

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

ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE DUAS ESPÉCIES  
DE *Myrsine* L. (PRIMULACEAE) E DE *Tithonia*  
*diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (ASTERACEAE)

Maria Augusta Ferraz Machado Miranda

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

São Carlos, SP  
2015

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

M672ab

Miranda, Maria Augusta Ferraz Machado.

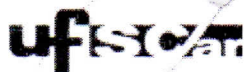
Atividades biológicas de duas espécies de *Myrsine* L. (Primulaceae) e de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (Asteraceae) / Maria Augusta Ferraz Machado Miranda. -- São Carlos : UFSCar, 2015.

115 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2015.

1. Cerrados. 2. Invasão biológica. 3. Metabólitos secundários. 4. Atividade biológica. 5. Fitoquímica. I. Título.

CDD: 581.5264 (20<sup>a</sup>)



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 Maria Augusta Ferraz Machado Miranda, realizada em 31/03/2015:

*Sonia Gualtieri*

---

Profa. Dra. Sonia Cristina Juliano Gualtieri  
UFSCar

*Moacir Rossi Forim*

---

Prof. Dr. Moacir Rossi Forim  
UFSCar

*Maristela Imatomi*

---

Profa. Dra. Maristela Imatomi  
UFSCar

*João Oiano Neto*

---

Prof. Dr. João Oiano Neto  
Embrapa

*Paula Novaes*

---

Profa. Dra. Paula Novaes  
USP

*Ao meu querido pai, Eloy, que  
participou desta caminhada  
quase que inteira... e agora, in  
memorian*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus queridos pais Eloy e Lilia por tudo o que fizeram por mim, por sempre estarem presentes na minha vida, pelo amor e dedicação, pelos ensinamentos e bons exemplos que me deram durante todos esses anos. Sem vocês nada disso seria possível!

Aos meus irmãos, Eloy Neto, Carlos Gustavo e João Guilherme, pelo carinho, apoio, ensinamentos e por serem meu orgulho!

Às minhas cunhadas Ana Marta e Denise e aos meus amorzinhos, Gustavo, Carina e Luisa, pelas imensas alegrias e bons momentos juntos, sempre.

Agradeço ao meu marido Felipe por estar sempre ao meu lado, me apoiando, me entendendo, me ajudando e principalmente pelo seu amor, dedicação e paciência.

Aos meus sogros Carlos e Rosani, ao meu cunhado Daniel e minha concunhada Camila, pelo carinho, pelo apoio e momentos felizes sempre que estamos juntos.

À minha querida orientadora, Dra. Sonia Cristina Juliano Gualtieri, pelo apoio, confiança e amizade.

À Dra. Andréia Pereira Matos, pela coorientação, pelo carinho e dedicação, principalmente nessa fase final.

Aos professores e funcionários do Departamento de Botânica da UFSCar, principalmente, Maristela Imatomi e Carlos Casali pelas imensas ajudas, Dona Ofélia pelos cafezinhos e Seu Ademir pela ajuda em campo.

A todos os membros do Grupo de Alelopatía da Universidad de Cádiz, principalmente aos professores, Dr. Francisco António Macías Domingues, Dra. Rosa Maria Varela Montoya, Dra. Ascensión Torres Martinez (Chon), Dr. José María González Molinillo (Chema), por terem me acolhido e tornarem a saudade de casa menos dolorosa, pela imensa ajuda e por todos os ensinamentos que me passaram. Agradeço também ao José Luis, pelas “aulas” de espanhol, pelas horas divertidas no laboratório e nos almoços, e pela ajuda sempre que precisei. À técnica do laboratório, Maite, pelas ajudas nos experimentos, e aos meus queridos colegas espanhóis Sandra, Carlos e Juan Miguel, pelo carinho e acolhida. Aos brasileiros, Luciane, Karina, Paula, Janclei, Silvia, Monaliza e claro, ao meu querido amigo Lafayette, por tornarem a distância menor e fazer dessa experiência, única.

À Ana Carolina Volante pela disposição e comprometimento nos experimentos com a *Spodoptera*.

Aos membros que compuseram a banca de Qualificação, pelas sugestões que contribuíram com o desenvolvimento do trabalho.

Aos membros que farão parte dessa banca de Defesa.

Aos meus queridos colegas de laboratório Maristela, Paula, Viviane, Patrícia, Simoni, Luciana, Leandro, Lafayette, Sadao, Flávia, Silmara, Eduardo, Raíssa e aos novos estagiários Edgar e Adriana.

À Maristela e Paula pelas imensas ajudas, apoio e principalmente, pelo carinho e amizade. Obrigada meninas!

Aos alunos e funcionários do PPGERN, principalmente aos amigos que fiz ao longo desta caminhada, Valéria, Andréia, Cássia, Renata, Lakshimi, Leandro, Pedro, Sadao, Sara, Gustavo, Danilo, Lafayette e Leite. Vocês são muito especiais!

Aos amigos, Caroline, Rodrigo, Melissa, Aline, Renata, Priscila, Rafael, Filipe, Eleandro, Lívia, Ariane, Leonardo, Murilo, Pedro, Paulo César, Joana e às pequenas, Valentina e Clara.

A todos que de alguma forma fizeram parte disso. É muita gente para agradecer!

À CAPES pela bolsa de doutorado e ao CNPq pelo apoio financeiro.

## **Como se fosse um prefácio**

*Nikolaus Von Behr*

O Cerrado é milagre  
(e também é pedaço do planeta  
que desaparece).  
Abraço meu irmão pequizeiro.  
Ando de mãos dadas  
com minha irmã sucupira.  
Meu pai jatobá sorri.  
Mãe peroba não diz nada,  
apenas sente.  
Minhas amigas abelhas  
são filhas das flores.

Agora prepare seu coração.  
Correntão vai passar e levar tudo:  
ninho de passarinho rasteiro também.  
Depois do correntão  
brotou o que tinha que brotar.  
Mas já era tarde.  
Faca fina cortou raiz pela raiz.  
Aí não brotou mais nada.  
Aliás, brotou coisa melhor:  
soja, verdinha, verdinha.  
Que beleza, diziam.

Olhe bem os cerrados  
da próxima vez.  
Rastejar por entre cupins  
e capins.  
E sentir o cheiro do anoitecer.

Antes de terminar pergunto:  
Quem vai pagar a conta  
de tanta destruição?  
“- Tudo bem, daqui a 100 anos  
estaremos todos mortos”  
disse alguém.  
Certo, estaremos todos mortos.  
Mas nossos netos não.

O Cerrado é milagre,  
Minha gente

## RESUMO

Espécies vegetais provenientes do Cerrado costumam apresentar mecanismos de defesa em resposta ao baixo teor de nutrientes do solo à que estão submetidas, a intensa luminosidade, a maior competição por recursos e ao longo período de estiagem, marcada por profundo déficit hídrico. Este domínio é uma fonte potencial de compostos bioativos ainda pouco explorada e estudos do potencial fitoquímico destas espécies são importantes para a preservação da sua biodiversidade. Entre os principais fatores que ameaçam a biodiversidade do Cerrado, está a invasão biológica. As plantas invasoras são geralmente mais competitivas que as demais espécies e suportam condições adversas. Essa vantagem pode ser explicada segundo a “hipótese das novas armas”, que afirma que as plantas invasoras possuem metabólitos secundários que agem como aleloquímicos e apresentam novos desafios para as espécies nativas. Dessa forma, metabólitos secundários de espécies invasoras do Cerrado também são uma importante área da fitoquímica a ser investigada. Sendo assim, foi proposta a hipótese de que espécies nativas, *Myrsine umbellata* e *Myrsine coriacea* e uma invasora do cerrado, *Tithonia diversifolia*, produzem metabólitos secundários em resposta ao estresse à que estão submetidas e que estes apresentam diferentes funções biológicas, incluindo, atividade antifúngica, antioxidante, inseticida e fitotóxica, que favoreçam seu estabelecimento nesse ambiente e apresentam importância econômica para uso na agricultura e na indústria farmacêutica. Para isso, no primeiro capítulo, foi avaliada a atividade biológica de extratos foliares de *M. umbellata* e *M. coriacea*. Foi avaliado o efeito antifúngico *in vitro* de extratos foliares destas espécies sobre *Pythium aphanidermatum*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum acutatum*, importantes patógenos de culturas agrícolas. Também foi avaliado o potencial inseticida destes extratos sobre *Spodoptera frugiperda*, conhecida como lagarta-do-cartucho do milho, importante praga causadora de danos a esta cultura. E por último, foi determinado a concentração de fenóis totais e atividade antioxidante dos extratos foliares destas duas espécies pelo método de redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil). No segundo capítulo foi avaliado o potencial fitotóxico de extratos de folha, caule e raiz de *T. diversifolia*. Foram realizados bioensaios com coleóptilos de trigo, germinação de sementes e crescimento de plântulas. O extrato foliar preparado com Acetato de Etila foi selecionado para continuar os estudos de isolamento e identificação de compostos por apresentar melhor atividade. A separação cromatográfica deste extrato nos permitiu isolar 12 lactonas sesquiterpênicas (STS), 1 secosesquiterpeno, e um diterpeno. Duas STSs estão sendo relatadas pela primeira vez neste trabalho,  $8\beta$ -*O*-(2-metilbutirol)tirotundina e  $8\beta$ -*O*-(isovaleroil)tirotundina. A alta atividade fitotóxica desta espécie, bem como dos compostos avaliados e, principalmente, os compostos majoritários  $1\beta$ -metoxidiversifolina, tagitinina A e tagitinina C, indica que a alelopatia pode ser uma das formas de seu estabelecimento nesse ambiente. No capítulo 3 foram testados a atividade inseticida de frações do extrato Acetato de Etila de *T. diversifolia* e seus compostos majoritários contra *S. frugiperda* e foi observado uma redução significativa no peso pupal da lagarta. A redução da massa pupal pode ser o indicativo da presença de substâncias tóxicas ao inseto nessas frações, no entanto, essa redução não está associada à presença dos compostos majoritários testados. Dessa forma, concluímos que as espécies vegetais estudadas, possuem metabólitos secundários com atividades biológicas promissoras e importância econômica para serem utilizados na agricultura e na indústria farmacêutica.

**Palavras-chave:** Cerrado, invasão biológica, metabólitos secundários, atividade biológica, extratos foliares, fitoquímica.



## ABSTRACT

Plants species from Brazilian savanna often have defense mechanisms in response to the low nutrient content of the soil, the light intensity, the competition for resources and drought, pronounced by deep water deficit, to which they are subjected. This area is a potential source of bioactive compounds that still little explored and potential phytochemical studies of these species are important to this preservation. Biological invasions are one of the main factors threatening the Brazilian savanna biodiversity. Many plants are initially introduced as ornamental species and subsequently become invasive. Invasive plants are generally more competitive than the other species and tolerate unfavorable conditions. This advantage can be explained according to the "Novel weapons hypothesis". It proposes that invasive plants have secondary metabolites that act as allelochemicals and present new challenges to native species. Thus, secondary metabolites of invasive species in the Brazilian savanna are also an important area of phytochemistry being investigated. Therefore, we hypothesized that native species from Brazilian savanna, *Myrsine umbellata* and *Myrsine coriacea*, and the alien specie, *Tithonia diversifolia*, produces secondary metabolites that have different biological activities, including insecticidal, antifungal and phytotoxic activities, favoring their establishment in this environment and have economic importance for agriculture and pharmaceutical industry. In the Chapter 1, the biological activity of leaf extracts of *M. umbellata* and *M. coriacea*, was evaluated. The *in vitro* antifungal effect of leaf extracts of these two species was evaluated against *Pythium aphanidermatum*, *Fusarium oxysporum* and *Colletotrichum acutatum*, three important crop pathogens. We also evaluated the insecticide potential of these extracts against *Spodoptera frugiperda*, known as fall armyworm, an important pest that causes damages to many crops. Finally, the total polyphenols and antioxidant activity of the leaf extracts of these two species was quantified by the DPPH method. In the Chapter 2 we evaluated the phytotoxic potential of leaf, stem and root extracts from *T. diversifolia*. Bioassays of wheat elongation coleoptile seed germination and seedling growth are performed. The Ethyl Acetate leaf extract was the most active extract and was selected to continue the isolation studies and the identification of compounds. The chromatographic separation of this extract allowed us the isolation of 12 sesquiterpene lactones (STs), 1 sesquiterpene, and 1 diterpene. Two STs are reported for the first time in this study,  $8\beta$ -O-(2-methylbutyryl) and  $8\beta$ -O-(isovaleryloxy)tirotundin. The high phytotoxic activity of the extracts and compounds, especially the majority,  $1\beta$ -methoxydiversifolin, tagitinin A and tagitinin C, indicates that allelopathy may be responsible for their establishment in this habitat. In the Chapter 3, the *T. diversifolia* Ethyl Acetate fractions were tested for insecticidal activity against *S. frugiperda* and it was observed a significant reduction in the pupal weight of the caterpillar. This may be an indicative of the presence of toxic substances to this insect in these fractions, however, this reduction in the pupal weight is not associated with the majority compounds tested. Thus, we conclude that the studied plant species have secondary metabolites with promising biological activities and economic importance for agriculture and pharmaceutical industry.

**Key-words:** Brazilian savanna, biological invasion, secondary metabolites, biological activity, leaf extracts, phytochemical.

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** Croqui da Universidade Federal de São Carlos, *campus* São Carlos, mostrando os diferentes tipos de uso da terra e a distribuição da vegetação. .... 8
- Figura 2** A) *Myrsine coriacea* (Sw.) R. Br. ex Roem. & Schult.; B) *Myrsine umbellata* Mart. C) Indivíduo jovem de *M. umbellata* e D) Indivíduo jovem de *M. coriacea* ..... 9
- Figura 3** *Tithonia diversifolia*: A, C) Inflorescência; B) Folha senescente. .... 11
- Figura 4** Invasão de *Tithonia diversifolia* no cerrado da UFSCar. .... 12
- Figura 1.1** Porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Pythium aphanidermatum*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum acutatum* na presença de extratos foliares de *Myrsine umbellata* e *Myrsine coriacea*. DCM: diclorometano; AcOEt: acetato de etila e MeOH: metanol. .... 34
- Figura 1.2** Correlação linear entre o teor de fenólicos totais (TPC, em mg de ácido gálico equivalente / g de extrato seco) e índice de atividade antioxidante (AAI) de extratos foliares de *Myrsine umbellata* e *Myrsine coriacea*.  $r^2 = 0,851$ ,  $p < 0,01$ . .... 40
- Figura 2.1** Efeito do herbicida Logran® e extratos acetato de etila (AcOEt) e metanólico (MeOH) de folha, caules e raízes de *Tithonia diversifolia* no alongamento de coleótilos de trigo. .... 59
- Figura 2.2** Efeito do herbicida Logran® e extrato acetato de etila (AcOEt) de folhas e caules de *Tithonia diversifolia* em espécies alvo padrão (STS). Valores são expressos como porcentagem em relação ao controle. .... 61
- Figura 2.3** Efeito do herbicida Logran® e extrato acetato de etila (AcOEt) de folhas e caules de *Tithonia diversifolia* em espécies invasoras. Valores são expressos como porcentagem em relação ao controle. .... 62

**Figura 2.4** Compostos isolados de *Tithonia diversifolia*. Tagitinina F-3-*O*-metileter (1), 3-metoxitirofundina (2), tirofundina (3), 8 $\beta$ -*O*-(2-metilbutiroil)tirofundina, (4), 8 $\beta$ -*O*-(isovaleroil)tirofundina (5) 1 $\beta$ -metoxidiversifolina (6), tagitinina A (7), tagitinina C (8), 3 $\beta$ -acetoxi-8 $\beta$ -isobutiriloxireinosina (9), 3 $\beta$ -acetoxitithifolina (10), 3 $\alpha$ -acetoxicostunolideo (11), 8 $\beta$ -isobutiriloxicumambranolideo (12), ácido 2-formil-4-hidroxi-4 $\alpha$ -metil-3-(3-oxobutil)ciclohexanoacético (13), (2*E*,6*E*10*E*)-3-(hidroximetil)-7,11,15-trimetilhexadeca-2,6,10,15-tetraen-1,14-diol (14). ..... 64

**Figura 2.5** Espectro TOCSY 1D RMN de sinais correspondentes a cadeia lateral do éster das frações contendo os compostos 4 e 5 (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)..... 66

**Figura 2.6** Espectro de zTOCSY RMN e correlações dos sinais correspondentes a cadeia lateral do éster dos compostos 4 e 5 (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)..... 68

**Figura 2.7** Efeito dos compostos Tagitinina F-3-*O*-metileter (1), 3-metoxitirofundina (2), tirofundina (3), 1 $\beta$ -metoxidiversifolina (6), tagitinina A (7), tagitinina C (8), 3 $\beta$ -acetoxi-8 $\beta$ -isobutiriloxireinosina (9), 3 $\beta$ -acetoxitithifolina (10), 3 $\alpha$ -acetoxicostunolideo (11), 8 $\beta$ -isobutiriloxi-cumambranolideo (12), (2*E*,6*E*10*E*)-3-(hidroximetil)-7,11,15-trimetilhexadeca-2,6,10,15-tetraen-1,14-diol (14) de *Tithonia diversifolia* na inibição do alongamento de coleóptilos de trigo. .... 69

**Figura 2.8** Efeito dos compostos 1 $\beta$ -methoxydiversifolina (6), tagitinina A (7) e tagitinina C (8) de *Tithonia diversifolia* no crescimento de STS. Valores são expressos como porcentagem em relação ao controle. Níveis de significância 0,01 < p < 0,05 (b) ou p < 0,01 (a) de acordo com o teste de Welch..... 72

**Figura 2.9** Efeito dos compostos 1 $\beta$ -methoxydiversifolina (6), tagitinina A (7) e tagitinina C (8) de *Tithonia diversifolia* no crescimento de espécies invasoras. Valores são expressos como porcentagem em relação ao controle. Níveis de significância 0,01 < p < 0,05 (b) ou p < 0,01 (a) de acordo com o teste de Welch. .... 73

<b>Figura 3.1</b> Fluxograma de procedimentos de extração e fracionamento do extrato acetato de etila de folhas de <i>T. diversifolia</i> e suas respectivas massas.....	86
<b>Apêndice 1</b> Massas e rendimento dos extratos de 100 g de folhas de <i>Myrsine umbellata</i> e <i>Myrsine coriacea</i> em solventes orgânicos.....	103
<b>Apêndice 2</b> Fluxograma de extração e isolamentos de compostos de <i>Tithonia diversifolia</i> .....	104
<b>Anexo 1</b> Espectro NMR <sup>1</sup> H de Tagitinina C ( <b>8</b> ) e regiões expandidas do espectro (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	106
<b>Anexo 2</b> Espectro NMR <sup>1</sup> H de Tagitinina A ( <b>7</b> ) e regiões expandidas do espectro (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	107
<b>Anexo 3</b> Espectro NMR <sup>1</sup> H de 1β-metoxidiversifolina ( <b>6</b> ) e regiões expandidas do espectro (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	108
<b>Anexo 4</b> Espectro NMR <sup>1</sup> H de 8β-O-(2-metilbutiroil)tirofundina ( <b>4</b> ) e 8β-O-(isovaleroil)tirofundina ( <b>5</b> ) (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	109
<b>Anexo 5</b> Regiões expandidas do espectro NMR <sup>1</sup> H de 8β-O-(2-metilbutiroil)tirofundina ( <b>4</b> ) e 8β-O-(isovaleroil)tirofundina ( <b>5</b> ) (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	110
<b>Anexo 6</b> Espectro NMR <sup>13</sup> C de 8β-O-(2-metilbutiroil)tirofundina ( <b>4</b> ) e 8β-O-(isovaleroil)tirofundina ( <b>5</b> ) (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	111
<b>Anexo 7</b> Regiões expandidas do espectro NMR <sup>13</sup> C de 8β-O-(2-metilbutiroil)tirofundina ( <b>4</b> ) e 8β-O-(isovaleroil)tirofundina ( <b>5</b> ) (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	112
<b>Anexo 8</b> Espectro gDQCOSY de 8β-O-(2-metilbutiroil)tirofundina ( <b>4</b> ) e 8β-O-(isovaleroil)tirofundina ( <b>5</b> ) (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	113

**Anexo 9** Espectro gHSQC de  $8\beta$ -*O*-(2-metilbutiroil)tirofundina (4) e  $8\beta$ -*O*-(isovaleroil)tirofundina (5) (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)..... 114

**Anexo 10** Espectro gHMBC de  $8\beta$ -*O*-(2-metilbutiroil)tirofundina (4) e  $8\beta$ -*O*-(isovaleroil)tirofundina (5) (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)..... 115

## ÍNDICE DE TABELAS

**Tabela 1.1** Concentrações ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) das soluções metanólicas dos extratos Hexano, Diclorometano (DCM), Acetato de Etila (AcOEt), Acetona e Metanol (MeOH) e dos controles Ácido gálico e Quercetina utilizados no bioensaio de atividade antioxidante. ... 29

**Tabela 1.2** Crescimento micelial médio,  $\pm$ desvio padrão da média, de *Pythium aphanidermatum*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum acutatum*, na presença de extratos foliares de *Myrsine umbellata* e *Myrsine coriacea* utilizando solventes em ordem crescente de polaridade ou água destilada como controle. DCM: diclorometano, AcOEt: acetato de etila e MeOH: metanol. Letras iguais sobrescritas na mesma linha indicam que não houve diferença significativa pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade. .... 32

**Tabela 1.3** Médias da duração de fase larval, fase pupal e massa pupal de *Spodoptera frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com extrato de *Myrsine umbellata* e *Myrsine coriacea* a  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Temp.:  $25 \pm 10\text{C}$ ; UR:  $70 \pm 5\%$  e fotofase: 12h. DCM: diclorometano, AcOEt: acetato de etila e MeOH: metanol. Letras iguais sobrescritas na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade. .... 36

**Tabela 1.4** Mortalidade de fase larval e pupal de *Spodoptera frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com extrato de *Myrsine umbellata* e *Myrsine coriacea* a  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$ .Temp.:  $25 \pm 1^0\text{C}$ ; UR:  $70 \pm 5\%$  e fotofase: 12h. DCM: diclorometano, AcOEt: acetato de etila e MeOH: metanol. Letras iguais sobrescritas na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). .... 37

**Tabela 1.5** Índice de atividade antioxidante (AAI) e conteúdo fenólico total (TPC) de extratos foliares de *Myrsine umbellata* e *Myrsine coriacea*. Ácido gálico e quercetina: referência de antioxidantes.  $r^2$ : coeficiente de determinação do efeito de eliminação de radicais livres sobre a concentração de substância / extrato I, II, e III (três repetições).  $\text{IC}_{50}$ : concentração para 50% de inibição. GAE: ácido gálico equivalente. DCM: diclorometano,

AcOEt: acetato de etila e MeOH: metanol. Letras diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam que houve diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). ..... 39

**Tabela 2.1** Dados espectroscópicos de  $^1\text{H}$  RMN (600MHz) e  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  para os compostos 4 e 5. .... 67

**Tabela 2.2** Valores de  $\text{IC}_{50}$  calculados dos compostos 1–3, 6–12 e 14, usando um modelo sigmoidal dose-resposta variável slope. .... 70

**Tabela 3.1**  $\text{CL}_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) das frações (A, B e C) do extrato acetato de etila de folhas de *T. diversifolia* e compostos majoritários,  $1\beta$ -metoxidiversifolina, tagitinina C e tagitinina A, frente à *Artemia salina* ..... 89

**Tabela 3.2** Médias da duração de fase larval, fase pupal e massa pupal de *Spodoptera frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com frações do extrato acetato de etila (A, B e C) de folhas de *Tithonia diversifolia* a  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Temp.:  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ; UR:  $70 \pm 5\%$  e fotofase: 12h. Letras iguais sobrescritas na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). ..... 92

**Tabela 3.3** Médias da duração de fase larval, fase pupal e massa pupal de *Spodoptera frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com as lactonas sesquiterpênicas tagitinina A, tagitinina C e  $1\beta$ -metoxidiversifolina a 100, 50, 10 e 5 ppm. Temp.:  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ; UR:  $70 \pm 5\%$  e fotofase: 12h. Letras iguais sobrescritas na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). ..... 93

**Tabela 3.4** Mortalidade na fase larval e pupal de *Spodoptera frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com frações do extrato acetato de etila (A, B e C) de folhas de *Tithonia diversifolia* a  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Temp.:  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ; UR:  $70 \pm 5\%$  e fotofase: 12h. Letras iguais sobrescritas na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). ..... 94

**Tabela 3.5** Mortalidade na fase larval e pupal e massa pupal de *Spodoptera frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com as lactonas sesquiterpênicas tagitinina A, tagitinina C e 1 $\beta$ -metoxidiversifolina a 100, 50, 10 e 5 ppm. Temp.: 25  $\pm$  1<sup>0</sup>C; UR: 70  $\pm$  5% e fotofase: 12h. Letras iguais sobrescritas na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa pelo teste de Tukey (p > 0,05). ..... 95



## SUMÁRIO

RESUMO .....	iv
ABSTRACT .....	v
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vi
ÍNDICE DE TABELAS .....	x
SUMÁRIO.....	xiii
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
<i>Cerrado: a savana brasileira</i> .....	1
<i>Invasão biológica e perda da biodiversidade</i> .....	2
<i>Alelopatia</i> .....	4
<i>Metabólitos secundários e atividades biológicas</i> .....	5
<i>Caracterização da área de estudo</i> .....	7
<i>Espécies selecionadas</i> .....	8
<i>Hipótese do trabalho</i> .....	12
<i>Objetivo geral</i> .....	12
<i>Objetivos específicos</i> .....	13
<i>Referências bibliográficas</i> .....	13
CAPÍTULO 1. ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS FOLIARES DE <i>Myrsine umbellata</i> (Mart.) E <i>Myrsine coriacea</i> (Sw.) R.Br. ex Roem. & Schult.....	20
<i>Resumo</i> .....	21
<i>Abstract</i> .....	22
<i>Introdução</i> .....	23
<i>Material e Métodos</i> .....	25
<i>Conclusões</i> .....	41
<i>Referências Bibliográficas</i> .....	42
CAPÍTULO 2. ATIVIDADE FITOTÓXICA DE BIOCOMUNICADORES DE <i>Tithonia diversifolia</i> (HEMSL.) A. GRAY.....	48

<i>Resumo</i> .....	49	
<i>Abstract</i> .....	50	
<i>Introdução</i> .....	51	
<i>Material e Métodos</i> .....	53	
<i>Resultados e Discussão</i> .....	58	
<i>Referências bibliográficas</i> .....	74	
CAPÍTULO 3. ATIVIDADE INSETICIDA DE FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DE FOLHAS DE <i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray CONTRA <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith) .....		79
<i>Resumo</i> .....	80	
<i>Abstract</i> .....	81	
<i>Introdução</i> .....	82	
<i>Material e Métodos</i> .....	84	
<i>Resultados e Discussão</i> .....	89	
<i>Conclusões</i> .....	96	
<i>Referências bibliográficas</i> .....	96	
CONCLUSÃO GERAL .....	101	
APÊNDICE .....	102	
ANEXOS .....	105	

## INTRODUÇÃO GERAL

### **Cerrado: a savana brasileira**

O Cerrado é a segunda maior formação vegetal brasileira, ocupando cerca de 21% do território nacional (KLINK; MACHADO, 2005) e é considerado um dos 25 *hotspots* para a conservação da biodiversidade no mundo (MYERS et al., 2000). Do ponto de vista fitofisionômico, o Cerrado não deve ser considerado um bioma único, mas sim um complexo de biomas formado por: campo tropical (campo limpo), savana (campo sujo, campo cerrado e cerrado *sensu stricto*) e floresta estacional (cerradão) (BATALHA, 2011). Os campos tropicais são formações predominantemente herbáceas, com raros arbustos e ausência completa de árvores (RIBEIRO; WALTER, 2008). As savanas são formações tropicais cujos padrões de crescimento estão associados às estações secas e úmidas, em que o estrato herbáceo é quase contínuo, contendo árvores ou arbustos espalhados, e estruturalmente intermediário entre floresta e campo (WALTER, 2006). Já as florestas estacionais se caracterizam pela presença de um estrato arbóreo de grande porte e um dossel contínuo, apresentando maior cobertura na estação chuvosa e menor na estação seca (RIBEIRO; WALTER, 2008). Devido ao predomínio da fisionomia savânica, que ocupa mais de 70% do Cerrado, este Domínio Fitogeográfico é considerado uma savana neotropical (COUTINHO, 2006).

A temperatura média anual no Cerrado e a precipitação estão em torno de 21,3 °C e 1.315 mm, respectivamente (DANTAS; BATALHA, 2011). Apresenta predominância de solos ácidos, profundos e bem drenados, pobres em nutrientes e com altos níveis de alumínio trocável (HARIDASAN, 2008). O clima favorece a ocorrência de fogo durante a estação seca, quando a cobertura vegetal é altamente inflamável (OLIVEIRA-FILHO; RATTER, 2002). No cerrado, assim como em outras savanas, o fogo desempenha um papel fundamental na determinação da composição de espécies (SILVA, I.; BATALHA, 2010) e sua vegetação possui adaptações ao fogo, como por exemplo, cascas espessas, xilopódios, folhas com cutículas densas e raízes profundas (NOVAES et al., 2013).

Devido seu alto grau de endemismo, é considerado uma das regiões de maior biodiversidade do planeta, podendo representar 33% da diversidade biológica do Brasil (AGUIAR; MACHADO; MARINHO-FILHO, 2004; LIMA, 2014). As angiospermas são o grupo com maior número de espécies, representando 11.384 espécies registradas pelo

Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil (FORZZA et al., 2010). Desse total, apenas 71 espécies (0,60%) possuem algum estudo sobre suas atividades biológicas (NOVAES et al., 2013). Esse valor é pouco expressivo considerando que se trata de um dos *hotspot* para a conservação da biodiversidade no mundo (MYERS et al., 2000). O conceito de *hotspot* é baseado no grau de endemismo e ameaça, sendo que o grau de ameaça é definido pela extensão de área natural perdida, que deve ser de pelo menos 70% de sua cobertura vegetal original (LIMA, 2014).

O Cerrado ocupa a porção central do Brasil, incluindo em partes os estados da Bahia, Ceará, Maranhão, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Piauí e Rondônia, além dos estados de Goiás, Tocantins e Distrito Federal (RIBEIRO; WALTER, 2009). Destes estados, São Paulo, Paraná e Mato Grosso do Sul são os que apresentam os menores índices de cobertura vegetal natural, 15, 32 e 32%, respectivamente, e os estados do Piauí, Maranhão e Tocantins, apresentam os maiores índices de preservação, 92, 89 e 79%, respectivamente. (SANO et al., 2008).

A ocupação do Cerrado iniciou-se na década de 1920, quando a indústria cafeeira estava em plena atividade, principalmente no Estado de São Paulo. A partir da década de 70, houve um incentivo por parte do governo, fornecendo subsídios e assistência técnica aos pecuaristas, e mais da metade da sua área original foi substituída por pastagens e culturas agrícolas anuais (KLINK; MACHADO, 2005). Em 2010, o Cerrado já produzia 40% do rebanho bovino brasileiro, grande parte para exportação, e metade da safra de grãos nacional (FERNANDES; PESSÔA, 2011).

A crescente ocupação humana do território e sua intensa capacidade de impactar o meio com o qual ela interage, trouxeram grandes danos ambientais como a degradação dos ecossistemas, a fragmentação de *habitat*, a extinção da biodiversidade, a invasão de espécies exóticas, a erosão dos solos, a poluição de aquíferos, a alteração nos regimes de queimada, o desequilíbrio no ciclo do carbono e possivelmente modificações climáticas regionais (KLINK; MACHADO, 2005). Diante da redução acelerada de áreas do Cerrado, é essencial a implantação de programas de manejo de reflorestamento e replantio de espécies nativas, além de estudos referentes à sua biodiversidade, haja vista a enorme riqueza de espécies de plantas com potencial biológico e ainda pouco exploradas.

### **Invasão biológica e perda da biodiversidade**

Além da intensa substituição do Cerrado por áreas de pastagens e monoculturas, outro fator que ameaça fortemente a biodiversidade desse domínio é o fenômeno da invasão biológica (PIVELLO, 2011). Este fenômeno se caracteriza pelo estabelecimento de espécies, animais ou vegetais, em ecossistemas naturais, de forma que passam a dominar o ambiente e causar danos incluindo a extinção de espécies nativas (CLAVERO; GARCÍA-BERTHOU, 2005). No entanto, alguns pesquisadores não consideram a invasão biológica como a principal causa de extinções de espécies e ainda reconhecem que, no caso das plantas, muitas espécies não nativas possuem papel importante no controle da erosão dos solos, fornecimento de madeira, alimentos e outros serviços, entretanto é necessário o manejo dessas espécies (SIMBERLOFF, 2011; GAERTNER et al., 2012).

Entre os principais fatores que favorecem as invasões biológicas, estão as ações antrópicas, seja pela introdução intencional ou acidental de novas espécies, ou por distúrbios provocados na própria comunidade (MATOS; PIVELLO, 2009). No caso das plantas, muitas delas foram introduzidas como plantas ornamentais ou pelo seu caráter farmacológico e posteriormente tornaram-se invasoras (PIMENTEL; ZUNIGA; MORRISON, 2005).

Nos fragmentos de cerrado as gramíneas africanas são as mais importantes invasoras, especialmente *Urochloa decumbens* (Stapf) R. D. Webster e *Melinis minutiflora* P. Beauv. (NOVAES et al., 2013). Devido ao seu comportamento agressivo elas se estabelecem, pelas bordas, em locais perturbados e em seguida se espalham por toda área (PIVELLO; SHIDA; MEIRELLES, 1999). As gramíneas africanas foram introduzidas no Brasil como pastagem para o gado, espalhando-se rapidamente por todo o país (PIVELLO; SHIDA; MEIRELLES, 1999; WILLIAMS; BARUCH, 2000). Entender os mecanismos que governam o sucesso dessas plantas tem sido um dos maiores desafios dos últimos anos (CATFORD; JANSSON; NILSSON, 2009; BENNETT; THOMSEN; STRAUSS, 2011).

As plantas invasoras são geralmente mais competitivas que as demais espécies, se reproduzem rapidamente, são melhores colonizadoras e suportam condições adversas (BAKER, 1965). Essas plantas podem alterar as propriedades do solo de modo que as nativas não conseguem se estabelecer, criando uma vantagem competitiva (WEIDENHAMER; CALLAWAY, 2010). Essa vantagem pode ser explicada segundo a “hipótese das novas armas” (CALLAWAY; RIDENOUR, 2004), que afirma que as plantas invasoras atingem superioridade competitiva, pois seus metabólitos secundários agem como aleloquímicos que apresentam novos desafios para as espécies nativas (ALLSTADT

et al., 2012). Dessa forma, metabólitos secundários de espécies invasoras do Cerrado são uma importante área da fitoquímica a ser investigada (NOVAES et al., 2013).

## **Alelopatia**

A alelopatia é um tipo de mecanismo de interação bioquímica entre vegetais, que tem sido amplamente estudado nos últimos anos devido à sua importância em diversos ecossistemas (SILVA, 2004). De acordo com An (2005) o fenômeno alelopático influencia a sucessão vegetal, a dominância, a formação clímax, a diversidade de espécies, a estrutura das comunidades e a produtividade, sendo importante em ambientes naturais e agroecossistemas. Além disso, é uma ciência multidisciplinar onde ecólogos, químicos, cientistas do solo, agrônomos, biólogos, fisiologistas vegetais e biólogos moleculares oferecem suas habilidades para dar uma visão global das complexas interações que ocorrem em um determinado ecossistema (MACÍAS et al., 2007).

A alelopatia é definida pela Sociedade Internacional de Alelopatia (IAS, 1996) como “Qualquer processo que envolve metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos, que influencia o crescimento e desenvolvimento de sistemas agrícolas e biológicos”. A liberação destas substâncias químicas, denominadas aleloquímicos, pelas plantas para o meio ambiente pode ocorrer por meio da volatilização, lixiviação, exsudação ou decomposição de resíduos vegetais (MARASCHIN-SILVA; AQUILA, 2006). O modo de ação dos aleloquímicos pode ser indireto, quando o composto alelopático altera, primeiramente, algumas propriedades químicas do solo ou direto quando a substância interfere no metabolismo vegetal (FERREIRA; AQUILA, 2000).

De acordo com Silva (2004), essas substâncias em sua maioria são oriundas do metabolismo secundário, sendo muito diversificadas quanto à estrutura química. Os metabólitos secundários atuam na defesa contra herbívoros e patógenos, na atração de polinizadores, além da ação alelopática (HARBORNE, 1997). Seus efeitos podem ser intra e interespecíficos e podem proporcionar vantagem tanto ao produtor (doador) como ao receptor (OLIVEIRA, 2009).

Todas as plantas produzem metabólitos secundários, sua natureza química muitas vezes varia de acordo com certas espécies de plantas e muitos deles têm sua síntese desencadeada devido às condições as quais as plantas estão expostas (FERREIRA; AQUILA, 2000). Todos os órgãos da planta têm potencial para armazenar aleloquímicos,

porém, o acúmulo de metabólitos secundários em estruturas especializadas evita que a planta produtora seja prejudicada pela toxidez que muitas destas substâncias apresentam (SILVA, 2004). A resistência ou tolerância aos metabólitos secundários que funcionam como aleloquímicos é específica, existindo espécies mais sensíveis que outras, como por exemplo, *Lactuca sativa* e *Lycopersicum esculentum*, por esse motivo, muito utilizadas em bioensaios de laboratório (FERREIRA; AQUILA, 2000). Einhelling (1996) demonstrou que tanto a quantidade como a ação prejudicial dos aleloquímicos depende de fatores bióticos e abióticos. Para esse autor, condições de estresse como umidade, temperatura ou condições de nutrientes abaixo do ideal, muitas vezes pode aumentar a produção destes compostos.

Grande parte dos trabalhos enfocando alelopatia é realizada avaliando a fitotoxicidade de extratos vegetais sobre o crescimento e a germinação de espécies em condições de laboratório. Muitos pesquisadores questionam a significância das interações alelopáticas, pois comprovações deste fenômeno e de seus mecanismos em condições naturais são difíceis de serem obtidas (GOLDFARB; PIMENTEL, L.; PIMENTEL N., 2009) e os bioensaios em laboratório não representam exatamente o que ocorre na natureza (MEINERS et al., 2012). De acordo com Inderjit e Duke (2003), os aleloquímicos costumam ocorrer como grupos de substâncias, o que dificulta atribuir, na natureza, a uma ou outra o efeito observado. Em muitos casos, os aleloquímicos se movem através do solo e podem ser transformados durante o movimento, metabolizados pelos microrganismos do solo, ou ligado à matéria orgânica do mesmo (INDERJIT, 2001). No entanto, se tratando de espécies invasoras, a identificação de aleloquímicos presentes nessas plantas é um passo importante para entender se a alelopatia pode ser uma das formas de seu estabelecimento no ambiente. Essas substâncias, depois de identificadas em laboratório, poderão ser utilizadas em estudos de campo, avaliando sua concentração no solo e sua interação com outras substâncias ou microrganismos (BLUM 1999; INDERJIT; DUKE 2003). Além disso, o desenvolvimento de novas metodologias, técnicas de bioensaios e uma compreensão completa do fenômeno alelopático, vão fornecer novas ferramentas para desenvolvimento de herbicidas naturais, no contexto das novas abordagens para o manejo integrado de pragas (MACÍAS et al., 2008).

### **Metabólitos secundários e atividades biológicas**

Uma das principais diferenças entre as plantas e os animais é a capacidade das plantas em acumular uma grande variedade de compostos orgânicos de baixa massa molecular e, que aparentemente, não possuem funções essenciais no seu crescimento e desenvolvimento (TAIZ; ZEIGER, 2009). A maioria das plantas por estarem sujeitas a desenvolver-se sobre um substrato fixo, necessitam de compostos químicos que atuem na defesa ao ataque de herbívoros, afídeos ou patógenos (OLIVEIRO-BASTIDAS, 2008). Além disso, os compostos do metabolismo secundário também podem agir como atrativos aos polinizadores e dispersores, além de atuarem na interação planta-planta (alelopatia) e planta-microrganismo. Esses compostos, conhecidos como metabólitos secundários ou produtos naturais, muitas vezes estão distribuídos entre grupos taxonômicos específicos, podendo relacionar algumas classes de compostos a certas famílias ou espécies de plantas (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000).

Taiz e Zeiger (2009) classificam os compostos secundários, em três grupos quimicamente distintos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados. Os terpenos e os compostos fenólicos são as maiores classes de metabólitos secundários existentes nas plantas e incluem ações fitotóxicas (DUKE; OLIVA, 2004; EINHELLIG, 2004), inseticidas (VIEGAS JÚNIOR, 2003; TAIZ; ZEIGER, 2009), antifúngicas (YANG et al., 2006) e antioxidantes (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002; ALVES-RODRIGUES; SHAO, 2003; STRINGHETA et al., 2006).

Todas as plantas produzem metabólitos secundários e sua produção, acúmulo e liberação no ambiente podem ser influenciados por fatores ambientais (GOBBO-NETO; LOPES, 2007) como, por exemplo, a exposição à luz (THARAYIL; TRIEBWASSER 2010), disponibilidade de água e nutrientes, temperatura, intensidade luminosa, textura do solo, microrganismos, ataque de insetos (EINHELLIG, 1996; CHOU, 1999; BLANCO, 2007) e também pela idade da planta (LARCHER, 2000).

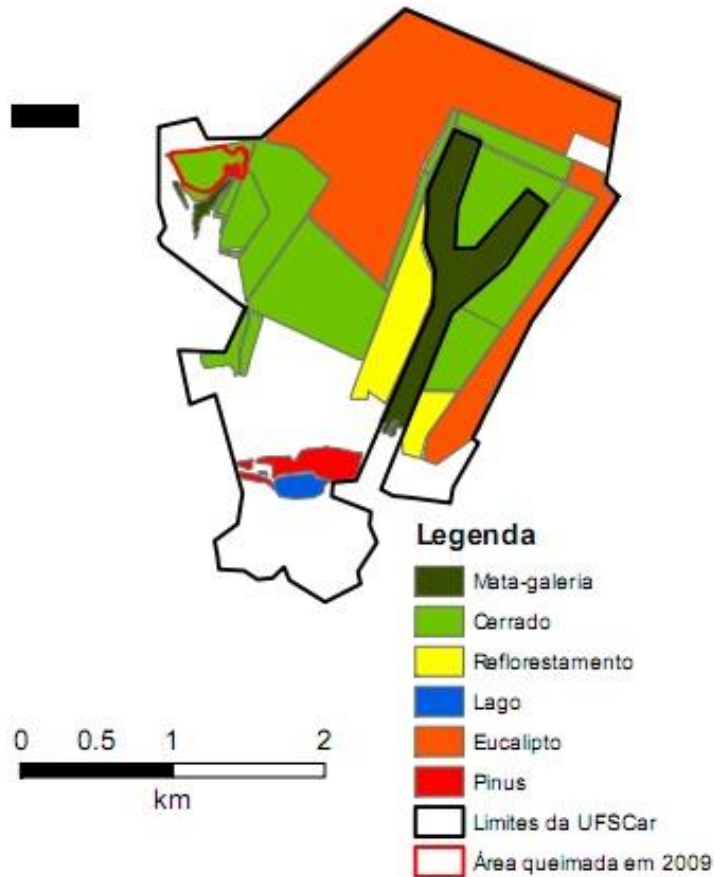
Espécies vegetais provenientes do Cerrado costumam apresentar mecanismos de defesa tais como folhas coriáceas, tricomas, quantidades elevadas de compostos fenólicos e taninos, em resposta ao baixo teor de nutrientes do solo à que estão submetidas, a maior competição por recursos e ao longo período de estiagem, marcada por profundo déficit hídrico (SILVA et al., 2009; SILVA, D.; BATALHA, 2011). Nesse sentido, espécies de plantas provenientes do Cerrado possuem potencial para a produção de metabólitos secundários com atividades biológicas. Entretanto, esse potencial ainda é pouco explorado, como observado por Novaes et al. (2013). Esses autores listaram 32 espécies de plantas do



Cerrado que apresentaram estudos publicados relacionados à suas atividades biológicas. As famílias com maior número de publicações nesse sentido foram Myrtaceae, Fabaceae, Bignoniaceae e Melastomataceae e, as atividades biológicas com compostos identificados, mais estudadas, incluíam a fitotóxica, moluscicida, fungicida, inseticida e antibacteriana.

### **Caracterização da área de estudo**

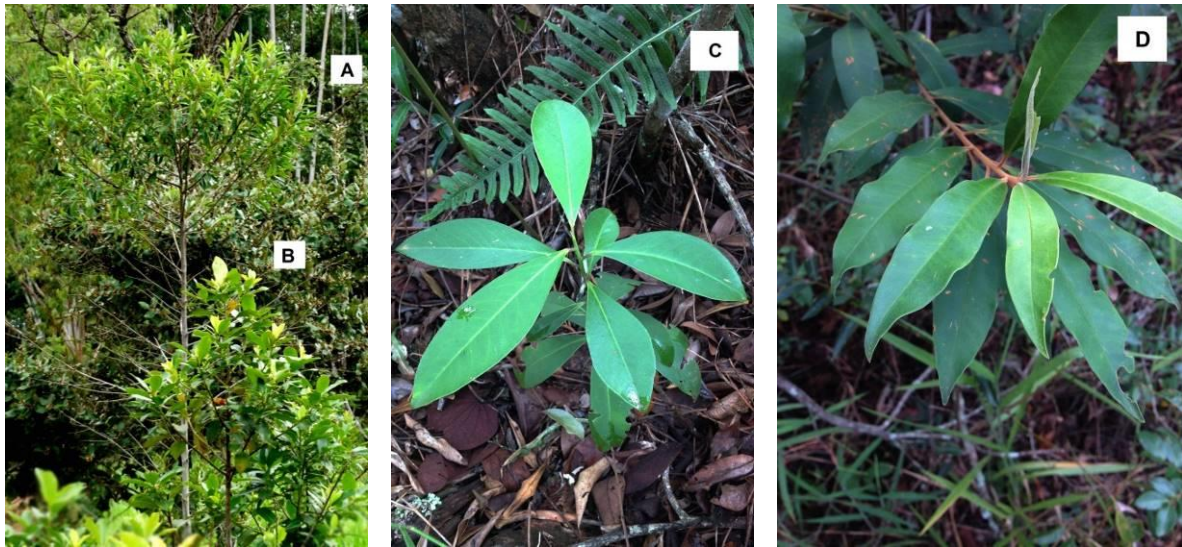
As coletas de material biológico foram realizadas no cerrado *sensu stricto* pertencente à Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), estado de São Paulo, Brasil (21° 58' a 22° 00' S e 47° 51' a 47° 52' W) (FIGURA 1). O clima da região, pela classificação de Köppen é do tipo Cwa (tropical de altitude). Existem duas estações climáticas bem definidas, uma chuvosa, normalmente entre os meses de outubro a março e um período seco, entre os meses de abril a setembro (SILVA et al., 2009). A vegetação é caracterizada por um estrato lenhoso formado por árvores e arbustos que se projetam acima de um estrato herbáceo bem definido (RIBEIRO; WALTER 2009).



**Figura 1** Croqui da Universidade Federal de São Carlos, *campus* São Carlos, mostrando os diferentes tipos de uso da terra e a distribuição da vegetação. ■ Limite da mancha urbana. Fonte: Xavier, 2011

### Espécies selecionadas

*Myrsine umbellata* Mart. (sin. hom. *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez) e *Myrsine coriacea* (Sw.) R. Br. ex Roem. & Schult. (sin. het. *Rapanea ferruginea* (Ruiz & Pav.) Mez) são espécies pertencentes a família Primulaceae e amplamente distribuídas no Estado de São Paulo, Brasil (WANDERLEY et al. 2005) (FIGURA 2).



**Figura 2** A) *Myrsine coriacea* (Sw.) R. Br. ex Roem. & Schult.; B) *Myrsine umbellata* Mart. C) Indivíduo jovem de *M. umbellata* e D) Indivíduo jovem de *M. coriacea*  
Fonte: Edgar Oliveira (A, B); Arquivo pessoal (C, D).

*M. umbellata* Mart. é uma espécie arbórea, perenifólia, polimorfa e heliofága, apresentando de 1,5 a 8 m de altura, possui ocorrência em diversos habitats e se encontra amplamente distribuída desde Pernambuco até o Rio Grande do Sul (JUNG-MENDAÇOLLI; BERNACCI, 2005). É caracterizada pela suas inflorescências umbelliformes, com longos pedicelos e densamente dispostas nos ramos terminais (FREITAS, 2003). As folhas são simples, alternas, coriáceas, verde-escuras, sendo brilhantes e visivelmente nervadas na face adaxial e opacas com glândulas esparsas na face abaxial (BACKES; IRGANG, 2002) (FIGURA 2C). As sementes germinam facilmente em qualquer tipo de solo, após os frutos passarem pelo tubo digestivo dos animais que os consomem (BACKES; IRGANG, 2002). Os nomes populares incluem capororoca, capororoca-branca, jacaré-do-mato e copororocão (JUNG-MENDAÇOLLI; BERNACCI, 2005).

*M. coriacea* (Sw.) R. Br. ex Roem. & Schult. Trata-se de uma espécie perenifólia, arbustos e arvoretas, que medem entre 4 a 10 m de altura, possui ramos terminais pilosos e ferrugíneos (FREITAS, 2003). É a espécie mais encontrada no Brasil, é considerada pioneira e característica de formações vegetais secundárias (JUNG-MENDAÇOLLI; BERNACCI, 2005). Ocorre preferencialmente em áreas abertas, secas e estradas (FREITAS, 2003). As folhas são cartáceas, ovadas a elípticas, possuem pontuações secretoras na face abaxial, base aguda, ápice agudo e nervura principal pilosa (SOUZA,

2014) (FIGURA 2D). É conhecida popularmente por canela-azeitona, azeitona-do-mato, copororoca vermelha e copororocaçu (LORENZI, 2002).

Ambas as espécies possuem madeira de coloração palha a marrom-escuro ou avermelhada, e pouca importância comercial (PINHEIRO; CARMO, 1993), sendo utilizada na construção civil, produção de lenha e carvão (BACKES; IRGANG, 2002). Segundo Midwo et al. (2002), algumas plantas da família Primulaceae (antiga família Myrsinaceae) são amplamente utilizadas na medicina tradicional como anti-helmínticos e antibactericidas. A casca é importante fonte de tanino e o seu decocto é considerado remédio contra a lepra (BACKES; IRGANG, 2002).

Várias substâncias já foram isoladas de diversas espécies de *Myrsine* (incluindo *Rapanea*). Dentre os metabólitos secundários presentes nestas espécies, podemos citar: triterpenóides (JANUÁRIO et al., 1992), flavonóides (ZHONG et al., 1997), hidroquinonas (ZHONG et al., 1998), glicosídeos (ZHONG et al., 1999) e benzoquinonas, este último, responsável pela ação antibacteriana e fitotóxica dessas espécies (MIDIWO et al., 2002).

*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray é uma planta herbácea, nativa do México, pertencente à família Asteraceae. É um arbusto perene semi-herbáceo, ramificado, com 1,5 - 2,5 m de altura, em média, podendo chegar até 3,0 m de altura. As folhas são inteiras ou lobadas, grandes, e pubescentes. Suas inflorescências são terminais e axilares, com flores amarelas vistosas, em capítulos solitários grandes, semelhantes aos girassóis (LORENZI; SOUZA, 2001) (FIGURA 3).



**Figura 3** *Tithonia diversifolia*: A, C) Inflorescência; B) Folha senescente. Fonte: Arquivo pessoal

Várias substâncias já foram isoladas de espécies de *Tithonia*, incluindo sesquiterpenos, flavonoides e diterpenóides (ZHAO et al., 2012). De acordo com Chagas-Paula et al. (2011), as atividades biológicas apresentadas por *T. diversifolia* podem ser atribuídas à presença de lactonas sesquiterpênicas pois estes compostos ocorrem em grandes quantidades na família Asteraceae ( $> 2\%$  do peso de matéria seca das folhas) e compreendem uma importante classe de metabólitos secundários responsáveis para várias atividades farmacológicas ou tóxicos (HEINRICH et al., 1998).

Foi introduzida em muitos países pelo seu caráter medicinal e ornamental (ZHAI et al., 2010). É utilizada como adubo verde, bem como no controle da erosão do solo (TONGMA et al., 1999). Produz matéria orgânica de boa qualidade, devido à presença de concentrações elevadas de nutrientes e sua grande capacidade de produção de biomassa (RÍOS-KATO, 1992). No Brasil, é considerada invasora, afetando as comunidades nativas bem como os sistemas agrícolas (AYENI; LORDBANJOU; MAJEK, 1997) (FIGURA 4).





**Figura 4** Presença da espécie invasora *Tithonia diversifolia* no cerrado da UFSCar. Fonte: Arquivo pessoal

Estas características são úteis para estudos fitoquímicos e ecológicos, como a alelopatia, uma vez que há sempre disponibilidade de material vegetal, em grandes quantidades. As atividades biológicas já estudadas nessa espécie incluem anti-inflamatória, analgésica, antidiabética, antimicrobiana, anticâncer, citotóxica, inseticida, fitotóxica, entre outras (CHAGAS-PAULA, 2012).

### **Hipótese do trabalho**

A hipótese desta tese é que espécies nativas do Cerrado, do gênero *Myrsine*, e uma invasora, *Tithonia diversifolia* apresentam diferentes atividades biológicas, incluindo inseticida, fungicida e antioxidante em resposta ao estresse à que estão submetidas e que a liberação de aleloquímicos pode ser um dos modos de ação das plantas invasoras estabelecerem-se no ambiente. Os metabólitos secundários liberados por estas espécies podem apresentar importância econômica servindo de modelo para a produção de produtos de origem natural que possam ser utilizados na agricultura, bem como, na indústria farmacêutica.

### **Objetivo geral**

O objetivo deste trabalho consistiu em avaliar o potencial biológico de extratos foliares de *Myrsine umbellata* e *Myrsine coriacea* e a atividade fitotóxica e inseticida de extratos foliares e compostos isolados de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (Asteraceae).

### Objetivos específicos

(1) Avaliar o efeito antifúngico *in vitro* de extratos foliares de espécies de *Myrsine* (*M.umbellata* e *M. coriacea*) sobre fungos fitopatogênicos.

(2) Avaliar o potencial inseticida dos extratos foliares de *M. umbellata* e *M. coriacea* sobre *Spodoptera frugiperda* (lagarta-do-cartucho do milho).

(3) Determinar a concentração de fenólicos totais e atividade antioxidante de extratos foliares de *M. umbellata* e *M. coriacea*, pelo método de redução do radical DPPH.

(4) Isolar e identificar as substâncias com atividade fitotóxica de *T. diversifolia*, coletadas no período seco.

(5) Avaliar a atividade inseticida da fração mais ativa no bioensaio de fitotoxicidade e compostos isolados de *T. diversifolia* sobre *S. frugiperda*.

### Referências bibliográficas

AGUIAR, L. M. S.; MACHADO, R. B.; MARINHO-FILHO, J. A diversidade biológica do Cerrado. **Ecologia e caracterização do Cerrado**, p. 19-42, 2004.

ALLSTADT, A. et al. Interference competition and invasion: spatial structure, novel weapons and resistance zones. **Journal of Theoretical Biology**, v. 306, p. 46–60, 2012.

AN, M. Mathematical modelling of dose-response relationship (hormesis) in allelopathy and its application. **Nonlinearity in Biology, Toxicology, and Medicine**, v.3, p.153–172, 2005.

AYENI, A. O.; LORDBANJOU, D. T.; MAJEK, B. A. *Tithonia diversifolia* (Mexican sunflower) in south-western Nigeria: occurrence and growth habit. **Weed research**, v.37, n.6, p.443-449, 1997.

ALVES-RODRIGUES, A.; SHAO, A. The science behind lutein. **Toxicology Letters**, v. 150, n. 1, p. 57-83, 2004.

BACKES, P.; IRGANG, B. 2002. **Árvores do sul: guia de identificação e interesse ecológico**. Santa Maria: Editora Palloti, 2002.326p.

BAKER, H. G. 1965. Characteristics and modes of origin of weeds. In: \_\_\_\_\_; STEBBINS, G. L. **The genetics of colonizing species**. Academic Press, New York. 1965. p. 147-172.

BATALHA, M. A. O cerrado não é um bioma. **Biota Neotropica**, v. 11, n. 1, p. 1-4, 2011.

BENNETT, A. E.; THOMSEN, M.; STRAUSS, S. Y. Multiple mechanisms enable invasive species to suppress native species. **American Journal of Botany**, v. 98, n. 7, p. 1086-94, 2011.

BLANCO, J. A. The representation of allelopathy in ecosystem-level forest models. **Ecological Modelling**, v. 209, n. 2, p. 65-77, 2007.

BLUM, U. Designing laboratory plant debris–soil bioassays: some reflections. In: INDERJIT; DAKSHINI, K. M. M.; FOY, C. L. **Principles and practices in plant ecology: allelochemical interactions**. CRC, Boca Raton, 1999. p. 17–23.

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, p.436–443, 2004.

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.

COORDENADORIA ESPECIAL PARA O MEIO AMBIENTE. **Trilha da Natureza**. Disponível em: <[http://www.ufscar.br/~ugr/cema/trilha\\_natureza.php](http://www.ufscar.br/~ugr/cema/trilha_natureza.php)> Acesso em: jan. 2015.

CHAGAS-PAULA, D. A. et al. Chlorogenic acids from *Tithonia diversifolia* demonstrate better anti-inflammatory effect than indomethacin and its sesquiterpene lactones. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, pp. 355–362. 2011.

CHAGAS-PAULA, D. A. et al. Ethnobotany, chemistry, and biological activities of the genus *Tithonia* (Asteraceae). **Chemistry & Biodiversity**, v. 9, 2012.

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

CLAVERO, M.; GARCÍA-BERTHOU, E. Invasive species are a leading cause of animal extinctions. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 20, n. 3, p. 110, 2005.

COUTINHO, L. M. O conceito de bioma. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 1, p. 13-23, 2006.

CROTEAU R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. **Biochemistry and molecular biology of plants**. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, 2000. p. 1250–1268.



DANTAS, V. L.; BATALHA, M. A. Vegetation structure: fine scale relationships with soil in a cerrado site. **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 206, n. 4, p. 341-346, 2011.

DUKE, S. O.; OLIVA, A. Mode of action of phytotoxic terpenoids. In: MACÍAS, F. A. et al. **Allelopathy: chemistry and mode of action of allelochemicals**. Boca Raton, CRC Press. 2004. p. 201-216.

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

EINHELLIG, F. A. Mode of action of phenolic compounds. In: MACÍAS, F. A. et al. **Allelopathy: chemistry and mode of action of allelochemicals**. Boca Raton, CRC Press. 2004. p. 217-238.

FERNANDES, P. A.; PESSÔA, V. L. S. O cerrado e suas atividades impactantes: uma leitura sobre o garimpo, a mineração e a agricultura mecanizada. **Observatorium: Revista Eletrônica de Geografia**, v. 3, n. 7, p. 19-37, 2011.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, n. 1, p. 175-204, 2000.

FORZZA, R. C. et al. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. v.1. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

FREITAS, M. F. Estudos taxonomicos das especies de Myrsine L. (Myrsinaceae) nas regiões sudeste e sul do Brasil. 235 p. Tese de Doutorado. Campinas: UNICAMP, 2003.

GAERTNER, M.; HOLMES, P. M.; RICHARDSON, D. M. Biological invasions, resilience and restoration. **Restoration Ecology: The New Frontier**, Second edition, p. 265-280, 2012.

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

GOLDFARB, M.; PIMENTEL, L. W.; PIMENTEL, N. W. Alelopatia: relações nos agroecossistemas. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v.3, n.1, p.23-28, 2009.

HARBORNE, J. B. Plant secondary metabolism. **Plant Ecology**. Second edition, p. 132-155, 1997.

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

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 572-584, 2002.

HEINRICH, M. et al. Ethnopharmacology of Mexican Asteraceae (Compositae). **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 38, n. 1, p. 539-565, 1998.

IAS. **International Allelopathy Society**. 2006. Disponível em: <<http://www.international-allelopathy-society.org>> Acesso em: maio 2013.

INDERJIT, N. F. Soil: environmental effects on allelochemical activity. **Agronomy Journal**, v. 93, n. 1, p. 79-84, 2001.

INDERJIT, N. F.; DUKE, S. O. Ecophysiological aspects of allelopathy. **Planta**, 217: 529-539, 2003.

JANUÁRIO, A. H. et al. Dammarane and cycloartanetriterpenoids from three *Rapanea* species. **Phytochemistry**, v. 31, n. 4, p. 1251-1253, 1992.

JUNG-MENDAÇOLLI, S. L.; BERNACCI, L. C. In: WANDERLEY, M. G. L. et al. **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**.v. 4. Ed. Rima. 432 p., 2005.

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

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos, Rima, 531 p., 2000.

LIMA, T. C. **Modelagem dos vetores de mudança na paisagem no bioma Cerrado**. 56 f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. 2014.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas ornamentais no Brasil**: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 3 ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 1087 p., 2001.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 384 p., 2002.

MACÍAS, F. A. et al. Review Allelopathy – a natural alternative for weed control. **Pest Management Science**, v. 63, p. 327-348, 2007.

MACÍAS, F. A. et al. Plant biocommunicators: their phytotoxicity, degradation studies and potential use as herbicide models. **Phytochemistry Review**, v. 7, p. 179-194, 2008.

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

MATOS, D. M. S.; PIVELLO, V. R. O impacto das plantas invasoras nos recursos naturais de ambientes terrestres: alguns casos brasileiros. **Ciência e Cultura**, v. 61, n. 1, p. 27-30, 2009.

MEINERS, S. J. et al. Developing an ecological context for allelopathy. **Plant Ecology**, v. 213, n. 8, p. 1221-1227, 2012.

MIDIWO, J. O. et al. Bioactive compounds from some Kenyan ethnomedicinal plants: Myrsinaceae, Polygonaceae and *Psiadia punctulata*. **Phytochemistry Reviews**, v. 1, n. 3, p. 311-323, 2002.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 24, 2000.

NOVAES, P. et al. Ecological phytochemistry of Cerrado (Brazilian savanna) plants. **Phytochemistry Reviews**, v. 12, n. 4, p. 839-855, 2013.

OLIVEIRA, S. C. C. **Estudo alelopático de espécies do gênero *Solanum* do Distrito Federal**. Tese de Doutorado. São Carlos: UFSCar, 2009.

OLIVEIROS-BASTIDAS, A. J. El fenómeno alelopático. El concepto, las estrategias de estudio y su aplicación en la búsqueda de herbicidas naturales. **Revista Química Viva** – n.1, ano 7, p. 1-34, 2008.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; RATTER, J. A. Vegetation physiognomies and woody flora of the Cerrado biome. In: OLIVEIRA, P. S.; MARQUIS, R. J. **The Cerrados of Brazil**. New York, Columbia University Press, 2002. p. 91-120.

PIMENTEL, D.; ZUNIGA, R.; MORRISON, D. Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. **Ecological Economics**, v. 52, n. 3, p. 273-288, 2005.

PINHEIRO, A. L.; CARMO, A. P. T. Contribuição ao estudo tecnológico da canela-azeitona, *Myrsine coriacea* (Ruiz e Pav.) Mez, uma espécie pioneira. i. características anatômicas da madeira. **Ciências Florestal**, Santa Maria, v.3, n.1, p. 121-145, 1993.

PIVELLO, V. R.; SHIDA, N. C.; MEIRELLES, S. T. Alien grasses in Brazilian savannas: a threat to the biodiversity. **Biodiversity and Conservation**, v. 8, p. 1281–1294, 1999.

PIVELLO, V. R. Invasões biológicas no cerrado brasileiro: efeitos da introdução de espécies exóticas sobre a biodiversidade. **Ecologia.Info**, v. 33, 2011. Disponível em: <<http://www.ecologia.info/cerrado.htm>> Acesso em: jan. 2015.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. As principais fitofisionomias do bioma Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: ecologia e flora**, v. 1, p. 153-212, 2009.

RICE, E. L. **Allelopathy**. Academic Press, Orlando, FL, 1984.

RÍOS-KATO, C. I. ***Tithonia diversifolia* (hemsl.) Gray, una planta con potencial para la producción sostenible en el trópico**. Conferencia electrónica de la FAO sobre "Agroforestería para la producción animal en Latinoamérica", 1992. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/aga/AGAP/FRG/agrofor1/Rios14.htm> Acesso em: jan. 2015.

SANO, E. E. et al. Mapeamento semidetalhado do uso da terra do Bioma Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.1, p.153-156, 2008.

SILVA, D. M.; BATALHA, M. A. Defense syndromes against herbivory in a cerrado plant community. **Plant Ecology**, v.212, p.181–193, 2011.

SILVA, F. M. **Verificação da eficiência dos bioensaios com extratos aquosos no diagnóstico de potencial alelopático: contribuição ao estudo de espécies nativas brasileiras.** Dissertação de Mestrado. Porto Alegre: UFRGS, 2004.

SILVA, F. A. M.; ASSAD, E. D.; EVANGELISTA, B. A. Caracterização climática do bioma Cerrado. **Cerrado: ecologia e flora**, v. 1, p. 69-88, 2009.

SILVA, I. A.; BATALHA, M. A. Woody plant species co-occurrence in Brazilian savannas under different fire frequencies. **Acta Oecologica**, v. 36, n. 1, p. 85-91, 2010.

SIMBERLOFF, D. Non-natives: 141 scientists object. **Nature**, v. 475, n. 7354, p. 36-36, 2011.

SOUZA, K. F. de. **Comparação da anatomia foliar de Myrsine coriacea e Myrsine umbellata em diferentes cotas altitudinais.** 50 p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

STRINGHETA, P. C. et al. Luteína: propriedades antioxidantes e benefícios à saúde. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 17, n. 2, p. 229-238. 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal.** 3 ed. Porto Alegre, Artmed, 848 p., 2009.

THARAYIL, N.; TRIEBWASSER, D. J. Elucidation of a diurnal pattern of catechin exudation by *Centaureastoebe*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 36, n. 2, p. 200-204, 2010.

TONGMA, S.; KOBAYASHI, K.; USUI, K. Allelopathic activity of Mexican sunflower (*Tithonia diversifolia*) in soil. **Weed Sciences**, Lawrence, v.46, p.432–437, 1999.

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

WALTER, B. M. T. **Fitofisionomias do bioma Cerrado: síntese terminológica e relações florísticas.** Tese de Doutorado. Universidade de Brasília, 2006.

WANDERLEY, M. G. L. et al. **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo** v. 4. Editora Rima. 432 p., 2005.

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

WEIDENHAMER, J. D.; CALLAWAY, R. M. Direct and indirect effects of invasive plants on soil chemistry and ecology function. **Journal of Chemical Ecology**, v. 36, p.59-69, 2010.

XAVIER, R. **Influencia do fogo no banco de sementes de áreas de cerrado com diferentes históricos de fogo.** 105 f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, 2011.

YANG, C. R et al. Antifungal activity of C-27 steroidal saponins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 5, p. 1710-1714, 2006.

ZHAI, H. L. et al. A new chromene glycoside from *Tithonia diversifolia*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 46, n. 2, p. 198-200, 2010.

ZHAO, G. J. et al. Chemical constituents from *Tithonia diversifolia* and their chemotaxonomic significance. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 44, p. 250-254, 2012.

ZHONG, X. N. et al. Three flavonoid glycosides from leaves of *Myrsine seguinii*. **Phytochemistry**, v. 46, n.5, p. 943-946, 1997.

ZHONG, X. N. et al. Hydroquinone glycosides from leaves of *Myrsine seguinii*. **Phytochemistry**, v. 49, n.7, p. 2149-2153, 1998.

ZHONG, X. N. et al. Hydroquinone diglycoside acyl esters from the leaves of *Myrsine seguinii*. **Phytochemistry**, v. 52, p. 923-927, 1999.

# CAPÍTULO 1

## **ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS FOLIARES DE *Myrsine umbellata* (Mart.) E *Myrsine coriacea* (Sw.) R.Br. ex Roem. & Schult.**

**Resumo** O Cerrado é uma das formações vegetais de maior biodiversidade encontradas no Brasil, devido às características desse ambiente, as espécies vegetais existentes possuem grande potencial como fonte de compostos bioativos. Este trabalho teve como objetivo o estudo da atividade biológica de extratos foliares de *Myrsine umbellata* e *Myrsine coriacea*. Para tanto, foram avaliadas as atividades antifúngicas dos extratos destas espécies sobre o crescimento micelial dos fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum acutatum* e *Pythium aphanidermatum* e o potencial inseticida sobre o desenvolvimento da fase larval e pupal de *Spodoptera frugiperda*. O potencial antioxidante dos extratos e o teor de fenóis totais foram avaliados por meio da atividade de redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e pelo método Folin-Ciocalteu, respectivamente. *Colletotrichum acutatum* foi o fungo mais afetado pelos extratos, apresentando 23% de inibição do crescimento micelial na presença do extrato acetato de etila de *M. umbellata*. A atividade inseticida foi mais expressiva sobre a mortalidade larval na presença do extrato hexânico de *M. coriacea* (63%) e do extrato diclorometânico de *M. umbellata* (49%). Entre os extratos testados para a atividade antioxidante, os acetônico e metanólico de *M. umbellata* (AAI = 7,02 e AAI = 4,57, respectivamente) e *M. coriacea* (AAI = 8,74 e AAI = 5,95, respectivamente) apresentaram índice de atividade antioxidante (AAI) muito forte (> 2). Os ensaios biológicos mostraram que o extrato foliar de *M. coriacea* obteve os melhores resultados nos bioensaios realizados, apresentando potencial promissor na busca por compostos bioativos.

**Palavras-chave** Extratos vegetais, Cerrado, crescimento micelial, potencial inseticida, atividade antioxidante, metabólitos secundários

**Biological activity of *Myrsine umbellata* Mart. and *Myrsine coriacea* (Sw.) R. Br. ex  
Roem. & Schult. leaf extracts**

**Abstract** Cerrado (Brazilian savanna) is one of the most biodiverse vegetation in Brazil. Due to their features, their plant species have great potential as a source of bioactive compounds. The aim of this work was study the biological activity of *Myrsine umbellata* and *Myrsine coriacea* leaf extracts. Thus, were evaluated the antifungal activity of the extracts on the mycelial growth of plant pathogens *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum acutatum* and *Pythium aphanidermatum* and the insecticide potential on the development of *Spodoptera frugiperda* larval and pupal stages. The antioxidant activity and total polyphenols content were evaluated by radical scavenging activity, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), and the Folin-Ciocalteu method, respectively. *Colletotrichum acutatum* was the most affected by the extracts, with 23% of mycelial growth inhibition for the *M. umbellata* ethyl acetate extract. Insecticidal activity was more pronounced on the larval mortality for the *M. coriacea* hexane extract (63%) and *M. umbellata* dichloromethane extract (49%). Among the extracts tested for antioxidant activity index, acetone and methanol from *M. umbellata* (AAI = 7.02 and = 4.57 AAI, respectively) and *M. coriacea* (AAI = 8.74 and = 5.95, respectively) showed very strong antioxidant activity (AAI > 2). The biological assays showed that the *M. coriacea* leaf extract had the best results, with great potential as search for bioactive compounds.

**Keywords** Plant extracts, Brazilian savanna, mycelial growth, insecticidal activity, antioxidant activity, secondary metabolites



## **Introdução**

Produtos naturais bioativos são compostos químicos produzidos por organismos vivos que exercem efeito biológico em outros organismos (COLEGATE; MOLYNEUX, 2007). Os compostos naturais derivados de plantas, que possuem atividade biológica, são a principal fonte de novas estruturas químicas com potencial uso na indústria farmacêutica, alimentícia e agrícola (MACÍAS et al., 2008). Estes compostos são oriundos do metabolismo secundário das plantas e são classificados em três grupos quimicamente distintos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (TAIZ; ZEIGER, 2013). Os terpenos e os compostos fenólicos são as maiores classes de metabólitos secundários existentes nas plantas e possuem ações fitotóxicas (DUKE; OLIVA, 2004; EINHELLIG, 2004), inseticidas (VIEGAS JÚNIOR, 2003; TAIZ; ZEIGER, 2013), antifúngicas (YANG et al., 2006) e antioxidantes (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002; ALVES-RODRIGUES; SHAO, 2004, STRINGHETA et al., 2006). Em geral, esses compostos são produzidos pelos organismos, em maior concentração, em resposta a um estresse (EINHELLING, 1996).

O Cerrado é uma das formações vegetais do Brasil de maior biodiversidade em que ocorre um elevado número de interações bioquímicas complexas (NOVAES et al., 2013a). Espécies vegetais provenientes do Cerrado costumam apresentar mecanismos de defesa tais como folhas coriáceas, tricomas, quantidades elevadas de compostos fenólicos e taninos, em resposta ao baixo teor de nutrientes do solo à que estão submetidas, a maior competição por recursos e ao longo período de estiagem, marcada por profundo déficit hídrico (SILVA; ASSAD; EVANGELISTA, 2009; SILVA; BATALHA, 2011). Este domínio é uma fonte potencial de compostos bioativos que ainda é pouco explorada e estudos do potencial fitoquímico destas espécies também são importantes para a preservação da sua biodiversidade (NOVAES et al., 2013a).

O interesse pelos estudos em plantas medicinais para o desenvolvimento de novos fármacos e seu uso como fitoterápicos vêm aumentando com o avanço científico e o desenvolvimento de técnicas que permitem o isolamento e a purificação de compostos, tornando possível a obtenção de novas substâncias com propriedades terapêuticas, proporcionando à população uma nova opção para o tratamento de enfermidades, haja vista que esses produtos, em geral, possuem efeitos colaterais menos intensos. (MACÍAS et al., 2008; GAZONI, 2009). No setor agrícola, a busca por compostos de origem natural

umentou com a necessidade do desenvolvimento de insumos para o controle biológico de insetos pragas, patógenos e plantas invasoras de culturas agrícolas. O sucesso da prática da agricultura moderna é devido, em parte, a contribuição dos compostos sintéticos para o controle destas pragas. No entanto, o uso de agroquímicos sintéticos pode provocar danos ao meio ambiente e à saúde humana, além de desenvolver resistência nesses organismos em resposta às suas aplicações repetidas (CAMPANHOLA; BETTIOL, 2003).

Os metabólitos secundários conhecidos como fitoalexinas são produzidos logo após a infecção, injúria ou ataque e acumulados no local afetado reduzindo ou impedindo a atividade de agentes patogênicos (AHUJA; KISSEN; BONES, 2012). No caso de infecções por fungos, esses efeitos se refletem na inibição do crescimento micelial ou inibição da germinação e alongamento do apressório (LO et al., 1996). Quando esses compostos são produzidos em resposta ao ataque de herbívoros ou afídeos, eles podem agir reduzindo a palatabilidade e a digestibilidade das folhas, bem como, a produção de hormônios que diminuem ou inibem o desenvolvimento das larvas (TANZUBIL; MCCAFFERY, 1990; COLEY; BATEMAN; KURSAR, 2006). Todas as plantas produzem metabólitos secundários, que variam em qualidade e quantidade de acordo com a espécie e às condições a que as plantas estão expostas (FERREIRA; AQUILA, 2000).

*Myrsine umbellata* Mart. e *Myrsine coriacea* (Sw.) R. Br. ex Roem. & Schult. são espécies que ocorrem nos Domínios Fitogeográficos Mata Atlântica e Cerrado. São espécies amplamente distribuídas e abundantes no Estado de São Paulo (WANDERLEY et al. 2005) e geralmente são encontradas em agrupamentos, em campo (NOVAES, 2011). Trata-se de espécies arbóreas, perenifólias, de médio porte, podendo atingir até 20 m de altura, com fustes curtos e retos de até 50 cm de diâmetro. *M. umbellata* é conhecida popularmente como capororoca-verdadeira, pororoca e copororocão, e *M. coriacea* como canela-azeitona, azeitona-do-mato, copororoca vermelha e copororocaçu (JUNG-MENDAÇOLLI; BERNACCI, 2005). O chá das folhas ou decocção da casca de ambas as plantas é indicado como diurético, no combate a infecções das vias urinárias e também constitui um bom depurativo. Além disso, diminui pruridos, erupções, urticárias, eczemas, reumatismo e é utilizado no combate de problemas do fígado (LORENZI, 2002). A casca dessas espécies é uma importante fonte de tanino e o seu decocto é considerado remédio contra a lepra (BACKES; IRGANG, 2002). Dentre as classes de metabólitos secundários presentes nestas espécies, podemos citar flavonóides (ZHONG et al., 1997), hidroquinonas (ZHONG et al., 1998), glicosídeos (ZHONG et al., 1999) e benzoquinonas, este último,

responsável pela ação antibacteriana e fitotóxica dessas espécies (MIDIWO et al., 2002). Os terpenos são compostos frequentemente isolados de espécies brasileiras de *Myrsine* (JANUÁRIO et al., 1991; 1992) e destacam-se pela sua atividade antioxidante, anti-inflamatória (OSPINA et al., 2001), anti-helmíntica e moluscicida (OHTANI; MAVI; HOSTETTMANN, 1993; MANGURO; MIDIWO; KRAUS, 1996; GITHIORI et al., 2002). Glicosídeos cianogênicos também já foram isolados de *M. umbellata*, estas substâncias podem participar dos mecanismos de proteção contra herbivoria (FRANCISCO; PINOTTI, 2000). Embora se conheça a composição química destas espécies, poucos estudos referem-se às suas atividades biológicas, principalmente ao potencial fungicida e inseticida (LOPES et al., 2008; LEITE et al., 2010; CRUZ et al., 2013; CECHINEL FILHO et al., 2013).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade fungicida, inseticida e antioxidante de extratos foliares de *M. umbellata* e *M. coriacea*. Para tanto, as atividades antifúngicas foram avaliadas sobre os fitopatógenos *Fusarium oxysporum* f. sp. *crysanthemi* (CCMA 1121), agente causal da murcha em crisântemo, é um patógeno de difícil controle, pois não existem fungicidas registrados (PINTO; MORANDI; BETTIOL, 2013), *Pythium aphanidermatum* (CCMA 243), principal agente causal de doenças em hidroponia, causando podridões de colo e raiz e tombamento de plântulas (SUTTON et al., 2006), e *Colletotrichum acutatum* (isolado de *Citrus sinensis* – Laranja Doce var. Valência), o principal patógeno causador de doenças relacionadas à fruticultura. Nos citros, este patógeno é responsável pela podridão floral, causada pela infecção das flores e acarretando a abscisão prematura de frutos (KUPPER; BELLOTTE; GOES, 2009).

O potencial inseticida foi avaliado sobre o desenvolvimento da fase larval e pupal de *Spodoptera frugiperda*. A espécie é conhecida popularmente como lagarta-do-cartucho e é uma das principais pragas de origem tropical e subtropical no Hemisfério Ocidental (SPARKS, 1979). Suas larvas alimentam-se de uma grande variedade de plantas, entre elas, milho, soja, trigo e algodão (GALLO et al., 2006).

A atividade antioxidante e o teor de fenóis totais dos extratos foliares foram avaliados por meio da atividade de redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) e Folin-Ciocalteu, respectivamente.

## **Material e Métodos**

### *Área de estudo*

A coleta de material vegetal foi realizada no cerrado *sensu stricto* pertencente à Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), *campus* São Carlos, São Paulo, Brasil (21° 58' a 22° 00' S e 47° 51' a 47° 52' W). O clima da região, pela classificação de Köppen é do tipo Cwa (tropical de altitude). Existem duas estações climáticas bem definidas, uma chuvosa, entre os meses de outubro a março e um período seco, entre os meses de abril a setembro (SILVA; ASSAD; EVANGELISTA, 2009). A vegetação é caracterizada por um estrato lenhoso formado por árvores e arbustos que se projetam acima de um estrato herbáceo bem definido (RIBEIRO; WALTER 2009).

### *Material biológico vegetal e preparo dos extratos foliares*

As folhas de *Myrsine umbellata* Mart. (sin. hom. *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez) e *Myrsine coriacea* (Sw.) R. Br. ex Roem. & Schult. (sin. het. *Rapanea ferruginea* (Ruiz & Pav.) Mez), pertencentes à família Primulaceae, foram coletadas assistematicamente em aproximadamente 10 indivíduos em estágio vegetativo durante o período seco (agosto/2011). As folhas coletadas foram secas em estufa a 40°C durante 48h, em seguida trituradas em moinho elétrico, armazenadas em embalagens plásticas e mantidas em refrigerador a 5°C, até o uso. O material vegetal coletado foi identificado e depositado no herbário do Departamento de Botânica da UFSCar (vouchers 7276 e 7278).

Os extratos de *M. umbellata* e *M. coriacea* foram preparados a partir do pó das folhas destas espécies utilizando-se o método de extração direta em solventes em ordem crescente de polaridade (hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona e metanol). Cerca de 200 g do material vegetal moído e 400 mL de cada solvente foi adicionado, sequencialmente, em recipientes de vidro. Os recipientes foram mantidos em banho de ultrassom durante 30 minutos para cada solvente. Decorrido este período, a mistura foi filtrada em funil de Büchner, coberto com papel filtro de poro 0,22 µm e acoplado a uma bomba de vácuo. O extrato obtido foi seco em evaporador rotativo. Essa extração foi repetida duas vezes para cada solvente (MACÍAS et al. 2010, modificado).

### *Atividade antifúngica dos extratos foliares sobre fitopatógenos*

A atividade antifúngica dos extratos foi avaliada por meio da inibição do crescimento micelial dos patógenos estudados. Os isolados de fungo foram cedidos pela Embrapa Meio Ambiente – CNPMA, Jaguariúna, Brasil. Para tanto, 100 mg de cada extrato foi previamente dissolvido em 500 µL de DMSO e em seguida adicionados 500 µL de água destilada autoclavada. Esta mistura foi adicionada a 100 mL do meio de cultura BDA (Batata-dextrose-ágar) fundente, com temperatura máxima de 50°C, homogeneizada e em seguida, vertido em placas de Petri de 9 cm de diâmetro. Os tratamentos consistiam dos extratos foliares hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona e metanol, de cada planta, na concentração 1mg.mL<sup>-1</sup>, além do meio de cultura contendo uma solução de 500 µL DMSO e 500 µL de água destilada autoclavada, como controle negativo. Após a solidificação do meio de cultura contendo BDA e os respectivos tratamentos ou controle, foi inoculado no centro de cada placa de Petri um disco de 5 mm de diâmetro contendo micélios dos patógenos. As placas foram incubadas à 25°C sob fotoperíodo de 12 h. Foram utilizadas 1 placa por repetição, sendo 4 repetições. A avaliação do efeito dos diferentes extratos sobre o crescimento micelial foi realizada até quando o crescimento micelial dos controles cobriu completamente a superfície do meio de cultura. A leitura do experimento foi feita medindo-se a cada 48 h o diâmetro da área de crescimento dos fitopatógenos (média de duas medidas diametralmente opostas). A porcentagem final de crescimento micelial (PIC) foi calculada no último dia de avaliação, aplicando-se a fórmula:

$$PIC = \frac{\text{Crescimento do controle} - \text{cresc. do tratamento}}{\text{Crescimento do controle}} \times 100$$

#### *Atividade inseticida dos extratos foliares sobre S. frugiperda*

Ensaio biológico com os extratos de *M. umbellata* e *M. coriacea* foram realizados no Laboratório de Bioensaios do Departamento de Química da UFSCar, a 25 ± 10°C, UR de 70 ± 5% e fotofase de 12 h. A criação de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) foi mantida em laboratório sendo as lagartas alimentadas com dieta artificial (KASTEN; PRICETTI; PARRA, 1978) e os adultos com solução de mel a 10%. A dieta artificial consistia de água destilada (600 mL), ágar (10,3 g), extrato de levedura (25,3 g), gérmen de trigo (39,6 g), ácido sórbico (0,8 g), ácido ascórbico (2,6 g), formaldeído 40% (6,3 mL), tetraciclina (50 mg), nipagin (1,1 g) e feijão carioquinha (82,5 g). Para a realização

dos bioensaios, os extratos foram solubilizados em uma pequena quantidade de solvente (metanol:acetona) e misturados ao ácido ascórbico contido na dieta artificial. Em seguida os solventes foram evaporados e a mistura de ácido ascórbico e os respectivos extratos foi incorporada à dieta na proporção de 30 mg de extrato para 300 g de dieta ( $100 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ), quando esta atingiu uma temperatura de  $50^{\circ}\text{C}$  (MATOS et al. 2009). Além das dietas correspondentes a cada extrato, também foram preparadas as dietas controle, sem extrato, contendo apenas os solventes em que foram solubilizados ou contendo apenas a dieta (branco), como controles negativos. As dietas foram vertidas em tubos de vidro ( $8,5 \times 2,5$  cm) esterilizados e tampados com algodão. Os tubos foram mantidos por 24 h em grades de arame para eliminação do excesso de umidade das suas paredes e em seguida, uma lagarta recém-eclodida de *S. frugiperda* foi inoculada por tubo de vidro. As pupas obtidas tiveram seus pesos registrados 1 dia após a pupação, estas foram transferidas para copos plásticos de 50 mL onde permaneceram até a emergência dos adultos. Para cada tratamento foram utilizadas 30 lagartas, distribuídas em três repetições de dez lagartas cada, em delineamento completamente casualizado. Os parâmetros avaliados foram duração das fases larval e pupal, peso das pupas e a mortalidade (%) ao final de cada fase.

*Atividade antioxidante de extratos foliares de M. umbellata e M. coriacea e teor de fenóis totais*

A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada por meio do método DPPH (Scherer; Godoy, 2009). Alíquotas de 0,05 mL de soluções metanólicas de cada extrato foram adicionadas a 1,95 mL DPPH a 0,08 mM, perfazendo 6 concentrações (TABELA 1.1). Como controles foram utilizados metanol PA (controle negativo) e os antioxidantes comerciais, ácido gálico e quercetina (controles positivos).

**Tabela 1.1** Concentrações ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) das soluções metanólicas dos extratos Hexano, Diclorometano (DCM), Acetato de Etila (AcOEt), Acetona e Metanol (MeOH) e dos controles Ácido gálico e Quercetina utilizados no bioensaio de atividade antioxidante.

		Concentração ( $\text{mg}/\text{mL}$ )						
		Hexano	DCM	AcOEt	Acetona	MeOH	Ácido gálico	Quercetina
<i>Myrsine umbellata</i>	Solução 1	10,00	16,00	2,00	0,30	0,40	0,06	0,12
	Solução 2	8,00	14,00	1,60	0,24	0,32	0,05	0,10
	Solução 3	6,00	10,00	1,20	0,18	0,24	0,04	0,08
	Solução 4	4,00	8,00	0,80	0,12	0,16	0,03	0,06
	Solução 5	3,00	4,00	0,40	0,06	0,08	0,02	0,04
	Solução 6	1,00	2,00	0,20	0,03	0,04	0,01	0,02
<i>Myrsine coriacea</i>	Solução 1	4,00	3,00	1,60	0,30	0,40	-	-
	Solução 2	3,20	2,40	1,40	0,24	0,32	-	-
	Solução 3	2,40	1,80	1,00	0,18	0,24	-	-
	Solução 4	1,60	1,20	0,80	0,12	0,16	-	-
	Solução 5	0,80	0,60	0,40	0,06	0,08	-	-
	Solução 6	0,40	0,30	0,20	0,03	0,04	-	-

Após 90 minutos de repouso no escuro à temperatura ambiente, as absorvâncias das amostras foram medidas a 517 nm, utilizando um espectrofotômetro Femto, modelo 800 XI. O índice de atividade antioxidante (AAI) foi calculado seguindo a fórmula:

$$AAI = \frac{\text{Concentração final de DPPH na reação}}{IC_{50}}$$

Sendo que a concentração final de DPPH na reação, correspondente a 0,08 mM, foi de  $30,75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . A concentração da reação para 50% de inibição ( $IC_{50}$ ) foi calculada por meio de uma regressão linear entre a concentração do extrato e sua correspondente capacidade sequestradora de radical ( $I\%$ ). A capacidade sequestradora de radical foi calculada como se segue:

$$I\% = \frac{Abs_0 - Abs_1}{Abs_0} \times 100$$

Onde,  $Abs_0$  indica absorvância do controle negativo, e  $Abs_1$  a absorvância do extrato testado em diferentes concentrações. A atividade antioxidante foi estabelecida de

acordo com o índice proposto por Scherer e Godoy (2009) para extratos vegetais: atividade fraca < 0,05 < moderada < 1,0 < forte < 2,0 < muito forte.

O teor de fenóis totais (TPC) dos extratos foi determinado por meio do método Folin-Ciocalteu, modificado (GEORGE et al., 2005). Alíquotas de 0,05 mL dos extratos solubilizados previamente em acetona foram adicionadas a 4,95 mL de água destilada. Em seguida, alíquotas de 0,5 mL dessas soluções ou água destilada (branco) foram misturadas com 2,5 mL de solução metanólica do reagente Folin-Ciocalteu. A mistura ficou em repouso durante 2 min à temperatura ambiente e em seguida foram adicionados 2 mL de solução aquosa de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ( $75 \text{ g.L}^{-1}$ ). A mistura foi homogeneizada utilizando um vórtice, incubada durante 15 min a  $50^\circ\text{C}$  e submetida a um banho de água gelada. As absorbâncias das amostras foram medidas a um comprimento de onda de 760 nm. A curva de calibração para polifenóis foi preparada utilizando ácido gálico como referência ( $1-8 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). O TPC foi expresso como miligramas de ácido gálico equivalentes (GAE) por grama de extrato seco de acordo com a curva de calibração obtida por meio de uma regressão linear entre a absorbância e a concentração de ácido gálico,  $y = 0,1143x + 0,0211$  ( $r^2 = 0,9981$ ), onde  $y$  indica a absorbância da amostra e  $x$  indica a concentração de ácido gálico equivalentes na amostra, em  $\text{mg.L}^{-1}$ .

#### *Análise estatística*

A normalidade dos dados foi analisada pelo teste Lilliefors. Todos os dados obtidos foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). Os dados da porcentagem final de crescimento micelial foram comparados em relação ao controle por meio do teste  $t$  ( $\alpha = 0,05$ ). As análises foram realizadas utilizando o software SISVAR, versão 5.3 (FERREIRA, 2011). Nos ensaios antioxidante, realizados em triplicata, as correlações entre os valores TPC e IAA foram analisadas estatisticamente por meio de uma regressão linear utilizando o software PAST, versão 2.5 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

### **Resultados e Discussão**

#### *Atividade antifúngica dos extratos foliares sobre fungos fitopatogênicos*



O crescimento micelial dos fitopatógenos estudados foi afetado pela presença dos extratos foliares de *M. umbellata*. Os extratos hexano, acetato de etila (AcOEt), acetona e metanol (MeOH) de *M. umbellata* inibiram significativamente o crescimento de *Pythium aphanidermatum* a partir do 5º dia após a inoculação (D.A.I). O extrato foliar AcOEt manteve o menor crescimento micelial deste fitopatógeno até o 9º D.A.I, em relação ao controle (BDA + DMSO). O fungo *F. oxysporum*, não apresentou redução significativa no crescimento micelial, comparado ao controle, para as duas espécies de *Myrsine* testadas. Entretanto, o extrato acetona proporcionou um estímulo no crescimento micelial de *F. oxysporum*, apresentando valores maiores que o controle. Os extratos hexano, DCM e AcOEt de *M. umbellata* inibiram significativamente o crescimento de *C. acutatum* a partir do 7º D.A.I., sendo que os extratos diclorometânico e acetato de etila mantiveram essa inibição até o 11º D.A.I. O extrato acetona desta planta reduziu significativamente o crescimento micelial de *C. acutatum* a partir do 9º D.A.I. (TABELA 1.2).

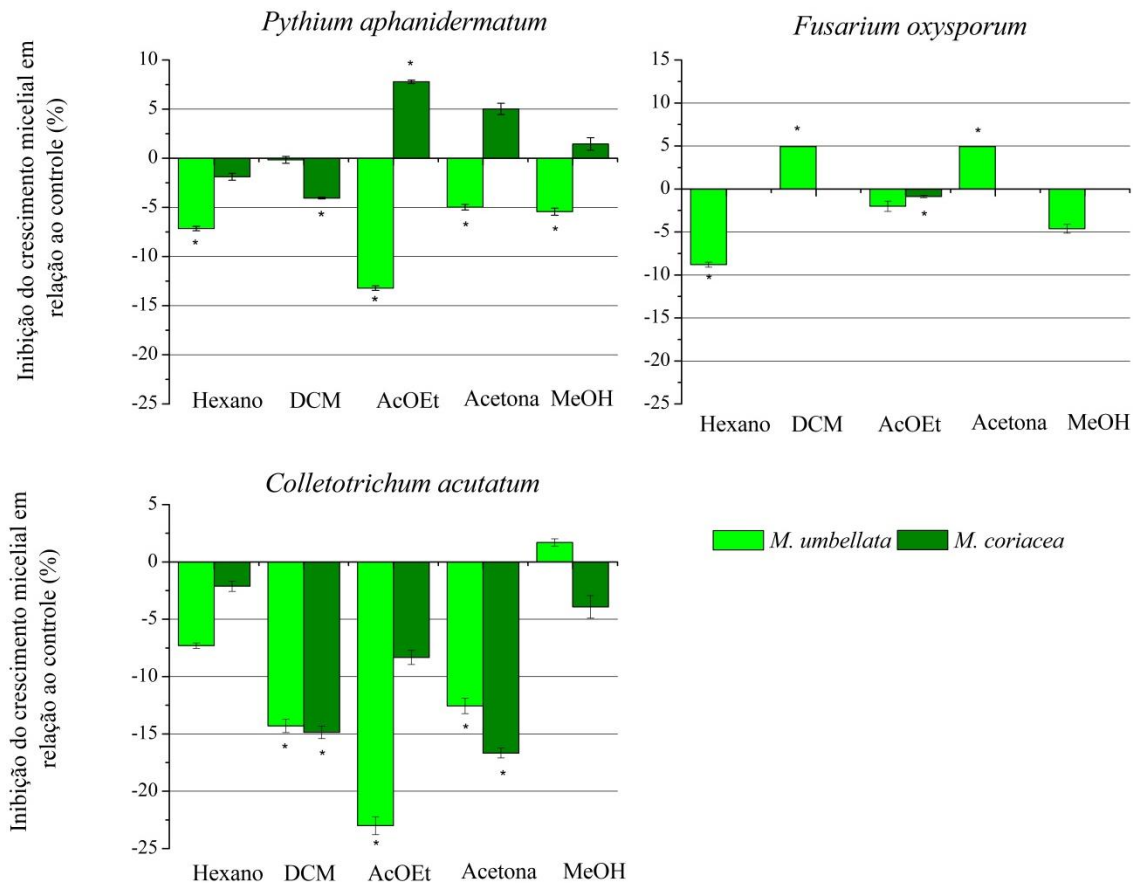
Os extratos foliares de *M. coriacea*, estudados, mostraram-se menos ativos quando comparados aos mesmos extratos de *M. umbellata*. A diferença no crescimento micelial de *P. aphanidermatum* sob influencia do extrato hexano de *M. coriacea* foi observada no 9º D.A.I., provocando o menor crescimento micelial em relação ao controle e aos demais extratos testados. O crescimento micelial de *F. oxysporum* foi afetado significativamente pelo extrato diclorometano de *M. coriacea*, em relação ao controle, a partir do 5º D.A.I, no entanto, foi observado um aumento no crescimento micelial. Os extratos diclorometano e acetona de *M. coriacea* proporcionaram um crescimento micelial de *C. acutatum* significativamente menor que o controle no 11º D. A. I. (TABELA 1.2).

**Tabela 1.2** Crescimento micelial médio,  $\pm$ desvio padrão da média, de *Pythium aphanidermatum*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum acutatum*, na presença de extratos foliares de *Myrsine umbellata* e *Myrsine coriacea* utilizando solventes em ordem crescente de polaridade ou água destilada como controle. DCM: diclorometano, AcOEt: acetato de etila e MeOH: metanol. Letras iguais sobrescritas na mesma linha indicam que não houve diferença significativa pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

		Controle	Hexano	DCM	AcOEt	Acetona	MeOH
<i>Myrsine umbellata</i>							
<i>Pythium aphanidermatum</i>	2° D.A.I	2,69 $\pm$ 0,18 <sup>ab</sup>	2,43 $\pm$ 0,12 <sup>ab</sup>	2,76 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup>	2,20 $\pm$ 0,18 <sup>b</sup>	2,38 $\pm$ 0,31 <sup>ab</sup>	2,40 $\pm$ 0,18 <sup>ab</sup>
	4° D.A.I	5,54 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>	4,80 $\pm$ 0,29 <sup>b</sup>	5,46 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>	4,34 $\pm$ 0,19 <sup>b</sup>	4,66 $\pm$ 0,35 <sup>b</sup>	4,72 $\pm$ 0,25 <sup>b</sup>
	6° D.A.I	7,38 $\pm$ 0,29 <sup>a</sup>	6,66 $\pm$ 0,18 <sup>bc</sup>	7,35 $\pm$ 0,41 <sup>a</sup>	6,16 $\pm$ 0,27 <sup>c</sup>	6,74 $\pm$ 0,24 <sup>b</sup>	6,68 $\pm$ 0,38 <sup>bc</sup>
	8° D.A.I	8,26 $\pm$ 0,28 <sup>a</sup>	8,05 $\pm$ 0,18 <sup>ab</sup>	8,36 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>	7,56 $\pm$ 0,19 <sup>b</sup>	8,04 $\pm$ 0,15 <sup>ab</sup>	8,09 $\pm$ 0,25 <sup>ab</sup>
<i>Fusarium oxysporum</i>	2° D.A.I	3,21 $\pm$ 0,15	2,74 $\pm$ 0,17	3,05 $\pm$ 0,11	3,00 $\pm$ 0,05	3,33 $\pm$ 0,26	3,26 $\pm$ 0,09
	4° D.A.I	5,21 $\pm$ 0,28 <sup>bc</sup>	4,64 $\pm$ 0,35 <sup>c</sup>	5,46 $\pm$ 0,12 <sup>ab</sup>	5,13 $\pm$ 0,18 <sup>bc</sup>	5,84 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	5,43 $\pm$ 0,13 <sup>ab</sup>
	6° D.A.I	7,03 $\pm$ 0,45 <sup>b</sup>	6,51 $\pm$ 0,26 <sup>b</sup>	7,75 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	6,86 $\pm$ 0,66 <sup>b</sup>	7,94 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup>	7,00 $\pm$ 0,54 <sup>b</sup>
<i>Colletotrichum acutatum</i>	2° D.A.I	2,20 $\pm$ 0,09	2,05 $\pm$ 0,24	1,94 $\pm$ 0,05	2,06 $\pm$ 0,15	2,10 $\pm$ 0,08	2,21 $\pm$ 0,10
	4° D.A.I	3,55 $\pm$ 0,09	3,05 $\pm$ 0,08	3,08 $\pm$ 0,07	3,10 $\pm$ 0,13	3,31 $\pm$ 0,11	3,53 $\pm$ 0,12
	6° D.A.I	5,58 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup>	4,24 $\pm$ 0,07 <sup>bc</sup>	4,11 $\pm$ 0,16 <sup>c</sup>	4,03 $\pm$ 0,26 <sup>c</sup>	4,99 $\pm$ 0,34 <sup>ab</sup>	5,66 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>
	8° D.A.I	6,26 $\pm$ 0,44 <sup>a</sup>	5,68 $\pm$ 0,13 <sup>ab</sup>	5,30 $\pm$ 0,39 <sup>b</sup>	4,95 $\pm$ 0,49 <sup>b</sup>	5,44 $\pm$ 0,50 <sup>b</sup>	6,31 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>
	10° D.A.I	7,36 $\pm$ 0,82 <sup>a</sup>	6,83 $\pm$ 0,24 <sup>ab</sup>	6,31 $\pm$ 0,58 <sup>bc</sup>	5,68 $\pm$ 0,78 <sup>c</sup>	6,44 $\pm$ 0,67 <sup>b</sup>	7,49 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup>
<i>Myrsine coriacea</i>							
<i>Pythium aphanidermatum</i>	2° D.A.I	2,28 $\pm$ 0,10	1,90 $\pm$ 0,08	2,03 $\pm$ 0,07	2,05 $\pm$ 0,21	2,08 $\pm$ 0,12	2,24 $\pm$ 0,07
	4° D.A.I	5,09 $\pm$ 0,08	4,09 $\pm$ 0,08	4,30 $\pm$ 0,18	4,79 $\pm$ 0,20	4,63 $\pm$ 0,17	4,74 $\pm$ 0,11
	6° D.A.I	6,78 $\pm$ 0,09	5,81 $\pm$ 0,11	6,00 $\pm$ 0,21	6,68 $\pm$ 0,18	6,43 $\pm$ 0,25	6,33 $\pm$ 0,21
	8° D.A.I	7,71 $\pm$ 0,36 <sup>a</sup>	7,10 $\pm$ 0,90 <sup>b</sup>	7,40 $\pm$ 0,09 <sup>ab</sup>	8,31 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>	8,10 $\pm$ 0,57 <sup>a</sup>	7,83 $\pm$ 0,64 <sup>a</sup>
<i>Fusarium oxysporum</i>	2° D.A.I	3,59 $\pm$ 0,14	3,68 $\pm$ 0,10	3,69 $\pm$ 0,10	3,81 $\pm$ 0,18	3,73 $\pm$ 0,23	3,64 $\pm$ 0,19
	4° D.A.I	5,99 $\pm$ 0,19 <sup>b</sup>	6,23 $\pm$ 0,13 <sup>ab</sup>	6,60 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	6,39 $\pm$ 0,34 <sup>ab</sup>	6,44 $\pm$ 0,32 <sup>ab</sup>	6,43 $\pm$ 0,28 <sup>ab</sup>
	6° D.A.I	7,56 $\pm$ 0,34 <sup>b</sup>	7,88 $\pm$ 0,20 <sup>b</sup>	8,43 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	7,91 $\pm$ 0,43 <sup>ab</sup>	8,04 $\pm$ 0,36 <sup>ab</sup>	8,05 $\pm$ 0,33 <sup>ab</sup>
<i>Colletotrichum acutatum</i>	2° D.A.I	1,90 $\pm$ 0,17	1,89 $\pm$ 0,08	1,90 $\pm$ 0,08	1,95 $\pm$ 0,08	1,98 $\pm$ 0,12	1,88 $\pm$ 0,10
	4° D.A.I	3,39 $\pm$ 0,21	3,21 $\pm$ 0,08	3,21 $\pm$ 0,10	3,31 $\pm$ 0,06	3,31 $\pm$ 0,10	3,29 $\pm$ 0,06
	6° D.A.I	4,66 $\pm$ 0,14	4,34 $\pm$ 0,17	4,21 $\pm$ 0,11	4,39 $\pm$ 0,19	4,28 $\pm$ 0,07	4,38 $\pm$ 0,23
	8° D.A.I	5,80 $\pm$ 0,44	5,56 $\pm$ 0,28	5,14 $\pm$ 0,27	5,44 $\pm$ 0,39	5,14 $\pm$ 0,22	5,68 $\pm$ 0,32
	10° D.A.I	7,03 $\pm$ 0,75 <sup>a</sup>	7,00 $\pm$ 0,28 <sup>a</sup>	6,05 $\pm$ 0,48 <sup>b</sup>	6,53 $\pm$ 0,52 <sup>ab</sup>	5,96 $\pm$ 0,37 <sup>b</sup>	6,87 $\pm$ 0,68 <sup>ab</sup>

A porcentagem final de inibição dos fungos *P. aphanidermatum*, *F. oxysporum* e *C. acutatum*, para os extratos utilizados a  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ , foi menor que 25% (FIGURA 1.1). O extrato AcOEt de *M. umbellata* proporcionou a maior inibição do crescimento de *P. aphanidermatum* (- 13,22%). Dos cinco extratos testados de *M. coriacea*, os extratos mais polares (AcOEt, Acetona e MeOH) apresentaram um estímulo do crescimento micelial do *Pythium*, sendo que a maior porcentagem de crescimento foi observada na presença do extrato AcOEt (7,78%) (FIGURA 1.1).

O fungo *F. oxysporum* apresentou a menor porcentagem de inibição do crescimento micelial na presença dos extratos das duas espécies avaliadas, porém, o extrato hexânico de *M. umbellata* proporcionou a maior porcentagem de inibição do crescimento de *Fusarium* (- 8,8%). Na presença do extrato acetato de etila de folhas de *M. umbellata*, o patógeno *C. acutatum* apresentou o maior valor de inibição do crescimento micelial, alcançando 23% de inibição (FIGURA 1.1).



**Figura 1.1** Porcentagem final de inibição do crescimento micelial de *Pythium aphanidermatum*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum acutatum* na presença de extratos foliares de *Myrsine umbellata* e *Myrsine coriacea*. DCM: diclorometano; AcOEt: acetato de etila e MeOH: metanol. (\*) Diferem significativamente em relação ao controle

A maioria dos extratos provocou redução no efeito supressivo dos fungos ao longo do tempo, porém, entre os extratos testados, o acetato de etila de folhas de *M. umbellata* manteve seu efeito supressivo ao longo do tempo em *P. aphanidermatum* e *C. acutatum*. Qasem e Abu-Blan (1996), observaram que embora a persistência do efeito antifúngico em *Alternaria solani*, *Rizhoctonia solani* e *Helminthosporium sativo* tenha sido diferente entre 64 extratos de plantas testados, o efeito supressivo de todos os extratos diminuiu com o tempo de incubação.

Não foram encontrados relatos de atividade antifúngica para as espécies estudadas, no entanto, estudos prévios mostraram que alguns extratos e compostos isolados de

espécies de *Myrsine* (incluindo *Rapanea*) possuem atividade anti-inflamatória, anti-helmíntica, antifúngica, moluscicida, tripanocida e fitotóxica (OHTANI; MAVI; HOSTETTMANN, 1993; GITHIORI et al., 2002; LEITE et al., 2010; NOVAES et al., 2013b). Ohtani, Mavi e Hostettmann (1993) relacionaram o efeito antifúngico em extratos metanólicos de folhas de *Rapanea melanophloeos* à presença do composto sakurasaponin, pertencente à classe das saponinas. Novaes et al. (2013b) isolaram o composto (-)- catequina de extratos acetônicos de folhas de *M. umbellata*. Esse flavonoide é relatado por apresentar propriedades fitotóxicas, enquanto seu epímero (+)- catequina, apresenta atividades antimicrobianas (BAIS et al., 2003).

Considerando as duas espécies de planta, alguns extratos estimularam o crescimento micelial, como o observado em *P. aphanidermatum* na presença do extrato acetato de etila de folhas de *M. coriacea*, *F. oxysporum* na presença dos extratos diclorometânico e acetônico de *M. umbellata* e *C. acutatum* na presença do extrato metanólico de *M. umbellata*. O efeito estimulador do crescimento de alguns extratos aos fungos pode ser explicado pela presença de substâncias promotoras do crescimento ou que sejam nutritivas para os fungos (QASEM; ABU-BLAN, 1996).

A diferença na fungitoxicidade dos extratos testados, frente aos fitopatógenos, pode ser atribuída à concentração do princípio ativo presente nos extratos, decorrente da eficiência da extração dos solventes utilizados, como observado por Amadioha (2000), ou também à polaridade dos compostos extraídos por cada solvente e sua capacidade em dissolver ou difundir-se no meio de cultura utilizado (ALVES, et al., 2000).

#### *Atividade inseticida dos extratos foliares sobre Spodoptera frugiperda*

Os extratos foliares hexano, diclorometano, acetona e metanol de *M. umbellata* diferiram significativamente do controle metanol:acetona, proporcionando uma maior duração da fase larval da lagarta, no entanto, não houve diferença entre os extratos e o controle contendo apenas a dieta artificial (branco) (TABELA 1.3). Foi observado um aumento na fase larval da lagarta na presença dos extratos acetona e metanol de *M. coriacea* em relação aos controles (TABELA 1.3). A duração da fase pupal não foi afetada na presença dos extratos de *M. umbellata*, porém o extrato hexano de *M. coriacea* proporcionou uma menor duração da fase pupal em relação ao controle branco (TABELA 1.3).

**Tabela 1.3** Médias da duração de fase larval, fase pupal e massa pupal de *Spodoptera frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com extrato de *Myrsine umbellata* e *Myrsine coriacea* a 100 mg.kg<sup>-1</sup>. Temp.: 25 ± 10C; UR: 70 ± 5% e fotofase: 12h. DCM: diclorometano, AcOEt: acetato de etila e MeOH: metanol. Letras iguais sobrescritas na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

Espécie	Extrato	Duração da fase larval (dias) ± DP <sup>1</sup>	Duração da fase pupal (dias) ± DP <sup>1</sup>	Massa pupal (mg) ± DP <sup>1</sup>
<i>Myrsine umbellata</i>	Hexano	13,68 ± 0,946 <sup>a</sup>	7,58 ± 1,170 <sup>b</sup>	283,05 ± 19,589 <sup>a</sup>
	DCM	13,80 ± 0,775 <sup>a</sup>	8,53 ± 1,685 <sup>ab</sup>	281,13 ± 18,864 <sup>a</sup>
	AcOEt	13,32 ± 1,335 <sup>ab</sup>	8,11 ± 1,166 <sup>ab</sup>	283,68 ± 20,378 <sup>a</sup>
	Acetona	14,07 ± 0,258 <sup>a</sup>	9,17 ± 1,537 <sup>a</sup>	283,66 ± 16,288 <sup>a</sup>
	MeOH	14,00 ± 0,000 <sup>a</sup>	7,88 ± 1,243 <sup>ab</sup>	282,92 ± 17,272 <sup>a</sup>
<b>Controle Metanol : Acetona</b>		12,58 ± 1,586 <sup>b</sup>	8,46 ± 1,444 <sup>ab</sup>	286,13 ± 18,548 <sup>a</sup>
<b>Branco</b>		13,67 ± 0,961 <sup>a</sup>	8,89 ± 1,826 <sup>a</sup>	263,96 ± 19,334 <sup>b</sup>
<i>Myrsine coriacea</i>	Hexano	12,18 ± 1,779 <sup>c</sup>	8,64 ± 1,748 <sup>a</sup>	275,72 ± 15,525 <sup>a</sup>
	DCM	12,61 ± 1,614 <sup>bc</sup>	8,41 ± 1,278 <sup>a</sup>	286,88 ± 24,351 <sup>a</sup>
	AcOEt	13,60 ± 1,231 <sup>ab</sup>	7,50 ± 1,433 <sup>a</sup>	285,15 ± 20,505 <sup>a</sup>
	Acetona	13,89 ± 0,786 <sup>a</sup>	8,07 ± 1,466 <sup>a</sup>	263,70 ± 69,986 <sup>a</sup>
	MeOH	13,85 ± 0,769 <sup>a</sup>	8,54 ± 1,503 <sup>a</sup>	289,41 ± 25,117 <sup>a</sup>
<b>Controle Metanol : Acetona</b>		12,58 ± 1,586 <sup>bc</sup>	8,46 ± 1,444 <sup>a</sup>	286,13 ± 18,548 <sup>a</sup>
<b>Branco</b>		13,67 ± 0,961 <sup>bc</sup>	8,89 ± 1,826 <sup>a</sup>	263,96 ± 19,334 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Desvio padrão da média

O aumento da fase larval, em campo, é desejável, pois quanto maior a duração da fase larval mais susceptível o inseto se torna ao ataque de parasitoides, predadores ou entomopatógenos, além de provocar maior competição por alimento (MATOS et al., 2009). Os adultos que emergem desses indivíduos terão a cópula dificultada devido à assincronia com a população normal reduzindo o número de gerações do inseto no ciclo agrícola (RODRÍGUEZ; VENDRAMIM, 1996).

No presente trabalho não foram observadas reduções significativas na massa pupal de *S. frugiperda* em relação aos controles, portanto pode-se afirmar que não houve inibição

na alimentação das larvas, provocada pelos extratos vegetais. O alongamento da fase larval sem a diminuição do peso pupal, como o observado nesse trabalho, possivelmente foi provocado pela presença de compostos bioativos nas folhas destas espécies (TANZUBIL; MCCAFFERY, 1990).

Na presença do extrato diclorometano de *M. umbellata* foi observado uma mortalidade larval significativa (48,87%) em relação ao controle branco. O extrato hexano de *M. coriacea* promoveu uma mortalidade larval significativa (62,60%) em relação ao controle contendo apenas a dieta (branco) (TABELA 1.4). Os demais extratos de *M. umbellata* e *M. coriacea* não diferiram dos controles. A mortalidade pupal não apresentou diferenças significativas na presença dos extratos de ambas as espécies de plantas.

**Tabela 1.4** Mortalidade de fase larval e pupal de *Spodoptera frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com extrato de *Myrsine umbellata* e *Myrsine coriacea* a  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Temp.:  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ; UR:  $70 \pm 5\%$  e fotofase: 12h. DCM: diclorometano, AcOEt: acetato de etila e MeOH: metanol. Letras iguais sobrescritas na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

Espécie	Extrato	Mortalidade da fase larval (%) $\pm$ DP <sup>1</sup>	Mortalidade da fase pupal (%) $\pm$ DP <sup>1</sup>
<i>Myrsine umbellata</i>	Hexano	36,67 $\pm$ 11,55 <sup>ab</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>
	DCM	48,87 $\pm$ 25,22 <sup>a</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>
	AcOEt	6,67 $\pm$ 5,78 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>
	Acetona	3,33 $\pm$ 5,77 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>
	MeOH	13,33 $\pm$ 15,28 <sup>ab</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>
<b>Controle Metanol : Acetona</b>		20,00 $\pm$ 10,00 <sup>ab</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>
<b>Branco</b>		6,67 $\pm$ 11,55 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>
<i>Myrsine coriacea</i>	Hexano	62,60 $\pm$ 19,96 <sup>a</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>
	DCM	34,43 $\pm$ 31,29 <sup>ab</sup>	11,10 $\pm$ 19,23 <sup>a</sup>
	AcOEt	33,33 $\pm$ 15,28 <sup>ab</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>
	Acetona	6,67 $\pm$ 5,77 <sup>c</sup>	3,33 $\pm$ 5,77 <sup>a</sup>
	MeOH	10,00 $\pm$ 10,00 <sup>c</sup>	3,33 $\pm$ 5,77 <sup>a</sup>
<b>Controle Metanol : Acetona</b>		20,00 $\pm$ 10,00 <sup>ab</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>
<b>Branco</b>		6,67 $\pm$ 11,55 <sup>c</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Desvio padrão da média

Segundo Silva, Lagunes e Rodrigues (2003), plantas e/ou extratos com atividade bioinseticida promissora apresentam mortalidade superior a 40%. Nesse sentido, os extratos diclorometano de *M. umbellata* e hexano de *M. coriacea* apresentam potencial tóxico como fontes promissoras de bioinseticidas para o controle da lagarta-do-cartucho do milho.

*Atividade antioxidante de extratos foliares de M. umbellata e M. coriacea e teor de fenóis totais*

Os valores de IC<sub>50</sub> variaram de 3,52 a 394,46 µg.mL<sup>-1</sup>, considerando a concentração final de DPPH na reação de 30,75 µg.mL<sup>-1</sup>. Os menores valores de IC<sub>50</sub> foram registrados para os extratos acetônicos de *M. coriacea* (IC<sub>50</sub>= 3,52) e *M. umbellata* (IC<sub>50</sub>= 4,40). O extrato acetônico de folhas de *M. coriacea* (AAI = 8,74) apresentou um potencial antioxidante equivalente à metade da quercetina (AAI = 17,29) e a um terço do ácido gálico puro (AAI = 27,98) (TABELA 1.5).

Segundo o critério estabelecido por Scherer e Godoy (2009) para o AAI, os extratos acetônico (7,02) e metanólico (4,57) de folhas de *M. umbellata* e *M. coriacea* foram considerados muito forte (AAI > 2) e o extrato acetato de etila de *M. coriacea* foi considerado forte (AAI > 1). Os demais extratos apresentaram atividade moderada (AAI > 0,05), seguindo o mesmo critério (TABELA 1.5). De modo geral, os extratos mais polares apresentaram um maior teor de fenóis totais, destacando-se os extratos acetona e metanol de *M. umbellata* (TPC = 446,65 mg GAE/g) e *M. coriacea* (TPC = 386,77 mg GAE/g), respectivamente (TABELA 1.5).

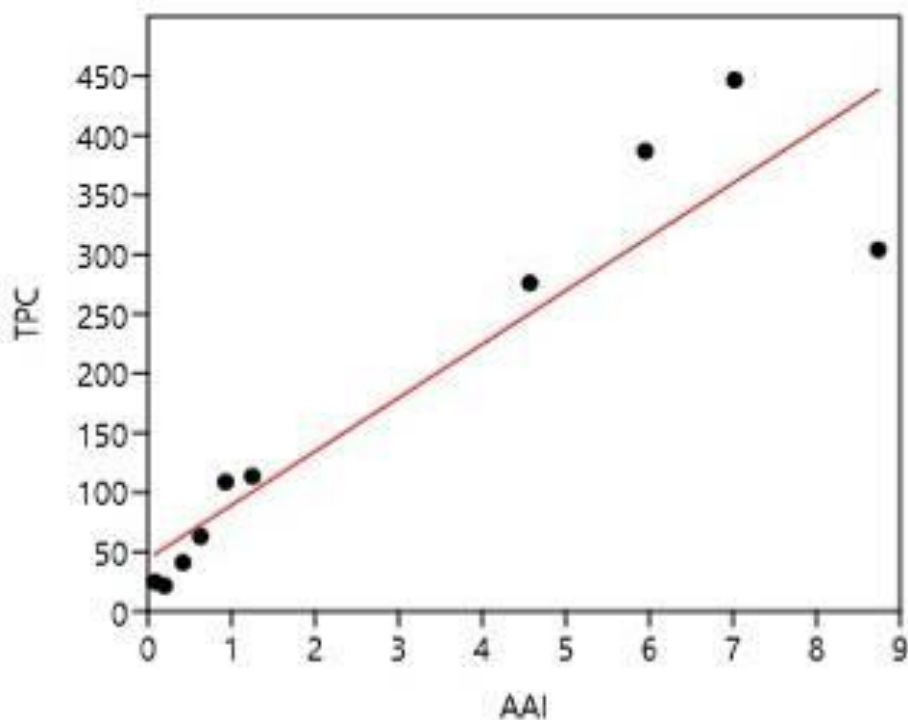


**Tabela 1.5** Índice de atividade antioxidante (AAI) e conteúdo fenólico total (TPC) de extratos foliares de *Myrsine umbellata* e *Myrsine coriacea*. Ácido gálico e quercetina: referência de antioxidantes.  $r^2$ : coeficiente de determinação do efeito de eliminação de radicais livres sobre a concentração de substância / extrato I, II, e III (três repetições).  $IC_{50}$ : concentração para 50% de inibição. GAE: ácido gálico equivalente. DCM: diclorometano, AcOEt: acetato de etila e MeOH: metanol. Letras diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam que houve diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

DPPH: 30,75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	$r^2$			Média $IC_{50}$ ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Média AAI $\pm$ DP <sup>1</sup>	Média TPC $\pm$ DP <sup>1</sup> (mg GAE/g extrato seco)	
	I	II	III				
Ácido Gálico	0,998	0,999	0,993	1,10	27,98 $\pm$ 1,90 <sup>a</sup>	–	
Quercetina	0,998	0,999	0,995	1,79	17,29 $\pm$ 1,70 <sup>b</sup>	–	
<i>Myrsine umbellata</i>	Hexano	0,999	0,995	0,993	152,59	0,20 $\pm$ 0,01 <sup>f</sup>	21,50 $\pm$ 0,46 <sup>e</sup>
	DCM	0,999	0,994	0,995	394,46	0,08 $\pm$ 0,01 <sup>f</sup>	24,77 $\pm$ 0,40 <sup>e</sup>
	AcOEt	0,998	0,996	0,993	33,09	0,93 $\pm$ 0,07 <sup>f</sup>	108,68 $\pm$ 1,82 <sup>d</sup>
	Acetona	0,999	0,998	0,998	4,40	7,02 $\pm$ 0,58 <sup>cd</sup>	446,65 $\pm$ 4,55 <sup>a</sup>
	MeOH	0,999	0,999	0,998	6,75	4,57 $\pm$ 0,33 <sup>e</sup>	276,07 $\pm$ 5,50 <sup>c</sup>
<i>Myrsine coriacea</i>	Hexano	0,998	0,994	0,985	74,19	0,42 $\pm$ 0,02 <sup>f</sup>	40,98 $\pm$ 0,53 <sup>e</sup>
	DCM	0,991	0,981	0,983	49,00	0,63 $\pm$ 0,03 <sup>f</sup>	62,96 $\pm$ 0,29 <sup>e</sup>
	AcOEt	0,985	0,998	0,994	24,62	1,25 $\pm$ 0,08 <sup>f</sup>	113,47 $\pm$ 3,21 <sup>d</sup>
	Acetona	0,994	0,987	0,968	3,52	8,74 $\pm$ 0,54 <sup>c</sup>	303,95 $\pm$ 6,73 <sup>c</sup>
	MeOH	0,999	0,997	0,992	5,18	5,95 $\pm$ 0,40 <sup>de</sup>	386,77 $\pm$ 48,32 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Desvio padrão da média

Foi observada uma correlação entre a presença de atividade antioxidante e o teor de fenóis totais para os extratos ( $r^2 = 0,851$ ), embora o extrato acetona de folhas de *M. coriacea* tenha apresentado o maior índice de atividade antioxidante (AAI = 8,74, TPC = 303,95) e o extrato acetônico de folhas de *M. umbellata* o maior teor de fenóis totais (AAI = 7,02, TPC = 446,65) (FIGURA 1.2).



**Figura 1.2** Correlação linear entre o teor de fenólicos totais (TPC, em mg de ácido gálico equivalente / g de extrato seco) e índice de atividade antioxidante (AAI) de extratos foliares de *Myrsine umbellata* e *Myrsine coriacea*.  $r^2 = 0,851$ ,  $p < 0,01$ .

A atividade antioxidante estabelecida por meio do índice proposto por Scherer e Godoy (2009) é um método estável e adequado para a comparação da atividade antioxidante de extratos vegetais, bem como de compostos puros. Nesse trabalho, o maior AAI foi encontrado para o extrato acetona de folhas de *M. coriacea* (AAI = 8,74). No entanto, a atividade antioxidante observada no extrato acetona de folhas de *M. umbellata* pode estar relacionada à presença da catequina e da luteína, conhecidos por suas propriedades antioxidantes e já isolados nesta planta por Novaes et al. (2013b).

Da mesma forma, o maior conteúdo de compostos fenólicos no extrato acetona de folhas de *M. umbellata* pode ser devido à presença deste flavonoide, a catequina. Os compostos fenólicos, e em particular os flavonoides, são produzidos em grandes quantidades pelas plantas (TAIZ; ZEIGER, 2009) e possuem funções importantes como antioxidantes (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997; JING et al., 2012). Os flavonoides representam o maior grupo de polifenóis encontrados em alimentos e possuem estrutura ideal para o sequestro de radicais, sendo antioxidantes mais efetivos que as vitaminas C e E (BARRETA, 2011).

No presente trabalho foi observado teores de atividade antioxidante e componentes fenólicos significativamente maiores nos extratos polares quando comparado aos extratos apolares. De acordo com Sultana et al. (2009) a eficiência no isolamento de compostos com propriedades antioxidantes depende da natureza do solvente e método de extração utilizado, sendo, portanto, os solventes polares os mais adequados na extração de polifenóis. A capacidade de inativação dos radicais livres pelos polifenóis pode ser atribuída à presença de grupamentos hidroxilas (-OH) que possuem propriedade de reduzir radicais livres presentes no organismo, impedindo sua ação (RIIHINEN et al., 2008).

As espécies estudadas nesse trabalho apresentaram atividades biológicas promissoras para futuros estudos. Este é o primeiro estudo sobre a atividade biológica das espécies *M. umbellata* e *M. coriacea* que incluem atividade antifúngica, inseticida e antioxidante.

## **Conclusões**

O extrato acetato de etila de folhas de *M. umbellata* apresentou maior atividade inibitória do crescimento micelial de *P. aphanidermatum* e *C. acutatum*.

A maior taxa de mortalidade larval de *S. frugiperda* foi obtida pelo extrato hexânico de folhas de *M. coriacea* (63%), seguida pelo extrato diclorometânico de *M. umbellata* (49%).

Dentre os extratos testados para a atividade antioxidante, os acetona e metanol de *M. umbellata* (AAI = 7,02 e AAI = 4,57) e *M. coriacea* (AAI = 8,74 e AAI = 5,95) apresentaram atividade antioxidante muito forte. O extrato acetato etílico de *M. coriacea* (AAI = 1,25) apresentou atividade forte e os demais apresentaram atividade moderada.

Os ensaios biológicos mostraram que os extratos foliares de *M. umbellata* obtiveram os melhores resultados no bioensaio antifúngico e os extratos de *M. coriacea* obtiveram os melhores resultados nos bioensaios inseticida e antioxidante. As duas espécies de *Myrsine* testadas apresentam potencial promissor na busca por compostos bioativos.

## **Agradecimentos**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro. Ao Dr. Wagner Bettiol pelos isolados de fungos.

## **Referências Bibliográficas**

AHUJA, I.; KISSEN, R.; BONES, A. M. Phytoalexins in defense against pathogens. **Trends in plant science**, v. 17, n. 2, p. 73-90, 2012.

ALVES, T. M. A. et al. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000.

ALVES-RODRIGUES, A.; SHAO, A. The science behind lutein. **Toxicology letters**, v. 150, n. 1, p. 57-83, 2004.

AMADIOHA, A. C. Controlling rice blast in vitro and in vivo with extracts of *Azadirachtaindica*. **Crop Protection**, v. 19, n. 5, p. 287-290, 2000.

ANOKWURU, C. P. et al. Effect of extraction solvents on phenolic, flavonoid and antioxidant activities of three Nigerian medicinal plants. **Nature & Science**, v. 9, n. 7, p. 53-61, 2011.

BACKES, P.; IRGANG, B. **Árvores do sul: guia de identificação & interesse ecológico**. Santa Maria: Editora Palloti, 326p., 2002.

BAIS, H. P. et al. Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions. **Science**, v. 301, n. 5638, p. 1377-1380, 2003.

BARRETTA C. **Atividade antioxidante de extratos e compostos isolados de *Eugenia umbelliflora* e *Rapanea ferruginea***. 103 f. Dissertação de Mestrado. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2011.

CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Jaguariúna: SP, Embrapa Meio Ambiente. 279p., 2003.

CECHINEL FILHO, V. et al. Evaluation of antileishmanial activity of selected Brazilian plants and identification of the active principles. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

COLEGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J. **Bioactive natural products: detection, isolation, and structural determination**. CRC press, 585 p., 2007.

COLEY, P. D.; BATEMAN, M. L.; KURSAR, T. A. The effects of plant quality on caterpillar growth and defense against natural enemies. **Oikos**, v. 115, n. 2, p. 219-228, 2006.

CRUZ, A. B. et al. Bio-guided isolation of antimicrobial compounds from *Rapanea ferruginea* and its cytotoxic and genotoxic potential. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 19, p. 1323-1329, 2013.

DARVILL, A. G.; ALBERSHEIM, P. Phytoalexins and their elicitors - a defense against microbial infection in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 35, n. 1, p. 243-275, 1984.

DUKE, S. O.; OLIVA, A. Mode of action of phytotoxic terpenoids. In: MACÍAS, F. A. et al. **Allelopathy: Chemistry and mode of action of allelochemicals**. Boca Raton, CRC Press. p. 201-216., 2004.

EINHELLIG, F. A. Mode of action of phenolic compounds. In: MACÍAS, F.A. et al. **Allelopathy: Chemistry and mode of action of allelochemicals**. Boca Raton, CRC Press. p. 217-238., 2004.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, n. 1, p. 175-204, 2000.

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

FRANCISCO, I. A.; PINOTTI, M. H. P. Cyanogenic glycosides in plants. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 43, n. 5, p. 487-492, 2000.

GALLO, M. B. C. et al. Bioactivity of extracts and isolated compounds from *Vitex polygama* (Verbenaceae) and *Siphoneugena densiflora* (Myrtaceae) against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Management Science**, v. 62, p. 1072-1081, 2006.

GAZONI, V. F. **Análise fitoquímica e avaliação do efeito anticolinesterásico do extrato e compostos isolados da *Rapanea ferruginea***. 84 f. Dissertação de Mestrado. Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2009.

GEORGE, S. et al. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1370-1373, 2005.

GITHIORI, J. B. et al. Anthelmintic activity of preparations derived from *Myrsine africana* and *Rapanea melanophloeos* against the nematode parasite, *Haemonchus contortus*, of sheep. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, n. 2, p. 187-191, 2002.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. **PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis**, 2001.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 572-584, 2002.

JANUÁRIO, A. H. et al. Terpeno-p-hydroxybenzoic acid derivatives from *Rapanea umbellata*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 6, p. 2019-2023, 1991.

JANUÁRIO, A. H. et al. Dammarane and cycloartanetriterpenoids from three *Rapanea* species. **Phytochemistry**, v. 31, n. 4, p. 1251-1253, 1992.

JING, P. et al. Quantitative studies on structure - DPPH• scavenging activity relationships of food phenolic acids. **Molecules**, v. 17, n. 11, p. 12910-12924, 2012.

JUNG-MENDAÇOLLI, S. L.; BERNACCI, L. C. In: WANDERLEY, M. G. L. et al. **Flora fanerogâmica do estado de São Paulo** v. 4. Ed. Rima., 432 p., 2005.

KASTEN, P. JR.; PRECETTI, A. A. C. M.; PARRA, J. R. P. Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) em duas dietas artificiais e substrato natural. **Revista de Agricultura**, v. 53, p. 68, 1978.

KUPPER, K. C.; BELLOTTE, J. A. M.; GOES, A. Controle alternativo de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 4, p. 1004-1015, 2009.

LEITE, A. C. et al. Trypanocidal activity of flavonoids and limonoids isolated from Myrsinaceae and Meliaceae active plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 01-06, 2010.

LO, S. C. et al. Phytoalexin accumulation in sorghum: identification of a methyl ether of luteolinidin. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 49, n. 1, p. 21-31, 1996.

LOPES, E. M. C. et al. Screening for antifungal, DNA-damaging and anticholinesterasic activities of Brazilian plants from the Atlantic Rainforest: Ilha do Cardoso State Park. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 655-660, 2008.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Editora Plantarum, 384 p., 2002.

MACÍAS, F. A. et al. Plant biocommunicators: their phytotoxicity, degradation studies and potential use as herbicide models. **Phytochemistry Review**, v.7, p. 179-194, 2008.

MACÍAS, F. A. et al. Isolation and phytotoxicity of terpenes from *Tectona grandis*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 36, p. 396-404, 2010.

MANGURO, A. L. O.; MIDIWO, J. O.; KRAUS, W. A flavonol glycoside from *Myrsine africana* leaves. **Phytochemistry**, v. 43, n. 5, p. 1107-1109, 1996.

MATOS, A. P. et al. Constituintes químicos e atividade inseticida dos extratos de frutos de *Trichilia elegans* e *T. catigua* (Meliaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1553-1556, 2009.

MIDWO, J. O. et al. Bioactive compounds from some Kenyan ethnomedicinal plants: Myrsinaceae, Polygonaceae and *Psiadia punctulata*. **Phytochemistry Reviews**, v. 1, p. 311-323, 2002.

NOVAES, P. **Alelopatia e bioprospecção de *Rapanea ferruginea* e de *Rapanea umbellata***. 112 f. Tese de Doutorado. São Carlos: UFSCar, 2011.

NOVAES, P. et al. Ecological phytochemistry of Cerrado (Brazilian savanna) plants. **Phytochemistry Reviews**, v. 12, n. 4, p. 839-855, 2013a.

NOVAES, P. et al. Allelopathic potential of *Rapanea umbellata* leaf extracts. **Chemistry & Biodiversity**, v. 10, n. 8, p. 1539-1548, 2013b.

OHTANI, K.; MAVI, S.; HOSTETTMANN, K. Molluscicidal and antifungal triterpenoid saponins from *Rapanea melanophloeos* leaves. **Phytochemistry**, v. 33, n. 1, p. 83-86, 1993.

OSPINA, L. F. et al. Inhibition of acute and chronic inflammatory responses by hydroxybenzoquinone derivative rapone. **Planta Medica**, v. 67, p. 791-795, 2001.

PINTO, Z. V.; MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Induction of suppressiveness to *Fusarium wilt* of chrysanthemum with composted sewage sludge. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, n. 5, p. 414-422, 2013.

QASEM, J. R.; ABU-BLAN, H. A. Fungicidal activity of some common weed extracts against different plant pathogenic fungi. **Journal of Phytopathology**, v. 144, n. 3, p. 157-161, 1996.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. As principais fitofisionomias do bioma Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: Ecologia e Flora**. v. 1, p.153-212, 2009.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 4, p. 152-159, 1997.

RIIHINEN, K. et al. Organ-specific distribution of phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and 'northblue' blueberry (*Vaccinium corymbosum* x *V. angustifolium*). **Food Chemistry**, v. 110, n. 1, p. 156-160, 2008.

RODRÍGUEZ, H. C.; VENDRAMIM, J. D. Toxicidad de extractos acuosos de Meliaceae en *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Manejo Integrado de Plagas**, n. 42, p. 14-22, 1996.

SCHERER, R.; GODOY, H. T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chemistry**, v. 112, n. 3, p. 654-658, 2009.

SILVA, D. M.; BATALHA, M. A. Defense syndromes against herbivory in a cerrado plant community. **Plant Ecology**, v. 212, p.181–193, 2011.

SILVA, F. A. M.; ASSAD, E. D.; EVANGELISTA, B. A. Caracterização climática do bioma Cerrado. **Cerrado: ecologia e flora**. v. 1, p. 69-88, 2009.

SILVA, G.; LAGUNES, A.; RODRÍGUEZ, J. Control de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) con polvos vegetales solos y en mezcla con carbonato de calcio en maíz almacenado. **Ciencia e Investigación Agraria**, v. 30, n. 3, p. 153-160, 2003.

SINGH, R. et al. Studies on antioxidant potential of methanol extract/fractions of *Acacia auriculiformis* A. Cunn. **Food Chemistry**, v. 103, n. 2, p. 505-511, 2007.

SPARKS, A. N. A Review of the biology of the fall armyworm. **The Florida Entomologist**, v.62, n.2, pp. 82-87, 1979.

STRINGHETA, P. C. et al. Luteína: propriedades antioxidantes e benefícios à saúde. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 17, n. 2, p. 229-238, 2006.

SULTANA, B.; ANWAR, F.; ASHRAF, M. Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. **Molecules**, v. 14, n. 6, p. 2167-2180, 2009.

SUTTON, J. C. et al. Etiology and epidemiology of *Pythium* root rot in hydroponic crops: Current knowledge and perspectives. **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 4, p. 307-321, 2006.

TANZUBIL, P. B.; MCCAFFERY, A. R. Effects of azadirachtin and aqueous neem seed extracts on survival, growth and development of the African armyworm, *Spodoptera exempta*. **Crop Protection**, v. 9, n. 5, p. 383-386, 1990.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. v. 4. Porto Alegre, Artmed, 848 p., 2013.

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

WANDERLEY, M. G. L. et al. **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo** v. 4. Ed. Rima. 432 p., 2005.

YANG, C. R et al. Antifungal activity of C-27 steroidal saponins. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 5, p. 1710-1714, 2006.

ZHONG, X. N. et al. Three flavonoid glycosides from leaves of *Myrsine seguinii*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 5, p. 943-946, 1997.

ZHONG, X. N. et al. Hydroquinone glycosides from leaves of *Myrsine seguinii*. **Phytochemistry**, v. 49, n.7, p. 2149-2153, 1998.



ZHONG, X. N. et al. Hydroquinone diglycoside acyl esters from the leaves of *Myrsine seguinii*. **Phytochemistry**, v. 52, p. 923-927, 1999.

## CAPÍTULO 2

### **FITOTOXINAS DE *Tithonia diversifolia* (HEMSL.) A. GRAY\***

\* Maria, A. F. M. Miranda, Rosa M. Varela, Ascension Torres, José M. G. Molinillo, Sonia C. J. Gualtieri e Francisco A. Macías. Phytotoxins from *Tithonia diversifolia*. **Journal of Natural Products** (Publicado online: abril 2015). DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b00040

**Resumo** *Tithonia diversifolia* (girassol Mexicano) é uma espécie dominante da família Asteraceae, o que sugere a presença de aleloquímicos que podem interferir no desenvolvimento de plantas vizinhas. O estudo foi realizado para identificar compostos que possuem atividade fitotóxica, em extratos de *T. diversifolia*. Os extratos acetato de etila de folhas, caules e raízes apresentaram inibição significativa no alongamento de coleótilos de trigo e esse extrato foliar proporcionou efeitos inibidores semelhantes ao herbicida Logran. Foram isolados 14 compostos, 12 dos quais são lactonas sesquiterpênicas. Duas lactonas sesquiterpênicas são relatadas pela primeira vez e foram isolados como uma mistura inseparável de  $8\beta$ -*O*-(2-metilbutiroil)tiro-tundina (**4**) e  $8\beta$ -*O*-(isovaleroil)tiro-tundina (**5**). As estruturas foram determinadas por meio de análises espectroscópicas, incluindo técnicas de NMR e espectrometria de massas. As lactonas sesquiterpênicas  $1\beta$ -metoxidiversifolina (**6**), tagitinina A (**7**) e tagitinina C (**8**) foram os compostos majoritários identificados. Estes compostos foram ativos na inibição do alongamento de coleótilos de trigo, germinação de sementes e crescimento de espécies alvo padrão (STS) e espécies invasoras. A atividade fitotóxica mostrada por estas lactonas sesquiterpênicas indica que elas são, possivelmente, os compostos responsáveis pela atividade apresentada pelos extratos. A dominância desta espécie pode ser explicada pela presença desses metabólitos secundários, e sua ação assegura o estabelecimento desta espécie no ambiente.

**Palavras-chave** Asteraceae, aleloquímicos, lactonas sesquiterpênicas, fitotoxicidade, espécies invasoras

**Abstract** *Tithonia diversifolia* (Mexican sunflower) is a dominant plant of the Asteraceae family, which suggests the production of allelochemicals that interfere with the development of surrounding plants. The study described here was conducted to identify the compounds that have phytotoxic activity in *T. diversifolia* extracts. Ethyl acetate extracts of leaves, stems and roots showed significant inhibition of wheat coleoptiles growth and, leaf extract had similar inhibitory effects to the herbicide Logran. Fourteen compounds, twelve of which were sesquiterpene lactones, have been isolated. Two sesquiterpene lactones are reported for the first time and were isolated as an inseparable mixture of 8 $\beta$ -*O*-(2-methylbutyryl)tirobundin (**4**) and 8 $\beta$ -*O*-(isovaleroyl)tirobundin (**5**). Their structures were determined by spectroscopic analysis, including NMR techniques and mass spectrometry. The sesquiterpene lactones 1 $\beta$ -methoxydiversifolin (**6**), tagitinin A (**7**), and tagitinin C (**8**) were the major products identified. These compounds were active on etiolated wheat coleoptiles, seed germination and the growth of STS and weeds. The phytotoxic activity shown by these sesquiterpene lactones indicates that they are the compounds responsible for the activity exhibited by the extracts. The dominance of this species can be explained by these secondary metabolites, as their action ensures the establishment of this plant in the environment.

**Keywords** Asteraceae, allelochemicals, sesquiterpene lactones, phytotoxicity, alien species

## **Introdução**

Espécies invasoras são a segunda maior causa de perda de diversidade global, após a fragmentação de habitat (DRAKE; MOONEY; DI CASTRI, 1989). Podem afetar sistemas ecológicos, alterando muitas comunidades e ecossistemas (GUREVITCH; PADILLA, 2004), competindo com a flora nativa e estabelecendo monoculturas (JOSE et al., 2013). Algumas destas espécies foram inicialmente introduzidas como culturas agrícolas e subsequentemente tornaram-se invasoras (PIMENTEL et al., 1989). Plantas invasoras apresentam vantagens competitivas por possuírem compostos secundários que representam novos desafios para as espécies nativas (WEIDENHAMER; CALLAWAY, 2010; ALLSTADT et al., 2012). Estas “armas bioquímicas” funcionam como agentes alelopáticos que podem inibir o desenvolvimento de outras espécies de plantas, em novas comunidades (CALLAWAY; RIDENOUR, 2004).

A alelopatia pode ser definida como efeitos positivos ou negativos sobre o crescimento de plantas, provocados por metabólitos secundários produzidos e liberados no ambiente por outras plantas (FERREIRA, 2004). Estes compostos podem ser liberados por meio da volatilização, exsudação, lixiviação, e decomposição do material vegetal (RICE, 1984). O fenômeno da alelopatia é um importante mecanismo ecológico que influencia a dominância e sucessão de plantas, formação clímax, comunidades e a produtividade de sistemas agrícolas (RIZVI et al., 1992; AN, 2005).

A identificação de aleloquímicos em plantas invasoras é um passo importante para uma compreensão completa do fenômeno alelopático. Tais informações podem proporcionar respostas importantes sobre o estabelecimento de plantas invasoras em um determinado ambiente e também podem permitir o desenvolvimento de novas ferramentas para modelos de herbicidas naturais (MACÍAS et al., 2007) que são ambientalmente corretos e menos nocivos que os tradicionais sintéticos (DUKE et al., 2000).

*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (girassol Mexicano) é um arbusto perene da família Asteraceae (AYENI; LORDBANJOU; MAJEK, 1997). Originária do México e América Central, foi introduzida em diversos países como espécie ornamental e também pelo seu caráter farmacológico (ZHAI et al., 2010), é utilizada como adubo verde e no controle da erosão do solo (TONGMA; KOBAYASHI; USUI, 2001). No entanto, esta planta tornou-se um problema devido seu comportamento invasor em muitos países (AYENI; LORDBANJOU; MAJEK, 1997; CHAGAS-PAULA et al., 2012).

Muitas classes de metabólitos secundários foram isoladas de espécies de *Tithonia*, incluindo, sesquiterpenos, diterpenos, e flavonoides (CHAGAS-PAULA et al., 2012). Mais de 150 compostos já foram isolados de *T. diversifolia* (ZHAO et al., 2012) e estes incluem as lactonas sesquiterpênicas tirotundin, tagitinina A e tagitinina C (LIN, 2012).

Lactonas sesquiterpênicas estão presentes em grandes quantidades na família Asteraceae e são uma importante classe de metabólitos secundários responsáveis por atividades farmacológicas e fitotóxicas dessas espécies (SEAMAN, 1982; MACÍAS; GALINDO; MASSANET, 1992; MACÍAS et al., 1996; HEINRICH et al., 1998; DAYAN et al., 1999; TAIWO; MAKINDE, 2005; RIAL et al., 2014). As lactonas sesquiterpênicas tagitinina A e tagitinina C foram relatadas por reduzir a germinação de sementes e o crescimento de plântulas de diversas espécies (BARUAH et al., 1994). Esta atividade fitotóxica sugere a presença do fenômeno alelopático, sobre o crescimento de outras plantas, em condições naturais (TONGMA; KOBAYASHI; USUI, 1999). A incorporação de *T. diversifolia* no solo também foi relatada por inibir o crescimento de plântulas de arroz (TONGMA; KOBAYASHI; USUI, 1998). Em outros estudos, verificou-se que extratos aquosos de *T. diversifolia* apresentaram atividade fitotóxica sobre a germinação e crescimento de espécies de *Amaranthus* (OTUSANYA; ILORI; ADELUSI, 2007; OTUSANYA; SOKAN-ADEAGA; ILORI, 2014).

O objetivo desse estudo foi o preparo de extratos de *T. diversifolia* por meio do isolamento e purificação de metabólitos secundários com potencial fitotóxico. Espera-se que os resultados possam explicar o comportamento invasor da espécie e que os compostos identificados poderão, futuramente, ser utilizados como modelos de herbicidas naturais. Neste estudo, o material vegetal (raízes, caules e folhas) foi extraído utilizando acetato de etila e metanol. Os extratos e os compostos foram testados em bioensaios de alongamento de coleótilos de trigo e de fitotoxicidade. O extrato mais fitotóxico foi fracionado, a fim de isolar e identificar seus compostos químicos. As estruturas dos compostos foram determinadas por estudos espectroscópicos. Os perfis de bioatividade dos compostos isolados foram testados nas espécies alvo padrão (STS) (MACÍAS et al., 2000), alface, agrião, tomate e cebola, e sobre as espécies invasoras, braquiária e capim arroz. As espécies de Poaceae, capim arroz (*Echinochloa crus-galli* L.) e braquiária (*Urochloa decumbens* (Stapf) RD Webster) são espécies invasoras de grande importância em todo o mundo. O capim arroz é uma espécie nativa da Ásia e considerada invasora em plantações de arroz em todo o mundo (TALBERT; BURGOS, 2007). Braquiária é uma das principais

espécies invasoras na América do Sul (SOUZA et al., 2006). Nossa hipótese é que os aleloquímicos de *T. diversifolia* possuem potencial fitotóxico e que poderiam inibir o desenvolvimento de outras espécies invasoras, tais como as que foram testadas neste estudo.

## **Material e Métodos**

### *Procedimentos Experimentais Gerais*

O desvio ótico foi determinado em um polarímetro modelo 241 (Perkin-Elmer, Waltham, MA, EUA) com lâmpada de sódio (598 nm) a temperatura ambiente. Espectros de infravermelho (IR) foram registrados em um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier FT-IR Spectrum 1000 (Perkin-Elmer, Waltham, MA, EUA). As amostras foram solubilizadas em clorofórmio 99,9% A.C.S grau espectrofotométrico e se depositaram em filme sobre pastilhas de KBr. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (NMR, *nuclear magnetic resonance*) foram registrados em espectrômetros de 400 MHz, 500 MHz e 600 MHz (Agilent, Palo Alto, CA, EUA). Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm e referenciados em relação aos sinais residuais  $^1\text{H}$  de  $\text{CDCl}_3-d_1$  ( $\delta$  7,25), e os sinais de  $^{13}\text{C}$  foram referenciados ao sinal do solvente ( $\delta$  77,00). A espectrometria de massas de alta resolução (HRMS, *high resolution mass spectrometry*) foi obtida por UPLC (*ultra performance liquid chromatography*) com ionização por eletronebulização (ESI, *electrospray ionization*) e analisador híbrido tipo quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF, *quadrupole time-of-flight hybrid analyzer*), Synapt G2 UPLC-ESI-QTOF-MS (Waters, Milford, MA, EUA). A separação cromatográfica foi conduzida em um cromatógrafo HPLC (*high performance liquid chromatography*) (Merck-Hitachi, Tóquio, Japão), com detecção de índice de refração. Neste procedimento foram utilizadas uma coluna semipreparativa (250 mm x 10 mm, 10  $\mu\text{m}$ ) Lichrospher 250-10  $\text{Si}_{60}$  (Merck) com uma coluna de proteção LiChrospher  $\text{Si}_{60}$  (Merck) e uma coluna analítica (250 mm x 4,60 mm x 10  $\mu\text{m}$ ) Luna 10  $\mu\text{m}$  Sílica (2) 100Å (Phenomenex). Para a cromatografia em coluna (CC) foi utilizado sílica gel 0,060-0,200, 60Å da Acros Organics (Geel, Bélgica) e Lichroprep RP-18 (40-63  $\mu\text{m}$ ) da Merck (Darmstadt, Alemanha). A cromatografia em camada delgada (CD) foi realizada em placas de sílica gel sobre base de alumínio, Sílica gel 60 F<sub>254</sub> e Sílica gel 60 RP-18 F<sub>254</sub>S, da Merck. Os compostos foram visualizados sob

luz UV<sub>254/366</sub> e utilizando como revelador químico *óleum*, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O/HOAc (4:16:80 v/v/v). Todas as extrações foram realizadas com auxílio de em um banho de ultrassom, Ultrassom (360 W, J.P. Selecta, Barcelona, Espanha).

### *Reagentes*

O clorofórmio, *n*-hexano (Hex), metanol (MeOH), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e acetona (Ac) Hipersolv Chromanorm para HPLC foram obtidos de VWR International (Radnor, PA, EUA). MagniSolv Clorofórmio-D1 grau de deuteração min. 99,9% para a espectroscopia de NMR foram obtidos da Merck.

### *Material Vegetal*

Folhas, caules e raízes foram coletados aleatoriamente de espécies de *T. diversifolia* na área de cerrado da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP, Brasil (21° 58 'a 22° 00' S e 47° 51 'a 47° 52' W), durante a estação seca (agosto de 2013). As exsiccatas de *T. diversifolia* foram depositadas no Herbário do Departamento de Botânica da UFSCar - Brasil (voucher 8728).

### *Extração e isolamento*

O material vegetal foi seco em estufa durante 72 h a 40°C e reduzido a pó utilizando um moinho elétrico. Uma pequena quantidade do material vegetal de cada parte da planta (60 g), raiz, folha e caule foram extraídos com hexano (Hex) em temperatura ambiente, utilizando um banho de ultrassom, a fim de eliminar hidrocarbonetos e lipídios do material. As seguintes quantidades de extrato seco foram obtidas: raízes 92,8 mg (Hex), folhas 401,5 mg (Hex) e caules 52,7 mg (Hex). O material vegetal livre de hidrocarbonetos e lipídios foi extraído com acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH). Estas extrações renderam, após a evaporação do solvente, as seguintes quantidades: raízes, 105,0 mg (AcOEt) e 628,6 mg (MeOH); folhas, 625,0 mg (AcOEt) e 1966,0 mg (MeOH); caule, 84,0 mg (AcOEt) e 1291,0 mg (MeOH). A clorofila foi removida dos extratos foliares utilizando como eluentes uma mistura de H<sub>2</sub>O/MeOH 20% (fração A); 40% + 60% (fração B); 80% (fração C) e 100% (fração D) e, finalmente, com clorofórmio, sobre uma coluna



de cromatografia em fase reversa, RP-18. Os extratos AcOEt e MeOH foram testados em bioensaios de alongamento de coleóptilos de trigo e os mais ativos foram utilizados em bioensaios de fitotoxicidade em espécies-alvo padrão (STS).

O extrato foliar AcOEt foi o que apresentou a maior atividade nos bioensaios de alongamento de coleóptilos de trigo e fitotoxicidade e foi, portanto, eleito para continuar os estudos de isolamento. Para isso, o material foliar restante (1,8 kg) foi extraído com Hex e posteriormente, esse material livre de hidrocarbonetos e lipídios, foi extraído com AcOEt (10 L). A extração foi realizada utilizando pequenas porções de 180 g de planta (2 × 500 mL de AcOEt cada), com auxílio de um banho de ultrassom. Este processo resultou em 35 g de material. A clorofila foi removida deste extrato, originando quatro frações livres de clorofila obtidas em ordem de polaridade decrescente: A (20% MeOH) (3,8306 g), B (40 + 60% MeOH) (10,7661 g), C (80% MeOH) (3,8310 g) e D (100% MeOH) (5,8751 g), que foram separadas com uma mistura de Hex/AcOEt em gradiente de 0 a 100% de AcOEt, com um aumento de 10% a cada vez e finalizando com 100% de MeOH (500 mL de cada polaridade), obtendo-se as subfrações: (A) A1, A2 e A4; (B) B1, B2, B3, B4 e; (C) C3, C4, C5, C6, e C8. A subfração B1 (22,1 mg) foi purificada por HPLC (coluna semipreparativa) eluindo com Hex/AcOEt (80:20 v/v, fluxo 3 mL/min) originando os compostos **1** (5 mg) e **2** (2,2 mg). As subfrações B2 (3,56 g), B3 (2,32 g), e B4 (3,32 g) originaram os compostos **6** (3,56 g), **8** (2,32 g) e **7** (3,32 g), respectivamente. A subfração C3 (505,5 mg) foi submetida a uma cromatografia em coluna com um gradiente de Hex/Ac de 20 a 100% de Ac, com aumento de 10% a cada vez, e finalizando com 100% de MeOH (250 mL de cada polaridade), originando nove subfrações (C3.1 a C3.9). A subfração C3.2 (98 mg) foi purificada por HPLC (coluna semipreparativa) eluindo com Hex/AcOEt (70:30 v/v, fluxo 3 mL/min) originando os compostos **11** (3,5 mg), **12** (10 mg), e **13** (1,3 mg). A subfração C3.3 (300 mg) foi purificada por HPLC (coluna semipreparativa) eluindo com Hex/AcOEt (50:50 v/v, fluxo 3 mL/min) originando os compostos **3** (11,3 mg), **10** (7,8 mg) e uma mistura de isômeros **4** + **5** (21,3mg). Esta mistura de isômeros **4** + **5** foi obtida após sucessivas purificações utilizando uma coluna analítica eluindo com Hex/AcOEt (60:40 v/v, fluxo 1 mL/min) e Hex/Ac (50:50 v/v, fluxo 1 mL/min) como um único pico. A subfração C4 (768 mg) originou o composto **8** (768 mg). A subfração C5 (295,5 mg) foi purificada por HPLC (coluna semipreparativa) eluindo com Hex/AcOEt (60:40 v/v, fluxo 3 mL/min) para se obter os compostos **8** (68,4 mg) e **9** (14,2 mg). A subfração C6 (756 mg) originou o composto **7** (756 mg). A subfração C8 (120,7 mg) deu origem ao composto **14**

(120,7 mg). As subfrações A1 (1,26 g), A2 (467mg), e A4 (854 mg) deram origem aos compostos **6** (1,26 g), **8** (467 mg) e **7** (854 mg), respectivamente (ver APÊNDICE 2, pg. 105).

*8β-O-(2-metilbutiroil)tirotundina (4)* e *8β-O-(isovaleroil)tirotundina (5)* (mistura de isômeros). Branco, pó amorfo; IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3400, 1770, 1735  $\text{cm}^{-1}$ ; dados de NMR  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) e NMR  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) (ver Tabela 2.1, pg. 67); EISMS de íon-positivo  $m/z$  389 (100)  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ; HRESIMS de íon-positivo  $m/z$  389.1938  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  (calculado para  $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_6\text{Na}$  389,1940); 367.2116  $[\text{M} + \text{H}]^+$ . MS-MS:  $\text{ESI}^+$  (367  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ): (349  $[\text{M} - \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$ ); 247  $[\text{M} - \text{H}_2\text{O} - \text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_2 + \text{H}]^+$ ; EISMS de íons negativos  $m/z$  365 (100)  $[\text{M} - \text{H}]^-$  HRESIMS de íons negativos  $m/z$  365,1976  $[\text{M} - \text{H}]^-$  (calculado para  $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_6$  365,1964). MS-MS:  $\text{ESI}^-$  (365  $[\text{M} - \text{H}]^-$ ): (263  $[\text{M} - \text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_2 - \text{H}]^-$ ; 101 ( $\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_2$ )).

Os compostos **1-3** a **6-12** e **14** foram utilizados em bioensaio de alongamento de coleóptilos de trigo, e os compostos majoritários **6**, **7** e **8** foram utilizados em bioensaios de fitotoxicidade sobre espécies-alvo padrão (STS) e espécies invasoras.

#### *Bioensaio de coleóptilos*

Sementes de trigo (*Triticum aestivum* L. cv. Duro) foram colocadas para germinar em placas de Petri de 15 cm de diâmetro, umedecidas com água e deixadas no escuro a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 3 dias (HANCOCK; BARLOW; LACEY, 1964). Raízes e cariopses foram removidas do coleóptilo. O restante foi colocado em uma guilhotina de Van der Weij e os 2 mm apicais foram cortados e eliminados. Os 4 mm seguintes foram usados para o bioensaio. Todo o processo foi realizado sob luz verde de segurança (NITSCH; NITSCH, 1956). Os extratos brutos ou compostos puros foram dissolvidos em DMSO (0,5%) e diluídos em tampão fosfato-citrato contendo sacarose a 2% (NITSCH; NITSCH, 1956) e pH ajustado a 5,6 para as concentrações finais utilizadas no bioensaio (0,8; 0,4 e 0,2  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  para os extratos e  $10^{-3}$ ,  $3 \times 10^{-4}$ ,  $10^{-4}$ ,  $3 \times 10^{-5}$  e  $10^{-5}$  M para os compostos).

Controles paralelos também foram realizados. O herbicida comercial Logran®, cuja formulação original é uma combinação de *N*<sup>2</sup>-tert-butil-*N*<sup>4</sup>-etil-6-metiltio-1,3,5-triazina-2,4-diamina (terbutrin, 59,4%) e 1-[2-(2-cloroetoxi)fenil]-3-(4-metoxi-6-metil-1,3,5-

triazina-2-il) ureia (triassulfuron, 0,6%), foi utilizado como controle positivo, nas mesmas concentrações e nas mesmas condições relatadas anteriormente (MACÍAS et al., 2000). Soluções tampão aquosas contendo DMSO, foram utilizadas como controle negativo para todas as espécies de plantas avaliadas.

Cinco coleóptilos foram colocados em tubos de ensaio contendo 2 mL de solução cada (três tubos por diluição) e os tubos foram colocados em rotação constante a 6 rpm, em um rotor de cultivo *Stuart Scientific* tipo SC2 durante 24 h a 25°C no escuro. Os coleóptilos foram medidos por meio da digitalização de suas imagens. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste de Welch (MARTIN ANDRÉS; LUNA DEL CASTILLO, 1990) e são apresentados como diferença percentual em relação ao controle. Os valores positivos representam estímulo e valores negativos representam inibição.

### *Bioensaios de fitotoxicidade*

A seleção das espécies alvo foi baseada em um estudo previamente relatado para bioensaios de fitotoxicidade (MACÍAS et al., 2000). Foram propostas várias “espécies alvo padrão” (STS), incluindo as dicotiledôneas tomate (*Lycopersicon esculentum* Will.), agrião (*Lepidium sativum* L.) e alface (*Lactuca sativa* L.) e uma monocotiledônea, cebola (*Allium cepa* L.), que foram utilizadas neste estudo. Duas espécies de plantas invasoras foram adicionadas como espécies alvo neste bioensaio: o capim arroz (*Echinochloa crus-galli* L.) e a braquiária (*Urochloa decumbens* (Stapf) RD Webster).

Os bioensaios foram realizados utilizando placas de Petri (50 mm de diâmetro) com uma folha de papel de filtro Whatman n°.1, como substrato. A germinação das sementes e o crescimento das plântulas foram realizadas em soluções aquosas com pH controlado utilizando ácido 2-[N-morfolin]jetanosulfônico (MES) a  $10^{-2}$  M e NaOH 1 M (pH 6,0). Os extratos ou compostos a serem ensaiados foram dissolvidos em DMSO (0,5%) e estas soluções foram diluídas com tampão (solução tampão de 5µL de DMSO/mL) de modo que as concentrações de ensaio para cada extrato (0,8; 0,4 e 0,2 mg.mL<sup>-1</sup>) e compostos ( $10^{-3}$ ,  $3 \times 10^{-4}$ ,  $10^{-4}$ ,  $3 \times 10^{-5}$  e  $10^{-5}$  M) foram alcançadas. Controles paralelos, positivo e negativo, também foram executados conforme descrito anteriormente para o bioensaio de coleóptilos.

Quatro repetições foram feitas para o tomate, agrião, cebola e alface, cada uma contendo 20 sementes. Foi adicionado 1 mL de cada tratamento, controle ou solução

herbicida de referência em cada placa de Petri de 5 cm de diâmetro. Após a adição das sementes e das soluções aquosas, as placas de Petri foram seladas com Parafilm®. As sementes foram incubadas a 25°C em ambiente controlado, em uma câmara de crescimento Memmert ICE 700. O fotoperíodo foi de 24 h de escuro para a cebola, tomate, agrião e alface, e 16/8h luz/escuro para o capim arroz e braquiária. Foram necessários 4 dias de bioensaio para o agrião, 5 dias para o tomate, 6 dias para o alface, 7 dias para a cebola e 8 dias para o capim arroz e a braquiária. Após crescimento, as plantas foram congeladas a -10°C durante 24 h, para evitar o crescimento subsequente, durante o processo de medição.

A medida da taxa de germinação e comprimento da raiz e parte aérea foi realizada utilizando o software Fitomed® (CASTELLANO SÁNCHEZ, 2002).

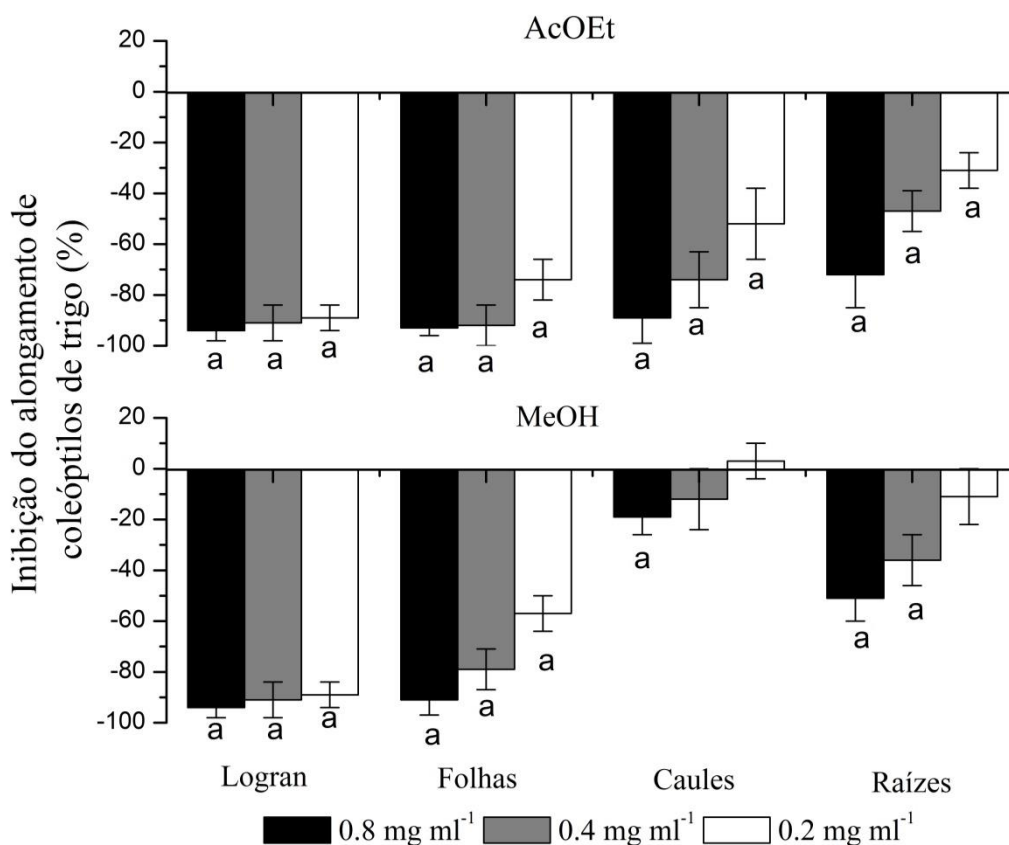
### *Análise estatística*

Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste de Welch, com nível de significância em 0,01 e 0,05. Os resultados são apresentados como diferenças percentuais em relação ao controle. Zero representa o controle, os valores positivos representam a estimulo, e valores negativos representam inibição.

## **Resultados e Discussão**

Folhas (60g), caules (60 g) e raízes (60 g) de *Tithonia diversifolia*, extraídas primeiramente com hexano, foram extraídas com acetato de etila (AcOEt) tendo um rendimento de 1,04; 0,14 e 0,18%, respectivamente e, posteriormente extraído com metanol (MeOH) tendo um rendimento de 3,28; 2,15 e 1,05%, respectivamente. A clorofila foi removida dos extratos foliares. Os extratos em concentrações de 0,8; 0,4 e 0,2 mg.mL<sup>-1</sup>, foram submetidos ao bioensaio de alongamento de coleóptilos de trigo (MACÍAS et al., 2000). Este bioensaio é amplamente utilizado na avaliação da atividade geral de extratos vegetais (HANCOCK; BARLOW; LACEY, 1964).

De modo geral, os extratos AcOEt de folha, caule e raiz apresentaram maior inibição do alongamento dos coleóptilos de trigo que os extratos MeOH. O extrato foliar AcOEt foi o mais ativo e também mostrou o melhor perfil de atividade, continuando ativo mesmo na menor concentração testada (0,2 mg.mL<sup>-1</sup>, -74%) (FIGURA 2.1).



**Figura 2.1** Efeito do herbicida Logran® e extratos acetato de etila (AcOEt) e metanólico (MeOH) de folha, caules e raízes de *Tithonia diversifolia* no alongamento de coleóptilos de trigo.

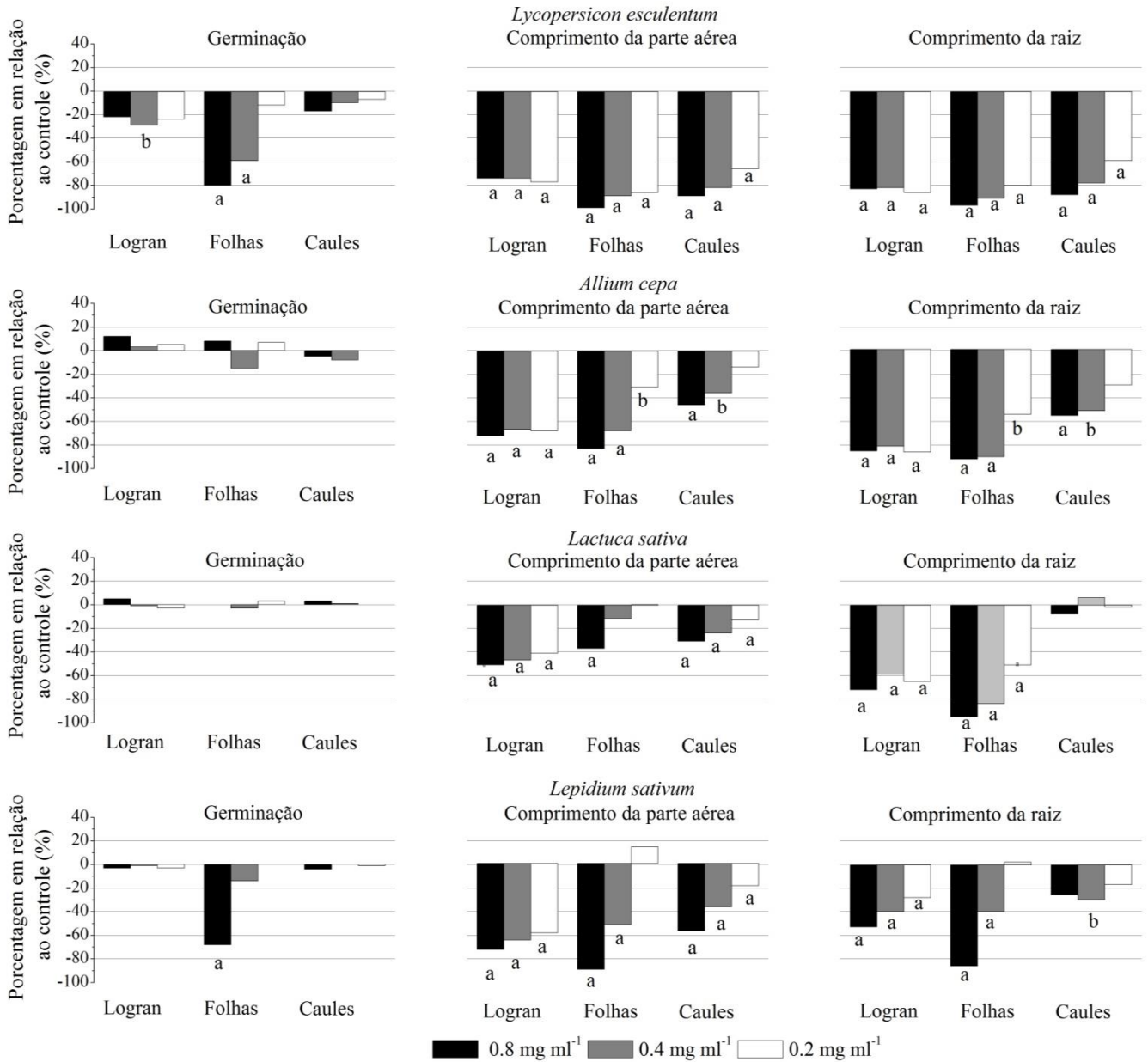
Efeito do herbicida Logran® e extratos AcOEt e MeOH de folha, caules e raízes de *Tithonia diversifolia* no alongamento de coleóptilos de trigo.

A fim de comparar a atividade dos extratos, os valores de  $IC_{50}$  foram calculados utilizando um modelo de dose-resposta sigmoidal. Os resultados permitiram classificar os extratos por ordem decrescente da atividade da seguinte forma: extrato foliar AcOEt ( $IC_{50} = 73 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $r^2 = 0,9955$ ) > extrato foliar MeOH ( $IC_{50} = 190 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $r^2 = 0,9988$ ) > extrato AcOEt de caules ( $IC_{50} = 240 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $r^2 = 0,9994$ ) > extrato AcOEt de raiz ( $IC_{50} = 720 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $r^2 = 0,9983$ ) > extrato MeOH de raiz ( $IC_{50} = 1520 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $r^2 = 0,9627$ ) > extrato MeOH de caules ( $IC_{50} = 3670 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $r^2 = 0,9654$ ). A partir dos valores de  $IC_{50}$  foi possível observar que os extratos foliares AcOEt e MeOH, e o extrato AcOEt de caules foram os mais ativos. As diferenças nos perfis de atividade e a semelhança entre os extratos foliares AcOEt e MeOH sugerem que os metabolitos mais ativos possuem

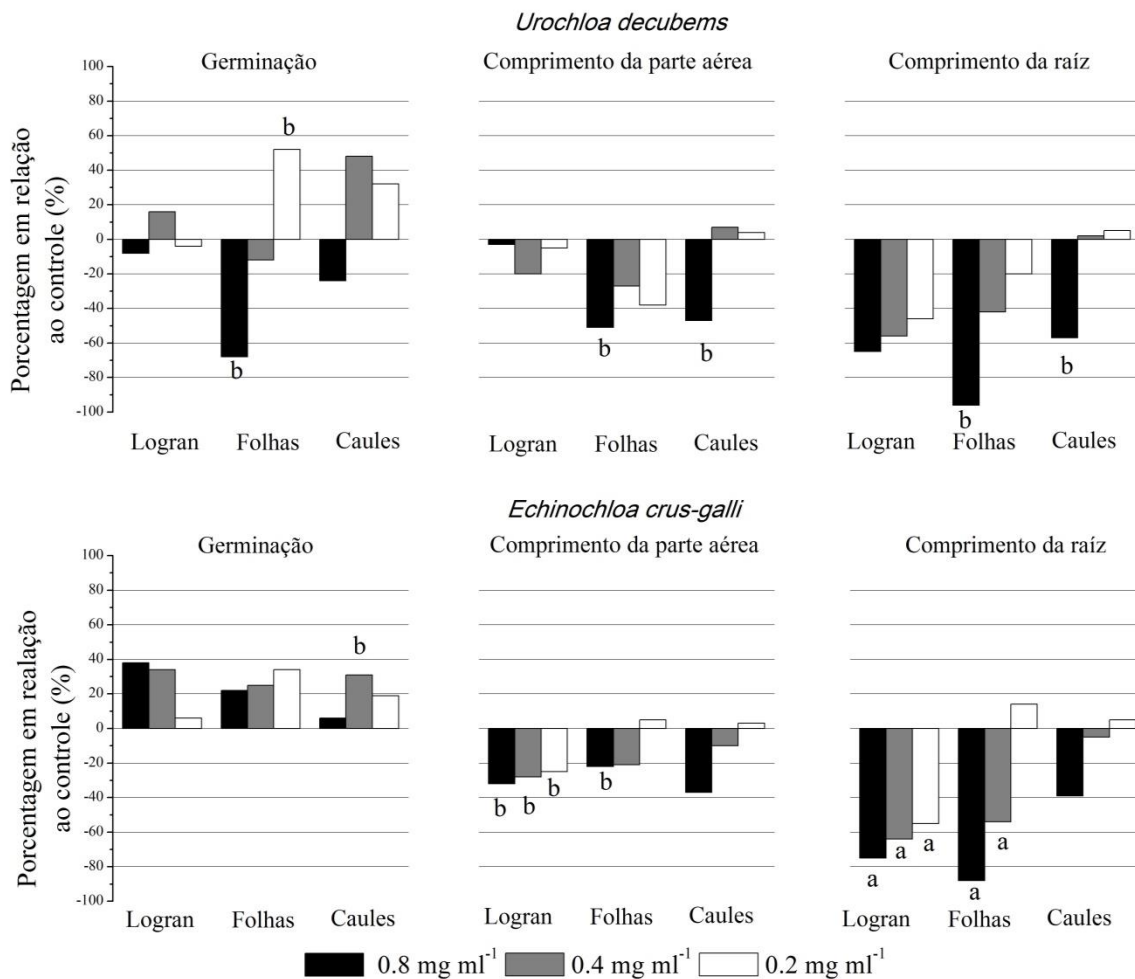
polaridade intermediária. O extrato foliar AcOEt mostrou um perfil de atividade mais consistente com a diluição, quando comparado com o extrato foliar MeOH. Portanto, os extratos de folhas e caules de AcOEt foram selecionados e utilizados em um bioensaio de fitotoxicidade, utilizando as mesmas concentrações descritas acima.

As espécies-alvo padrão (STS) utilizadas no bioensaio de fitotoxicidade foram alface, tomate, agrião e cebola, e as invasoras capim arroz e braquiária. O parâmetro mais afetado pelos extratos vegetais foi o comprimento das raízes. A sensibilidade da raiz à aleloquímicos pode ser explicada pelo fato de que as raízes são os primeiros órgãos da planta que emergem e que entram em contato direto com os extratos, que podem ser absorvidos diretamente por elas. Como consequência, as raízes são expostas a períodos de pico e concentrações de fitotoxinas (TANVEER et al., 2012).

A inibição no crescimento da raiz proporcionada pelo extrato foliar nas concentrações mais elevadas (0,8 e 0,4 mg.mL<sup>-1</sup>) foi igual ao herbicida Logran® em STS (FIGURA 2.2) e capim arroz (FIGURA 2.3), com valores acima de 80% de inibição na concentração mais alta, para a maioria das espécies. Além disso, o extrato foliar a 0,8 mg.mL<sup>-1</sup> foi mais ativo do que o herbicida sobre a germinação de sementes de tomate e agrião (FIGURA 2.2). A inibição proporcionada pelos extratos foliares nas duas concentrações mais elevadas sobre o comprimento da parte aérea de tomate, cebola e agrião, foram semelhantes aos obtidos com o herbicida (FIGURA 2.2). Por outro lado, o extrato de caule proporcionou inibição semelhante ao herbicida sobre o comprimento da parte aérea de tomate, cebola e agrião e sobre o comprimento da raiz de tomate e cebola (FIGURA 2.2). A germinação das espécies invasoras não foi afetada pelos extratos ou pelo herbicida, e não foi observada atividade significativa sobre os comprimentos de parte aérea e raiz de braquiária (FIGURA 2.3).



**Figura 2.2** Efeito do herbicida Logran® e extrato acetato de etila (AcOEt) de folhas e caules de *Tithonia diversifolia* em espécies alvo padrão *Lycopersicon esculentum* Will. (tomate), *Allium cepa* L. (cebola), *Lactuca sativa* L. (alface) e *Lepidium sativum* L. (agrião). Valores são expressos como porcentagem em relação ao controle. Nível de significância de  $0,01 < P < 0,05$  (b) quando for significativo, ou  $P < 0,01$  (a), quando for altamente significativo, de acordo com o teste de Welch.



**Figura 2.3** Efeito do herbicida Logran® e extrato acetato de etila (AcOEt) de folhas e caules de *Tithonia diversifolia* em espécies invasoras, *Echinochloa crus-galli* L. (capim arroz) e a *Urochloa decumbens* (Stapf) RD Webster (braquiária). Valores são expressos como porcentagem em relação ao controle. Nível de significância de  $0,01 < P < 0,05$  (b) quando for significativo, ou  $P < 0,01$  (a), quando for altamente significativo, de acordo com o teste de Welch.

Estes resultados mostram que os extratos de *T. diversifolia* possuem atividade fitotóxica sobre STS e espécies invasoras. O isolamento e a identificação dos compostos, bem como a avaliação de sua bioatividade, proporciona uma melhor compreensão da habilidade das plantas invasoras em tornarem-se dominante e, portanto, facilita a descoberta de novas ferramentas para o manejo culturas agrícolas.



O extrato foliar AcOEt foi selecionado para continuar o estudo de bioprospecção uma vez que foi o extrato mais ativo nos bioensaios realizados. O material foliar remanescente (1,8 kg), livre de hidrocarbonetos e lipídios, foi extraído com AcOEt e a clorofila foi removida, gerando 24,30 g de material em quatro frações livres de clorofila: A (3,8306 g), B (10,7661 g), C (3,8310 g) e D (5,8751 g). Estas frações foram submetidas à cromatografia em coluna, de sílica gel, utilizando como eluentes misturas de hexano / acetona de polaridade crescente. Este processo originou as subfrações (A) A1, A2 e A4; (B) B1, B2, B3 e B4; (C) C3, C4, C5, C6 e C8. Essas subfrações foram purificadas e seus aleloquímicos foram identificados.

A separação cromatográfica das subfracções levou ao isolamento de 14 compostos: 12 lactonas sesquiterpênicas (**1-12**), um secosesquiterpeno (**13**), e um diterpeno (**14**). Os compostos isolados **1-3** e **6-14** foram identificados por comparação dos seus dados espectroscópicos de NMR -  $^1\text{H}$ , NMR -  $^{13}\text{C}$ , IR e MS com os relatados na literatura para tagitinina F-3-*O*-metileter (**1**) (ZDERO; BOHLMANN; MÜLLER, 1987), 3-metoxitirofundina (**2**) (SCHUSTER et al., 1992), tirofundina (**3**) (HERZ; SHARMA, 1975), 1 $\beta$ -metoxidiversifolina (**6**) (ZDERO; BOHLMANN; MÜLLER, 1987) (ver ANEXO 3, pg. 109), tagitinina A (**7**) (BARUAH et al., 1979) (ver ANEXO 2, pg. 108), tagitinina C (**8**) (BARUAH et al., 1979) (ver ANEXO 1, pg. 107), 3 $\beta$ -acetoxi-8 $\beta$ -isobutiriloxireinosina (**9**) (HERZ; SHARMA, 1975), 3 $\beta$ -acetoxitithifolina (**10**) (SCHUSTER et al., 1992), 3 $\alpha$ -acetoxicostunolideo (**11**) (ORTEGA; MALDONADO, 1998), 8 $\beta$ -isobutiriloxi-cumambranolideo (**12**) (KUO; CHEN, 1998), 2-formil-4-hidroxi-4 $\alpha$ -metil-3-(3-oxobutil) ácido ciclohexanoacético (**13**) (BORDOLOI; BARUA; GHOSH, 1996) e (2*E*,6*E*,10*E*)-3-(hidroximetil)-7,11,15-trimetilhexadeca-2,6,10,15-tetraen-1,14-diol (**14**) (PEREZ; ORTEGA; DE VIVAR, 1988) (FIGURA 2.4). O composto **11** está sendo relatado pela primeira vez em *T. diversifolia*.

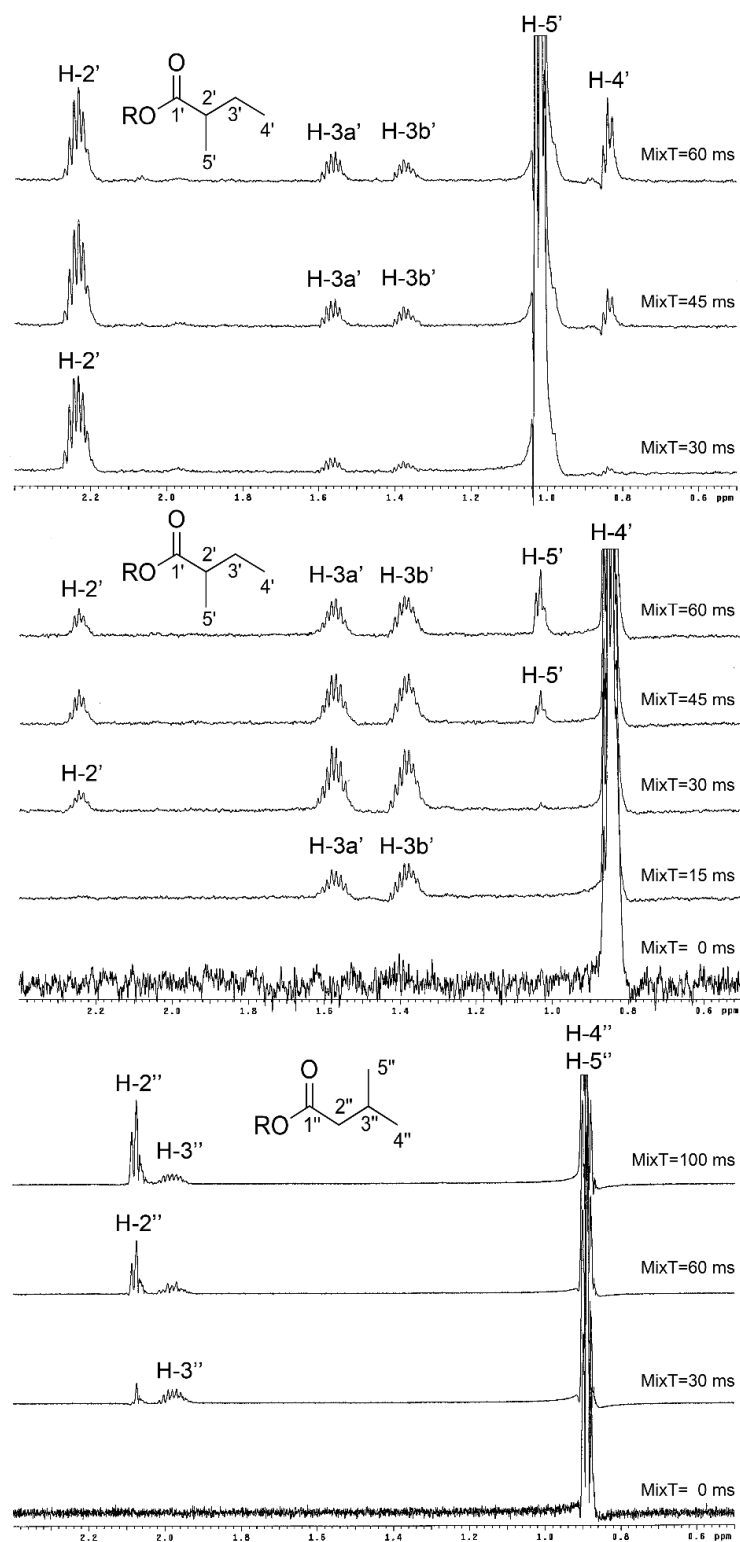


Os compostos **4** e **5** foram isolados a partir da fração C3.3, aparentemente como um composto único, após sucessivas purificações utilizando técnicas de HPLC. No entanto, os espectros de NMR  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (ver ANEXOS 4 a 7, pg. 110-113) mostraram que se tratava de uma mistura de duas lactonas sesquiterpênicas, em uma proporção de 3:2.

A espectroscopia de massa de alta resolução (+)-HRESITOFMS (*high-resolution electrospray-ionization time-of-flight mass spectrometry*) mostrou dois sinais a  $m/z$  367,2116 e 389,1938 de acordo com os adutos  $[\text{M} + \text{H}]^+$  e  $[\text{M} + \text{H} + \text{Na}]^+$ , que são compatíveis com a presença de um único composto, e os dados de TOF MS ES<sup>-</sup> mostraram outros sinais a  $m/z$  365.1976 e 389.1914 correspondentes a  $[\text{M} - \text{H}]^-$  e  $[\text{M} - \text{H} + \text{Na}]^-$ . Estes picos são compatíveis com a fórmula molecular  $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_6$ , que deve corresponder com os dois compostos isômeros.

Os espectros NMR  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  continham sinais semelhantes àqueles do tirotundina **3** (HERZ; SHARMA, 1975), exceto pela ausência dos sinais correspondentes à cadeia lateral do isobutiroil éster em C-8. Os espectros continham sinais de duas cadeias diferentes e, acredita-se que estes correspondem a dois compostos diferentes. Não foi possível identificar por COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  qual sinal correspondia com qual cadeia lateral, uma vez que os sinais eram muito próximos uns dos outros. No entanto, o espectro TOCSY 1D mostrou-se mais informativo e permitiu a determinação exata dos deslocamentos químicos dos sinais de cada cadeia lateral do éster. Sinais correspondentes a grupos metil de ambas as cadeias foram excitados pela técnica de Correlação Espectroscópica Total (TOCSY 1D). Estes sinais foram selecionados uma vez que estavam mais protegidos que os outros.

O procedimento conhecido como "array-TOCSY", com valores de tempo de pulso entre 0,010 e 0,15 segundos, forneceram diferentes subspectros (FIGURA 2.5). O aumento no valor do tempo de pulso nos permitiu ver uma maior distância de acoplamento em sistemas de spins. Cada próton da cadeia lateral das lactonas sesquiterpênicas foi atribuído (FIGURA 2.5). Começando com o próton do grupo metil a  $\delta$  0,83 (H-4'), correlações à  $\delta$  1,38 (H-3'a),  $\delta$  1,58 (H-3'b),  $\delta$  1,02 (H-5') e  $\delta$  2,22 (H-2'), no espectro TOCSY 1D, foram observadas, e estes resultados são consistentes com um 2-metilbutiroil éster (ZDERO; BOHLMANN; MÜLLER, 1987) (TABELA 2.1). Da mesma forma, as correlações no subspectro TOCSY 1D foram obtidas por excitação seletiva dos prótons do grupo metil a  $\delta$  0,86 e  $\delta$  0,87 (H-4", H-5") a partir do outro composto, e a ligação estabelecida com sinais a  $\delta$  1,95 (H-3") e  $\delta$  2,06 (H-2") corresponde a uma cadeia isovaleroil (SCHUSTER et al., 1992) (TABELA 2.1).



**Figura 2.5** Espectro TOCSY 1D NMR de sinais correspondentes a cadeia lateral do éster das frações contendo os compostos **4** e **5** (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

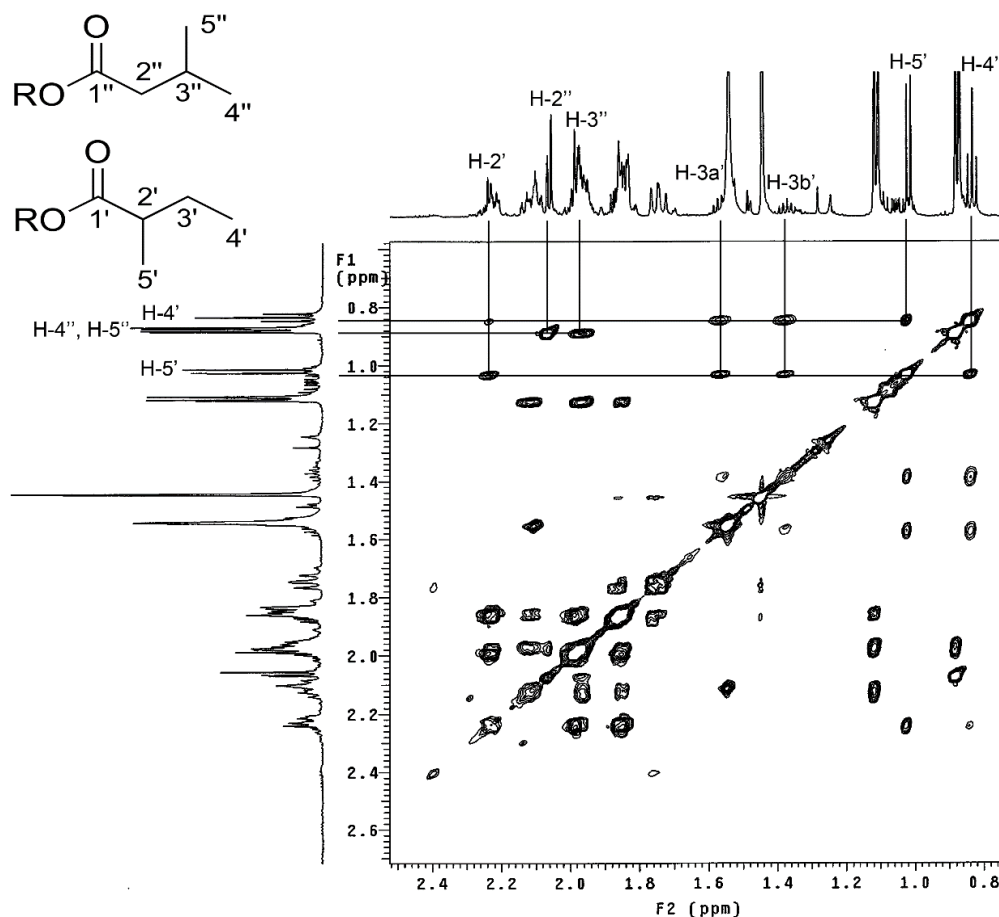
**Tabela 2.1** Dados espectroscópicos de  $^1\text{H}$  NMR (600MHz) e  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  para os compostos **4** e **5**.

Posição	$\delta_{\text{C}}$ tipo	$\delta_{\text{H}}$ (J em Hz)	HMBC
1	38.74, $\text{CH}_2$	2.22, m ; 1.97, m	C-2, C-3, C-9, C-10
2	38.17 <sup>*</sup> ; 38.15 <sup>*</sup> , $\text{CH}_2$	1.85 m	C-1, C-3
3	108.77 <sup>*</sup> ; 108.76 <sup>*</sup> , C		
4	43.23 <sup>*</sup> ; 43.22 <sup>*</sup> , CH	1.98, d (7)	C-2, C-3, C-5, C-6
5	38.05 <sup>*</sup> ; 38.03 <sup>*</sup> , $\text{CH}_2$	2.11, ddd (1.5, 7, 9.3); 1.84, ddd (1.5, 7, 9.3)	C-3, C-4, C-6, C-7, C-15
6	81.18 <sup>*</sup> ; 81.14 <sup>*</sup> ; CH	4.53, ddd (1.5, 6.5, 9.3)	C-4, C-7, C-8
7	47.72 <sup>*</sup> ; 47.59 <sup>*</sup> , CH	4.06, dddd (2.9, 3.4, 4.1, 6.5)	
8	69.80 <sup>*</sup> ; 69.55 <sup>*</sup> , CH	5.54, ddd (4.1, 4.8, 11.1)	C-6, C-7
9	42.11 <sup>*</sup> ; 42.08 <sup>*</sup> , $\text{CH}_2$	1.85, dd (4.8, 14.7); 1.74, dd (11.1, 14.7)	C-1, C-7, C-8, C-10, C14
10	80.19; 80.18, C		
11	136.93 <sup>*</sup> ; 137.00 <sup>*</sup> , C		
12	169.39, C		
13	121.58 <sup>*</sup> ; 121.55 <sup>*</sup> , $\text{CH}_2$	6.25, d (2.9); 5.52, d (3.4)	C-7, C-11, C-12
14	26.86 <sup>*</sup> ; 26.81 <sup>*</sup> , $\text{CH}_3$	1.44, s	C-1, C-9, C-10
15	18.56 <sup>*</sup> ; 18.54 <sup>*</sup> , $\text{CH}_3$	1.10, d (7)	C-3, C-4, C-5
2-metilbutirol			
1'	175.80, C		
2'	41.16, CH	2.22, tq (7)	C-1', C-3', C-4', C-5'
3'	26.56, $\text{CH}_2$	1.38, dq (7); 1.58, dq (7)	C-1', C-2', C-4', C-5'
4'	11.60, $\text{CH}_3$	0.83, t (7)	C-2', C-3'
5'	16.86, $\text{CH}_3$	1.02, d (7)	C-2', C-3'
isovaleroil			
1''	172.19, C		
2''	43.34, $\text{CH}_2$	2.06, dd (15, 7)	C-1'', C-3'', C-4'', C-5''
3''	25.63, CH	1.95, m	C-1'', C-2'', C-4'', C-5''
4''	22.22, $\text{CH}_3$	0.86, d (7)	C-2'', C-3'', C-5''
5''	22.34, $\text{CH}_3$	0.87, d (7)	C-2'', C-3'', C-4''

\* Atribuições de  $^{13}\text{C}$  dos compostos **4** e **5** podem ser trocados entre si.

zTOCSY é uma técnica de espectroscopia bidimensional de correlação-*J* total, para sistemas escalares de spin, acoplado com um filtro de zero-quantum para a supressão do

artefato. Assim, portanto, o experimento zTOCSY contém um filtro zero-quantum e, geralmente, resulta em espectros mais limpos do que os experimentos TOCSY. O espectro zTOCSY nos permitiu confirmar as sequências estruturais propostas acima. (FIGURA 2.6).

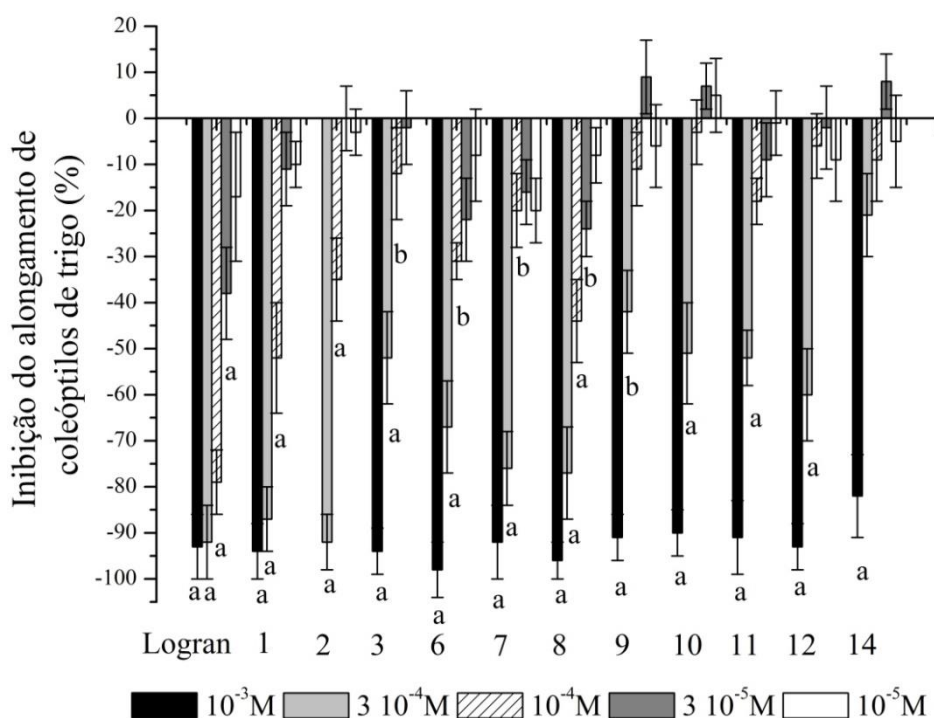


**Figura 2.6** Espectro de zTOCSY NMR e correlações dos sinais correspondentes a cadeia lateral do éster dos compostos **4** e **5** (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

A atribuição completa dos dados espectroscópicos  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para estas novas lactonas sesquiterpênicas é relatada com dados de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , gDQCOSY (ver ANEXO 8, pg. 114), HSQC (ver ANEXO 9, pg. 115), HMBC (ver ANEXO 10, pg. 116) e NOESY. Como resultado, a estrutura do composto **4** foi estabelecida como  $8\beta$ -*O*-(2-metilbutiroil)tirotundina e a estrutura do composto **5** foi estabelecida como  $8\beta$ -*O*-(isovaleroil)tirotundina. Nenhum destes dois compostos havia sido descritos anteriormente na literatura.

A bioatividade dos compostos **1-3**, **6-12**, e **14** foram testadas em bioensaios de coleótilos de trigo nas concentrações de  $10^{-3}$ M a  $10^{-5}$ M (exceto para o composto **2**, que tinha um limite de concentração de  $3 \times 10^{-4}$ M). O composto **13** não foi testado devido à baixa quantidade obtida. Os compostos **4** e **5** não foram testados pois foram obtidos como uma mistura.

Todos os compostos testados apresentaram elevada atividade inibidora no alongamento dos coleótilos de trigo na concentração mais elevada. Os compostos **1** (94%), **3** (94%), **6** (98%), **7** (91%), **8** (96%), e **12** (93%) apresentaram uma atividade semelhante ou superior que o herbicida comercial Logran® na concentração  $10^{-3}$ M (FIGURA 2.7). Os compostos **1-3**, **6-8** e **10-12** foram também ativos a uma concentração de  $3 \times 10^{-4}$ M, apresentando uma inibição acima de 50%. O composto **2** mostrou uma atividade semelhante ao herbicida na concentração  $3 \times 10^{-4}$ M, mas a sua atividade diminuiu a partir da concentração  $10^{-4}$ M.



**Figura 2.7** Efeito dos compostos Tagitinina F-3-O-metileter (**1**), 3-metoxitirofundina (**2**), tirofundina (**3**),  $1\beta$ -metoxidiversifolina (**6**), tagitinina A (**7**), tagitinina C (**8**),  $3\beta$ -acetoxi-8 $\beta$ -isobutiriloxireinosina (**9**),  $3\beta$ -acetoxitithifolina (**10**),  $3\alpha$ -acetoxicostunolideo (**11**),  $8\beta$ -isobutiriloxi-cumambranólideo (**12**), (2E,6E10E)-3-(hidroximetil)-7,11,15-trimetilhexadeca-2,6,10,15-tetraen-1,14-

diol (**14**) de *Tithonia diversifolia* na inibição do alongamento de coleótilos de trigo.

Os compostos com os melhores perfis de atividade no bioensaio de coleótilos de trigo foram **1**, **2**, **6**, **7** e **8**, pois apresentaram valores de inibição superiores a 65% na segunda concentração testada ( $3 \times 10^{-4} \text{M}$ ). Estes valores de atividade corroboraram com o cálculo dos valores de  $\text{IC}_{50}$  para todos os compostos. Os valores de  $\text{IC}_{50}$  foram calculados utilizando modelos de dose-resposta sigmoidal ou dose-resposta de inclinação variável. (TABELA 2.2).

**Tabela 2.2** Valores de  $\text{IC}_{50}$  calculados dos compostos **1–3**, **6–12** e **14**, usando um modelo sigmoidal dose-resposta variável slope.

Compostos	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	$r^2$
1	98.15	0.9953
2	125.3	0.9993
3	288.1	0.9993
6	177.5	0.9814
7	203.6	0.9395
8	113.0	0.9951
9	357.0	0.9530
10	283.7	0.9967
11	287.4	0.9971
12	265.0	0.9947
14	528.3	0.9877
Logran	38.69	0.9895

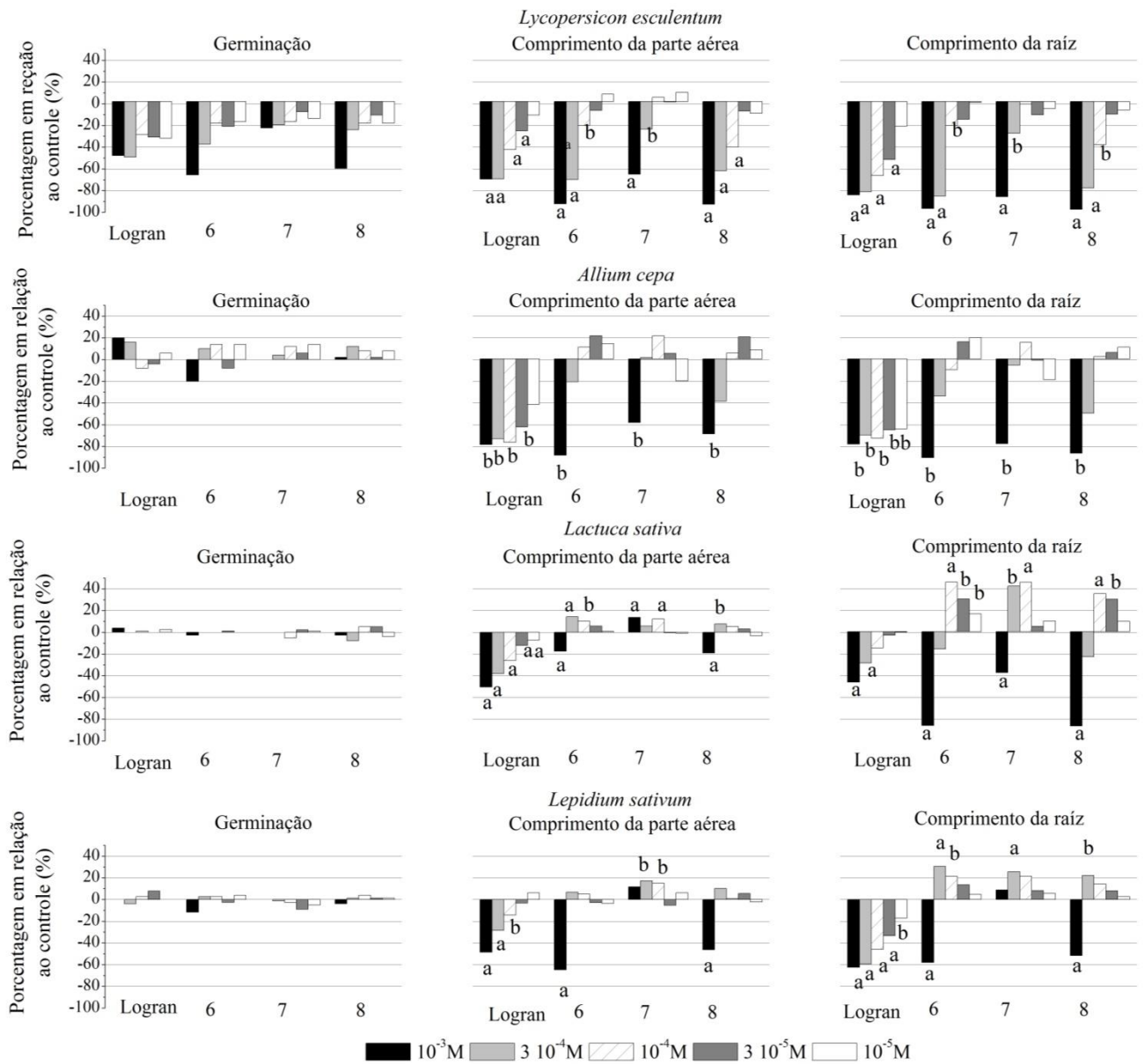
Os compostos **6** (4,82 g), **7** (4,17 g) e **8** (3,62 g) foram os compostos majoritários e representaram 20%, 17% e 15%, respectivamente, do extrato AcOEt (24,3 g) estudado. Esses valores representam 52% de todos os compostos deste extrato. Bioensaios de fitotoxicidade na germinação de sementes e crescimento de plântulas de STS e invasoras foram realizadas com os compostos **6** (1 $\beta$ -metoxidiversifolina), **7** (tagitinina A) e **8** (tagitinina C). Como foram obtidas pequenas quantidades dos compostos **1** e **2**, estes não foram avaliados neste bioensaio.

O parâmetro menos afetado foi a germinação. Não foram observadas diferenças significativas entre os compostos e o herbicida para as STS (FIGURA 2.8). Por outro lado,

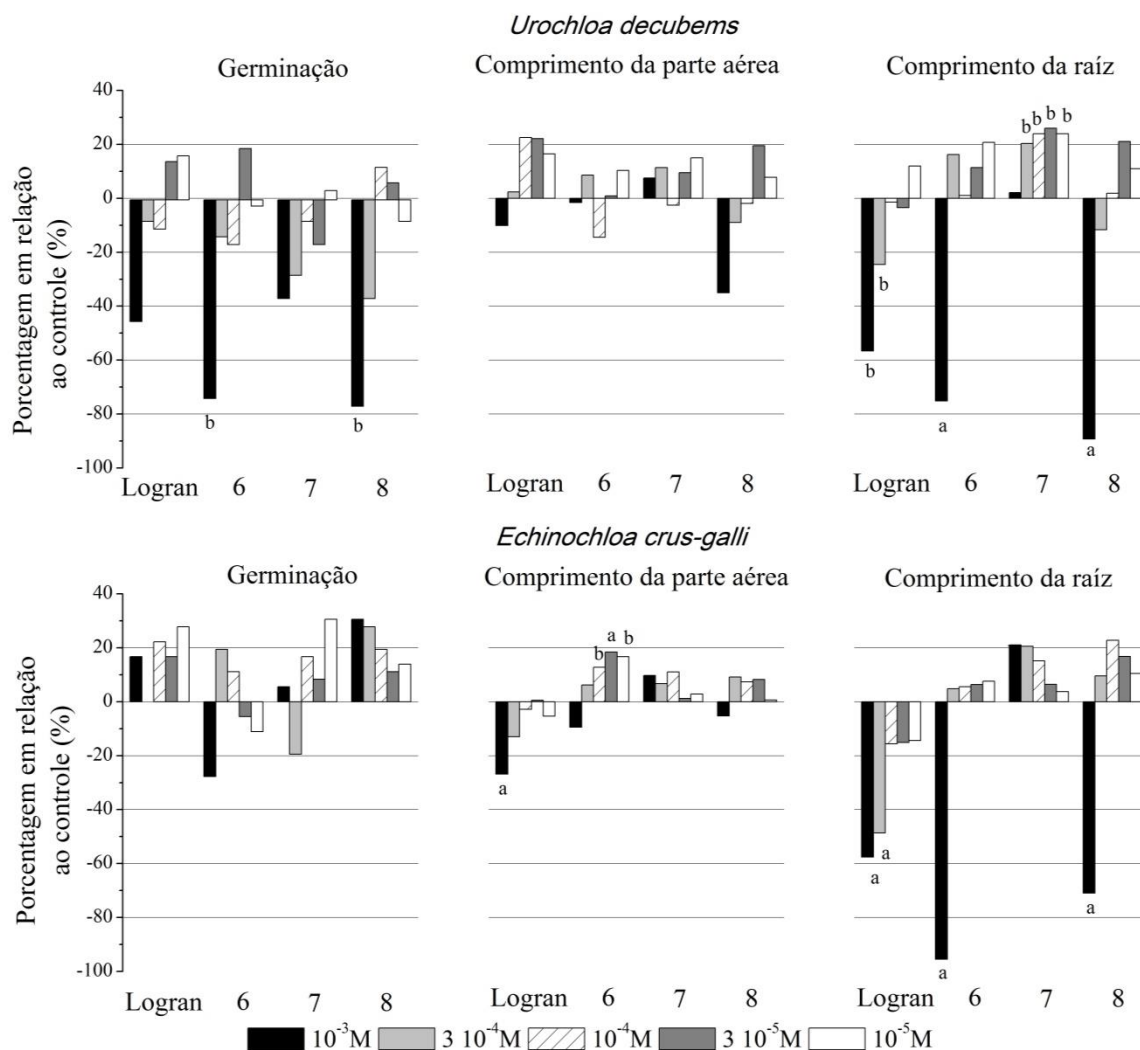


os compostos **6** e **8** mostraram uma inibição significativa (quase 80%) na germinação de sementes de braquiária e esta foi mais elevada do que a observada para o herbicida (FIGURA 2.9). Estes resultados sugerem uma possível seletividade e potencial de utilização destes compostos no controle biológico de braquiária, para aplicação em pré-emergência.

O comprimento da parte aérea só foi afetado pelos compostos na concentração mais alta e, na maioria dos casos, os valores de inibição foram iguais às do herbicida comercial. Os valores de inibição foram de 95% para o tomate na presença dos compostos **6** e **8**, 90% para a cebola na presença do composto **6**, e de 65% para o agrião na presença do composto **6** (FIGURA 2.8). O comprimento das raízes foi a variável mais afetado pelas aleloquímicos, principalmente, na concentração de  $10^{-3}$ M. Os compostos isolados foram mais fitotóxicos que o herbicida na maioria dos casos. O composto **6** foi mais ativo que o herbicida, a  $10^{-3}$ M, no comprimento da raiz de braquiária (FIGURA 2.9). Os compostos **6**, **7** e **8** foram ativos no comprimento da raiz de tomate (96, 85 e 97%, respectivamente) e cebola (90, 77 e 86%, respectivamente) e também mostraram atividade em alface e agrião (FIGURA 2.8). Estes compostos também foram ativos no comprimento radicular das espécies invasoras, com valores de inibição do crescimento das raízes de capim arroz e braquiária acima de 70%, superior ao valor obtido para o herbicida (FIGURA 2.9).



**Figura 2.8** Efeito dos compostos  $1\beta$ -metoxidiversifolina (6), tagitina A (7) e tagitina C (8) de *Tithonia diversifolia* no crescimento de *Lycopersicon esculentum* Will. (tomate), *Allium cepa* L. (cebola), *Lactuca sativa* L. (alface) e *Lepidium sativum* L. (agrião). Valores são expressos como porcentagem em relação ao controle. Níveis de significância  $0,01 < p < 0,05$  (b) ou  $p < 0,01$  (a) de acordo com o teste de Welch.



**Figura 2.9** Efeito dos compostos 1 $\beta$ -metoxidiversifolina (6), tagitinina A (7) e tagitinina C (8) de *Tithonia diversifolia* no crescimento de espécies invasoras, *Echinochloa crus-galli* L. (capim arroz) e a *Urochloa decubens* (Stapf) RD Webster (braquiária). Valores são expressos como porcentagem em relação ao controle. Níveis de significância  $0,01 < p < 0,05$  (b) ou  $p < 0,01$  (a) de acordo com o teste de Welch.

Os extratos e compostos testados foram ativos nas STS e espécies invasoras. O amplo espectro de atividade biológica mostrada pelas lactonas sesquiterpênicas significa que eles possuem potencial para a utilização tanto na agricultura quanto na medicina. De fato, esta classe de compostos já foi descrita como possuindo atividades anti-tumoral (LEE et al., 2003), citotóxicas (SCOTTI et al., 2007; CHUKWUJEKWU et al., 2009), anti-inflamatórias (YOUN et al., 2012), antimicrobianas (FORTUNA et al., 2011), antifúngicas

(PICKMAN, 1984; BARRERO et al., 2000), inibidoras da alimentação de insetos (CIS; NOWAK; KISIEL, 2006), além de propriedades alelopáticas (MACÍAS; GALINDO; MASSANET, 1992; MACÍAS et al., 1996).

Em adição à sua atividade fitotóxica, a lactona sesquiterpênica tagitinina A foi relatada possuindo propriedades inseticidas (DUTTA et al., 1986) e a tagitinina C foi relatada por possuir atividade antiplasmódica (RIAL et al., 2014).

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que os extratos e compostos puros apresentaram perfis de atividade semelhantes nos bioensaios de coleóptilos e crescimento de plântulas. As quantidades em que os compostos naturais são sintetizados e as suas atividades biológicas, incluindo a fitotoxicidade, sugerem que estes podem estar envolvidos no mecanismo de defesa da planta (RIAL et al., 2014) e este fato também apoia a nossa hipótese de que *T. diversifolia* possui efeitos fitotóxicos e pode inibir o desenvolvimento de outras plantas. Estes compostos seriam os aleloquímicos responsáveis pela atividade apresentada por essa planta. O alto potencial de *T. diversifolia* pode ser explorado para o controle biológico de espécies invasoras e também como modelo de herbicidas naturais para o manejo ecológico de culturas agrícolas.

### **Agradecimentos**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) (Projeto AGL2013-42238-R) e Consejería de Economía Innovación y Ciencia, Junta de Andalucía (Projeto DP12-TEP-725), pelo apoio financeiro aos autores.

### **Referências bibliográficas**

ALLSTADT, A. et al. Interference competition and invasion: spatial structure, novel weapons and resistance zones. **Journal of Theoretical Biology**, v. 306, p. 46-60, Aug 7 2012.

AN, M. Mathematical modelling of dose-response relationship (hormesis) in allelopathy and its application. **Nonlinearity in Biology, Toxicology, Medicine**, v. 3, n. 2, p. 153-72, Apr 2005.

AYENI, A.; LORDBANJOU, D.; MAJEK, B. *Tithonia diversifolia* (Mexican sunflower) in South-western Nigeria: occurrence and growth habit. **Weed Research**, v. 37, n. 6, p. 443-449, 1997.

BARRERO, A. F. et al. New Sources and antifungal activity of sesquiterpene lactones. **Fitoterapia**, v. 71, n. 1, p. 60-64, 2000.

BARUAH, N. C. et al. Germination and growth Inhibitory sesquiterpene lactones and a flavone from *Tithonia diversifolia*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 1, p. 29-36, 1994.

BARUAH, N. C. et al. Sesquiterpene lactones of *Tithonia diversifolia*. Stereochemistry of the tagitinins and related compounds. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 44, n. 11, p. 1831-1835, 1979.

BORDOLOI, M.; BARUA, N. C.; GHOSH, A. C. An artemisinic acid analogue from *Tithonia diversifolia*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 2, p. 557-559, 1996.

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

CASTELLANO SÁNCHEZ, D. Optimización de bioensayos alelopáticos: aplicación en la búsqueda de herbicidas naturales. **Dissertation Abstracts International**, v. 63, p. 0610, 2002.

CHAGAS-PAULA, D. A. et al. Ethnobotany, chemistry, and biological activities of the genus *Tithonia* (Asteraceae). **Chemistry & Biodiversity**, v. 9, n. 2, p. 210-235, 2012.

CHUKWUJEKWU, J. C. et al. Antiplasmodial and cytotoxic activity of isolated sesquiterpene lactones from the acetone leaf extract of *Vernonia colorata*. **South African Journal of Botany**, v. 75, n. 1, p. 176-179, 2009.

CIS, J.; NOWAK, G.; KISIEL, W. Antifeedant properties and chemotaxonomic implications of sesquiterpene lactones and syringin from *Rhaponticum pulchrum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, n. 12, p. 862-867, 2006.

DAYAN, F. E. et al. Comparative phytotoxicity of artemisinin and several sesquiterpene analogues. **Phytochemistry**, v. 50, n. 4, p. 607-614, 1999.

DRAKE, J. A.; MOONEY, H. A.; DI CASTRI, F. **Biological Invasions: A global perspective**. p.525. New York: John Wiley & Sons, 1989.

DUKE, S. et al. Natural products as sources of herbicides: current status and future trends. **Weed Research Oxford**, v. 40, n. 1, p. 99-112, 2000.

DUTTA, P. et al. Feeding deterrents for *Philosamia ricini* (*Samia cynthia* subsp. *Ricini*) from *Tithonia diversifolia*. **Phytoparasitica**, v. 14, n. 1, p. 77-80, 1986.

FERREIRA, A. Interferência: competição e alelopatia. FERREIRA, A. G; BORGHETTI, F. **Germinação**: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, p. 251-262, 2004.

FORTUNA, A. M. et al. Antimicrobial activities of sesquiterpene lactones and inositol derivatives from *Hymenoxys robusta*. **Phytochemistry**, v. 72, n. 18, p. 2413-8, Dec 2011.

GUREVITCH, J.; PADILLA, D. K. Are Invasive species a major cause of extinctions? **Trends in Ecology & Evolution**, v. 19, n. 9, p. 470-4, Sep 2004.

HANCOCK, C.; BARLOW, H.; LACEY, H. The east malling coleoptile straight growth test method. **Journal of Experimental Botany**, v.15, n. 43, p. 166-176, 1964.

HEINRICH, M. et al. ethnopharmacology of mexican Asteraceae (Compositae). **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 38, n. 1, p. 539-565, 1998.

HERZ, W.; SHARMA, R. P. Trans-1, 2-cis-4, 5-germacradienolide and other new germacranolides from *Tithonia* species. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 40, n. 21, p. 3118-3123, 1975.

JOSE, S. et al. **Invasive Plant Ecology**. p. 302. CRC Press, 2013.

KUO, Y. H.; CHEN, C. H. Sesquiterpenes from the leaves of *Tithonia diversifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 6, p. 827-828, 1998.

LEE, S. H. et al. Anti-tumor activity of the farnesyl-protein transferase inhibitors arteminolides, isolated from Artemisa. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 21, p. 4545-4549, 2003.

LIN, H. R. Identification of liver X receptor and farnesoid X receptor dual agonists from *Tithonia diversifolia*. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, n. 7, p. 3270-3281, 2012.

MACÍAS, F. A. et al. Sesquiterpene lactones with potential use as natural herbicide models. 2. Guaianolides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 11, p. 5288-5296, 2000.

MACÍAS, F. A.; GALINDO, J. C. G.; MASSANET, G. M. Potential allelopathic activity of several sesquiterpene lactone models. **Phytochemistry**, v. 31, n. 6, p. 1969-1977, 1992.

MACÍAS, F. A. et al. Plant biocommunicators: their phytotoxicity, degradation Studies and potential use as herbicide models. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, n. 1, p. 179-194, 2007.

MACÍAS, F. A. et al. Potential allelopathic of sesquiterpene lactones from sunflower leaves. **Phytochemistry**, v. 43, n. 6, p. 1205-1215, 1996.

MARTIN ANDRÉS, A.; LUNA DEL CASTILLO, J. D. D. Bioestadística para las Ciencias de la Salud. **Norma**: Madrid, Spain, 1990.

NITSCH, J.; NITSCH, C. Studies on the growth of coleoptile and first internode sections. A new, sensitive, straight-growth test for auxins. **Plant Physiology**, v. 31, n. 2, p. 94, 1956.

ORTEGA, A.; MALDONADO, R. A. A Costic acid guaianyl ester and other constituents of *Podachaenium eminens*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 4, p. 1085-1090, 1998.

OTUSANYA, O.; ILORI, O.; ADELUSI, A. Allelopathic effect of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray on germination and growth of *Amaranthus cruentus*. **Research Journal of Environmental Sciences**, v. 1, n. 6, p. 285-293, 2007.

OTUSANYA, O.; SOKAN-ADEAGA, A.; ILORI, O. Allelopathic effect of the root exudates of *Tithonia diversifolia* on the germination, growth and chlorophyll accumulation of *Amaranthus dubius* L. and *Solanum melongena* L. **Research Journal of Botany**, v. 9, n. 2, 2014.

PEREZ, A. L.; ORTEGA, A.; DE VIVAR, A. R. An acyclic diterpene and sesquiterpene lactones from *Tithonia pedunculata*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 12, p. 3897-3901, 1988.

PICKMAN, A. K. Antifungal activity of sesquiterpene lactones. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 12, n. 1, p. 13-18, 1984.

PIMENTEL, D. et al. Benefits and risks of genetic engineering in agriculture. **BioScience**, p. 606-614, 1989.

RIAL, C. et al. Phytotoxicity of cardoon (*Cynara cardunculus*) allelochemicals on standard target species and weeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 28, p. 6699-706, Jul 16 2014.

RICE, E. L. **Allelopathy**. p.422. Academic press, 1984.

RIZVI, S. J. H. et al. A discipline called allelopathy. In: RIZVI, S. J. H.; RIZVI, V. (Ed.). **Allelopathy**: Springer Netherlands, 1992. cap. 1, p.1-10.

SCHUSTER, A. et al. Sesquiterpene lactones from two *Tithonia* species. **Phytochemistry**, v. 31, n. 9, p. 3139-3141, 1992.

SCOTTI, M. T. et al. Quantitative structure-activity relationship of sesquiterpene lactones with cytotoxic activity. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 8, p. 2927-34, 2007.

SEAMAN, F. C. Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the Asteraceae. **The Botanical Review**, v. 48, n. 2, p. 121-594, 1982.

SOUZA, L. S. et al. Efeitos das faixas de controle do capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) no desenvolvimento inicial e na produtividade do cafeeiro (*Coffea arabica*). **Planta Daninha**, v. 24, p. 715-720, 2006.

TAIWO, L.; MAKINDE, J. Influence of water extract of Mexican sunflower (*Tithonia diversifolia*) on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*). **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 355-360, 2005.

TALBERT, R. E.; BURGOS, N. R. History and management of herbicide-resistant barnyardgrass (*Echinochloa Crus-galli*) in Arkansas rice. **Weed Technology**, v. 21, n. 2, p. 324-331, 2007.

TANVEER, A. et al. Allelopathic effects of aqueous and organic fractions of *Euphorbia dracunculoides* Lam. on germination and seedling growth of chickpea and wheat. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 72, n. 4, p. 495-501, 2012.

TONGMA, S.; KOBAYASHI, K.; USUI, K. Allelopathic activity and movement of water leachate from Mexican sunflower (*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray) leaves in soil. **Journal of Weed Science and Technology**, v. 44, n. 1, p. 51-58, 1999.

TONGMA, S.; KOBAYASHI, K.; USUI, K. Allelopathic activity of Mexican sunflower (*Tithonia diversifolia*) in soil. **Weed Science**, p. 432-437, 1998.

\_\_\_\_\_. Allelopathic activity of Mexican sunflower [*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray] in soil under natural field conditions and different moisture conditions. **Weed Biology and Management**, v. 1, n. 2, p. 115-119, 2001.

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.

YOUN, U. J. et al. Anti-inflammatory sesquiterpene lactones from the flower of *Vernonia cinerea*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letter**, v. 22, n. 17, p. 5559-62, 2012.

ZDERO, C.; BOHLMANN, F.; MÜLLER, M. Sesquiterpene lactones and other constituents from *Eriocephalus* species. **Phytochemistry**, v. 26, n. 10, p. 2763-2775, 1987.

ZHAI, H.-L. et al. A New Chromene glycoside from *Tithonia diversifolia*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 46, n. 2, p. 198-200, 2010/05/01 2010.

ZHAO, G.-J. et al. Chemical constituents from *Tithonia diversifolia* and their chemotaxonomic significance. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 44, p. 250-254, 2012.



## CAPÍTULO 3

**ATIVIDADE INSETICIDA DE FRAÇÕES E  
COMPOSTOS ISOLADOS DE FOLHAS DE  
*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray  
CONTRA *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)**

**Resumo** A busca por métodos de controle de insetos pragas baseados em produtos naturais têm se tornado uma alternativa ao controle convencional. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade das frações do extrato acetato de etila de folhas de *Tithonia diversifolia* e compostos isolados destas frações sobre *Artemia salina* e a atividade inseticida destas frações e compostos isolados, sobre *Spodoptera frugiperda*. Foram avaliados a toxicidade das frações A (20% MeOH), B (40% MeOH), C (60% MeOH), D (80% MeOH) e E (100% MeOH) e dos compostos isolados tagitinina A, tagitinina C e 1 $\beta$ -metoxidiversifolina, isolados da fração A, a 1000, 500, 250, 150  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  sobre *A. salina*. As frações e compostos, dissolvidos em DMSO, foram adicionados em microplacas contendo *A. salina* e após 24 h de incubação a 25°C foi realizada a contagem de indivíduos mortos. A maioria das frações e compostos testados mostraram toxicidade sobre *A. salina*. A fração C mostrou-se mais tóxica ( $\text{CL}_{50} = 308,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), seguida pela fração B ( $\text{CL}_{50} = 439,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e pela fração A ( $\text{CL}_{50} = 481,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Os menores valores de  $\text{CL}_{50}$  foram observados para os compostos 1 $\beta$ -metoxidiversifolina (185,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e tagitinina C (293,8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). As frações e compostos mais ativos foram testados posteriormente sobre *S. frugiperda*. Para tanto, as frações foram incorporadas à dieta artificial da lagarta a 100  $\text{mg.Kg}^{-1}$  e os compostos a 100, 50, 10 e 5 ppm. Larvas *S. frugiperda* foram adicionadas a tubos de ensaio contendo as dietas + extratos e as dietas controle (MeOH e branco, controles positivos). Foram avaliadas a duração das fases larval e pupal, peso das pupas e a mortalidade nas fases larval e pupal (%). Foi observada uma redução significativa na massa pupal da lagarta na presença da fração A comparada ao controle contendo apenas a dieta artificial (branco), indicando um efeito supressor da alimentação das lagartas causado por essa fração. As frações B e C proporcionaram diferenças significativas na fase larval da lagarta, sendo que, este último, aumentou a duração da fase larval em 2,03 dias. Na presença dos compostos, principalmente o 1 $\beta$ -metoxidiversifolina, a duração da fase larval foi reduzida em relação aos dois controles positivos. Os demais parâmetros avaliados não foram afetados pelos compostos testados.

**Palavras-chave** Lagarta-do-cartucho do milho, *Artemia salina*, extrato foliar, inseticidas naturais, lactonas sesquiterpênicas.

**Insecticidal activity of fractions and compounds isolated from leaves of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray against *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)**

**Abstract** The search for insect pest control methods based on natural products has become an alternative to conventional control. Therefore, this work aimed to evaluate the toxicity of the ethyl acetate fractions of *Tithonia diversifolia* leaf extract on *Artemia salina* and their insecticidal effect against the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. We evaluated the toxicity of fractions A (20% MeOH), B (40% MeOH), C (60% MeOH) and D (80% MeOH) and E (100% MeOH) and the compounds tagitinin A, tagitinin C and 1 $\beta$ -methoxydiversifolin, isolated from fraction A, at the concentrations 1000, 500, 250, 150  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  on *Artemia salina*. The EtOAc fractions and compounds, dissolved in DMSO, were added on microplate containing *A. salina* and after 24 h of incubation at 25 ° C were performed to estimate the percentage of death. Most tested fractions and compounds showed toxicity to *A. salina*. Fraction C was more toxic ( $\text{LC}_{50} = 308.8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), followed by the fraction B ( $\text{LC}_{50} = 439.1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) and the fraction A ( $\text{LC}_{50} = 481.2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). The lowest  $\text{LC}_{50}$  values were obtained for compounds 1 $\beta$ -methoxydiversifolin ( $185.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) and tagitinin C ( $293.8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). The most active fractions and compounds were further tested on *S. frugiperda*. Therefore, the fractions were incorporated in artificial caterpillar food at 100  $\text{mg.Kg}^{-1}$  and the compounds at 100, 50, 10 and 5 ppm. *S. frugiperda* larvae were added to test tubes containing artificial food + extracts or the controls (MeOH or only the artificial food, as positive controls). We evaluated the length of larval and pupal stages, pupal weight and mortality in the larval and pupal stages (%). A significant reduction was observed in the caterpillar pupal mass at the fraction A, compared to the control containing only the artificial food, indicating a suppressive effect of caterpillars feeding caused by this fraction. Fractions B and C yielded a significant difference in the larval caterpillar stage, and the fraction C increased the duration of larval stage at 2.03 days. In the presence of the compounds, especially 1 $\beta$ -methoxydiversifolina, the larval stage was reduced compared to the two positive controls. Other parameters were not affected by the tested compounds.

**Keywords** Fall armyworm, *Artemia salina*, leaf extract, natural insecticides, sesquiterpene lactones.

## Introdução

Produtos naturais são uma fonte importante de modelos para o desenvolvimento de bioinseticidas (GERWICK; SPARKS, 2014). Inseticidas naturais ou bioinseticidas incluem substâncias químicas derivadas de plantas ou microrganismos (BETTIOL, 2011). O termo produtos naturais refere-se, na maioria das vezes, a metabólitos secundários, que são compostos formados por moléculas de pequena massa molecular e que geralmente não são essenciais aos processos básicos do metabolismo das plantas (DIXON, 2001). Esses compostos podem servir como um tipo de defesa química produzida pela planta em resposta a um estresse. Eles são responsáveis pela transmissão de informações entre a planta e o meio ambiente, e incluem interações planta-planta, planta-inseto e planta-microorganismo (OLIVEIROS-BASTIDAS, 2008).

Compostos do metabolismo secundário das plantas estão envolvidos na defesa contra o ataque de insetos herbívoros e atuam como toxinas, repelentes de insetos ou inibidores da alimentação. As plantas produzem duas estratégias de defesa em resposta a herbivoria, a constitutiva, por meio da toxicidade direta ou da redução da digestibilidade dos tecidos vegetais, e a induzida, pela produção de substâncias tóxicas sintetizadas mediante ao ataque de insetos (MELLO; SILVA-FILHO, 2002). Além disso, os insetos têm desenvolvido alguns mecanismos de sobrevivência às defesas das plantas como, por exemplo, (1) alimentar-se apenas das partes da planta que contêm pequenas quantidades de compostos tóxicos, evitando esses metabólitos; (2) desenvolver mecanismos que permitam uma excreção mais rápida das toxinas; (3) destoxificar os metabólitos vegetais por meio de vias metabólicas ou com a ajuda de microrganismos endossimbióticos; (4) tolerar os metabólitos ou (5) acumular, concentrar e modificar esses compostos para o seu próprio benefício (OPTIZ; MÜLLER, 2009).

*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (girassol mexicano) é um arbusto perene pertencente à família Asteraceae. Possui como centro de origem o México e América Central. Foi introduzida em muitos países pelo seu caráter medicinal e ornamental (ZHAI et al., 2010). É utilizada como adubo verde, pela sua capacidade de produção de biomassa e por suas folhas possuírem quantidades elevadas de nutrientes (RÍOS-KATO, 1992), e também no controle da erosão do solo (TONGMA; KOBAYASHI; USUI, 1999). No entanto, tornou-se um problema devido ao seu comportamento invasor em vários países.

Várias substâncias já foram isoladas de espécies de *Tithonia*, incluindo sesquiterpenos, flavonoides e diterpenos (ZHAO et al., 2012). Uma análise das frações ativas de *T. diversifolia* também revelou a presença de esteroides, triterpenos, lactonas sesquiterpênicas, cumarinas, taninos e saponinas (BAGNARELLO et al., 2009; MIRANDA et al., 2015).

Terpenos são a classe mais comum e estruturalmente diversa de produtos naturais (TAIZ; ZEIGER, 2009) e incluem, óleos essenciais, iridóides, ácido abscísico, giberelinas, esteroides, glicosídeos, saponinas e carotenoides. A unidade estrutural básica dos terpenos é determinada pelo número de unidades de isopreno, formado por cinco átomos de carbonos (SEAMAN, 1982). As lactonas sesquiterpênicas são terpenos formados por 15 átomos de carbono e possuem um anel de lactona acoplado. São compostos característicos da família Asteraceae e são uma importante classe de metabólitos secundários responsáveis por grande parte das suas atividades biológicas (SEAMAN, 1982).

As lactonas sesquiterpênicas possuem um papel importante na defesa das plantas contra insetos herbívoros e têm sido reportados como tóxicas ou inibidoras da alimentação de insetos (PICMAN, 1986; FRAGA, 2004). Burnett et al. (1974) observaram diferenças significativas na preferência alimentar de seis larvas de Lepidóptera e ainda constataram que a presença da lactona sesquiterpênica glaucolideo A reduziu a alimentação das larvas quando incorporada na dieta. Lactonas sesquiterpênicas isoladas de *T. diversifolia*, tagitinina A, tagitinina C e hispidulina, localizadas principalmente nos tricomas glandulares na face adaxial das folhas, também apresentaram atividade deterrente contra larvas de Lepidóptera (AMBRÓSIO et al., 2008; DUTTA et al., 1986).

A lagarta do cartucho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidóptera: Noctuidae) é uma das principais pragas de origem tropical e subtropical no Hemisfério Ocidental (SPARKS, 1979). Suas larvas alimentam-se de uma variedade de plantas, entre elas, milho, soja, trigo e algodão (GALLO et al., 2006). Atualmente, a forma mais comum para reduzir a população destes insetos é a aplicação de inseticidas químicos (HUANG et al., 2013), sendo os piretróides a classe mais utilizada (BULLANGPOTI et al., 2012).

Em 2011 as vendas de produtos químicos para o controle de pragas agrícolas, no Brasil, apresentaram um aumento de mais de 72%, sendo responsável por 1/5 do consumo mundial de agroquímicos (ASSAD, 2012). Entre os produtos químicos mais consumidos no Brasil, os inseticidas aparecem em segundo lugar, perdendo apenas para os herbicidas (BETTIOL, 2011).

A busca por métodos de controle de insetos pragas que sejam compatíveis ao meio ambiente têm se tornado uma alternativa ao controle convencional, devido aos problemas de ordem ambiental e na saúde humana causados pelo uso indiscriminado de inseticidas químicos (GONZALEZ-COLOMA et al., 2005; BETTIOL, 2011). A vantagem do uso de inseticidas naturais está no fato deles se degradarem rapidamente, serem menos persistentes e serem, geralmente, menos tóxicos que os tradicionais sintéticos (ISMAN, 2006). Tendo em vista o potencial inseticida e inibidor da alimentação de espécies da família Asteraceae e compostos pertencentes à classe das lactonas sesquiterpênicas, o presente estudo tem como objetivo avaliar a toxicidade das frações do extrato acetato de etila de folhas de *T. diversifolia* e compostos isolados destas frações sobre *A. salina* e a atividade inseticida destas frações e compostos isolados, sobre *S. frugiperda*.

## **Material e Métodos**

### *Coleta do material vegetal*

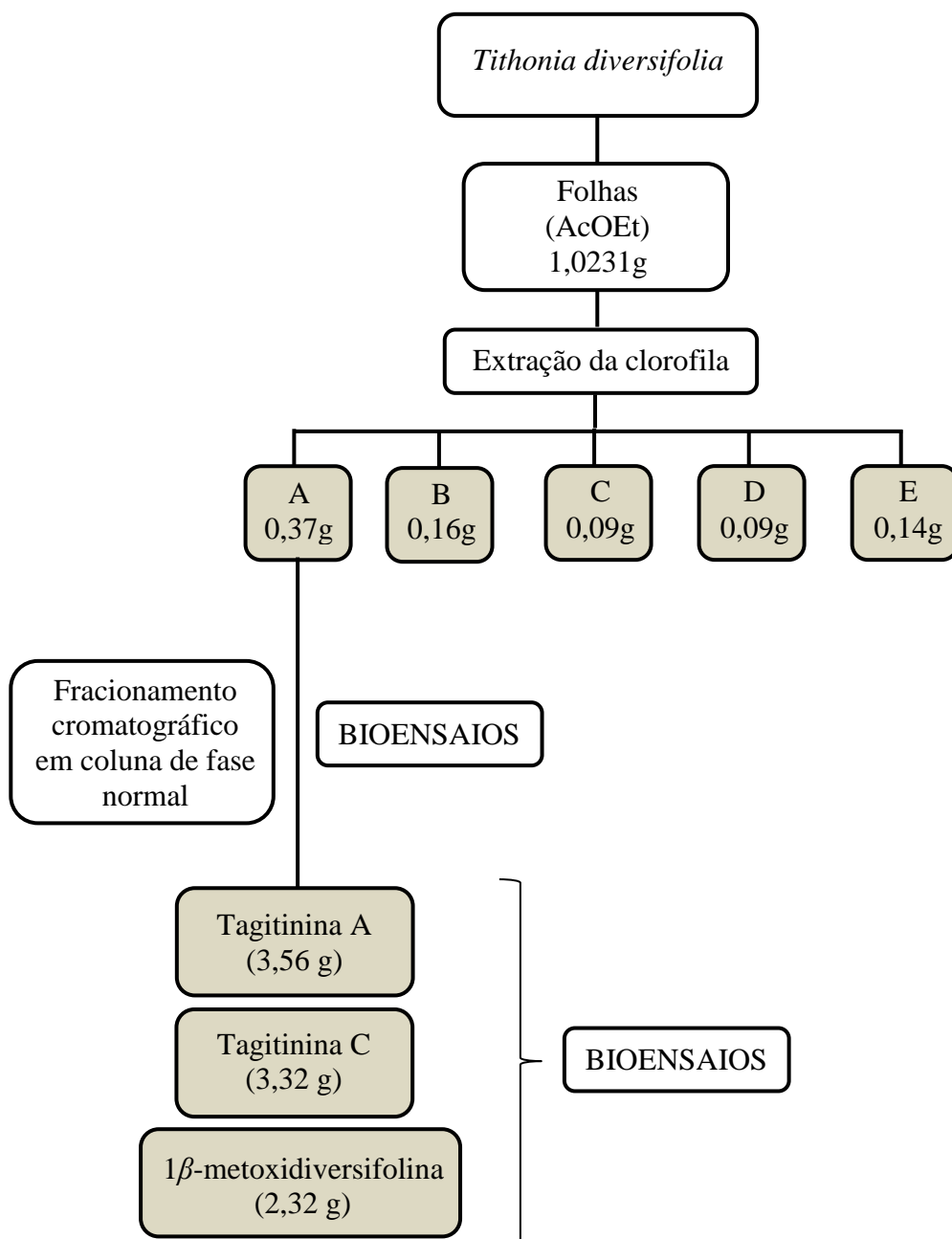
Folhas de *Tithonia diversifolia* foram coletadas aleatoriamente em plantas da área de Cerrado pertencente à Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) São Carlos, campus São Carlos - SP - Brasil (21° 58 'a 22° 00' S e 47° 51 'a 47° 52' W), durante a estação seca (agosto de 2013). As exsiccatas de *T. diversifolia* foram depositadas no Herbário do Departamento de Botânica da UFSCar - Brasil (voucher 8728).

### *Preparo do extrato foliar e fracionamento*

As folhas coletadas foram secas em estufa a 40°C por 48 h, em seguida, reduzidas a pó utilizando um moinho elétrico, armazenadas em embalagens plásticas e mantidas em refrigerador a 5°C. O pó das folhas (100 g) foi submetido à extração com hexano (Hex) em temperatura ambiente, utilizando um banho de ultrassom durante 25 min., a fim de remover hidrocarbonetos e lipídios do material vegetal. Posteriormente, foi realizada uma extração com cerca de 300 mL de acetato de etila (AcOEt) e utilizando um banho de ultrassom durante 15 minutos. A clorofila foi removida do extrato foliar utilizando como eluentes uma mistura de água/ metanol (H<sub>2</sub>O/MeOH), 20% MeOH (fração A), 40% MeOH (fração B) 60% MeOH (fração C), 80% MeOH (fração D) e 100% MeOH (fração

E) e, finalmente, com clorofórmio, sobre uma coluna cromatográfica de fase reversa, RP-18. As frações livres de clorofila Fração A (20% MeOH), Fração B (40% MeOH), Fração C (60% MeOH), Fração D (80% MeOH) e Fração E (100% MeOH) foram recolhidas separadamente e secas em evaporador rotativo, e posteriormente foram utilizadas nos bioensaios de toxicidade em *Artemia salina* e atividade inseticida sobre *S. frugiperda*.

Os compostos tagitinina A, tagitinina C e 1 $\beta$ -metoxidiversifolina, utilizados neste trabalho, foram isolados diretamente da fração A por meio de uma coluna cromatográfica de fase normal e identificados por meio de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) em um trabalho prévio realizado por Miranda et al. (2015) (ver Capítulo 2, pg. 48) e gentilmente cedidos pela Universidad de Cádiz, Espanha, para a realização deste trabalho (FIGURA 3.1).



**Figura 3.1** Fluxograma de procedimentos de extração e fracionamento do extrato acetato de etila de folhas de *T. diversifolia* e suas respectivas massas.



*Bioensaio de toxicidade sobre Artemia salina*

O bioensaio de toxicidade sobre *A. salina* das frações sem clorofila A (20% MeOH), B (40% MeOH), C (60% MeOH), D (80% MeOH) e E (100% MeOH) do extrato acetato de etila de folhas de *T. diversifolia* e dos compostos majoritários, foi realizado no Laboratório de Bioensaios do Departamento de Botânica pertencente ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo – USP, *campus* São Paulo.

Para a realização do bioensaio, foi utilizada a metodologia descrita em Solis et al. (1993). Cistos de *A. salina* (Maramar Aquacultura Com. Imp. Exportação Ltda., Rio de Janeiro, Brasil) foram colocados para eclodir em água do mar esterilizada (salinidade de 32 u. p. s), sob aeração constante, a 25°C e intensidade luminosa de 100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ . Após 48 horas, os naupilus foram coletados com uma pipeta Pasteur, depois de serem atraídos para um lado do recipiente com uma fonte de luz. Os naupilus foram separados dos cistos, pipetando-os 2 a 3 vezes para pequenos recipientes contendo água do mar. As frações e compostos majoritários foram solubilizadas, previamente, em DMSO 2%. Foram adicionadas 20  $\mu\text{L}$  de DMSO em 2  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  das frações ou compostos e em seguida completados com 980 $\mu\text{L}$  de água do mar. A partir desta solução, foram feitas diluições seriadas até a concentração final de 150  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . O controle negativo foi preparado adicionando-se 20  $\mu\text{L}$  de DMSO a 980  $\mu\text{L}$  de água do mar e o controle positivo, dicromato de potássio nas mesmas concentrações dos extratos. Em cada poço da microplaca foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  das diluições de cada amostra ou 100  $\mu\text{L}$  dos controles, positivo e negativo. Em seguida foram adicionados em cada poço, 100  $\mu\text{L}$  da suspensão de naupilus, contendo de 10 a 30 indivíduos. A microplaca foi fechada e mantida por 25°C durante 24 horas. Após esse período, a microplaca foi examinada sob um estereomicroscópio binocular (16 x) e foi registrado o número de naupilus mortos (não móveis) em cada poço. Após as contagens, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de metanol 80% e, após 30 minutos, foi contado o número total de indivíduos em cada poço. Os valores de  $\text{CL}_{50}$  foram calculados utilizando o software GraphPad Prism 5<sup>®</sup>. Foram feitas quatro repetições para cada amostra ou controles.

*Atividade inseticida sobre Spodoptera frugiperda*

Ensaios biológicos com as frações A (20% MeOH), B (40% MeOH), C (60% MeOH) do extrato acetato de etila de *T. diversifolia* e seus compostos majoritários tagitinina A, tagitinina C e 1 $\beta$ -metoxidiversifolina foram realizados no Laboratório de Bioensaios do Departamento de Química da UFSCar, a  $25 \pm 10^\circ\text{C}$ , UR de  $70 \pm 5\%$  e fotofase de 12 h. Para a realização do bioensaio, foi utilizada uma dieta artificial (KASTEN; PRICETTI; PARRA, 1978) contendo água destilada (600 mL), ágar (10,3 g), extrato de levedura (25,3 g), gérmen de trigo (39,6 g), ácido sórbico (0,8 g), ácido ascórbico (2,6 g), formaldeído 40% (6,3 mL), tetraciclina (50 mg), nipagin (1,1 g) e feijão carioquinha (82,5 g). As frações ou compostos foram solubilizadas em uma pequena quantidade de solvente (metanol) e misturadas ao ácido ascórbico contido na dieta artificial. Em seguida o solvente foi evaporado e a mistura de ácido ascórbico e as respectivas frações ou compostos foram incorporadas à dieta artificial quando esta atingiu uma temperatura de  $50^\circ\text{C}$  (MATOS et al. 2009). As frações foram utilizadas na proporção de 30 mg por 300 g de dieta ( $100 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ), e os compostos majoritários na proporção de 30, 15, 3 e 1,5 mg por 300 g de dieta (100, 50, 10 e 5 ppm, respectivamente). Além das dietas correspondentes a cada fração ou compostos, também foram preparadas as dietas controle, contendo apenas o solvente em que foram solubilizadas ou contendo apenas a dieta artificial (branco). As dietas foram vertidas em tubos de vidro ( $8,5 \times 2,5 \text{ cm}$ ) esterilizados e tampados com algodão. Os tubos foram mantidos por 24 h em grades de arame para eliminação do excesso de umidade das suas paredes e em seguida, uma lagarta recém-eclodida de *S. frugiperda* foi inoculada por tubo de vidro. As pupas obtidas tiveram seus pesos registrados 1 dia após a pupação, estas foram transferidas para copos plásticos de 50 mL onde permaneceram até a emergência dos adultos. Para cada tratamento foram utilizadas 30 lagartas, distribuídas em três repetições de dez lagartas cada, em delineamento completamente casualizado. Os parâmetros avaliados foram duração das fases larval e pupal, peso das pupas e a mortalidade (%) ao final de cada fase.

#### *Análise estatística*

A normalidade dos dados foi analisada pelo teste Lilliefors. Todos os dados obtidos foram comparados por análise de variância seguida pelo teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). As análises foram realizadas utilizando o software SISVAR<sup>®</sup>, versão 5.3 (FERREIRA, 2011).

## Resultados e Discussão

### *Bioensaio de toxicidade frente à Artemia salina*

O bioensaio de toxicidade em *A. salina* é considerado um ensaio preliminar utilizado para avaliar diferentes atividades biológicas de extratos vegetais ou substâncias puras. Uma vez que um extrato vegetal ou composto é ativo em baixas concentrações ( $< 1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), testes mais específicos podem ser empregados a fim de avaliar sua atividade biológica (MEYER et al., 1982). Entre as atividades biológicas relacionadas, este teste tem sido utilizado na avaliação da atividade inseticida de algumas plantas (FATOPE; IBRAHIM; TAKEDA, 1993). Neste trabalho foi utilizado este bioensaio para selecionar frações e compostos isolados do extrato acetato de etila de folhas de *T. diversifolia* para a avaliação da atividade inseticida contra *S. frugiperda*. Foi avaliada a toxicidade das frações A (20% MeOH), B (40% MeOH), C (60% MeOH), D (80% MeOH) e E (100% MeOH) e dos compostos tagitinina A, tagitinina C e  $1\beta$ -metoxidiversifolina nas concentrações 1000, 500, 250, 150  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . As frações D e E não apresentaram atividade na concentração mais alta (1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e por esse motivo não foram testadas as concentrações menores e, portanto, não foi calculada a concentração letal para a qual ocorre 50% de mortalidade ( $CL_{50}$ ). Os resultados da  $CL_{50}$  para as demais frações e compostos isolados estão apresentados na Tabela 3.1.

**Tabela 3.1**  $CL_{50}$  ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) das frações (A, B e C) do extrato acetato de etila de folhas de *T. diversifolia* e compostos majoritários,  $1\beta$ -metoxidiversifolina, tagitinina C e tagitinina A, frente à *Artemia salina*

Espécie	Frações/ Compostos	$CL_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$r^2$
<i>Tithonia diversifolia</i>	A	481,2	0,90
	B	439,1	0,86
	C	308,8	0,95
	$1\beta$ -metoxidiversifolina	185,5	0,90
	Tagitinina C	293,8	0,92
	Tagitinina A	> 1000	0,96

A maioria das frações e seus compostos majoritários testados mostraram toxicidade sobre *A. salina* de acordo com o proposto por Meyer et al. (1982), os quais classificaram extratos brutos e substâncias puras em: tóxicas (valor  $CL_{50} < 1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e não tóxicas ( $CL_{50} > 1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). A fração C mostrou ser a mais tóxica ( $CL_{50} = 308,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), seguida pela fração B ( $CL_{50} = 439,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e pela fração A ( $CL_{50} = 481,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Os menores valores de  $CL_{50}$  foram observados para os compostos  $1\beta$ -metoxidiversifolina ( $185,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e tagitinina C ( $293,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). O composto tagitinina A apresentou baixa toxicidade ( $CL_{50} > 1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) em *A. salina*. (TABELA 3.1).

*A. salina*, popularmente conhecida como camarão de água salgada, é um minúsculo invertebrado halofílico, pertencente à classe Crustaceae e que desempenha um papel importante em sistemas aquáticos e marinhos (ZHANG et al., 2012). Embora sua aplicação mais comum seja como ingrediente alimentar na aquicultura, larvas de *A. salina* também possuem uma aplicação importante como ferramenta na detecção de toxicidade (KANWAR, 2007). Devido à simplicidade do método, ao baixo custo de aplicação, à rapidez dos resultados e à sensibilidade a diferentes agentes tóxicos, sua aplicação é cada vez maior como bioensaio preliminar de agentes antitumorais naturais e pesticidas, bem como na detecção de poluentes ambientais, tais como pesticidas, toxinas de fungos, toxinas de cianobactérias, metais pesados e outros poluentes orgânicos (KANWAR, 2007; ZITOVA et al., 2009).

#### *Atividade inseticida sobre Spodoptera frugiperda*

As frações B e C do extrato acetato de etila de *T. diversifolia* apresentaram diferenças significativas no alongamento da fase larval com relação ao controle contendo apenas a dieta (branco). Na presença da fração C, a duração da fase larval de *S. frugiperda* apresentou um aumento de 2,03 dias em relação ao controle branco (TABELA 3.2). O prolongamento da fase larval de insetos causado pela ingestão de produtos de origem natural já foi relatado na literatura. Santos et al. (2013), observaram alongamento da fase larval de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo extrato metanólico do pó de folhas de mandioca. Tirelli et al. (2010) observaram o prolongamento da fase larval de *S. frugiperda* na presença de frações tânicas de *Ochroma pyramidalis* (Bombacaceae), *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae), *Enterolobium contortisiliquum* (Fabaceae) e *Peltophorum dubium* (Fabaceae), incorporadas à dieta artificial da lagarta. Santiago et al.

(2008) verificaram que o extrato aquoso de *Ricinus comunis* L. (Euforbiaceae) também provocou alongamento na fase larval de *S. frugiperda*. Em relação à fase de pupa, não houve diferenças significativas entre os tratamentos e os controles na presença das frações acetato etílicas (TABELA 3.2). De modo geral, a fase pupal é menos afetada que a fase larval. Smith et al., 1983 avaliaram o desenvolvimento de *S. frugiperda* na presença de extratos brutos de duas espécies de *Melampodium* e não observaram diferenças significativas na duração da fase pupal, embora tenha sido maior na presença da dieta que continha extrato de *M. americanum* (13,2 dias) comparada com a dieta controle (9,2 dias). O menor efeito no desenvolvimento de *S. frugiperda* na fase pupal em relação à fase larval pode ser devido ao efeito de plantas com potencial inseticida ser maior na fase larval, uma vez que é nesta fase que o inseto ingere as substâncias químicas presentes no alimento (RODRÍGUEZ; VENDRAMIM, 1996).

Foi observada uma redução significativa na massa pupal da lagarta do cartucho do milho na presença da fração A (229,12 mg) (TABELA 3.2). O peso das pupas está relacionado diretamente ao desempenho alimentar do inseto na fase larval. Nesta fase, o aumento no consumo de alimento pelas lagartas poderá originar pupas de maior peso (LIMA et al., 2006). Nesse sentido, a menor massa pupal registrada para a fração A, pode ser devido a presença de substâncias tóxicas ao inseto, com propriedades deterrentes ou supressoras de alimentação, presentes nessa fração.

**Tabela 3.2** Médias da duração de fase larval, fase pupal e massa pupal de *Spodoptera frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com frações do extrato acetato de etila (A, B e C) de folhas de *Tithonia diversifolia* a 100 mg.kg<sup>-1</sup>. Temp.: 25 ± 1<sup>0</sup>C; UR: 70 ± 5% e fotofase: 12h. Letras iguais sobrescritas na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa pelo teste de Tukey (p > 0,05).

Espécie	Frações	Duração da fase larval (dias) (± DP) <sup>1</sup>	Duração da fase pupal (dias) (± DP) <sup>1</sup>	Massa pupal (mg) (± DP) <sup>1</sup>
<i>Tithonia diversifolia</i>	A	13,92 ± 1,38 <sup>b</sup>	10,60 ± 1,68 <sup>a</sup>	229,12 ± 25,38 <sup>b</sup>
	B	14,40 ± 1,26 <sup>a</sup>	11,03 ± 1,56 <sup>a</sup>	232,14 ± 23,82 <sup>ab</sup>
	C	14,56 ± 0,87 <sup>a</sup>	10,95 ± 1,29 <sup>a</sup>	231,88 ± 14,69 <sup>ab</sup>
Controle Metanol		14,03 ± 0,89 <sup>ab</sup>	10,51 ± 1,18 <sup>a</sup>	235,20 ± 21,99 <sup>ab</sup>
Branco		12,53 ± 0,68 <sup>b</sup>	9,27 ± 1,16 <sup>a</sup>	261,07 ± 20,11 <sup>a</sup>

A duração da fase larval na presença das lactonas sesquiterpênicas tagitinina A, tagitinina C e 1β-metoxidiversifolina foi reduzida significativamente em relação aos controles, e foi o único parâmetro afetado (TABELA 3.3). Apesar da redução observada nesta fase, tais compostos não causaram diminuição no consumo alimentar da lagarta, consequentemente, não foram observado efeitos significativos dos compostos na fase pupal bem como no peso das pupas (TABELA 3.3). Uma possível explicação para o efeito não significativo destas lactonas sesquiterpênicas sobre o desenvolvimento da lagarta pode ser justificada pela habilidade que algumas espécies de Lepidóptera possuem em sequestrar metabólitos secundários de plantas na fase larval e descartarem esses compostos durante a muda para pupa (HARBORNE, 2001; MARTUCCI, 2012), apresentando um comportamento preventivo à intoxicação ou simplesmente esses compostos são atóxicos à *S. frugiperda*.

**Tabela 3.3** Médias da duração de fase larval, fase pupal e massa pupal de *Spodoptera frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com as lactonas sesquiterpênicas tagitinina A, tagitinina C e 1 $\beta$ -metoxidiversifolina a 100, 50, 10 e 5 ppm. Temp.: 25  $\pm$  1<sup>0</sup>C; UR: 70  $\pm$  5% e fotofase: 12h. Letras iguais sobrescritas na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa pelo teste de Tukey (p > 0,05).

Espécie	Compostos	Concentração	Duração da fase	Duração da fase	Massa pupal (mg)
			larval (dias) ( $\pm$ DP) <sup>1</sup>	pupal (dias) ( $\pm$ DP) <sup>1</sup>	( $\pm$ DP) <sup>1</sup>
<i>Tithonia diversifolia</i>	Tagitinina A	100 ppm	12,92 $\pm$ 1,49 <sup>ab</sup>	10,00 $\pm$ 0,86 <sup>a</sup>	239,42 $\pm$ 17,28 <sup>ab</sup>
		50 ppm	12,79 $\pm$ 1,20 <sup>b</sup>	10,14 $\pm$ 1,21 <sup>a</sup>	257,45 $\pm$ 23,28 <sup>a</sup>
		10 ppm	12,82 $\pm$ 1,27 <sup>b</sup>	10,14 $\pm$ 1,00 <sup>a</sup>	243,42 $\pm$ 23,86 <sup>ab</sup>
		5 ppm	13,00 $\pm$ 1,30 <sup>ab</sup>	9,89 $\pm$ 0,87 <sup>a</sup>	250,60 $\pm$ 22,03 <sup>ab</sup>
	Controle Metanol	-	13,28 $\pm$ 1,58 <sup>ab</sup>	9,88 $\pm$ 1,14 <sup>a</sup>	239,42 $\pm$ 17,28 <sup>b</sup>
	Branco	-	13,92 $\pm$ 1,46 <sup>a</sup>	9,80 $\pm$ 0,89 <sup>a</sup>	240,00 $\pm$ 25,28 <sup>b</sup>
	Tagitinina C	100 ppm	13,14 $\pm$ 1,14 <sup>ab</sup>	9,05 $\pm$ 0,88 <sup>a</sup>	243,85 $\pm$ 15,67 <sup>a</sup>
		50 ppm	13,07 $\pm$ 1,24 <sup>ab</sup>	0,89 $\pm$ 0,95 <sup>a</sup>	245,39 $\pm$ 23,60 <sup>a</sup>
		10 ppm	12,96 $\pm$ 1,03 <sup>ab</sup>	9,92 $\pm$ 1,14 <sup>a</sup>	244,57 $\pm$ 22,44 <sup>a</sup>
		5 ppm	12,85 $\pm$ 1,46 <sup>b</sup>	10,04 $\pm$ 1,13 <sup>a</sup>	251,78 $\pm$ 17,89 <sup>a</sup>
	Controle Metanol	-	13,28 $\pm$ 1,58 <sup>ab</sup>	9,88 $\pm$ 1,14 <sup>a</sup>	239,42 $\pm$ 17,28 <sup>a</sup>
	Branco	-	13,92 $\pm$ 1,46 <sup>a</sup>	9,80 $\pm$ 0,89 <sup>a</sup>	240,00 $\pm$ 25,28 <sup>a</sup>
	1 $\beta$ -metoxidiversifolina	100 ppm	12,73 $\pm$ 1,26 <sup>b</sup>	10,48 $\pm$ 0,99 <sup>a</sup>	240,79 $\pm$ 26,15 <sup>ab</sup>
		50 ppm	12,69 $\pm$ 1,38 <sup>b</sup>	10,31 $\pm$ 1,05 <sup>a</sup>	235,04 $\pm$ 23,38 <sup>b</sup>
		10 ppm	12,88 $\pm$ 1,21 <sup>b</sup>	9,73 $\pm$ 1,11 <sup>a</sup>	253,74 $\pm$ 20,33 <sup>a</sup>
		5 ppm	13,43 $\pm$ 0,86 <sup>ab</sup>	10,45 $\pm$ 1,15 <sup>a</sup>	246,43 $\pm$ 18,91 <sup>ab</sup>
Controle Metanol	-	13,28 $\pm$ 1,58 <sup>ab</sup>	9,88 $\pm$ 1,14 <sup>a</sup>	239,42 $\pm$ 17,28 <sup>ab</sup>	
Branco	-	13,92 $\pm$ 1,46 <sup>a</sup>	9,80 $\pm$ 0,89 <sup>a</sup>	240,00 $\pm$ 25,28 <sup>ab</sup>	

O alongamento da fase larval observada para as lagartas tratadas com as frações B e C de *T. diversifolia* possivelmente se deu em função de uma redução na ingestão do alimento em razão da existência de inibidores da alimentação na dieta, assim, essas lagartas necessitaram se alimentar por um período maior, antes de atingirem a fase de pupa (TIRELLI et al., 2010). Em campo, o alongamento da fase larval é vantajoso, pois os adultos que emergem desses indivíduos terão a cópula dificultada devido à heterogeneidade com a população normal, reduzindo o número de gerações do inseto no ciclo agrícola (RODRÍGUEZ; VENDRAMIM, 1996), além disso, o prolongamento das fases larval ou pupal torna o inseto mais susceptível ao ataque de parasitóides, predadores ou entomopatógenos, além de provocar maior competição por alimento.

Os resultados sugerem que a menor massa pupal registrada na presença da fração A devido, não está associada à presença das lactonas sesquiterpênicas tagitinina A, tagitinina C e 1 $\beta$ -metoxidiversifolina. É possível que tenha ocorrido inibição na alimentação ou uma menor eficiência na conversão do alimento ingerido, resultando na redução do peso pupal (TANZUBIL; MCCAFFERY, 1990). Se a massa pupal dos tratamentos é menor que o do controle, sugere-se que a planta provocou a diminuição no consumo e utilização do alimento. Em função disso, pupas de menor peso originarão adultos pequenos e possivelmente haverá problemas na cópula destes indivíduos (RODRÍGUEZ; VENDRAMIM 1996).

Com relação à mortalidade nas fases larval e pupal, tanto as frações (TABELA 3.4) como seus compostos majoritários (TABELA 3.5) apresentaram baixa mortalidade (< 40%) e não diferiram significativamente em relação aos controles.

**Tabela 3.4** Mortalidade na fase larval e pupal de *Spodoptera frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com frações do extrato acetato de etila (A, B e C) de folhas de *Tithonia diversifolia* a 100 mg.kg<sup>-1</sup>. Temp.: 25  $\pm$  1<sup>0</sup>C; UR: 70  $\pm$  5% e fotofase: 12h. Letras iguais sobrescritas na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa pelo teste de Tukey (p > 0,05).

Espécie	Frações	Mortalidade larval (%) ( $\pm$ DP) <sup>1</sup>	Mortalidade pupal (%) ( $\pm$ DP) <sup>1</sup>
<i>Tithonia diversifolia</i>	A	16,66 $\pm$ 15,28 <sup>a</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>
	B	6,66 $\pm$ 5,77 <sup>a</sup>	3,33 $\pm$ 5,77 <sup>a</sup>
	C	16,66 $\pm$ 11,55 <sup>a</sup>	7,40 $\pm$ 6,41 <sup>a</sup>
Controle Metanol		0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	3,33 $\pm$ 5,77 <sup>a</sup>
Branco		0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	3,33 $\pm$ 5,77 <sup>a</sup>



**Tabela 3.5** Mortalidade na fase larval e pupal e massa pupal de *Spodoptera frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com as lactonas sesquiterpênicas tagitinina A, tagitinina C e 1 $\beta$ -metoxidiversifolina a 100, 50, 10 e 5 ppm. Temp.: 25  $\pm$  1<sup>0</sup>C; UR: 70  $\pm$  5% e fotofase: 12h. Letras iguais sobrescritas na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa pelo teste de Tukey (p > 0,05).

Espécie	Compostos	Concentração	Mortalidade larval (%) ( $\pm$ DP) <sup>1</sup>	Mortalidade pupal (%) ( $\pm$ DP) <sup>1</sup>
<i>Tithonia diversifolia</i>	Tagitinina A	100 ppm	6,67 $\pm$ 11,54 <sup>a</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>
		50 ppm	3,33 $\pm$ 5,77 <sup>a</sup>	3,33 $\pm$ 5,77 <sup>a</sup>
		10 ppm	6,67 $\pm$ 5,77 <sup>a</sup>	3,33 $\pm$ 5,77 <sup>a</sup>
		5 ppm	6,67 $\pm$ 5,77 <sup>a</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>
	Controle Metanol	-	5,00 $\pm$ 7,07 <sup>a</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>
	Branco	-	13,33 $\pm$ 5,77 <sup>a</sup>	11,11 $\pm$ 15,71 <sup>a</sup>
	Tagitinina C	100 ppm	3,33 $\pm$ 5,77 <sup>a</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>
		50 ppm	6,67 $\pm$ 5,77 <sup>a</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>
		10 ppm	6,67 $\pm$ 11,54 <sup>a</sup>	3,33 $\pm$ 5,77 <sup>a</sup>
		5 ppm	6,67 $\pm$ 11,54 <sup>a</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>
	Controle Metanol	-	5,00 $\pm$ 7,07 <sup>a</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>
	Branco	-	13,33 $\pm$ 5,77 <sup>a</sup>	11,11 $\pm$ 15,71 <sup>a</sup>
1 $\beta$ -metoxidiversifolina	100 ppm	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	3,33 $\pm$ 5,77 <sup>a</sup>	
	50 ppm	20,00 $\pm$ 14,14 <sup>a</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	
	10 ppm	10,00 $\pm$ 10,00 <sup>a</sup>	3,33 $\pm$ 5,77 <sup>a</sup>	
	5 ppm	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	3,33 $\pm$ 5,77 <sup>a</sup>	
Controle Metanol	-	5,00 $\pm$ 7,07 <sup>a</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	
Branco	-	13,33 $\pm$ 5,77 <sup>a</sup>	11,11 $\pm$ 15,71 <sup>a</sup>	

Embora os compostos não tenham afetado o desenvolvimento larval e pupal da lagarta, foi possível observar alguns sintomas de toxicidade provocados pelos compostos. Na presença das lactonas sesquiterpênicas, tagitinina A, tagitinina C e 1 $\beta$ -metoxidiversifolina, algumas lagartas morreram durante a ecdise, sem conseguir liberar completamente a exúvia, enquanto outras morreram na fase intermediária entre lagarta-pupa. Essas alterações morfológicas provavelmente resultaram de efeitos desses compostos no sistema hormonal do inseto, que são atribuídas à redução na concentração do ecdisônio ou da alteração do nível ou atividade do hormônio juvenil (ROEL et al., 2000).

A suscetibilidade de insetos-pragas a metabólitos secundários de origem vegetal depende da espécie e órgão vegetal utilizado e da forma de extração desses aleloquímicos (TORRES; BARROS; OLIVEIRA, 2001). Portanto, uma planta com potencial inseticida pode não apresentar ação direta no desenvolvimento ou morte do inseto, mas pode atuar inibindo ou reduzindo sua alimentação e conseqüentemente, pode reduzir sua população ao final de uma geração.

## **Conclusões**

As frações do extrato acetato de etila de folhas de *T. diversifolia* e seus compostos majoritários apresentaram alta toxicidade sobre *A. salina* indicando devem possuir diferentes atividades biológicas, entre elas inseticida. As frações B e C proporcionaram o prolongamento da fase larval de *S. frugiperda*, no entanto, esse prolongamento foi maior na presença da fração C. A massa pupal foi reduzida significativamente pela fração A em relação ao controle preparado apenas com a dieta, o que pode indicar um efeito inibidor da alimentação provocado pela presença de substâncias tóxicas ao inseto. O parâmetro mais afetado pelos compostos foi a duração da fase larval, o qual foi reduzido na presença das lactonas sesquiterpênicas tagitinina A, tagitinina C e 1 $\beta$ -metoxidiversifolina. Os resultados indicam ainda, que, a redução da massa pupal provocada pela fração A não está associada à presença destas lactonas sesquiterpênicas.

## **Agradecimentos**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro. Ao Departamento de Botânica do Instituto Biológica da Universidade de São Paulo, USP e ao Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, UFSCar.

## **Referências bibliográficas**

AMBRÓSIO, S. R. et al. Constituents of glandular trichomes of *Tithonia diversifolia*: relationships to herbivory and antifeedant activity. **Phytochemistry**, v. 69, p. 2052–2060, 2008.

ASSAD, L. Agricultura brasileira é a maior consumidora mundial; gasto em 2011 chegou a R\$ 14 bilhões. **Ciencia e Cultura**, v. 64, n. 4, pp. 06-08, 2012.

BAGNARELLO, G. et al. Actividad fagodisuasiva de las plantas *Tithonia diversifolia* y *Montanoa hibiscifolia* (Asteraceae) sobre adultos del insecto plaga *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). **Revista de Biología Tropical**, v. 57, n.4, p. 1201-1215, 2009.

BARUAH, N. C. et al. Germination and growth Inhibitory sesquiterpene lactones and a flavone from *Tithonia diversifolia*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 1, p. 29-36, 1994.

BETTIOL, W. Biopesticide use and research in Brazil. **Outlooks on Pest Management**, v. 22, n. 6, p. 280-283, 2011.

BULLANGPOTI, V. et al. Antifeedant activity of *Jatropha gossypifolia* and *Melia azedarach* senescent leaf extracts on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and their potential use as synergists. **Pest Management Science**, v. 68, p. 1255–1264, 2012.

BURNETT, W. C., et al. Sesquiterpene lactones - Insect feeding deterrents in *Vernonia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 2. p. 25-29, 1974.

DIXON, R. A. Natural products and plant disease resistance. **Nature**, v. 411, p. 843-847, 2001.

DUTTA, P. et al. Feeding deterrents for *Philosamia ricini* (*Samia cynthia* subsp. *ricini*) from *Tithonia diversifolia*. **Phytoparasitica**, v. 14, n. 1, p. 77-80, 1986.

FATOPE, M. O.; IBRAHIM, H.; TAKEDA, Y. Screening of higher plants reputed as pesticides using the brine shrimp lethality assay. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 31, n. 4, p. 250-254, 1993.

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

FRAGA, B. M. Natural sesquiterpenoids. **Natural Products Reports**, v. 21, p. 669-693, 2004.

GALLO, M. B. C. et al. Bioactivity of extracts and isolated compounds from *Vitex polygama* (Verbenaceae) and *Siphoneugena densiflora* (Myrtaceae) against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Management Science**, v. 62, p. 1072–1081, 2006.

GERWICK, B. C.; SPARKS, T. C. Natural products for pest control: an analysis of their role, value and future. **Pest Management Science**, v. 70, n.8, p. 1169-85, 2014.

GOFFIN, E. et al. In vitro antiplasmodial activity of *Tithonia diversifolia* and identification of its main active constituent: tagitinin C. **Planta Medica**, v. 68, n. 6, p. 543-545, 2002.

GONZALEZ-COLOMA, A. et al. Antifeedant/insecticidal terpenes from Asteraceae and Labiatae species native to Argentinean semi-arid lands. **Zeitschrift fur Naturforschung C-Journal of Biosciences**, v. 60, n. 11-12, p. 855-861, 2005.

HARBORNE, J. B. Twenty-five years of chemical ecology. **Natural Product Reports**, v. 18, n. 4, p. 361-379, 2001.

HUANG, S. H. et al. Insecticidal activity of pogostone against *Spodoptera litura* and *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Management Science.**, v. 70, p. 510–516, 2014.

ISMAN, M. B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, v. 51, p.45–66, 2006.

KANWAR, A. S. Brine shrimp (*Artemia salina*) – a marine animal for simple and rapid biological assays. **Journal of Chinese Clinical Medicine**, v. 2, n. 4, 2007.

KASTEN, P. JR.; PRECETTI, A. A. C. M.; PARRA, J. R. P. Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) em duas dietas artificiais e substrato natural. **Revista de Agricultura**, v. 53, p. 68, 1978.

LIAO, MAY-HUA et al. *Tithonia diversifolia* and its main active component tagitinin C induce survivin inhibition and G2/M arrest in human malignant glioblastoma cells. **Fitoterapia**, v. 82, n. 3, p. 331-341, 2011.

LIAO, MAY-HUA et al. Anti-human hepatoma Hep-G2 proliferative, apoptotic, and antimutagenic activity of tagitinin C from *Tithonia diversifolia* leaves. **Journal of Natural Medicines**, v. 67, n. 1, p. 98-106, 2012.

LIMA, F. W. N. et al. Avaliação de acessos de milho para resistência a *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em laboratório. **Acta Amazônica**, v. 36, n. 2, p. 147-150, 2006.

LIN, H. R. Identification of liver X receptor and farnesoid X receptor dual agonists from *Tithonia diversifolia*. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, n. 7, p. 3270-3281, 2012.

MARTUCCI, M. E. P. **Análise da interação ecoquímica entre a lagarta-do-girassol *Chlosyne lacinia* (Lepidoptera: Nymphalidae) e as Asteraceae *Tithonia diversifolia* e *Vernonia polyanthes* utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.** p. 86. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, 2012.

MATOS, A. P. et al. Constituintes químicos e atividade inseticida dos extratos de frutos de *Trichilia elegans* e *T. catigua* Meliaceae. **Química Nova**, v. 32, p. 1553-1556, 2009.

MELLO, M. O.; SILVA-FILHO, M. C. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 14, n.2, p. 71-81, 2002.

MEYER, B. N., et al. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica.**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MIRANDA, M. A. F. M. et al. Phytotoxins from *Tithonia diversifolia*. **Journal of Natural Products**, 2015. (Publicado online: abril 2015). DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b00040

OLIVEIROS-BASTIDAS, A. J. El fenómeno alelopático. El concepto, las estrategias de estudio y su aplicación en la búsqueda de herbicidas naturales. **Revista Química Viva** – n.1, ano 7, p. 1-34, 2008.

OPTIZ, S. E. W.; MULLER, C. Plant chemistry and insect sequestration. **Chemoecology**, v. 19, p. 117–154, 2009.

PICMAN, A. K. Biological activities of sesquiterpene lactones. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 14, n. 3, p. 255-281, 1986.

RÍOS-KATO, C. I. *Tithonia diversifolia* (hemsl.) Gray, una planta con potencial para la producción sostenible en el trópico. Conferencia electrónica de la FAO sobre "Agroforestería para la producción animal en Latinoamérica". Disponível em: <http://www.fao.org/ag/aga/AGAP/FRG/agrofor1/Rios14.htm>. Acesso em: janeiro de 2015.

RODRÍGUEZ, H. C.; VENDRAMIM, J. D. Toxicidad de extractos acuosos de Meliaceae en *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Manejo Integrado de Plagas**, n. 42, p. 14-22, 1996.

ROEL, A. R. et al. Efeito do extrato acetato de etila de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) no desenvolvimento e sobrevivência da lagarta-do-cartucho. **Bragantia**, v. 59, n. 1, p. 53-58, 2000.

SÁNCHEZ-MENDOZA, M. E. et al. Bioassay-guided isolation of an anti-ulcer compound, tagitinin C, from *Tithonia diversifolia*: role of nitric oxide, prostaglandins and sulfhydryls. **Molecules**, v. 16, n. 1, p. 665-674, 2011.

SANTOS, M. A. I., et al. Extrato metanólico de folhas de mandioca como alternativa ao controle da lagarta-do-cartucho e de formigas cortadeiras. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 6, suplemento 1, p. 3501-3512, 2013.

SANTIAGO, G. P., et al. Efeitos de extratos de plantas na biologia de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) mantida em dieta artificial. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 792-796, 2008.

SEAMAN, F. C. Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the Asteraceae. **The Botanical Review**, v. 48, n. 2, p. 121-594, 1982.

SOLIS, P. N., et al. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (Brine shrimp). **Planta Medica**, v. 59, p. 250-252, 1993.

SPARKS, A. N. A Review of the biology of the fall armyworm. **The Florida Entomologist**, v. 62, n. 2, p. 82-87, 1979.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. v.3. Porto Alegre, Artmed, 848p., 2009.

TANZUBIL, P. B.; MCCAFFERY, A. R. Effects of azadirachtin and aqueous neem seed extracts on survival, growth and development of the African armyworm, *Spodoptera exempta*. **Crop Protection**, v. 9, n. 5, p. 383-386, 1990.

TIRELLI, A. A. et al. Efeito de frações tânicas sobre parâmetros biológicos e nutricionais de *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE). **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 6, p. 1417-1424, 2010.

TOLEDO, J. S. et al. In vitro leishmanicidal activities of sesquiterpene lactones from *Tithonia diversifolia* against *Leishmania braziliensis* promastigotes and amastigotes. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 6070-6079, 2014.

TONGMA, S.; KOBAYASHI, K.; USUI, K. Allelopathic activity and movement of water leachate from Mexican sunflower (*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray) leaves in soil. **Journal of Weed Science and Technology**, v. 44, n. 1, 51-58, 1999.

TORRES, A. L.; BARROS, R.; OLIVEIRA, J. V. Efeito de extratos aquosos de plantas no desenvolvimento de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 1, p. 151-156, 2001.

ZHAI, H. L. et al. A new chromene glycoside from *Tithonia diversifolia*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 46, n. 2, p. 198-200, 2010.

ZHAO, G. J. et al. Chemical constituents from *Tithonia diversifolia* and their chemotaxonomic significance. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 44, p. 250-254, 2012.

ZITOVA, A et al. Toxicological profiling of chemical and environmental samples using panels of test organisms and optical oxygen respirometry. **Environmental toxicology**, v. 24, n. 2, p. 116-127, 2009.

## CONCLUSÃO GERAL

*Myrsine umbellata* mostrou-se mais eficiente que *M. coriacea* contra os fungos testados, no entanto, *M. coriacea* alcançou resultados mais expressivos nos ensaios biológicos para as atividades inseticida e antioxidante.

*Tithonia diversifolia* apresentou elevada atividade fitotóxica sobre as espécies alvo e sobre duas gramíneas invasoras de cultivos agrícolas, entre elas *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster, importante gramínea invasora do Cerrado. O estudo cromatográfico das frações de seu extrato foliar AcOEt resultou no isolamento de 14 compostos, sendo 12 lactonas sesquiterpênicas, 1 secosesquiterpeno e 1 diterpeno. O composto 3 $\alpha$ -acetoxicostunolideo está sendo pela primeira vez descrito, nesse trabalho, para a espécie *T. diversifolia* e os compostos 8 $\beta$ -O-(2-metilbutiroil)tirotundina e 8 $\beta$ -O-(isovaleroil)tirotundina, uma mistura de isômeros com características espectroscópicas não conhecidas anteriormente, estão sendo relatados pela primeira vez na literatura.

A alta atividade fitotóxica dos compostos avaliados e, principalmente, dos compostos majoritários de *T. diversifolia*, 1 $\beta$ -metoxidiversifolina, tagitinina A e tagitinina C, indica que esses aleloquímicos podem ser responsáveis pela atividade apresentada por esta planta.

As frações e compostos majoritários, 1 $\beta$ -metoxidiversifolina, tagitinina A e tagitinina C, apresentaram alta toxicidade sobre o microcrustáceo *Artemia salina*, indicando um possível potencial citotóxico e inseticida dessa planta. O bioensaio inseticida realizado com as frações do extrato AcOEt de *T. diversifolia* apresentou potencial deterrente ou supressor da alimentação de *Spodoptera frugiperda*. Essa atividade possivelmente foi provocada pela presença de substâncias tóxicas ao inseto, no entanto, o potencial deterrente destas frações não está associado à presença dos compostos majoritários testados.

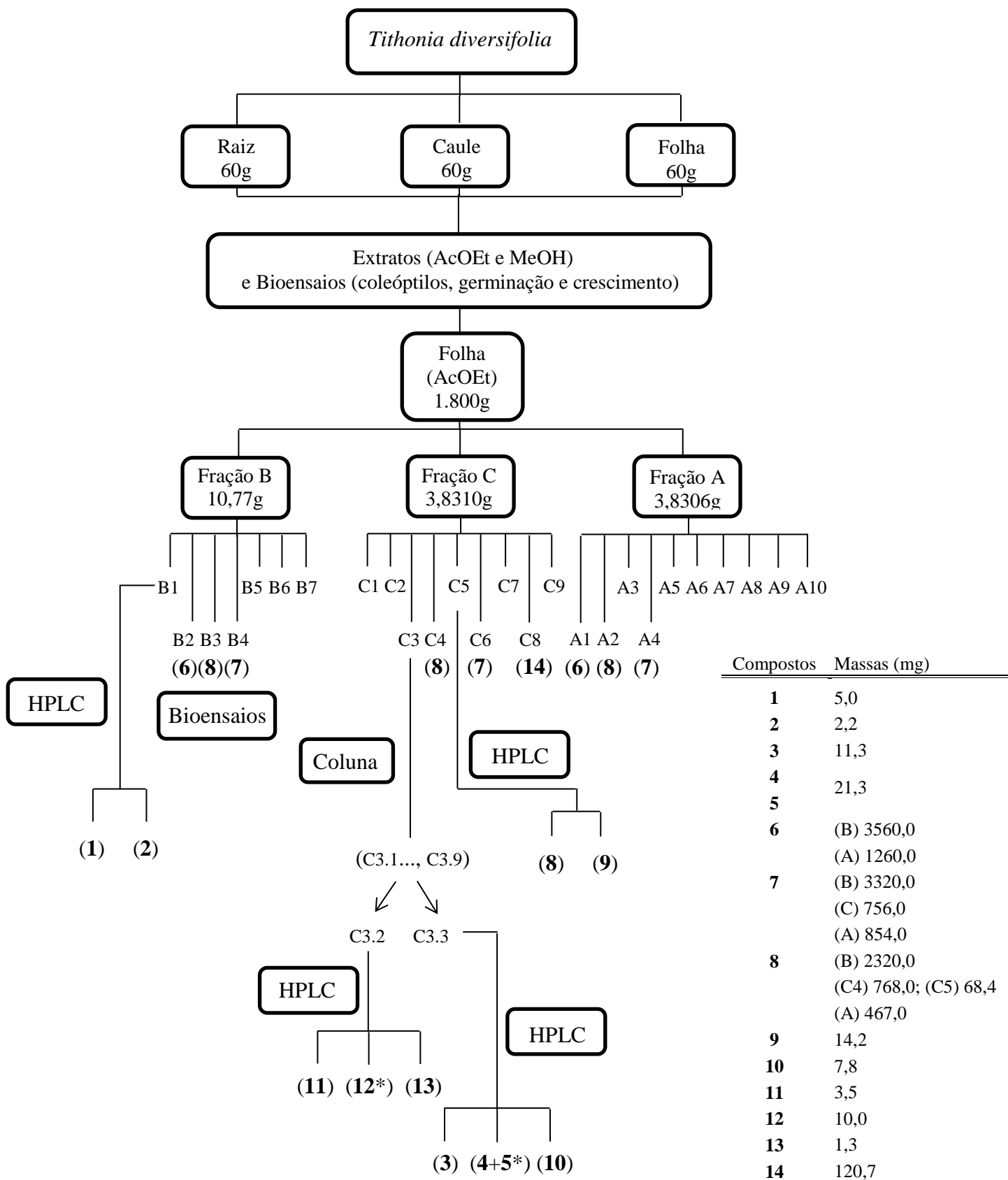
# APÊNDICE



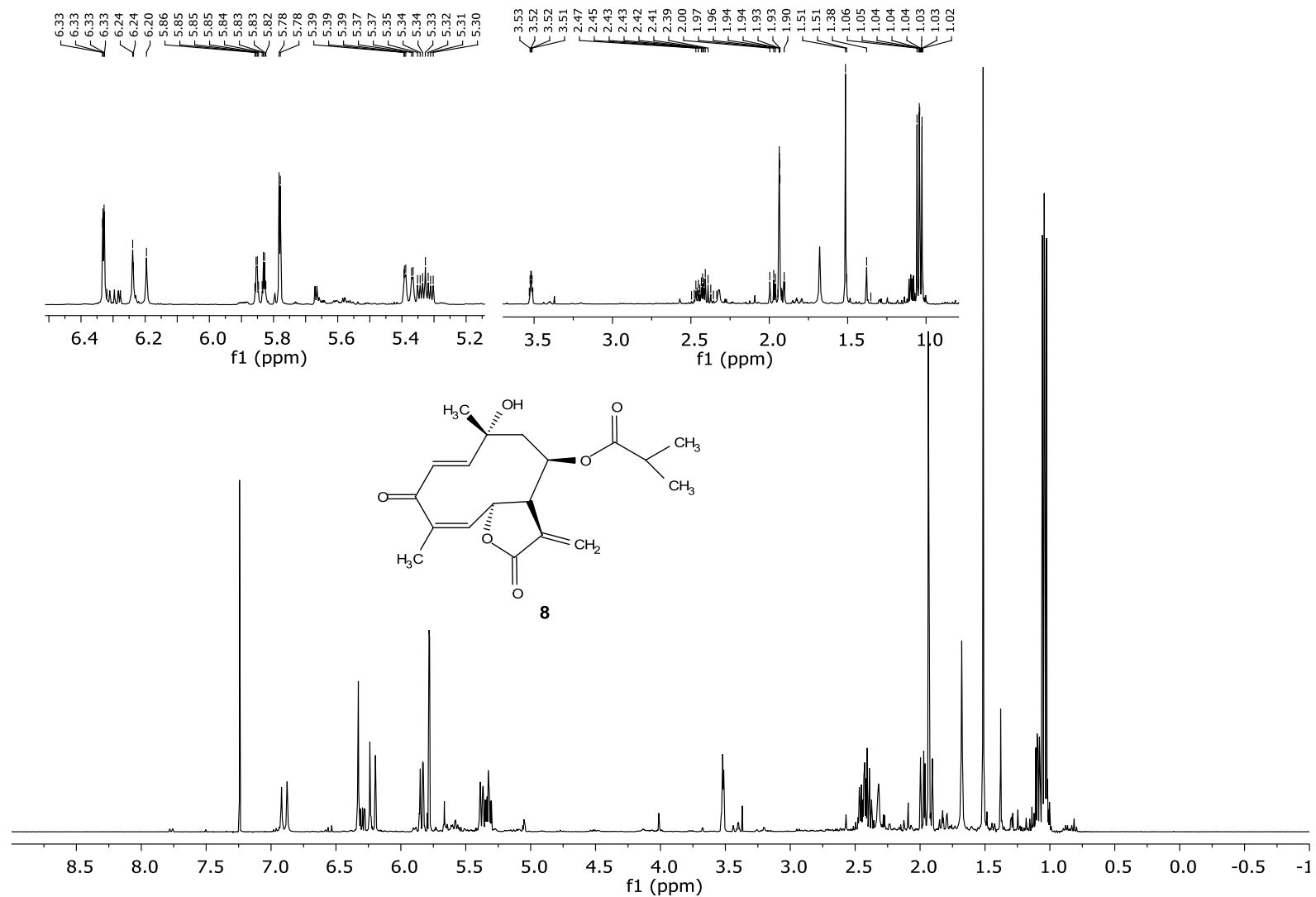
**Apêndice 1** Massas e rendimento dos extratos de 100 g de folhas de *Myrsine umbellata* e *Myrsine coriacea* em solventes orgânicos.

Espécies	Solventes orgânicos	Massa (mg)	Rendimento (%)
<i>Myrsine umbellata</i>	Hexano	187	0,187
	DCM	284	0,284
	AcOEt	129	0,129
	Acetona	428	0,428
	MeOH	949	0,949
<i>Myrsine coriacea</i>	Hexano	0,83	0,083
	DCM	137	0,137
	AcOEt	0,81	0,081
	Acetona	535	0,535
	MeOH	995	0,995

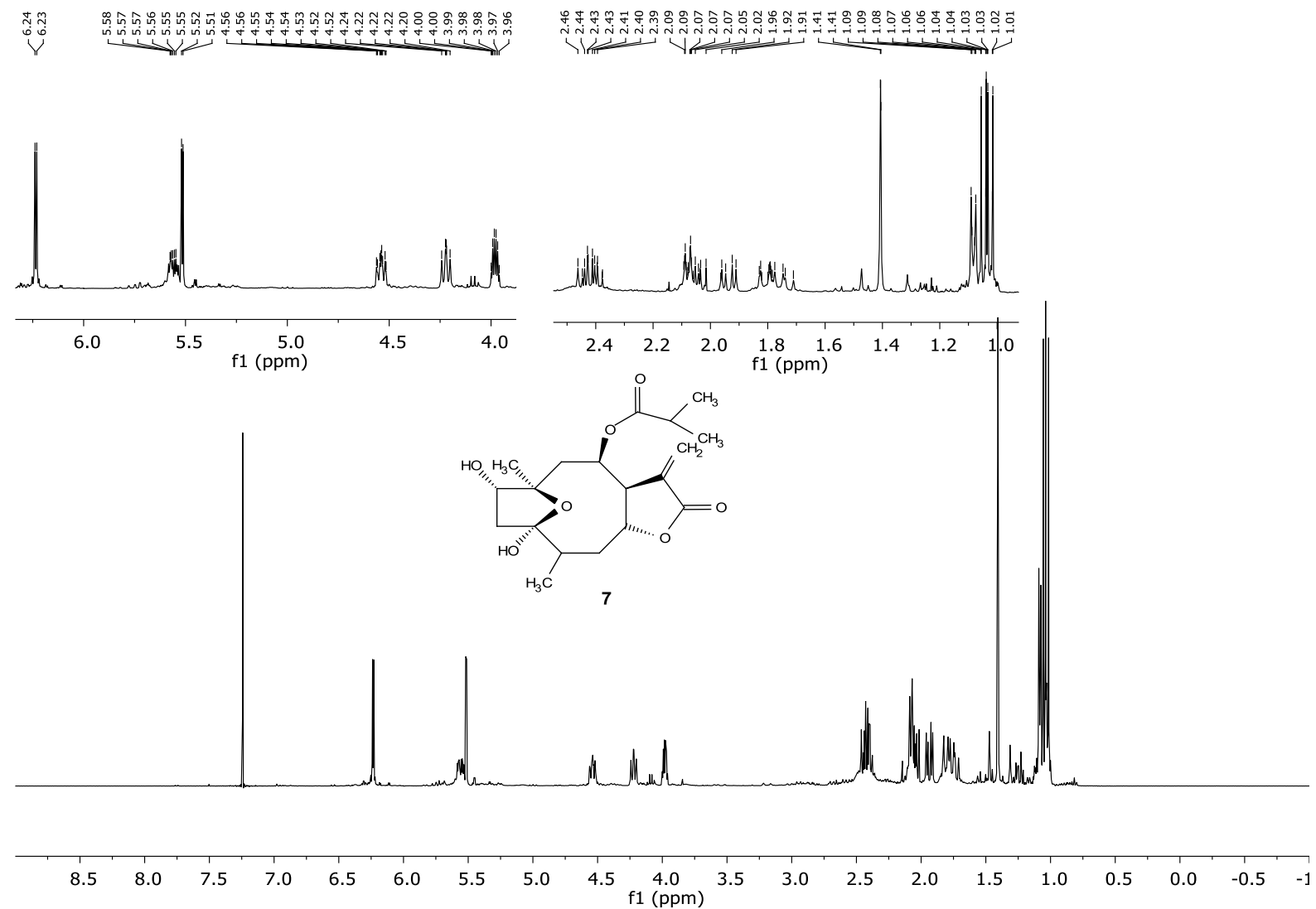
**Apêndice 2** Fluxograma de extração e isolamentos de compostos de *Tithonia diversifolia*



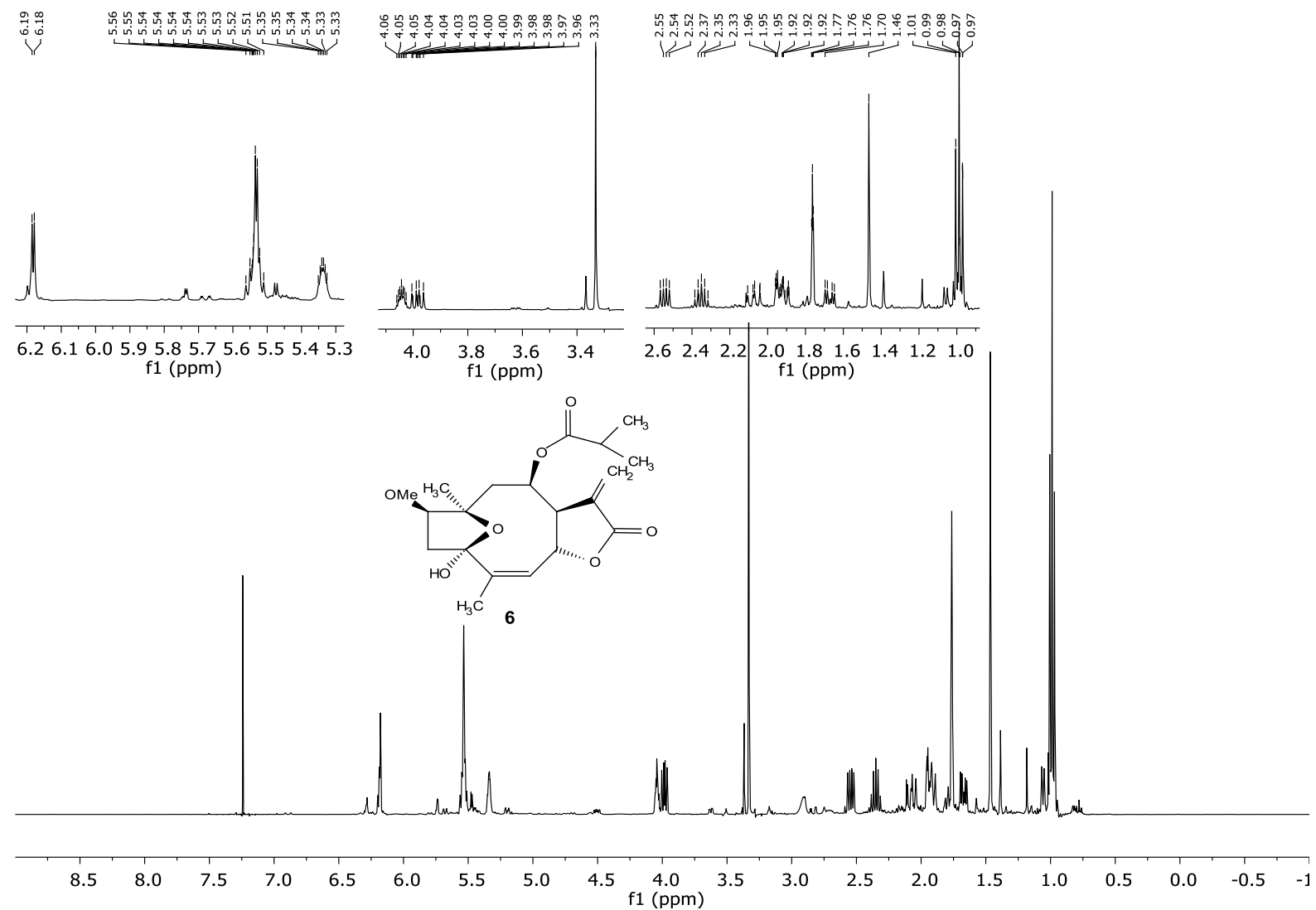
## **ANEXO**



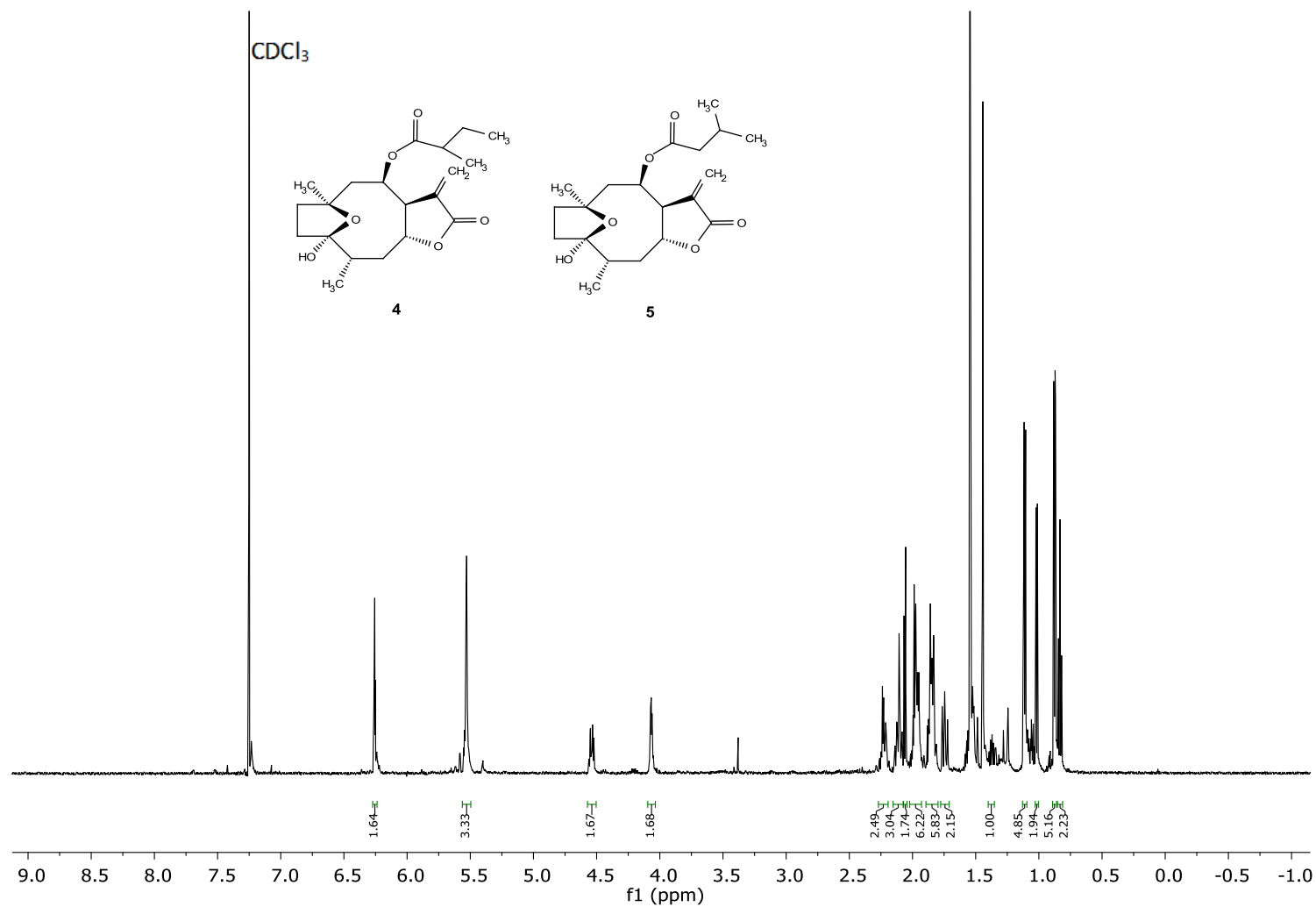
**Anexo 1** Espectro NMR <sup>1</sup>H de Tagitinina C (8) e regiões expandidas do espectro (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



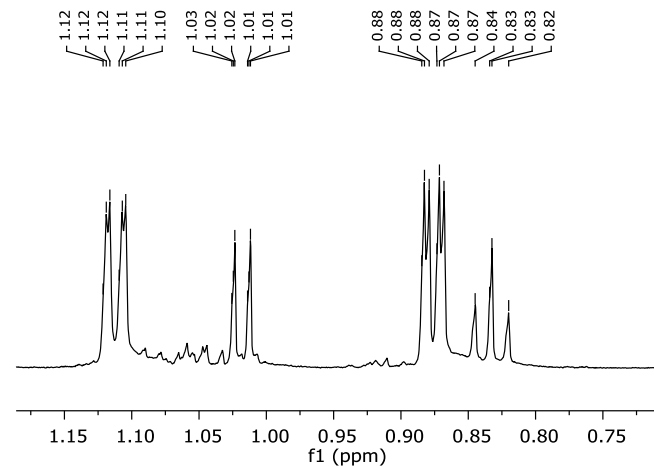
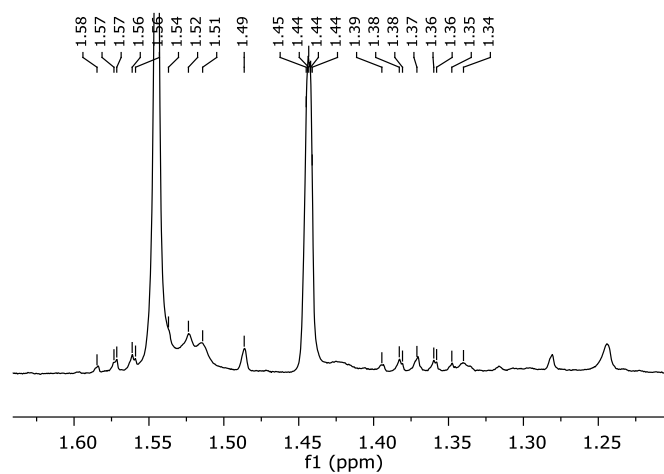
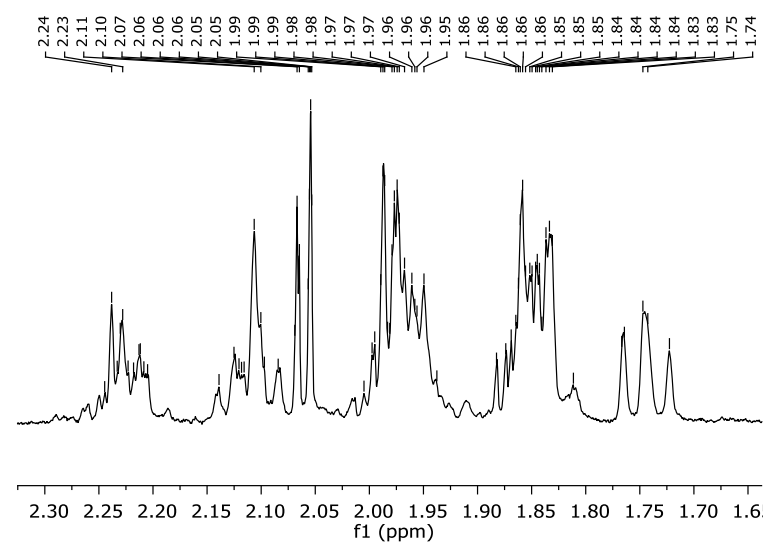
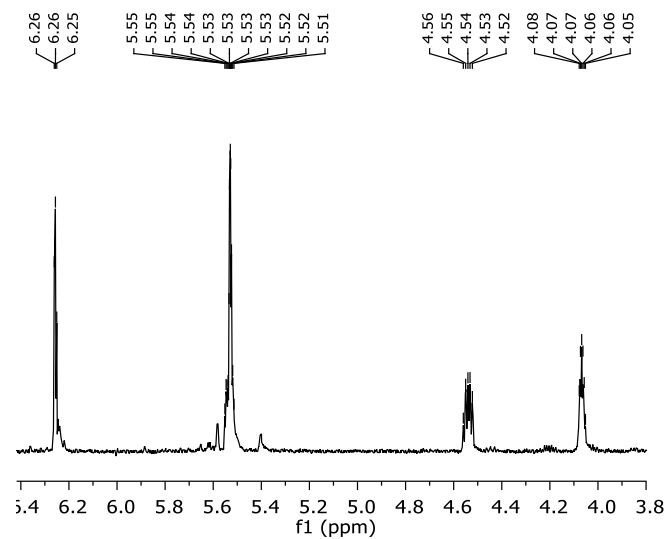
Anexo 2 Espectro NMR <sup>1</sup>H de Tagitinina A (7) e regiões expandidas do espectro (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



**Anexo 3** Espectro NMR <sup>1</sup>H de 1β-metoxidiversifolina (6) e regiões expandidas do espectro (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

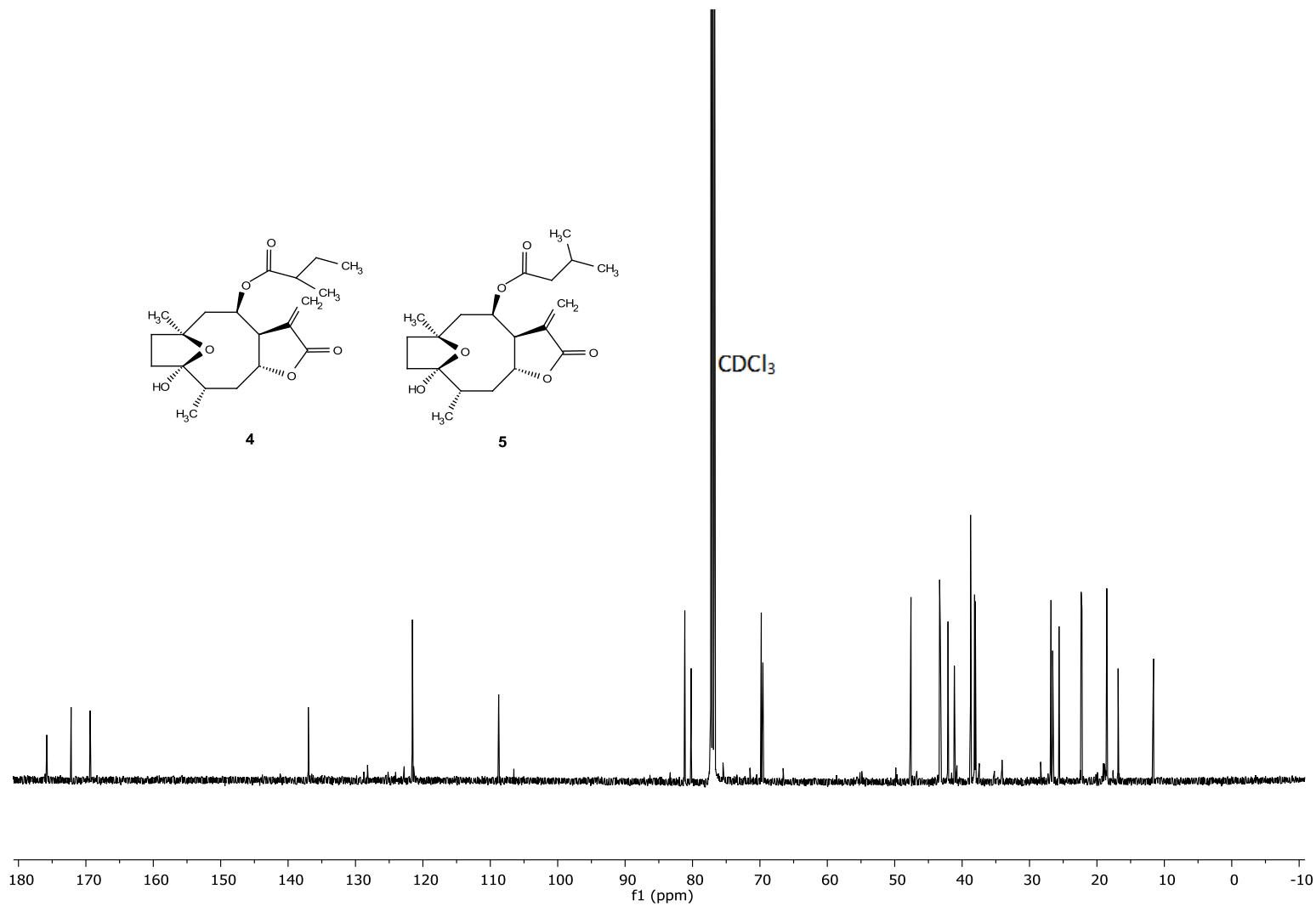


**Anexo 4** Espectro NMR <sup>1</sup>H de 8β-O-(2-metilbutroil)tirotundina (**4**) e 8β-O-(isovaleroil)tirotundina (**5**) (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

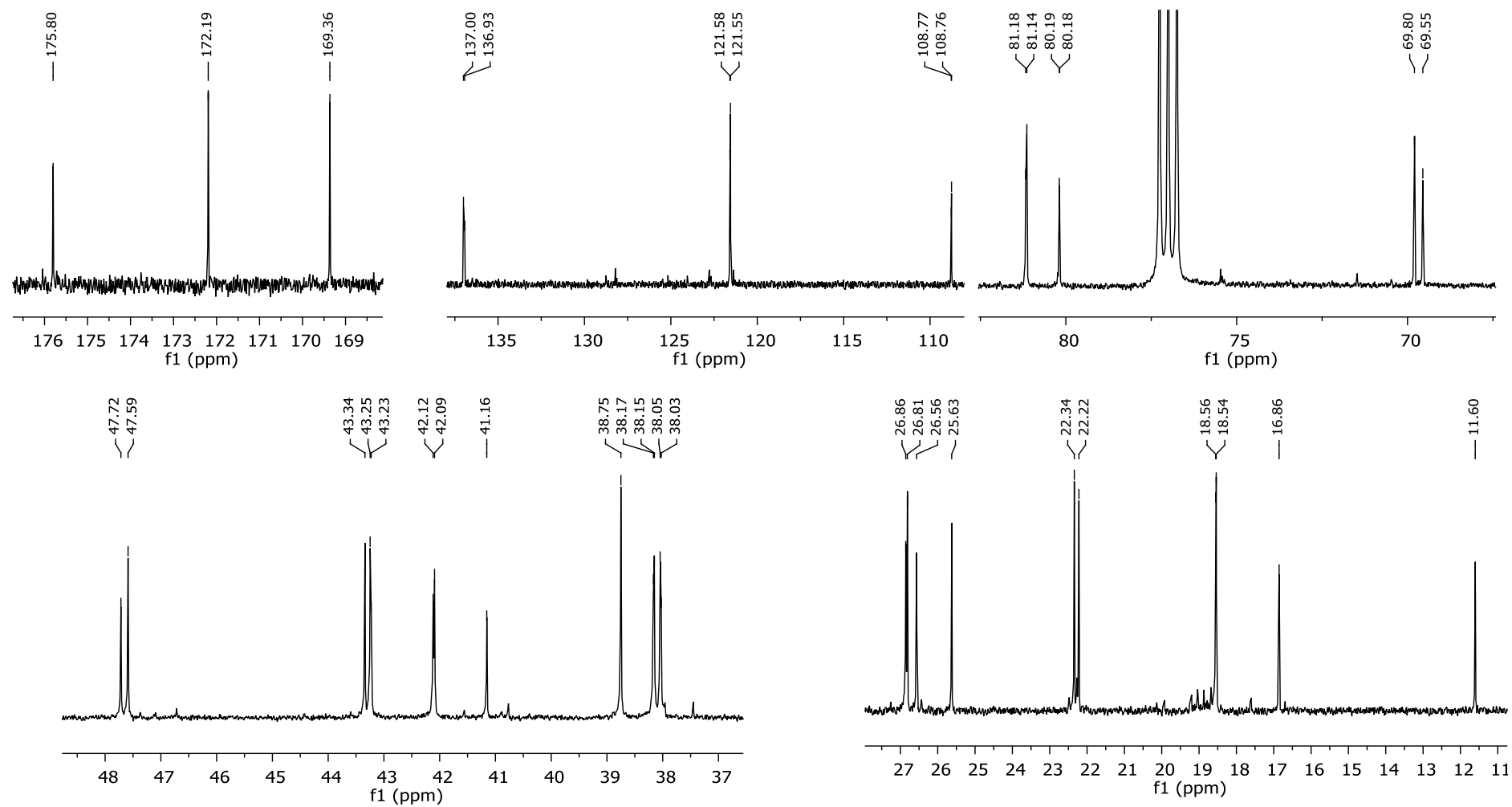


Anexo 5 Regiões expandidas do espectro NMR  $^1\text{H}$  de  $8\beta$ -*O*-(2-metilbutirol)tirofundina (**4**) e  $8\beta$ -*O*-(isovaleroil)tirofundina (**5**) (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

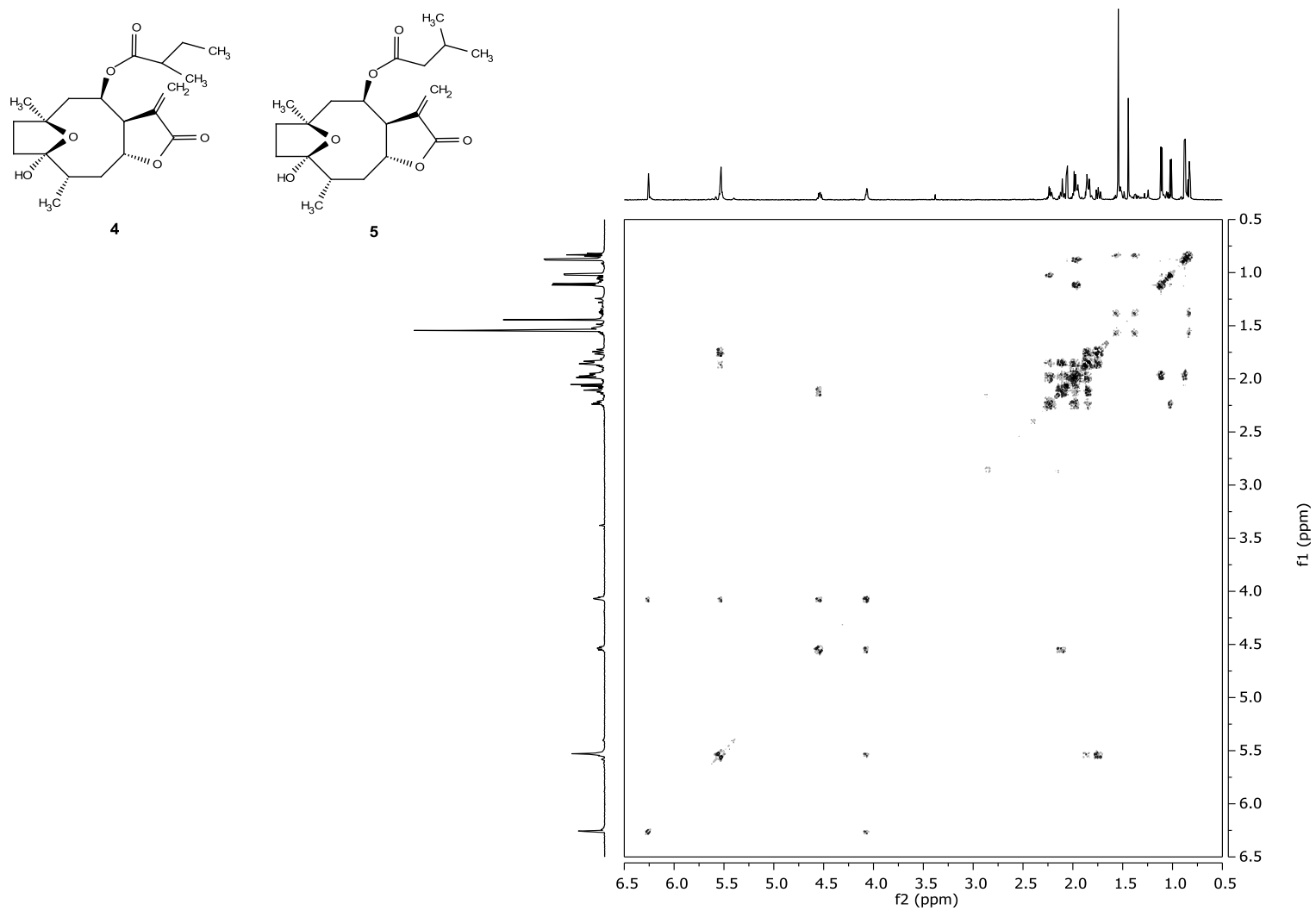




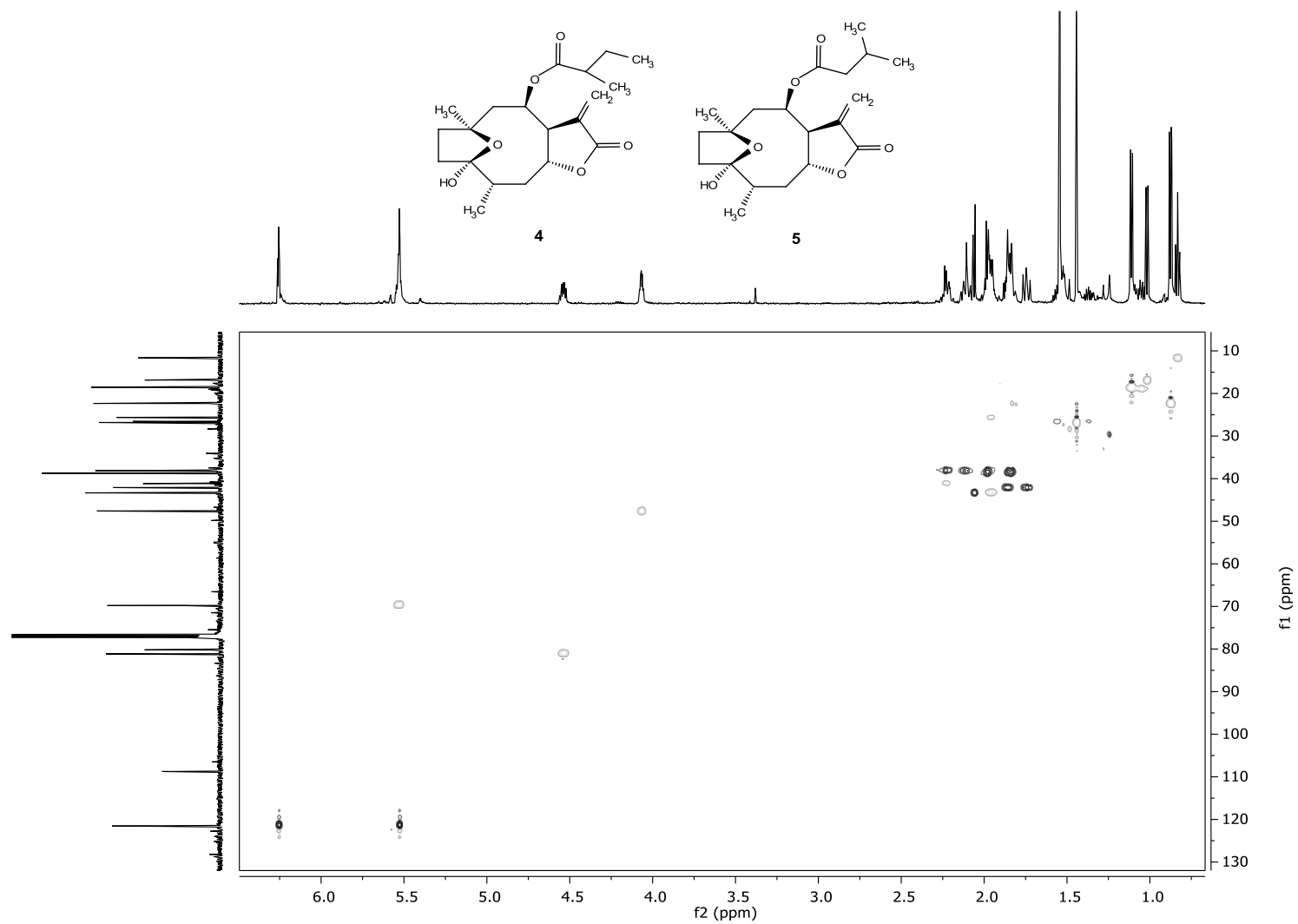
**Anexo 6** Espectro NMR <sup>13</sup>C de 8β-O-(2-metilbutirol)tirotundina (4) e 8β-O-(isovaleroil)tirotundina (5) (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



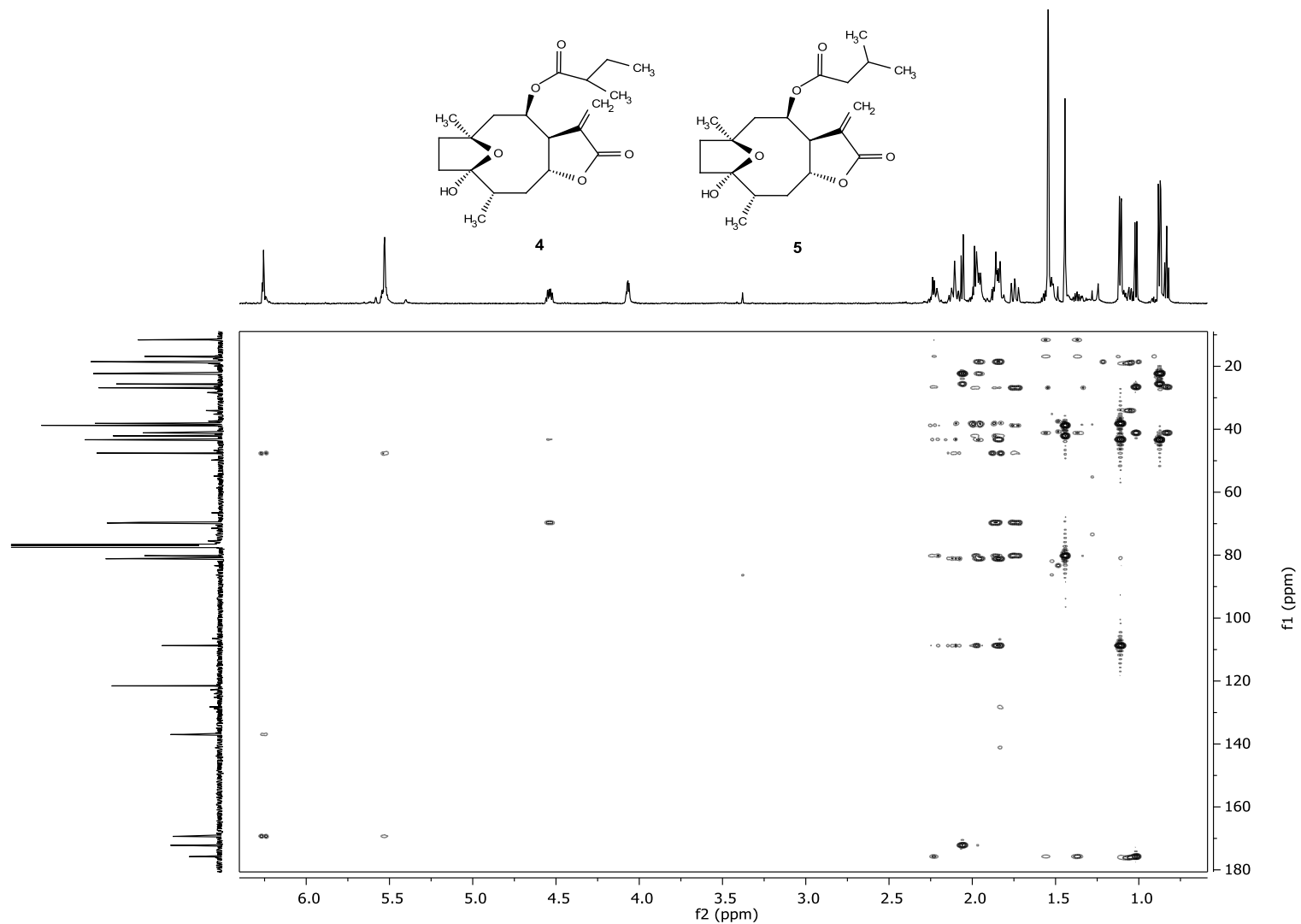
Anexo 7 Regiões expandidas do espectro NMR <sup>13</sup>C de 8β-O-(2-metilbutiroil)tirotundina (4) e 8β-O-(isovaleroil)tirotundina (5) (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



**Anexo 8** Espectro gDQCOSY de 8β-O-(2-metilbutirol)tirofundina (**4**) e 8β-O-(isovaleroil)tirofundina (**5**) (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



**Anexo 9** Espectro gHSQC de 8β-O-(2-metilbutirol)tirofundina (**4**) e 8β-O-(isovalerol)tirofundina (**5**) (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



**Anexo 10** Espectro gHMBC de 8β-O-(2-metilbutirol)tirotundina (**4**) e 8β-O-(isovaleroil)tirotundina (**5**) (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)