

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

Luciana de Jesus Jatobá

**Compostos com potencial alelopático
em *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze**

São Carlos – SP
Brasil
2012

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

Luciana de Jesus Jatobá

**Compostos com potencial alelopático
em *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze**

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

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Sonia Cristina Juliano Gualtieri

São Carlos – SP
Brasil
2012

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

J39cp

Jatobá, Luciana de Jesus.

Compostos com potencial alelopático em *Aristolochia
esperanzae* O. Kuntze / Luciana de Jesus Jatobá. -- São
Carlos : UFSCar, 2012.

91 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2012.

1. Ecologia. 2. Aleloquímicos. 3. Estudo fitoquímico. 4.
Isolamento biodirigido. 5. Fitotoxicidade. 6. Bioherbicidas. I.
Título.

CDD: 574.5 (20ª)

“Diga-me uma coisa: por que as pessoas estudam os sinais deixados pelas formigas?”

“Bem, acho que um entomologista diria que é para entender as formigas e sua sociedade”, sugeriu Ellie. “Os cientistas sentem prazer em entender as coisas.”

“Isso é apenas outra maneira de dizer que sentem amor pelas formigas.”

Contato, Carl Sagan

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmã, Candida, Jaime e Claudia, pelo apoio e confiança, mesmo quando essa ideia pareceu loucura da minha parte. Por terem me feito quem sou, agora confiante e orgulhosa por ter feito a escolha certa.

Ao João Pedro Lima, pela companhia no laboratório depois do expediente, pelas ideias, ajuda e por ter segurado o rojão e confiado no melhor, mesmo nas piores crises de ansiedade, frustração e dúvida. Por ter transformado minha vida com seu amor.

À Prof^a. Sonia Cristina Juliano Gualtieri, pela oportunidade, pela orientação e amizade.

Ao Prof. Roberto Gomes de Souza Berlinck, pela parceria fundamental para a realização do trabalho, para meu aprendizado e crescimento profissional.

Ao Prof. Antonio Gilberto Ferreira, pela realização das análises por RMN.

Aos colegas do Laboratório de Ecofisiologia de Sementes - UFSCar e do Grupo de Química Orgânica de Produtos Naturais – IQSC USP, por tudo que aprendi em nossa convivência e trabalho conjunto, pelo companheirismo, cafés, noites de trabalho e momentos de descontração.

Aos técnicos do Departamento de Botânica – UFSCar, Carlos Casali, Ademir de Paula e Maristela Imatomi, e também ao jardineiro Sr. Luiz Ferraz, pelo auxílio na coleta de material e no desenvolvimento do trabalho.

Às técnicas do Instituto de Química de São Carlos, Karin Bandeira e Fabiana Tessari, por toda a paciência e dedicação, por todo o mundo novo de técnicas e aprendizado que comecei a desbravar com sua ajuda.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

Ao Grupo de Química Orgânica de Produtos Naturais – IQSC USP pelas condições oferecidas para o desenvolvimento das separações cromatográficas.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade, sugestões e correções.

Aos meus amigos e colegas, pelo apoio incansável e manutenção da minha saúde mental. Em especial, agradeço à Lia Sabinson, Emmanuel Moralez, Raquel Negrão, Simoni Anese, Talita Sampaio, Tatiana Massaro, Ricardo Brocenschi, Jeferson Moreto, Valéria Iared, Karen de Jesus, Eli Pimenta, Messias Passos, Stelamar Romminger, Natália Cerântola, Otávio Lino (mesmo de longe), Pamela Smencellato, Pablo Muñoz, Tainã Matos, Rafael Pinheiro e Diogo Fujiwara (querida família Pastel).

Às agências de financiamento CNPq, CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

RESUMO GERAL

A alelopatia é definida como qualquer processo envolvendo metabólitos secundários que influenciam no crescimento e desenvolvimento de sistemas naturais e cultiváveis. Plantas do gênero *Aristolochia* são conhecidas por seu uso na medicina tradicional, porém poucos estudos foram realizados sobre a importância ecológica de seus compostos secundários ou sua possível aplicação na agricultura. O presente estudo teve por objetivo o isolamento, caracterização e avaliação da atividade alelopática de compostos secundários de *A. esperanzae*. Procedeu-se a extração, isolamento biodirigido, análises espectroscópicas e espectrométricas dos compostos isolados. Avaliou-se a atividade fitotóxica dos extratos ativos de diferentes órgãos de *A. esperanzae* sobre o desenvolvimento de espécies cultivadas e invasoras de culturas agrícolas, e de amostra ativa semi-purificada sobre o crescimento inicial de *Triticum aestivum* L. (trigo). Os extratos AcOEt de folhas maduras e raízes de *A. esperanzae* apresentaram atividade fitotóxica semelhante ao do herbicida utilizado como controle sobre espécies invasoras de culturas agrícolas. O isolamento biodirigido de compostos com atividade alelopática de folhas maduras de *A. esperanzae* levou à obtenção de três compostos isoméricos com fragmentos de massas com razão m/z 321 Da e 161 Da, e absorção no ultravioleta em 234 nm e entre 286 nm e 287 nm. Análises por RMN mono e bidimensionais de um destes compostos possibilitaram estabelecer sua estrutura parcial. A amostra semi-purificada ISO, obtida de folhas maduras de *A. esperanzae* e compostas majoritariamente pela mistura isomérica isolada, apresentou atividade alelopática sobre o desenvolvimento inicial do trigo, com inibição do desenvolvimento do sistema radicular e formação de anormalidades necróticas na porção aérea, com comportamento hormético. A atividade dos compostos presentes na fração ISO mostrou-se diferenciada daquela apresentada pelo herbicida comercial, sendo promissoras no desenvolvimento de bioherbicidas.

Palavras-chave: Aleloquímicos, estudo fitoquímico, isolamento biodirigido, cipó-mil-homens, atividade fitotóxica, bioherbicidas.

ABSTRACT

Allelopathy is defined as any process involving secondary metabolites that influence the growth and development of natural and cultivated systems. Plants of the *Aristolochia* genus are known for their use in traditional medicine, but few studies have been conducted on the ecological importance of their secondary compounds and their possible application in agriculture. This study aimed at the isolation, characterization and evaluation of the allelopathic activity of *A. esperanzae* secondary metabolites. Extraction, bioassay-guided isolation, spectroscopic and spectrometric analysis of the isolated compounds was carried out. The phytotoxic activity of the active extracts from *A. esperanzae* different organs on the development of species of cultivated crops and weeds, and of the active semi-purified sample in the initial growth of *Triticum aestivum* L. (wheat) was evaluated. The EtOAc extracts of *A. esperanzae* mature leaves and roots showed phytotoxic activity similar to the herbicide used as control over the weed species. Bioassay-guided isolation of compounds with allelopathic activity from mature leaves of *A. esperanzae* has led to the isolation of three isomeric compounds with mass fragments with m/z 321 Da and 161 Da, and ultraviolet absorption at 234 nm and between 286 nm and 287 nm. Analysis by 1D- and 2D-NMR of one of these compounds allowed to stabilize its partial structure. The semi-purified ISO sample, obtained from *A. esperanzae* mature leaves and composed mainly by the isomeric mixture isolated, showed allelopathic activity on the early development of wheat, with inhibition of root development and formation of necrotic abnormalities over the shoots of these seedlings, with hormetic behavior. The activity of the compounds present in the ISO fraction showed to be different from that presented by the commercial herbicide, and may lead to the development of bioherbicides.

Keywords: Allelochemicals, phytochemistry study, bioassay-guided isolation, *cipó-mil-homens*, phytotoxicity, bioherbicides.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AcOEt – Acetato de etila	i-PrOH – Isopropanol
B.O.D. – <i>Biochemical oxygen demand</i>	<i>J</i> – Constante de acoplamento
CCD – Cromatografia de camada delgada	m - Multipleteo
CLAE-UV – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de ultravioleta	MeCN - Cianopropila
CLAE-UV-EM – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetros de ultravioleta e de massas	MeOH - Metanol
CN - Cianopropila	MES – Ácido 2-[N-morfolino]-etanossulfônico
CH ₂ Cl ₂ – Diclorometano	<i>m/z</i> – Razão massa / carga do íon
COSY- ¹ H- ¹ H – <i>Correlation spectroscopy</i>	ppm – Partes por milhão
DEPT- ¹³ C – <i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>	RMN– Ressonância magnética nuclear
DMSO – Dimetilsulfóxido	RMN- ¹ H - Ressonância magnética nuclear do hidrogênio
Hex – Hexano	RMN- ¹³ C – Ressonância magnética nuclear do carbono
HMBC – <i>Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy</i>	rpm – Rotações por minuto
HSQC – <i>Heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy</i>	Si – Sílica
	t - Tripleto
	TMS – Tetrametilsilano
	UV – Ultravioleta
	α - Nível de significância
	δ – Deslocamento químico

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 – Rendimentos dos extratos de folhas maduras, folhas jovens e raízes de <i>Aristolochia esperanzae</i>	38
TABELA 1.2. Porcentagem de inibição ou estímulo do crescimento inicial da parte aérea de espécies cultivadas e invasoras de cultura crescidas na presença dos extratos AcOEt de diferentes órgãos de <i>Aristolochia esperanzae</i>	41
TABELA 1.3. Porcentagem de inibição ou estímulo do crescimento inicial do sistema radicular de espécies cultivadas e invasoras de cultura crescidas na presença dos extratos AcOEt de diferentes órgãos de <i>Aristolochia esperanzae</i>	45
TABELA 2.1. Valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) e correlações a longa distância da substância presente na amostra ISO _{II} -P ₁ (4) em DMSO- d_6	74

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. Folha (A) e flor (B) de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze. (Fotos: ORTOLAN, R. L., 2003 (A) e JATOBÁ, L. J., 2011 (B))..... 23
- FIGURA 2. Estrutura molecular da lignana fargesina, encontrada em raízes de *Aristolochia esperanzae*. Fonte: GATTI *et al.* (2010).....23
- FIGURA 1.1 – Fluxograma da obtenção dos extratos dos diferentes órgãos de *Aristolochia esperanzae*..... 34
- FIGURA 1.2. Fragmentos de coleótilos estiolados de trigo ao fim do bioensaio realizado com o extrato AcOEt de raízes de *Aristolochia esperanzae*. (Foto: JATOBÁ, L. J., 2010).....36
- FIGURA 1.3. Porcentagem de inibição ou estímulo do alongamento de fragmentos de coleótilo de trigo (*Triticum aestivum* L.) estiolado sob a ação dos extratos de raízes (A), folhas maduras (B) e folhas jovens (C) de *A. esperanzae* e soluções do herbicida GOAL[®] em diferentes concentrações. Os valores são expressos como porcentagem do controle negativo. a Valores significativamente diferentes do controle negativo, de acordo com o teste de Welch a $\alpha = 0,05$. b Valores não significativamente diferentes do controle positivo, de acordo com o teste de Welch a $\alpha = 0,05$39
- FIGURA 1.4. Porcentagem de inibição ou estímulo do crescimento inicial da parte aérea de plântulas de agrião-da-terra (*Barbarea verna*) (A), trigo (*Triticum aestivum*) (B), amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*) (C) e capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) (D) crescidas sob a ação de soluções do extrato AcOEt de diferentes órgãos de *Aristolochia esperanzae* e do herbicida Sanson SC 40[®] em diferentes concentrações. a Valores significativamente diferentes do controle negativo de acordo com o teste de Welch a $\alpha = 0,05$. b Valores não significativamente diferentes do controle positivo, de acordo com o teste de Welch a $\alpha = 0,05$40
- FIGURA 1.5. Plântulas de capim-arroz (A) e amendoim-bravo (B) crescidas sob a ação de soluções da fração AcOEt de folhas maduras de *A. esperanzae* a 800 ppm, 400 ppm, 200 ppm, e do controle negativo (da esquerda para a direita). (Fotos: JATOBÁ, L. J., 2012).....41
- FIGURA 1.6. Porcentagem de inibição ou estímulo do crescimento inicial do sistema radicular de plântulas de agrião-da-terra (*Barbarea verna*) (A), trigo (*Triticum aestivum*) (B), amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*) (C) e capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) (D) crescidas sob a ação de soluções do extrato AcOEt de diferentes órgãos de *Aristolochia esperanzae* e do herbicida Sanson SC 40[®] em diferentes concentrações. a Valores significativamente diferentes do controle negativo de acordo com o teste de Welch a $\alpha = 0,05$. b Valores não significativamente diferentes do controle positivo, de acordo com o teste de Welch a $\alpha = 0,05$42

FIGURA 1.7. Plântulas de trigo (A) e capim-arroz (B) crescidas sob a ação de soluções da fração AcOEt de raízes de <i>A. esperanzae</i> a 800 ppm, 400 ppm, 200 ppm, e do controle negativo (da esquerda para a direita). (Fotos: JATOBÁ, L. J., 2012).....	44
FIGURA 1.8. Porcentagem de plântulas anormais de agrião-da-terra (<i>Barbarea verna</i>) (A), trigo (<i>Triticum aestivum</i>) (B), amendoim-bravo (<i>Euphorbia heterophylla</i>) (C) e capim-arroz (<i>Echinochloa crus-galli</i>) (D) relativo ao controle negativo, crescidas sob a ação de soluções do extrato AcOEt de diferentes órgãos de <i>Aristolochia esperanzae</i> e do herbicida Sanson SC 40 [®] em diferentes concentrações. a Valores significativamente diferentes do controle negativo de acordo com o teste de Welch a $\alpha = 0,05$	46
FIGURA 2.1. Estruturas do ácido aristolóquico I (1) e do d-(+)-Pinitol (2). Fonte: WU <i>et al.</i> (2005).....	57
FIGURA 2.2 – Estrutura molecular da lignana fargesina (3), encontrada em raízes de <i>Aristolochia esperanzae</i> . Fonte: GATTI <i>et al.</i> (2010).....	58
FIGURA 2.3 – Fluxograma da obtenção dos extratos dos diferentes órgãos de <i>Aristolochia esperanzae</i>	60
FIGURA 2.4. Fluxograma das separações cromatográficas do extrato AcOEt das raízes de <i>Aristolochia esperanzae</i>	63
FIGURA 2.5. Fluxograma das separações cromatográficas do extrato AcOEt das folhas maduras de <i>Aristolochia esperanzae</i>	64
FIGURA 2.6. Fluxograma da purificação por CLAE-UV da fração ISO _{II} , de folhas maduras de <i>Aristolochia esperanzae</i>	65
FIGURA 2.7. Fluxograma das separações cromatográficas do extrato AcOEt das folhas jovens de <i>Aristolochia esperanzae</i>	65
FIGURA 2.8. Porcentagem de inibição ou estímulo do alongamento de fragmentos de coleóptilo estiolado de trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.) sob a ação de diferentes frações do extrato bruto de raízes de <i>A. esperanzae</i> e soluções do herbicida GOAL [®] em diferentes concentrações. Os valores são expressos como porcentagem do controle negativo. a Valores significativamente diferentes do controle negativo, de acordo com o teste de Welch a $\alpha = 0,05$. b Valores não significativamente diferentes do controle positivo, de acordo com o teste de Welch a $\alpha = 0,05$	68
FIGURA 2.9. Porcentagem de inibição ou estímulo do alongamento de fragmentos de coleóptilo estiolado de trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.) sob a ação de diferentes frações do extrato bruto de folhas maduras de <i>A. esperanzae</i> e soluções do herbicida GOAL [®] em diferentes concentrações. Os valores são expressos como porcentagem do controle negativo. a Valores significativamente diferentes do	

controle negativo, de acordo com o teste de Welch a $\alpha = 0,05$. b Valores não significativamente diferentes do controle positivo, de acordo com o teste de Welch a $\alpha = 0,05$69

FIGURA 2.10. Porcentagem de inibição ou estímulo do alongamento de fragmentos de coleóptilo estiolado de trigo (*Triticum aestivum* L.) sob a ação de diferentes frações do extrato bruto de folhas jovens de *A. esperanzae* e soluções do herbicida GOAL® em diferentes concentrações. Os valores são expressos como porcentagem do controle negativo. a Valores significativamente diferentes do controle negativo, de acordo com o teste de Welch a $\alpha = 0,05$. b Valores não significativamente diferentes do controle positivo, de acordo com o teste de Welch a $\alpha = 0,05$70

FIGURA 2.11. Placas de CCD obtidas nas cromatografias da amostra FMC₂, resultando nas amostras FMD₁ – FMD₄, com as amostras mais ativas FMD₂ e FMD₃ indicadas pela seta (A) e da amostra FMD₃, resultando nas amostras FMD_{3b} e ISO, esta última indicada pela seta (B). As placas foram eluídas em mistura Hex / AcOEt 7:3. (Fotos: JATOBÁ, L. J., 2011).....70

FIGURA 2.12. Perfil cromatográfico por CLAE-UV da amostra ISO a 254 nm (A) e 280 nm (B)..... 71

FIGURA 2.13. Cromatograma por CLAE-UV-MS da amostra ISO_{II} e espectros de massas e absorção no ultravioleta dos compostos (4), (5) e (6).....72

FIGURA 2.14. Estrutura das subunidades 1 (A) e 2 (B) do composto presente na amostra ISO_{II}-P₁ (4) com as respectivas correlações observadas nos espectros COSY-¹H-¹H e HMBC. X₁, Y₁, X₂ e Y₂ são desconhecidos.....73

FIGURA 2.15. Estruturas do 5-hidroximetilfurfural (7) e seu derivado hemiacetal cis-*N*-feruloil-3-*O*-metildopamina (8). Fonte: NAVICKIENE e LOPES (2001).....75

FIGURA 2.16. Porcentagem de inibição ou estímulo do crescimento inicial da parte aérea (A) e sistema radicular (B) de trigo (*Triticum aestivum* L.) crescido sob a ação da fração ISO e do herbicida Sanson SC 40® em diferentes concentrações. a Valores significativamente diferentes do controle negativo de acordo com o teste de Welch a $\alpha = 0,05$76

FIGURA 2.17. Porcentagem de plântulas de trigo anormais relativo ao controle negativo. a Valores significativamente diferentes do controle negativo de acordo com o teste de Welch a $\alpha = 0,05$. Não houve diferença significativa entre os valores apresentados para as concentrações 400 ppm e 200 ppm de acordo com o teste de Welch ($p < 0,05$).....77

FIGURA 2.18. Anormalidade necrótica na parte aérea de plântula de trigo crescida na presença da fração ISO. (Foto: JATOBÁ, L. J., 2011).....78

FIGURA 2.19. Plântulas de trigo crescidas sob a ação de soluções da fração ISO, de folhas maduras de *A. esperanzae*, a 200 ppm, 400 ppm, 800 ppm, e do controle negativo. (Fotos: JATOBÁ, L. J., 2011).....79

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	18
Objetivo Geral	24
Objetivos Específicos	24
Referências	25
CAPÍTULO I	29
Atividade Alelopática dos Extratos de Folhas Maduras, Folhas Jovens e Raízes de <i>Aristolochia esperanzae</i> O. Kuntze	
RESUMO	30
ABSTRACT	31
1.1. Introdução	32
1.2. Objetivos	33
1.3. Materiais e Métodos	33
1.3.1. <i>Material Vegetal e Extração Inicial</i>	33
1.3.2. <i>Bioensaios com Coleóptilos de Trigo</i>	35
1.3.3. <i>Bioensaios de Fitotoxicidade</i>	36
1.4. Resultados e Discussão	37
1.4.1. <i>Extração Inicial</i>	37
1.4.2. <i>Bioensaios com Coleóptilos de Trigo</i>	38
1.4.3. <i>Bioensaios de Fitotoxicidade</i>	39
1.5. Conclusões	47
1.6. Referências	48
CAPÍTULO II	53
Estudo Fitoquímico e Atividade Fitotóxica de Aleloquímicos de <i>Aristolochia</i> <i>esperanzae</i> O. Kuntze	
RESUMO	54
ABSTRACT	55
2.1. Introdução	56

2.2. Objetivos	58
2.3. Materiais e Métodos	58
2.3.1. <i>Técnicas Gerais</i>	58
2.3.2. <i>Material Vegetal e Obtenção dos Extratos</i>	59
2.3.3. <i>Bioensaios com Coleóptilos de Trigo</i>	61
2.3.4. <i>Procedimentos Cromatográficos</i>	62
2.3.5. <i>Bioensaio de Fitotoxicidade</i>	66
2.4. Resultados e Discussão	67
2.4.1. <i>Estudo Fitoquímico por Isolamento Biodirigido</i>	67
2.4.2. <i>Bioensaio de Fitotoxicidade</i>	75
2.5. Conclusões	80
2.6. Referências	81
CONCLUSÕES GERAIS.....	85
ANEXOS.....	86

INTRODUÇÃO GERAL

Apesar de ser um fenômeno observado e descrito por diferentes culturas ao longo de mais de dois mil anos, o termo alelopatia foi cunhado pela primeira vez apenas em 1937, pelo fisiologista vegetal austríaco Hans Molisch, significando do grego *allelon* = mútuo e *pathos* = dano (CHOU, 2006; WILLIS, 2007). Desde então, muitos outros pesquisadores se dedicaram a aperfeiçoar a definição do termo. Rice (1984) definiu alelopatia como qualquer efeito, direto ou indireto, benéfico ou nocivo, de uma planta sobre a outra através da produção e liberação para o ambiente de substâncias químicas. Mais recentemente, Rizvi *et al.* (1999) ampliaram a abrangência do conceito, definindo o fenômeno como a influência de uma planta sobre outro organismo, prejudicando ou favorecendo-o, por meio de biomoléculas denominadas aleloquímicos produzidas por ela e lançadas no ambiente. De acordo com a Sociedade Internacional de Alelopatia, o fenômeno pode ser definido como qualquer processo envolvendo metabólitos secundários que influenciem no crescimento e desenvolvimento de sistemas naturais e cultiváveis, podendo ser produzidos por plantas, algas, bactérias ou fungos, e incluindo efeitos positivos ou negativos (INTERNATIONAL ALLELOPATHY SOCIETY, 2011).

A partir destas definições, no caso das interações planta-planta, reconhece-se uma planta doadora, aquela que produz os aleloquímicos, e um organismo alvo, que sofre seus efeitos (RIZVI *et al.*, 1999; INDERJIT e DUKE, 2003). Os compostos do metabolismo secundário com atividade alelopática podem variar em qualidade e quantidade de espécie para espécie e, dentro da mesma espécie, de um local de ocorrência para outro, já que a síntese de muitos deles é desencadeada por variações ambientais às quais as plantas estão expostas (FERREIRA e ÁQUILA, 2000). Esses compostos também podem estar presentes em todas as partes das plantas, porém sua distribuição não é uniforme, podendo variar em qualidade e quantidade nos diferentes órgãos da planta e ao longo do tempo (ALVES *et al.*, 2002). Estes compostos pertencem a diferentes classes químicas (NARWAL e SAMPIETRO, 2009), podendo ser substâncias solúveis em água, liberadas diretamente no ambiente pelas plantas vivas através de exsudação radicular ou lixiviação, por intermédio da decomposição de resíduos vegetais ou ainda, por volatilização (LOTINA-HENNSEN *et al.*, 2006).

A ação desses aleloquímicos pode ser direta, como as alterações celulares e metabólicas, ou indireta, incluindo alterações sobre os organismos que habitam o solo e têm efeito sobre propriedades e características nutricionais de outras plantas (REIGOSA *et al.*, 1999). A ação maléfica destes compostos sobre a germinação e/ou desenvolvimento da planta alvo são consequências secundárias de efeitos ocorridos anteriormente a nível molecular e celular, provocando distúrbios celulares generalizados e que agem em diversos locais de interferência (EINHELLIG, 1995; FERREIRA e ÁQUILA, 2000; NARWAL e SAMPIETRO, 2009).

Um maior número de estudos sobre o assunto é necessário, principalmente na tentativa de diferenciar os efeitos secundários dos compostos com atividade alelopática de suas causas primárias. Os compostos com atividade alelopática podem afetar a germinação e/ou desenvolvimento da planta através de seu efeito sobre a divisão, alongação, ultraestrutura celular, hormônios indutores do crescimento, permeabilidade das membranas celulares, nutrição mineral, mecanismo de abertura e fechamento dos estômatos, fotossíntese, respiração, relações hídricas internas, síntese proteica e alterações no metabolismo lipídico e de ácidos orgânicos, entre outros (NARWAL e SAMPIETRO, 2009).

A ação dos compostos com atividade alelopática na planta receptora depende de uma série de fatores, como a taxa de produção destes químicos pela planta produtora em resposta a stress biótico e abiótico (LOTINA-HENNSSEN *et al.*, 2006), tempo e extensão da exposição da planta receptora à substância inibitória (BLUM, 1995), a união química entre os compostos e a matéria orgânica do solo, sua acumulação em concentrações ativas, taxa de decomposição no solo e sinergismo entre os compostos que apresentam efeito alelopático e outras substâncias químicas no ambiente (BLUM, 2006).

Alelopatia e Ecologia

Os compostos naturais produzidos pelas plantas possuem dois papéis fundamentais para o organismo produtor: a auto-regulação e a interação da planta com o ecossistema (MACÍAS *et al.*, 2007). Os estudos sobre a interação da planta com seu ecossistema através de compostos químicos deu origem à fitoquímica ecológica, onde se inserem os estudos de alelopatia.

No ambiente natural, os efeitos da alelopatia sobre a estrutura de populações ou comunidades vegetais se confundem facilmente com os efeitos provocados pela competição por recursos, já que os dois fenômenos funcionariam de maneira integrada (INDERJIT e CALLAWAY, 2003).

Alelopatia e competição, apesar de proximamente relacionados, são fenômenos distintos e podem ser separados experimentalmente porque os efeitos da alelopatia diminuem conforme aumenta a densidade populacional da planta alvo (INDERJIT e NIELSEN, 2003). A competição representa a retirada ou redução de fatores tais como água, luz ou nutrientes. Ao contrário, a alelopatia implica na introdução ou liberação de elementos no ambiente, os aleloquímicos (CHOU, 2006). Assim, competição e alelopatia seriam processos opostos (FERREIRA e ÁQUILA, 2000). A independência destes dois processos pode ser demonstrada, pois o efeito alelopático de uma planta doadora sobre uma planta alvo diminui proporcionalmente ao aumento da densidade populacional da última, uma vez que a quantidade de aleloquímicos disponíveis para cada planta diminui com o aumento do número de indivíduos (WEIDENHAMER, 2006). Sinkkonen (2001) desenvolveu um modelo matemático que permite, a partir do conceito de dependência da densidade, a separação entre alelopatia e competição. Por meio de experimentos em casa de vegetação e em campo, Hierro e Callaway (2003) também foram bem sucedidos em demonstrar os diferentes efeitos da competição e da alelopatia no processo de invasão biológica.

A alelopatia mostra-se, assim, como uma interação química com significativa importância na determinação da estrutura e funcionamento das comunidades naturais (FRIEDMAN, 1995; CHOU, 2006; MACÍAS *et al.*, 2007).

Importância dos Estudos Fitoquímicos em Alelopatia

O primeiro passo a ser tomado nos estudos em alelopatia é avaliar o potencial alelopático de uma planta através de experimentos que demonstrem que a alelopatia pode contribuir nos efeitos negativos observados em outras plantas. Em seguida, a identificação das substâncias com possível ação alelopática deve ser realizada, assim como a determinação dos modos de produção, liberação para o ambiente e quantificação da produção basal, ou seja, a produção mínima sob ausência de estresse, dessas substâncias pela planta doadora (BLAIR *et al.*, 2009).

Graças aos recentes avanços técnicos nas áreas de cromatografia e elucidação estrutural, foi possível o isolamento e a caracterização de vários compostos, permitindo o estudo de seus papéis fisiológicos e ecológicos (MACÍAS *et al.*, 2007). Avanços recentes na metodologia de extração, isolamento, purificação e identificação têm contribuído significativamente para melhor conhecimento sobre os compostos secundários bioativos (FERREIRA e ÁQUILA, 2000). Segundo Kim *et al.* (2005), as substâncias provenientes do metabolismo secundário das plantas doadoras e que apresentam efeito alelopático em plantas alvo incluem fenóis, terpenóides, flavonóides e alcalóides, sendo os fenóis os mais abundantes em condições de campo.

Alelopatia e Bioherbicidas

Os produtos naturais, oriundos do metabolismo secundário de diversos organismos, foram utilizados ao longo da história como fonte importante de pesticidas, utilizados diretamente como preparações cruas, compostos purificados ou como pistas estruturais para a descoberta e desenvolvimento de pesticidas (DAYAN e DUKE, 2006). Apesar de subestimado, quando comparado ao uso de produtos naturais isolados de fungos e bactérias, o desenvolvimento de herbicidas baseados em metabólitos com atividade alelopática provenientes de plantas pode levar à descoberta de substâncias com novas formas de ação e menor impacto ambiental, prevenindo o desenvolvimento de resistência em populações de plantas invasoras, contaminação ambiental e dos alimentos (ANJUM e BJAWA, 2005; NARWAL, 2006; BLAIR *et al.*, 2009).

A incidência de plantas daninhas em culturas agrônômicas de interesse econômico representa sério problema devido à competição por nutrientes e luz, o que exige a adoção de medidas de controle que passam, muitas vezes, pelo uso de defensivos agrícolas que têm sido condenados pelo impacto ambiental que produzem. Uma alternativa a esses produtos são os produtos naturais provenientes do metabolismo secundário das plantas (GRISI, 2010).

Além disso, muitas substâncias do metabolismo secundário das plantas podem ter outras atividades biológicas, como atividade antioxidante, antitumoral e antiparasitária, podendo levar ao desenvolvimento de novas drogas no estudo

fitoquímico com enfoque farmacêutico (MACÍAS *et al.*, 2007; GU *et al.*, 2008; CECHINEL-FILHO, 2009).

***Aristolochia esperanzae* O. Kuntze**

O gênero *Aristolochia* (Aristolochiaceae) possui cerca de 400 espécies amplamente distribuídas, dos trópicos a zonas temperadas (WU *et al.*, 2001), sendo que dessas, 62 ocorrem no Brasil (FERRI, 1969). *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze, conhecida popularmente como cipó-mil-homens, papo-de-peru ou jarrinha é uma planta nativa do cerrado brasileiro, ocorrendo em todas as suas fisionomias e se apresentando como a espécie de *Aristolochiaceae* mais frequente nos cerrados de São Paulo. Sua distribuição estende-se do centro-nordeste do Estado de São Paulo ao oeste de Minas Gerais, sul de Goiás, oeste do Mato Grosso do Sul, ao Paraguai, sul da Bolívia e nordeste da Argentina. Consiste em planta de grande porte, perene, folhas cordiformes, flores pouco vistosas, com forte odor semelhante à carne em putrefação e forte coloração púrpura e amarelada, frutos do tipo cápsula (CARPELLARI-JUNIOR, 1991).

Apesar de ser a maior e mais rica formação vegetal de savana tropical do mundo e o segundo maior bioma da América do Sul (SILVA e BATES, 2002), o cerrado encontra-se entre os 25 *hotspots* terrestres mais importantes, restando atualmente apenas 20% de sua extensão original ainda não perturbada, e desta, apenas 1,2% preservada em áreas de proteção ambiental (MYERS *et al.*, 2000). Compreender os mecanismos que influenciam a estrutura e funcionamento das comunidades vegetais, como no caso da interação química da alelopatia, é fator crucial para o desenvolvimento de estratégias de conservação e restauração de ambientes ameaçados.

Plantas do gênero *Aristolochia* são conhecidas por seu uso medicinal por populações tradicionais e várias espécies desse gênero apresentam atividade diurética, analgésica, antiinflamatória e anticancerígena em condições de laboratório (YU *et al.*, 2007). Além disso, plantas desta família são fontes ricas em terpenóides, lignóides, alcalóides e derivados fenólicos (LOPES *et al.*, 2001). Apesar disso, poucos estudos foram desenvolvidos com o intuito de compreender a importância ecológica ou a possível aplicação na agricultura dos compostos do metabolismo secundário de espécies de *Aristolochia*.



FIGURA 1. Folha (A) e flor (B) de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze. (Fotos: ORTOLAN, R. L., 2003 (A) e JATOBÁ, L. J., 2011 (B)).

Recentes estudos sobre o efeito alelopático de *A. esperanzae* permitiram detectar a atividade alelopática de extratos aquosos dos diferentes órgãos desta planta sobre germinação e crescimento de alface (*Lactuca sativa* L.) e rabanete (*Raphanus sativus* L.) (GATTI, 2003; GATTI *et al.*, 2004), além de diminuir o tamanho médio de células do metaxilema da raiz primária de gergelim (*Sesamum indicum* L.), com efeito mais pronunciado quando utilizados extratos de raiz. O estudo fitoquímico do extrato CH_2Cl_2 de raízes de *A. esperanzae* levou à obtenção de uma fração semi-purificada que apresentava atividade alelopática contendo lignanas e esteróides, levando à identificação da lignana fargesina como seu composto majoritário (Figura 2) (GATTI *et al.*, 2010).

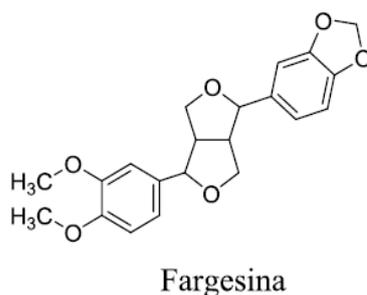


FIGURA 2. Estrutura molecular da lignana fargesina, encontrada em raízes de *Aristolochia esperanzae*. Fonte: GATTI *et al.* (2010).

Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo o isolamento, caracterização e a avaliação da atividade alelopática de compostos do metabolismo secundário de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze.

Objetivos Específicos

Os objetivos específicos foram:

1. Avaliar a atividade inibitória dos diferentes extratos orgânicos de folhas maduras, folhas jovens e raízes de *A. esperanzae* sobre o alongamento de coleótilos de trigo, bem como investigar a atividade alelopática de diferentes concentrações dos extratos mais ativos sobre o desenvolvimento inicial de duas espécies cultivadas e duas espécies invasoras de culturas agrícolas. Comparar a atividade com a de um herbicida comercial e também se existe efeito distinto sobre plantas mono e eudicotiledôneas.

2. Realizar o estudo fitoquímico por isolamento biodirigido e apresentar o perfil de atividade fitotóxica de aleloquímicos presentes nos diferentes órgãos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze, assim como avaliar a atividade fitotóxica de aleloquímicos de folhas maduras desta planta (fração ISO) sobre o desenvolvimento inicial de *Triticum aestivum* L. (trigo), comparando-a à atividade do herbicida comercial Sanson 40 SC®.

Referências

- ALVES, S. M.; ARRUDA, M. S. P.; SOUZA-FILHO, A. P. S. Biossíntese e distribuição de substâncias alelopáticas. In: SOUZA-FILHO, A. P. S.; ALVES, S. M. (Eds.). **Alelopatia: Princípios Básicos e Aspectos Gerais**. Belém, PA, EMBRAPA Amazônia Oriental, 2002. p. 79-110.
- ANJUM, T.; BJAWA, R. A bioactive annouionone from sunflower leaves. **Phytochemistry**, v. 66, n. 16, p. 1919-1921, 2005.
- BLAIR, A. C.; WESTON, L. A.; NISSEN, S. J.; BRUNK, G. R.; HUFBAUER, R. A. The importance of analytical techniques in allelopathy studies with the reported allelochemical catechin as an example. **Biological Invasions**, v. 11, n. 2, p. 325-332, 2009.
- BLUM, U. The value of model plant – microbe – soil systems for understanding processes associated with allelopathic interaction: one example. In: INDERJIT; DAKSHINI, K. M. M.; EINHELLIG, F. A. (Eds.). **Allelopathy: Organisms, Processes and Applications**. ACS Symposium Series, 1995.
- BLUM, U. Allelopathy: A soil system perspective. In: REIGOSA, M. J.; PEDROL, N.; GONZÁLEZ, L. (Eds.). **Allelopathy – A Physiological Process With Ecological Implications**. Netherlands, Springer, 2006. p. 299-340.
- CARPELLARI-JUNIOR, L. **Espécies de *Aristolochia* L. (Aristolochiaceae) Ocorrentes no Estado de São Paulo**. 1991. 205 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – IB, UNICAMP, Campinas, 1991.
- CECHINEL-FILHO, V. Produtos naturais e sintéticos com potencial terapêutico: 15 anos de estudos realizados no núcleo de investigações químico-farmacêuticas (NIQFAR)/UNIVALI. **Revista Fitos**, v. 4, n. 2, p. 6-23, 2009.
- CHOU, C. H. Introduction to allelopathy. In: REIGOSA, M. J.; PEDROL, N.; GONZÁLEZ, L. (Eds.). **Allelopathy – A Physiological Process With Ecological Implications**. Netherlands, Springer, 2006. p. 1-9.
- DAYAN, F. E.; DUKE, S. O. Clues in the search for new herbicides. In: REIGOSA, M. J.; PEDROL, N.; GONZÁLEZ, L. (Eds.). **Allelopathy – A Physiological Process With Ecological Implications**. Netherlands, Springer, 2006. p. 63-83.
- EINHELLIG, F. A. Mechanism of action of allelochemicals in allelopathy. In: INDERJIT; DAKSHINI, K. M. M.; EINHELLIG, F. A. (Eds.). **Allelopathy: Organisms, Processes and Applications**. ACS Symposium Series, 1995.
- FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, edição especial, p. 175-204, 2000.

FERRI, M. G. **Plantas do Brasil – Espécies do Cerrado**. São Paulo, Editora Edgard Blucher Ltda / EDUSP, 1969.

FRIEDMAN, J. Allelopathy, autotoxicity, and germination. In: KIGEL, L.; GALILI, G. (Eds.). **Seed Development and Germination**. New York, Marcel Dekker Inc, 1995.

GATTI, B. A. **Atividade Alelopática de Extratos Aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Ktze e *Ocotea odorifera* (Vell) Rohwer na Germinação e Crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L.** 2003. 148 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – CCBS, UFSCar, São Carlos, 2003.

GATTI, B. A.; PEREZ, S. C. J. G. A.; LIMA, M. I. S. Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L.. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n.3, p. 459-472, 2004.

GATTI, A. B.; FERREIRA, A. G.; ARDUIM, M.; PEREZ, S. C. J. G. A. Allelopathic effects of aqueous extracts of *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze on development of *Sesamum indicum* L. seedlings. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n.2, p. 454-461, 2010.

GRISI, P. U. **Potencial Alelopático de *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae)**. 2010. 127 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – CCBS, UFSCar, São Carlos, 2011.

GU, L.; WU, T.; WANG, Z. TLC bioautography-guided isolation of antioxidants from fruit of *Perilla frutescens* var. *acuta*. **Food, Science and Technology**, v. 42, p. 131-136, 2008.

HIERRO, J.L.; CALLAWAY, R.M. Allelopathy and exotic plant invasion. **Plant and Soil**, v. 256, n. 1, p. 29-39, 2003.

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

INDERJIT; DUKE, S. O. Ecophysiological aspects of allelopathy. **Planta**, v. 217, n. 4, p. 529-539, 2003.

INDERJIT; NIELSEN, E. Bioassays and field studies for allelopathy in terrestrial plants: progress and problems. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, n. 3-4, p. 221-238, 2003.

INTERNATIONAL ALLELOPATHY SOCIETY [Online]; 2011. <http://www.international-allelopathy-society.org> (Acessado em 01 de Novembro de 2011).

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

LOPES, L. M. X.; NASCIMENTO, I. R.; SILVA, T. Phytochemistry of the Aristolochiaceae family. In: **Research Advances in Phytochemistry**. Global Research Network, Ed. Kerala, vol. 2, 2001.

LOTINA-HENNSEN, B.; KING-DIAZ, B.; AGUILAR, M. I.; HERNANDEZ TERRONES, M. G. Plant secondary metabolites. Targets and mechanisms of allelopathy. In: REIGOSA, M. J.; PEDROL, N.; GONZÁLEZ, L. (Eds.). **Allelopathy – A Physiological Process With Ecological Implications**. Netherlands, Springer, 2006. p. 229-265.

MACÍAS, F. A.; GALINDO, J. L. G.; GALINDO, J. C. G. Evolution and current status of ecological phytochemistry. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22-24, p. 2917-2936, 2007.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.

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

NARWAL, S. S.; SAMPIETRO, D. A. Allelopathy and allelochemicals. In: SAMPIETRO, D. A.; CATALAN, C. A. N.; VATTUONE, M. A. (Eds.). **Isolation, Identification and Characterization of Allelochemicals / Natural Products**. USA, Science Publishers, 2009. p. 3-5.

REIGOSA, M. J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.; GONZÁLEZ, L. Ecophysiological approach in allelopathy. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 18, n. 5, p. 577-608, 1999.

RICE, E. L. **Allelopathy**. USA, Academic press, 1984.

RIZVI, S. J. H.; TAHIR, M.; RIZVI, V.; KOHLI, R. K.; ANSARI, A. Allelopathic interactions in agroforestry systems. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 18, n. 6, p. 773-796, 1999.

SILVA, J. M. C. & BATES, J. M. Biogeographic patterns and conservation in the south american cerrado: a tropical savana hotspot. **BioScience**, v. 52, n. 3, p. 225-234, 2002.

SINKKONEN, A. Density-dependent chemical interference – an extension of the biological response model. **Journal of Chemical Ecology**, v. 27, n. 7, p. 1513-1523, 2001.

WEIDENHAMER, J. D. Distinguishing allelopathy from source competition: the role of density. In: REIGOSA, M. J.; PEDROL, N.; GONZÁLEZ, L. (Eds.). **Allelopathy – A**

Physiological Process With Ecological Implications. Netherlands, Springer, 2006. p. 299-340.

WILLIS, R. J. **The History of Allelopathy.** Netherlands, Springer, 2007. 316 p.

WU, T.; CHAN, Y. Y. & LEU, Y. L. Constituents of the roots and stems of *Aristolochia mollissima*. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 1, p. 71-74, 2001.

YU, J. Q.; LIAO, Z. X.; CAI, X. Q.; LEI, J. C. & ZOU, G. L. Composition, antimicrobial activity and cytotoxicity of essential oils from *Aristolochia mollissima*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 23, n. 2, p. 162-167, 2007.

CAPÍTULO I

**Atividade Alelopática dos Extratos de Folhas Maduras,
Folhas Jovens e Raízes de *Aristolochia esperanzae* O.
Kuntze**

RESUMO

A alelopatia, definida como qualquer processo envolvendo metabólitos secundários que influenciam no crescimento e desenvolvimento de sistemas naturais e cultiváveis, representa uma alternativa ao uso de defensivos agrícolas para o controle de plantas daninhas, com menor impacto ambiental. Plantas do gênero *Aristolochia* são conhecidas por seu uso na medicina tradicional, porém poucos estudos foram realizados sobre a importância ecológica de seus compostos secundários ou sua possível aplicação na agricultura. O presente estudo teve por objetivo avaliar a fitotoxicidade de extratos orgânicos de folhas maduras, folhas jovens e raízes de *A. esperanzae* e sua possível aplicação na agricultura para controle de espécies invasoras de culturas agrícolas. Plântulas de duas espécies cultivadas - *Triticum aestivum* L. (trigo) e *Barbarea verna* (P. Mill.) Aschers. (agrião-da-terra) - e duas espécies invasoras de culturas agrícolas - *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. (capim-arroz) e *Euphorbia heterophylla* L. (amendoim-bravo) - foram crescidas em soluções a 800, 400 e 200 ppm do extrato ativo AcOEt dos diferentes órgãos de *A. esperanzae* e do herbicida comercial Sanson 40 SC[®]. Os extratos apresentaram atividade alelopática sobre o desenvolvimento das espécies alvo testadas, com maior atividade do extrato AcOEt de folhas maduras sobre a parte aérea e do extrato AcOEt de raízes sobre o sistema radicular, com resultados semelhantes aos apresentados pelo herbicida para as espécies invasoras de culturas agrícolas. Além disso, observou-se a influência do estágio de maturação das folhas de *A. esperanzae* em sua atividade alelopática, já que o extrato de folhas maduras mostrou-se mais ativo que o de folhas jovens.

Palavras-chave: Atividade fitotóxica, desenvolvimento inicial, bioherbicidas.

ABSTRACT

Allelopathy, defined as any process involving secondary metabolites that influence the growth and development of natural and cultivated systems, represents an alternative to the use of pesticides on weed control, with less environmental impact. Plants of the *Aristolochia* genus are known for their use in traditional medicine, but few studies have been conducted on the ecological importance of their secondary compounds and their possible application in agriculture. This study aimed to evaluate the phytotoxicity of organic extracts from roots, mature leaves and young leaves of *A. esperanzae* and its possible application in agriculture to control weed species. Seedlings of two cultivated species - *Triticum aestivum* L. (wheat) and *Barbarea verna* (P. Mill.) Aschers. (watercress) - and two weed species - *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. (barnyardgrass) and *Euphorbia heterophylla* L. (wild poinsettia) - were grown in solutions at 800, 400 and 200 ppm of the active EtOAc extract of *A. esperanzae* different organs and of the commercial herbicide Sanson 40 SC[®]. The extracts showed allelopathic activity on the development of target species tested, with greater activity of the EtOAc extract from mature leaves on the shoots and the EtOAc extract from roots over the roots of these seedlings, with results similar to those presented by the herbicide to the weed species. In addition, we observed the influence of maturation stage of *A. esperanzae* leaves in their allelopathic activity as the mature leaves extract was more active than the young leaves one.

Keywords: Phytotoxicity, initial development, bioherbicides.

1.1. Introdução

A alelopatia é definida pela Sociedade Internacional de Alelopatia como qualquer processo envolvendo metabólitos secundários que influenciam no crescimento e desenvolvimento de sistemas naturais e cultiváveis, podendo ser produzidos por plantas, algas, bactérias ou fungos, e incluindo efeitos positivos ou negativos (INTERNATIONAL ALLELOPATHY SOCIETY, 2011). No caso das plantas, os compostos do metabolismo secundário possuem dois papéis fundamentais: a auto-regulação e a interação da planta com o ecossistema (MACÍAS *et al.*, 2007a). Nas interações ecológicas, muitos compostos do metabolismo secundário de plantas atuam como defesa química contra o ataque de insetos, microrganismos patogênicos e pressão de competição com outras plantas. Ao longo do tempo evolutivo, o processo de ação-reação entre vegetais e organismos predadores ou competidores pode ter levado à co-evolução de plantas e seus inimigos naturais, resultando na grande biodiversidade hoje observada, não apenas em riqueza de espécies, mas também na grande variedade de metabólitos secundários em sua composição química (MACÍAS *et al.*, 2007a; MACÍAS *et al.*, 2007b).

Os produtos naturais, oriundos do metabolismo secundário de diversos organismos, foram utilizados ao longo da história como fonte importante de pesticidas, utilizados diretamente como preparações cruas, compostos purificados ou como pistas estruturais para a descoberta e desenvolvimento de pesticidas (KIM *et al.*, 2005). Apesar de subestimado, quando comparado ao uso de produtos naturais isolados de fungos e bactérias, o desenvolvimento de herbicidas baseados em metabólitos com atividade alelopática provenientes de plantas pode levar à descoberta de substâncias com novas formas de ação e menor impacto ambiental, prevenindo o desenvolvimento de resistência em populações de plantas invasoras, contaminação ambiental e dos alimentos (ANJUM e BJAWA, 2005; NARWAL, 2006; BLAIR *et al.*, 2009).

A incidência de plantas daninhas em culturas agrônômicas de interesse econômico representa sério problema devido à competição por nutrientes e luz, o que exige a adoção de medidas de controle que passam, muitas vezes, pelo uso de

defensivos agrícolas que têm sido condenados pelo impacto ambiental que produzem. Uma alternativa a esses produtos são os produtos naturais provenientes do metabolismo secundário das plantas (GRISI, 2010).

Plantas do gênero *Aristolochia* são conhecidas por seu uso na medicina tradicional (LOPES *et al.*, 2001), porém poucos estudos foram realizados sobre elas no tocante ao seu potencial alelopático, de maneira a compreender a importância ecológica de seus compostos do metabolismo secundário ou sua possível aplicação na agricultura. Estudos recentes demonstraram o potencial alelopático de extratos aquosos dos diferentes órgãos desta planta (GATTI *et al.*, 2004; GATTI *et al.*, 2010).

1.2. Objetivos

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a atividade inibitória dos diferentes extratos orgânicos de folhas maduras, folhas jovens e raízes de *A. esperanzae* sobre o alongamento de coleótilos de trigo, bem como investigar a atividade alelopática de diferentes concentrações dos extratos mais ativos sobre o desenvolvimento inicial de duas espécies cultivadas e duas espécies invasoras de culturas agrícolas. Comparar a atividade com a de um herbicida comercial e também se existe efeito distinto sobre plantas mono e eudicotiledôneas.

1.3. Materiais e Métodos

1.3.1. Material Vegetal e Extração Inicial

Folhas e raízes de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze foram coletadas no jardim experimental do Departamento de Botânica da UFSCar em Maio de 2010 (voucher depositado no herbário do Departamento de Botânica – UFSCar sob nº 7199). Folhas jovens e maduras foram separadas. Folhas jovens foram consideradas aquelas que apresentavam coloração verde clara e textura membranosa, enquanto que as folhas verdes escuras e de textura cartácea foram consideradas como maduras (GRISI, 2010). Folhas maduras, jovens e raízes foram lavadas em água corrente, as duas primeiras foram secas em casa de vegetação em temperatura ambiente e à sombra, por cinco dias. As raízes foram secas em estufa

de circulação forçada de ar a 40°C por 72h. Após a secagem, os três materiais vegetais foram triturados em moinho industrial.

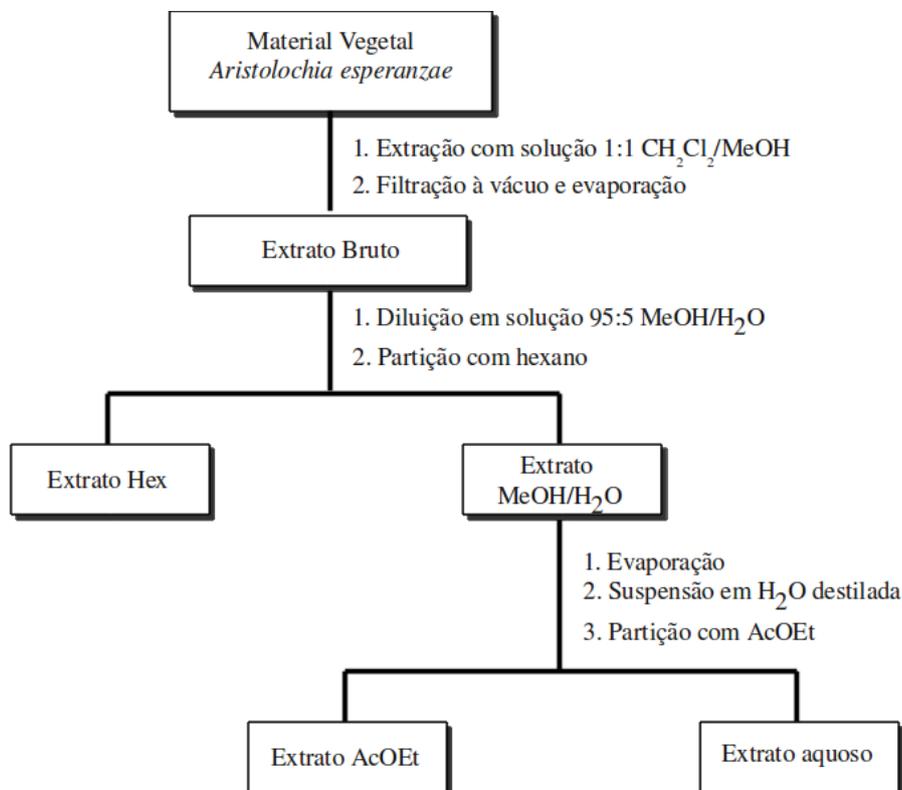


FIGURA 1.1 – Fluxograma da obtenção dos extratos dos diferentes órgãos de *Aristolochia esperanzae*.

A extração inicial foi realizada, para folhas maduras e raízes, utilizando-se 200 g de pó e 600 mL de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ em banho de ultra-som durante 30 minutos. Para folhas jovens, a extração inicial foi realizada utilizando-se 60 g de pó e 250 mL de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ em banho de ultra-som durante 30 minutos (ROSTAGNO *et al.*, 2003; AIBU *et al.*, 2004). Após filtragem a vácuo, o processo foi repetido à exaustão, para todos os materiais vegetais. Os extratos brutos foram evaporados sob baixa pressão a 37°C, diluídos em solução 95:5 de $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ e particionados com hexano (3 x 600 mL). Os extratos obtidos foram outra vez evaporados sob baixa pressão a 37°C. Em sequência, os extratos MeOH foram evaporados, suspensos em água destilada e particionados com AcOEt (3 x 600 mL) (adaptado de OTSUKA, 2006). Os extratos AcOEt foram evaporados sob baixa pressão a 37°C e os extratos aquosos foram evaporados em sistema de centrifuga a vácuo Savant modelo Speedvac® Plus SC 210 à securo. O procedimento de extração está

sumarizado na Figura 1.1. Os extratos Hex, AcOEt e aquoso obtidos para cada órgão estudado foram submetidos a bioensaios com coleóptilos de trigo, como descrito a seguir.

1.3.2. Bioensaios com Coleóptilos de Trigo

A atividade biológica dos extratos obtidos foi testada utilizando-se bioensaios com fragmentos de coleóptilo estiolado de trigo. Sementes de trigo (*Triticum aestivum* L. cv. BRS264) foram distribuídas em caixas gerbox forradas com duas folhas de papel filtro e umedecidas com 10 mL de água destilada. As caixas foram embrulhadas em papel alumínio e acondicionadas em incubadora B.O.D. durante 72 h, a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, no escuro. As plântulas estioladas de trigo assim obtidas foram cortadas com a ajuda de uma guilhotina de Van der Veij sob luz verde de segurança. Os ápices (2 mm) foram descartados e o restante foi cortado em fragmentos de 4 mm utilizado nos bioensaios (NITSCH e NITSCH, 1956; MACÍAS *et al.*, 2010). Os extratos testados foram pré-solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídos em solução tampão (pH = 5.6) de fosfato de potássio (250 mL de água destilada, 5 g de sacarose, 0,2625 g de ácido cítrico e 0,725 g de fosfato de potássio di-básico) para obter soluções a 800, 400 e 200 ppm, com concentração constante de 5 $\mu\text{L/mL}$ de DMSO em cada concentração (MACÍAS *et al.*, 2006).

As soluções preparadas em cada tratamento foram testadas em triplicata, adicionando 2 mL de cada em tubos de ensaio e cinco coleóptilos de trigo em cada tubo de ensaio. Dois controles foram realizados, um controle negativo com solução tampão e DMSO (5 $\mu\text{L/mL}$) e um controle positivo com o herbicida comercial GOAL[®] (ingrediente ativo Oxifluorfen = 240 g/L) solubilizado em solução tampão a 800, 400 e 200 ppm e DMSO (5 $\mu\text{L/mL}$) (MACÍAS *et al.*, 2006; GARCÍA, 2009). Os tubos de ensaio foram tampados e mantidos em incubadora B.O.D. a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ no escuro, com rotação constante (0,25 rpm) (GARCÍA, 2009). Após 24 h, os coleóptilos foram retirados os tubos, fotografados e medidos utilizando o software Image-Pro Plus[®] 5.0 (Figura 1.2).

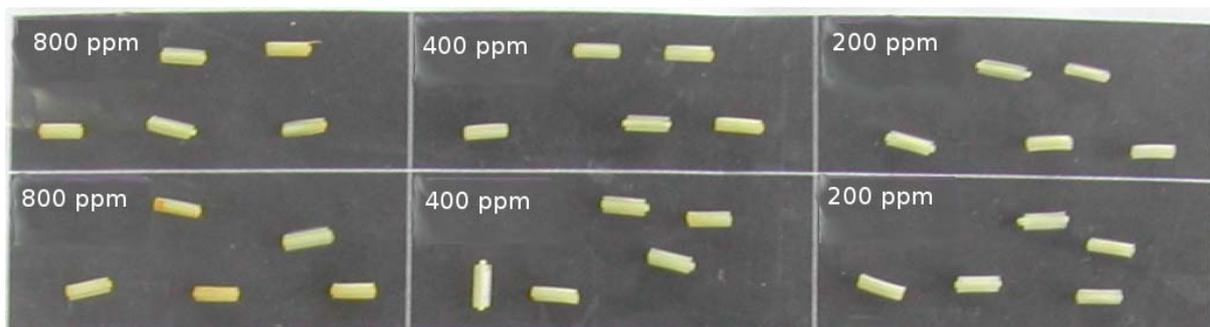


FIGURA 1.2. Fragmentos de coleótilos estiolados de trigo ao fim do bioensaio realizado com o extrato AcOEt de raízes de *Aristolochia esperanzae*. (Foto: JATOBÁ, L. J., 2010).

Os dados foram submetidos ao teste de Welch a $\alpha = 0,05$ para comparação entre médias, com o auxílio do software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011), e apresentados como porcentagem de inibição ou estímulo em relação ao controle negativo. Assim, o zero representa o controle negativo, os valores positivos representam estímulo e os valores negativos representam inibição (MACÍAS *et al.*, 2010).

1.3.3. Bioensaios de Fitotoxicidade

O extrato AcOEt de folhas maduras, folhas jovens e raízes de *Aristolochia esperanzae* foi testado quanto à sua atividade fitotóxica sobre o crescimento inicial de *Triticum aestivum* L. (trigo) e *Barbarea verna* (P. Mill.) Aschers. (agrião-da-terra), duas espécies cultivadas, e de *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. (capim-arroz) e *Euphorbia heterophylla* L. (amendoim-bravo), duas espécies invasoras de culturas agrícolas.

Para a realização dos bioensaios, 51 mg do extrato AcOEt de cada material vegetal foi solubilizado em solução tampão 10 mM de ácido 2-[N-morfolino]-etanossulfônico (MES), com pH ajustado a 5,6 com solução 1M de hidróxido de sódio e DMSO (5 μ L/mL) para obter soluções a 800, 400 e 200 ppm (MACÍAS *et al.*, 2010). Além dos tratamentos contendo o extrato, foram realizados dois controles, um negativo com solução tampão e DMSO (5 μ L/mL) e outro positivo com o herbicida comercial Sanson 40 SC[®] (ingrediente ativo Nicossulfurom = 40 g/L) e DMSO (5 μ L/mL), nas diluições de 800, 400 e 200 ppm. Os bioensaios foram realizados utilizando-se quatro repetições em caixas plásticas transparentes (13 x 8 x 3 cm) forradas com duas folhas de papel de filtro e umedecidas com 8 mL do extrato ou do

herbicida nas diferentes concentrações, além do controle negativo. Sementes de cada espécie alvo foram pré-germinadas em água destilada, em incubadora B.O.D. sob condições ideais estabelecidas por experimentos preliminares. Dez sementes pré-germinadas de cada espécie alvo, ou seja, que apresentavam radícula de 2 mm de comprimento, foram semeadas em cada caixa e acondicionadas em incubadora B.O.D. sob condições ótimas de temperatura e luminosidade durante 7 dias. Ao final desse período as plântulas foram avaliadas quanto à sua normalidade, o comprimento da parte aérea e subterrânea das plantas foi medido. Plântulas anormais são aquelas que não apresentam potencial para continuar seu desenvolvimento, com parte aérea ou raízes podres, necróticas, atrofiadas ou completamente ausentes. Plântulas mortas também estão incluídas nesta classificação (REGRAS..., 2009).

Os dados são apresentados como porcentagem de inibição ou estímulo do crescimento inicial, em relação ao controle negativo. Estes foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Barlett a $\alpha = 0,05$ para a avaliação da normalidade e homocedasticidade dos dados, e então submetidos ao teste de Welch a $\alpha = 0,05$ para comparação entre médias (SANTANA e RANAL, 2004). Todas as análises foram realizadas utilizando o software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011).

1.4. Resultados e Discussão

1.4.1. Extração Inicial

Ao final do processo de extração inicial, obteve-se três extratos orgânicos para cada material vegetal, os extratos Hex, AcOEt e aquoso. Os rendimentos obtidos para cada extrato, com relação à massa inicial de pó seco, são apresentados na Tabela 1.1.

TABELA 1.1 – Rendimentos¹ dos extratos de folhas maduras, folhas jovens e raízes de *Aristolochia esperanzae*.

Extrato	Material Vegetal		
	Folhas Maduras	Folhas Jovens	Raízes
Hex	20,7837 g (10,40%)	7,1410 g (11,90%)	10,5731 g (5,29%)
AcOEt	16,3350 g (8,17%)	5,0036 g (83,39%)	8,1228 g (4,06%)
Aquoso	8,7910 g (4,40%)	2,0401 g (3,40%)	15,4650 g (7,73%)
Total	45,9097 g (22,95%)	14,1847 g (23,64%)	34,1609 g (17,08%)

¹Massa (g) e percentual relativo à massa de material vegetal utilizada na extração inicial.

1.4.2. Bioensaios com Coleóptilos de Trigo

Os extratos obtidos na extração inicial sumarizada na Figura 1.1 foram submetidos a bioensaios com fragmentos de coleóptilo de trigo estiolado. O extrato AcOEt foi o mais ativo na inibição do alongamento dos coleóptilos de trigo para os três materiais vegetais, enquanto o extrato aquoso de folhas maduras e raízes apresentou atividade estimulativa (Figura 1.3).

A partir da metodologia adotada, espera-se encontrar substâncias de baixa polaridade no extrato Hex, como ácidos graxos. No extrato aquoso espera-se encontrar substâncias de alta polaridade, como açúcares. No extrato AcOEt, de polaridade intermediária, espera-se encontrar substâncias como fenóis, terpenóides, flavonóides e alcalóides, provenientes do metabolismo secundário da planta. Substâncias que apresentam atividade alelopática pertencem principalmente a esses grupos (KIM *et al.*, 2005).

A atividade estimulante do alongamento dos coleóptilos de trigo apresentada pelo extrato aquoso de folhas maduras e raízes de *A. esperanzae* pode ser explicada pela maior concentração de açúcares nestes extratos. Esse efeito mais pronunciado no extrato aquoso de folhas maduras sugere a possível presença de compostos com ação estimulante de multiplicação ou alongamento celular do tecido vegetal testado (Figura 1.3).

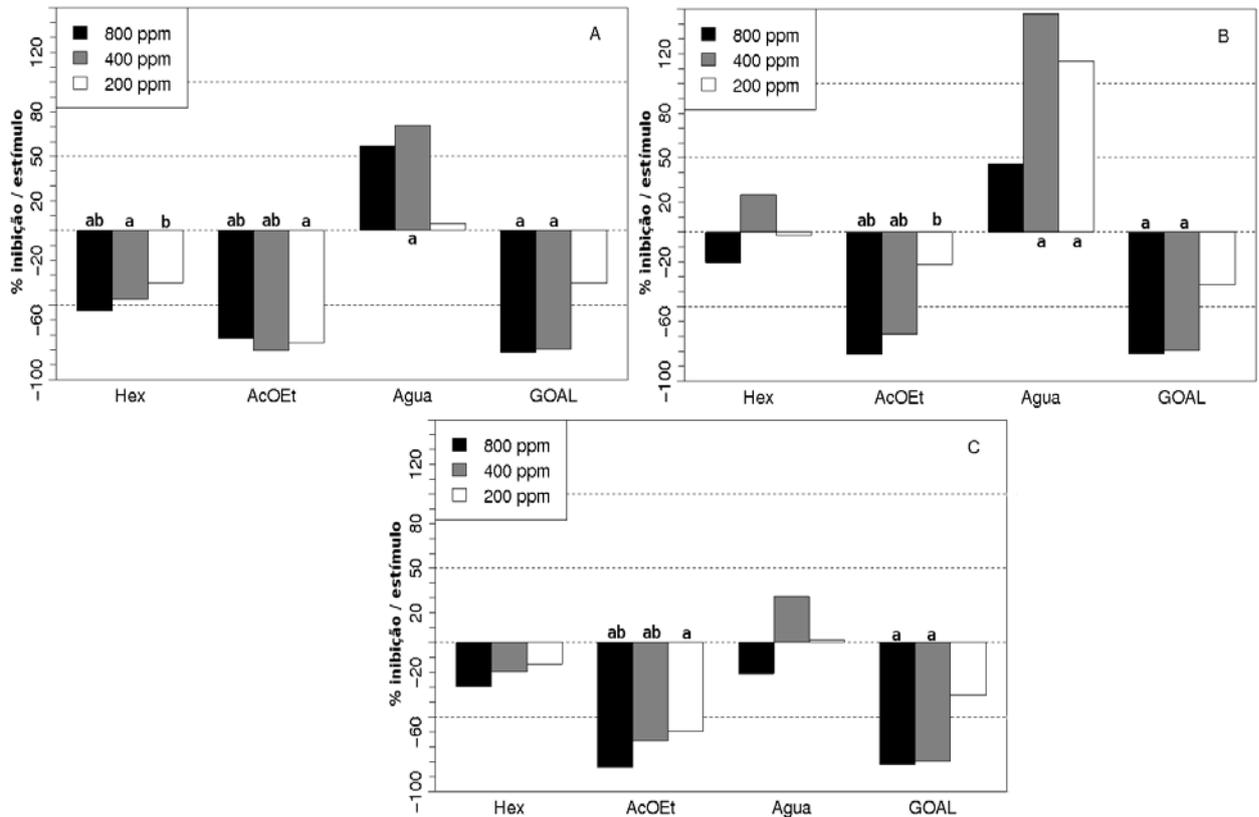


FIGURA 1.3. Porcentagem de inibição ou estímulo do alongamento de fragmentos de coleótilo de trigo (*Triticum aestivum* L.) estiolado sob a ação dos extratos de raízes (A), folhas maduras (B) e folhas jovens (C) de *A. esperanzae* e soluções do herbicida GOAL[®] em diferentes concentrações. Os valores são expressos como porcentagem do controle negativo. a Valores significativamente diferentes do controle negativo, de acordo com o teste de Welch a $\alpha = 0,05$. b Valores não significativamente diferentes do controle positivo, de acordo com o teste de Welch a $\alpha = 0,05$.

Devido a sua ação inibitória, os extratos AcOEt foram utilizados nos bioensaios de fitotoxicidade.

1.4.3. Bioensaios de Fitotoxicidade

Para o desenvolvimento inicial da parte aérea, observou-se inibição do crescimento em todas as espécies alvo testadas, na presença dos extratos AcOEt dos três materiais vegetais, quando comparado com o controle negativo (Figura 1.4). As duas espécies invasoras de culturas agrícolas apresentaram-se mais resistentes à ação do herbicida Sanson 40 SC[®]. Sob a ação das soluções do extrato AcOEt de raízes de *A. esperanzae*, apresentaram inibição do crescimento equivalente ao herbicida para amendoim-bravo, enquanto que sob a ação do extrato AcOEt de folhas maduras e folhas jovens, apresentaram inibição similar ou superior à do

herbicida para as duas espécies (Figuras 1.4-C, 1.4-D e 1.5). Para as espécies cultivadas, o extrato AcOEt de folhas maduras causou efeito inibitório superior ao do herbicida comercial apenas sob o desenvolvimento da parte aérea de agrião (Figura 1.4-A).

Quando comparados entre si, o extrato AcOEt de folhas maduras de *A. esperanzae* apresenta maior atividade inibitória sobre o desenvolvimento inicial da parte aérea de todas as espécies alvo testadas, com exceção de amendoim-bravo, que apresentou a mesma resposta inibitória para os extratos dos três materiais vegetais testados (Tabela 1.2).

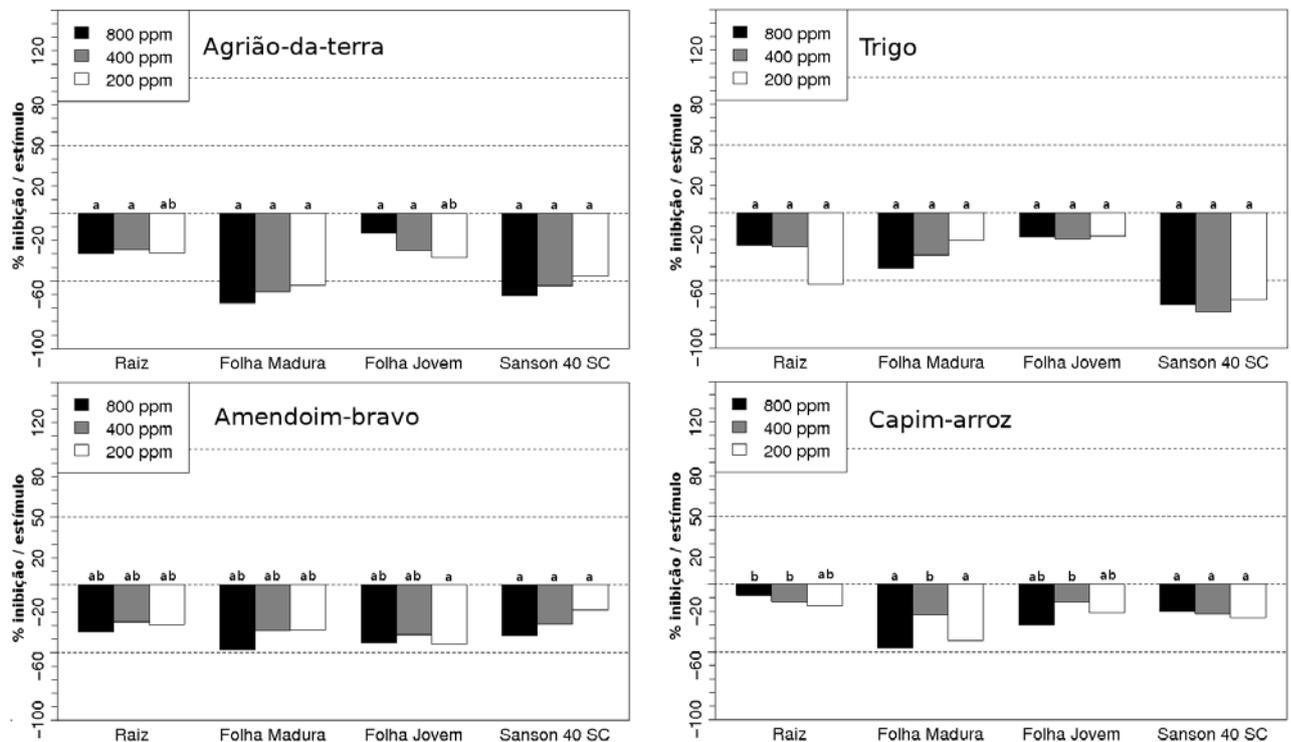


FIGURA 1.4. Porcentagem de inibição ou estímulo do crescimento inicial da parte aérea de plântulas de agrião-da-terra (*Barbarea verna*) (A), trigo (*Triticum aestivum*) (B), amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*) (C) e capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) (D) crescidas sob a ação de soluções do extrato AcOEt de diferentes órgãos de *Aristolochia esperanzae* e do herbicida Sanson SC 40[®] em diferentes concentrações. a Valores significativamente diferentes do controle negativo de acordo com o teste de Welch a $\alpha = 0,05$. b Valores não significativamente diferentes do controle positivo, de acordo com o teste de Welch a $\alpha = 0,05$.

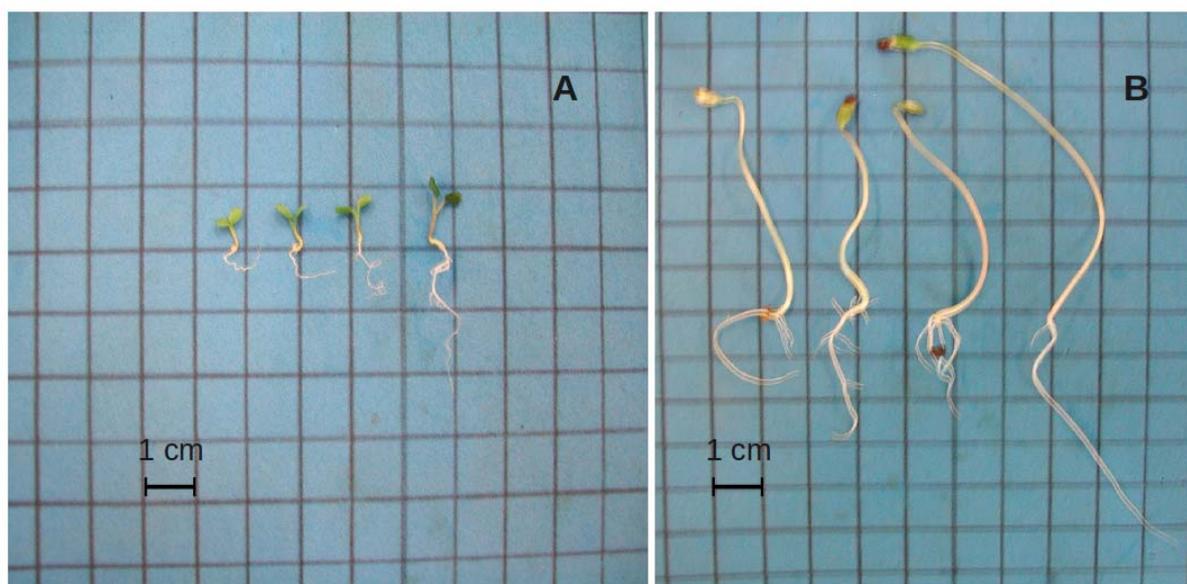


FIGURA 1.5. Plântulas de agrião-da-terra (A) e amendoim-bravo (B) crescidas sob a ação de soluções da fração AcOEt de folhas maduras de *A. esperanzae* a 800 ppm, 400 ppm, 200 ppm, e do controle negativo (da esquerda para a direita). (Fotos: JATOBÁ, L. J., 2012).

TABELA 1.2. Porcentagem de inibição ou estímulo do crescimento inicial da parte aérea de espécies cultivadas e invasoras de cultura crescidas na presença dos extratos AcOEt de diferentes órgãos de *Aristolochia esperanzae*.

Espécie Alvo	Material Vegetal	Porcentagem de Inibição ^{1,2}		
		800 ppm	400 ppm	200 ppm
<i>Agrião-da-terra</i>	Raízes	-30,05±5,38 a	-27,07±4,15 a	-29,53±4,64 a
	Folhas Maduras	-66,30±10,04 b	-57,75±5,33 ab	-53,44±13,81 b
	Folhas Jovens	-14,85±6,84 c	-53,95±5,18 b	-32,49±10,08 ab
<i>Trigo</i>	Raízes	-24,47±4,30 a	-25,45±10,32 ab	-53,34±25,70 a
	Folhas Maduras	-41,30±5,22 b	-31,53±5,40 a	-20,36±4,28 a
	Folhas Jovens	-17,93±4,73 a	-19,70±4,69 b	-17,13±4,27 a
<i>Amendoim-bravo</i>	Raízes	-34,77±7,30 a	-27,51±5,53 a	-29,31±13,46 a
	Folhas Maduras	-48,14±10,59 a	-33,80±2,90 a	-33,10±8,07 a
	Folhas Jovens	-42,73±2,21 a	-37,00±14,29 a	-43,77±4,29 a
<i>Capim-arroz</i>	Raízes	-8,22±8,80 a	-12,92±9,77 a	-15,82±9,00 a
	Folhas Maduras	-46,81±6,29 b	-22,62±51,44 a	-41,89±9,00 b
	Folhas Jovens	-30,03±6,47 c	-13,03±12,63 a	-21,21±4,63 a

¹Médias seguidas das mesmas letras na mesma coluna e espécie alvo não diferem entre si de acordo com o teste de Welch a $\alpha = 0,05$. ²Média±desvio padrão.

Para o desenvolvimento inicial do sistema radicular, observou-se inibição do crescimento em agrião, trigo e capim-arroz, na presença dos extratos

AcOEt dos três materiais vegetais, quando comparado com o controle negativo. Para amendoim-bravo, observou-se inibição apenas na maior concentração do extrato AcOEt de raízes de *A. esperanzae* (Figura 1.6). Raízes são frequentemente os tecidos mais sensíveis das plântulas à ação dos aleloquímicos (FERREIRA, 2004) e no caso dos extratos AcOEt de *A. esperanzae*, com exceção de amendoim-bravo, as espécies alvo apresentaram maior inibição do desenvolvimento radicular do que da parte aérea (Figuras 1.4 e 1.6).

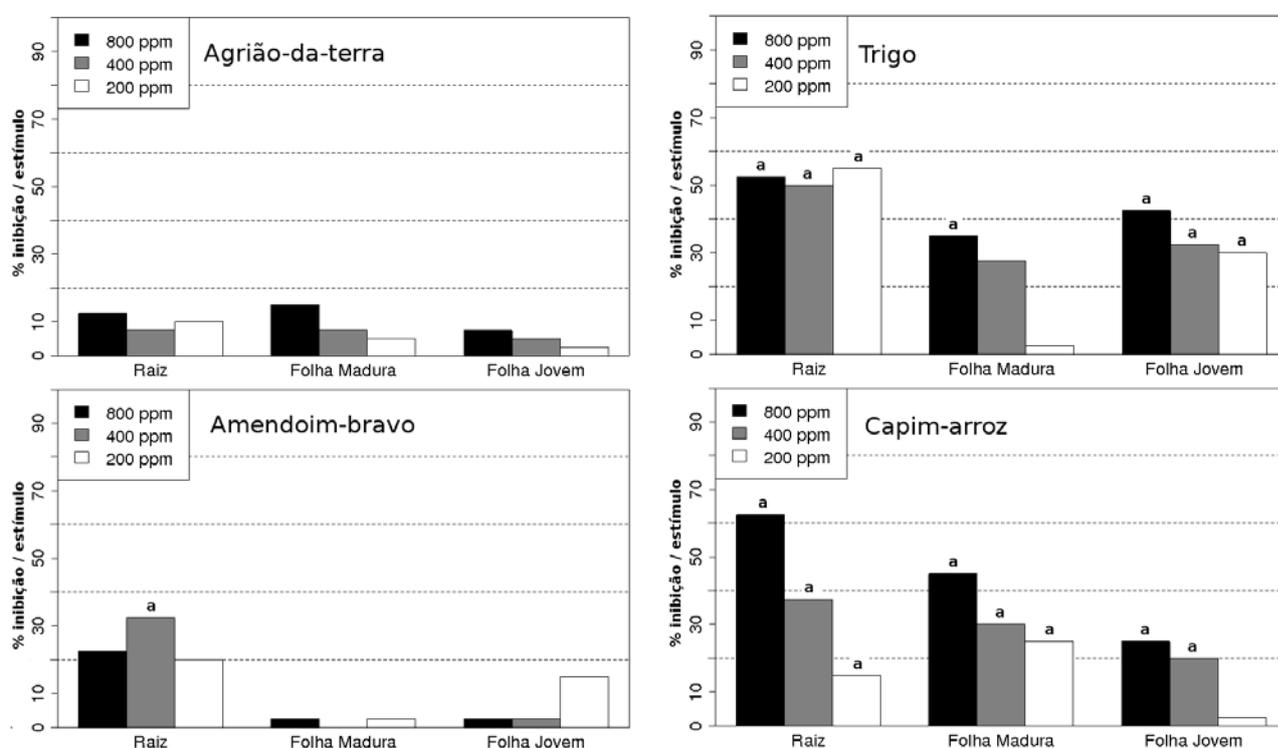


FIGURA 1.6. Porcentagem de inibição ou estímulo do crescimento inicial do sistema radicular de plântulas de agrião-da-terra (*Barbarea verna*) (A), trigo (*Triticum aestivum*) (B), amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*) (C) e capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) (D) crescidas sob a ação de soluções do extrato AcOEt de diferentes órgãos de *Aristolochia esperanzae* e do herbicida Sanson SC 40[®] em diferentes concentrações. a Valores significativamente diferentes do controle negativo de acordo com o teste de Welch a $\alpha = 0,05$. b Valores não significativamente diferentes do controle positivo, de acordo com o teste de Welch a $\alpha = 0,05$.

As duas espécies de monocotiledôneas apresentaram-se mais sensíveis à presença do herbicida, assim como à presença dos extratos AcOEt dos diferentes órgãos de *A. esperanzae* (Figuras 1.6-B, 1.6-D e 1.7). Para capim-arroz, observou-se inibição do desenvolvimento radicular similar à apresentada pelo herbicida Sanson 40 SC[®] para o extrato AcOEt de raízes de *A. esperanzae* (Figura 1.6-D). Para as espécies de eudicotiledôneas, agrião-da-terra mostrou-se mais

resistente aos extratos de *A. esperanzae* que ao herbicida, enquanto amendoim-bravo apresentou resultados de inibição similares ou superiores ao do herbicida (Figura 1.6-A e 1.6-C).

De acordo com experimentos preliminares, o herbicida GOAL[®], adotado nos bioensaios com coleótilos de trigo, provocou a morte de quase a totalidade das plântulas testadas, impedindo assim a comparação dos resultados oferecidos com os obtidos para a fração testada. Assim, optou-se pelo herbicida comercial Sanson 40 SC[®] para o controle positivo, por apresentar-se menos tóxico que o herbicida GOAL[®] sob o desenvolvimento inicial das espécies alvo testadas.

A atividade inibitória observada para os extratos AcOEt de folhas jovens e folhas maduras não apresentou diferença estatística significativa sobre o desenvolvimento do sistema radicular das espécies alvo testadas, mas o extrato de folhas maduras apresentou-se mais ativo na inibição do desenvolvimento da parte aérea das duas espécies de monocotiledôneas do que o extrato de folhas jovens (Tabelas 1.2 e 1.3).

Vários estudos apontam para a variação na concentração e composição química de compostos com atividade alelopática dentro de uma mesma espécie de acordo com a fase de desenvolvimento, particularmente entre a fase vegetativa e reprodutiva da mesma planta (SOUZA-FILHO *et al.*, 2003). Para *Calopogonium mucunoides* Desv. (calapogônio), Souza-Filho *et al.* (2003) observaram variação no potencial alelopático dos extratos dessa planta em função do órgão e da idade da planta, indicando a alocação diferencial de substâncias químicas.

O declínio na concentração de aleloquímicos com o aumento da idade da planta pode ser observado em diversos casos (AN *et al.*, 2003; MARCHI *et al.*, 2008; GRISI, 2012). Tecidos jovens são particularmente suscetíveis ao ataque de insetos, herbívoros e patógenos, o que justifica a maior concentração de aleloquímicos (DUKE *et al.*, 1999; ALVES *et al.*, 2002). No entanto, muitos trabalhos relatam atividade alelopática de resíduos de tecidos vegetais maduros, especialmente o arroz, em condições de campo e de laboratório (JUNG *et al.*, 2004; KATO-NOGUCHI e INO, 2005; SATOKO *et al.*, 2010). Reinhardt *et al.* (2006) observou que a concentração de aleloquímicos nas folhas de *Parthenium hysterophorus* L. aumentavam com a idade da planta, atingindo o pico máximo antes

do início da floração. Aleloquímicos acumulados em tecidos maduros podem ser liberados para o ambiente por lixiviação e decomposição de resíduos vegetais (LOTINA-HENNSEN *et al.*, 2006).

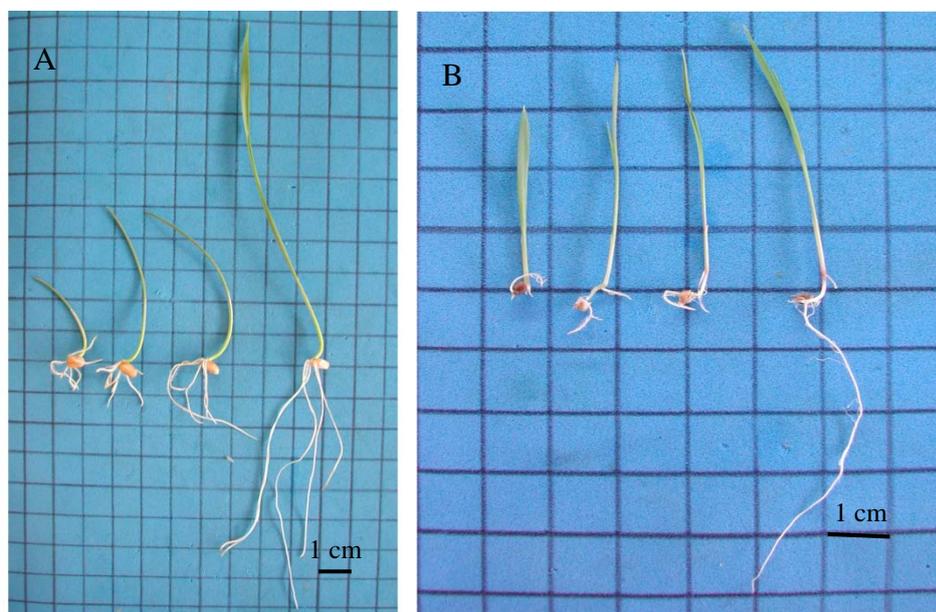


FIGURA 1.7. Plântulas de trigo (A) e capim-arroz (B) crescidas sob a ação de soluções da fração AcOEt de raízes de *A. esperanzae* a 800 ppm, 400 ppm, 200 ppm, e do controle negativo (da esquerda para a direita). (Fotos: JATOBÁ, L. J., 2012).

Quando comparados entre si, o extrato AcOEt de raízes de *A. esperanzae* apresenta maior atividade inibitória sobre o desenvolvimento inicial do sistema radicular de todas as espécies alvo testadas (Tabela 1.3). Assim, observou-se maior atividade alelopática do extrato AcOEt de folhas maduras sobre o desenvolvimento da parte aérea (Tabela 1.2), e do extrato AcOEt de raízes sobre o desenvolvimento do sistema radicular das espécies alvo testadas (Tabela 1.3).

Apesar de não existir um padrão fixo de distribuição de substâncias alelopáticas nas plantas, os resultados obtidos reforçam a tese de que esta pode estar relacionada à facilidade de liberação para o meio ambiente e função que desempenham na planta (ALVES *et al.*, 2002). Assim, no ambiente natural, espera-se que substâncias com atividade alelopática presentes nas folhas da planta sejam liberadas para o ambiente por lixiviação ou decomposição de resíduos vegetais, concentrando-se mais próximas à superfície do solo, permanecendo disponível para agir preferencialmente sobre o tecido da parte aérea da planta alvo. Substâncias presentes no sistema radicular da planta produtora seriam liberadas para o ambiente

por exsudação radicular ou decomposição de resíduos, concentrando-se a maior profundidade no solo e sendo mais ativas, portanto, sobre o sistema radicular da planta alvo (BLUM, 2006; LOTINA-HENNSEN *et al.*, 2006).

TABELA 1.3. Porcentagem de inibição ou estímulo do crescimento inicial do sistema radicular de espécies cultivadas e invasoras de cultura crescidas na presença dos extratos AcOEt de diferentes órgãos de *Aristolochia esperanzae*.

Espécie Alvo	Material Vegetal	Porcentagem de Inibição ^{1,2}		
		800 ppm	400 ppm	200 ppm
<i>Agrião-da-terra</i>	Raízes	-57,27±5,14 a	-43,61±5,49 a	-30,27±10,16 a
	Folhas Maduras	-55,91±5,99 a	-34,54±10,69 a	-10,06±14,12 a
	Folhas Jovens	-63,00±5,33 a	-44,61±7,47 a	-12,62±5,49 a
<i>Trigo</i>	Raízes	-82,10±1,59 a	-70,39±4,75 a	-75,25±16,03 a
	Folhas Maduras	-75,83±2,23 b	-71,41±7,36 ab	-62,63±4,24 a
	Folhas Jovens	-64,15±2,88 c	-60,47±4,47 b	-54,20±5,41 a
<i>Amendoim-bravo</i>	Raízes	-51,40±14,98 a	-26,61±26,18 a	-16,37±21,40 ab
	Folhas Maduras	-10,72±5,13 b	16,31±11,51 ab	16,61±15,30 a
	Folhas Jovens	-4,61±13,04 b	0,62±7,66 b	-12,00±9,04 b
<i>Capim-arroz</i>	Raízes	-74,41±3,42 a	-61,75±6,12 a	67,24±10,46 a
	Folhas Maduras	-50,95±15,62 a	-39,57±15,92 ab	19,13±10,51 b
	Folhas Jovens	-54,24±13,75 a	-21,71±11,87 b	22,45±1,99 b

¹Médias seguidas das mesmas letras na mesma coluna e espécie alvo não diferem entre si de acordo com o teste de Welch a $\alpha = 0,05$. ²Média±desvio padrão.

Quanto à ocorrência de plântulas anormais, observou-se que as duas espécies de monocotiledôneas foram mais sensíveis à presença dos extratos AcOEt dos diferentes órgãos de *A. esperanzae*, com atividade mais pronunciada do extrato de raízes (Figura 1.8). Dentre as anormalidades observadas para trigo, destaca-se a necrose radicular, enquanto que, para capim-arroz, não foram observadas anormalidades necróticas, mas sim atrofia do sistema radicular.

O nicossulfuron, princípio ativo do herbicida Sanson 40 SC[®], é amplamente utilizado no controle de plantas invasoras de culturas agrícolas. Possui ação pós-emergente seletiva, de ação sistêmica e de baixa toxicidade, recomendado para o controle de gramíneas e algumas espécies de eudicotiledôneas (RODRIGUES e ALMEIDA, 2005). Poucos estudos foram realizados para comparar

o custo e eficiência de produtos para manejo de pragas agrícolas baseados em produtos naturais com o de pesticidas sintéticos (COPPING e DUKE, 2007).

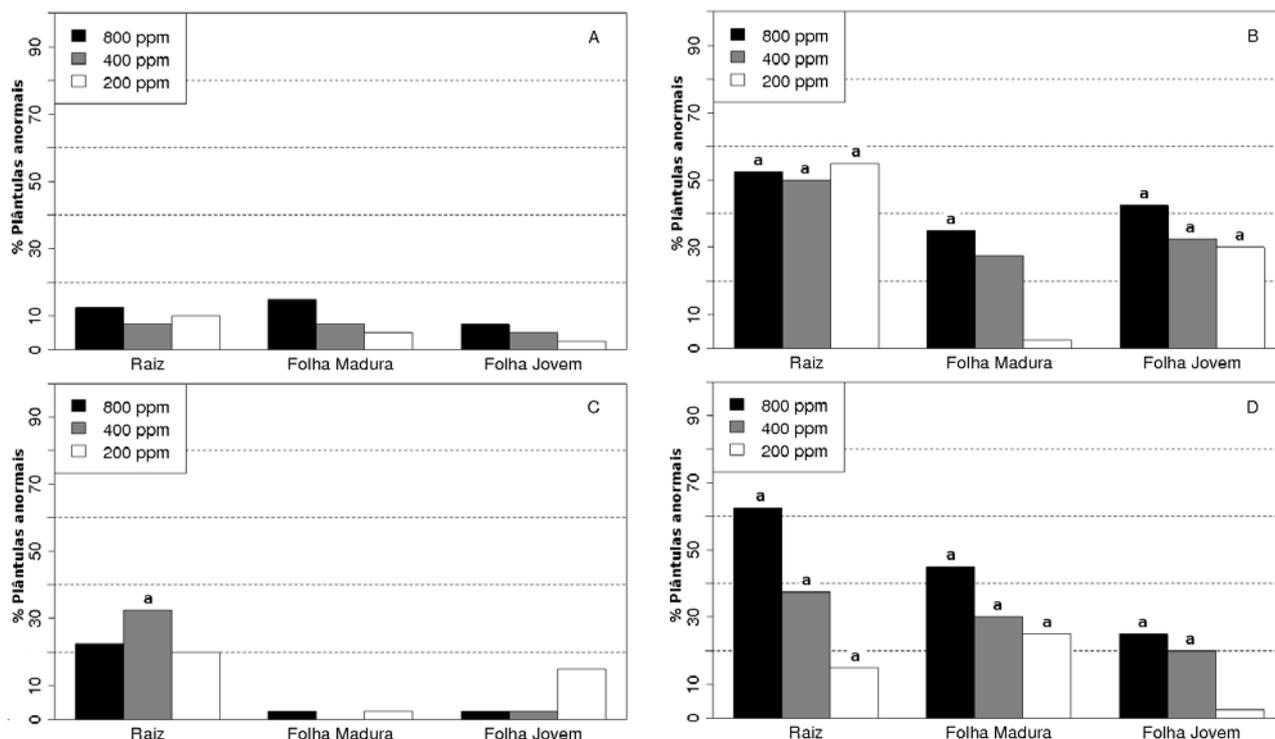


FIGURA 1.8. Porcentagem de plântulas anormais de agrião-da-terra (*Barbarea verna*) (A), trigo (*Triticum aestivum*) (B), amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*) (C) e capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) (D) relativo ao controle negativo, crescidas sob a ação de soluções do extrato AcOEt de diferentes órgãos de *Aristolochia esperanzae* e do herbicida Sanson SC 40[®] em diferentes concentrações. a Valores significativamente diferentes do controle negativo de acordo com o teste de Welch a $\alpha = 0,05$.

Os extratos AcOEt de raízes e folhas maduras de *Aristolochia esperanzae* apresentaram resultados satisfatórios na inibição do desenvolvimento inicial de amendoim-bravo e capim-arroz em condições de laboratório, quando comparados com o herbicida comercial Sanson 40 SC[®]. Além disso, apresentou atividade semelhante ou com menor fitotoxicidade sobre o desenvolvimento das espécies cultivadas testadas, agrião-da-terra e trigo. No entanto, os resultados obtidos em condições de laboratório podem não se repetir em campo, devido à fatores ambientais bióticos e abióticos que podem interferir na atividade dos aleloquímicos (INDERJIT e DUKE, 2003).

Assim, apesar de mostrarem-se promissores para o desenvolvimento de bioherbicidas, uma investigação mais ampla - incluindo experimentos de campo e

a identificação dos compostos ativos - deve ser realizada para uma melhor avaliação da viabilidade de aplicação dos produtos naturais de raízes e folhas maduras de *A. esperanzae* no controle de pragas agrícolas.

1.5. Conclusões

1. Os extratos AcOEt provenientes de raízes, folhas maduras e folhas jovens de *A. esperanzae* O. Kuntze foram os que apresentaram maior atividade inibitória sobre a elongação de fragmentos de coleóptilo estiolado de trigo.

2. Os extratos AcOEt de raízes, folhas maduras e folhas jovens apresentaram atividade alelopática sobre o desenvolvimento inicial das espécies alvo testadas.

3. O estágio de maturação das folhas apresenta interferência na sua atividade alelopática.

4. O extrato AcOEt de folhas maduras apresentou maior atividade inibitória no desenvolvimento inicial da parte aérea das espécies alvo, principalmente sobre eudicotiledôneas. Para amendoim-bravo, esta atividade foi semelhante ou superior à apresentada pelo herbicida comercial Sanson 40 SC[®].

5. O extrato AcOEt de raízes foi o que apresentou maior atividade inibitória do desenvolvimento inicial do sistema radicular das plantas alvo testadas, com maior atividade sobre as duas espécies de monocotiledôneas. Para capim-arroz, esta atividade foi semelhante à apresentada pelo herbicida comercial Sanson 40 SC[®].

1.6. Referências

- AIBU, S.; JOYCE, E.; PANIWNKY, L.; LORIMER, J.; MASON, T. Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinales* for the food and pharmaceutical industry. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 11, n. 3-4, p. 261-265, 2004.
- ALVES, S. M.; ARRUDA, M. S. P.; SOUZA-FILHO, A. P. S. Biossíntese e distribuição de substâncias alelopáticas. In: SOUZA-FILHO, A. P. S.; ALVES, S. M. (Eds.). **Alelopatia: Princípios Básicos e Aspectos Gerais**. Belém, PA, EMBRAPA Amazônia Oriental, 2002. p. 79-110.
- AN, M.; LIU, D.; JOHNSON, I.; LOVETT, J. Mathematical modelling of allelopathy: II. The dynamics of allelochemicals from living plants in the environment. **Ecological Models**, v. 161, n. 1-2, p. 53-66, 2003.
- ANJUM, T.; BJAWA, R. A bioactive annouionone from sunflower leaves. **Phytochemistry**, v. 66, n. 16, p. 1919-1921, 2005.
- BLAIR, A. C.; WESTON, L. A.; NISSEN, S. J.; BRUNK, G. R.; HUFBAUER, R. A. The importance of analytical techniques in allelopathy studies with the reported allelochemical catechin as an example. **Biological Invasions**, v. 11, n. 2, p. 325-332, 2009.
- BLUM, U. Allelopathy: A soil system perspective. In: REIGOSA, M. J.; PEDROL, N.; GONZÁLEZ, L. (Eds.). **Allelopathy – A Physiological Process With Ecological Implications**. Netherlands, Springer, 2006. p. 299-340.
- COPPING, L. G.; DUKE, S. O. Natural products that have been used commercially as crop protection agents. **Pest Management Science**, v. 63, p. 524-554, 2007.
- DUKE, S. O.; RIMANDO, A. M.; DUKE, M. V.; PAUL, R. N.; FERREIRA, J. F. S.; SMEDA, R. J. Sequestration of phytotoxins by plants: implications for biosynthetic production. In: CUTLER, H. G.; CUTLER, S. J. (Eds.). **Biologically Active Natural Products: Agrochemicals**. USA, CRC Press, 1999.
- FERREIRA, A. G. Interferência: competição e alelopatia. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Orgs.). **Germinação – do Básico ao Aplicado**. Porto Alegre, Artmed, 2004. p.251-261.
- GARCÍA, J. L. L. G. **Aislamento y Síntesis de Compuestos Bioactivos de Girasol Variedades Cultivadas de Perodovick y Atila**. 2009. Tese (Doutorado em Química) - Universidad de Cádiz, Cádiz, Espanha, 2009.
- GATTI, B. A.; PEREZ, S. C. J. G. A.; LIMA, M. I. S. Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze na germinação e no crescimento de

Lactuca sativa L. e *Raphanus sativus* L.. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n.3, p. 459-472, 2004.

GATTI, A. B.; FERREIRA, A. G.; ARDUIM, M.; PEREZ, S. C. J. G. A. Allelopathic effects of aqueous extracts of *Aristolochia esmeranziae* O. Kuntze on development of *Sesamum indicum* L. seedlings. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n.2, p. 454-461, 2010.

GRISI, P. U. **Potencial Alelopático de *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae)**. 2010. 127 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – CCBS, UFSCar, São Carlos, 2011.

GRISI, P. U.; RANAL, M. A.; GUALTIERI, S. C. J.; SANTANA, D. G. Allelopathic potential of *Sapindus saponaria* L. leaves in the control of weeds. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 34, n. 1, p. 1-9, 2012.

INDERJIT; DUKE, S. O. Ecophysiological aspects of allelopathy. **Planta**, v. 217, n. 4, p. 529-539, 2003.

INTERNATIONAL ALLELOPATHY SOCIETY [Online]; 2011. <http://www.international-allelopathy-society.org> (Acessado em 01 de Novembro de 2011).

JUNG, W. S.; KIM, K. H.; AHN, J. K.; HAHN, S. J.; CHUNG, I. M. Allelopathic potential of rice (*Oryza sativa* L.) residues against *Echinochloa crus-galli*. **Crop Protection**, v. 23, n. 3, p. 211-218, 2004.

KATO-NOGUCHI, H.; INO, T. Possible involvement of momilactone B in rice allelopathy. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, n. 6, p. 718-721, 2005.

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

LOPES, L. M. X.; NASCIMENTO, I. R.; SILVA, T. Phytochemistry of the Aristolochiaceae family. In: **Research Advances in Phytochemistry**. Global Research Network, Ed. Kerala, vol. 2, 2001.

LOTINA-HENNSEN, B.; KING-DIAZ, B.; AGUILAR, M. I.; HERNANDEZ TERRONES, M. G. Plant secondary metabolites. Targets and mechanisms of allelopathy. In: REIGOSA, M. J.; PEDROL, N.; GONZÁLEZ, L. (Eds.). **Allelopathy – A Physiological Process With Ecological Implications**. Netherlands, Springer, 2006. p. 229-265.

MACÍAS, F. A.; CHINCHILLA, N.; VARELA, R. M.; MOLINILLO, J. M. G. Bioactive steroids from *Oryza sativa* L.. **Steroids**, v. 71, n. 7, p. 603-608, 2006.

MACÍAS, F. A.; GALINDO, J. L. G.; GALINDO, J. C. G. Evolution and current status of ecological phytochemistry. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22-24, p. 2917-2936, 2007a.

MACÍAS, F. A.; MOLINILLO, J. M. G.; VARELA, R. M.; GALINDO, J. C. G. Allelopathy – a natural alternative for weed control. **Pest Management Science**, v. 63, n. 4, p. 327-348, 2007b.

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

MARCHI, G.; MARCHI, E. C. S.; WANG, G.; MCGIFFEN, M. Effect of age of a Sorghum-sudangrass hybrid on its allelopathic action. **Planta Daninha**, v. 26, n. 4, p. 707-716, 2008.

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

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

OTSUKA, H. Purification by solvent extraction using partition coefficient. In: SARKER, S. D.; LATIF, Z.; GRAY, A. I. (Eds.). **Natural Products Isolation**. Methods in Biotechnology 20, New Jersey, Humana Press, 2006. p.269-273.

R DEVELOPMENT CORE TEAM [Online]; R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, 2011. <http://www.R-project.org> (Acessado em 03 de Outubro de 2011).

REGRAS para Análise de Sementes. Brasília, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA / ACS, 2009.

REINHARDT, C.; VAN DER LAAN, M.; BELZ, R.; HURLE, K.; FOXCROFT, L. Production dynamics of the allelochemical parthenin in leaves of *Parthenium hysterophorus* L.. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 20, p. 427-433, 2006.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de Herbicidas**. Londrina, 2005. 697 p.

ROSTAGNO, M.; PALMA, M.; BARROSO, C. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. **Journal of Chromatography A**, v. 1012, n. 2, p. 119-128, 2003.

SANTANA, D. G.; RANAL, M. A. **Análise da Germinação: Um Enfoque Estatístico**. Brasília, Editora UnB, 2004. 247p.

SATOGO, Y; MATSUZAKI, M.; HIROKANE, H.; OKADA, K. Glucosinolate content in rapeseed in relation to suppression of subsequent crop. **Plant Production Science**, v. 13, n. 2, p. 150-155, 2010.

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

CAPÍTULO II

**Estudo Fitoquímico e Atividade Fitotóxica de
Aleloquímicos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze**

RESUMO

Alelopatia é definida como qualquer processo que envolve metabólitos secundários que influenciam o crescimento e desenvolvimento de sistemas naturais e cultivados. O isolamento e caracterização de compostos com atividade alelopática, conhecidos como aleloquímicos, são critérios indispensáveis para comprovar o fenômeno da alelopatia. O isolamento guiado por bioensaios de substâncias com atividade alelopática em *Aristolochia esperanzae* levou à obtenção de uma fração composta majoritariamente de uma mistura de três compostos isoméricos com fragmentos de massas com razão m/z 321 Da e 161 Da, e absorção no ultravioleta em 234 nm e entre 286 nm e 287 nm presentes nas folhas maduras desta planta. Análises por RMN mono e bidimensionais de um destes compostos possibilitaram estabelecer sua estrutura parcial. Esta fração apresentou atividade alelopática sobre o desenvolvimento inicial do trigo, com inibição do desenvolvimento do sistema radicular e formação de anormalidades necróticas na porção aérea. Esta atividade apresentou-se com comportamento hormético. O herbicida comercial Sanson 40 SC[®] apresentou maior inibição do desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular das plântulas de trigo, porém, não levou à formação de anormalidades necróticas nestas plântulas. Assim, a atividade dos compostos presentes na fração ISO mostrou-se diferenciada daquela apresentada pelo herbicida comercial, sendo promissores no desenvolvimento de bioherbicidas.

Palavras-chave: Alelopatia, isolamento biodirigido, bioherbicidas, cipó-mil-homens.

ABSTRACT

Allelopathy is defined as any process involving secondary metabolites that influence the growth and development of natural and cultivated systems. Isolation and characterization of compounds with allelopathic activity, known as allelochemicals, are needed criteria to confirm the phenomenon of allelopathy. The bioassay-guided isolation of substances with allelopathic activity in *Aristolochia esperanzae* has led to a fraction composed mainly of a mixture of three isomeric compounds with fragments with mass fragments with m/z 321 Da and 161 Da, and ultraviolet absorption at 234 nm and between 286 nm and 287 nm, present in mature leaves of this plant. Analysis by 1D- and 2D-NMR of one of these compounds allowed to stabilize its partial structure.

This fraction showed allelopathic activity on the early development of wheat, with inhibition of root development and formation of necrotic abnormalities over the shoots of these seedlings. This activity presented hormetic behavior. The commercial herbicide Sanson SC 40[®] showed greater inhibition of the wheat seedlings root and shoot development, however, didn't lead to the formation of necrotic abnormalities over the shoot of these seedlings. Thus, The activity of the compounds present in the ISO fraction showed to be different from that presented by the commercial herbicide, and may lead to the development of bioherbicides.

Keywords: Allelopathy, bioassay-guided isolation, bioherbicides, *cipó-mil-homens*.

2.1. Introdução

Alelopatia é definida como qualquer processo envolvendo metabólitos secundários que influenciam o crescimento e desenvolvimento de sistemas naturais e agrícolas. Estes metabólitos são produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos, e podem ter efeitos positivos ou negativos (INTERNATIONAL ALLELOPATHY SOCIETY, 2011).

Substâncias do metabolismo secundário de plantas são utilizadas desde a antiguidade com muitas finalidades. Para a planta produtora, no entanto, estas substâncias têm duas funções principais: a auto-regulação e a interação com o ecossistema, como no caso da alelopatia (MACÍAS *et al.*, 2007). A maioria dos compostos que possuem atividade alelopática, conhecidos como aleloquímicos, são fruto do metabolismo secundário e são liberados para o ambiente por volatilização, lixiviação, exsudação radicular e decomposição de resíduos vegetais ou ainda, por volatilização (LOTINA-HENNSEN *et al.*, 2006). Os aleloquímicos pertencem a diferentes classes moleculares, como compostos fenólicos, terpenóides, flavonóides, alcalóides, glicosídeos cianogênicos, entre outros, e participam como mediadores deste fenômeno de interação química com importância na estrutura e funcionamento das comunidades naturais (KATO-NOGUCHI, 2003; KIM, 2005; CHOU, 2006).

Produtos naturais (metabólitos secundários) foram utilizados ao longo da história como importante fonte de pesticidas, utilizados diretamente como extratos brutos, compostos purificados ou como pistas estruturais para o descobrimento e desenvolvimento de pesticidas (DAYAN e DUKE, 2006). De acordo com Blair *et al.* (2009) o isolamento e caracterização dos compostos com atividade alelopática são etapas indispensáveis na comprovação do fenômeno da alelopatia. Apesar de subestimado, quando comparado ao uso de produtos naturais isolados de fungos e bactérias, o desenvolvimento de herbicidas baseados em metabólitos com atividade alelopática provenientes de plantas pode levar à descoberta de substâncias com novas formas de ação e menor impacto ambiental, prevenindo o desenvolvimento de resistência em populações de plantas invasoras, contaminação ambiental e dos alimentos (ANJUM e BJAWA, 2005; NARWAL, 2006; BLAIR *et al.*, 2009).

Plantas do gênero *Aristolochia* são conhecidas por seu uso medicinal por populações tradicionais, como antiofídico, antiasmático, digestivo, expectorante e emanagogo (LOPES *et al.*, 2001), apresentando-se como fonte rica de compostos fisiologicamente ativos de diferentes classes químicas. Dentre os principais grupos baseados em estrutura molecular que apresentam atividade, encontram-se ácidos aristolóquicos e seus derivados, que ocorrem apenas neste gênero, aporfinas, benzilisoquinonas, terpenóides, lignanas, esteróides, entre outros (WU *et al.*, 2005).

Muitas plantas deste gênero tem mostrado atividade diurética, analgésica, anti-inflamatória e anticancerígena, em condições de laboratório (YU *et al.*, 2007). No entanto, poucos estudos foram realizados sobre plantas desse grupo no tocante ao seu potencial alelopático, importância ecológica de seus compostos do metabolismo secundário ou sua possível aplicação na agricultura.

Estudos sobre a importância ecológica destes produtos naturais mostram que estes são acumulados por borboletas da família Papilionidae que se alimentam em plantas de *Aristolochia* spp., utilizando-os como alomônios contra aves predadoras (WU *et al.*, 2005). Exemplos destas substâncias incluem: o ácido aristolóquico I (**1**), encontrados em folhas e flores de *Aristolochia californica*, presentes em adultos de *Battus philenor hirsuta* (FORDYCE, 2000) e o composto polihidroxi d-(+)-Pinitol (**2**), isolado de folhas jovens e maduras de *Aristolochia macrophylla* e relacionado à defesa contra herbívoros, com atividade estimuladora da ovoposição em *B. philenor* (PARAJ *et al.*, 1992).

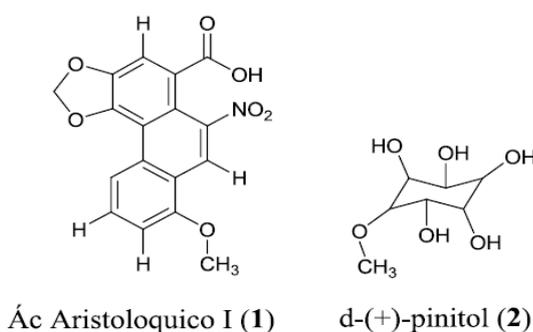
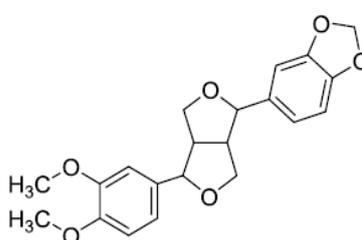


FIGURA 2.1. Estruturas do ácido aristolóquico I (**1**) e do d-(+)-Pinitol (**2**). Fonte: WU *et al.* (2005).

Recentes estudos sobre o efeito alelopático de *A. esperanzae* permitiram detectar a atividade alelopática de extratos aquosos dos diferentes

órgãos desta planta sobre germinação e crescimento de alface (*Lactuca sativa* L.) e rabanete (*Raphanus sativus* L.) (GATTI, 2003; GATTI *et al.*, 2004), além de diminuir o tamanho médio de células do metaxilema da raiz primária de gergelim (*Sesamum indicum* L.), com efeito mais pronunciado quando utilizados extratos de raiz. O estudo fitoquímico de frações com atividade alelopática do extrato CH₂Cl₂ de raízes de *A. esperanzae* levaram à identificação da lignana fargesina (**3**), além de outras lignanas e esteróides (GATTI *et al.*, 2010).



Fargesina (**3**)

FIGURA 2.2 – Estrutura molecular da lignana fargesina (**3**), encontrada em raízes de *Aristolochia esperanzae*. Fonte: GATTI *et al.* (2010).

2.2. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo realizar o estudo fitoquímico por isolamento biodirigido e apresentar o perfil de atividade fitotóxica de aleloquímicos presentes nos diferentes órgãos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze, assim como avaliar a atividade fitotóxica de aleloquímicos de folhas maduras desta planta (fração ISO) sobre o desenvolvimento inicial de *Triticum aestivum* L. (trigo), comparando-a à atividade do herbicida comercial Sanson 40 SC[®].

2.3. Materiais e Métodos

2.3.1. Técnicas Gerais

As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas com placas de sílica (Si) gel Aldrich[®] (25 µm, 60 Å, Sigma-Aldrich Co.). As manchas foram visualizadas sob luz UV a 254 nm e reveladas com aplicação de

solução etilica de ácido fosfomolibídico (5:100 m/v) seguida de aquecimento a 120°C por 5 min.

Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE-UV) foi realizada utilizando-se equipamento Waters[®], modelo Controller 600, com bomba modelo 600, conectado a detector de UV-visível modelo 2487 em dois comprimentos de onda (254 nm e 280 nm; 254-240 nm) e colunas de sílica gel derivatizadas com grupo octadecilsilano (C₁₈) Delta Pak WAT011798 100 A (300 x 7,8 mm, 15 µm) e Inertsil ODS-SP (250 x 4,6 mm, 5 µm).

Espectros de massas foram obtidos utilizando um sistema composto por um cromatógrafo líquido de alta eficiência Waters[®], modelo Alliance 2695 acoplado a espectrômetro de massas Waters[®], modelo ZQ 2000 equipado com fonte de ionização por eletrospray, analisador de massas do tipo quadrupolo e detector espectrofotométrico UV-Vísivel (varredura de 200 nm a 400 nm), marca Waters[®] modelo 2996, de arranjo de fotodiodos. Foi utilizada a coluna de sílica gel C₁₈ Inertsil ODS-SP (250 x 4,6 mm, 5 µm).

Os espectros de RMN foram obtidos utilizando-se espectrômetro Bruker DRX 400 (9,4 Tesla), operando a 400,35 MHz na frequência do hidrogênio (¹H) e a 100,1 MHz na frequência do carbono (¹³C). O deslocamento químico é representado em ppm relativo ao sinal residual de ¹H e ¹³C do solvente utilizado (DMSO-d₆, Cambridge Isotopes, δ 2,49 e 39,7, respectivamente), utilizando-se como padrão de referência interna o tetrametilsilano (TMS). Além desses, também foram obtidos os espectros DEPT ¹³C, COSY-¹H-¹H, HMBC e HSQC.

As análises de RMN foram realizadas em parceria com o Laboratório de RMN do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, sob a coordenação do Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira.

2.3.2. Material Vegetal e Obtenção dos Extratos

Folhas e raízes de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze foram coletadas no jardim experimental do Departamento de Botânica da UFSCar em Maio de 2010 (voucher depositado no herbário do Departamento de Botânica – UFSCar sob nº 7199). Folhas jovens e maduras foram separadas. Folhas jovens foram consideradas aquelas que apresentavam coloração verde clara e textura membranosa, enquanto folhas verdes escuras e de textura cartácea foram

consideradas como maduras (GRISI, 2010). Folhas maduras, jovens e raízes foram lavadas em água corrente, as duas primeiras foram secas em casa de vegetação em temperatura ambiente na sombra e as raízes foram secas em estufa de circulação forçada de ar a 40°C. Após a secagem, os três materiais vegetais foram triturados em moinho industrial.

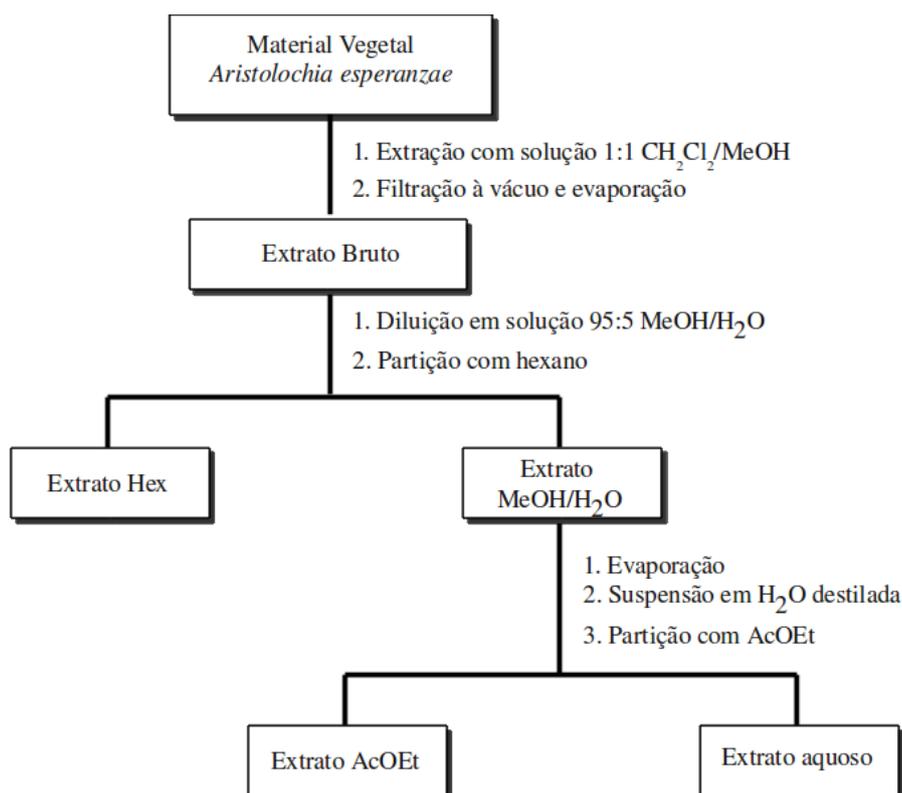


FIGURA 2.3 – Fluxograma da obtenção dos extratos dos diferentes órgãos de *Aristolochia esperanzae*.

A extração inicial foi realizada, para folhas maduras e raízes, utilizando-se 200 g de pó e 600 mL de CH₂Cl₂/MeOH em banho de ultra-som durante 30 minutos. Para folhas jovens, a extração inicial foi realizada utilizando-se 60 g de pó e 250 mL de CH₂Cl₂/MeOH em banho de ultra-som durante 30 minutos (ROSTAGNO *et al.*, 2003; AIBU *et al.*, 2004). Após filtragem a vácuo, o processo foi repetido à exaustão, para todos os materiais vegetais. Os extratos brutos foram evaporados sob pressão reduzida, a 37°C, diluídos em solução 95:5 de MeOH/H₂O e particionados com hexano (3 x 600 mL). Os extratos obtidos foram outra vez evaporados sob baixa pressão a 37°C. Em sequência, os extratos MeOH foram evaporados, suspensos em água destilada e particionados com AcOEt (3 x 600 mL)

(adaptado de OTSUKA, 2006). Os extratos AcOEt foram evaporados sob baixa pressão a 37°C e os extratos aquosos foram evaporados em sistema de centrífuga a vácuo Savant modelo Speedvac[®] Plus SC 210 à secura. O procedimento de extração está sumarizado na Figura 2.3. Os extratos Hex, AcOEt e aquoso obtidos para cada órgão estudado foram submetidos a bioensaios com coleóptilos de trigo.

2.3.3. Bioensaios com Coleóptilos de Trigo

O isolamento dirigido por bioensaios, ou isolamento biodirigido, é um processo simples e interativo em que as frações obtidas por cromatografia de extratos iniciais são utilizadas em bioensaios para determinar a atividade biológica de interesse. As frações com atividade são re-fractionados e utilizados nos bioensaios até que, finalmente, um composto puro com a atividade desejada é encontrado (DAYAN e DUKE, 2006).

A atividade biológica dos extratos obtidos foi testada utilizando-se bioensaios com fragmentos de coleóptilo estiolado de trigo. Sementes de trigo (*Triticum aestivum* L. cv. BRS264) foram distribuídas em caixas gerbox forradas com duas folhas de papel filtro e umedecidas com 10 mL de água destilada. As caixas foram embrulhadas em papel alumínio e acondicionadas em incubadora B.O.D. durante 72 h, a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, no escuro. As plântulas estioladas de trigo assim obtidas foram cortadas com a ajuda de uma guilhotina de Van der Veij sob luz verde de segurança. Os ápices (2 mm) foram descartados e o restante foi cortado em fragmentos de 4 mm utilizado nos bioensaios (NITSCH e NITSCH, 1956; MACÍAS *et al.*, 2010). Os extratos testados foram pré-solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídos em solução tampão (pH = 5.6) de fosfato de potássio (250 mL de água destilada, 5 g de sacarose, 0,2625 g de ácido cítrico e 0,725 g de fosfato de potássio di-básico) para obter soluções a 800, 400 e 200 ppm, com concentração constante de 5 µL/mL de DMSO em cada concentração (MACÍAS *et al.*, 2006).

As soluções preparadas em cada tratamento foram testadas em triplicata, adicionando 2 mL de cada em tubos de ensaio e cinco coleóptilos de trigo em cada tubo de ensaio. Dois controles foram realizados, um controle negativo com solução tampão e DMSO (5 µL/mL) e um controle positivo com o herbicida comercial GOAL[®] (ingrediente ativo Oxifluorfen = 240 g/L) solubilizado em solução tampão a

800, 400 e 200 ppm e DMSO (5 μ L/mL) (MACÍAS *et al.*, 2006; GARCÍA, 2009). Os tubos de ensaio foram tampados e mantidos em incubadora B.O.D. a $25\pm 1^\circ\text{C}$ no escuro, com rotação constante (0,25 rpm) (GARCÍA, 2009). Após 24 h, os coleóptilos foram retirados os tubos, fotografados e medidos utilizando o software Image-Pro Plus[®]5.0.

Os dados foram submetidos ao teste de Welch a $\alpha = 0,05$ para comparação entre médias, com o auxílio do software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011), e apresentados como porcentagem de inibição ou estímulo em relação ao controle negativo. Assim, o zero representa o controle negativo, os valores positivos representam estimulação e os valores negativos representam inibição (MACÍAS *et al.*, 2010).

2.3.4. Procedimentos Cromatográficos

Uma alíquota (Figuras 2.4, 2.5 e 2.7) do extrato AcOEt de cada material vegetal foi submetida a cromatografia em sílica (Si) gel derivatizada com grupo cianopropila (CN), utilizando-se coluna pré-empacotada Waters Sep-Pak[®] Vac (10 g), eluída com gradientes de CH_2Cl_2 (40-100%) em hexano, AcOEt (10-100%) em CH_2Cl_2 , e MeOH (50-100%) em AcOEt.

Cinco frações foram obtidas para cada material vegetal, a partir da análise por cromatografia de camada delgada (CCD): RA₁-RA₅ para raiz (Figura 2.4), FMA₁-FMA₅ para folhas maduras (Figura 2.5) e FJA₁-FJA₅ para folhas jovens (Figura 2.7). As frações foram utilizadas em bioensaios com coleóptilos de trigo.

As frações mais ativas para raízes (RA₁, 0,824 g) e folhas maduras (FMA₁, 1,3645 g) foram submetidas a separação cromatográfica utilizando coluna de Si gel (SiO_2 , 6,5 x 15 cm, 70 - 230 mesh, Aldrich Chemical[®]) e gradientes com quantidades crescentes de AcOEt (30-100%) em hexano, seguido por MeOH (50-100%) em AcOEt. Cinco frações foram obtidas para raízes (RB₁-RB₅) e quatro frações foram obtidas para folhas maduras (FMB₁-FMB₄) (Figuras 2.4 e 2.5).

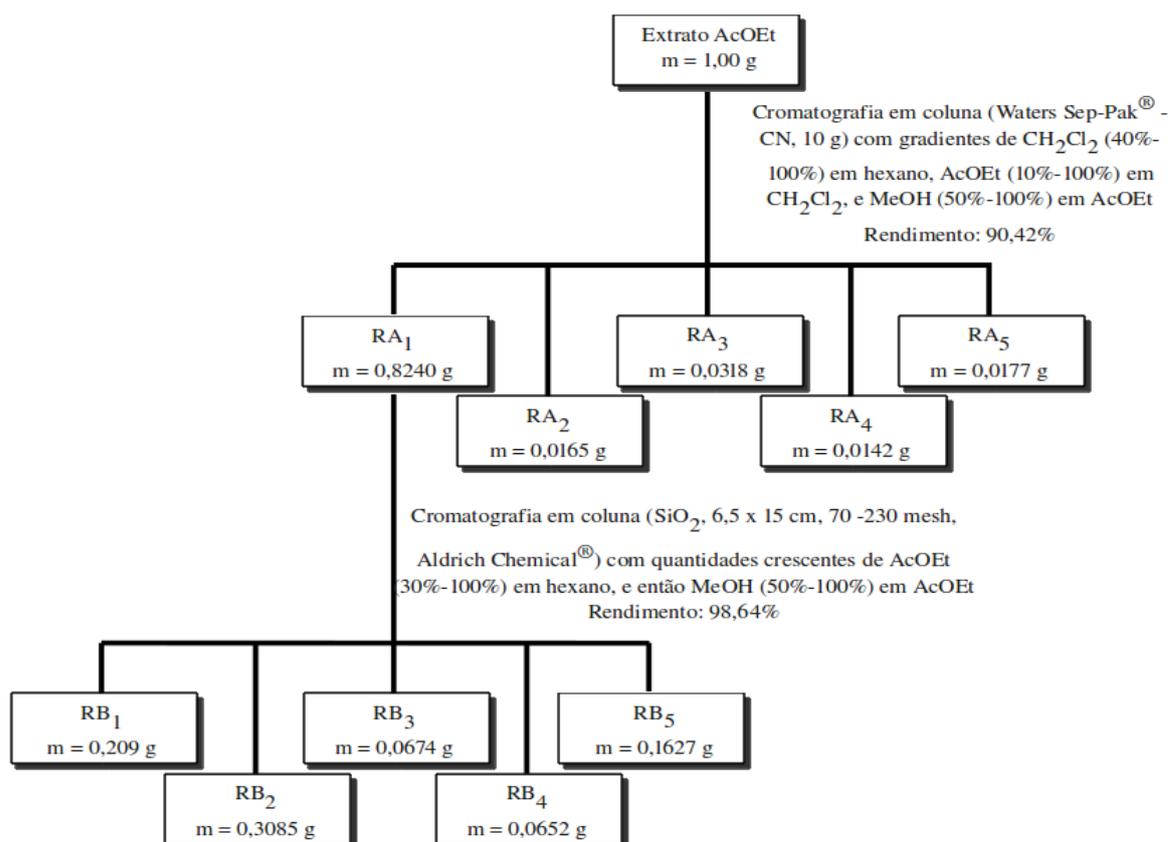


FIGURA 2.4. Fluxograma das separações cromatográficas do extrato AcOEt das raízes de *Aristolochia esperanzae*.

A fração mais ativa para folhas maduras (FMB₂, 0,866 g) foi submetida a nova separação cromatográfica em coluna de Si gel pré-empacotada Phenomenex[®] Strata[™] (10 g) e eluída com misturas de (hexano/CH₂Cl₂ 9:1) / (AcOEt/MeOH 9:1) 9:1 até 100% AcOEt/MeOH 9:1. Foram obtidas quatro frações: FMC₁ - FMC₄. A fração ativa FMC₂ (0,5929 g) foi separada por cromatografia em coluna de Si gel pré-empacotada Phenomenex[®] Strata[™] (10 g) eluída com gradiente de [AcOEt/(MeOH/MeCN 1:1) 9:1] em (hexano/CH₂Cl₂ 9:1). Quatro novas frações foram obtidas: FMD₁ - FMD₄. As frações FMD₂ (0,1558 g, 75:23 - 7:3) e FMD₃ (0,1257 g, 7:3 - 65:35) foram as mais ativas. Ambas foram submetidas a nova separação cromatográfica em coluna de Si gel pré-empacotada Phenomenex[®] Strata[™] (10 g) utilizando misturas de [hexano/(CH₂Cl₂/i-PrOH 1:1) 9:1] / [AcOEt/(MeOH/MeCN 1:1) 9:1] 8:2 em gradiente crescente de polaridade, resultando em três frações para FMD₂ (FMD_{2I} - FMD_{2III}) e duas frações para FMD₃ (FMD_{3I} e FMD_{3II}) (Figura 2.5).

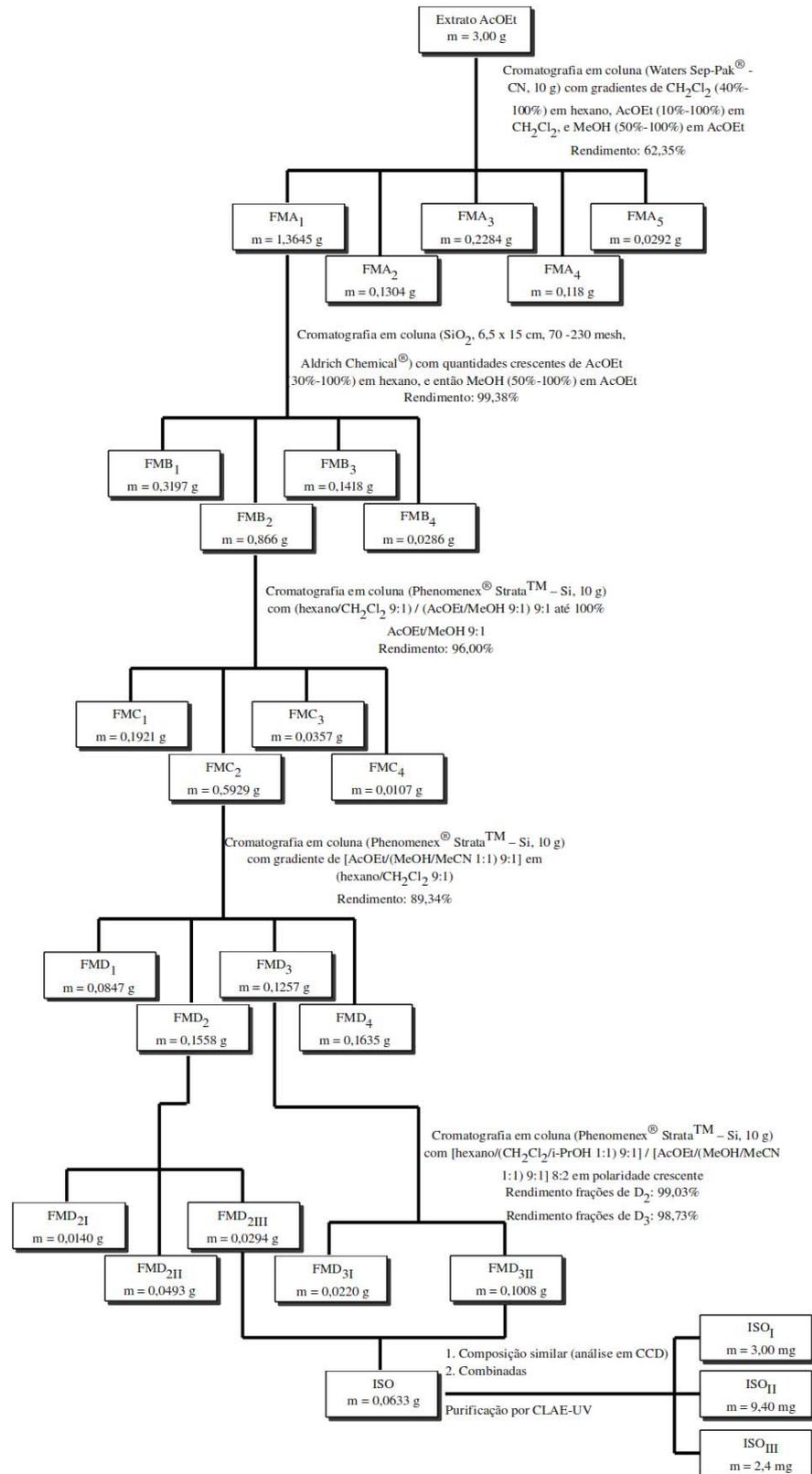


FIGURA 2.5. Fluxograma das separações cromatográficas do extrato AcOEt das folhas maduras de *Aristolochia esperanzae*.

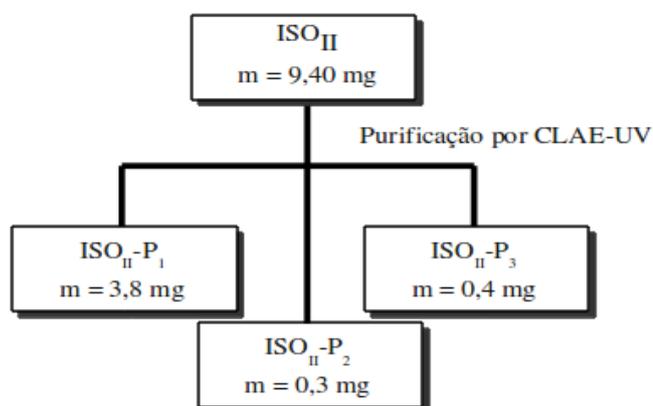


FIGURA 2.6. Fluxograma da purificação por CLAE-UV da fração ISO_{II}, de folhas maduras de *Aristolochia esperanzae*.

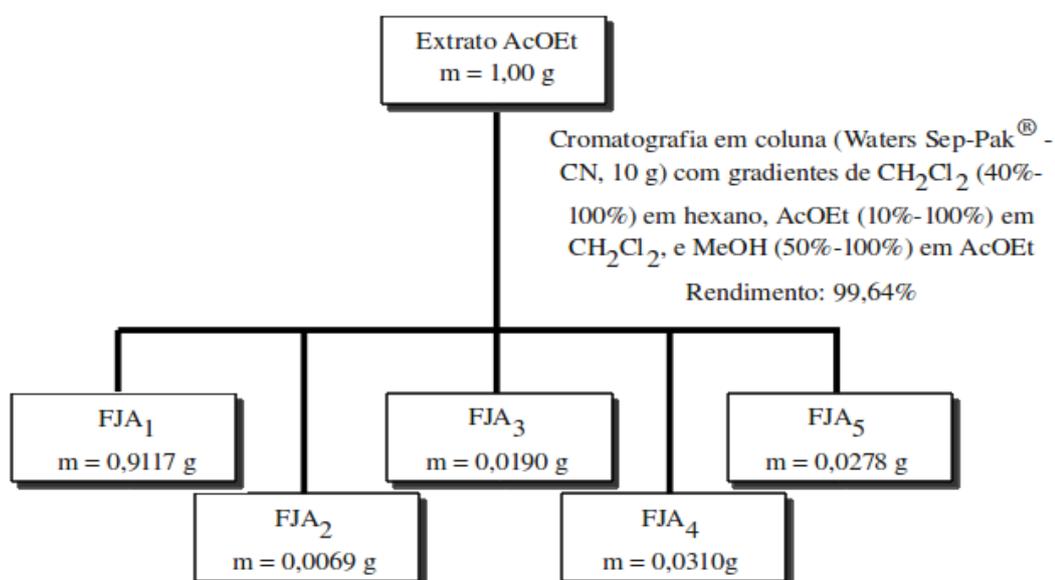


FIGURA 2.7. Fluxograma das separações cromatográficas do extrato AcOEt das folhas jovens de *Aristolochia esperanzae*.

Como as frações FMD_{2II} e FMD_{3I} apresentaram composição química similar a partir da análise por CCD, estas duas frações foram reunidas e renomeadas como fração ISO (0,0633 g) (Figura 2.5). A fração ISO foi então submetida a CLAE-UV utilizando eluição isocrática com uma mistura de MeCN/MeOH/H₂O 35:35:30 com 0,1% de ácido fórmico e coluna de fase reversa de Si gel derivatizada com grupo octadecilsilano (C₁₈) Delta Pack WAT011798 100 A (300 x 7,8 mm, 15 µm). Três amostras foram obtidas: ISO_I, ISO_{II} e ISO_{III} (Figura 2.5).

A amostra ISO_{II} (9,4 mg) foi verificada por CLAE-UV-EM utilizando uma coluna de fase reversa de Si gel C₁₈ Inertsil ODS-SP (250 x 4,6 mm, 5 µm) eluída com um gradiente de MeOH/MeCN 1:1 (10-100%) em H₂O com 0,1% de ácido fórmico. Esta amostra foi então submetida a purificação em HPLC-UV utilizando a mesma coluna e mesma eluição descrita para a análise por CLAE-UV-EM, resultando nas amostras ISO_{II}-P₁ (3,8 mg), ISO_{II}-P₂ (0,3 mg) e ISO_{II}-P₃ (0,4 mg) (Figura 2.6). As três amostras foram submetidas à análise por RMN para obtenção dos espectros ¹H, ¹³C, DEPT, COSY-¹H-¹H, HMBC e HSQC.

2.3.5. Bioensaio de Fitotoxicidade

Para testar os efeitos dos compostos presentes na fração ISO, de folhas maduras de *Aristolochia esperanzae*, sobre o crescimento inicial de trigo (*Triticum aestivum* L. cv. BRS264), 51 mg desta fração foi dissolvido em solução tampão 10 mM de ácido 2-[N-morfolino]-etanossulfônico (MES), com pH ajustado a 5,6 com solução 1M de hidróxido de sódio e DMSO (5 µL/mL) para obter soluções a 800, 400 e 200 ppm (MACÍAS *et al.*, 2010). Além dos tratamentos contendo o extrato, foram realizados dois controles, um negativo com solução tampão e DMSO (5 µL/mL) e outro positivo com o herbicida comercial Sanson 40 SC[®] (ingrediente ativo Nicossulfurom = 40 g/L) e DMSO (5 µL/mL), nas diluições de 800, 400 e 200 ppm. O bioensaio foi realizado utilizando-se quatro repetições em caixas plásticas transparentes (13 x 8 x 3 cm) forradas com duas folhas de papel de filtro e umedecidas com 8 mL do extrato ou do herbicida nas diferentes concentrações, além do controle negativo. Sementes de trigo foram pré-germinadas em água destilada, em incubadora B.O.D. a 25 °C no escuro. Dez sementes pré-germinadas, ou seja, que apresentavam radícula de 2 mm de comprimento, foram semeadas em cada caixa, acondicionadas em incubadora B.O.D. a 25 °C com fotoperíodo de 12 h durante 7 dias. Ao final desse período as plântulas foram avaliadas quanto à sua normalidade, o comprimento da parte aérea e subterrânea das plantas foi medido. Plântulas anormais são aquelas que não apresentam potencial para continuar seu desenvolvimento, com parte aérea ou raízes podres, necróticas, atrofiadas ou completamente ausentes. Plântulas mortas também estão incluídas nesta classificação (REGRAS..., 2009).

Os dados são apresentados como porcentagem de inibição ou estímulo do crescimento inicial em relação ao controle negativo. Estes foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Barlett a $\alpha = 0,05$ para a avaliação da normalidade e homocedasticidade dos dados, e então submetidos ao teste de Welch a $\alpha = 0,05$ para comparação entre médias (SANTANA e RANAL, 2004). Todas as análises foram realizadas utilizando o software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011).

2.4. Resultados e Discussão

2.4.1. Estudo Fitoquímico por Isolamento Biodirigido

O isolamento biodirigido de substâncias com atividade alelopática de *Aristolochia esperanzae* está sumarizado nas Figuras 2.3 a 2.10. Para todos os materiais vegetais, o extrato AcOEt foi o mais ativo, com atividade semelhante a do herbicida comercial GOAL[®] (Figuras 2.8-A a 2.10-A). Esta atividade foi detectada nas frações obtidas nas cromatografias subsequentes (Figura 2.8 a 2.10).

A partir da metodologia adotada, espera-se que estejam presentes na fração hexano substâncias de baixa polaridade, como ácidos graxos. Em contrapartida, espera-se que na fração água estejam presentes substâncias de alta polaridade, como açúcares. Na fração acetato de etila espera-se encontrar substâncias de polaridade intermediária, como fenóis, terpenóides, flavonóides e alcalóides, provenientes do metabolismo secundário da planta. Substâncias que apresentam atividade alelopática pertencem principalmente a esses grupos (KIM *et al*, 2005).

Os extratos aquosos de raízes e folhas maduras de *A. esperanzae* apresentaram ação estimulante da elongação dos coleótilos de trigo (Figuras 2.8-A e 2.9-A). Essa atividade pode ser explicada pela esperada maior concentração de açúcares nesses extratos, mas o estímulo pronunciado apresentado pelo extrato aquoso de folhas maduras (150% e 100% quando comparados ao controle nas concentrações 400 ppm e 200 ppm) sugere a possível presença de compostos com ação estimulante da multiplicação ou elongação celular do tecido vegetal testado.

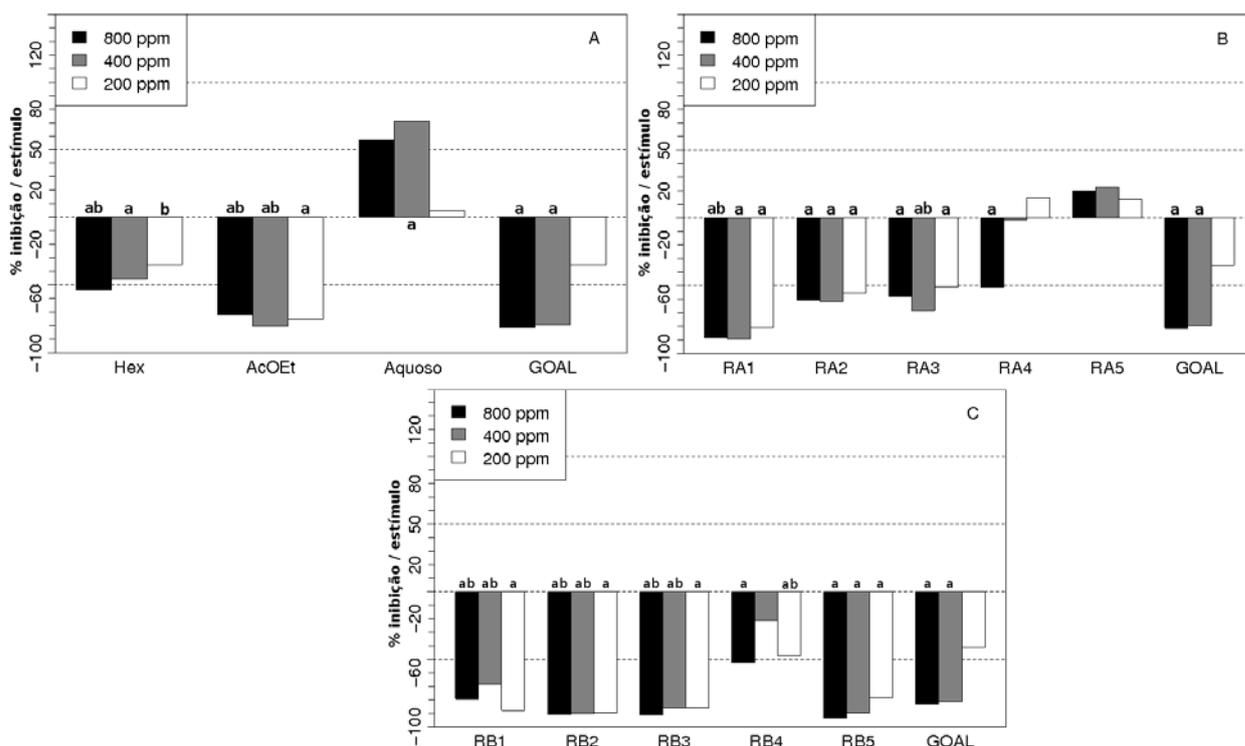


FIGURA 2.8. Porcentagem de inibição ou estímulo do alongamento de fragmentos de coleóptilo estiolado de trigo (*Triticum aestivum* L.) sob a ação de diferentes frações do extrato bruto de raízes de *A. esperanzae* e soluções do herbicida GOAL® em diferentes concentrações. Os valores são expressos como porcentagem do controle negativo. a Valores significativamente diferentes do controle negativo, de acordo com o teste de Welch a $\alpha = 0,05$. b Valores não significativamente diferentes do controle positivo, de acordo com o teste de Welch a $\alpha = 0,05$.

Devido a sua ação inibitória, os extratos AcOEt foram considerados os mais promissores para subseqüentes fracionamentos e foram, então, submetidos a uma nova separação cromatográfica. As cinco frações obtidas para cada material vegetal e as frações obtidas nas separações cromatográficas posteriores foram submetidas a bioensaios com coleóptilo de trigo (Figuras 2.8 a 2.10).

Levando-se em consideração a atividade apresentada nos bioensaios com coleóptilos de trigo e a massa das amostras, optou-se por prosseguir o estudo fitoquímico das frações do extrato AcOEt de folhas maduras de *A. esperanzae*. A partir da amostra FMA₁, o isolamento biodirigido de substâncias com atividade alelopática de folhas maduras de *A. esperanzae* levou à obtenção da amostra semi-purificada ISO (Figura 2.6-B a 2.6-F). Esta amostra, apesar de apresentar atividade inferior à demonstrada pelas amostras FMD_{2A} e FMD_{3b}, quando analisada por CCD mostrou-se composta pelas substâncias majoritárias encontradas nas outras duas amostras mais ativas (Figura 2.11).

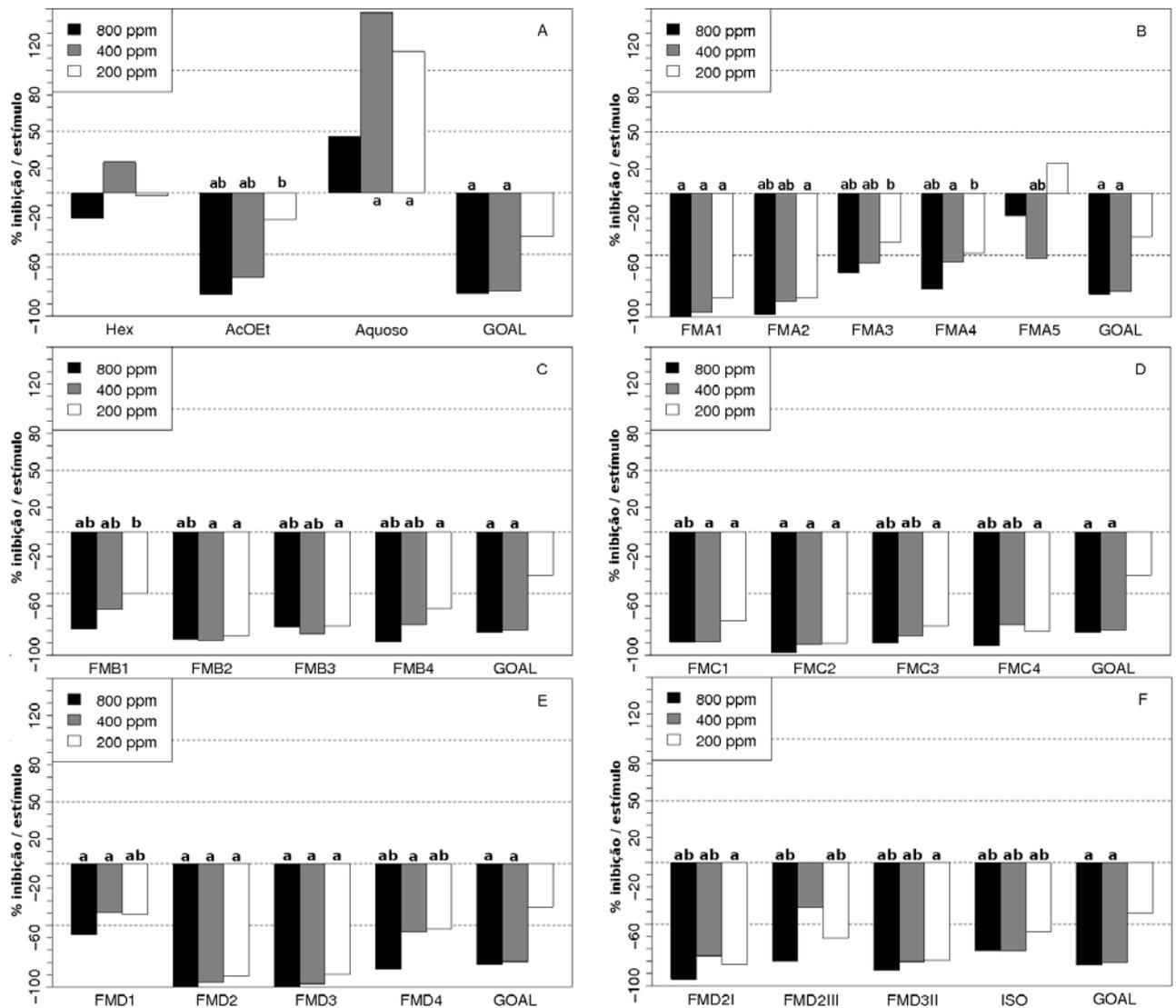


FIGURA 2.9. Porcentagem de inibição ou estímulo do alongamento de fragmentos de coleótilo estiolado de trigo (*Triticum aestivum* L.) sob a ação de diferentes frações do extrato bruto de folhas maduras de *A. esperanzae* e soluções do herbicida GOAL[®] em diferentes concentrações. Os valores são expressos como porcentagem do controle negativo. a Valores significativamente diferentes do controle negativo, de acordo com o teste de Welch a $\alpha = 0,05$. b Valores não significativamente diferentes do controle positivo, de acordo com o teste de Welch a $\alpha = 0,05$.

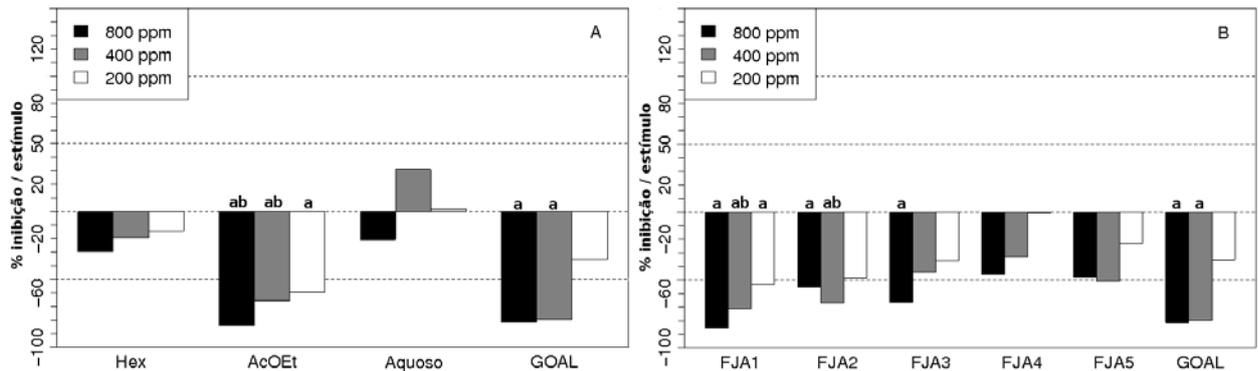


FIGURA 2.10. Porcentagem de inibição ou estímulo do alongamento de fragmentos de coleótilo estiolado de trigo (*Triticum aestivum* L.) sob a ação de diferentes frações do extrato bruto de folhas jovens de *A. esperanzae* e soluções do herbicida GOAL® em diferentes concentrações. Os valores são expressos como porcentagem do controle negativo. a Valores significativamente diferentes do controle negativo, de acordo com o teste de Welch a $\alpha = 0,05$. b Valores não significativamente diferentes do controle positivo, de acordo com o teste de Welch a $\alpha = 0,05$.

A diminuição da atividade dos compostos ao longo do fracionamento cromatográfico pode se dar por modificação química ou degradação dos compostos ativos, ou por atividade sinérgica de dois ou mais compostos presentes nas frações semi-purificadas (DAYAN e DUKE, 2006). Como não foram observadas alterações no padrão de composição química nas amostras analisadas por CCD, acreditamos que esta perda de atividade tenha se dado por sinérgismo das substâncias presentes na fração ISO, com as outras presentes nas frações semi-purificadas FMD₂₁ e FMD₃₁₁.

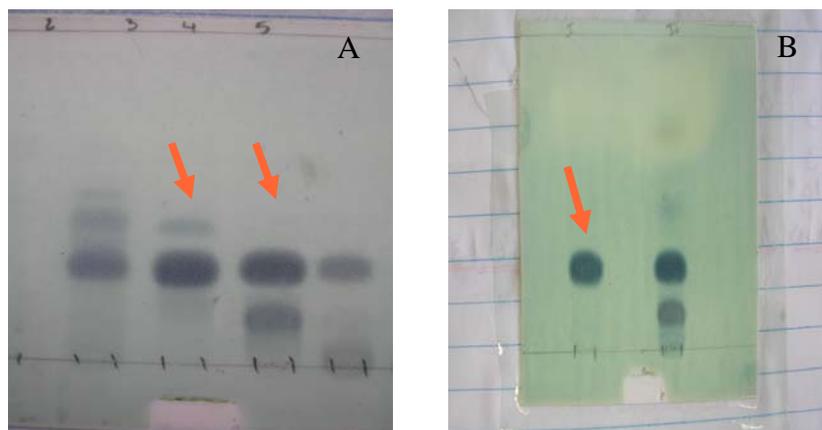


FIGURA 2.11. Placas de CCD obtidas nas cromatografias da amostra FMC₂, resultando nas amostras FMD₁ – FMD₄, com as amostras mais ativas FMD₂ e FMD₃ indicadas pela seta (A) e da amostra FMD₃, resultando nas amostras FMD_{3b} e ISO, esta última indicada pela seta (B). As placas foram eluídas em mistura Hex / AcOEt 7:3. (Fotos: JATOBÁ, L. J., 2011).

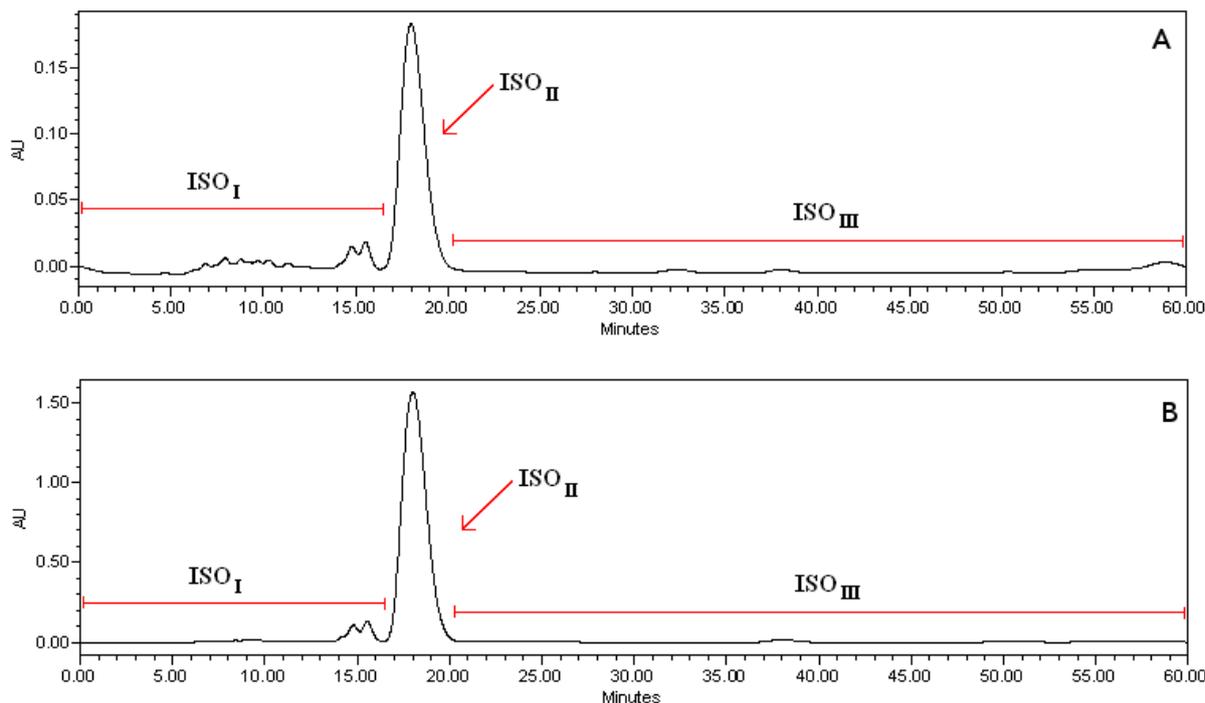


FIGURA 2.12. Perfil cromatográfico por CLAE-UV da amostra ISO a 254 nm (A) e 280 nm (B).

A separação cromatográfica da amostra ISO por CLAE-UV resultou no perfil cromatográfico mostrado na Figura 2.12. As amostras ISO_I, ISO_{II} e ISO_{III} foram coletadas, evaporadas à secura e a amostra ISO_{II} foi submetida a análise por CLAE-UV-MS. O cromatograma assim obtido mostrou três picos (P1, P2 e P3) com absorção no ultravioleta e espectro de massas como mostrado na Figura 2.13. Os três picos correspondem a três compostos isoméricos (**4**), (**5**) e (**6**), com fragmentos de massas com razão m/z 321 Da e 161 Da, e bandas de absorção no ultravioleta a 234 nm e entre 286 nm e 287 nm.

Uma pesquisa detalhada na literatura não permitiu encontrar uma estrutura molecular com dados espectroscópicos e espectrométricos similares aos encontrados para os isômeros presentes na amostra ISO_{II}.

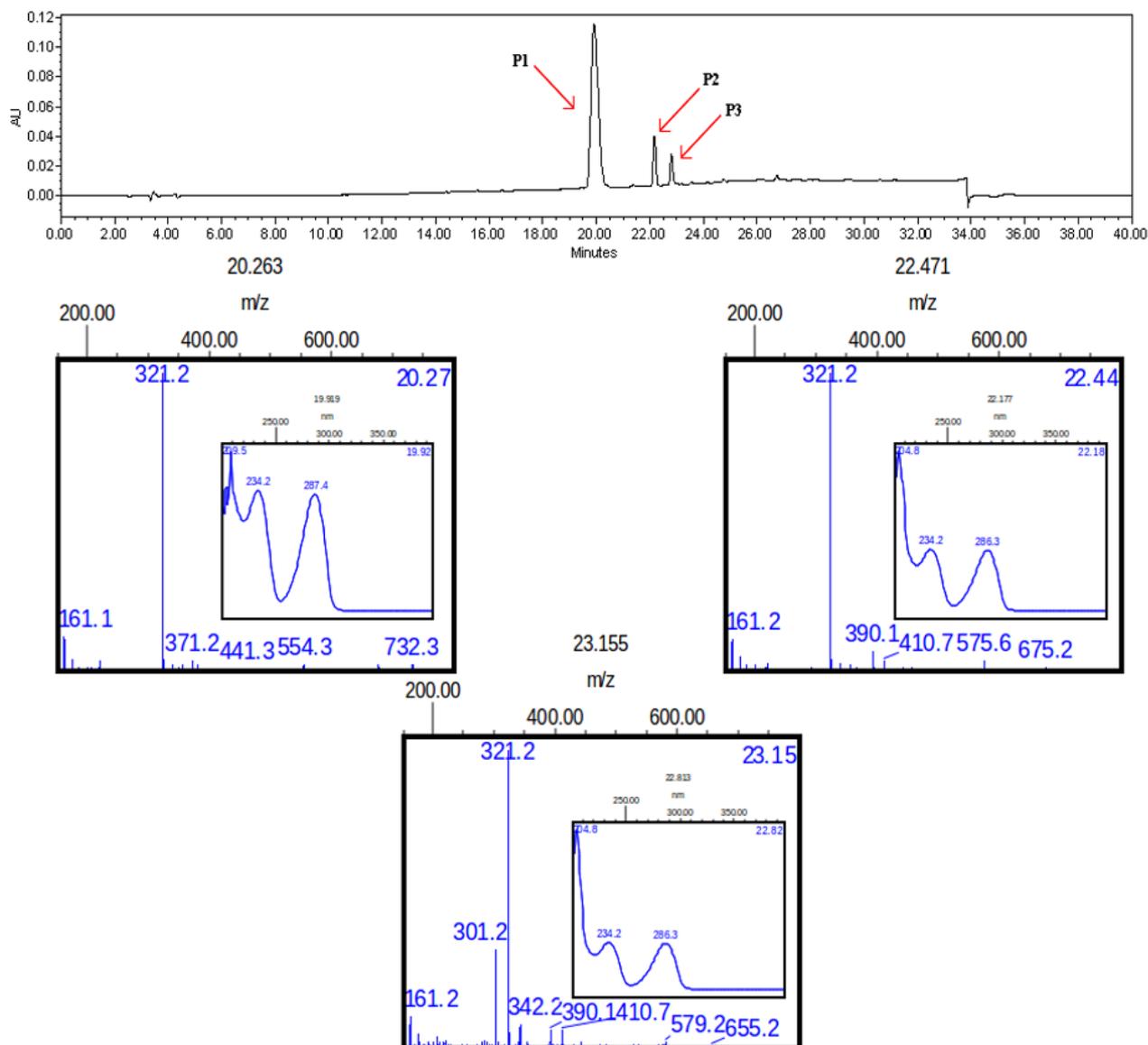


FIGURA 2.13. Cromatograma por CLAE-UV-MS da amostra ISO_{II} e espectros de massas e absorção no ultravioleta dos compostos (4), (5) e (6).

A amostra ISO_{II} foi purificada por CLAE-UV, resultando nas frações ISO_{II}-P₁ (3,8 mg), ISO_{II}-P₂ (0,3 mg) e ISO_{II}-P₃ (0,4 mg). O composto ISO_{II}-P₁ (4), isolado como um sólido branco amorfo, foi analisado por diversos experimentos de ressonância magnética nuclear mono e bidimensionais: RMN-¹H, RMN-¹³C (BBD e DEPT), HMBC, HSQC e COSY-¹H-¹H (Anexos A a F), que possibilitaram estabelecer sua estrutura parcial (Figura 2.14, Tabela 2.1).

O espectro de RMN-¹H exibe quatro tripletos na região de 3 – 4 ppm, característicos de hidrogênios oximetínicos. A análise conjunta dos espectros RMN-¹H, RMN-¹³C, HSQC E COSY-¹H-¹H indicou um grupo CH₂ (δ ¹H 3,83 e 3,39, δ ¹³C 71,0) acoplado com um grupo metino substituído por um substituinte não identificado

TABELA 2.1. Valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) e correlações a longa distância da substância presente na amostra ISO_{II}-P₁ (**4**) em DMSO-*d*₆.

δ ^{13}C	δ ^1H (mult, J/Hz, integral)	COSY- ^1H - ^1H	HMBC
<i>Subunidade 1</i>			
97,8	5,03 (t, 4,49 Hz, 1H)	H2	C2, C3, C4
51,5	1,84 (m, 1H)*	H1, H5a, H5b	C3, C5
42,9	2,27 (m, 1H)*	H4a, H4b, H5b	-
71,0	a - 3,39 (t, 7,90 Hz, 1H)	H3, H4b	C1, C3
	b - 3,83 (t, 7,90 Hz, 1H)	H3, H4a	C2
33,4	a - 2,49 (m, 1H)*	H2	?
	b - 2,62 (m, 1H)*	H2	?
<i>Subunidade 2</i>			
102,4	4,99 (m, 1H)*	H2	C4
53,1	1,89 (m, 1H)*	H1, H3, H5a, H5b	C1
45,8	2,01 (m, 7,03 Hz, 1H)	H2, H4a, H4b, H6	C2, C4, C5, C6
70,6	a - 3,56 (t, 8,30 Hz, 1H)	H3, H4b	C1, C2, C3, C6
	b - 3,75 (t, 8,30 Hz, 1H, b)	H3, H4a	C1, C2, C3, C6
37,8**	a - 2,38 (m, 1H)*	H2	C2, C3
	b - 2,55 (m, 1H)*	H2	?
38,2**	2,50 (m, 2H)*	H3	?

* Valores referentes ao centro do multipletto. ** Podem estar interconvertidos. ? Não foi possível a atribuição devido à grande sobreposição / proximidade de sinais.

A análise dos mesmos espectros indicou outro grupo CH₂ (δ ^1H 3,56 e 3,75, δ ^{13}C 70,6) acoplado com um grupo metino (δ ^1H 2,01, δ ^{13}C 45,8). Este, por sua vez, mostra-se ligado a dois grupos, outro grupo metino (δ ^1H 1,89, δ ^{13}C 53,1) substituído por um grupo CH₂ (δ ^1H 2,55 e 2,58, δ ^{13}C 37,8) ligado a um substituinte desconhecido, e um grupo CH₂ (δ ^1H 2,50, δ ^{13}C 38,20) também ligado a um radical não identificado. Devido à proximidade de sinais nos espectros bidimensionais, não foi possível determinar com clareza a posição dos carbonos em δ ^{13}C 38,2 e δ ^{13}C 37,8. Assim, as atribuições sugeridas na Tabela 2.1 e Figura 2.14-B podem ser interconvertidas. Além destes acoplamentos, o hidrogênio em δ ^1H 1,89 correlaciona-se diretamente com um grupo CH (δ ^1H 4,99, δ ^{13}C 102,4) e um hidrogênio em δ ^1H 5,97 que, por sua vez, não exibe correlação direta com qualquer átomo de carbono. Pelo fato do hidrogênio em δ ^1H 5,97 estar vizinho ao CH com δ ^{13}C 102,4, atribuiu-se este hidrogênio a um grupo OH. O fato do carbono em δ ^{13}C

102,4 estar substituído por dois oxigênios justificaria seu deslocamento químico (Figura 2.14-B).

Além das correlações descritas na determinação estrutural das duas subunidades do composto presente na amostra ISO_{II}-P₁, observa-se no espectro de ¹³C e DEPT desta substância 18 sinais referentes a carbonos sp², sendo 10 CH (δ ¹³C 107,92, 107,98, 108,06, 108,79, 108,95, 109,16, 121,26, 121,36, 121,46 e 121,70) e 8 quaternários (δ ¹³C 133,88, 134,39, 134,98, 145,14, 145,26, 145,30, 147,14 e 147,20). Observa-se também, nos espectros de RMN-¹H e RMN-¹³C, a presença de sinais característicos de dois grupamentos -O-CH₂-O- (δ ¹H 5,94-5,96, δ ¹³C 100,55 e 100,62). A completa determinação da estrutura do composto ISO_{II}-P₁ não pode ser realizada por falta de dados que possibilitassem uma análise inequívoca. Espectros de RMN adicionais estão sendo obtidos, para que se possa conseguir informações complementares para a identificação do composto.

NAVICKIENE e LOPES (2001) isolaram um derivado hemiacetálico do 5-hidroxiacetilfurfural (**7**), a *cis*-*N*-feruloil-3-*O*-metildopamina (**8**), a partir da extração com acetona de galhos de *Aristolochia gehrtii*. A ocorrência de compostos derivados de fenetil (C₆-C₂) é significativa em *A. gehrtii*, a partir dos quais derivados biosintéticos como o composto (**8**) podem ser formados.

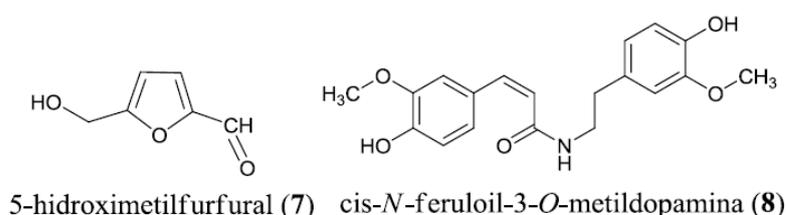


FIGURA 2.15. Estruturas do 5-hidroxiacetilfurfural (**7**) e seu derivado hemiacetálico *cis*-*N*-feruloil-3-*O*-metildopamina (**8**). Fonte: NAVICKIENE e LOPES (2001).

2.4.2. Bioensaio de Fitotoxicidade

O isolamento dirigido por bioensaios com coleótilos de trigo de substâncias com atividade alelopática em folhas maduras de *Aristolochia esperanzae*, realizado de acordo com MACÍAS *et al.* (2006) e MACÍAS *et al.* (2010), levou à obtenção da fração ISO, utilizado no bioensaio de fitotoxicidade.

O trigo (*Triticum aestivum* L.) foi escolhido como espécie alvo para este bioensaio por apresentar-se como boa espécie alvo padrão, mais resistente que

outras espécies comumente utilizadas, como alface, cebola ou agrião (MACÍAS *et al.*, 2000). Os dados obtidos para o crescimento inicial de trigo apresentaram-se com distribuição não-normal de acordo com o teste de Shapiro-Wilk a $\alpha = 0,05$ e, então, o teste não-paramétrico de Welch a $\alpha = 0,05$ foi utilizado para a comparação entre médias.

De acordo com experimentos preliminares, o herbicida GOAL, adotado nos bioensaios com coleóptilos de trigo, provocou a morte de quase a totalidade das plântulas testadas, impedindo assim a comparação dos resultados oferecidos com os obtidos para a fração testada. Assim, optou-se pelo herbicida comercial Sanson 40 SC[®] para o controle positivo, por apresentar-se menos tóxico que o herbicida GOAL[®] sob o desenvolvimento inicial das plântulas de trigo testadas.

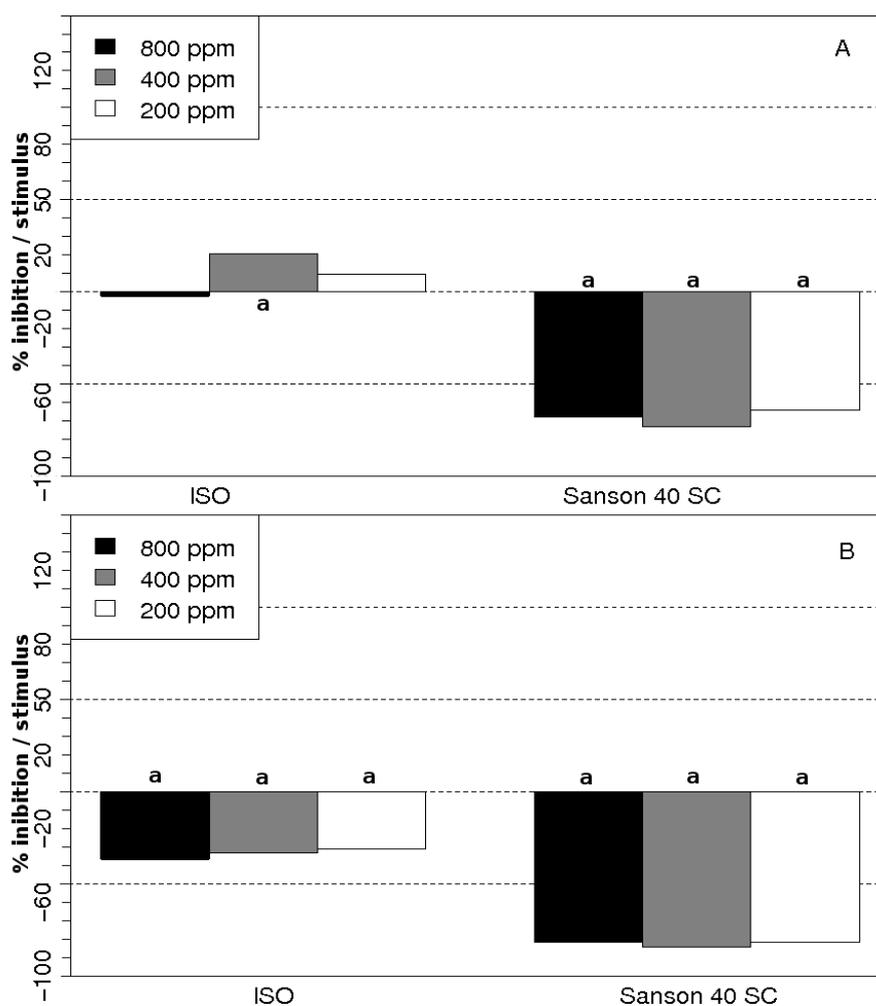


FIGURA 2.16. Porcentagem de inibição ou estímulo do crescimento inicial da parte aérea (A) e sistema radicular (B) de trigo (*Triticum aestivum* L.) crescido sob a ação da fração ISO e do herbicida Sanson SC 40[®] em diferentes concentrações. a Valores significativamente diferentes do controle negativo de acordo com o teste de Welch a $\alpha = 0,05$.

A Figura 2.16-A apresenta os resultados para o crescimento da parte aérea das plântulas de trigo. A parte aérea destas plântulas não sofreu inibição do desenvolvimento na presença das soluções da fração ISO quando comparada ao controle negativo, com estímulo do crescimento na concentração intermediária (400 ppm). Embora não tenha apresentado inibição, as soluções da fração ISO provocaram anormalidades necróticas, um efeito diferente daquele apresentado pelo controle positivo (Figuras 2.16-A e 2.17). As plântulas anormais crescidas na presença do herbicida comercial Sanson SC 40[®] apresentaram pronunciada inibição do desenvolvimento e anormalidades não-necróticas, como geotropismo negativo e atrofia da parte aérea e do sistema radicular. Além disso, a ocorrência de plântulas anormais e o crescimento da parte aérea das plântulas de trigo na presença da fração ISO apresentaram efeito hormético (Figura 2.16-A e 2.17).

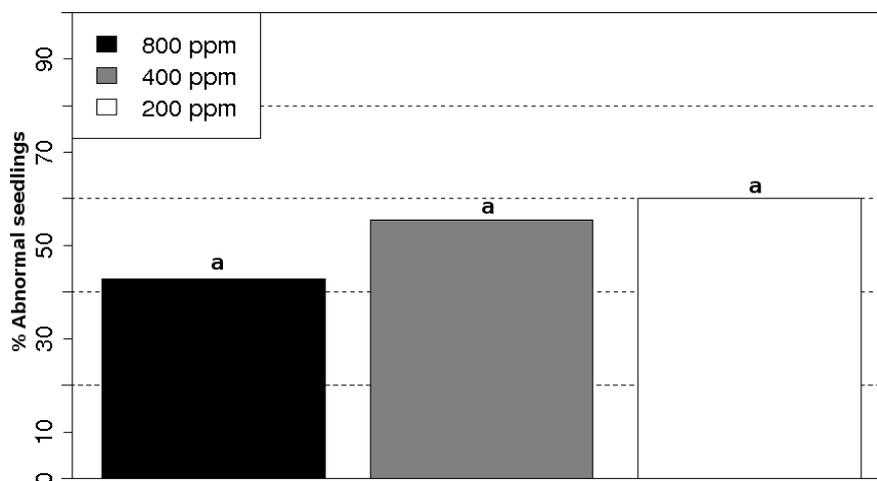


FIGURA 2.17. Porcentagem de plântulas de trigo anormais relativo ao controle negativo. a Valores significativamente diferentes do controle negativo de acordo com o teste de Welch a $\alpha = 0,05$. Não houve diferença significativa entre os valores apresentados para as concentrações 400 ppm e 200 ppm de acordo com o teste de Welch ($p < 0,05$).

A hormese é um fenômeno amplamente reconhecido na área de alelopatia, relacionado à natureza espécie-específica da resposta alelopática, isto é, o fenômeno observado depende do aleloquímico específico e da espécie alvo adotada (AN, 2005; CALABRESE e BLAIR, 2009). O estímulo do crescimento na presença da fração ISO a 400 ppm pode ser explicada por realocação de recursos sob stress (CALABRESE e BALDWIN, 2003; CALABRESE, 2005). Assim, na maior

concentração (800 ppm), o efeito fitotóxico seria forte o suficiente para inibir o crescimento radicular e também o *trade-off* de recursos. A concentração intermediária (400 ppm) inibiu o crescimento radicular mas não foi suficientemente forte para prevenir este *trade-off*. A concentração mais baixa não apresentou efeito sobre o desenvolvimento radicular e não ofereceu condição estressante para que a planta necessitasse realocar recursos no desenvolvimento da parte aérea (FORBES, 2001). No entanto, com o aumento do comprimento médio da parte aérea das plântulas de trigo, aumentou também a área de contato deste tecido com as substâncias presentes nas soluções da fração ISO a 400 ppm e 200 ppm, o que poderia explicar o aumento na frequência de anormalidades necróticas.

A Figura 2.16-B apresenta os resultados para o crescimento inicial do sistema radicular de plântulas de trigo. Quando comparado ao controle negativo, o desenvolvimento radicular destas plântulas foi inibido tanto na presença de soluções da fração ISO quanto nas soluções do herbicida comercial Sanson SC 40[®], apresentando-se como mais sensível do que o desenvolvimento da parte aérea.



FIGURA 2.18. Anormalidade necrótica na parte aérea de plântula de trigo crescida na presença da fração ISO. (Foto: JATOBÁ, L. J., 2011).

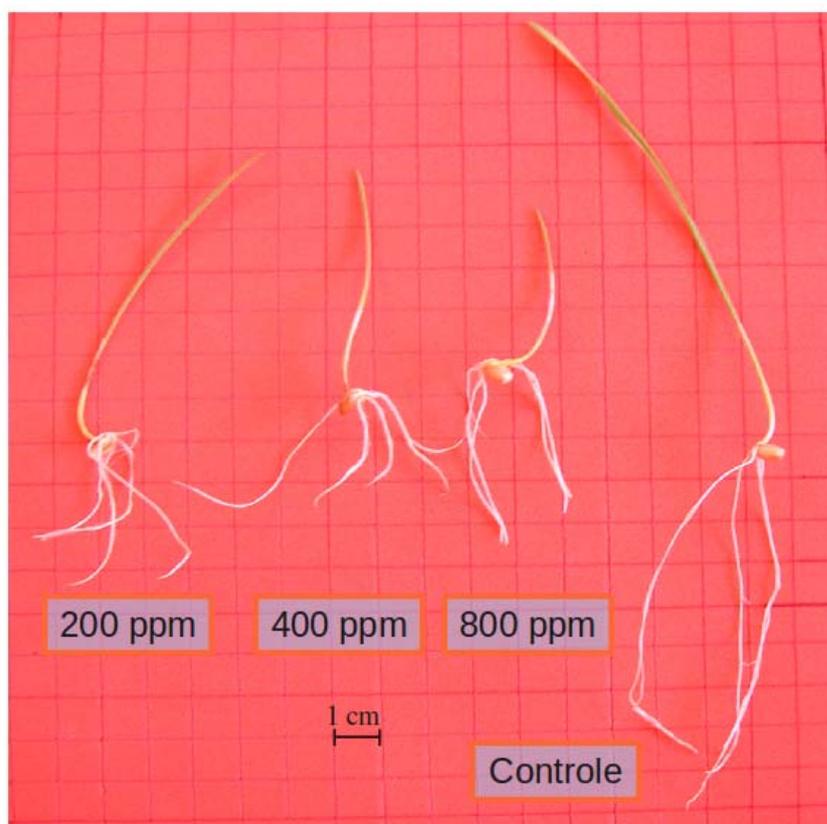


FIGURA 2.19. Plântulas de trigo crescidas sob a ação de soluções da fração ISO, de folhas maduras de *A. esperanzae*, a 200 ppm, 400 ppm, 800 ppm, e do controle negativo. (Fotos: JATOBÁ, L. J., 2011).

Poucos estudos compararam o custo e eficiência de produtos para manejo de pragas agrícolas baseados em produtos naturais com pesticidas sintéticos (COPPING e DUKE, 2007). Apesar dos resultados apresentados pela fração ISO serem menos pronunciados do que os apresentados pelo herbicida Sanson SC 40[®] sobre o comprimento da parte aérea e o sistema radicular de plântulas de trigo, as anormalidades necróticas causadas pelos aleloquímicos presentes na fração ISO sugerem diferenças nos modos de ação bioquímicos de ambos. Assim, os aleloquímicos de folhas maduras de *Aristolochia esperanzae* podem levar ao desenvolvimento de novos herbicidas, servindo como ferramentas importantes na prevenção de resistência aos herbicidas convencionais por parte das populações de plantas daninhas (DAYAN e DUKE, 2006; COPPING e DUKE, 2006).

2.5. Conclusões

1. O isolamento biodirigido de compostos com atividade alelopática em *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze levou à purificação de três compostos isoméricos com fragmentos de massas com razão m/z 321 Da e 161 Da, e absorção no ultravioleta em 234 nm e entre 286 nm e 287 nm.

2. Análises por RMN mono e bidimensionais de um destes compostos – composto (4), presente na amostra ISO_{II}-P₁ de folhas maduras – possibilitaram estabelecer sua estrutura parcial.

3. A fração ISO apresentou atividade inibitória sobre o desenvolvimento inicial da parte aérea e do sistema radicular de trigo, além de ter provocado anormalidades necróticas na parte aérea destas plântulas por efeito de contato.

4. Apesar dos resultados apresentados pela fração ISO serem menos pronunciados do que aqueles apresentados pelo herbicida comercial Sanson 40 SC[®], as diferenças de atividade observadas sugerem diferentes modos de ação bioquímica de ambos.

2.6. Referências

- AIBU, S.; JOYCE, E.; PANIWNKY, L.; LORIMER, J.; MASON, T. Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinales* for the food and pharmaceutical industry. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 11, n. 3-4, p. 261-265, 2004.
- AN, M. Mathematical modelling of dose-response relationship (hormesis) in allelopathy and its application. **Nonlinearity in Biology, Toxicology and Medicine**, v. 3, n. 2, p. 153-172, 2005.
- ANJUM, T.; BJAWA, R. A bioactive annouionone from sunflower leaves. **Phytochemistry**, v. 66, n. 16, p. 1919-1921, 2005.
- BLAIR, A. C.; WESTON, L. A.; NISSEN, S. J.; BRUNK, G. R.; HUFBAUER, R. A. The importance of analytical techniques in allelopathy studies with the reported allelochemical catechin as an example. **Biological Invasions**, v. 11, n. 2, p. 325-332, 2009.
- CALABRESE, E. J.; BALDWIN, L. A. Hormesis: the dose-response revolution. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 43, p. 175-197, 2003.
- CALABRESE, E. J. Paradigm lost, paradigm found: the re-emergence of hormesis as a fundamental dose-response model in toxicological sciences. **Environmental Pollution**, v. 138, n. 3, p. 379-411, 2005.
- CALABRESE, E. J.; BLAIR, R. B. Hormesis and plant biology. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 1, p. 42-48, 2009.
- CHOU, C. H. Introduction to allelopathy. In: REIGOSA, M. J.; PEDROL, N.; GONZÁLEZ, L. (Eds.). **Allelopathy – A Physiological Process With Ecological Implications**. Netherlands, Springer, 2006. p. 1-9.
- COPPING, L. G.; DUKE, S. O. Natural products that have been used commercially as crop protection agents. **Pest Management Science**, v. 63, p. 524-554, 2007.
- DAYAN, F. E.; DUKE, S. O. Clues in the search for new herbicides. In: REIGOSA, M. J.; PEDROL, N.; GONZÁLEZ, L. (Eds.). **Allelopathy – A Physiological Process With Ecological Implications**. Netherlands, Springer, 2006. p. 63-83.
- FORBES, V. E. Is hormesis an evolutionary expectation?. **Functional Ecology**, v. 14, n. 1, p. 12-24, 2001.
- FORDYCE, J. A. A model without a mimic: Aristolochic acids from the california pipevine swallowtail, *Battus philenor hirsuta*, and its host plant, *Aristolochia californica*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, n. 11, p. 2567-2578, 2000.

GARCÍA, J. L. L. G. **Aislamento y Síntesis de Compuestos Bioactivos de Girasol Variedades Cultivadas de Perodovick y Atila**. 2009. Tese (Doutorado em Química) - Universidad de Cádiz, Cádiz, Espanha, 2009.

GATTI, B. A. **Atividade Alelopática de Extratos Aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Ktze e *Ocotea odorifera* (Vell) Rohwer na Germinação e Crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L.**. 2003. 148 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – CCBS, UFSCar, São Carlos, 2003.

GATTI, B. A.; PEREZ, S. C. J. G. A.; LIMA, M. I. S. Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L.. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n.3, p. 459-472, 2004.

GATTI, A. B.; FERREIRA, A. G.; ARDUIM, M.; PEREZ, S. C. J. G. A. Allelopathic effects of aqueous extracts of *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze on development of *Sesamum indicum* L. seedlings. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n.2, p. 454-461, 2010.

GRISI, P. U. **Potencial Alelopático de *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae)**. 2010. 127 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – CCBS, UFSCar, São Carlos, 2011.

INTERNATIONAL ALLELOPATHY SOCIETY [Online]; 2011. <http://www.international-allelopathy-society.org> (Acessado em 01 de Novembro de 2011).

KATO-NOGUCHI, H. Isolation and identification of an allelopathic substance in *Pisum sativum*. **Phytochemistry**, v. 62, n. 7, p. 1141-1144, 2003.

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

LOPES, L. M. X.; NASCIMENTO, I. R.; SILVA, T. Phytochemistry of the Aristolochiaceae family. In: **Research Advances in Phytochemistry**. Global Research Network, Ed. Kerala, vol. 2, 2001.

LOTINA-HENNSSEN, B.; KING-DIAZ, B.; AGUILAR, M. I.; HERNANDEZ TERRONES, M. G. Plant secondary metabolites. Targets and mechanisms of allelopathy. In: REIGOSA, M. J.; PEDROL, N.; GONZÁLEZ, L. (Eds.). **Allelopathy – A Physiological Process With Ecological Implications**. Netherlands, Springer, 2006. p. 229-265.

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

MACÍAS, F. A.; CHINCHILLA, N.; VARELA, R. M.; MOLINILLO, J. M. G. Bioactive steroids from *Oryza sativa* L.. **Steroids**, v. 71, n. 7, p. 603-608, 2006.

MACÍAS, F. A.; GALINDO, J. L. G.; GALINDO, J. C. G. Evolution and current status of ecological phytochemistry. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22-24, p. 2917-2936, 2007.

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

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

NAVICKIENE, H. M. D.; LOPES, L. M. X. Alkamides and phenethyl derivatives from *Aristolochia gehrtii*. **Journal of the Brazilian Chemistry Society**, v. 12, n. 4, p. 467-472, 2001.

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

OTSUKA, H. Purification by solvent extraction using partition coefficient. In: SARKER, S. D.; LATIF, Z.; GRAY, A. I. (Eds.). **Natural Products Isolation**. Methods in Biotechnology 20, New Jersey, Humana Press, 2006. p.269-273.

PARAJ, D. R.; FEENY, P.; GUPTA, K. S.; ROSENBERRY, L. d-(+)-Pinitol, an oviposition stimulant for the pipevine swallowtail butterfly, *Battus philenor*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 18, n. 5, p. 799-851, 1992.

R DEVELOPMENT CORE TEAM [Online]; R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, 2011. <http://www.R-project.org> (Acessado em 03 de Outubro de 2011).

REGRAS para Análise de Sementes. Brasília, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA / ACS, 2009.

ROSTAGNO, M.; PALMA, M.; BARROSO, C. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. **Journal of Chromatography A**, v. 1012, n. 2, p. 119-128, 2003.

SANTANA, D. G.; RANAL, M. A. **Análise da Germinação: Um Enfoque Estatístico**. Brasília, Editora UnB, 2004. 247p.

WU, T. S.; DAMU, A. G.; SU, C. R. & KUO, P. C. Chemical constituents and pharmacology of *Aristolochia* species. In: ATTA-UR-RAHMAN (Ed.). **Studies in Natural Products Chemistry**, Vol. 32. Netherlands, Elsevier, 2005. p.855-1018.

YU, J. Q.; LIAO, Z. X.; CAI, X. Q.; LEI, J. C. & ZOU, G. L. Composition, antimicrobial activity and cytotoxicity of essential oils from *Aristolochia mollissima*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 23, n. 2, p. 162-167, 2007.

CONCLUSÕES GERAIS

1. Os extratos AcOEt provenientes de raízes, folhas maduras e folhas jovens de *A. esperanzae* O. Kuntze foram os que apresentaram maior atividade inibitória sobre a elongação de fragmentos de coleóptilo estiolado de trigo.

2. Os extratos AcOEt de raízes, folhas maduras e folhas jovens apresentaram atividade alelopática sobre o desenvolvimento inicial das espécies alvo testadas.

3. O estágio de maturação das folhas apresenta interferência na sua atividade alelopática.

4. O extrato AcOEt de folhas maduras apresentou maior atividade inibitória no desenvolvimento inicial da parte aérea das espécies alvo, principalmente sobre eudicotiledôneas. Para amendoim-bravo, esta atividade foi semelhante ou superior à apresentada pelo herbicida comercial Sanson 40 SC[®].

5. O extrato AcOEt de raízes foi o que apresentou maior atividade inibitória do desenvolvimento inicial do sistema radicular das plantas alvo testadas, com maior atividade sobre as duas espécies de monocotiledôneas. Para capim-arroz, esta atividade foi semelhante à apresentada pelo herbicida comercial Sanson 40 SC[®].

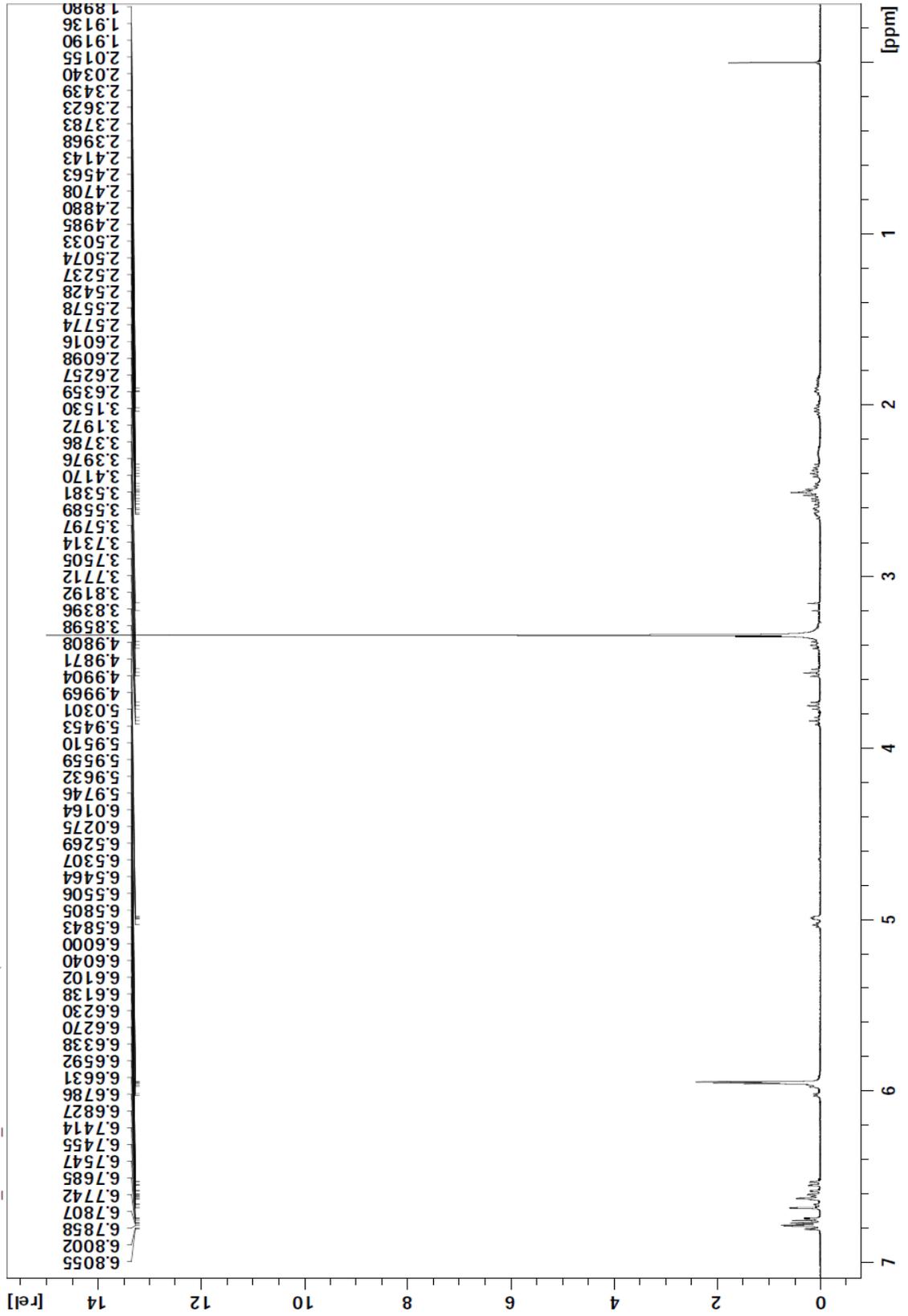
6. O isolamento biodirigido de compostos com atividade alelopática em *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze levou à purificação de três compostos isoméricos com fragmentos de massas com razão m/z 321 Da e 161 Da, e absorção no ultravioleta em 234 nm e entre 286 nm e 287 nm.

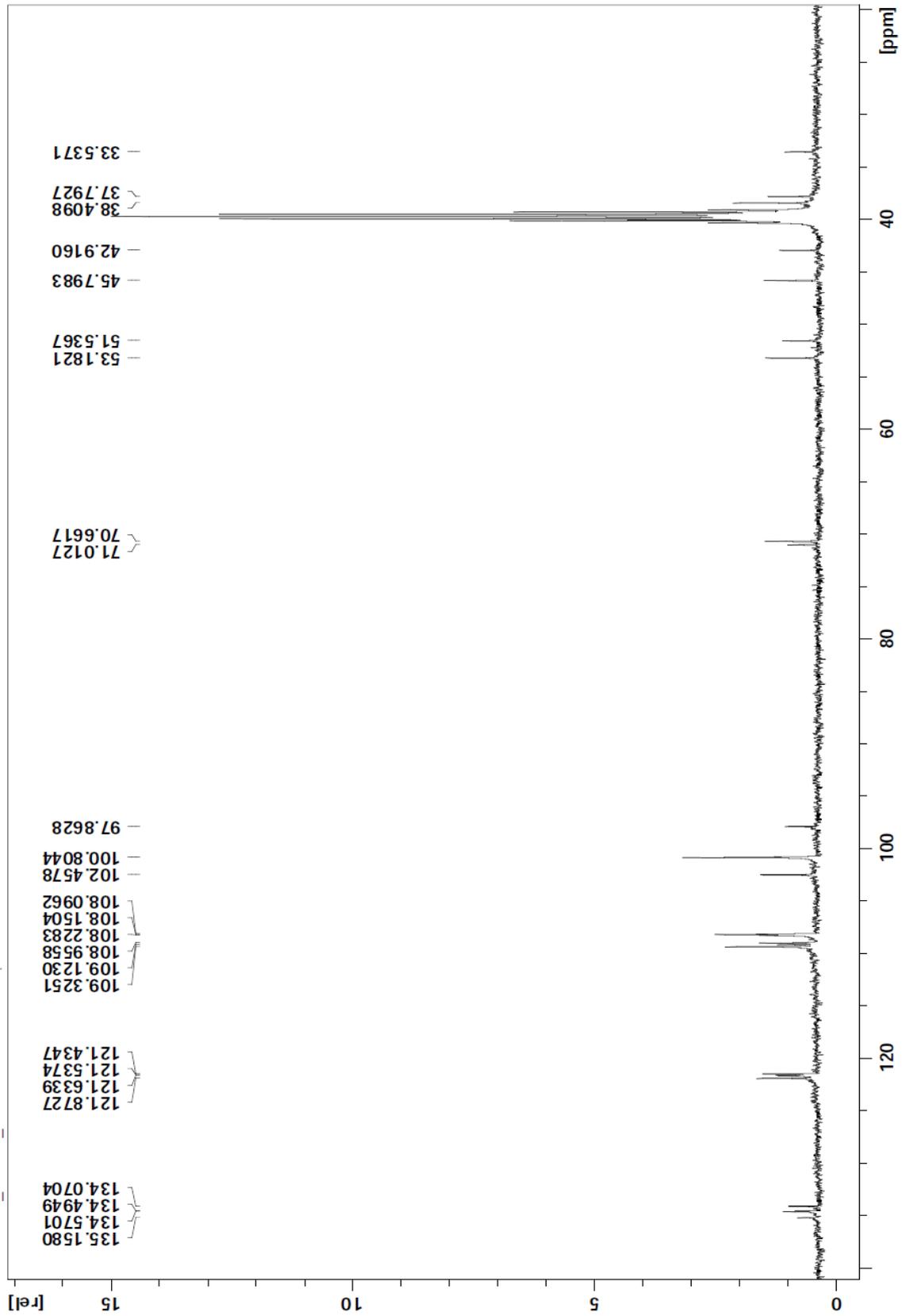
7. Análises por RMN mono e bidimensionais de um destes compostos – composto (4), presente na amostra ISO_{II}-P₁ de folhas maduras – possibilitaram estabelecer sua estrutura parcial.

8. A fração ISO apresentou atividade inibitória sobre o desenvolvimento inicial da parte aérea e do sistema radicular de trigo, além de ter provocado anormalidades necróticas na parte aérea destas plântulas por efeito de contato.

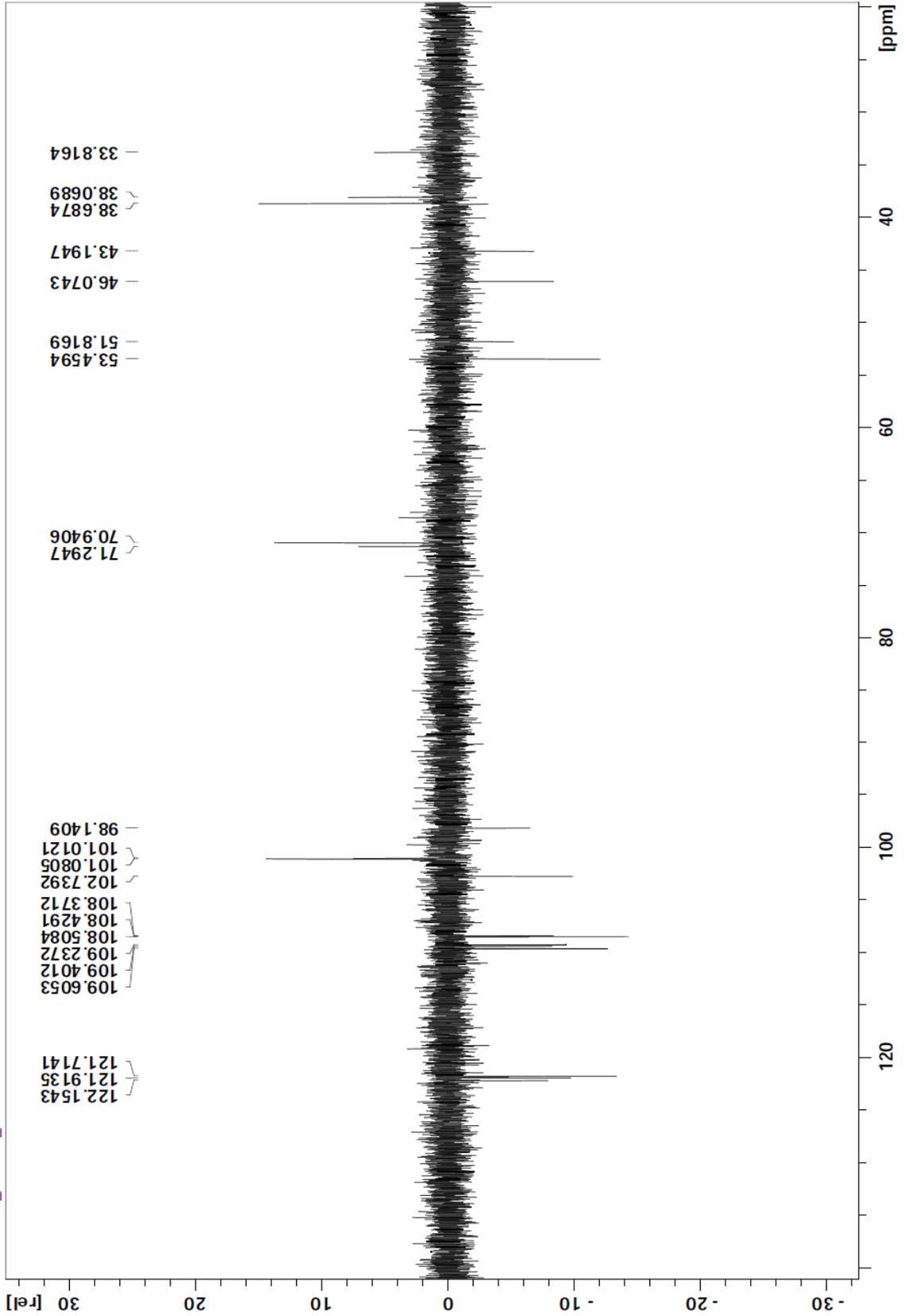
9. Apesar dos resultados apresentados pela fração ISO serem menos pronunciados do que aqueles apresentados pelo herbicida comercial Sanson 40 SC[®], as diferenças de atividade observadas sugerem diferentes modos de ação bioquímica de ambos.

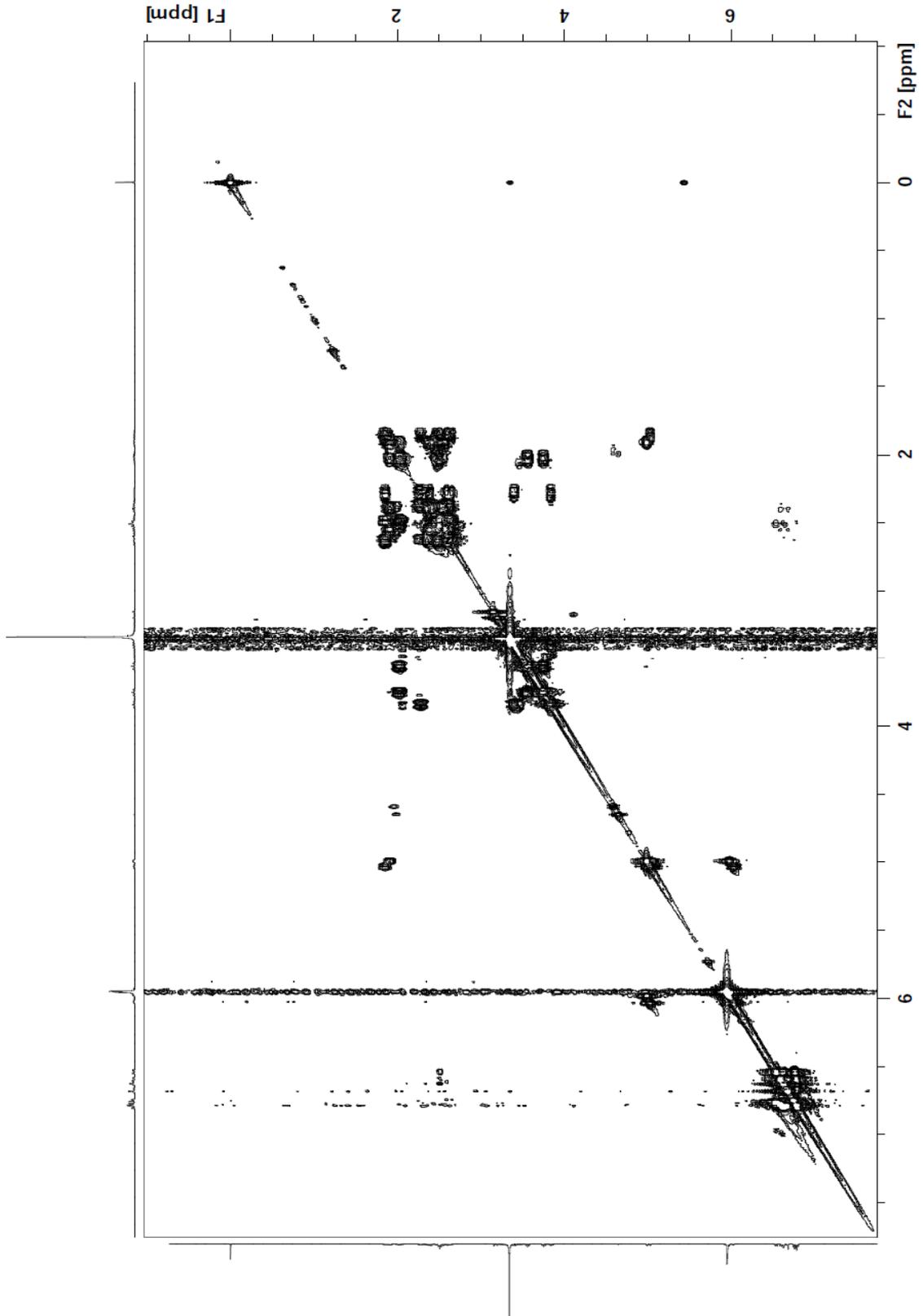
ANEXO A – Espectro RMN- ¹H do composto ISO_{II}-P₁



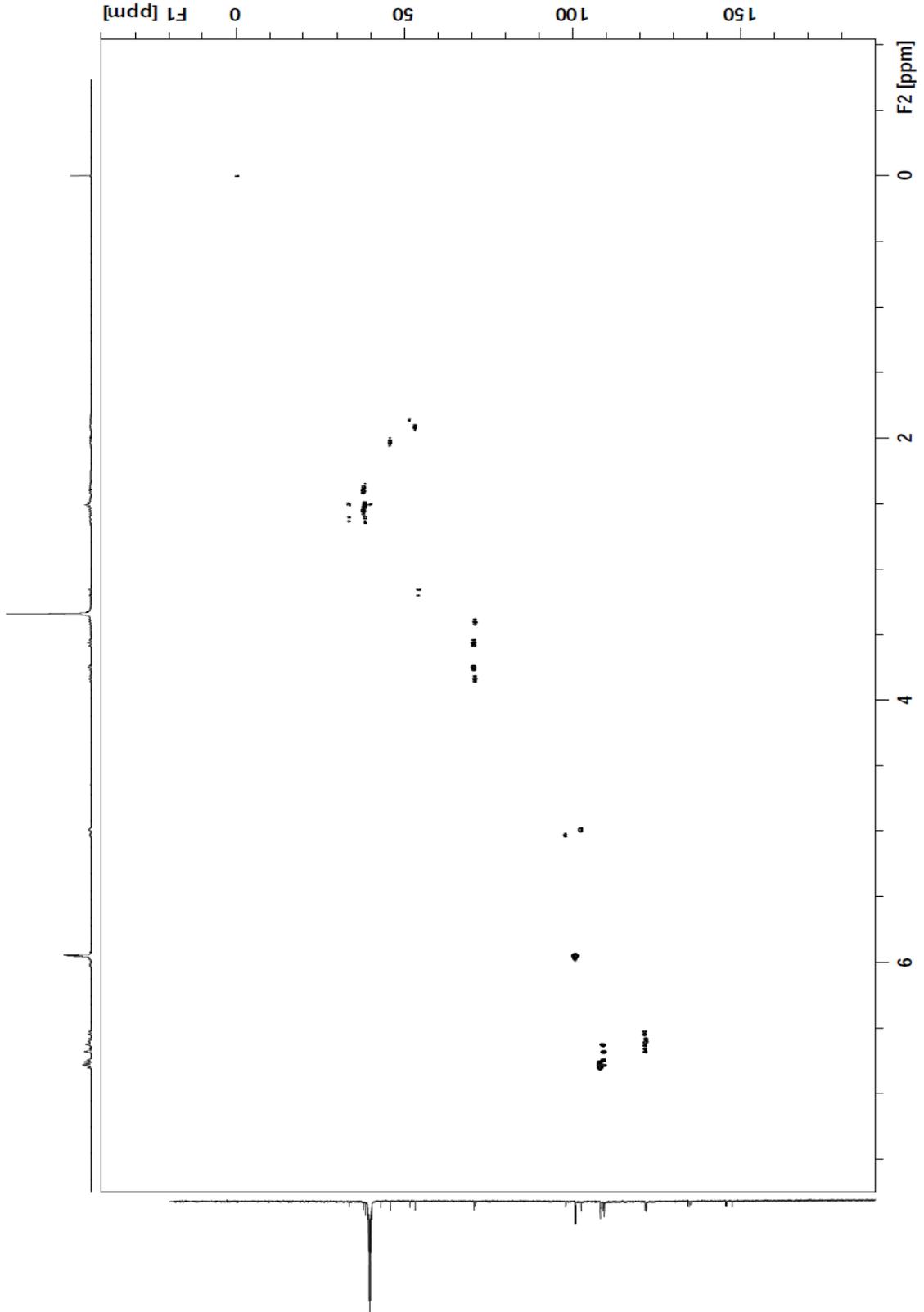
ANEXO B – Espectro RMN-¹³C do composto ISO_{II}-P₁

ANEXO C – Espectro DEPT-¹³C do composto ISO_{II}-P₁



ANEXO D - Espectro RMN-COSY- ^1H - ^1H do composto ISO_{II}-P₁

ANEXO E - Espectro RMN-HSQC do composto ISOII-P1



ANEXO F - Espectro RMN-HMBC do composto ISO_{II}-P₁