

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**Identificação e avaliação de compostos bioativos do capim-annoni em
plantas daninhas**

Adriana Favaretto

Passo Fundo

2018

Adriana Favaretto

Identificação e avaliação de compostos bioativos do capim-annoni em plantas daninhas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, como requisito parcial para obtenção de título de doutora em Agronomia.

Orientador:
Simone Meredith Scheffer-Basso
Coorientador:
Naylor Bastiani Perez

Passo Fundo

2018

CIP – Catalogação na Publicação

F272i Favaretto, Adriana
Identificação e avaliação de compostos bioativos do capim-annoni em plantas daninhas / Adriana Favaretto. – 2018.
[112] f. : il. color. ; 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Simone Meredith Scheffer-Basso.

Coorientador: Prof. Dr. Naylor Bastiani Perez.

Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, 2018.

1. Compostos bioativos. 2. Erva daninha. 3. Herbicidas.
4. Alelopatia. 5. Capim-annoni. I. Scheffer-Basso, Simone Meredith, orientadora, Perez, Naylor Bastiani, coorientador.
II. Título.

CDU: 632.954
632.51

ATA DE DEFESA DE TESE



A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a tese

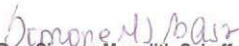
“Identificação e avaliação de compostos bioativos do capim-annoni em plantas daninhas”


Elaborada por

Adriana Favaretto

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
“Doutora em Agronomia – Área de Produção e Proteção de Plantas”

Aprovada em: 16/04/2018
Pela Comissão Examinadora


Dra. Simone Meredith Scheffer Basso
Presidente da Comissão Examinadora
Orientadora


Dr. Mauro Antonio Rizzardi
Universidade de Passo Fundo


Dr. Naylor Bastiani Perez
Embrapa – Pecuária Sul


Dra. Charise Dallazem Bertol
Universidade de Passo Fundo


Dr. Aldo Merotto Junior
Universidade Federal do Rio Grande do Sul


Dr. Edson Campanhola Bortoluzzi
Coordenador PPGAgro


Dr. Hélio Carlos Rocha
Diretor da Faculdade de Agronomia e Medicina
Veterinária, Universidade de Passo Fundo

DEDICATÓRIA



Ao meu avô Emílio (*in memoriam*), por ser meu exemplo de coragem, humildade e fé.

AGRADECIMENTOS

“Não há no mundo exagero mais belo que a gratidão” - (Jean de la Bruyere)

Toda minha gratidão para as pessoas mais importantes da minha vida, meus pais Miguel e Zelinda e meu irmão Everton. Obrigada por me apoiarem, me darem força e estarem sempre ao meu lado, por serem meu porto seguro e minhas asas nas vezes que faltou o chão. Vocês são tudo para mim!

À toda minha família, pelo apoio e pela confiança depositada em mim.

Agradeço à UPF e ao PPGAgro pela oportunidade. À todos os professores do PPGAgro pelos ensinamentos e aos funcionários pela prontidão e ajuda.

Agradeço à minha orientadora Simone M. S. Basso, por estar comigo nessa longa caminhada. Por abrir as portas do laboratório para mim há dez anos atrás, por me apresentar o universo da pesquisa, por todos os ensinamentos e pela orientação.

À Capes, pela concessão da bolsa de doutorado Capes-Embrapa e pela bolsa de Doutorado Sanduíche-PDSE.

Na pessoa do Naylor Perez, agradeço a Embrapa Pecuária Sul, pela parceria firmada no projeto Capes-Embrapa e pela troca de experiências.

Agradeço aos pesquisadores Charise Bertol, Naylor Perez, Aldo Merotto e Mauro Rizzardi pela disponibilidade em participar da banca de defesa e pelas valiosas contribuições.

Agradeço ao Centro de Pesquisa em Produtos Naturais do Departamento de Agricultura dos EUA, por terem possibilitado uma das maiores experiências durante o doutorado. Em especial, agradeço meus supervisores Dr. Stephen Duke e Dr. Charles Cantrell. Obrigada por serem tão atenciosos, me acolherem tão bem e me mostrarem que a humildade pode estar presente em “currículos brilhantes”. Serão para sempre um grande exemplo para mim. Agradeço também Amber, Solomon, Jason, Gloria, Bob e Linda, por terem sido pacientes, me acolhido e auxiliado sem hesitar. Obrigada pela agradável convivência. Sem vocês nada teria sido possível.

Agradeço a todos os professores, alunos e colegas que passaram pelo Laboratório Multiveg durante esse período. Obrigada pela convivência diária e pela troca de experiências. Em especial, as minhas eternas amigas: Vandí, Kalinca, Jossana e Sílvia. Vocês são parte dessa caminhada. Foram o ombro amigo para o desabafo, a cabeça que ajudou a desvendar os enigmas da pesquisa e as mãos que auxiliaram no trabalho quando as minhas não foram suficientes. Com certeza, amigas para toda vida. Seja na hora do mate ou do trabalho duro, nas alegrias ou nas dificuldades, vocês foram essenciais!

Agradeço aos colegas do PPGAgro, por compartilharem comigo, além de conhecimento, momentos de angústia e alegrias. Ao final dessa etapa tenho certeza que ganhei amigos para vida.

Agradeço a todos os meus amigos, sem nomes e sem distinções, porque, graças a Deus, sou presenteada com muitos. Os de longe e os de perto, os antigos e os recentes, aqueles de uma vida ou aqueles que foram essenciais em alguns dias. Obrigada por serem compreensivos quando não pude dedicar a vocês o tempo que mereciam. Obrigada por serem meu apoio, meus confidentes, por vibrarem comigo e por estarem lá quando eu mais precisei. Eu nada seria sem vocês.

E, por fim, agradeço a Deus, por ter colocado essas pessoas maravilhosas no meu caminho, por me dar força durante essa caminhada e por sempre guiar meus passos. Obrigada por permitir que essa conquista fosse possível. Por me mostrar que ao final o que mais importa é aquilo que somos, as pessoas que temos ao nosso lado e o quanto nos permitimos evoluir frente a cada desafio. *Gratidão!*

EPIGRAFE

“O conhecimento serve para encantar as pessoas, não para humilhá-las”

Mário Sergio Cortella

RESUMO

Favaretto, Adriana. Identificação e avaliação de compostos bioativos do capim-annoni em plantas daninhas. [112] f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2018.

Plantas alelopáticas, como o capim-annoni (*Eragrostis plana*), podem ser utilizadas no controle de plantas daninhas por fornecer compostos bioativos com atividade fitotóxica. Este trabalho teve como objetivo testar se o capim-annoni possui potencial herbicida, por meio de três experimentos. Experimento 1: foi testada a fitotoxicidade, isolada e conjunta, dos aleloquímicos catequina, epicatequina e ácidos cafeico, ferúlico, p-cumárico e vanílico, já identificados no capim-annoni, sobre sementes e plântulas de alface (*Lactuca sativa*). Verificou-se que todos os compostos foram fitotóxicos, principalmente, sobre plântulas. Apenas o ácido vanílico foi fitotóxico sobre a germinação de sementes. Catequina e epicatequina não agiram conjuntamente, o ácido cafeico potencializou a atividade do ácido p-cumárico e os ácidos cafeico e ferúlico foram antagônicos. Experimento 2: o fracionamento de extratos etanólicos de folhas de capim-annoni resultou nas frações hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol e hidroetanólica, que posteriormente foram utilizadas para realização de bioensaios de germinação e crescimento inicial com buva (*Conyza canadensis*), capim-amargoso (*Digitaria insularis*), picão-preto (*Bidens pilosa*) e a bioindicadora alface. A fitotoxicidade das frações foi observada tanto sobre a germinação quanto sobre o crescimento inicial das plantas receptoras. As frações hexano e diclorometano foram as mais fitotóxicas e a alface e o capim-amargoso foram as plantas receptoras mais sensíveis. Experimento 3: o fracionamento bioguiado permitiu o isolamento e identificação de três diterpenos inéditos em raízes de capim-annoni. Esses compostos inibiram o crescimento da lentilha d'água (*Lemna paucicostata*), com valores de IC₅₀ de 109, 200 e 59 µM, respectivamente. O ácido α-linolênico foi identificado em folhas de capim-annoni e causou necrose em lentilha d'água na concentração de 10 µM. Os resultados indicam que os aleloquímicos do capim-annoni agem tanto de forma conjunta quanto de forma isolada. Eles estão presentes nas frações hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol e hidroetanólica. Os compostos isolados, pela primeira vez, no capim-annoni devem ser testados quanto ao potencial herbicida.

Palavras-chave: 1. Compostos bioativos. 2. Diterpenos. 3. Fitotoxicidade. 4. Fracionamento bioguiado. 5. Plantas daninhas.

ABSTRACT

Favaretto, Adriana. Identification and evaluation of bioactive compounds of tough lovegrass on weeds. [112] f. Thesis (PhD in Agronomy) – University of Passo Fundo, Passo Fundo, 2018.

Allelopathic plants, such as tough lovegrass (*Eragrostis plana*), can be used to control weeds by supplying bioactive compounds with phytotoxic activity. This work aimed to test if the tough lovegrass has herbicide potential, by means of three experiments. Experiment 1: the separated and joint phytotoxicity of the catechin, epicatechin and the caffeic, ferulic, p-coumaric and vanillic acids, identified in the tough lovegrass, were tested on lettuce (*Lactuca sativa*) seeds and seedlings. All compounds were phytotoxic, especially on seedlings. Only vanillic acid was phytotoxic on seed germination. Catechin and epicatechin did not act together, caffeic acid potentialized p-coumaric acid activity and caffeic and ferulic acids were antagonistic. Experiment 2: the fractionation of ethanolic extracts from tough lovegrass leaves resulted in the hexane, dichloromethane, ethyl acetate, butanol and hydroethanolic fractions, which were later used to perform germination and initial growth bioassays with horseweed (*Conyza canadensis*), sourgrass (*Digitaria insularis*), hairy beggarticks (*Bidens pilosa*) and lettuce. The phytotoxicity of the fractions was observed both on germination and on initial growth of the tested plants. The hexane and dichloromethane fractions were the most phytotoxic and lettuce and sourgrass were the most susceptible plants. Experiment 3: bioguided fractionation allowed the isolation and identification of three diterpenes previously unknown in tough lovegrass roots. These compounds inhibited the growth of duckweed (*Lemna paucicostata*), with IC_{50} values of 109, 200 and 59 μ M, respectively. The α -linolenic acid was identified in leaves of tough lovegrass and caused necrosis in duckweed at 10 μ M. The results indicate that the allelochemicals from tough lovegrass act both jointly and in separate. They are present in the hexane, dichloromethane, ethyl acetate, butanol and hydroethanolic fractions. Compounds isolated for the first time in tough lovegrass should be tested for herbicide potential.

Key words: 1. Bioactive compounds. 2. Bioguided fractionation. 3. Diterpenes. 4. Phytotoxicity. 5. Weeds.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	<i>Capim-annoni (Eragrostis plana Nees)</i>	16
2.2	<i>Alelopatia</i>	19
2.2.1	Aplicabilidade da alelopatia no manejo de plantas daninhas	21
2.3	<i>Aleloquímicos com atividade herbicida</i>	22
2.4	<i>Fracionamento bioguiado e técnicas cromatográficas na descoberta de compostos bioativos</i>	24
3	CAPÍTULO I	29
3.1	<i>Resumo</i>	29
3.2	<i>Introdução</i>	29
3.3	<i>Material e Métodos</i>	31
3.3.1	Espécie receptora e aleloquímicos	31
3.3.2	Tratamentos e delineamento experimental	31
3.3.3	Procedimentos experimentais	32
3.3.4	Análise estatística	33
3.4	<i>Resultados</i>	33
3.4.1	Ação isolada de aleloquímicos	33
3.4.2	Ação conjunta de aleloquímicos	36
3.5	<i>Discussão</i>	37
3.6	<i>Conclusões</i>	42
4	CAPÍTULO II	43
4.1	<i>Resumo</i>	43
4.2	<i>Introdução</i>	43
4.3	<i>Material e Métodos</i>	45
4.3.1	Material vegetal e fracionamento	45
4.3.2	Tratamentos e delineamento experimental	46
4.3.3	Bioensaios de germinação	47
4.3.4	Bioensaio de crescimento inicial	47
4.3.5	Análise estatística	48
4.4	<i>Resultados</i>	48

4.4.1	Bioensaios de germinação	48
4.4.2	Crescimento inicial	52
4.5	<i>Discussão</i>	56
4.6	<i>Conclusões</i>	61
5	CAPÍTULO III	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5.1	<i>Resumo</i>	<i>Erro! Indicador não definido.</i>
5.2	<i>Introdução</i>	<i>Erro! Indicador não definido.</i>
5.3	<i>Material e Métodos</i>	<i>Erro! Indicador não definido.</i>
5.3.1	Químicos	Erro! Indicador não definido.
5.3.2	Material vegetal e processo de extração	Erro! Indicador não definido.
5.3.3	Bioensaio em alface (<i>Lactuca sativa</i>) e <i>Agrostis stolonifera</i>	Erro! Indicador não definido.
5.3.4	Fracionamento bioguiado	Erro! Indicador não definido.
5.3.5	Análise química e identificação dos compostos	Erro! Indicador não definido.
5.3.6	Bioensaio em lentilha d'água	Erro! Indicador não definido.
5.3.7	Ensaio de condutividade elétrica	Erro! Indicador não definido.
5.3.8	Bioensaios em fungos fitopatogênicos do gênero <i>Colletotrichum</i> spp.	Erro! Indicador não definido.
5.3.9	Análise estatística	Erro! Indicador não definido.
5.4	<i>Resultados e Discussão</i>	<i>Erro! Indicador não definido.</i>
5.4.1	Fracionamento bioguiado	Erro! Indicador não definido.
5.4.2	Identificação de compostos fitotóxicos	Erro! Indicador não definido.
5.4.3	Efeito fitotóxico dos compostos puros 1, 2, 3 e 4 em alface, <i>A. stolonifera</i> e lentilha d'água	Erro! Indicador não definido.
5.4.4	Ensaio de condutividade elétrica	Erro! Indicador não definido.
5.4.5	Bioensaio em <i>Colletotrichum</i> spp.	Erro! Indicador não definido.
5.5	<i>Conclusões</i>	<i>Erro! Indicador não definido.</i>
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
7	CONCLUSÃO GERAL	65
	REFERÊNCIAS	66
Apêndice I	<i>Dados suplementares de RMN para os compostos 1, 2 e 3</i>	<i>Erro! Indicador não definido.</i>

1 INTRODUÇÃO

O capim-annoni (*Eragrostis plana* Nees) é uma gramínea de origem africana, que, após ser introduzida acidentalmente no Rio Grande do Sul, foi disseminada propositalmente por se acreditar ser uma excelente opção forrageira, uma vez que sobrevivia a condições ambientais adversas. No entanto, pela baixa palatabilidade, a espécie passou a ser rejeitada pelos animais e as mesmas características que a elegeram como uma planta forrageira “milagrosa” são as que lhe conferem o elevado poder de invasão em novos habitats, de forma descontrolada. Aproximadamente setenta anos após a sua introdução no Rio Grande do Sul, que foi na década de 50, o capim-annoni ocupa extensas áreas territoriais no Brasil, Argentina e Uruguai e é a principal invasora das pastagens naturais do Bioma Pampa.

Os danos causados por essa espécie vão além da área física de invasão. O capim-annoni possui reconhecida vantagem competitiva em relação às espécies nativas, causando prejuízos à diversidade local, desequilíbrios no ecossistema e, conseqüentemente, danos ambientais irreparáveis. Economicamente, essa gramínea é responsável por perdas de ordem milionária na pecuária da Região Sul do Brasil.

Dada à problemática decorrente da invasão do capim-annoni, várias atividades de pesquisa tem sido implementadas na busca por estratégias de manejo e controle dessa espécie, enquanto outras procuram compreender os mecanismos que possibilitam o processo de invasão. A partir dos primeiros relatos sobre o impacto negativo do capim-annoni na biodiversidade florística dos campos nativos, foi verificado que a alelopatia seria um dos fatores responsáveis pela agressividade do capim-annoni frente às outras espécies. A partir disso, os estudos avançaram e alguns aleloquímicos foram identificados e quantificados nessa gramínea.

Plantas alelopáticas despertam atenção da comunidade científica, não apenas na busca de explicações ecológicas e no entendimento de inter-relações entre plantas, mas como uma ferramenta alternativa e sustentável no manejo de plantas daninhas. Talvez, uma das mais promissoras aplicações da alelopatia nessa área seja a seleção de aleloquímicos com atividade herbicida.

A pressão de seleção causada pelo uso intensivo de herbicidas na agricultura moderna resulta no aparecimento de plantas daninhas resistentes. Além do mais, os herbicidas utilizados erroneamente e de forma descontrolada ocasionam danos ambientais. Os aleloquímicos, por serem oriundos de produtos naturais, possuem estruturas químicas mais simples e degradação mais rápida. Além de serem fitotóxicos sobre um grande número de alvos celulares e moleculares, esses compostos podem suprir a carência de novos mecanismos de ação demandados pela indústria agroquímica. Os aleloquímicos com atividade herbicida podem tanto servir como fonte de moléculas naturais, quanto de estruturas-base para a síntese química de novos compostos.

Partindo do pressuposto que o capim-annoni é alelopático e possui diversidade de aleloquímicos em suas folhas e raízes, julgou-se importante descobrir se essa gramínea tem atividade herbicida. A hipótese é a de que os aleloquímicos e/ou frações presentes em capim-annoni tem atividade fitotóxica sobre sementes e plântulas de plantas daninhas.

Com base nisso, esta tese foi desenvolvida com o objetivo de verificar se o capim-annoni tem potencial herbicida. Especificamente, objetivou-se: 1) avaliar se aleloquímicos do capim-annoni tem ação isolada ou conjunta sobre sementes e plântulas de alface (*Lactuca sativa*); 2) avaliar se frações de folhas de capim-annoni são fitotóxicas para as plantas daninhas capim-amargoso (*Digitaria insularis*), buva (*Conyza canadenses*) e picão-preto (*Bidens pilosa*), além da bioindicadora alface e; 3) isolar e identificar os compostos fitotóxicos do capim-annoni por meio de bioensaio direcionado ao isolamento de compostos bioativos.

Este documento está organizado, além desta Introdução, da seguinte maneira: Aborda-se, em breve revisão da literatura, os principais aspectos teóricos e conceituais

acerca do capim-annoni, da alelopatia e sua aplicabilidade na área de plantas daninhas, e das técnicas utilizadas na identificação de compostos bioativos. Em seguida, apresenta-se, em três capítulos, as atividades de pesquisa realizadas para responder à questão central desta tese. O Capítulo I apresenta avaliação da ação isolada ou conjunta de aleloquímicos identificados no capim-annoni sobre sementes e plântulas de alface, por meio de avaliações sobre a germinação e o crescimento inicial. O Capítulo II investiga o efeito fitotóxico de frações de folhas de capim-annoni sobre a germinação e crescimento inicial de capim-amargoso, buva, picão-preto e alface. Por fim, o Capítulo III trata do isolamento e identificação dos compostos fitotóxicos do capim-annoni, por meio de ensaios bioguiados, usando de técnicas cromatográficas e ensaios biológicos. Para encerramento do trabalho, os capítulos são discutidos conjuntamente nas Considerações Finais e o trabalho é encerrado com uma Conclusão Geral.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Capim-annoni (*Eragrostis plana* Nees)

O capim-annoni é uma espécie perene, estival e cespitosa, originária da África do Sul, e é considerada a principal invasora das pastagens naturais da Região Sul do Brasil (MEDEIROS; FOCHT, 2007). Sua introdução data do final da década de 50, quando foi introduzida no Rio Grande do Sul como impureza em lotes de sementes de capim-de-rhodes (*Chloris gayana* Kunth) e capim-chorão [*Eragrostis curvula* (Schrader) Nees] (REIS, 1993). Por acreditar que a planta seria uma forrageira excelente e revolucionária, devido ao seu porte vigoroso e boa produção de massa verde e sementes, o Grupo Rural Annoni, de Sarandi-RS, passou a produzir e comercializar suas sementes (REIS; COELHO, 2000). Isso motivou pecuaristas a semeá-la em seus campos, contribuindo com a difusão da espécie (MEDEIROS; FOCHT, 2007).

Alguns anos mais tarde, percebeu-se que a espécie era muito fibrosa, não sendo considerada um bom alimento para o gado (REIS, 1993). No entanto, uma vez introduzido, o capim-annoni se dispersou pelo Rio Grande do Sul, fazendo-se presente em vastas extensões territoriais. A espécie se estabelece, preferencialmente, em campos degradados por pastejo, pisoteio excessivo ou cultivo intenso do solo e em margens de estradas (MEDEIROS; FOCHT, 2007). Uma vez estabelecida, ela responde pela drástica redução na frequência e riqueza de muitas espécies nativas e pela queda da produtividade e impactos econômicos na pecuária (REIS, 1993), com prejuízos à riqueza biológica do solo (MEDEIROS; FOCHT, 2007).

Além do Rio Grande do Sul, há relatos de que o capim-annoni também ocorre, mas em menor extensão, em Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Bahia, Tocantins, Pará, Distrito Federal (MEDEIROS; FOCHT, 2007).

Ele está presente na Ásia, Índia, América do Sul e Estados Unidos (BOECHAT; LONGHI-WAGNER, 2000; USDA, 2009).

De acordo com um modelo bioclimático para prever a expansão do capim-annoni, existem vários habitats considerados de alta aptidão para invasão dessa gramínea, como algumas regiões da Argentina e Uruguai, bem como do Sudeste, Nordeste e Norte do Brasil (BARBOSA et al., 2013). Além desses locais, estudos mostram que muitas áreas do Bioma Pampa, ainda não invadidas, têm condições adequadas para o estabelecimento do capim-annoni em curto prazo (GONZÁLEZ, 2017; CICCINET, 2017).

O capim-annoni possui inúmeros traços de planta invasora, que o conferem uma vantagem competitiva sobre espécies locais, como: alta persistência a cortes, resistência à pisoteio e geadas, elevada capacidade de rebrota, baixa aceitabilidade pelos animais (REIS, 1993), valor nutritivo aquém do desejável para ruminantes (NASCIMENTO; HALL, 1978), grande produção de sementes e ausência de inimigos naturais (REIS, 1993). Além disso, o efeito alelopático da espécie é um dos fatores decisivos para o sucesso da invasão (MEDEIROS; FOCHT, 2007).

O capim-annoni é autotóxico, ou seja, produz e libera compostos químicos capazes de inibir a germinação de suas sementes e o crescimento de suas plântulas (FAVARETTO; SCHEFFER-BASSO; PEREZ, 2017). A respeito de sua heterotoxicidade, vários trabalhos já foram conduzidos até o momento. Coelho (1986) foi pioneiro nesse assunto, constatando que o extrato da parte aérea do capim-annoni é alelopático sobre a germinação e crescimento de trevo-branco (*Trifolium repens* L.) e azevém (*Lolium multiflorum* Lam.). A partir de então, outros trabalhos continuaram na mesma linha de estudo, relatando o efeito alelopático do capim-annoni sobre grama-forquilha (*Paspalum notatum* Fluggé), capim-kazungula (*Setaria sphacelata* Schumach), macega-do-banhado (*Paspalum regnellii* Mez.) (FERREIRA; MEDEIROS; SOARES, 2008), leiteira (*Euphorbia heterophylla* L.), buva (*Conyza* spp.) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) (REIK, 2016). Extratos aquosos de folhas de capim-annoni são alelopáticos, ainda, para milho (*Zea mays* L.), aveia-branca (*Avena sativa* L.), trevo-vermelho

(*Trifolium pratense* L.), azevém e cornichão (*Lotus corniculatus* L.) (FIORENZA et al., 2016).

Além das folhas, as raízes de capim-annoni são alelopáticas para leiteira e corda-de-viola [*Ipomoea grandifolia* (Dammer) O'Donell] (SILVA, 2014). Ao comparar o efeito alelopático de extratos aquosos brutos de folhas e raízes de capim-annoni sobre trevo-branco, Favaretto et al. (2011) observaram maior potencial alelopático dos extratos de folha, sugerindo distinta composição química e/ou concentração de aleloquímicos nesses órgãos.

Por meio de cromatografia líquida de alta eficiência, Favaretto et al. (2015) constataram que extratos aquosos de folhas e raízes de capim-annoni não diferem quanto à quantidade de cumarina, mas catequina e epicatequina foram observadas apenas nas folhas. Observaram, ainda, que no extrato de folhas havia maior concentração dos ácidos cafeico, p-cumárico e vanílico, ao passo que no extrato de raiz o teor de ácido ferúlico superou o constatado no extrato de folhas. A quantidade desses compostos nas folhas de capim-annoni varia de acordo com a adubação nitrogenada e o estágio fenológico das plantas, com maiores concentrações dos ácidos cafeico, ferúlico, vanílico e p-cumárico em plantas florescidas e adubadas com 0 ou 200 kg de N/ha (CECCHIN et al., 2017).

Além dos compostos citados, Fiorenza et al. (2016) identificaram em extratos metanólicos elaborados com folhas de capim-annoni, quantidades variáveis de ácido gálico, ácido elágico, ácido clorogênico, rutina e quercetina. No óleo essencial do capim-annoni, Klein e Souza (2012) identificaram os seguintes compostos: 1-hidroxi-propan-2-ona, 2-metoxi-1-(2 itroetenil)-3-(fenilmetoxi)-benzeno, isobutilmetil-cetona-benziloxima, tetracloroetileno, 2-metil-octa-4,6-diin-3-ona, hepta-3,5-diin-2-ona, clorobenzeno, 2,6-di-terc-butil hidroxil-4-metil-benzeno, 1,6,7,8-tetrahidro-1,6-dimetil-4-oxo-4H-pirido, [1,2-a] pirimidina-3-carboxamida, 2,4-bis-(terc-butil)-6-metil-fenol, carbohidrazida.

A identificação de inúmeros aleloquímicos no capim-annoni, pertencentes a distintos grupos químicos, reitera a importância de prosseguir estudando a alelopatia da

espécie, que, além de interferir nas relações ecológicas, pode ser útil em agroecossistemas.

2.2 Alelopatia

O termo “alelopatia” (do grego *allelon*= mútuo, *pathos*= sofrer) foi definido por Rice (1984, p. 17) como qualquer efeito direto ou indireto, danoso ou benéfico, que uma planta (incluindo microrganismos) exerce sobre outra pela produção de compostos químicos liberados no ambiente.

Os metabólitos secundários responsáveis pelo efeito alelopático são chamados de aleloquímicos e tem basicamente quatro precursores: acetil coenzima A, ácido chiquímico, ácido mevalônico e deoxixilulose fosfato (RAZAVI, 2011). Baseado nesses precursores são descritas como classes de aleloquímicos: ácidos orgânicos solúveis em água, lactonas insaturadas simples, ácidos graxos de cadeia longa e poliacetilenos, naftoquinonas, antraquinonas e quinonas complexas, fenóis simples, ácido benzóico e derivados, ácido cinâmico e derivados, cumarinas, flavonoides, taninos condensados e hidrolisáveis, terpenoides e esteroides, aminoácidos e polipeptídeos, alcaloides e cianoidrinas, sulfetos e glicosídeos, purinas e nucleosídeos (RICE, 1984, p. 276). Dentre essas, os aleloquímicos podem ser agrupados em três principais classes químicas: terpenoides, compostos nitrogenados e compostos fenólicos (DE ALBUQUERQUE et al., 2010).

Os aleloquímicos podem ser produzidos nas folhas, caules, raízes e sementes (PARVEZ et al., 2003; WESTON; DUKE, 2003), com quantidades variáveis de um órgão para outro (HONG et al., 2004). As plantas que produzem aleloquímicos são chamadas de “doadoras”, enquanto as plantas para as quais os aleloquímicos são direcionados são chamadas de “alvo” ou “receptoras” (SOLTYS et al., 2013). Os compostos provenientes da planta doadora são liberados no ambiente por volatilização, lixiviação, exsudação radicial e decomposição de tecidos (INDERJIT; DAKSHINI, 1995). A toxicidade desses compostos pode variar em função da concentração, idade e estágio fenológico da planta,

clima, estação do ano e componentes químicos, físicos e microbiológicos do solo (INDERJIT; WEINER, 2001; GNIAZDOWSKA; BOGATEK, 2005).

Independente do mecanismo de liberação dos aleloquímicos, as plantas alelopáticas podem agir por duas formas: a) heterotoxicidade: quando os aleloquímicos liberados de uma planta interferem sobre a germinação e o crescimento de outra espécie e; b) autotoxicidade: quando há a produção de aleloquímicos que inibem a germinação e o crescimento de plantas da mesma espécie (WHITTAKER; FEENY, 1971).

Um passo básico para entender as propriedades alelopáticas de um composto é avaliar sua propriedade fitotóxica (BRAVO et al., 2013). A principal diferença entre alelopátia e fitotoxicidade consiste no modo de extração dos compostos. Nos estudos de alelopátia preconiza-se a extração aquosa do aleloquímico por processos que imitam fenômenos naturais, como chuva e lixiviação, mas em trabalhos de fitotoxicidade a extração é conduzida com solventes orgânicos ou por meio de processos físico-químicos (REIGOSA et al., 2013).

Uma demonstração de sucesso de interação alelopática tem três componentes: (1) ecológico: demonstração que isso existe na natureza; (2) químico: isolamento, identificação e caracterização de aleloquímicos envolvidos; e (3) fisiológico: identificação de mecanismos de interferência em nível bioquímico, fisiológico, celular e molecular (INDERJIT; WESTON, 2000). Independente da forma de atuação, deve-se considerar que os aleloquímicos podem agir isoladamente, sinergicamente ou antagonicamente com outras substâncias (GUSMAN; VIEIRA; VESTENA, 2012).

Depois de alcançarem as plantas receptoras, os aleloquímicos podem afetar indiretamente muitos processos fisiológicos e as respostas fenotípicas a um composto específico podem ser o resultado de um efeito secundário, mais do que um mecanismo primário de sua ação (DAYAN; ROMAGNI; DUKE, 2000). De acordo com Rizvi e Rizvi (1992), os aleloquímicos podem afetar estruturas citológicas e ultra-estruturais, hormônios, permeabilidade das membranas, absorção de minerais, movimento dos estômatos, síntese de pigmentos e fotossíntese, respiração, síntese de proteínas, atividade

enzimática, relações hídricas e material genético da planta. Considerando os inúmeros locais de ação dos aleloquímicos, destaca-se a possibilidade de sua utilização no manejo de plantas daninhas, principalmente como fonte de novos produtos químicos.

2.2.1 Aplicabilidade da alelopatia no manejo de plantas daninhas

Desde sua introdução nos anos 60, a área do controle químico das plantas daninhas tornou-se um campo de pesquisa dinâmico, requerendo constante inovação. A necessidade de compostos com amplo espectro de controle e adequado comportamento ambiental forçou os programas de química sintética a gerar inúmeros compostos, culminando em uma grande quantidade de moléculas biologicamente ativas que afetam relativamente poucos locais alvo (DUKE; ROMAGNI; DAYAN, 2000). De fato, aproximadamente 270 herbicidas disponíveis no mercado têm somente 17 modos de ação, com quase metade deles agindo em três locais: fotossistema II (FSII), enzima acetolactato sintase (ALS) e inibidor de protox (MACÍAS et al., 2007).

Além disso, com o advento da engenharia genética, passou-se a usar herbicidas não seletivos em culturas que tem sido geneticamente alteradas para tornar-se resistentes. Esse fator, juntamente com práticas agrícolas inadequadas acabaram levando à mudanças nas populações de plantas daninhas, ocasionando espécies naturalmente resistentes (DUKE; ROMAGNI; DAYAN, 2000). Com o aumento no número de casos de resistência, há necessidade de desenvolver novas classes químicas de herbicidas e, em particular, compostos com novos modos de ação e alvos moleculares (DAYAN; OWENS; DUKE, 2012). Essa demanda torna-se proeminente quando se considera o fato de que há mais de vinte anos foi lançado o último herbicida com um novo mecanismo de ação, que foi a inibição da enzima p-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (HPPD) (DUKE; DAYAN, 2013; DAYAN; DUKE, 2014).

Nesse sentido, a alelopatia pode auxiliar na descoberta de herbicidas (MACÍAS et al., 2008), seja na forma de compostos isolados ou como fonte de estruturas-base, a partir das quais modificações sintéticas podem originar novos produtos (DUKE; DAYAN, 2013).

2.3 Aleloquímicos com atividade herbicida

Embora a pesquisa na área da alelopatia visando à busca por herbicidas ainda seja um processo recente, existem alguns exemplos de compostos naturais com potencial de utilização para o controle de plantas daninhas. O caso mais bem sucedido de desenvolvimento de um herbicida a partir de um aleloquímico é o do leptospermone, originário da inflorescência de escova-de-garrafa (*Callistemon citrinus* Curtis) (DUKE; ROMAGNI; DAYAN, 2000). Esse composto causa o branqueamento dos tecidos das plantas a partir da disrupção na biossíntese de carotenoides e perda da clorofila, atuando sobre a enzima HPPD (DAYAN; OWENS; DUKE, 2012). A estrutura desse aleloquímico foi usada como base para o desenvolvimento do seu análogo sintético, a mesotriona, que é o ingrediente ativo do Callisto®, herbicida sistêmico, seletivo e pós-emergente, que pode controlar plantas daninhas resistentes à atrazina (SOLTYS et al., 2013). Tendo como base o leptospermone, as tricetonas são a única classe de herbicida comercial com local de ação que foi descoberto por intermédio de pesquisas com fitoquímicos (DUKE; DAYAN, 2013).

Os aleloquímicos 2-benzoxazolinona (BOA) e 6-metoxi-2,3-benzoxazolinona (MBOA), pertencentes à classe dos terpenoides benzoxazolinonas (MACÍAS et al., 2007), são exsudados em sua forma glicosilada, principalmente, pelas raízes de várias gramíneas (DAYAN; CANTRELL; DUKE, 2009). O modo de ação ainda é desconhecido, mas acredita-se que eles interferem no transporte de elétrons e na atividade da ATPase. Mesmo que esses compostos já tenham sido patenteados como herbicidas, até 2012 nenhum produto foi comercializado para essa finalidade (DAYAN; OWENS; DUKE, 2012).

O herbicida cinmetilina é análogo aos monoterpenos voláteis 1,4 e 1,8-cineol, presente em óleos essenciais de diversas espécies (*Laurus nobilis* L., *Salvia* spp., *Eucalyptus* spp., *Xanthoxylum rhetsa* DC e *Artemisia* spp.), e atua como inibidor da asparagina sintetase, em monocotiledôneas (ROMAGNI; DUKE; DAYAN, 2000). Esse composto é comercializado na Europa e Ásia (DUKE; ROMAGNI; DAYAN, 2000).

Já, o sorgoleone é uma benzoquinona lipídica exsudada de raízes do sorgo (*Sorghum bicolor* L.) e possui potencial herbicida, pois reduz o crescimento de plantas daninhas pela ação sobre o fotossistema II (PSII) (HEJL; KOSTER, 2004) e inibe a enzima H⁺-ATPase nas raízes. O composto afeta a absorção de íons e o balanço hídrico da planta, reduzindo a absorção de água (SOLTYS et al., 2013), similar à ação das triazinas (GNIAZDOWSKA; BOGATEK, 2005).

Por sua vez, a sarmentina foi isolada em extrato de frutos da pimenteira-longa (*Piper longum* L.) e patenteada como um herbicida, mas ainda não é comercializada. Sua fitotoxicidade se assemelha aos ácidos graxos de cadeia curta, o que o caracteriza como herbicida de amplo espectro, de contato, utilizado para dessecação (HUANG; ASOLKAR, 2011). Ele rompe a cutícula da planta, o que leva a danos na membrana celular, seguida pela rápida dessecação e morte dos tecidos (DAYAN; OWENS; DUKE, 2012).

Alguns dos compostos mais fitotóxicos derivados das plantas são os sesquiterpenos e as diterpeno-lactonas, tais como a artemisinina, extraída dos tricomas glandulares de folhas e flores da *Artemisia annua* (L.) (NGUYEN; ARSENAULT; WEATHERS, 2011) e o chaparrinone (DAYAN et al., 1999). No entanto, em sua forma natural, esses compostos não têm as características físico-químicas necessárias que se prestem ao uso de herbicidas comerciais. Eles são caros, muito reativos e mal absorvidos pelas plantas (GALINDO et al., 1999).

Uma das principais vantagens que os aleloquímicos podem oferecer à indústria agroquímica é a descoberta de novos mecanismos de ação (DAYAN; DUKE, 2014). Além disso, ressalta-se a diversidade de moléculas de organismos vivos, que fornece novas estruturas improváveis de serem produzidas por síntese tradicional (DUKE; ROMAGNI; DAYAN, 2000). A maioria dos compostos ativos naturais são moléculas não-halogenadas e solúveis em água, o que facilita sua aplicação sem adição de surfactantes. Eles possuem mais moléculas ricas em oxigênio e nitrogênio, com relativamente poucos átomos pesados. Essas propriedades diminuem a meia-vida química

no ambiente, prevenindo a acumulação do composto no solo e a eventual influência em organismos não alvo (SOLTYS et al., 2013).

Por outro lado, a complexidade das estruturas desse tipo de compostos torna-os mais reativos e instáveis. Portanto, a degradação rápida de um dos grupos químicos pode diminuir significativamente a bioatividade dos compostos, como um todo (SOLTYS et al., 2013). Essa mesma complexidade estrutural, uma vez modificada, pode ocasionar perdas nas propriedades físico-químicas requeridas para suficiente absorção, translocação e/ou estabilidade ambiental (DUKE, 2011), o que dificulta a produção econômica desses compostos. Aleloquímicos são caracterizados por múltiplos locais de ação em plantas, sem alta especificidade, ao contrário do que é observado em herbicidas sintéticos. Essa característica exclui a aplicação de um composto alelopático como um herbicida seletivo (BELZ; HURLE; DUKE, 2005).

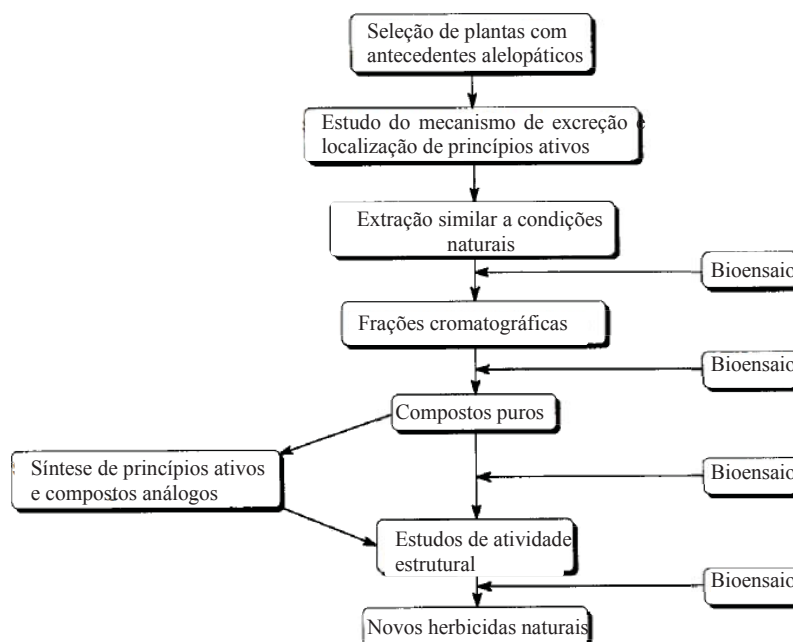
Apesar das limitações e dificuldades encontradas na pesquisa por aleloquímicos com atividade herbicida, há um crescente interesse nesse tipo de estudo, seja por parte de pesquisadores ou da indústria agroquímica. O aprimoramento de bioensaios e o avanço na utilização de técnicas cromatográficas facilita o processo de isolamento e obtenção de compostos bioativos.

2.4 Fracionamento bioguiado e técnicas cromatográficas na descoberta de compostos bioativos

Para que um composto natural com atividade herbicida seja identificado, várias etapas são requeridas. A primeira delas consiste em selecionar a fonte biológica de compostos, e nesse caso, destacam-se as plantas alelopáticas, por possuírem algum tipo de efeito comprovado. Depois da seleção da fonte biológica, tradicionalmente, se utiliza o método de bioensaios dirigidos ao isolamento (DUKE; ROMAGNI; DAYAN, 2000). Para tanto, são preparados extratos brutos provenientes do material vegetal. Então, os extratos mais ativos são selecionados e particionados por meio de técnicas cromatográficas, visando a semipurificação das substâncias a partir de sua polaridade. No sentido de localizar os princípios ativos, todos os extratos semipuros devem ser

submetidos aos bioensaios novamente (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998) e a fração mais ativa é refracionada até a purificação e identificação dos compostos responsáveis pela atividade detectada (MACÍAS et al., 2001). Esses produtos são estruturalmente caracterizados e submetidos a bioensaios no estado puro, para determinar seu efeito fitotóxico (MACÍAS et al., 2008) (Figura 1).

Figura 1 - Estratégia alelopática na busca por novos aleloquímicos com atividade herbicida



Fonte: Macías et al. (2001).

A purificação e identificação de substâncias ativas (aleloquímicos) é considerada um passo essencial em estudos de alelopátia (BLAIR et al., 2009). Porém, a exemplo do que acontece no Brasil, poucos trabalhos que são designados à avaliação do potencial alelopático de plantas, identificaram as moléculas ativas responsáveis por tais efeitos (REIGOSA et al., 2013). Essa falta de informação química nos trabalhos se deve ao fato de que os compostos geralmente ocorrem em misturas metabólicas complexas e em quantidades muito pequenas, criando assim um problema no processo de análise. Além disso, as ferramentas para identificar essas misturas foram disponibilizadas comercialmente somente a partir de 1975 (HAIG, 2001). No entanto, as novas tecnologias

permitem aumentar significativamente a velocidade da descoberta e avaliação da atividade biológica dos produtos naturais (DUKE; ROMAGNI; DAYAN, 2000). Métodos de separação química combinados com técnicas espectroscópicas são úteis no isolamento, quantificação e identificação de novas moléculas com potencial atividade alelopática e/ou herbicida (DE ALBUQUERQUE et al., 2011).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma das técnicas de separação cromatográfica mais difundidas em análises qualitativas e quantitativas. É uma técnica comum e bem estabelecida, capaz de separar misturas complexas, de baixo e alto peso molecular, bem como diferentes polaridades e propriedades ácido-básicas (NÚÑEZ et al., 2012). Apesar da versatilidade, alta resolução e boa detectabilidade, ela não é a técnica de quantificação mais apropriada para todos os tipos de compostos e não resolve sozinha todos os problemas relacionados ao aumento do número de analitos em matrizes muito complexas (NÚÑEZ et al., 2012), como são os extratos vegetais.

Para solucionar esse problema, os avanços na tecnologia de instrumentação analítica possibilitaram o acoplamento de métodos de separação e de detecção. Como alternativa surgiram as técnicas hífenadas, que acoplam duas ou mais técnicas analíticas com objetivo de obter ferramentas mais eficientes e rápidas em relação às técnicas convencionais.

As técnicas analíticas químicas mais empregadas na análise de produtos vegetais são a cromatografia e a espectrometria (RODRIGUES et al., 2006). A espectrometria de massas é baseada na produção de íons, que são subsequentemente separados ou filtrados de acordo com sua relação massa-carga (m/z) e detectados. Excelente seletividade pode ser obtida, o que é de extrema importância na análise quantitativa de traços (NIESSEN, 2003).

Já, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) é uma técnica hífenada que combina o poder de resolução da cromatografia com a especificidade de detecção de espectrometria de massas. Ela permite a identificação de compostos desconhecidos e a quantificação de compostos conhecidos e tem claras vantagens sobre

processos convencionais de elucidação estrutural, os quais são trabalhosos, consomem tempo e requerem grandes quantidades de amostras para análise (DUKE; ROMAGNI; DAYAN, 2000). Essa técnica tem a habilidade de separar compostos lábeis, sensíveis ao calor, não voláteis e de alto peso molecular, cobrindo aproximadamente 80% de todos os compostos conhecidos. Os 20% remanescentes são voláteis e mais estáveis (HAIG, 2001). Os compostos voláteis podem ser melhor separados em cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), que possui maior resolução cromatográfica quando comparada com LC-MS e tem a vantagem de possuir grandes bibliotecas comerciais contendo espectros de massa padrões (INDERJIT; NIESSEN, 2003).

As bibliotecas e bancos de dados, em termos de suas massas moleculares, permitem a utilização de uma metodologia denominada desreplicação. Essa técnica é empregada na identificação e diferenciação de compostos ou classes de compostos ativos, que já tenham sido descritos na literatura, contendo atividade idêntica ou similar àquela encontrada no extrato de interesse (NIESSEN, 2003). Esse processo é importante para priorizar o isolamento de compostos ativos inéditos e para agrupar amostras que contém perfis químicos semelhantes (BUSS; BUTLER, 2004) e evitar desperdício de trabalho com compostos que já tenham sido isolados e não possuem atividade biológica de interesse. Essa fase não requer nenhum experimento e pode reduzir grandemente a quantidade de trabalho requerida nas próximas etapas, além de evitar custos desnecessários.

Dentre as técnicas hífenadas, a cromatografia líquida acoplada à ressonância magnética nuclear (LC-RMN) é a menos sensível, mas fornece as mais úteis informações estruturais para elucidação estrutural de produtos naturais (SARKER; NAHAR, 2005, p. 241). Essa técnica é uma das ferramentas mais valiosas para a determinação estrutural de compostos orgânicos, contribuindo para o estabelecimento do esqueleto da molécula. Para a obtenção de espectros de RMN, submete-se a amostra a um campo magnético externo, de forma que determinados núcleos de massa ímpar ^1H , ^{13}C , ^{31}P , por exemplo, podem entrar em ressonância com a radiofrequência aplicada, absorvendo energia eletromagnética em frequências características para cada núcleo, conforme sua

vizinhança química. Os dados obtidos com esse método são muito importantes para a elucidação estrutural de praticamente toda as classes de produtos naturais, incluindo os metabólicos secundários vegetais. Os espectros de RMN de hidrogênio (^1H) e RMN de carbono (^{13}C) são os mais utilizados e a sua interpretação permite caracterizar o número e o tipo de átomos de H e C, em função da localização e do desdobramento dos sinais correspondentes à absorção de energia eletromagnética (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2001).

No processo final de purificação de um composto, pode ocorrer a cristalização do mesmo, ou seja, a formação de cristais ordenados que indicam a pureza máxima da substância e possibilitam análise por difração de raios X. Essa técnica, denominada de cristalografia estrutural, é a única capaz de fornecer, com precisão atômica, a estrutura tridimensional de uma molécula. É uma das técnicas de maior prestígio na comunidade científica para elucidação estrutural, devido a sua precisão e confiabilidade. Muito mais direta do que RMN, a difração de raios X permite definir a posição tridimensional dos átomos e pode ser usada para determinar, confirmar ou completar estruturas moleculares (FLORENCE; SHANKLAND; JOHNSTON, 2005, p. 276).

Embora as técnicas cromatográficas sejam essenciais para a identificação e isolamento de compostos com atividade biológica, o trabalho não termina com a descoberta de um composto que tem boa atividade herbicida. A molécula pode ser muito complexa, ter propriedades físico-químicas subótimas, ser tóxica para animais ou ter uma eficácia limitada (DUKE; ROMAGNI; DAYAN, 2000). Dessa forma, alguns pontos precisam ser ponderados antes de considerar aleloquímicos como herbicidas naturais: (1) primeiramente, experimentos de laboratório e de campo são exclusivamente necessários para estudar a interação com várias propriedades físicas, químicas e biológicas do solo; (2) o movimento, modo de ação e seletividade devem ser amplamente estudados; e (3) o impacto do uso dos aleloquímicos do ponto de vista agrônomo e ambiental precisa receber especial atenção (BHADORIA, 2011).

3 CAPÍTULO I

Fitotoxicidade isolada e conjunta de aleloquímicos presentes em *Eragrostis plana* Nees

3.1 Resumo

O capim-annoni (*Eragrostis plana*) possui aleloquímicos pertencentes ao grupo dos ácidos fenólicos e das procianidinas. No entanto, a concentração desses aleloquímicos requerida para causar fitotoxicidade e o efeito da ação conjunta quanto à atividade alelopática não é conhecida. Este estudo foi realizado com o objetivo de verificar se aleloquímicos do capim-annoni, isolados ou em combinação, são fitotóxicos. Os ácidos cafeico, ferúlico, p-cumárico e vanílico, e as procianidinas catequina e epicatequina foram aplicados sobre sementes de alface (*Lactuca sativa*), em três concentrações, determinadas de acordo com a quantidade desses compostos em folhas do capim-annoni. Avaliou-se a ação isolada e conjunta desses aleloquímicos, agrupando-os em pares, para identificar a ocorrência de sinergismo ou antagonismo. Avaliou-se a germinação e índice de velocidade de germinação das sementes, e, nas plântulas, o comprimento de raiz e parte aérea, mortalidade e anormalidades. A germinação foi reduzida apenas pelo ácido vanílico, mas o índice de velocidade de germinação sofreu decréscimo sob ação desse ácido e dos ácidos cafeico e p-cumárico. Nas plântulas, os ácidos ferúlico e vanílico aumentaram o percentual de mortalidade e catequina, epicatequina e ácido cafeico elevaram o percentual de anormalidades. Observou-se efeito antagônico entre os ácidos cafeico e ferúlico quanto o efeito sobre a germinação e o comprimento da raiz e parte aérea. Para as demais combinações, o efeito variou de acordo com a proporção de cada composto. Não ocorre ação conjunta entre as procianidinas catequina e epicatequina. Em conclusão, os aleloquímicos do capim-annoni são fitotóxicos e agem isolada e/ou conjuntamente, embora não expliquem, em sua totalidade, a atividade alelopática dessa gramínea.

Palavras-chave: 1. Ácidos fenólicos. 2. Antagonismo. 3. Capim-annoni. 4. Procianidinas. 5. Sinergismo.

3.2 Introdução

O capim-annoni (*Eragrostis plana* Nees) é uma gramínea africana responsável por causar impactos econômicos e por modificar a estrutura da comunidade vegetal, tornando-se, assim, a principal invasora das pastagens naturais do sul do Brasil. Possivelmente, o efeito alelopático da espécie é um dos fatores decisivos para o sucesso da invasão (MEDEIROS; FOCHT, 2007). Esse efeito foi evidenciado em trevo-branco

(*Trifolium repens* L.), azevém (*Lolium multiflorum* Lam.), cornichão (*Lotus corniculatus* L.), grama-forquilha (*Paspalum notatum* Fluggé), capim-kazungula (*Setaria sphacelata* Schumach), milho (*Zea mays* L.), aveia-branca (*Avena sativa* L.), trevo-vermelho (*Trifolium pratense* L.) e no próprio capim-annoni (COELHO, 1986; MEDEIROS; SOARES, 2008; FAVARETTO et al., 2011; FERREIRA; FIORENZA et al., 2016).

Alguns aleloquímicos, como os ácidos cafeico, ferúlico, p-cumárico e vanílico, catequina e epicatequina, são sintetizados pelo capim-annoni (FAVARETTO et al., 2015). No entanto, ainda não se sabe se esses compostos são isoladamente alelopáticos ou se há efeito conjunto entre eles. Uma vez que os efeitos promovidos pelas substâncias, testadas juntas, forem de maior magnitude do que quando testadas isoladamente, pode-se afirmar que há sinergismo entre elas. Caso contrário, se os efeitos forem de menor intensidade, pode-se inferir pela existência de antagonismo (SOUZA FILHO; GUILHON; SANTOS; 2010).

Os compostos fenólicos são a classe de aleloquímicos mais comuns e importantes nas plantas, razão pela qual são objeto de estudos químicos, biológicos e agrícolas (LI et al., 2010), com foco especial em seu potencial fitotóxico (BLUM, 1996; INDERJIT, 1996). Geralmente, as concentrações individuais de ácidos fenólicos encontradas no solo e nas plantas estão abaixo dos níveis requeridos para inibição da germinação e crescimento (LYU et al., 1990). Além do mais, defende-se que, praticamente, toda atividade alelopática se deve à mistura de dois ou mais compostos e, provavelmente, não há casos em que o efeito possa ser explicado por um único aleloquímico (EINHELLIG, 1995). Frequentemente, os ácidos fenólicos são encontrados juntos em muitas plantas e no solo e, embora sejam fitotóxicos, há poucas evidências sobre os efeitos que esses fenóis podem ter quando estão em combinação (RASMUSSEN; EINHELLIG, 1977). Dessa forma, é importante estabelecer se eles agem isolada ou conjuntamente.

Neste trabalho objetivou-se testar se aleloquímicos presentes em capim-annoni tem ação isolada ou conjunta sobre sementes e plântulas. Especificamente, foi acessado o potencial dessas substâncias de: 1) inibir e/ou retardar a germinação de sementes; 2) afetar a sobrevivência, o crescimento e a morfologia das plântulas de alface.

3.3 Material e Métodos

3.3.1 Espécie receptora e aleloquímicos

Para a condução dos experimentos foi adotada como espécie receptora a alface (*Lactuca sativa* L.), considerada uma planta sensível e indicadora da atividade fitotóxica de aleloquímicos (MACÍAS; CASTELLANO; MOLINILLO, 2000). Foram usadas sementes da cv. Monica SF 31, com percentual de germinação $\geq 92\%$.

Os seguintes compostos, de grau analítico e com percentual de pureza entre 97% e 99%, foram obtidos comercialmente da empresa Sigma-Aldrich: ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido p-cumárico, ácido vanílico, catequina e epicatequina.

3.3.2 Tratamentos e delineamento experimental

Foram conduzidos dois bioensaios: I) Ação isolada dos aleloquímicos e, II) Ação conjunta dos aleloquímicos. Para ambos, os tratamentos foram alocados em delineamento completamente casualizado, com quatro repetições. As unidades experimentais foram caixas Gerbox revestidas com papel germitest.

No bioensaio I foram testados 18 tratamentos qualitativos compostos pela combinação de aleloquímico e concentração (Tabela 1), um tratamento adicional e um tratamento controle. A escolha da concentração de referência (R) de cada aleloquímico foi com base no estudo de Favaretto et al. (2015), que determinaram a quantidade dos compostos presentes nas folhas do capim-annoni. O tratamento adicional, denominado controle-solvente, foi composto por etanol+água (1:1, v/v), a fim de eliminar o efeito ocasionado pelo solvente, e o tratamento-controle foi água destilada.

No bioensaio II, os tratamentos consistiram de combinações binárias entre todos os compostos referidos na Tabela 1. Essas combinações foram testadas nas proporções de 3:1, 1:1 e 1:3, além dos compostos puros. Estabeleceu-se a concentração de 20 ml/L como limite para todas as combinações. Dessa forma, as substâncias puras foram utilizadas na

concentração de 20 ml/L, e as somas de todas as combinações foram sempre iguais a 20 ml/L.

Tabela 1 - Composição dos tratamentos testados no bioensaio I. Passo Fundo, 2016

Aleloquímico	Concentração (mg/100 mL)		
	R ⁽¹⁾	3R ⁽²⁾	5R ⁽³⁾
Ácido cafeico (CAF)	0,95	2,85	4,75
Ácido ferúlico (FER)	0,30	0,90	1,50
Ácido p-cumárico (CUM)	4,70	14,10	23,50
Ácido vanílico (VAN)	2,10	6,30	10,50
Catequina (CAT)	47,80	143,40	239,00
Epicatequina (EPI)	21,10	63,30	105,50

(1) R (referência) = quantidade do composto presente em 5 g de MS de folhas de capim-annoni. (2) 3R = quantidade do composto presente em 15 g de MS de folhas de capim-annoni. (3) = quantidade do composto presente em 25 g de MS de folhas de capim-annoni.

3.3.3 Procedimentos experimentais

Nos dois bioensaios, os tratamentos foram dissolvidos em etanol a fim de atingir a concentração desejada. Posteriormente, foram aplicados 10 mL sobre duas folhas de papel de germinação presentes em cada uma das caixas gerbox. Após completa evaporação do solvente (etanol), cada unidade experimental recebeu 10 mL de água destilada. O mesmo procedimento foi realizado para o tratamento controle-solvente. Então, as unidades experimentais receberam 50 sementes de alface e foram mantidas em câmara de germinação, em temperatura de 20 °C e fotoperíodo de 12 horas, por dez dias. A germinação foi monitorada diariamente, considerando-se germinadas as sementes com aproximadamente 2 mm de protrusão radicial. Foram avaliados os atributos de germinação e índice de velocidade de germinação (IVG), segundo Ranal e Santana (2006).

Por ocasião do final do bioensaio de germinação, após dez dias de crescimento das plântulas de alface na presença dos tratamentos, realizou-se a contagem de plântulas normais, anormais e mortas. Então, cinco plântulas homogêneas de cada caixa gerbox foram mensuradas quanto ao comprimento de raiz e parte aérea. Os resultados foram

expressos em percentual de inibição e interpretados de acordo com Oliveira et al. (2012), segundo os quais, valores positivos indicam estímulo e valores negativos indicam inibição.

3.3.4 Análise estatística

Os dados oriundos do bioensaio I foram submetidos à análise de variância, considerando o modelo fatorial diferenciado, com um tratamento adicional (controle-solvente) + tratamento testemunha, pelo qual o teste de Dunnett ($p \leq 0,05$) compara as médias do tratamento com as médias do controle.

Para avaliar a ação conjunta dos aleloquímicos foi utilizado modelo proposto por Souza Filho (2006). De acordo com o qual, há a possibilidade de quatro combinações de resultados. Quando toda e qualquer combinação entre as duas substâncias produz efeitos alelopáticos inibitórios sempre superiores àqueles produzidos pelas substâncias puras, admite-se a existência de sinergismo entre as substâncias. Por outro lado, quando substâncias puras tem maior potencial inibitório do que qualquer uma das combinações estabelecidas, assume-se a ocorrência de antagonismo. Se as combinações 3:1 e 1:1 produzem efeitos inibitórios mais intensos do que aqueles produzidos pela substância S1 pura, porém em todas as combinações entre S1 e S2 as inibições são de magnitude inferior à daquelas promovidas pela substância S2; nesse caso propõe-se que a substância S2 potencializa os efeitos de S1. Quando o comportamento é inverso ao anteriormente citado, a substância S1 potencializa a atividade da substância S2.

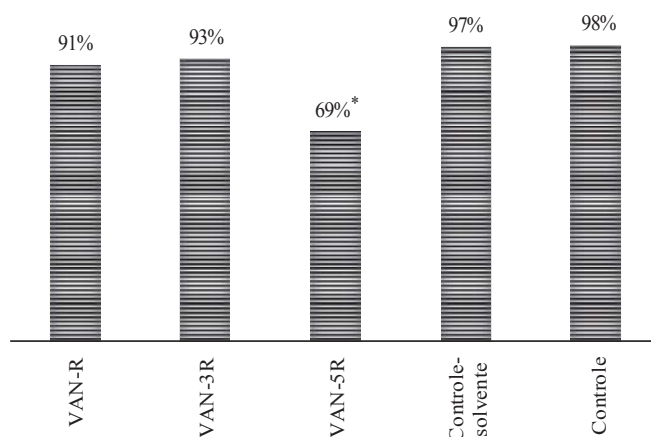
3.4 Resultados

3.4.1 Ação isolada de aleloquímicos

Os aleloquímicos do capim-annoni interferiram na germinação de sementes de alface em diferente magnitude de acordo com a concentração testada e a medida de germinação considerada. De todos os compostos testados, apenas o ácido vanílico teve efeito sobre a germinação de alface. O tratamento VAN-5R reduziu a germinação em

29% comparado ao controle (Figura 1). Por outro lado, adicionalmente ao ácido vanílico, os ácidos cafeico e p-cumárico reduziram o IVG (Tabela 2).

Figura 1 - Germinação de sementes de alface (1) submetidas a diferentes concentrações de ácido vanílico. Passo Fundo, 2016



Fonte: Dados do autor.

Notas: Asterisco (*) indica que o valor diferiu do controle pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$).

VAN-R (referência) = quantidade do composto presente em 5 g de MS de capim-annoni. VAN-3R = quantidade do composto presente em 15 g de MS de capim-annoni. VAN-5R = quantidade do composto presente em 25 g de MS de capim-annoni. Controle-solvente: água+etanol. Controle: água destilada.

Tabela 2 - Índice de velocidade de germinação de sementes de alface tratadas com três concentrações de aleloquímicos em relação ao tratamento-controle (1). Passo Fundo, 2016

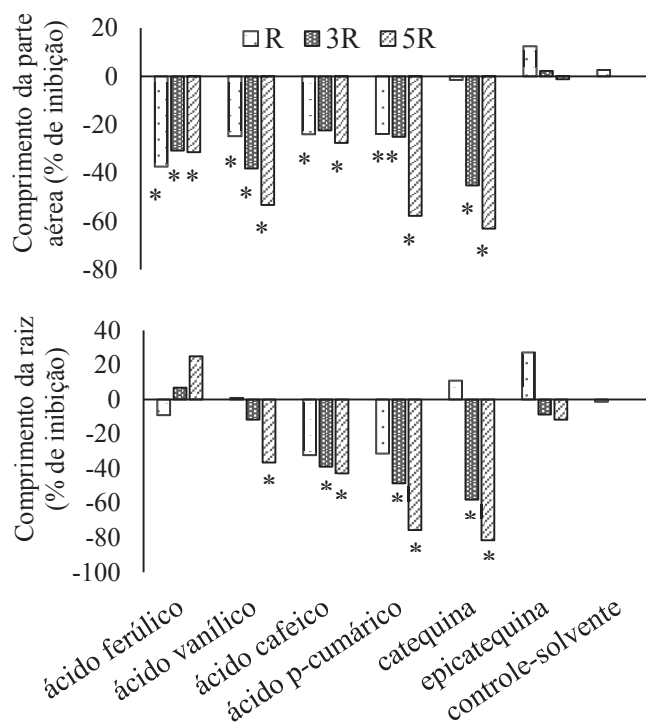
Aleloquímico	Concentração (mg/100 mL)		
	R ⁽²⁾	3R ⁽³⁾	5R ⁽⁴⁾
Ácido ferúlico	34,6	32,7	33,2
Ácido vanílico	29,8*	31,8	19,7*
Ácido cafeico	29,8*	27,4*	25,5*
Ácido p-cumárico	28,3*	29,7*	22,3*
Catequina	43,2	39,7	39,8
Epicatequina	48,9	49,1	49,5
Controle-solvente	42,5	42,5	42,5

Notas: Asterisco (*) indica diferença em relação ao tratamento-controle (IVG= 42,2), pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$).

(1) Tratamento-controle (água destilada). (2) R (referência) = quantidade do composto presente em 5 g de MS de capim-annoni. (3) 3R = quantidade do composto presente em 15 g de MS de capim-annoni. (4) = quantidade do composto presente em 25 g de MS de capim-annoni.

Além da germinação, os aleloquímicos afetaram o crescimento das plântulas, conforme verificado pela inibição em relação ao tratamento-controle (Figura 2). Os ácidos ferúlico, vanílico, p-cumárico e cafeico reduziram o crescimento da parte aérea das plântulas, independentemente da concentração testada. A catequina inibiu o crescimento da parte aérea nas concentrações 3R e 5R. O comprimento da raiz foi menos sensível aos aleloquímicos do que o da parte aérea, inibido pela catequina e pelos ácidos cafeico e p-cumárico nas concentrações 3R e 5R e pelo ácido vanílico apenas na concentração 5R (Figura 2).

Figura 2 - Inibição do crescimento (1) da parte aérea e da raiz primária de plântulas de alface tratadas com três concentrações de aleloquímicos (2). Passo Fundo, 2016



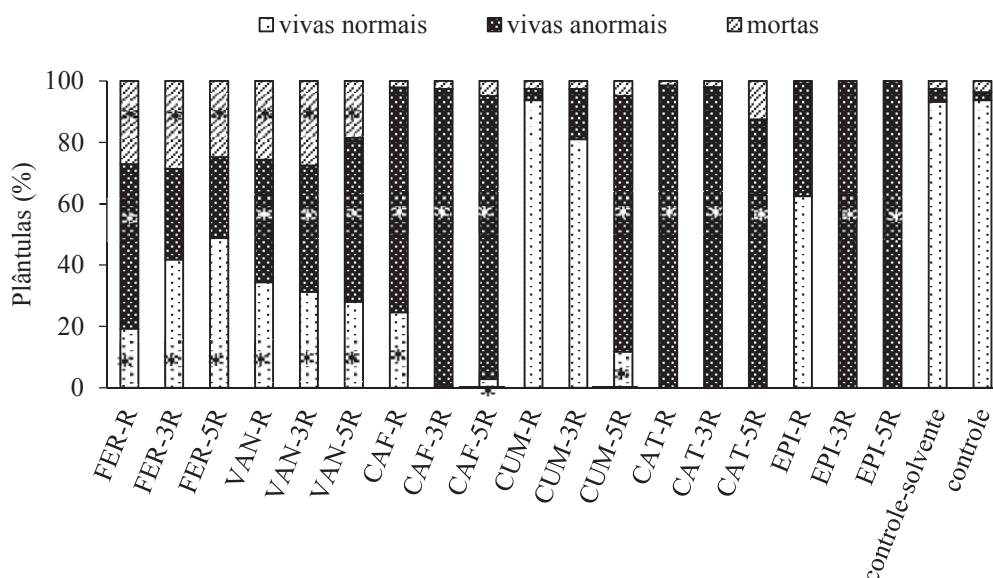
Nota: Asterisco (*) junto às colunas indica diferença em relação ao tratamento-controle (água destilada), pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$).

(1) Inibição (%) = $[(XT - XC) / XC] \times 100$, onde: xt = valor obtido com o tratamento aleloquímico; xc = valor verificado com a aplicação do tratamento-controle. O valor "0" representa o controle.

(2) R (referência) = quantidade do composto presente em 5 g de MS de capim-annoni; 3R = quantidade do composto presente em 15 g de MS de capim-annoni; 5R = quantidade do composto presente em 25 g de MS de capim-annoni.

A mortalidade de plântulas nos tratamentos à base dos ácidos ferúlico e vanílico, em todas as concentrações testadas, diferiu do controle (Figura 3). As anormalidades, como necrose radicial, ausência de raízes secundárias, engrossamento e encurtamento da raiz primária, necrose e deformidades na parte aérea, foram elevadas significativamente pelos tratamentos com catequina e ácidos cafeico e vanílico, em todas as concentrações testadas. Para a epicatequina e o ácido p-cumárico, este efeito foi observado apenas nas maiores concentrações testadas (Figura 3). Os tratamentos CUM-R, CUM-3R e EPI-R não afetaram o percentual de anormalidade e mortalidade das plântulas ($p \leq 0,05$).

Figura 3 - Proporção de plântulas de alface (1) normais, anormais e mortas submetidas à distintas concentrações de aleloquímicos (2). Passo Fundo, 2016



Nota: Asterisco (*) junto às colunas indica diferença em relação ao tratamento-controle (água destilada), pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$).

(1) Em porcentagem

(2) R (referência) = quantidade do composto presente em 5 g de MS de capim-annoni; 3R = quantidade do composto presente em 15 g de MS de capim-annoni; 5R = quantidade do composto presente em 25 g de MS de capim-annoni.

3.4.2 Ação conjunta de aleloquímicos

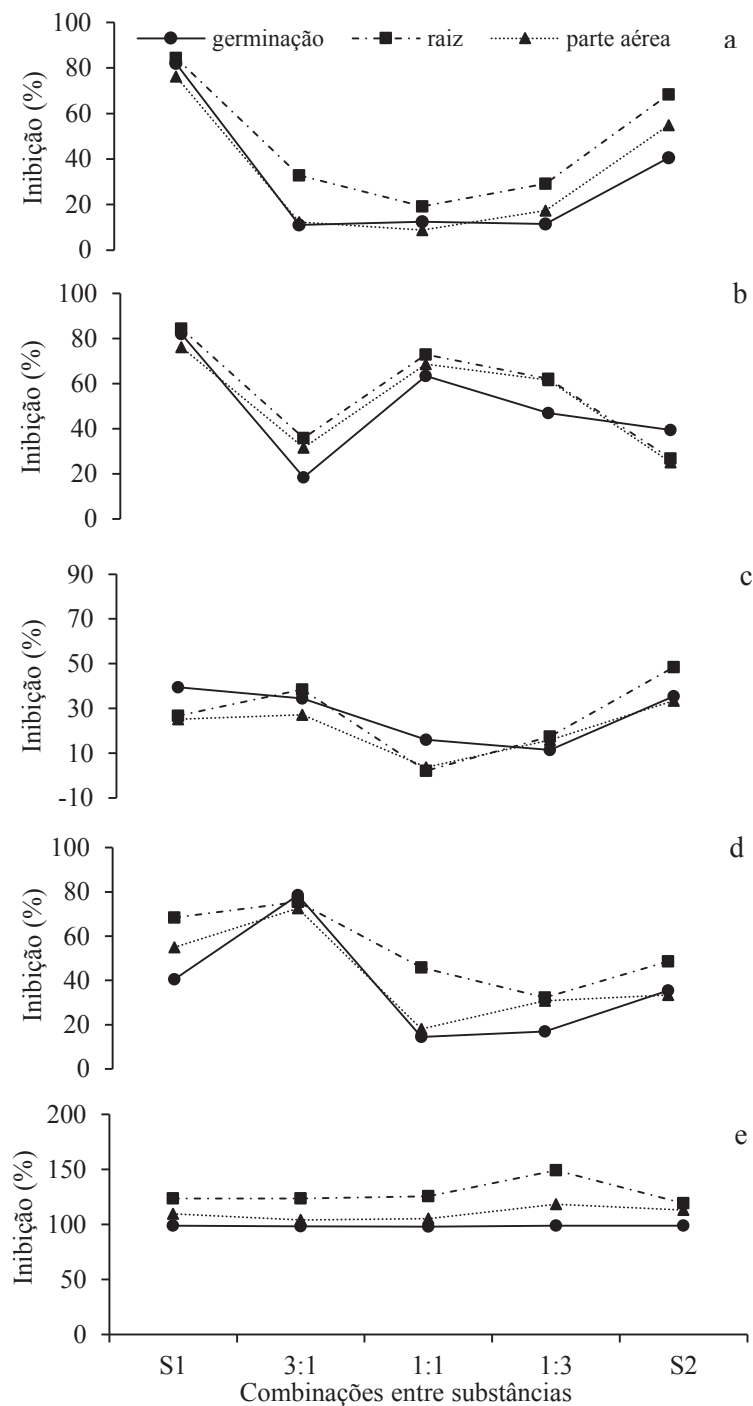
Com base no modelo teórico proposto por Souza Filho (2006), verificou-se que ocorreu ação conjunta dos aleloquímicos nas seguintes combinações: ácidos cafeico +

ferúlico; ácidos cafeico + p-cumárico; ácidos cafeico + vanílico; ácidos p-cumárico + vanílico; ácidos ferúlico + vanílico; ácidos ferúlico + p-cumárico e catequina + epicatequina. O comportamento observado entre as diferentes combinações foi semelhante para porcentagem de inibição da germinação, do comprimento da parte aérea e da raiz. Verificou-se antagonismo entre os ácidos cafeico e ferúlico (Figura 4a). As proporções 1:1 e 1:3 dos ácidos cafeico e p-cumárico foram mais inibitórias do que o ácido p-cumárico puro, mas menos inibitórias do que o ácido cafeico puro, deixando claro que o ácido cafeico potencializa a atividade do ácido p-cumárico (Figura 4b). Para as combinações entre os ácidos p-cumárico + vanílico e ferúlico + vanílico, não foram observados comportamentos que indicam a presença de sinergismo e/ou antagonismo, mas sim uma variação de acordo com a concentração dos compostos nas proporções testadas (Figuras 4c e 4d). Catequina e epicatequina não agem conjuntamente (Figura 4e).

3.5 Discussão

A fitotoxicidade dos aleloquímicos provenientes do capim-annoni varia de acordo com o atributo avaliado. Observou-se que o percentual de germinação foi influenciado apenas pelo ácido vanílico, enquanto que o IVG foi influenciado, também, pelos ácidos cafeico e p-cumárico (Figura 1, Tabela 2). A germinabilidade é pouco sensível aos aleloquímicos, ao contrário do IVG, pois muitos compostos permitem que a semente germine, mas retardam esse processo (OLIVEIRA; BORGHETTI; FERREIRA, 2004; OLIVEIRA et al., 2012). Quanto se utiliza espécies de germinação rápida, como a alface, isso é ainda mais relevante, pelo pouco tempo de contato entre o aleloquímico e a semente antes que essa germine.

Figura 4 - Fitotoxicidade de aleloquímicos isolados e em combinação sobre a germinação de sementes e o crescimento de raiz e parte aérea de plântulas de alfaca. Ácidos cafeico + ferúlico (a); ácidos cafeico + p-cumárico (b); ácidos p-cumárico + vanílico (c); ácidos ferúlico + vanílico (d) e catequina + epicatequina (e). Passo Fundo, 2016



Nota: S1: substância 1 pura; S2: substância 2 pura.

O efeito alelopático dos ácidos fenólicos sobre sementes de plantas daninhas já foi estudado, denotando efeito inibitório do ácido vanílico na germinação de caruru (*Amaranthus retroflexus* L.), tanchagem (*Plantago lanceolata* L.) e labaga (*Rumex crispus* L.) (REIGOSA; SOUTO; GONZÁLEZ, 1999), além do sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] (RASMUSSEN, 1979). Esse ácido foi encontrado em sementes não viáveis de soja [*Glycine max* (L.) Merrill], mas ausente em sementes viáveis, levando à hipótese de que ele pode ser responsável pela inibição da germinação (SATHIYAMOORTHY, 1990). No entanto, o mecanismo de ação desse aleloquímico ainda é desconhecido, não sendo possível inferir sobre como atua na germinação.

A concentração de um composto está entre os fatores que podem interferir na atividade fitotóxica. Para o ácido ferúlico, por exemplo, reportou-se que somente a concentração de 10 mM inibiu a germinação de sementes de tanchagem, labaga, caruru e quenopódio (*Chenopodium album* L.) (REIGOSA; SOUTO; GONZÁLEZ, 1999). No capim-annoni, este composto está na concentração de 0,26 mM (Tabela 1). Portanto, nos casos em que não houve efeito dos aleloquímicos testados sobre a germinação, pode-se supor que a concentração testada esteve abaixo daquela necessária para causar qualquer efeito.

Nem sempre os aleloquímicos vão interferir na germinação. Muitas vezes, o crescimento das plântulas pode ser mais sensível. Dessa forma, a avaliação do crescimento das plântulas é um instrumento valioso, uma vez que os aleloquímicos induzem o aparecimento de plântulas anormais (FERREIRA; AQUILA, 2000). Em geral, os ácidos fenólicos afetam mais o crescimento das plântulas do que a germinação (REIGOSA; SOUTO; GONZÁLEZ, 1999).

Aleloquímicos afetam indiretamente muitos processos fisiológicos e as respostas fenotípicas à um composto específico podem ser o resultado de um efeito secundário, mais do que um mecanismo primário de sua ação (DAYAN; ROMAGNI; DUKE, 2000). Assim sendo, o efeito de aleloquímicos sobre a germinação e/ou desenvolvimento da planta são manifestações secundárias de efeitos ocorridos a nível molecular e celular inicialmente (FERREIRA; AQUILA, 2000). Perturbações na membrana são

frequentemente reportadas como os locais de ação primários de muitos aleloquímicos, o que desencadeia sequentes modificações nos processos fisiológicos das plantas (SANTOS; FERRARESE; FERRARESE-FILHO, 2008).

Os ácidos cafeico, ferúlico, p-cumárico, cinâmico e vanílico, por exemplo, inibiram o crescimento da soja, reduziram os produtos fotossintéticos e o conteúdo de clorofila (PATTERSON, 1981). O ácido ferúlico pode inibir a síntese de proteínas (DUKE; DAYAN, 2006, p. 511-536), reduzir o uso da água, inibir a expansão foliar e o comprimento da raiz, diminuir nas taxas de fotossíntese e absorção de nutrientes (EINHELLIG, 1995, p. 96-116). O ácido cafeico inibe o transporte de elétrons (ZHOU; YU, 2006, p. 127-139), a atividade da fosforilase e da peroxidase (BATISH et al., 2008). Ainda, este ácido induz a geração de espécies reativas de oxigênio, resultando em mudanças na atividade da peroxidase, o que causa redução na rizogênese e suprime o crescimento da raiz e hipocótilo das plantas (DEVI, 1992). O ácido p-cumárico inibiu a taxa fotossintética e a respiração em sorgo (DEMOS et al., 1975). A catequina e a epicatequina são reportadas como aleloquímicos (DUKE et al., 2009; LÔBO et al., 2008), mas não se tem conhecimento sobre seus locais de ação.

A compreensão do atual âmbito dos efeitos alelopáticos requer a investigação, não somente aleloquímicos puros, mas também seus efeitos combinados, pois a atividade alelopática se deve quase sempre à presença simultânea de vários compostos (RIAL et al., 2016). A modificação do efeito de uma fitotoxina na presença de outro composto ocorre de várias maneiras. Se os locais ou modos de ação de duas toxinas são similares, o efeito nos processos da planta pela mistura dessas fitotoxinas poderia ser antagônico, quando comparado com o efeito combinado de compostos individuais. Nesse trabalho, isso foi representado pela combinação dos ácidos cafeico + ferúlico. Se os locais ou modos de ação são diferentes, a resposta provavelmente será a soma múltipla dos seus efeitos individuais (BLUM, 1996). Ácidos fenólicos tem essencialmente o mesmo local de ação, e assim, a ação não poderia ser sinérgica, a menos que os locais fossem diferentes ou os compostos interagissem formando um novo composto (INDERJIT; STREIBIG; OLOFSDOTTER, 2002). Para esses autores, a ação conjunta dos fenólicos depende da concentração dos compostos na mistura, e estes podem agir antagonicamente em altas

concentrações e aditivamente em baixas concentrações. A diferença de ação de acordo com a concentração testada pode ser exemplificada aqui pelas combinações entre os ácidos cafeico x p-cumárico, p-cumárico x vanílico e ferúlico x vanílico.

A afinidade de cada aleloquímico pela membrana pode ser diferente para cada composto. Quando um composto tem maior afinidade, mais moléculas do mesmo composto irão capturar mais locais, resultando em maior atividade, o que explica as diferenças na fitotoxicidade. Quando há mais locais disponíveis do que o número total de moléculas cercando uma membrana, o efeito é aditivo para misturas (encontrado em baixas concentrações). No entanto, se há mais moléculas do que locais de membranas, o composto mais competitivo irá capturar mais locais, resultando em antagonismo (INDERJIT; STREIBIG; OLOFSDOTTER, 2002). De qualquer forma, efeitos inibitórios de misturas de ácidos fenólicos e outros compostos orgânicos podem ocorrer quando a concentração de compostos individuais na mistura está bem abaixo de seu nível individual inibitório. Assim, desmistificando a inexistência da atividade alelopática de ácidos fenólicos devido sua baixa concentração específica nos solos, que está geralmente abaixo de 0,1 $\mu\text{M/g}$ (BLUM, 1996).

Em trabalho prévio (FAVARETTO; SCHEFFER-BASSO; PEREZ, 2017), o efeito de extratos aquosos de capim-annoni foi aproximadamente 50% maior sobre a germinação do que o observado neste trabalho. Da mesma forma, o crescimento da parte aérea e raiz foi mais inibido, alcançando valores de até 100% de inibição. O fato de os extratos brutos serem mais alelopáticos do que os aleloquímicos testados nesse trabalho, seja em combinação ou isoladamente, demonstra que os compostos aqui testados não são os únicos responsáveis pela alelopatia do capim-annoni. Outras substâncias devem estar envolvidos na alelopatia dessa invasora, provavelmente, pertencentes a outros grupos químicos. Folhas de capim-annoni possuem saponinas, alcaloides, flavonoides e taninos (FAVARETTO, 2014) e, talvez, aleloquímicos de algum desses grupos sejam os principais responsáveis pela alelopatia da espécie.

3.6 Conclusões

Os ácidos cafeico, ferúlico, p-cumárico e vanílico, e as procianidinas catequina e epicatequina, previamente identificados no capim-annoni, são compostos com ação fitotóxica isolada e/ou conjunta. Dentre os compostos testados nesse trabalho, o ácido vanílico destaca-se pelo maior potencial alelopático sobre a germinação, IVG e percentual de plântulas mortas. O percentual de plântulas anormais e mortas é mais sensível do que a germinação quando se considera o efeito dos compostos isolados. A catequina e a epicatequina não tem ação conjunta, enquanto que os ácidos cafeico e ferúlico são antagonicos. Dado o exposto, os compostos testados neste trabalho são parcialmente responsáveis pelo efeito alelopático do capim-annoni, pois não explicam, em sua totalidade, a atividade alelopática dessa gramínea.

4 CAPÍTULO II

Fitotoxicidade de frações de capim-annoni (*Eragrostis plana* Nees) sobre a germinação e crescimento inicial de plantas daninhas

4.1 Resumo

O capim-annoni (*Eragrostis plana*) é alelopático e, portanto, possível fonte de moléculas de interesse para a indústria agroquímica, mas nunca foi avaliado quanto ao seu potencial herbicida. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar se frações de folhas de capim-annoni são fitotóxicas para as plantas daninhas capim-amargoso (*Digitaria insularis*), buva (*Conyza canadensis*) e picão-preto (*Bidens pilosa*), além da bioindicadora alface (*Lactuca sativa*). Para tanto, o extrato etanólico de folhas de capim-annoni foi submetido ao fracionamento líquido-líquido, com solventes de polaridade crescente: hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol e água. Cada uma das frações originadas foi seca e ressuspensa nas concentrações de 0; 0,125; 0,25; 0,50; 0,75 e 1 mg/ml e testada em bioensaios de germinação e crescimento inicial das plântulas receptoras. A alface foi a espécie mais sensível às frações de capim-annoni. Dentre as plantas daninhas testadas, a que mostrou maior sensibilidade foi o capim-amargoso. As frações hexano e diclorometano foram as mais fitotóxicas, inibindo a germinação, o comprimento de raiz e parte aérea e ocasionando maior percentual de mortalidade quando comparados aos demais solventes. A continuidade do processo de purificação dessas frações é imprescindível, pois compostos isolados dessa planta possuem potencial herbicida.

Palavras-chave: 1. Alelopatia. 2. Compostos bioativos. 3. *Eragrostis plana*. 4. Fracionamento bioguiado.

4.2 Introdução

Depois da Revolução Verde, a produção agrícola tornou-se dependente de uma grande variedade de herbicidas sintéticos para controlar o crescimento de plantas daninhas e aumentar a produtividade de espécies cultivadas (DAYAN; CANTRELL; DUKE, 2009). O uso excessivo de defensivos, muitos com elevada toxicidade e baixas taxas de degradação, aumenta a contaminação do solo e da água, e pode ocasionar mudanças na biodiversidade de ecossistemas naturais (JABRAN et al., 2010). Em ecossistemas cultivados, o uso excessivo dessas substâncias tem resultado no

aparecimento de plantas daninhas resistentes, levando a consideráveis perdas econômicas (JAMIL et al., 2009).

Em decorrência disso, pesquisas com o objetivo de encontrar novas fontes de produtos naturais são de extrema importância e tem se intensificado nos últimos anos. Há uma crescente necessidade por novas classes químicas de herbicidas e, em particular, por compostos com novos modos de ação e alvos moleculares (DAYAN; OWENS; DUKE, 2012). Essa necessidade torna-se proeminente quando se considera o fato de que mais de vinte anos se passaram desde que o último herbicida com um novo mecanismo de ação foi introduzido no mercado (DUKE; DAYAN, 2013).

A alelopatia, como ciência que estuda as interações químicas entre as plantas e os organismos de seu entorno, constitui valiosa fonte de produtos naturais, com potencial para serem utilizados na indústria agroquímica, por meio do desenvolvimento de herbicidas a partir de aleloquímicos (MACÍAS et al., 2008). A alelopatia pode auxiliar tanto na descoberta de compostos isolados quanto na de estruturas-base, a partir das quais, modificações sintéticas podem ser úteis na formulação de herbicidas. Os aleloquímicos oferecem algumas vantagens sobre as moléculas sintéticas, como maior diversidade de compostos ativos e, principalmente, novos modos de ação (NOVAES et al., 2013; OLIVEROS-BASTIDAS, 2008).

Assim sendo, a busca por moléculas bioativas em plantas alelopáticas pode ser o primeiro passo na identificação de potenciais herbicidas. O capim-annoni (*Eragrostis plana* Nees) possui efeito alelopático sobre trevo-branco (*Trifolium repens* L.), azevém (*Lolium multiflorum* Lam.), cornichão (*Lotus corniculatus* L.), grama-forquilha (*Paspalum notatum* Fluggé), capim-kazungula (*Setaria sphacelata* Schumach), milho (*Zea mays* L.), aveia-branca (*Avena sativa* L.) e trevo-vermelho (*Trifolium pratense* L.) (COELHO, 1986; FERREIRA; MEDEIROS; SOARES, 2008; FAVARETTO et al., 2011; FIORENZA et al., 2016), além de ser autotóxico (FAVARETTO; SCHEFFER-BASSO; PEREZ, 2017). No entanto, não se tem conhecimento acerca de seu efeito sobre plantas daninhas e, apesar de alguns aleloquímicos já terem sido identificados na espécie (FAVARETTO et al., 2015; FIORENZA et al., 2016), nenhum foi isolado por

fracionamento bioguiado. Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi avaliar se frações de folhas de capim-annoni são fitotóxicas para as plantas daninhas capim-amargoso (*Digitaria insularis* (L.) Mez.), buva (*Conyza canadensis* L.) e picão-preto (*Bidens pilosa* L.), além da bioindicadora alface (*Lactuca sativa* L.).

4.3 Material e Métodos

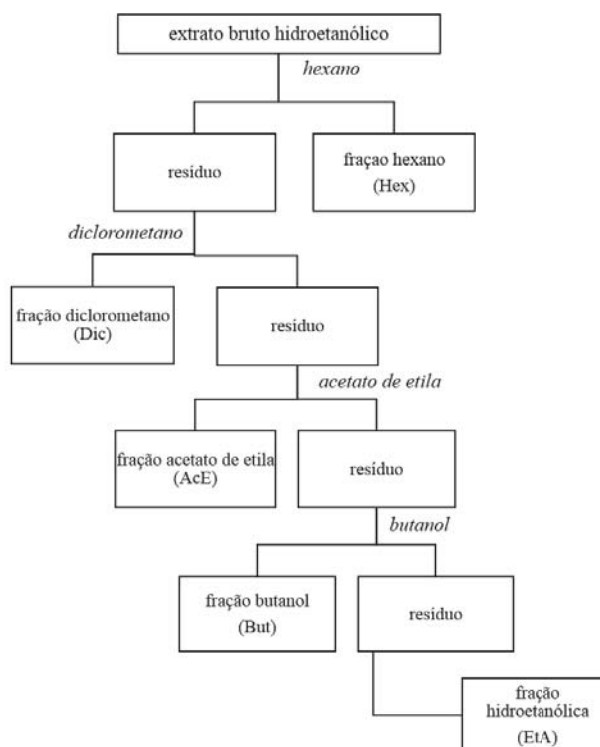
4.3.1 Material vegetal e fracionamento

Folhas de plantas de capim-annoni em estágio vegetativo foram coletadas em área dominada por essa invasora, na Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, Rio Grande do Sul (28°152 S, 52°242 W), em agosto de 2015. O material vegetal foi seco em estufa de circulação de ar forçado, a 40 °C, até peso constante, com posterior trituração em moinho tipo Willey a fim de ser usada na elaboração de extrato etanólico.

Como espécies receptoras foram utilizadas as plantas daninhas capim-amargoso, buva e picão-preto, além da bioindicadora alface, cujas sementes foram obtidas comercialmente. Para a buva, foi necessário realizar quebra de dormência das sementes, por meio de imersões em água destilada a 5 °C por, 48 horas.

O extrato etanólico de folhas de capim-annoni foi elaborado na proporção de 1:10 (material vegetal seco:etanol). Essa mistura foi mantida em maceração estática, à temperatura ambiente, durante sete dias. Após esse período, a solução foi filtrada e concentrada em rotaevaporador, sob pressão reduzida a temperatura de 40 °C. O extrato seco foi ressuspendido em etanol:água (50:50) e submetido ao fracionamento líquido-líquido, com solventes de polaridade crescente: hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol (Figura 1). Foram utilizados 200 mL de cada solvente e o processo foi repetido duas vezes. O material obtido depois de cada etapa foi concentrado em rotaevaporador, separadamente, originando um extrato seco para cada solvente. Cada uma das frações foi ressuspendida na concentração de 1 mg/mL, a partir da qual foram feitas diluições para alcançar as concentrações utilizadas nos bioensaios.

Figura 1 - Fracionamento líquido-líquido dos extratos de folhas de capim-annoni. Passo Fundo, 2017



Fonte: elaborada pelo autor.

4.3.2 Tratamentos e delineamento experimental

As frações obtidas pelo fracionamento líquido-líquido foram testadas em bioensaios de germinação e crescimento inicial de plântulas de quatro espécies receptoras (capim-amargoso, buva, picão-preto e alface). As frações hexano (Hex), diclorometano (Dic), acetato de etila (AcE), butanol (But) e hidroetanólica (EtA) na concentração de 1 mg/mL foram ressuspensas, originando as demais concentrações testadas: 0; 0,125; 0,25; 0,50; 0,75 e 1 mg/mL. A concentração 0 mg/ml foi composta pelo solvente utilizado para diluição de cada fração + água destilada.

Para cada espécie receptora foi realizado um experimento, em delineamento completamente casualizado, com quatro repetições. Os tratamentos foram arranjados em um esquema fatorial 5 (frações) x 6 (concentrações). O tratamento controle foi composto por água destilada, usado como controle.

4.3.3 Bioensaios de germinação

Nos bioensaios de germinação foram usadas como unidades experimentais caixas Gerbox forradas com duas folhas de papel de germinação, umedecido com 10 mL de cada um dos tratamentos. Logo após evaporação dos solventes, foi adicionado igual volume de água destilada, mantendo-se o volume inicial de 10 mL/caixa. Em cada caixa Gerbox foram depositadas cinquenta sementes da espécie receptora, que foram mantidas em câmara de germinação, à 25 °C, sob fotoperíodo de 12 horas de luz, seguido por 12 horas de escuro.

Foram avaliados a porcentagem de germinação e o índice de velocidade de germinação (IVG) segundo Ranal e Santana (2006). O critério considerado para mensurar a germinação foi a protrusão radicial, que foi avaliada diariamente, durante dez dias.

4.3.4 Bioensaio de crescimento inicial

Os bioensaios para avaliação do efeito das frações sobre o alongamento das plântulas receptoras foram conduzidos nas mesmas condições experimentais descritas para os bioensaios de germinação. Para esses ensaios, foram escolhidas cinco plântulas de tamanho similar, obtidas da germinação de sementes em água destilada. As plântulas foram transferidas para caixas gerbox contendo papel filtro umedecido com 10 mL de cada um dos tratamentos. Logo após evaporação dos solventes, foi adicionado igual volume de água destilada, mantendo-se o volume inicial de 10 mL/caixa.

No 15º dia mensurou-se o comprimento da raiz primária e da parte aérea. A diferença entre o comprimento final e o comprimento inicial, mensurado na ocasião do transplante das plântulas, foi considerada como crescimento. Ao final deste período, as plantas foram classificadas como vivas normais, vivas anormais e mortas.

4.3.5 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Dados relativos à germinação foram analisados por regressão, ajustando-se a modelos linear, quadrático ou cúbico. À partir da germinabilidade foi calculado o IC₅₀ (concentração requerida para inibir a germinação em 50%), pelo programa SigmaPlot 12.0. Os dados dos bioensaios de crescimento inicial de plântulas foram submetidos à ANOVA no modelo fatorial diferenciado (5 x 6) +1, seguido pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$), que compara as médias do tratamento com as médias do controle (água destilada).

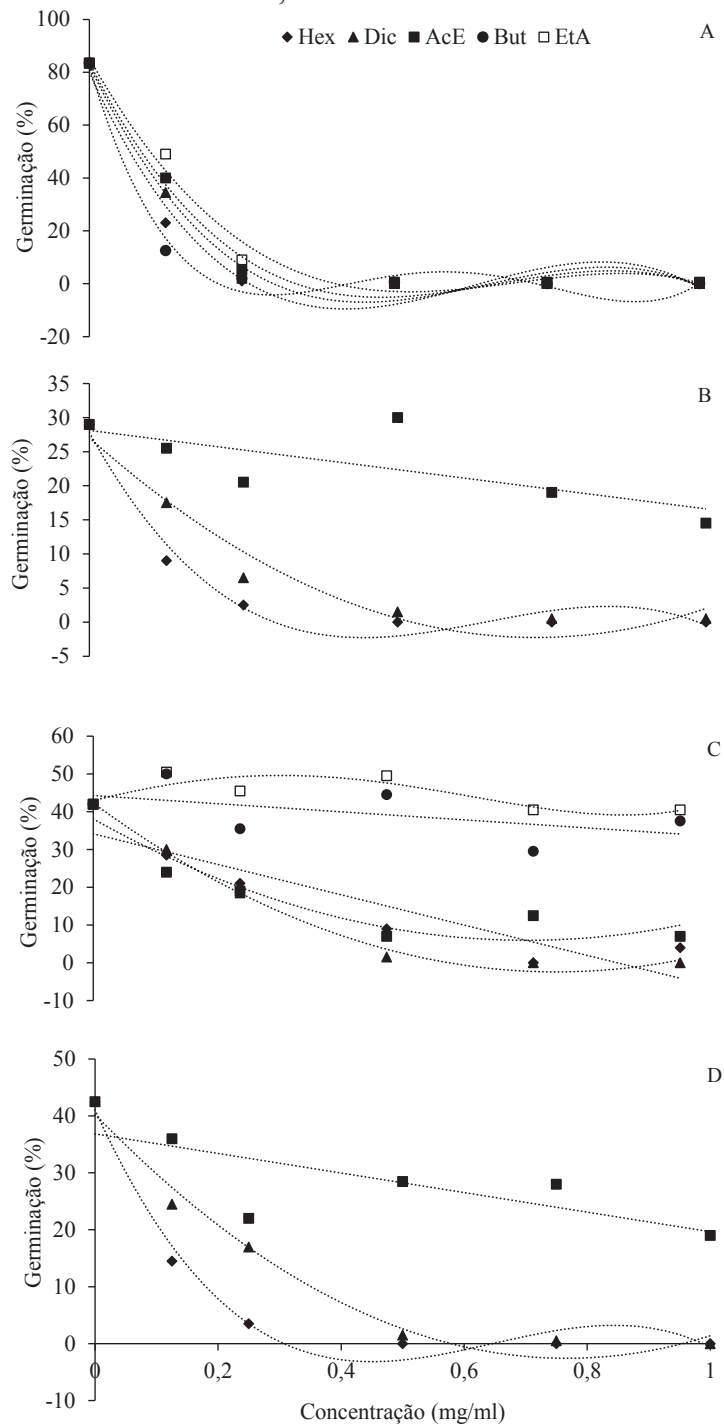
4.4 Resultados

4.4.1 Bioensaios de germinação

As frações de extratos elaborados com folhas de capim-annoni influenciaram a germinação, dependendo da concentração e da espécie receptora. Para alface, todas as frações demonstraram comportamento similar, inibindo totalmente a germinação a partir da concentração de 0,5 mg/mL (Figura 2A). Em capim-amargoso e picão-preto, Hex e Dic inibiram totalmente a germinação a partir da concentração 0,5 mg/mL, enquanto que AcE reduziu linearmente a germinação, em 14,5% e 23,5% na concentração de 1 mg/mL, respectivamente para capim-amargoso e picão-preto (Figura 2B e 2D). Para a buva, a porcentagem de germinação reduziu mais intensamente sob as frações Hex, Dic e AcE quando comparada à fração But e EtA (Figura 2C).

O IC₅₀ foi calculado por meio de curva de regressão da germinação para os valores significativos ao nível de 5% de probabilidade. Os valores variaram de acordo com a fração testada e a espécie receptora, de 0,06 mg/mL a 0,74 mg/mL (Tabela 1).

Figura 2 - Germinação de alface (A), capim-amargoso (B), buva (C) e picão-preto (D) em função da concentração de frações obtidas a partir de extratos etanólicos de capim-annoni. Passo Fundo, 2016



Notas: Hex: fração hexano; Dic: fração diclorometano; AcE: fração acetato de etila; But: fração butanol; EtA: fração hidroetanólica.

Equações obtidas pela análise de regressão: (A) Hex= $-483,16x^3+912,65x^2-511,01x+79,885$, $R^2= 0,9721$; Dic = $-421,51x^3+820,93x^2-483,02x+82,549$, $R^2 = 0,9858$; AcE= $-372,45x^3+744,54x^2-456,39x+83,593$, $R^2 = 0,9883$; But= $1251,1x^4-2962x^3+2406,2x^2-777,31x+82,222$, $R^2= 0,9896$; EtA= $-35,05x^4-233,59x^3+594,46x^2-410,79x+85,223$, $R^2 = 0,9828$. (B) Hex= $-146,35x^3+282,27x^2-164,17x+27,79$, $R^2= 0,9778$; Dic= $55,915x^2-80,937x+27,041$, $R^2=0,9574$; AcE= $-11,495x+28,112$, $R^2 = 0,5281$; But= $985,03x^4-1736x^3+839,54x^2-84,189x + 29,549$, $R^2 = 0,9704$. (C) Hex= $-38,274x+34,161$, $R^2=0,8401$; Dic= $71,65x^2-113,12x+42,244$, $R^2= 0,9932$; AcE= $58,818x^2- 6,937x+38,084$, $R^2= 0,8977$; But= $-10,189x+44,291$, $R^2= 0,2954$; EtA= $73,15x^4-74,5x^3-40,092x^2+38,864x+42,944$, $R^2 = 0,6874$. (D) Hex = $-209,61x^3+406,8x^2 - 238,87x+41,056$, $R^2 = 0,9838$; Dic = $72,879x^2-111,73x+40,249$, $R^2 = 0,9822$; AcE = $-17,179x+ 6,849$, $R^2 = 0,5751$.

Tabela 1 - Concentração das frações requerida para inibir a germinação em 50% (IC₅₀) de frações de folhas de capim-annoni. Passo Fundo, 2016

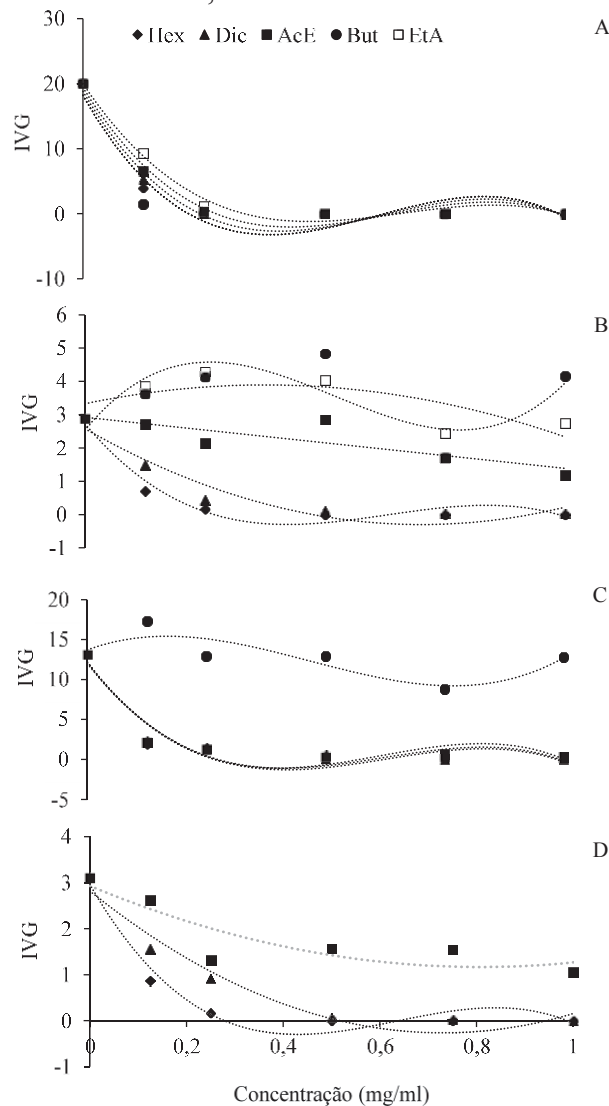
Planta receptora	Hexano	Diclorometano	Acetato de etila	Butanol	Hidroetanólica
Alface	0,10 ± 0,002	0,12 ±0,005	0,12 ±0,003	0,06 ±0,002	0,14 ±0,001
Capim-amargoso	0,08 ± 0,030	0,15 ±0,010	0,74 ±0,080	ns	Ns
Buva	0,26 ± 0,020	0,22 ±0,030	0,14 ± 0,070	0,41 ± 0,060	0,68 ± 0,080
Picão-preto	0,10 ± 0,002	0,20 ±0,060	ns	ns	Ns

Fonte: Dados do autor.

Notas: Os valores de IC₅₀ foram obtidos pela análise de regressão da germinação ($p \leq 0,05$) e correspondem a concentração que produz 50% de inibição da germinação das sementes de plantas daninhas. ns: não significativo ao nível de 5% de probabilidade pela análise de regressão.

O IVG da alface apresentou o mesmo comportamento da porcentagem de germinação (Figura 3A). Para capim-amargoso, as frações But e EtA na concentração 0,75 mg/mL reduziram o IVG (Figura 3B). As frações Hex, Dic e AcE reduziram significativamente o IVG de buva em todas as concentrações testadas, enquanto que a fração But mostrou efeito inibitório apenas na concentração de 0,75 mg/mL (Figura 3C). O IVG de picão-preto apresentou o mesmo comportamento da porcentagem de germinação, aonde as frações Hex e Dic foram mais fitotóxicas do que a fração AcE (Figura 3D).

Figura 3 - Índice de velocidade de germinação (IVG) de alface (A), capim-amargoso (B), buva (C) e picão-preto (D) em diferentes concentrações de frações de capim-annoni. Passo Fundo, 2016



Notas: Hex: fração hexano; Dic: fração diclorometano; AcE: fração acetato de etila; But: fração butanol; EtA: fração etanol-água.

Equações obtidas pela análise de regressão: (A) Hex= $-124,27x^3+231,45x^2-126,48x+18,833$, $R^2 = 0,9537$; Dic= $-524,98x^3+971,14x^2-525,54x+77,216$, $R^2=0,9326$; AcE= $-110,4x^3+210,76x^2-120,12x+19,416$, $R^2 = 0,9802$; But= $-135,32x^3+247,38x^2-130,88x+18,221$, $R^2=0,9046$; EtA= $-91,963x^3+182,25x^2-110,46x+20,003$, $R^2=0,989$. (B) Hex= $-16,199x^3+30,629x^2-17,218x+2,7304$, $R^2=0,9624$; Dic= $5,8555x^2-8,2162x+2,5811$, $R^2=0,9251$; AcE= $-1,5335x+2,9226$, $R^2=0,7157$; But= $29,051x^3-45,354x^2+17,717x+2,5285$, $R^2=0,5734$; EtA= $-4,0033x^2+3,0102x+3,3278$, $R^2=0,5147$. (C) Hex= $-73,519x^3+137,21x^2-75,841x+11,995$, $R^2=0,9016$; Dic= $-74,071x^3+138,99x^2-77,397x+12,179$, $R^2=0,9318$; AcE= $79,075x^3+145,74x^2-78,767x+12,162$, $R^2=0,9254$; But= $57,326x^3-80,455x^2+22,134x+13,701$, $R^2 = 0,7145$. (D) Hex= $-16,902x^3+32,189x^2-18,309x+2,9664$, $R^2=0,9723$; Dic= $5,7838x^2-8,4519x+2,8227$, $R^2=0,9603$; AcE= $2,7059x^2-4,3723x+2,9336$, $R^2 = 0,7737$.

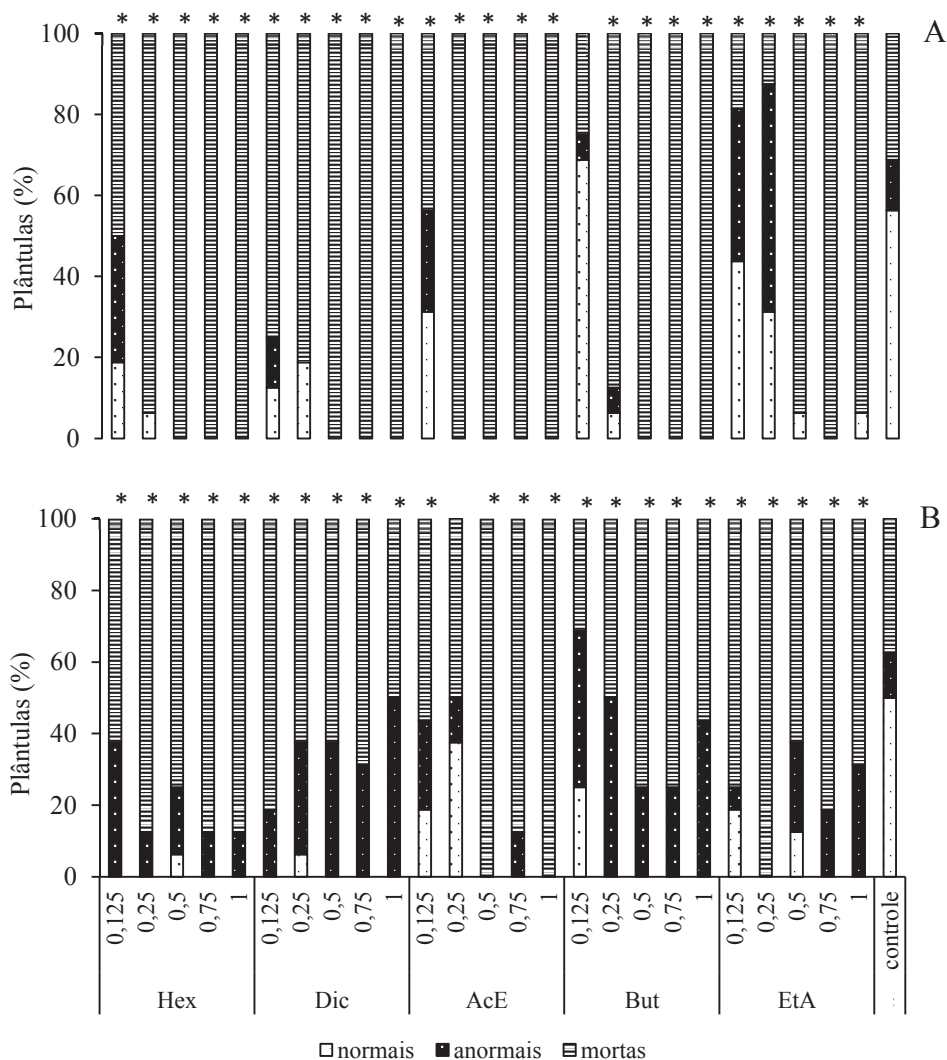
4.4.2 Crescimento inicial

O percentual de mortalidade e anormalidades das plântulas foi relativo a espécie receptora e fração testada. A alface demonstrou ser extremamente sensível à mortalidade, em todas as frações, sendo que nas maiores concentrações testadas, a mortalidade alcançou valores de 100% (Figura 4A). O capim-amargoso foi a planta daninha mais sensível às frações, pois todos os tratamentos diferiram do controle quanto ao número de plântulas normais, seja pela presença de anormalidades ou mortalidade (Figura 4B). Comparada às demais espécies receptoras, a buva foi a menos sensível, onde a porcentagem de plântulas mortas diferiu do controle apenas nas maiores concentrações de todas as frações testadas (Figura 5A). Para picão-preto, a mortalidade das plântulas só foi significativa nas frações Hex e Dic, enquanto que as demais frações destacaram-se por maior percentual de anormalidades (Figura 5B).

Ao considerar as anormalidades, destacaram-se alguns sintomas característicos em cada espécie receptora. Na alface observou-se o escurecimento da raiz e parte aérea, que evoluiu para necrose, além de ausência de raízes secundárias e pêlos radiciais (Figura 6A). Para capim-amargoso houve amarelecimento no ápice das folhas, principalmente mais velhas, além da presença de folhas jovens albinas, com evolução para necrose das plantas (Figura 6B). Em buva, a raiz e parte aérea atrofiaram e escureceram, evoluindo para necrose total (Figura 6C). No entanto, para picão-preto, verificou-se amarelecimento da parte aérea e encarquilhamento das plântulas (Figura 6D).

Apenas os extratos AcE e EtA na concentração de 0,125 mg/mL não inibiram significativamente o crescimento da parte aérea de alface (Tabela 2). Em capim-amargoso, não foi observado efeito para AcE 0,75 mg/mL e But 0,125 mg/mL sobre o comprimento da parte aérea (Tabela 3). Em picão-preto, apenas os extratos AcE 0,125 mg/mL, But 1 mg/mL e EtA 0,125 mg/mL não inibiram o comprimento da raiz e somente EtA 0,125 mg/mL não inibiu o comprimento da parte aérea (Tabela 4).

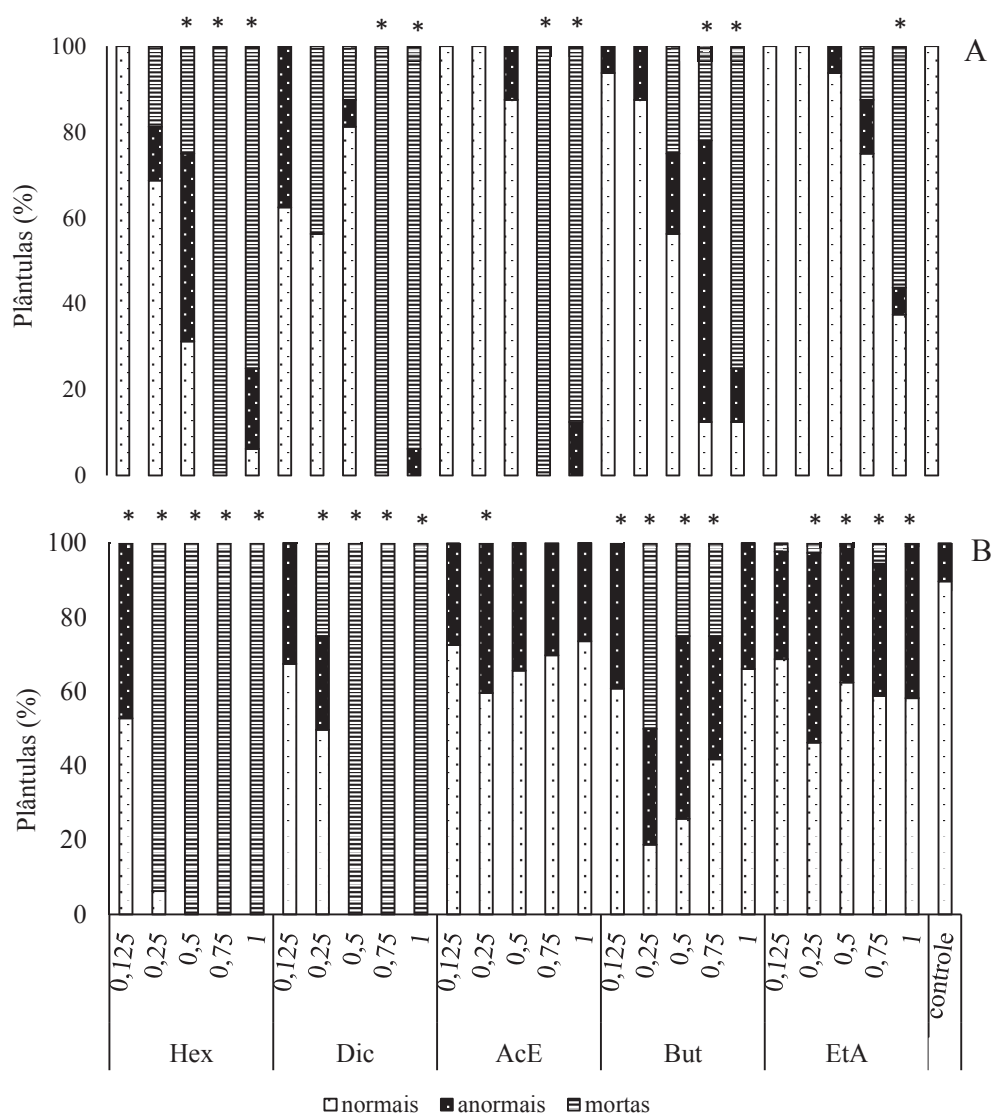
Figura 4 - Proporção de plântulas normais, anormais e mortas de alfaca (A) e capim-amargoso (B) submetidas à frações de extrato etanólico de capim-annoni. Passo Fundo, 2017



Notas: Asterisco (*) acima das colunas indica diferença em relação ao tratamento-controle (água destilada), pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$).

Hex: fração hexano; Dic: fração diclorometano; AcE: fração acetato de etila; But: fração butanol; EtA: fração etanol-água.

Figura 5 - Proporção de plântulas normais, anormais e mortas de buva (A) e picão-preto (B) submetidas às frações de extrato etanólico de capim-annoni. Passo Fundo, 2017



Notas: Asterisco (*) acima das colunas indica diferença em relação ao tratamento-controle (água destilada), pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$).

Hex: fração hexano; Dic: fração diclorometano; AcE: fração acetato de etila; But: fração butanol; EtA: fração etanol-água.

Figura 6 - Anormalidades nas plântulas de alface (A), capim-amargoso (B), buva (C) e picão-preto (D). Passo Fundo, 2017

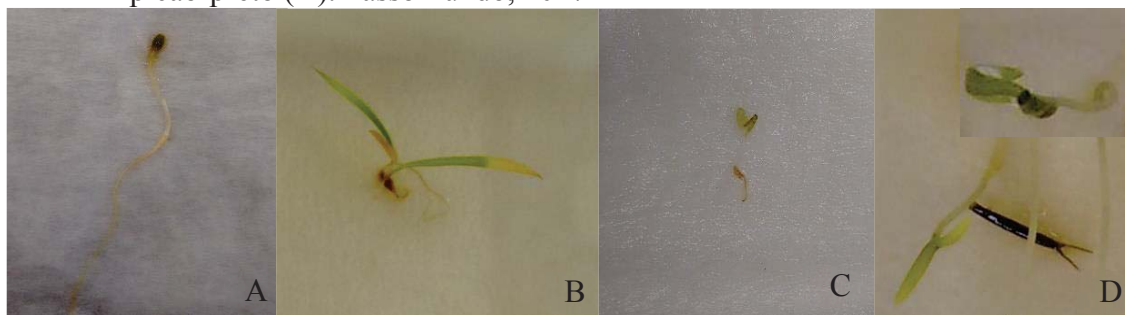


Tabela 2 - Comprimento da parte aérea de plântulas de alface submetidas a distintas concentrações de frações obtidas a partir de extratos etanólicos de folhas de capim-annoni. Passo Fundo, 2016

Fração	Concentração (mg/mL)				
	0,125	0,25	0,50	0,75	1,00
Comprimento da parte aérea (cm)					
Hexano	*0,07	*0,00	*0,00	*0,00	*0,00
Diclorometano	*0,00	*0,00	*0,00	*0,00	*0,00
Acetato de etila	0,46	*0,00	*0,00	*0,00	*0,19
Butanol	*0,00	*0,00	*0,00	*0,00	*0,00
Hidroetanólica	0,84	*0,00	*0,14	*0,00	*0,00
Controle	0,82				

Notas: *Valor difere da testemunha pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$). Médias seguidas de mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 3 - Comprimento da parte aérea de plântulas de capim-amargoso submetidas a distintas concentrações de frações obtidas a partir de extratos etanólicos de folhas de capim-annoni. Passo Fundo, 2016

Fração	Concentração (mg/mL)				
	0,125	0,25	0,50	0,75	1,00
Comprimento da parte aérea (cm)					
Hexano	*0,06	*0,00	*0,00	*0,00	*0,00
Diclorometano	*0,15	*0,22	*0,13	*0,30	*0,00
Acetato de etila	*0,29	*0,01	*0,00	0,99	*0,02
Butanol	1,22	*0,00	*0,00	*0,13	*0,53
Hidroetanólica	*0,09	*0,00	*0,57	*0,13	*0,00
Controle	1,74				

Nota: *Valor difere da testemunha pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$).

Tabela 4 - Comprimento da raiz e parte aérea de plântulas de picão-preto submetidas a distintas concentrações de frações obtidas a partir de extratos etanólicos de folhas de capim-annoni. Passo Fundo, 2016

Fração	Concentração (mg/mL)				
	0,125	0,25	0,50	0,75	1,00
Comprimento da raiz (cm)					
Hexano	*9,43 bA	*0,00 bB	*00,00 cB	*0,00 bB	*0,00 cB
Diclorometano	*17,52 aA	*9,56 aB	*00,00 cC	*0,00 bC	*0,00 cC
Acetato de etila	18,68 aA	*14,56 aAB	*13,22 abAB	*17,22 aA	*11,45 bB
Butanol	*7,14 bC	*00,00 bD	*09,81 bBC	*13,66 aB	19,31 aA
Hidroetanólica	20,10 aA	*12,20 aB	*16,17 aAB	*16,36 aAB	*17,09 aAB
Controle	23,70				
Comprimento da parte aérea (cm)					
Hexano	*11,32 bA	*00,00 bB	*00,00 cB	*00,00 bB	*00,00 cB
Diclorometano	*23,50 aA	*16,50 aA	*00,00 cB	*00,00 bB	*00,00 cB
Acetato de etila	*23,36 aA	*21,34 aA	*21,70 abA	*21,60 aA	*19,10 bA
Butanol	*11,29 bB	*00,00 bC	*15,49 bB	*17,06 aB	*29,44 abA
Hidroetanólica	32,27 aA	*26,68 aA	*27,53 aA	*22,28 aA	*29,98 aA
Controle	42,47				

Nota: *Valor difere da testemunha pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$). Médias seguidas de mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

4.5 Discussão

Há variabilidade na fitotoxicidade em função das frações de extrato foliar de capim-annoni e da espécie receptora. Para as plantas daninhas testadas, as frações Hex e Dic foram as mais inibitórias na porcentagem de germinação e IVG. Essas mesmas frações foram as responsáveis por um menor IC_{50} , indicando maior fitotoxicidade, em capim-amargoso e picão-preto e por um maior percentual de mortalidade em picão-preto. A fitotoxicidade variável das diferentes frações pode ser devido a diferença na eficiência da extração dos solventes utilizados (TANVEER et al., 2012). Portanto, pode-se levantar a hipótese de que os compostos com maior atividade fitotóxica do capim-annoni seriam extraídos com hexano e diclorometano. Ambos são consideradas frações não polares (CASIMIRO et al., 2017), contendo compostos mais apolares. Os prováveis metabólitos secundários extraídos pelo solvente hexano seriam esteroides, terpenos e acetofenonas, enquanto que o diclorometano é capaz de extrair lignanas, flavonoides metoxilados, sesquiterpenos, lactonas, triterpenos e cumarinas (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

Em adição às diferenças na fitotoxicidade exibida pelas frações de capim-annoni, as espécies receptoras variaram quanto à susceptibilidade e resposta aos atributos testados. A alface foi a espécie mais sensível quanto à germinação e crescimento de plântulas, pois esses atributos foram influenciados por todas as frações testadas. Para essa espécie foram verificados também os menores valores de IC₅₀. Esse resultado era esperado, tendo em vista que a alface é considerada uma planta bioindicadora nos trabalhos de alelopatia e é extensivamente usada nesse tipo de experimento por ter rápida germinação, crescimento e alta sensibilidade à diversos extratos e produtos (MACÍAS; CASTELLANO; MOLINILLO, 2000). Porém, o teste de extratos vegetais sobre plantas bioindicadoras dificilmente reflete o que ocorre em ecossistemas naturais (INDERJIT; DAKSHINI, 1999, p. 35-42). Assim sendo, e considerando a aplicabilidade da alelopatia quando na pesquisa por herbicidas, torna-se fundamental estudar o comportamento dos extratos vegetais sobre plantas de interesse, neste caso, as plantas daninhas.

Dentre as plantas daninhas, o capim-amargoso foi o mais sensível, com maior número de plântulas mortas e maior inibição do alongamento radicial e da parte aérea em todas as frações, inclusive mostrando maior sensibilidade do que a alface no comprimento da raiz (Tabela 3). Dessa forma, pode-se inferir que essa espécie possui características particulares que a tornam mais sensível, ou que o efeito fitotóxico do capim-annoni seria mais pronunciado em gramíneas, tendo em vista que o capim-amargoso é a única representante de Poaceae dentre as espécies receptoras testadas. Por isso, é importante usar diferentes espécies receptoras em trabalhos de alelopatia, tendo em vista que elas podem apresentar sensibilidade variada de acordo com o tipo de extrato testado (OLIVEIRA et al., 2012). De acordo com Souza Filho, Rodrigues e Rodrigues (1997), a atividade biológica de um aleloquímico depende do limite de resposta da espécie afetada, que está intimamente relacionada à sua sensibilidade.

Na germinação e IVG de capim-amargoso e buva verificou-se um estímulo dos atributos testados sob baixas concentrações das frações AcE e EtA. A alelopatia é um processo químico-mediado, que pode ser estimulatório ou inibitório (BELZ; HURLE; DUKE, 2005). O fenômeno em que ocorre um estímulo de um parâmetro dependente em uma baixa concentração de uma fitotoxina é denominado hormese (DAYAN; DUKE,

2006). No entanto, respostas inibitórias dos aleloquímicos são frequentemente descritas, enquanto que o estímulo em baixas concentrações é raramente relatado (BELZ; HURLE; DUKE, 2005).

Na ciência das plantas daninhas, estudos de dose-resposta auxiliam no entendimento da eficácia e modo de ação de herbicidas comerciais. No entanto, nas últimas décadas, este mesmo modelo passa a ser usado no estudo de fitotoxinas naturais (BELZ; HURLE; DUKE, 2005), permitindo calcular o IC₅₀ do crescimento/germinação da espécie receptora e com este resultado, comparar a fitotoxicidade entre aleloquímicos e destes com herbicidas sintéticos.

Os valores de IC₅₀, oriundos do efeito de frações de extratos de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) sobre alface, variaram de acordo com o solvente utilizado no fracionamento (entre 0,020 e 1,4 mg/mL), sendo o extrato diclorometano o mais fitotóxico e o extrato aquoso o menos fitotóxico (CASIMIRO et al., 2017). Com amendoeira (*Terminalia catappa* L.), a fração diclorometânica também foi a mais fitotóxica (BARATELLI et al., 2012).

Neste trabalho, a fração butanol foi a mais fitotóxica para alface, com IC₅₀ de 0,06 mg/mL, o que indica que os aleloquímicos do capim-annoni pertencem a grupos diferentes em relação às espécies acima citadas, que foram extraídas com diclorometano. Os valores de IC₅₀ obtidos neste trabalho indicam a qualidade do material estudado para obter substâncias com potencial atividade herbicida. Para tanto, destaca-se a importância de continuar o processo de fracionamento dos extratos, pois com a obtenção de compostos puros e suas respectivas curvas de dose-resposta será possível a comparação com herbicidas comerciais.

A avaliação do crescimento das plântulas é um instrumento valioso em trabalhos de alelopatia, uma vez que os aleloquímicos induzem o aparecimento de plântulas anormais (FERREIRA; AQUILA, 2000). Os sintomas observados em bioensaios são os indicativos mais óbvios dos locais de ação dos compostos. Esses indicadores podem ajudar a determinar se o composto tem o mesmo mecanismo de ação de compostos

conhecidos, que causam sintomas similares. A simples inibição no crescimento, que neste trabalho foi observada para buva, é o sintoma mais problemático, pois inúmeros locais de ação podem causar tal sintoma (DUKE; ROMAGNI; DAYAN, 2000).

Aleloquímicos são substâncias que modificam uma variedade de processos metabólicos, como a fotossíntese (QIAN et al., 2009), fisiologia dos estômatos (MARTÍNEZ-PEÑALVER et al., 2012), trocas gasosas (SCHULZ et al., 2007), relações hídricas (HUSSAIN; REIGOSA, 2011), produção de espécies reativas de oxigênio (QIAN et al., 2009), alteração na função de hormônios (FERREIRA; AQUILA, 2000) e biologia molecular (TANVEER et al., 2012). Portanto, alterações na germinação e morfologia de plântulas sob a influência de extratos vegetais pode ser uma expressão secundária de distúrbios e alterações nestes mecanismos primários (TANVEER et al., 2012).

A redução no crescimento da raiz ocasionada por aleloquímicos pode ser explicada pela indução no aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, causando a morte de células da raiz, (MECINA et al., 2014). Já, a inibição da germinação pode ser explicada por distúrbios na atividade da peroxidase, alfa-amilase e fosfatase (ALAM; ISLAM, 2002). A necrose da raiz, observada nesse trabalho para todas as espécies, é um dos sintomas mais característicos da alelopatia (HABERMANN et al., 2017) e pode ser explicado pelo contato mais próximo da raiz com o extrato (CHUNG; AHN; YUN, 2001). Bais et al. (2003) elucidaram o mecanismo de ação de catequinas liberadas por *Centaurea maculosa* (Lam.) e constataram que essas fitotoxinas produzem espécies reativas de oxigênio no meristema da raiz, que se propagam através das células, causando mudanças na concentração intracelular de Ca^{2+} e, assim, modificando a expressão do gene calmodulina, peroxidase e da proteína ribossomal L9. Essa sequência de eventos culmina na necrose do sistema radicial.

Aleloquímicos podem atuar sobre a fotossíntese, causando danos à maquinaria de síntese e aceleração da decomposição de pigmentos fotossintéticos. Consequentemente, o conteúdo desses pigmentos diminui, o que bloqueia a energia e transferência de elétrons, inibe a síntese de ATP e afeta a condutância estomática e a transpiração, inibindo o

processo fotossintético (CHENG; CHENG, 2015). Um dos mais bem caracterizados mecanismos fitotóxicos induzidos por aleloquímicos é sobre a função do FSII (CHENG; CHENG, 2015). Nesse caso, os inibidores competem pelo local de ligação da plastoquinona na proteína D1 do FSII, interrompem o fluxo fotossintético normal e, então, as plantas morrem devido a um estresse oxidativo associado com moléculas de clorofila super energizadas. Muitas quinonas e a capsaicina (isolada de pimenta-vermelha) são conhecidos como potentes inibidores do FSII (DUKE; DAYAN, 2006). Mas, o mais bem documentado inibidor do FSII é o sorgoleone, uma benzoquinona lipofílica, componente de exudados de raízes de sorgo (CZARNOTA et al., 2001).

O mecanismo de ação sobre o FSII é característico para herbicidas do grupo das triazinas, dentre o qual está a atrazina. A sintomatologia causada por esses herbicidas inicia com clorose internerval nas folhas e amarelecimento nas margens, que pode ser mais expressivo em plantas suscetíveis. Pode ocorrer ainda a presença de coloração dourada no ápice das folhas (SENSEMAN, 2007) A sintomatologia observada neste trabalho para plântulas de capim-amargoso é muito semelhante à relatada para os inibidores do FSII, considerando-se assim a hipótese de que este poderia ser um possível mecanismo de ação dos compostos fracionados do capim-annoni. No entanto, não se descarta a hipótese de que outro conhecido mecanismo de ação de herbicidas, os inibidores da biossíntese de carotenoides, podem causar a perda de pigmentação das folhas, resultando em uma aparência albina, com branqueamento seguido por necrose (SENSEMAN, 2007). Deve-se ressaltar que nesse trabalho foram testadas frações do extrato. Para melhor entendimento do mecanismo de ação e comparação com herbicidas sintéticos, é essencial prosseguir com o processo de purificação e teste de substâncias puras.

O isolamento de novos compostos é a melhor abordagem para a descoberta de fitotoxinas naturais e novos mecanismos de ação, que podem ser valiosos para herbicidas sintéticos. Na pesquisa em produtos naturais, bioensaios direcionados ao isolamento são requeridos. Depois que a fitotoxicidade de um conhecido ou novo composto natural é descoberta, a determinação do mecanismo de ação é um processo que não difere dos herbicidas sintéticos (DUKE; ROMAGNI; DAYAN, 2000).

4.6 Conclusões

As frações hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol e hidroetanólica provenientes de folhas de capim-annoni são fitotóxicas para alface, capim-amargoso, buva e picão-preto. Dentre as plantas daninhas, o capim-amargoso é a espécie mais sensível e dentre as frações, hexano e diclorometano são as mais fitotóxicas. Isso indica a necessidade da continuidade do processo de purificação dessas frações, pois compostos isolados dessa planta possuem potencial herbicida.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O interesse em compostos alternativos com propriedades fitotóxicas cresceu nas últimas décadas, proporcionando um campo promissor para a descoberta de herbicidas de origem natural que agem diretamente sobre plantas daninhas e, mais importante, não impõe efeitos adversos ao ambiente e a saúde humana (HAIG et al., 2009). Assim, cientistas tem focado seus esforços na pesquisa por compostos oriundos de plantas para o desenvolvimento de compostos com atividade herbicidas como alternativa (CANTRELL; DAYAN; DUKE, 2012).

As plantas alelopáticas são uma provável fonte de compostos com potencial herbicida. No entanto, a alelopatia é um processo bastante complexo e nem sempre a atividade alelopática se deve a ação de um único composto. Portanto, o entendimento das relações entre os aleloquímicos, sejam elas sinérgicas ou antagônicas, é de fundamental importância.

Os aleloquímicos catequina, epicatequina e os ácidos cafeico, ferúlico, p-cumárico e vanílico já haviam sido identificados no capim-annoni por Favaretto et al. (2015). No entanto, considerando as intrínsecas relações e interferências que podem haver entre esses compostos, optou-se por testar, no Capítulo I, tanto o efeito isolado quanto conjunto desses aleloquímicos. De fato, existem modificações na atividade fitotóxica desses compostos quando eles agem em combinação, exceto para catequina e epicatequina. O parâmetro mais sensível a ação desses compostos é a presença de anormalidades e mortalidade das plântulas, o que ressalta a importância de incluir esse tipo de avaliação em trabalhos de alelopatia.

Apesar de constatada atividade fitotóxica e ação conjunta dos aleloquímicos descritos no Capítulo I, observou-se que esses não explicam totalmente a atividade alelopática do capim-annoni. Em trabalho prévio (FAVARETTO; SCHEFFER-BASSO; PEREZ, 2017), o efeito de extratos aquosos de capim-annoni foi aproximadamente 50% maior sobre a germinação do que o observado neste trabalho. Portanto, a atividade alelopática remanescente provavelmente é explicada pela presença de outros compostos, ainda não identificados. Ao final desse trabalho permaneceu uma questão a ser respondida: qual/quais os compostos majoritários presentes no capim-annoni, responsáveis pelo efeito alelopático?

Para responder essa pergunta, o Capítulo II foi desenvolvido com base em um fracionamento líquido-líquido do extrato bruto de folhas de capim-annoni, utilizando solventes de polaridade crescente. Além do mais, considerando a investigação dos compostos como herbicidas, optou-se por incluir, além da bioindicadora alface, as plantas daninhas capim-amargoso, buva e picão-preto como receptoras.

Um extrato bruto é geralmente uma complicada mistura de vários compostos com propriedades físicas e químicas distintas. A estratégia fundamental para separar esses compostos é a extração com solventes de diferentes polaridades, visando a separação inicial de grupos químicos. O fracionamento conduzido no Capítulo II mostrou que frações obtidas de extratos etanólicos de folhas de capim-annoni são fitotóxicas para as plantas daninhas capim-amargoso, buva e picão-preto, o que sugere a importância de prosseguir com a investigação do potencial herbicida dessa espécie. De acordo com os dados desse capítulo, os compostos com maior atividade fitotóxica do capim-annoni são extraídos por hexano e diclorometano.

Baseado nesses resultados, o Capítulo III foi focado no isolamento e identificação dos compostos biologicamente ativos presentes no extrato de capim-annoni. As frações mais fitotóxicas, indicadas pelo Capítulo II, foram submetidas a técnica de fracionamento bioguiado, resultando na identificação de três compostos inéditos presentes nas raízes de capim-annoni e do ácido α -linolênico, presente nas folhas. Muito além da pesquisa por atividade biológica dos compostos isolados, esse trabalho consiste na descrição química

da espécie. O primeiro relato científico da atividade alelopática do capim-annoni data de 1986 (COELHO, 1986). No entanto, mais de trinta anos se passaram para que agora, com essa tese, se buscasse identificar e isolar compostos químicos responsáveis por essa atividade.

Embora as folhas de capim-annoni sejam mais alelopáticas do que as raízes (FAVARETTO; SCHEFFER-BASSO; PEREZ, 2017), e por isso foram utilizadas nos experimentos do capítulo II, a complexidade e quantidade de compostos presentes nesse órgão dificulta o processo de isolamento e identificação de compostos químicos. Por esse motivo, no capítulo III, mais compostos foram isolados de raízes de capim-annoni do que de folhas. Além do mais, vale ressaltar a dificuldade de coleta e manuseio de raízes, utilizando-se preferencialmente folhas para preparação de extratos.

Com base na estratégia alelopática de busca por novos herbicidas, proposta por Macías et al. (2001), após a obtenção de compostos puros, o próximo passo consiste na síntese de princípios ativos e compostos análogos, bem como na determinação dos mecanismos de ação dos compostos isolados. Isso indica que ainda há um longo caminho na investigação da atividade herbicida do capim-annoni.

6 CONCLUSÃO GERAL

O capim-annoni possui potencial herbicida. Seu efeito fitotóxico sobre plantas daninhas pode ser estimulatório ou inibitório, dependendo da concentração testada. A atividade fitotóxica de distinta magnitude, a depender do solvente utilizado, indica que hexano e diclorometano são os mais eficazes na extração dos compostos biologicamente ativos do capim-annoni. A inibição da germinação e crescimento inicial de plantas indica maior fitotoxicidade dos extratos sobre plantas monocotiledôneas em relação a não-monocotiledôneas, sugerindo especificidade da atividade alelopática do capim-annoni quanto à espécie receptora.

A investigação fitoquímica do capim-annoni, com a descrição inédita de um novo esqueleto de carbono e de três novos compostos fitotóxicos, pertencentes a classe dos diterpenoides, além de contribuir para a caracterização química da espécie, pode ser o primeiro passo no estudo do potencial desses compostos como herbicidas e na sua aplicação como uma alternativa ambientalmente sustentável no controle de plantas daninhas.

REFERÊNCIAS

- ALAM, S. M.; ISLAM, E. U. Effect of aqueous extract of leaf, stem and root of nettle leaf goosefoot and NaCl on germination and seedling growth of rice. **Pakistan Journal of Science and Technology**, v. 1, p. 47-52, 2002.
- ALIOTTA, G.; DELLA GRECA, M.; MONACO, P.; PINTO, G.; POLLIO, A.; PREVITERA, L. *In vitro* algal growth inhibition by phytotoxins of *Typha latifolia* L. **Journal of Chemical Ecology**, v. 16, p. 2637-2646, 1990.
- BAIS, H. P.; VEPACHEDU, R.; GILROY, S.; CALLAWAY, R. M.; VIVANCO, J. M. Allelopathy and exotic plant invasions: from molecules and genes to species interactions. **Science**, v. 301, p. 1377-1380, 2003.
- BARATELLI, T. D. G.; CANDIDO GOMES, A. C.; WESSJOHANN, L. A.; KUSTER, R. M.; SIMAS, N. K. Phytochemical and allelopathic studies of *Terminalia catappa* L. (Combretaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 41, p. 119-125, 2012.
- BARATH, M.; ARAVIND, J.; SIVASAMY, R. Investigation of antimicrobial activity and chemical constituents of *Eragrostis cynosuroides* by GC-MS. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 9, n. 3, p. 267-271, 2016.
- BARBOSA, F. G.; PILLAR, V. D.; PALMER, A. R.; MELO, A. S. Predicting the current distribution and potential spread of the exotic grass *Eragrostis plana* Nees in South America and identifying a bioclimatic niche shift during invasion. **Austral Ecology**, v. 38, p. 260-267, 2013.
- BATISH, D. R.; SINGH, H. P.; KAUR, S.; KOHLI, R. K.; YADAV, S. S. Caffeic acid affects early growth and morphogenetic response of hypocotyl cuttings of mung bean (*Phaseolus aureus*). **Journal of Plant Physiology**, v. 165, n. 3, p. 297-305, 2008.
- BERTIN, C.; YANG, X.; WESTON, L. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. **Plant Soil**, v. 256, p. 67-83, 2003.
- BELZ, R. G.; HURLE, K.; DUKE, S. O. Dose-response - a challenge for allelopathy? **Nonlinearity in Biology, Toxicology and Medicine**, v. 3, n. 2, p. 173-211, 2005.
- BELZ, R. G. Allelopathy in crop/weed interactions – an update. **Pest Management Science**, v. 63, p. 308–326, 2007.
- BHADORIA, P. B. S. Allelopathy: a natural way towards weed management. **American Journal of Experimental Agriculture**, v. 1, n. 1, p. 7-20, 2011.
- BHOWMIK, P. C.; INDERJIT. Challenges and opportunities in implementing allelopathy for natural weed management. **Crop protection**, v. 22, p. 661-671, 2003.

- BLAIR, A. C.; WESTON, L. A.; NISSEN, S. J.; BRUNK, G. R.; HUFEB, R. A. The importance of analytical techniques in allelopathy studies with the reported allelochemical catechin as an example. **Biological Invasions**, v. 11, p. 325-332, 2009.
- BLUM, U. Allelopathic interactions involving phenolic acids. **Journal of Nematology**, v. 28, p. 259–267, 1996.
- BOECHAT, S. C.; LONGHI-WAGNER, H. M. Padrões de distribuição geográfica dos táxons brasileiros de *Eragrostis* (Poaceae, Chloridoidea). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 23, n. 2, p. 177-194, 2000.
- BRAVO, J.; MONENTE, C.; JUÁNIZ, I.; PEÑA, M. P.; CID, C. Influence of process extraction on antioxidant capacity on spent coffee. **Food Research International**, v. 50, n. 2, p. 610-616, 2013.
- BUSS, A. D.; BUTLER, M. S. A new model for utilising chemical diversity from natural sources. **Drug Development Research**, v. 62, p. 362-370, 2004.
- CANTRELL, C. L.; DAYAN, F. E.; DUKE, S. O. Natural products as sources for new pesticides. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 1231–1242, 2012.
- CASIMIRO, G. S.; MANSUR, E.; PACHECO, G.; GARCIA, R.; LEAL, I. C. R.; SIMAS, N. K. Allelopathic activity of extracts from different brazilian peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars on lettuce (*Lactuca sativa*) and weed plants. **Hindawi: The Scientific World Journal**, v. 2017, p. 1-7, 2017.
- CECCHIN, K.; FAVARETTO, A.; SCHEFFER-BASSO, S. M.; BERTOL, C. D.; CHINI, S. O. Allelopathy and allelochemicals of *Eragrostis plana* (Poaceae) and its relation with phenology and nitrogen fertilization. **Planta Daninha**, v. 35, e017157907, 2017.
- CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.
- CHENG, F.; CHENG, Z. Research progress on the use of plant allelopathy in agriculture and the physiological and ecological mechanisms of allelopathy. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1-16, 2015.
- CHUNG, I. M.; AHN, J. K.; YUN, S. J. Assessment of allelopathic potential of barnyard grass (*Echinochloa crus-galli*) on rice (*Oriza sativa* L.) cultivars. **Crop Protection**, v. 20, p. 921-928, 2001.

CICCONET, N. **Mapeamento das áreas de ocorrência de infestação do *Eragrostis plana* Nees (capimannoni) com sensoriamento remoto: estudo de caso em Santana do Livramento/RS/Brasil.** 2017. 83 f. Dissertação (Mestrado em Geografia) – Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade de Santa Maria, Santa Maria, 2017.

COELHO, R. W. Substâncias fitotóxicas presentes no capim-annoni-2. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 21, n. 3, p. 255-263, 1986.

CZARNOTA, M. A.; PAUL, R. N.; DAYAN, F. E.; NIMBAL, C. I.; WESTON, L. A. Mode of action, localization of production, chemical nature, and activity of sorgoleone: a potent PSII inhibitor in *Sorghum* spp. root exudates. **Weed Technology**, v. 15, n. 4, p. 813-825, 2001.

DAYAN, F. E.; CANTRELL, C. L.; DUKE, S. O. Natural products in crop protection. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 12, p. 4022-4034, 2009.

DAYAN, F. E.; DUKE, S. O. Clues in the search for new herbicides. In: REIGOSA, M. J.; PEDROL, N.; GONZÁLEZ, L. (Ed.). **Allelopathy: a physiological process with ecological implications.** Dordrecht: Springer, 2006. p. 63-84.

DAYAN, F. E.; DUKE, S. O. Natural compounds as next-generation herbicides. **Plant Physiology**, v. 166, n. 2, p. 1090-1105, 2014.

DAYAN, F. E.; OWENS, D. K.; DUKE, S. O. Rationale for a natural products approach to herbicide discovery. **Pest Management Science**, v. 68, n. 4, p. 519-528, 2012.

DAYAN, F. E.; ROMAGNI, J. G.; DUKE, S. O. Investigating the mode of action of bio-synthesized phytotoxins. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, n. 9, p. 2079–2094, 2000.

DAYAN, F. E.; WATSON, S. B. Plant cell membrane as a marker for light-dependent and light-independent herbicide mechanisms of action. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 101, n. 3, p. 182-190, 2011.

DAYAN, F. E.; WATSON, S. B.; GALINDO, J. C. G.; HERNÁNDEZ, A.; DOU, J.; MCCHESENEY, J. D.; DUKE, S. O. Phytotoxicity of quassinoids: physiological responses and structural requirements. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 65, n. 1, p. 15-24, 1999.

DE ALBUQUERQUE, M. B.; DOS SANTOS, R. C.; LIMA, L. M.; MELO FILHO, P. A.; NOGUEIRA, R. J. M. C.; CÂMARA, C. A. G.; RAMOS, A. R. Allelopathy, an alternative tool to improve cropping systems. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 31, p. 379-395, 2011.

DEMOS, E. K.; WOOLWINE, M.; WILSON, R. H.; McMILLAN, C. The effects of ten phenolic compounds on hypocotyl growth and mitochondrial metabolism of mung bean. **American Journal of Botany**, v. 62, n. 1, p. 97-102, 1975.

DEVI, S. R. Effects of ferulic acid on growth and hydrolytic enzyme activities of germinating maize seeds. **Journal of Chemical Ecology**, v. 18, p. 1981-1990, 1992.

DEWANJEE, S.; GANGOPADHYAY, M.; BHATTACHARYA, N.; KHANRA, R.; DUA, T. K. Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 5, n. 2, p. 75-84, 2015.

DUKE, S. O. Why have no new herbicide modes of action appeared in recent years? **Pest Management Science**, v. 68, p. 505-512, 2011.

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

DUKE, S. O.; BLAIR, A. C.; DAYAN, F. E.; JOHNSON, R. D.; MEEPAGALA, K. M.; COOK, D.; BAJSA, J. Is (-)-catechin a novel weapon of spotted knapweed (*Centaurea stoebe*)? **Journal of Chemical Ecology**, v. 35, n. 2, p.141-153, 2009.

DUKE, S. O.; DAYAN, F. E. Modes of action of phytotoxins from plants. In: REIGOSA, M. J.; PEDROL, N.; GONZÁLEZ, L. **Allelopathy: a physiological process with ecological implications**. Dordrecht: Springer, 2006. p. 511-536.

DUKE, S. O.; DAYAN, F. E. Clues to new herbicide mechanisms of action from natural sources. In: BECK, J. J.; COATS, J. R.; DUKE, S. O.; KOIVUNEN, M. E. **Pest Management with Natural Products**. Washington: ACS Publications, 2013. p. 203-215.

DUKE, S. O.; OLIVA, A. Mode of action of phytotoxic terpenoids. In: MACÍAS, F. A.; GALINDO, J. C. G.; MOLINILLO, J. M. G.; CUTLER, H. G. (Ed.). **Allelopathy. Chemistry and mode of action of allelochemicals**. Boca Raton: CRC Press, 2004. p. 201-216.

DUKE, S. O.; ROMAGNI, J. G.; DAYAN, F. E. Natural products as sources for new mechanisms of herbicidal action. **Crop Protection**, v. 19, n. 8, p. 583-589, 2000.

EINHELLIG, F. A. Allelopathy: Current status and future goals. In: INDERJIT; DAKSHINI, K. M. M. (Ed.). **Allelopathy: Organisms, Processes and Applications**. Washington: American Chemical Society, 1995. p. 96-116.

FAVARETTO, A.; CHINI, S. O.; SCHEFFER-BASSO, S. M.; SOBOTTKA, A. M.; BERTOL, C. D.; PEREZ, N. B. Pattern of allelochemical distribution in leaves and roots of tough lovegrass (*Eragrostis plana* Nees). **Australian Journal of Crop Science**, v. 9, n. 11, p. 1119-1125, 2015.

- FAVARETTO, A.; SCHEFFER-BASSO, S. M.; FELINI, V.; ZOCH, A. N.; CARNEIRO, C. M. Growth of white clover seedlings treated with aqueous extracts of leaf and root of tough lovegrass. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 6, p. 68-72, 2011.
- FAVARETTO, A.; SCHEFFER-BASSO, S. M.; PEREZ, N. B. Autotoxicity in tough lovegrass (*Eragrostis plana*). **Planta Daninha**, v. 35, e017164046, 2017.
- FAVARETTO, A.; TONIAL, F.; BERTOL, C. D.; SCHEFFER-BASSO, S. M. Antimicrobial activity of leaf and root extracts of tough lovegrass. **Comunicata Scientiae**, v. 7, n. 4, p. 420-427, 2016.
- FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 175-204, 2000.
- FERREIRA, N. R.; MEDEIROS, R. B.; SOARES, G. L. Potencial alelopático de capim-annoni (*Eragrostis plana* Nees) na germinação de sementes de gramíneas estivais. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 2, p. 43-50, 2008.
- FIORINZA, M.; DOTTO, D. B.; BOLIGON, A. A.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; VESTENA, S. Análise fitoquímica e atividade alelopática de extratos de *Eragrostis plana* Nees (capim-annoni). **Iheringia**, v. 71, p. 193-200, 2016.
- FLORENCE, A. J.; SHANKLAND, N.; JOHNSTON, A. Crystallization in final stages of purification. In: SARKER, S. D.; LATIF, Z.; GRAY, A. Y. (Ed.). **Natural Products Isolation**. 2. ed. Totowa: Humana Press, 2005. p. 275-296.
- FREEMAN, S.; RODRIGUEZ, R. J. Differentiation of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose of strawberry by arbitrarily primed PCR. *Mycological Research*, v. 99, n. 4, p. 501-504, 1995.
- GALINDO, J. C. G.; HERNÁNDEZ, A.; DAYAN, F. E.; TELLEZ, M. R.; MACÍAS, F. A.; PAUL, R. N.; DUKE, S. O. Dehydrozalanin C, a natural sesquiterpenolide, causes rapid plasma membrane leakage. **Phytochemistry**, v. 52, n. 5, p. 805-813, 1999.
- GALLARDO-WILLIAMS, M. T.; GEIGER, C.; PIDALA, J.; MARTIN, D. F. Essential fatty acids and phenolic acids from extracts and leachates of southern cattail (*Typha domingensis* P.). **Phytochemistry**, v. 59, p. 305-308, 2002.
- GERSHENZON, J.; DUDAREVA, N. The function of terpene natural products in the natural world. **Nature Chemical Biology**, v. 3, p. 408-414, 2007.
- GNIĄZDOWSKA, A.; BOGATEK, R. Allelopathic interactions between plants: Multisite action of allelochemicals. **Acta Physiologia**, v. 27, n. 3, p. 395-407, 2005.

GONZÁLEZ, J. D. M. **Análise da suscetibilidade à invasão do capim-annoni-2 sobre áreas do Bioma Pampa do município de Aceguá-RS**. 2017. 96 f. Dissertação (Mestrado em Sensoriamento Remoto) - Centro Estadual de Pesquisa em Sensoriamento Remoto e Meteorologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

GUSMAN, G. S.; VIEIRA, L. R.; VESTENA, S. Alelopatia de espécies vegetais com importância farmacêutica para espécies cultivadas. **Biotemas**, v. 25, n. 4, p. 37-48, 2012.

HABERMANN, E.; PEREIRA, V. de C.; IMATOMI, M.; PONTES, F. C.; GUALTIERI, S. C. J. *In vitro* herbicide activity of crude and fractionated leaf extracts of *Blepharocalyx salicifolius* (Myrtaceae). **Brazilian Journal of Botany**, v. 40, n. 1, p. 33-40, 2017.

HAIG, T. Application of hyphenated chromatography–mass spectrometry techniques to plant allelopathy research. **Journal of Chemical Ecology**, v. 27, n. 12, p. 2365-2396, 2001.

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 of Chemical Ecology**, v. 35, p. 1129–1136, 2009.

HEJL, A. M.; KOSTER, K. L. The allelochemical sorgoleone inhibits root H⁺-ATPase and water uptake. **Journal of Chemical Ecology**, v. 30, n. 11, p. 2181-2191, 2004.

HONG, N. H.; XUAN, T. D.; EIJI, T.; KHANH, T. D. Paddy weed control by higher plants from Southeast Asia. **Crop Protection**, v. 23, n. 3, p. 255–261, 2004.

HUANG, H.; ASOLKAR, R. **Use of sarmentine and its analogs for controlling plant pests**. WO2011011415A2, 27 jan. 2011.

HUSSAIN, M. I.; REIGOSA, M. J. Allelochemical stress inhibits growth, leaf water relations, PSII photochemistry, non-photochemical fluorescence quenching, and heat energy dissipation in three C₃ perennial species. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 4533-4545, 2011.

HWANG, B. K.; SUNG, N. K. Effect of metalaxyl on capsidiol production in stems of pepper plants infected with *Phytophthora capsici*. **Plant Disease**, v. 73, p. 748–751, 1989.

INDERJIT. Plant phenolics in allelopathy. **Botanical Review**, v. 62, n. 2, p. 186–202, 1996.

INDERJIT; DAKSHINI, K. M. M. On laboratory bioassays in allelopathy. **The Botanical Review**, v. 61, p. 28-44, 1995.

- INDERJIT; CHENG, H. H.; NISHIMURA, H. Plant phenolics and terpenoids: transformation, degradation, and potential for allelopathic interactions. In: INDERJIT; DAKSHINI, K. M. M.; FOY, C. L. (Ed.). **Principles and practices in plant ecology: allelochemical interactions**. Boca Raton: CRC, 1999. p. 255–266.
- INDERJIT; DAKSHINI, K. M. M. Bioassays for allelopathy: interactions of soil organic and inorganic constituents. In: INDERJIT; DAKSHINI, K. M. M. (Ed.). **Principles and practice of plant ecology - allelochemical interactions**. Boca Raton: CRC, 1999. p. 35-42.
- INDERJIT; MURAMATSU, M.; NISHIMURA, H. On the allelopathic potential of certain terpenoids, phenolics, and their mixtures, and their recovery from soil. **Canadian Journal of Botany**, v. 75, p. 888-891, 1997.
- INDERJIT; STREIBIG, J. C.; OLOFSDOTTER, M. Joint action of phenolic acid mixtures and its significance in allelopathy research. **Physiologia Plantarum**, v. 114, n. 3, p. 422-428, 2002.
- INDERJIT; WEINER, J. Plant allelochemical interference o soil chemical ecology? **Perspectives in Plant Ecology Evolution Systematics**, v. 4, p. 4–12, 2001.
- INDERJIT; WESTON, L. A. Are laboratory bioassays for allelopathy suitable for prediction of field responses? **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, p. 2111-2118, 2000.
- JABRAN, K.; FAROOK, M.; HUSSAIN, M.; REHMANH J.; 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.
- JAMIL, M.; CHEEMA, Z. A.; MUSHTAQ, M. N.; FAROOQ, M.; CHEEMA, M. A. Alternative control of wild oat and canary grass in wheat fields by allelopathic plant water extracts. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 29, p. 475-482, 2009.
- KLEIN, A. P. P.; SOUZA, J. de. **Otimização do processo de obtenção do óleo essencial de folhas frescas e secas de capim-annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) por hidrodestilação**. 2012. 35 f. Conclusão de curso (Bacharel em Química) - Curso de Bacharelado em Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2012.
- KUMAR, K. S.; HAN, T. Physiological response of *Lemna* species to herbicides and its probable use in toxicity testing. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 2, p. 39-49, 2010.
- LAHIVE, E.; HALLORAN, J. O.; JANSEN, M. A. K. Differential sensitivity of four Lemnaceae species to zinc sulphate. **Environmental and Experimental Botany**, v. 71, p. 25-33, 2011.

- LEDERER, B.; FUJIMORI, T.; TSUJINO, Y.; WAKABAYASHI, K.; BÖGER, P. Phytotoxic activity of middle-chain fatty acids II: peroxidation and membrane effects. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 80, n. 3, p. 151-156, 2004.
- LEE, S. O.; CHOI, S. Z.; CHOI, S. U.; RYU, S. Y.; LEE, K. R. Phytochemical constituents of the aerial parts from *Aster hispidus*. **Natural Products Science**, v. 10, p. 335-340, 2004.
- LEE, W. B.; KWON, H. C.; CHO, O. R.; LEE, K. C.; CHOI, S. U.; BAEK, N. I.; LEE, K. R. Phytochemical constituents of *Cirsium setidens* Nakai and their cytotoxicity against human cancer cell lines. **Archives of Pharmacal Research**, v. 25, p. 628-635, 2002.
- LI, Z. H.; WANG, Q.; RUAN, X.; PAN, C. D.; JIANQ, D. A. Phenolics and plant allelopathy. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 8933-8952, 2010.
- LÔBO, L. T.; CASTRO, K. C. F.; ARRUDA, M. S. P.; SILVA, M. N. da; ARRUDA, A. C.; MULLER, A. H.; ARRUDA, G. M. S. P.; SANTOS, A. S.; SOUZA FILHO, A. P. da S. Potencial alelopático de catequinas de *Tachigali myrmecophyla* (Leguminosae). **Química Nova**, v. 31, n. 3, p.493-497, 2008.
- LLUSIÀ, J.; ESTIARTE, M.; PEÑUELAS, J. Terpenoids and Plant Communication. **Butlletí de la Institució Catalana d'Historia Natural**, v. 64, p. 125-133, 1996.
- LYU, S. W.; BLUM, U.; GERIG, T. M.; O'BRIEN, T. E. Effects of mixtures of phenolic acids on phosphorus uptake by cucumber seedlings. **Journal of Chemical Ecology**, v. 16, p. 2559-2567, 1990.
- MACÍAS, F. A. Allelopathy in the search for natural herbicide models. In: INDERJIT; DAKSHINI, K. M. M.; EINHELLIG, F. A. (Ed.). **Allelopathy: organisms, processes, and applications**. Washington: American Chemical Society, 1995. p. 310-329.
- MACÍAS, F. A.; CASTELLANO, D.; MOLINILLO, J. M. Search for a standard phytotoxic bioassay for allelochemicals: selection of standard target species. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2512-2521, 2000.
- MACÍAS, F. A.; MOLINILLO, J. M. G.; GALINDO, J. C. G.; VARELA, R. M.; SIMONET, A. M.; CASTELLANO, D. The use of allelopathic studies in the search for natural herbicides. **Journal of Crop Production**, v. 4, n. 2, p. 237-255, 2001.
- MACÍAS, F. A.; MOLINILLO, J. M. G.; VARELA, R. M.; GALINDO, J. C. G. Allelopathy - a natural alternative for weed control. **Pest Management Science**, v. 63, p. 327-348, 2007.

- MACÍAS, F. A.; OLIVEROS-BASTIDAS, A.; MARÍN, D.; CARRERA, C.; CHINCHILLA, N.; MOLINILLO, J. M. G. Plant biocommunicators: their phytotoxicity, degradation studies and potential use as herbicide models. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, p. 179-194, 2008.
- MARTÍNEZ-PEÑALVER, A.; PEDROL, N.; REIGOSA, M. J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A. M. Tolerance of *Arabidopsis thaliana* to the allelochemical Protocatechualdehyde. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 31, p. 406-415, 2012.
- MECINA, G. F.; SANTOS, V. H. M.; DOKKEDAL, A. L.; SALDANHA, L. L.; SILVA L. P.; SILVA, R. M. G. Phytotoxicity of extracts and fractions of *Ouratea spectabilis* (Mart. ex Engl.) Engl. (Ochnaceae). **South African Journal of Botany**, v. 95, p. 174-180, 2014.
- MEDEIROS, R. B.; FOCHT, T. Invasão, prevenção, controle e utilização do capim-annoni (*Eragrostis plana* Nees) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 13, n. 1-2, p. 105-144, 2007.
- MICHEL, A.; JOHNSON, R. D.; DUKE, S. O.; SCHEFFLER, B. E. Dose-response relationships between herbicides with different modes of action and growth of *Lemna paucicostata*: an improved ecotoxicological method. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, p. 1074-1079, 2004.
- NASCIMENTO, A.; HALL, G. A. B. Estudos comparativos de capim-annoni-2 (*Eragrostis plana*) e pastagem nativa de várzea da região de Santa Maria, Rio Grande do Sul. 1. Características químico-bromatológicas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 13, n. 2, p. 7-14, 1978.
- NGUYEN, K. T.; ARSENAULT, P. R.; WEATHERS, P. J. Trichomes + roots + ROS = artemisinin: regulating artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 47, n. 3, p. 329-338, 2011.
- NIESSEN, W. M. A. Progress in liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1-2, p. 413-436, 2003.
- NISHIYA, K.; KIMURA, T.; TAKEYA, K.; TOKAWA, H.; LEE, S. R. Diterpenoids from *Eragrostis ferruginea*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 7, p. 2410-2411, 1991.
- NOVAES, P.; MOLINILLO, J. M. G.; VARELA, R. M.; MACÍAS, F. Ecological phytochemistry of Cerrado (Brazilian savana) plants. **Phytochemistry Reviews**, v. 12, p. 839-855, 2013.
- NÚÑEZ, O.; GALLART-AYALA, H.; MARTINS, C. P. B.; LUCCI, P. New trends in fast liquid chromatography for food and environmental analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1228, p. 298-323, 2012.

OLIVEIRA, S. C. C.; BORGHETTI, F.; FERREIRA, A. G. Effect of *Solanum lycocarpum* fruit extract on sesame seed germination and seedling growth. **Allelopathy Journal**, v. 13, n. 2, p. 201-210, 2004.

OLIVEIRA, S. C. C.; GUALTIERI, S. C. J.; DOMÍNGUEZ, F. A. M.; MOLINILLO, J. M. G.; MONTOYA, R. V. Estudo fitoquímico de folhas de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil (Solanaceae) e sua aplicação na alelopatia. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 3, p. 607-618, 2012.

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

PARVEZ, S. S.; PARVEZ, M. M.; FUJII, Y.; GEMMA, H. Allelopathic competence of *Tamarindus indica* L. root involved in plant growth regulation. **Plant Growth Regulation**, v. 41, n. 2, p. 139-148, 2003.

PATTERSON, D. T. Effects of allelopathic chemicals on growth and physiological response of soybean (*Glycine max*). **Weed Science**, v. 29, p. 53-58, 1981.

PEÑUELAS, J.; RIBAS-CARBO, M.; GILES, L. Allelochemical effects of plant respiration and on oxygen discrimination by alternative oxidase. **Journal of Chemical Ecology**, v. 22, p. 801-805, 1995.

PETERS, R. J. Uncovering the complex metabolic network underlying diterpenoid phytoalexin biosynthesis in rice and other cereal crops. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2307-2317, p. 2006.

QUEIROZ, S. C. N.; CANTRELL, C. L.; DUKE, S. O.; WEDGE, D. E.; NANDULA, V. K.; MORAES, R. M.; CERDEIRA, A. L. Bioassay-directed isolation and identification of phytotoxic and fungitoxic acetylenes from *Conyza canadensis*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 60, p. 5893-5898, 2012.

QIAN, H.; XUA, X.; CHENA, W.; JIANGB, H.; JINA, Y.; LIUA, W.; FUA, Z. Allelochemical stress causes oxidative damage and inhibition of photosynthesis in *Chlorella vulgaris*. **Chemosphere**, v. 75, p. 368-375, 2009.

R-DEVELOPMENT CORE TEAM (R). **A Language and Environment for Statistical Computing**. Viena: R Foundation for Statistical Computing, 2009.

RANAL, M. A.; SANTANA, D. G. How and why to measure de germination process? **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n. 1, p. 1-11, 2006.

RASMUSSEN, J. A.; EINHELLIG, F. A. Synergistic inhibitory effects of p-coumaric and ferulic acids on germination and growth of grain sorghum. **Journal of Chemical Ecology**, v. 3, n. 2, p. 197-205, 1977.

RASMUSSEN, J. A. Inhibitory effects of combinations of three phenolic acids on grain sorghum germination. **Plant Science Letters**, v. 14, p. 69-74, 1979.

RAZAVI, S. M. Plant coumarins as allelopathic agents. **International Journal of Biological Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 86-90, 2011.

REIGOSA, M. J.; SOUTO, X. C.; GONZÁLEZ, L. Effect of phenolic compounds on the germination of six weeds species. **Plant Growth Regulation**, v. 28, n. 2, p.8 3-88, 1999.

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

REIK, G. G. **Fitotoxicidade e eficácia de extratos aquosos aplicados no manejo de plantas daninhas em culturas de verão**. 2016. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim, 2016.

REIS, J. C. L. **Capim-annoni: origem, morfologia, características, disseminação**. Bagé: Embrapa Pecuária Sul, 1993. (Documento técnico, 7).

REIS, J. C. L.; COELHO, R. W. **Controle do capim-annoni em campos naturais e pastagens**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2000. (Circular Técnica, 22).

RIAL, C.; GARCÍA, B. F.; VARELA, R. M.; TORRES, A.; MOLINILLO, J. M.; MACÍAS, F. A. The joint action of sesquiterpene lactones from leaves as an explanation for the activity of *Cynara cardunculus*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 64, n. 33, p. 6416-6424, 2016.

RICE, E. L. **Allelopathy**. 2. ed. New York: Academic Press, 1984.

RITZ, C.; STREIBIG, J. C. Bioassay analysis using R. **Journal of Statistical Software**, v. 12, p. 1-22, 2005.

RIZVI, S. J. H.; RIZVI, V. Exploration of allelochemicals in improving crop productivity. In: RIZVI, S. J. H.; RIZVI, V. (Ed.). **Allelopathy**. New York: Chapman & Hall, 1992. p. 443-472.

RODRIGUEZ, M. V. N.; REHDER, V. L. G.; SARTORATTO, A.; BOAVENTURA, S.; SANTOS, A. da S. O emprego de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais. **Multiciência**, v. 7, p. 37-42, 2006.

ROMAGNI, J. G.; DUKE, S. O.; DAYAN, F. E. Inhibition of plant asparagine synthetase by monoterpene cineoles. **Plant Physiology**, v. 123, n. 2, p. 725-732, 2000.

SANTOS, W. D. dos; FERRARESE, M. de L. L.; FERRARESE-FILHO, O. Ferulic acid: an allelochemical troublemaker. **Functional Plant Science and Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 47-55, 2008.

SARKER, S. D.; NAHAR, L. Hyphenated techniques. In: SARKER, S. D.; LATIF, Z.; GRAY, A. Y. (Ed.). **Natural Products Isolation**. 2. ed. Totowa: Humana Press, 2005. p. 233-268.

SATHIYAMOORTHY, P. Identification of vanillic and p-coumaric acid as endogenous inhibitors of soybean seeds and their inhibitory effect on germination. **Journal of Plant Physiology**, v. 136, p. 120-121, 1990.

SCHMELZ, E. A.; HUFFAKER, A.; SIMS, J. W.; SHAWN, A.; LU, X. C.; OKADA, K.; PETERS, R. J. Biosynthesis, elicitation and roles of monocot terpenoid phytoalexins. **The Plant Journal**, v. 79, p. 659-678, 2014.

SEBASTIÃO, N. N.; CORDEIRO, I. J. S.; SANTOS, A. F. dos; GASPAR, J. F.; MARTINS, C.; RUEFF, J.; DIAKANAMWA, C.; SANT'ANA, A. E. G.; MENDONÇA, D. I. M. de. 8,15-Epoxyabdane and norlabdane diterpenoids from *Eragrostis viscosa*. **Phytochemistry**, v. 71, p. 798-803, 2010.

SENSEMAN, S. A. **Herbicide Handbook**. 9. ed. Lawrence: WSSA, 2007.

SERMAKKANI, M.; THANGAPANDIAN, V. GC-MS analysis of *Cassia italica* leaf methanol extract. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 5, n. 2, p. 90-94, 2012.

SCHULZ, M.; KUSSMANN, P.; KNOP, M.; KRIEGS, B.; GRESENS, F.; EICHERT, T.; ULBRICH, A.; MARX, F.; FABRICIUS, H.; GOLDBACH, H.; NOGA, G. Allelopathic monoterpenes interfere with *Arabidopsis thaliana* cuticular waxes and enhance transpiration. **Plant Signal & Behaviour**, v. 2, p. 231-239, 2007.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 39, p. 3733-3740, 2016.

SILVA, M. G. F. da. **Avaliação do potencial alelopático de raízes de Capim Annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) e estudo fitoquímico**. 2014. 99 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2014.

SILVERSTEIN, M. R.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6. ed. Botafogo: Guanabara, 2001.

- SOLTYS, D.; KRASUSKA, U.; BOGATEK, R.; GNIAZDOWSKA, A. Allelochemicals as bioherbicides – Present and perspectives. In: PRICE, A. J.; KELTON, J. **Herbicides current research and case studies in use**. Warsaw: InTech, 2013. p. 517-542.
- SOUZA FILHO, A. P. S. Proposta metodológica para análise da ocorrência de sinergismo e efeitos potencializadores entre aleloquímicos. **Planta Daninha**, v. 24, n. 3, p. 607-610, 2006.
- 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.
- SOUZA FILHO, A. P. S.; RODRIGUES, L. R. A.; RODRIGUES, T. J. D. Potencial alelopático de forrageiras tropicais: efeitos sobre invasoras de pastagens. **Planta Daninha**, v. 15, n. 1, p. 53-60, 1997.
- TAMONGANI, S.; MITANI, M. Oryzalexin S structure: a new stemarane-type rice plant phytoalexin and its biosynthesis. **Tetrahedron**, v. 49, p. 2025–2032, 1993.
- 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.
- TEDESCO, M. J.; VOLKWEISS, S. J.; BOHNEN, H. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: UFRGS, 1995.
- TELLEZ, M. R.; DAYAN, F. E.; SCHRADER, K. K.; WEDGE, D. E.; DUKE, S. O. Composition and some biological activities of the essential oil of *Calliarpa americana* (L.). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, p. 3008-3012, 2000.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA. **Plants Database** (Versão 3.5). Disponível em: < <http://plants.usda.gov/> >. Acesso em: Out. 2017.
- YANG, Q.; CAO, W.; ZHOU, X.; CAO, W.; XIE, Y.; WANG, S. Anti-thrombotic effects of α -linolenic acid isolated from *Zanthoxylum bungeanum* Maxim seeds. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, p. 348-356, 2014.
- WALLER, G. R. **Allelochemicals: role in agriculture and forestry**. Washington: American Chemical Society, 1987.
- WANG, W. Literature Review on Duckweed Toxicity Testing. **Environmental Research**, v. 52, n. 1, p. 7-22, 1990.

WEDGE, D. E.; NAGLE, D. G. A new 2D-TLC bioautography method for the discovery of novel antifungal agents to control plant pathogens. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1050-1054, 2000.

WESTON, L. A.; DUKE, S. O. Weed and crop allelopathy. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, n. 3-4, p. 367-389, 2003.

WHITTAKER, R. H.; FEENY, P. P. Allelochemics: chemical interactions between species. **Science**, v. 171, n. 3, p. 757-770, 1971.

XU, M.; GALHANO, R.; WIEMANN, P.; BUENO, E.; TIERNAN, M.; CHUNG, I. M.; GERSHENZON, J.; TUDZYNSKI, B.; SESMA, A.; PETERS, R. J. Genetic evidence for natural product-mediated plant-plant allelopathy in rice (*Oryza sativa*). **New Phytology**, v. 193, p. 570-575, 2012.

ZEENI, R. D.; ZILLER, S. R. An overview of invasive plants in Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 34, n. 3, p. 431-446, 2011.

ZHOU, Y. H.; YU, J. Q. Allelochemicals and photosynthesis. In: REIGOSA, M. J.; PEDROL, N.; GONZÁLEZ, L. **Allelopathy: a physiological process with ecological implications**. Dordrecht: Springer, 2006. p. 127-139.



PPGAgro

Programa de Pós-Graduação em Agronomia

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - FAMV