts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.23(3), p.521-526, 2013.

MENDONÇA, R.C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T. et al. Flora vascular do bioma Cerrado: checklist com 12.356 espécies. In: Sano, S.M.; Almeida, S.P.; Ribeiro, J.P. (eds.). **Cerrado: ecologia e flora**. Brasília: Embrapa Informação e Tecnologia. p. 422-442. 2008.

MITTERMEIER, R.A; ROBLES-GIL, P.; HOFFMANN, M. et al. **Hotspots revisited**.

México City: CEMEX/ Agrupación Sierra Madre, 2004.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant in Science**, v. 9, p. 405-410, 2002.

MORAIS, P. O. & LOMBARDI, J. A. A Família Myrtaceae na Reserva Particular do Patrimônio Natural da Serra do Caraça, Catas Altas, Minas Gerais, Brasil. **Lundiana** v.7(1), p.3-32, 2006.

MORESCO, H.H.; PEREIRA, M.; BRETANHA, L.C. et al. Myricitrin as the main constituent of two species of Myrcia. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v.4(2), p.001-007, 2014.

MURPHY, S.D. 2003. Biochemical and physiological aspects of pollen allelopathy In: INDERJIT, M.; MALLIK A. U. (eds.). **Chemical Ecology of plant: allelopathy of aquatic and terrestrial ecosystems**. Springer. p. 245-260

NOVAES, P., MOLINILLO, J.M.G., VARELA, R.M., MACIAS, F.A. Ecological phytochemistry of Cerrado (Brazilian savanna) plants. **Phytochemistry Reviews**, v.12, p.839-855, 2013.

OLIVEIRA, S. C. C. **Estudo alelopático de espécies do gênero Solanum do Distrito Federal**. PhD Thesis. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2009.

OLIVEIRA-FILHO, A. T. **Catálogo das árvores nativas de Minas Gerais**: mapeamento e inventário da flora nativa e dos reflorestamentos de Minas Gerais. Lavras: UFLA. 2006.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.& FONTES, M. A. L. Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in southeastern Brazil and the influence of climate. **Biotropica**, v.32(4b), p. 793-810. 2000.

OLIVEROS-BASTIDAS, A. El fenómeno alelopático: El concepto, las estrategias de estudio y su aplicación en la búsqueda de herbicidas naturales. **Revista Química Viva**, v.1(7), p. 2-34, 2008.

PERES, F. & MOREIRA, J.C. Saúde e ambiente e sua relação com o consumo de agrotóxicos em um pólo agrícola do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v.23(4), p.S612-S621, 2007.

RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v.6, p. 1720-1731, 2011.

REIGOSA, M.; GOMES, A.S.; FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. Allelopathic research in Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v.27 (4), p.629-646, 2013.

REUTER, S.; GUPTA, S.C.; CHATURVEDI, M.M.; AGGARWAL, B.B. Oxidative Stress, Inflammation, and Cancer: How are They Linked?. **Free Radical Biology & Medicine**, v.49, n.11, p. 1603-1616, 2010.

RICE, E.L. **Allelopathy**. New York:Academic Press, 1984.

RIMANDO, A.M. & DUKE, S.O. Natural Products for Pest Management. In: _____. **Natural Products for Pest Management**; ACS Symposium Series; Washington, DC: American Chemical Society. p. 2-21, 2006.

ROJAS, M.C.; BREWER, M.S. Consumer attitudes towards issues in food safety. **Journal of Food Safety**, v. 28(1), p.1–22, 2008.

SCIO, E.; MENDES, R.F.; MOTTA, E.V.S. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of some plant extracts. In: RAO, V. (Ed.) **Phytochemicals as Nutraceuticals - Global approaches to their role in nutrition and health**. InTech, 2012. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/phytochemicals-as-nutraceuticals-global-approaches-to-their-role-in-nutrition-and-health/antimicrobial-and-antioxidant-activities-of-some-plant-extracts>> Acesso: Março, 2015.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5a ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora UFRGS/Editora UFSC, 2004.

SOARES, A. M. S., MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v.1, n. 1, p. 13, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 719p.

WINDSOR, A.J.; REICHEL, M.; FIGUTH, A. et al. Geographic and evolutionary diversification of glucosinolates among near relatives of *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). **Phytochemistry**, v.66; p.1321-1333, 2005.

WINK, M. Biochemistry, physiology and ecological functions of secondary metabolites: In: _____ . **Annual Plant Reviews: Biochemistry of Plant Secondary Metabolism**, 2 ed. Wiley-Blackwell, v. 40, p.1-19, 2010.

WU, A.; YU, H.; GAO, S.; HUANG, C. et al. Differential belowground allelopathic effects of leaf and root of *Mikania micrantha*. **Trees**, v. 23, p.11-17, 2009.

**CAPÍTULO I : Atividade fitotóxica de extratos de
folhas jovens de *Myrcia splendens* DC.**

RESUMO

Myrcia splendens (Myrtaceae) é uma espécie arbórea encontrada no cerrado brasileiro que é pouco estudada no que se refere aos seus metabólitos secundários. Este trabalho avaliou a atividade fitotóxica de extratos de folhas jovens *M. splendens* provenientes de duas metodologias de extração: partição líquido-líquido e com solventes em série eluotrópica. Os extratos obtidos foram avaliados sobre o crescimento de coleótilos de trigo (*Triticum aestivum*) e o crescimento inicial de plântulas das espécies infestantes de cultivos agrícolas: amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*) e capim-colonião (*Megathyrsus maximus*). Cinco dos tratamentos testados nos coleótilos de trigo foram inibitórios quando comparados ao controle negativo, com destaque para o extrato 2C, o mais ativo na menor concentração (0,2 mg.mL⁻¹) e com atividade igual ao do herbicida comercial oxifluorfem. No bioensaio de crescimento, os extratos 2C, 3C, 2D e 3D inibiram significativamente o desenvolvimento inicial da parte aérea e raiz das plântulas de amendoim-bravo nas quatro concentrações testadas. O crescimento da parte aérea e raiz de plântulas de capim-colonião foi inibido pelo extrato 1D em todas as concentrações avaliadas. O rendimento dos extratos em ambas as extrações foi semelhante. Os extratos oriundos da metodologia de extração utilizando partição líquido-líquido apresentaram atividades seletivas neste estudo, sendo mais ativos em uma das espécies-alvo avaliadas.

Palavras-chave: amendoim-bravo, capim-colonião, alelopatia, extração química, produtos naturais.

ABSTRACT

Myrcia splendens (Myrtaceae) is a tree species found in the Brazilian cerrado and there are few studies in relation to their secondary metabolites. This study evaluated the phytotoxic activity of young leaf extracts *M. splendens* from two extraction methods: Liquid-liquid partition and solvents in elutropic series. The extracts obtained were evaluated on the growth of wheat coleoptile (*Triticum aestivum*) and the initial growth of seedlings of weeds species of crops: wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla*) and a specie of grass colonião (*Megathyrus maximus*). Five of the treatments tested in wheat coleoptile were inhibitory when compared to the negative control, especially the 2C extract, the most active at lower concentrations (0.2 mg.mL⁻¹) and activity equal to the commercial oxifluorfem herbicide. The growth bioassay, the extracts 2C, 3C, 2D and 3D significantly inhibited the early development of shoots and roots of wild poinsettia seedlings in the four concentrations tested. The shoot growth and roots of the grass seedlings were inhibited by the 1D extract at all concentrations tested. The yield of the extracts in both extractions were similar. The extracts from the extraction method using liquid-liquid partition showed selective activity in this study, being more active in one of the target species evaluated.

Keywords: wild poinsettia, *Megathyrus maximus*, alleopathy, chemical extraction, natural products.

INTRODUÇÃO

Uma característica da maioria das plantas terrestres é que elas são sedentárias. Este fato fez com que as plantas desenvolvessem importantes estratégias evolutivas de defesa para minimizar os prejuízos causados pela competição com outras plantas vizinhas e pela predação. Entre tais estratégias, encontram-se as defesas químicas, caracterizadas pela produção de metabólitos secundários responsáveis pela interação das plantas com seu ambiente, seja por meio de interações planta-planta, planta-insetos ou planta-microrganismos (OLIVEROS-BASTIDAS, 2008).

Os metabólitos secundários podem ser liberados diretamente no ambiente por meio da exsudação radicular, volatilização, lixiviação ou ainda, por decomposição do material vegetal (CIPOLLINI; RIGSBY; BARTO, 2012) e podem estar presentes em diferentes órgãos e estruturas de uma planta incluindo folhas, flores, raízes, frutos, cascas, sementes e grãos de pólen, mas são as folhas e as raízes as principais fontes destes compostos em grande parte de espécies (ALVES; ARRUDA; SOUZA FILHO, 2002; MURPHY, 2003; WU et al., 2009). A produção desses compostos pode ser influenciada pelo estágio de desenvolvimento da planta e por variações ambientais, como variação na temperatura, ritmo circadiano, altitude, índice pluviométrico, radiação ultravioleta, ataques de herbívoros ou patógenos, entre outros. (GOBBO-NETO & LOPES, 2007; RAMAKRISHNA & RAVISHANKAR, 2011). Estudos mostram que pode haver uma variação na concentração e composição química de compostos com bioatividade dentro de uma mesma espécie de acordo com a fase de desenvolvimento, especialmente entre a fase vegetativa e reprodutiva da mesma planta (SOUZA-FILHO et al., 2003; ÇIRAK; RADUSIENE; CAMASS, 2008). Tecidos vegetais mais vulneráveis, como as folhas jovens, de modo geral, são mais defendidos que tecidos velhos e senescentes, concentrando grandes quantidades de compostos com função de defesa química (ALVES; ARRUDA; SOUZA FILHO, 2002; WINK, 2010).

Estudos que avaliam a bioatividade de compostos presentes nas plantas são importantes para identificar espécies que possuam compostos com atividades biológicas variadas, entre elas fitotóxica, fungicida, bactericida, inseticida e acaricida, e estes compostos isolados podem ser usados na produção de biopesticidas (COPPING & DUKE, 2007, OLIVEROS-BASTIDAS, 2008). O desenvolvimento de agroquímicos a partir de metabólitos vegetais com atividade fitotóxica, por exemplo, pode se dar por meio da descoberta de substâncias com novas formas de ação e menor impacto ambiental, reduzindo o desenvolvimento de resistência de plantas infestantes e contaminação do ambiente e dos alimentos produzidos (ANJUM & BJAWA, 2005; NARWAL, 2006; BLAIR et al., 2009).

O cerrado, uma das mais extensas formações vegetais brasileiras com 2.036.448 km², é constituído por três biomas: campos tropicais, savanas e florestas estacionais (BATALHA, 2011; BRASIL, 2015). Compostos bioativos são produzidos em grandes quantidades por plantas submetidas a estresses bióticos ou abióticos (CHAVES & ESCUDERO, 1999), então as espécies vegetais encontradas no cerrado podem ser promissoras na busca de compostos do metabolismo secundário com atividade biológica, pois os solos do cerrado são pobres, ácidos e com altos níveis de alumínio (HARIDASAN, 2008) e a ocorrência de incêndios na estação chuvosa é comum (MOREIRA, 2000).

Myrcia splendens (Sw.) DC. (Myrtaceae) é uma espécie encontrada no cerrado e popularmente conhecida como guamirim e folha-miúda. Trata-se de uma espécie arbórea, ocorrendo do México ao sul do Brasil (OLIVEIRA-FILHO & FONTES, 2000; MORAIS & LOMBARDI, 2006). Segundo Oliveira-Filho (2006), algumas sinonímias desta espécie são *Myrcia acutata* DC., *Myrcia rostrata* DC., *Myrcia communis* Berg. e *Myrcia fallax* (Rich.) DC. Existem poucos trabalhos sobre a fitoquímica e atividades biológicas de *M. splendens*. Um estudo com óleos essenciais dessa espécie, demonstrou a presença de grandes quantidades de hidrocarbonetos sesquiterpênicos (55,7%) e sesquiterpenos oxigenados (31,8%) na sua composição e a ausência dos compostos α -pineno e 1,8-cineol, que são comuns à família Myrtaceae (COLE; HABER; SETZER, 2008). Extratos de *M. splendens*, também apresentaram potencial antioxidante, antibacteriana e fitotóxico em algumas espécies cultivadas e infestantes da agricultura (IMATOMI, 2010; SCIO et al., 2012; IMATOMI; NOVAES; GUALTIERI, 2013; MORESCO et al., 2014)

Diante deste contexto, este trabalho tem como objetivo avaliar o potencial fitotóxico de extratos de folhas jovens de *M. splendens* provenientes de duas metodologias de extração no alongamento de coleóptilos de trigo e no crescimento inicial de duas espécies infestantes agrícolas (amendoim-bravo e capim-colonião), bem como comparar as extrações quanto à atividade e rendimento dos extratos obtidos.

MATERIAIS E MÉTODOS

I. Coleta e preparação do material vegetal.

Folhas jovens de *Myrcia splendens* (Sw.) DC. foram coletadas de cinco indivíduos na reserva de cerrado *sensu stricto* (savana neotropical) pertencente ao campus da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP (21°58' a 22°00' S e 47° 51' a 47° 52'W), na estação seca (maio de 2013). A região é caracterizada pelo tipo climático Cwa (tropical de

altitude) segundo a classificação de Köppen, com inverno seco (abril a setembro) e verão chuvoso (outubro a março) (MONTEIRO & PRADO, 2006). Foram consideradas jovens as folhas que possuíam coloração verde-clara, algumas vezes acastanhada nas bordas e textura membranosa. A exsiccata do material coletado foi depositada no Herbário da Universidade Federal de São Carlos com o número 8317.

Após a coleta, as folhas foram secas em estufa de circulação forçada a 40 °C durante 72 h. Posteriormente foram trituradas em moinho elétrico para obtenção do pó das folhas, que foi acondicionado em saco plástico e armazenado sob refrigeração (aproximadamente 5°C).

II. Preparação dos extratos.

Foram realizados dois procedimentos de extração. O primeiro utilizou solventes em ordem crescente de polaridade (eluotrópica): hexano (Hx), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcoEt), acetona (ACE) e metanol (MeOH). Foram acrescentados 50 g de pó das folhas de *M.splendens* a 300 mL de Hx. Esta mistura foi submetida a banho de ultrassom durante 15 minutos seguido de filtração. Este processo foi realizado três vezes com cada solvente, utilizando o mesmo pó residual das filtrações a cada nova extração e seguindo a ordem crescente de polaridade dos solventes. Os filtrados de cada solvente foram secos em capela, dando origem aos extratos 1C (hexânico), 2C (diclorometânico), 3C (acetato etílico), 4C (acetônico) e 5C (metanólico) (Fig. 1.1). O extrato hexânico 1C foi utilizado apenas para a retirada de ceras e lipídeos do pó de folhas e depois foi descartado.

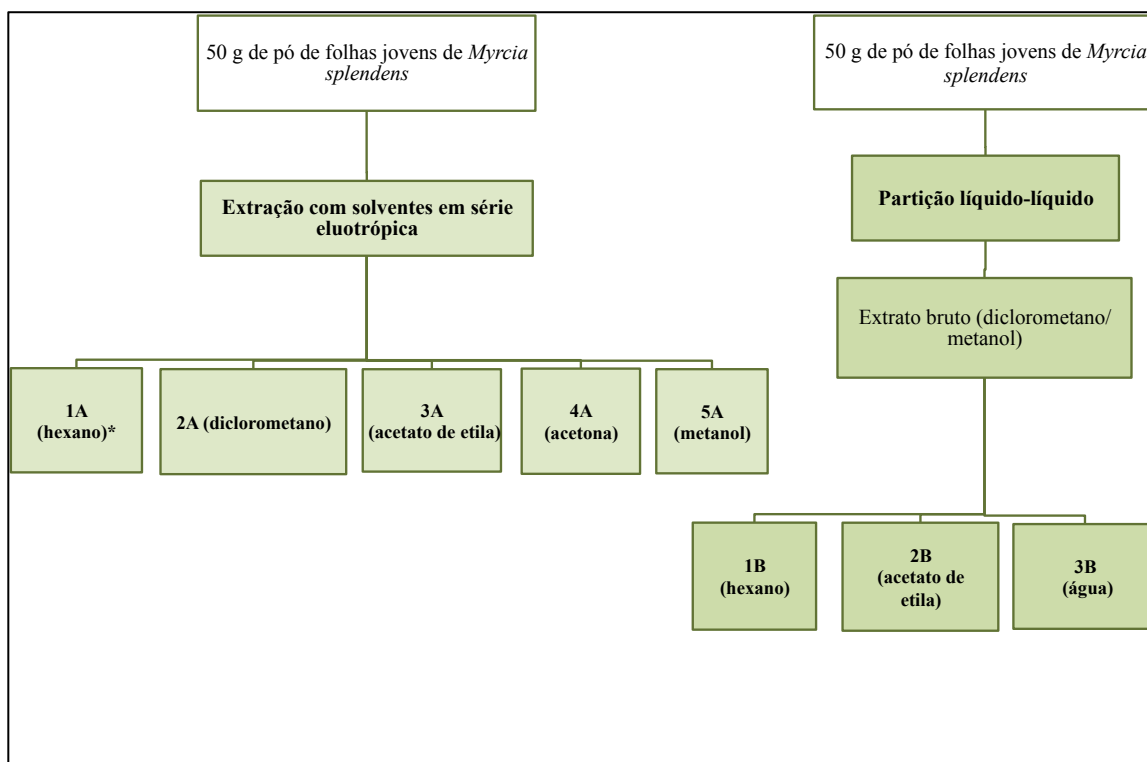


Figura 1.1 Fluxograma da obtenção dos extratos de folhas jovens de *Myrcia splendens* por meio das duas metodologias de extração empregadas e os solventes utilizados. (*) Extrato 1C não foi utilizado nos bioensaios.

No segundo método de extração, outros 50 g pó de foram submetidos à extração com DCM/MeOH (1:1) em banho de ultrassom por 30 minutos. Depois a mistura foi filtrada para obtenção do extrato bruto. Este processo foi repetido 5 vezes, até que o filtrado exibisse uma cor mais clara. O extrato bruto obtido foi seco e depois diluído em 300 mL MeOH/água destilada (95:5) e particionado com 300 mL Hx, originando os extratos hexânico (1D) e metanólico-aquoso. Por fim, o extrato metanólico-aquoso seco foi diluído em 300 mL água destilada e particionado com 300 mL AcoEt, dando origem aos extratos acetato etílico (2D) e aquoso (3D) (Fig.1.1) (OTSUKA, 2005).

III. Bioensaio de crescimento de coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum*).

Os extratos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) ($5 \mu\text{L.mL}^{-1}$) e solução tampão fosfato-citrato (2% de sacarose) com pH 5,6 a fim de obter as concentrações 0,8; 0,4 e $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$. Foram feitos dois controles: um negativo com solução tampão e DMSO a $5 \mu\text{L.mL}^{-1}$ e outro positivo com o herbicida comercial GOAL[®] (princípio ativo: oxifluorfem 240 g.L^{-1}) e DMSO nas mesmas concentrações e condições dos extratos.

Sementes de trigo (*Triticum aestivum* L. cv.'BRS264') foram germinadas no escuro a 25°C , durante 72 horas, em caixas do tipo gerbox forradas com duas folhas de papel

filtro embebidas com água destilada para a obtenção das plântulas (HANCOCK et al., 1964). De cada coleóptilo descartou-se os 2 mm apicais e os próximos 4 mm foram cortados e utilizados no bioensaio. Todo este processo foi realizado sob luz verde de segurança (NITSCH & NITSCH, 1956).

Foram utilizadas três réplicas (tubos de ensaio) para cada tratamento. Em cada tubo de ensaio foram colocados cinco fragmentos de coleóptilo e 2 mL de solução dos extratos, solução tampão ou herbicida. Os tubos foram mantidos a 25° C no escuro a uma rotação de 1,2 Hz durante 24 horas em posição horizontal (MACÍAS et al., 2010). Posteriormente os coleóptilos foram fotografados e medidos com auxílio do programa ImageJ.

IV. Bioensaio de crescimento de plântulas.

Os extratos foram diluídos em DMSO (5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$) e água destilada para obter as concentrações 2,0; 1,5; 1,25 e 1,0 mg.mL^{-1} . Para este bioensaio também foram preparados dois controles: um controle negativo utilizando somente DMSO (5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$) e água destilada e outro positivo com DMSO e o herbicida comercial GOAL[®] (princípio ativo: oxifluorfem 240 g.L^{-1}) nas mesmas concentrações e condições dos extratos e frações.

As espécies-alvo utilizadas foram as plantas infestantes de culturas agrícolas amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla* L.), eudicotiledônea, e capim-colonião (*Megathyrus maximus* Jacq.), uma monocotiledônea. Sementes das duas espécies foram pré-germinadas em água destilada e mantidas em câmaras do tipo B.O.D.. Quando as sementes apresentaram 3 mm de comprimento de radícula, foram transferidas para caixas plásticas transparentes (13 x 8 x 4 cm) forradas com duas folhas de papel filtro umedecidas com 6mL das soluções dos extratos, água destilada ou herbicida. Em cada caixa foram colocadas 10 plântulas. Foram utilizadas quatro repetições de cada tratamento, em um delineamento experimental totalmente casualizado. As caixas foram tampadas e mantidas em B.O.D. por sete dias com temperatura de 27° C e fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro para *M. maximus* (TOMAZ et al., 2010) e com temperatura de 25° C e fotoperíodo de 12-12 horas para *E. heterophylla* (INOUE et al., 2010). Posteriormente foram medidos os comprimentos da parte aérea e da raiz primária utilizando um paquímetro digital. Além disso, as plântulas foram classificadas em normais e anormais de acordo com as especificações das Regras de Análises de Sementes (BRASIL, 2009).

V. Medida dos potenciais osmóticos.

As medidas dos potenciais osmóticos dos extratos foram obtidas em mOsm.Kg^{-1} utilizando um osmômetro e depois foram convertidas para pressão osmótica (MPa) (LARCHER, 2004).

VI. Análises estatísticas.

Os comprimentos dos fragmentos de coleóptilo de trigo e da parte aérea e raiz primária das plântulas das espécies-alvo foram calculados como porcentagem de inibição ou estímulo em relação ao controle negativo, sendo que os valores positivos representam estímulo e os valores negativos representam inibição.

Os dados foram submetidos a teste de normalidade (Shapiro-Wilk). A diferença estatística foi calculada com uma significância de 5%, utilizando o Teste de Welch para dados normais ou o Teste de Wilcoxon para dados não normais. Todas as análises foram realizadas no programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2014).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os rendimentos obtidos para cada extrato estão apresentados na Tabela 1.1. A metodologia de extração C (solventes em série eluotrópica) apresentou o maior rendimento total, embora grande parte do rendimento tenha se concentrado em apenas um dos extratos (5C). A distribuição do rendimento obtido pela metodologia de extração C foi um pouco mais homogênea entre os extratos, apesar da maior parte também estar concentrado em apenas um extrato (3D). O fato da maior parte do rendimento total obtido encontrar-se nos extratos mais polares em ambos os procedimentos de extração, ou seja, no extrato metanólico (5C) e no extrato aquoso (3D), provavelmente ocorre porque compostos com polaridade mais alta tais como açúcares simples e polissacarídeos solúveis são bastante abundantes nas plantas (VATTUONE et al., 2009).

Tabela 1.1 – Rendimentos¹ dos extratos de folhas jovens de *Myrcia splendens*.

Extratos					
Extração direta – solventes em ordem crescente de polaridade:					
	2C	3C	4C	5C	TOTAL
Rendimento	1,39%	0,62%	1,97%	16,87%	20,85%
Partição líquido-líquido:					
	1D	2D	3D	TOTAL	
Rendimento	2,64%	4,16%	9,35%	16,15%	

¹ Porcentual relativo à massa de pó de folhas jovens utilizada na extração.

O bioensaio de coleóptilos de trigo é um modelo clássico para a avaliação da atividade fitotóxica de extratos vegetais (HANCOCK et al., 1964). Neste bioensaio, somente

os extratos dicloromêtanico (2C) e acetato etílico (2D) apresentaram atividade inibitória diferente do controle em todas as concentrações testadas, sendo o extrato 2C o mais ativo na menor concentração (0,2 mg.mL⁻¹), com atividade igual ao do herbicida comercial. O extrato aquoso (3D) apresentou atividade estimulante ao crescimento dos coleóptilos na concentração mais baixa e os extratos acetato etílico (3C), acetônico (4C) e hexânico (1D) foram diferentes do controle apenas nas duas maiores concentrações (0,8 mg.mL⁻¹ e 0,4 mg.mL⁻¹) (Fig.1.2).

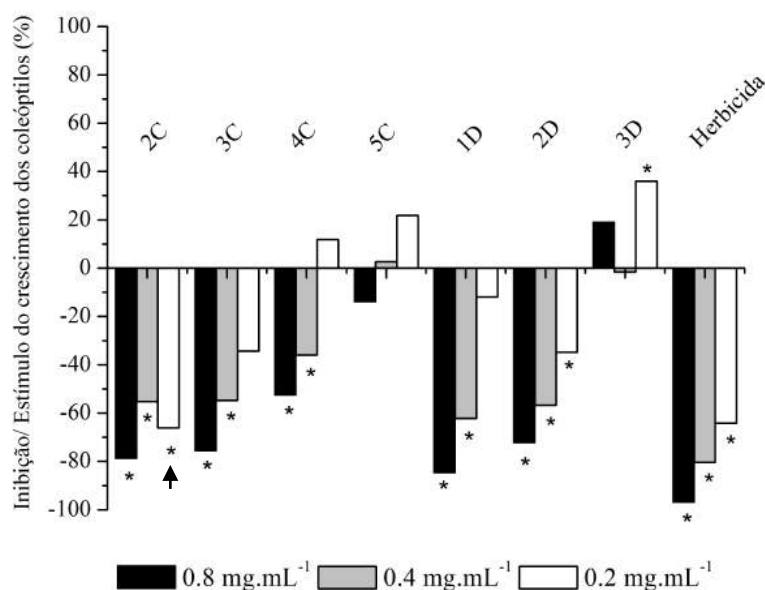


Figura 1.2 . Efeito dos extratos de folhas jovens *Myrcia splendens* sobre o comprimento de coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum*). (*) indica tratamento que apresenta diferença significativa quando comparado com o controle negativo. (↑) indica tratamento com efeito igual ao do controle positivo na mesma concentração. O controle positivo foi feito com herbicida comercial cujo princípio ativo é o Oxifluorfem

O potencial osmótico é um aspecto que deve ser considerado em bioensaios de crescimento de plântulas, pois pode mascarar os efeitos dos compostos fitotóxicos (FERREIRA & ÁQUILA, 2000). O potencial osmótico dos extratos nas concentrações testadas se manteve entre -0,09 a -0,13 MPa, dentro de padrões aceitáveis quando comparados com dados da literatura. Gatti e colaboradores (2004) recomendam que o potencial osmótico de extratos não ultrapasse -0,2 MPa.

No bioensaio de crescimento, os extratos 2C, 3C, 2D e 3D inibiram significativamente o crescimento de parte aérea e raiz de plântulas de amendoim-bravo em relação ao controle negativo, em todas as concentrações testadas, enquanto nos demais extratos apenas duas concentrações inibiram significativamente o crescimento da parte aérea e da raiz. Nas plântulas de capim-colonião, o extrato 1D inibiu significativamente o crescimento tanto de parte aérea quanto de raiz nas quatro concentrações testadas. O extrato

2C inibiu significativamente o crescimento da raiz em três concentrações e a parte aérea em apenas na concentração mais alta. O extrato 3C apresentou inibição significativa em três concentrações apenas nas raízes. De um modo geral, as raízes de capim-colonião foram mais afetadas do que a parte aérea das plântulas, enquanto que em amendoim-bravo ambas as partes vegetais foram afetadas (Fig.1.3).

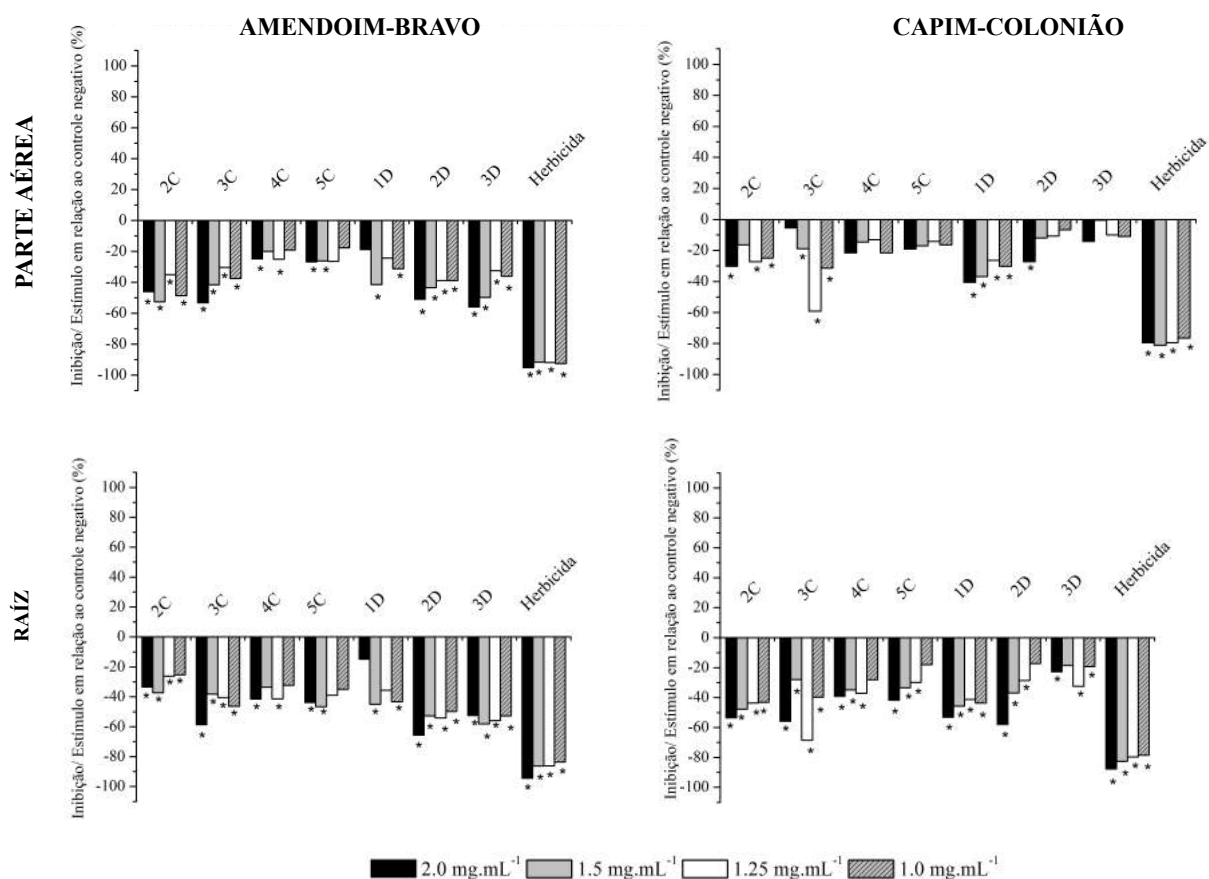


Figura 1.3. Efeito dos extratos de folhas jovens de *Myrcia splendens* sobre o crescimento inicial de plântulas de amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*) e capim-colonião (*Megathyrus maximus*) em diferentes concentrações. (*) indicam os extratos nas concentrações que apresentaram diferença significativa quando comparado com o controle negativo. O controle positivo foi feito com herbicida comercial cujo princípio ativo é o Oxifluorfem.

A maior sensibilidade radicular, como apresentada pelas plântulas de capim-colonião, é amplamente documentada na literatura e caracteriza um dos principais parâmetros para indicar a sensibilidade de plantas aos efeitos de fitotoxinas alelopáticas (CHON et al., 2002; GATTI et al., 2004; SOUZA FILHO & DUARTE, 2007; REJILA & VIJAYAKUMAR, 2011; GRISI et al., 2013). Isso pode ser explicado pelo fato de as raízes ficarem mais em contato com o extrato do que a parte aérea neste bioensaio, além disso as

raízes podem apresentar maior permeabilidade aos compostos fitotóxicos, pois não possuem uma cobertura cuticular bem desenvolvida como a apresentada pela superfície do hipocótilo (CORREIA; CENTURION; ALVES, 2005; BESSIRE et al., 2007; YOSHIMURA et al., 2011).

Os extratos 1D, 2D, e 3D, todos provenientes do mesmo tipo de extração (por partição líquido-líquido), apresentaram maior quantidade de tratamentos com atividade inibitória significativa concentrados em uma das espécies, sendo o primeiro mais ativo em capim-colonião e as últimas mais ativas em amendoim-bravo. Metabólitos secundários que inibem o desenvolvimento de uma planta receptora podem causar menos ou nenhuma inibição no desenvolvimento de outra (XUAN et al., 2005). A tolerância ou resistência a compostos fitotóxicos pode ser específica, havendo espécies mais sensíveis a algumas substâncias que outras (FERREIRA & AQUILA, 2000). Esta diferença de sensibilidade pode ser resultado das diferenças fisiológicas e bioquímicas das espécies-alvo utilizadas, sendo uma monocotiledônea (capim-colonião) e uma eudicotiledôneas (amendoim-bravo). Respostas espécie-dependente para atividade fitotóxica demonstra que os compostos do metabolismo secundário das plantas podem ser fundamentais para a utilização como herbicidas seletivos na agricultura (IMATOMI; NOVAES; GUALTIERI, 2013). Neste caso, é possível dizer que neste trabalho a metodologia de extração utilizando a partição líquido-líquido pode ser mais eficaz para o isolamento de substâncias com atividades seletivas, enquanto que a metodologia de extração utilizando uma série eluotrópica de solventes pode ser mais eficaz no isolamento de substâncias com atividades não-seletivas, pois os extratos mais ativos 2C e 3C apresentaram atividade elevada em ambas as espécies-alvo e partes vegetais da plântula testadas.

Em um estudo que avaliou o potencial alelopático de algumas espécies da família Myrtaceae, Imatomi, Novaes e Gualtieri (2013) identificaram que o extrato aquoso de *M. splendens* possui potencial fitotóxico, inibindo o crescimento e germinação de alface, tomate e cebola. Além disso, extratos aquosos da mesma espécie também apresentaram atividade fitotóxica nas espécies infestantes de culturas agrícolas amendoim-bravo, capim-arroz e corda de viola (IMATOMI, 2010). Habermann e colaboradores (2015) observaram que extratos de folhas e cascas de *Blepharocalyx salicifolius* (Myrtaceae) exerceram efeito fitotóxico sobre as espécies amendoim-bravo e capim-arroz. Triturados de folhas de *Campomanesia adamantium* e *Eugenia dysenterica* incorporados no solo foram capazes de diminuir o comprimento de plântulas de gergelim (SOUZA et al., 2007).

As Tabelas 1.2 e 1.3 mostram o percentual de anormalidades no desenvolvimento inicial das espécies-alvo amendoim-bravo e capim-colonião, respectivamente. As anormalidades observadas foram: inversão gravitrópica, necrose de raízes e/ou de parte aérea, hipocótilo enrolado ou contorcido e atrofias (Fig. 1.4). A espécie-alvo amendoim-bravo apresentou as maiores porcentagens de plântulas anormais em relação ao capim-colonião. As anormalidades mais frequentes foram necroses e atrofias de raízes e enrolamento de hipocótilo.

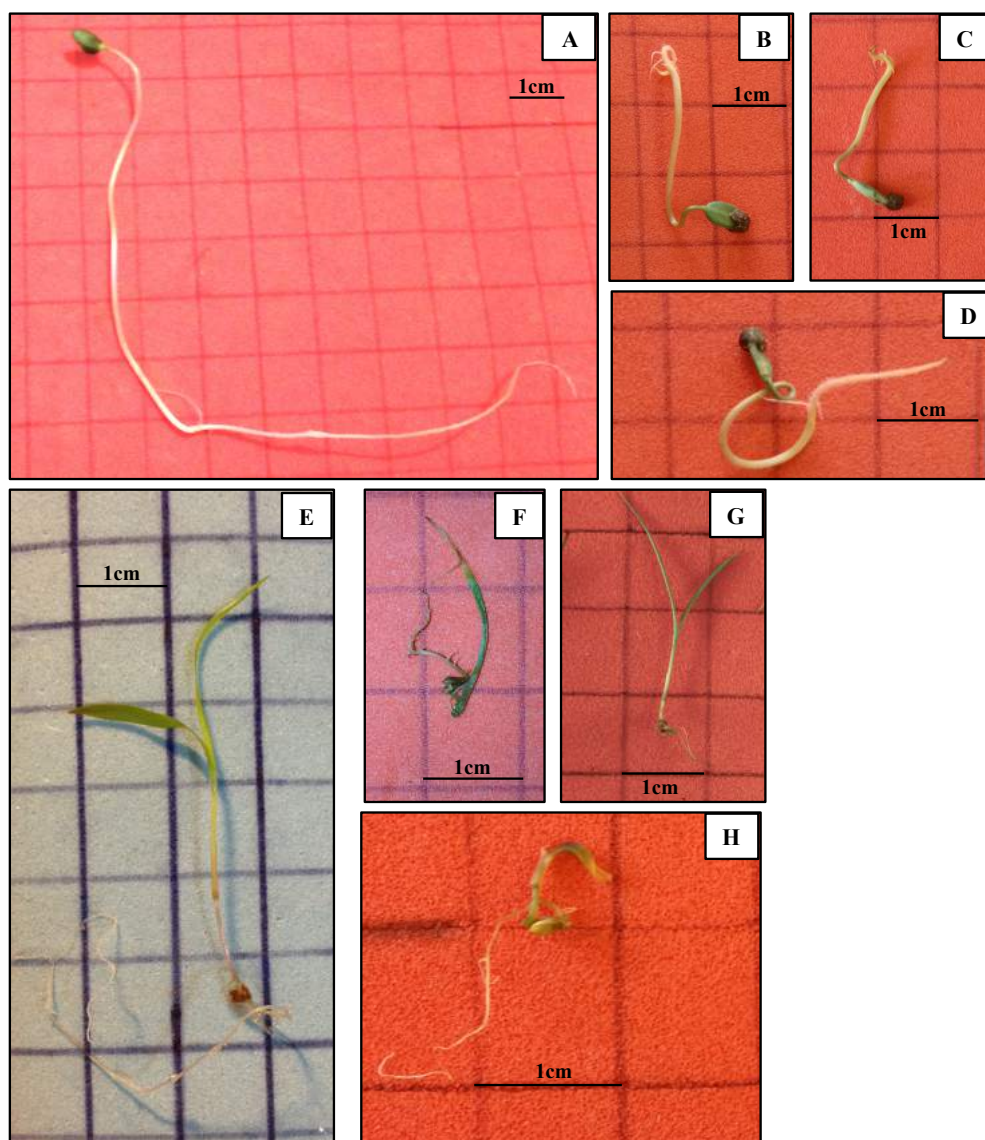


Figura 1.4. Anormalidades apresentadas pelas espécies-alvo tratadas com extratos de folha jovem de *Myrcia splendens*. Amendoim-bravo: A- controle; B e C- necrose e atrofia de raiz e inversão gravitrópica; D- enrolamento de hipocótilo e atrofia de raiz. Capim-colonião: E- controle; F- inversão gravitrópica; G- necrose e atrofia de raiz; H- necrose e atrofia severa de parte aérea.

As plântulas de amendoim-bravo crescidas no extrato aquoso 3D apresentaram as maiores ocorrências de anormalidades, com 67,5% e 62,5% nas concentrações mais elevadas ($2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ respectivamente). Os extratos 2D, 1D e 3C foram os

que promoveram os maiores percentuais de plântulas anormais em capim-colonião, sendo 27,5%, 22,5% e 20% respectivamente. Os resultados observados pelos extratos 2C, 3C, 2D e 3D coincide com os resultados obtidos no bioensaio de crescimento para a espécie-alvo amendoim-bravo.

Tabela 1.2. Percentual de plântulas de amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*) crescidas sob efeito dos extratos 2C (diclorometânico), 3C (acetato etílico), 4C (acetônico), 5C (metanólico), 1D (hexânico), 2D (acetato etílico) e 3D (aquoso) de folhas jovens de *Myrcia splendens* em diferentes concentrações e as anomalias encontradas em cada tratamento: N- necrose; A- atrofia severa; IG- inversão gravitropica e EH- enrolamento de hipocótilo.

AMENDOIM-BRAVO									
Extrato	% de plântulas anormais				Tipos de anomalias				
	Concentrações (mg.mL ⁻¹)				Concentrações (mg.mL ⁻¹)				
	2,0	1,5	1,25	1,0	2,0	1,5	1,25	1,0	
2C	32,5%	20%	17,5%	10%	N;A;IG;EH	N;A;IG;EH	N;A;IG;EH	N;A;EH	
3C	45%	22,5%	22,5%	35%	N;A;IG;EH	N;A;IG;EH	N;A;IG;EH	N;A;IG;EH	
4C	27,5%	10%	20%	15%	N;A;IG;EH	A	N;A;IG;EH	N;A;EH	
5C	30%	30%	20%	15%	N;A;IG;EH	N;A;IG;EH	N;A;IG;EH	N;A	
1D	10%	22,5%	20%	20%	A	N;A;IG;EH	A;IG;EH	N;A;IG;EH	
2D	40%	30%	12,5%	17,5%	N;A;IG;EH	N;A;IG;EH	N;A;EH	N;A;EH	
3D	67,5%	62,5%	37,5%	42,5%	N;A;IG;EH	A;IG	N;A;IG	N;A;IG;EH	
Controle negativo		2,5%					A		

Tabela 1 3 Percentual de plântulas de capim-colonião (*Megathyrsus maximus*) crescidas sob efeito dos extratos 2C (diclorometânico), 3C (acetato etílico), 4C (acetônico), 5C (metanólico), 1D (hexânico), 2D (acetato etílico) e 3D (aquoso) de folhas jovens de *Myrcia splendens* em diferentes concentrações e as anomalias encontradas em cada tratamento: N- necrose; A- atrofia severa; IG- inversão gravitropica e EH- enrolamento de hipocótilo.

O CAPIM-COLONIÃO									
Extrato	% de plântulas anormais				Tipos de anomalias				
	Concentrações (mg.mL ⁻¹)				Concentrações (mg.mL ⁻¹)				
	2,0	1,5	1,25	1,0	2,0	1,5	1,25	1,0	
2C	12,5%	0%	12,5%	5%	N;A;IG	-	N;A	N;IG	
3C	20%	10%	20%	5%	N;A;IG	A	N;A	IG	
4C	15%	7,5%	2,5%	10%	N;A;IG	N;A	A	N;A	
5C	12,5%	10%	2,5%	2,5%	N;A;IG	N;A;IG	N	A	
1D	22,5%	7,5%	7,5%	7,5%	N;A;IG	N;A	N;IG	N;A;IG	
2D	27,5%	17,5%	7,5%	10%	N;A	N;A;IG	A;IG	A;IG	
3D	12,5%	10%	20%	5%	N;IG	A;IG	N;A;IG	N;A	
Controle negativo		0%					-		

Metabólitos secundários com atividade fitotóxica podem alterar a morfologia e anatomia de plântulas interferindo na função de alguns fitormônios, como a auxina e a citocinina, importantes na modulação de processos como a resposta trópica à luz e à gravidade, arquitetura geral do caule e das raízes, desenvolvimento vascular, divisão e alongamento celular, levando ao surgimento de anomalias responsáveis por inviabilizar ou prejudicar o desenvolvimento das plântulas (FERREIRA & ÁQUILA, 2000; TANIMOTO, 2005; ALONI et al., 2006).

Com base nos resultados dos bioensaios realizados, os extratos foram ranqueados em ordem decrescente de atividade fitotóxica pelo somatório do número de tratamentos com efeito inibitório (estatisticamente diferente do controle negativo), como mostrado na Tabela 1.4.

Tabela 1.4. Ordem decrescente da atividade fitotóxica causada pelos extratos de folhas jovens de *Myrcia splendens* dada pela quantidade de tratamentos com atividade inibitória em relação ao controle 27anzânia. (*) Ocorrência de pelo menos um tratamento com atividade igual ao do herbicida.

Extrato	Alongamento de coleóptilos de trigo	Crescimento de amendoim-bravo		Crescimento de capim-colônia		Total
		PARTE AÉREA	RAIZ	PARTE AÉREA	RAIZ	
2C	3	4	4	3	4	18*
3C	2	4	4	3	4	17
2D	3	4	4	1	3	15
1D	2	2	2	4	4	14
3D	0	4	4	0	3	11
4C	2	2	2	0	3	9
5C	0	2	2	0	3	7

O extrato 2C teve a maior atividade fitotóxica geral, além de ter um tratamento com atividade inibitória estatisticamente igual ao efeito causado pelo herbicida (concentração 0,2 mg.mL⁻¹ no bioensaio de coleótilos de trigo).

CONCLUSÕES

Para ambas as metodologias de extração os extratos mais polares (5C e 3D) apresentaram os maiores rendimentos, enquanto os extratos com polaridades intermediárias apresentaram rendimentos mais baixos.

Os extratos provenientes da extração por partição líquido-líquido apresentaram atividade inibitória mais proeminente apenas em uma das espécies-alvo, podendo ser objeto de estudo na busca por substâncias com atividade seletiva.

O extrato 2C teve a maior atividade fitotóxica geral apresenta-se promissor para futuros estudos de fitotoxicidade, pois possivelmente contém metabólitos secundários fitotóxicos.

REFERÊNCIAS

ALVES, S.M.; ARRUDA, M.S.P. & SOUZA FILHO, A.P.S.. Biossíntese e Distribuição de Substâncias alelopáticas. In: SOUZA FILHO, A. P.S. ALVES, S.M. (Ed.). **Alelopatia: Princípios básicos e aspectos gerais**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2002.

ALONI, R.; ALONI, E.; LANGHANS, M.; ULLRICH, C.I. Role of auxin 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.

ANJUM, T. & BJAWA, R. A bioactive annouionone from sunflower leaves. **Phytochemistry**, v. 66, n. 16, p. 1919-1921, 2005.

BATALHA, M.A. O cerrado não é um bioma. **Biota Neotropica**, v.11, n.1, 2011.

BESSIRE, M.; CHASSOT, C.; JACQUAT, A.C. et al. A permeable cuticle in *Arabidopsis* leads to a strong resistance to *Botrytis cinerea*. **EMBO Journal**, v. 26, 2158-2168, 2007.

BLAIR, A. C.; WESTON, L. A.; NISSEN, S. J. et al. The importance of analytical techniques in allelopathy studies with the reported allelochemical catechin as an example. **Biological Invasions**, v. 11, n. 2, p. 325- 332, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Coordenação de Laboratório Vegetal. **Regras para análise de sementes**. Brasília. 365 p. 2009.

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **O Bioma Cerrado**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>> Acesso: Março, 2015.

CHAVES, N.; ESCUDERO, J.C. Variation of flavonoid synthesis induced by ecological factors. In: Inderjit, Dakshini, K.M.M.; Foy C.L. (eds) **Principles and practices in plant ecology**. Boca Raton: CRC Press, pp 267–285. 1999.

CHON, S.U.; CHOI, S.K.; JUNG, S. et al. Effects of alfafa leaf extracts and phenolic allelochemicals on early seedling growth and root morphology of alfafa and barnyard grass. **Crop Protection**, v.21, p.1077-1082, 2002.

CIPOLLINI, D.; RIGSBY, C.M.; BARTO, E.K. Microbes as target and mediators of allelopathy in plants. **Journal of chemical ecology**, v.38(6), p. 714-727, 2012.

COLE, R.A.; HABER, W.A.; SETZER, W.N. The leaf oil composition of *Myrcia splendens* from Monteverde, Costa Rica. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v.11(1), p. 41-44, 2008.

COPPING L.G. & DUKE S.O. Natural products that have been used commercially as crop protection agents. **Pest Management Science**, v.63, p. 524-554, 2007.

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.

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

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.; PEREZ, S.C.J.G.A. & LIMA, M.I.S. Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esparanzae* O. Ktze na germinação e crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. **Acta Botanica Brasilica**, v.18, n.3, p.459-472, 2004.

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

GRISI, P.U.; GUALTIERI, S.C.J.; RANAL, M.A.; SANTANA, D.G. Phytotoxic activity of crude aqueous extracts and fractions of Young leaves of *Sapindus saponaria* L.

(Sapindaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v.27, n.1, p. 62-70, 2013.

HABERMANN, E.; IMATOMI, M.; PEREIRA, V.C. et al. Atividade fitotóxica de cascas do caule e de folhas maduras de *Blepharocalyx salicifolius* (Myrtaceae) sobre espécies infestantes. **Acta Biologica Colombiana**, v.20, n.1, p.153-162, 2015.

HANCOCK, C.R.; BARLOW, H.W.B.; LACEY, H.J. The east malling coleoptile straight growth test method. **Journal of Experimental Botany**, v.15, n.1, p.166-176, 1964.

HARIDASAN, M. Nutritional adaptations of native plants of the cerrado biome in acid soils. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.20(3), p.183-195, 2008.

IMATOMI, M. **Estudo alelopático de espécies da família Myrtaceae do cerrado**. 2010. 88 f. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

IMATOMI, M.; NOVAES, P. & GUALTIERI, S.C.J. Interspecific variation in allelopathic potential of the Myrtaceae Family. **Acta Botanica Brasilica**, v.24, p.54-61, 2013.

INOUE, M. H.; SANTANA, D.C; VILHENA, K.S.S. *et al.* Avaliação do potencial alelopático de substâncias isoladas em sementes de araticum (*Annona crassiflora*). **Planta Daninha**, v.4, p.735-741, 2010.

INTERNATIONAL ALLELOPATHY SOCIETY. [Online] Disponível em:
<<http://www.international-allelopathy-society.org>> Acesso: Dezembro, 2013.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima Artes e Textos, 2004.

MACÍAS, F. A.; LACRET, R.; VARELA, R.M. et al. Isolation and phytotoxicity of terpenes from *Tectona grandis*. **Journal of Chemical Ecology**, v.36, n.4, p. 396-404, 2010.

MONTEIRO, J.A.F.& PRADO, C.H.B.A. Apparent carboxylation efficiency and relative stomatal and mesophyll limitations of photosynthesis in an evergreen cerrado species during water stress. **Photosynthetica**, v.44, p.39-45, 2006.

MORAIS, P. O. & LOMBARDI, J. A. A Família Myrtaceae na Reserva Particular do Patrimônio Natural da Serra do Caraça, Catas Altas, Minas Gerais, Brasil. **Lundiana** v.7(1), p.3-32, 2006.

MOREIRA, A. Effects of fire protection on savanna structure in Central Brazil. **Journal of Biogeography**, v.37, p. 1021-1029, 2000.

MORESCO, H.H.; PEREIRA, M.; BRETANHA, L.C. et al. Myricitrin as the main constituent of two species of Myrcia. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v.4(2), p.001-007, 2014.

MURPHY, S.D. 2003. Biochemical and physiological aspects of pollen allelopathy In: INDERJIT, M.; MALLIK A. U. (eds.). **Chemical Ecology of plant: allelopathy of aquatic and terrestrial ecosystems**. Springer. P. 245-260

NARWAL, S. S. Allelopathy in ecological sustainable agriculture. In: REIGOSA, M. J.; PEDROL, N.; GONZÁLEZ, L. (Eds.). **Allelopathy – A Physiological Process with Ecological Implications**. Netherlands: Springer, 2006. P. 537-564.

NITSCH, J. P. & NITSCH, C. Studies on the growth of coleoptiles and first internod sections. A new, sensitive, straight-growth test for auxins. **Plant Physiology**, v. 31, n. 2, p. 94-111, 1956.

OLIVEIRA-FILHO, A. T. **Catálogo das árvores nativas de Minas Gerais: mapeamento e inventário da flora nativa e dos reflorestamentos de Minas Gerais**. Lavras: UFLA. 2006.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.& FONTES, M. A. L. Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in southeastern Brazil and the influence of climate. **Biotropica**, v.32(4b), p. 793-810. 2000.

OLIVEROS-BASTIDAS, A. El fenómeno alelopático: El concepto, las estrategias de 32anzân y su aplicación en la búsqueda de herbicidas naturales. **Revista Química Viva**, v.1(7), p. 2-34, 2008.

OTSUKA, H. Purification by solvent extraction using partition coefficient. In: SARKER, S. D.; LATIF, Z.; GRAY, A. I. (Ed.) **Natural Products Isolation. Methods in Biotechnology**. Totowa:Human Press Inc, 2.ed. v. 20, 2005. P.269-273.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2014. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>

RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v.6, p. 1720-1731, 2011.

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.

RICE, E.L. **Allelopathy**. New York:Academic Press, 1984.

RODRIGUES, B. N. & DE ALMEIDA, F.S. **Guia de herbicidas**. 5ªEd. Londrina: Grafmarke, 2005. 591p.

SCIO, E.; MENDES, R.F.; MOTTA, E.V.S. et al. Antimicrobial and 32anzânia32nte activities of some plant extracts. In: RAO, V. (Ed.) **Phytochemicals as Nutraceuticals – Global approaches to their role in nutrition and health**. InTech, 2012. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/phytochemicals-as-nutraceuticals-global-approaches-to-their-role-in-nutrition-and-health/antimicrobial-and-antioxidant-activities-of-some-plant-extracts>> Acesso: Março, 2015.

SOUZA, L.M.; CANINI, G.B.; AIRES, S.S.; BORGHETTI, F. Efeito Alelopático de Folhas de Quatro Espécies do Cerrado sobre Crescimento de Gergelim. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 2, p. 540-542, 2007.

SOUZA-FILHO, A. P. S.; ALVES, S. M.; FIGUEIREDO, F. J. C. Efeitos alelopáticos do calopogônio em função de sua idade e da densidade de sementes da planta receptora. **Planta Daninha**, v. 21, n. 2, p. 211-218, 2003.

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.

TANIMOTO, E. Regulation of root growth by plant hormones: Roles for auxin and gibberellin. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.24, p.249–265, 2005.

TOMAZ, C.A.; MARTINS, C. C.; CARVALHO, L.R.; NAKAGAWA, J. Duração do teste de germinação do capim 33anzânia. **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, n.4, p.80-87, 2010.

VATTUONE, M. A.; SAMPIETRO, D.A; SOBERÓN, R. et al. Plant Sampling and Sample Preparation. In: SAMPIETRO, D.A.; CATALAN, C.A.N.; VATTUONE, M.A.; NARWAL, S.S. (eds.) **Isolation, Identification and Characterization of Allelochemicals/Natural Products**. Science Publishers, Enfield, NH, USA. P. 377-398. 2009.

WINK, M. Biochemistry, physiology and ecological functions of secondary metabolites: In: _____. **Annual Plant Reviews: Biochemistry of Plant Secondary Metabolism**, 2 ed. Wiley-Blackwell, v. 40, p.1-19, 2010.

WU, A.; YU, H.; GAO, S.; HUANG, C. et al. Differential belowground allelopathic effects of leaf and root of *Mikania micrantha*. **Trees**, v. 23, p.11-17, 2009.

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.

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 II : Estudo fitoquímico e atividade
fitotóxica de extratos e frações de folhas maduras de
Myrcia splendens (Sw.)DC .**

RESUMO

Myrcia splendens (Myrtaceae) é uma espécie arbórea encontrada no cerrado brasileiro e existem poucos trabalhos que investigam o potencial fitotóxico de seus metabólitos secundários. Este trabalho avaliou a atividade fitotóxica de extratos e frações foliares de *Myrcia splendens* e comparou duas metodologias de extração (partição líquido-líquido e solventes em série eluotrópica) quanto ao rendimento e à fitotoxicidade em testes de crescimento de coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum*) e crescimento inicial de duas espécies-alvo (*Euphorbia heterophylla* e *Megathyrus maximus*). Em ambas as metodologias usadas, os extratos mais polares foram os que obtiveram os maiores rendimentos. Todos os extratos testados inibiram o crescimento de coleóptilos de trigo. No bioensaio de crescimento inicial, as raízes das espécies-alvo foram mais afetadas e *M. maximus* foi a mais sensível entre as duas espécies. O extrato 2B (extraído com acetato de etila) apresentou o maior potencial fitotóxico e por isso foi utilizado para bioensaio de células de metaxilema radicular a fim de se avaliar um dos seus modos de ação. O extrato 2B inibiu o crescimento de células do metaxilema de maneira dose-dependente. Então, este extrato foi fracionado em cromatografia de coluna contendo sílica-gel, resultando em 14 frações, as quais foram testadas em bioensaio de coleóptilos de trigo. As frações FM4, FM5, FM8 e FM9 apresentaram os maiores efeitos inibitórios. As frações FM8 e FM9 foram utilizadas para isolamento e identificação do composto majoritário. O isolamento foi feito por CLAE e a identificação por RMN, resultando na identificação do composto miricitrina (miricetina-3-O-ramnosídeo).

Palavras-chave: flavonóide glicosilado, miricitrina, fitotoxicidade, metaxilema, bioatividade.

ABSTRACT

Myrcia splendens (Sw.) DC. (Myrtaceae) is a tree species found in the Brazilian cerrado and there are few studies that investigate the phytotoxic potential of its secondary metabolites. This study evaluated the phytotoxic activity of extracts and leaf fractions *Myrcia splendens* and compared two extraction methods (liquid-liquid partition and solvents in eluotropic series) in yield and phytotoxicity in wheat coleoptile growth testing (*Triticum aestivum*) and biological activity in wheat coleoptiles' growth tests and initial growth of two target species (*Euphorbia heterophylla* and *Megathyrus maximus*). In both extraction methods the polar extracts were the ones with the highest yields. All extracts tested inhibited the wheat coleoptile growth). In the initial growth bioassay, the roots of the target species used were most affected and *M. maximus* species was the most sensitive of the two tested species. The 2B extract (extracted with ethyl acetate) showed the greatest potential phytotoxic and so was used for bioassay root metaxylem cells in order to evaluate one of its modes of action. 2B metaxylem extracts inhibited cell growth in a dose-dependent manner. Then, this extract was fractionated by column chromatography with silica gel, resulting in 14 fractions which were assayed by bioassay wheat coleoptile. The FM4 fractions, FM5, FM8 and FM9 showed the highest inhibitory effects. The FM8 and FM9 fractions were used for isolation and identification of the major compound. The isolation was done by HPLC and identification by NMR, resulting in the identification of miricitrina compound (myricetin-3-O-rhamnoside).

Keywords: glycosylated flavonoid, miricitrin, phytotoxicity, metaxylem, bioactivity.

INTRODUÇÃO

As plantas produzem uma grande variedade de compostos secundários, que recebem este nome por não estarem diretamente envolvidos nos processos primários de crescimento e desenvolvimento vegetal (KROYMANN, 2011). Os tipos e a quantidade de metabólitos secundários podem variar entre indivíduos de uma mesma espécie, entre plantas de espécies diferentes, entre órgãos e também entre estágios de desenvolvimento e é fortemente influenciada por fatores ambientais (WINDSOR et al., 2005; GOBBO-NETO & NETO, 2007; KROYMANN, 2011). Variáveis como temperatura, umidade e intensidade luminosa, bem como a biota e as propriedades físico-químicas do solo podem afetar não só a produção de compostos secundários, mas também a estrutura química e a atividade dessas substâncias.

Muitos desses metabólitos desempenham funções importantes para a proteção contra patógenos (vírus, bactérias e fungos), plantas competidoras e contra herbívoros. Além disso, também podem atuar como sinalizadores para atrair agentes polinizadores e dispersores de sementes. Alguns metabólitos secundários ainda podem ter funções fisiológicas, por exemplo, eles podem proteger contra a radiação ultravioleta ou como compostos armazenadores de nitrogênio (CIPOLLINI & LEVEY, 1997; WINK, 2010). Os metabólitos secundários são liberados diretamente no ambiente por meio da exsudação radicular, volatilização, lixiviação, ou ainda por decomposição do material vegetal (CIPOLLINI; RIGSBY; BARTO, 2012). Estes compostos podem estar presentes em diferentes órgãos e estruturas da planta incluindo folhas, flores, raízes, frutos, cascas, sementes e grãos de pólen (ALVES; ARRUDA; SOUZA FILHO, 2002; MURPHY, 2003).

Alguns autores afirmam que os compostos bioativos podem interferir em processos tais como respiração, fotossíntese, atividade enzimática, abertura de estômatos, níveis de hormônios, divisão e alongamento celular, estrutura e permeabilidade de membranas e paredes celulares e assim podem inibir o crescimento de plântulas. (GNIAZDOWSKA & BOGATEK, 2005; SINGH et al., 2009, TEERARACK et al., 2010).

O desenvolvimento de métodos modernos de extração, isolamento, purificação e identificação tem contribuído para avanços na área da química de produtos naturais, permitindo um conhecimento mais acurado dos inúmeros compostos secundários vegetais (FERREIRA & ÁQUILA, 2000). Atualmente existem mais de 100.000 substâncias identificadas, que são divididas em três classes principais: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (TAIZ & ZAIGER, 2013; WINK, 2010).

Pesquisas que avaliam a bioatividade dos compostos podem ser importantes para descobrir novas substâncias que tenham algum tipo de ação sobre o desenvolvimento de outras plantas invasoras de culturas ou microrganismos fitopatógenos, como uma alternativa para diminuir o impacto ambiental causado pelos pesticidas sintéticos usados na prática agrícola (BELZ & HURLE, 2004; HERNÁNDEZ-TERRONES et al., 2007).

O cerrado é uma das mais extensas formações vegetais brasileiras com 2.036.448 km², cerca de 22% do território nacional. O cerrado é considerado um hotspot mundial (MITTERMEIER et al., 2004) e é formado por três biomas: campos tropicais, savanas e florestas estacionais (BATALHA, 2011; BRASIL, 2015). A flora do cerrado apresenta uma elevada riqueza de espécies, com plantas herbáceas, arbustivas, arbóreas e cipós, totalizando 12.356 espécies que ocorrem espontaneamente, além de uma flora vascular nativa (pteridófitas e fanerógamas) somando 11.627 espécies (MENDONÇA et al., 2008).

Myrcia splendens (Sw) DC. é uma espécie arbórea pertencente à família Myrtaceae, popularmente conhecida como guamirim e folha-miúda e possui várias sinonímias, entre elas *Myrcia acutata* DC., *Myrcia rostrata* DC. e *Myrcia communis* Berg e *Myrcia fallax* (Rich.) DC. (OLIVEIRA-FILHO, 2006). Está distribuída desde o México até o sul do Brasil (OLIVEIRA-FILHO & FONTES 2000; MORAIS & LOMBARDI, 2006), ocorrendo abundantemente em áreas de cerrado.

Estudos comprovam que o extrato aquoso de folhas de *M. splendens* inibe a germinação e crescimento inicial de alface, cebola e tomate e das espécies infestantes de culturas agrícolas: amendoim-bravo, corda de viola e capim arroz (IMATOMI, 2010; IMATOMI; NOVAES; GUALTIERI, 2013). Em uma pesquisa sobre a composição de óleos essenciais de *M. splendens*, foi encontrada a presença de grandes quantidades de hidrocarbonetos sesquiterpênicos (55,7%), sesquiterpenos oxigenados (31,8%) e a ausência dos compostos α -pineno e 1,8-cineol, que são comuns à família Myrtaceae (COLE; HABER; SETZER, 2008). Moresco e colaboradores (2014) identificaram a substância miricitrina, um derivado glicosilado da miricetina, nas frações acetato etílica e butanólica de caule e folhas de *M. splendens*. Não foram encontrados trabalhos que avaliam a atividade fitotóxica destes compostos identificados em *M. splendens*.

Assim este trabalho tem como objetivo identificar metabólitos secundários de extratos de folhas maduras de *M. splendens* que possuam potencial fitotóxico. Para isso foi realizado o fracionamento biodirigido dos extratos. A atividade fitotóxica foi avaliada por meio de bioensaios com coleóptilos de trigo e de crescimento inicial de duas espécies

infestantes agrícolas (amendoim-bravo e capim-colonião). Além disso, também foi objetivo comparar os procedimentos de extração quanto à atividade e rendimento dos extratos obtidos.

MATERIAIS E MÉTODOS

I. Coleta e preparação do material vegetal.

As folhas maduras de *Myrcia splendens* (Sw.) DC. foram coletadas de cinco indivíduos na reserva de cerrado *sensu stricto* (savana neotropical) pertencente ao campus da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP (21°58' a 22°00' S e 47° 51' a 47° 52'W), na estação seca (Maio de 2013). A região é caracterizada pelo tipo climático Cwa (tropical de altitude) segundo a classificação de Köppen, com inverno seco (abril a setembro) e verão chuvoso (outubro a março) (MONTEIRO & PRADO, 2006). Foram consideradas maduras as folhas que possuíam coloração verde-escura e textura coriácea. A exsiccata do material coletado foi depositada no Herbário da Universidade Federal de São Carlos com o número 8317.

Após a coleta, as folhas foram secas em estufa de secagem a 40 °C durante 72h. Posteriormente foram trituradas em moinho elétrico para obtenção do pó das folhas, que foi acondicionado em saco plástico e armazenado sob refrigeração (aproximadamente 5°C).

II. Preparação dos extratos.

Foram realizados dois procedimentos de extração. O primeiro utilizou solventes em ordem crescente de polaridade (eluotrópica): hexano (Hx), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcoEt), acetona (ACE) e metanol (MeOH). Foram acrescentados 50g de pó das folhas de *M. splendens* a 300 mL de Hx. Esta mistura foi submetida a banho de ultrassom por 15 minutos seguido de filtração. Este processo foi realizado três vezes com cada solvente, utilizando o mesmo pó residual das filtrações a cada nova extração e seguindo a ordem crescente de polaridade dos solventes. Os filtrados de cada solvente foram secos em capela, dando origem aos extratos 1A (hexânico), 2A (diclorometânico), 3A (acetato etílico), 4A (acetônico) e 5A (metanólico) (Fig. 2.1). O extrato hexânico 1A foi utilizado apenas para a retirada de ceras e lipídeos do pó de folhas e depois foi descartado.

No segundo método de extração, outros 50 g pó de folhas de *M. splendens* foram submetidos à extração com 300 mL de DCM/MeOH (1:1) em banho de ultrassom por 30 minutos. Depois a mistura foi filtrada para obtenção do extrato bruto. Este processo foi repetido 5 vezes, até que o filtrado atingisse uma cor mais clara, indicando que o material

vegetal estava sendo exaurido. O extrato bruto obtido foi seco e depois diluído em 300 mL MeOH/água destilada (95:5) e particionado com 300 mL Hx, originando os extratos hexânico (1B) e metanólico-aquoso. Por fim, o extrato metanólico-aquoso foi seco e diluído em 300 mL água destilada e particionado com 300 mL AcoEt, dando origem aos extratos acetato etílico (2B) e aquoso (3B) (Fig.2.1) (OTSUKA, 2005).

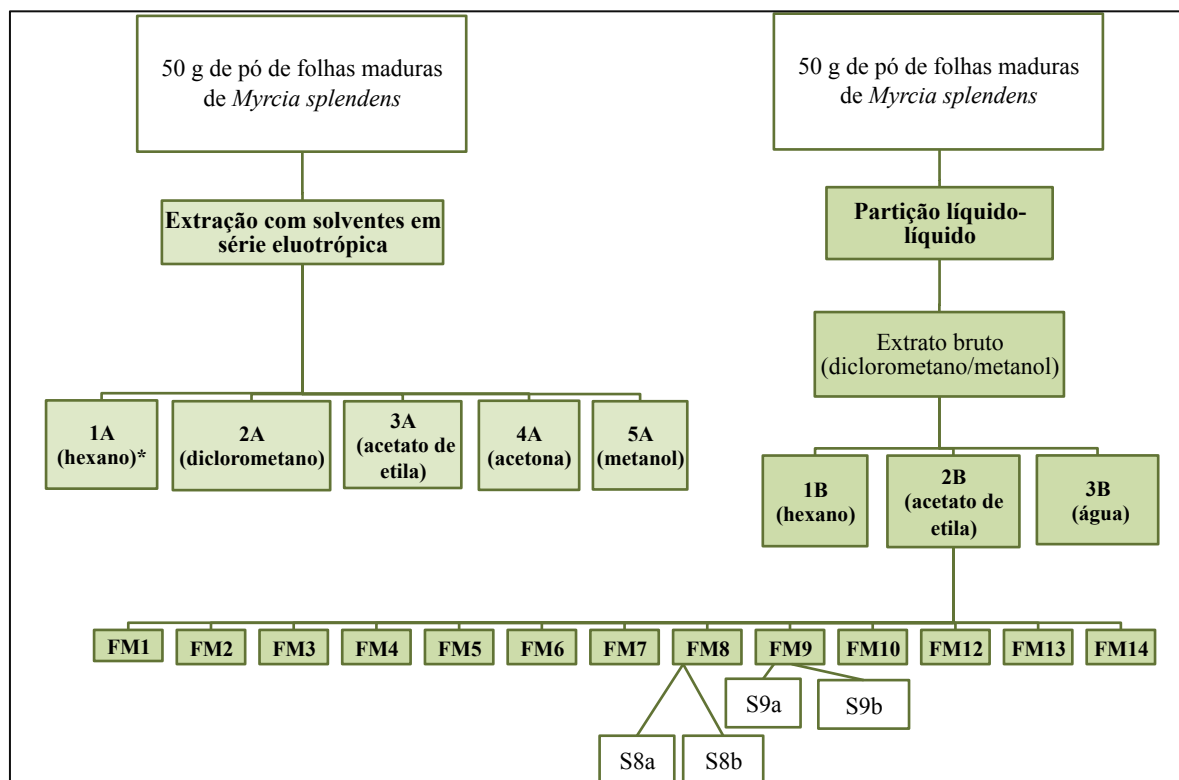


Figura 2.1. Fluxograma da obtenção dos extratos, frações e subfrações de folhas maduras de *Myrcia splendens* por meio das duas metodologias de extração empregadas. (*) Extrato 1A não foi utilizado nos bioensaios.

III. Fracionamento por cromatografia de coluna.

O extrato 2B (acetato etílico), que apresentou atividade fitotóxica promissora nos bioensaios e bom rendimento na extração, foi fracionado em coluna cromatográfica contendo sílica gel (70 - 230 mesh) como fase estacionária e misturas de Hx e ACE com polaridade crescente, seguido de MeOH como eluentes. Foram obtidas 46 frações, as quais foram analisadas em cromatografia de camada delgada analítica (CCDA). As placas cromatográficas foram visualizadas sob luz UV a 254 e 365 nm e reveladas com aplicação de solução etílica de ácido fosfomolibídico (5:100 m/v) seguida de aquecimento a 120°C durante aproximadamente 1min.

As frações com perfis semelhantes foram reunidas, resultando em 14 frações finais (Fig.2.1). Estas foram testadas em bioensaio de coleóptilo de trigo seguindo o método descrito no item IV.

IV. Isolamento por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e identificação química.

As frações FM8 e FM9, que apresentaram potencial fitotóxico sobre o crescimento dos coleótilos de trigo e rendimento suficiente, foram analisadas por CLAE e subfracionadas em cartucho de sílica C18 eluído com MeOH/H₂O 1:1 seguido por MeOH/H₂O 95:05 dando origem às subfrações S8a, S8b, S9a e S9b (Fig. 2.2). Antes de serem injetadas no equipamento de CLAE, as subfrações foram filtradas em filtros com 0,22µm de poro.

A CLAE analítica foi feita com as 4 subfrações na concentração de aproximadamente 2 mg.mL⁻¹ a fim de verificar o perfil cromatográfico de cada uma delas e determinar o melhor método para o isolamento do composto majoritário. O fluxo utilizado na CLAE analítica foi de 1mL por minuto. O método escolhido para o isolamento foi de eluição isocrática com uma mistura de 40% de MeOH em H₂O por 40 minutos. O composto majoritário, presente nas 4 subfrações, foi isolado da subfração S9b por CLAE preparativa com o método escolhido e fluxo de 10 mL por minuto. A amostra foi injetada na concentração de 20 mg.mL⁻¹.

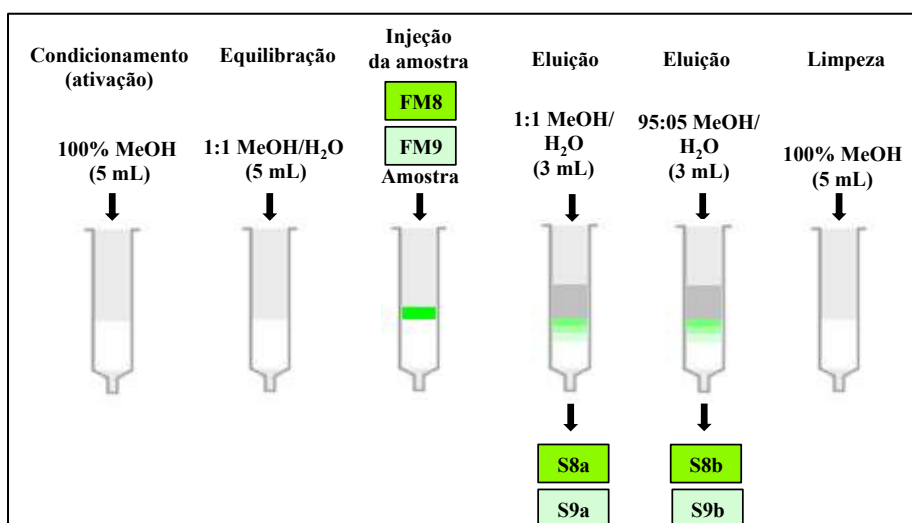


Figura 2.2. Esquema de preparo das amostras para realização de CLAE analítica e preparativa, resultando nas subfrações S8a, S8b, S9a e S9b.

A CLAE foi realizada utilizando-se equipamento Shimadzu[®], com bombas modelo LC-6AD, Degasser DGU-20A_{5R}, Autosampler SIL-10AF, detector DAD (Diodo Array Detector) SPD-M20A, controladora CBM-20A, colunas analítica Phenomenex[®] Luna C18 (2) 100A (250 x 4,60mm, 5µm) e preparativa Phenomenex[®] Luna C18 (2) 100A (150 x 21,20mm, 5µm).

O composto isolado foi submetido à análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para obtenção dos espectros ^1H e ^{13}C com supressão do pico da água, ^{13}C , TOCSY 1D, HMBC e HSQC. Os espectros de RMN foram obtidos utilizando-se espectrômetro Bruker Avance III 600 HD (14,1 T), operando a 600 MHz para ^1H e 200 MHz para ^{13}C . O solvente deuterado utilizado para solubilizar a amostra foi o MeOH.

As análises de CLAE e RMN foram realizadas em parceria com Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, sob a coordenação do Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro.

V. Bioensaio de crescimento de coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum*).

Os extratos e frações foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) ($5 \mu\text{L.mL}^{-1}$) e em solução tampão fosfato-citrato (2% de sacarose e pH 5,6) a fim de obter as concentrações 0,8; 0,4 e $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$. Foram feitos dois controles: um negativo com DMSO a $5 \mu\text{L.mL}^{-1}$ e solução tampão e outro positivo com DMSO e o herbicida comercial GOAL[®] (princípio ativo: oxifluorfem 240 g.L^{-1}) nas mesmas concentrações e condições dos extratos. Foram utilizadas três réplicas em tubos de ensaio para cada tratamento.

Sementes de trigo (*Triticum aestivum* L. cv.'BRS264') foram germinadas no escuro a 25°C , durante 72 horas em caixas do tipo gerbox forradas com duas folhas de papel filtro embebidas com água destilada para a obtenção das plântulas (HANCOCK et al., 1964). De cada coleóptilo descartou-se os 2 mm apicais e os próximos 4 mm foram cortados e utilizados no bioensaio. Todo este processo foi realizado sob luz verde de segurança (NITSCH & NITSCH, 1956).

Em cada tubo de ensaio foram colocados cinco fragmentos de coleóptilo e 2mL de solução dos extratos ou frações, controle negativo ou controle positivo. Os tubos foram mantidos a 25°C no escuro a uma rotação de 1,2 Hz durante 24h em posição horizontal (MACÍAS et al., 2010). Posteriormente os coleóptilos foram fotografados e medidos com auxílio do programa ImageJ.

VI. Bioensaio de crescimento de plântulas.

Os extratos e as frações foram diluídos em DMSO ($5 \mu\text{L.mL}^{-1}$) e água destilada para obter as concentrações 2,0; 1,5; 1,25 e $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$. Para este bioensaio também foram preparados dois controles: um controle negativo utilizando somente DMSO ($5 \mu\text{L.mL}^{-1}$) e água destilada e outro positivo com DMSO e o herbicida comercial GOAL[®] (princípio ativo: oxifluorfem 240 g.L^{-1}) nas mesmas concentrações e condições dos extratos e frações.

As espécies-alvo utilizadas foram as plantas infestantes de culturas agrícolas amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla* L.), eudicotiledônea, e capim-colonião (*Megathyrsus maximus* Jacq.), monocotiledônea. Sementes das duas espécies foram pré-germinados em água destilada e mantidas em câmaras do tipo B.O.D.. Plântulas com aproximadamente 3 mm de comprimento de radícula, foram transferidas para caixas plásticas transparentes (13 x 8 x 4 cm) forradas com duas folhas de papel filtro umedecidas com 6mL das soluções dos extratos ou dos controles. As caixas, com 10 plântulas cada, foram tampadas e mantidas em B.O.D. por sete dias com temperatura de 27° C e fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro para capim-colonião (TOMAZ et al., 2010) e com temperatura de 25° C e fotoperíodo de 12-12 horas para amendoim-bravo (INOUE et al., 2010). Foram feitos quatro repetições de cada tratamento. Posteriormente mediu-se os comprimentos da parte aérea e da raiz primária utilizando um paquímetro digital. Além disso, as plântulas foram classificadas em normais e anormais de acordo com as especificações das Regras de Análises de Sementes (BRASIL, 2009).

VII. Medida dos potenciais osmóticos.

As medidas dos potenciais osmóticos dos extratos foram obtidas em mOsm.Kg⁻¹ utilizando um osmômetro e depois foram convertidas para pressão osmótica (MPa) (LARCHER, 2004).

VIII. Bioensaio de crescimento de células do metaxilema radicular.

Para este bioensaio utilizou-se apenas raízes de amendoim-bravo, pois a distribuição dos feixes vasculares de monocotiledôneas, como o capim-colonião, não permite boa visualização das células do metaxilema radicular.

Raízes de amendoim-bravo obtidas de plântulas crescidas no extrato 2B (extrato bioativo com maior rendimento) e no controle negativo e mantidas nas mesmas condições do bioensaio de crescimento (Item V) compuseram o material anatômico utilizado.

As raízes primárias das plântulas foram cortadas com uma lâmina, colocadas em frascos contendo etanol 70% (GATTI et al., 2010), que foram fechados e incubados a 40° C durante sete dias. Em seguida, as raízes foram lavadas com água destilada, mantidas numa solução de hidróxido de sódio 25% e incubadas a 40° C por 48 horas para clarificação. Posteriormente as raízes foram lavadas com água destilada, colocadas em corante Lacmóide durante 24 horas e dispostas em lâminas, cobertas com xarope Apathy e uma lamínula, de acordo com o método de Fuchs modificado (KRAUS & ARDUIN, 1997). Foram utilizadas

quatro repetições de raízes primárias para cada tratamento utilizado.

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico acoplado a uma câmera fotográfica. Foram fotografadas 10 células da região central do metaxilema das raízes num aumento de 10X (GATTI et al., 2010). O comprimento das células fotografadas foram medidos com o auxílio do software ImageJ.

IX. Análises estatísticas.

Os comprimentos dos fragmentos de coleótilo de trigo e da parte aérea e raiz primária das plântulas das espécies-alvo foram calculados como porcentagem de inibição ou estímulo em relação ao controle negativo, sendo que os valores positivos representam estímulo e os valores negativos representam inibição.

Os dados foram submetidos a teste de normalidade (Shapiro-Wilk). A diferença estatística foi calculada com uma significância de 5%, utilizando o Teste de Welch para dados normais ou o Teste de Wilcoxon para dados não normais. Todas as análises foram realizadas no programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2014).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O bioensaio de crescimento de coleótilos de trigo é um teste clássico para a avaliação da atividade fitotóxica de extratos vegetais (HANCOCK et al., 1964). Todos os extratos apresentaram atividades inibitórias estatisticamente diferentes do controle negativo em todas as concentrações testadas (Fig. 2.3). Os extratos 2A (0,4 mg.mL⁻¹) e 2B (0,4 mg.mL⁻¹) destacaram-se dos demais por inibir mais de 70% do comprimento dos coleótilos. Já os extratos 3A, 2B e 1B foram os mais ativos na menor concentração utilizada (0,2 mg. mL⁻¹).

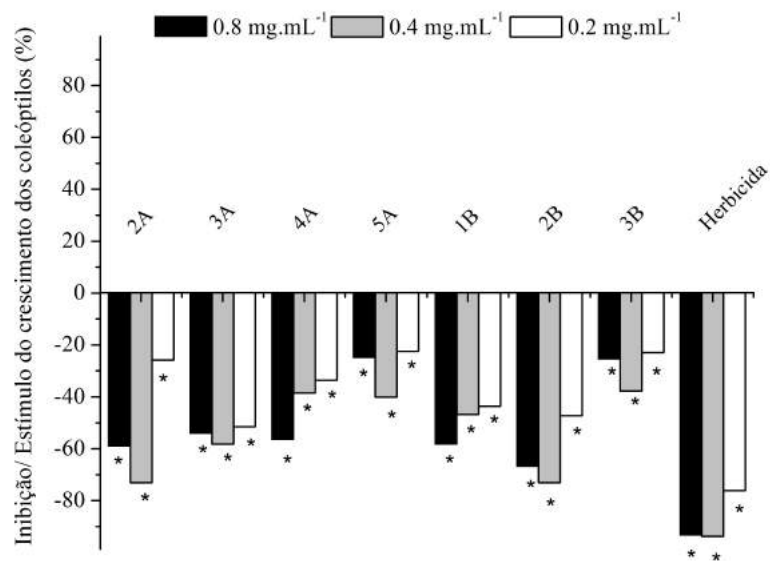


Figura 2.3 Efeito dos extratos de folhas maduras de *Myrcia splendens* sobre o comprimento de coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum*). (*) indica tratamento que apresenta diferença significativa quando comparado ao controle negativo. O controle positivo foi feito com herbicida comercial cujo princípio ativo é o Oxifluorfem.

O potencial osmótico é um aspecto que deve ser considerado em bioensaios de crescimento de plântulas, pois pode mascarar os efeitos dos compostos fitotóxicos (FERREIRA & ÁQUILA, 2000). O potencial osmótico dos extratos nas concentrações testadas se manteve baixo (entre -0,05 a -0,16 MPa), encontrando-se dentro de padrões aceitáveis quando comparados com dados da literatura. Gatti e colaboradores (2004) recomendam que o potencial osmótico de extratos não ultrapasse -0,2 MPa.

A parte aérea das plântulas de amendoim-bravo foi inibida significativamente pelos extratos 2A (1,5 mg.mL⁻¹), 3A (a 2,0; 1,5 e 1 mg.mL⁻¹), 4A (a 2,0; 1,5 e 1,25 mg.mL⁻¹), 1B (a 2,0 e 1,5 mg.mL⁻¹) e 2B (em todas as concentrações). O comprimento da raiz dessa mesma espécie foi inibido pelos extratos 2A e 4A em todas as concentrações, pelos extratos 3A, 5A, 1B e 2B (a 2,0; 1,5 e 1,25 mg.mL⁻¹) e pelo extrato 3B na concentração de 2 mg.mL⁻¹.

A parte aérea de capim-colonião foi inibida pelos extratos 2A e 1B (a 2,0 e 1,5 mg.mL⁻¹), 3A (a 1,5, 1,25 e 1,0 mg.mL⁻¹), 4A e 2B (a 2,0; 1,5 e 1,25 mg.mL⁻¹) e 5A (a 2,0 mg.mL⁻¹) e a raiz, pelos extratos 2A, 3A, 4A, 5A, 1B e 2B em todas as concentrações e pelo extrato 3B (a 2,0 e 1,5 mg.mL⁻¹) (Fig. 2.4). O controle positivo, feito com o herbicida oxifluorfem, que é classificado como pré e pós-emergente inicial, foi ativo em ambas as espécies, afetando o desenvolvimento inicial das plântulas com efeitos tanto na parte aérea quanto na raiz.

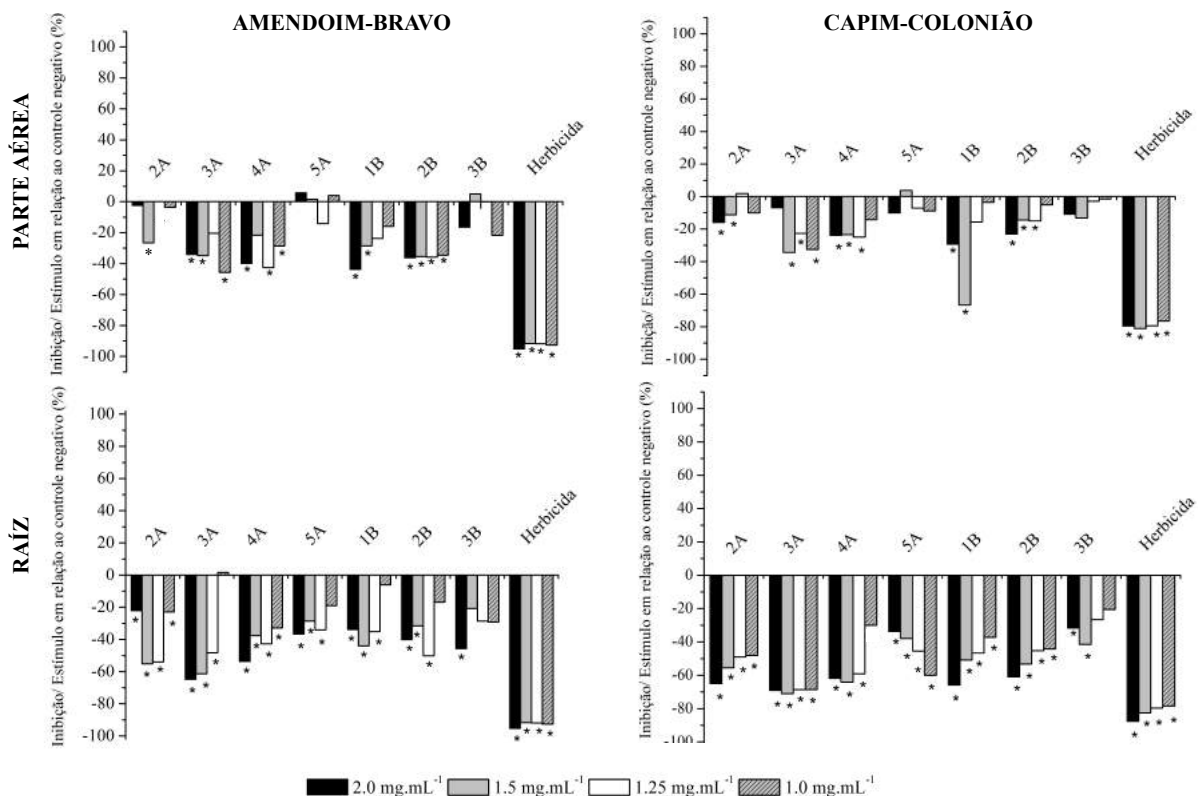


Figura 2.4. Efeito dos extratos de folhas maduras de *Myrcia splendens* sobre o crescimento inicial de plântulas de amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*) e capim-colonião (*Megathyrus maximus*) em diferentes concentrações. (*) indicam os extratos nas concentrações que apresentaram diferença significativa quando comparado com o controle negativo. O controle positivo foi feito com herbicida comercial cujo princípio ativo é o oxifluorfem.

Observou-se que o crescimento da raiz das plântulas das espécies-alvo foram mais afetadas pelo efeito dos extratos do que a parte aérea, sendo capim-colonião mais sensível do que amendoim-bravo. A maior sensibilidade radicular a compostos fitotóxicos está amplamente documentada na literatura e é considerada um dos principais parâmetros que indicam sensibilidade da planta aos efeitos das fitotoxinas. (CHON et al., 2002; GATTI et al., 2004; SOUZA FILHO & DUARTE, 2007; REJILA & VIJAYAKUMAR, 2011; GRISI et al., 2013b; HAMERMANN et al., 2015). Tal sensibilidade pode ser devido ao fato das raízes ficarem em maior contato com o extrato do que a parte aérea neste tipo de bioensaio, e também podem apresentar maior permeabilidade aos compostos fitotóxicos, pois não possuem uma cobertura cuticular bem desenvolvida como a apresentada pela superfície do hipocótilo (CORREIA; CENTURION; ALVES, 2005; BESSIRE et al., 2007; YOSHIMURA et al., 2011). A interferência dos compostos fitotóxicos no crescimento e desenvolvimento radicular de plântulas 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).

Os percentuais e tipos de anomalias apresentados em cada tratamento são mostrados na Tabela 2.1 para amendoim-bravo e na Tabela 2.2 para capim-colonião. As anormalidades observadas foram: inversão gravitópica, necrose de raízes e/ou de parte aérea, hipocótilo enrolado ou contorcido e atrofias (Fig. 2.5).

Tabela 2.1. Percentual de plântulas de amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*) crescidas sob efeito dos extratos 2A (diclorometânico), 3A (acetato etílico), 4A (acetônico), 5A (metanólico), 1B (hexânico), 2B (acetato etílico) e 3B (aquoso) de folhas maduras de *Myrcia splendens* em diferentes concentrações e as anomalias encontradas em cada tratamento: N- necrose; A- atrofia severa; IG- inversão gravitópica e EH- enrolamento de hipocótilo.

AMENDOIM-BRAVO									
Extrato	% de plântulas anormais				Tipos de anomalias				
	Concentrações (mg.mL ⁻¹)				Concentrações (mg.mL ⁻¹)				
	2,0	1,5	1,25	1,0	2,0	1,5	1,25	1,0	1,0
2A	37,5%	25%	27,5%	25%	N;A;IG;EH	N;A;IG;EH	N;A;IG;EH	N;A;EH	N;A;EH
3A	60%	75%	50%	20%	N;A;IG	N;A;IG;EH	N;A;IG;EH	A;IG;EH	A;IG;EH
4A	52,5%	42,5%	50%	27,5%	N;A;IG;EH	N;A;IG;EH	A;IG;EH	A;IG;EH	A;IG;EH
5A	25%	40%	27,5%	15%	N;A;IG;EH	N;A;IG;EH	N;A;IG;EH	N;A;EH	N;A;EH
1B	40%	42,5%	32,5%	25%	N;A;IG;EH	N;A;IG;EH	N;A;IG;EH	N;A;IG;EH	N;A;IG;EH
2B	57,5%	57,5%	50%	30%	N;A;IG;EH	N;A;IG;EH	N;A;EH	N;A;IG;EH	N;A;IG;EH
3B	35%	25%	27,5%	20%	N;A;IG;EH	N;A;IG;EH	N;A;IG;EH	A;EH	A;EH
Controle negativo	2,5%				A				

Tabela 2.2. Porcentual de plântulas de capim-colonião (*Megathyrsus maximus*) crescidas sob efeito dos extratos 2A (diclorometânico), 3A (acetato etílico), 4A (acetônico), 5A (metanólico), 1B (hexânico), 2B (acetato etílico) e 3B (aquoso) de folhas maduras de *Myrcia splendens* em diferentes concentrações e as anomalias encontradas em cada tratamento: N- necrose; A- atrofia severa; IG- inversão gravitropica e EH- enrolamento de hipocótilo.

A	CAPIM-COLONIÃO								
	Extrato	% de plântulas anormais				Tipos de anomalias			
		Concentrações (mg.mL ⁻¹)				Concentrações (mg.mL ⁻¹)			
	2,0	1,5	1,25	1,0	2,0	1,5	1,25	1,0	
2A	2,5%	12,5%	17,5%	10%	N	A; IG	N;A	N;A	
3A	80%	40%	30%	10%	N;A	N;A;IG	N;A	A	
4A	15%	10%	15%	5%	A;IG	A;IG	A;IG	A	
5A	5%	10%	5%	5%	A	A	A	A	
1B	20%	17,5%	2,5%	2,5%	N;A	A;IG	A	A	
2B	30%	17,5%	15%	2,5%	A;IG	A;IG;EH	A;IG	A	
3B	7,5%	10%	5%	0%	N;A	A;IG	A	-	
Controle negativo	0%				-				

As plântulas de amendoim-bravo apresentaram maiores porcentagens de anormalidades do que as plântulas de capim-colonião, principalmente necroses e enrolamento de hipocótilo. Entretanto, a maior porcentagem de plântulas anormais em um tratamento foi encontrada na concentração de 2,0 mg.mL⁻¹ do extrato 3A para capim-colonião, na qual registrou-se 80% de plântulas anormais, sendo a anormalidade predominante a necrose em raiz. Este extrato na concentração de 1,5 mg.mL⁻¹ também induziu a maior porcentagem de plântulas anormais em amendoim-bravo (75%). Além disso, os tratamentos 3A (2 e 1,25 mg.mL⁻¹), 4A (2 e 1,25 mg.mL⁻¹) e 2B (2, 1,5 e 1,25 mg.mL⁻¹) levaram à ocorrência de 50% ou mais de plântulas anormais de amendoim-bravo. Todas as plântulas de ambas as espécies-alvo tratadas com o herbicida necrosaram após os sete dias de duração do bioensaio. No controle negativo, apenas uma plântula de amendoim-bravo apresentou anormalidade (2,5%).

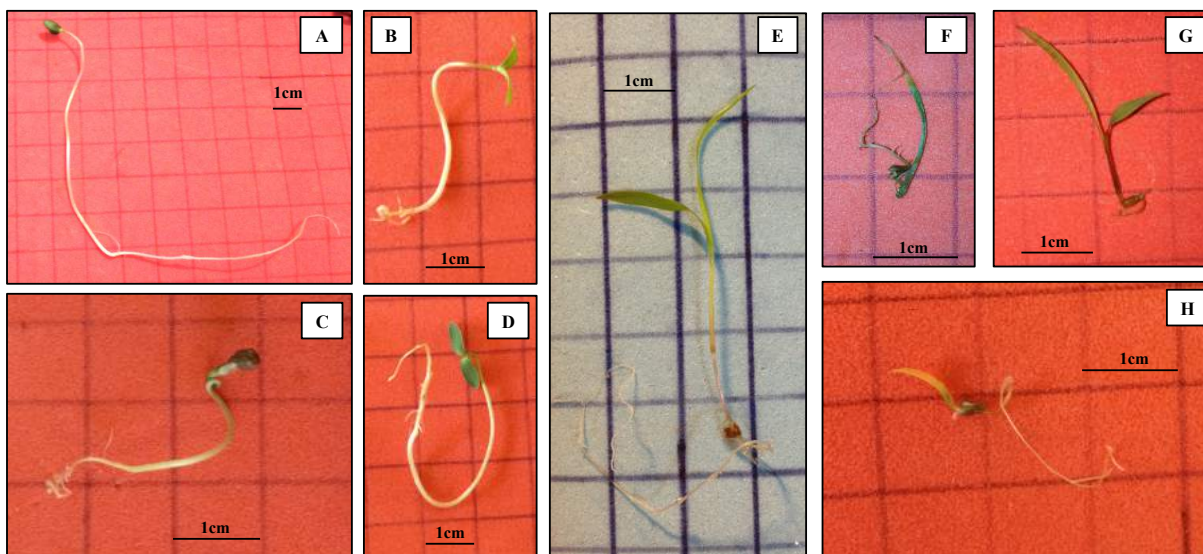


Figura 2.5. Anormalidades apresentadas pelas espécies-alvo tratadas com extratos de folha madura de *Myrcia splendens*. Amendoim-bravo: A- controle; B- necrose e acrofia de raiz; C- necrose; atrofia de raiz e enrolamento de hipocótilo; D- atrofia de raiz e inversão gravitropica. Capim-colonião: E- controle; F- inversão gravitropica; G- necrose e atrofia de raiz; H- necrose e atrofia de parte aérea.

As anormalidades observadas impedem que a plântula se desenvolva normalmente, assim, seu crescimento fica comprometido a ponto de não permitir que ela se estabeleça (BRASIL, 2009). A morfologia e a anatomia das plântulas podem ser modificadas pelo efeito de algumas fitotoxinas que interferem na função de alguns hormônios vegetais como a auxina e a citocinina, importantes na modulação de processos como a resposta trópica à luz e a gravidade, arquitetura geral do caule e raízes, desenvolvimento vascular, divisão e alongamento celular, levando ao surgimento de anomalias responsáveis por inviabilizar ou prejudicar o desenvolvimento das plântulas, sendo a necrose da radícula a mais comum (FERREIRA & ÁQUILA, 2000; TANIMOTO, 2005; ALONI, et al. 2006).

Com base nos resultados dos bioensaios realizados, os extratos foram ranqueados em ordem decrescente de atividade fitotóxica pelo somatório do número de tratamentos com efeito inibitório (estatisticamente diferente do controle negativo), como mostrado na Tabela 2.3. O extrato 2B teve a maior atividade fitotóxica total.

Tabela 2.3. Ordem decrescente da atividade fitotóxica causada pelos extratos de folhas maduras de *Myrcia splendens* dada pela quantidade de tratamentos com atividade inibitória em relação ao controle negativo.

Extrato	Alongamento de coleóptilos de trigo	Crescimento de amendoim-bravo		Crescimento de capim-colonião		Total
		PARTE AÉREA	RAIZ	PARTE AÉREA	RAIZ	
2B	3	4	3	3	4	17
4A	3	3	4	3	3	16
3A	3	3	3	3	4	16
2A	3	1	4	2	4	14
1B	3	2	3	2	4	14
5A	3	0	3	0	4	10
3B	3	2	2	0	3	7

Comparando as metodologias de extração quanto a atividade e o rendimento dos extratos, foi possível observar que para as duas extrações os extratos mais polares 5A (metanol) e 3B (aquoso) foram os menos ativos e apresentaram os maiores rendimentos (Tabela 2.4). Já os extratos obtidos com os solventes de polaridade intermediária acetato de etila (3A e 2B) e acetona (4A), tiveram as maiores atividades e rendimentos baixos, especialmente o extrato 3A com rendimento de apenas 0,57%.

Tabela 2.4 – Rendimentos¹ dos extratos de folhas maduras de *Myrcia splendens*.

	Extratos				
	Extração direta – solventes em ordem crescente de polaridade:				
	2A	3A	4A	5A	TOTAL
Rendimento	1,5%	0,57%	6,1%	18,28%	26,45%
	Partição líquido-líquido:				
	1B	2B	3B	TOTAL	
Rendimento	4,65%	4,74%	20,24%	29,63%	

¹ Porcentual relativo à massa de pó de folhas maduras utilizada na extração.

Baseado nos resultados dos bioensaios de coleóptilos de trigo e de crescimento inicial, o extrato 2B foi selecionado para ser fracionado e foi submetido a um bioensaio de crescimento de células do metaxilema radicular, para verificar se esta redução ocorria a partir de alterações a nível celular. Observou-se que houve diminuição significativa do comprimento das células do metaxilema tratadas com o extrato em relação ao controle e esta redução ocorreu de maneira dose-dependente (Fig. 2.6 e 2.7).

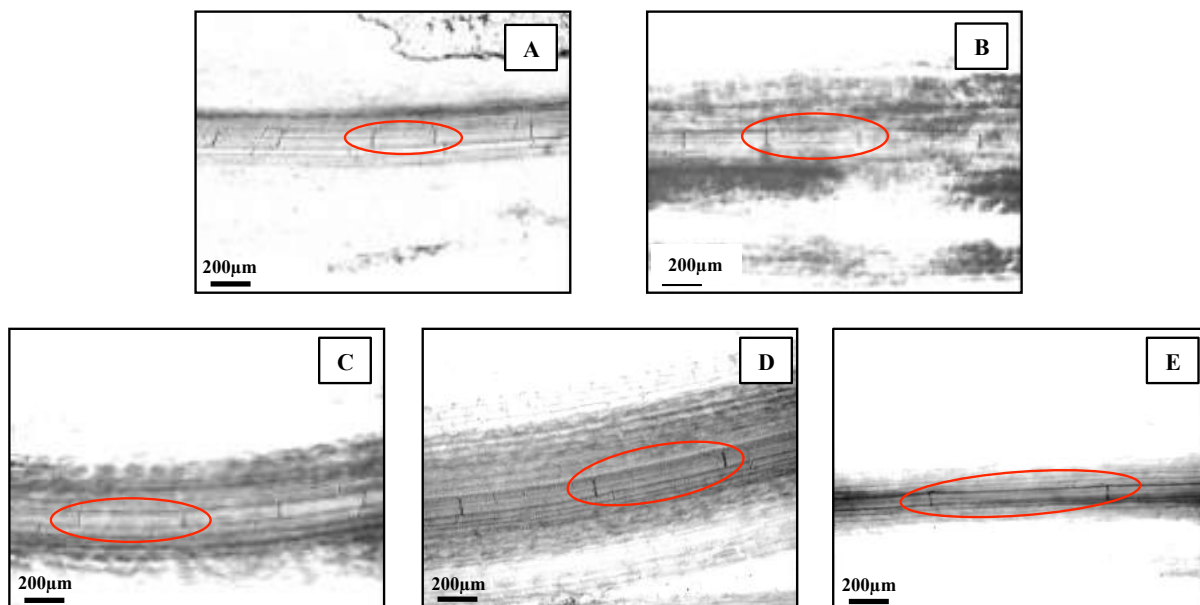


Figura 2.6. Fotomicrografias de células do metaxilema de amendoim-bravo crescidas com o extrato 2B (acetato etílico) nas concentrações $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ (A), $1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ (B), $1,25 \text{ mg.mL}^{-1}$ (C), $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ (D) e o controle negativo (E).

A cada $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ de extrato adicionado, o comprimento médio das células diminui $77,015 \mu\text{m}$ (Fig.2.7). Resultados semelhantes foram obtidos por Grisi et al. (2013a) com extratos de *Serjania lethalis* em células de metaxilema de raiz de amendoim-bravo.

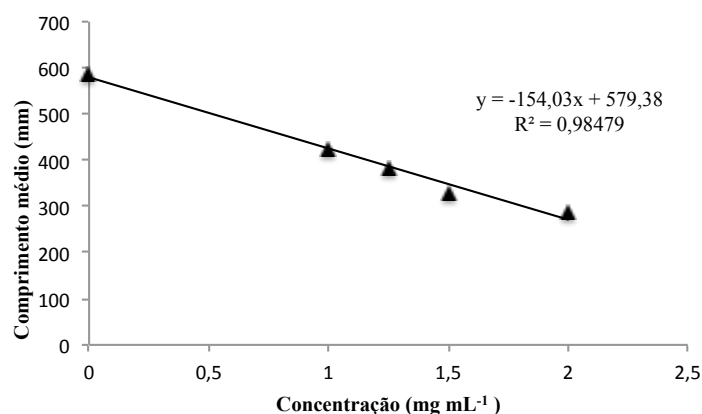


Figura 2.7 . Variação do comprimento de células de metaxilema radicular de amendoim-bravo em diferentes concentrações do extrato 2B.

Hormônios vegetais que modulam o desenvolvimento de raízes, como as citocininas e as auxinas, podem acarretar uma diminuição ou impedimento do crescimento de células meristemáticas sob condições de estresse como as possivelmente causadas pelos extratos vegetais (TANIMOTO, 2005; ALONI et al., 2006).

O fracionamento do extrato 2B resultou em 14 frações (Fig. 2.1), cujos rendimentos estão expressos na Tabela 2.5.

Tabela 2.5. Resultado do fracionamento do extrato 2B contendo o rendimento de cada fração e a polaridade aproximada dos solventes utilizados para obtê-las.

Resultado do fracionamento do extrato 2B							
Fração	FM1	FM2	FM3	FM4	FM5	FM6	FM7
Polaridade aproximada	Hx/ACE 9:1	Hx/ACE 8:2	Hx/ACE 8:2	Hx/ACE 7:3	Hx/ACE 6:4	Hx/ACE 1:1	Hx/ACE 3:7
Rendimento	6,79%	4,36%	8,49%	4,79%	1,15%	0,85%	3,63%
Fração	FM8	FM9	FM10	FM11	FM12	FM13	FM14
Polaridade aproximada	Hx/ACE 2:8	Hx/ACE 1:9	ACE 100%	ACE/MeOH 1:1	MeOH 100%	MeOH/H ₂ O 7:3	MeOH/H ₂ O 1:1
Rendimento	9,09%	5,01%	10,82%	16,13%	2,87%	1,24%	1,17%

As frações foram testadas sobre o crescimento de coleótilos de trigo e os resultados obtidos mostraram que as frações FM4, FM5, FM8 e FM9 inibiram significativamente o crescimento dos coleótilos de trigo em todas as concentrações testadas (Fig. 2.8). As frações FM10 e FM12 estimularam o crescimento dos coleótilos de trigo em uma concentração (0,2 mg.mL⁻¹ e 0,4 mg.mL⁻¹ respectivamente).

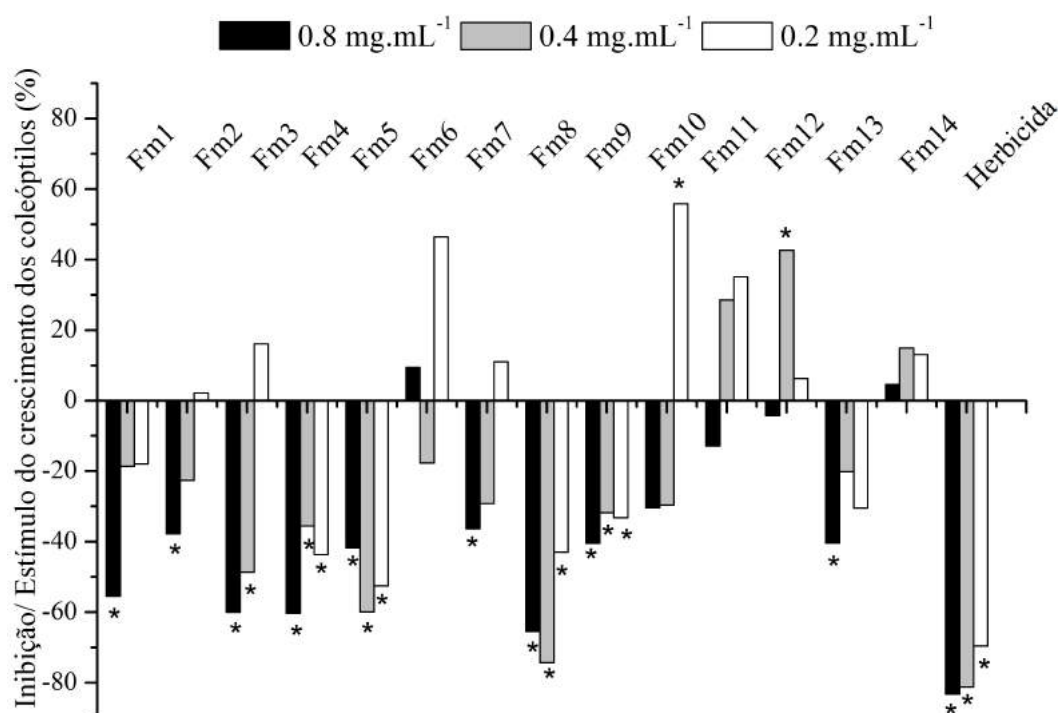


Figura 2.8. Efeito das frações obtidas do extrato 2B (acetato etílico) de folhas maduras de *Myrcia splendens* sobre o comprimento de coleótilos de trigo (*Triticum aestivum*). (*) indica tratamento que apresenta diferença

significativa quando comparado ao controle negativo. O controle positivo foi feito com herbicida comercial cujo princípio ativo é o oxifluorfem.

As frações FM8 e FM9 submetidas a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) analítica continham o mesmo composto majoritário (Fig. 2.9), o qual foi isolado da subfração S9b e submetido a RMN.

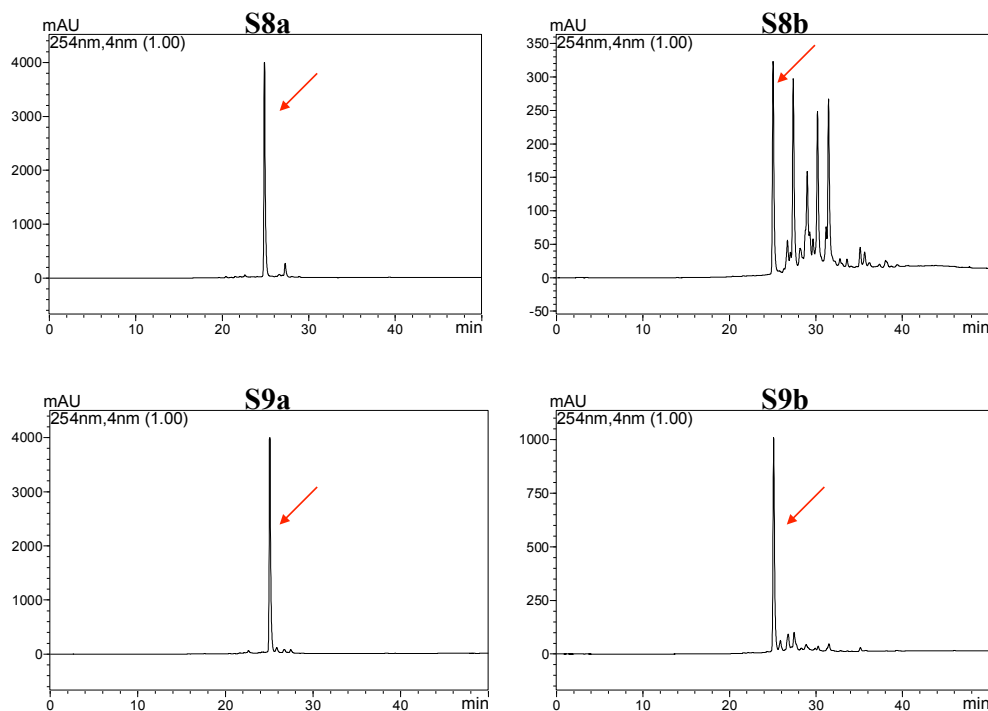


Figura 2.9. Cromatogramas das subfrações obtidas das frações FM8 e FM9 por CLAE analítico utilizando método isocrático (40% de MeOH e H₂O).

A partir dos espectros de RMN e da literatura consultada (DAVID et al., 1996; ADEROGBA et al. 2013), foi possível elucidar a estrutura molecular do composto majoritário como sendo miricetina-3-O-ramnosídeo, também chamada de miricitrina, um flavonóide glicosilado derivado da miricetina com o açúcar ramnose (Fig.2.10).

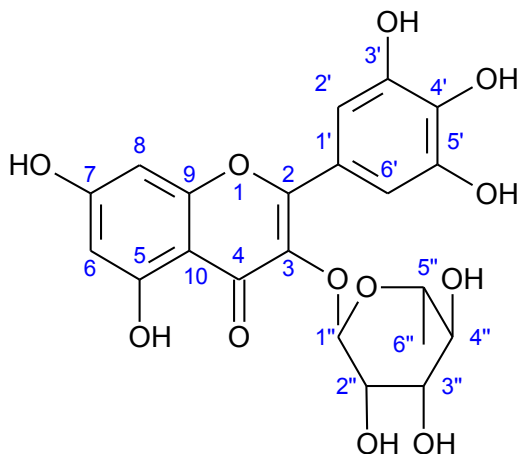


Figura 2.10. Estrutura da miricetina-3-O-ramnosídeo (miricitrina).

Os dados obtidos no RMN ^1H e ^{13}C estão contidos na Tabela 2.6. Por ser o composto majoritário nas quatro subfrações, a presença deste flavonóide glicosilado pode estar associado com a atividade fitotóxica apresentada pelas frações FM8 e FM9. Os flavonóides podem influenciar o transporte de auxina, a defesa vegetal, a modulação dos níveis e espécies reativas de oxigênio (EROs) e atividade antioxidante, além de promover efeitos alelopáticos (TAYLOR & GROTEWOLD, 2005; TREUTTER, 2005; BAIS et al., 2006; MACÍAS et al., 2007; PEER & MURPHY, 2007). A atividade biológica dos flavonóides está relacionada a sua estrutura química, especialmente aos grupos hidroxil (CUNHA; ALENCAR; DE OLIVEIRA, 2007). Segundo Macías e colaboradores (2007), os flavonóides aumentam as taxas de apoptose e integridade e funcionalidade da membrana celular, apesar de não se saber se estas atividades se relacionam com as atividades fitotóxicas destes compostos, portanto ainda são necessários mais estudos a fim de determinar seus alvos moleculares e modos de ação.

Tabela 2.6. Tabela comparando os dados obtidos pela RMN do composto isolado e dos dados encontrados na bibliografia consultada para miricitina-3-O-ramnosídeo.

Miricitina-3-O-ramnosídeo	δ Bibliografia (ADEROGBA et al., 2013)		δ Composto isolado	
	¹ H-NMR (CH ₃ OD, 500 MHz)	¹³ C-NMR (CH ₃ OD, 125.0 MHz)	¹ H-NMR (CH ₃ OD, 600 MHz)	¹³ C-NMR (CH ₃ OD, 200.0 MHz)
1'	-	122.0	-	121.86
2'	6.95 (1H,s)	109.7	6.95(1H,s)	109.52
3'	-	146.9	-	146.85
4'	-	138.0	-	137.90
5'	-	146.9	-	146.85
6'	6.95 (1H,s)	109.7	6.95(1H,s)	109.52
1	-	-	-	-
2	-	159.5	-	159.43
3	-	136.4	-	136.28
4	-	179.8	-	179.65
5	-	163.3	-	163.20
6	6.20 (1H,d, J = 2.2Hz)	99.9	6.20(1H,d,J=2.1Hz)	99.83
7	-	165.9	-	166.05
8	6.36 (1H,d, J=2.1Hz)	94.8	6.36(1H,d,J=2.1Hz)	94.70
9	-	158.5	-	158.51
10	-	106.0	-	105.80
1''	5.32(1H,d, J = 1.5Hz)	103.7	5.31(1H,d,J=1.25Hz)	103.86
2''	4.23 (1H,dd, J = 3.3,1.7Hz)	72.0	4.22(1H,dd,1.63,3.27Hz)	71.87
3''	3.81 (1H,dd, J = 9.5,3.4Hz)	72.3	3.79(1H,dd,3.42,9.81Hz)	72.08
4''	3.37 (1H,t, J = 9.5Hz)	73.4	3.33(1H,t,9.8Hz)	73.31
5''	3.53 (1H,dd, J = 9.6, 6.2Hz)	72.1	3.52 (1H,dq,6.41, 6.41, 6.41, 9.92Hz)	72.03
6''	0.97 (3H,d, J = 6.3Hz)	17.7	0.96(3H,d,6.38Hz)	17.66

A miricitrina já foi identificada em diversas espécies vegetais (SOICKE; GÖRLER; WARLING, 1990; KEINÄNEN & JULKUNEN-TIITTO, 1998; ELEGAMI et al., 2003; SILVA; LOPES; BOLZANI, 2006; BRITO et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2012), incluindo as mirtáceas *Myrtus communis* (ROMANI et al., 1998), *Myrcia uniflora* (FERREIRA et al. 2006), *Campomanesia adamantium* (COUTINHO et al., 2010), *Campomanesia velutina* (MICHEL et al, 2013) e na própria *Myrcia splendens* (MORESCO et al., 2014). A miricitrina está associada a atividades antioxidante, antimicrobiana, antígeno-tóxica, antiinflamatória, antinociceptiva e contra diabetes mellitus, mas ainda não há estudos que avaliem seu potencial fitotóxico (YOSHIKAWA et al., 1998; MATSUDA et al, 2002; HAYDERA et al., 2008; COUTINHO et al., 2010; ADEROGBA et al., 2013; MICHEL et al, 2013; MORESCO et al., 2014). Este trabalho identificou a miricitrina em frações de

folhas maduras de *Myrcia splendens* que apresentaram atividade fitotóxica, sugerindo que possa haver relação entre a substância isolada e a fitotoxicidade das frações.

CONCLUSÕES

Os extratos mais polares (5A e 3B) apresentaram os maiores rendimentos e as menores atividades fitotóxicas, enquanto os extratos com polaridades intermediárias apresentaram rendimentos mais baixos e maior potencial fitotóxico.

Nos bioensaios de crescimento inicial, as raízes das plantulas das duas espécies-alvo testadas foram mais inibidas pela atividade dos extratos e o capim-colonião foi a espécie mais sensível.

O extrato 2B foi considerado o mais promissor na busca de substâncias com potencial fitotóxico e apresentou atividade inibitória nas células do metaxilema radicular de amendoim-bravo.

As frações FM4, FM5, FM8 e FM9 do extrato 2B mantiveram a atividade inibitória após o fracionamento, especialmente FM8.

O composto majoritário das frações FM8 e FM9 foi isolado e identificado como sendo a miricitrina (miricetina-3-O-ramnosídeo), indicando possível atividade fitotóxica desse composto.

REFERÊNCIAS

ADEROGBA, M.A.; NDHLALA, A.R.; RENGASAMY, N.R.R.; VAN STADEN, J. Antimicrobial and Selected In Vitro Enzyme Inhibitory Effects of Leaf Extracts, Flavonols and Indole Alkaloids Isolated from *Croton menyharthii*. **Molecules**, v.18, p.12633-12644, 2013.

ALVES, S.M.; ARRUDA, M.S.P. & SOUZA FILHO, A.P.S.. Biossíntese e Distribuição de Substâncias alelopáticas. In: SOUZA FILHO, A. P.S. ALVES, S.M. (Ed.). **Alelopatia: Princípios básicos e aspectos gerais**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2002.

ALONI, R.; ALONI, E.; LANGHANS, M.; ULLRICH, C.I. Role of cytokin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical

dominance and root gravitropism. **Annals of Botany**, v.97, p.883-893, 2006.

BAIS, H.P., WEIR, T.L., PERRY, L.G.; et al. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology** v.57, p.233-266, 2006.

BATALHA, M.A. O cerrado não é um bioma. **Biota Neotropica**, v.11, n.1, 2011.

BESSIRE, M.; CHASSOT, C.; JACQUAT, A.C. et al. A permeable cuticle in *Arabidopsis* leads to a strong resistance to *Botrytis cinerea*. **EMBO Journal**, v. 26, 2158-2168, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Coordenação de Laboratório Vegetal. **Regras para análise de sementes**. Brasília. 365 p. 2009.

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **O Bioma Cerrado**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>> Acesso: Março, 2015.

BRITO, E.S., ARAÚJO, M.C.P.; LIN, L.; HARNLY, J. Determination of the flavonoid components of cashew apple (*Anacardium occidentale*) by LC-DAD-ESI/MS. **Food Chemistry**, v.105, n.3, p. 1112–1118, 2007.

CHON, S.U.; CHOI, S.K.; JUNG, S. et al. Effects of alfafa leaf extracts and phenolic allelochemicals on early seedling growth and root morphology of alfafa and barnyard grass. **Crop Protection**, v.21, p.1077-1082, 2002.

CIPOLLINI, M.L. & LEVEY, D.J. Secondary metabolites of fleshy vertebrate- dispersed fruits: adaptive hypotheses and implications for seed dispersal. **American Naturalist**, v.150, p. 346–73, 1997.

CIPOLLINI, D.; RIGSBY, C.M.; BARTO, E.K. Microbes as target and mediators of allelopathy in plants. **Journal of chemical ecology**, v.38(6), p. 714-727, 2012.

COLE, R.A.; HABER, W.A.; SETZER, W.N. The leaf oil composition of *Myrcia splendens* from Monteverde, Costa Rica. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v.11(1), p. 41-44, 2008.

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.

COUTINHO, I.D.; KATAOKA, V.M; HONDA, N.K.; et al. Influência da variação sazonal nos teores de flavonóides e atividade antioxidante das folhas de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg, Myrtaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.20, n.3, p. 322-327, 2010.

CUNHA, C.R.M., ALENCAR, R.G., DE OLIVEIRA V. (2007) Bioconversão: uma alternativa sintética para a produção de derivados funcionalizados na naringina e naringenina. *Revista Eletrônica de Farmácia* 4 (2): 19-22

DAVID, J.M; CRUZ, F.G.;GUEDES, M.L.S; CHÁVEZ, J.P. Flavonol Glycosides from *Davilla flexuosa*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.7, n.2, p.115-118, 1996.

ELEGAMI, A.A.; BATES, C.; GRAY, A.I.; et al. Two very unusual macrocyclic flavonoids from the water lily *Nymphaea lotus*. **Phytochemistry**, v.63, n.6, p.727-31, 2003.

FERREIRA, A.C.F.;NETO, J.C.; DA SILVA, A.C.M; et al. Inhibition of thyroid peroxidase by *Myrcia uniflora* flavonoids. **Chemical Res Toxicology**, v. 19, p. 351-355, 2006.

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.; PEREZ, S.C.J.G.A.& LIMA, M.I.S. Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Ktze na germinação e crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. **Acta Botanica Brasilica**, v.18, n.3, p.459-472, 2004.

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 Botanica Brasilica**, v. 24, n.2, p. 454-461, 2010

GNIAZDOWSKA, A.; BOGATEK, R. Allelopathic interactions between plants. Multi site action of allelochemicals. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.27, n.3B, p.395-407, 2005

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

GOTTLIEB, O.R.; DA SILVA, M.L., MAIA, J.G.S. Eucalyptin from *Eugenia* and *Myrcia* species. **Phytochemistry**, v.11, p.1185, 1972.

GRISI, P.U.; GUALTIERI, S.C.J.; ANESE, S.; et al. Effect of *Serjania lethalis* ethanolic extract on weed control. **Planta Daninha** v. 31, n.2, p. 239-248, 2013a.

GRISI, P.U.; GUALTIERI, S.C.J.; RANAL, M.A.; SANTANA, D.G. Phytotoxic activity of crude aqueous extracts and fractions of Young leaves of *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v.27, n.1, p. 62-70, 2013b.

HABERMANN, E.; IMATOMI, M.; PEREIRA, V.C. et al. Atividade fitotóxica de cascas do caule e de folhas maduras de *Blepharocalyx salicifolius* (Myrtaceae) sobre espécies infestantes. **Acta Biologica Colombiana**, v.20, n.1, p.153-162, 2015.

HANCOCK, C.R.; BARLOW, H.W.B.; LACEY, H.J. The east malling coleoptile straight growth test method. **Journal of Experimental Botany**, v.15, n.1, p.166-176, 1964.

HAYDERA, N.; BOUHLELA, I.; SKANDRANIA, I. et al. In vitro antioxidant and antigenotoxic potentials of myricetin-3-o-galactoside and myricetin-3-o-rhamnoside from *Myrtus communis*: Modulation of expression of genes involved in cell defence system using cDNA microarray. **Toxicology in Vitro**. v.22, n.3, p. 567–581, 2008.

IMATOMI, M. **Estudo alelopático de espécies da família Myrtaceae do cerrado**. 2010. 88 f. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Centro de Ciências Biológicas e da

Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

IMATOMI, M.; NOVAES, P.; MATOS, A.P. et al Phytotoxic effect of bioactive compounds isolated from *Myrcia tomentosa* (Myrtaceae) leaves. **Biochemichal Systematics an Ecology**, v.46, p.29-35, 2013.

IMATOMI, M.; NOVAES, P. & GUALTIERI, S.C.J. Interespecific variation in allelopathic potencial of the Myrtaceae Family. **Acta Botanica Brasilica**, v.24, p.54-61, 2013.

INOUE, M. H.; SANTANA, D.C; VILHENA, K.S.S. *et al.* Avaliação do potencial alelopático de substâncias isoladas em sementes de araticum (*Annona crassiflora*). **Planta Daninha**, v.4, p.735-741, 2010.

INTERNATIONAL ALLELOPATHY SOCIETY. [Online] Disponível em:
<<http://www.international-allelopathy-society.org>> Acesso: Dezembro, 2013.

KEINÄNEN, M. & JULKUNEN-TIITTO, R. High-performance liquid chromatographic determination of flavonoids in *Betula pendula* and *Betula pubescens* leaves. **Journal of Chromatography A**, v.793, n.2, p.370–377, 1998.

KRAUS, J. E. & ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropedica: EDUR, 1997.

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

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima Artes e Textos, 2004.

MACÍAS F.A., MOLINILLO J.M.G., VARELA R.M., GALINDO, J.C.G .Allelopathy – a natural alternative for weed control. **Pest Management Science**, v.63, p.327-34, 2007

MACÍAS, F. A.; LACRET, R.; VARELA, R.M. et al. Isolation and phytotoxicity of terpenes from *Tectona grandis*. **Journal of Chemical Ecology**, v.36, n.4, p. 396-404, 2010.

MATSUDA, H.; NISHIDA, N.; YOKISHAWA, M. Antidiabetic principles of natural medicines. V. aldose reductase inhibitors from *Myrcia multiflora* DC.(2): Structures of myrciatrins II, IV and V. **Chemical Pharmacological Bulletin**, v. 50, p. 429-431, 2002

MENDONÇA, R.C. et al. Flora vascular do bioma Cerrado: checklist com 12.356 espécies. In: SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P.; RIBEIRO, J.P. (eds.). **Cerrado: ecologia e flora**. Vol. 2. Brasília: Embrapa Informação e Tecnologia, 2008. p. 422-442

MICHEL, M.C.P. et al. Extracts from the leaves of *Campomanesia velutina* inhibits production of LPS/INF- γ induced inflammatory mediators in J774A.1 cells and exerts anti-inflammatory and antinociceptive effects *in vivo*. **Revista Brasileira de Farmacognose** [online]. v. 23, n.6, p. 927-936, 2013.

MITTERMEIER, R.A.; ROBLES-GIL, P.; HOFFMANN, M. et al. **Hotspots revisited**. México City: CEMEX/ Agrupación Sierra Madre, 2004.

MONTEIRO, J.A.F.& PRADO, C.H.B.A. Apparent carboxylation efficiency and relative stomatal and mesophyll limitations of photosynthesis in an evergreen cerrado species during water stress. **Photosynthetica**, v.44, p.39-45, 2006.

MORAIS, P. O. & LOMBARDI, J. A. A Família Myrtaceae na Reserva Particular do Patrimônio Natural da Serra do Caraça, Catas Altas, Minas Gerais, Brasil. **Lundiana** v.7(1), p.3-32, 2006.

MORESCO, H.H.; PEREIRA, M.; BRETANHA, L.C. et al. Myricitrin as the main constituent of two species of *Myrcia*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v.4(2), p.001-007, 2014.

MURPHY, S.D. 2003. Biochemical and physiological aspects of pollen allelopathy In: INDERJIT, M.; MALLIK A. U. (eds.). **Chemical Ecology of plant: allelopathy of aquatic and terrestrial ecosystems**. Springer. p. 245-260.

NASCIMENTO, I.A.; BRAZ-FILHO, R; DE CARVALHO, M. G.; et al. Flavonoides e

outros compostos isolados de *Mimosa artemisiana* Heringer e Paula. **Quimica Nova**, v. 35, n. 11, p. 2159-2164, 2012.

NITSCH, J. P. & NITSCH, C. Studies on the growth of coleoptiles and first internod sections. A new, sensitive, straight-growth test for auxins. **Plant Physiology**, v. 31, n. 2, p. 94-111, 1956.

OLIVEIRA-FILHO, A. T. **Catálogo das árvores nativas de Minas Gerais**: mapeamento e inventário da flora nativa e dos reflorestamentos de Minas Gerais. Lavras: UFLA. 2006.

OLIVEIRA-FILHO, A. T. & FONTES, M. A. L. Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in southeastern Brazil and the influence of climate. **Biotropica**, v.32(4b), p. 793-810. 2000.

OTSUKA, H. Purification by solvent extraction using partition coefficient. In: SARKER, S. D.; LATIF, Z.; GRAY, A. I. (Ed.) **Natural Products Isolation. Methods in Biotechnology**. Totowa: Human Press Inc, 2.ed. v. 20, 2005. p.269-273.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2014. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>

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.

ROMANI, A.; PINELLI, P.; MULINACCI, N. et al. Identification and quantitation of polyphenols in leaves of *Myrtus communis* L. **Chromatographia**, v.49, n;1-2, p.17-20, 1998.

PEER, W.A. & MURPHY, A. S. Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? **Trends in Plant Science**, v.12, p.556–563, 2007.

SILVA, V.C.; LOPES M.N.; BOLZANI, V.S. Chemical study of leaves of *Chrysophyllum marginatum* (Hook. & Arn.) Radlk (Sapotaceae). **Química Nova** [online], v.29, n.3, p. 493-495, 2006.

SINGH, A.; SINGH, D.; SINGH, N. B. Allelochemical stress produced by aqueous leachate of *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. **Plant Growth Regulation**, v.58, p.163–171, 2009.

SOICKE, H.; GÖRLER, K.; WARING, H. Flavonol Glycosides from *Moghania faginea*. **Planta Medica**, v.56, n.4, p.410-412, 1990.

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.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 719p.

TANIMOTO, E. Regulation of root growth by plant hormones: Roles for auxin and gibberellin. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.24, p.249–265, 2005.

TAYLOR, L.P., GROTEWOLD, E. Flavonoids as developmental regulators. **Current Opinion Plant Biology** v. 8, p.317–323, 2005.

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 alpha-amylase activity induction of *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 7850-7854, 2012.

TREUTTER, D. Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. **Plant Biology**, v.7, p.581–91, 2005.

TOMAZ, C.A.; MARTINS, C. C.; CARVALHO, L.R.; NAKAGAWA, J. Duração do teste de germinação do capim tanzânia. **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, n.4, p.80-87, 2010.

WINDSOR, A.J.; REICHELT, M.; FIGUTH, A. et al. Geographic and evolutionary

diversification of glucosinolates among near relatives of *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). **Phytochemistry**, v.66; p.1321-1333, 2005.

WINK, M. Biochemistry, physiology and ecological functions of secondary metabolites: In: _____ . **Annual Plant Reviews: Biochemistry of Plant Secondary Metabolism**, 2 ed. Wiley-Blackwell, v. 40, p.1-19, 2010.

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.

YOSHIKAWA, M.; SHIMADA, H.; NISHIDA, N.; et al. Antidiabetic principles of natural medicines . II. Aldose reductase and alpha-glucosidase inhibitors from Brazilian natural medicine, the leaves of *Myrcia multiflora* DC. (Myrtaceae): Structures of myrciacitrins I and II and myrciaphenones A and B. **Chemical Pharmacological Bulletin**, v. 46, p. 113-119, 1998.

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 III : Atividade antifúngica e antioxidante de folhas maduras de *Myrcia splendens* (Sw.)DC .

RESUMO

A busca de produtos naturais com atividades antifúngicas e antioxidante tem crescido nos últimos anos como alternativa mais sustentável para os produtos químicos atualmente usados para estas funções. O fungo fitopatogênico *Alternaria alternata* é agente causador de doenças nos citros, levando a grandes perdas econômicas. Substâncias antioxidantes são importantes tanto para a produção de medicamentos para diversas doenças que podem estar relacionadas à presença de radicais livres, como o câncer, bem como para a indústria cosmética, como agentes anti-envelhecimento e para a indústria alimentícia, como conservantes. Este trabalho avaliou o potencial antioxidante e antifúngico dos extratos de folhas maduras de *Myrcia splendens*, uma espécie arbórea que ocorre no cerrado brasileiro. O potencial antioxidante foi analisado por meio de ensaio da capacidade sequestrante do radical DPPH e o antifúngico, por meio da avaliação do crescimento micelial. A maioria dos extratos apresentou atividade antioxidante muito forte, especialmente o extrato 4A. A atividade antioxidante pode ser relacionada a presença de compostos fenólicos. Por outro lado, os extratos não apresentaram atividade inibitória do crescimento micelial do fungo testado, com exceção do extrato 2B, que foi o único que teve efeito inibitório (10,2%) ao final do teste.

Palavras-chave: Myrtaceae, atividade biológica, *Alternaria alternata*, mancha marrom da *Alternaria*.

ABSTRACT

The search for natural products with antifungal and antioxidant activities has grown in recent years as a more sustainable alternative to the chemicals currently used for these functions. The plant pathogenic fungus *Alternaria alternata* is causative agent of diseases in citrus, leading to huge economic losses. Antioxidants are important both for the production of medicaments for various diseases that may be related to the presence of free radicals, such as cancer, as well as to the cosmetic industry as an anti-aging agent and the food industry as preservatives. This study evaluated the antifungal and antioxidant potential of extracts from mature leaves of *Myrcia splendens*, a tree species that occurs in the Brazilian cerrado. The antioxidant potential was analyzed by an assay of the DPPH radical scavenging and the antifungal activity through the evaluation of mycelial growth. Most of the extracts showed strong antioxidant activity, especially the 4A extract. The antioxidant activity may be related to the presence of phenolic compounds. On the other hand, the extracts showed no inhibitory activity of mycelial growth of fungus tested, with the exception of 2B extract, which was the one who had inhibitory effect (10.2%) at the end of testing.

Keywords: Myrtaceae, biological activity, *Alternaria alternata*, *Alternaria* brown spot.

INTRODUÇÃO

Os metabólitos secundários são conhecidos pelas populações humanas há milhares de anos, sendo utilizados em sua forma isolada, como extratos ou mesmo na planta fresca ou seca como tinturas, saborizantes, fragrâncias, estimulantes, alucinógenos, inseticidas, venenos e como agentes terapêuticos (WINK, 2010). Nas plantas muitos desses metabólitos desempenham funções importantes para a proteção vegetal contra patógenos (vírus, bactérias e fungos), plantas competidoras e herbívoros. Podem ainda ter funções fisiológicas como na proteção contra a radiação ultravioleta ou como compostos armazenadores de nitrogênio (CIPOLLINI & LEVEY, 1997; WINK, 2010).

O fungo *Alternaria alternata* é agente causal de três doenças dos citros: a mancha marrom de *Alternaria*, a mancha foliar de *Alternaria* e a podridão negra (Fig. 3.1). Estas doenças causam importantes perdas comerciais e o controle do patógeno é feito com o uso de fungicidas como: estrobilurinas, triazóis, dicarboximidas, ditiocarbamatos e produtos a base de cobre (FEITCHTENBERGER et al., 2005; COLTURATO et al., 2009).

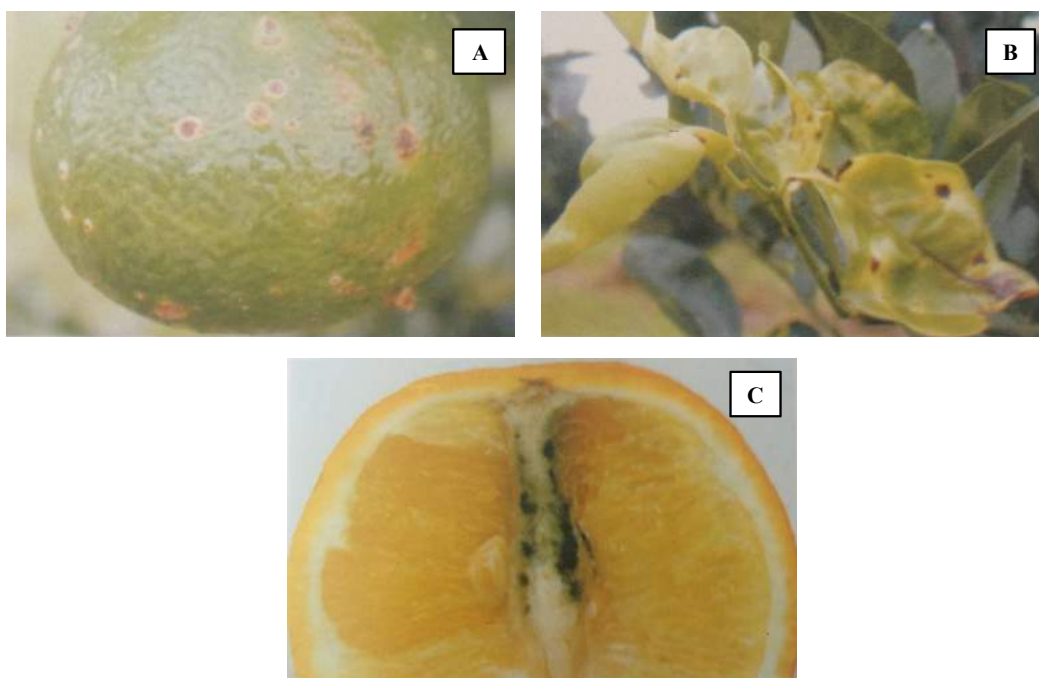


Figura 3.1. Doenças causadas pelo fungo *Alternaria alternata* em citros (KIMATI et al., 2005). A- Mancha marrom de *Alternaria*. B- Mancha foliar de *Alternaria*. C- Podridão negra.

Muitos fungicidas utilizados atualmente são tóxicos tanto para humanos quanto para outros seres vivos, inclusive os que podem ser benéficos às culturas agrícolas (NEWTON et al., 2010). Segundo Wink (2010), como muitas das substâncias do metabolismo secundário vegetal possuem atividade inseticida, fungicida e fitotóxica, elas

podem atuar como pesticidas naturais, menos prejudiciais ao ambiente. Além disso, os produtos naturais podem servir de modelo para o desenvolvimento de drogas sintéticas (DEMAIN, 2009). Desta forma, a busca de compostos antifúngicos em plantas pode ser interessante (KHAN & NASREEN, 2010).

Alguns compostos do metabolismo secundário vegetal também podem apresentar atividade antioxidante. Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) são frequentemente gerados como subprodutos do metabolismo celular regular, mas podem também ser produzidos induzidos por estímulos ambientais como a exposição a níveis elevados de luminosidade, seca, metais pesados, alta concentração de sais, extremos de temperatura, radiação ultra-violeta, poluição do ar, uso de herbicidas e por ataque de patógenos e herbívoros (MALLICK & RAÍ, 1999; MITTLER, 2002; SOARES & MACHADO, 2007). Os antioxidantes atrasam a auto-oxidação por meio da inibição da formação de radicais livres ou por interrupção de propagação dos radicais livres (BREWER, 2011)

Atualmente, o interesse em antioxidantes naturais, especialmente os de origem vegetal, tem aumentado (JAYAPRAKASH et al., 2000), visto que a presença de radicais livres e o estresse oxidativo podem estar associadas ao desenvolvimento de doenças como o câncer, diabetes, aterosclerose, processos inflamatórios e envelhecimento (FINKEL & HOLBROOK, 2000). Além disso, o estresse oxidativo também é um problema para a indústria alimentícia, modificando o cheiro, sabor e valor nutricional dos alimentos (KRING & BERGER, 2001).

Entre as 250.000 – 500.000 espécies vegetais que se estima existir, apenas uma pequena porcentagem delas já foi investigada no que se refere a fitoquímica e uma fração ainda menor destas espécies foi submetida a testes biológicos e farmacológicos (MAHESH & SATISH, 2008). *Myrcia splendens* (Sw.) DC. é uma espécie pertencente à família Myrtaceae encontrada no cerrado brasileiro e é popularmente conhecida como guamirim e folha-miúda. Trata-se de uma espécie arbórea, ocorrendo do México ao sul do Brasil (OLIVEIRA-FILHO & FONTES, 2000; MORAIS & LOMBARDI, 2006). Segundo Oliveira-Filho (2006), algumas sinonímias desta espécie são *Myrcia acutata* DC., *Myrcia rostrata* DC. e *Myrcia communis* Berg. e *Myrcia fallax* (Rich.) DC.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antioxidante e antifúngico contra o fitopatógeno *A.alternata* de extratos de folhas maduras de *M.splendens* proveniente de dois tipos de extração.

MATERIAIS E MÉTODOS

I. Coleta e preparação do material vegetal.

Folhas maduras (coloração verde-escura e textura coriácea) de *Myrcia splendens* (Sw.) DC. (Myrtaceae) foram coletadas de cinco indivíduos na reserva de cerrado *sensu stricto* (savana neotropical) pertencente ao campus da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP (21°58' a 22°00' S e 47° 51' a 47° 52'W), na estação seca (Maio de 2013). A região é caracterizada pelo tipo climático Cwa (tropical de altitude) segundo a classificação de Köppen, com inverno seco (abril a setembro) e verão chuvoso (outubro a março) (MONTEIRO & PRADO, 2006). Foram consideradas maduras as folhas com coloração verde escura e textura coriácea. A exsiccata do material coletado foi depositada no Herbário da Universidade Federal de São Carlos com o número 8317.

Após a coleta, as folhas foram secas em estufa de secagem a 40 ° C durante 72 horas. Posteriormente foram trituradas em moinho elétrico para obtenção do pó das folhas, que foi acondicionado em saco plástico e armazenado sob refrigeração (aproximadamente 5° C) até ser utilizado.

II. Preparação dos extratos.

Foram realizados dois procedimentos de extração. O primeiro utilizou solventes em ordem crescente de polaridade (eluotrópica): hexano (Hx), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcoEt), acetona (ACE) e metanol (MeOH). Foram acrescentados 50 g de pó das folhas a 300 mL de Hx. Esta mistura foi submetida a banho de ultrassom durante 15 minutos seguido de filtração. Este processo foi realizado três vezes com cada solvente, utilizando o mesmo pó residual das filtrações a cada nova extração. Os filtrados de cada solvente foram secos em capela, dando origem aos extratos 1A (hexânico), 2A (diclorometânico), 3A (acetato etílico), 4A (acetônico) e 5A (metanólico) (Fig. 3.2). O extrato hexânico 1A foi utilizado apenas para a retirada de ceras e lipídeos do pó de folhas e depois foi descartado.

No segundo método de extração, outros 50 g pó das folhas maduras de *M. splendens* de foram submetidos à extração com 300 mL de DCM/MeOH (1:1) em banho de ultrassom durante 30 minutos. Depois a mistura foi filtrada para obtenção do extrato bruto. Este processo foi repetido cinco vezes, até que o filtrado atingisse uma cor mais clara, indicando que o material vegetal estava sendo exaurido. O extrato bruto obtido foi seco e depois diluído em 300 mL da mistura MeOH/água destilada (95:5) e particionado com 300

mL de Hx, originando os extratos hexânico (1B) e metanólico-aquoso. Por fim, o extrato metanólico-aquoso foi seco e diluído em 300 mL água destilada e particionado com 300 mL AcoEt, dando origem aos extratos acetato etílico (2B) e aquoso (3B) (Fig.3.2) (OTSUKA, 2005).

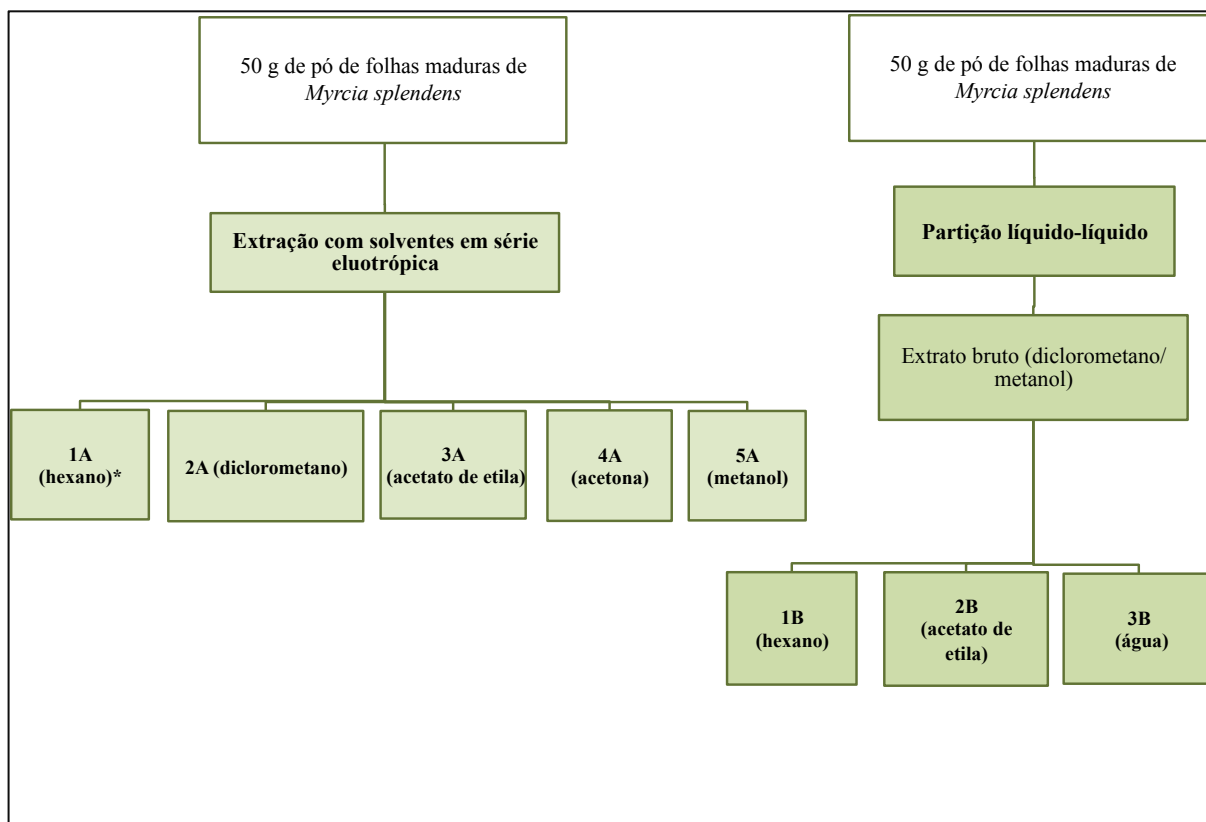


Figura 3.2. Fluxograma da obtenção dos extratos de folhas maduras de *Myrcia splendens* utilizando duas metodologias de extração. (*) Extrato 1A não foi utilizado nos bioensaios.

III. Ensaio de bioautografia por análise em Cromatografia de camada delgada (CCD).

Ensaio de bioautografia por análise em CCD foram realizados para análise preliminar sobre quais extratos apresentam atividade antioxidante. Os ensaios foram realizados de acordo com Luo e colaboradores (2009), adaptado. Soluções 1 mg.mL^{-1} de cada extrato foram preparadas com o uso de solventes orgânicos em grau analítico e depositadas diretamente sobre placas de CCD. Estas placas foram eluídas em mistura de solventes orgânicos adequada à polaridade dos compostos analisados e reveladas com solução metanólica do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) na proporção $0,4 \text{ mg.mL}^{-1}$. Os extratos que continham compostos com atividade antioxidante foram observados como manchas claras sob um fundo roxo.

IV. Ensaio da capacidade sequestrante do radical DPPH.

O ensaio da capacidade sequestrante do radical DPPH foram realizados de acordo com Scherer & Godoy (2009), com algumas modificações. Os extratos foram solubilizados em metanol em diferentes concentrações (entre 0,1 e 16,0 mg/mL). Aliquotas de 0,05 mL de cada extrato foram adicionados em tubos contendo 1,95 mL de uma solução metanólica de DPPH (a 0,08 mM). Foram feitos dois controles: um negativo contendo metanol e a solução de DPPH, e outro positivo contendo o flavonóide quercetina e a solução de DPPH. A concentração final do DPPH em cada tubo após adição dos controles ou extratos foi de 30,75 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$. Os tubos foram levemente agitados e mantidos a temperatura ambiente e no escuro durante 90 minutos. Depois, com o auxílio de espectofotometro, a absorbância de cada tratamento foi medida a 517 nm (A_{517}), calibrado com uma amostra de metanol puro. O ensaio foi realizado com três repetições.

A atividade antioxidante foi calculada de acordo com a equação:

$$I\% = \left(\frac{Abs_0 - Abs_1}{Abs_0} \right) \times 100$$

Onde Abs_0 é a absorbância do controle negativo e Abs_1 é a absorbância do tratamento. Cada extrato foi testado em cinco concentrações. O IC_{50} (concentração em que há 50% de inibição) foi calculado graficamente pela regressão linear da atividade antioxidante dos extratos testados nas 5 concentrações avaliadas. A atividade antioxidante de cada um dos extratos foi expressa utilizando o Índice de Atividade Antioxidante (IAA) (SCHERER & GODOY, 2009):

$$IAA = \frac{\text{concentração final de DPPH } (\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1})}{IC_{50} (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})}$$

Então os extratos foram classificados de acordo com seu IAA em: fraco (IAA < 0,5), moderado (IAA entre 0,5 e 1,0), forte (IAA entre 1,0 e 2,0) e muito forte (IAA > 2,0).

V. Bioensaio de atividade antifúngica.

O potencial antifúngico dos extratos foi verificado pela avaliação do crescimento micelial do fungo fitopatogênico *Alternaria alternata* (LRS 182/10) isolado de tangerina Ponkan e obtido a partir da coleção micologia "Dra. Victoria Rossetti" (UPDS / APTA / SAA), Sorocaba, São Paulo.

Antes de serem usados no bioensaio, os fungos foram reativados em placas de petri com ágar BDA (batata-dextrose-ágar) mantidas em incubadora (B.O.D) a 25° C com fotoperíodo de 12-12 horas por aproximadamente 20 dias (até tomarem $\frac{3}{4}$ das placas de petri).

Os extratos foram dissolvidos em DMSO a 1%, filtrados em filtro de 0,22 μm e incorporados no meio de cultura BDA a aproximadamente 40° C na concentração de 1 mg.mL^{-1} . O controle negativo foi feito com meio de cultura e DMSO. Foram feitas 4 repetições de cada tratamento em placas de petri de 5,6cm de diâmetro. O fungo foi inoculado com discos de micélio de aproximadamente 5 mm de diâmetro no centro de cada placa, as quais foram mantidas em incubadora a 25° C e com fotoperíodo de 12-12horas.

O diâmetro do crescimento micelial foi medido com um paquímetro digital em dois eixos ortogonais (média das duas medidas diametricamente opostas). As medidas foram feitas a cada 48 horas, totalizando 10 medidas (19 dias). Em cada dia medido, foi calculada a porcentagem de inibição do crescimento (IC) dos tratamentos em relação ao controle, utilizando-se a fórmula:

$$IC(\%) = \left(\frac{\text{diâmetro do tratamento} - \text{diâmetro do controle}}{\text{diâmetro do controle}} \right) \times 100$$

VI. Análises estatísticas.

Os gráficos de regressão linear da atividade antioxidante foram feitos no programa Microsoft[®]Excel. Os valores de IC_{50} no ensaio de antioxidante e as médias dos diâmetros do micélio do fungo em cada dia medido foram submetidos a teste de normalidade (Shapiro-Wilk). A diferença estatística foi calculada com uma significância de 5%, utilizando o Teste de Welch para dados normais ou o Teste de Wilcoxon para dados não normais. Estas análises foram realizadas no programa R (R Development Core Team, 2014).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A bioautografia em placas de CCD mostrou que todos os extratos avaliados possuíam potencial antioxidante, pois estes apresentaram manchas amarelo-esbranquiçadas depois de reveladas. Portanto foram feitos testes de capacidade sequestrante do radical DPPH com todos os extratos. Os resultados deste teste estão expressos na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Atividade antioxidante dos extratos de folhas maduras de *Myrcia splendens*. O controle positivo foi feito com o composto puro quercetina. R²- coeficiente de linearidade de cada uma das repetições (I, II e III). IC₅₀- concentração média na qual o tratamento apresenta 50% de inibição. IAA±DP- média do índice de atividade antioxidante ± o desvio padrão. Médias seguidas por letras iguais na coluna não diferem entre si (P<0,05). O poder antioxidante foi determinado de acordo com Sherer e Godoy (2009).

Extratos	R ²			IC ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	IAA±DP	Poder antioxidante
	I	II	III			
2A	0,99331	0,9928	0,95745	324,59	0,096±0,012 ^a	Fraco
1B	0,96923	0,99628	0,9841	52,34	0,595±0,079 ^b	Moderado
3A	0,98744	0,97639	0,99147	16,01	1,923±0,067 ^c	Forte
2B	0,99724	0,99074	0,98413	8,03	3,924±0,782 ^{de}	Muito forte
3B	0,99837	0,99692	0,9924	7,56	4,069±0,047 ^d	Muito forte
5A	0,99771	0,98424	0,96258	6,49	4,737±0,074 ^e	Muito forte
4A	0,97075	0,97392	0,97346	3,60	8,537±0,201 ^f	Muito forte
Quercetina	0,98782	0,94894	0,9723	2,055	14,97±0,22 ^g	Muito forte

A atividade antioxidante pode ser de dois tipos: primária quando os compostos se ligam a radicais livres ou secundária se os compostos possuem capacidade quelante de metais de transição e pode ocorrer sinergismo quando os dois modos estão presentes (FENNEMA, 2000). O ensaio da capacidade sequestrante do DPPH avalia a capacidade de antioxidantes de eliminar os radicais livres e é indicado para a triagem de amostras com polaridades diferentes (SCIO et al., 2012). Este teste está baseado no descoloração de uma solução composta pelo radical livre estável DPPH, de cor violeta, quando da adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio (Fig.3.3) (BRAND; CUVELIER; BERSSET, 1995). Os antioxidantes capazes de reduzir o radical DPPH são caracterizados como primários (YEN & CHEN, 1995).

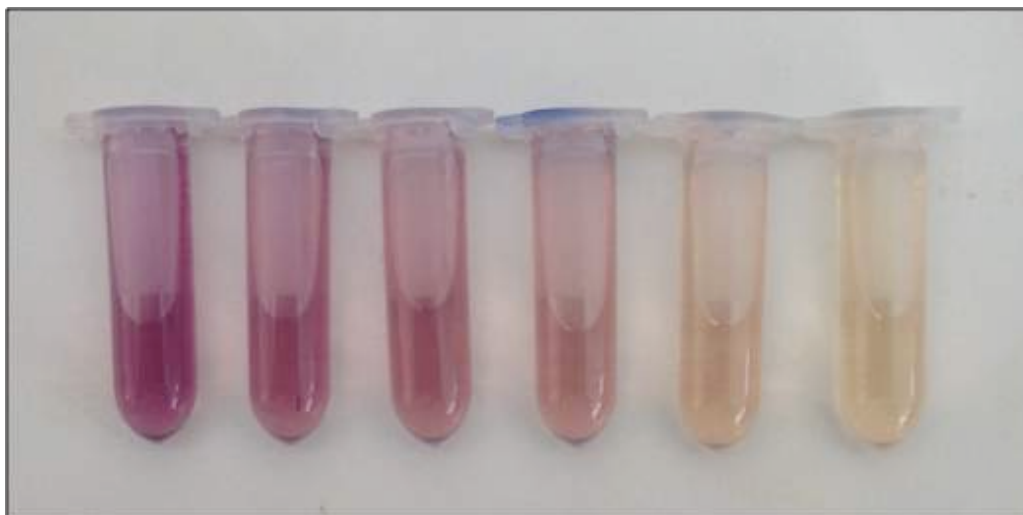


Figura 3.3. Descoloração da solução de DPPH em contato a diferentes concentrações de antioxidante.

Quercetina e os extratos 2B, 3B, 5A e 4A apresentaram atividade antioxidante (IAA) muito forte, 3A apresentou IAA forte, 1B apresentou IAA moderada e 2A, IAA fraco de acordo com a classificação estabelecida por Scherer e Godoy (2009). Os maiores valores de IAA foram obtidos por extratos mais polares. O extrato 4A se destacou por apresentar atividade antioxidante que representa pouco mais de 50% da atividade observada pela quercetina, um antioxidante puro. Além disso, a metodologia de extração com solventes em ordem eluotrópica foi mais eficiente na obtenção de extratos com maior atividade antioxidante (4A e 5A).

Plantas que possuem propriedades antioxidantes estão geralmente relacionadas a presença de compostos fenólicos, especialmente ácidos fenólicos e flavonóides (FABRI et al. 2009) e a capacidade antioxidante destes compostos é atribuída ao poder redutor do grupo hidroxila aromático, que reduz os radicais livres reativos (SAITO et al., 2008). Compostos fenólicos são frequentemente extraídos por solventes de polaridade intermediária a alta como metanol, etanol, acetona, água e acetato de etila (VATTUONE et al, 2009). Neste trabalho os extratos com atividades antioxidantes mais fortes foram extraídos com solventes como acetona (4A) e metanol (5A), portanto esta atividade também pode estar associada a presença de compostos polifenólicos ou outras substâncias com grupamentos hidroxila disponíveis para doar um átomo hidrogênio à molécula oxidante (MENSOR, 1999).

Estes resultados são consistentes com outros trabalhos que demonstraram o potencial antioxidante de folhas de *M.splendens*. O extrato metanólico de folhas desta espécie apresentou elevado potencial antioxidante e este potencial estava associado a presença de compostos polifenólicos no extrato (SCIO et al., 2012). No mesmo sentido, frações

butanólicas e acetato etílicas de *M. splendens* possuíam elevado potencial redutor e de eliminação do radical DPPH, bem como elevadas concentrações de compostos fenólicos e flavonóides (MORESCO et al., 2014).

No bioensaio de atividade antifúngica, apenas o extrato 2B apresentou atividade inibitória significativamente diferente em relação ao crescimento micelial do controle, atingindo 10,2% de inibição no último dia do bioensaio (Tabela 3.2). Os tratamentos feitos com os extratos 5A e 4A estimularam o crescimento micelial. Assim, o método de extração por partição líquido-líquido foi mais eficiente para obtenção de extrato com atividade antifúngica.

Tabela 3.2. Porcentagem de inibição ou estímulo do crescimento micelial do fungo *Alternaria alternata* tratado com os extratos de folhas maduras de *Myrcia splendens* em cada dia de medição. Valores negativos indicam inibição e valores positivos indicam estímulo. (*) na mesma coluna indicam tratamentos com diferença significativa em relação ao controle negativo em cada dia.

	Dia 1 (24h)	Dia 3 (72h)	Dia 5 (120h)	Dia 7 (168h)	Dia 9 (216h)	Dia 11 (264h)	Dia 13 (312h)	Dia 15 (360h)	Dia 17 (408h)	Dia 19 (456h)
2A	-1,8%	6,6%	12,0%	6,9%	5,9%	5,2%	2,3%	6,7%	8,1%	5,7%
3A	-0,8%	15,2%*	23,4%*	20,3%	18,1%	11,2%	4,9%	10,4%	9,1%	3,1%
4A	6,3%	28,2%*	37,9%*	37,1%*	31,0%*	27,2%*	22,8%*	21,2%*	17,4%*	10,8%*
5A	17,8%*	20,4%*	27,1%*	24,2%*	21,0%*	21,2%*	17,9%*	13,7%*	11,8%	6,7%
1B	14,2%*	10,4%*	14,2%	11,8%	15,3%	16,3%	12,5%	14,1%	12,7%	7,4%
2B	7,3%	1,0%	-0,3%	-5,3%	-7,4%	-6,3%	-9,6%*	-8,6%*	-8,7%*	-10,2%*
3B	18,8%*	13,4%	23,3%	17,0%	16,0%	14,1%	7,8%	8,5%	7,7%	3,5%

A atividade antifúngica de mirtáceas já foi relatada na literatura, especialmente no que se refere aos seus óleos essenciais (MILES et al., 1991; DE CERQUEIRA et al., 2007; ZABKAA; PAVELAA; PROKINOVAB, 2014). Porém poucos são os trabalhos sobre o potencial antifúngico de *Myrcia splendens*. Moresco (2014) verificou que vários extratos de *M. splendens* apresentaram inibição elevada em cepas de *Candida*, especialmente em *C. krusei* e *C. tropicalis*. Por outro lado, extratos metanólicos de folhas de *M. splendens* não apresentaram atividade inibitória nos fungos *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* avaliados por Scio e colaboradores (2012).

Em uma pesquisa sobre atividade antifúngica de extratos aquosos e hidroetanólicos de espécies do cerrado, Narazuma e Papa (2011) observaram que extratos de *Aristolochia esperanzae* e *Byrsonima verbasifolia* estimularam o crescimento do fungo fitopatogênico *Corynespora cassiicola*, enquanto extratos de *Lafoensia pacari* e *Myracrodruon urundeuva* inibiram 100% do crescimento micelial do mesmo fungo.

As doenças causadas pelo fungo *Alternaria* sp. estão entre as doenças vegetais mais comuns no mundo e afetam as folhas, os caules, as flores e os frutos das plantas; muitas espécies deste gênero causam manchas foliares em diversas plantas cultivadas e não cultivadas (MELLO et al., 2001). A mancha marrom de *Alternaria* é uma doença causada por *Alternaria alternata*, afetam tangeres, tangerinas e tangelos causando lesões em folhas, ramos e frutos, acarretando em desfolha e manchas que depreciam o fruto comercialmente (COLTURATO et al., 2009). Em um dos poucos trabalhos que avaliam a atividade de produtos naturais contra o fitopatógeno *A.alternata*, constatou-se que o óleo essencial de *Piper hispidinervum* apresentou atividade fungitóxica sobre o crescimento micelial deste fungo (NASCIMENTO et al, 2008). Embora a atividade inibitória apresentada pelo extrato 2B seja considerada baixa, ela se refere a extratos e não a compostos isolados, portanto a continuidade dos estudos com este extratos são incentivados.

CONCLUSÕES

A maioria dos extratos apresentou atividade antioxidante muito forte, especialmente o extrato 4A. A atividade antioxidante pode ser relacionada a presença de compostos fenólicos. Por outro lado, somente o extrato 2B apresentou efeito inibitório (10,2%) no crescimento micelial de *Alternaria alternata*. Apesar de ser um efeito baixo, estudos com este extrato são incentivados a fim de buscar substâncias que possam ser responsáveis pelo efeito inibitório do extrato e que quando isoladas possam ter atividades mais intensas.

REFERÊNCIAS

BRAND, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v.28, n.1, p.25-30, 1995.

BREWER, M.S. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.10, p.221-247, 2011

CIPOLLINI, M.L. & LEVEY, D.J. Secondary metabolites of fleshy vertebrate- dispersed fruits: adaptive hypotheses and implications for seed dispersal. **American Naturalist**, v.150, p. 346–73, 1997.

- COLTURATO, A.B.; PAULOSI, T.; VENÂNCIO, W.S. et al . Eficiência e custo do controle químico da mancha de alternaria em tangor murcote. **Summa phytopathol.**, Botucatu , v. 35, n. 3, set. 2009.
- DE CERQUEIRA, M. D.; SOUZA-NETA, L. C.; PASSOS, M. D. G. V. M.; et al.. Seasonal variation and antimicrobial activity of Myrcia myrtifolia essential oils. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, p. 998-1003, 2007.
- DEMAIN, A.L. Antibiotics: natural products essential to human health. **Medicinal Research Reviews**, v.29, n.6, p.821-42, 2009.
- FABRI, R.L.; NOGUEIRA, M.S.; BRAGA, F.G.; et al. Mitracarpus frigidus Aerial Parts Exhibited potent Antimicrobial, Antileismanial and Antioxidant Effects. **Bioresource Technology**, V.100, N.1, pp. 428-433, 2009.
- FEITCHTENBERGER, E., BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M.B.; BELASQUE JR., J. Doenças dos citros (*Citrus spp.*). In: KIMATI,H. et al. (Eds.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. Vol.2. São Paulo:Ceres, p. 239-269. 2005.
- FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v.480, p.239-47, 2000.
- JAYAPRAKASH, G.K., RAO, L.J.Phenolic constituents from lichen *Parmonotrema stuppeum*. **Food Control**. v.56, p.1018-22, 2000.
- KHAN, Z.S. & NASREEN, S. Phytochemical analysis, antifungal activity and mode of action of methanol extracts from plants against pathogens. **Journal of Agriculture Technology**, v.6, n.4, p.793-805, 2010.
- KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M. et al. **Manual de fitopatologia – Doenças das plantas**. v.2. 4 ed. São Paulo: CERES. 2005
- KRING, U. & BERGER, R.G. Antioxidant activity of some roasted foods. **Journal Food Chemistry**, vol. 72, no. 2, p. 223-229, 2001.

LUO, H.; YAMAMOTO, Y.; KIM, J.A. et al. Lecanoric acid, a secondary lichen substance with antioxidant properties from *Umbilicaria antarcticain* maritime Antarctica (King George Island). **Polar Biology**, v.32, n. 4, p. 1033-1040, 2009.

MAHESH, B. & SATISH, S. Antimicrobial activity of some important medicinal plants against plant and human pathogens. **World Journal of Agricultural Sciences**, v.4, n.5, p.839-843, 2008.

MALLICK, N. & RAI, L.C. Response of the antioxidant systems of the nitrogen fixing cyanobacterium *Anabaena doliolum* to the copper. **Journal of Plant Physiology**, v. 155, p. 146-149, 1999.

MELLO, S.C.M.; RIBEIRO, Z.M.A.; SOUSA, G.R.; et.al. Padrões isoenzimáticos e morfologia de isolados de *Alternaria* spp. patogênicos a *Senna obtusifolia*. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, n.3, p. 667-669, 2001.

MENSOR, L. L. **Avaliação da atividade antioxidante em plantas brasileiras**. (Tese de Mestrado), UFRJ, Rio de Janeiro, 1999.

MILES, D.H.; ROSA DE MEDEIROS, J.M.; CHITTAWONG, V. et al. **Phytochemistry**, v.30, p.1131, 1991.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant in Science**, v. 9, p. 405-410, 2002.

MONTEIRO, J.A.F.& PRADO, C.H.B.A. Apparent carboxylation efficiency and relative stomatal and mesophyll limitations of photosynthesis in an evergreen cerrado species during water stress. **Photosynthetica**, v.44, p.39-45, 2006.

MORAIS, P. O. & LOMBARDI, J. A. A Família Myrtaceae na Reserva Particular do Patrimônio Natural da Serra do Caraça, Catas Altas, Minas Gerais, Brasil. **Lundiana** v.7(1), p.3-32, 2006.

MORESCO, H.H. **Estudo fitoquímico e biológico de quatro espécies da família Myrtaceae**. 2014. Tese (Doutorado em Química) – Centro De Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Caratina, Florianópolis, SC, 2014.

MORESCO, H.H.; PEREIRA, M.; BRETANHA, L.C. et al. Myricitrin as the main constituent of two species of *Myrcia*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v.4(2), p.001-007, 2014.

NASCIMENTO, F.R. et al . Efeito do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC) e do emulsificante Tween® 80 sobre o crescimento micelial de *Alternaria alternata* (Fungi: Hyphomycetes). **Acta Amazonica**, v. 38, n. 3, 2008 .

NARUZAWA, E.S. & PAPA, M.F.S. Antifungal activity of extracts from brazilian Cerrado plants on *Colletotrichum gloeosporioides* and *Corynespora cassiicola*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.4, p.408-412, 2011.

NEWTON, A.C. et al. Pathogenesis, parasitism and mutualism in the trophic space of microbe plant interactions. **Trends in Microbiology**, v.18, n.8, p.365-73, 2010.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.& FONTES, M. A. L. Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in southeastern Brazil and the influence of climate. **Biotropica**, v.32(4b), p. 793-810. 2000.

OTSUKA, H. Purification by solvent extraction using partition coefficient. In: SARKER, S. D.; LATIF, Z.; GRAY, A. I. (Ed.) **Natural Products Isolation. Methods in Biotechnology**. Totowa:Human Press Inc, 2.ed. v. 20, 2005. p.269-273.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2014. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>

SCHERER, R. & GODOY, H.T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chemistry**, v. 112, n. 2, p.654–658 , 2009.

SCIO, E.; MENDES, R.F.; MOTTA, E.V.S. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of some plant extracts. In: RAO, V. (Ed.) **Phytochemicals as Nutraceuticals** - Global approaches to their role in nutrition and health. InTech, 2012. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/phytochemicals-as-nutraceuticals-global-approaches-to-their-role-in-nutrition-and-health/antimicrobial-and-antioxidant-activities-of-some-plant-extracts>> Acesso: Março, 2015.

SOARES, A. M. S., MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v.1, n. 1, p. 13, 2007.

VATTUONE, M. A.; SAMPIETRO, D.A; SOBERÓN, R. et al. Plant Sampling and Sample Preparation. In: SAMPIETRO, D.A.; CATALAN, C.A.N.; VATTUONE, M.A.; NARWAL, S.S. (eds.) **Isolation, Identification and Characterization of Allelochemicals/Natural Products**. Science Publishers, Enfield, NH, USA. p. 377-398. 2009.

WINK, M. Biochemistry, physiology and ecological functions of secondary metabolites: In: _____. **Annual Plant Reviews: Biochemistry of Plant Secondary Metabolism**, 2 ed. Wiley-Blackwell, v. 40, p.1-19, 2010.

YEN, G.C. & CHEN, H.Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, p.27-32, 1995.

ZABKAA, M.; PAVELAA, R.; PROKINOVAB, E. Antifungal activity and chemical composition of twenty essential oils against significant indoor and outdoor toxigenic and aeroallergenic fungi. *Chemosphere*, v. 112, p.443–448, 2014.

CONCLUSÕES GERAIS

Os extratos de folha jovem e maduras de *Myrcia splendens* apresentaram potencial fitotóxico nas espécies infestantes utilizadas como alvo.

O extrato 2C se mostrou o extrato de folha jovem mais promissor para identificação de compostos fitotóxicos. Nesta pesquisa, os extratos de folhas jovens provenientes da extração por partição líquido-líquido foram mais inibitórios apenas em uma das espécies-alvo, podendo ser objeto de estudo na busca por substâncias com atividade seletiva.

Para folhas maduras, o extrato 2B (extraído com acetato de etila) foi o mais ativo nos bioensaios realizados, de modo que foi fracionado e de suas frações mais ativas isolou-se e identificou-se o composto miricitrina, um derivado glicosilado da miricetina (ou miricetina-3-O-ramnosídeo). Este composto pode estar associado à atividade fitotóxica apresentada pelo extrato, por se tratar do componente majoritário de duas das frações mais ativas. Além disso, o extrato 2B demonstrou possuir atividade inibitória no alongamento de células do metaxilema radicular de amendoim-bravo, podendo este ser um dos modos de ação que justifique a fitotoxicidade do extrato. Não houve diferenças importantes nas metodologias de extração quanto a atividade e ao rendimento.

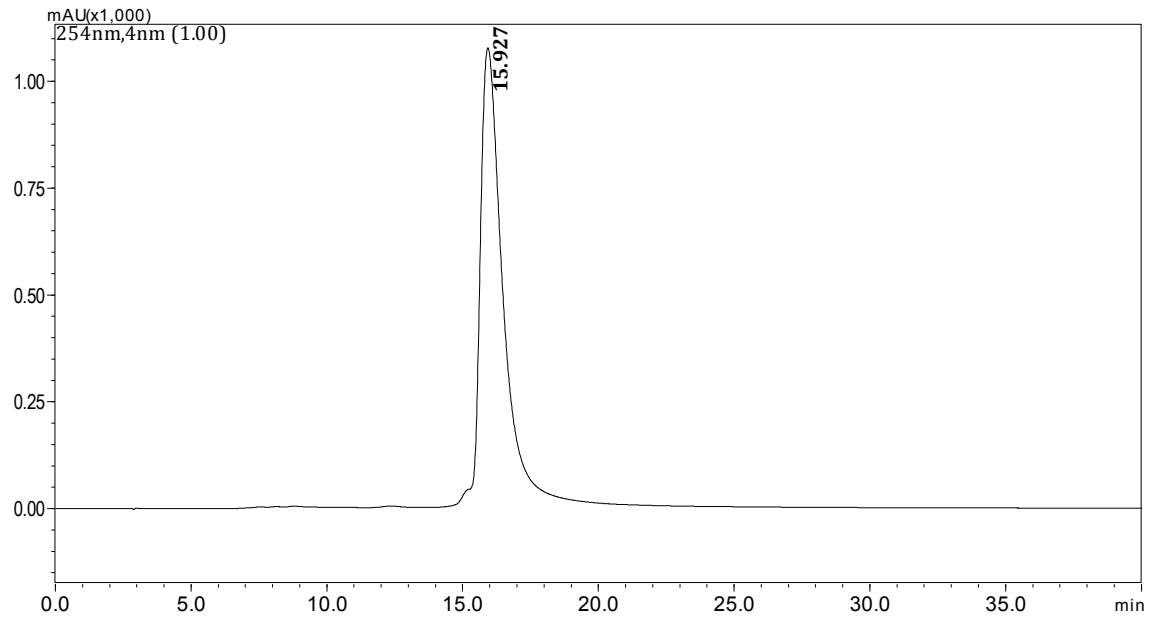
No que se refere ao potencial antioxidante, os extratos obtidos com solventes mais polares, tais como acetona (4A), metanol (5A) e água (3B), apresentaram atividade antioxidante muito forte, sendo promissores para o isolamento e identificação de substâncias que possam atuar como antioxidantes naturais.

Apenas um dos extratos testados (2B) teve atividade de inibição no crescimento micelial do fitopatógeno *Alternaria alternata*. Recomenda-se que mais estudos sejam feitos no que diz respeito ao potencial antifúngico deste extrato.

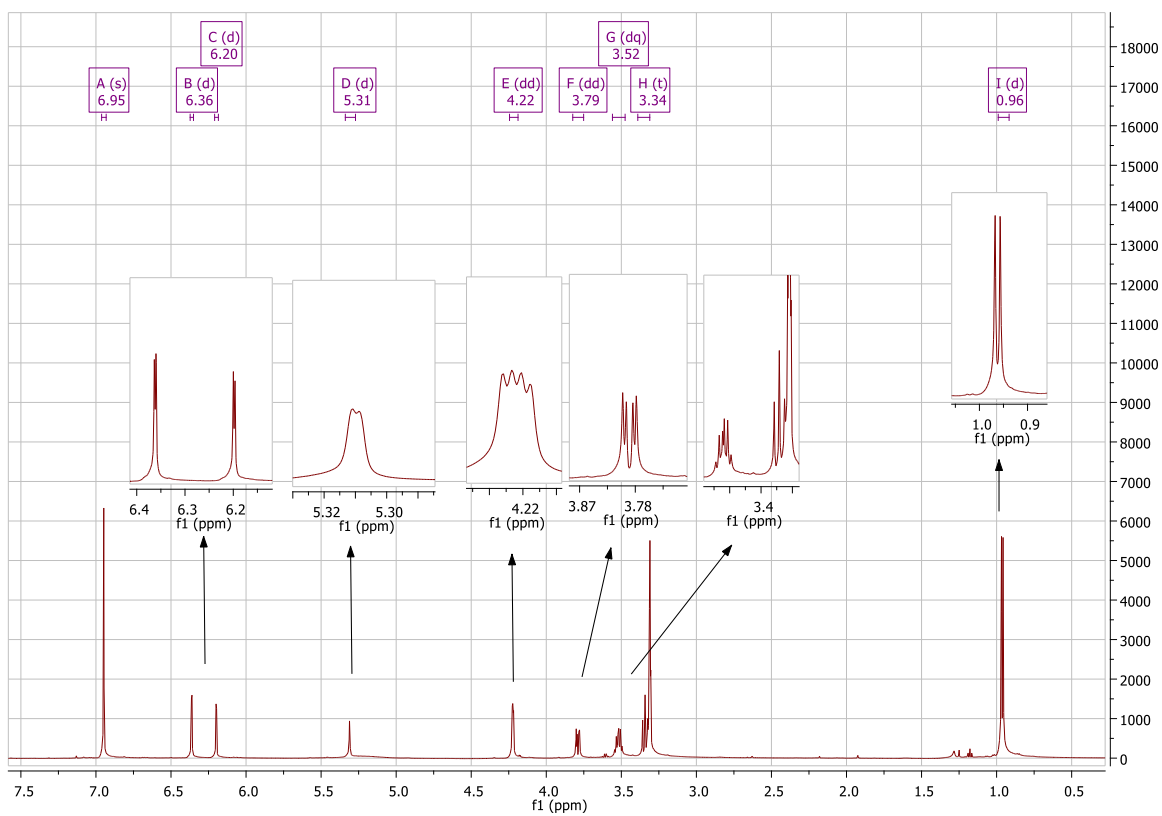
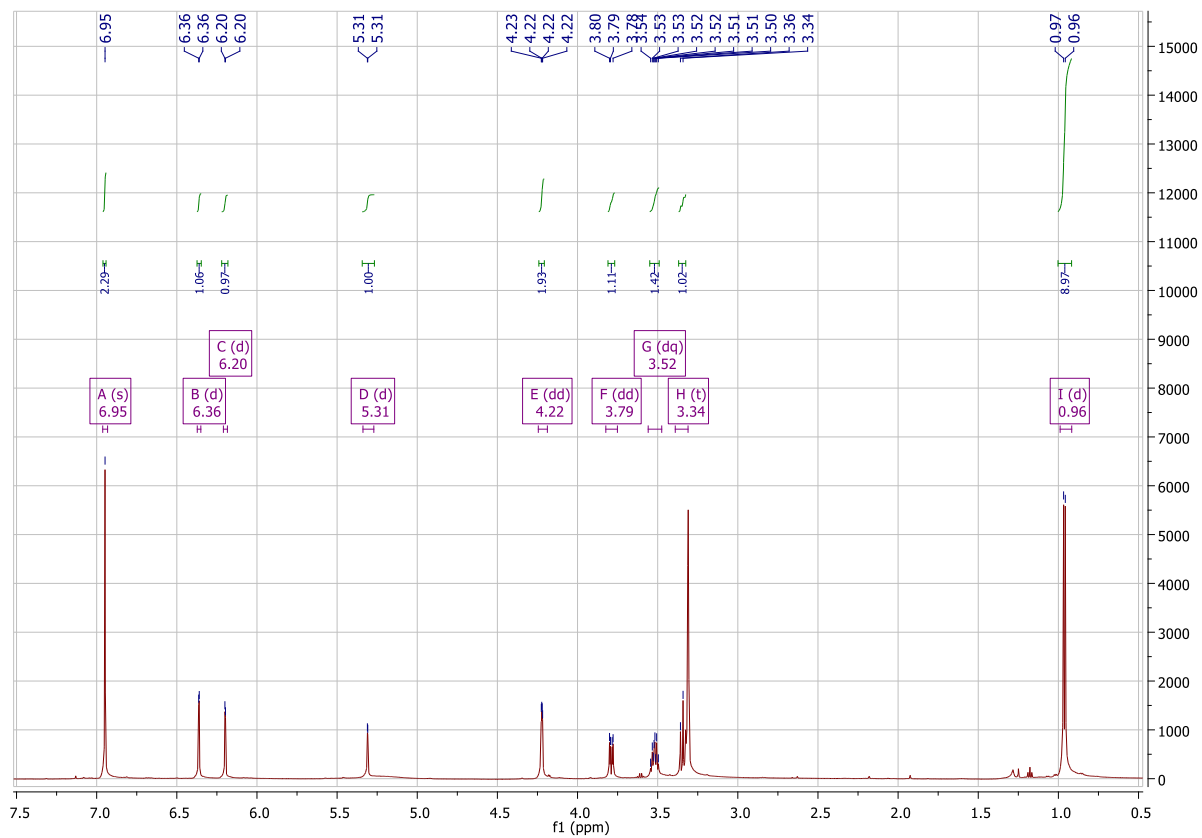
Assim, podemos concluir que as folhas de *Myrcia splendens* possuem potencial fitotóxico, antioxidante e antifúngico, podendo ser utilizada para estudos posteriores a fim da identificação das substâncias responsáveis por estes potenciais.

ANEXOS

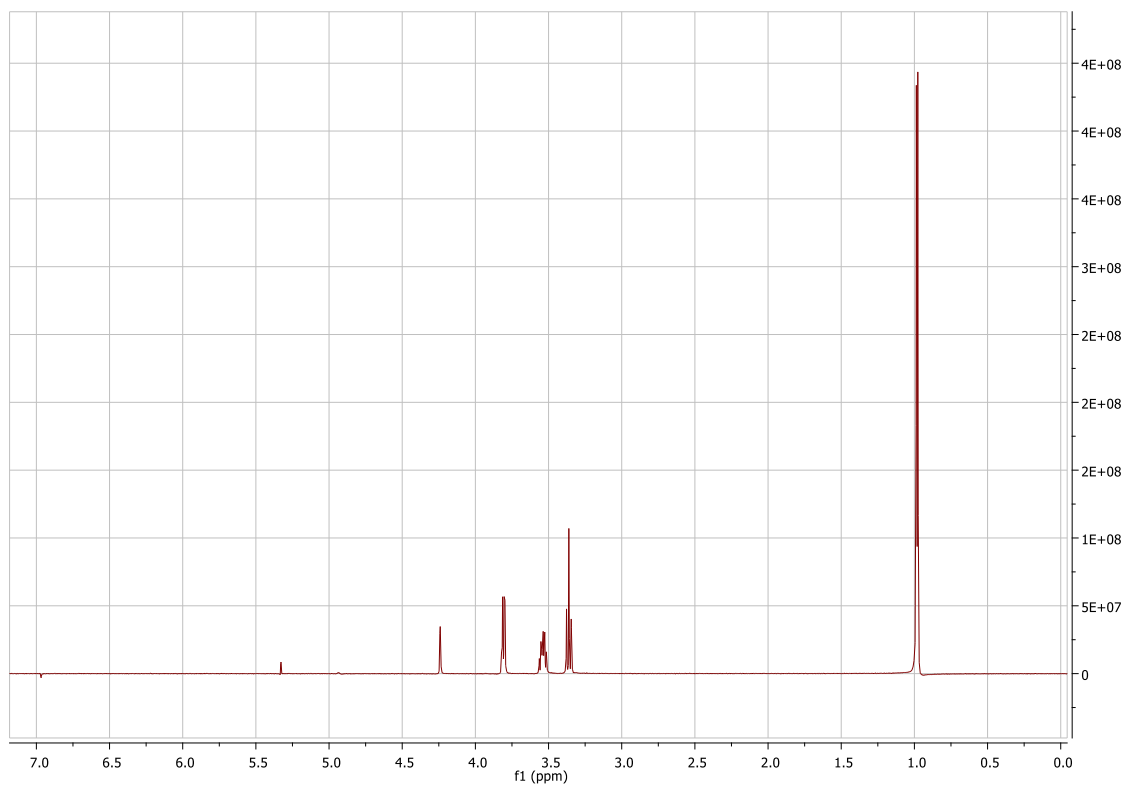
ANEXO A – Cromatograma do composto isolado miricitrina com método isocrático MeOH 40% em H₂O.



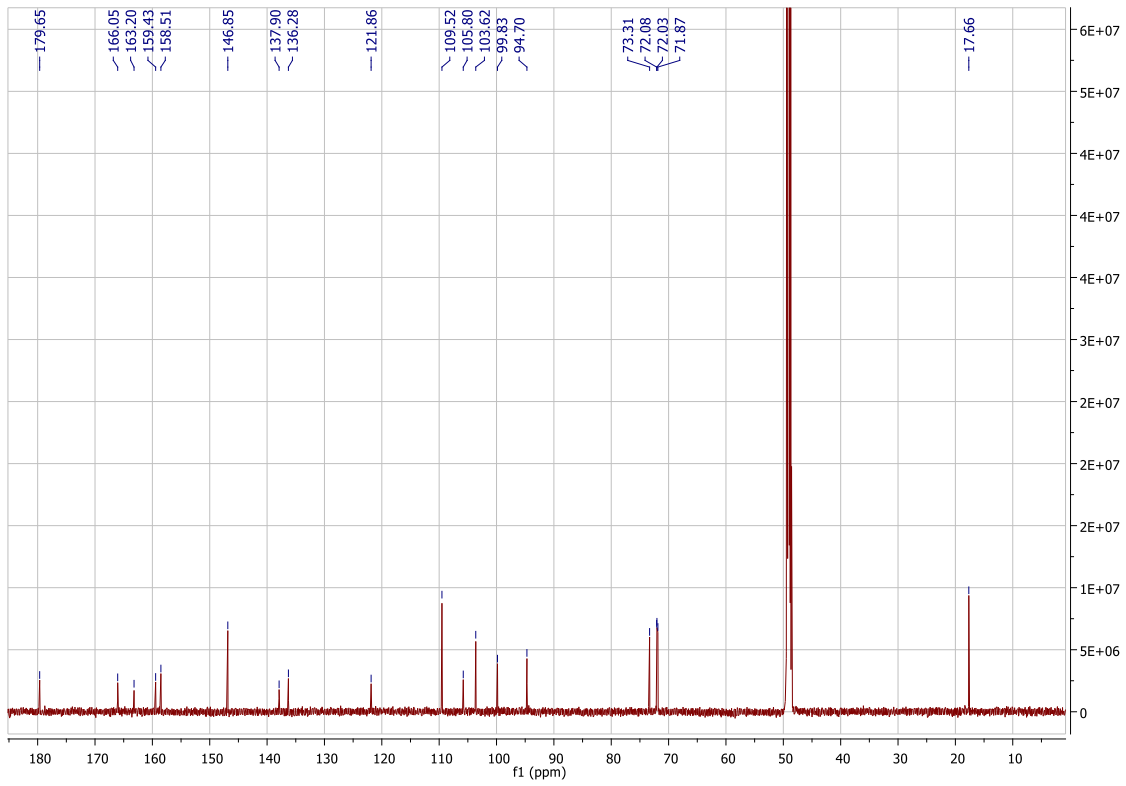
ANEXO B – Espectros de ^1H -RMN referente ao composto isolado.



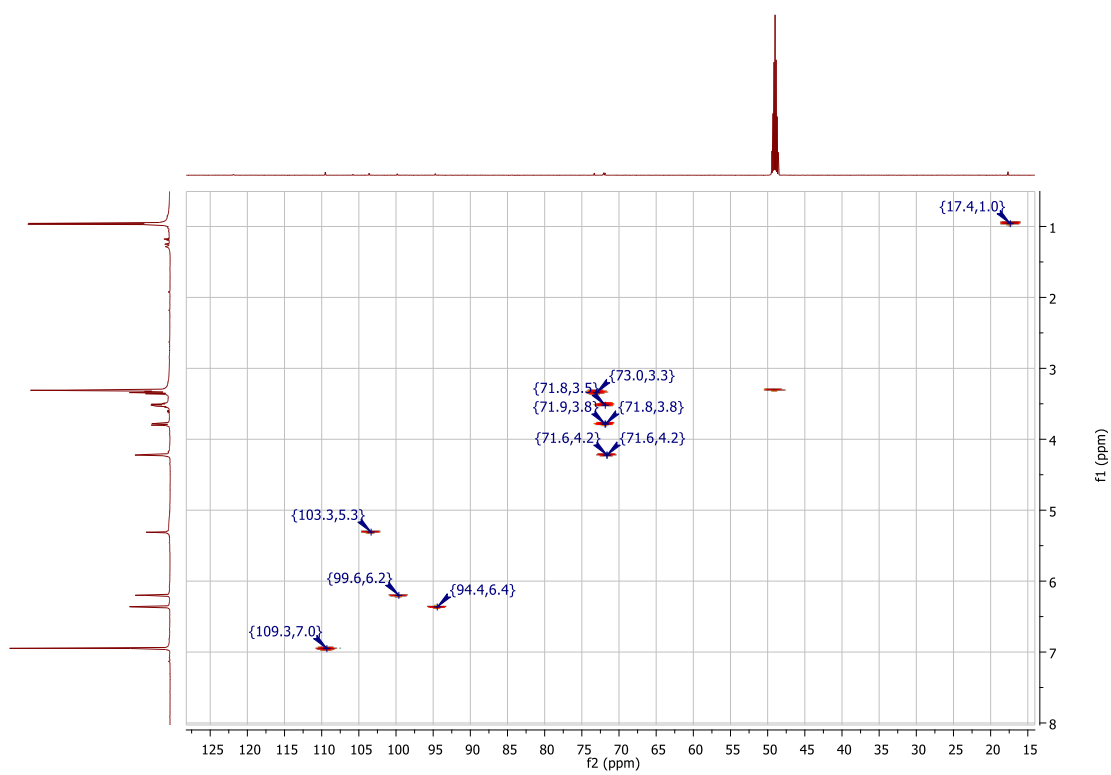
ANEXO C – Espectro de RMN TOCSY 1D referente ao composto isolado.



ANEXO D – Espectro de ^{13}C -RMN referente ao composto isolado.



ANEXO E- Espectro de RMN HSQC do composto isolado.



ANEXO F- Espectro de RMN HMBC do composto isolado.

