

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

RAISSA BARCHA ACCARINI

**Atividade fitotóxica de extratos foliares de *Piptocarpha rotundifolia* (candeia)
(Less.) Baker – Asteraceae**

São Carlos –SP

Brasil

2016

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

RAISSA BARCHA ACCARINI

**Atividade fitotóxica de extratos foliares de *Piptocarpha rotundifolia* (candeia)
(Less.) Baker – Asteraceae**

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

**Orientadora:
Prof.^a. Dr.^a. Sonia Cristina Juliano Gualtieri**

São Carlos –SP
Brasil
2016

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

A169a Accarini, Raissa Barcha
 Atividade fitotóxica de extratos foliares de
Piptocarpha rotundifolia (candeia) (Less.) Baker -
Asteraceae / Raissa Barcha Accarini. -- São Carlos :
UFSCar, 2016.
 125 p.

 Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de
São Carlos, 2016.

 1. Atividade fitotóxica. 2. Candeia. 3.
Coleóptilos. 4. Cromatografia. 5. Extratos. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Raissa Barcha Accarini, realizada em 08/08/2016:

Profa. Dra. Sonia Cristina Juliano Gualtieri
UFSCar

Prof. Dr. Moacir Rossi Forim
UFSCar

Profa. Dra. Flavia Cristina Sossae
UNIARA

*“Tudo é considerado impossível,
até acontecer”*

Nelson Mandela

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à professora Sonia Cristina Juliano Gualtieri, por todas as oportunidades que me concedeu desde minha graduação, pela amizade e toda orientação e atenção dadas a mim.

À Maristela Imatomi, por toda ajuda, conselhos, companheirismo e amizade. Obrigada por tudo e mais um pouco!

Aos meus pais, Mario e Rejane, por toda força, incentivo e suporte. Sem vocês eu jamais teria chegado até aqui.

À Viviane de Cássia Pereira, pela amizade, risadas, conversas e todos os conselhos, desde que ingressei no mestrado.

À minha grande amiga Caroline Palamin, por me acolher e estar sempre disposta a me ajudar quando precisei. Também à minha tia Ana Maria Accarini por toda ajuda durante meu período de adaptação.

A todos os amigos do laboratório, que me ajudaram de alguma forma: Laffayette Pereira, Luciana Jatobá, Simone Anese, Viviane Pereira, Maristela Imatomi e Maria Augusta Machado. Obrigada!

Ao professor Moacir Rossi Forim e à Alany Ribeiro, do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), por todo apoio e ajuda com a parte química do meu trabalho, e pela disponibilidade e atenção concedidas a mim.

Ao professor Marcos Arduim, pela disponibilização do laboratório de Anatomia Vegetal-UFSCar.

Aos professores que participaram da minha qualificação: José Luis Garcia Galindo, Flávia Sossae e Maristela Imatomi. Obrigada pelas valiosas sugestões e conselhos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da
Universidade Federal de São Carlos.

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

SUMÁRIO

SUMÁRIO DE FIGURAS.....	10
SUMÁRIO DE TABELAS.....	14
RESUMO GERAL	15
ABSTRACT	17
INTRODUÇÃO GERAL.....	19

Capítulo I

“Atividade fitotóxica de extratos foliares de *Piptocarpha rotundifolia* (candeia) (Less.) – Baker, oriundos de extração eluotrópica”

RESUMO	33
ABSTRACT	34
1. Introdução	35
2. Material e Métodos	37
2.1. Coleta e processamento do material vegetal	37
2.2. Preparação dos extratos	38
2.3. Bioensaio de crescimento de coleótilos de trigo.....	39
2.4. Bioensaio de germinação e crescimento de plântulas.....	40
2.5. Estudo anatômico de raízes (células do metaxilema) de gergelim.....	41
2.6. Análise estatística	42
2.7. Técnicas cromatográficas.....	43
2.7.1. Cromatografia em coluna	43
2.7.2. Cromatografia de camada delgada (CCD)	43
3. Resultados	44
3.1. Rendimento dos extratos brutos	44

3.2. Bioensaio de crescimento de coleóptilos de trigo.....	45
3.3. Bioensaio de germinação de plântulas.....	46
3.4. Bioensaio de crescimento de plântulas.....	49
3.5. Estudo anatômico de raízes (células do metaxilema) de gergelim.....	53
3.6. Rendimento das frações e subfrações.....	57
3.7. Cromatografia de camada delgada (CCD)	57
3.8. Bioensaio de crescimento de coleóptilos de trigo com frações e subfrações.....	58
4. Discussão	61
5. Conclusão.....	66
6. Referências	67

Capítulo II

“Atividade fitotóxica de extratos foliares de *Piptocarpha rotundifolia* (candeia) (Less.) – Baker, obtidos com extração líquido-líquido”

RESUMO.....	72
ABSTRACT	74
1. Introdução	76
2. Material e Métodos.....	79
2.1. Coleta e processamento do material vegetal	79
2.2. Preparação dos extratos.....	80
2.3. Bioensaio de crescimento de coleóptilos de trigo.....	81
2.4. Bioensaio de germinação e crescimento de plântulas.....	83
2.5. Estudo anatômico de raízes (células do metaxilema) de gergelim	84
2.6. Análise estatística	85

2.7. Técnicas cromatográficas.....	86
2.7.1. Cromatografia em coluna.....	86
2.7.2. Cromatografia de camada delgada (CCD)	87
3. Resultados.....	88
3.1. Rendimento dos extratos brutos.....	88
3.2. Bioensaio de crescimento de coleótilos de trigo.....	88
3.3. Bioensaio de germinação e crescimento de plântulas.....	89
3.4. Estudo anatômico de raízes (células do metaxilema) de gergelim	94
3.5. Rendimento das frações e subfrações	95
3.6. Bioensaio com coleótilos de trigo com frações e subfrações.....	96
4. Discussão	98
5. Conclusão	101
6. Referências	102

Capítulo III

“Estudo do perfil químico dos extratos, frações e subfrações de *Piptocarpha rotundifolia* (candeia) (Less.) - Baker oriundos de diferentes metodologias de extração”

RESUMO	106
ABSTRACT	107
1. Introdução	108
2. Material e Métodos	111
2.1. Coleta e processamento do material vegetal	111
2.2. Preparação dos extratos	111

2.3. Análises por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE) e identificação química	112
3. Resultados	113
4. Discussão	119
5. Conclusão	121
6. Referências	121
CONCLUSÕES GERAIS	125

SUMÁRIO DE FIGURAS

Introdução geral

- Figura 1. Mapa da área destacada da extensão do cerrado no Brasil (Fonte: WWF Brasil, 2016)22
- Figura 2. *Piptocarpha rotundifolia*: arvoreta, ramos, inflorescências, sementes, casca e madeira. (Lorenzi, 1998)24
- Figura 3: Estruturas químicas de um alfa-carofileno (1), beta-carofileno (2), geraniol (3) e linalol 4) (Sigma-Aldrich, 2016)25

Capítulo I

- Figura 1. Vista aérea da UFSCar com a área de cerrado identificada (Fonte: Google Maps, 2016– modificado)37
- Figura 2. Fluxograma para a obtenção dos extratos, frações e subfrações. Indicados em negrito, foram selecionados para os fracionamentos subsequentes39
- Figura 3. Valores médios de percentual de inibição de coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum*) submetidos à ação dos extratos brutos de *Piptocarpha rotundifolia* em diferentes concentrações. * indicam tratamentos que diferiram estatisticamente do controle negativo, e + indicam tratamentos estatisticamente iguais ao herbicida comercial GOAL® na mesma concentração46
- Figura 4. Percentual de germinação de espécies alvo tratadas com extratos brutos de *Piptocarpha rotundifolia*, provenientes de extração eluotrópica em diferentes concentrações47
- Figura 5. Efeito dos extratos brutos originários da extração em ordem eluotrópica, de folhas de *Piptocarpha rotundifolia* sobre o crescimento inicial de plântulas de amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*), capim-colonião (*Megathyrsus maximus*), cebola (*Allium cepa*) e gergelim (*Sesamum indicum*) em diferentes concentrações. (*) indicam os extratos nas concentrações que apresentaram diferença significativa quando comparado com o controle negativo (Solução tampão com DMSO)50
- Figura 6. Anormalidades apresentadas pelas espécies-alvo tratadas com extrato de folhas de *P. rotundifolia*. Capim-colonião: A (controle negativo), B (atrofia e necrose de raiz), C (inversão gravitópica). Amendoim-bravo: D (controle), E (inversão gravitópica), F (necrose de raiz e atrofia de parte aérea) e G (atrofia severa de parte aérea)51
- Figura 7. Valores de porcentagem de anomalias verificadas em plântulas de capim-colonião, amendoim-bravo, cebola e gergelim, tratadas com extratos brutos

- oriundos de extração eluotrópica, sendo estas anomalias: N.R. (necrose de raiz), A.R. (atrofia de raiz), A.Pa (atrofia de parte aérea) e I.G. (inversão gravitrópica).....52
- Figura 8. Fotomicrografia de células do metaxilema radicular de plântulas de gergelim tratadas com os extratos D: (A) controle, (B) 0.2mg.mL⁻¹, (C) 0.4 mg.mL⁻¹ e (D) 0.8mg.mL⁻¹. As marcações equivalem à medida correspondente a 50 micrômetros.....54
- Figura 9. Frequência relativa das classes de tamanho (µm) das células do metaxilema radicular de gergelim (*Sesamum indicum*) submetidas à ação do extratos brutos A, B, C, D e E de *Piptocarpha rotundifolia* em diferentes concentrações.....56
- Figura 10. Cromatografia em Camada Delgada, com os extratos brutos, frações e subfrações provenientes do extrato acetônico (D)57
- Figura 11. Efeito das frações referentes ao fracionamento do extrato D de folhas adultas *Piptocarpha rotundifolia* sobre o comprimento de coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum*). (*) indica tratamento que apresenta diferença significativa quando comparado com o controle negativo. (+) indica tratamento com efeito igual ao do controle positivo na mesma concentração. O controle negativo corresponde às soluções com o herbicida Goal®, e o positivo à solução tampão com DMSO.....59
- Figura 12. Efeito dos extratos referentes ao fracionamento do extrato D1 de folhas adultas *Piptocarpha rotundifolia* sobre o comprimento de coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum*). (*) indica tratamento que apresenta diferença significativa quando comparado com o controle negativo. (+) indica tratamento com efeito igual ao do controle positivo na mesma concentração. O controle positivo corresponde às soluções com o herbicida Goal®, e o negativo à solução tampão com DMSO60
- Figura 13. Efeito das subfrações referentes ao fracionamento de D1A sobre o comprimento de coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum*). (*) indica tratamento que apresenta diferença significativa quando comparado com o controle negativo. (+) indica tratamento com efeito igual ao do controle positivo na mesma concentração. O controle positivo corresponde às soluções com o herbicida Goal®, e o negativo à solução tampão com DMSO.....61

Capítulo II

- Figura 1. Vista aérea da UFSCar com a área de cerrado identificada (Fonte: Google Maps, 2016– modificado)79
- Figura 2. Funil de separação contendo frações visivelmente particionadas (Raíssa Accarini, arquivo pessoal)81

- Figura 3. Coleóptilos de trigo após a realização do bioensaio, organizados em planilha a serem fotografados para posterior medição. (Raíssa Accarini, arquivo pessoal)83
- Figura 4. Fluxograma da obtenção de frações obtidas de extratos foliares de *Piptocarpha rotundifolia* utilizando-se a partição líquido-líquido de feitos em sequência87
- Figura 5. Efeito dos extratos brutos de folhas jovens *Piptocarpha rotundifolia*, oriundos de extração líquido-líquido, sobre o comprimento de coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum*). (*) indica tratamento que apresenta diferença significativa quando comparado com o controle negativo. O controle negativo corresponde à solução tampão com DMSO89
- Figura 6. Efeito dos extratos brutos referentes à extração líquido-líquido, de folhas adultas de *Piptocarpha rotundifolia* sobre o crescimento inicial de plântulas de amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*), capim-colonião (*Megathyrus maximus*), cebola (*Allium cepa*) e gergelim (*Sesamum indicum*) em diferentes concentrações. (*) indicam os extratos nas concentrações que apresentaram diferença significativa quando comparado com o controle negativo (Solução tampão com DMSO)90
- Figura 7. Anormalidades apresentadas pelas espécies-alvo tratadas com extrato de folhas de *P. rotundifolia*. Capim-colonião: A (controle negativo). B (atrofia e necrose de raiz), C (inversão gravitrópica). Amendoim-bravo: D (controle), E (inversão gravitrópica), F (necrose de raiz e atrofia de parte aérea) e G (atrofia severa de parte aérea)92
- Figura 8. Valores de porcentagem de anomalias verificadas em plântulas de capim-colonião, amendoim-bravo, cebola e gergelim, tratadas com extratos brutos oriundos de extração líquido-líquido, sendo estas anomalias: N.R. (necrose de raiz), A.R. (atrofia de raiz), A.Pa (atrofia de parte aérea) e I.G. (inversão gravitrópica)93
- Figura 9. Fotomicrografia de células do metaxilema radicular de plântulas de gergelim tratadas com o extrato (acetato-etílico (2): (A) controle, (B) 0.2mg.mL⁻¹, (C) 0.4 mg.mL⁻¹ e (D) 0.8mg.mL⁻¹. Escala: 50µm95
- Figura 10. Efeito das frações do extrato acetato etílico (2) de folhas adultas *Piptocarpha rotundifolia* sobre o comprimento de coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum*). (*) indica tratamento que apresenta diferença significativa quando comparado com o controle negativo. (+) indica tratamento com efeito igual ao do controle positivo na mesma concentração. O controle positivo corresponde às soluções com o herbicida Goal®, e o negativo à solução tampão com DMSO.....96
- Figura 11. Efeito das subfrações referentes ao subfracionamento de 2L, originárias de folhas adultas *Piptocarpha rotundifolia* sobre o comprimento de coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum*). (*) indica tratamento que apresenta diferença significativa quando comparado com o controle negativo. (+) indica tratamento

com efeito igual ao do controle positivo na mesma concentração. O controle positivo corresponde às soluções com o herbicida Goal®, e o negativo à solução tampão com DMSO97

Capítulo III

- Figura 1. Característica comum entre as lactonas sesquiterpênicas109
- Figura 2. Estruturas químicas das lactonas sesquiterpênicas identificadas nos extratos de folhas adultas de *Piptocarpha rotundifolia* usando a técnica de Cromatografia líquida de Ultra Eficiência (CLUE)114
- Figura 3. Fluxograma relacionando os compostos encontrados com os extratos e frações oriundos de fracionamento eluotrópico e líquido-líquido115
- Figura 4. Cromatogramas de íons totais dos extratos brutos (A, B e C / C, D e E) provenientes de extração eluotrópica.....116
- Figura 5. Cromatograma de íons totais das frações (D2, D3, D4 e D5) provenientes do fracionamento do extrato acetônico (D).....117
- Figura 6. Cromatogramas de íons totais dos extratos brutos 1 (hexano), 2 (acetato de etila) e 3 (aquoso), provenientes de partição líquido-líquido e dos extratos brutos C (acetato de etila) e 3 (aquoso), provenientes de extração eluotrópica e de extração líquido-líquido, respectivamente118
- Figura 7. Cromatograma dos extratos brutos (1, 2 e 3) oriundos de extração líquido-líquido, contendo os compostos glaucolídeos A e G e piptocarpinas A e B identificados.....119

SUMÁRIO DE TABELAS

Capítulo I

- Tabela 1. Rendimento¹ (mg e %) dos extratos brutos, frações e subfrações de folhas de *Piptocarpha rotundifolia*45
- Tabela 2. Valores de Velocidade de Germinação (h⁻¹) e sincronia de plântulas submetidas à ação de extratos brutos oriundos de extração eluotrópica de *Piptocarpha rotundifolia*, em diferentes concentrações48
- Tabela 3. Médias (µm) das células do metaxilema de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum*) tratadas com os extratos brutos de folhas de *Piptocarpha rotundifolia*, oriundos de extração eluotrópica, em diferentes concentrações55

Capítulo II

- Tabela 1. Rendimento¹ (mg e %) dos extratos brutos de folhas de *P. rotundifolia* obtidos por extração eluotrópica e por extração líquido-líquido.....88
- Tabela 2. Médias (µm) das células do metaxilema de plântulas de gergelim tratadas com os extratos brutos de folhas de *P. rotundifolia*, oriundos de extração líquido-líquido, em diferentes concentrações94
- Tabela 3. Rendimento¹ referente aos fracionamentos do extrato metanólico-aquoso de folhas de *P. rotundifolia* obtido na extração líquido-líquido, e suas subfrações96

Capítulo III

- Tabela 1. Condições de tempo, fluxo e proporções de solventes utilizadas para o processo de otimização cromatográfica112
- Tabela 2. Condições utilizadas em detector híbrido triplo quadruplo (QqQ), utilizado para identificação dos metabólitos ionizáveis no espectrofotômetro de massas de alta resolução.....113

RESUMO GERAL

O cerrado é uma das mais extensas formações vegetais brasileiras com 2.036.448 km², representando 22% do território nacional. O cerrado é considerado um hotspot mundial (Mittermeier et al., 2004) formado por três biomas: campos tropicais, savanas e florestas estacionais (Batalha, 2011; Brasil, 2015). A flora do cerrado apresenta uma elevada riqueza de espécies, com plantas herbáceas, arbustivas, arbóreas e cipós, totalizando 12.356 espécies que ocorrem espontaneamente, além de uma flora vascular nativa (pteridófitas e fanerógamas) somando 11.627 espécies (Mendonça et al., 2008). No entanto, o potencial químico de suas espécies vegetais ainda é subutilizado. A investigação de plantas com atividade alelopática vem de encontro com a necessidade de se apresentar novas alternativas no manejo integrado de pragas agrícolas. Estudos realizados sobre os efeitos biológicos destes compostos químicos representam uma importante ferramenta para o desenvolvimento de agroquímicos naturais mais específicos e menos prejudiciais ao ambiente. *Piptocarpha rotundifolia* (candeia) (Less.) – Baker, planta pertencente à família Asteraceae, embora seja considerada a maior representante das eudicotiledôneas do cerrado brasileiro, existem poucos os trabalhos publicados que tratam de investigações do potencial fitotóxico de seus metabólitos secundários. Sendo assim, o principal objetivo deste trabalho foi analisar o potencial fitotóxico dos extratos, frações e subfrações de *P. rotundifolia* sobre espécies-alvo de hortaliças e invasoras e o modo de ação dos mesmos. Na primeira etapa deste trabalho, foi realizada uma extração em ordem crescente de polaridade, onde o potencial fitotóxico dos extratos brutos foi avaliado sobre o crescimento de coleótilos de trigo, germinação e crescimento de plântulas de espécies invasoras e de hortaliças mono e eudicotiledôneas: amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla* L.), capim-colonião (*Megathyrus maximus* J.), cebola (*Allium cepa* L.) e gergelim (*Sesamum indicum* L.), respectivamente, bem como a avaliação do crescimento de células do metaxilema radicular de gergelim (*Sesamum indicum* L.). O extrato acetônico (D) foi selecionado para o fracionamento devido ao bom rendimento (2,370g), e apresenta uma atividade inibitória sobre o crescimento de coleótilos de trigo (*Triticum aestivum* L.) bem como sobre a germinação e crescimento de espécies-alvo indicadoras (cebola e gergelim) e invasoras amendoim-bravo e capim-colonião. Suas frações e subfrações foram também ensaiadas sobre o crescimento de coleótilos de trigo e as que apresentaram maiores rendimentos e atividade inibitória (D1 e D1A) foram selecionadas para os fracionamentos bioguiado subsequentes. Dando sequência aos

estudos, foi realizada uma extração líquido-líquido, que originou os extratos 1 (hexânico), 2 (acetato etílico) e 3 (aquoso) e, dentre estes, o extrato acetato etílico apresentou maior atividade inibitória sobre o crescimento de coleóptilos de trigo e também sobre a germinação e crescimento das espécies-alvo, bem como reduziu significativamente o crescimento de células do metaxilema de raízes de plântulas de gergelim. Sendo assim, este extrato foi refractionado em coluna cromatográfica de bancada, sendo a fração com maior rendimento denominada (2L), submetida a novos subfracionamentos. As subfrações resultantes foram testadas apenas em crescimento com coleóptilos de trigo. Para a complementação da pesquisa foi realizada uma análise do perfil químico dos compostos presentes nos extratos, frações e subfrações de *P. rotundifolia* provenientes de ambas metodologias de extração, utilizando a técnica de cromatografia líquida de ultra eficiência, onde foi encontrado um composto identificado como glaucolide b, e outros dois compostos já conhecidos para o gênero. Sendo assim, a espécie *Piptocarpha rotundifolia* mostra-se como promissora na busca de compostos fitotóxicos, devido à atividade inibitória apresentada pelos compostos presentes nos extratos ou frações.

Palavras-chave: atividade fitotóxica, candeia, coleóptilos, cromatografia, extratos, germinação.

ABSTRACT

The Brazilian savanna is one of the largest vegetation with 2,036,448 km², about 22% of the national territory. This bioma is considered a global hotspot (Mittermeier et al., 2004) and consists of three biomes: tropical fields, grasslands and dry forests (Batalha, 2011; Brasil, 2015). Cerrado flora has a high species richness with herbs, shrubs, tree and vines, totaling 12,356 species occurring spontaneously, as well as a native vascular flora (ferns and phanerogams) totaling 11,627 species (Mendonça et al., 2008). However, the chemical potential of its plant species is still underutilized. Research plants with allelopathic activity comes against the need to introduce new alternatives in the management of agricultural pests. Studies on the biological effects of these chemical compounds represent an important tool for the development of more specific agrochemicals natural and less harmful to the environment. *Piptocarpha rotundifolia* (Less.) - Baker belongs to the Asteraceae family, considered the most representative of the Brazilian cerrado eudicotyledons, but there are few published works that deal with potential investigations phytotoxic of this species and its secondary metabolites. Thus, the main objective of this study was to analyze the phytotoxic potential of *P. rotundifolia* extracts, fractions and subfractions on target species of vegetables and weeds and the mode of action of the same. In the first step of this work, an extraction in order of increasing polarity was done and the phytotoxic potential of crude extracts was evaluated on the growth of wheat coleoptile, germination and seedling growth of mono and eudicotyledons invasive and vegetable species: wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla* L.), guinea grass (*Megathyrsus maximus* J.), onion (*Allium cepa* L.) and sesame (*Sesamum indicum* L.), respectively, as well as the evaluation of the root sesame metaxylem cell growth. The acetone extract (D) was selected for the fractionation, due the mass (2370 mg) and the inhibitory activity on the growth of wheat coleoptile good as on the germination growth indicator target species (onion and sesame) and invasive (wild poinsettia and guinea grass). This fractions and subfractions were also tested on the growth of wheat coleoptile and those who had higher incomes and inhibitory activity (D1 and D1A) were selected for the following bioguided fractioning. After, a liquid-liquid extraction was performed using the extracts 1 (hexane), 2 (ethyl acetate) and 3 (aqueous) and, among these, the extract 2 showed inhibitory activity on the growth of wheat coleoptile and also on the germination and growth of the target species, as well as significantly reduced metaxylem cell root growth of sesame seedlings. Therefore, this

extract was refractionated by a countertop chromatography column, and the fraction with the highest income was denominated (2L), then refractionated. The resulting subfractions were tested only growing wheat coleoptile. To complete the survey, a chemical profile analysis was conducted using the extracts, fractions and subfractions of *P. rotundifolia* from both extraction methodologies, performing the ultra efficiency liquid chromatography technique, which has found a compound identified as glaucolide b and two other compounds known to the genre. Thus, the species *Piptocarpha rotundifolia* shown as promissing in the search of phytotoxic compounds due to their phytotoxic activity presented by their compounds.

Keywords: brazillian savanna, candeia, coleoptiles, cromatography, extracts, f phytotoxic activity, germination.

INTRODUÇÃO GERAL

A falta de mobilidade das plantas fez com que estas desenvolvessem importantes estratégias evolutivas de defesa para minimizar os prejuízos ocasionados pela competição com outras plantas vizinhas e pela predação. Entre tais estratégias, encontra-se a defesa do tipo química, caracterizada pela produção de metabólitos secundários responsáveis pela comunicação das plantas com o seu ambiente, incluindo as interações planta-planta, planta-insetos e planta-microorganismos (Oliveros-Bastidas, 2008). Este fenômeno é conhecido como alelopatia.

O termo alelopatia foi primeiramente cunhado por Molisch (1937) e seu significado provém do grego *allelon* = mútuo e *pathós* = prejuízo (Rizvi *et al.*, 1992). A Sociedade Internacional de Alelopatia descreve a alelopatia como a “ciência que estuda qualquer processo envolvendo, essencialmente, metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos que influenciam o crescimento e desenvolvimento de sistemas agrícolas e biológicos, incluindo efeitos positivos e negativos” (International Allelopathy Society, 2014).

A diversidade e a quantidade de metabólitos secundários produzidos podem variar entre indivíduos de uma mesma espécie, entre plantas de espécies diferentes, entre órgãos de um mesmo vegetal e também entre estágios de desenvolvimento, além de ser fortemente influenciada por fatores ambientais (Windsor *et al.*, 2005; Gobbo-Neto & Neto, 2007; Kroymann, 2011).

Muitos desses metabólitos desempenham funções importantes para a proteção vegetal contra patógenos (vírus, bactérias e fungos), plantas competidoras e contra herbívoros. Além disso, também podem atuar como sinalizadores para atrair agentes polinizadores e dispersores de sementes. Alguns ainda podem desempenhar outras funções fisiológicas como por exemplo, eles podem atuar como protetores contra a radiação ultravioleta ou como fonte de nitrogênio (Cipollini e Levey, 1997; Wink, 2010).

Dentre os métodos de controle e prevenção de pragas ou doenças agrícolas, o uso de agroquímicos continua sendo o componente mais importante para aumentar o rendimento das colheitas e reduzir o trabalho nas culturas (Silva, 2009). No entanto, o uso continuado de pesticidas em áreas de monocultura tem levado ao crescente aparecimento, em escala mundial, de biótipos de organismos tolerantes e resistentes a esses produtos sintéticos, o que tem ocasionado um aumento significativo dos custos de

produção e problemas graves de contaminação ambiental (Haig et al., 2009; Marangoni et al., 2012; Khaliq et al., 2013; Nebo et al., 2014).

Com o desenvolvimento da sociedade humana, promovido pela evolução agrícola e pecuária, as áreas destinadas à atividade rural foram expandidas, ocasionando a ampla distribuição de pragas, patógenos e plantas indesejáveis. Nesse contexto, a comunidade de plantas indesejáveis ou daninhas tornou-se cada vez mais densa e diversificada, com profunda especialização na ocupação dos agroecossistemas (Mortimer, 1990); sendo definida como qualquer planta que ocorre onde não é desejada, ou então uma planta sem valor econômico ou que compete, com o homem, pelo solo (Silva et al., 2007; Concenção et al., 2014). Em termos mais simples, uma planta pode ser considerada daninha se estiver direta ou indiretamente prejudicando determinada atividade humana (Concenção et al., 2014). Essas invasoras coevoluíram com as plantas cultivadas, porém, elas possuem várias características fisiológicas (crescimento rápido e resistência à outras espécies), agronômicas (alta capacidade de competição e estabelecimento) e reprodutivas (elevada produção de sementes e capacidade de dispersão), que as tornam dominantes em comparação com as cultivadas.

Nos agroecossistemas, elas competem pelos mesmos recursos das espécies cultivadas, reduzem a produtividade, deterioram a qualidade dos produtos dela resultantes, o que ocasiona enormes perdas financeiras (Kohli et al., 2004; Tanveer et al., 2012).

No Brasil, algumas espécies invasoras se destacam pelos severos danos que causam às culturas agrícolas, como a de soja por exemplo. Uma delas é a *Euphorbia heterophylla* L., conhecida como amendoim-bravo, uma planta daninha conhecida por causar consideráveis perdas na produtividade de sistemas agrícolas, como tem sido verificado para cultura de soja (Carvalho et al., 2010). Além disso, é considerada de difícil controle, sendo resistente a herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS) e a protoporfirinogênio oxidase (Protox) (Trezzi et al., 2009).

Outra espécie que se destaca é o *Megathyrus maximus* Jacq. (capim-colonião), uma gramínea conhecida como uma das plantas daninhas mais importantes em áreas canavieiras e de reflorestamentos, principalmente devido a sua elevada agressividade, intensa capacidade de produção e longevidade de sementes (da Costa et al., 2002). Embora herbicidas sintéticos sejam bastante utilizados no controle de plantas invasoras (Freitas et al., 2004), inclusive no controle de *M. maximus* (Alves et al., 2002), estes apresentam problemas quando comparados com os herbicidas naturais, principalmente

em relação aos impactos causados no ambiente, como contaminação de água e solos (Souza Filho et al., 2006).

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

Produtos à base de plantas podem ser usados na forma de extratos, contendo uma mistura de compostos ativos de natureza química diversa; ou como aleloquímicos puros, os quais podem exibir diferentes mecanismos de inibição no desenvolvimento de pragas (Koul & Walia, 2009). A vantagem dos compostos naturais derivados de plantas é que geralmente exibem bioatividade em baixas concentrações, são biodegradáveis, raramente contém átomos halogenados e tem baixa ou nenhuma toxicidade sobre espécies não-alvo (Farooq et al., 2011).

O Brasil possui uma abundante riqueza de espécies vegetais, tornando-se uma fonte inesgotável de exploração na procura por novos compostos bioativos em sua flora nativa, sendo o bioma cerrado (Figura 1) uma de suas mais extensas formações vegetais, com uma área total de 204,7 milhões de hectares (Oliveira, 2009; Sano et al., 2010).



Figura 1: Área destacada da extensão do cerrado no Brasil (Fonte: WWF Brasil, 2016)

Recentes estudos indicam que a flora do cerrado apresenta uma elevada riqueza de espécies, com plantas herbáceas, arbustivas, arbóreas e cipós, totalizando 12.356 espécies que ocorrem espontaneamente e uma flora vascular nativa (pteridófitas e fanerógamas) somando 11.627 espécies (Mendonça et al., 2008). Com relação à riqueza, essa flora deve ser superada apenas pelas florestas amazônicas e pela Mata Atlântica.

O domínio Cerrado se desenvolveu em solos antigos, profundos, hidratados por aquíferos, ácidos e pobres em nutrientes, mas com elevada concentração de alumínio (Haridasan, 2001). Apesar do Cerrado ser um *hotspot* mundial (Myers et al., 2000), com 44% das espécies vegetais endêmicas, é a savana tropical mais rica do mundo (Klink e Machado, 2005).

Atualmente, as principais pressões da agricultura sobre o Cerrado são a pecuária e as monoculturas de soja, sendo responsáveis por desmatamentos ainda maiores que os observados na Amazônia (Klink e Machado 2005). Além das consequências da fragmentação, embora o Cerrado seja adaptado ao fogo, os regimes de queima de pastagens e da cana-de-açúcar na época seca resultaram em grandes problemas como a lixiviação, compactação e erosão do solo. O fogo facilita a invasão de espécies exóticas altamente competitivas, principalmente de gramíneas africanas, as quais produzem

grande quantidade de biomassa, que quando seca no inverno, favorece novos incêndios (Klink e Machado 2005, Carmo et al. 2011). Essas características agravam as interações ecológicas entre as espécies vegetais e destas com os fatores abióticos, tornando este domínio fitogeográfico uma importante fonte de estudo do ponto de vista alelopático (Oliveira et al., 2004; Grisi et al., 2013).

Asteraceae é uma das maiores famílias de plantas e compreende cerca de 1.600 gêneros e 23.000 espécies (Andenberg et al, 2007). No Brasil, a família está bem representada, com aproximadamente 300 gêneros e 2.000 espécies (Souza e Lorenzi 2005). Considerada como a família de maior importância entre as fanerógamas, representando dez por cento do total da flora de angiospermas (Wilson, 1986), as *Asteraceae* apresentam distribuição cosmopolita, encontrando-se disseminadas por todos os continentes, com exceção da Antártica, porém com representação mais ampla nas regiões temperadas e semi-áridas dos trópicos e subtropicais. Várias características morfológicas em *Asteraceae* suportam seu monofiletismo, dentre elas a presença de um capítulo altamente modificado, ovário bicarpelar ínfero que se desenvolve em uma cipsela com óvulo basal e reto e anteras sinânteras (Jansen & Palmer, 1988).

O gênero *Piptocarpha* pertence à subtribo Piptocarphinae, tribo Vernonieae e subfamília Cichorioideae (Bremer 1994; Robinson 1999). É um gênero neotropical que abriga aproximadamente 50 espécies escandentes e árvores, o qual se estende do sul do Brasil e norte da Argentina para América Central (Robinson 2002). O maior centro de distribuição de *Piptocarpha* está nas regiões sul e leste do Brasil, mas centros secundários são as florestas do norte e centro da América do Sul (Smith 1981; 1982).

A espécie *Piptocarpha rotundifolia* (Less.) Baker, uma espécie exclusiva dos cerrados e campos cerrados, é popularmente conhecida como candeia, paratudo e infalível, e pode atingir alturas que variam entre 4 e 8 metros, sendo dotada de uma copa arredondada, com ramos acinzentado-tomentosos. Possui tronco tortuoso com casca grossa, corticosa e fissurada longitudinalmente. É dotada de folhas alternas, simples, coriáceas e de margens inteiras e um pouco onduladas, glabras e rugosas na face superior e pardacento-tomentosas na inferior, de 5 a 10cm de comprimento por 3 a 6cm de largura, sobre pecíolo de e a 3cm de comprimento com nervuras impressas na face superior e salientes na inferior. Suas inflorescências são em capítulos curto-pedunculados, axilares, em número de 3-5 por axila, com flores arroxeadas e perfumadas. Já o fruto é do tipo aquênio glabro e alongado (Figura 2). *P. rotundifolia* ocorre, no Brasil nos estados da Bahia, Tocantins, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, e São Paulo,

nos cerrados e campos cerrados (Lorenzi, 1998). A floração ocorre de julho a maio e a frutificação de novembro a maio (Oliveira & Paula, 2001).



Figura 2: *Piptocarpha rotundifolia*: árvoreta, ramos, inflorescências, sementes, casca e madeira. (Lorenzi, 1998).

Como utilidade desta espécie, pode ser citado o uso de sua madeira, da qual é empregada para obras internas e externas, para marcenaria leve e carpintaria, serviços de torno, moirões, postes, estacas, bem como para lenha de ótima qualidade. Sua casca é rica em tanino e já foi muito usada na indústria de curtume. Já as flores e folhas são reputadas como de valor medicinal.

Existem na literatura, poucos estudos sobre a composição química dos extratos de plantas do gênero *Piptocarpha*, e nenhum sobre a espécie *P. rotundifolia*. Achutti e Silva (1988) determinaram a composição do óleo essencial de folhas de *P. rotundifolia*, que revelou, entre seus componentes, a presença de alfa-carofileno, beta-carofileno, geraniol e linalol (Figura 3).

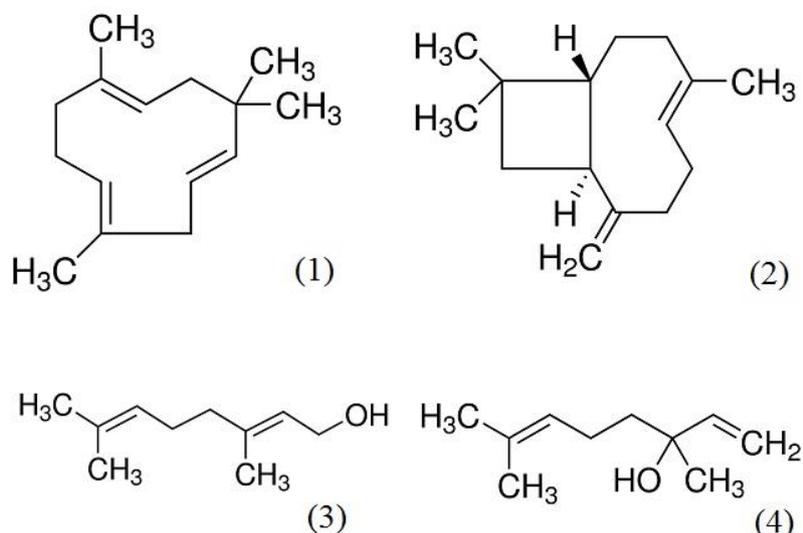


Figura 3: Estruturas químicas de um alfa-carofileno (1), beta-carofileno (2), geraniol (3) e linalol 4) (Sigma-Aldrich, 2016)

Outros estudos, como o de Mathur e Gonzalez (1982) identificaram terpenóides nas folhas de *Piptocarpha paradoxa*; e Herz e Kulanthaivel (1983), estudaram a presença ésteres de piptocarpol provenientes de *Piptocarpha opaca* (Benth.) Baker.

Sendo assim, a continuidade dos estudos com membros da família Asteraceae, como a *Piptocarpha*, são encorajados, visando a determinação de bioatividade de compostos semipurificados e purificados, que tragam subsídios para possíveis aplicações na indústria, agricultura e medicina.

Para a extração de substâncias do metabolismo secundário podem ser utilizados diferentes métodos de extração química. A extração é uma etapa importante, pois a escolha da metodologia empregada pode determinar a constituição e rendimento dos extratos (Hinneburg & Neubert, 2005), podendo influenciar a atividade dos mesmos. Portanto, quando não se conhece a natureza dos compostos presentes no material vegetal estudado, aconselha-se submetê-lo a sucessivas extrações, com solventes em ordem crescente de polaridade para que os diferentes extratos obtidos contenham compostos com polaridade crescente também (Simões et al., 2004; Falkenberg; Dos Santos; Simões, 2007). Além disso, o uso de mais de um método de extração é recomendado para a

determinação do perfil fitoquímico de uma planta, pois dependendo da seletividade dos solventes utilizados na extração a composição química dos extratos pode variar qualitativa e quantitativamente (Falkenberg; dos Santos; Simões, 2007; Martins et al., 2013).

Um aspecto importante nas pesquisas de alelopatia é a identificação de compostos aleloquímicos envolvidos na interação planta-planta e seu possível modo de ação. O isolamento e o conhecimento da estrutura dos compostos da planta podem resultar na produção de derivados semi- sintéticos (Souza et al., 2011) e também representa importante passo no entendimento do papel ecológico que elas desempenham na dinâmica das plantas nos agrossistemas (Luz et al. 2010), podendo ser de interesse acadêmico, não registrados na literatura especializada; intermediários de processos de biossíntese; de importância quimiotaxonômica; e substâncias de interesse econômico, como novos agentes medicamentosos ou novas fontes de compostos raros já utilizados (Matos 1997; Rodrigues et al. 2010).

A cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) é uma técnica versátil e pode ser usada para reduzir o tempo de análises, principalmente correspondentes a amostras complexas, como extratos vegetais e seus metabólitos (Wu et al., 2013).

Diante deste contexto, esse trabalho buscou responder as questões:

- 1) Extratos e frações obtidos do pó de folhas de *P. rotundifolia* possuem efeitos fitotóxico sobre as espécies alvo selecionadas?
- 2) Existem diferenças no potencial fitotóxico quando se empregam diferentes metodologias para a extração?
- 3) Que compostos podem ser identificados nas subfrações dos extratos foliares?

REFERÊNCIAS

- ALVES, E.; MARTINS, D.; SOUZA, F. H. D. Seletividade de herbicidas pré-emergentes para gramíneas forrageiras tropicais. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 20, n. 3, p. 457-464, 2002.
- AN, B. J., KWAK, J. H. SON, J. H. PARK, J. M., LEE, J. Y., JO, C., et al. (2004). Biological and antimicrobial activity of irradiated green tea polyphenols. **Food Chemistry**, 88(4), 549-555.
- ANDENBERG, A.A., BALDWIN, B.G., BAYER, R.G., BREITWIESER, J., JEFFREY, C., DILLON, M.O., ELDEÑAS, P., FUNK, V., GARCIA-JACAS, N., HIND, D.J.N., KARIS, P.O., LACK, H.W., NESON, G., NORDENSTAM, B., OBERPRIELER, CH., PANERO, J.L., PUTTOCK, C., ROBINSON, H., STUESSY, T.F., SUSANNA, A., URTUBEY, E., VOGT, R., WARD, J. & WATSON, L.E. 2007. Compositae. Pg. 61-588. In: J.W. Kadereit & C. Jeffrey (Eds.). **Flowering Plants Eudicots Asterales**, Vol. VIII. The Families and Genera of Vascular Plants, K. Kubitzki (Ed.). Springer – Verlag.
- ANVISA & UFPR. Seminário de mercado de agrotóxico e regulação. ANVISA, Brasília, 11 abril de 2012.
- AZEVEDO, M. F. A. Abordagem inicial no atendimento ambulatorial em distúrbios neurotoxicológicos. Parte II – agrotóxicos. **Revista Brasileira de Neurologia**, v. 46, p. 21-28, 2010.
- BREMER, K. 1994. **Asteraceae: Cladistics & Classification**. Portland, Timber Press.
- CARNEIRO, F. F.; PIGNATI, W.; RIGOTTO, R.M; AUGUSTO, L.G.S.; RIZOLLO, A. **Dossiê ABRASCO** - Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. ABRASCO, Rio de Janeiro, abril de 2012. 1ª Parte. 98p.
- CARVALHO, L. B.; BIANCO, S.; GUZZO, C. D. Interferência de *Euphorbia heterophylla* no crescimento e acúmulo de macronutrientes da soja. **Planta Daninha**, v. 28, p. 33-39, 2010.
- CIPOLLINI, M.L. & LEVEY, D.J. Secondary metabolites of fleshy vertebrate- dispersed fruits: adaptive hypotheses and implications for seed dispersal. **American Naturalist**, v.150, p. 346–73, 1997.
- CONCENÇO, G.; ANDRES, A.; SILVA, A.F.; GALON, L.; FERREIRA, E.A.; ASPIAZÚ, I. Ciências das plantas daninhas: histórico, biologia, ecologia e fisiologia. In: MONQUERO, P.A. (Org.). Aspectos da biologia e manejo das plantas daninhas. São Carlos, SP: RiMa, 2014. p. 83- 101.
- da COSTA, E. A. D.; MATALLO, M. B.; CARVALHO, J. C.; ROZANSKI, A. Eficiência de nova formulação do herbicida oxyfluorfen no controle de plantas daninhas em área de *Pinus caribea* morelet var. hondurensis barr. et Golf. **Revista Árvore**, v. 26, p. 683-689, 2002.

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

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

FREITAS, S. P.; OLIVEIRA, A. R.; FREITAS, S. J.; SOARES, L. M. S. Controle químico de *Rottboellia exaltata* em cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 22, n. 3, p. 461-466, 2004.

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

GRISI, P.U.; GUALTIERI, S.C.J.; ANESE, S.; PEREIRA, V.C.; FORIM, M.R. Effect of *Serjania lethalis* ethanolic extract on weed control. **Planta Daninha**, v. 31, p. 239-248, 2013.

HAIG, T.J., HAIG, T.J., SEAL, A.N., PRATLEY, J.E., AN, M., WU, H. Lavender as a source of novel plant compounds for the development of a natural herbicide. **Journal Chemical Ecology**, v. 35, p. 1129-1136, 2009.

HARIDASAN, M. Nutrient cycling as a function of landscape and biotic characteristics in the cerrado of central Brazil. Pp. 68-83. In: McClain, M.E., Victoria, R.L; Richey, J.E. (ed). Biogeochemistry of the Amazon basin and its role in a changing world. New York, Oxford University Press, 2001.

HERZ, W., KULANTHAIVEL, P. 1983. Piptocarphol esters from *Piptocarpha opaca*. **Phytochemistry**. 22: 1286-1287.

JABRAN, K.; FAROOQ, M.; HUSSAIN, M.; REHMAN, H.; ALI, M.A. Wild oat (*Avena fatua* L.) and canary grass (*Phalaris minor* Ritz.) management through allelopathy. **Journal of Plant Protection Research**, v. 50, p. 41-45, 2010.

JANSEN, R.K. & PALMER, J.D. 1987. A chloroplast DNA inversion marks and ancient evolutionary split in the sunflower family (Asteraceae). **Evolution** 84: 5818-5822.

KHALIQ, A., MATLOOB, A., KHAN, M.B., TANVEER, A. Differential suppression of rice weeds by allelopathic plant aqueous extracts. **Planta Daninha**, v. 31, p. 21-28, 2013.

KLINK, C.A.; MACHADO, R.B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, v. 19, p. 707-713, 2005.

KOHLI, R.K., BATISH, D.R., SINGH, H.P. Weeds and Their Management – Rationale and Approaches. In Singh HP, Batish DR, Kohli RK (eds) **Handbook of Sustainable Weed Management**, In Press. Haworth Press, Inc., USA, 2004.

KOUL, O.; WALIA, S. Comparing impacts of plant extracts and pure allelochemicals and implications for pest control. CAB Reviews: **Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 4, p. 1-30, 2009.

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

LUZ SM, SOUZA FILHO APS, GUILOHN GMSP, VILHENA KSS (2010) Atividade alelopática de substâncias químicas isoladas da *Acacia mangium* e suas variações em função do pH. **Planta Daninha** 28(3): 479-487

MARANGONI, C.; MOURA, N.F.; GARCIA, F.R.M. Utilização de óleos essenciais e extratos de plantas no controle de insetos. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 6, n. 2, p. 95-112, 2012.

MARTHUS S. B.; GONZALEZ L. Identification of Terpenoids From the Leaves of *Piptocarpha paradoxa* and Their Biological Activities. **J. Nat. Prod.**, 1982, 45 (4), pp 495–496.

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

MATOS F.J.A. (1997) Introdução a fitoquímica experimental. 2.ed. Edições UFC, Fortaleza. 141 p.

MORTIMER A.M. The biology of weeds. In: HANCE, R. J.; HOLLY, K. (eds.) Weed control handbook: principles. 8ed. London: **Blackwell Scientific Publications**. 582p. 1990.

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.

NAKAJIMA, J.N. & SEMIR, J. 2001. Asteraceae no Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica** 24: 471-478.

NEBO, L.; VARELA, R.M.; MOLINILLO, J.M.G.; SAMPAIO, O.M.; SEVERINO, V.G.P.; CAZAL, C.M.; FERNANDES, M.F.G.; FERNANDES, J.B.; MACÍAS, F.A. Phytotoxicity of alkaloids, coumarins and flavonoids isolated from 11 species belonging to the Rutaceae and Meliaceae families. **Phytochemistry Letters**, v. 8, p. 226-232, 2014.

OLIVEIRA, P. E. A. M.; PAULA, F. R. Fenologia e biologia reprodutiva de plantas de Mata de Galeria. In: RIBERIO, J.F.; FONSECA, C.E.L. DA; SOUSA-SILVA, J.C. eds. Cerrado: caracterização e recuperação de matas de galeria. Planaltina: Embrapa-Cerrados, 301-332 p.. 2001.

OLIVEIRA, S. C. C. Estudo alelopático de espécies do gênero *Solanum* do Distrito Federal. 2009. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

OLIVEROS-BASTIDAS, A. El fenómeno alelopático: El concepto, las estrategias de 33anzân y su aplicación en la búsqueda de herbicidas naturales. *Revista Química Viva*, v.1(7), p. 2-34, 2008.

RIZVI, S.J.H.; HAQUE, H.; SINGH, V.K. & RIZVI, V. 1992. A discipline called allelopathy. Pp. 1-10. In: Rizvi, S.J.H. & Rizvi, V. (Eds.). **Allelopathy: basic and applied aspects**. London, Chapman & Hall.

RODRIGUES IMC, SOUZA FILHO APS, FERREIRA FA, DEMUNER AJ (2010) Prospecção química de compostos produzidos por *Senna alata* com atividade alelopática. **Planta Daninha** 28 (1): 1-12.

SANO, E. E. et al. Land cover mapping of the tropical savanna region in Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**. v. 166, n. 1-4, p. 113-124, 2010.

SEOW L-J., BEH H-K., UMAR M. I., SADIKUN A., ASMAWI M. Z. Anti-inflammatory and antioxidant activities of the methanol extract of *Gynura segetum* leaf. **International Immunopharmacology** 23 (2014) 186-191.

SILVA, A.A.; FERREIRA, F.A.; FERREIRA, L.R.; SANTOS, J.B. Biologia de plantas daninhas. In: SILVA, A.A.; SILVA, J.F. **Tópicos em manejo de plantas daninhas**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2007. 318 p.

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

SMITH, G.L. 1981. New taxa in *Piptocarpha* R. Br. (Vernonieae: Compositae). **Annals of the Missouri Botanical Garden** 68: 661-667.

SMITH, G.L. 1982. Taxonomic considerations of *Piptocarpha* (Compositae: Vernonieae) and new taxa in Brazil. **Brittonia** 34: 210-218.

SOCIEDADE INTERNACIONAL DE ALELOPATIA (IAS). 2014. Disponível em: <<http://www.international-allelopathy-society.org>> Acesso em: setembro/2014.

SOUZA FILHO, A. P. S.; SANTOS, R. A.; SANTOS, L. S.; GUILHON, G. M. P.; SANTOS, A. S.; ARRUDA, M. S. P.; MULLER, A. H.; ARRUDA, A. C. Potencial alelopático de *Myrcia guianensis*. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 24, n. 4, p. 649-656, 2006.

SOUZA, M.C.; CARVALHO, L.B.; ALVES, P.L.C.A.; GIANCOTTI, P.R.F. Allelopathy in pigweed (a review). **Communications in Plant Sciences**, v. 1, p. 5-12, 2011.

TANVEER, A.; JABBAR, M.K.; KAHLIQ, A.; MATLOOB, A.; ABBAS, R.N.; JAVAID, M.M. Allelopathic effects of aqueous and organic fractions of *Euphorbia dracunculoides* Lam. on germination and seedling growth of chickpea and wheat. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 72, n. 4, p. 495-501, 2012.

TREZZI, M. M.; PORTES, E. D. S.; SILVA, H. L.; GUSTMAN, M. S.; DA SILVA, R. P.; FRANCHIN, E. Características morfofisiológicas de biótipos de *Euphorbia*

heterophylla com resistência a diferentes mecanismos de ação herbicida. **Planta Daninha**, v. 27, p. 1075-1082, 2009.

WILSON, E. O. 1986. **Biodiversity**. National Academy Press, Washington.

WINDSOR, A. J., M. REICHEL, A. FIGUTH, A. SVATOS, J. KROYMANN *et al.*, 2005. Geographic and evolutionary diversification of glucosinolates among near relatives of *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). **Phytochemistry** 66: 1321–1333.

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

WU, H., GUO, J., CHEN, S., LIU, X., ZHOU, Y., ZHANG, X., XU, X. Recent Developments in Qualitative and Quantitative Analysis of Phytochemical Constituents and their Metabolites Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 72, pp. 267-291 (2013).

CAPÍTULO I

**Atividade fitotóxica de extratos foliares de *Piptocarpha rotundifolia* (Less.) – Baker
(candeia), oriundos de extração eluotrópica.**

RESUMO - *Piptocarpha rotundifolia* (Less.) Baker, é uma espécie pertencente à família Asteraceae, muito comum no cerrado brasileiro. Tendo como objetivo principal, analisar o potencial fitotóxico de extratos brutos, semipurificados e purificados de folhas de *Piptocarpha rotundifolia*, neste trabalho foi realizada uma metodologia de extração feita em ordem eluotrópica. Os extratos obtidos foram utilizados nas concentrações de 0,8, 0,4 e 0,2 mg.mL⁻¹, em bioensaios com coleótilos de trigo (*Sesamum indicum* L.) e de germinação e crescimento e com as espécies-alvo indicadoras, cebola (*Allium cepa* L.) e gergelim (*Sesamum indicum* L.) e invasoras, capim colônia (*Megathyrsus maximus* J.) e amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla* L.). Todos extratos apresentaram atividade inibitória em coleótilos de trigo. O bioteste de germinação revelou uma falta de sincronia no processo de germinação, principalmente na espécie de amendoim-bravo, que em contrapartida apresentou maiores valores de porcentagem de germinação. Já o bioteste de crescimento de plântulas revelou que as espécies de hortaliças se mostraram mais sensíveis aos extratos, porém em grande parte das plântulas foram constatadas diversas anomalias, como necrose e atrofia de raiz e parte aérea. As células do metaxilema radicular de plântulas de gergelim também foram analisadas, e foram observadas alterações a nível celular de forma dose-dependente no extrato acetônico (D) selecionado para fracionamento. Com base nos resultados obtidos, conclui-se que os extratos e frações possuem atividade fitotóxica.

Palavras-chave: candeia, fitotoxicidade, fracionamento, germinação, gergelim, plântulas.

ABSTRACT – *Piptocarpha rotundifolia* (Less.) Baker, is a species belonging to the family Asteraceae, very common in the Brazilian savanna. With the main objective to analyze the phytotoxic potential of *Piptocarpha rotundifolia* leaves extracts, fractions and subfractions, this work was performed an extraction methodology performed in eluotropic order. The extracts were used at concentrations of 0.8, 0.4 and 0.2 mg.mL⁻¹ in bioassays wheat coleoptile (*Sesamum indicum* L.), and germination and growth and indicator target species, onion (*Allium cepa* L.) and sesame (*Sesamum indicum* L.) and invasive, guinea grass (*Megathyrus maximus* J.) and wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla* L.). All extracts showed inhibitory activity in wheat coleoptile. The bioassay of germination revealed a lack of synchrony in the germination process, especially in species of wild poinsettia, which in turn showed higher germination percentage values. The growth of seedlings bioassay revealed that the species of vegetables were more sensitive to the extracts, but in most of the seedlings were found several anomalies, such as necrosis and root atrophy and shoot. The cells of the root metaxylem sesame seedlings were also analyzed, and changes were observed at the cellular level in a dose-dependent manner in acetone extract (D) selected for fractionation. Based on the results obtained, it is concluded that the extracts and fractions have phytotoxic activity.

Keywords: candeia, phytotoxicity, fractioning, germination, sesame seeds, seedlings.

1. Introdução

O Cerrado brasileiro ocupa 23% do território nacional (Ribeiro e Walter, 2008) e apresenta grande diversidade de espécies e fitofisionomias (Ribeiro e Walter, 2008; Batalha, 2011). Com uma degradação estimada em 78,7% da paisagem original (Conservation International, 2010; Oliveira, 2011), recentes esforços vêm sendo realizados para a manutenção e conservação dessa biodiversidade. Estudos fitosociológicos (Ribeiro et al., 1985; Batalha e Mantovani 2001; Fonseca e Silva-Júnior, 2004; Felfili et al., 2004; Carvalho et al., 2008; Aquino et al., 2014) e ecofisiológicos (Sasaki et al.; 1999; Dorneles et al., 2005; Mendes-Rodrigues et al., 2011; Dorneles et al., 2013; Braga Filho et al., 2014) foram realizados em várias regiões de Cerrado. Entretanto, a conservação e o uso sustentável dessas áreas dependem ainda de conhecimentos básicos sobre as interações ecológicas e a adaptação das espécies ocorrentes nesse ecossistema.

A alelopátia é responsável pelas interações interespecíficas e intraespecíficas, na estabilização e dinâmica de uma comunidade (Aires, 2005) e os aleloquímicos são liberados diretamente no ambiente por meio da exsudação radicular, volatilização, lixiviação ou ainda, por decomposição do material vegetal (Cipollini; Rigsby; Barto, 2012). Estes compostos do metabolismo secundário estão presentes em diferentes órgãos e estruturas de uma planta incluindo folhas, flores, raízes, frutos, cascas, sementes e grãos de pólen, mas são as folhas e as raízes as principais fontes destes compostos (Alves; Arruda; Souza Filho, 2002; Murphy, 2003; Wu et al., 2009). A produção de aleloquímicos pode ser influenciada pelo estágio de desenvolvimento da planta e por variações ambientais, como variação na temperatura, ritmo circadiano, altitude, índice pluviométrico, radiação ultravioleta, ataques de herbívoros ou patógenos, entre outros (Gobbo-Neto & Lopes, 2007; Ramakrishna & Ravishankar, 2011).

A ação de 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 fitotóxica destes compostos sobre a germinação e/ou desenvolvimento da planta são consequências secundárias de efeitos ocorridos anteriormente a nível molecular e celular, provocando distúrbios celulares generalizados e que agem em diversos locais de interferência (Ferreira e Áquila, 2000; Narwal e Sampietro, 2009).

Quando sementes são expostas aos aleloquímicos, a germinação pode ser inibida e, se esta ocorrer, as plântulas destas originadas podem apresentar crescimento, desenvolvimento ou metabolismo anormal. Os principais efeitos observados são atraso no tempo de germinação, atrofia e espessamento da raiz, redução do crescimento radicular e do hipocótilo, redução do número de raízes secundárias e ausência da raiz primária (Gatti et al., 2010; Gusman et al., 2011; Grisi et al., 2012; Silvestre et al., 2013).

A espécie selecionada para este estudo, *Piptocarpha rotundifolia* (Less.) Baker, é arvoreta de até 4 metros, hermafrodita com folhas alternadas, ovaladas, e apresenta duas colorações: verde-acinzentado a parte adaxial e a parte abaxial é acinzentada ou amarelada. As inflorescências saem entre a folha e o ramo (axilar) e contém pequenas flores de cor creme agrupadas (Ferri 1968). Os frutos são secos (tipo aquênio) pequenos, com muitos pêlos rígidos de cor cinza-amarelado e a floração ocorre de julho a maio e a frutificação de novembro a maio (Oliveira & Paula, 2001).

P. rotundifolia possui propriedades medicinais, e há relatos de seu uso no tratamento contra a sífilis, diarreia, fraqueza e meteorismo encontradas em suas folhas (Ramalho et al., 2010). Porém, estudos mencionando potencial fitotóxico não foram encontrados na literatura e, por essa razão, a proposta deste trabalho foi avaliar o potencial fitotóxico de extratos, frações e subfrações obtidos de folhas adultas de *P. rotundifolia* usando fracionamento bioguiado.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivos específicos avaliar o efeito fitotóxico de extratos, frações e subfrações de *P. rotundifolia* no alongamento de coleótilos de trigo, na germinação e no crescimento de espécies-alvo invasoras e indicadoras, bem como os efeitos destes, em células do metaxilema radicular de plântulas de gergelim.

2. Materiais e métodos

2.1. Coleta e processamento do material vegetal.

O material vegetal utilizado foi constituído por folhas adultas de *Piptocarpha rotundifolia* (Less.) Baker. As folhas foram coletadas na área de reserva de cerrado sensu stricto pertencente ao campus da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), localizado na cidade de São Carlos, estado de São Paulo (21° 58' a 22° 00' S e 47° 51' a 47° 52' W) (Figura 1). Foi depositada uma exsicata no Herbário da Universidade Federal de São Carlos (HUFSCar).



Figura 1: Vista aérea da UFSCar com a área de cerrado identificada (Fonte: Google Maps, 2016– modificado).

Após realizar uma triagem do material vegetal, onde foram selecionadas apenas as folhas adultas em bom estado e livres de fungos ou estragadas, estas foram lavadas, secas em estufa de circulação forçada de ar a 40°C durante 72 h e trituradas em moinho elétrico. O pó resultante foi pesado e embalado a vácuo, sendo mantido sob refrigeração

(aproximadamente 5°C) e então utilizado para a obtenção dos extratos e frações das folhas adultas de *Piptocarpha rotundifolia*.

2.2. Preparação dos extratos

Foram utilizados cinco solventes em ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona e metanol. Foi utilizado um total de 150 g do pó das folhas e 1,8 L de cada um dos solventes acima mencionados e, a cada troca de solvente, o mesmo pó de folhas foi seco e reutilizado na extração com o próximo solvente. A metodologia de extração foi feita de acordo com Macías et al., 2010. Os extratos foram secos em capela de exaustão até a evaporação completa do solvente e deram origem aos extratos: A (hexânico), B (diclorometânico), C (acetato etílico), D (acetônico) e E (metanólico). Aqueles com melhores rendimentos e/ou atividades em bioensaios foram submetidos a fracionamentos, como mostra a Figura 2.

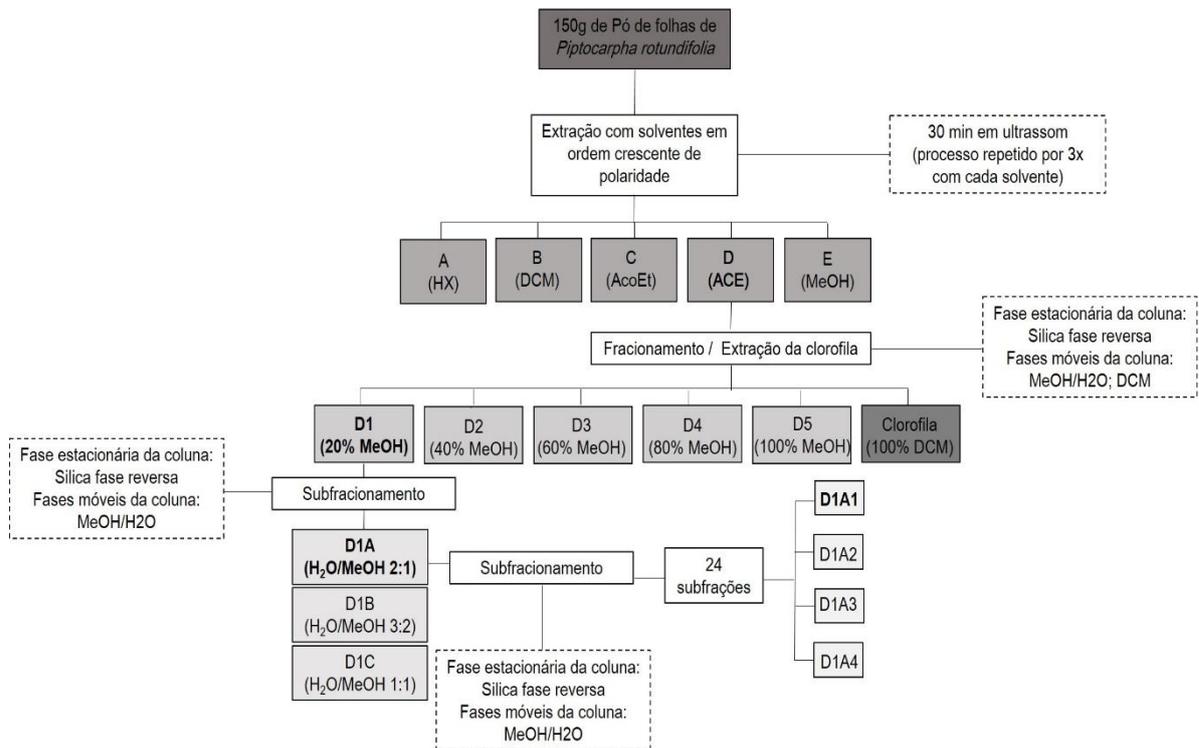


Figura 2. Fluxograma para a obtenção dos extratos, frações e subfrações. Indicados em negrito, foram selecionados para os fracionamentos subsequentes.

2.3.. - Bioensaio de crescimento de coleótilos de trigo (*Triticum aestivum* L.).

Sementes de trigo (*Triticum aestivum* L. cv.'BRS264') foram germinadas no escuro a 25°C, durante 72h em caixas plásticas forradas com duas folhas de papel filtro embebidas com água destilada para a obtenção das plântulas (Hancock et al., 1964). De cada coleótilo descartou-se os 2 mm apicais e os próximos 4 mm foram cortados e utilizados no bioensaio. Todo este processo foi realizado sob luz verde de segurança (Nitsch & Nitsch, 1956). As soluções foram preparadas a partir de 10 mg de cada fração ou subfração, pré-solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO, 5 $\mu\text{L mL}^{-1}$) e diluídas em solução tampão (pH = 5,6) contendo ácido cítrico monohidratado (1,05 g/L), hidrogenofosfato de potássio tri-hidratado (2,9 g/L) e 2% de sacarose, nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8 mg mL^{-1} . Em tubos de ensaio foram adicionados 2 mL das respectivas soluções, contendo cinco coleótilos de trigo. Dois controles foram realizados, um negativo com solução tampão e DMSO (5 $\mu\text{L/mL}^{-1}$) e outro positivo com o herbicida

Goal® (240 µL/mL⁻¹) solubilizado em solução tampão e DMSO (5 µL/mL), nas mesmas concentrações avaliadas para as frações. Foram utilizadas três repetições para cada tratamento e para cada concentração. Esses tubos foram mantidos a 25 °C no escuro e sob constante rotação (1,2 Hz) (Macías et al., 2010). Após 24 h, os coleótilos retirados dos tubos de ensaio, organizados em uma planilha devidamente identificada e então foram medidos com auxílio do programa ImageJ.

2.4. Bioensaio de germinação e crescimento de plântulas

Foram utilizadas como espécies alvo duas hortaliças (cebola (*Allium cepa* L.) e gergelim (*Sesamum indicum* L.), que, por serem geneticamente melhoradas apresentam respostas mais homogêneas aos extratos e, dessa forma, indicam se os bioensaios estão sendo conduzidos de forma adequada. Além disso, foram selecionadas duas invasoras, uma de culturas de soja amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla* L.) e outra de cana-de-açúcar capim-colônião (*Megathyrus maximus* J.) e, que apresentam resistências a herbicidas (Kissmann, 1997; Trezzi et al., 2009) e permite avaliar o potencial fitotóxico dos extratos e frações da espécie doadora.

Os extratos foram diluídos em solução tampão (pH = 5,6) contendo ácido cítrico monohidratado (1,05 g/L) e hidrogenofosfato de potássio tri-hidratado (2,9 g/L) nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8 mg.mL⁻¹. Para este bioensaio também foram utilizados dois controles, iguais aos citados no item anterior. Estes bioensaios foram conduzidos em caixas plásticas transparentes (12,6x7,9x3,7cm), contendo duas folhas de papel filtro ao fundo, umedecidas com 6 mL das soluções controle negativo e positivo ou com as soluções dos extratos brutos. Cada caixa recebeu 20 sementes das espécies-alvo e foram feitas quatro repetições para cada tratamento. As caixas foram tampadas colocadas em

câmaras de germinação do tipo B.O.D. a 25°C sob fotoperíodo de 12h luz / 12h escuro (Anese et al., 2014 modificado). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. As leituras foram realizadas a cada 12h durante os três primeiros dias e depois em intervalos de leituras a cada 24h até a germinação ser nula por duas leituras consecutivas. Foi adotado a protrusão de no mínimo 2mm de raiz primária e gravitropismo positivo como critério de germinação (Brasil, 2009).

Foram avaliados a porcentagem a velocidade de germinação e sincronia (Ranal & Santana, 2006).

O bioensaio de crescimento foi conduzido da mesma forma que o bioensaio de germinação, porém após completados sete dias em câmara B.O.D., as plântulas permaneceram em congelador por 24h para que estas se tornassem mais fáceis de manusear para posterior medição. Em seguida foram dispostas em uma folha de papel milimetrado, e fotografadas com o auxílio do programa ImageJ. Além disso, as plântulas foram classificadas em normais e anormais de acordo com as especificações das Regras de Análises de Sementes (Brasil, 2009).

2.5. Bioensaio de crescimento de células do metaxilema de gergelim (*Sesamum indicum* L.)

Os extratos brutos hexânico (A), diclorometânico (B), acetato etílico (C), acetônico (D) e metanólico (E) foram submetidos ao bioensaio que avalia o crescimento de células do metaxilema de gergelim que cresceram em contato com estas frações. Raízes obtidas de plântulas crescidas nos extratos citados acima, no controle negativo e positivo, e mantidas nas mesmas condições do bioensaio de crescimento (Item 2.5) compuseram o material anatômico utilizado. Decorridos sete dias as plântulas de gergelim

foram retiradas das caixas e com o auxílio de um estilete foi separado um segmento da raiz primária e colocado em álcool 70%. A coloração do material vegetal foi feita a partir do método Fuchs modificado (Kraus & Arduin 1997). As raízes foram imersas em álcool (70%) durante sete dias, lavadas com água destilada e mantidas em solução de hidróxido de sódio 25%, em estufa a 40°C por 48 h. Em seguida, o material vegetal foi corado com o corante Lacmóide a 25%, durante 24 h em temperatura ambiente, e lavados. O material vegetal foi então depositado em lâminas de vidro com xarope de Apathy e lamínula, sendo deixadas de repouso por sete dias para a secagem. A observação foi feita em microscópio óptico (Olympus-BX41) acoplado com câmara fotográfica (Sony CCD-IRIS). Foram utilizadas quatro raízes primárias provenientes de plântulas de gergelim crescidas em soluções controles negativo e positivo, e com os extratos mencionados para este bioensaio. De cada raiz foi fotografado 50% de seu comprimento total, partindo da região central em direção ao colo e o aumento utilizado foi de 20 vezes (Gatti, 2008). As medidas foram feitas utilizando-se o programa ImageJ.

2.6. Análise estatística

Os comprimentos dos fragmentos de coleóptilo de trigo e da parte aérea e raiz primária das plântulas das espécies-alvo foram calculados como porcentagem de inibição ou estímulo em relação ao controle negativo, sendo que os valores positivos representam estímulo e os valores negativos representam inibição (Novaes, et al., 2013). Os dados foram submetidos a um teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade (Levene). Dados normais e homogêneos, foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey a 0,05 de significância. Para dados não normais ou não homogêneos foi utilizado o teste de Welch seguido do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

Todas as análises foram realizadas no programa estatístico PAST v.2.17c (Hammer, O, Harper D. A. T., 2013).

2.7. – Técnicas Cromatográficas

2.7.1. –Cromatografia em Coluna

Foram realizadas cromatografias em coluna de vidro utilizando sílica gel (RP 18 (40 – 60 μ m) para separações em fase reversa), como fase estacionária, e como fase móvel, mesclas de solventes orgânicos com polaridades crescentes, de acordo com a polaridade do extrato / fração a ser particionado. Os extratos e frações foram adsorvidas à forma estacionária, em uma camada, denominada de cabeça. O diâmetro da coluna de vidro utilizado foi proporcional à quantidade da amostra a ser fracionada. Para o fracionamento do extrato acetônico (D) foram utilizadas mesclas com os solventes metanol e água, combinadas em diferentes proporções (20%, 40%, 60%, 80% e 100% MeOH). Por último, a fim de retirar a clorofila, foram utilizados 200 mL de diclorometano, sendo cada mescla de solvente (fase móvel) passada uma única vez e, contendo volume de 200 mL. Para o subfracionamento de D1, as fases móveis utilizadas foram Água/Metanol nas proporções de 2:1, 3:2 e 1:1, totalizando um volume total de 1,2 L, em sequência, para o subfracionamento de D1A, as fases móveis utilizadas foram Água/Metanol/Acetonitrila nas proporções de 10:1:1, 9:2:1 e 8:2:2, contendo volumes totais de 120 mL de cada mescla. A cada fracionamento houve reunião por similaridade de compostos, utilizando a técnica de cromatografia em camada delgada (CDC) (Ghisalberti, 2008).

2.7.2. - Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Esta técnica foi realizada mediante a diferença entre as forças de adsorção das moléculas presentes nas amostras, entre a solubilidade da fase móvel (solvente) e a uma fase estacionária (placa de sílica de fase normal ou reversa). O desenvolvimento cromatográfico se procedeu de forma ascendente e unidimensional, em placas simples de sílica (4,0 x 5,0 cm) e com as mesclas de solventes orgânicos. Cada cromatoplaça (placa de sílica com as substâncias separadas) foi analisada sob luz ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm e revelada com Oleum (solução de 10 mL de ácido sulfúrico e 200 mL de ácido acético dissolvidos em 40 mL de água destilada) e posteriormente aquecidos a 150 °C (Ghisalberti, 2008). Após secas, as cromatoplaças foram fotografadas para fixação dos pontos e suas respectivas cores que aparecem após a revelação. Esta técnica foi empregada sempre ao final de cada extração, fracionamento e subfracionamentos para avaliar o perfil de compostos presentes ou, reunir de acordo com similaridade de polaridade.

3. Resultados

3.1. Rendimento dos extratos brutos

Na Tabela 1 foram apresentados os rendimentos referentes aos extratos brutos e fracionamentos do extrato acetônico (D). O extrato mais polar, (metanólico) (E) foi o que apresentou maior rendimento (3.10%), enquanto que o acetato etílico apresentou o menor (0,42%). A quantidade total de extrato bruto acetônico utilizado para o fracionamento foi de 3,8g.

Tabela 1. Rendimento¹ (mg e %) dos extratos brutos, frações e subfrações de folhas de *Piptocarpha rotundifolia*.

Extratos							
Extração em série eluotrópica							
	A	B	C	D	E	TOTAL	
Rendimento	3630 (2,42%)	1970 (1,31%)	630 (0,42%)	2370 (1,58%)	4660 (3,10%)	13260 (8,83%)	
Remoção da clorofila do extrato D							
	D1	D2	D3	D4	D5	Clorof.	TOTAL
Rendimento	910 (23,94%)	890 (23,42%)	290 (7,63%)	120 (3,15%)	270 (7,1%)	170 (4,47%)	2650 (69,7%)
Fracionamento (extrato D1)							
	D1A		D1B		D1C	TOTAL	
Rendimento	452,7 (49,7)		39,9 (4,38%)		3,19 0,35%	495,79 (54,4%)	
Subfracionamento (extrato D1A)							
	D1A1	D1A2	D1A3	D1A4	TOTAL		
Rendimento	236 (52,1%)	128 (28,2%)	48 (10,6%)	22 (4,8%)	434 (79,9%)		

¹Rendimento dos extratos brutos relativo à massa inicial de pó de folhas (150g); e frações/subfrações, de acordo com a massa inicial de extrato/fração utilizada a ser fracionada.

3.2. Bioteste de crescimento com coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum*)

Foram considerados fitotóxicos os extratos que inibiram o crescimento de coleóptilos de trigo nas concentrações de 0,8; 0,4 e 0,2 mg.mL⁻¹. De forma geral, todos os extratos brutos, em todas suas concentrações, com exceção do extrato metanólico (E) a 0,4 mg.mL⁻¹ inibiram o crescimento dos coleóptilos de trigo quando comparados com o controle positivo. Os extratos diclorometânico (B) e acetato etílico (C) nas concentrações 0,4 e 0,8 mg.mL⁻¹, bem como os extratos acetônico (D) nas concentrações 0,2 mg.mL⁻¹ e 0,4 mg.mL⁻¹ e metanólico (E), na concentração 0,2 mg.mL⁻¹ apresentaram valores de inibição que não diferem estatisticamente dos valores referentes ao controle positivo nas mesmas concentrações. O extrato acetato etílico (C) a 0,8 mg.mL⁻¹ foi o que promoveu maior percentual de inibição (79,3%) (Figura 3). Porém, o extrato D foi selecionado para dar continuidade aos fracionamentos, pois a atividade inibitória permaneceu constante com as diluições, além de ter massa suficiente para os fracionamentos.

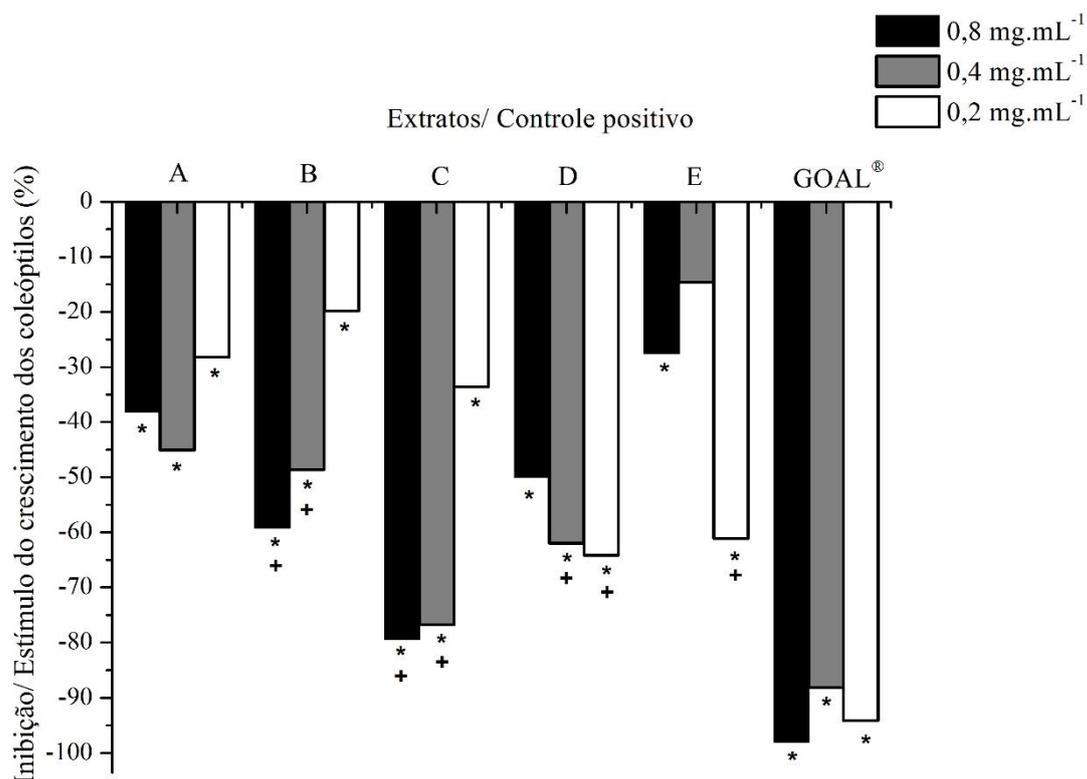


Figura 3: Valores médios de percentual de inibição de coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum*) submetidos à ação dos extratos brutos de *Piptocarpha rotundifolia* em diferentes concentrações. * indicam tratamentos que diferiram estatisticamente do controle negativo, e + indicam tratamentos estatisticamente iguais ao herbicida comercial GOAL® na mesma concentração.

3.3. Bioensaio de germinação de plântulas

Este bioensaio foi realizado utilizando apenas os extratos brutos, uma vez que estes foram os com maiores rendimentos.

De maneira geral, a porcentagem de germinação da maior parte das espécies-alvo invasoras, não seguiram um padrão dose-dependente, sendo este padrão observado, para todos os extratos, apenas em plântulas de cebola (Figura 4). Para cada uma das espécies, os maiores percentuais de germinação ocorreram em plântulas de gergelim tratadas com o extrato C a 0,4mg.mL⁻¹ (100%), em plântulas de cebola tratadas com o extrato A em sua menor concentração (96,25%), em plântulas de amendoim-bravo tratadas com o

extrato C em sua menor concentração (73,75%) e em plântulas de capim-colonião tratadas com os extratos D e E a 0,4 e 0,2 mg.mL⁻¹, respectivamente (90%).

O menor percentual de germinação, atingiu o valor de 23,75% em plântulas de amendoim-bravo tratadas com o herbicida Goal®.

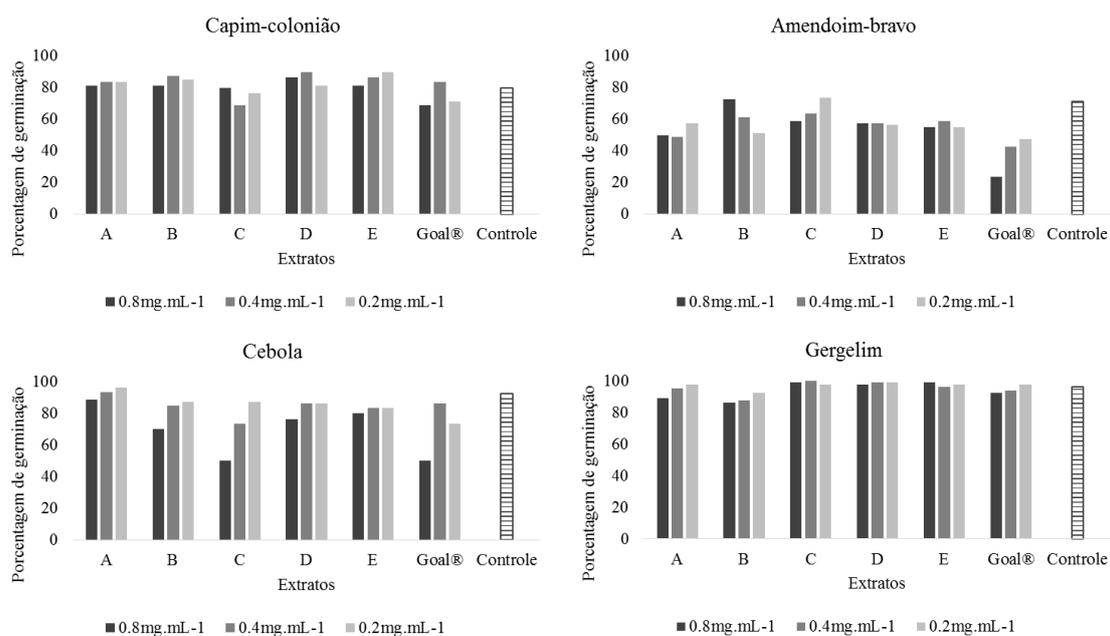


Figura 4: Percentual de germinação de espécies alvo tratadas com extratos brutos de *Piptocarpha rotundifolia*, provenientes de extração eluotrópica em diferentes concentrações.

Neste mesmo bioensaio, foi possível verificar que o aumento da velocidade de germinação nem sempre influencia no aumento da sincronia, sendo assim, não há uma sincronia no processo de germinação das espécies-alvo (Tabela 2).

O gergelim apresentou os maiores valores de velocidade de germinação, enquanto a cebola mostrou maiores valores de sincronia. Porém, a espécie invasora amendoim-bravo, foi a mais sensível aos extratos, refletindo um menor percentual de germinação, e também menores valores de velocidade e sincronia (Tabela 2).

Tabela 2. Valores de Velocidade de Germinação (h^{-1}) e sincronia de plântulas submetidas à ação de extratos brutos oriundos de extração eluotrópica de *Piptocarpha rotundifolia*, em diferentes concentrações.

	VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO			SINCRONIA		
	0.8mg.mL ⁻¹	0.4mg.mL ⁻¹	0.2mg.mL ⁻¹	0.8mg.mL ⁻¹	0.4mg.mL ⁻¹	0.2mg.mL ⁻¹
Capim-colonião						
A	0,459	0,514	0,522	0,232	0,264	0,217
B	0,394	0,571	0,613	0,217	0,206	0,215
C	0,342	0,384	0,447	0,179	0,220	0,222
D	0,560	0,425	0,423	0,180	0,197	0,194
E	0,444	0,444	0,501	0,198	0,271	0,167
Goal®	0,251	0,323	0,354	0,209	0,304	0,241
Amendoim-bravo						
A	0,351	0,324	0,344	0,212	0,154	0,256
B	0,433	0,370	0,314	0,154	0,139	0,171
C	0,367	0,398	0,428	0,174	0,177	0,132
D	0,329	0,315	0,315	0,196	0,164	0,294
E	0,298	0,349	0,320	0,208	0,393	0,188
Goal®	0,126	0,237	0,226	0,158	0,304	0,362
Cebola						
A	0,412	0,435	0,493	0,519	0,473	0,507
B	0,209	0,384	0,420	0,308	0,478	0,570
C	0,150	0,325	0,369	0,580	0,711	0,685
D	0,273	0,379	0,421	0,666	0,664	0,625
E	0,326	0,440	0,410	0,724	0,770	0,675
Goal®	0,174	0,362	0,315	0,190	0,251	0,193
Gergelim						
A	0,432	0,531	0,558	0,222	0,253	0,316
B	0,375	0,455	0,488	0,310	0,385	0,395
C	0,507	0,580	0,580	0,250	0,241	0,379
D	0,542	0,599	0,618	0,313	0,373	0,253
E	0,557	0,549	0,597	0,227	0,381	0,196
Goal®	0,461	0,486	0,526	0,513	0,476	0,500

Valores em negrito diferem do controle negativo pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade

Com relação à velocidade de germinação, para as espécies invasoras (capim-colonião e amendoim-bravo), todos tratamentos foram estatisticamente iguais ao controle positivo. Assim, somente as plântulas de cebola tratadas com os extratos B, C, D e E em suas maiores concentrações, bem como C a 0,4mg.mL⁻¹; e plântulas de gergelim tratadas com os extratos A e B em suas maiores concentrações, diferiram estatisticamente do controle negativo pelo teste de Tukey.

Por outro lado, com relação à sincronia, nenhum tratamento diferiu do controle negativo.

3.4. Bioensaio de crescimento de plântulas

Este bioensaio foi realizado apenas com os extratos brutos nas mesmas concentrações do bioteste com coleóptilos de trigo.

O extrato C (acetato etílico) a $0,4\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ foi capaz de inibir em 88,1% o crescimento das partes aéreas de gergelim, porém não foi possível realizar medições para plântulas tratadas com este mesmo extrato em sua maior concentração, visto que as partes aéreas encontravam-se todas necrosadas. Já as plântulas com parte aérea menos afetada foram as da espécie de capim-colonião, em que o maior percentual de inibição foi observado naquelas tratadas com o extrato B. Este apresentou uma inibição dose-dependente, de acordo com suas concentrações (Figura 4).

Em contrapartida, as raízes com maior percentual de inibição (80,4%) foram observadas em plântulas de amendoim-bravo tratadas com o extrato B (diclorometânico) a $0,4\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, e a espécie menos afetada em suas raízes foi a de cebola. (Figura 5).

Assim, de forma geral, as raízes das plântulas de amendoim-bravo e as partes aéreas das plântulas de gergelim (ambas dicotiledôneas) foram as que apresentaram maiores percentuais de inibição quando comparadas às outras espécies.

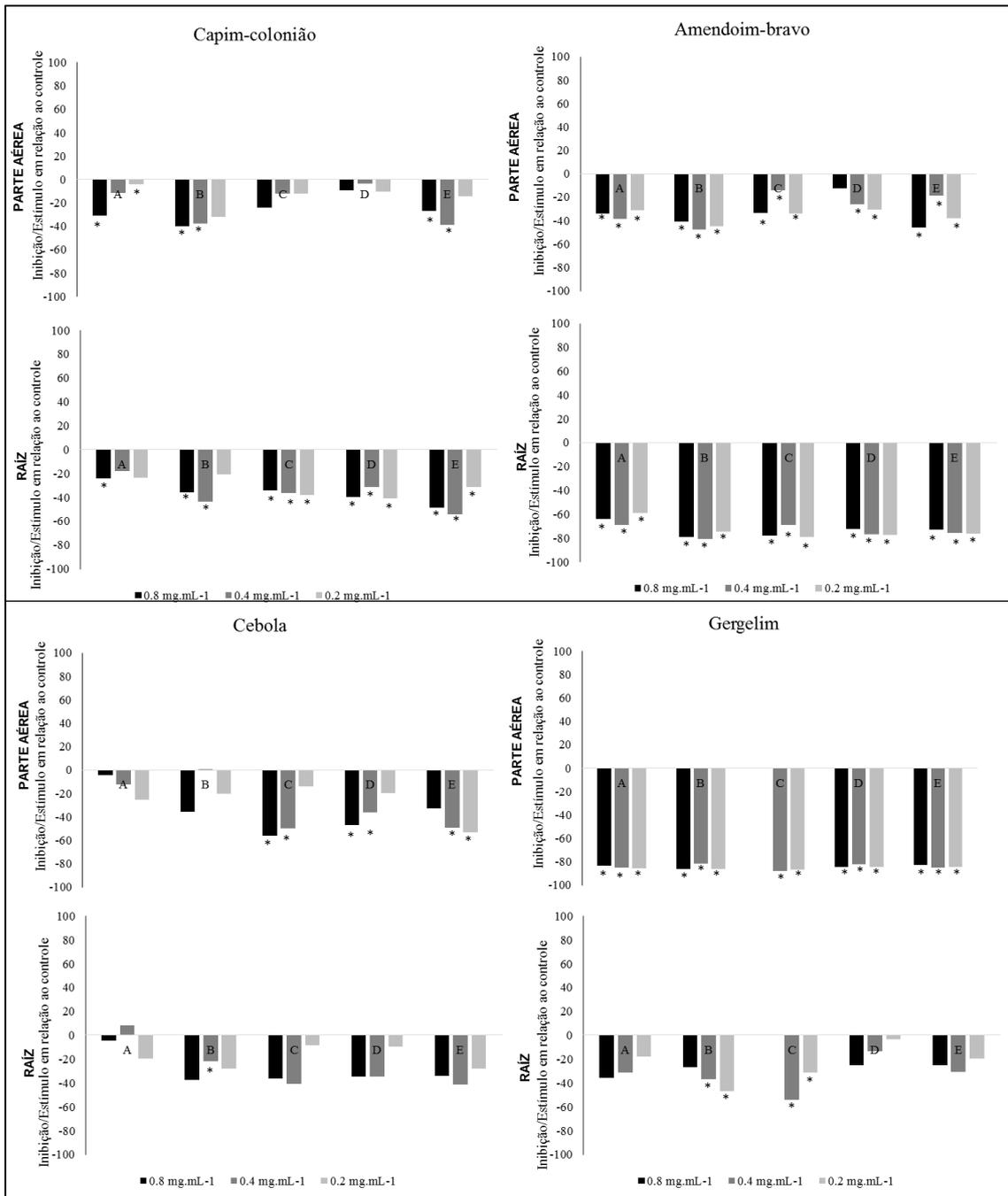


Figura 5. Efeito dos extratos brutos originários da extração em ordem eluotrópica, de folhas de *Piptocarpha rotundifolia* sobre o crescimento inicial de plântulas de amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*), capim-colonião (*Megathyrus maximus*), cebola (*Allium cepa*) e gergelim (*Sesamum indicum*) em diferentes concentrações. (*) indicam os extratos nas concentrações que apresentaram diferença significativa quando comparado com o controle negativo (Solução tampão com DMSO).

Ao término do bioteste de crescimento foi possível observar que grande parte das plântulas das espécies-alvo crescidas na presença do herbicida Goal® apresentavam-se

necrosadas tanto nas partes aéreas quanto em suas raízes. Sendo assim, não foi possível realizar as medições nestas últimas.

O gergelim e, principalmente o amendoim-bravo, mostraram-se mais sensíveis à ação dos extratos das folhas adultas de *P. rotundifolia* do que as espécies monocotiledôneas. Também foram observadas diversas anormalidades durante o desenvolvimento inicial de plântulas das espécies-alvo tanto invasoras como as indicadoras, sendo estas: inversão gravitrópica, necrose de raízes e/ou de parte aérea, e atrofia. As anormalidades verificadas podem ser melhor visualizadas de acordo com a Figura 6.

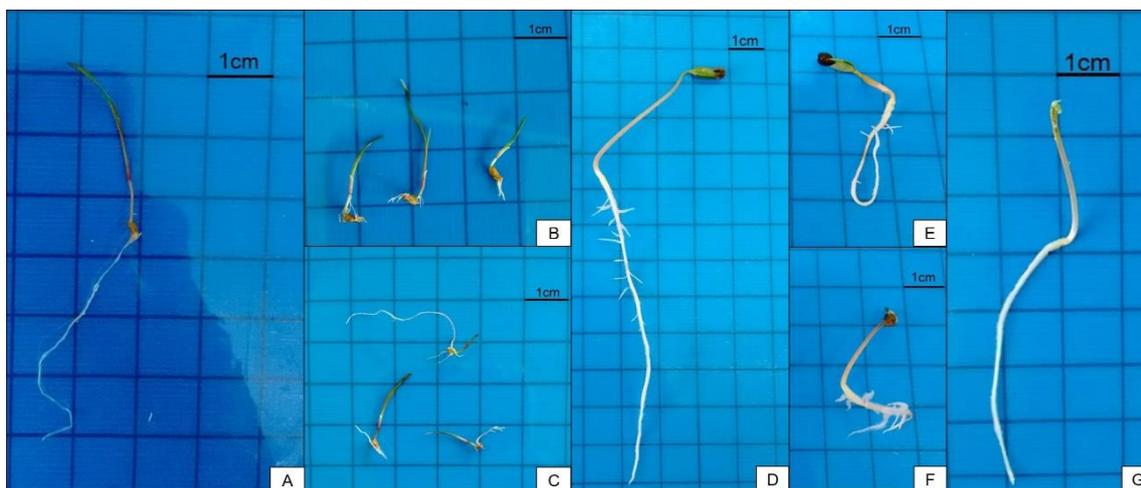


Figura 6. Anormalidades apresentadas pelas espécies-alvo tratadas com extrato de folhas de *P. rotundifolia*. Capim-colonião: A (controle negativo), B (atrofia e necrose de raiz), C (inversão gravitrópica). Amendoim-bravo: D (controle), E (inversão gravitrópica), F (necrose de raiz e atrofia de parte aérea) e G (atrofia severa de parte aérea).

A partir da figura abaixo (Figura 7) é possível observar as anormalidades ocorridas em cada espécie, de acordo com suas frequências.

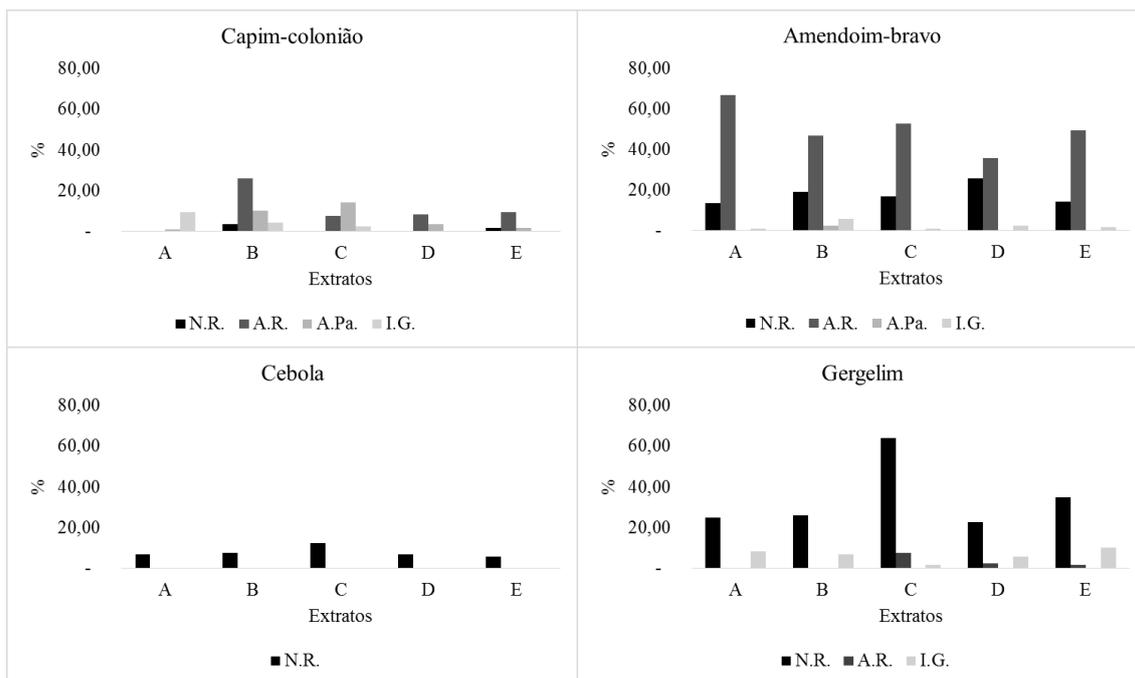


Figura 7: Valores de porcentagem de anomalias verificadas em plântulas de capim-colonião, amendoim-bravo, cebola e gergelim, tratadas com extratos brutos oriundos de extração eluotrópica, sendo estas anomalias: N.R. (necrose de raiz), A.R. (atrofia de raiz), A.Pa. (atrofia de parte aérea) e I.G. (inversão gravitropical).

De forma geral, os maiores valores percentuais de anomalias foram verificados em plântulas de amendoim-bravo de gergelim. Atrofia de raiz e necrose de raiz foram as anormalidades mais frequentes em plântulas de amendoim e gergelim, respectivamente.

Com relação às plântulas de cebola, estas apresentaram os menores percentuais de anormalidades, sendo necrose de raiz, o único constatado nesta.

As espécies invasoras apresentaram maior quantidade de anomalia do tipo atrofia de raiz, onde os maiores valores encontrados foram os de 66,67% para plântulas de amendoim-bravo tratadas com o extrato hexânico (A), e 25,83% para as de capim-colonião tratadas com o extrato diclorometânico (B). As espécies de hortaliças apresentaram maiores percentuais de necrose de raiz, sendo os maiores valores, 64,17% e 12,5%, para gergelim e cebola, respectivamente; ambas verificadas na presença do extrato acetato etílico (C). Desta forma, pode-se concluir que, de maneira geral, a espécie monocotiledônea de cebola, foi a mais resistente aos extratos brutos, apresentando apenas

um tipo de anomalia, e pouca quantidade de plântulas afetadas. Já a espécie invasora de eudicotiledônea (amendoim-bravo) mostrou-se mais sensível a estes extratos, sendo nesta espécie verificada todos os tipos de anomalias, e grandes quantidades de plântulas afetadas.

3.5. - Bioensaio de crescimento de células do metaxilema de gergelim (*Sesamum indicum* L.)

O estudo anatômico das raízes de plântulas de gergelim possibilitou uma melhor visualização dos efeitos fitotóxicos dos diferentes extratos, em nível celular. Os extratos brutos foram submetidos a um bioensaio de crescimento de células do metaxilema radicular, para verificar se a redução do comprimento das raízes ocorria a partir de alterações a nível celular. Foi observada uma diminuição significativa do comprimento das células do metaxilema tratadas com os extratos em relação ao controle negativo. (Figura 8).

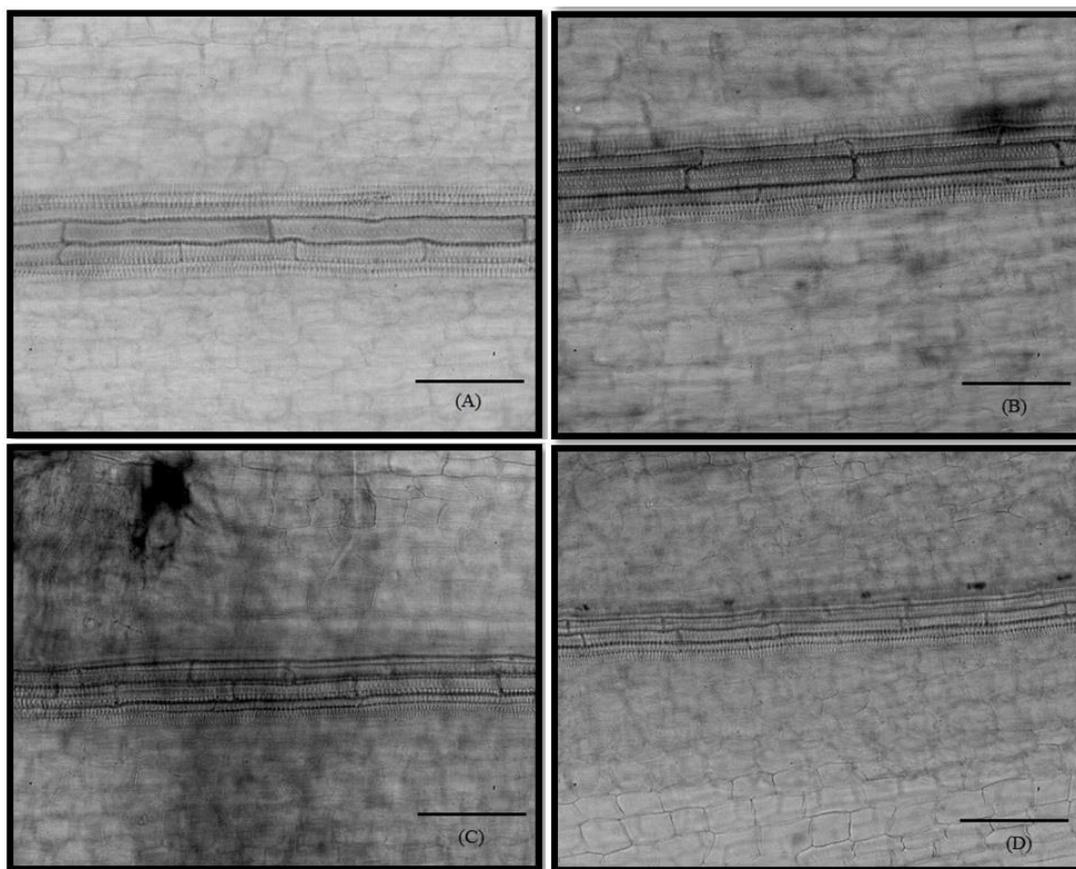


Figura 8. Fotomicrografia de células do metaxilema radicular de plântulas de gergelim tratadas com os extratos D: (A) controle, (B) 0.2mg.mL^{-1} , (C) 0.4 mg.mL^{-1} e (D) 0.8mg.mL^{-1} . As marcações equivalem à medida correspondente a 50 micrômetros.

O extrato que mais influenciou negativamente no crescimento de células, do metaxilema de plântulas de gergelim foi o acetato etílico (C) a $0,8\text{mg.mL}^{-1}$. Este, apresentou um padrão de inibição dose-dependente, e, além de estatisticamente diferente do controle negativo, apresentou a menor média de tamanho ($75,76\mu\text{m}$) (Tabela 3). Os únicos extratos que se mostraram iguais ao controle negativo foram A e E em suas concentrações mais baixas.

Tabela 3. Médias (μm) das células do metaxilema de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum*) tratadas com os extratos brutos de folhas de *P. rotundifolia*, oriundos de extração eluotrópica, em diferentes concentrações.

Extrato	Concentrações		
	0.8mg.mL ⁻¹	0.4mg.mL ⁻¹	0.2mg.mL ⁻¹
Hexânico (A)	90,76*	112,44*	126,70
Diclorometânico (B)	78,26*	100,88*	103,48*
Acetato Etilico (C)	75,76*	76,04*	104,55*
Acetônico (D)	110,65*	87,96*	89,92*
Metanólico (E)	94,02*	118,77*	130,43
Controle	140,57		

*: Diferem estatisticamente do controle negativo pelo teste de Tukey.

Na Figura 9 é possível verificar o tamanho das células de acordo com a frequência que ocorrem em cada classe de tamanho. Raízes de gergelim tratadas com os extratos A, B e E não apresentam células do metaxilema com tamanho entre 25 e 50 μm . Os extratos que apresentaram maiores valores de frequências foram os extratos D a 0,4mg.mL⁻¹, com 77,5% das células com tamanhos entre 50 à 75 μm ; e C a 0,8mg.mL⁻¹, com 62,5% das células com a mesma faixa de tamanho. As células que não foram tratadas (controle) apresentaram-se em maioria (32,5%), na classe de tamanho entre 125 e 150 μm .

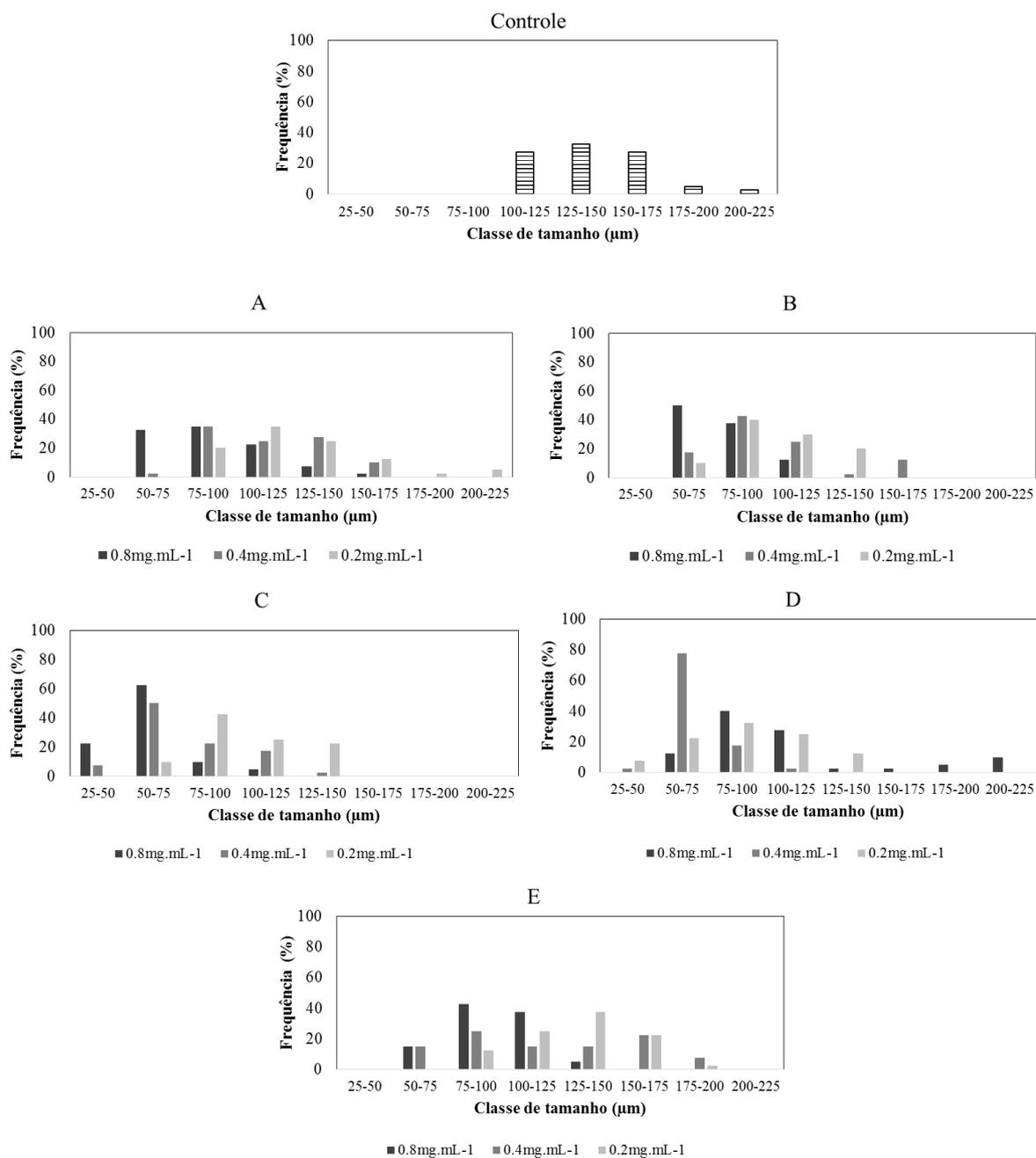


Figura 9.: Frequência relativa das classes de tamanho (μm) das células do metaxilema radicular de gergelim (*Sesamum indicum*) submetidas à ação do extratos brutos A, B, C, D e E de *Piptocarpha rotundifolia* em diferentes concentrações.

Assim, como ocorreu no bioensaio de crescimento de plântulas, não foi possível avaliar o crescimento de células do metaxilema radicular com as plântulas submetidas ao tratamento com o controle positivo contendo GOAL®, já que as mesmas se apresentavam, em sua maioria mortas ou necrosadas.

3.6. Rendimento das frações e subfrações

De forma geral, os extratos mais polares foram os que apresentaram maiores rendimentos. Os valores de rendimento das frações e subfrações originadas do fracionamento do extrato acetônico (D) estão apresentados na Tabela 1, apresentada no ítem 3.1 deste capítulo.

3.7. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As cromatoplas utilizadas na metodologia de CCD podem ser visualizadas de acordo com a Figura 10.

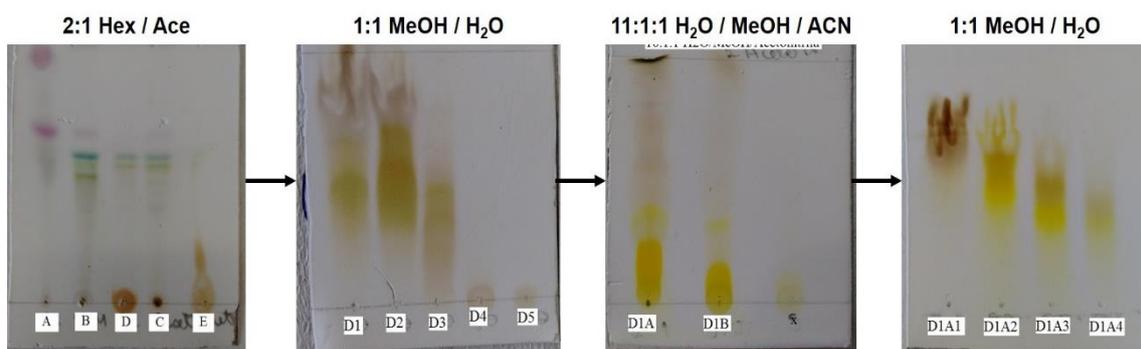


Figura 10. Cromatografia em Camada Delgada, com os extratos brutos, frações e subfrações provenientes do extrato acetônico (D).

Esta metodologia foi utilizada com todos extratos, frações e subfrações, visando a análise de polaridade dos compostos presentes nessas e se a separação entre eles era nítida. As fases móveis utilizadas estão descritas nas imagens, devidamente identificadas.

As placas cromatográficas, foram dispostas sob uma luz ultravioleta para que desta forma fosse possível visualizar alguns compostos que não ficam aparentes após a revelação das placas. O extrato mais apolar, hexânico (A) apresentou apenas bandas de coloração roxa, o que indica uma grande quantidade de ácidos graxos e gorduras, e o extrato diclorometânico (B) apresentou maior quantidade de bandas de coloração verde,

indicando assim, grande quantidade de clorofila neste. No decorrer dos fracionamentos foi notável que a quantidade de bandas aparentes nas placas cromatográficas decresceu, indicando assim que os compostos foram sendo cada vez mais isolados. Porém, à medida em que ocorreram os subfracionamentos, a separação dos compostos nas cromatoplasas foi se tornando menos visível, dificultando uma distinção nítida da separação das bandas.

3.8. Bioteste de crescimento com coleótilos de trigo (*Triticum aestivum*) com frações e subfrações

As frações D1, D2, D3, D4 e D5 também foram testadas em coleótilos de trigo, quanto ao seu potencial fitotóxico. A fração D1 foi a que apresentou maior atividade inibitória, sendo seu maior percentual de inibição foi igual a 37,4%, para a concentração de 0,4mg.mL⁻¹. Esta fração (D1) na concentração de 0,4 mg.mL⁻¹, e a D2 em sua menor concentração foram as únicas a produzir efeito igual ao do controle positivo na mesma concentração. Apenas o controle positivo apresentou uma resposta inibitória dose-dependente. Por outro lado, a fração D4 a 0,2 mg.mL⁻¹, bem como todas concentrações da fração D5 mostraram estímulo no crescimento dos coleótilos comparando ao controle negativo (Figura 11).

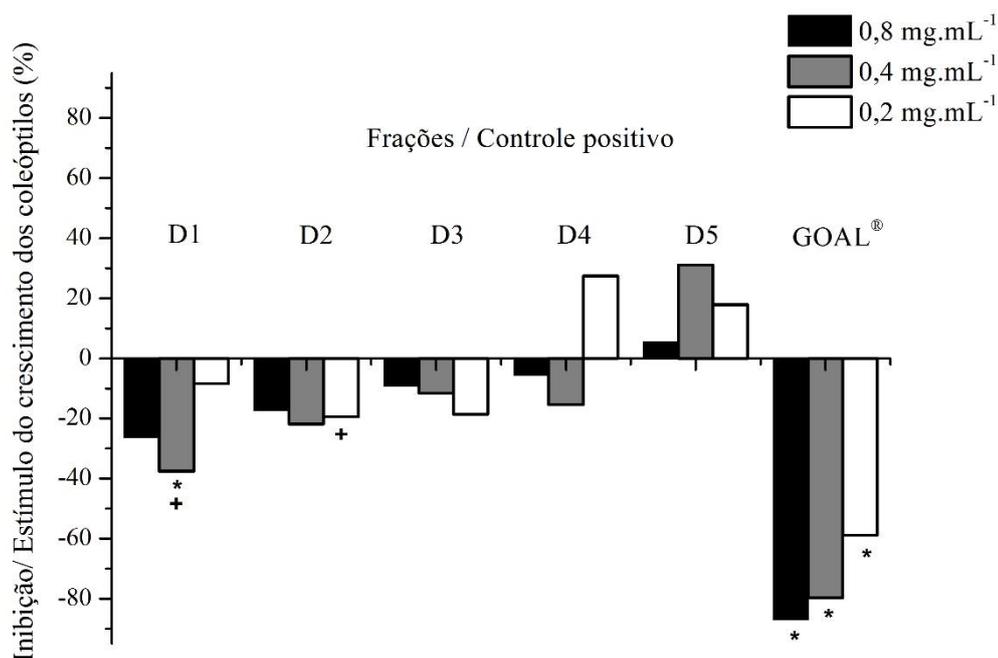


Figura 11. Efeito das frações referentes ao fracionamento do extrato D de folhas adultas *Piptocarpha rotundifolia* sobre o comprimento de coleótipos de trigo (*Triticum aestivum*). (*) indica tratamento que apresenta diferença significativa quando comparado com o controle negativo. (+) indica tratamento com efeito igual ao do controle positivo na mesma concentração. O controle negativo corresponde às soluções com o herbicida Goal®, e o positivo à solução tampão com DMSO.

Levando-se em conta estes resultados e os rendimentos das subfrações, D1 deu continuidade ao próximo fracionamento, que originou as subfrações D1A, D1B e D1C.

Um outro bioensaio de coleótipos foi conduzido e como resultado, observou-se que apenas as subfrações D1A e D1B foram capazes de inibir o crescimento de coleótipos de trigo, apresentando uma resposta dose-dependentes. De maneira geral, apenas a subfração D1A diferiu estatisticamente do controle negativo, em todas as concentrações, porém o maior percentual de inibição (79,8%) foi encontrado em coleótipos tratados com a subfração D1B a 0,8 mg.mL⁻¹; tratamento este, maior que os apresentados anteriormente, tanto com extratos brutos quanto com as frações deles originadas, e o único que se assemelha ao herbicida na mesma concentração. A subfração

mais polar (D1C) foi a única a apresentar estímulo no crescimento dos coleótilos (Figura 12).

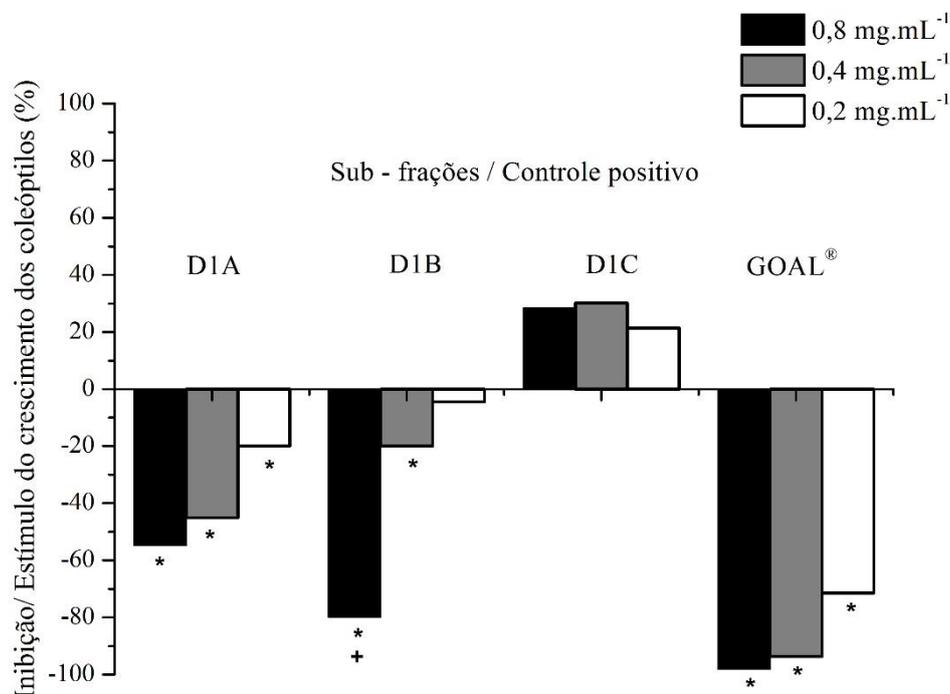


Figura 12. Efeito dos extratos referentes ao fracionamento do extrato D1 de folhas adultas *Piptocarpha rotundifolia* sobre o comprimento de coleótilos de trigo (*Triticum aestivum*). (*) indica tratamento que apresenta diferença significativa quando comparado com o controle negativo. (+) indica tratamento com efeito igual ao do controle positivo na mesma concentração. O controle positivo corresponde às soluções com o herbicida Goal®, e o negativo à solução tampão com DMSO.

Desta forma, pelo fato da subfração D1A apresentar maior rendimento, ser capaz de inibir o crescimento dos coleótilos e, também ser estatisticamente diferente do controle negativo em todas suas concentrações, esta foi selecionada para continuar os experimentos seguintes. Após o subfracionamentos de D1A, suas subfrações (D1A1, D1A2, D1A3 e D1A4) também foram testados em coleótilos de trigo. A subfração D1A1 nas concentrações de 0,2 e 0,4 mg.mL⁻¹ foi a única a apresentar estímulo no crescimento dos coleótilos, porém, as demais subfrações, foram capazes de inibir o crescimento de coleótilos de trigo, diferindo estatisticamente do controle negativo, em todas

concentrações. O maior percentual de inibição foi apresentado por D1A3 a 0,4 mg.mL⁻¹ (64,2%) (Figura 13). As subfrações D1A2 e D1A4 em suas menores concentrações, bem como D1A3 a 0,4mg.mL⁻¹ mostraram-s estatisticamente igual ao herbicida nas mesmas concentrações.

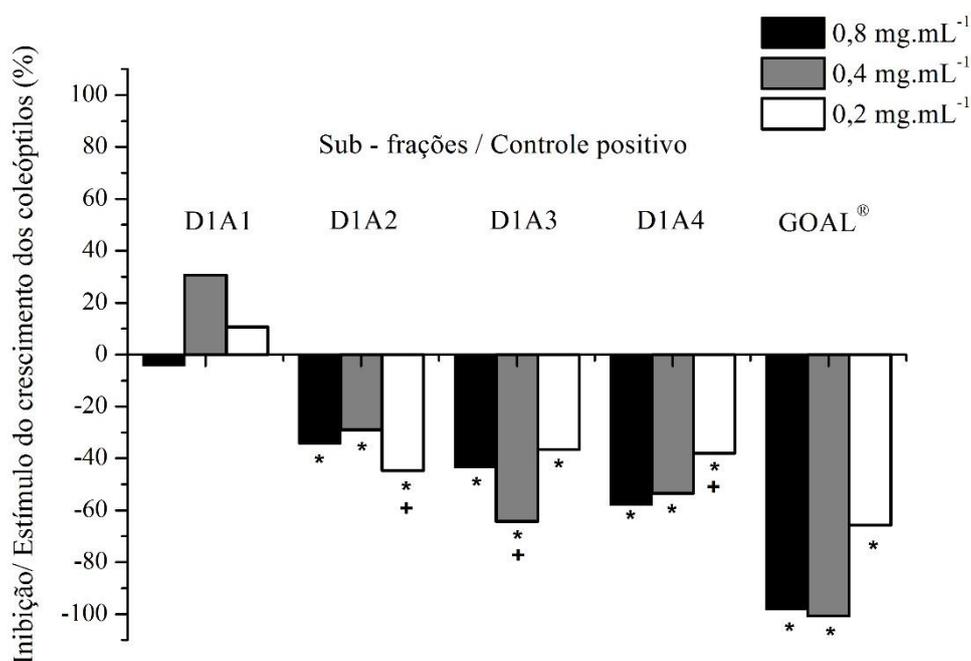


Figura 13: Efeito das subfrações referentes ao fracionamento de D1A sobre o comprimento de coleótilos de trigo (*Triticum aestivum*). (*) indica tratamento que apresenta diferença significativa quando comparado com o controle negativo. (+) indica tratamento com efeito igual ao do controle positivo na mesma concentração. O controle positivo corresponde às soluções com o herbicida Goal®, e o negativo à solução tampão com DMSO.

4. Discussão

Compostos com polaridade mais elevada, tais como açúcares simples e polissacarídeos solúveis são bastante abundantes nas plantas (Vattuone et al., 2009); motivo pelo qual o extrato metanólico (E) e as frações e subfrações mais polares tiveram maior rendimento.

Os bioensaios com coleóptilos de trigo apresentam a vantagem de serem rápidos e sensíveis a uma grande variedade de substâncias bioativas (Cutler et al., 2000) e muito utilizados por se mostrarem capazes de avaliar o estímulo ou inibição do crescimento dos coleóptilos quando em contato com os agentes fitotóxicos. Dados similares aos obtidos no bioensaio de coleóptilos com os extratos brutos, foram encontrados por Macías *et al.* (2004), em que frações e substâncias isoladas de *Helianthus annuus* também provocaram inibição no comprimento de coleóptilos de trigo. O mesmo padrão foi observado por Pereira et al., 2015 em coleóptilos de trigo crescidos em soluções com extrato de *Serjania lethalis*.

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), porém neste trabalho este efeito não foi observado, de forma que não houve diminuição da atividade de inibição ao longo dos fracionamentos realizados.

Assim como foi observado no presente estudo, extratos de *Andira humilis* Mart. ex Benth., *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil., *Aristolochia esperanzae* Kuntze e *Myrcia tomentosa* (Aubl.) DC., também plantas do cerrado, causaram inibição mais significativa no tempo do que na porcentagem de germinação de diversas espécies alvo (Oliveira et al., 2004; Periotto et al., 2004; Gatti et al., 2010; Imatomi et al., 2013).

A velocidade de germinação foi mais afetada do que a porcentagem de diásporos germinados, como já relatado em diversos estudos (Periotto et al., 2004; Souza et al., 2010; Grisi et al., 2013a). Dessa forma, um fator importante ao se utilizar a germinação de sementes como indicador do efeito dos aleloquímicos está vinculado ao número de variáveis analisadas. A simples determinação da germinabilidade das sementes não é

suficiente para determinar a influência do extrato testado sobre a planta alvo (Ferreira e Águila, 2000). Outras variáveis podem ser utilizadas para a avaliação da fitotoxicidade, como a velocidade e tempo médio de germinação, coeficiente de variação do tempo e sincronia do processo de germinação (Ranal e Santana, 2006; Grisi et al., 2013b). A diminuição no tempo de germinação e emergência das plântulas reduzem a capacidade de competição e, portanto, o de estabelecimento de uma população em campo.

O teste de crescimento de plântulas pode ser útil para a determinação do espectro de ação dos extratos testados, sendo importante no planejamento das demais etapas de investigação. A resistência ou tolerância aos metabólitos secundários é uma característica espécie-específica, existindo aquelas mais sensíveis como alface (*Lactuca sativa* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller) e rabanete, consideradas plantas indicadoras de atividade alelopática (Souza Filho et al., 2010; Tur et al., 2010; Cremones et al., 2013). Sementes de cebola são usadas também como espécie alvo para ensaios alelopáticos (Abdelgaleil & Hashinaga 2007). A observação do sistema teste do crescimento radicular tem mostrado que essa planta é bastante sensível quando da presença de contaminantes ambientais (substâncias solúveis em água).

Esta diferença de sensibilidade pode ser resultado das diferenças fisiológicas e bioquímicas das espécies-alvo utilizadas, sendo uma monocotiledônea (capim-colonião) e uma eudicotiledônea (amendoim-bravo), além do mais, diversos estudos mostram que o efeito negativo das substâncias químicas sobre as plantas daninhas é dependente da espécie (Prati e Bossdorf, 2004; Xuan et al., 2005; Sodaeizadeh et al., 2009). Segundo Kobayashi (2004) a susceptibilidade das espécies alvo à ação de substâncias fitotóxicas, sob condições de laboratório, depende das características fisiológicas e bioquímicas de cada espécie.

A maior sensibilidade radicular, como apresentada pelas plântulas de capim-colônia é amplamente documentada na literatura e caracteriza um dos principais parâmetros para indicar a sensibilidade de plantas aos efeitos de fitotoxinas (Chon et al., 2002; Gatti et al., 2004; Souza Filho & Duarte, 2007; Rejila & Vijayakumar, 2011; Grisi et al., 2013). Isto pode ser explicado pelo fato de as raízes ficarem mais em contato com o extrato do que a parte aérea neste bioensaio, além disso as raízes podem apresentar maior permeabilidade aos compostos fitotóxicos, pois não possuem uma cobertura cuticular bem desenvolvida como a apresentada pela superfície do hipocótilo (Correia; Centurion; Alves, 2005; Bessire et al., 2007; Yoshimura et al., 2011).

De acordo com Ferreira (2004) o desenvolvimento e a sobrevivência das plântulas são eventos cruciais para o crescimento e/ou manutenção das populações, que inicialmente depende da germinação das sementes (emissão da radícula) e do estabelecimento das plântulas (emissão das superfícies fotossintéticas). As plântulas anormais são aquelas que não apresentam potencial para continuar o seu desenvolvimento. Baseando-se neste conceito, foram observadas diversas anormalidades durante o desenvolvimento inicial de plântulas das espécies-alvo, sendo estas: inversão gravitropica, necrose de raízes e/ou de parte aérea, e atrofia (Brasil, 2009).

Algumas fitotoxinas podem alterar a morfologia e a anatomia das plântulas interferindo na função de alguns hormônios vegetais como a auxina e a citocinina, importantes na modulação de processos como a resposta trópica à luz e a gravidade, arquitetura geral do caule e raízes, desenvolvimento vascular, divisão e alongamento celular, levando ao surgimento de anomalias responsáveis por inviabilizar ou prejudicar o desenvolvimento das plântulas, sendo a necrose da radícula a mais comum (Ferreira & Áquila, 2000; Tanimoto, 2005; Aloni, et al. 2006). As anormalidades observadas impedem que a plântula se desenvolva normalmente, assim, seu crescimento fica

comprometido a ponto de não permitir que ela se estabeleça (Brasil, 2009). Os aleloquímicos podem induzir o aparecimento de plântulas anormais, nas quais a necrose é o sintoma mais evidente do efeito alelopático, inibindo o desenvolvimento da planta receptora (Ferreira e Áquila 2000).

Diferente dos herbicidas sistêmicos, os de ação seletiva controlam um grupo de plantas daninhas, sendo ineficazes para outros grupos. Oxifluorfem é um herbicida de ação seletiva, não sistêmico e indicado para o controle de plantas daninhas, mono e eudicotiledôneas, em aplicações de pré-emergência ou pós-emergência inicial (Rodrigues e Almeida, 2011).

A redução no crescimento radicular das plântulas de gergelim submetidas à ação dos extratos de *P. rotundifolia* pode estar associada com a inibição no alongamento celular do metaxilema. Isso indica a provável interferência dos aleloquímicos nas concentrações das diferentes categorias de hormônios.

Segundo Al-Wakeel et al. (2007) a inibição no processo de alongamento celular pode estar relacionada com a ação direta dos aleloquímicos e, por estes interferirem no processo de divisão celular e no equilíbrio entre os diferentes hormônios. Da mesma forma, Gatti et al., 2010, e Jatobá, 2012, que investigaram o efeito de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze sobre o desenvolvimento das células do metaxilema em raízes de plântulas de gergelim, discutem que a provável interferência de aleloquímicos na redução do tamanho das células pode estar associada a alterações na concentração de fitormônios. A auxina é o principal fitormônio que controla a divisão, a expansão e a diferenciação de células (Perrot-Rechenmann, 2010) e tem uma profunda influência em aspectos da morfologia e crescimento da raiz (Strader et al., 2010), assim como no controle da diferenciação e crescimento dos tecidos vasculares primários da raiz, o proto e o metaxilema (Aloni et al., 2006). Dessa forma, as alterações no crescimento

celular provocadas pela ação de metabólitos secundários podem ser resultado da interferência na ação desse hormônio.

No processo germinativo, juntamente com a água, podem penetrar substâncias alelopáticas capazes de inibir ou retardar a multiplicação ou crescimento das células, podendo também retardar a germinação, evidenciada pelo aumento do tempo médio (Gonzalez et al., 2002).

O tamanho das sementes por si só não explica a tolerância de algumas espécies aos aleloquímicos, uma vez que, da mesma forma que ocorre com os herbicidas comerciais, a capacidade diferencial de uma espécie para desintoxicar o composto pode contribuir para a sua tolerância (Burgos et al., 2004), e neste trabalho, observou-se que a germinação de sementes de amendoim-bravo foi mais sensível aos efeitos do extrato acetônico de *P. rotundifolia* do que as sementes de capim-colonião. Sendo assim, o fato das sementes de amendoim-bravo, serem maiores que as de capim-colonião, não justificam os baixos resultados de porcentagens de germinação destas. Segundo Rizvi e Rizvi (1992) alterações no padrão de germinação podem resultar de efeitos sobre a permeabilidade de membranas, transcrição e tradução do DNA, funcionamento dos mensageiros secundários, da respiração, conformação de enzimas e de receptores, entre outros.

5. Conclusão

Os extratos e frações de *P. rotundifolia* foram capazes de inibir o crescimento de coleótilos de trigo e de plântulas de espécies invasoras, e não houve perda de atividade através dos fracionamentos realizados. Neste contexto, os mesmos mostraram-se fitotóxicos, sendo promissores no estudo e busca de seus compostos.

6. Referências

- ABDELGALEIL, S. & HASHINAGA, F. 2007. Allelopathic potencial of two sesquiterpene lactones from *Magnolia grandiflora* L. **Biochemical Systematics and Ecology** **35**(11):737-742.
- ALONI, R.; ALONI, E.; LANGHANS, M.; ULLRICH, C.I. role of cytokin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. **Annals of Botany**, v.97, p.883-893, 2006.
- BESSIRE, M.; CHASSOT, C.; JACQUAT, A.C. et al. A permeable cuticle in *Arabidopsis* leads to a strong resistance to *Botrytis cinerea*. **EMBO Journal**, v. 26, 2158-2168, 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/ DNDV/CLAV, 1992. 365p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria da Defesa Agropecuária. **Regras para a análise de sementes**. Brasília, 2009. 395f.
- CARVALHO, L. B.; BIANCO, S.; GUZZO, C. D. Interferência de *Euphorbia heterophylla* no crescimento e acúmulo de macronutrientes da soja. *Planta Daninha*, v. 28, p. 33-39, 2010.
- CHON, S.U. et al. Herbicidal potential and quantification of causative allelochemicals from several Compositae weeds. *Weed Research* v. 43, p. 444-450, 2003.
- CORREIA, N. M.; CENTURION, M. A. P. C.; ALVES, P. L. C. A. Influência de extratos aquosos de sorgo sobre a germinação e desenvolvimento de plântulas de soja. **Ciência Rural**, v. 35, p.498-503, 2005.
- CREMONEZ, P.A.; FEIDEN, A.; SANTOS, R.F.; BASSEGIO, D.; ROSSI, E.; NADALETI, W.C.; ANTONELLI, J.; TOMASSONI, F. Allelopathic influence of the aqueous extract of *Jatropha curcas* L. leaves on wild *Cichorium intybus*. **African Journal of Agricultural Research**, v. 8, n. 49, p. 6575-6578, 2013.
- DA COSTA, E. A. D.; MATALLO, M. B.; CARVALHO, J. C.; ROZANSKI, A. Eficiência de nova formulação do herbicida oxyfluorfen no controle de plantas daninhas em área de *Pinus caribea* morelet var. hondurensis barr. et Golf. **Revista Árvore**, v. 26, p. 683-689, 2002.
- DAYAN, F. E.; 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.
- FERREIRA, A. G.& ÁQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12; p.175-204, 2000.
- FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 2004. 323p.

FERRIANI, A. P. Estaquia de Vassourão-branco (*Piptocarpha angustifolia*) com uso de ácido indol butírico. **Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo**, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2006.

FISKEJÖ, G. Allium test. Methodological and Molecular Biology. v.43, p.119-127. 1995.
GATTI, A. B.; FERREIRA, A. G.; ARDUIN, M.; PEREZ, S. C. J. G. A. Allelopathic effects of aqueous extracts of *Aristolochia esperanzae* O.Kuntze on development of *Sesamum indicum* L. seedlings. **Acta Botânica Brasílica**, v. 24, p. 454-461, 2010.

GATTI, A.B. Atividade alelopática de espécies do cerrado. 2008, 138 f. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo.

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

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

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

GROKOVISKI, L.; CERVI, A. C.; TARDIVO, R. C. O gênero *Piptocarpha* R.Br. (Asteraceae: *Vernonieae*) no estado do Paraná, Brasil. **Acta Bot. Bras.** 23 (2): 486-498. 2009.

HANCOCK, C.R.; BARLOW, H.W. & LACEY, H.J. 1964. The East Malling Coleoptile Straight Growth Test Method. **Experimental Botany** 15(1):166- 176.

JAMIL, M., CHEEMA, Z.A., MUSHTAQ, M.N., FAROOQ, M. AND CHEEMA, M.A., 2009. Alternative control of wild oat and canary grass in wheat fields by allelopathic plant water extracts. *Agronomy for Sustainable Development*, vol. 29, no. 3, pp. 475- 482. <http://dx.doi.org/10.1051/agro/2009007>

JATOBÁ L. Compostos com potencial alelopático em *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze. [**Dissertação de mestrado**]. São Carlos: Departamento de Botânica, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos. 2012.

KOBAYASHI, K. Factors affecting phytotoxic activity of allelochemicals in soil. **Weed Biology and Management**, v. 4, p. 1-7, 2004.

KRAUS, J.E. & ARDUIN, M. 1997. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro, Seropédica. Editora Universitária Rural, Rio de Janeiro, p. 198.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de estudos da flora, 2000.

- MACÍAS, F.A.; GALINDO, J.C.G.; MOLINILLO, J.M.G. & Cutler H.G. 2004. Allelopathy: Chemistry and mode of action of allelochemicals .CRC Press, Washington, 372 p.
- MACÍAS, F.A.; LACRET, R.; VARELA, R.M.; NOGUEIRAS, C. & MOLINILLO, J.M.G. 2010. Isolation and Phytotoxicity of Terpenes from *Tectona grandis*. **Journal of Chemical Ecology** 36:396-404.
- NOVAES, P., MOLINILLO, J.M.G., VARELA, R.M., E MACÍAS, F.A. 2013. Ecological phytochemistry of Cerrado (Brazilian savana) plants. **Phytochemistry Reviews** 12 (4): 839–855. doi: 10.1007/s11101-013-9315-3.
- OLIVEIRA, S.C.C.; FERREIRA, A.G. E BORGHETTI, F. Efeito alelopático de folhas de *Solanum lycocarpum* St. Hil. na germinação e crescimento de *Sesamum indicum* sob diferentes temperaturas. **Acta Botanica Brasílica**, v. 18, p. 401-406, 2004.
- OLIVEROS-BASTIDAS, A.J. El fenómeno alelopático. El concepto, las estrategias de estudio y su aplicación en la búsqueda de herbicidas naturales. **Química Viva**, ano 7, n.1, p. 1-34, 2008.
- PEREIRA, V.C.; ANESE, S.; GRISI, P.U.; IMATOMI, M.; GUALTIERI, S.C.J.; RODRIGUES FILHO, E. Phytotoxic potential of *Serjania lethalis* leaves on *Sesamum indicum*. **Acta Biologica Colombiana**, v. 20, n. 1, p. 31-37, 2015.
- PERES, F.; MOREIRA, J. C. Saúde e Ambiente e Sua Relação Com o Consumo de Agrotóxicos em um Pólo Agrícola do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.23, n.4, p. 612-621, 2007.
- PERIOTTO, F.; PEREZ, S.C.J.G.A.; LIMA, M.I.S. Efeito alelopático de *Andira humilis* Mart. ex Benth na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. **Acta Botanica Brasílica**, v. 18, n. 3, p. 425-430, 2004. PIMENTEL-GOMES, F.P. Curso de estatística experimental. 13. ed. Piracicaba: Nobel, 1990.
- PERROT-RECHENMANN, C. Cellular Responses to Auxin: Division versus Expansion. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, p. 1-15, 2010.
- PRATI, D.; BOSSDORF, O. Allelopathic inhibition of germination by *Alliaria petiolata* (*Brassicaceae*). **American Journal of Botany**, v. 91, p. 285-288, 2004.
- RANAL, M.A.; SANTANA, D.G. How and why to measure the germination Process? **Revista Brasileira de Botânica**, v.29, n.1, p.11 -1, de 2006.
- RIZVI, S.J.H.; HAQUE, H.; SINGH, V.K. & RIZVI, V. 1992. A discipline called allelopathy. Pp. 1-10. In: Rizvi, S.J.H. & Rizvi, V. (Eds.). **Allelopathy: basic and applied aspects**. London, Chapman & Hall.
- SMITH, G. L. New taxa in *Piptocarpha* R. Br. (Vernonieae: Compositae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**. 68: 661-667. 1981.

SMITH, G.L. 1982. Taxonomic considerations of *Piptocarpha* (Compositae: *Vernonieae*) and new taxa in Brazil. **Brittonia** **34**: 210-218.

SOCIEDADE INTERNACIONAL DE ALELOPATIA (IAS). 2014. Disponível em: <<http://www.international-allelopathy-society.org>> Acesso em: setembro/2014.

SODAEIZADEH, H.; RAFIEIOLHOSSAINI, M.; HAVLIK, J.; DAMME, P.V.) Allelopathic activity of different plant parts of *Peganum harmala* L. and identification of their growth inhibitors substances. **Plant Growth Regulation**, v. 59, p. 227-236, 2009.

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

STRADER, L. C.; CHEN, G. L.; BARTE, B. Ethylene directs auxin to control root cell expansion. **The Plant Journal**, v. 64, p. 874-884, 2010.

TUR, C.M.; BORELLA, J.; PASTORINI, L.H. Alelopatia de extratos aquosos de *Duranta repens* sobre a germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* e *Lycopersicum esculentum*. **Biotemas**, n. 23, v. 2, p. 13-22, 2010.

VATTUONE, M. A.; SAMPIETRO, D.A; SOBERÓN, R. ET AL. PLANT SAMPLING AND SAMPLE PREPARATION. IN: SAMPIETRO, D.A.; CATALAN, C.A.N.; VATTUONE, M.A.; Narwal,S.S. (eds.) Isolation, Identification and Characterization of Allelochemicals/Natural Products. **Science Publishers, Enfield**, NH, USA. p. 377-398. 2009.

XUAN T. D.; TAWATA, S.; KHANH, T. D.; CHUNG, I. M. Decomposition of allelopathic plants in soil. **Journal Agronomy Crop Science**, v. 191, p. 162-171, 2005.

YOSHIMURA, H., SAWA, Y., TAMOTSU, S. & SAKAI, A. 1,8-cineole inhibits both proliferation and elongation of by-2 cultured tobacco cells. **Journal Chemical Ecology**, v.37, p.320-328, 2011.

CAPÍTULO II

**Atividade fitotóxica de extratos foliares de *Piptocarpha rotundifolia* (Less.) – Baker
(candeia), obtidos com extração líquido-líquido.**

RESUMO – Pesquisas com espécies do cerrado têm mostrado que extratos vegetais apresentam ação fitotóxica no desenvolvimento e no crescimento de plantas alvo. Considerando isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade fitotóxica dos extratos foliares de *P. rotundifolia* obtidos utilizando a extração líquido-líquido e compará-la com a extração em ordem crescente de polaridade. Para tal, os extratos brutos obtidos foram testados sobre o crescimento de coleótilos de trigo (*Triticum aestivum* L.), sobre germinação e o crescimento e de plântulas das espécies-alvo invasoras capim-colonião (*Megathyrus maximus* J.), amendoim-bravo (*Euphorbia Heterophylla* L.) e de hortaliças, cebola (*Allium cepa* L.) e gergelim (*Sesamum indicum* L.) e também sob o crescimento de células do metaxilema radicular de plântulas de gergelim. O extrato bruto foi preparado a partir de 100g do pó de folhas de *P. rotundifolia*, submetido à extração com 600 mL de uma mescla Diclorometano/Metanol (1:1), que após seco foi diluído em 600 mL de solução MeOH/H₂O destilada (95:5) e particionado com 600 mL de hexano. Desta forma originou-se os extratos brutos 1 (hexânico). 2 (acetato etílico) e 3 (Aquoso). Por apresentar atividade inibitória nos biotestes de coleótilos de trigo, de crescimento e germinação de plântulas e de avaliação de células do metaxilema, o extrato 2 foi selecionado para ser fracionado. Um total de 14 frações foram reunidas por similaridade cromatográfica, sendo estas testadas sob o crescimento de coleótilos de trigo, onde a fração 2L foi selecionada para fracionamentos subsequentes por apresentar atividade inibitória e massa suficiente para prosseguir o subfracionamento. Assim, foram originadas as subfrações 2L1, 2L2, 2L3 e 2L4, das quais também foram testadas por meio do bioensaio com coleótilos de trigo. O método de extração líquido-líquido mostrou-se mais eficiente, originando maior rendimento total comparado ao método de extração eluotrópica. Assim como no método de extração eluotrópica, tanto o extrato bruto 2 como as frações e subfrações deste originadas, mostraram atividade inibitória nos biotestes com

coleóptilos de trigo, mostrando-se desta forma, fitotóxicas e promissoras na busca por compostos bioativos.

Palavras-chave: atividade fitotóxica, coleóptilos, extratos, germinação, metaxilema, *Triticum aestivum*.

ABSTRACT – Researchs on the savanna species have shown that plant extracts have phytotoxic activity in the development and target plant growth. Considering this, the aim of this study was to evaluate the phytotoxic activity of *P. rotundifolia* leaf extracts obtained using liquid-liquid extraction and compare it with the eluotropic extraction. To this, the crude extracts were tested on the growth of wheat coleoptile (*Triticum aestivum* L.), on germination and growth of seedlings of invasive and target species grass colônião (*Megathyrsus maximus* J.), wild poinsettia (*Euphorbia Heterophylla* L.) and vegetables, onion (*Allium cepa* L.), sesame (*Sesamum indicum* L.) and also under the cell root growth metaxylem sesame seedlings. The crude extract was prepared from 100g *P. rotundifolia* leaf powder, subjected to extraction with 600 ml of a mixture dichloromethane / methanol (1:1), after dried was diluted in 600 mL MeOH solution / distilled H₂O (95:5) and partitioned with 600 mL of hexane. Thus originated the crude extracts 1 (hexane). 2 (ethyl acetate) and 3 (aqueous). By presenting inhibitory activity in bioassays wheat coleoptile, growth and germination of seedlings and evaluation metaxylem cells, the extract 2 was selected to be fractionated. After this, 14 fractions were joined by chromatographic similarities, and after tested by wheat coleoptile growth bioassay, where the 2L fraction was selected for subsequent fractionation by having inhibitory activity and enough mass to continue subfractioning. Thus, 2L1 subfractions were derived 2L2, 2L3 and 2L4, which were also tested using wheat coleoptile bioassay. The method of liquid-liquid extraction was more efficient, resulting in higher throughput compared to eluotropic extraction method. As in eluotropic extraction method, both the crude extract 2 as fractions and subfractions of this originated, showed inhibitory activity in bioassays with wheat coleoptile, showing in this way that they are phytotoxic and promising in the search for bioactive compounds.

Keywords: coleoptile, extracts, germination, metaxylem, phytotoxic activity, *Triticum aestivum*.

1. Introdução

As plantas sintetizam um vasto número de metabólitos secundários, assim denominados por não estarem diretamente envolvidos em processos primários básicos do seu crescimento e desenvolvimento. Muitos destes produtos naturais desempenham um papel importante na interação das plantas com o meio ambiente e, em particular, com o seu ambiente biótico, onde eles podem atuar como atrativos para polinizadores ou dispersores de sementes, na defesa contra inimigos naturais, ou como aleloquímicos na interferência com outras plantas (Kroymann, 2011). A produção de metabólitos secundários pode variar entre espécies, órgão da planta, estágio de desenvolvimento e é fortemente influenciada por fatores ambientais (Gobbo- Neto & Neto, 2007). Em plantas, as folhas e raízes constituem-se na maior fonte de aleloquímicos (Wu et al., 2009). No entanto, devido à especificidade de produzir metabólitos que são exsudados diretamente no ambiente, muitos compostos com atividades biológicas relevantes têm sido localizados quase de maneira exclusiva em raízes (Oliveros-Bastidas et al., 2009). As plantas daninhas exibem grande adaptabilidade em diferentes ambientes, aproveitam as condições favoráveis ocorrentes nos sistemas agrícolas e competem com as plantas cultivadas. O uso intensivo de agroquímicos sintéticos tem contribuído para o aumento da resistência de plantas daninhas, além de conduzir a problemas de saúde e contaminação dos recursos naturais (Verdeguer et al., 2011). A principal ferramenta empregada no controle dessas espécies é o uso de herbicidas sintéticos, com consequente ocorrência de impactos ambientais e seleção de biótipos resistentes a algumas moléculas convencionalmente utilizadas (Batish et al., 2007; Hagemann et al., 2010; Grisi et al., 2013). O controle químico é o método mais amplamente empregado, em decorrência da sua alta eficiência e praticidade (Panozzo et al., 2014). A solução para o país está na

conversão do modelo agroquímico para um modelo de base agroecológica (Carneiro e Almeida 2010). Os compostos do metabolismo secundário vegetal podem ser utilizados como herbicidas naturais, uma vez que inibem o crescimento de plântulas de espécies daninhas, atuando também em nível celular (Grisi et al., 2013). Atualmente existem alguns herbicidas naturais sendo comercializados, como os bilafanos, ácido pelargônico, glúten de milho, óleo de cravo e 2-Phenethyl-propinato (Copping e Duke, 2007), estes apresentam vantagens em relação aos herbicidas sintéticos pois não causam danos ambientais (Souza-Filho et al., 2006), não apresentam moléculas halogenadas e possuem meia vida menor (Duke et al., 2000; Rimando e Duke, 2006).

O Brasil possui uma abundante riqueza de espécies vegetais, tornando-se uma fonte inesgotável de exploração na procura por novos compostos bioativos em sua flora nativa, sendo o bioma cerrado uma de suas mais extensas formações vegetais, com uma área total de 204,7 milhões de hectares (Oliveira, 2009; Sano et al., 2010). Recentes estudos indicam que a flora do cerrado apresenta uma elevada riqueza de espécies, com plantas herbáceas, arbustivas, arbóreas e cipós, totalizando 12.356 espécies que ocorrem espontaneamente e uma flora vascular nativa (pteridófitas e fanerógamas) somando 11.627 espécies (Mendonça et al., 2008). Com relação à riqueza, essa flora deve ser superada apenas pelas florestas amazônicas e pela Mata Atlântica. Recentemente têm sido realizados diversos estudos de importância médica utilizando extratos de plantas da família *Asteraceae*. Uma recente pesquisa analisou o potencial de extratos aquosos e etanólicos de espécies da família *Asteraceae* contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, no qual verificou-se uma alta eficiência da atividade antimicrobiana de extratos etanólicos, principalmente contra bactérias Gram positivas. No geral, os extratos etanólicos exibiram melhor resposta antimicrobiana, comparado a extratos aquosos (O. Kenny et al, 2014). A presença de compostos de açúcares e glicose em extratos aquosos

é a mais provável causa para a falta de significância de atividade antimicrobiana nestes extratos, já que agem como uma fonte de alimentação, promovendo proliferação celular bacteriana (An et al., 2004).

Em outro estudo de com uma espécie da família *Compositae*, L-J. Seow (2014) observou que extratos metanólicos exibiram ótima atividade antioxidante que é associada com o total conteúdo fenólico e de flavonóides. Neste estudo o extrato metanólico de folhas de *G. segetum* inibiu de forma eficiente a formação de tecido de granuloma em ratos (Seow L-J. et al. 2014).

O gênero *Piptocarpha* pertence à subtribo *Piptocarphinae*, tribo *Vernonieae* e subfamília *Cichorioideae* (Bremer 1994; Robinson 1999). É um gênero neotropical que abriga aproximadamente 50 espécies escandentes e árvores, o qual se estende do sul do Brasil e norte da Argentina para América Central (Robinson 2002). A subtribo *Piptocarphinae* é caracterizada pelo estilete com tricomas de ápice truncado, enquanto que outras *Vernonieae* apresentam estilete com tricomas de ápice agudo (Bremer 1994). Segundo Robinson (1999), a característica mais importante para a subtribo são as brácteas involucrais internas caducas associadas com poucas flores no capítulo.

A distribuição de *Piptocarpha* está concentrado nas regiões sul e leste do Brasil, mas centros secundários são as florestas do norte e centro da América do Sul (Smith 1981; 1982). As espécies arbóreas apresentam grande distribuição nos planaltos do sul do Brasil, mas *Piptocarpha rotundifolia* (Less.) Baker, árvore comum do cerrado do Brasil Central, é uma exceção (Smith 1981).

Assim, devido à falta de trabalhos envolvendo o estudo da fitotoxicidade dos extratos de *P. rotundifolia*, objetivou-se neste, analisar o potencial fitotóxico de extratos, frações e subfrações de folhas adultas desta espécie, obtidas com a metodologia de

extração líquido-líquido, comparando essa fitotoxicidade com a registrada com os produtos da extração eluotrópica.

2. Materiais e Métodos

2.1. Coleta e processamento do material vegetal.

O material vegetal utilizado foi constituído por folhas adultas de *Piptocarpha rotundifolia* (Less.) Baker. As folhas foram coletadas no período de novembro de 2013, na área de reserva de cerrado sensu stricto pertencente ao campus da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), localizado na cidade de São Carlos, estado de São Paulo (21° 58' a 22° 00' S e 47° 51' a 47° 52' W) (Figura 1). Foi depositada uma exsicata no Herbário da Universidade Federal de São Carlos (HUFSCar).



Figura 1. Vista aérea da UFSCar com a área de cerrado identificada (Fonte: Google Maps , 2016– modificado).

Após realizar uma triagem do material vegetal, onde foram selecionadas apenas as folhas adultas em bom estado e livres de fungos ou estragadas, estas foram lavadas, secas em estufa de circulação forçada de ar a 40°C durante 72 h e trituradas em moinho elétrico. O pó resultante foi pesado e embalado a vácuo, sendo mantido sob refrigeração (aproximadamente 5°C) e então utilizado para a obtenção dos extratos e frações das folhas adultas de *Piptocarpha rotundifolia*.

2.2. Preparação dos Extratos

Neste tipo de extração, foram utilizados 100g de pó de folhas de *P. rotundifolia*. Este pó foi submetido à extração com 600 mL da mescla Diclorometano/Metanol (1:1) em banho de ultrassom por 30 minutos. Depois, a mistura foi filtrada à vácuo para obtenção do extrato bruto. Este processo foi repetido 6 vezes, utilizando-se o mesmo pó de folhas, até que o filtrado exibisse uma cor mais clara no final da extração, em comparação com o início desta. O extrato bruto foi seco e depois diluído em 600 mL de solução MeOH/H₂O destilada (95:5) e particionado em funil de separação com 600 mL de hexano. Com as mesclas dentro do funil tampado, o mesmo foi agitado em movimentos de rotação por 3 vezes, a fim de que os solventes se misturassem o suficiente para garantir uma extração eficiente. Assim, após a separação das frações no funil, originaram-se os extratos hexânico (1) e metanólico-aquoso (Figura 2). Por fim, o extrato metanólico-aquoso foi seco em rotavapor, ressuspendido em 600mL água destilada e particionado com 600mL AcoEt, dando origem aos extratos acetato etílico (2) e aquoso (3) (Otsuka, 2005).



Figura 2. Funil de separação contendo frações visivelmente particionadas (Raíssa Accarini, arquivo pessoal).

Após calculados os rendimentos, feito o teste de coleótilos de trigo com os extratos 1, 2 e 3, o extrato acetato etílico (2) foi selecionado para prosseguir os futuros experimentos por ter apresentado uma boa atividade de inibição no referido bioensaio.

O extrato 2 foi solubilizado com quantidade mínima de acetato de etila, e a ele foi acrescentado sílica gel de fase normal (procedimento idêntico ao realizado com o extrato D). Esta sílica contendo o extrato foi utilizado como cabeça seca para a realização de fracionamento em coluna contendo sílica de fase normal como fase estacionária. As frações seguintes foram novamente fracionadas desta mesma forma.

2.3. Bioensaio de crescimento de coleótilos de trigo (*Triticum aestivum L.*).

Sementes de trigo (*Triticum aestivum* L. cv.'BRS264') foram germinadas no escuro a 25°C, durante 72h em caixas plásticas forradas com duas folhas de papel filtro embebidas com água destilada para a obtenção das plântulas (Hancock et al., 1964). De cada coleóptilo descartou-se os 2 mm apicais e os próximos 4 mm foram cortados e utilizados no bioensaio. Todo este processo foi realizado sob luz verde de segurança (Nitsch & Nitsch, 1956). As soluções foram preparadas a partir de 10 mg de cada fração ou subfração, pré-solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO, 5 $\mu\text{L mL}^{-1}$) e diluídas em solução tampão (pH = 5,6) contendo ácido cítrico monohidratado (1,05 g/L), hidrogenofosfato de potássio tri-hidratado (2,9 g/L) e 2% de sacarose, nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8 mg mL^{-1} . Em tubos de ensaio foram adicionados 2 mL das respectivas soluções, contendo cinco coleóptilos de trigo. Dois controles foram realizados, um negativo com solução tampão e DMSO (5 $\mu\text{L/mL}^{-1}$) e outro positivo com o herbicida Goal® (240 $\mu\text{L/mL}^{-1}$) solubilizado em solução tampão e DMSO (5 $\mu\text{L/mL}$), nas mesmas concentrações avaliadas para as frações. Foram utilizadas três repetições para cada tratamento e para cada concentração. Esses tubos foram mantidos a 25 °C no escuro e sob constante rotação (1,2 Hz) (Macías et al., 2010). Após 24 h, os coleóptilos retirados dos tubos de ensaio, organizados em uma planilha devidamente identificada (Figura 3), e então foram medidos com auxílio do programa ImageJ.

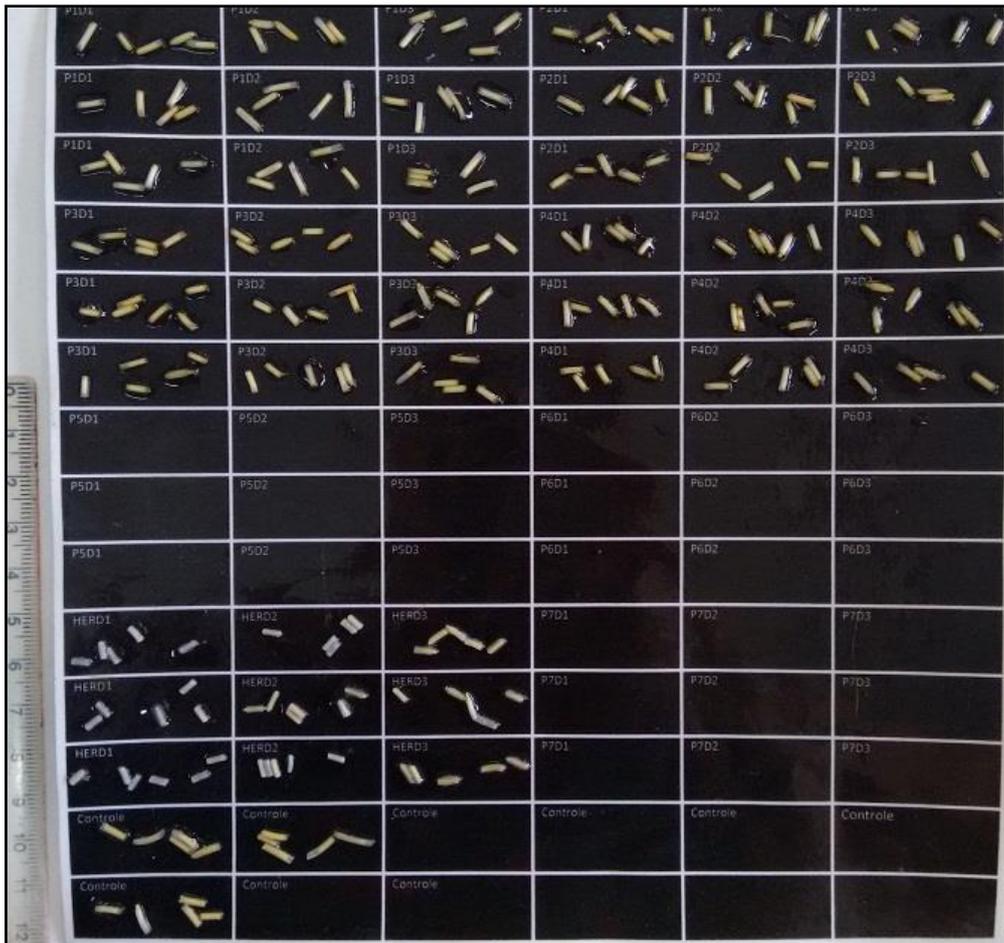


Figura 3: Coleóptilos de trigo após a realização do bioensaio, organizados em planilha a serem fotografados para posterior medição. (Raíssa Accarini, arquivo pessoal).

2.4. Bioensaio de germinação e crescimento de plântulas

Foram utilizadas como espécies alvo duas hortaliças (cebola (*Allium cepa* L.) e gergelim (*Sesamum indicum* L.), que, por serem geneticamente melhoradas apresentam respostas mais homogêneas aos extratos e, dessa forma, indicam se os bioensaios estão sendo conduzidos de forma adequada. Além disso, foram selecionadas duas invasoras: uma de culturas de soja, o amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla* L.) e outra de cana-de-açúcar capim-colômbio (*Megathyrus maximus* Jacq.) e, que apresentam resistências a herbicidas comerciais (Kissmann, 1997; Trezzi et al., 2009). Os extratos foram diluídos em solução tampão (pH = 5,6) contendo ácido cítrico monohidratado (1,05 g/L) e hidrogenofosfato de potássio tri-hidratado (2,9 g/L) nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8

mg.mL⁻¹. Para este bioensaio também foram utilizados dois controles, iguais aos citados no item anterior. Estes bioensaios foram conduzidos em caixas plásticas transparentes (12,6x7,9x3,7cm), contendo duas folhas de papel filtro ao fundo, umedecidas com 6 mL das soluções controle negativo e positivo ou com as soluções dos extratos brutos. Cada caixa recebeu 20 sementes das espécies-alvo e foram feitas quatro repetições para cada tratamento. As caixas foram tampadas colocadas em câmaras de germinação do tipo B.O.D. a 25°C sob fotoperíodo de 12h luz / 12h escuro (Anese et al., 2014 modificado). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. As leituras foram realizadas a cada 12h durante os três primeiros dias e, em intervalos de leituras a cada 24h até a germinação ser nula por duas leituras consecutivas. Foi adotado a protrusão de no mínimo 2mm de raiz primária e gravitropismo positivo como critério de germinação (Brasil, 2009).

Foram avaliados a porcentagem de germinação, a velocidade de germinação e sincronia (Ranal & Santana, 2006).

O bioensaio de crescimento foi conduzido da mesma forma que o bioensaio de germinação, porém após completados sete dias em câmara B.O.D., as plântulas permaneceram em congelador por 24h e, em seguida foram dispostas em uma folha de papel milimetrado, e fotografadas com o auxílio do programa ImageJ. Além disso, as plântulas foram classificadas em normais e anormais de acordo com as especificações das Regras de Análises de Sementes (Brasil, 2009).

2.5. Bioensaio de crescimento de células do metaxilema de gergelim (*Sesamum indicum* L.)

Os extratos brutos (A, B, C, D e E) foram submetidos ao bioensaio que avalia o crescimento de células do metaxilema de gergelim que cresceram em contato com estas

frações. Raízes obtidas de plântulas crescidas nos extratos citados acima, no controle negativo e positivo, e mantidas nas mesmas condições do bioensaio de crescimento e germinação (Item 2.5) compuseram o material anatômico utilizado. Decorridos sete dias as plântulas de gergelim foram retiradas das caixas e com o auxílio de um estilete foi separado um segmento da raiz primária e colocado em álcool 70%. A coloração do material vegetal foi feita a partir do método Fuchs modificado (Kraus & Arduin 1997). As raízes foram imersas em álcool (70%) durante sete dias, lavadas com água destilada e mantidas em solução de hidróxido de sódio 25%, em estufa a 40°C por 48 h. Em seguida, o material vegetal foi corado com o corante Lacmóide a 25%, durante 24 h em temperatura ambiente, e lavados. O material vegetal foi então depositado em lâminas de vidro com xarope de Apathy e lamínula, sendo deixadas de repouso por sete dias para a secagem. A observação foi feita em microscópio óptico (Olympus-BX41) acoplado com câmara fotográfica (Sony CCD-IRIS). Foram utilizadas quatro raízes primárias provenientes de plântulas de gergelim crescidas em soluções controles negativo e positivo, e com os extratos mencionados para este bioensaio. De cada raiz foi fotografado 50% de seu comprimento total, partindo da região central em direção ao colo e o aumento utilizado foi de 20 vezes (Gatti, 2008). As medidas foram feitas utilizando-se o programa ImageJ.

2.6. Análise estatística

Os comprimentos dos fragmentos de coleóptilo de trigo e da parte aérea e raiz primária das plântulas das espécies-alvo foram calculados como porcentagem de inibição ou estímulo em relação ao controle negativo, sendo que os valores positivos representam estímulo e os valores negativos representam inibição (Novaes, et al., 2013). Os dados foram submetidos a um teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade (Levene).

Dados normais e homogêneos, foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey a 0,05 de significância. Para dados não normais ou não homogêneos foi utilizado o teste de Welch seguido do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

Todas as análises foram realizadas no programa estatístico PAST v.2.17c (Hammer. O, Harper D. A. T., 2013).

2.7. – Técnicas Cromatográficas

2.7.1. –Cromatografia em Coluna

Foram realizadas separações cromatograficas em coluna de vidro utilizando como fase estacionária, sílica gel para separações no modo normal (70 – 230 mesh). Os extratos e frações selecionados (2 e 2L), foram adsorvidas à forma estacionária, em uma camada, denominada de cabeça. Como fase móvel, foram utilizadas 12 misturas com os solventes hexano e acetona nas seguintes ordens e proporções: hexano (200 mL), Hx/Ace 9:1 (400 ml), Hx/Ace 8:2 (300 mL), Hx/Ace 7:3 (200 mL), Hx/Ace 6:4 (300 mL), Hx/Ace 1:1 (250 mL), Hx/Ace 4:6 (100 mL), Hx/Ace 3:7 (150 mL), Hx/Ace 2:8 (150 mL), Hx/Ace 1:9 (150 mL), Acetona (150 mL) e Metanol (150 mL); sendo este último para a limpeza dos possíveis resquícios de extrato que ficaram na sílica da coluna. O diâmetro da coluna de vidro utilizado foi proporcional à quantidade da amostra a ser fracionada. A cada fracionamento houve reunião por similaridade de compostos, utilizando a CDC (Ghisalberti, 2008).

Ao final do fracionamento obteve-se um total de 28 frações, que foram recolhidos e secos em capela e analisados por cromatografia de camada delgada para junção dos extratos similares, e calculados os rendimentos. As junções originaram um total de 14 frações (2A ao 2N). A fração mais fitotóxica no bioensaio de coleóptilos (2L), foi

refracionada em coluna de fase normal “baby”, pelo fato da fração a ser utilizada apresentar pouca massa, sendo assim desnecessário seu fracionamento em coluna de vidro de maior tamanho. As misturas de solvente utilizadas como fase móvel na coluna foram as mesmas citadas anteriormente. Nesta última coluna, as subfrações secas e reunidas por similaridade cromatográfica utilizando CCD, deram origem as subfrações 2L1, 2L2, 2L3 e 2L4, conforme indicado no fluxograma da Figura 4.

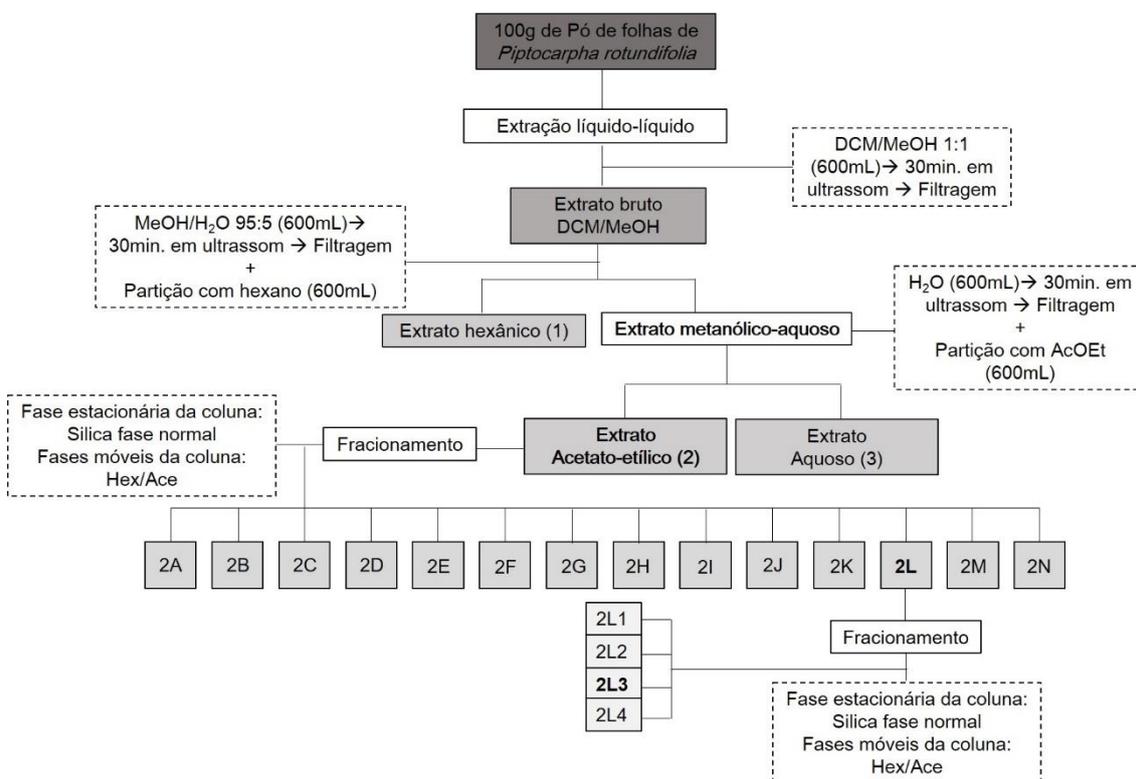


Figura 4. Fluxograma da obtenção de frações obtidas de extratos foliares de *Piptocarpha rotundifolia* utilizando-se a extração líquido-líquido de feitos em sequência.

2.7.2. - Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Esta técnica foi realizada mediante a diferença entre as forças de adesão das moléculas dos componentes, a uma fase móvel (solvente) e, a uma fase estacionária (placa de sílica de fase normal ou reversa). O desenvolvimento cromatográfico se procedeu de forma ascendente e unidimensional, em placas simples de sílica (4,0 x 5,0 cm) e com as mesclas de solventes orgânicos. Cada cromatoplaça (placa de sílica com as substâncias

separadas) foi observada sob luz ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm e revelada com Oleum (solução de 10 mL de ácido sulfúrico e 200 mL de ácido acético dissolvidos em 40 mL de água destilada) e posteriormente aquecidos a 150 °C (Ghisalberti, 2008). Após secas, as cromatoplasmas foram fotografadas para fixação dos pontos e suas respectivas cores que aparecem após a revelação. Esta técnica foi empregada sempre ao final de cada extração, fracionamento e subfracionamentos para avaliar o perfil de compostos presentes ou, reunir de acordo com similaridade de polaridade.

3. Resultados

3.1. Rendimento dos extratos brutos

Os rendimentos referentes aos extratos submetidos a fracionamentos da metodologia de extração líquido-líquido encontram-se na Tabela 1.

A metodologia de extração líquido-líquido apresentou maior rendimento total, comparado ao processo de extração em ordem eluotrópica, porém neste caso, o maior rendimento foi obtido para o extrato bruto hexânico (1), sendo este valor igual a 10,49%.

Tabela 1.- Rendimento¹ (mg e %) dos extratos brutos de folhas de *P. rotundifolia* obtidos por extração eluotrópica e por extração líquido-líquido.

Extratos						
Extração em série eluotrópica						
	A	B	C	D	E	TOTAL
Rendimento	3630 (2,42%)	1970 (1,31%)	630 (0,42%)	2370 (1,58%)	4660 (3,10%)	13260 (8,83%)
Extração Líquido-líquido						
	1	2	3	TOTAL		
Rendimento	1049 (10,49%)	970 (0,97%)	570 (0,57%)	1203 (12,03%)		

¹Percentual relativo à massa de pó de folhas utilizada na extração

3.2. Bioensaio de crescimento de coleótilos de trigo (*Triticum aestivum* L.).

Os extratos 1 (hexânico), 2 (acetato etílico) e 3 (aquoso) foram testados no bioensaio com coleótilos de trigo, e seus resultados encontram-se na Figura 5.

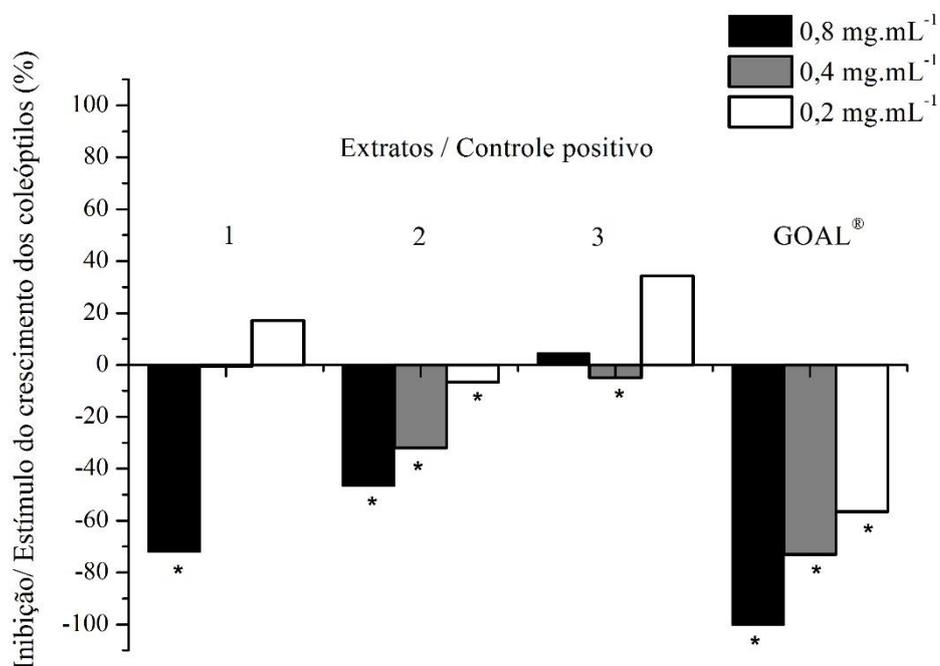


Figura 5.: Efeito dos extratos brutos de folhas jovens *Piptocarpha rotundifolia*, oriundos de extração líquido-líquido, sobre o comprimento de coleótilos de trigo (*Triticum aestivum*). (*) indica tratamento que apresenta diferença significativa quando comparado com o controle negativo. O controle negativo corresponde à solução tampão com DMSO.

O maior percentual de inibição (72%) foi observado em coleótilos tratados com o extrato hexânico (1) em sua maior concentração. Porém, o extrato acetato etílico (2) produziu uma relação dose-dependente, inibindo o crescimento dos coleótilos e apresentando-se estatisticamente diferente do controle negativo em todas suas concentrações. Sendo assim, foi o extrato escolhido para a sequência dos experimentos.

3.3. Bioensaio de germinação e crescimento de plântulas

Os extratos hexânico (2), acetato etílico (2) e aquoso (3), também foram utilizados nos biotestes de germinação e crescimento de plântulas, da mesma forma como os

extratos da primeira metodologia de extração empregada (eluotrópica). Tais resultados e resultados estão apresentados na Figura 6.

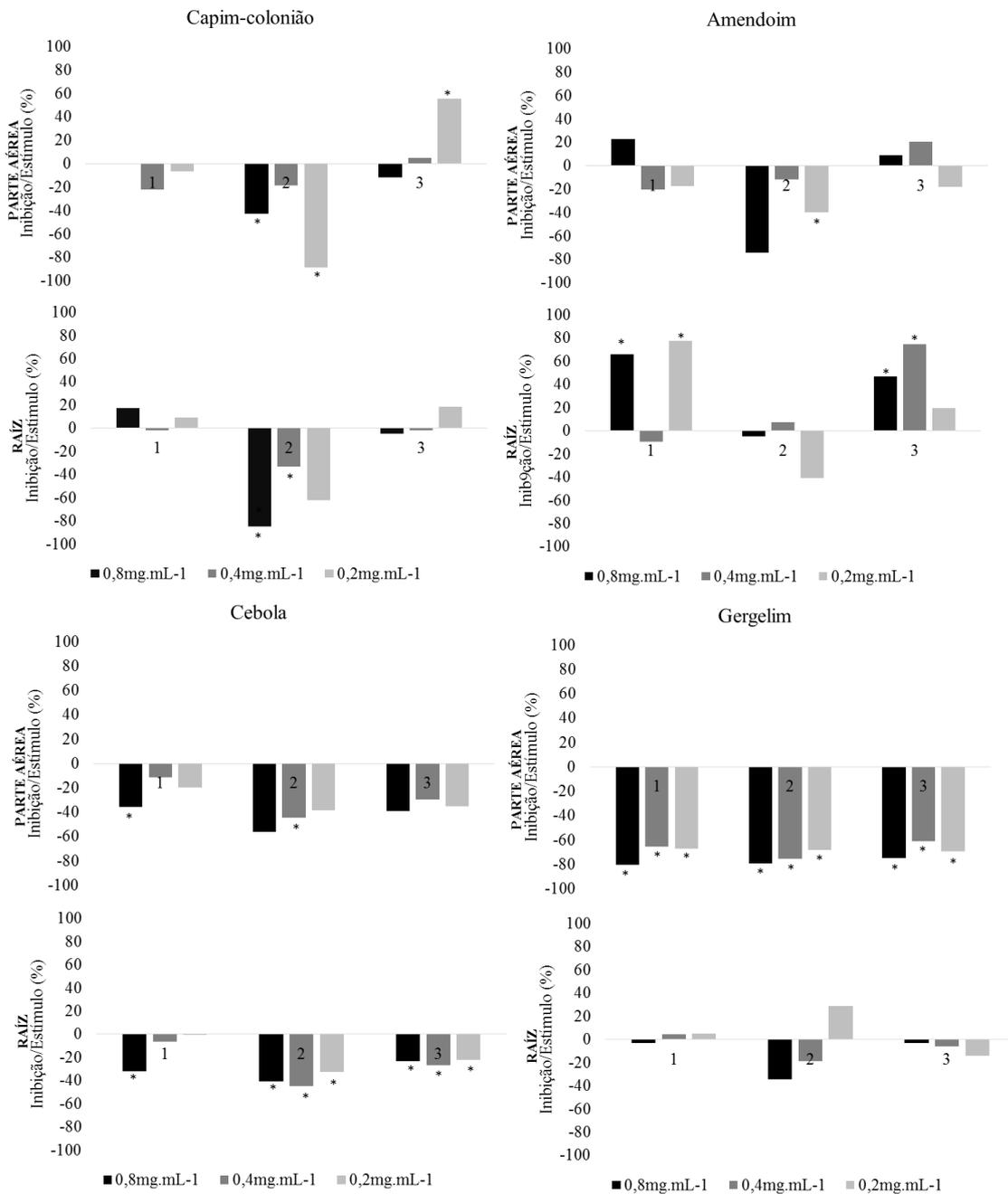


Figura 6. Efeito dos extratos brutos referentes à extração líquido-líquido, de folhas adultas de *Piptocarpha rotundifolia* sobre o crescimento inicial de plântulas de amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*), capim-colonião (*Megathyrsus maximus*), cebola (*Allium cepa*) e gergelim (*Sesamum indicum*) em diferentes concentrações. (*) indicam os extratos nas concentrações que apresentaram diferença significativa quando comparado com o controle negativo (Solução tampão com DMSO).

O extrato acetato-etílico (2) foi o que produziu maior efeito inibitório em todas as espécies-alvo (tanto as invasoras como as de hortaliças), sendo que o maior valor atingiu um percentual 88,8% de inibição, em sua menor concentração, nas partes aéreas de capim-colonião. Porém, as partes aéreas de gergelim foram as que se mostraram, para todos os extratos testados, as mais afetadas negativamente, onde todos extratos, em todas suas concentrações, diferiram estatisticamente do controle negativo. Resultado semelhante ocorreu para esta mesma espécie, neste bioensaio feito com extratos oriundos de extração eluotrópica (item 3.4 do capítulo 1).

No geral, as partes aéreas das espécies indicadoras (gergelim e cebola), foram as que mais sofreram inibição, sendo os maiores valores encontrados nas partes aéreas de gergelim tratadas com o extrato 2 a $0,8 \text{ mg.mL}^{-1}$ (79,2%) e raízes de cebola tratadas com o mesmo extrato também na concentração de $0,8 \text{ mg.mL}^{-1}$ (56,1%). Por outro lado, nas raízes, os maiores percentuais de inibição ocorreram com as espécies de gergelim tratadas com o extrato 2 a $0,8 \text{ mg.mL}^{-1}$ (34,6%) e de cebola tratadas também com o extrato 2 a $0,4 \text{ mg.mL}^{-1}$ (44,7%). A espécie indicadora de monocotiledônea (cebola) foi a única a não apresentar estímulos no crescimento tanto de parte aérea como raiz, para todos os extratos testados e em todas suas concentrações, mostrando-se assim, a espécie mais sensível à estes.

De acordo com as Regras de Análises de sementes (Brasil 2009) as plântulas anormais são aquelas que não apresentam potencial para continuar o seu desenvolvimento. Baseando-se neste conceito, da mesma forma como ocorreu com as plântulas tratadas com os extratos brutos, as plântulas submetidas ao bioensaio de crescimento e germinação com os extratos oriundos da extração líquido-líquido, também apresentaram anomalias (Figura 7). Foram observadas diversas anormalidades durante o

desenvolvimento inicial das plântulas, sendo estas: inversão gravitrópica, necrose de raízes e/ou de parte aérea, e atrofia.

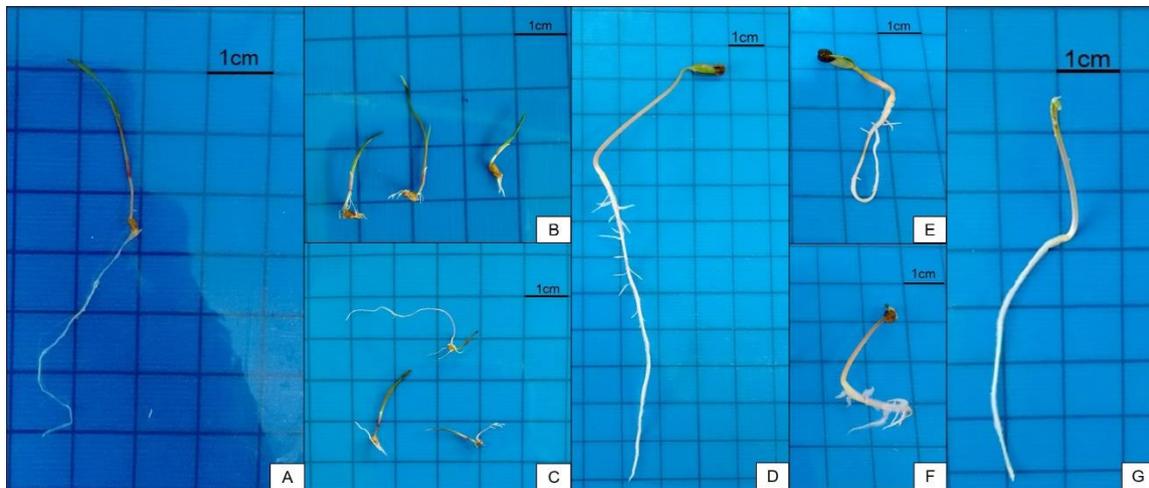


Figura 7. Anormalidades apresentadas pelas espécies-alvo tratadas com extrato de folhas de *P. rotundifolia*. Capim-colonião: A (controle negativo), B (atrofia e necrose de raiz), C (inversão gravitrópica). Amendoim-bravo: D (controle), E (inversão gravitrópica), F (necrose de raiz e atrofia de parte aérea) e G (atrofia severa de parte aérea).

As plântulas em contato com o extrato aceto etílico (2) foram visualmente mais afetadas, apresentando maior porcentagem de raízes necrosadas ou plântulas mortas.

A maior parte das plântulas de todas espécies-alvo expostas ao controle positivo (GOAL®), apresentaram anomalias (necroses) e perderam a viabilidade, não sendo assim possível realizar as medições de suas partes aéreas e raízes. Valores de porcentagem de cada uma destas anormalidades podem ser melhor visualizadas na imagem abaixo (Figura 8).

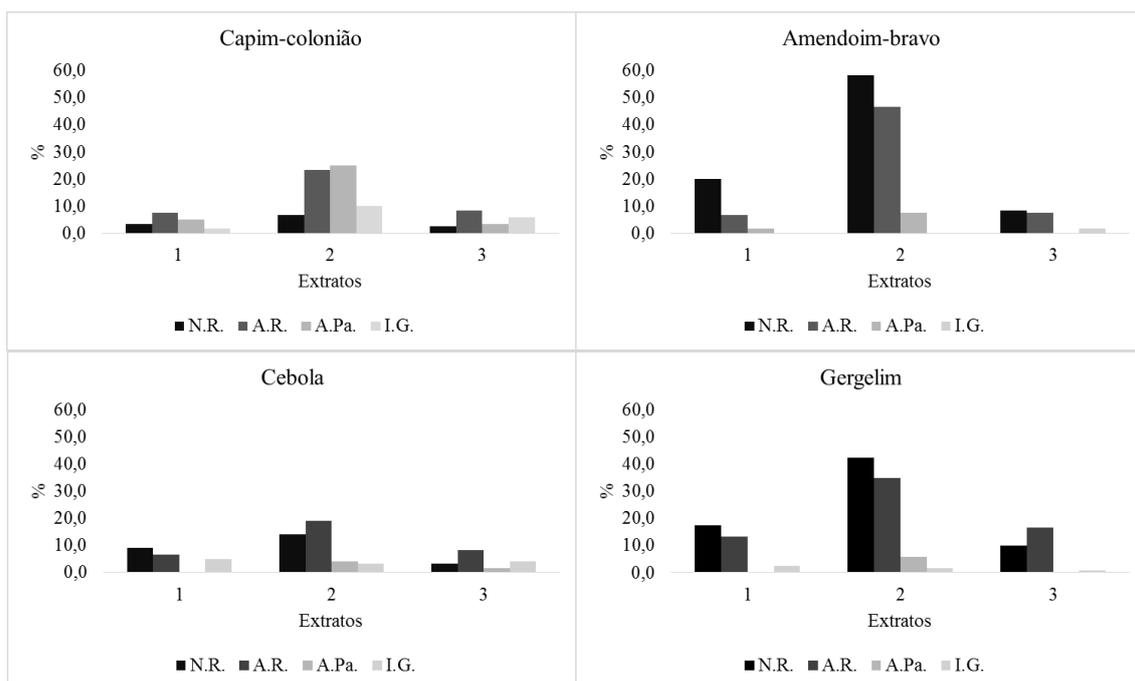


Figura 8.: Valores de porcentagem de anomalias verificadas em plântulas de capim-colonião, amendoim-bravo, cebola e gergelim, tratadas com extratos brutos oriundos de extração líquido-líquido, sendo estas anomalias: N.R. (necrose de raiz), A.R. (atrofia de raiz), A.Pa. (atrofia de parte aérea) e I.G. (inversão gravitropica).

O extrato acetato etílico (2), foi o que afetou mais negativamente todas as espécies-alvo. As anormalidades como necrose e atrofia de raiz foram mais incidentes nas espécies de eudicotiledôneas (amendoim-bravo e gergelim), onde os maiores percentuais atingiram valores de 58,2% e 46,6% para necrose e atrofia de raiz respectivamente, ambas em plântulas de amendoim-bravo tratadas com o extrato acetato etílico (2). A espécie com menores percentuais de anormalidades foi a cebola, em que o maior percentual atingiu o valor de 19,2% para atrofia de raiz, que ocorreu nestas plântulas tratadas também com o extrato 2.

Assim, como também ocorreu com as plântulas tratadas com os extratos brutos obtidos através de extração eluotrópica, pode ser verificado que estas seguiram um mesmo padrão, onde maiores incidências de anormalidades foram observadas em espécies de eudicotiledôneas, e a cebola foi a espécie menos afetada.

3.4. Bioensaio de crescimento de células do metaxilema de gergelim (*Sesamum indicum* L.)

Todos os extratos (hexânico (1), acetato-etílico (2) e aquoso (3)) foram utilizados no bioensaio de crescimento de células do metaxilema radicular de quem, para verificar se esta redução ocorria a partir de alterações a nível celular. Foi observada uma diminuição significativa do comprimento das células do metaxilema tratadas com os extratos 1 e 2 em relação ao controle e esta redução ocorreu de maneira dose-dependente (Tabela 2).

Tabela 2.: Médias (μm) das células do metaxilema de plântulas de gergelim tratadas com os extratos brutos de folhas de *P. rotundifolia*, oriundos de extração líquido-líquido, em diferentes concentrações.

Extrato	Concentrações		
	0,2mg.mL ⁻¹	0,4mg.mL ⁻¹	0,8mg.mL ⁻¹
Hexânico (1)	134,99*	124,89*	111,73*
Acetato etílico (2)	186,28	148,13	100,64*
Aquoso (3)	121,56*	123,08*	151,30
Controle		173,4	

*: Diferem estatisticamente do controle negativo

O extrato acetato etílico, em sua maior concentração foi o que mais inibiu o crescimento das células do metaxilema e, pode ser claramente visualizado na imagem abaixo (Figura 9). As células apresentaram um padrão de inibição dose-dependentes.

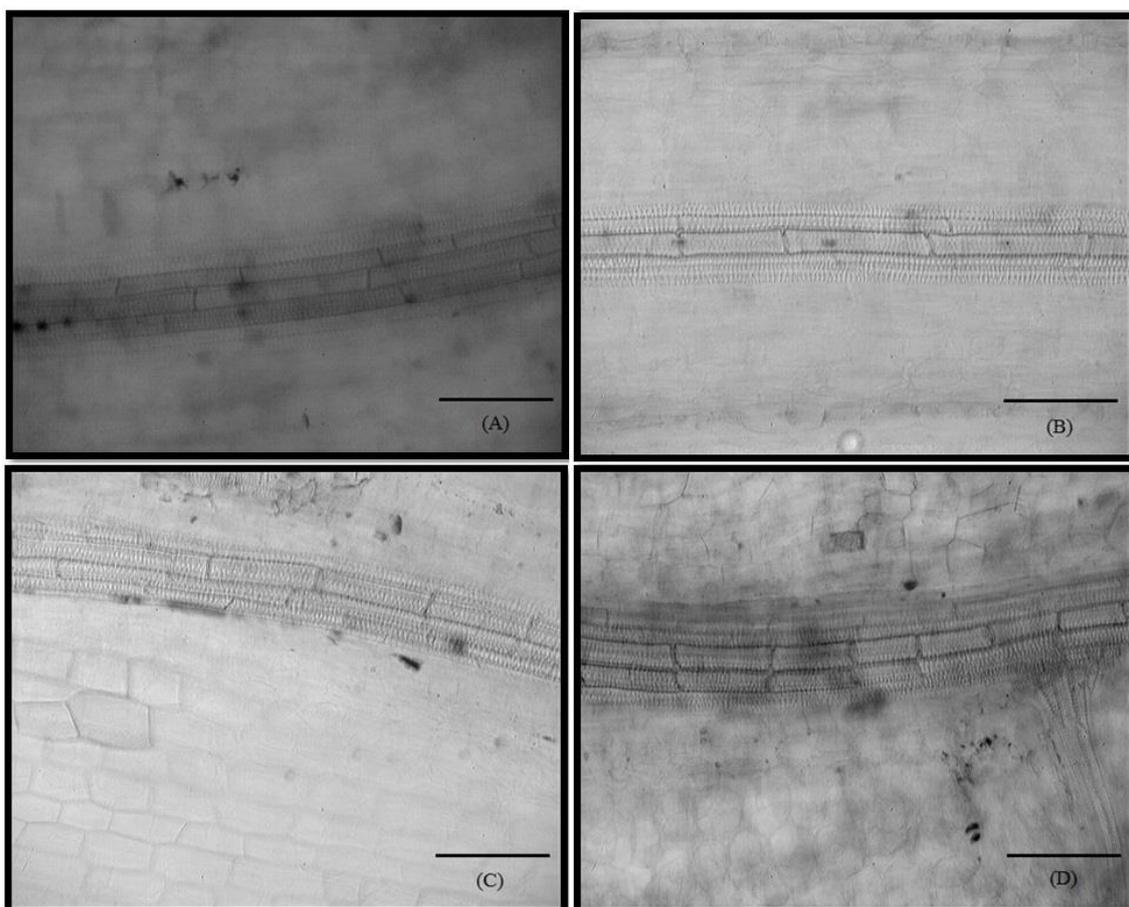


Figura 9: Fotomicrografia de células do metaxilema radicular de plântulas de gergelim tratadas com o extrato (acetato-etílico (2): (A) controle, (B) 0.2mg.mL^{-1} , (C) 0.4mg.mL^{-1} e (D) 0.8mg.mL^{-1} . Escala: $50\mu\text{m}$.

Da mesma forma como ocorreu com as outras espécies-alvo, as plântulas de gergelim apresentavam-se necrosadas em suas raízes, impossibilitando realizar com estas, a análise das células das raízes do metaxilema.

3.5. Rendimento das frações e subfrações

Na Tabela 3 é possível verificar o rendimento (%) das frações e subfrações, obtidas a partir dos extratos brutos oriundos de extração líquido-líquido.

Tabela 3. Rendimento¹ referente aos fracionamentos do extrato metanólico-aquoso de folhas de *P. rotundifolia* obtido na extração líquido-líquido, e suas subfrações.

Extratos brutos					
	1	2	3	TOTAL	
Rendimento	10,49%	0,97%	0,57%	12,03%	
Frações					
	Σ 14 subfrações			TOTAL	
Rendimento	2A à 2N			1.49%	
Subfrações					
	2L1	2L2	2L3	2L4	TOTAL
Rendimento	0,026%	0,013%	0,158%	0,023%	0,22%

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

3.6. Bioensaio com coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum* L.) com frações e subfrações.

Com relação ao resultado de um segundo bioensaio realizado com coleóptilos de trigo, onde subfrações do extrato acetato etílico foram utilizadas está resumido na Figura 10.

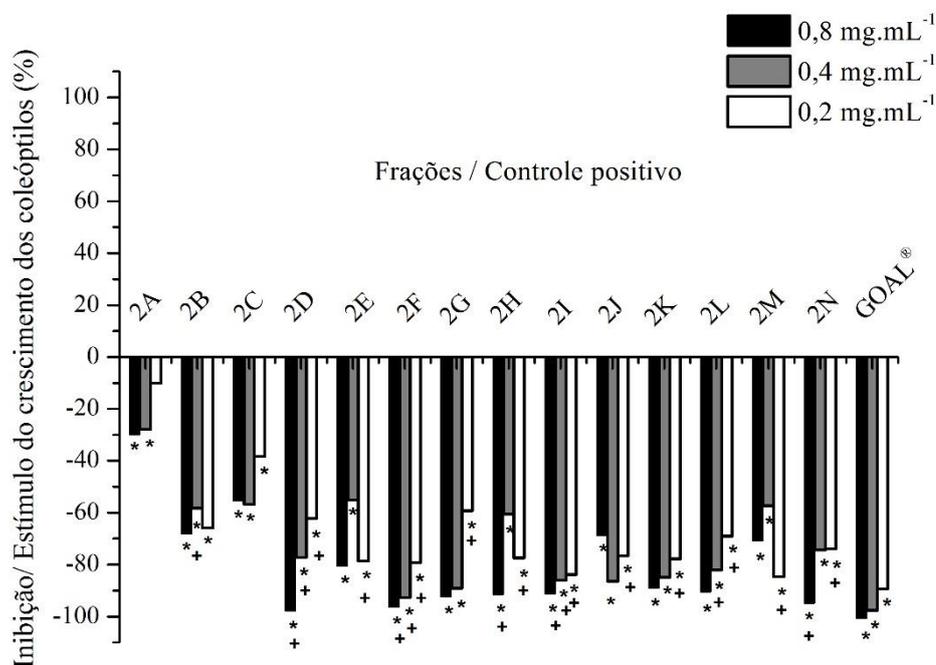


Figura 10. Efeito das frações do extrato acetato etílico (2) de folhas adultas *Piptocarpha rotundifolia* sobre o comprimento de coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum*). (*) indica tratamento que apresenta diferença significativa quando comparado com o controle

negativo. (+) indica tratamento com efeito igual ao do controle positivo na mesma concentração. O controle positivo corresponde às soluções com o herbicida Goal®, e o negativo à solução tampão com DMSO.

O maior percentual foi observado com o uso do extrato 2D na maior concentração, sendo este capaz de inibir em 97,6% o crescimento de coleóptilos de trigo. Dentre todas as frações provenientes do extrato acetato etílico que foram validas, a selecionada para sequência do fracionamento foi a 2L, que produziu resultados estatisticamente iguais ao controle positivo, nas concentrações a 0,2 e 0,4mg.mL⁻¹. Apenas a fração 2A em sua concentração mais baixa, não diferiu estatisticamente do controle negativo, porem todas frações testadas mostraram atividade inibitória no crescimento dos coleóptilos. Na Figura 11 estão os resultados do biotestes com coleóptilos realizado com as subfrações provenientes de 2L.

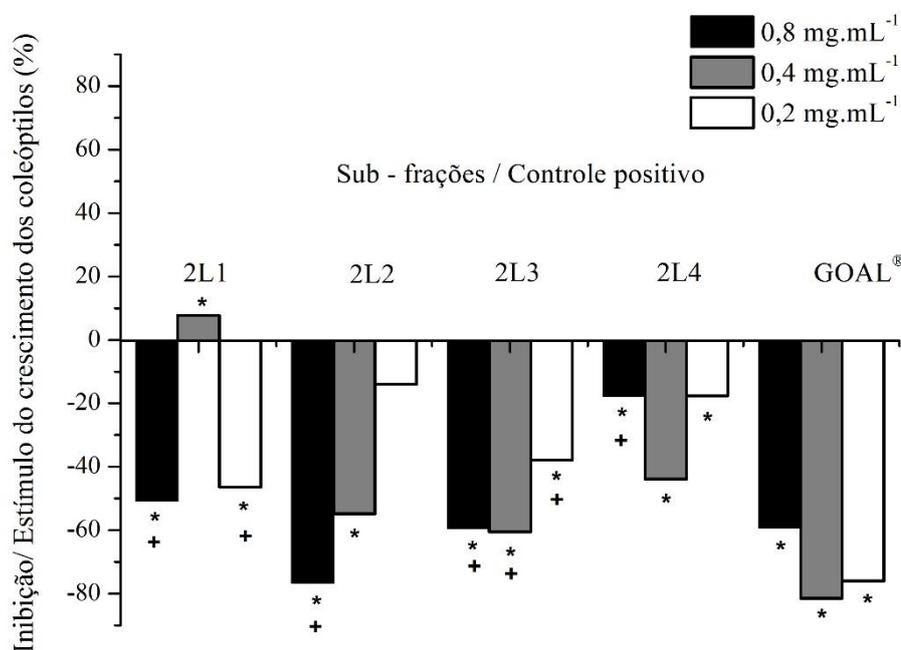


Figura 11: Efeito das subfrações referentes ao subfracionamento de 2L, originárias de folhas adultas *Piptocarpha rotundifolia* sobre o comprimento de coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum*). (*) indica tratamento que apresenta diferença significativa quando comparado com o controle negativo. (+) indica tratamento com efeito igual ao do controle

positivo na mesma concentração. O controle positivo corresponde às soluções com o herbicida Goal®, e o negativo à solução tampão com DMSO.

Sendo a fração 2L1 na concentração de $0,4\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a única a apresentar estímulo no crescimento dos coleóptilos, todos os outros produziram atividade inibitória, e, em particular, a fração 2L2 exibiu efeito inibitório dose – dependente. O maior valor de inibição foi de 76,5%, induzido pela fração 2L2 em sua maior concentração. Este, produziu efeito estatisticamente ao do herbicida GOAL® em sua mesma concentração.

Não houve diminuição da atividade de inibição ao longo dos fracionamentos até aqui realizados.

4. Discussão

O maior rendimento total apresentado pelos extratos oriundos da segunda metodologia de extração (líquido-líquido) pode ter ocorrido devido à afinidade de polaridade deste solvente com açúcares e produtos glicosilados presentes no pó de folhas (Vattuone et al., 2009). Com o uso dessa metodologia de extração espera-se encontrar substâncias de baixa polaridade no extrato hexânico. No extrato aquoso encontra-se substâncias com elevada polaridade, como açúcares. O solvente acetato-de-etila é comumente utilizado para obtenção de frações enriquecidas com compostos fenólicos (An et al., 2001; Imatomi et al., 2013), referidos na literatura como aleloquímicos potenciais (Li et al., 2010). Assim, como ocorreu nos bioensaios realizados com extratos provenientes de extração eluotrópica, o extrato acetato etílico proveniente de extração líquido-líquido foi o que mais inibiu tanto o crescimento dos coleóptilos, como as partes aéreas e raízes de plântulas das espécies alvo. Da mesma forma, as frações e subfrações do extrato acetato etílico (2) não perderam seus potenciais inibitórios no bioensaio de coleóptilos.

O bioensaio de trigo é uma das formas de se obter uma avaliação rápida do potencial fitotóxico dos produtos do metabolismo secundário do vegetal (Hancock et al. 1964). 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 destes que estavam presentes nas frações semi-purificadas (Dayan e Duke, 2006); porém tal efeito não foi observado nos bioensaios com coleótilos de trigo realizados neste trabalho.

A atividade estimulatória produzida pelo extrato aquoso (3) de folhas de *P. rotundifolia* no alongamento dos coleótilos de trigo pode ser explicada pela maior concentração de açúcares presente em tal extrato. Esse efeito estimulante pode ocorrer nos processos de crescimento vegetal como a divisão e alongamento celular dos tecidos vegetais da espécie alvo selecionada para o bioensaio (Aloni et. Al, 2006).

Dados de inibição similares aos obtidos no bioensaio de coleótilos com os extratos brutos, foram encontrados por Macías *et al.* (2004), em que frações e substâncias isoladas de *Helianthus annuus* também provocaram inibição no comprimento de coleótilos de trigo.

Da mesma forma como observado no bioteste de crescimento de plântulas, diferenças de sensibilidade entre espécies alvo são comuns em trabalhos verificando alelopatia (Ma et al., 2011; Grisi et al., 2012; Imatomi et al., 2013; Anese et al., 2014; Walsh et al., 2014) e podem ser explicadas pelo fato dos mecanismos de absorção, translocação e o local de ação das fitotoxinas variarem entre as espécies (Magiero et al., 2009). O presente trabalho verificou que as plântulas são mais sensíveis aos extratos vegetais do que os diásporos, e a raiz é a parte mais afetada da plântula, corroborando com outros trabalhos (Souza et al., 2010; Teerarak et al., 2012; Grisi et al., 2013; Reigosa et al., 2013, Anese et al., 2014). A diferença de sensibilidade pode ser resultado das

diferenças fisiológicas e bioquímicas das espécies-alvo utilizadas, sendo uma monocotiledônea (capim-colonião) e uma eudicotiledônea (amendoim-bravo), além do mais, diversos estudos mostram que o efeito negativo das substâncias químicas sobre as plantas daninhas é dependente da espécie (Prati e Bossdorf, 2004; Xuan et al., 2005; Sodaeizadeh et al., 2009).

As inibições promovidas sobre o desenvolvimento da raiz são um dos principais fatores que indicam sensibilidade da planta aos aleloquímicos (Souza Filho e Duarte, 2007), principalmente durante o desenvolvimento inicial da plântula, que é caracterizado por metabolismo elevado e sensibilidade ao estresse ambiental (Cruz-Ortega et al., 1998). A hiperalometria (comprimento da parte aérea > comprimento da raiz) é uma característica comum observada nos estudos de fitotoxicidade dos extratos vegetais, em que a raiz é o órgão mais afetado e com menor tamanho. Outros trabalhos utilizando extratos provenientes de plantas da família Asteraceae também inibiram o crescimento de plântulas de espécies alvo. Por exemplo, Belinelo et al., 2008 testaram extratos obtidos de *Arctium minus*, que apresentaram atividade alelopática inibitória sobre a germinação e o crescimento radicular de sorgo.

A redução no crescimento das plântulas de amendoim-bravo tratadas com as frações de *P. rotundifolia* pode ser associada com a inibição do alongamento das células do metaxilema, sugerindo provável interferência dos aleloquímicos no equilíbrio hormonal (Gatti et al., 2010). Estudos recentes revelaram que os fitormônios desempenham um papel importante no controle da divisão celular, no crescimento celular e na diferenciação celular em zonas distintas das raízes (Takatsuka e Umeda, 2014). A auxina pode ser considerada um importante sinal vegetal de curta a longa distância, capaz de controlar vários processos de desenvolvimento, incluindo a padronização do

desenvolvimento radicular (Friml et al., 2002; Petersson et al., 2009), a divisão celular e o alongamento das células nas raízes (Ding e Friml, 2010).

O efeito visível dos aleloquímicos sobre a germinação e o crescimento é somente uma sinalização secundária do que ocorreu inicialmente em nível molecular e celular (Ferreira e Áquila, 2000; Magiero et al., 2009). Dessa maneira, a redução no crescimento radicular das plântulas submetidas ao estresse dos extratos fitotóxicos pode estar associada com a diminuição no alongamento das células do metaxilema, fato observado no presente estudo com as plântulas de gergelim. Cruz-Ortega et al. (1998) também observaram que os extratos aquosos de *Sicyos deppei* G. Don condicionaram desorganização dos tecidos e falta de diferenciação celular nas raízes de feijão, evidenciados por alterações ultra-estruturais na membrana plasmática, parede vegetal, mitocôndrias, retículo endoplasmático e na divisão celular.

O herbicida comercial Goal® cujo principio ativo é o Oxifluorfem, foi utilizado nos bioensaios realizados e possui ação seletiva. Assim, controla um grupo de plantas daninhas, sendo ineficazes para outros grupos. É indicado no controle tanto de mono como eudicotiledôneas, em aplicações de pré-emergência ou pós-emergência inicial (Rodrigues e Almeida, 2011). Assim, este foi efetivo no controle das espécies-alvo utilizadas, inibindo o crescimento e germinação das plântulas, em todas concentrações testadas.

5. Conclusão

A metodologia de partição líquido-líquido mostrou-se mais eficiente no processo de extração quando comparada à extração eluotrópica, apresentando maior rendimento dos extratos. Porém, os extratos brutos oriundos de extração eluotrópica apresentaram maiores atividades inibitórias nos bioensaios realizados, e ambas frações e subfrações

(referentes às duas metodologias de extração) não perderam atividade conforme os fracionamentos. Ambos extratos acetato etílico (C e 2) foram os que apresentaram maiores atividades inibitórias nos bioensaios realizados. Assim, neste estudo, o extrato acetato etílico (2) mostra-se potencialmente promissor no estudo de seus compostos.

6. Referências

ALONI, R., ALONI, E., LANGHANS, M., ULLRICH, C.I. (2006) Role of cytokin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. **Annals of Botany** 97: 883-893.

AN, M.; HAIG, T.; PRATLEY, J. E. Phytotoxicity of *Vulpia* residues: II. Separation, identification and quantitation of allelochemicals from *Vulpia myuros*. *Journal Chemical Ecology*, v. 26, p.1465-1476, 2000.

BATISH, D.R.; ARORA, K.; SINGH, H.P.; KOHLI, R.K. Potential utilization of dried powder of *Tagetes minuta* as a natural herbicide for managing rice weeds. **Crop Protection**, v. 26, p. 566-571, 2007.

BELINELO, V. J.; CZEPAC M. P.; FILHO, S. A. V.; MENEZES L. F. T.; JAMAL, C. M. Alelopatia de *Arctium minus* Bernh (Asteraceae) na germinação e crescimento radicular de sorgo e pepino. **Caatinga**, v. 21, n. 4, p. 12-16, 2008.

BREMER, K. 1994. **Asteraceae: Cladistics & Classification**. Portland, Timber Press.
CARNEIRO FF E ALMEIDA VES (2010). UNB <http://www.unb.br/noticias/unbagencia/artigo.php?id=279#> (acessado em 03/11/2010).

COPPING LG, DUKE SO (2007) Natural products that have been used commercially as crop protection agents. **Pest Management Science** 63: 524-554.

DING, Z.; FRIML, J. Auxin regulates distal stem cell differentiation in *Arabidopsis* roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 107, p. 12046-12051, 2010.

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

FRIML, J.; BENKOVÁ, E.; BLILOU, I.; WISNIEWSKA, J.; HAMANN, T.; LJUNG, K.; WOODY, S.; SANDBERG, G.; SCHERES, B.; JÜRGENS, G.; PALME, K. AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*. **Cell**, v. 108, p. 661-673, 2002.

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

GRISI, P.U.; GUALTIERI, S.C.J.; ANESE, S.; PEREIRA, V.C., FORIM, M.R. Efeito do extrato etanólico de *Serjania lethalis* no controle de plantas daninhas. **Planta Daninha**, v. 31, n. 2, p. 239-248, 2013.

HAGEMANN, T.R.; BENIN, G.; LEMES, C.; MARCHESE, J.A.; MARTIN, T.N.; PAGLIOSA, E.S.; BECHE, E. Potencial alelopático de extratos aquosos foliares de aveia sobre azevém e amendoim-bravo. **Bragantia**, v. 69, n. 3, p. 509-518, 2010.

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

IMATOMI, M.; NOVAES, P.; MATOS, A.P.; GUALTIERI, S.C.J.; MOLINILLO, J.M.G.; LACRET, R.; VARELA, R.M.; MACÍAS, F.A. Phytotoxic effect of bioactive compounds isolated from *Myrcia tomentosa* (Myrtaceae) leaves. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 46, p. 29-35, 2013.

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

LI, Z-L.; WANG, Q.; RUAN, X.; PAN, C.; JIANG, D.H. Phenolics and Plant Allelopathy. *Molecules*, v. 15, p. 8933-8952, 2010.

MENDONÇA, R.C.; FELFILI, J.M.; WALTER, B.M.T.; SILVA JUNIOR, M.C.; FILGUEIRAS, T.S.; NOGUEIRA, P.E. & FAGG, C.W. 2008. Flora vascular do bioma Cerrado: checklist com 12.356 espécies. Pp. 423-1279. In: S.M. Sano; Almeida, S.P. & J.F. Ribeiro (eds.). Cerrado: ecologia e flora. v. 2. Brasília, Embrapa Informação e Tecnologia.

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

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

OLIVEROS-BASTIDAS, A. J.; MACÍAS, F.A.; FERNÁNDEZ, C.C.; MARÍN, D.; MOLINILLO, J.M.G. Exudados de la raíz y su relevancia actual en las interacciones alelopáticas. **Química nova**, v. 32, n. 1, p. 198-213, 2009.

PETERSSON, S.V.; JOHANSSON, A.I.; KOWALCZYK, M.; MAKOVEYCHUK, A.; WANG, J.Y.; MORITZ, T.; GREBE, M.; BENFEY, P.N.; SANDBERG, G.; LJUNG, K.

An auxin gradient and maximum in the *Arabidopsis* root apex shown by high-resolution cell-specific analysis of IAA distribution and synthesis. **Plant Cell**, v. 21, p. 1659-1668, 2009.

RIMANDO, A.M.; DUKE, S.O. Natural products for pest management. In: Rimando A. M et al. Natural products for Pest Management; ACS Symposium Series: **American Chemical Society**: Washington, 2006.

ROBINSON, H. 1999. Generic and Subtribal Classification of American Vernoniae. **Smithsonian Contributions to Botany 89**: 1-116.

ROBINSON, H. 2002. Three new species of *Piptocarpha* (Asteraceae: Vernoniae) from Ecuador and Peru. **Novon 12**: 393-398.

SMITH, G.L. 1981. New taxa in *Piptocarpha* R. Br. (Vernoniae: Compositae). **Annals of the Missouri Botanical Garden 68**: 661-667.

SOUZA FILHO, A. P. S. ; SANTOS, R.A., SANTOS, L.S.; GUILHON, G.M.P.; SANTOS, A.S.; ARRUDA, M.S.P.; MULLER, A.H.; ARRUDA, A.C. Potencial alelopático de *Myrcia guianensis*. **Planta Daninha**, v. 24, n. 4, p. 649-656, 2006.

TAKATSUKA, H.; UMEDA, M. Hormonal control of cell division and elongation along differentiation trajectories in roots. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, p. 2633-2643, 2014.

VERDEGUER, M.; GARCÍA-RELLÁN, D.; BOIRA, H.; PÉREZ, E.; GANDOLFO, S.; BLÁZQUEZ, M. A. Herbicidal Activity of *Peumus boldus* and *Drimys winterii* Essential Oils from Chile. **Molecules**, v. 16, p. 403-411, 2011.

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

CAPITULO III

“Estudo do perfil químico dos extratos, frações e subfrações de *Piptocarpha rotundifolia* (candeia) (Less.) – Baker oriundos de diferentes metodologias de extração”

RESUMO - *Piptocarpha rotundifolia* (Less.) Baker, é uma espécie pertencente à família Asteraceae, comumente encontrada no cerrado brasileiro. Com o objetivo de identificar compostos secundários de *P. rotundifolia* presentes em seus extratos, frações e subfrações previamente obtidos a partir das metodologias de extração em ordem crescente de polaridade, de extração líquido-líquido e cromatografia preparativa, foram submetidas a análise através da técnica de Cromatografia líquida de Ultra Performance (CLUE). Para isto, os extratos, frações e subfrações provenientes foram submetidos a uma separação cromatográfica em gradiente exploratório utilizando como fase estacionária uma coluna Acquity UPLC BEH C18 (50 X 2,1 mm, 1,7 µm- Waters), sendo o volume de injeção dos extratos, frações e subfrações, 2 µL na concentração de 1 mg/mL preparados com a mesma proporção de solventes do início da eluição cromatográfica. As amostras foram submetidas a análises em Detector Espectrométrico de Massas (Xevo G2-MS QToF MS, Waters), com a finalidade de se obter uma comparação do perfil das amostras. Os eluentes utilizados para a separação foram água ultra-pura e acetonitrila, ambos acidificadas com 0,1% (v/v) de ácido fórmico. As amostras apresentaram um composto, conhecido como Glaucolideo B, presente em maior quantidade especialmente nos extratos de acetato de etílico proveniente de extração eluotrópica, 2 (acetato etílico) e 3 (aquoso) provenientes da extração líquido-líquido. Com relação as frações, o mesmo composto majoritário encontra-se presente somente na fração D3. Outros compostos já conhecidos para o gênero *Piptocarpha* também foram identificados sendo as piptocarpinas A e B. O composto glaucolideo B ainda não havia sido descrito na literatura para o gênero *Piptocarpha*, mostrando-se inédito neste estudo, e também o provável responsável pelas atividades inibitórias apresentadas pelas frações onde este se encontra.

Palavras-chave: cromatografia, extratos, glaucolídeo, lactonas sesquiterpênicas, piptocarpinas, *Piptocarpha rotundifolia*.

ABSTRACT: *Piptocarpha rotundifolia* (Less.) Baker, is a species belonging to the *Asteraceae* family, very common in the Brazilian savanna. In order to separate *P. rotundifolia* secondary compounds present in their extracts, fractions and subfractions previously obtained from the extraction method in order of increasing polarity, liquid-liquid extraction and preparative chromatography were subjected to analysis by Ultra Performance liquid chromatography technique (UPLC). For this purpose, extracts, fractions and subfractions from underwent an exploratory gradient chromatographic separation using as stationary phase column Acquity UPLC BEH one C18 (50 x 2.1 mm, 1.7 μ m- Waters), being the injection volume of extracts, fractions and subfractions 2 μ L in a concentration of 1 mg/mL prepared with the same proportion of solvents the start of the race. The samples were subjected to analysis by Mass Spectrometric Detector (Xevo G2 QToF MS-MS, Waters), with the aim of obtaining a comparison of Sample profile. The eluents used for the separation were Milli-Q water and acetonitrile, both acidified with 0.1% (v/v) formic acid. Samples showed a compound known as glaucolide B, present in larger amount especially in crude extracts C (ethyl acetate) from eluotropic extraction, 2 (ethyl acetate) and 3 (aqueous) from the liquid-liquid extraction. Concerning the fractions, the same major compound is present only in the fraction D3. Other compounds known to the *Piptocarpha* genus were also identified as piptocarphin A and B. The compound glaucolide B was never described in the literature for the genus *Piptocarpha*, being inedited in this study, and also likely responsible for inhibitory activities presented by the fractions which it is located.

Keywords: chromatography, extracts, glaucolide, sesquiterpene lactones, piptocarphins, *Piptocarpha rotundifolia*.

1. Introdução

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

A família Asteraceae é considerada o segundo grupo sistemático mais numeroso dentro das Angiospermas, representando cerca de 10% da flora mundial. Apresenta plantas de hábito extremamente variado, incluindo principalmente pequenas ervas ou arbustos e raramente árvores (Bremer, 1994). Esta família caracteriza-se quimicamente pela elevada capacidade de biossintetizar metabólitos secundários com grande diversidade estrutural, principalmente, terpenóides flavonóides, cumarinas e poliacetilenos (Zdero; Bohlmann, 1990).

O acúmulo de substâncias com efeitos alelopáticos tem sido verificado em todos os órgãos vegetais, havendo uma tendência de acúmulo nas folhas (Dorning e Cipollini, 2006; Khan et al., 2011); porém, os aleloquímicos podem variar quanto à composição, concentração e localização no vegetal (Hong et al., 2004). Os efeitos fitotóxicos são mediados por substâncias químicas pertencentes a diferentes categorias de compostos, tais como fenóis, terpenos, alcalóides, poliacetilenos, ácidos graxos, peptídeos, glicosídeos, saponinas, taninos, entre outros (Wink, 2003; Silva et al., 2010).

As lactonas sesquiterpênicas são compostos de grande ocorrência na natureza e representam um importante grupo de metabólitos secundários da família Asteraceae,

sendo também encontradas em espécies das famílias Umbelliferae, Acanthaceae, Amaranthaceae, Apiaceae e Magnoliaceae (Robbers et al.,1996). São formadas pela condensação de três unidades isoprênicas e, subseqüentemente, por ciclizações mediadas por enzimas e transformações oxidativas, produzindo lactonas *cis* ou *trans*. A presença do anel α -metileno- γ -lactona (Figura 1) é geralmente uma característica comum entre as lactonas sesquiterpênicas (Duke et al.,2000; Neerman, 2003).

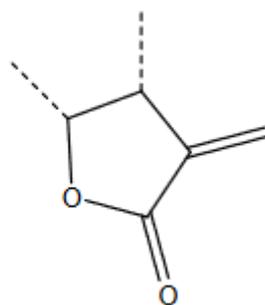


Figura 1. Característica comum entre as lactonas sesquiterpênicas.

Devido ao seu amplo espectro de atividade biológica, as lactonas sesquiterpênicas constituem uma classe de substâncias com potencial para utilização na medicina destacando-se as atividades citotóxica, antitumoral, antibacteriana, antiinflamatória, esquistossomicida, antimalárica e antifúngica (Arantes, 2007).

Além das atividades biológicas, tem sido demonstrado que as LST desempenham também um papel ecológico altamente importante, como por exemplo, na defesa da planta que as produz contra insetos herbívoros. Esta hipótese é reforçada através de estudos que demonstram um aumento significativo nos níveis desses metabólitos nas folhas de algumas espécies vegetais submetidas a injúrias mecânicas, por processos alelopáticos (redução da taxa de germinação e do crescimento de alguns vegetais), pela capacidade de atuar como substâncias deterrentes (desestimulantes alimentares ou fagoinibidores) para alguns mamíferos e insetos, bem como pela diminuição da taxa de sobrevivência e

reprodutibilidade em diferentes tipos de larvas de borboletas e de besouros (Passreiter; Isman, 1997; Picman, 1986).

Apesar do alto número de lactonas sesquiterpênicas descritas e das suas atividades biológicas, poucos estudos têm sido feitos sobre a correlação estrutura/atividade biológica das mesmas e também sobre os modos de ação nas plantas. (Macías et al., 2006).

A cromatografia é um método físico-químico de separação por conter uma fase móvel e uma estacionária, sendo que a amostra a ser analisada é injetada na entrada da coluna e a fase móvel é bombeada continuamente fazendo com que a amostra migre de acordo com as interações e as propriedades físico-químicas da fase móvel e da estacionária. Outro lado da coluna é instalado um detector que transmite para um registrador um sinal que é interpretado em forma de cromatograma, sendo a área e a altura deste proporcional a concentração do analito (Ciola, 1985; Jin et al., 2008).

A cromatografia líquida de ultraeficiência (CLUE) é uma técnica recente, e já está sendo utilizada em análises de rotina em diversas áreas, sendo uma nova tecnologia para proporcionar a máxima eficiência cromatográfica das partículas porosas sub – 2 µm e, com isso, ganho em resolução, sensibilidade, tempo de retenção, velocidade linear, largura e eficiência nos sinais, permitindo assim uma análise mais rápida e com um gasto de solventes e amostra menores entre as análises quando comparadas com a CLAE que utiliza partículas convencionas de 10 µm, 5 µm ou 3,5 µm (Jerkovich, et al., 2005; Rainville & Plumb, 2007; Wren, 2005; Wren & Tchelitcheff, 2006).

Assim, a investigação das propriedades fitotóxicas de *P. rotundifolia* podem representar uma oportunidade para a descoberta de novas moléculas e compostos ativos com empregabilidade agrícola, podendo ser utilizadas como reguladores ou inibidores do crescimento de plantas daninhas. Assim, devido à falta de trabalhos na literatura envolvendo uma investigação do perfil fitoquímico da espécie estudada, o presente

capítulo teve como objetivo identificar os principais compostos presentes nos extratos, frações e subfrações de *Piptocarpha rotundifolia*, por meio de análise por Cromatografia Líquida de Ultra Performance acoplada a Espectrometria de Massas de Alta Resolução (UPLC – HRMS).

2. Materiais e métodos

2.1. Coleta e processamento do material vegetal.

O material vegetal utilizado foi constituído por folhas adultas de *Piptocarpha rotundifolia* (Less.) Baker. As folhas foram coletadas em novembro de 2013, na área de reserva de cerrado stricto sensu pertencente ao campus da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), localizado na cidade de São Carlos, estado de São Paulo (21° 58' a 22° 00' S e 47° 51' a 47° 52' W) (Figura c). Foi depositada uma exsicata no Herbário da Universidade Federal de São Carlos (HUFSCar).

Após triagem, o material vegetal foi lavado, seco em estufa de circulação forçada de ar a 40°C durante 72 h e triturado em moinho elétrico. O pó resultante foi pesado e embalado a vácuo, sendo mantido sob refrigeração (5±2°C).

2.2. Preparação dos Extratos

Nesta etapa, foram utilizados os extratos, frações e subfrações oriundos de extração feita em ordem eluotrópica A (hexânico), B (diclorometânico), C (acetato etílico), D (acetônico), E (metanólico), D1, D2, D3, D4, D5; D1A, D1B, D1C, D1A1, D1A2, D1A3 e D1A4; e da extração líquido-líquido 1 (hexânico), 2 (acetato etílico) e 3 (aquoso). Os extratos brutos, frações e subfrações provenientes da extração eluotrópica foram previamente preparados de acordo com a metodologia citada no capítulo I (item

2.2). Os extratos provenientes da partição líquido-líquido foram preparados de acordo com a metodologia citada no capítulo 2 (item 2.2).

2.3. Análises por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE) e identificação química.

Esta etapa do trabalho foi realizada em colaboração com o Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, no Laboratório de Produtos Naturais.

Os extratos, frações e subfrações citados do item anterior foram submetidos a análises em UPLC Acquity-HRMS (Xevo G2-XS QToF, MS Waters) com a finalidade de se obter uma separação dos compostos presentes em cada extrato, para que assim fosse feita a identificação dos mesmos, promovendo então uma comparação qualitativa da melhor condição de extração.

Previamente, foi feita uma separação cromatográfica em gradiente exploratório utilizando como fase estacionária uma coluna Acquity UPLC BEH C18 (50 x 2.1 mm 1,7 µm - Waters). O volume de injeção dos extratos, frações e subfrações, foi 2 µL e concentração de 1 mg/mL preparados com a mesma proporção de fase móvel do início da separação. Os eluentes utilizados para a separação foram água ultra-pura e acetonitrila, ambos acidificados com 0,1% (v/v) de ácido fórmico. As condições de eluição e vazão estão representadas na tabela 1.

Tabela 1. Condições de vazão utilizadas para o processo de otimização cromatográfica.

Tempo (min)	Fluxo (mg/mL)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0.0	0,500	80	20
6.0	0,500	50	50
8.50	0,500	2	98
9.00	0,500	2	98
9.10	0,500	80	20
10.00	0,500	80	20

A: solução aquosa de ácido fórmico 1% (v/v); B: acetonitrila com ácido fórmico (99:1 v/v)

Para a identificação dos metabólitos ionizáveis no espectrômetro de massas de alta resolução, foi utilizado a fonte electrospray (ESI), com um detector híbrido Triplo quadrupolo (QqQ) hifienado a um por tempo de vôle (TOF). Esses experimentos foram feitos no modo positivo de ionização (ESI+). As condições utilizadas nesse detector estão descritas abaixo (Tabela 2):

Tabela 2.: Condições utilizadas em detector híbrido Tríple quadruplo (QqQ), utilizado para identificação dos metabólitos ionizáveis no espectrofotômetro de massas de alta resolução.

Voltagem do capilar	12 kV
<i>Sampling cone</i>	30 kV
Temperatura da fonte	100°C
Temperatura de dessolvatação	450°C
Energia de colisão	6.0 kV
Vazão do gás no cone	750.0 L/h
Massa de início	100,0000 Da
Massa final	1.200,0000 Da

Os dados obtidos foram processados pelo *software* de Waters UNIFI® e comparados nas mesmas condições experimentais entre si e com os dados na literatura.

3. Resultados

Após as análises citadas no ítem anterior (2.3), foi possível comparar o perfil químico através dos compostos presentes nos extratos, frações e subfrações analisadas. Os cromatogramas foram obtidos pelo somatório (total) da intensidade de sinais de íons em cada um dos espectros de massas de uma série adquirida em função do tempo de retenção cromatográfico. Assim, os picos são proporcionais à quantidade do composto presente nos extratos.

No total, quatro compostos foram identificados: piptocarpina A, piptocarpina B, glaucolideo A e glaucolideo G. As estruturas químicas destes podem ser visualizadas de acordo com a figura 2.

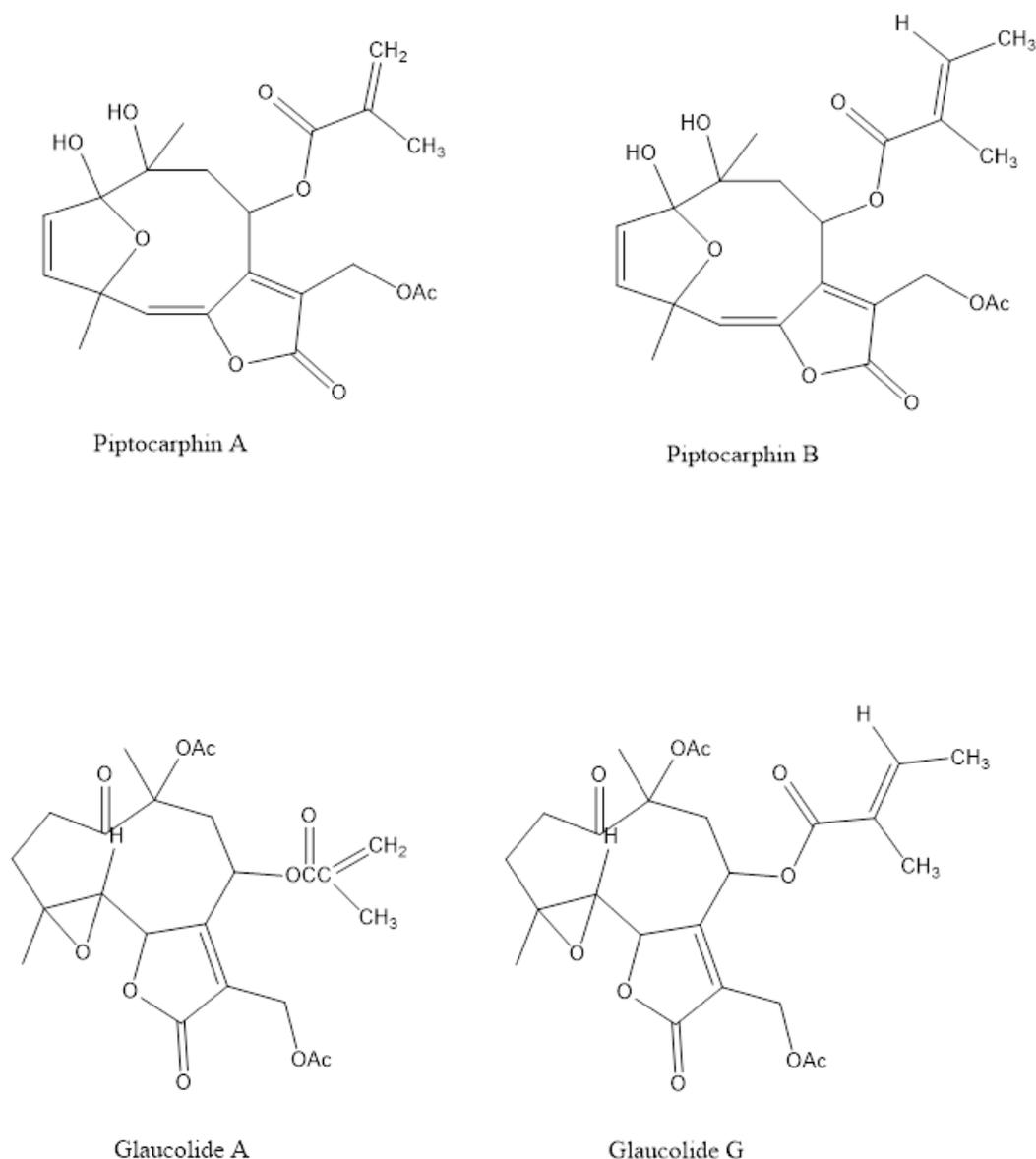


Figura 2. Estruturas químicas das lactonas sesquiterpênicas identificadas nos extratos de folhas adultas de *Piptocarpha rotundifolia* usando a técnica de Cromatografia líquida de Ultra Eficiência (CLUE).

Uma relação dos compostos encontrados em cada um dos extratos, frações e subfrações, referentes à cada tipo de extração pode ser melhor observado de acordo com a figura 3. No processo de extração eluotrópica, os compostos glaucolideo A e piptocarpina A aparecem presentes apenas nos extratos A, B, C e D, e na fração D3. Já

no processo de extração líquido-líquido, os quatro compostos identificados (glaucolídeo A, glaucolídeo G, piptocarpina A e piptocarpina B), aparecem presentes nos extratos 2 e 3.

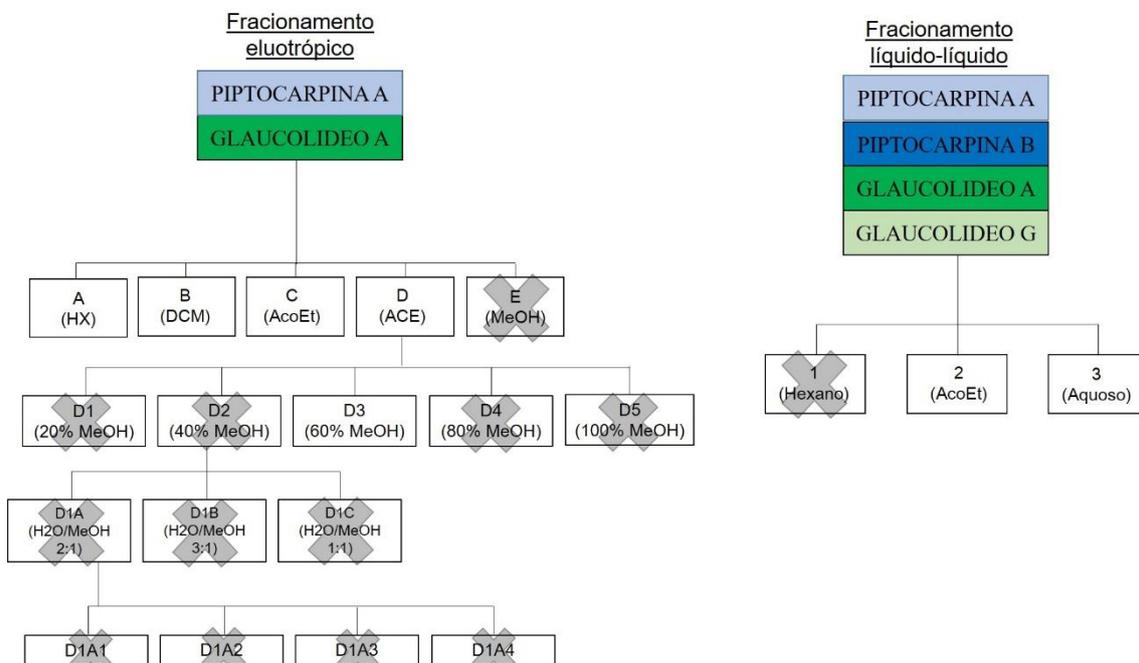


Figura 3.: Fluxograma relacionando os compostos encontrados com os extratos e frações oriundos de fracionamento eluotrópico e líquido-líquido.

Nos cromatogramas com extratos, frações e subfrações provenientes da extração eluotrópica é possível verificar a presença de um composto majoritário, presente em maior concentração no extrato C (acetato etílico) que no extrato acetônico (D). Este composto encontra-se no tempo de retenção em 6,17 min (Figura 4).

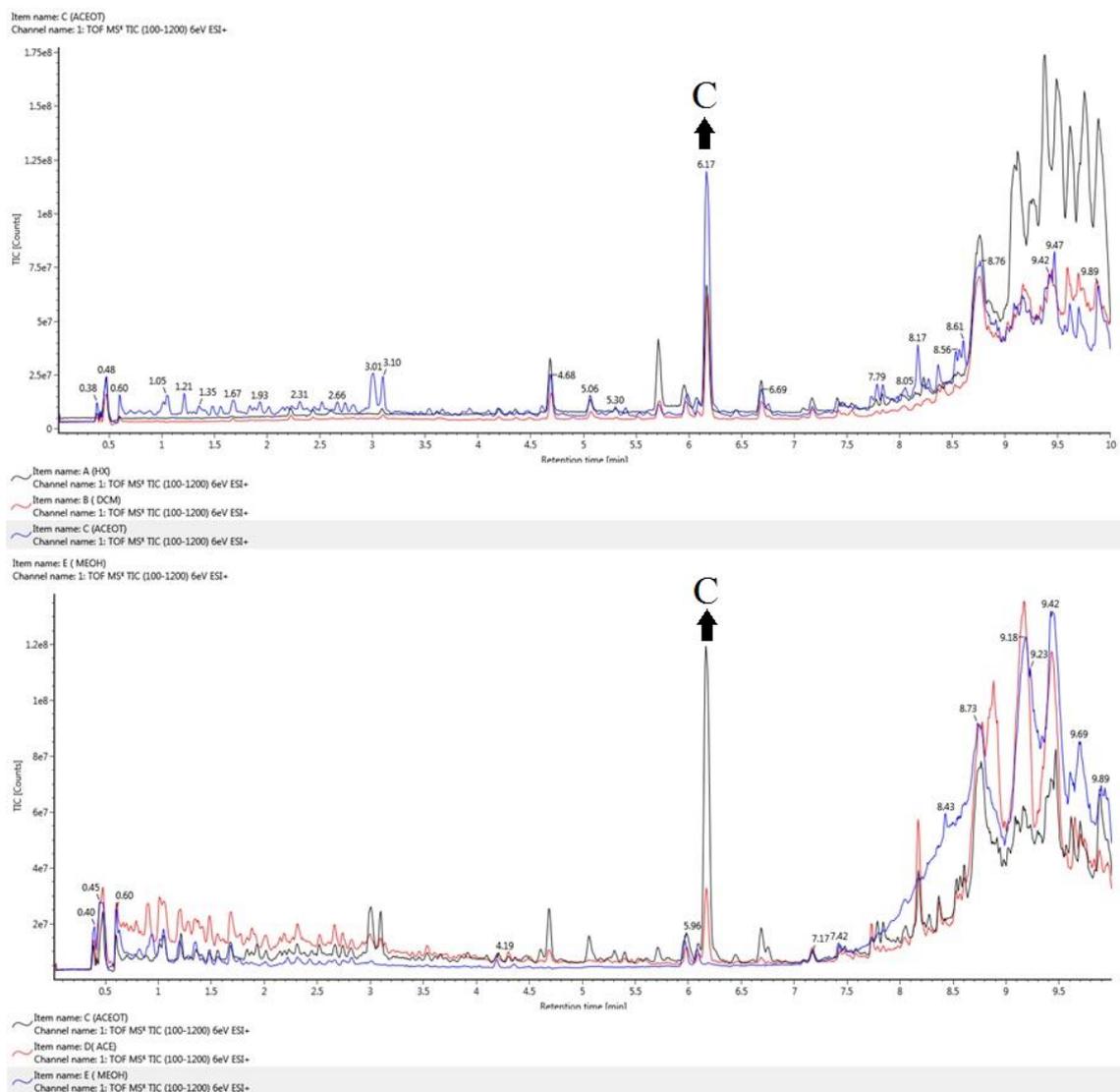


Figura 4. Cromatogramas de íons totais dos extratos brutos (A, B e C / C, D e E) provenientes de extração eluotrópica.

Nota-se que a partir do fracionamento do extrato acetônico (D), este composto majoritário continua presente apenas na fração D3 (60% MeOH), não havendo diminuição da concentração do mesmo nesta fração (Figura 5).

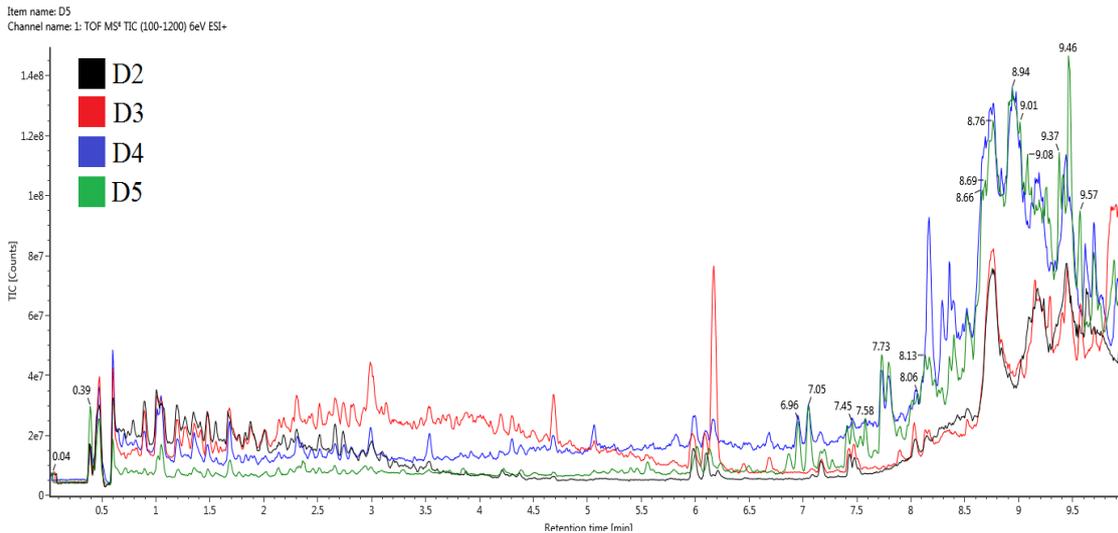


Figura 5. Cromatograma de íons totais das frações (D2, D3, D4 e D5) provenientes do fracionamento do extrato acetônico (D).

O composto encontrado nos extratos oriundos de extração eluotrópica encontra-se presente também no extrato acetato etílico (2) e aquoso (3), provenientes de partição líquido-líquido, no mesmo tempo de retenção, porém em maior quantidade, como é possível observar no cromatogramas (figura 6).

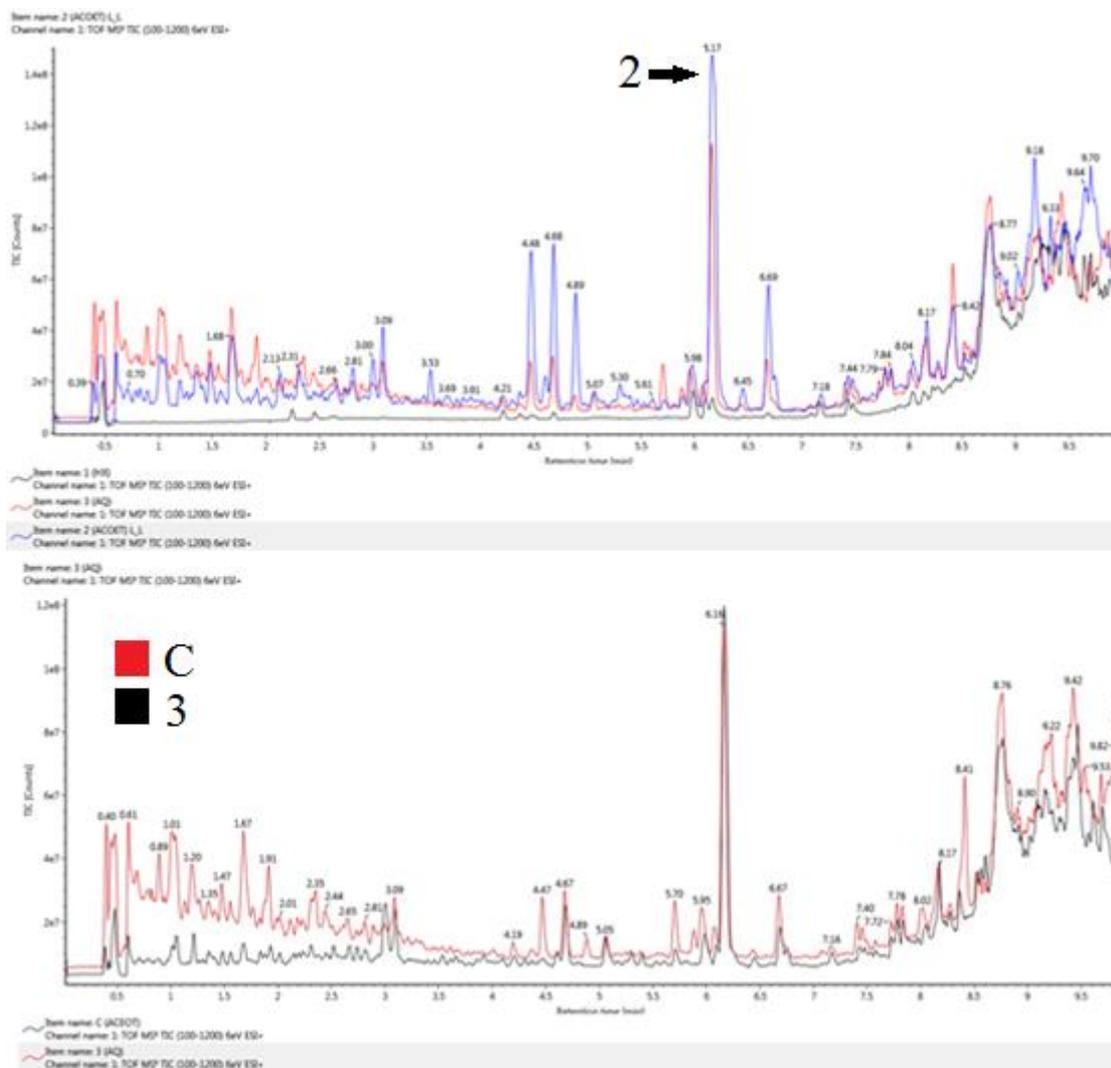


Figura 6. Cromatogramas de íons totais dos extratos brutos 1 (hexano), 2 (acetato de etila) e 3 (aquoso), provenientes de partição líquido-líquido e dos extratos brutos C (acetato de etila) e 3 (aquoso), provenientes de extração eluotrópica e de extração líquido-líquido, respectivamente

A partir dos cromatogramas obtidos através das análises de HRMS (High-resolution Mass Spectrometry), e de revisão da literatura consultada (Cowan et al., 1981; Herz, W., & Kulanthaivel, P., 1983), foi possível elucidar a estrutura molecular do composto majoritário como sendo a lactona sesquiterpênica glaucolideo A, já representado na figura 3. No cromatograma abaixo (figura 7) correspondente aos extratos brutos (1, 2 e 3) oriundos de extração líquido-líquido, estão presentes os quatro compostos identificados como glaucolideos A e G e piptocarpinas A e B.

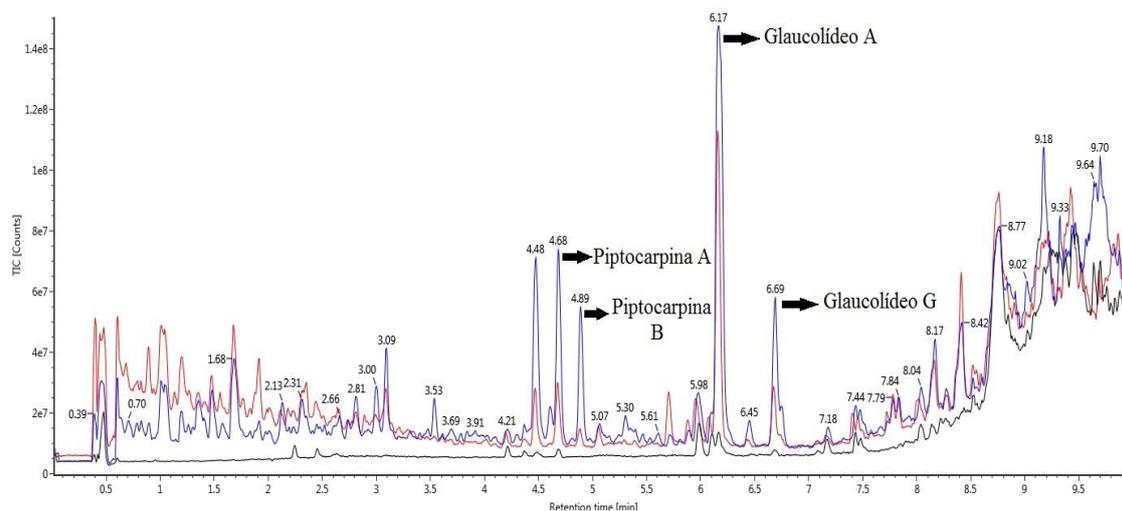


Figura 7: Cromatograma dos extratos brutos (1, 2 e 3) oriundos de extração líquido-líquido, contendo os compostos glaucolídeos A e G e piptocarpinas A e B identificados.

Outros compostos já identificados para o gênero *Piptocarpha* também foram encontrados em *Piptocarpha paradoxa*, sendo estes a piptocarpina A e piptocarpina B, estudados por Cowall et al., 1981.

4. Discussão

Segundo Cronquist (1981), as espécies da família Asteraceae armazenam carboidratos do tipo inulina, produzem poliacetilenos e óleos aromáticos terpênicos, normalmente apresentam lactonas sesquiterpênicas e não possuem iridóides. Schultes & Raffauf (1990) relatam que essa família é rica em constituintes potencialmente biodinâmicos, incluindo alcalóides, sesqui e diterpenóides, óleos essenciais, triterpenos, saponinas, esteróis, carotenóides, acetilenos, polienos, tiofenóis, amidas, flavonóides e várias outras substâncias. Tais considerações são importantes, pois, corroboram com os resultados obtidos neste estudo.

São poucos os trabalhos encontrados na literatura que tratam da identificação e/ou isolamento de compostos em espécies do gênero *Piptocarpha*. As piptocarpinas identificadas nos extratos de *P. rotundifolia*, coincidem com estudos já publicados em

outras espécies do mesmo gênero. Por exemplo, Cowall et al., 1981, isolou piptocarpinas de *Piptocarpha chontalensis*; Marthur et al., 1982, identificou terpenos presentes em extratos foliares da espécie *Piptocarpha paradoxa* e Herz et al., 1983 isolou 6 sesquiterpenolactonas de *Piptocarpha opaca*, sendo todas estas, piptocarpinas.

Outras pesquisas apontam o efeito alelopático inibitório das lactonas sesquiterpênicas sobre o desenvolvimento das plantas daninhas (Goto et al., 2001; Belz et al., 2007; Macías et al., 2010). Essa classe de compostos possui um amplo espectro de atividades biológicas, e parecem desempenhar um importante papel no mecanismo de defesa das plantas (Jansen & Groot, 2004). Assim, os compostos encontrados nos extratos e frações e *P. rotundifolia* podem estar diretamente relacionados com as atividades inibitórias deste sob o desenvolvimento das espécies-alvo utilizadas no presente trabalho.

Vários fatores podem contribuir para achados negativos em relação a determinados grupos de metabólitos secundários. Gobbo-Neto & Lopes (2007) relatam que variações temporais e espaciais no conteúdo total, bem como as proporções relativas de metabólitos secundários em plantas podem ocorrer nos níveis climáticos, sazonais e diários e, apesar da existência de controle genético, a expressão pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos. Muitas vezes, as variações podem ser decorrentes também do desenvolvimento foliar e/ou surgimento de novos órgãos concomitante a uma constância no conteúdo total de metabólitos secundários. Para lactonas sesquiterpênicas são relatadas variações no conteúdo devido à sazonalidade, idade, estágio de desenvolvimento da planta e intensidade de luz (Picman, 1986; Willuhn et al., 1998; Gobbo-Neto & Lopes, 2007). Entretanto, alguns fatores podem apresentar correlações entre si e não atuam isoladamente, podendo influir em conjunto no metabolismo secundário, como

desenvolvimento e sazonalidade, índice pluviométrico e sazonalidade, temperatura e altitude, entre outros (Gobbo-Neto & Lopes, 2007).

Já com relação ao composto majoritário identificado como glaucolideo A, não há relatos na literatura, deste, para o gênero *Piptocarpha*, sendo bastante incidente em espécies do gênero *Vernonia* (Abdel-Baset et al., 1971; Padolina et al., 1974; Mabry et al., 1975b; Jakupovic et al., 1985), o glaucolídeo A também já foi identificado para as espécies de *Vernonanthura* como em *V. pinguis*, *V. chamaedrys*, *V. phosphorica*, *V. squamulosa* (Catalán et al., 1986; Catalán et al., 1988; Borkosky et al., 1997; Kotowicz et al., 1998; Igual et al., 2013).

Jones et al., 1979 cita o composto glaucolideo A, extraído de *Vernonia noveboracensis* (L.), como responsável pela redução da sobrevivência de larvas de Lepidoptera.

Assim, a sesquiterpenolactona glaucolide A, foi através deste estudo, identificada pela primeira vez em extratos provenientes de uma espécie do gênero *Piptocarpha*.

5. Conclusão

Foram encontrados compostos já identificados para o gênero *Piptocarpha*, e também um composto majoritário inédito, nunca mencionado neste gênero, como sendo glaudolídeo A.

Este estudo é o primeiro na literatura a encontrar um composto inédito em extrato foliar de *Piptocarpha rotundifolia*, bem como realizar uma investigação química com extratos foliares desta espécie.

6. Referências

ABDEL-BASET, Z.H.; SOUTHWICK, L.; PADOLINA, W.G.; YOSHIOKA, H.; MABRY, T.J.; JONES, S.B. Sesquiterpene lactones: a survey of 21 United States taxa from the genus *Vernonia* (Compositae). **Phytochemistry**, v. 10, n. 9, p. 2201-2204, 1971.

ARANTES, F. F. P. Síntese e avaliação da fitotoxicidade de novas lactonas sesquiterpênicas. Viçosa, MG: Dissertação UFV (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, 2007. 136p.

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

BELZ, R.G.; REINHARDT, C.F.; FOXCROFT, L.C.; HURLE, K. Residue allelopathy in *Parthenium hysterophorus* L. – Does parthenin play a leading role? *Crop Protection*, v. 26, p. 237- 245, 2007.

BORKOSKY, S.; BARDÓN, A.; CATALÁN, C.A.N.; DÍAZ, J.G.; HERZ, W. Glaucolides, hirsutinolides and other sesquiterpene lactones from *Vernonanthura pinguis*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 3, p. 465-470, 1997.

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

BREMER, K. Asteraceae – Cladistics & Classification. Portland: **Timber Press**, p. 752, 1994.

CATALÁN, C.A.N.; DE IGLESIAS, D.I.A.; KAVKA, J.; SOSA, V.E.; HERZ, W. Sesquiterpene lactones and other constituents of *Vernonia mollissima* and *Vernonia squamulosa*. **Journal of Natural Products**, v. 49, n. 2, p. 351- 353, 1986.

CATALÁN, C.A.N.; DE IGLESIAS, D.I.A.; KAVKA, J.; SOSA, V.E.; HERZ, W. Glaucolides and related sesquiterpene lactones from *Vernonia chamaedrys*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 1, p. 197-202, 1988.

COWALL, PL; CASSADY, JM; CHANG, CJ; KOZLOWSKI, JF, 1981: Isolation and structure. A-F, cytotoxic germacranolide lactones from *Piptocarpha chontalensis*.

CRONQUIST, A. An integrated system of classification of flowering plants. New York: **Columbia University Press**, 1981, 1262p.

DORNING, M.; CIPOLLINI, D. Leaf and root extracts of the invasive shrub, *Lonicera maackii*, inhibit seed germination of three herbs with no autotoxic effects. **Plant Ecology**, v. 184, p. 287-296, 2006.

DUKE, S. O.; ROMAGNI, J. A. G.; DAYAN, F. E. Natural products as sources for new mechanisms of herbicidal action. *Crop Protection*. v. 19, p. 583-589, 2000.

GOTO, Y.; KOJIMA, Y.; NAKAYAMA, T.; TERAZAWA, M. Allelopathic sesquiterpenoids from rhizomes of *Petasites japonicus* ssp. *giganteus* Kitam. **Phytochemistry**, v. 57, p. 109-113, 2001.

HONG, N.H.; XUAN, T.D.; TSUZUKI, E.; TERAO, H.; MATSUO, M.; KHANH, T.D. Weed control of four higher plant species in paddy rice fields in Southeast Asia. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 190, p. 59-64, 2004.

IGUAL, M.O.; MARTUCCI, M.E.P.; DA COSTA, F.B.; GOBBO-NETO, L. Sesquiterpene lactones, chlorogenic acids and flavonoids from leaves of *Vernonia polyanthes* Less (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 51, n., p. 94-97, 2013.

JAKUPOVIC, J.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; SCHUSTER, A.; ZDERO, C.; BOHLMANN, F.; KING, R.M.; ROBINSON, H.; PICKARDT, J. Hirsutinolides, glaucolides and sesquiterpene lactone from *Vernonia* species. **Phytochemistry**, v. 25, n. 1, p. 145-158, 1985.

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

JERKOVICH AD, LOBRUTTO R, VIVILECCHIA RV. The use of acquity uplc in pharmaceutical development. Sep. **Sci. Redef.**, Maio: 15 - 21, 2005.

JONES, S.B., BURNETT, W.C., COILE, N.C. MABRY, T. J, BETKOUSKI M. F. Sesquiterpene Lactones of *Vernonia* - Influence of Glaucolide-A on the Growth Rate and Survival of *Lepidopterous Larvae*. **Oecologia** (Berl.) 39, 71-77 (1979).

KHAN, M.; HUSSAIN, F.; MUSHARAF, S.; IMDADULLAH. Allelopathic effects of *Rhazya stricta* decne on seed germination and seedling growth of maize. **African Journal of Agricultural Research**, v. 6, n. 30, p. 6391-6396, 2011.

KOTOWICZ, C.; BARDÓN, A.; CATALÁN, C.A.N.; CERDA-GARCÍA-ROJAS, C.M.; JOSEPH-NATHAN, P. Glaucolides and hirsutinolides from *Vernonanthura squamulosa*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 3, p. 425-428, 1998.

MABRY, T.J.; ABDEL-BASET, Z.; PADOLINA, W.G.; JONES, S.B. Systematic implications of flavonoids and sesquiterpene lactones in species of *Vernonia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 2, n. 3, p. 185-192, 1975b.

MACÍAS, A. F.; FERNANDES A.; VARELA, R. M.; MOLINILLO, J. M. G.; TORRES, A.; ALVES, P. L. C. A. Sesquiterpene lactones as allelochemicals **J. Nat. Prod.**, v.69, p. 795-800, 2006.

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

MATHUR S. B.; GONZALEZ L. Identification of Terpenoids From the Leaves of *Piptocarpha paradoxa* and Their Biological Activities. **J. Nat. Prod.**, 1982, 45 (4), pp 495-496.

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

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

NEERMAN, M. F. Sesquiterpene lactones: a diverse class of compounds found in essential oils possessing antibacterial and antifungal properties. *The International Journal of Aromatherapy* . V. 13, n. 2/3, p. 114-120, 2003.

PADOLINA, W.G.; YOSHIOKA, H.; NAKATANI, N.; MABRY, T.J.; MONTI, S.A.; DAVIS, R.E.; COX, P.J.; SIM, O.A.; WATSON, W.H.; WU, I.B. Glaucolide-A and -B, new germacranolide-type sesquiterpene lactones from *Vernonia* (Compositae). *Tetrahedron*, v. 30, n. 10, p. 1161-1170, 1974.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology** .New York: Williams & Wilkins, 1996. 337 p.

SCHULTES, R.E.; RAFFAUF, R.F. The healing forest: medicinal and toxic plants of the Northwest Amazonia. Portland, Oregon: **Dioscorides Press**, 1990. v.2, 484p.

SILVA, R.M.G.; SARAIVA, T.S.; SILVA, R.B.; GONÇALVES, L.A.; SILVA, L.P. Potencial alelopático de extrato etanólico de *Anadenanthera macrocarpa* e *Astronium graveolens*. **Bioscience Journal**, v. 26, p. 632-637, 2010.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, v. 64, p. 3-19, 2003.

WREN SAC. Peak capacity in gradient ultra performance liquid chromatography (UPLC). *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 38: 337 - 343, 2005.

ZDERO, C.; Bohlmann, F. Systematics and evolution within the Compositae, seen with the eyes of a chemist. **Plant Systematics and Evolution**, v.171, p.1-14, 1990.

CONCLUSÕES GERAIS

- A metodologia de extração líquido-líquido mostrou-se mais eficiente do que a metodologia de extração em ordem eluotrópica, gerando maior rendimento de extratos brutos.
- Os extratos de *Piptocarpha rotundifolia*, bem como a maior parte de suas frações e subfrações provenientes de ambas metodologias de extração apresentaram atividade fitotóxica nos bioensaios realizados e não perdem seu potencial fitotóxico no decorrer dos fracionamentos.
- Um composto majoritário identificado como glaucolideo B foi identificado pela primeira vez nos extratos de *P rotundifolia*.
- Os extratos, frações e subfrações da espécie estudada mostram-se promissores no estudo detalhado de seus compostos, como possíveis produtos naturais inibidores do crescimento de espécies invasoras.