

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

**Alelopatia em *Pteridium arachnoideum* (Kaulf.)
Maxon. (Dennstaedtiaceae)**

Luciana de Jesus Jatoba

São Carlos

2016

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

**Alelopatia em *Pteridium arachnoideum* (Kaulf.)
Maxon. (Dennstaedtiaceae)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, como requisito para obtenção do título de Doutorado em Ciências, orientado pela Profa. Dra. Sonia Cristina Juliano Gualtieri.

São Carlos

2016

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

J399a Jatoba, Luciana de Jesus
Alelopatia em *Pteridium arachnoideum* (Kaulf.)
Maxon. (Dennstaedtiaceae) / Luciana de Jesus Jatoba.
-- São Carlos : UFSCar, 2016.
113 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2016.

1. Alelopatia. 2. Samambaião. 3. Comportamento
invasor. 4. Aleloquímico. 5. Cromatografia analítica.
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 Tese de Doutorado da candidata Luciana de Jesus Jatobá, realizada em 18/03/2016:

Sonia Gualtieri

Profa. Dra. Sonia Cristina Juliano Gualtieri
UFSCar

Maristela Imatomi

Profa. Dra. Maristela Imatomi
UFSCar

Taícia Pacheco Fill

Profa. Dra. Taícia Pacheco Fill
UNICAMP

Mariângela Tambellini

Profa. Dra. Mariângela Tambellini
UFTM

Paula Novaes

Profa. Dra. Paula Novaes
USP

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Sonia Cristina Juliano Gualtieri, por ter aceitado ser minha orientadora, pela orientação e pela confiança ao longo desses anos.

Ao Prof. Dr. Francisco Antonio Macías, à Profa. Dra. Rosa Varela Montoya e ao Prof. José Maria Gonzalez Molinillo por terem me recebido no Grupo de Alelopatía de Cádiz e me orientado. Agradeço especialmente à Profa. Rosa, que me acompanhou de perto, me apoiou e incentivou durante todo o tempo em que estive lá.

Ao Prof. Dr. Edson Rodrigues-Filho por ter me recebido no seu laboratório, pela orientação e confiança. A todos os colegas de laboratório no Departamento de Química da UFSCar, em especial ao Zia Ud Din, pela paciência e disponibilidade em me ajudar.

Ao João Pedro de Freitas Lima, por todo apoio incondicional. Por estar comigo sempre, se alegrando com meus bons resultados e me consolando nos momentos de desespero. Por me emprestar o carro para as coletas de campo, sem (quase) se importar com o amassado e os riscos resultantes. Por ser meu parceiro, em todos os aspectos da vida.

À minha mãe, Candida Maria de Jesus Jatoba e ao meu pai, Jaime Barbosa Jatoba, por terem me ensinado o valor da educação e do trabalho, a ser independente e forte, e a acreditar no meu próprio potencial.

A todos os colegas de laboratório no Departamento de Botânica da UFSCar, em especial à Simoni Anese, Maristela Imatomi, Maria Augusta Machado, Lafayette Candido, Leandro Kenji Takao, Viviane de Cassia Pereira, Flavia Pontes, Raquel Negrão, Talita Sampaio, Marcelo Leite, Rafael Xavier e Raquel Miatto pelo apoio, pela discussão de ideias e empréstimo de equipamentos. Ao técnico Ademir de Paula, à Aline Alves Ataidés, Maria Gabriela Miranda e Heron Luiz Barros pela ajuda em campo.

A todos os colegas do Grupo de Alelopatía e do CAIV da UCA, em especial ao José Luis Garcia Galindo, Maria Teresa Fernández Ponce, Carlos Rial Cumbreira e Gerardo Fernandez Barbero pela amizade, companhia, cafés e almoços compartilhados. À Amanda Trindade, Janclei Pereira Coutinho, Eliane Silva, Marília Almeida, Paula Novaes, Silvia C. Heredia, Michelli Massaroli e Ana Pinto pela convivência em Cádiz.

Aos meus amigos, em especial à Lia Mayrink Sabinson, Helena Janke, Mayla Willik, Valéria Ghislotti e Otávio Lino, por serem sempre exemplos e a melhor companhia para o que der e vier.

À Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas concedidas.

"Que o esforço técnico não esteja separado da moral. A ciência, sem ética que a conduza, não necessariamente é fator de progresso. Pode ser fator de exploração e submissão "

José Mujica

RESUMO

Plantas do gênero *Pteridium* são samambaias (monilófitas) e estão distribuídas em todo mundo. São consideradas espécies problemas pois invadem áreas recentemente queimadas, abandonadas ou sob impacto antrópico. No Brasil, *Pteridium arachnoideum* (Kaulf.) Maxon. apresenta-se como uma importante espécie problema do Cerrado e da Mata Atlântica. Compreender os mecanismos que governam o sucesso de plantas com comportamento invasor tem se mostrado um dos maiores desafios das últimas décadas. Dentre as interações que podem influenciar este sucesso está a alelopatia. No entanto, poucas são as evidências apresentadas até então para este fenômeno, especialmente a partir do isolamento e identificação de substâncias do metabolismo secundário destas plantas. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o papel da alelopatia por fitotoxicidade direta e alterações abióticas na dominância de *P. arachnoideum* nas áreas em que ocorre. Para isso, foi realizado estudo fitoquímico biodirigido de diferentes órgãos e serrapilheira desta planta, avaliação da atividade fitotóxica dos polifenóis e do metabólito secundário isolado e identificado sobre o desenvolvimento inicial da espécie bioindicadora gergelim, identificação da presença deste composto no solo, sua quantificação e avaliação de sua interação com características físico-químicas do solo. O estudo fitoquímico levou ao isolamento de um composto majoritário presente em suas frondes verdes e serrapilheira desta planta, a proantocianidina selligueina A. Esta é a primeira vez que este composto é descrito para *P. arachnoideum*, assim como para a família Dennstaediaceae. A selligueina A apresentou atividade fitotóxica sobre o alongamento de coleótilos de trigo, com atividade inibitória acima de 71%, e IC₅₀ de 0,69 mM. A fração enriquecida em polifenóis extraídos da serrapilheira de *P. arachnoideum* exerceu atividade inibitória sobre o desenvolvimento inicial de espécies bioindicadoras, nativa e invasora do Cerrado, especialmente sobre o desenvolvimento das raízes dessas plântulas, e atividade sobre as células do metaxilema de gergelim, e sobre o conteúdo de clorofila de gergelim e de capim rabo-de-raposa. O potencial alelopático do principal composto polifenólico desta planta, selligueina A, também foi testado sobre o crescimento inicial de gergelim, promovendo inibição do comprimento final do caule e da raiz de plântulas de gergelim em todas as concentrações testadas. Plântulas de gergelim crescidas na presença de selligueina A apresentaram células do metaxilema menores do que o as do controle nas concentrações de 0,3 mM e 1 mM, com inibição de 50,82% na maior concentração e IC₅₀ de 0,98 mM. Não houve atividade de selligueina A sobre o conteúdo de clorofila dessas plântulas. Análises dos extratos de solo coletado sob manchas de *P. arachnoideum* apontaram a presença de selligueina A como composto majoritário na solução do solo, e, portanto, como aleloquímico produzido por esta planta. As concentrações do composto no solo variaram entre 0,02 e 0,65 mM. De acordo com resultados de potencial alelopático essa faixa de concentração seria suficiente para potencialmente atuar sobre espécies co-ocorrentes, favorecendo a dominância de *P. arachnoideum*. A presença de *P. arachnoideum* em áreas de Cerrado altera condições químicas do solo, especialmente com relação à concentração do nutriente N e de Al, quando comparada à presença de braquiária (*U. decumbens*). Além disso, a concentração de Al se encontra correlacionada à massa de serrapilheira e à concentração de selligueina A nas áreas amostradas. Estes resultados corroboram a hipótese de alelopatia como mecanismo de dominância dessa planta nas áreas em que ocorre, com a primeira descrição de um aleloquímico para uma espécie do gênero *Pteridium*, que apresenta atividade não apenas por fitotoxicidade direta, mas também por ação indireta, ao controlar a concentração de Al nessas áreas.

Palavras-chave: Samambaião, espécie problema, comportamento invasor, aleloquímico, isolamento biodirigido, atividade fitotóxica, cromatografia analítica.

ABSTRACT

Pteridium plants are ferns (monilopytes) distributed all around the globe. These plants are considered problem species as they invade recently abandoned or burned areas, and areas under anthropogenic impacts. In Brazil, *Pteridium arachnoideum* (Kaulf.) Maxon. has become an important problem species at the Cerrado (Tropical Savanna) and Atlantic Forest biomes. To understand the mechanisms underlying invasive plants success are one of the greatest challenges of the last decades. Among the interaction that can influence this success, we find allelopathy. However, until now we have few evidences for this phenomenon on these plants, especially from the isolation and indentification of secondary metabolites with activities related to allelopathy. Therefore, the present work aimed to evaluate the allelopathy role by direct phytotoxicity and abiotic changes in *Pteridium arachnoideum* (Kaulf.) Maxon. dominance in the areas it invades. To do so, the bioguided phytochemical study of this plant tissues and litter was performed, as well as the evaluation of the phytotoxic activity of phenolic compounds present in its litter and of its isolated and identified secondary metabolite against the early development of sesame, verifying the presence of this compound in the soil, its quantification, and evaluation of its interactions with physical and chemical soil characteristics. The phytochemical study led to the isolation and identification of a majoritarian compound in the plants green fronds and litter, the proanthocianidin selligueian A. This is the first time this compound is described for *P. arachnoideum*, as well as for the Dennstaediaceae family. Selligueain A showed phytotoxic activity against wheat coleoptiles elongation, with inhibitory activity over 71%, and IC₅₀ of 0.69 mM. The poliphenols enriched fraction extracted from *P. arachnoideum* litter exert inhibitory activity against the early development of bioindicators species, native and invasive species of the Cerrado biome, specially over the development of these seedlings roots, besides activity against the metaxylem cells of sesame, and against chlorophyll content of sesame and the native weed *Setaria parviflora*. The allelopathic potential of the main poliphenolic compound of *P. arachnoideum*, selligueain A, was also evaluated against the early growth of sesame seedlings, promoting root and shoot growth in all the concentrations tested. Sesame seedlings grown in the presence of selligueain A showed smaller metaxylem cells when compared to the control, in the concentrations of 0.3 mM e 1 mM, with 50.82% inhibition in the greatest concentration and IC₅₀ value of 0.98 mM. There was no activity of selligueain A against chlorophyll content of these seedlings. Analyses of extracts of soil collect under a *P. arachnoideum* patches pointed to the presence of selligueain A as major compound in soil solution, and, therefore, as a putative allelochemical produced by this plant. The concentration observed for this compound in the soil raged between 0.02 and 0.65 mM. According to allelopathic potential results, this concentration rage is sufficient to act over co-occurring plant species, promoting *P. arachnoideum* dominance. The presence of *P. arachnoideum* in Cerrado areas alters the chemical conditions of the soil, especially regarding N and Al, when compared to the presence of *U. decumbens*. Additionally, Al concentration is correlated to litter mass and to selligueain A concentration at the sites sampled. These results corroborates the hypothesis of allelopathy as a dominance mechanism of this plant in the areas where it occurs, with the first report of an allelochemical for a *Pteridium* species, by direct phytotoxic activity as well as by controlling Al concentration at those areas.

Key words: Bracken fern, problem species, ivasive behavior, allelochemical, bioguided isolation, phytotoxic activity, analytical chromatography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Área de Cerrado (21°58'01.7"S 047°52'10.3"O) dominada por *Pteridium arachnoideum* e camada de serrapilheira (30 centímetros)., 14

Figura 2. Compostos bioativos isolados de plantas do gênero *Pteridium*., 15

Figura 1.1. Processo de fracionamento cromatográfico do extrato AcOEt de frondes verdes de *P. arachnoideum*., 33

Figura 1.2. Processo de fracionamento cromatográfico do extrato AcOEt de serrapilheira de *P. arachnoideum*., 33

Figura 1.3. Placas de CCD dos extratos AcOEt (à direita de cada placa) e MeOH (à esquerda de cada placa) dos extratos de frondes verdes (A), serrapilheira (B) e rizoma (C) de *P. arachnoideum*., 36

Figura 1.4. Inibição do alongamento de fragmentos de coleótilos de trigo (*T. aestivum*) na presença de frações dos extratos AcOEt de frondes verdes de *P. arachnoideum*, e do herbicida Logran em diferentes concentrações., 37

Figura 1.5. Placas de CCD das frações GF-1 – GF-2 (A) e das sub-frações GF-2A – GF-2D do extrato AcOEt de frondes verdes de *P. arachnoideum*., 38

Figura 1.6. Selligueina A, isolada das frondes verdes e serrapilheira de *P. arachnoideum*., 38

Figura 1.7. Inibição do alongamento de fragmentos de coleótilos de trigo (*T. aestivum*) na presença de frações dos extratos AcOEt de serrapilheira de *P. arachnoideum*, e do herbicida Logran em diferentes concentrações., 39

Figura 1.8. Inibição do alongamento de fragmentos de coleótilo de trigo (*T. aestivum*) na presença de selligueina A isolada de *P. arachnoideum*, e do herbicida em diferentes concentrações., 41

Figura 2.1. Curva analítica do padrão ácido gálico para avaliação do teor total de polifenóis das frações do extrato de serrapilheira de *P. arachnoideum*., 53

Figura 2.2. Aspecto das plântulas de gergelim (*S. indicum*) crescidas na presença da fração PaS-1., 57

Figura 2.3. Aspecto das plântulas de cebola (*A. cepa*) crescidas na presença da fração PaS-1., 58

Figura 2.4. Micrografias de células do metaxilema da raiz de plântulas de gergelim (*S. indicum*) tratadas com a fração PaS-1., 60

- Figura 2.5. Aspecto das plântulas de capim rabo-de-raposa (*S. parviflora*) crescidas na presença da fração PaS-1., 62
- Figura 2.6. Aspecto das plântulas de capim braquiária (*U. decumbens*) crescidas na presença da fração PaS-1., 63
- Figura 2.7. Aspecto das plântulas de gergelim (*S. indicum*) crescidas na presença de selligueina A., 66
- Figura 2.8. Aspecto das anormalidades apresentadas por plântulas de gergelim crescidas na presença de selligueina A., 68
- Figura 2.9. Micrografias de células do metaxilema da raiz de plântulas de gergelim (*S. indicum*) tratadas com selligueina A. Micrografias obtidas com aumento de 20 vezes., 69
- Figura 3.1. Localização das manchas de *P. arachnoideum* e *U. decumbens* sob as quais foram coletadas amostras de solo para análise., 82
- Figura 3.2. Curva analítica de padronização interna utilizada para quantificação de selligueina A em extratos de solo., 85
- Figura 3.3. Curva analítica de padronização externa utilizada para cálculo da concentração de quercetina em extratos de solo nos ensaios de recuperação., 87
- Figura 3.4. Cromatogramas de extratos de solo coletado sob manchas de *P. arachnoideum* para análise preliminar., 89
- Figura 3.5. Espectro de massas em modo *full scan* (A) e absorção UV (B) do pico correspondente à selligueina A., 90
- Figura 3.6. Cromatogramas de solução metanólica de quercetina a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (A) e de extrato de solo solubilizado com solução metanólica de quercetina a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (B)., 92
- Figura 3.7. Espectro de massas em modo *full scan* (A) e absorção UV (B) do pico correspondente à quercetina., 93
- Figura 3.8. Modelos lineares da relação entre a concentração de selligueina A no solo e a massa de serrapilheira (A) e a concentração de alumínio no solo (B) em áreas dominadas por *P. arachnoideum* ao final da estação chuvosa., 96
- Figura 3.9. Modelo linear da relação entre a massa de serrapilheira e a concentração de alumínio no solo em áreas dominadas por *P. arachnoideum* ao final da estação seca., 97

LISTA DE TABELAS

- Tabela 2.1. Crescimento inicial de plântulas de gergelim (*S. indicum*), cebola (*A. cepa*), capim-rabo-de-raposa (*S. parviflora*) e capim-braquiária (*U. decumbens*) crescidas na presença da fração PaS-1., 59
- Tabela 2.2. Frequência relativa (%) das classes de tamanho de células do metaxilema de plântulas de gergelim (*S. indicum*) tratadas com o extrato PaS-1., 60
- Tabela 2.3. Teores^a de clorofila a (C_a), clorofila b (C_b) e clorofila total (C_t) de plântulas de gergelim (*S. indicum*), cebola (*A. cepa*), capim-rabo-de-raposa (*S. parviflora*) e capim-braquiária (*U. decumbens*) crescidas na presença da fração PaS-1., 65
- Tabela 2.4. Crescimento inicial^a de plântulas de gergelim (*S. indicum*) crescidas na presença de selligueína A., 67
- Tabela 2.5. Frequência relativa (%) das classes de tamanho de células do metaxilema de plântulas de gergelim (*S. indicum*) tratadas com selligueína A., 69
- Tabela 2.6. Teores^a de clorofila a (C_a), clorofila b (C_b) e clorofila total (C_t) de plântulas de gergelim (*S. indicum*) crescidas na presença de selligueína A., 70
- Tabela 3.1. Coordenadas geográficas de localização dos pontos de coleta de solo., 82
- Tabela 3.2. Frequência relativa (%) das classes de concentração de selligueína A (mM) no solo sob *P. arachnoideum* ao final da estação chuvosa e ao final da estação seca., 93
- Tabela 3.3. Parâmetros físicos e químicos¹ de amostras de solo coletadas sob manchas de *P. arachnoideum* e *U. decumbens* ao fim da estação chuvosa e ao fim da estação seca., 95
- Tabela 3.4. Modelos lineares da relação entre a concentração de selligueína A no solo e a massa de serrapilheira e a concentração de alumínio no solo em áreas dominadas por *P. arachnoideum* ao final da estação chuvosa., 97
- Tabela 3.5. Modelo linear da relação entre a massa de serrapilheira e a concentração de alumínio no solo em áreas dominadas por *P. arachnoideum* ao final da estação seca., 99

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	13
Justificativa	19
Hipóteses.....	19
Objetivos.....	20
Referências	21
CAPÍTULO I.....	27
ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E FITOTOXICIDADE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE <i>Pteridium arachnoideum</i> (Kaulf.) Maxon. (DENNSTAEDTIACEAE)	27
RESUMO	28
1. INTRODUÇÃO.....	29
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
2.1. Extração Inicial e Isolamento Biodirigido.....	31
2.2. Bioensaios com Coleóptilos de Trigo.....	34
2.3. Análises Estatísticas	34
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
3.1 Isolamento Biodirigido	35
3.2 Atividade Fitotóxica de Selligueina A.....	40
4. CONCLUSÃO.....	42
Referências	42
CAPITULO II	47
POTENCIAL ALELOPÁTICO DE POLIFENÓIS DA SERRAPILHEIRA DE <i>Pteridium arachnoideum</i> (Kaulf.) Maxon. (DENNSTAEDTIACEAE)	47
RESUMO	48
1. INTRODUÇÃO.....	49
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	51
2.1. Material Vegetal	51
2.3. Extração Inicial e Cromatografia.....	51
2.4. Quantificação de Polifenóis Totais.....	52

2.5.	Bioensaios de Crescimento Inicial	53
2.6.	Teores de Clorofila	55
2.7.	Avaliação de Células do Metaxilema	55
2.8.	Análise Estatística	56
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.	CONCLUSÃO.....	71
	Referências.....	71
	CAPITULO III.....	75
	SELLIGUEINA A COMO ALELOQUÍMICO DE <i>Pteridium arachnoideum</i> (Kaulf.)	
	Maxon. (DENNSTAEDTIACEAE): EVIDÊNCIAS EM ANÁLISES DE SOLO.....	75
	RESUMO	76
1.	INTRODUÇÃO.....	77
2.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	79
2.1.	Equipamentos e Reagentes	79
2.2.	Preparação do Padrão Selligueina A	80
2.3.	Desenho Amostral	81
2.4.	Extração e Análises Preliminares dos Extratos de Solo	84
2.5.	Quantificação de Selligueina A no Solo.....	84
2.6.	Análise Estatística	88
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	88
3.1.	Análises Preliminares	88
3.2.	Quantificação de Selligueina A no Solo sob <i>P. arachnoideum</i>	91
3.3.	Análises de Parâmetros Físico-Químicos do Solo.....	94
4.	CONCLUSÃO.....	100
	Referências.....	100
	CONCLUSÕES FINAIS.....	104
	ANEXOS	105

INTRODUÇÃO GERAL

Plantas do gênero *Pteridium* são samambaias cosmopolitas heliófitas, sendo um dos táxons de planta mais abundantes do planeta, presente em todos os continentes, com exceção da Antártida (ALONSO-AMELOT, 2002; SILVA; MATOS, 2006; DER et al., 2009; GIL DA COSTA et al., 2012). Plantas do gênero *Pteridium* apresentam grande plasticidade fenotípica, muitos intermediários morfológicos entre morfotipos definíveis e capacidade de hibridização entre si, mesmo a longas distâncias. Até recentemente, este gênero era considerado monotípico, com a existência de duas subespécies (*Pteridium aquilinum* ssp. *aquilinum* e *Pteridium aquilinum* ssp. *caudatum*). Para a subespécie ssp. *aquilinum*, eram reconhecidas oito variedades europeias, enquanto que para a subespécie ssp. *caudatum* eram reconhecidas quatro variedades encontradas na América do Sul e Central, Ásia e Oceania. Dentre essas subespécies e variedades, encontrava-se *Pteridium aquilinum* ssp. *caudatum* var. *arachnoideum* (DER et al., 2009; GIL DA COSTA et al., 2012). A crescente necessidade de revisão do complexo de espécies do gênero *Pteridium* culminou na proposta de organização taxonômica infragenérica adotada atualmente, baseada em análises de ploidia cromossômica e de DNA mitocondrial, em que *Pteridium arachnoideum* é considerada uma espécie independente (DER et al., 2009). Para efeitos do presente trabalho, a nomenclatura mais recente foi adotada, ainda que muitos trabalhos de referência sobre a biologia, ecologia e fitoquímica da espécie tenha sido publicada de acordo com a classificação em subespécies e variedades.

Pteridium arachnoideum (Kaulf.) Maxon. é uma espécie pertencente ao clado das monilófitas, família Dennstaediaceae, conhecida popularmente como samambaião, samambaia das taperas ou samambaia do campo (SILVA; MATOS, 2006; SCHWARTSBURD et al., 2014). No Brasil, sua distribuição se estende por todo território das regiões sul e sudeste, ocorrendo também em parte das regiões nordeste e norte, sendo considerada nativa de dois dos principais biomas brasileiros, o Cerrado e a Mata Atlântica (SCHWARTSBURD et al., 2014).

Plantas do gênero *Pteridium* representam um desafio para o manejo e conservação da biodiversidade ao redor do mundo, por se tornarem dominantes em áreas degradadas ou que sofrem impactos antrópicos (ROYO; CARSON, 2006; GHORBANI et al., 2007; MAREN et al., 2008; STEWART et al., 2008), capazes de provocar alterações ambientais significativas nas áreas em que se estabelece (GRIFFITHS; FILAN, 2007; OLIVARES et al., 2007; ADIE et al., 2011). No Brasil, *P. arachnoideum* é descrita como uma espécie pioneira

agressiva de difícil manejo, invadindo áreas abandonadas ou recém-queimadas (MATOS; BELINATO, 2010; GIL DA COSTA et al., 2012).



Figura 1. Área de Cerrado (21°58'01.7"S 047°52'10.3"O) dominada por *Pteridium arachnoideum* e camada de serrapilheira (30 centímetros). Fotos: Luciana de Jesus Jatobá, abril de 2014.

O Cerrado é considerado como o segundo maior bioma brasileiro, cobrindo originalmente cerca de 42% do território nacional. Até o final de 2009, estima-se que esta cobertura original tenha sido reduzida quase que pela metade (GANEM et al., 2013; BORGES et al., 2014). O Cerrado é considerado um *hotspot* de conservação de biodiversidade, dados sua alta taxa de endemismo e de risco à biodiversidade. Apresenta-se como a savana mais biodiversa do mundo, assim como uma das mais ameaçadas, principalmente pela expansão agrícola e fragmentação da paisagem (MYERS et al., 2000; PHALAN et al., 2013; GANEM et al., 2013). Somam-se a estes impactos aqueles decorrentes da sua vulnerabilidade a espécies invasoras, como as gramíneas africanas capim-braquiária (*Urochloa decumbens*) e capim-gordura (*Melinis minutiflora*) (ROSSI et al., 2014; GORGONE-BARBOSA et al., 2016). Os efeitos da invasão por estas duas espécies de gramíneas incluem supressão da biomassa de gramíneas nativas, grande acúmulo de biomassa seca como combustível para incêndios (ROSSI et al., 2014) e interferência sobre o desenvolvimento inicial de espécies arbóreas nativas (FONSECA et al., 2013). Áreas de Cerrado submetidas a impactos antrópicos estão sujeitas não apenas à invasão por essas espécies exóticas (GORGONE-BARBOSA et al., 2016), mas também por espécies nativas de comportamento invasor, como é o caso de *P. arachnoideum* (GIL DA COSTA et al., 2012). Compreender os mecanismos que permitem a dominância

dessas espécies nas áreas em que se estabelecem pode resultar em estratégias de manejo mais eficientes para a conservação da biodiversidade nesse bioma.

Fitoquímica de *Pteridium*

Muitos estudos sobre a fitoquímica de plantas do gênero *Pteridium* foram realizadas devido ao interesse farmacêutico e toxicológico das substâncias de seu metabolismo secundário. Animais que se alimentam destas plantas, especialmente de suas frondes verdes, apresentam diferentes síndromes, como deficiência de tiamina, envenenamento agudo, degeneração progressiva da retina, e câncer do trato digestivo (FINNIE et al., 2011; GIL DA COSTA et al., 2012; FURLAN et al., 2014).

Entre os compostos bioativos isolados e identificados a partir destas plantas, encontramos glicosídeos cianogênicos com atividade deterrente alimentar e de interferência no desenvolvimento de insetos (ALONSO-AMELOT; OLIVEROS-BASTIDAS, 2005); taninos com atividade carcinogênica (WANG et al., 1976; PAMUKCU; WANG; et al., 1980) e deterrente da alimentação de insetos (TEMPEL, 1981); flavonoides (CHEN et al., 2013a, 2013b), incluindo o flavonoide carcinogênico quercetina (PAMUKCU; YALCINER; et al., 1980); pterosinas e pterosídeos com atividade carcinogênica (SAITO et al., 1975; HOEVEN, VAN DER et al., 1983; FLETCHER et al., 2010); assim como o sesquiterpeno ptaquilosídeo, principal responsável pela atividade carcinogênica do consumo de *P. aquilinum* por mamíferos (PRAKASH et al., 2006; GIL DA COSTA et al., 2012) (Figura 2).

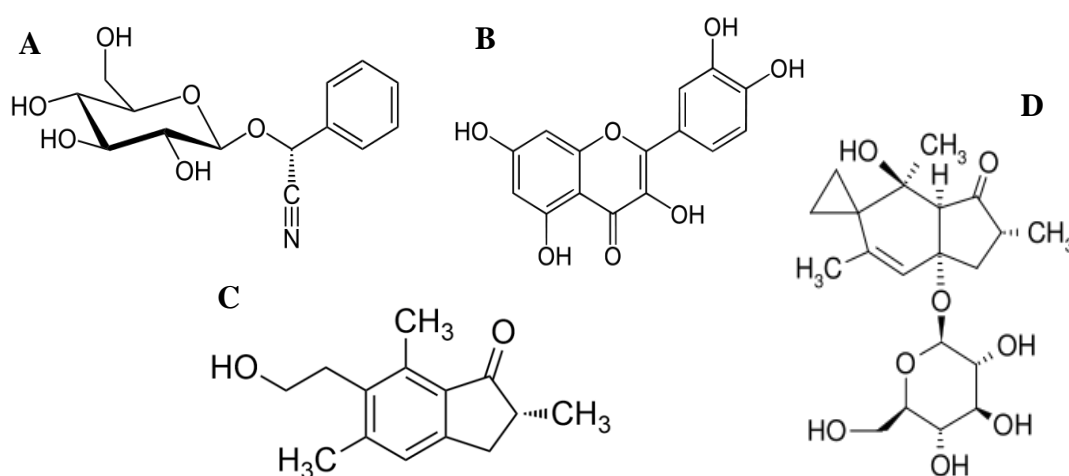


Figura 2. Compostos bioativos isolados de plantas do gênero *Pteridium*. (A) Glicosídeo cianogênio prunasina. (B) Flavonóide quercetina. (C) Pterosina B. (D) Ptaquilosídeo.

Apesar do grande esforço empregado para se compreender aspectos biológicos, ecológicos e toxicológicos desta planta, ainda são necessários estudos para que se possa compreender adequadamente as diferentes atividades biológicas da grande quantidade de compostos secundários produzidos por plantas do gênero *Pteridium* (HOJO-SOUZA et al., 2010; GIL DA COSTA et al., 2012).

Alelopatia e Ecologia de Plantas Invasoras

Plantas invasoras são definidas como espécies exóticas, ou seja, não nativas de determinado ambiente, que, ao se estabelecerem nele, provocam importantes alterações ambientais que podem ameaçar ecossistemas, habitats ou espécies (PEJCHAR; MOONEY, 2009). Entender os mecanismos que governam o sucesso das plantas invasoras tem sido um dos maiores desafios científicos das últimas décadas (CATFORD et al., 2009), incluindo processos ecológicos e evolutivos (FRIDLEY; SAX, 2014). Dentre os processos ecológicos com papel central no sucesso de plantas invasoras estão interações mediadas por recursos e competição no sentido estrito (ORROCK et al., 2015), assim como interações como a alelopatia (GREER et al., 2014).

A alelopatia é definida como qualquer efeito direto ou indireto de metabólitos secundários produzidos por uma planta (ou microrganismos) doadora e liberados no ambiente, sobre o crescimento, sobrevivência ou reprodução de uma planta alvo (ZENG, 2014). Estes metabólitos secundários são chamados de aleloquímicos, e suas interferências ambientais ou atividade fitotóxica podem ocorrer por fitotoxicidade direta (KATO-NOGUCHI et al., 2013), interferência na microbiota do solo (CIPOLLINI et al., 2012), sobre a dinâmica da ciclagem de nutrientes e sua disponibilidade (KRAUS et al., 2003), entre outros efeitos (INDERJIT; EVANS; et al., 2011; CANHOTO et al., 2013).

Para que seja possível afirmar a existência de alelopatia como mediadora do processo de dominância de espécies invasoras ou nativas com comportamento invasor, fazem-se necessários o isolamento e identificação dos compostos químicos responsáveis pelas atividades observadas, a avaliação do potencial alelopático destes compostos por meio de experimentos que demonstrem que a alelopatia pode contribuir nos efeitos negativos observados em outras plantas, assim como a determinação dos modos de produção, liberação para o ambiente e quantificação da produção basal dessas substâncias pela planta doadora (BLAIR et al., 2008; DUKE, 2015).

Neste contexto, identificar compostos que apresentem bioatividade em condições de laboratório não se mostra suficiente na comprovação do fenômeno da alelopatia (INDERJIT; CALLAWAY, 2003; ROMEO, 2011). A alelopatia apenas pode ser imputada quando o desenho experimental proposto leva em consideração aspectos como a relevância ecológica dos bioensaios, com a escolha de espécies que de fato coabitem com a espécie doadora sendo investigada, assim como análises *in situ* que apresentem evidências da presença dos compostos com atividade de interesse em concentrações relevantes para a inibição das espécies alvo (BLAIR et al., 2008; ROMEO, 2011; DUKE, 2015).

Estudos com enfoque biogeográfico sugerem relações evolutivas entre plantas, microrganismos do solo e suas relações que podem interferir no papel da alelopatia na organização das comunidades vegetais. Assim, espécies exóticas invasoras poderiam obter vantagens nos ambientes invadidos ao produzirem substâncias químicas do metabolismo secundário com atividade alelopática, para os quais as plantas nativas e a microbiota do solo do novo ambiente não teriam defesas. Dessa forma, as espécies de plantas invasoras obteriam vantagem competitiva sobre as espécies nativas, colocando a alelopatia como importante mecanismo de dominância (BAIS et al., 2003; CALLAWAY; RIDENOUR, 2004; INDERJIT; WARDLE; et al., 2011). Estes estudos levaram ao desenvolvimento da “hipótese das novas armas”, proposta por Callaway e Ridenour (2004) após o estudo em enfoque biogeográfico da invasão de *Centaurea maculosa*, espécie nativa da região do Mediterrâneo, nas áreas de comunidades vegetais do oeste da América do Norte, por meio da mediação do composto fitotóxico catequina.

Desde então, vários foram os trabalhos publicados indicando a alelopatia como mecanismo de dominância de plantas com comportamento. Por exemplo, Nielsen e colaboradores (2013) determinaram a importância da alelopatia no padrão espacial da dominância de *Thymus vulgaris* na Nova Zelândia, por meio da produção de óleos essenciais ricos em terpenos modulado por fatores abióticos. Fabbro e Prati (2015) determinaram a importância do “legado da alelopatia”, ao analisar a continuidade do efeito alelopático ao longo do tempo de 11 espécies doadoras, invasoras do continente europeu, por compostos presentes no solo após a sua retirada manual. Apenas no caso de espécies de monilófitas (samambaias), podemos citar o envolvimento da alelopatia na formação de bancos monotípicos de *Gleichenia japonica* (Gleicheniaceae) no sudeste asiático, mediado pela produção e liberação de diterpenóides glicosilados (KATO-NOGUCHI et al., 2013); assim como na formação de bancos monoespecíficos de *Dicranopteris linearis* (Gleicheniaceae) em terrenos montanhosos em Takamatsu, Japão, mediado por taninos condensados produzidos por essas plantas.

Comportamento Invasor de *Pteridium* e seus Impactos

Plantas do gênero *Pteridium* apresentam comportamento invasor agressivo e grande diversidade de compostos xenobióticos (MIATTO et al., 2011; GIL DA COSTA et al., 2012). Entre seus efeitos nos ambientes em que se estabelecem e tornam-se dominantes, incluem-se alterações em parâmetros físico-químicos do solo, ciclagem e disponibilidade de nutrientes (GRIFFITHS; FILAN, 2007; DELUCA et al., 2012). A grande quantidade de serrapilheira que produzem atua como biomassa combustível, contribuindo para a ocorrência de incêndios grandes e de altas temperaturas (ADIE et al., 2011). Estas plantas também representam um desafio em áreas de restauração ecológica, por interferirem na composição do banco de sementes (GHORBANI et al., 2006), no rebrotamento de espécies de interesse (ADIE et al., 2011), e na dinâmica de restauração florestal (MAREN et al., 2008).

No caso de *P. arachnoideum*, essa espécie é descrita como uma espécie pioneira agressiva, de difícil manejo nas áreas em que se torna dominante (MATOS; BELINATO, 2010; GIL DA COSTA et al., 2012). Apesar de ser uma espécie nativa do Cerrado e da Mata Atlântica, *P. arachnoideum* provoca importantes alterações ambientais nas áreas em que se estabelece e se torna dominante, caracterizando um comportamento invasor pelo qual é classificada como uma importante espécie problema destes biomas (PEJCHAR; MOONEY, 2009; GIL DA COSTA et al., 2012), considerados *hotspots* de conservação de biodiversidade (MYERS et al., 2000). Seus efeitos nestes biomas incluem esgotamento do banco de sementes (SILVA; MATOS, 2006) e interferência no estabelecimento de espécies arbóreas na Mata Atlântica (MATOS; BELINATO, 2010), assim como interferência na estrutura da vegetação do Cerrado (MIATTO et al., 2011).

Alelopatia em *Pteridium*

As plantas do gênero *Pteridium* produzem grande diversidade de metabólitos secundários, com diversas atividades biológicas e tornam-se dominantes e problemáticas nas áreas em que ocorrem (HOJO-SOUZA et al., 2010; GIL DA COSTA et al., 2012). No entanto, os mecanismos que permitem esta dominância ainda não estão bem esclarecidos. A alelopatia pode ter um papel importante neste fenômeno.

Atividade fitotóxica sobre cevada (*Hordeum vulgare*) foi observada para soluções contendo ácidos fenólicos associados à rizosfera de *P. aquilinum*, com inibição do desenvolvimento radicular (GLASS, 1976). Da mesma forma, o potencial alelopático de soluções aquosas de frondes verdes de *P. aquilinum* foi observado sobre diferentes espécies

vegetais bioindicadoras, apresentando redução no tamanho radicular (WANG et al., 2011). Para *P. arachnoideum*, foi observado potencial alelopático do extrato aquoso de frondes verdes sobre o desenvolvimento de espécies arbóreas comumente utilizadas para reflorestamento na Mata Atlântica, com atividade sobre a germinação, mortalidade de plântulas e comprimento final (MATOS; BELINATO, 2010).

Apesar destes relatos, nenhum composto com atividade fitotóxica ou qualquer outra atividade relacionada à alelopatia havia sido isolada ou individualmente identificada em *P. arachnoideum* ou qualquer uma das outras espécies do mesmo gênero.

Justificativa

Muitos dos estudos realizados a fim de se compreender como plantas invasoras obtêm sucesso nos ecossistemas em que se estabelecem se concentram em mecanismos como competição, alelopatia, falta de inimigos naturais, entre outros, mas poucos trabalhos se dedicaram a compreender a interação entre estes fatores. Entender a variedade de mecanismos pelos quais espécies invasoras e espécies problema modificam o ecossistema invadido e eliminam espécies nativas de seus habitats é importante pois permite ampliar os conhecimentos em ecologia vegetal e promover a conservação de ecossistemas naturais (MATTINGLY; REYNOLDS, 2014; DEL FABBRO; PRATI, 2015). Tendo em vista a importância da conservação do bioma Cerrado e a falta de conhecimentos sobre o papel dos compostos secundários de *Pteridium arachnoideum* nos processos de dominância dessa planta, maiores estudos são necessários para a determinação dos compostos com potencial alelopático e suas atividades com potencial de alterar seu ambiente, por meio de fitotoxicidade direta e alteração de condicionantes abióticos do solo.

Hipóteses

Pteridium arachnoideum produz substâncias do metabolismo secundário com atividade fitotóxica, presentes em suas frondes verdes, serrapilheira e rizoma.

Metabólitos secundários de *P. arachnoideum* apresentam atividade fitotóxica e, portanto, potencial alelopático sobre o desenvolvimento de espécies bioindicadoras, de gramíneas nativa e invasora do Cerrado.

Os compostos do metabolismo secundário com atividade fitotóxica produzidos por *P. arachnoideum* estão presentes no ambiente e disponíveis para agir sobre o desenvolvimento de espécies vegetais co-existentes.

Os compostos do metabolismo secundário com atividade fitotóxica produzidos por *P. arachnoideum* que se encontram presentes no ambiente alteram propriedades físico-químicas do solo, favorecendo seu estabelecimento e desenvolvimento.

Objetivos

Objetivo Geral

Avaliar o papel da alelopatia por fitotoxicidade direta e alterações abióticas na dominância de *Pteridium arachnoideum* nas áreas em que ocorre.

Objetivos Específicos

Isolar e caracterizar substância(s) com atividade fitotóxica em frondes verdes, serrapilheira e rizoma de *Pteridium arachnoideum*, por meio do método de isolamento biodirigido.

Determinar métodos de fracionamento cromatográfico, isolamento e purificação dos compostos ativos de interesse obtidos por isolamento biodirigido.

Estudar o efeito fitotóxico de diferentes frações e substância(s) isolada(s) dos extratos de *P. arachnoideum* sobre a germinação e desenvolvimento inicial de espécies bioindicadoras, nativa e invasora do Cerrado.

Determinar as curvas de dose-resposta para a atividade fitotóxica da(s) substância(s) isoladas de *P. arachnoideum*.

Verificar se a presença de manchas (agrupamentos) de *P. arachnoideum* modifica propriedades físico-químicas do solo quando comparadas às de solo sob manchas de *U. decumbens*.

Determinar correlação entre a presença e a concentração de substância(s) produzidas por *P. arachnoideum* com a biomassa da planta e propriedades físico-químicas do solo.

REFERÊNCIAS

- ADIE, H.; RICHERT, S.; KIRKMAN, K. P.; LAWES, M. J. The heat is on: frequent high intensity fire in bracken (*Pteridium aquilinum*) drives mortality of the sprouting tree *Protea caffra* in temperate grasslands. **Plant Ecology**, v. 212, n. 12, p. 2013–2022, 2011. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.1007/s11258-011-9945-8>>. Acesso em: 16/3/2012.
- ALONSO-AMELOT, M. E. The chemistry and toxicology of bioactive compounds in bracken fern (*Pteridium* spp), with special reference to chemical ecology and carcinogenesis. In: Attar-Rahman (Ed.); **Studies in Natural Products Chemistry**. Vol. 26 ed., v. 26, p.685–739, 2002. Berlin: Elsevier.
- ALONSO-AMELOT, M. E.; OLIVEROS-BASTIDAS, A. Kinetics of the natural evolution of hydrogen cyanide in plants in neotropical *Pteridium arachnoideum* and its ecological significance. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, n. 2, p. 315–331, 2005. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10886-005-1343-z>>. Acesso em: 15/5/2014.
- BAIS, H. P.; VEPACHEDU, R.; GILROY, S.; CALLAWAY, R. M.; VIVANCO, J. M. Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions. **Science**, v. 301, n. 5638, p. 1377–80, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12958360>>. Acesso em: 29/2/2012.
- BLAIR, A. C.; WESTON, L. A.; NISSEN, S. J.; BRUNK, G. R.; HUFBAUER, R. A. 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, 2008. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.1007/s10530-008-9250-1>>. Acesso em: 16/3/2012.
- BORGES, P. P.; OLIVEIRA, K. A. F. A.; MACHADO, K. B.; et al. Tendências e lacunas da literatura científica sobre o bioma Cerrado: uma análise cienciométrica. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 10, n. 1, p. 2–8, 2014. Disponível em: <<http://revistas.unisinos.br/index.php/neotropical/article/view/nbc.2015.101.01>>. Acesso em: 19/5/2016.
- CALLAWAY, R. M.; RIDENOUR, W. M. Novel Weapons: invasive success and the evolution of increased competitive ability. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 2, n. 8, p. 436, 2004. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/3868432?origin=crossref>>.
- CANHOTO, C.; CALAPEZ, R.; GONÇALVES, A. L.; MOREIRA-SANTOS, M. Effects of *Eucalyptus* leaf litter and oxygen on leaf-litter processing by fungi and stream invertebrates. **Freshwater Science**, v. 32, n. 2, p. 411–424, 2013. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.1899/12-062.1>>. Acesso em: 17/10/2013.
- CATFORD, J. A.; JANSSON, R.; NILSSON, C. Reducing redundancy in invasion ecology by integrating hypotheses into a single theoretical framework. **Diversity and Distributions**, v. 15, n. 1, p. 22–40, 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1472-4642.2008.00521.x>>. Acesso em: 16/3/2012.

CHEN, N.-D.; CHEN, N.-F.; CHEN, C.-W.; ZHANG, L. A novel bihomoflavanonol with an unprecedented skeleton from *Pteridium aquilinum*. **Chinese Herbal Medicines**, v. 5, n. 2, p. 96–100, 2013a.

CHEN, N.-D.; CHEN, N.-F.; CHEN, C.-W.; ZHANG, L. Separation and structure elucidation of a new homoflavanol derivative from *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. **Natural Product Research**, 2013b. Taylor & Francis.

CIPOLLINI, D.; RIGSBY, C. M.; BARTO, E. K. Microbes as targets and mediators of allelopathy in plants. **Journal of Chemical Ecology**, 2012.

DELUCA, T. H.; ZEWDIE, S. A.; ZACKRISSON, O.; HEALEY, J. R.; JONES, D. L. Bracken fern (*Pteridium aquilinum* L. kuhn) promotes an open nitrogen cycle in heathland soils. **Plant and Soil**, v. 367, n. 1-2, p. 521–534, 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11104-012-1484-0>>. Acesso em: 18/10/2013.

DER, J. P.; THOMSON, J. A.; STRATFORD, J. K.; WOLF, P. G. Global chloroplast phylogeny and biogeography of bracken (*Pteridium*; Dennstaedtiaceae). **American Journal of Botany**, v. 96, n. 5, p. 1041–1049, 2009.

DUKE, S. O. Proving allelopathy in crop–weed interactions. **Weed Science**, v. 63, n. sp1, p. 121–132, 2015.

FABBRO, C. DEL; PRATI, D. The relative importance of immediate allelopathy and allelopathic legacy in invasive plant species. **Basic and Applied Ecology**, v. 16, n. 1, p. 28–35, 2015.

FONSECA, M. B.; L. CAROLINO, M. M. S. S. DE; DIAS, T.; CRUZ, C.; FRANÇA, M. G. C. Early growth of Brazilian tree *Dimorphandra wilsonii* is also threatened by African grass *Urochloa decumbens*. **Journal of Plant Interactions**, v. 9, n. 1, p. 92–99, 2013. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/17429145.2013.770085>>. Acesso em: 19/5/2016.

FINNIE, J.; WINDSOR, P.; KESSELL, A. Neurological diseases of ruminant livestock in Australia. II: toxic disorders and nutritional deficiencies. **Australian Veterinary Journal**, v. 89, n. 7, p. 247–253, 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1751-0813.2011.00793.x>>. Acesso em: 25/6/2015.

FLETCHER, M. T.; HAYES, P. Y.; SOMERVILLE, M. J.; VOSS, J. J. DE. Ptesculentoside, a novel norsesquiterpene glucoside from the Australian bracken fern *Pteridium esculentum*. **Tetrahedron Letters**, v. 51, n. 15, p. 1997–1999, 2010.

FRIDLEY, J. D.; SAX, D. F. The imbalance of nature: revisiting a Darwinian framework for invasion biology. **Global Ecology and Biogeography**, v. 23, n. 11, p. 1157–1166, 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/geb.12221>>. Acesso em: 14/5/2015.

FURLAN, F. H.; MENDES, E. R. S.; DUCATTI, K. R.; et al. Acute poisoning by *Pteridium arachnoideum* and *Pteridium caudatum* in cattle and distribution of the plants in Mato Grosso. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 4, p. 343–348, 2014. Colégio Brasileiro de Patologia

Animal. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2014000400008&lng=en&nrm=iso&tlng=es>. Acesso em: 25/6/2015.

GANEM, R. S.; DRUMMOND, J. A.; FRANCO, J. L. DE A. Conservation policies and control of habitat fragmentation in the Brazilian Cerrado biome. **Ambiente & Sociedade**, v. 16, n. 3, p. 99–118, 2013.

GHORBANI, J.; DUC, M. G. LE; MCALLISTER, H. A.; PAKEMAN, R. J.; MARRS, R. H. Effects of the litter layer of *Pteridium aquilinum* on seed banks under experimental restoration. **Applied Vegetation Science**, v. 9, p. 127–136, 2006.

GHORBANI, J.; DUC, M. G. LE; MCALLISTER, H. A.; PAKEMAN, R. J.; MARRS, R. H. Temporal responses of propagule banks during ecological restoration in the United Kingdom. **Restoration Ecology**, v. 15, n. 1, p. 103–117, 2007.

GIL DA COSTA, R. M.; BASTOS, M. M. S. M.; OLIVEIRA, P. A.; LOPES, C. Bracken-associated human and animal health hazards: Chemical, biological and pathological evidence. **Journal of Hazardous Materials**, v. 203-204, p. 1–12, 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030438941101538X>>. Acesso em: 8/5/2012.

GLASS, A. D. M. The allelopathic potential of phenolic acids associated with the rhizosphere of *Pteridium aquilinum*. **Canadian Journal of Botany**, v. 54, n. 21, p. 2440–2444, 1976. NRC Research Press Ottawa, Canada.

GORGONE-BARBOSA, E.; PIVELLO, V. R.; BAEZA, M. J.; FIDELIS, A. Disturbance as a factor in breaking dormancy and enhancing invasiveness of African grasses in a Neotropical Savanna. **Acta Botanica Brasilica**, v. 30, n. 1, p. 131–137, 2016.

GREER, M. J.; WILSON, G. W. T.; HICKMAN, K. R.; WILSON, S. M. Experimental evidence that invasive grasses use allelopathic biochemicals as a potential mechanism for invasion: chemical warfare in nature. **Plant and Soil**, v. 385, n. 1-2, p. 165–179, 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11104-014-2209-3>>. Acesso em: 26/6/2015.

GRIFFITHS, R. P.; FILAN, T. Effects of bracken fern invasions on harvested site soils in Pacific Northwest (USA) Coniferous Forests. **Northwest Science**, v. 81, n. 3, p. 191–198, 2007.

HOEVEN, J. C. M. VAN DER; LAGERWEIJ, W. J.; POSTHUMUS, M. A.; VELDHUIZEN, A. VAN; HOLTERMAN, H. A. J. Aquilide A, a new mutagenic compound isolated from bracken fern (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn). **Carcinogenesis**, v. 4, n. 12, p. 1587–1590, 1983.

HOJO-SOUZA, N. S.; CARNEIRO, C. M.; SANTOS, R. C. *Pteridium aquilinum*: o que sabemos e o que ainda falta saber. **Biosciences Journal**, v. 26, n. 5, p. 798–808, 2010.

INDERJIT; CALLAWAY, R. M. Experimental designs for the study of allelopathy. **Plant and Soil**, v. 256, p. 1–11, 2003.

INDERJIT; EVANS, H.; CROCOLL, C.; et al. Volatile chemicals from leaf litter are associated with invasiveness of a neotropical weed in Asia. **Ecology**, v. 92, n. 2, p. 316–24, 2011.

- KATO-NOGUCHI, H.; SAITO, Y.; SUENAGA, K. Involvement of allelopathy in the establishment of pure colony of *Dicranopteris linearis*. **Plant Ecology**, v. 213, n. 12, p. 1937–1944, 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11258-012-0096-3>>. Acesso em: 27/2/2014.
- KATO-NOGUCHI, H.; SAITO, Y.; OHNO, O.; SUENAGA, K. Allelopathy is involved in the formation of pure colonies of the fern *Gleichenia japonica*. **Journal of Plant Physiology**, v. 170, p. 577–582, 2013.
- KRAUS, T. E. C.; DAHLGREN, R. A.; ZASOSKI, R. J. Tannins in nutrient dynamics of forest ecosystems - a review. **Plant and Soil**, v. 256, n. 1, p. 41–66, 2003.
- MAREN, I.; VANDVIK, V.; EKELUND, K. Restoration of bracken-invaded *Calluna vulgaris* heathlands: Effects on vegetation dynamics and non-target species. **Biological Conservation**, v. 141, n. 4, p. 1032–1042, 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006320708000505>>. Acesso em: 22/5/2012.
- MATOS, D. M. D. S.; BELINATO, T. A. Interference of *Pteridium arachnoideum* (Kaulf.) Maxon. (Dennstaedtiaceae) on the establishment of rainforest trees. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 2, p. 311–316, 2010.
- MATTINGLY, W. B.; REYNOLDS, H. L. Soil fertility alters the nature of plant–resource interactions in invaded grassland communities. **Biological Invasions**, v. 16, n. 11, p. 2465–2478, 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10530-014-0678-1>>. Acesso em: 26/6/2015.
- MIATTO, R. C.; SILVA, I. A.; SILVA-MATOS, D. M.; MARRS, R. H. Woody vegetation structure of Brazilian Cerrado invaded by *Pteridium arachnoideum* (Kaulf.) Maxon (Dennstaedtiaceae). **Flora**, v. 206, n. 8, p. 757–762, 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0367253011000399>>. Acesso em: 3/3/2012.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. DA; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853–8, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/35002501>>. Acesso em: 14/7/2014.
- NIELSEN, J. A.; WHIGHAM, P. A.; FREW, R. D.; CALLAWAY, R. M.; DICKINSON, K. J. M. Invasion essentials: does secondary chemistry plasticity contribute to the invasiveness of *Thymus vulgaris* L.? **Chemoecology**, v. 24, n. 1, p. 15–27, 2013.
- OLIVARES, E.; PEÑA, E.; BENÍTEZ, M. *Pteridium caudatum* (L.) Maxon behaves as a potassium plant and accumulates aluminum in the subterranean organs. **American Fern Journal**, v. 97, n. 2, p. 81–94, 2007.
- ORROCK, J. L.; DUTRA, H. P.; MARQUIS, R. J.; BARBER, N. Apparent competition and native consumers exacerbate the strong competitive effect of an exotic plant species. **Ecology**, v. 96, n. 4, p. 1052–1061, 2015. Ecological Society of America. Disponível em: <<http://www.esajournals.org/doi/10.1890/14-0732.1>>. Acesso em: 17/4/2015.

PAMUKCU, A. M.; WANG, C. Y.; HATCHER, J.; BRYAN, G. T. Carcinogenicity of tannin and tannin-free extracts of bracken fern (*Pteridium aquilinum*) in rats. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 65, n. 1, p. 131–136, 1980.

PAMUKCU, A. M.; YALCINER, S.; HATCHER, J. F.; BRYAN, G. T. Quercetin, a rat intestinal and bladder carcinogen present in bracken fern (*Pteridium aquilinum*). **Cancer Research**, v. 40, n. 10, p. 3468–3472, 1980.

PEJCHAR, L.; MOONEY, H. A. Invasive species, ecosystem services and human well-being. **Trends in ecology & evolution**, v. 24, n. 9, p. 497–504, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19577817>>. Acesso em: 18/7/2012.

PRAKASH, A. S.; PEREIRA, T. N.; SMITH, B. L.; SHAW, G.; SEAWRIGHT, A. A. Mechanism of bracken fern carcinogenesis: Evidence for H-ras activation via initial adenine alkylation by ptaquiloside. **Natural Toxins**, v. 4, n. 5, p. 221–227, 2006. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/%28SICI%29%281996%294%3A5%3C221%3A%3AAID-NT4%3E3.0.CO%3B2-Q>>. Acesso em: 25/6/2015.

ROMEO, J. T. Raising the beam: moving beyond phytotoxicity. **Journal of chemical ecology**, v. 26, n. 9, p. 2011–2014, 2011.

ROYO, A. A.; CARSON, W. P. On the formation of dense understory layers in forests worldwide: consequences and implications for forest dynamics, biodiversity, and succession. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 36, p. 1345–1362, 2006.

SAITO, M.; UMEDA, M.; ENOMOTO, M.; et al. Cytotoxicity and carcinogenicity of pterosins and pterosides, 1-indanone derivatives from bracken (*Pteridium aquilinum*). **Experientia**, v. 31, n. 7, p. 829–831, 1975. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF01938490>>. Acesso em: 25/6/2015.

SCHWARTSBURD, P. B.; MORAES, P. L. R. DE; LOPES-MATTOS, K. L. B. Recognition of two morpho-types in eastern South American brackens (*Pteridium*-Dennstaedtiaceae-Polypodiopsida). **Phytotaxa**, v. 170, n. 2, p. 103–117, 2014.

SILVA, U. S. R.; MATOS, D. M. S. The invasion of *Pteridium aquilinum* and the impoverishment of the seed bank in fire prone areas of Brazilian Atlantic Forest. **Biodiversity and Conservation**, v. 15, n. 9, p. 3035–3043, 2006. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.1007/s10531-005-4877-z>>. Acesso em: 10/4/2012.

STEWART, G.; COX, E.; DUC, M. LE; et al. Control of *Pteridium aquilinum*: meta-analysis of a multi-site study in the UK. **Annals of Botany**, v. 101, n. 7, p. 957–70, 2008.

TEMPEL, A. S. Field studies of the relationship between herbivore damage and tannin concentration in bracken (*Pteridium aquilinum* Kuhn). **Oecologia**, v. 51, n. 1, p. 97–106, 1981. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF00344659>>. Acesso em: 25/6/2015.

WANG, C. Y.; CHIU, C. W.; PAMUKCU, A. M.; BRYAN, G. T. Identification of carcinogenic tannin isolated from bracken fern (*Pteridium aquilinum*). **Journal of the National Cancer Institute**, v. 56, n. 1, p. 33–36, 1976. Disponível em: <<http://jnci.oxfordjournals.org/content/56/1/33.short>>. Acesso em: 25/6/2015.

WANG, H. H.; CHEN, B. J.; HSU, L. M.; et al. Allelopathic effects of bracken fern (*Pteridium aquilinum* L. Kuhn) in Taiwan. **Allelopathy Journal**, v. 27, p. 97–110, 2012.

ZENG, R. SEN. Allelopathy - the solution is indirect. **Journal of chemical ecology**, p. 515–516, 2014.

CAPÍTULO I

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E FITOTOXICIDADE DE METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS DE *Pteridium arachnoideum* (Kaulf.) Maxon.
(DENNSTAEDTIACEAE)**

RESUMO

Pteridium spp. são samambaias (monilófitas) distribuídas em todo mundo, que invadem áreas recentemente queimadas ou abandonadas, e que, portanto, são uma importante espécie problema do Cerrado e da Mata Atlântica no Brasil. Compreender os mecanismos que governam o sucesso de plantas com comportamento invasor tem se mostrado um dos maiores desafios das últimas décadas. Dentre as interações que podem influenciar este sucesso está a alelopatia. No entanto, poucas são as evidências apresentadas até então para este fenômeno, especialmente a partir do isolamento e identificação de substâncias do metabolismo secundário destas plantas. Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar o estudo fitoquímico de compostos com atividade fitotóxica em *Pteridium arachnoideum* pelo método de isolamento biodirigido. Este estudo fitoquímico levou ao isolamento de um composto majoritário presente em suas frondes verdes e serrapilheira desta planta, a proantocianidina selligueina A. Esta substância é produzida por *P. arachnoideum* em suas frondes verdes, não sofrendo alterações durante a senescência foliar e mantendo-se como metabólito secundário majoritário na serrapilheira. A selligueina A apresentou atividade fitotóxica sobre o alongamento de coleótilos de trigo, com atividade inibitória acima de 71%, e IC₅₀ de 0,69 mM. Esta é a primeira vez que este composto é descrito para *P. arachnoideum*, assim como para a família Dennstaedtiaceae. Da mesma forma, esta é a primeira vez que um composto isolado com atividade relacionada ao fenômeno da alelopatia é descrito para membros do gênero *Pteridium*. Estes resultados apresentam-se, então, como indicativos do possível papel da alelopatia na dominância dessas plantas nas áreas em que ocorrem.

Palavras-chave: Espécie problema, comportamento invasor, aleloquímico, isolamento biodirigido.

1. INTRODUÇÃO

Pteridium aquilinum (Kaulf.) Maxon. é uma espécie pertencente ao clado das monilófitas, família Dennstaediaceae, conhecida popularmente como samambaião, samambaia das taperas ou samambaia do campo (SILVA; MATOS, 2006; SCHWARTSBURD et al., 2014). No Brasil, sua distribuição se estende por todo território das regiões sul e sudeste, ocorrendo também em parte das regiões nordeste e norte, sendo considerada nativa de dois dos principais biomas brasileiros, o Cerrado e a Mata Atlântica (SCHWARTSBURD et al., 2014).

Plantas do gênero *Pteridium* são samambaias cosmopolitas heliófitas, difundidas mundialmente, sendo um dos táxons de planta mais abundantes do planeta, presente em todos os continentes, com exceção da Antártida (DER et al., 2009; GIL DA COSTA et al., 2012). Estas plantas representam um desafio para o manejo e conservação da biodiversidade ao redor do mundo, por se tornarem dominantes em áreas degradadas ou que sofrem impactos antrópicos (STEWART et al., 2008; SUAZO-ORTUÑO et al., 2015), capazes de provocar alterações ambientais significativas nas áreas em que se estabelecem (GRIFFITHS; FILAN, 2007; ADIE et al., 2011; DELUCA et al., 2012). No Brasil, *P. arachnoideum* é descrita como uma espécie pioneira agressiva de difícil manejo, invadindo áreas abandonadas ou recém-queimadas (MATOS; BELINATO, 2010; GIL DA COSTA et al., 2012), tendo se tornado uma importante espécie problema da Mata Atlântica e do Cerrado (SILVA; MATOS, 2006; MATOS; BELINATO, 2010; MIATTO et al., 2011).

Compreender os mecanismos que governam a dominância e sucesso de plantas invasoras têm sido um dos maiores desafios científicos das últimas décadas (CATFORD et al., 2009). Estes mecanismos compreendem processos evolutivos (FRIDLEY; SAX, 2014), como as interações mediadas por recursos e competição no sentido estrito (ORROCK et al., 2015); assim como interações como a alelopátia (GREER et al., 2014). Neste contexto, a alelopátia pode ser definida como qualquer efeito direto ou indireto produzido sobre o crescimento, sobrevivência ou reprodução de uma planta alvo por compostos do metabolismo secundário produzidos por uma planta doadora e liberados no ambiente (ZENG, 2014).

Metabólitos secundários com potencial alelopático são conhecidos como aleloquímicos, e seus efeitos sobre o ambiente ou atividade fitotóxica podem ocorrer por fitotoxicidade direta (KATO-NOGUCHI et al., 2013), interferência sobre a microbiota do solo (CIPOLLINI et al., 2012), sobre a dinâmica de ciclagem de nutrientes e sua disponibilidade (KRAUS et al., 2003), entre outras interferências (INDERJIT et al., 2011; CANHOTO et al., 2013). Neste cenário, o isolamento e identificação de compostos com atividades observadas

experimentalmente consistem em passos essenciais na confirmação do fenômeno da alelopatia (BLAIR et al., 2008; DUKE, 2015).

Muitos estudos sobre a fitoquímica de *Pteridium* spp. foram realizados devido ao interesse farmacêutico e toxicológico sobre as substâncias do seu metabolismo secundário. Entre os compostos bioativos identificados encontram-se glicosídeos cianogênicos, com atividade deterrente da alimentação e de interferência no desenvolvimento de insetos (ALONSO-AMELOT; OLIVEROS-BASTIDAS, 2005); taninos, com atividade carcinogênica (WANG et al., 1976; PAMUKCU; WANG; et al., 1980) e deterrente da alimentação de insetos (TEMPEL, 1981); flavonoides (CHEN et al., 2013a, 2013b), incluindo o composto carcinogênico quercetina (PAMUKCU; YALCINER; et al., 1980); pterosinas e pterosídeos com atividade carcinogênica (SAITO et al., 1975; HOEVEN, VAN DER et al., 1983; FLETCHER et al., 2010); assim como o sesquiterpeno ptaquilosídeo, responsável pelo efeito carcinogênico do consumo de *P. aquilinum* por animais (PRAKASH et al., 2006). No entanto, pouco se conhece sobre o papel destes compostos na ecologia da planta (WEIDENHAMER; CALLAWAY, 2010).

Justificativa

Plantas do gênero *Pteridium* produzem grande quantidade de metabólitos secundários com diversas atividades biológicas, ainda não totalmente compreendidas (GIL DA COSTA et al., 2012); tornam-se dominantes e espécies problema nas áreas em que ocorrem, e seus mecanismos de dominância não foram bem estabelecidos. A alelopatia poderia, então, ter um papel importante nesse fenômeno. Mas, apesar de alguns relatos sobre o possível papel da alelopatia na dominância de *Pteridium* spp. (MATOS; BELINATO, 2010; WANG et al., 2011), nenhum composto com atividade fitotóxica, ou outras atividades relacionadas à interação alelopática, foram isolados e individualmente identificados para *P. arachnoideum* ou qualquer outra espécie do gênero *Pteridium*.

Hipótese

Pteridium arachnoideum produz substâncias do metabolismo secundário com atividade fitotóxica, presentes em suas frondes verdes, serrapilheira e rizoma.

Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo o estudo fitoquímico de compostos com atividade fitotóxica presentes nas frondes verdes, rizoma e serrapilheira de *P. arachnoideum* pelo método de isolamento biodirigido.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Extração Inicial e Isolamento Biodirigido

2.1.1. Material Vegetal

O material vegetal consistiu de frondes verdes, serrapilheira e rizomas de *Pteridium arachnoideum* coletados na área de reserva de Cerrado da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos - SP (21°58'02.0" S 047°52'09.9" O), no final da estação seca. Uma exsicata foi depositada no herbário do Departamento de Botânica da UFSCar (Voucher n° HUFSCAR8797). Após triagem, o material foi lavado, as frondes verdes e serrapilheira foram secas em casa de vegetação à sombra (17 - 43 °C). Os rizomas foram secos em estufa de circulação forçada de ar a 40 °C até atingirem peso constante (190 h). Os materiais vegetais foram moídos em moinho industrial e o pó resultante foi transportado para a Universidade de Cádiz, Espanha (permissão de exportação CITES/FLORA IBAMA n° 12BR009485/DF) para ser usado para extração e estudo fitoquímico.

2.1.2. Equipamentos e Reagentes

Solventes e reagentes comerciais foram utilizados de acordo com a disponibilidade. Ressonância magnética nuclear (RMN) foram realizadas em espectrômetros Agilent 400 MHz, 500 MHz, e 600 MHz ou Bruker 400 MHz. Os deslocamentos químicos foram dados em ppm, referenciados para o sinal residual de ^1H (δ 4.78) do metanol deuterado (Metanol-d₄, equipamentos Agilent), ou usando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno (equipamento Bruker). Análise por cromatografia de camada delgada (CCD) foram realizadas utilizando placas Alugram Sil G UV254 W/UV254, eluídas com acetato de etila (AcOEt); e placas Alugram Sil G RP-18 W/UV254 (ambas Macherey-Nagel), eluídas com H₂O/metanol (MeOH) (5:2 v/v) ou H₂O/MeOH/Acetonitrila (ACN) (5:1:1 v/v), e reveladas por submersão em revelador *oleum* (ácido sulfúrico, água e ácido acético 1:4:20 v/v), seguido de aquecimento a 120 °C. Cromatografia clássica de bancada foi realizada utilizando sílica Lichroprep RP-18 (40–63 μm ; Merck), Discovery DSC-18 (50 μm ; SUPELCO, Sigma-Aldrich), e sílica gel 0,060-0,200, 60 Å (Acros Organics). Cromatografia *flash* foi realizada em aparelho

CombiFlash Rf utilizando coluna RediSep Rf Gold C18 de 15,5 g (ambos Teledyne Isco), com fluxo de 15 mL m⁻¹ a 25°C. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de índice de refração (CLAE-IR; Merck-Hitachi) foi realizada utilizando colunas LiChrospher RP-18 (10 µm, 250 x 10 mm; Merck) e Gemini C18 (5 µm, 250 x 4,60 mm; Phenomenex); com volumes de injeção de 150 µL; fluxo de eluição de 3 mL m⁻¹ e 1 mL m⁻¹, respectivamente; a 20°C. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) foi realizada em equipamento Waters Alliance 2695 acoplado a detector Waters 2995 PDA, utilizando coluna Luna 5 µm Phenyl-Hexyl (5 µm, 250 x 4,6 mm; Phenomenex), com volume de injeção de 15 µL e fluxo de eluição de 0,7 mL m⁻¹, a 25°C.

2.1.3. *Extração e Isolamento*

Cada material vegetal foi extraído utilizando 100 g de pó vegetal e 500 mL de hexano (Hex) em banho de ultrassom por 15 minutos, para retirada de ceras e gorduras. Após filtração à vácuo, o procedimento de extração foi repetido mais quatro vezes. Em seguida, o material foi submetido a cinco extrações com AcOEt e cinco extrações com MeOH, resultando em dois extratos para frondes verdes (AcOEt, 1,12 g; MeOH, 30,86 g), assim como para serrapilheira (AcOEt, 455,8 mg; MeOH, 4,80 g) e rizoma (AcOEt, 255,3 mg; MeOH, 6,78 g) (MIRANDA et al., 2015).

Os extratos AcOEt e MeOH de frondes verdes e serrapilheira exibiram composição química semelhante por análises de CCD e ¹H-RMN, com a presença de um composto majoritário em ambos extratos AcOEt. Não foi possível alcançar resolução apropriada para a separação cromatográfica dos extratos MeOH, utilizando diferentes fases estacionárias e eluentes, na presença ou ausência de ácido acético (0,01%), ácido fórmico (0,001%) ou ácido trifluoroacético (0,001%). Assim, o isolamento biodirigido e isolamento foi realizado com os extratos AcOEt de frondes verdes e serrapilheira (Figuras 1.1 e 1.2).

Os extratos AcOEt de frondes verdes e serrapilheira foram submetidos a cromatografia de fase reversa para remoção de clorofila, com eluição em gradiente de MeOH em água (água pura; H₂O/MeOH 5:1, 5:2, 5:3, 5:4 v/v; MeOH puro), seguido por diclorometano (DCM) puro (MIRANDA et al., 2015). Após análise por CCD, quatro frações foram obtidas para frondes verdes (GF-1 a GF-4) e para serrapilheira (L-1 a L-4).

Frações GF-2 e L-2 foram submetidas a cromatografia de fase normal em coluna de sílica gel eluída com um gradiente de acetona em hexano (Hex/Acetona 1:1, 5:3, 10:7; 5:4; acetona pura), seguido por MeOH puro, resultando em várias sub-frações: GF-2A a GF-2E e L-2A a L-2D.

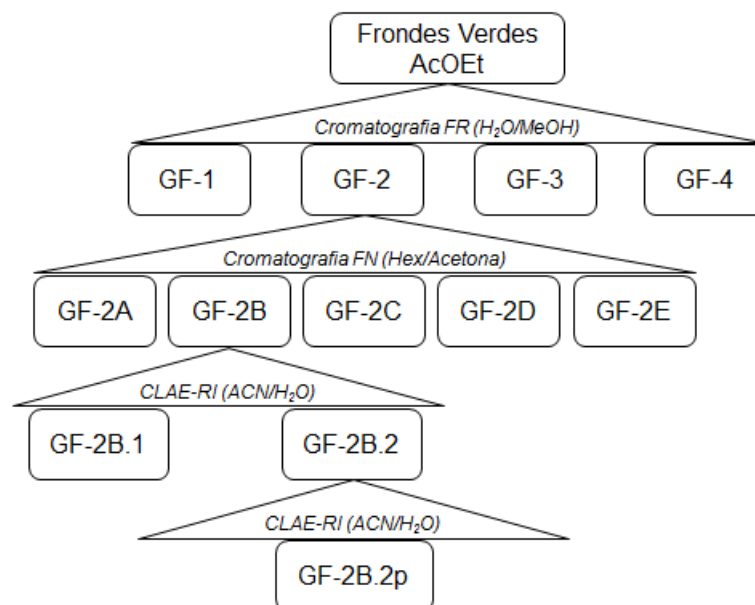


Figura 1.1. Processo de fracionamento cromatográfico do extrato AcOEt de frondes verdes de *P. arachnoideum*.

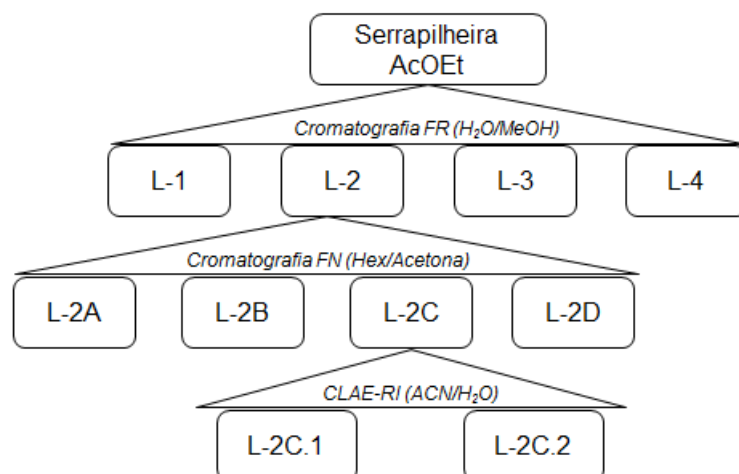


Figura 1.2. Processo de fracionamento cromatográfico do extrato AcOEt de serrapilheira de *P. arachnoideum*.

Sub-frações GF-2B e L-2C foram submetidas a CLAE-RI de fase reversa com coluna semi-preparativa e eluição isocrática com ACN/H₂O (20:7 v/v), resultando nas seguintes sub-frações: (GF-2B) GF-2B.1 e GF-2B.2; (L-2C) L-2C.1 e L-2C.2. A sub-fração GF-2B.2 foi purificada em CLAE-RI de fase reversa com coluna analítica e eluição isocrática com ACN/H₂O (1:5 v/v). As frações purificadas GF-2B.2p e L-2C.1 foram submetidas a análises de RMN (¹H, ¹³C, COSY-¹H-¹H, HMBC, HSQC e NOESY).

2.2. Bioensaios com Coleóptilos de Trigo

A atividade fitotóxica das frações obtidas foi testada utilizando bioensaios com fragmentos de coleóptilo estiolado de trigo. Sementes de trigo (*Triticum aestivum* L. v. Catervo) foram distribuídas em placas de Petri (20 mm de diâmetro), forradas com uma folha de papel de filtro e umedecidas com 5 mL de água destilada. Estas placas de Petri foram embrulhadas em papel alumínio e acondicionadas em estufa B.O.D. por 72 h a 25 ± 1 °C, no escuro. Sob luz verde de segurança, a porção apical dos coleóptilos estiolados (2 mm) foi cortada e descartada. Os 4 mm seguintes dos coleóptilos foram cortados e utilizados nos bioensaios (MIRANDA et al., 2015). As sementes de trigo foram doadas pelo Instituto de Pesquisa e Formação Agrária e Pesqueira da Espanha (IFAPA Centro Rancho de la Merced, Jerez de la Frontera – CA, Espanha). As frações testadas foram pré-solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídas em solução tampão de fosfato de potássio (250 mL de água destilada, 5 g de glicose, 0,2625 g de ácido cítrico e 0,725 g de fosfato de potássio di-básico; pH 5.6), para obtenção de soluções a 0,8; 0,4 e 0,2 mg mL⁻¹ com concentração constante de DMSO de 5 µL mL⁻¹. Para o bioensaio com selligueina A isolada, soluções a 1, 0,3, 0,1, 0,03 e 0,01 mM foram preparadas como descrito anteriormente (MIRANDA et al., 2015).

Dois controles foram realizados, um controle negativo com solução tampão e DMSO (5 µL mL⁻¹) e um controle positivo com o herbicida Logran Extra (terbutryn 59,4% + triasulfuron 0,6%; Syngenta Agro) solubilizado em solução tampão nas mesmas concentrações testadas para as frações ou composto isolado e DMSO (5 µL mL⁻¹). Os bioensaios foram preparados em triplicata para cada tratamento, adicionando-se 2 mL de cada solução e cinco fragmentos de coleóptilos em tubos de ensaio. Os tubos de ensaio foram tampados e mantidos em estufa B.O.D. a 25 ± 1 °C, no escuro e sob rotação constante (0,25 rpm) (MIRANDA et al., 2015). Após 24 h, os tubos de ensaio foram abertos e os coleóptilos foram fotografados e medidos utilizando o *software* Photomed 4.

2.3. Análises Estatísticas

Os dados dos bioensaios com coleóptilos de trigo foram avaliados pela sua inibição ou estímulo percentual quando comparado com o controle negativo (MIRANDA et al., 2015), de acordo com a equação (1):

$$\%_{\text{inibição/estímulo}} = \left[\frac{(C_r - \bar{C}_r) - (C_c - \bar{C}_c)}{C_r - \bar{C}_c} \right] \times 100 \quad (1)$$

Onde C_r corresponde ao comprimento de referência do coleóptilo (4mm); \bar{C}_t é a média do comprimento dos coleóptilos em cada tratamento; e \bar{C}_c é a média do comprimento dos coleóptilos do controle negativo.

Os resultados foram submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk, $\alpha = 0,05$) e homocedasticidade (Levene, $\alpha = 0,05$). Tendo sido verificado a não normalidade dos dados, estes foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Welch para comparação entre médias ($\alpha = 0,05$).

A atividade inibitória média (IC_{50}) foi calculada para os resultados obtidos com selligueina A isolada. Para tanto, os dados de fitotoxicidade foram ajustados para uma curva sigmoidal de dose-resposta (escala logarítmica) definida pela equação (2):

$$Y = Y_{min} + \frac{Y_{max} - Y_{min}}{1 + 10^{[(\log IC_{50} - X) \times h]}} \quad (2)$$

Onde X indica o logaritmo da concentração; Y indica a resposta (fitotoxicidade); Y_{max} e Y_{min} são os valores máximo e mínimo da resposta, respectivamente; e IC_{50} indica o valor de X que se encontra no meio de Y_{max} e Y_{min} na curva (ANESE et al., 2015). O ajuste dos dados ao modelo logístico de três parâmetros (3PL) para o cálculo do IC_{50} é descrito pelo valor do coeficiente de determinação (R^2). Os cálculos de ajuste da curva, IC_{50} e do R^2 foram realizados utilizando o *software* GraphPad Prism 4.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Isolamento Biodirigido

Análises de CCD e 1H -RMN mostraram que ambos os extratos brutos AcOEt de frondes verdes e serrapilheira apresentavam como composto majoritário um polifenol, que não se encontrava presente no extrato AcOEt de rizoma (Figura 1.3). Devido à presença desse composto majoritário nos extratos AcOEt de frondes verdes e serrapilheira, e dificuldades técnicas para desenvolver a separação cromatográfica dos compostos dos extratos metanólicos, o isolamento biodirigido foi realizado utilizando-se os extratos AcOEt de frondes verdes e serrapilheira.

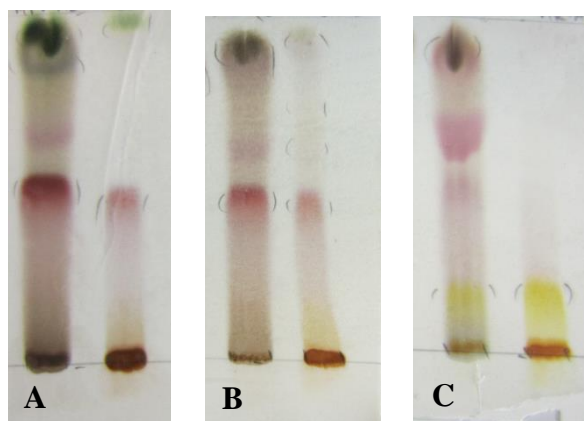


Figura 1.3. Placas de CCD dos extratos AcOEt (à direita de cada placa) e MeOH (à esquerda de cada placa) dos extratos de frondes verdes (A), serrapilheira (B) e rizoma (C) de *P. arachnoideum*. Placas eluídas com H₂O/MeOH (5:2 v/v).

Após cromatografia de fase reversa de uma alíquota do extrato AcOEt de frondes verdes (810 mg), quatro frações foram obtidas (GF-1 - GF-4). Essas frações foram submetidas ao bioensaio com coleóptilos de trigo. Os resultados destes bioensaios foram utilizados como indicadores de atividade fitotóxica, permitindo o planejamento dos procedimentos cromatográficos adotados. Além dos dados de atividade fornecidos por esses bioensaios, fatores como rendimento e composição química das frações de acordo com análises de CCD e ¹H-RMN foram levados em consideração nesse planejamento.

As frações GF-1 a GF-3 apresentaram atividade inibitória significativa sobre o alongamento dos coleóptilos de trigo (Figura 1.4 A). A fração GF-1 (9,26 mg) apresentou a maior atividade inibitória, variando entre 76% e 39%, da maior para a menor concentração. As frações GF-2 e GF-3 também foram ativas (253,3 mg and 56,4 mg, respectivamente), variando entre 52% e 18% para a fração GF-2 e de 53% a 26% para a fração GF-3. De acordo com análises por CCD e ¹H-RMN, estas frações apresentaram como composto majoritário a mesma substância, que estava mais purificada na fração GF-1. Nas frações subsequentes havia maior presença de compostos interferentes (Figura 1.5 A). Assim, o estudo fitoquímico e isolamento biodirigido foi continuado com a fração GF-2, de maior massa que GF-1 e mais purificada que GF-3.

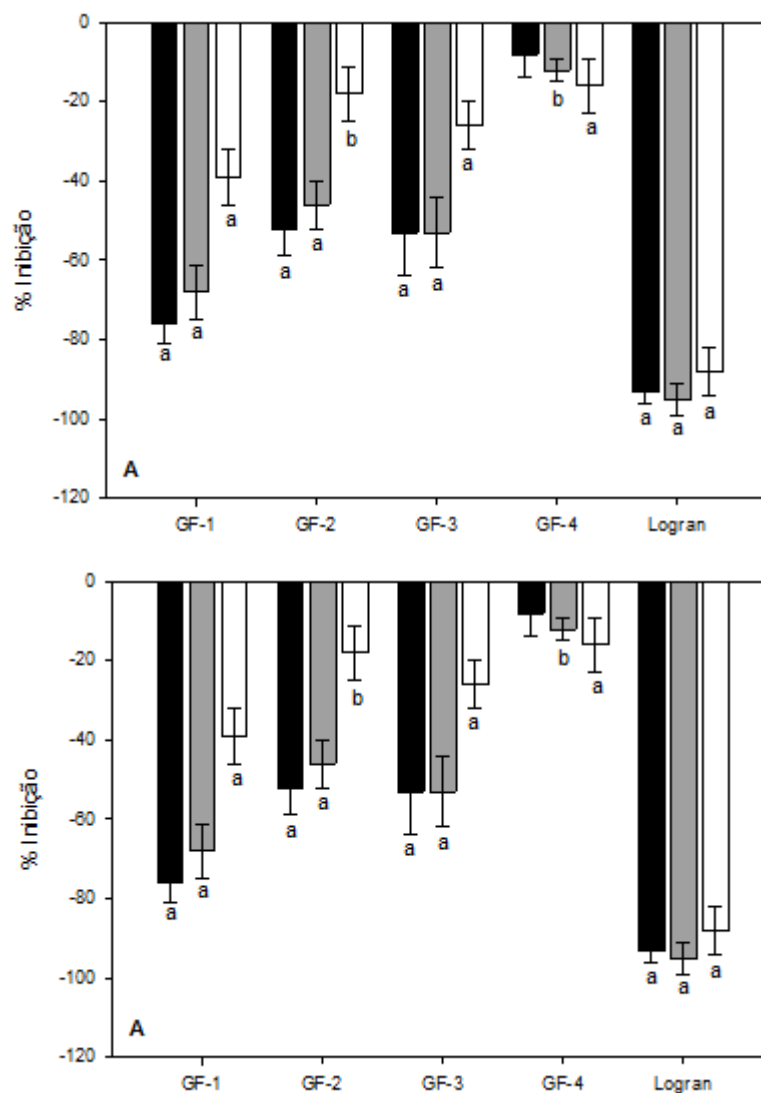


Figura 1.4. Inibição do alongamento de fragmentos de coleótilos de trigo (*T. aestivum*) na presença de frações dos extratos AcOEt de frondes verdes de *P. arachnoideum*, e do herbicida Logran em diferentes concentrações. Colunas pretas, 0,8 mg mL⁻¹; colunas cinzas escuro, 0,4 mg mL⁻¹; colunas cinzas claro, 0,2 mg mL⁻¹. Barras verticais indicam desvio padrão. Valores marcados com a letra “a” ($p < 0,01$) e “b” ($0,01 < p < 0,05$) são significativamente diferentes do controle negativo, de acordo com o teste de Welch.

Após cromatografia de coluna em fase normal, cinco sub-frações foram obtidas a partir do fracionamento de GF-2 (GF-2A - GF-2E). As sub-frações GF-2A, GF-2B e GF-2C apresentaram atividade inibitória significativamente diferente do controle negativo, porém, a sub-fração mais ativa foi GF-2A (17,3 mg), com atividade inibitória entre 76% e 38%, da maior para a menor concentração; seguida pela sub-fração GF-2B (69,7 mg), com atividade inibitória variando de 43% a 15% (Figura 1.4 B). De acordo com análises de ¹H-RMN, as sub-frações GF-2A e GF-2B apresentavam o mesmo composto majoritário, presente de forma mais purificada na sub-fração GF-2A (Figura 1.5 B). Novamente, frente ao pequeno rendimento da

sub-fração GF-2A, o isolamento deste composto majoritário por CLAE –IR foi realizado com a sub-fração GF-2B, resultando na sub-fração GF-2B.2p (11,3 mg), um composto purificado das frondes verdes.

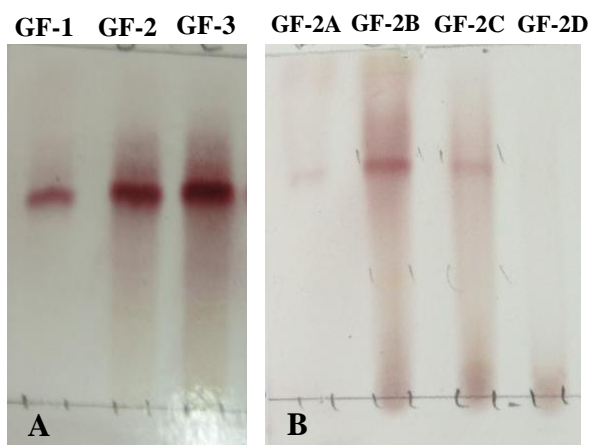


Figura 1.5. Placas de CCD das frações GF-1 – GF-2 (A) e das sub-frações GF-2A – GF-2D do extrato AcOEt de frondes verdes de *P. arachnoideum*. Placas eluídas com H₂O/MeOH (5:2 v/v).

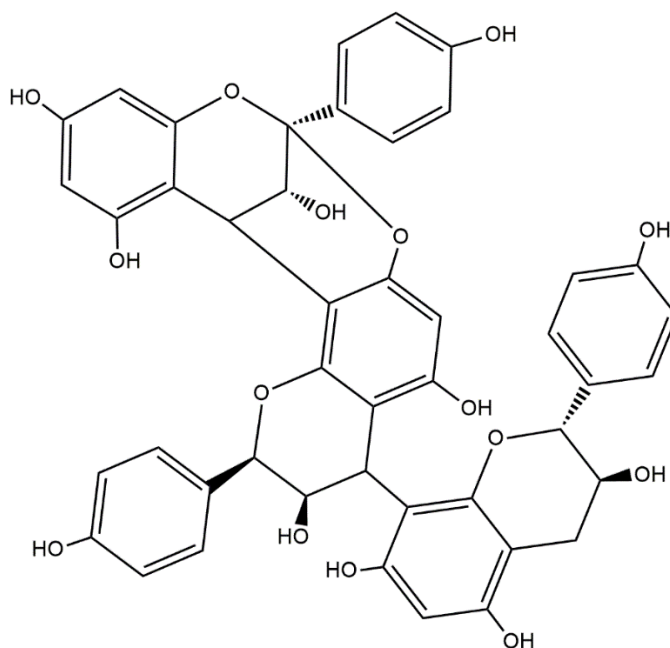


Figura 1.6. Selliguetina A, isolada das frondes verdes e serrapilheira de *P. arachnoideum*.

Os dados das análises de RMN comparados com os reportados na literatura levaram à identificação da sub-fração GF-2B.2p como a proantocianidina selliguetina A (BAEK et al., 1993; FU et al., 2013) (Anexos A - E, Figura 1.6).

Após o isolamento e identificação de selligueina A no extrato de frondes verdes, o estudo fitoquímico do extrato de serrapilheira foi realizado a fim de determinar se o composto polifenólico majoritário deste extrato corresponderia àquele encontrado nas frondes verdes, ou se seria um derivativo deste, resultante do metabolismo de senescência foliar.

Após cromatografia de fase reversa, foram obtidas quatro frações para o extrato AcOEt de serrapilheira (L-1 - L-4). As frações L-1 (9,9 mg) e L-2 (82,1 mg) apresentavam em sua constituição química a presença do composto majoritário presente no extrato AcOEt, com maior presença de substâncias interferentes nas frações subsequentes. Atividade inibitória foi observada para a fração L-1, variando entre 84% e 53%, enquanto a fração L-2 apresentou atividade variando entre 64% e 23% (Figura 1.7). A fração L-3 (13,9 mg) também apresentou forte atividade inibitória, comparável à do herbicida utilizado como controle positivo. Esta atividade variou entre 90% e 60% (Figura 1.7), mas a fração L-3 não apresentava a presença do composto majoritário presente nas duas outras frações. Para a fração L-3, análises de $^1\text{H-RMN}$ apresentaram a presença de flavonoides glicosilados como compostos majoritários (Anexo F).

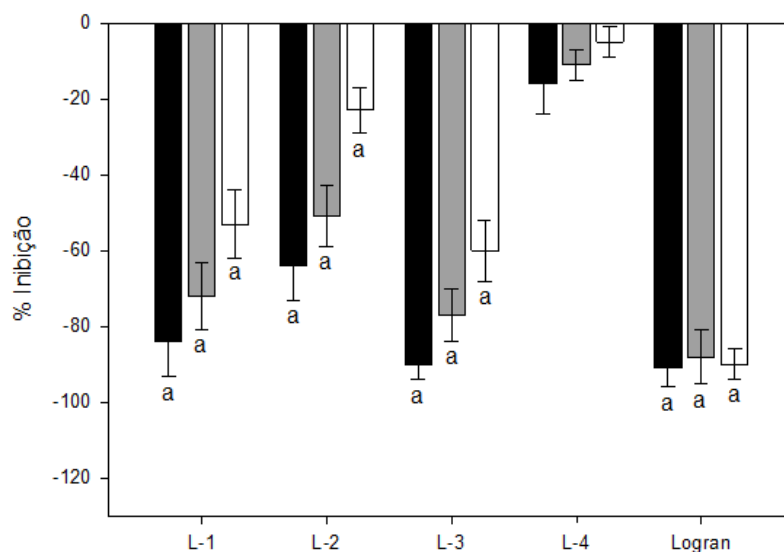


Figura 1.7. Inibição do alongamento de fragmentos de coleótilos de trigo (*T. aestivum*) na presença de frações dos extratos AcOEt de serrapilheira de *P. arachnoideum*, e do herbicida Logran em diferentes concentrações. Colunas pretas, 0,8 mg mL⁻¹; colunas cinzas escuro, 0,4 mg mL⁻¹; colunas cinzas claro, 0,2 mg mL⁻¹. Barras verticais indicam desvio padrão. Valores marcados com a letra “a” ($p < 0,01$) e “b” ($0,01 < p < 0,05$) são significativamente diferentes do controle negativo, de acordo com o teste de Welch.

Frente ao pequeno rendimento da fração L-1, o isolamento do polifenol majoritário foi realizado utilizando a fração L-2. Após cromatografia clássica de fase normal e isolamento por CLAE-IR, a fração L-2C.1 (6,1 mg) foi isolada e identificada como sendo

selligueina A por análises de RMN (Anexo G), o mesmo composto presente no extrato AcOEt de frondes verdes como composto majoritário.

3.1.1 A Proantocianidina Selligueina A

Proantocianidinas são taninos condensados, oligopolímeros de flavonoides de três anéis com ligações C-C, caracterizados pelos monômeros catequina e epi-catequina e dois radicais hidroxilas ligadas ao anel B (EBRAHIMNEJAD et al., 2014). Taninos são considerados o mais importante grupo de substâncias bioquímicas produzidas por plantas vasculares, representando uma parte significativa da biomassa de carbono terrestre. Por serem substâncias custosas do ponto de vista energético, acredita-se que tenham um papel importante no funcionamento e evolução das plantas produtoras, com importante atividade relacionada com a proteção contra radiação ultravioleta (ALONSO-AMELOT et al., 2004, 2007). Várias atividades biológicas foram descritas para proantocianidinas ou materiais ricos nestes compostos, como atividade antioxidante, anti-inflamatória e antibiótica (SARG et al., 2011; WANG et al., 2011; NAKASHIMA et al., 2012).

Do ponto de vista ecológico, para os taninos condensados foram observadas atividade defensiva contra herbivoria (MOCTEZUMA et al., 2014), influência sobre a decomposição de serrapilheira (HÄTTENSCHWILER; JØRGENSEN, 2010; COQ et al., 2010), sobre a ciclagem de nutrientes e atividade microbiana do solo (SMOLANDER et al., 2011), dentre outras atividades.

A selligueina A foi descrita pela primeira vez nos rizomas de *Selliguea feei* Bory (Polypodiaceae) (BAEK et al., 1993), e também está presente em *Polypodium feei* (Bory) Mett., outra espécie da família Polypodiaceae (SUBARNAS; WAGNER, 2000). A selligueina A é descrita aqui pela primeira vez para *Pteridium arachnoideum*, assim como para a família Dennstaedtiaceae, ocorrendo em suas frondes verdes e serrapilheira, mas não no seu rizoma.

3.2 Atividade Fitotóxica de Selligueina A

A maior parte dos taninos condensados produzidos por *Pteridium* spp. são do tipo condensado, proantocianidinas, prodelfinas ou seus derivados. Apesar de não serem considerados como as principais toxinas produzidas por essas plantas, já foi observada atividade anti-herbivoria (ALONSO-AMELOT et al., 2001; GIL DA COSTA et al., 2012).

Foi observada correlação entre a concentração de proantocianidinas e a altitude em que plantas do gênero *Pteridium* cresciam na região dos Andes (ALONSO-AMELOT et al.,

2004). Esta correlação pode estar associada com a resposta adaptativa à maior incidência de radiação UV-B em altitudes mais elevadas. Para selligueina A já foram descritas atividades analgésica e anti-inflamatória, a partir do seu isolamento dos rizomas de *Polypodium feei* (SUBARNAS; WAGNER, 2000).

No entanto, até agora não havia registro de possíveis atividades com relevância ecológica para essa substância. A selligueina A está presente nas frondes verdes e serrapilheira de *P. arachnoideum*, sem sofrer modificações durante o processo de senescência foliar. Por ser uma substância cara do ponto de vista de recursos e energético, sua persistência na serrapilheira indica uma possível importância ecológica. Assim, a atividade fitotóxica de selligueina A foi testada no bioensaio com coleótilos de trigo.

Foi observada atividade inibitória do alongamento de coleótilos de trigo em todas as concentrações testadas de selligueina A, ainda que uma redução drástica na atividade tenha sido observada entre a maior concentração e as subseqüentes (Figura 1.8). Na maior concentração, esta atividade inibitória superou os 71%, com $IC_{50} = 0,69$ mM ($R^2 = 0,94$). Esta atividade fitotóxica indica que, além da função de proteção contra radiação ultra-violeta, as proantocianidinas e outros taninos condensados produzidos por *P. arachnoideum* poderiam também apresentar potencial alelopático.

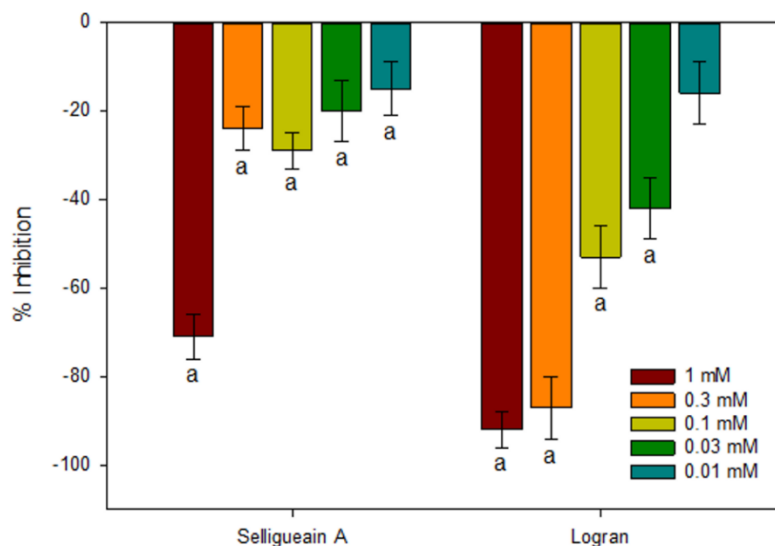


Figura 1.8. Inibição do alongamento de fragmentos de coleótilo de trigo (*T. aestivum*) na presença de selligueina A isolada de *P. arachnoideum*, e do herbicida em diferentes concentrações. Barras verticais indicam desvio padrão. Valores marcados com a letra “a” ($p < 0,01$) e “b” ($0,01 < p < 0,05$) são significativamente diferentes do controle negativo, de acordo com o teste de Welch.

4. CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico por isolamento biodirigido de compostos com atividade fitotóxica presentes nos diferentes órgãos e serrapilheira de *Pteridium arachnoideum* levou ao isolamento de um composto majoritário presente em suas frondes verdes e serrapilheira, a proantocianidina selligueina A. Esta é a primeira vez que este composto é descrito para *P. arachnoideum*, assim como para a família Dennstaediaceae. Da mesma forma, esta é a primeira vez que um composto isolado com atividade relacionada ao fenômeno da alelopatia é descrito para membros do gênero *Pteridium*. A selligueina A é produzida por *P. arachnoideum* em suas frondes verdes, não sofrendo alterações durante a senescência foliar e mantendo-se como metabólito secundário majoritário na serrapilheira. Estes resultados apresentam-se, então, como indicativos do possível papel da alelopatia na dominância dessas plantas nas áreas em que ocorrem.

REFERÊNCIAS

- ADIE, H.; RICHERT, S.; KIRKMAN, K. P.; LAWES, M. J. The heat is on: frequent high intensity fire in bracken (*Pteridium aquilinum*) drives mortality of the sprouting tree *Protea caffra* in temperate grasslands. **Plant Ecology**, v. 212, n. 12, p. 2013–2022, 2011. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.1007/s11258-011-9945-8>>. Acesso em: 16/3/2012.
- ALONSO-AMELOT, M. E.; OLIVEROS, A.; CALCAGNO, M. P.; ARELLANO, E. Bracken adaptation mechanisms and xenobiotic chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 3, p. 549–553, 2001.
- ALONSO-AMELOT, M. E.; OLIVEROS, A.; CALCAGNO-PISARELLI, M. P. Phenolics and condensed tannins in relation to altitude in neotropical *Pteridium* spp. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n. 11, p. 969–981, 2004. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0305197804000924>>. Acesso em: 18/10/2013.
- ALONSO-AMELOT, M. E.; OLIVEROS-BASTIDAS, A. Kinetics of the natural evolution of hydrogen cyanide in plants in neotropical *Pteridium arachnoideum* and its ecological significance. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, n. 2, p. 315–331, 2005. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10886-005-1343-z>>. Acesso em: 15/5/2014.
- ALONSO-AMELOT, M. E.; OLIVEROS-BASTIDAS, A.; CALCAGNO-PISARELLI, M. P. Phenolics and condensed tannins of high altitude *Pteridium arachnoideum* in relation to sunlight exposure, elevation, and rain regime. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 1, p. 1–10, 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0305197806001839>>. Acesso em: 21/5/2014.

- ANESE, S.; JATOBÁ, L. J.; GRISI, P. U.; et al. Bioherbicidal activity of drimane sesquiterpenes from *Drimys brasiliensis* Miers roots. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 28–35, 2015.
- BAEK, N.-I.; CHUNG, M.-S.; SHAMON, L.; et al. Selliguaeain A, a novel highly sweet proanthocyanidin from de rhizomes of *Selliguea feei*. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 9, p. 1532–1538, 1993.
- BLAIR, A. C.; WESTON, L. A.; NISSEN, S. J.; BRUNK, G. R.; HUFBAUER, R. A. 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, 2008. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.1007/s10530-008-9250-1>>. Acesso em: 16/3/2012.
- CANHOTO, C.; CALAPEZ, R.; GONÇALVES, A. L.; MOREIRA-SANTOS, M. Effects of *Eucalyptus* leachates and oxygen on leaf-litter processing by fungi and stream invertebrates. **Freshwater Science**, v. 32, n. 2, p. 411–424, 2013. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.1899/12-062.1>>. Acesso em: 17/10/2013.
- CATFORD, J. A.; JANSSON, R.; NILSSON, C. Reducing redundancy in invasion ecology by integrating hypotheses into a single theoretical framework. **Diversity and Distributions**, v. 15, n. 1, p. 22–40, 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1472-4642.2008.00521.x>>. Acesso em: 16/3/2012.
- CHEN, N.-D.; CHEN, N.-F.; CHEN, C.-W.; ZHANG, L. A novel bihomoflavanonol with an unprecedented skeleton from *Pteridium aquilinum*. **Chinese Herbal Medicines**, v. 5, n. 2, p. 96–100, 2013a.
- CHEN, N.-D.; CHEN, N.-F.; CHEN, C.-W.; ZHANG, L. Separation and structure elucidation of a new homoflavanol derivative from *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. **Natural Product Research**, 2013b.
- CIPOLLINI, D.; RIGSBY, C. M.; BARTO, E. K. Microbes as targets and mediators of allelopathy in plants. **Journal of Chemical Ecology**, 2012.
- COQ, S.; SOUQUET, J.-M.; MEUDEEC, E.; CHEYNIER, V.; HÄTTENSCHWILER, S. Interspecific variation in leaf litter tannins drives decomposition in a tropical rain forest of French Guiana. **Ecology**, v. 91, n. 7, p. 2080–2091, 2010.
- DELUCA, T. H.; ZEWDIE, S. A.; ZACKRISSON, O.; HEALEY, J. R.; JONES, D. L. Bracken fern (*Pteridium aquilinum* L. kuhn) promotes an open nitrogen cycle in heathland soils. **Plant and Soil**, v. 367, n. 1-2, p. 521–534, 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11104-012-1484-0>>. Acesso em: 18/10/2013.
- DER, J. P.; THOMSON, J. A.; STRATFORD, J. K.; WOLF, P. G. Global chloroplast phylogeny and biogeography of bracken (*Pteridium*; Dennstaedtiaceae). **American journal of botany**, v. 96, n. 5, p. 1041–1049, 2009.
- DUKE, S. O. Proving allelopathy in crop–weed interactions. **Weed Science**, v. 63, n. sp1, p. 121–132, 2015.

EBRAHIMNEJAD, H.; BURKHOLZ, T.; JACOB, C. Flavonols and proanthocyanidins. In: JACOB, C.; KIRSCH, G.; SLUSARENKO, A.; WINYARD, P. G.; BURKHOLZ, T. (Eds.); **Recent Advances in Redox Active Plant and Microbial Products**. p. 211–232, 2014. Dordrecht: Springer Netherlands.

FLETCHER, M. T.; HAYES, P. Y.; SOMERVILLE, M. J.; VOSS, J. J. Ptesculentoside, a novel norsesquiterpene glucoside from the Australian bracken fern *Pteridium esculentum*. **Tetrahedron Letters**, v. 51, n. 15, p. 1997–1999, 2010.

FRIDLEY, J. D.; SAX, D. F. The imbalance of nature: revisiting a Darwinian framework for invasion biology. **Global Ecology and Biogeography**, v. 23, n. 11, p. 1157–1166, 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/geb.12221>>. Acesso em: 14/5/2015.

FU, C.; WANG, H.; NG, W. L.; SONG, L.; HUANG, D. Antioxidant activity and proanthocyanidin profile of *Selliguea feei* rhizomes. **Molecules**, v. 18, n. 4, p. 4282–4292, 2013.

GIL DA COSTA, R. M.; BASTOS, M. M. S. M.; OLIVEIRA, P. A.; LOPES, C. Bracken-associated human and animal health hazards: Chemical, biological and pathological evidence. **Journal of Hazardous Materials**, v. 203-204, p. 1–12, 2012. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030438941101538X>>. Acesso em: 8/5/2012.

GREER, M. J.; WILSON, G. W. T.; HICKMAN, K. R.; WILSON, S. M. Experimental evidence that invasive grasses use allelopathic biochemicals as a potential mechanism for invasion: chemical warfare in nature. **Plant and Soil**, v. 385, n. 1-2, p. 165–179, 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11104-014-2209-3>>. Acesso em: 26/6/2015.

GRIFFITHS, R. P.; FILAN, T. Effects of bracken fern invasions on harvested site soils in Pacific Northwest (USA) Coniferous Forests. **Northwest Science**, v. 81, n. 3, p. 191–198, 2007.

HÄTTENSCHWILER, S.; JØRGENSEN, H. B. Carbon quality rather than stoichiometry controls litter decomposition in a tropical rain forest. **Journal of Ecology**, v. 98, n. 4, p. 754–763, 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2745.2010.01671.x>>. Acesso em: 26/6/2015.

HOEVEN, J. C. M. VAN DER; LAGERWEIJ, W. J.; POSTHUMUS, M. A.; VELDHUIZEN, A. VAN; HOLTERMAN, H. A. J. Aquilide A, a new mutagenic compound isolated from bracken fern (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn). **Carcinogenesis**, v. 4, n. 12, p. 1587–1590, 1983.

INDERJIT; EVANS, H.; CROCOLL, C.; et al. Volatile chemicals from leaf litter are associated with invasiveness of a neotropical weed in Asia. **Ecology**, v. 92, n. 2, p. 316–24, 2011.

KATO-NOGUCHI, H.; SAITO, Y.; OHNO, O.; SUENAGA, K. Allelopathy is involved in the formation of pure colonies of the fern *Gleichenia japonica*. **Journal of Plant Physiology**, v. 170, p. 577–582, 2013.

KRAUS, T. E. C.; DAHLGREN, R. A.; ZASOSKI, R. J. Tannins in nutrient dynamics of forest ecosystems - a review. **Plant and Soil**, v. 256, n. 1, p. 41–66, 2003.

MATOS, D. M. D. S.; BELINATO, T. A. Interference of *Pteridium arachnoideum* (Kaulf.) Maxon. (Dennstaedtiaceae) on the establishment of rainforest trees. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 2, p. 311–316, 2010.

MIATTO, R. C.; SILVA, I. A.; SILVA-MATOS, D. M.; MARRS, R. H. Woody vegetation structure of Brazilian Cerrado invaded by *Pteridium arachnoideum* (Kaulf.) Maxon (Dennstaedtiaceae). **Flora**, v. 206, n. 8, p. 757–762, 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0367253011000399>>. Acesso em: 3/3/2012.

MIRANDA, M. A. F. M.; VARELA, R. M.; TORRES, A.; et al. Phytotoxins from *Tithonia diversifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 5, p. 1083–1092, 2015.

MOCTEZUMA, C.; HAMMERBACHER, A.; HEIL, M.; et al. Specific polyphenols and tannins are associated with defense against insect herbivores in the tropical oak *Quercus oleoides*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 40, n. 5, p. 458–467, 2014.

NAKASHIMA, S.; ODA, C.; MASUDA, S.; TAGASHIRA, M.; KANDA, T. Isolation and structure elucidation of tetrameric procyanidins from unripe apples (*Malus pumila* cv. Fuji) by NMR spectroscopy. **Phytochemistry**, v. 83, p. 144–52, 2012.

ORROCK, J. L.; DUTRA, H. P.; MARQUIS, R. J.; BARBER, N. Apparent competition and native consumers exacerbate the strong competitive effect of an exotic plant species. **Ecology**, v. 96, n. 4, p. 1052–1061, 2015. Disponível em: <<http://www.esajournals.org/doi/10.1890/14-0732.1>>. Acesso em: 17/4/2015.

PAMUKCU, A. M.; WANG, C. Y.; HATCHER, J.; BRYAN, G. T. Carcinogenicity of tannin and tannin-free extracts of bracken fern (*Pteridium aquilinum*) in rats. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 65, n. 1, p. 131–136, 1980.

PAMUKCU, A. M.; YALCINER, S.; HATCHER, J. F.; BRYAN, G. T. Quercetin, a rat intestinal and bladder carcinogen present in bracken fern (*Pteridium aquilinum*). **Cancer Research**, v. 40, n. 10, p. 3468–3472, 1980.

PRAKASH, A. S.; PEREIRA, T. N.; SMITH, B. L.; SHAW, G.; SEAWRIGHT, A. A. Mechanism of bracken fern carcinogenesis: Evidence for H-ras activation via initial adenine alkylation by ptaquiloside. **Natural Toxins**, v. 4, n. 5, p. 221–227, 2006. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/%28SICI%29%281996%294%3A5%3C221%3A%3AAID-NT4%3E3.0.CO%3B2-Q>>. Acesso em: 25/6/2015.

SAITO, M.; UMEDA, M.; ENOMOTO, M.; et al. Cytotoxicity and carcinogenicity of pterosins and pterosides, 1-indanone derivatives from bracken (*Pteridium aquilinum*). **Experientia**, v. 31, n. 7, p. 829–831, 1975. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF01938490>>. Acesso em: 25/6/2015.

SARG, T. M.; ABBAS, F. A.; EL-SAYED, Z. I.; MUSTAFA, A. M. Two new polyphenolic compounds from *Ficus retusa* L. “variegata” and the biological activity of the different plant extracts. **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy**, v. 3, n. 7, p. 89–100, 2011.

SCHWARTSBURD, P. B.; MORAES, P. L. R. DE; LOPES-MATTOS, K. L. B. Recognition of two morpho-types in eastern South American brackens (*Pteridium*-Dennstaedtiaceae-Polypodiopsida). **Phytotaxa**, v. 170, n. 2, p. 103–117, 2014.

SILVA, U. S. R.; MATOS, D. M. S. The invasion of *Pteridium aquilinum* and the impoverishment of the seed bank in fire prone areas of Brazilian Atlantic Forest. **Biodiversity and Conservation**, v. 15, n. 9, p. 3035–3043, 2006. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.1007/s10531-005-4877-z>>. Acesso em: 10/4/2012.

SMOLANDER, A.; KANERVA, S.; ADAMCZYK, B.; KITUNEN, V. Nitrogen transformations in boreal forest soils - does composition of plant secondary compounds give any explanations? **Plant and Soil**, v. 350, n. 1-2, p. 1–26, 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11104-011-0895-7>>. Acesso em: 5/5/2015.

STEWART, G.; COX, E.; DUC, M. LE; et al. Control of *Pteridium aquilinum*: meta-analysis of a multi-site study in the UK. **Annals of botany**, v. 101, n. 7, p. 957–70, 2008.

SUAZO-ORTUÑO, I.; LOPEZ-TOLEDO, L.; ALVARADO-DÍAZ, J.; MARTÍNEZ-RAMOS, M. Land-use change dynamics , soil type and species forming mono-dominant patches: the case of *Pteridium aquilinum* in a neotropical rain forest region. **Biotropica**, v. 47, n. 1, p. 18–26, 2015.

SUBARNAS, A.; WAGNER, H. Analgesic and anti-inflammatory activity of the proanthocyanidin shellegueain A from *Polypodium feei* METT. **Phytomedicine**, v. 7, n. 5, p. 401–5, 2000.

TEMPEL, A. S. Field studies of the relationship between herbivore damage and tannin concentration in bracken (*Pteridium aquilinum* Kuhn). **Oecologia**, v. 51, n. 1, p. 97–106, 1981. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF00344659>>. Acesso em: 25/6/2015.

WANG, C. Y.; CHIU, C. W.; PAMUKCU, A. M.; BRYAN, G. T. Identification of carcinogenic tannin isolated from bracken fern (*Pteridium aquilinum*). **Journal of the National Cancer Institute**, v. 56, n. 1, p. 33–36, 1976. Disponível em: <<http://jnci.oxfordjournals.org/content/56/1/33.short>>. Acesso em: 25/6/2015.

WANG, H. H.; CHEN, B. J.; HSU, L. M.; et al. Allelopathic effects of bracken fern (*Pteridium aquilinum* L. Kuhn) in Taiwan. **Allelopathy Journal**, v. 27, p. 97–110, 2012.

WEIDENHAMER, J. D.; CALLAWAY, R. M. Direct and indirect effects of invasive plants on soil chemistry and ecosystem function. **Journal of chemical ecology**, v. 36, n. 1, p. 59–69, 2010. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/3714770652285257/>>. Acesso em: 4/3/2012.

ZENG, R. SEN. Allelopathy - the solution is indirect. **Journal of chemical ecology**, p. 515–516, 2014.

CAPITULO II

**POTENCIAL ALELOPÁTICO DE POLIFENÓIS DA SERRAPILHEIRA DE
Pteridium arachnoideum (Kaulf.) Maxon. (DENNSTAEDTIACEAE)**

RESUMO

Pteridium arachnoideum é descrita como uma espécie pioneira agressiva, de difícil manejo, que invade áreas abandonadas ou recentemente queimadas, produzindo grande quantidade de biomassa e serrapilheira. *Pteridium* spp. produzem grande variedade de compostos com atividades biológicas. Apesar de não serem consideradas como as suas principais toxinas, os polifenóis são majoritários. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o potencial alelopático de polifenóis da serrapilheira de *P. arachnoideum* sobre o crescimento inicial de quatro espécies alvo: cebola (*Allium cepa*), gergelim (*Sesamum indicum*), capim rabo-de-raposa (*Setaria geniculata*) e capim braquiária (*Urochloa decumbens*). A serrapilheira foi coletada na área de reserva de Cerrado da UFSCar e, após extração e cromatografia, procedeu-se a quantificação de polifenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu. A fração PaS-1 foi apontada como a mais enriquecida em polifenóis (EAG = $169 \pm 1,46 \text{ mg g}^{-1}$), sendo então empregada na realização de bioensaios de crescimento inicial. Esta fração exerceu atividade inibitória sobre o desenvolvimento inicial das espécies alvo testadas. Para a parte aérea, a maior inibição observada (47,83%) foi sobre capim rabo-de-raposa, na maior concentração do extrato ($0,8 \text{ mg mL}^{-1}$). Com relação ao crescimento da raiz, todas as espécies alvo foram afetadas, com a maior inibição (53,20%) observada em cebola, na concentração de $0,8 \text{ mg mL}^{-1}$. A fração PaS-1 também apresentou atividade inibitória sobre as células do metaxilema de gergelim, o conteúdo de clorofila de gergelim e de capim rabo-de-raposa. O potencial alelopático do principal composto fenólico presente na fração PaS-1, selligueina A, também foi testado sobre o crescimento inicial de gergelim. Houve inibição do comprimento final do caule e da raiz de gergelim em todas as concentrações testadas (1 mM – 0,01 mM), com inibição de crescimento do caule e raiz de 52,21% e 46,17%, respectivamente, na maior concentração. Plântulas de gergelim crescidas na presença deste composto apresentaram células do metaxilema menores do que o as do controle nas concentrações de 0,3 mM e 1 mM, com inibição de 50,82% na maior concentração e IC_{50} de 0,98 mM. Não houve atividade de selligueina A sobre o conteúdo de clorofila dessas plântulas. Esta é a primeira vez que o potencial alelopático de uma substância isolada de uma espécie do gênero *Pteridium* é verificado, providenciando novas evidências sobre o papel da alelopatia na dominância dessas plantas.

Palavras-chave: Alelopatia, samambaião, crescimento inicial, tanino condensado.

1. INTRODUÇÃO

Pteridium aquilinum (Kaulf.) Maxon. é uma espécie pertencente ao clado das monilófitas, família Dennstaediaceae, conhecida popularmente como samambaião. É parte de um complexo de espécies difundido mundialmente, presente em todos os continentes, com exceção da Antártida (DER et al., 2009; GIL DA COSTA et al., 2012). É descrito como uma espécie pioneira agressiva de difícil manejo, invadindo áreas abandonadas ou recém-queimadas. Produz grande biomassa de frondes, extensos rizomas e grande quantidade de serrapilheira, tendo se tornado uma importante espécie problema da Mata Atlântica e do Cerrado no Brasil (MATOS; BELINATO, 2010; MIATTO et al., 2011).

Muitos estudos sobre a fitoquímica de *Pteridium* spp. foram realizados devido ao interesse farmacêutico e toxicológico sobre as substâncias do seu metabolismo secundário. Animais que se alimentam de *P. aquilinum*, principalmente de frondes jovens, apresentam síndromes como deficiência de tiamina, envenenamento agudo, degeneração progressiva da retina e câncer do trato digestivo. Entre os compostos bioativos identificados nessas plantas encontram-se glicosídeos cianogênicos, taninos, flavonoides, derivados do ácido chiquímico, pterosinas e pterosídeos, entre os quais se destaca o ptaquilosídeo, responsável pelo efeito carcinogênico do consumo de *P. aquilinum* por animais (GIL DA COSTA et al., 2012). No entanto, pouco se conhece sobre o papel destes compostos na ecologia da planta (WEIDENHAMER; CALLAWAY, 2010).

Os compostos polifenólicos são a principal classe química de metabólitos secundários em plantas do gênero *Pteridium* (ALONSO-AMELOT et al., 2007), apesar de não serem considerados como as principais substâncias tóxicas produzidas por *P. arachnoideum*. Dentre estes compostos, os taninos condensados, como derivados de proantocianidina ou de prodelfinas, são os principais. Para estas substâncias foram observadas atividade anti-herbivoria (ALONSO-AMELOT et al., 2001; GIL DA COSTA et al., 2012), além de estarem relacionadas à proteção contra radiação ultravioleta (ALONSO-AMELOT et al., 2004).

A alelopátia pode ser definida como qualquer efeito direto ou indireto sobre o crescimento, sobrevivência ou reprodução de uma planta alvo, causado por compostos do metabolismo secundário de uma planta doadora e liberada no ambiente (ZENG, 2014). Esta interação é considerada como importante na dominância de espécies vegetais com comportamento invasor e, por ser mediada por metabólitos secundários, a composição química dos tecidos vegetais pode ser utilizada como indicador de seu potencial invasor (INDERJIT et al., 2011).

A alelopatia é considerada em alguns trabalhos como um dos mecanismos que permitem a dominância de *Pteridium* spp. nas áreas em que se estabelecem (MATOS; BELINATO, 2010; WANG et al., 2011). Apesar disso, são poucas as evidências disponíveis sobre o potencial alelopático de metabólitos secundários produzidos por essas plantas. Atividade alelopática (fitotóxica) foi observada para compostos fenólicos associados ao sistema radicular de *P. aquilinum*, assim como a lixiviados de frondes de *P. esculentum* (GLASS, 1976; TAYLOR; THOMSON, 1990). Mais recentemente, o estudo fitoquímico biodirigido com extratos de frondes verdes e serrapilheira de *P. arachnoideum* levou ao isolamento e identificação da proantocianidina selligueina A, um composto polifenólico com atividade fitotóxica (JATOBA et al., submetido).

Justificativa

Frente à importância de se compreender os mecanismos que permitem às plantas com comportamento invasor obterem sucesso nas áreas em que se estabelecem (CATFORD et al., 2009; GREER et al., 2014), e frente aos impactos observados em áreas dominadas por *P. arachnoideum* no Cerrado (MIATTO et al., 2011), maiores estudos fazem-se necessários para esclarecer o papel da alelopatia na dominância dessa planta. Além do isolamento e identificação de compostos com atividade fitotóxica (BLAIR et al., 2008; DUKE, 2015), faz-se necessário verificar o potencial alelopático destas substâncias no desenvolvimento de espécies vegetais ecologicamente relevantes e co-existentes com a espécie doadora (ROMEO, 2011).

Hipótese

Metabólitos secundários de *P. arachnoideum* apresentam potencial alelopático sobre o desenvolvimento de espécies bioindicadoras, de gramíneas nativa e invasora do Cerrado.

Objetivos

O objetivo desse estudo foi avaliar o potencial alelopático, de compostos do metabolismo secundário de *P. arachnoideum* sobre o desenvolvimento de outras espécies vegetais. Para isso, a atividade fitotóxica de polifenóis da serrapilheira de *P. arachnoideum* foi avaliada sobre o desenvolvimento inicial de espécies bioindicadoras, uma espécie de gramínea nativa e outra invasora do Cerrado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Vegetal

O material vegetal utilizado consistiu de serrapilheira de *Pteridium arachnoideum* coletada na área de Cerrado do *campus* São Carlos da Universidade Federal de São Carlos, Estado de São Paulo (21°58'02.0" S, 047°52'09.9" O). Uma exsiccata da planta foi depositada no herbário do Departamento de Botânica da UFSCar (Voucher n° HUFSCAR8797). Para evitar a avaliação de polifenóis produtos da atuação de microrganismos durante a decomposição das frondes, foram coletadas folhas mortas presentes nas camadas superficiais da serrapilheira. O material foi triado para descarte das frondes visualmente atacadas por fungos, lavado e seco em casa de vegetação (17 – 43 °C) até atingir massa constante (190 h). Após secagem, o material vegetal foi triturado em moinho elétrico e o pó vegetal resultante foi utilizado para a obtenção dos extratos.

2.2. Equipamentos e Reagentes

Solventes comercialmente disponíveis (grau P.A. ou HPLC) foram utilizados conforme a necessidade. Análises por cromatografia de camada delgada (CCD) foram realizadas utilizando-se placas Alugram Sil RP – 18 W/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel, Germany), eluídas com uma mistura de metanol (MeOH) em água (H₂O/MeOH 5:2). Após eluição, as placas foram reveladas por submersão em revelador *oleum* (ácido sulfúrico, água e ácido acético 1:4:20 v/v), seguido de aquecimento a 120 °C. Cromatografia em fase reversa foi realizada utilizando-se sílica gel derivatizada com grupo octadesilsilano (C₁₈) Discovery[®] DSC-18 (Supelco). Cromatografia *flash* foi realizada em equipamento CombiFlash Rf usando coluna RediSep Rf Gold C18 (15,5 g, ambos Teledyne Isco), com fluxo de 15 mL m⁻¹ a 25°C a 25°C. Os reagentes Folin-Ciocalteu e ácido gálico anidro foram providos por Haloquímica Ind. E Com. Ltda. (São Paulo – SP) e Vetec Química Fina (Sigma-Aldrich, Rio de Janeiro – RJ), respectivamente. As avaliações de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro UV/visível Hach DR 5000. Micrografias foram obtidas em microscópio óptico Olympus BX41, com câmera fotográfica digital Sony CCD-IRIS acoplada.

2.3. Extração Inicial e Cromatografia

A extração inicial do material vegetal foi realizada misturando-se 100 g de pó vegetal e 500 mL de cada solvente utilizado. Primeiramente, foi realizada a extração com hexano (Hex) para a retirada de ceras e gorduras, em banho de ultrassom por 15 minutos. Após

filtração a vácuo, o processo foi repetido por outras quatro vezes com o solvente Hex. Em seguida, foram realizadas cinco extrações com acetato de etila (AcOEt), como descrito anteriormente. O extrato AcOEt foi submetido à análise de CCD e submetido à cromatografia em fase reversa.

A cromatografia em fase reversa foi realizada com sílica gel C₁₈ em placa filtrante acoplada a kitasato e bomba de vácuo, eluída com gradiente de metanol em água (água pura; H₂O/MeOH 5:1, 5:2, 5:3, 5:4 v/v; MeOH puro), seguido por diclorometano (DCM) puro para a eluição de substâncias apolares (MIRANDA et al., 2015). Ao final do processo, foram obtidas sete frações, submetidas a análise de CCD e reunidas de acordo com sua similaridade, resultando em quatro frações finais (PaS-1 a PaS-4). A fração PaS-4 (0,180 g; DCM) foi descartada, por apresentar-se majoritariamente composta por substâncias apolares e clorofila, de acordo com análise por CCD.

Uma alíquota (0,122 g) da fração PaS-1 (0,964 g; H₂O/MeOH 1:0 – 5:3 v/v) foi utilizada para o isolamento de selligueina A (JATOBA et al., submetido), a partir da otimização do isolamento em cromatografia *flash*. Assim, a alíquota da fração PaS-1 foi submetida a cromatografia *flash* de fase reversa em sílica gel C₁₈, com monitoramento UV a 214 nm e eluição em gradiente de MeOH (solvente B) em água (solvente A). O gradiente foi desenvolvido como segue: 0 – 10 minutos, aumento linear de 0% - 10% de B; 10 – 20 minutos, aumento linear de 10% - 40% de B; 20 – 30 minutos, aumento linear de 40% - 70% de B; 30 – 45 minutos, aumento linear de 70% - 100% de B. O composto selligueina A foi coletado como um pico em 22 min (40% de B; H₂O/MeOH 5:2 v/v).

2.4. Quantificação de Polifenóis Totais

As frações do extrato de serrapilheira de *P. arachnoideum* foram submetidas à quantificação de polifenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu (GEORGÉ et al., 2005, adaptado). Para isso, alíquotas de cada fração foram solubilizadas em MeOH nas concentrações 29 mg mL⁻¹, 54 mg mL⁻¹ e 96 mg mL⁻¹ para as frações PaS-1, PaS-2 e PaS-3, respectivamente. Em seguida, 0,05 mL de cada solução foi misturado em 4,95 mL de água destilada. Desta solução, 0,5 mL foi adicionado a 2,5 mL de solução Folin-Ciocalteu, pré-diluído em água destilada (1:3), em quatro réplicas em tubos de ensaio. Após dois minutos de reação em temperatura ambiente, foram adicionados 2 mL de solução aquosa de carbonato de sódio (Na₂CO₃, 75 g L⁻¹) a cada tubo. Os tubos foram então submetidos a banho-maria a 50 °C por 15 minutos, ao final dos quais foram submetidos a banho de gelo para finalizar a reação. A absorbância final de cada solução foi medida em espectrofotômetro a 760 nm. Uma curva de

calibração foi preparada utilizando-se ácido gálico como padrão (1 mg L⁻¹ a 8 mg L⁻¹). Assim, os resultados obtidos para os extratos avaliados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato (EAG, mg g⁻¹) (TAKAO et al., 2015).

A regressão linear ($r^2 = 0,99$, Figura 2.1) obtida para a curva de calibração está representada pela equação (5):

$$y = 0,1303 x + 0,0053 \quad (5)$$

Onde y indica a absorbância a 760 nm e x indica a concentração de ácido gálico (mg L⁻¹).

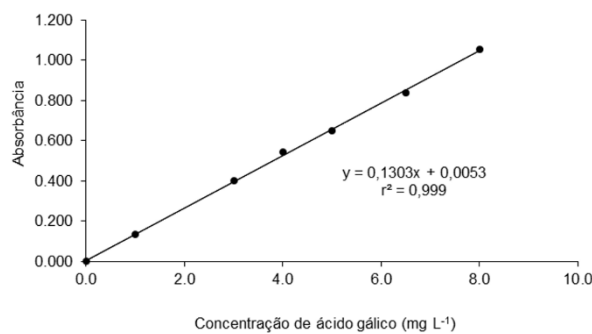


Figura 2.1. Curva analítica do padrão ácido gálico para avaliação do teor total de polifenóis das frações do extrato de serrapilheira de *P. arachnoideum*.

2.5. Bioensaios de Crescimento Inicial

O potencial alelopático do extrato PaS-1 foi testado sobre o desenvolvimento inicial de duas espécies bioindicadoras – cebola (*Allium cepa* L., monocotiledônea) e gergelim (*Sesamum indicum* L., eudicotiledônea) –, uma espécie de gramínea nativa do Cerrado – capim rabo-de-raposa [*Setaria parviflora* (Poir.) Kerguelen, monocotiledônea] – e uma espécie de gramínea invasora do Cerrado – capim braquiária [*Urochloa decumbens* (Stapf) R.D.Webster, monocotiledônea]. As espécies bioindicadoras são aquelas que por sua homogeneidade genética, permitem a avaliação da atividade fitotóxica com a obtenção de valores de desvio-padrão menores do que aqueles obtidos na resposta de espécies nativas, devido à sua maior variabilidade genética (MACÍAS et al., 2000). As espécies bioindicadoras aqui empregadas estão de acordo com o indicado por Macías e colaboradores (2000) para espécies alvo-padrão (*standard target species*, STS), sendo portanto adequadas para uma primeira abordagem do potencial alelopático de compostos do metabolismo secundário de *P. arachnoideum*. Já para as espécies de gramíneas utilizadas nos bioensaios, o critério de escolha se baseou na relevância ecológica das espécies (BLAIR et al., 2008; ROMEO, 2011; DUKE, 2015), já que ambas

coexistem com *P. arachnoideum* em condições naturais no bioma Cerrado e representam uma espécie invasora resistente e de difícil manejo (*U. decumbens*), e uma espécie nativa (*S. parviflora*) que sofre os impactos da competição tanto contra *P. arachnoideum* quanto contra *U. decumbens*.

Para o desenvolvimento dos bioensaios, soluções a 0,8, 0,4 e 0,2 mg mL⁻¹ da fração PaS-1 foram preparadas em solução tampão 10 mM de ácido 2-[N-morfolino]-etanossulfônico (MES), com pH ajustado a 6,00 com solução 1 M de hidróxido de sódio (NaOH), com concentração constante de dimetilsulfóxido (DMSO) de 5 µL mL⁻¹. Sementes de cebola e gergelim foram pré-germinadas a 25 °C e fotoperíodo de 12 h de luz, em estufa de germinação. Da mesma forma, sementes de capim rabo-de-raposa e capim braquiária foram pré-germinadas com alternância de temperatura 27 °C – 18°C e fotoperíodo de 16 h de luz em estufa de germinação. As condições estabelecidas para a germinação e crescimento inicial das espécies alvo testadas foram determinados em bioensaios preliminares. Foram consideradas germinadas aquelas sementes que apresentavam protrusão de qualquer parte da plântula maior ou igual a três milímetros (ANESE et al., 2015 a).

O potencial alelopático do composto selligueina A foi testado sobre o desenvolvimento inicial da espécie bioindicadora gergelim (*S. indicum*). Para isso, soluções a 1 mM, 0,3 mM, 0,1 mM, 0,03 mM e 0,01 mM foram preparadas conforme descrito anteriormente para a fração PaS-1. As sementes de gergelim foram pré-germinadas nas mesmas condições descritas anteriormente.

Os bioensaios foram realizados com quatro réplicas, em potes plásticos transparentes (11 x 6 x 4 cm) forrados com duas folhas de papel de filtro e umedecidas com 6 mL de cada solução, separadamente. O controle negativo foi realizado na presença de solução tampão e DMSO (5 µL mL⁻¹). Dez sementes pré-germinadas de cada espécie supra mencionada foram acomodadas por caixa, separadamente, lacradas em sacos plásticos e acondicionadas em estufa de germinação nas mesmas condições utilizadas para a germinação, durante sete dias (ANESE et al., 2015 b).

Ao final desse período, a parte aérea (caule ou talo) e a raiz das plântulas foram medidas, e as plântulas foram classificadas como normais ou anormais, de acordo com Brasil (2009). As folhas ou cotilédones fotossintetizantes foram separados para a quantificação de clorofilas, e as raízes de gergelim foram separadas para a preparação de lâminas e avaliação das células do metaxilema.

2.6. Teores de Clorofila

Amostras de aproximadamente 30 mg (peso fresco) de folhas ou cotilédones fotossintetizantes das espécies alvo foram coletadas e pesadas ao final dos bioensaios de crescimento inicial, uma amostra por repetição para cada tratamento.

As folhas ou cotilédones fotossintetizantes foram mergulhados em 5 mL de DMSO em tubos de ensaio tampados, mantidos em banho-maria a 70 °C por duas horas, sob luz verde de segurança, para a extração total de clorofila (PARRY et al., 2014, adaptado). Após esse período, os tubos foram mantidos em temperatura ambiente e protegidos da luz, até atingirem temperatura ambiente.

A absorbância dos extratos de clorofila assim obtidos foi observada em espectrofotômetro a 665 nm e 648 nm. Os resultados foram expressos em miligrama de clorofila a, clorofila b e clorofila total por grama de peso fresco de folha ou cotilédone fotossintetizante, a partir das equações (1), (2) e (3) (BARNES et al., 1992):

$$C_a = 14,85(A^{665}) - 5,14(A^{648}) \quad (1)$$

$$C_b = 25,48(A^{648}) - 7,36(A^{665}) \quad (2)$$

$$C_t = 7,94(A^{665}) + 20,34(A^{648}) \quad (3)$$

Onde C_a indica a concentração de clorofila a, C_b indica a concentração de clorofila b e C_t indica a concentração de clorofila total (mg g⁻¹ de material fresco); A^{665} e A^{648} indicam as absorbâncias obtidas a 665 nm e 648 nm, respectivamente.

2.7. Avaliação de Células do Metaxilema

Para a avaliação das células do metaxilema, quatro raízes de gergelim crescidas nas diferentes concentrações da fração PaS-1, do composto selligueina A ou do controle negativo foram imediatamente imersas em solução de etanol (H₂O/EtOH 10:7 v/v) ao final do bioensaio de crescimento inicial. A coloração das raízes foi feita pelo método de Fuchs modificado (KRAUS; ARDUIN, 1997). Após sete dias em solução de EtOH, as raízes foram submetidas a clarificação com solução de hidróxido de sódio (H₂O/NaOH 10:1 v/m) a 50 °C por 48 h. Ao final desse período, as raízes foram coradas em solução etanólica de lacmóide 0,25% por 24 h.

Após esse processo, as raízes foram montadas entre lâmina e lamínula de microscopia óptica com xarope de Apathy (KRAUS; ARDUIN, 1997), deixadas em temperatura ambiente e protegidas da luz por sete dias, até a completa secagem das lâminas.

As raízes foram então observadas sob microscópio óptico com câmera digital acoplada. Foram fotografados trechos do feixe central do metaxilema na região média de cada

raiz, com aumento de 10 ou 20 vezes. De cada micrografia foram medidas dez células do metaxilema, com o auxílio do *software* Image J 1.48v (SCHNEIDER et al., 2012).

2.8. Análise Estatística

Os resultados foram submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk, $\alpha = 0,05$) e homocedasticidade (Levene, $\alpha = 0,05$). Quando os pré-requisitos de distribuição normal e homogeneidade de variâncias foram cumpridos, os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA, $\alpha = 0,05$), seguida do teste de Tuckey ($\alpha = 0,05$) para comparação entre médias. Nos casos em que um ou ambos pré-requisitos não foram cumpridos, os dados foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($\alpha = 0,05$), seguido de teste de Welch ($\alpha = 0,05$) para comparação entre médias.

A concentração de inibição média (IC_{50}) foi calculada para os resultados do bioensaio com selligueina A que apresentaram inibição de pelo menos 50% com relação ao controle negativo. Para isso, os dados foram ajustados a uma curva sigmoide de dose-resposta (escala logarítmica) definida pela equação (4):

$$Y = Y_{min} + \frac{Y_{max} - Y_{min}}{1 + 10^{[(\log IC_{50} - X) \times h]}} \quad (4)$$

Onde X indica o logaritmo da concentração; Y indica a resposta (atividade inibitória); Y_{max} e Y_{min} são os valores máximo e mínimo da resposta, respectivamente; e IC_{50} indica o valor de X para o qual a curva se encontra entre Y_{max} e Y_{min} (ANESE, S. et al., 2015). O ajuste dos dados ao modelo logístico de três parâmetros (3PL) para o cálculo do IC_{50} é descrito pelo valor do coeficiente de determinação (R^2). Os cálculos de ajuste da curva, valores de IC_{50} e de R^2 foram realizados utilizando o *software* GraphPad Prism 4.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantificação de polifenóis pelo método Folin-Ciocalteu, fazendo uso da curva analítica definida pela equação (5), apresentou a fração PaS-1 (0,963 g; H₂O/MeOH 1:0 – 5:3 v/v) como a mais enriquecida em polifenóis totais (EAG = 169,44 ± 1,46 mg g⁻¹). A segunda fração com maior quantidade de polifenóis totais foi PaS-3 (0,023g; H₂O/MeOH 5:4 v/v; EAG = 47,93 ± 1,21 mg g⁻¹), seguida pela fração PaS-2 (0,187 g; MeOH; EAG = 42,68 ±

0,30 mg g⁻¹). Por se apresentar como a fração mais enriquecida em polifenóis, a fração PaS-1 foi escolhida para realizar os bioensaios de crescimento inicial.

A fração PaS-1 apresentou potencial alelopático contra todas as espécies testadas, com atividade inibitória significativamente diferentes do controle para todos os parâmetros morfológicos avaliados (Tabela 1). Para as espécies bioindicadoras gergelim (*S. indicum*) e cebola (*A. cepa*), o órgão mais afetado foi a raiz. Para gergelim não houve inibição do crescimento inicial do caule (Tabela 1, Figura 2.2), enquanto que para cebola houve atividade inibitória significativa sobre o talo apenas na maior concentração (0,8 mg mL⁻¹). Neste caso, houve uma redução do valor médio do comprimento do talo de cebola de 31,99 mm no controle para 22,64 mm na concentração de 0,8 mg mL⁻¹, correspondente a uma inibição de 29,23% (Tabela 2.1, Figura 2.3).

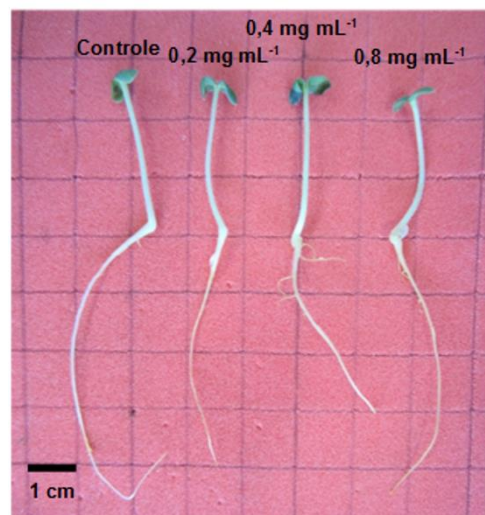


Figura 2.2. Aspecto das plântulas de gergelim (*S. indicum*) crescidas na presença da fração PaS-1.

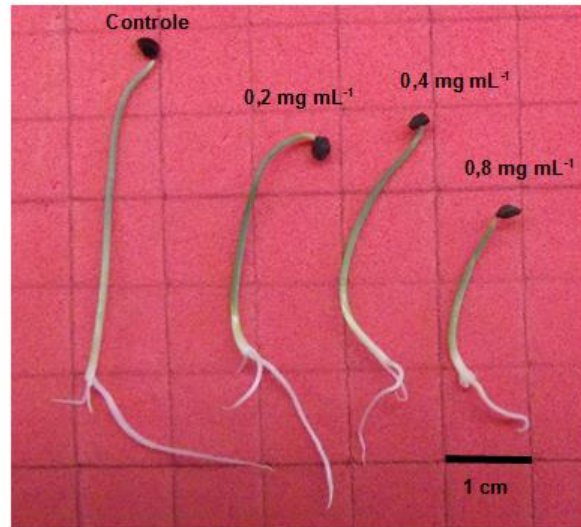


Figura 2.3. Aspecto das plântulas de cebola (*A. cepa*) crescidas na presença da fração PaS-1.

Para cebola, a inibição do desenvolvimento inicial da raiz resultou em uma significativa redução do valor médio do comprimento, de 24,29 mm no controle para 11,37 mm na concentração de 0,8 mg mL⁻¹, correspondente a uma inibição de 53,20% (Tabela 1, Figura 2.3). Para gergelim, a fração PaS-1 exerceu uma redução significativa do comprimento final médio da raiz, de 55,08 mm no controle para 35,52 mm na concentração de 0,8 mg mL⁻¹, correspondente a uma inibição de 35,51% (Tabela 1, Figura 2.2). Para gergelim também foi avaliado o tamanho das células do metaxilema radicular. Baseado nos dados de distribuição das classes de tamanho das células do metaxilema radicular de gergelim (Tabela 2.2), foi observada distribuição uniforme das células das plantas do controle, com maior distribuição das células (32,5%) entre 170 μm e 230 μm. Plântulas de gergelim crescidas na presença da fração PaS-1 apresentaram células do metaxilema significativamente menores do que o as do controle, com redução significativamente diferente do controle nas concentrações de 0,4 mg mL⁻¹ e 0,8 mg mL⁻¹, com valores médios de 121,75 μm e 108,96 μm, respectivamente (Tabela 2.2, Figura 2.4). Essa redução corresponde a uma inibição de 41,41% na maior concentração.

Tabela 2.1. Crescimento inicial de plântulas de gergelim (*S. indicum*), cebola (*A. cepa*), capim-rabo-de-raposa (*S. parviflora*) e capim-braquiária (*U. decumbens*) crescidas na presença da fração PaS-1.

Parâmetro (unidade)	Controle	0,2 mg mL ⁻¹	0,4 mg mL ⁻¹	0,8 mg mL ⁻¹	Estatística	
					X ² (p) ^b	F (p) ^c
<i>S. indicum</i>						
Caule (mm)	22,85 ± 1,50 a	22,64 ± 1,09 a	23,57 ± 1,34 a	22,24 ± 1,74 a	-	0,62 (0,61)
Raiz (mm)	55,08 ± 3,63 a	44,80 ± 2,58 b	41,91 ± 1,27 b	35,52 ± 1,48 c	-	45,04 (8,33 x 10 ⁻⁷)
Células do metaxilema (µm)	185,96 ± 9,63 a	146,15 ± 22,88 ab	121,75 ± 22,74 b	108,96 ± 15,95 b	-	9,93 (0,0014)
<i>A. cepa</i>						
Talo (mm)	31,99 ± 3,38 a	28,87 ± 0,52 a	27,16 ± 1,72 a	22,64 ± 1,12 b	12,07 (0,0070)	-
Raiz (mm)	24,29 ± 4,67 a	17,78 ± 0,49 b	14,15 ± 0,66 bc	11,37 ± 0,94 c	-	14,77 (2,48 x 10 ⁻⁴)
<i>S. parviflora</i>						
Talo (mm)	6,07 ± 0,43 a	4,86 ± 0,27 b	4,81 ± 0,15 b	4,21 ± 0,13 c	-	32,70 (8,93 x 10 ⁻⁶)
Raiz (mm)	34,05 ± 1,38 a	29,22 ± 0,63 b	25,34 ± 0,54 c	23,43 ± 0,93 c	-	93,90 (4,04 x 10 ⁻⁸)
<i>U. decumbens</i>						
Talo (mm)	8,35 ± 0,01 a	8,35 ± 0,15 ab	7,12 ± 0,12 bc	7,13 ± 0,07 c	10,55 (0,013)	-
Raiz (mm)	101,52 ± 0,63 a	86,04 ± 0,85 b	83,80 ± 0,90 c	62,51 ± 0,61 d	-	1997,00 (2,50 x 10 ⁻¹⁵)

Médias na mesma linha acompanhadas das mesmas letras não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

^a Média ± desvio padrão.

^b X² = Estatística H do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

^c F = Estatística F da ANOVA.

Tabela 2.2. Frequência relativa (%) das classes de tamanho de células do metaxilema de plântulas de gergelim (*S. indicum*) tratadas com o extrato PaS-1.

Classes de tamanho (μm)	Controle	0,2 mg mL ⁻¹	0,4 mg mL ⁻¹	0,8 mg mL ⁻¹
0 50	0,0	0,0	2,5	0,0
50 80	0,0	5,0	17,5	22,5
80 110	5,0	12,5	25,0	37,5
110 140	10,0	37,5	17,5	17,5
140 170	27,5	20,0	25,0	12,5
170 200	15,0	12,5	10,0	7,5
200 230	27,5	7,5	2,5	2,5
230 260	7,5	5,0	0,0	0,0
260 290	7,5	0,0	0,0	0,0

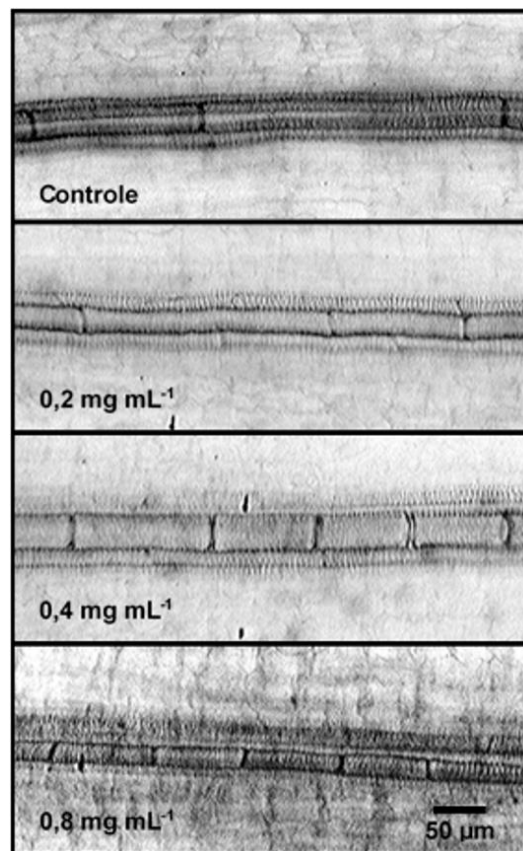


Figura 2.4. Micrografias de células do metaxilema da raiz de plântulas de gergelim (*S. indicum*) tratadas com a fração PaS-1. Micrografias obtidas com aumento de 10 vezes.

O crescimento radicular ocorre por dois mecanismos principais: divisão e alongamento celular. Novas células são produzidas por rápida divisão celular na região do meristema apical, seguida por diferenciação e alongamento na zona de alongamento da porção imediatamente acima do ápice da raiz. Na zona de alongamento, as células se expandem, aumentando o volume vacuolar e a área externa de forma direcional, ao longo do eixo longitudinal da raiz. Este processo é controlado por hormônios e é crucial para o desenvolvimento de raízes funcionais (DOLAN; DAVIES, 2004; ROY; BASSHAM, 2014). Neste trabalho, as células avaliadas foram as células do metaxilema radicular, por serem uma característica anatômica prontamente mensurável, maior do que outras células da raiz e com paredes celulares mais grossas (ANESE, S. et al., 2015), permitindo assim uma avaliação anatômica do alongamento celular. Assim, a atividade inibitória da fração PaS-1 sobre o crescimento da raiz de gergelim pode ser visualizada em nível celular por interferência no processo de alongamento celular, o que pode levar ao comprometimento da funcionalidade da raiz em condições de campo.

Para as demais espécies alvo, todas elas monocotiledôneas, não foi possível realizar a análise do tamanho das células do metaxilema da raiz, devido à organização dos feixes de vasos condutores nessas plantas ser diferente do presente nas eudicotiledôneas. Este arranjo diferente não permite o uso do método de clarificação e coloração aqui empregado para visualização e mensuração das células do metaxilema, sendo que um método alternativo eficaz para esta finalidade ainda não foi definido. Apesar disso, frente à evidência provida por esta avaliação em plântulas de gergelim, pode-se esperar que a inibição do desenvolvimento radicular das outras espécies alvo testadas se deem, pelo menos em parte, graças à inibição do alongamento celular nesse tecido.

Para a espécie nativa capim-rabo-de-raposa (*S. parviflora*) e para a espécie invasora capim braquiária (*U. decumbens*), o órgão mais afetado também foi a raiz. Para capim rabo-de-raposa houve inibição significativa do crescimento do talo e da raiz em todas as concentrações testadas da fração PaS-1 (Tabela 1). Neste caso, houve redução do tamanho médio final do talo, de 8,07 mm no controle para 4,21 mm na concentração de 0,8 mg mL⁻¹, enquanto que para raiz, a redução foi de 34,05 mm no controle para 23,43 mm na concentração de 0,8 mg mL⁻¹. Estes resultados correspondem a uma inibição significativamente diferente do controle, de 47,83% e 31,18% sobre talo e raiz, respectivamente (Tabela 2.1, Figura 2.5).

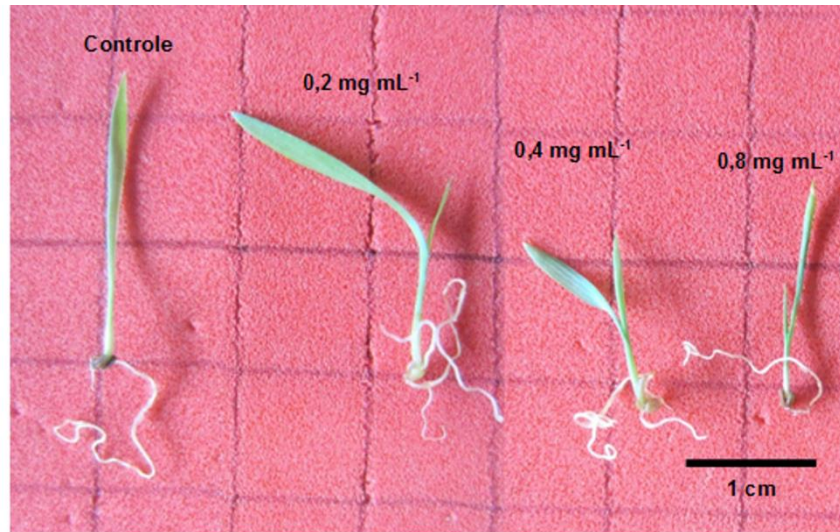


Figura 2.5. Aspecto das plântulas de capim rabo-de-raposa (*S. parviflora*) crescidas na presença da fração PaS-1.

Para capim braquiária houve inibição significativa do crescimento inicial do talo nas concentrações de $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,8 \text{ mg mL}^{-1}$ (Tabela 2.1, Figura 2.6), com redução do comprimento médio de $8,35 \text{ mm}$ no controle para $7,13 \text{ mm}$ na maior concentração ($0,8 \text{ mg mL}^{-1}$), correspondente a uma inibição de $14,61\%$. A raiz de capim braquiária também sofreu inibição significativa, com atividade diferente do controle para todas as concentrações testadas da fração PaS-1. Nesse caso, houve uma redução do valor médio do comprimento da raiz de $101,52 \text{ mm}$ no controle para $62,51 \text{ mm}$ na concentração de $0,8 \text{ mg mL}^{-1}$, correspondente a uma inibição de $38,43\%$ (Tabela 2.1, Figura 2.6).

Quanto ao parâmetro bioquímico teor de clorofila, apenas gergelim e capim rabo-de-raposa apresentaram inibição significativa na presença da fração PaS-1 (Tabela 2.3). Para gergelim, atividade significativamente diferente do controle ocorreu em todas as concentrações para os teores de clorofila a e clorofila total, não havendo atividade sobre o conteúdo de clorofila b. O teor médio de clorofila a foi reduzido de $0,97 \text{ mg g}^{-1}$ no controle para $0,83 \text{ mg g}^{-1}$ na concentração de $0,8 \text{ mg mL}^{-1}$, correspondendo a uma inibição de $14,43\%$. O teor de clorofila total teve redução significativa do valor médio de $1,14 \text{ mg g}^{-1}$ no controle para $1,00 \text{ mg g}^{-1}$ na maior concentração, correspondendo a uma inibição de $12,28\%$.

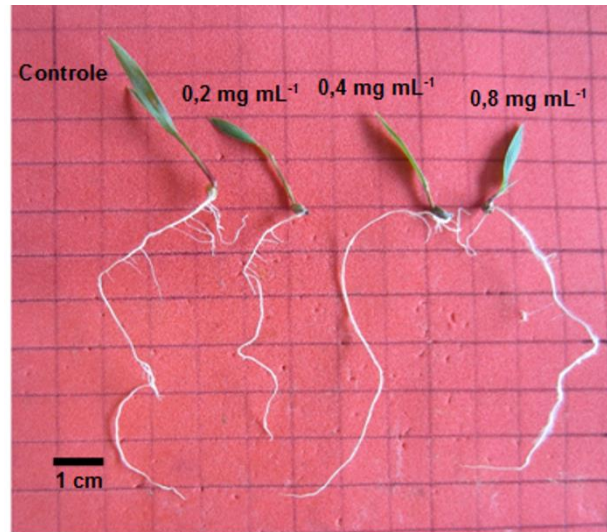


Figura 2.6. Aspecto das plântulas de capim braquiária (*U. decumbens*) crescidas na presença da fração PaS-1.

Capim rabo-de-raposa apresentou inibição significativamente diferente do controle para os teores de clorofila a, b e total. Para esta espécie alvo houve redução do teor médio de clorofila a de $1,61 \text{ mg g}^{-1}$ no controle para $1,10 \text{ mg g}^{-1}$ na maior concentração, correspondendo a uma inibição de 31,68%. Para o teor de clorofila b houve redução de $0,23 \text{ mg g}^{-1}$ para $0,16 \text{ mg g}^{-1}$, correspondendo a uma inibição de 30,43% na maior concentração. Da mesma forma, para clorofila total houve redução de $1,84 \text{ mg g}^{-1}$ no controle para $1,26 \text{ mg g}^{-1}$ na concentração de $0,8 \text{ mg mL}^{-1}$, correspondendo a uma inibição de 31,52% (Tabela 2.3).

O capim rabo-de-raposa foi a única espécie de monocotiledônea testada a sofrer interferência da fração PaS-1 sobre os teores de clorofila. Esta espécie é nativa do Cerrado, portanto, ocorre em áreas sujeitas à invasão não apenas por *P. arachnoideum* mas também por capim braquiária. O conteúdo de clorofila está relacionado com a eficiência de captura de luz (LOHBECK et al., 2014) e, como a clorofila a participa de várias funções fisiológicas na planta, este é um parâmetro que permite avaliar distúrbios no desenvolvimento e stress tóxico (FLORES-DE-SANTIAGO et al., 2012).

A fração enriquecida em polifenóis PaS-1 apresentou potencial alelopático sobre espécies bioindicadoras, nativa e invasora do Cerrado. Assim, os resultados aqui apresentados corroboram a hipótese da alelopátia como um dos mecanismos de dominância de plantas do gênero *Pteridium* (MATOS; BELINATO, 2010; WANG et al., 2011), pela produção e liberação no ambiente de polifenóis.

Outros autores se dedicaram a avaliar o potencial alelopático de *Pteridium* spp. Taylor e Thomson (1990) analisaram o efeito fitotóxico do lixiviado de frondes jovens, maduras

e senescentes de *P. esculentum* em Sidney, na Austrália. As espécies alvo selecionadas foram a bioindicadora alfafa (*Medicago sativa*), as nativas trevo-branco (eudicotiledônea, *Trifolium repens*) e azevém (monocotiledônea, *Lolium perene*). Lixiviados de frondes jovens e maduras causaram inibição do desenvolvimento radicular de alfafa e trevo-branco, enquanto os lixiviados de frondes senescentes causaram inibição do desenvolvimento radicular tanto de trevo-branco quanto de azevém. Matos e Belinato (2010) observaram inibição na germinação e desenvolvimento inicial de espécies arbóreas pioneiras e secundárias do Cerrado exercido por lixiviados de frondes de *P. arachnoideum*, inclusive com inibição do comprimento radicular.

No presente trabalho, todas as espécies testadas apresentaram inibição do desenvolvimento radicular, quando na presença da fração enriquecida em polifenóis da serrapilheira de *P. arachnoideum*. Cabe ressaltar que o método de extração aqui empregado pode resultar na presença de compostos liberados do interior do tecido senescente que podem não estar presentes no seu lixiviado (CABOUN; JOHN, 2015), causando maior atividade do que a que seria observada no ambiente natural.

Glass (1976) analisou o crescimento da espécie bioindicadora cevada (eudicotiledônea, *Hordeum vulgare*) na presença de soluções que simulavam a constituição de compostos fenólicos associados à rizosfera de *P. aquilinum* na Nova Zelândia, contendo ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido vanílico, ácido *p*-hidroxicinâmico e ácido ferúlico. Após três semanas de experimento, as raízes das plantas tratadas com estas soluções apresentavam 8 cm de comprimento, contra 25 centímetros do controle (inibição de 68%). Além do período prolongado de experimento, o modelo experimental empregado não permite inferir qual dos compostos seria o responsável pela atividade observada, ou se esta seria resultado de atividade sinérgica entre eles (SOUZA FILHO et al., 2010).

Tabela 2.3. Teores^a de clorofila a (C_a), clorofila b (C_b) e clorofila total (C_t) de plântulas de gergelim (*S. indicum*), cebola (*A. cepa*), capim-rabo-de-raposa (*S. parviflora*) e capim-braquiária (*U. decumbens*) crescidas na presença da fração PaS-1.

	Controle	0,2 mg mL ⁻¹	0,4 mg mL ⁻¹	0,8 mg mL ⁻¹	Estatística	
					X ² (p) ^b	F (p) ^c
<i>S. indicum</i>						
C _a	0,97 ± 0,01 a	0,89 ± 0,01 b	0,85 ± 0,09 b	0,83 ± 0,12 b	8,47 (0,036)	-
C _b	0,17 ± 0,01 a	0,15 ± 0,01 a	0,14 ± 0,02 a	0,15 ± 0,03 a	6,71 (0,079)	-
C _t	1,14 ± 0,01 a	1,04 ± 0,02 b	0,99 ± 0,11 b	1,00 ± 0,14 b	8,47 (0,036)	-
<i>A. cepa</i>						
C _a	0,66 ± 0,09 a	0,63 ± 0,05 a	0,58 ± 0,07 a	0,63 ± 0,07 a	-	2,82 (0,084)
C _b	0,09 ± 0,02 a	0,08 ± 0,03 a	0,08 ± 0,01 a	0,09 ± 0,02 a	-	1,15 (0,369)
C _t	0,75 ± 0,11 a	0,71 ± 0,055 a	0,66 ± 0,08 a	0,72 ± 0,08 a	5,36 (0,147)	-
<i>S. parviflora</i>						
C _a	1,61 ± 0,09 a	1,60 ± 0,10 a	1,17 ± 0,12 b	1,10 ± 0,14 b	-	20,99 (4,58 x 10 ⁻⁵)
C _b	0,23 ± 0,03 a	0,12 ± 0,05 b	0,15 ± 0,01 b	0,16 ± 0,01 b	-	8,41 (0,0028)
C _t	1,84 ± 0,1 a	1,70 ± 0,06 a	1,32 ± 0,13 b	1,26 ± 0,15 b	-	23,23 (2,75 x 10 ⁻⁵)
<i>U. decumbens</i>						
C _a	1,38 ± 0,15 a	1,38 ± 0,16 a	1,23 ± 0,16 a	1,37 ± 0,08 a	3,20 (0,361)	-
C _b	0,21 ± 0,07 a	0,22 ± 0,06 a	0,21 ± 0,03 a	0,24 ± 0,05 a	2,25 (0,521)	-
C _t	1,59 ± 0,12 a	1,60 ± 0,12 a	1,43 ± 0,19 a	1,62 ± 0,09 a	-	1,75 (0,210)

Médias na mesma linha acompanhadas das mesmas letras não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

^a Conteúdo de clorofila expresso como miligramas de clorofila por grama de tecido fresco (mg g⁻¹ ± desvio padrão).

^b X² = Estatística H do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis; p = probabilidade.

^c F = Estatística F da ANOVA; p = probabilidade.

A proantocianidina selligueina A é um tanino condensado encontrado como composto secundário majoritário em extratos de frondes verdes e serrapilheira de *P. arachnoideum*, apresentando atividade fitotóxica (JATOBA et al., submetido). Esta também é a principal substância polifenólica encontrada na fração PaS-1, de acordo com análise de CCD. Assim, foi realizado bioensaio de crescimento inicial com selligueina A isolada da serrapilheira de *P. arachnoideum* sobre a espécie bioindicadora gergelim, a fim de estabelecer o seu potencial alelopático.

Selligueina A promoveu inibição significativa do comprimento final do caule e da raiz de plântulas de gergelim em todas as concentrações testadas (Tabela 2.4). Para os valores médios de comprimento final do caule destas plântulas, houve redução significativa de 22,85 mm no controle para 10,92 mm na concentração de 1mM, correspondendo a uma inibição de 52,21% entre o controle e a maior concentração. Para o comprimento médio final da raiz, houve redução significativa de 55,08 mm no controle para 29,65 mm na maior concentração, correspondendo a uma inibição de 46,17% (Tabela 2.4, Figura 2.7). Enquanto o desenvolvimento do caule foi levemente mais afetado do que o da raiz, o que pode afetar a habilidade competitiva por luz e espaço em condições de campo, a inibição do desenvolvimento radicular pode prejudicar a obtenção de água e nutrientes, aspectos críticos para a sobrevivência e estabelecimento das plântulas (DOLAN; DAVIES, 2004; GROSSNICKLE, 2012).

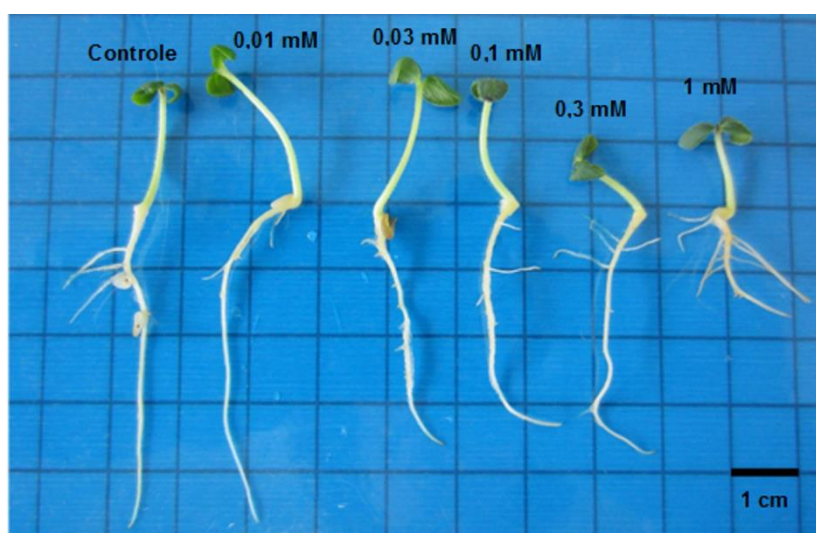


Figura 2.7. Aspecto das plântulas de gergelim (*S. indicum*) crescidas na presença de selligueina A.

Tabela 2.4. Crescimento inicial^a de plântulas de gergelim (*S. indicum*) crescidas na presença de selligueina A.

	Caule (mm)	Raiz (mm)	Células do metaxilema (µm)	Anormalidades (%)
Controle	22,85 ± 1,50 a	55,08 ± 3,63 a	166,17 ± 15,91 a	-
0,01 mM	14,12 ± 0,64 b	35,97 ± 1,15 b	142,20 ± 9,63 a	15,00 ± 10,00 a
0,03 mM	14,99 ± 1,62 b	35,28 ± 3,35 bc	130,17 ± 8,28 ab	30,00 ± 14,14 ab
0,1 mM	12,73 ± 1,67 bc	33,39 ± 1,93 bc	133,20 ± 25,93 ab	37,50 ± 9,57 b
0,3 mM	12,31 ± 0,50 bc	30,88 ± 1,88 bc	103,21 ± 17,71 bc	67,50 ± 17,08 c
1 mM	10,92 ± 1,30 c	29,65 ± 1,05 c	81,72 ± 10,53 c	75,00 ± 13,00 d
F (p) ^b	41,38 (6,26 x 10 ⁻⁹)	58,57 (4,08 x 10 ⁻¹⁰)	13,12 (1,78 x 10 ⁻⁵)	-
X ² (p) ^c				15,28 (0,0036)

Médias na mesma coluna seguidas das mesmas letras não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tuckey (p < 0,05).

^a Média ± desvio padrão.

^b F = Estatística F da ANOVA; p = probabilidade.

^c X² = Estatística H do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis; p = probabilidade.

Além da inibição do seu tamanho final, plântulas de gergelim crescidas na presença de selligueina A também apresentaram anormalidades. Plântulas anormais são definidas como aquelas que não apresentam potencial para continuar crescendo e dar origem a plantas saudáveis, ou normais (BRASIL, 2009). As anormalidades apresentadas por estas plântulas incluíram o desenvolvimento de raízes laterais no colo, inversão geotrópica da raiz, e necrose do meristema radicular e caulinar (Figura 2.8). Nenhuma plântula do controle apresentou anormalidades. A proporção de anormalidades variou de 75% a 15%, da maior para a menor concentração, sendo os maiores índices observados nas concentrações de 1 mM e 0,3 mM (Tabela 2.4).

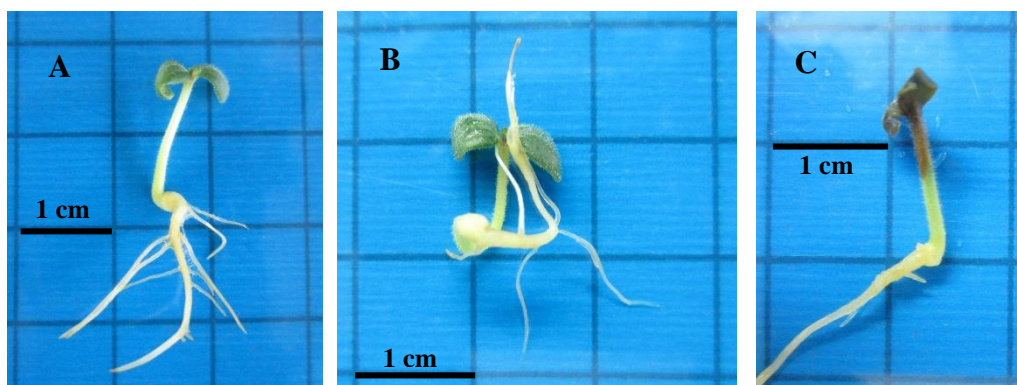


Figura 2.8. Aspecto das anormalidades apresentadas por plântulas de gergelim crescidas na presença de selligueina A. (A) Desenvolvimento de raízes laterais no colo; (B) Inversão geotrópica da raiz e necrose do meristema radicular; (C) Necrose do meristema caulinar.

Baseado nos dados de distribuição das classes de tamanho das células do metaxilema radicular de gergelim (Tabela 2.5), foi observada distribuição uniforme das células do controle, com maior distribuição das células (40%) entre 140 μm e 170 μm . Plântulas de gergelim crescidas na presença de selligueina A apresentaram células do metaxilema significativamente menores do que as do controle, com redução significativamente diferente do controle nas concentrações de 0,3 mM e 1 mM, com valores médios de 103,21 μm e 81,72 μm , respectivamente (Tabela 2.5, Figura 2.9). A atividade inibitória de selligueina A variou entre 50,82% e 14,42%, da maior para a menor concentração, com IC_{50} de 0,98 mM ($R^2 = 0,96$).

Ao estudar a influência da interação alelopática na formação de colônias monotípicas de outras samambaias, Kato-Noguchi et al. (2012) observaram inibição do desenvolvimento inicial do talo e raiz de *Avena fatua* (monocotiledônea) e *Echinochloa colonum* (eudicotiledônea) pelo tanino condensado cinnamotanino B-1, isolado de frondes de *Dicranopteris linearis* (Gleicheniaceae), com IC_{50} entre 0,34 e 1,31 mM para inibição da raiz. Estes valores de concentração foram considerados como bastante prováveis de serem encontrados no ambiente natural, e sua faixa inclui o valor de concentração para o IC_{50} encontrado para selligueina A sobre as células do metaxilema de agrião.

Tabela 2.5. Frequência relativa (%) das classes de tamanho de células do metaxilema de plântulas de gergelim (*S. indicum*) tratadas com selligueina A.

Classes de tamanho (µm)	Controle	0.01 mM	0.03 mM	0.1 mM	0.3 mM	1 mM
0 50	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	7,5
50 80	0,0	5,0	2,5	7,5	12,5	37,5
80 110	0,0	22,5	25,0	20,0	52,5	45,0
110 140	25,0	20,0	32,5	30,0	30,0	10,0
140 170	40,0	27,5	27,5	22,5	5,0	0,0
170 200	20,0	15,0	10,0	17,5	0,0	0,0
200 230	7,5	7,5	2,5	2,5	0,0	0,0
230 260	2,5	2,5	0,0	0,0	0,0	0,0
260 290	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

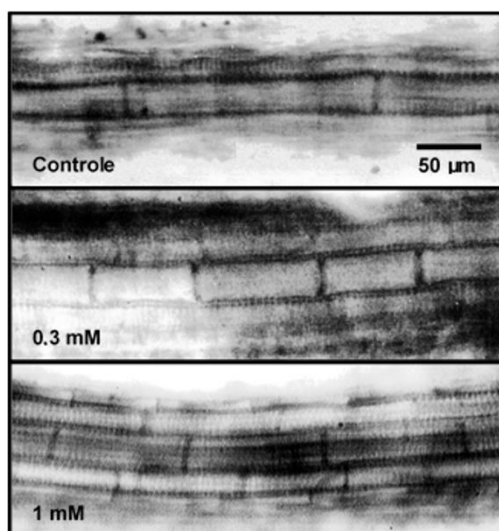


Figura 2.9. Micrografias de células do metaxilema da raiz de plântulas de gergelim (*S. indicum*) tratadas com selligueina A. Micrografias obtidas com aumento de 20 vezes.

Ao contrário do observado para a fração PaS-1, não houve inibição do teor de clorofila de gergelim crescido na presença de selligueina A (Tabela 2.6). Assim, a atividade observada para PaS-1 pode ser devida à outras substâncias presentes juntamente à selligueina A em sua composição, ou à atividade sinérgica entre elas (SOUZA FILHO et al., 2010).

Tabela 2.6. Teores^a de clorofila a (C_a), clorofila b (C_b) e clorofila total (C_t) de plântulas de gergelim (*S. indicum*) crescidas na presença de selligueina A.

	C _a	C _b	C _t
Controle	1,05 ± 0,11 a	0,18 ± 0,02 a	1,25 ± 0,13 a
0,01 mM	1,00 ± 0,03 a	0,19 ± 0,02 a	1,19 ± 0,03 a
0,03 mM	1,07 ± 0,03 a	0,18 ± 0,02 a	1,26 ± 0,04 a
0,1 mM	0,95 ± 0,08 a	0,19 ± 0,01 a	1,13 ± 0,09 a
0,3 mM	1,11 ± 0,16 a	0,18 ± 0,01 a	1,30 ± 0,18 a
1 mM	1,06 ± 0,08 a	0,20 ± 0,03 a	1,24 ± 0,09 a
Statística	F (p) ^b	X ² (p) ^c	F (p)
	1,18 (0,36)	3,30 (0,65)	0,90 (0,50)

Médias na mesma coluna seguidas das mesmas letras não diferem significativamente entre si, de acordo com o respectivo teste de comparação entre médias.

^a Conteúdo de clorofila expresso como miligramas de clorofila por grama de tecido fresco (mg g⁻¹ ± desvio padrão).

^b F = Estatística F da ANOVA; p = probabilidade.

^c X² = Estatística H do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis; p = probabilidade.

Selligueina A apresentou potencial alelopático sobre as plântulas de gergelim, afetando especialmente o desenvolvimento do caule e raiz. Em nível celular, a inibição do crescimento da raiz pode ser explicada, pelo menos para as duas maiores concentrações (1mM e 0,3 mM), pela redução observada no comprimento das células do metaxilema. A inibição observada para as menores concentrações poderia ser explicada por interferência no processo de divisão celular (DOLAN; DAVIES, 2004; ROY; BASSHAM, 2014), mas este mecanismo não foi testado no presente trabalho. Wang et al. (2011) observaram redução da divisão celular no meristema radicular de rabanete (dicotiledônea, *Raphanus sativus*) exercido por extratos aquosos de frondes de *P. aquilinum* em Taiwan. Essa atividade inibitória chegou a interromper totalmente a divisão celular nas raízes dessa planta alvo, mantendo as células meristemáticas em prófase.

Os resultados aqui apresentados providenciam novas evidências sobre o papel da alelopátia na dominância de plantas do gênero *Pteridium*. No entanto, vale ressaltar que os obtidos com espécies bioindicadoras e em condição de laboratório podem não se reproduzir em condições de campo, devido à complexidade de fatores que podem interferir na atividade de selligueina A, além das diferentes respostas fisiológicas das espécies nativas do Cerrado.

4. CONCLUSÃO

A fração enriquecida em polifenóis da serrapilheira de *P. arachnoideum*, PaS-1, apresentou potencial alelopático sobre o crescimento inicial de todas as espécies alvo testadas, duas espécies bioindicadoras e duas espécies de gramíneas do Cerrado, uma invasora e outra nativa. Além da redução das raízes dessas plantas, houve redução no conteúdo de clorofila de gergelim e capim-rabo-de-raposa, assim como redução no tamanho das células do metaxilema radicular de plântulas de gergelim. Da mesma forma, o composto fenólico majoritário desta fração, selligueina A, também exerceu atividade inibitória sobre a espécie bioindicadora gergelim, com redução da raiz e parte aérea, além de redução no tamanho das células do metaxilema radicular das plântulas que cresceram na presença deste metabólito isolado. Esta é a primeira vez que o potencial alelopático de uma substância isolada de uma espécie do gênero *Pteridium* é verificado, providenciando novas evidências sobre o papel da alelopatia na dominância dessas plantas.

REFERÊNCIAS

- ALONSO-AMELOT, M. E.; OLIVEROS, A.; CALCAGNO, M. P.; ARELLANO, E. Bracken adaptation mechanisms and xenobiotic chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 3, p. 549–553, 2001.
- ALONSO-AMELOT, M. E.; OLIVEROS, A.; CALCAGNO-PISARELLI, M. P. Phenolics and condensed tannins in relation to altitude in neotropical *Pteridium* spp. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n. 11, p. 969–981, 2004. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0305197804000924>>. Acesso em: 18/10/2013.
- ALONSO-AMELOT, M. E.; OLIVEROS-BASTIDAS, A.; CALCAGNO-PISARELLI, M. P. Phenolics and condensed tannins of high altitude *Pteridium arachnoideum* in relation to sunlight exposure, elevation, and rain regime. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 1, p. 1–10, 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0305197806001839>>. Acesso em: 21/5/2014.
- ANESE, S.; GRISI, P. U.; JATOBÁ, L. DE J.; PEREIRA, V. DE C.; GUALTIERI, S. C. J. Phytotoxic activity of different plant parts of *Drimys brasiliensis* Miens on germination and seedling development. **Bioscience Journal**, v. 31, n. 3, p. 923-933, 2015.
- ANESE, S.; JATOBÁ, L. J.; GRISI, P. U.; et al. Bioherbicidal activity of drimane sesquiterpenes from *Drimys brasiliensis* Miens roots. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 28–35, 2015.

BARNES, J. D.; BALAGUER, L.; MANRIQUE, E.; ELVIRA, S.; DAVISON, A. W. A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls a and b in lichens and higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 32, n. 2, p. 85–100, 1992.

BLAIR, A. C.; WESTON, L. A.; NISSEN, S. J.; BRUNK, G. R.; HUFBAUER, R. A. 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, 2008. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.1007/s10530-008-9250-1>>. Acesso em: 16/3/2012.

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

CABOUN, V.; JOHN, J. Allelopathy research methods in forestry. **Allelopathy Journal**, v. 36, n. 2, p. 133–166, 2015.

CATFORD, J. A.; JANSSON, R.; NILSSON, C. Reducing redundancy in invasion ecology by integrating hypotheses into a single theoretical framework. **Diversity and Distributions**, v. 15, n. 1, p. 22–40, 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1472-4642.2008.00521.x>>. Acesso em: 16/3/2012.

DER, J. P.; THOMSON, J. A.; STRATFORD, J. K.; WOLF, P. G. Global chloroplast phylogeny and biogeography of bracken (*Pteridium*; Dennstaedtiaceae). **American Journal of Botany**, v. 96, n. 5, p. 1041–1049, 2009.

DOLAN, L.; DAVIES, J. Cell expansion in roots. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, n. 1, p. 33–39, 2004.

DUKE, S. O. Proving allelopathy in crop–weed interactions. **Weed Science**, v. 63, n. sp1, p. 121–132, 2015.

FLORES-DE-SANTIAGO, F.; KOVACS, J. M.; FLORES-VERDUGO, F. Seasonal changes in leaf chlorophyll a content and morphology in a sub-tropical mangrove forest of the Mexican Pacific. **Marine Ecology**, v. 444, p. 57–68, 2012.

GEORGÉ, S.; BRAT, P.; ALTER, P.; AMIOT, M. J. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1370–3, 2005.

GIL DA COSTA, R. M.; BASTOS, M. M. S. M.; OLIVEIRA, P. A.; LOPES, C. Bracken-associated human and animal health hazards: Chemical, biological and pathological evidence. **Journal of Hazardous Materials**, v. 203-204, p. 1–12, 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030438941101538X>>. Acesso em: 8/5/2012.

GLASS, A. D. M. The allelopathic potential of phenolic acids associated with the rhizosphere of *Pteridium aquilinum*. **Canadian Journal of Botany**, v. 54, n. 21, p. 2440–2444, 1976.

GREER, M. J.; WILSON, G. W. T.; HICKMAN, K. R.; WILSON, S. M. Experimental evidence that invasive grasses use allelopathic biochemicals as a potential mechanism for invasion: chemical warfare in nature. **Plant and Soil**, v. 385, n. 1-2, p. 165–179, 2014.

Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11104-014-2209-3>>. Acesso em: 26/6/2015.

GROSSNICKLE, S. C. Why seedlings survive: influence of plant attributes. **New Forests**, v. 43, n. 5-6, p. 711–738, 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s11056-012-9336-6/fulltext.html>>. Acesso em: 15/4/2015.

INDERJIT; WARDLE, D. A.; KARBAN, R.; CALLAWAY, R. M. The ecosystem and evolutionary contexts of allelopathy. **Trends in ecology & evolution**, v. 26, n. 12, p. 655–62, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21920626>>. Acesso em: 6/3/2012.

JATOBA, L. J.; VARELA, R. M.; MOLINILLO, J. M. G.; DIN, Z. U.; GUALTIERI, S. C.; RODRIGUES-FILHO, E.; MACÍAS, F. A. Allelopathy of bracken fern (*Pteridium arachnoideum*): new evidence from green fronds, litter and soil. **PlosOne**, submetido.

KATO-NOGUCHI, H.; SAITO, Y.; SUENAGA, K. Involvement of allelopathy in the establishment of pure colony of *Dicranopteris linearis*. **Plant Ecology**, v. 213, n. 12, p. 1937–1944, 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11258-012-0096-3>>. Acesso em: 27/2/2014.

LOHBECK, M.; POORTER, L.; MARTÍNEZ-RAMOS, M.; et al. Changing drivers of species dominance during tropical forest succession. **Functional Ecology**, v. 28, n. 4, p. 1052–1058, 2014.

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

MATOS, D. M. D. S.; BELINATO, T. A. Interference of *Pteridium arachnoideum* (Kaulf.) Maxon. (Dennstaedtiaceae) on the establishment of rainforest trees. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 2, p. 311–316, 2010.

MIATTO, R. C.; SILVA, I. A.; SILVA-MATOS, D. M.; MARRS, R. H. Woody vegetation structure of Brazilian Cerrado invaded by *Pteridium arachnoideum* (Kaulf.) Maxon (Dennstaedtiaceae). **Flora**, v. 206, n. 8, p. 757–762, 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0367253011000399>>. Acesso em: 3/3/2012.

MIRANDA, M. A. F. M.; VARELA, R. M.; TORRES, A.; et al. Phytotoxins from *Tithonia diversifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 5, p. 1083–1092, 2015.

PARRY, C.; BLONQUIST, J. M.; BUGBEE, B. In situ measurement of leaf chlorophyll concentration: analysis of the optical/absolute relationship. **Plant, Cell & Environment**, v. 37, n. 11, p. 2508–20, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24635697>>. Acesso em: 21/1/2016.

ROMEO, J. T. Raising the beam: moving beyond phytotoxicity. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, n. 9, p. 2011–2014, 2011.

ROY, R.; BASSHAM, D. C. Root growth movements: waving and skewing. **Plant Science**, v. 221-222, p. 42–7, 2014.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, 2012.

SOUZA FILHO, A. P. S.; GUILHON, G. M. S. P.; SANTOS, L. S. Metodologias empregadas em estudos de avaliação da atividade alelopática em condições de laboratório - revisão crítica. **Planta Daninha**, v. 28, n. 3, p. 689–697, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2013.

TAKAO, L. K.; IMATOMI, M.; GUALTIERI, S. C. J. Antioxidant activity and phenolic content of leaf infusion of Myrtaceae species from Cerrado (Brazilian Savanna). **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 4, p. 948–952, 2015.

TAYLOR, J. E.; THOMSON, J. A. Allelopathic activity of frond run-off from *Pteridium esculentum*. In: TAYLOR, J. A.; SMITH, R. T. (Eds.); **Bracken Biology and Management**. Occasional ed., p.203–208, 1990. Sydney, Australia: Australian Institute of Agricultural Science - AIAS.

WANG, H. H.; CHEN, B. J.; HSU, L. M.; et al. Allelopathic effects of bracken fern (*Pteridium aquilinum* L. Kuhn) in Taiwan. **Allelopathy Journal**, v. 27, n. 1, p. 97-110, 2011.

WEIDENHAMER, J. D.; CALLAWAY, R. M. Direct and indirect effects of invasive plants on soil chemistry and ecosystem function. **Journal of Chemical Ecology**, v. 36, n. 1, p. 59–69, 2010. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/3714770652285257/>>. Acesso em: 4/3/2012.

ZENG, R. SEN. Allelopathy - the solution is indirect. **Journal of Chemical Ecology**, p. 515–516, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24946747>>.

CAPITULO III

**SELLIGUEINA A COMO ALELOQUÍMICO DE *Pteridium arachnoideum* (Kaulf.)
Maxon. (DENNSTAEDTIACEAE): EVIDÊNCIAS EM ANÁLISES DE SOLO**

RESUMO

Pteridium aquilinum (Kaulf.) Maxon. é uma espécie pertencente ao clado das monilófitas, família Dennstaediaceae, conhecida popularmente como samambaião. É parte de um complexo de espécies difundido mundialmente, presente em todos os continentes, com exceção da Antártida. Muitos estudos sobre a fitoquímica de *Pteridium* spp. foram realizados devido ao interesse farmacêutico e toxicológico sobre as substâncias do seu metabolismo secundário. No entanto, pouco se conhece sobre o papel destes compostos na ecologia da planta. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a presença deste composto, selligueina A, no solo sob manchas de *P. arachnoideum*, sua concentração e sua interação com aspectos físico-químicos do solo. Os valores obtidos para a concentração deste composto no solo variaram entre 0,106 mM e 0,648 mM, com valores médios de 0,156 mM e 0,340 mM ao final da estação chuvosa e da estação seca, respectivamente. De acordo com resultados de potencial alelopático previamente reportados, selligueina A é encontrada na solução do solo em quantidade suficiente para potencialmente atuar sobre espécies co-ocorrentes, favorecendo a dominância de *P. arachnoideum*. A presença de *P. arachnoideum* em áreas de Cerrado altera condições químicas do solo, especialmente com relação à concentração do nutriente N e de Al, quando comparada à presença de braquiária (*U. decumbens*). Além disso, a concentração de Al se encontra correlacionada à massa de serrapilheira e à concentração de selligueina A nas áreas amostradas. Estes resultados corroboram a hipótese de alelopatia como mecanismo de dominância dessa planta nas áreas em que ocorre, com a primeira descrição de um aleloquímico para uma espécie do gênero *Pteridium*, que apresenta atividade não apenas por fitotoxicidade direta, mas também por ação indireta, ao controlar a concentração de Al nessas áreas.

Palavras-chave: Aleloquímico, tanino condensado, proantocianidina, cromatografia analítica.

1. INTRODUÇÃO

Pteridium aquilinum (Kaulf.) Maxon. é uma espécie pertencente ao clado das monilófitas, família Dennstaediaceae, conhecida popularmente como samambaião. É parte de um complexo de espécies difundido mundialmente, presente em todos os continentes, com exceção da Antártida (DER et al., 2009; GIL DA COSTA et al., 2012).

O samambaião produz grande biomassa de frondes, extensos rizomas e grande quantidade de serrapilheira. Comporta-se de forma oportunista, tirando vantagem de sua capacidade de armazenar grandes quantidades de carboidratos nos rizomas, que são resistentes ao fogo. É descrito como uma espécie pioneira agressiva de difícil manejo, invadindo áreas abandonadas ou recém-queimadas (MATOS; BELINATO, 2010; GIL DA COSTA et al., 2012), tendo se tornado uma importante espécie problema da Mata Atlântica e do Cerrado no Brasil (MATOS; BELINATO, 2010; MIATTO et al., 2011).

Vários mecanismos podem intermediar relações negativas entre plantas, influenciando sua coexistência e distribuição espacial, como interações mediadas por recursos e competição no sentido estrito, além de interações como a alelopatia (GREER et al., 2014; ORROCK et al., 2015). A alelopatia é definida como qualquer processo envolvendo metabólitos secundários que influenciem no crescimento e desenvolvimento de sistemas naturais e cultiváveis, podendo ser produzidos por plantas, algas, bactérias ou fungos, e incluindo efeitos positivos ou negativos (IAS, 2011). Os efeitos mais bem documentados das plantas sobre seu ambiente envolvem competição por recursos, principalmente por nutrientes do solo (WEIDENHAMER; CALLAWAY, 2010). No entanto, a alelopatia tem sido proposta como mediadora desses efeitos em ambientes naturais e agrícolas, com aplicação na ciência das plantas invasoras e controle de plantas daninhas (PETROSKI; STANLEY, 2009; INDERJIT et al., 2011).

Os aleloquímicos pertencem a diferentes classes químicas, podendo ser substâncias solúveis em água, liberadas diretamente no ambiente pelas plantas vivas por meio de exsudação radicular ou lixiviação, por intermédio da decomposição de resíduos vegetais ou ainda, por volatilização (ZENG, 2014; DUKE, 2015). Sua ação pode ser direta, como as alterações celulares e metabólicas, ou pode ser indireta, incluindo alterações sobre os organismos que habitam o solo e têm efeito sobre propriedades e características nutricionais de outras plantas (ROMEO, 2011; CIPOLLINI et al., 2012). Muitos compostos secundários

liberados no solo por plantas tem a função de aumentar a disponibilidade de nutrientes, e também podem apresentar atividade alelopática (INDERJIT et al., 2011). Os efeitos dos metabólitos produzidos por plantas invasoras sobre a geoquímica dos ecossistemas invadidos também podem representar vantagem competitiva destas sobre as plantas nativas, integrando os fatores envolvidos no processo de interferência (WEIDENHAMER; CALLAWAY, 2010).

O primeiro passo a ser tomado nos estudos em alelopatia é avaliar o potencial alelopático de uma planta por meio de experimentos que demonstrem que a alelopatia pode contribuir nos efeitos negativos observados em outras plantas. Em seguida, a identificação das substâncias com possível ação alelopática deve ser realizada, assim como a determinação dos modos de produção, liberação para o ambiente e quantificação da produção basal dessas substâncias pela planta doadora (BLAIR et al., 2008; DUKE, 2015). Graças aos avanços técnicos nas áreas de cromatografia e elucidção estrutural, foi possível o isolamento e a caracterização de vários compostos, permitindo o estudo de seus papéis fisiológicos e ecológicos (MACÍAS et al., 2007).

Muitos estudos sobre a fitoquímica de *Pteridium* spp. foram realizados devido ao interesse farmacêutico e toxicológico sobre as substâncias do seu metabolismo secundário. Animais que se alimentam de *P. aquilinum*, principalmente de frondes jovens, apresentam síndromes como deficiência de tiamina, envenenamento agudo, degeneração progressiva da retina e câncer do trato digestivo. Entre os compostos bioativos identificados nessas plantas encontram-se glicosídeos cianogênicos, taninos, flavonoides, derivados do ácido chiquímico, pterosinas e pterosídeos, entre os quais se destaca o ptaquilosídeo, responsável pelo efeito carcinogênico do consumo de *P. aquilinum* por animais (GIL DA COSTA et al., 2012). No entanto, pouco se conhece sobre o papel destes compostos na ecologia da planta (WEIDENHAMER; CALLAWAY, 2010).

Justificativa

Frente às novas evidências do papel da alelopatia como mecanismo de dominância de *P. arachnoideum* nas áreas em que se estabelece, com a identificação do composto fitotóxico selligueina A nas frondes verdes e serrapilheira dessa planta (JATOBA et al., submetido), faz-se necessário o estabelecimento da presença desse composto no ambiente, e sua disponibilidade em concentrações relevantes para inibir o desenvolvimento de espécies coexistentes em condições naturais (BLAIR et al., 2008; ROMEO, 2011; DUKE, 2015).

Hipóteses

Os compostos do metabolismo secundário com atividade fitotóxica produzidos por *P. arachnoideum* estão presentes no ambiente e disponíveis para agir sobre o desenvolvimento de espécies vegetais co-existentes.

Os compostos do metabolismo secundário com atividade fitotóxica produzidos por *P. arachnoideum* que se encontram presentes no ambiente alteram propriedades físico-químicas do solo, favorecendo seu estabelecimento e desenvolvimento.

Objetivos

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a presença de selligueina A no solo sob manchas de *P. arachnoideum*, avaliar a sua concentração e a sua interação com aspectos físico-químicos do solo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Equipamentos e Reagentes

Solventes e reagentes comerciais foram utilizados de acordo com a disponibilidade. Análise por cromatografia de camada delgada (CCD) foram realizadas utilizando placas Alugram RP-18 W/UV₂₅₄, eluídas com H₂O/metanol (MeOH) (5:2 v/v) ou H₂O/MeOH/Acetonitrila (ACN) (5:1:1 v/v). Após eluição, as placas foram reveladas por submersão em revelador *oleum* (ácido sulfúrico, água e ácido acético 1:4:20 v/v), seguido de aquecimento a 120 °C. Cromatografia em fase reversa foi realizada utilizando-se sílica gel derivatizada com grupo octadesilsilano (C18) Discovery® DSC-18 (Supelco, USA). Cromatografia *flash* foi realizada em equipamento CombiFlash Rf utilizando coluna RediSep Rf Gold C18 de 15.5 g (ambos Teledyne Isco), com fluxo de 15 mL m⁻¹ a 25°C. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) foi realizada em equipamento Waters Alliance 2695 acoplado a detector Waters 2995 PDA, utilizando coluna Luna 5 µm Phenyl-Hexyl (5 µm, 250 x 4,6 mm; Phenomenex), com volume de injeção de 15 µL, fluxo de eluição de 0,9 mL m⁻¹, a 25°C. Análises de espectrometria de massas (MS) foi realizado por CLAE-DAD acoplado a espectrômetro de massas (CLAE-DAD-MS) equipado com fonte de ionização por *electrospray* e analisador de massas de tipo triplo quadrupolo, Waters Quattro Premier T-Wave, nas mesmas condições especificadas anteriormente.

2.2. Preparação do Padrão Selligueina A

Selligueina A pura para utilização como padrão para a determinação de sua presença em extratos de amostra de solo foi obtida conforme descrito por Jatoba et al. (submetido). Serrapilheira de *Pteridium arachnoideum* foi coletada na área de Cerrado da da Universidade Federal de São Carlos, *campus* São Carlos, Estado de São Paulo (21°58'02.0" S, 047°52'09.9" O), ao final da estação seca. Uma exsicata da planta foi depositada no herbário do Departamento de Botânica da UFSCar (Voucher n° HUFSCAR8797). Levando-se em consideração a profundidade da camada de serrapilheira produzida por essa planta e os diferentes estágios de decomposição ao longo do perfil de deposição, foram coletadas as folhas mortas presentes nas camadas superficiais. O material foi triado para descarte das frondes visualmente atacadas por fungos, lavado e seco em casa de vegetação (17 – 43 °C) até atingir massa constante (190 h). Após secagem, o material vegetal foi triturado em moinho elétrico e o pó resultante foi utilizado para a obtenção dos extratos.

A extração inicial do material vegetal foi realizada misturando-se 100 g de pó vegetal e 500 mL de cada solvente utilizado. Primeiramente, foi realizada a extração com hexano (Hex) para a retirada de ceras e gorduras, em banho de ultrassom por 15 minutos. Após filtração a vácuo, o processo foi repetido por outras quatro vezes com o solvente Hex. Em seguida, foram realizadas cinco extrações com acetato de etila (AcOEt), como descrito anteriormente. O extrato AcOEt foi submetido à análise de CCD e submetido à cromatografia em fase reversa.

A cromatografia em fase reversa foi realizada com sílica gel (C18) em placa filtrante acoplada a kitasato e bomba de vácuo, eluída com gradiente de metanol em água (água pura; H₂O/MeOH 5:1, 5:2, 5:3, 5:4 v/v; MeOH puro), seguido por diclorometano (DCM) puro para a eluição de substâncias apolares (MIRANDA et al., 2015). Ao final do processo, foram obtidas sete frações, submetidas a análise de CCD e reunidas de acordo com sua similaridade, resultando em quatro frações finais (PaS-1 a PaS-4). A fração PaS-4 (0,180 g; DCM) foi descartada, por apresentar-se majoritariamente composta por substâncias apolares e clorofila, de acordo com análise por CCD.

Uma alíquota (0,122 g) da fração PaS-1 (0,964 g; H₂O/MeOH 1:0 – 5:3 v/v) foi utilizada para o isolamento de selligueina A (JATOBA et al., submetido), a partir da otimização do isolamento em cromatografia *flash*. Assim, a alíquota da fração PaS-1 foi submetida a cromatografia *flash* de fase reversa (C18), com monitoramento UV a 214 nm e eluição em gradiente de MeOH (solvente B) em água (solvente A). O gradiente foi desenvolvido como

segue: 0 – 10 minutos, aumento linear de 0% - 10% de B; 10 – 20 minutos, aumento linear de 10% - 40% de B; 20 – 30 minutos, aumento linear de 40% - 70% de B; 30 – 45 minutos, aumento linear de 70% - 100% de B. O composto selligueina A foi coletado como um pico em 22 min (40% de B; H₂O/MeOH 5:2 v/v).

2.3. Desenho Amostral

Solo e biomassa foram coletados sob dois bancos de *Pteridium arachnoideum* na reserva de Cerrado da UFSCar, São Carlos, São Paulo (21°58'02.0" S, 047°52'09.9" W). Em cada banco de *P. arachnoideum* foram estabelecidas cinco parcelas aleatórias de 0,25 m² (0,50 x 0,50 m), com distância mínima de 2 m entre parcelas (Tabela 3.1). A distância entre as parcelas e a borda entre vegetação e o aceiro mais próximo foram medidas. De cada parcela foram coletadas toda a cobertura do solo, triadas para separação entre biomassa verde e serrapilheira, e entre material vegetal de *P. arachnoideum* e de outras espécies vegetais coexistentes. Para isso, foi considerado como biomassa verde todo material vegetal de coloração verde ainda anexado à haste central da planta ereta e verde. A serrapilheira foi considerada como todo material vegetal seco, de coloração acinzentada ou marrom, totalmente separado da haste central da planta ereta e verde, ou ainda anexado à haste central de uma planta caída e acinzentada / marrom. Frondes parcialmente verdes, anexadas ou não à haste da planta ereta, foram classificadas como biomassa verde.

Para cada parcela também foram coletadas quatro sub-amostras de solo superficial, combinadas a fim de resultarem em uma única amostra composta de solo por parcela (YANG et al., 2010; CALLAWAY et al., 2011). As coletas foram realizadas ao final da estação chuvosa e ao final da estação seca. Outras duas áreas dominadas por *Urochloa decumbens* também foram amostradas para coleta de solo, da mesma forma descrita anteriormente. Assim, foram realizadas ao todo 20 amostragens para áreas dominadas por *P. arachnoideum*, 20 amostragens para áreas dominadas por *U. decumbens*, sendo 10 amostras para cada categoria em cada estação do ano (Figura 3.1).

Tabela 3.1. Coordenadas geográficas de localização dos pontos de coleta de solo.

<i>Pteridium arachnoideum</i>		<i>Urochloa decumbens</i>	
Estação chuvosa	Estação seca	Estação chuvosa	Estação seca
21°58'01.7" S 047°52'10.3" O	21°58'03.3" S 047°52'16.3" O	21°58'11.1" S 047°51'51.4" O	21°58'19.3" S 047°51'85.9" O
21°58'01.7" S 047°52'10.2" O	21°58'0.30 S" 047°52'16.6" O	21°58'11.5" S 047°51'51.3" O	21°58'19.3" S 047°51'85.4" O
21°58'02.0" S 047°52'09.8" O	21°58'03.3" S 047°52'16.8" O	21°58'11.9" S 047°51'51.2" O	21°58'19.7" S 047°51'85.0" O
21°58'02.1" S 047°52'09.8" O	21°58'03.0" S 047°52'17.3" O	21°58'11.7" S 047°51'50.8" O	21°58'20.8" S 047°51'84.8" O
21°58'01.9" S 047°52'09.9" O	21°58'04.1" S 047°52'16.4" O	21°58'12.0" S 047°51'50.8" O	21°58'19.9" S 047°51'83.9" O
21°58'19.3" S 047°52'14.0" O	21°58'32.0" S 047°52'22.9" O	21°58'01.9" S 047°51'43.0" O	21°58'03.1" S 047°51'72.6" O
21°58'19.3" S 047°52'14.2" O	21°58'31.9" S 047°52'23.6" O	21°58'01.8" S 047°51'42.2" O	21°58'02.9" S 047°51'72.1" O
21°58'20.8" S 047°52'13.9" O	21°58'33.4" S 047°52'23.1" O	21°58'01.8" S 047°51'42.0" O	21°58'02.6" S 047°51'71.2" O
21°58'33.2" S 047°52'23.6" O	21°58'33.9" S 047°52'23.2" O	21°58'01.6" S 047°51'41.6" O	21°58'03.1" S 047°51'69.2" O
21°58'33.7" S 047°52'24.0" O	21°58'33.3" S 047°52'23.7" O	21°58'01.8" S 047°51'40.9" O	21°58'04.5" S 047°51'68.1" O



Figura 3.1. Localização das manchas de *P. arachnoideum* e *U. decumbens* sob as quais foram coletadas amostras de solo para análise. Balões assinalados com a letra P (azuis) indicam áreas dominadas por *P. arachnoideum*. Balões assinalados com a letra B (amarelos) indicam áreas

dominadas por *U. decumbens* (braquiária). Os limites da reserva de Cerrado da UFSCar encontram-se marcados em laranja. Fonte: Google Earth.

A biomassa verde e de serrapilheira foram triadas para separação entre material vegetal de *P. arachnoideum* e de outras espécies vegetais, e seca em estufa de circulação forçada de ar a 90°C por 72 h para avaliação da biomassa seca (BERTHOLDSSON, 2011).

Amostras superficiais de solo (15 cm de profundidade) foram coletadas sob dois bancos de *P. arachnoideum* e dois bancos de *Urochloa decumbens*. As amostras de solo foram acondicionadas em sacos plásticos para alimentos e prontamente transportadas para o laboratório e triadas para retirada de fragmentos visíveis de raízes, folhas, pedras, artrópodes ou outros materiais estranhos ao solo a ser extraído, e separado em alíquotas para realização das diferentes análises.

Para cada amostra de solo, uma alíquota de aproximadamente 200 g foi acondicionada em sacos plásticos para alimentos e enviada para realização de análises de parâmetros físico-químicos do solo. Estas análises foram realizadas pelo Laboratório de Solos e pelo Laboratório de Física do Solo da UFSCar, Araras, São Paulo. Estas análises incluíram medidas de pH, caracterização física (proporção areia, silte e argila) e teor de nutrientes do solo (nitrogênio, fósforo, cálcio, magnésio, matéria orgânica total e alumínio) (adaptado de YANG et al., 2010).

Para as amostras de solo coletadas sob *P. arachnoideum*, uma outra alíquota de 50 g de solo de cada amostra foi acondicionada em sacos plásticos para alimentos tipo “zip-lock” e mantidas congeladas (< -20°C) até a realização da extração para quantificação de selligueína A (SAMPIETRO et al., 2009). Uma terceira alíquota de aproximadamente 30 g foi utilizada para avaliação gravimétrica do teor de umidade de cada uma dessas amostra. Para esta análise, o solo de cada amostra foi pesado em balança analítica e acondicionado em estufa a 105°C por 24h. Após este período, as amostras foram novamente pesadas e o teor de umidade foi calculado como a porcentagem da diferença da massa da amostra antes e depois da secagem em estufa (YANG et al., 2010).

Uma coleta de solo independente foi realizada no início da estação seca sob um banco de *P. arachnoideum* na mesma área descrita anteriormente. Foram coletadas quatro amostras independentes, e distantes entre si ao menos dois metros (ESQ-1–ESQ-4). Estas amostras foram triadas como previamente descrito e imediatamente extraídas para as análises preliminares da presença de selligueína A no solo sob *P. arachnoideum*.

2.4. Extração e Análises Preliminares dos Extratos de Solo

As amostras de solo foram extraídas utilizando 50 g de solo fresco e 200 mL de MeOH, sob agitação em agitador orbital (120 rpm) por 18 h (SAMPIETRO et al., 2009). Após este período, o extrato foi filtrado em papel de filtro qualitativo e seco sob fluxo contínuo de ar. O extrato seco foi re-suspendido em MeOH e filtrado com o uso de filtro de seringa Minisart® (hidrofílico, acetato de celulose, 28 mm, diâmetro de poro de 0,2- μ m, Sartorius Stedim Biotech) para remoção de partículas finas em suspensão e secos novamente sob fluxo contínuo de ar. Para a análise da presença de selligueina A nos extratos, estes foram solubilizados em 4 mL de MeOH e analisados por CCD (eluição com H₂O/MeOH 5:2 v/v) e CLAE-DAD. A análise por CLAE-DAD foi realizada utilizando eluição em gradiente com quantidades crescentes de ACN (solvente B) em água (solvente A), com o seguinte perfil: 0–20 min, aumento linear de 20–30% de B; 20–25 min, aumento linear de 30–100% de B; 25–30 min, aumento linear de 100–20% de B. As análises foram realizadas por injeções independentes e subsequentes do padrão selligueina A isolado a partir da serrapilheira de *P. arachnoideum* e dos extratos de solo.

A partir destas análises preliminares, o método cromatográfico foi otimizado para o seguinte perfil de eluição em gradiente: 0–5 min, aumento linear de 20–30% de B; 5–10 min, aumento linear de 30–40% de B; 10–15 min, aumento linear de 40–50% de B; 15–20 min, aumento linear de 50–100% de B.

Os extratos de solo coletados para quantificação de selligueina A e mantidos congelados foram descongelados em geladeira (4°C) por 24 horas e extraídos como descrito anteriormente.

2.5. Quantificação de Selligueina A no Solo

2.5.1. Curva analítica de padronização interna

Uma curva analítica de padronização interna foi estabelecida para a quantificação do composto selligueina A nos extratos de solo. Para isso, uma solução padrão de concentração conhecida do padrão interno quercetina (10 μ g mL⁻¹) foi preparada, à qual foram adicionadas concentrações conhecidas e variáveis do composto de interesse selligueina A. As avaliações foram realizadas em triplicata para cada concentração do composto de interesse (50; 100; 200; 400; 700 e 1400 μ g mL⁻¹) (RIBANI et al., 2004; GOUVEA et al., 2012). As soluções foram analisadas por CLAE-DAD com método cromatográfico otimizado, conforme descrito anteriormente. Para cada injeção foram calculadas as integrais das áreas sob a curva dos picos de selligueina A (10 min) e quercetina (13 min) observados a 272 nm. A curva

analítica foi então calculada por regressão linear, relacionando a razão de áreas dos picos do composto de interesse e do padrão interno com as concentrações do composto de interesse usadas nas análises, cuja qualidade do ajuste da reta é descrita pelo coeficiente de correlação (r^2 ; Figura 3.2, Equação 1) (RIBANI et al., 2004).

$$y = 0,001 x + 0,0066 \quad (1)$$

Onde y indica a razão entre a integral dos picos de selligueina A e do padrão interno quercetina, observados a 272 nm, e x indica a concentração de selligueina A ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

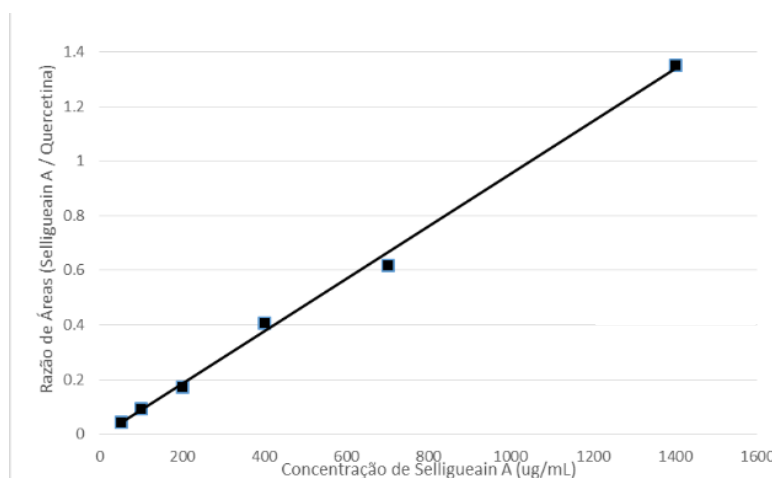


Figura 3.2. Curva analítica de padronização interna utilizada para quantificação de selligueina A em extratos de solo.

O valor do coeficiente de correlação para esta curva foi de $r^2 = 0,9972$, indicando um ajuste adequado para a finalidade de quantificação de selligueina A por padronização interna com quercetina.

2.5.2. Limites de Detecção e de Quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) da curva analítica de padronização interna foram calculados pelo método baseado em parâmetros da curva analítica, conforme descrito nas equações (2) e (3) (RIBANI et al., 2004).

$$LD = 3,3 \times \frac{S}{a} \quad (2)$$

$$LQ = 10 \times \frac{S}{a} \quad (3)$$

Onde S = estimativa do desvio-padrão da resposta, determinada pela estimativa do desvio-padrão do coeficiente linear da equação da reta da curva analítica; e a = coeficiente angular da curva analítica.

Os valores obtidos para ambos os parâmetros foi de $LD = 51,52 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $LQ = 156,11 \mu\text{g mL}^{-1}$. Assim, foram desprezados os resultados obtidos para as amostras em que o valor calculado para a concentração de selligueina A em extrato reconstituído foi menor que o valor de LQ.

2.5.3. Cálculo da concentração final de selligueina A no solo

Para quantificação de selligueina A nos extratos de solo, estes foram solubilizados com 4 mL de solução de quercetina em MeOH ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) para análise por CLAE-DAD utilizando o mesmo método cromatográfico adotado para estabelecimento da curva analítica de padronização externa, conforme descrito anteriormente. As análises dos extratos de solo foram realizadas em triplicata, com injeções independentes e subsequentes dos extratos obtidos para as diferentes parcelas e épocas de coleta.

A concentração de selligueina A no solo por grama de solo seco ($\mu\text{g g}^{-1}$) foi calculada de acordo com a Equação (4) (SAMPIETRO et al., 2009):

$$C_s = (C_{es} \times V_{MeOH}) / (M_{sf} - W) \quad (4)$$

Onde C_s = concentração de selligueina A no solo por grama de solo seco ($\mu\text{g g}^{-1}$); C_{es} = concentração de selligueina A no extrato analisado por CLAE-DAD, de acordo com a curva de calibração de padronização externa ($\mu\text{g mL}^{-1}$); V_{MeOH} = volume de MeOH utilizado na reconstituição do extrato para injeção (4 mL); M_{sf} = massa de solo fresco utilizado na extração (50 g); W = teor de umidade da amostra de solo extraída, medida por avaliação gravimétrica.

A concentração final de selligueina A nas amostras de solo foi então calculada como concentração molar, de acordo com a Equação (5):

$$C_{Ms} = [C_s \times (M_{sf} - W) / M_s] / W \quad (5)$$

Onde C_{Ms} = concentração molar de selligueina A na amostra de solo (mM); C_s = concentração de selligueina A no solo por grama de solo seco ($\mu\text{g g}^{-1}$); M_{sf} = massa de solo fresco utilizado na extração (50 g); W = teor de umidade da amostra de solo extraída, medida por avaliação gravimétrica; M_s = massa molar da selligueina A em daltons (816 Da).

2.5.4. Ensaios de Recuperação

Uma curva analítica de padronização externa foi estabelecida a fim de avaliar o fator de recuperação do composto substituto (*surrogate*) quercetina nos ensaios de recuperação. Para tanto, soluções metanólicas em seis concentrações diferentes de quercetina foram preparadas nas concentrações de 45, 100, 300, 500, 700 e 900 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As soluções foram analisadas por CLAE-DAD conforme descrito anteriormente, e a curva analítica de

padronização externa foi calculada como um gráfico relacionando a área do pico do composto substituto (quercetina) com as concentrações usadas nas análises, obtido por meio de regressão linear (Equação 6, Figura 3.3) (RIBANI et al., 2004).

$$y = 1066,3 x - 25769 \quad (6)$$

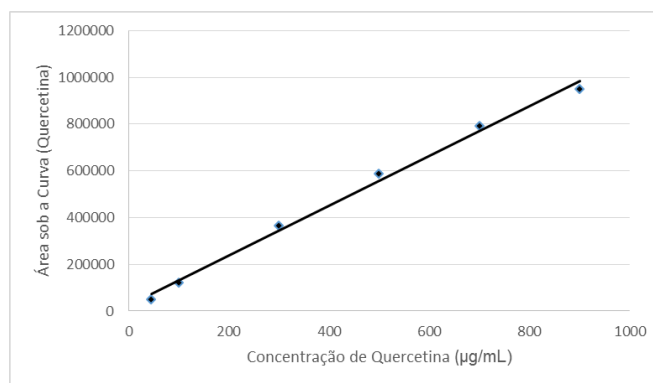


Figura 3.3. Curva analítica de padronização externa utilizada para cálculo da concentração de quercetina em extratos de solo nos ensaios de recuperação.

O valor do coeficiente de correlação para esta curva foi de $r^2 = 0,9947$, indicando um ajuste adequado para a finalidade de quantificação de quercetina por padronização externa nos ensaios de recuperação.

Os valores de LD e LQ foram calculados para esta curva analítica conforme descrito anteriormente para a curva analítica de padronização interna. Os valores obtidos para ambos os parâmetros foi de $LD = 16,02 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $LQ = 48,54 \mu\text{g mL}^{-1}$.

O fator de recuperação (R) do método de extração adotado foi calculado como a proporção em porcentagem da quantidade do composto substituto quercetina adicionado em solo livre de selligueain A, extraído e quantificado por este método (Equação 7). Para isso, ensaios de extração foram realizados conforme descrito anteriormente, em triplicata, com fortificação (*spiking*) nas amostras de solo de 50, 100 e 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (1, 2 e 10 vezes o valor do limite de quantificação da curva de padronização externa), expresso como concentração em extrato reconstituído (RIBANI et al., 2004; WANG et al., 2011).

$$R = \frac{Qq}{Qa} \quad (7)$$

Onde Qq = quantidade de quercetina quantificada após extração; Qa = quantidade de quercetina adicionada ao solo a ser extraído. Medidas obtidas como concentração em extrato reconstituído ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

O solo utilizado como porção analítica desses ensaios de recuperação consistiu de solo coletado sob manchas de *P. arachnoideum*, armazenado em sacos plásticos para

alimentos e acondicionado sob refrigeração por 18 meses. No período de armazenamento, a selligueina A do solo foi degradada pela microbiota natural do solo, não sendo mais detectável por análise CLAE-DAD quando extraído pelo método descrito anteriormente.

Valores aceitáveis para o fator de recuperação (R) estarão compreendidos entre 85 e 110%, com precisão de até $\pm 20\%$ (RIBANI et al., 2004). Os valores calculados para R foram de 98,41%, 92,57% e 86,28% para as concentrações de 50, 100 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Estes são valores considerados aceitáveis e representam a exatidão do método de extração e quantificação aqui empregados (RIBANI et al., 2004).

2.6. Análise Estatística

Os resultados foram submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk, $\alpha = 0,05$) e homocedasticidade (Levene, $\alpha = 0,05$). Tendo sido observada não normalidade de muitos grupos de dados, optou-se por realizar as análises de comparação entre médias por testes não-paramétricos. A análise estatística dos dados obtidos para as concentrações de selligueina A no solo coletado na estação chuvosa e na estação seca foram submetidos ao teste de Mann-Whitney para comparação entre médias ($\alpha = 0,05$). A análise dos dados de características físico-químicas do solo coletado sob *P. arachnoideum* e sob *U. decumbens* nas diferentes estações de coleta foi realizado pelo teste de Kruskal-Wallis ($\alpha = 0,05$) seguido pelo teste de Mann-Whitney para comparação entre médias ($\alpha = 0,05$).

As análises da relação entre fatores biológicos e a concentração de selligueina A no solo sob *P. arachnoideum*, assim como a influência da sua concentração sobre parâmetros físico-químicos do solo foram realizadas por análise de correlação linear de Pearson (r), seguida pelo teste de significância t ($\alpha = 0,05$). Para os resultados com correlação significativa também foram estabelecidos os modelos de regressão linear simples pelo método dos mínimos quadrados, sendo o intervalo de confiança de 95% calculado pelo método de bootstrap. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software Past 3.11 (HAMMER et al., 2001).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análises Preliminares

A análise preliminar do padrão selligueina A isolado da serrapilheira de *P. arachnoideum* e das amostras de solo ESQ-1 a ESQ-4 por CLAE-DAD-MS apresentou este composto como um pico cromatográfico em 17.50 min (H₂O/ACN 5:2 v/v; Figura 3.4), com

absorção UV em 272 nm e adutos de relação massa / carga m/z 839 $[M+Na]^+$ e m/z 855 $[M+K]^+$ (Figura 3.5). Não foi possível encontrar o íon $[M+H]^+$ pelo método utilizado.

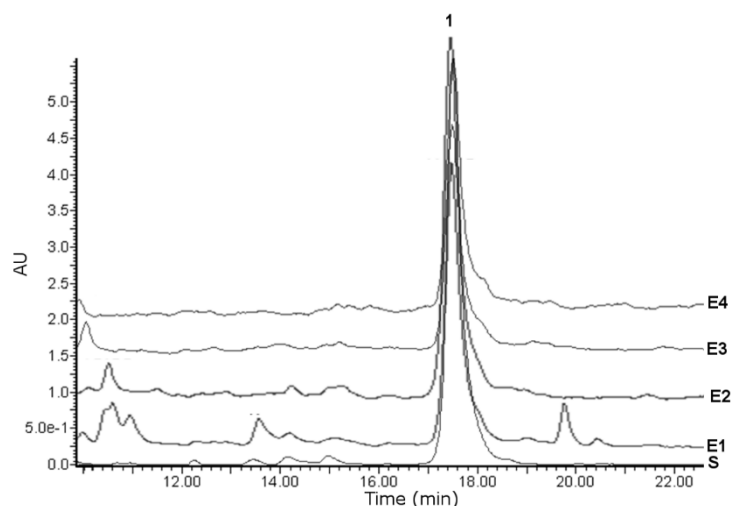


Figura 3.4. Cromatogramas de extratos de solo coletado sob manchas de *P. arachnoideum* para análise preliminar. (S) Padrão de selligueina A isolada da serrapilheira de *P. arachnoideum*; (E1) Amostra de solo ESQ-1; (E2) Amostra de solo ESQ-2; (E3) Amostra de solo ESQ-3; (E4) Amostra de solo ESQ-4; (1) Pico de selligueina A em 17.50 minutos.

Assim, o composto selligueina A foi identificado no solo sob *P. arachnoideum* nas quatro amostras independentes coletadas, como um dos compostos majoritários na solução do solo (Figura 3.4). Metabólitos secundários produzidos por plantas são liberados no ambiente por diversos mecanismos. Dentre eles, a lixiviação de frondes verdes e serrapilheira, e decomposição de serrapilheira são os mais prováveis meios envolvidos na liberação no ambiente de selligueina A por *P. arachnoideum* (ZENG, 2014).

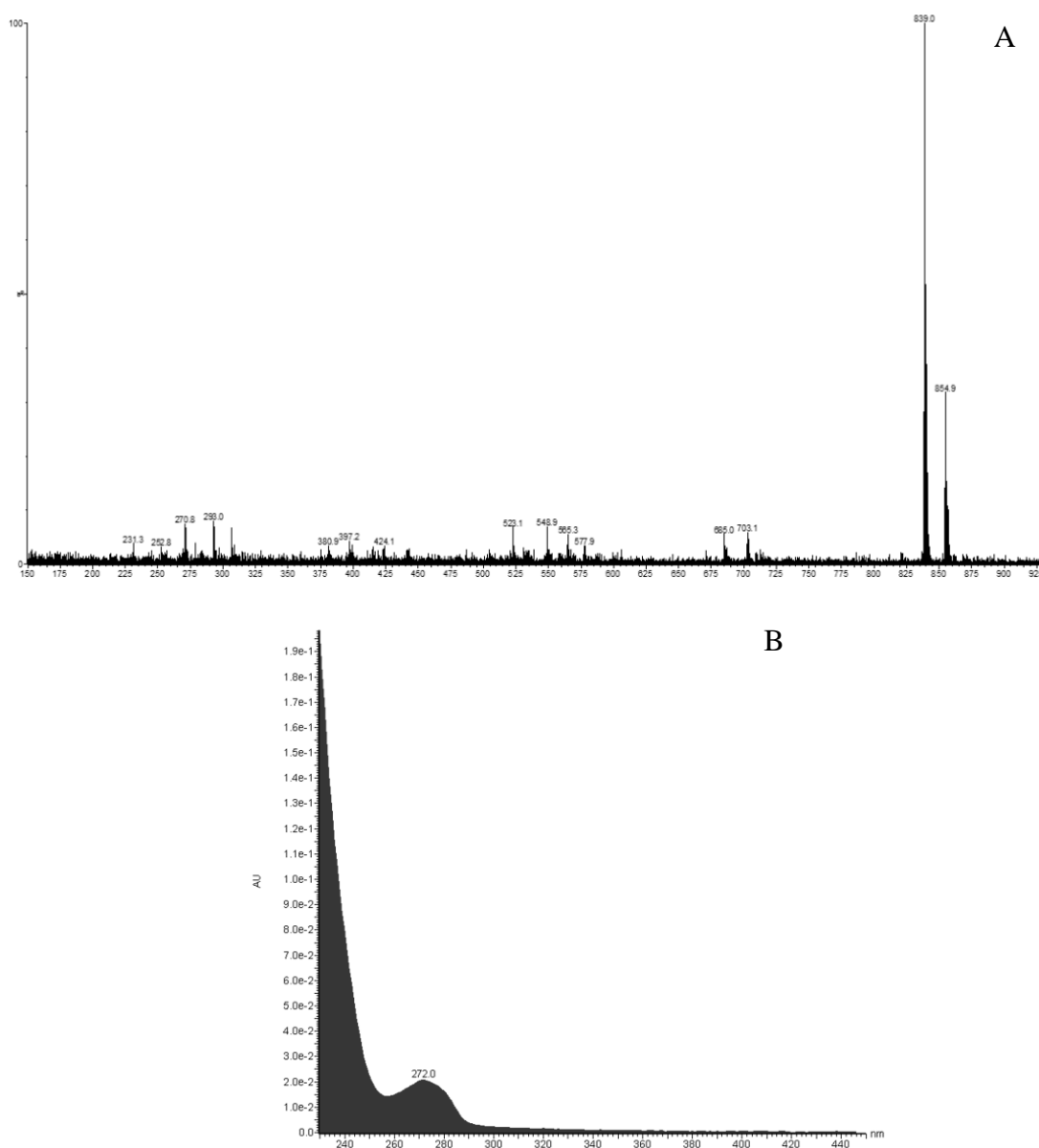


Figura 3.5. Espectro de massas em modo *full scan* (A) e absorção UV (B) do pico correspondente à selligueina A.

Os resultados aqui reportados corroboram mais uma vez a hipótese de alelopatia em plantas do gênero *Pteridium*, com a identificação de um tanino condensado, um composto polifenólico, produzido nas frondes verdes de *P. arachnoideum*, presente em sua serrapilheira como metabólito secundário majoritário e presente no solo sob as áreas dominadas por esta planta.

3.2. Quantificação de Selligueina A no Solo sob *P. arachnoideum*

Análises quantitativas das amostras de solo coletadas sob *P. arachnoideum* foram realizadas a fim de compreender a relação entre a biomassa da planta, a concentração de selligueina A no solo e fatores físico-químicos do solo, em diferentes estações. Para isso, utilizou-se o método de quantificação por CLAE-UV com curva analítica de padronização interna, avaliando-se os cromatogramas obtidos a 272 nm. A Figura 3.6 apresenta o cromatograma obtido para a solução de quercetina a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ e um cromatograma representativo daqueles obtidos para os extratos de solo solubilizados com esta solução de quercetina. O pico referente à quercetina foi identificado em 13 minutos, a partir da análise do espectro de massas (m/z 303 $[\text{M}+\text{H}]^+$) e da absorção UV (253 nm e 366 nm) característicos (Figura 3.7) (DAY et al., 2000; VACEK et al., 2013).

A partir da análise quantitativa dos extratos de amostras de solo coletadas sob manchas de *P. arachnoideum* foram calculadas as concentrações molares (mM) de selligueina A na solução do solo para cada parcela, em cada estação de coleta. Os valores obtidos nesta análise variaram entre 0,106 mM e 0,648 mM. Os dados de distribuição da frequência relativa das classes de concentração de selligueina A no solo nas diferentes estações de coleta (Tabela 3.2) apresentam uma maior frequência de distribuição entre 0,1 e 0,2 mM (71,43%) ao fim da estação chuvosa, enquanto essa distribuição mostra-se mais uniforme e abrangendo classes de concentração maiores ao final da estação seca. Os valores médios encontrados para as amostras coletadas ao final da estação chuvosa ($0,156 \pm 0,045$ mM) foram significativamente diferentes daqueles encontrados ao final da estação seca ($0,343 \pm 0,15$ mM), de acordo com o teste de Mann-Whitney ($z_c = 2,4765$; $p = 0,0133$).

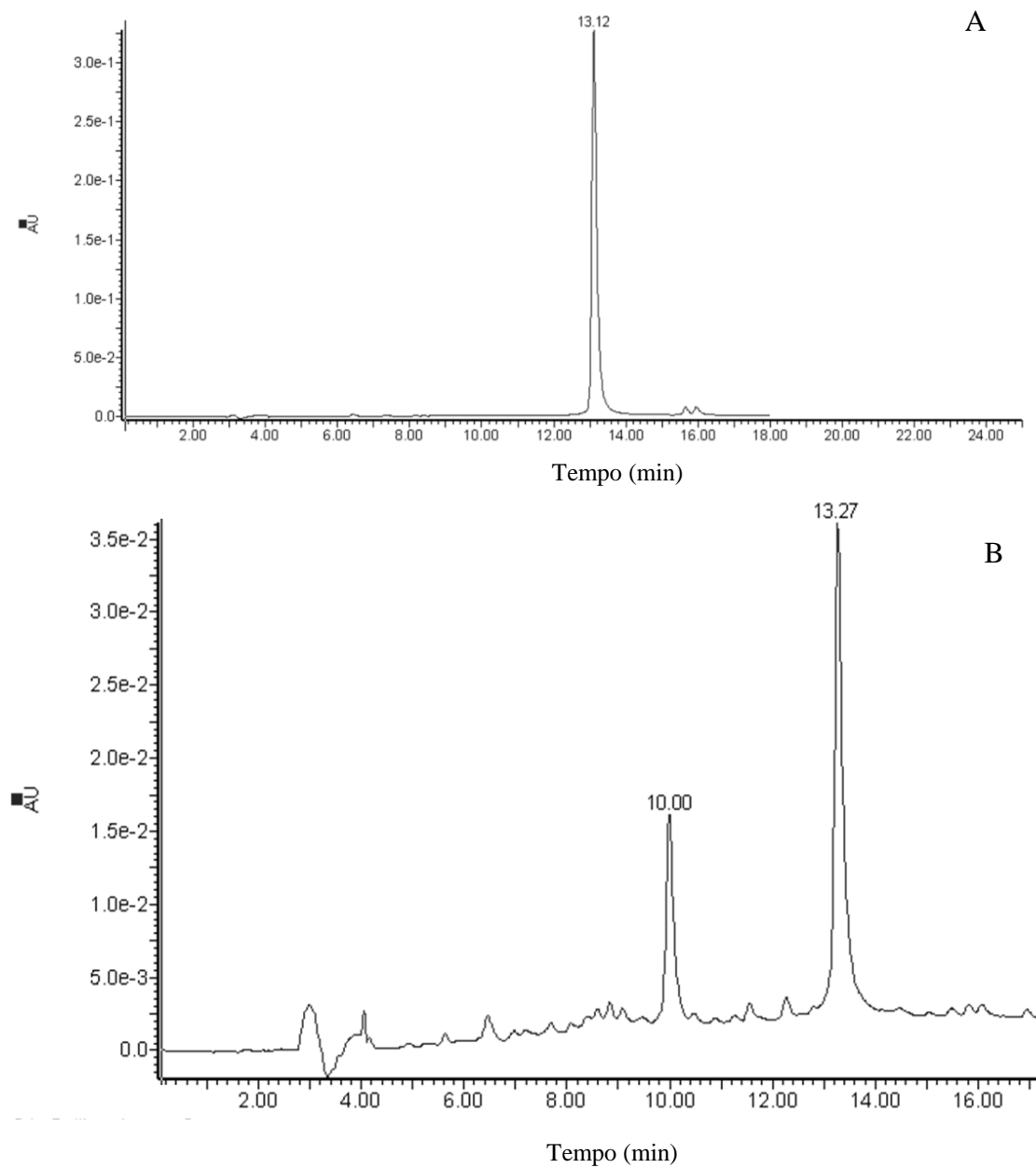


Figura 3.6. Cromatogramas de solução metanólica de quercetina a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (A) e de extrato de solo solubilizado com solução metanólica de quercetina a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (B).

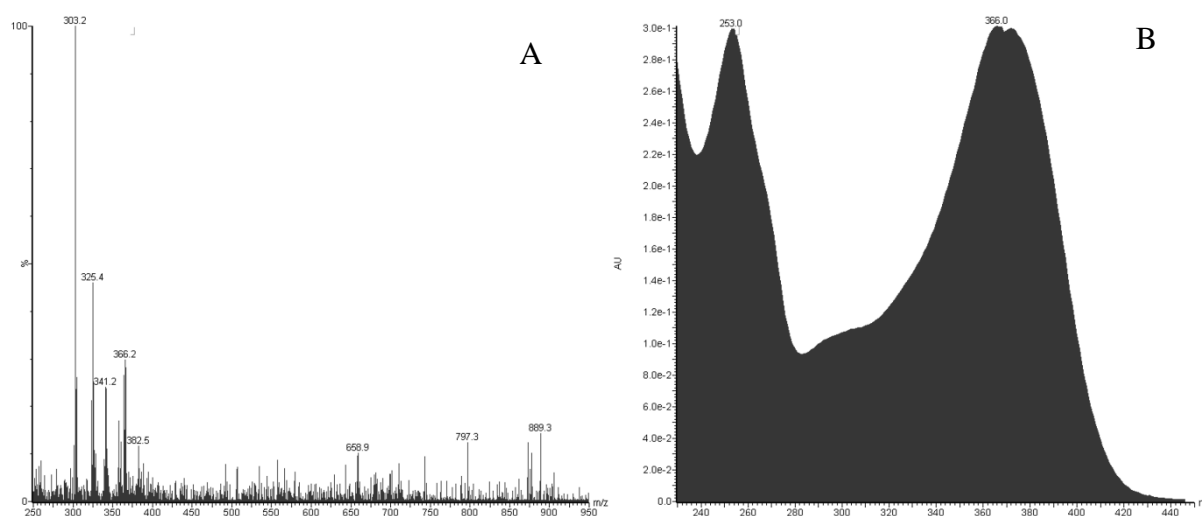


Figura 3.7. Espectro de massas em modo *full scan* (A) e absorção UV (B) do pico correspondente à quercetina.

Tabela 3.2. Frequência relativa (%) das classes de concentração de selligueina A (mM) no solo sob *P. arachnoideum* ao final da estação chuvosa e ao final da estação seca.

Concentração de Selligueina A (mM)	Estação Chuvosa	Estação Seca
0,01 - 0,1	0,00	0,00
0,1 - 0,2	71,43	14,29
0,2 - 0,3	28,57	28,57
0,3 - 0,4	0,00	28,57
0,4 - 0,5	0,00	14,29
0,5 - 0,6	0,00	0,00

Dentre os fenômenos que podem explicar a variação sazonal observada para a concentração de selligueina A no solo sob *P. arachnoideum*, encontram-se quelação por partículas do solo (SAMPIETRO et al., 2009), degradação por microrganismos (LOU et al., 2015) ou lixiviação (ZENG, 2014). O solo do Cerrado, caracterizado por sua origem em rochas muito antigas e sedimentos marinhos do Proterozóico, e por alto intemperismo, apresenta-se como ácido e pobre em nutrientes, rico em óxidos de ferro e alumínio, é profundo e muito bem drenado. Estes solos arenosos apresentam-se pobres em partículas eletricamente carregadas que favoreceriam a quelação de aleloquímicos (PEIXOTO et al., 2010; ZINN; LAL, 2013). A alta solubilidade em água da selligueina A, observada em estudos preliminares (dados não publicados), e a maior atividade da microbiota do solo do Cerrado durante a estação chuvosa

(PIVELLO et al., 2010; SILVA et al., 2012), apontam para a biodegradação e a lixiviação deste metabólito pela água percolante para camadas mais profundas do solo como os possíveis mecanismos responsáveis pela menor concentração de selligueina A observada na solução do solo durante a estação chuvosa.

Potencial alelopático foi observado para fração enriquecida em polifenóis da serrapilheira de *P. arachnoideum* sobre espécies bioindicadoras e de gramíneas do Cerrado. Para essas espécies foi observada inibição do desenvolvimento inicial da raiz e parte aérea, além de diminuição do tamanho das células do metaxilema de gergelim (*Sesamum indicum*) e do conteúdo de clorofila em gergelim e capim-rabo-de-raposa (*Setaria parviflora*) (JATOBA et al., em preparação). Também foi observado o potencial alelopático do principal metabólito presente nesta fração, selligueina A, sobre o desenvolvimento inicial da espécie bioindicadora gergelim. Dentre os parâmetros avaliados, houve inibição do desenvolvimento da parte aérea e raiz destas plantas nas concentrações de 1 mM a 0,03 mM, e redução do tamanho das células do metaxilema da raiz destas plantas nas concentrações de 1 mM e 0,3 mM. Esta faixa de concentração compreende a encontrada na solução do solo sob *P. arachnoideum*, tanto ao final da estação chuvosa quanto ao final da estação seca. Assim, o aleloquímico selligueina A é encontrado na solução do solo em quantidade suficiente para potencialmente atuar sobre espécies co-ocorrentes, contribuindo para a dominância de *P. arachnoideum* nas áreas onde ocorre.

3.3. Análises de Parâmetros Físico-Químicos do Solo

A fim de compreender se a presença de *P. arachnoideum* e seus metabólitos secundários influenciaria em aspectos físico-químicos do solo, sub-amostras de solo coletado em cada parcela sob manchas de *P. arachnoideum* foram analisadas quanto a aspectos físicos (proporção areia, silte e argila) e químicos (umidade, pH, matéria orgânica, K, Ca, Mg, P, N, e Al). Da mesma forma, amostras coletadas em parcelas em áreas sob manchas de *U. decumbens* também foram analisadas.

Os resultados destas análises mostraram a ausência de diferenças significativas das propriedades físicas do solo entre as duas espécies e as duas estações de coleta. Porém, para as propriedades químicas do solo, foram observadas diferenças significativas para todos os parâmetros avaliados (Tabela 3.3).

Tabela 3.3. Parâmetros físicos e químicos¹ de amostras de solo coletadas sob manchas de *P. arachnoideum* e *U. decumbens* ao fim da estação chuvosa e ao fim da estação seca.

	<i>P. arachnoideum</i>		<i>U. decumbens</i>		Estatística ²
	Estação Chuvosa	Estação Seca	Estação Chuvosa	Estação Seca	$X^2 (p)$
Areia (%)	64,90 ± 9,65 a	69,80 ± 4,92 a	72,30 ± 3,40 a	70,30 ± 2,90 a	5,432 (0,12)
Silte (%)	6,00 ± 1,70 a	5,00 ± 1,76 a	5,20 ± 2,39 a	5,10 ± 1,06 a	6,993 (0,06)
Argila (%)	29,90 ± 8,10 a	25,20 ± 4,44 a	23,50 ± 3,41 a	24,40 ± 6,11 a	6,876 (0,0572)
Umidade (%)	15,32 ± 2,68 b	13,42 ± 2,13 b	8,74 ± 1,94 a	8,36 ± 2,53 a	27,77 (4,06 x 10 ⁻⁶)
M.O. (g dm ⁻³)	9,89 ± 2,68 c	8,23 ± 1,04 bc	7,24 ± 1,27 ab	6,15 ± 1,20 a	19,90 (1,78 x 10 ⁻⁴)
pH	4,76 ± 0,31 a	4,66 ± 0,18 a	4,96 ± 0,63 a	5,61 ± 0,65 b	17,73 (4,29 x 10 ⁻⁴)
K (mM dm ⁻³)	1,83 ± 0,31 c	0,87 ± 0,20 a	1,49 ± 0,73 b	1,91 ± 0,90 bc	26,47 (6,86 x 10 ⁻⁶)
Ca (mM dm ⁻³)	3,66 ± 2,97 ab	5,02 ± 0,64 c	2,07 ± 1,68 a	7,52 ± 8,12 bc	13,03 (0,0046)
Mg (mM dm ⁻³)	2,24 ± 0,65 b	1,70 ± 0,36 a	3,72 ± 0,83 c	3,33 ± 0,57 c	20,23 (1,52 x 10 ⁻⁴)
P (mM dm ⁻³)	2,00 ± 0,47 b	2,00 ± 0,24 b	1,87 ± 0,23 a	6,00 ± 0,63 c	19,78 (1,17 x 10 ⁻⁴)
N (mM dm ⁻³)	1607,14 ± 185,80 c	1360,00 ± 194,08 c	238,00 ± 43,41 a	833,33 ± 81,65 b	31,41 (6,34 x 10 ⁻⁷)
Al (mM dm ⁻³)	11,05 ± 1,82 b	21,45 ± 2,55 c	5,51 ± 0,75 a	5,87 ± 0,95 a	33,1 (3,01 x 10 ⁻⁷)

Médias na mesma linha acompanhadas das mesmas letras não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

¹ Média ± desvio-padrão.

² X^2 = Estatística H do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis; p = probabilidade.

Dentre os parâmetros avaliados, as concentrações de K, Ca, Mg e Al no solo variaram sazonalmente nas áreas dominadas por *P. arachnoideum*, comportamento não observado para as áreas dominadas por braquiária, com exceção do nutriente Ca (Tabela 3.3). Para K e Mg observou-se diminuição dos níveis de disponibilidade entre o final da estação chuvosa e o final da estação seca em áreas dominadas por *P. arachnoideum*. Por outro lado, para Ca e Al, observou-se aumento da disponibilidade entre o final da estação chuvosa e o final da estação seca nestas mesmas áreas.

Potássio e cálcio são mantidos em níveis mais altos ao final da estação chuvosa em áreas dominadas por *P. arachnoideum* do que em áreas dominadas por braquiária, mas são encontradas em níveis mais baixos ao final da estação seca. Para P e N não foi observada variação sazonal em áreas dominadas por *P. arachnoideum*, mas os níveis de N nessas áreas são significativamente mais altos do que os encontrados sob braquiária nas duas estações. Para os níveis de P, estes são mais altos apenas ao final da estação chuvosa, sendo que ao final da estação seca eles permanecem inalterados para *P. arachnoideum* e significativamente maiores para braquiária.

Para *P. aquilinum* foi observada a promoção de ciclo aberto de nitrogênio em áreas de vegetação xerófila (*heathland* ou charneca, dominada por *Colluna vulgaris*) nas ilhas britânicas, criando um ambiente mais rico em nitrogênio do que o encontrado sob a vegetação nativa (DELUCA et al., 2012). Olivares e colaboradores (2007) observaram o comportamento nutricional de *P. caudatum* em áreas de savana tropical na Venezuela como apresentando altos índices de razão K/Ca na parte aérea, por apresentarem menor necessidade de K quando comparado a eudicotiledôneas e sendo vantajoso como controle de troca iônica em ambientes xerófitos.

Os resultados aqui apresentados indicam evidências de promoção de ciclo aberto de nitrogênio por *P. arachnoideum* como já observado para *P. aquilinum*. Neste caso, as variações sazonais observadas poderiam ser explicadas pelas diferentes exigências nutricionais impostas por diferentes taxas de crescimento e decomposição entre as estações chuvosa e seca do Cerrado (WATRUD et al., 2003; SILVA MATOS et al., 2014).

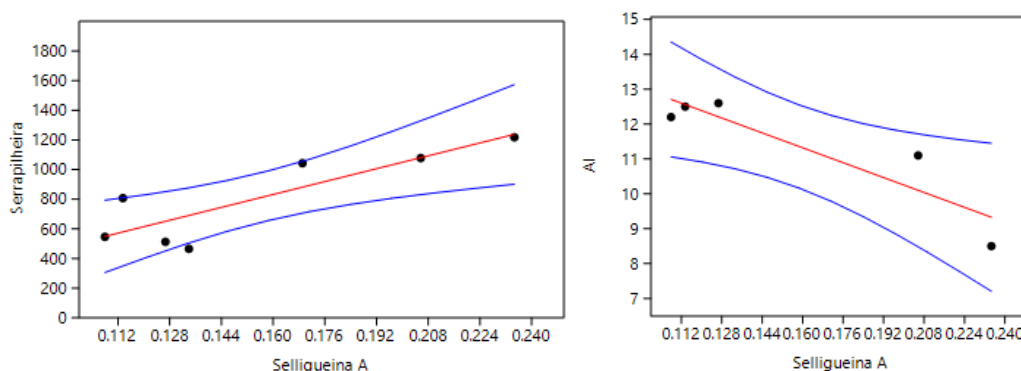


Figura 3.8. Modelos lineares da relação entre a concentração de seligueina A no solo e a massa de serrapilheira (A) e a concentração de alumínio no solo (B) em áreas dominadas por *P. arachnoideum* ao final da estação chuvosa. Concentração de seligueina A expressa em milimolar (mM); massa de serrapilheira expressa em gramas (g); concentração de alumínio expressa em milimolar por decímetro cúbico (mM dm⁻³). Linhas curvas (azuis) indicam limites de 95% de confiança, de acordo com o método de bootstrap.

Quando comparado às áreas dominadas por braquiária, os níveis de Al encontrados em áreas dominadas por *P. arachnoideum* mostraram-se significativamente superiores, enquanto os níveis de pH observados foram significativamente inferiores. Estes resultados concordam com os descritos por Johnson-Maynard e colaboradores (1997) para uma área dominada por *P. aquilinum* durante 30 anos na região noroeste da América do Norte. Estas alterações nas propriedades do solo poderiam então interferir significativamente com o desenvolvimento de outras espécies nessas áreas.

Tabela 3.4. Modelos lineares da relação entre a concentração de selligueína A no solo e a massa de serrapilheira e a concentração de alumínio no solo em áreas dominadas por *P. arachnoideum* ao final da estação chuvosa.

	Selligueína A x Serrapilheira	Selligueína A x Al
Equação da reta	$y = 5429,9x - 36,527$	$y = -26,678x + 15,587$
Intervalo de confiança 95% [‡]	a (2664; 7800,3)	a (-74,702; -15,382)
	b (-538,08; 450,67)	b (13,488; 21,277)
r	0,86007	-0,9066
r ²	0,73972	0,82192
t (p) [†]	37,696 (0,013028) *	-37211 (0,033782) *

[‡] Intervalo de confiança calculado de acordo com o método de bootstrap.

[†] t = estatística t para o coeficiente de correlação linear de Pearson (r) entre x e y; p = probabilidade. Dados marcados com (*) mostram correlação significativa.

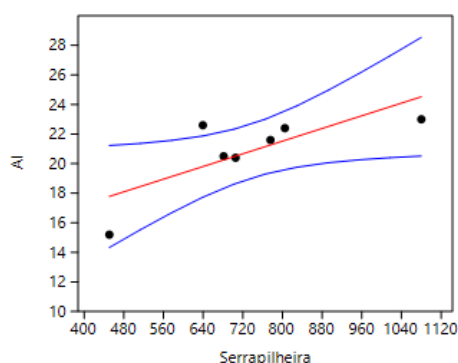


Figura 3.9. Modelo linear da relação entre a massa de serrapilheira e a concentração de alumínio no solo em áreas dominadas por *P. arachnoideum* ao final da estação seca. Massa de serrapilheira expressa em gramas (g); concentração de alumínio no solo expressa em milimolar por decímetro cúbico (mM dm^{-3}). Linhas curvas (azuis) indicam limites de 95% de confiança, de acordo com o método de bootstrap.

Tendo em vista a observação de alterações nas propriedades químicas do solo em áreas dominadas por *P. arachnoideum*, desejou-se verificar a existência de relação entre estas alterações e a concentração de selligueína A nessas áreas, assim como com relação aos dados de biomassa coletados. A análise de correlação linear de Pearson apresentou correlação significativa entre a concentração de selligueína A e a massa de serrapilheira, e entre a concentração de selligueína A e a concentração de Al no solo ao final da estação chuvosa (Figura 3.8 e Tabela 3.4). Da mesma forma, foi observada correlação significativa entre a massa de serrapilheira e a concentração de Al no solo ao final da estação seca (Figura 3.9 e Tabela 3.5).

Apesar de ter sido observada correlação significativa entre estes parâmetros, o ajuste da regressão linear aos pontos amostrais não se apresentou satisfatório para a relação entre selligueína A e serrapilheira, e entre serrapilheira e concentração de alumínio no solo (Tabelas 3.4 e 3.5). Possivelmente, o pequeno número amostral a cada estação e as coletas realizadas ao longo de apenas um ano de observação podem ter influenciado estes resultados. Assim, um estudo mais amplo e ao longo de um período maior de observação seria necessário para esclarecer a influência da cobertura de serrapilheira e da concentração de selligueína A no solo sobre os parâmetros químicos avaliados.

O melhor ajuste observado do modelo linear ($r^2 = 0,82192$) foi para a relação entre a concentração de selligueína A e a concentração de Al no solo ao final da estação chuvosa (Tabela 3.4). Assim, a presença de selligueína A no solo estaria relacionada à capacidade de aumento da concentração de Al no solo por *P. arachnoideum*, em uma correlação negativa. Esta correlação indicaria, então, um importante papel da selligueína A na dominância de *P. arachnoideum*, de forma adicional àquele representado pela atividade inibitória do desenvolvimento já descrita (JATOBA et al., em preparação). Considerando-se a toxicidade do Al para o desenvolvimento vegetal (MORRIS et al., 2009), a maior concentração de selligueína A em áreas com menores concentrações desse íon poderia indicar um *trade-off* de controle da dominância de *P. arachnoideum* nessas áreas. Da mesma forma que para as correlações anteriores, maiores estudos seriam necessários para esclarecer os mecanismos subjacentes à relação entre a concentração deste metabólito e a de Al no solo.

Tabela 3.5. Modelo linear da relação entre a massa de serrapilheira e a concentração de alumínio no solo em áreas dominadas por *P. arachnoideum* ao final da estação seca.

Serrapilheira x Al	
Equação da reta	$y = 0,010719x + 12947$
Intervalo de confiança 95% [‡]	a (-0,00046263; 0,022501) b (3,4084; 20,088)
r	0,76661
r ²	0,58768
t (p) [†]	26696 (0,044371) *

[‡] Intervalo de confiança calculado de acordo com o método de bootstrap.

[†] t = estatística t para o coeficiente de correlação linear de Pearson (r) entre x e y; p = probabilidade. Dados marcados com (*) mostram correlação significativa.

Esforços realizados a fim de controlar a invasão por plantas do gênero *Pteridium*, incluindo experimentos de controle e restauração ecológica realizados no Reino Unido e na Noruega, mostraram que, no longo termo, o corte mecânico realizado duas vezes ao ano e remoção da serrapilheira são as melhores abordagens para controlar *P. aquilinum* e promover maior riqueza de espécies (GHORBANI et al., 2007; MAREN et al., 2008; STEWART et al., 2008). A cobertura e profundidade da camada de serrapilheira de samambaião influenciaram a composição do banco de sementes em áreas caracterizadas por vegetação herbácea e arbustiva, e solos ácidos (*acid grasslands* e *heathlands*) no Reino Unido, agindo como uma barreira que interfere na germinação ou impede as sementes de atingirem o solo (GHORBANI et al., 2006). Os efeitos do samambaião neotropical na composição do banco de sementes na Mata Atlântica brasileira (SILVA; MATOS, 2006) também pode estar associada à cobertura de serrapilheira. No entanto, em adição ao efeito mecânico, as novas evidências aqui apresentadas sugerem que a remoção da serrapilheira como fonte de aleloquímicos pode também estar associada à maior riqueza de espécies observada, quando este método é utilizado para controle e recuperação das áreas invadidas (STEWART et al., 2008). Assim, fica clara a necessidade de se estabelecer se a plasticidade fenotípica do gênero *Pteridium* (DER et al., 2009; GIL DA COSTA et al., 2012) poderia influenciar sua composição química, com especial atenção aos taninos condensados presentes nas frondes verdes e serrapilheira. Este conhecimento poderia levar ao desenvolvimento de protocolos de controle de *Pteridium* mais eficientes para o propósito de restauração ecológica.

4. CONCLUSÃO

A presença de *P. arachnoideum* em áreas de Cerrado altera condições químicas do solo, especialmente com relação à concentração do nutriente N e de Al, quando comparada à presença de braquiária (*U. decumbens*). Além disso, a concentração de Al se encontra correlacionada à massa de serrapilheira e à concentração de seliguetina A nas áreas amostradas. Estes resultados corroboram a hipótese de alelopatia como mecanismo de dominância dessa planta nas áreas em que ocorre, não apenas por fitotoxicidade direta, mas também por ação indireta, ao alterar a concentração de Al nessas áreas.

REFERÊNCIAS

- BERTHOLDSSON, N. O. Use of multivariate statistics to separate allelopathic and competitive factors influencing weed suppression ability in winter wheat. **Weed Research**, v. 51, n. 3, p. 273–283, 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3180.2011.00844.x>>. Acesso em: 5/4/2012.
- BLAIR, A. C.; WESTON, L. A.; NISSEN, S. J.; BRUNK, G. R.; HUFBAUER, R. A. 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, 2008. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.1007/s10530-008-9250-1>>. Acesso em: 16/3/2012.
- CALLAWAY, R. M.; BEDMAR, E. J.; REINHART, K. O.; SILVAN, C. G.; KLIRONOMOS, J. Effects of soil biota from different ranges on *Robinia* invasion: acquiring mutualists and escaping pathogens. **Ecology**, v. 92, n. 5, p. 1027–35, 2011.
- CIPOLLINI, D.; RIGSBY, C. M.; BARTO, E. K. Microbes as targets and mediators of allelopathy in plants. **Journal of Chemical Ecology**, 2012.
- DAY, A. J.; BAO, Y.; MORGAN, M. R. A.; WILLIAMSON, G. Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, n. 12, p. 1234–1243, 2000.
- DELUCA, T. H.; ZEWDIE, S. A.; ZACKRISSON, O.; HEALEY, J. R.; JONES, D. L. Bracken fern (*Pteridium aquilinum* L. kuhn) promotes an open nitrogen cycle in heathland soils. **Plant and Soil**, v. 367, n. 1-2, p. 521–534, 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11104-012-1484-0>>. Acesso em: 18/10/2013.
- DER, J. P.; THOMSON, J. A.; STRATFORD, J. K.; WOLF, P. G. Global chloroplast phylogeny and biogeography of bracken (*Pteridium*; Dennstaedtiaceae). **American Journal of Botany**, v. 96, n. 5, p. 1041–1049, 2009.
- DUKE, S. O. Proving allelopathy in crop–weed interactions. **Weed Science**, v. 63, n. sp1, p. 121–132, 2015.

GHORBANI, J.; DUC, M. G. L. E.; MCALLISTER, H. A.; PAKEMAN, R. J.; MARRS, R. H. Effects of experimental restoration on the diaspore bank of an upland moor degraded by *Pteridium aquilinum* invasion. **Land Degradation and Development**, v. 669, p. 659–669, 2007.

GHORBANI, J.; DUC, M. G. LE; MCALLISTER, H. A.; PAKEMAN, R. J.; MARRS, R. H. Effects of the litter layer of *Pteridium aquilinum* on seed banks under experimental restoration. **Applied Vegetation Science**, v. 9, p. 127–136, 2006.

GIL DA COSTA, R. M.; BASTOS, M. M. S. M.; OLIVEIRA, P. A.; LOPES, C. Bracken-associated human and animal health hazards: Chemical, biological and pathological evidence. **Journal of Hazardous Materials**, v. 203-204, p. 1–12, 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030438941101538X>>. Acesso em: 8/5/2012.

GOUVEA, D. R.; GOBBO-NETO, L.; SAKAMOTO, H. T.; et al. Seasonal variation of the major secondary metabolites present in the extract of *Eremanthus mattogrosensis* Less (Asteraceae: Vernoniae) leaves. **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2139–2145, 2012.

GREER, M. J.; WILSON, G. W. T.; HICKMAN, K. R.; WILSON, S. M. Experimental evidence that invasive grasses use allelopathic biochemicals as a potential mechanism for invasion: chemical warfare in nature. **Plant and Soil**, v. 385, n. 1-2, p. 165–179, 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11104-014-2209-3>>. Acesso em: 26/6/2015.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Paleontologia Eletrônica**, v. 4, n. 1, art. 4, 9 pp., 2001.

INDERJIT; WARDLE, D. A; KARBAN, R.; CALLAWAY, R. M. The ecosystem and evolutionary contexts of allelopathy. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 26, n. 12, p. 655–62, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21920626>>. Acesso em: 6/3/2012.

JATOBA, L. J.; VARELA, R. M.; MOLINILLO, J. M. G.; DIN, Z. U.; GUALTIERI, S. C.; RODRIGUES-FILHO, E.; MACÍAS, F. A. (submetido) Allelopathy of bracken fern (*Pteridium arachnoideum*): new evidence from green fronds, litter and soil. **PlosOne**.

JATOBA, L. J.; UIN, Z. U.; RODRIGUES-FILHO, E.; GUALTIERI, S. (em preparação). Potencial alelopático de compostos fenólicos da serrapilheira de *Pteridium arachnoideum* (Kaulf.) Maxon. (Dennstaedtiaceae).

JOHNSON-MAYNARD, J. L.; MCDANIEL, P. A.; FALEN, A. L.; FERGUSON, D. E. Chemical and mineralogical conversion of Andisols following invasion by bracken fern. **Soil Science Society of America Journal**, v. 61, n. 2, p. 549, 1997.

LOU, Y.; DAVIS, A. S.; YANNARELL, A. C. Interactions between allelochemicals and the microbial community affect weed suppression following cover crop residue incorporation into soil. **Plant and Soil**, v. 399, n. 1-2, p. 357–371, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11104-015-2698-8>>. Acesso em: 17/5/2016.

MACÍAS, F. A.; GALINDO, J. L. G.; GALINDO, J. C. G. Evolution and current status of ecological phytochemistry. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2917–2936, 2007.

MAREN, I.; VANDVIK, V.; EKELUND, K. Restoration of bracken-invaded *Calluna vulgaris* heathlands: Effects on vegetation dynamics and non-target species. **Biological Conservation**, v. 141, n. 4, p. 1032–1042, 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006320708000505>>. Acesso em: 22/5/2012.

MATOS, D. M. D. S.; BELINATO, T. A. Interference of *Pteridium arachnoideum* (Kaulf.) Maxon. (Dennstaedtiaceae) on the establishment of rainforest trees. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 2, p. 311–316, 2010.

MIATTO, R. C.; SILVA, I. A.; SILVA-MATOS, D. M.; MARRS, R. H. Woody vegetation structure of Brazilian Cerrado invaded by *Pteridium arachnoideum* (Kaulf.) Maxon (Dennstaedtiaceae). **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 206, n. 8, p. 757–762, 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0367253011000399>>. Acesso em: 3/3/2012.

MIRANDA, M. A. F. M.; VARELA, R. M.; TORRES, A.; et al. Phytotoxins from *Tithonia diversifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 5, p. 1083–1092, 2015.

MORRIS, C.; GROSSI, P. R.; CALL, C. A. Elemental allelopathy: processes, progress, and pitfalls. **Plant Ecology**, v. 202, n. 1, p. 1–11, 2009.

OLIVARES, E.; PEÑA, E.; BENÍTEZ, M. *Pteridium caudatum* (L.) Maxon behaves as a potassium plant and accumulates aluminum in the subterranean organs. **American Fern Journal**, v. 97, n. 2, p. 81–94, 2007.

ORROCK, J. L.; DUTRA, H. P.; MARQUIS, R. J.; BARBER, N. Apparent competition and native consumers exacerbate the strong competitive effect of an exotic plant species. **Ecology**, v. 96, n. 4, p. 1052–1061, 2015. Disponível em: <<http://www.esajournals.org/doi/10.1890/14-0732.1>>. Acesso em: 17/4/2015.

PEIXOTO, R. S.; CHAER, G. M.; FRANCO, N.; et al. A decade of land use contributes to changes in the chemistry, biochemistry and bacterial community structures of soils in the Cerrado. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 98, n. 3, p. 403–413, 2010.

PETROSKI, R. J.; STANLEY, D. W. Natural compounds for pest and weed control. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 18, p. 8171–9, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19719128>>. Acesso em: 16/3/2012.

PIVELLO, V. R.; OLIVERAS, I.; MIRANDA, H. S.; et al. Effect of fires on soil nutrient availability in an open savanna in Central Brazil. **Plant and Soil**, v. 337, n. 1–2, p. 111–123, 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11104-010-0508-x>>. Acesso em: 17/5/2016.

RIBANI, M.; GRESPLAN BOTTOLI, C. B.; COLLINS, C. H.; FONTES JARDIM, I. C. S.; COSTA MELO, L. F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

ROMEO, J. T. Raising the beam: moving beyond phytotoxicity. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, n. 9, p. 2011–2014, 2011.

SAMPIETRO, D. A.; SOBERÓN, J. R.; SGARIGLIA, M. A.; QUIROGA, E. N.; VATTUONE, M. A. Soil, air and water samples. In: SAMPIETRO, D. A.; CATALAN, C. A. N.; VATTUONE, M. A. (Eds.); **Isolation, Identification and Characterization of Allelochemicals / Natural Products**. p.7–29, 2009. Enfield, NH, USA: Science Publishers.

SILVA, D. K. A.; OLIVEIRA FREITAS, N. DE; SOUZA, R. G. DE; et al. Soil microbial biomass and activity under natural and regenerated forests and conventional sugarcane plantations in Brazil. **Geoderma**, v. 189-190, p. 257–261, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016706112002492>>. Acesso em: 16/3/2016.

SILVA MATOS, D. M.; XAVIER, R. O.; TIBERIO, F. C. S.; MARRS, R. H. A comparative study of resource allocation in *Pteridium* in different Brazilian ecosystems and its relationship with European studies. **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, n. 1, p. 156–65, 2014.

SILVA, U. S. R.; MATOS, D. M. S. The invasion of *Pteridium aquilinum* and the impoverishment of the seed bank in fire prone areas of Brazilian Atlantic Forest. **Biodiversity and Conservation**, v. 15, n. 9, p. 3035–3043, 2006. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.1007/s10531-005-4877-z>>. Acesso em: 10/4/2012.

STEWART, G.; COX, E.; DUC, M. LE; et al. Control of *Pteridium aquilinum*: meta-analysis of a multi-site study in the UK. **Annals of Botany**, v. 101, n. 7, p. 957–70, 2008.

VACEK, J.; PAPOUSKOVA, B.; VRBA, J.; et al. LC-MS metabolic study on quercetin and taxifolin galloyl esters using human hepatocytes as toxicity and biotransformation in vitro cell model. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 86, p. 135–142, 2013.

WANG, T.; CHEN, C.; NAILE, J. E.; et al. Perfluorinated compounds in water, sediment and soil from Guanting Reservoir, China. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 87, n. 1, p. 74–79, 2011.

WATRUD, L. S.; MAGGARD, S.; SHIROYAMA, T.; et al. Bracken (*Pteridium aquilinum* L.) frond biomass and rhizosphere microbial community characteristics are correlated to edaphic factors. **Plant and Soil**, v. 249, p. 359–371, 2003.

YANG, C.; HAMEL, C.; SCHELLENBERG, M. P.; PEREZ, J. C.; BERBARA, R. L. Diversity and functionality of arbuscular mycorrhizal fungi in three plant communities in semiarid Grasslands National Park, Canada. **Microbial Ecology**, v. 59, p. 724–733, 2010.

ZENG, R. SEN. Allelopathy - the solution is indirect. **Journal of Chemical Ecology**, p. 515–516, 2014.

ZINN, Y. L.; LAL, R. Principles of soil management in Neotropical Savannas: the Brazilian Cerrado. In: LAL, R.; STEWART, B. A. (Eds.); **Principles of Sustainable Soil Management in Agroecosystems**, 2013. Boca Raton, FL: CRC Press.

CONCLUSÕES FINAIS

O isolamento biodirigido dos diferentes tecidos de *Pteridium arachnoideum* (Kaulf.) Maxon. levou à purificação e identificação da proantocianidina selligueina A como metabólito secundário majoritário nas frondes verdes e serrapilheira da planta, ainda que ausente em seu rizoma. Esta é a primeira vez que o composto selligueina A é descrito para *Pteridium arachnoideum* e para a família Dennstaedtiaceae.

A fração enriquecida em polifenóis extraídos da serrapilheira de *P. arachnoideum* exerceu potencial alelopático sobre o desenvolvimento inicial de espécies bioindicadoras, nativa e invasora do Cerrado.

O composto selligueina A apresentou atividade fitotóxica sobre o alongamento de coleótilos estiolados de trigo, e potencial alelopático sobre o desenvolvimento inicial de gergelim.

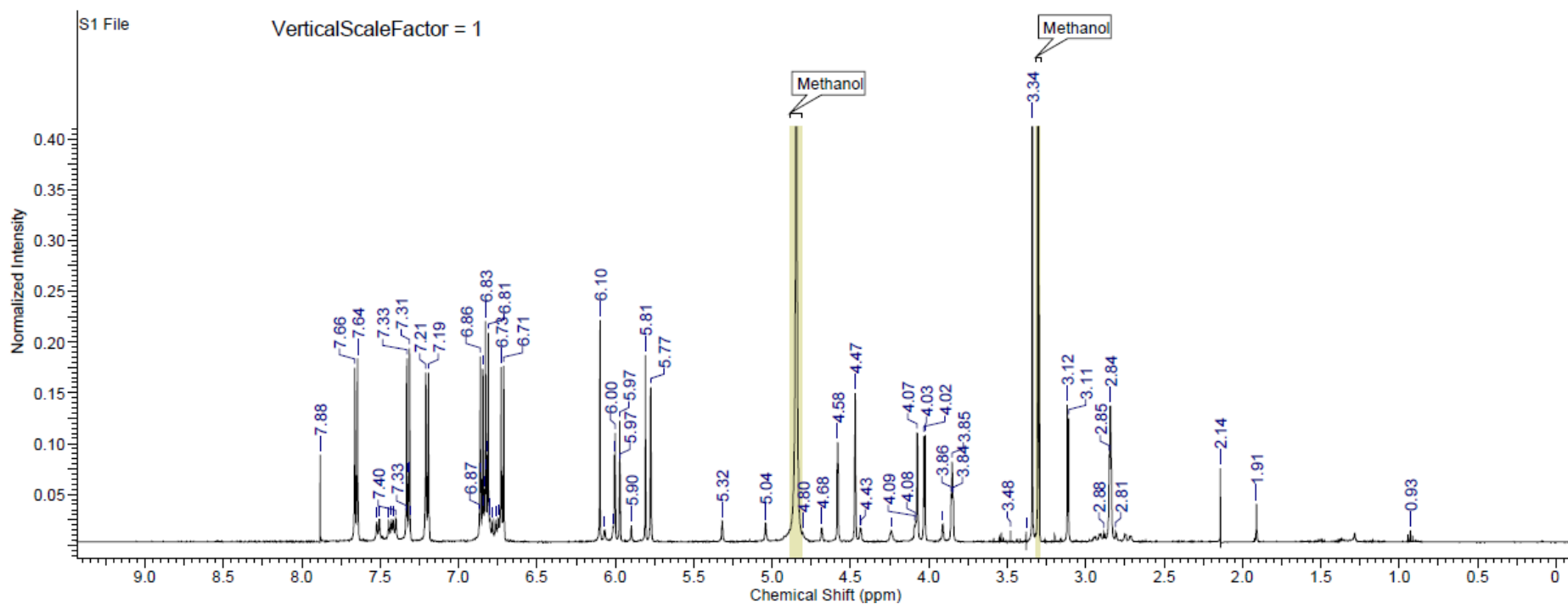
O composto selligueina A está presente no solo sob manchas de *P. arachnoideum* como um dos principais metabólitos na solução do solo. Por apresentar atividade fitotóxica, potencial alelopático e estar disponível no solo na faixa ativa de concentração, selligueina A pode ser considerada um aleloquímico desta planta.

A presença de *P. arachnoideum* altera características químicas do solo, especialmente quanto à concentração de N e Al, quando comparado a áreas dominadas por braquiária (*U. decumbens*).

A concentração de Al se encontra correlacionada à massa de serrapilheira e à concentração de selligueina A nas áreas amostradas. Assim, *P. arachnoideum* apresentaria atividade alelopática não apenas por fitotoxicidade direta, mas também por ação indireta, ao controlar a concentração de Al nessas áreas.

Estes resultados corroboram a hipótese de alelopatia como mecanismo de dominância dessa planta nas áreas em que ocorre, com a primeira descrição de um aleloquímico para uma espécie do gênero *Pteridium*.

ANEXO A – Espectro RMN-¹H de selligueina A isolada das frondes verdes de *P. arachnoideum* (amostra GF-2B.2p). Espectro obtido em Metanol-d₄.

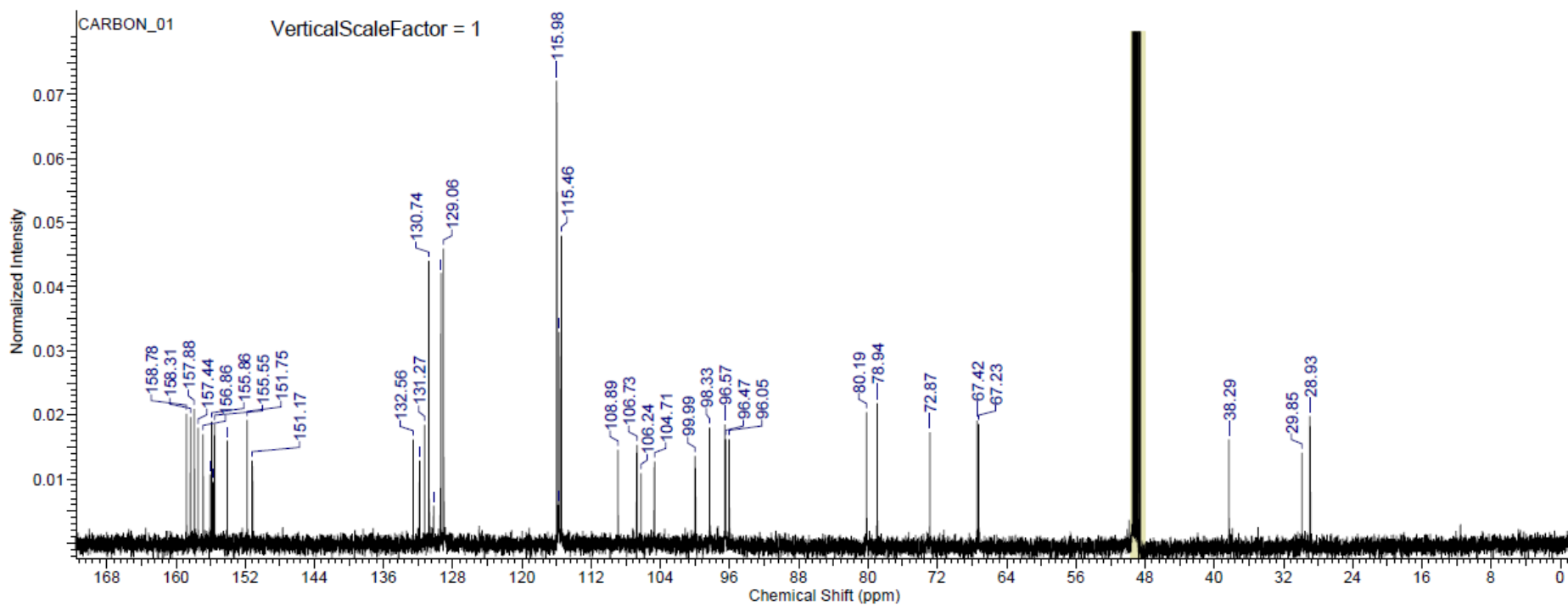


ANEXO A (continuação) – Espectro RMN-¹H de selligueina A isolada das frondes verdes de *P. arachnoideum* (amostra GF-2B.2p). Espectro obtido em Metanol-d₄.

Tabela de dados espectroscópicos

No.	(ppm)	(Hz)	Height	No.	(ppm)	(Hz)	Height	No.	(ppm)	(Hz)	Height	No.	(ppm)	(Hz)	Height	No.	(ppm)	(Hz)	Height
1	0.93	464.2	0.0146	12	3.48	1737.8	0.0144	23	4.24	2118.8	0.0142	34	5.90	2946.8	0.0194	45	6.76	3379.2	0.0252
2	1.91	954.2	0.0404	13	3.84	1921.2	0.0481	24	4.43	2214.6	0.0164	35	5.97	2982.0	0.0813	46	6.78	3388.9	0.0240
3	2.14	1069.2	0.0753	14	3.85	1924.1	0.0821	25	4.44	2217.6	0.0161	36	5.97	2984.5	0.1226	47	6.80	3397.7	0.0265
4	2.81	1403.2	0.0137	15	3.86	1927.0	0.0488	26	4.47	2233.2	0.1496	37	6.00	2998.2	0.1106	48	6.80	3399.7	0.0332
5	2.84	1419.8	0.1368	16	3.91	1954.4	0.0202	27	4.58	2289.0	0.1015	38	6.00	3000.6	0.0890	49	6.81	3402.6	0.2089
6	2.85	1423.8	0.0894	17	4.02	2010.7	0.1086	28	4.68	2339.3	0.0174	39	6.01	3005.5	0.0176	50	6.81	3404.6	0.0887
7	2.88	1440.9	0.0133	18	4.03	2014.1	0.1076	29	4.80	2400.5	0.0128	40	6.07	3031.9	0.0149	51	6.82	3409.5	0.0711
8	3.11	1553.9	0.1248	19	4.07	2034.6	0.1100	30	5.04	2518.8	0.0214	41	6.10	3047.1	0.2214	52	6.83	3411.4	0.2206
9	3.12	1557.3	0.1380	20	4.07	2035.6	0.1108	31	5.32	2657.3	0.0238	42	6.71	3353.7	0.1765	53	6.83	3414.4	0.0546
10	3.34	1668.8	1.0000	21	4.08	2040.5	0.0233	32	5.77	2885.2	0.1554	43	6.73	3362.0	0.1750	54	6.84	3417.3	0.0348
11	3.38	1688.9	0.0133	22	4.09	2043.9	0.0205	33	5.81	2901.8	0.1872	44	6.75	3370.8	0.0269	55	6.84	3420.2	0.1738
56	6.85	3422.2	0.0650	61	7.21	3602.2	0.1699	66	7.33	3662.3	0.1835	71	7.44	3720.1	0.0238	76	7.88	3938.7	0.0889
57	6.86	3426.6	0.0677	62	7.31	3651.1	0.0256	67	7.33	3665.3	0.0307	72	7.50	3749.4	0.0252				
58	6.86	3428.6	0.1855	63	7.31	3653.5	0.1937	68	7.40	3697.1	0.0256	73	7.52	3758.2	0.0235				
59	6.87	3431.5	0.0313	64	7.32	3656.0	0.0683	69	7.41	3705.4	0.0252	74	7.64	3819.3	0.1839				
60	7.19	3593.4	0.1700	65	7.32	3660.4	0.0680	70	7.43	3711.7	0.0256	75	7.66	3828.1	0.1748				

ANEXO B – Espectro RMN-¹³C de selligueina A isolada das frondes verdes de *P. arachnoideum* (amostra GF-2B.2p). Espectro obtido em Metanol-d₄.

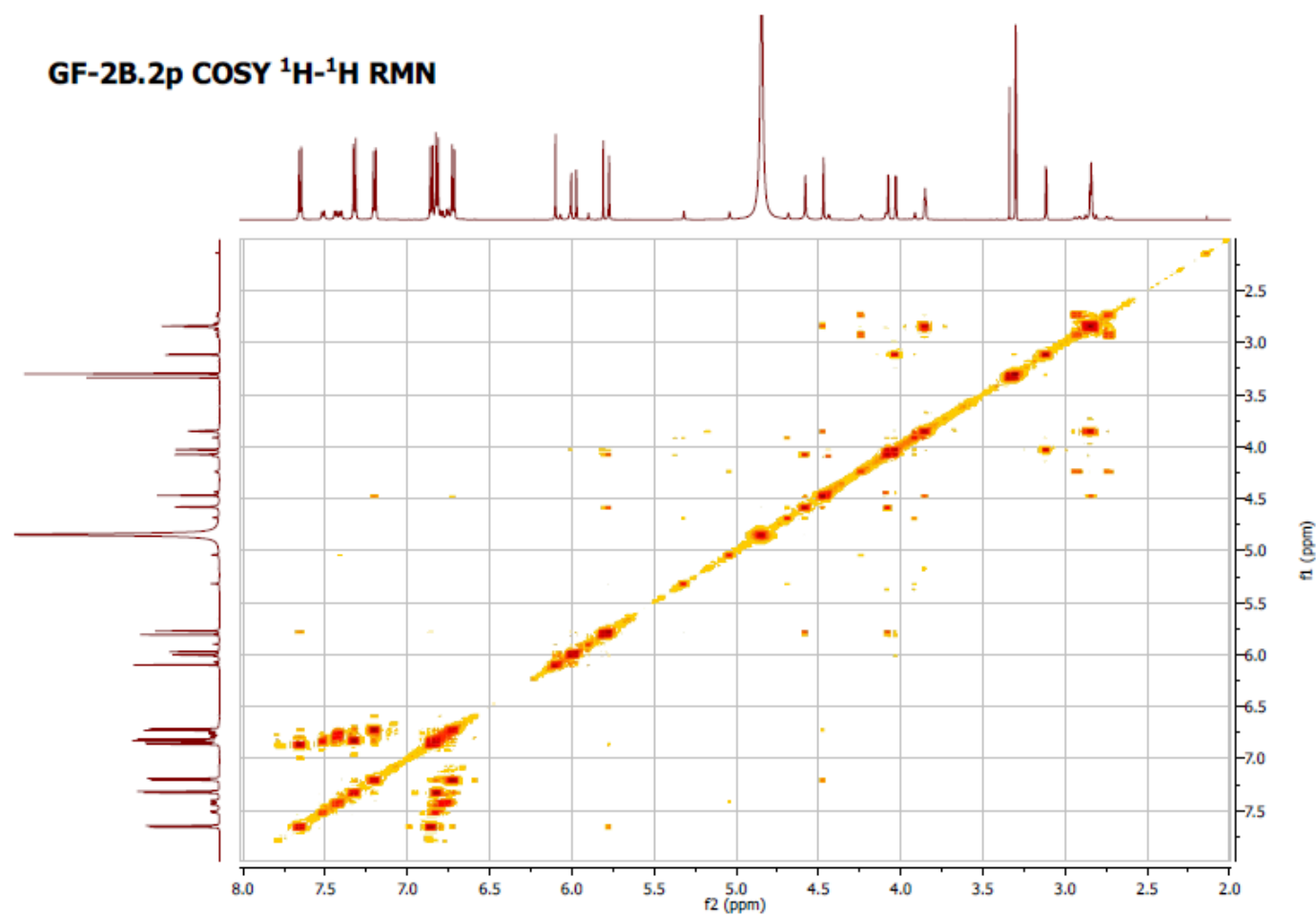


ANEXO B (continuação) – Espectro RMN-¹³C de selligueina A isolada das frondes verdes de *P. arachnoideum* (amostra GF-2B.2p). Espectro obtido em Metanol-d₄.

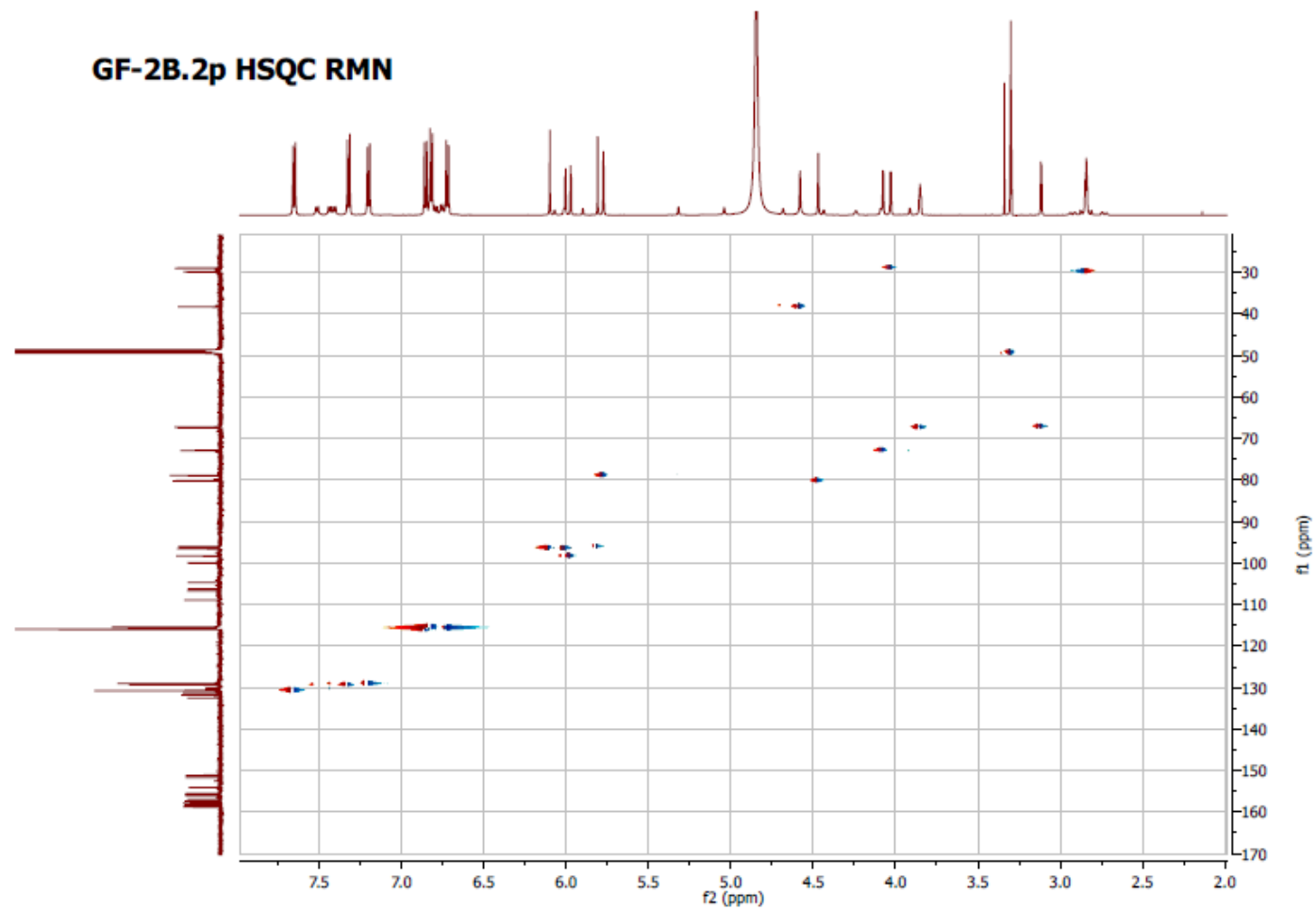
Tabela de dados espectroscópicos

No.	(ppm)	(Hz)	Height	No.	(ppm)	(Hz)	Height	No.	(ppm)	(Hz)	Height	No.	(ppm)	(Hz)	Height
1	28.93	4363.2	0.0198	10	96.47	14551.2	0.0163	19	115.70	17450.4	0.0330	28	131.84	19886.0	0.0129
2	29.85	4502.7	0.0141	11	96.57	14565.5	0.0185	20	115.79	17464.7	0.0059	29	132.56	19994.4	0.0161
3	38.29	5774.7	0.0162	12	98.33	14831.3	0.0180	21	115.98	17493.3	0.0721	30	151.17	22800.7	0.0129
4	67.23	10140.3	0.0186	13	99.99	15081.7	0.0136	22	129.06	19466.3	0.0459	31	151.75	22888.9	0.0192
5	67.42	10168.9	0.0191	14	104.71	15793.4	0.0128	23	129.36	19511.6	0.0421	32	154.08	23239.4	0.0160
6	72.87	10991.5	0.0173	15	106.24	16024.6	0.0109	24	129.44	19523.5	0.0044	33	155.55	23462.3	0.0186
7	78.94	11907.0	0.0218	16	106.73	16098.6	0.0153	25	130.21	19640.4	0.0058	34	155.69	23482.6	0.0096
8	80.19	12095.4	0.0204	17	108.89	16424.0	0.0145	26	130.74	19720.2	0.0441	35	155.86	23508.8	0.0190
9	96.05	14488.0	0.0163	18	115.46	17414.7	0.0480	27	131.27	19798.9	0.0185	36	156.04	23536.3	0.0107
												37	156.86	23659.0	0.0170
												38	157.44	23747.3	0.0180
												39	157.88	23812.8	0.0210
												40	158.31	23878.4	0.0196
												41	158.78	23948.7	0.0202

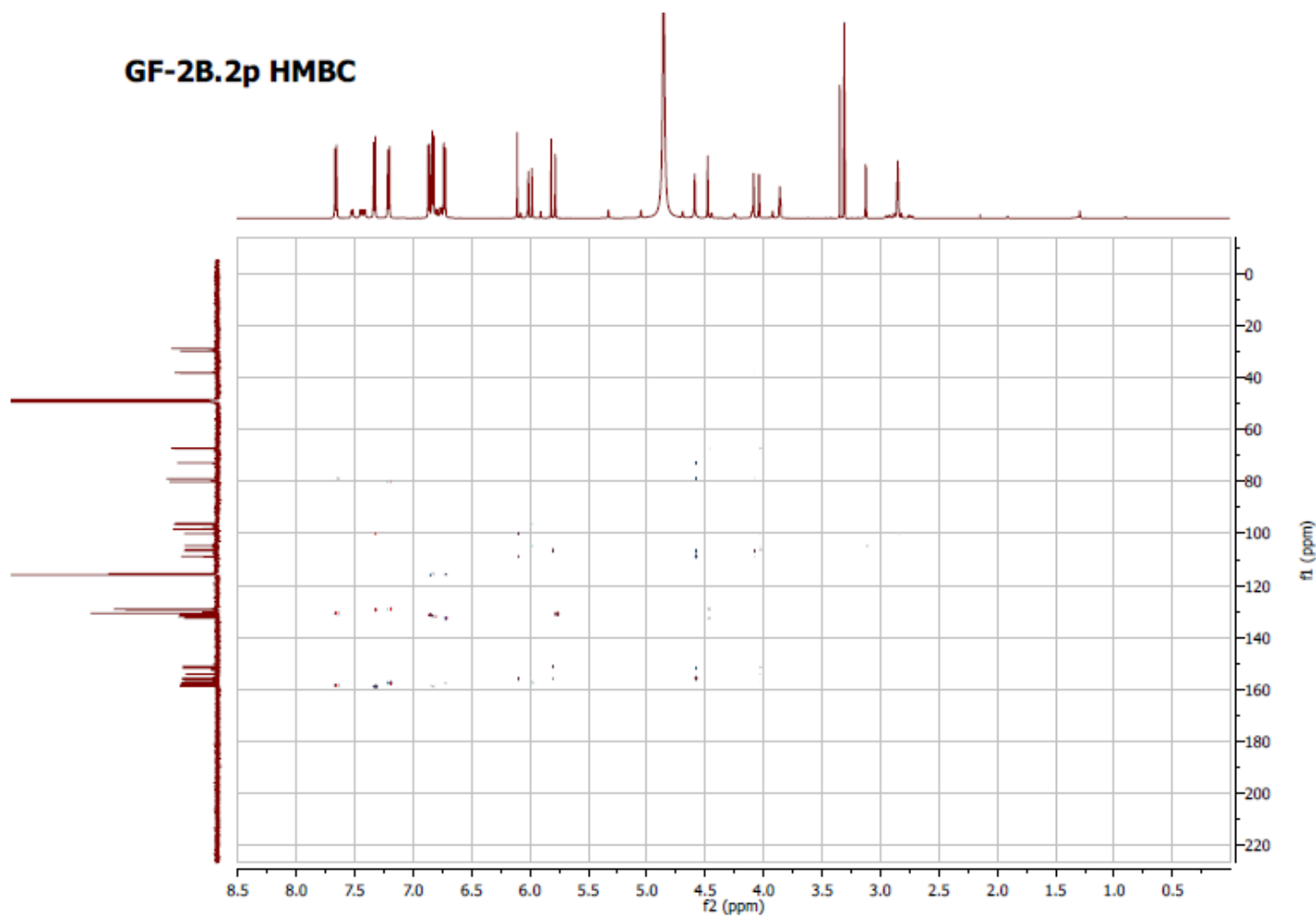
ANEXO C – Espectro RMN-COSY- ^1H - ^1H de selligueina A isolada das frondes verdes de *P. arachnoideum* (amostra GF-2B.2p). Espectro obtido em Metanol- d_4 .



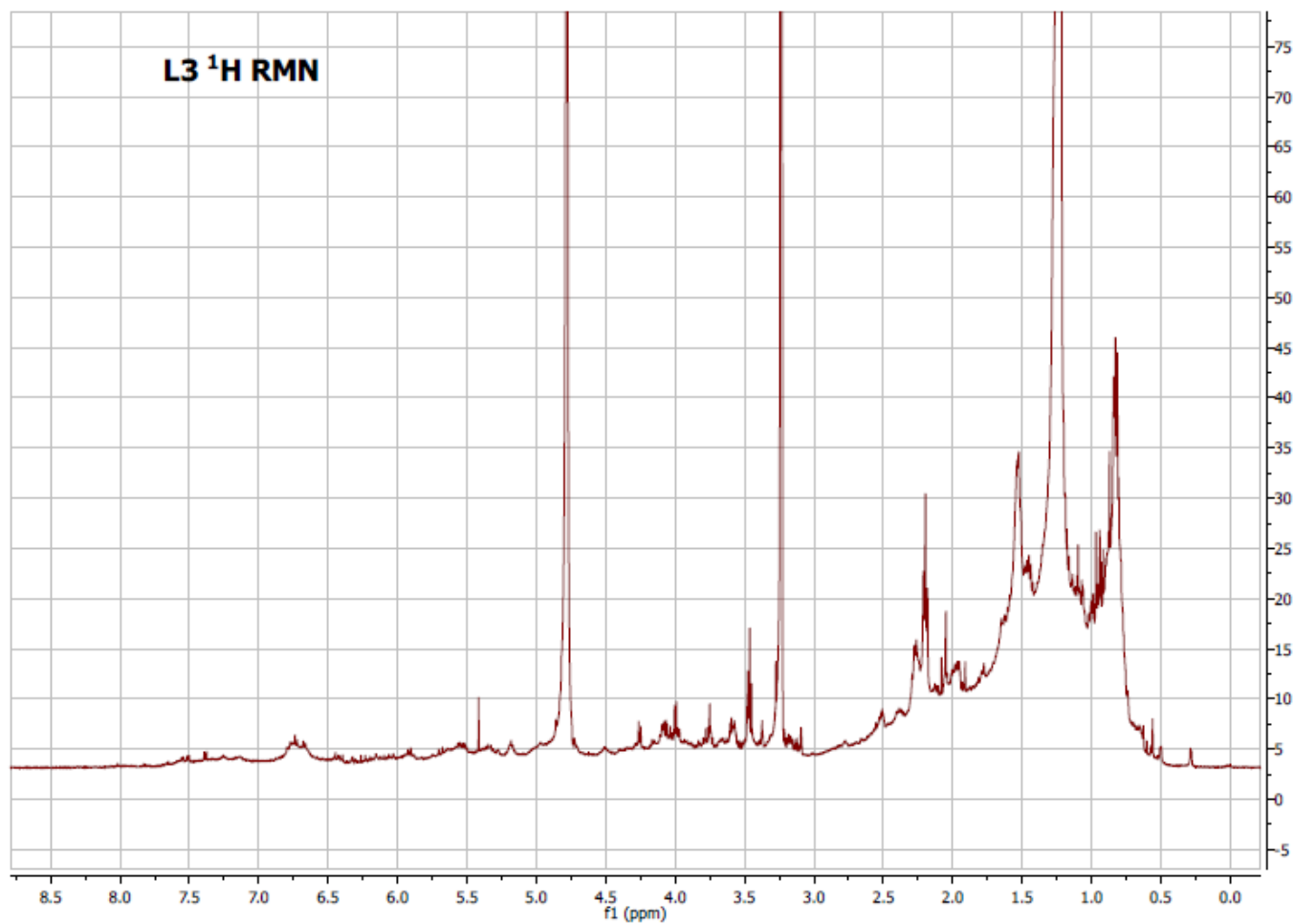
ANEXO D – Espectro RMN-HSQC de seligueina A isolada das frondes verdes de *P. arachnoideum* (amostra GF-2B.2p). Espectro obtido em Metanol-d4.



ANEXO E – Espectro RMN-HMBC de selligueina A isolada das frondes verdes de *P. arachnoideum* (amostra GF-2B.2p). Espectro obtido em Metanol-d4.



ANEXO F – Espectro RMN-¹H da fração L-3, obtida da serrapilheira de *P. arachnoideum*. Espectro obtido em Metanol-d₄.



ANEXO G – Espectro RMN-¹H de selligueina A isolada da serrapilheira de *P. arachnoideum* (amostra L-2C.1). Espectro obtido em Metanol-d₄.

