



Universidade de Brasília

Programa de pós-graduação em Botânica

**Extratos de folhas de *Lepidaploa aurea* (Mart. ex DC.) H. Rob.
(Asteraceae) como potencial bioherbicida contra gramíneas
exóticas invasoras do Cerrado**

Karina Alacid Salles

Brasília-DF

Janeiro/2025



Universidade de Brasília
Mestrado em Botânica

**Extratos de folhas de *Lepidaploa aurea* (Mart. ex DC.) H. Rob.
(Asteraceae) como potencial bioherbicida contra gramíneas
exóticas invasoras do Cerrado**

Karina Alacid Salles

Orientadora: Dra. Sarah Christina Caldas Oliveira

Dissertação de mestrado submetida
ao programa de pós-graduação em
Botânica da Universidade de Brasília,
como um dos requisitos necessários
para a obtenção do título de Mestre em
Botânica.

JANEIRO/2025

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

Agradecimentos

Agradeço,

À **Deus**, pelo dom da vida e por todos os caminhos que se abriram para mim.

Ao meu companheiro, amigo, pai, irmão, amor da minha vida, **Ernani Mendes Salles**, quem me incentivou a esta empreitada mesmo depois dos 50, por todo amor, apoio, incentivo e aturar meu estresse durante cada dia. Aos meus filhos **Luiza, Breno e Paulo** que vivenciaram ao meu lado os momentos de ansiedade e conquistas. Ao meu neto, **Luigi**, que queria brincar comigo, mas a vovó tinha que estudar e trabalhar. Aos meus familiares, que mesmo de longe torcem pelo meu sucesso, minha mãe **Catarina** e meus irmãos **Simone, Camila e Bruno**, à minha madrinha **Virgínia**, e *in memoriam* ao meu pai **Nélio** e ao meu padrinho **Sérgio** que sempre acreditaram em mim e me incentivaram em todos os momentos da minha vida.

À minha orientadora, **Dra. Sarah Christina Caldas Oliveira**, por toda ajuda, paciência, compreensão, incentivo, pela amizade e por tudo que aprendi sobre profissionalismo, cuidado e dedicação.

A todos os meus amigos do CECIPE que me acompanharam até aqui, me incentivam e cobrem minhas faltas nos trabalhos voluntários, agradeço por cada palavra de apoio, cada abraço, por todo carinho e pela compreensão com minha ausência durante esse período.

Aos companheiros de laboratório, todos os professores e técnicos, em especial ao **Jonathan** e ao **Luan** agradeço a ajuda e companheirismo.

A FAPDF e CAPES pelo apoio financeiro.

À Universidade de Brasília e a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

Lista de Tabelas

Tabela 1 Soluções utilizadas para as extrações aquosas de folhas de <i>L. aurea</i> e as respectivas concentrações de água destilada, metanol e ácido acético.....	23
Tabela 2 Soluções utilizadas para a purificação por SPE da fração do acetato de etila (Fac) do extrato de folhas de <i>L. aurea</i> e as respectivas concentrações de metanol, água destilada e diclorometano.....	25
Tabela 3 Soluções utilizadas para a purificação por SPE da fração F1 e as respectivas concentrações de metanol, água destilada e diclorometano	26
Tabela 4 Escala de classificação da Sociedade Europeia de Pesquisas de Ervas Daninhas (EWRS) usada para pontuar a eficácia do controle das espécies daninhas no bioensaio de hidroponia.....	31
Tabela 5 Rendimento das extrações ácidas E1, E2, E3 e E4 de extrato de folhas de <i>L. aurea</i> ..	34
Tabela 6 Rendimento em porcentagem das frações e IC 50 de F1, K3, K4, K5 e do Glifosato.....	41
Tabela 7 Resultado da Regressão linear simples e ANOVA a 95% de confiança do bioensaio de hidroponia com a fração Fac do extrato de <i>L. aurea</i> e o Glifosato nas espécies <i>P. maximum</i> , <i>E. indica</i> , <i>B. pilosa</i> e <i>C. bonariensis</i>	45
Tabela 8 Resultado dos ensaios fitoquímicos preliminares de saponinas, fenóis, taninos, alcaloides e terpenoides. Muito intenso: +++++, Intenso: +++, Moderado: ++, Leve: +, e ausente: -, no extrato aquoso de folhas de <i>L. aurea</i>	46
Tabela 9 Resultado dos ensaios fitoquímicos colorimétricos preliminares em CCD de fenóis, taninos, alcaloides e terpenoides. Muito intenso: +++++, Intenso: +++, Moderado: ++, Leve: +, e ausente: -, nas frações F1, K3, K4 e K5 provenientes do fracionamento e purificação do extrato aquoso de folhas de <i>L. aurea</i>	47
Tabela 10 Moléculas com alguma atividade alelopática encontradas nas frações F1, K3, K4 e K5 provenientes do fracionamento e purificação do extrato aquoso de folhas de <i>L. aurea</i> , através de CG/MS, suas estruturas, propriedades e o Qual, de acordo com a biblioteca NIST11.L.....	49

Lista de Figuras

- Figura 1** Serrapilheira de *L. aurea*. Foto própria.....18
- Figura 2** Área de restauração ecológica no Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros, GO, mostrando o estabelecimento de *L. aurea* coexistindo com plantas nativas, mas não com gramíneas exóticas invasoras. Foto: Keiko Fueta Pellizzaro.....18
- Figura 3** Esquema do isolamento biodirigido com o fracionamento do extrato aquoso de folhas de *L. aurea* com acetato de etila e posterior fracionamento com SPE/CL18, as frações separadas e o bioensaio de coleóptilo estiolado de trigo.....24
- Figura 4** Planilha com os coleóptilos após bioensaio. CONTROL: controle com tampão e DMSO a 5µL/mL; P1: Solução com a fração F1, tampão e DMSO; P2: Solução com a fração F2, tampão e DMSO; P3: Solução com a fração F3, tampão e DMSO; P4: Solução com a fração F4, tampão e DMSO; D1: diluição a 800 ppm; D2: Diluição a 400 ppm; D3: Diluição a 200 ppm.....28
- Figura 5** Foto para medição pelo ImageJ ® do controle branco do tomate (*S. lycopersicum*) do bioensaio de sementes alvo padrão.....29
- Figura 6** Cromatografia de camada delgada das extrações ácidas E, E2, E3 e E4 de folhas de *L. aurea*, como fase móvel uma solução de 5% de metanol e 95% de clorofórmio. Em a: E1, E2, E3 e E4 da esquerda para a direita respectivamente, após revelação em Oleum; b: E1, E2, E3 e E4 da esquerda para a direita respectivamente, exposto a luz UV 254 nm; c: E1, E2, E3 e E4 da esquerda para a direita respectivamente, exposto a luz UV 365 nm.....35
- Figura 7** Porcentagem de bioatividade de extrato foliares de *L. aurea*, das frações EB (extrato aquoso bruto), FAQ (fração aquosa da separação com acetato de etila), FAC (fração do acetato de etila), F1, F2, F3 e F4 da fração do acetato de etila (FAC), e do Glifosato (GLF, controle positivo) em coleóptilos estiolados de trigo, em relação ao controle, nas concentrações de 800, 400 e 200 ppm. Significância: a = $p < 0,01$; b = $0,01 < p < 0,05$; n.s. = $p > 0,05$ (não significativo)36
- Figura 8** Cromatografia de coluna delgada do extrato aquosos bruto (Eb) de folhas de *L. aurea*, usando como fase móvel uma solução de 50% acetona e 50% hexano. a: após revelação em Oleum; b: exposto a luz UV 254 nm; c: exposto a luz UV 365 nm.....37
- Figura 9** Cromatografia de camada delgada da fração do acetato de etila (Fac) do extrato aquosos de folhas de *L. aurea*, como fase móvel uma solução de 50% acetato de etila e 50% hexano. a: após revelação em Oleum; b: exposto a luz UV 254 nm; c: exposto a luz UV 365 nm.....38
- Figura 10** Cromatografia de camada delgada das frações F1, F2, F3, F4 e da fração do acetato de etila (Fac, representada na figura como B) do extrato aquosos de folhas de *L. aurea*, como fase móvel uma solução de 30% de acetona e 70% hexano. a: F1, F2, F3, F4 e fração do acetato de etila (Fac) da esquerda para a direita respectivamente, após revelação em Oleum; b: F1, F2, F3, F4 e fração do acetato de etila (Fac) da esquerda para a direita respectivamente, exposto a

luz UV 254 nm; c: F1, F2, F3, F4 e fração do acetato de etila (Fac) da esquerda para a direita respectivamente, exposto a luz UV 365 nm.....39

Figura 11 Sólido branco nas frações K3, K4 e K5 obtidas na purificação por SPE da fração F1.....39

Figura 12 Porcentagem de bioatividade de extratos foliares de *L. aurea* das frações F1 (fração mais bioativa de Fac), K3, K4 e K5 (frações com maior rendimento a partir da F1) e do Glifosato (Glif, controle positivo) em coleóptilos estiolado de trigo, em relação ao controle, nas concentrações de 800, 400 e 200 ppm. Significância: a = $p < 0,01$ e b = $0,01 < p < 0,05$40

Figura 13 Cromatografia de coluna delgada das frações K3, K4 e K5 da fração F1 do acetato de etila (Fac) do extrato aquosos de folhas de *L. aurea*, como fase móvel uma solução de 5% de metanol e 95% de clorofórmio, após revelação em *Oleum*.....41

Figura 14 Efeito das frações Fac, F1, e K5 do extrato de *L. aurea* e do glifosato (Glif), nas concentrações de 200, 400 e 800 ppm, na germinação e crescimento de *L. sativa* (A), *N. officinale* (B), *S. lycopersicum* (C) e *A. schoenoprasum* (D), com valores expressos em porcentagem em relação ao controle, e significância com a = $p < 0,01$; b = $0,01 < p < 0,05$43

Figura 15 Efeito de fitotoxicidade da fração Fac do extrato de *L. aurea* e do glifosato (Glif), nas concentrações de 200, 400 e 800 ppm em *P. maximum*, *E. indica*, *B. pilosa* e *C. bonariensis*, no bioensaio de hidroponia, expresso em porcentagem de dano em relação ao controle nas espécies testadas de acordo com a EWRS.....44

Figura 16 Efeito de fitotoxicidade da fração Fac do extrato de *L. aurea* e do glifosato (Glif), nas concentrações de 800 ppm em comparação com o controle negativo (tampão MS) em *B. pilosa* (A), *C. bonariensis* (B), *P. maximum* (C) e *E. indica* (D), no bioensaio de hidroponia....45

Figura 17 Resultado dos ensaios de detecção de saponinas (A), fenóis e taninos (B), alcaloides (C) e terpenoides (D), respectivamente da esquerda para a direita, em extrato aquoso de folhas de *L. aurea*.....46

Figura 18 Resultado dos ensaios de detecção de fenóis e taninos (A), alcaloides (B) e terpenoides (C), respectivamente da esquerda para a direita, das frações F1, K3, K4 e K5 obtidas da purificação do extrato de folhas de *L. aurea*.....48

Resumo

Espécies exóticas invasoras são uma ameaça à biodiversidade e um grande desafio em áreas de restauração ecológica, dificultando a sucessão ecológica em áreas degradadas e o trabalho da restauração assim como as plantas daninhas na agricultura. Para o controle das plantas daninhas e das espécies exóticas invasoras são comumente utilizados herbicidas, sendo o glifosato o mais utilizado, já apresentando resistência de alguns biótipos. A tendência ecológica e sustentável no manejo destas plantas tem direcionado os estudos de compostos naturais como herbicidas ambientalmente seguros, os “bioherbicidas”, compostos orgânicos produzidos por organismos vivos, dentre eles, compostos do grupo dos metabólitos secundários de plantas, pois alguns são fitotóxicos, como os compostos alelopáticos. A espécie arbustiva *Lepidaploa aurea* (Mart. ex DC.) H. Rob. (Asteraceae), nativa do Cerrado, tem sido muito utilizada em ações de restauração ecológica por ter bom estabelecimento e competir muito bem com as espécies exóticas invasoras, e já foi verificado seu potencial alelopático em estudos anteriores. Portanto o presente estudo teve como objetivo avaliar a fitotoxicidade e o potencial bioherbicida de extratos de folhas de *L. aurea* para o controle de gramíneas exóticas invasoras do Cerrado. Foi usado extrato aquoso de folhas de *L. aurea*. Para identificar os compostos secundários ativos e avaliar a fitotoxicidade foi feito um isolamento biodirigido, com a separação por acetato de etila e fracionamento com extração por fase sólida (SPE/CL18) com diferentes proporções de metanol:água, e bioensaios de coleóptilo de trigo estiolado e de sementes alvo padrão nas concentrações de 800, 400 e 200 ppm das frações obtidas no isolamento. No isolamento biodirigido foi obtido um sólido branco, solúvel em água e com atividade fitotóxica. Os compostos ativos foram extraídos com acetato de etila (Fac), com o resíduo aquoso (Faq) perdendo a atividade inibitória. Segundo seu fracionamento por diferença de polaridade em SPE/CL18, ele é mais polar, é solúvel em um gradiente de soluções de água:metanol desde 80% a 50% de água. Os compostos parecem ter seletividade para monocotiledôneas de acordo com os bioensaios de sementes alvo padrão e de hidroponia. Através de Cromatografia gasosa com espectrometria de massa (CG/MS) foram identificadas algumas moléculas com potencial alelopático, como compostos fenólicos: o ácido protocatecuico, o ácido gálico, o ácido cafeico, o ácido p-cumárico, e os seguintes derivados do ácido cinâmico: o ácido m-hidroxicinâmico, o ácido p-hidroxicinâmico, o metil m-hidroxicinamato, o metil p-hidroxicinamato, além do ácido palmítico, esteárico e aconítico.

Palavras-chave: Bioherbicida, compostos fitotóxicos, fitoquímica, Isolamento biodirigido,
Lepidaploa aurea

Abstract

Invasive exotic species pose a threat to biodiversity and represent a major challenge in areas of ecological restoration, hindering ecological succession in degraded areas and restoration efforts, much like weeds in agriculture. Herbicides are commonly used to control weeds and invasive exotic species, with glyphosate being the most widely used, though some biotypes have already developed resistance. The ecological and sustainable trend in the management of these plants has directed research towards natural compounds as environmentally safe herbicides, known as "bioherbicides," which are organic compounds produced by living organisms. Among these are secondary plant metabolites, some of which are phytotoxic, such as allelopathic compounds. The shrub species *Lepidaploa aurea* (Mart. ex DC.) H. Rob. (Asteraceae), native to the Cerrado, has been widely used in ecological restoration efforts due to its strong establishment and competitive ability against invasive exotic species. Previous studies have already identified its allelopathic potential. Therefore, the present study aimed to evaluate the phytotoxicity and bioherbicidal potential of *L. aurea* leaf extracts for controlling invasive exotic grasses in the Cerrado. An aqueous extract from *L. aurea* leaves was used. To identify active secondary compounds and assess phytotoxicity, bio-guided isolation was performed, using ethyl acetate separation and fractionation with solid-phase extraction (SPE/CL18) at different methanol:water proportions, followed by bioassays on etiolated wheat coleoptiles and standard target seeds at concentrations of 800, 400, and 200 ppm of the fractions obtained from the isolation process. Bio-guided isolation resulted in a white, water-soluble solid with phytotoxic activity. The active compounds were extracted with ethyl acetate (Fac), while the aqueous residue (Faq) lost its inhibitory activity. Based on fractionation by polarity differences in SPE/CL18, the compound was found to be more polar, being soluble in a gradient of water:methanol solutions ranging from 80% to 50% water. The compounds appear to have selectivity for monocotyledons, according to bioassays with standard target seeds and hydroponics. Gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) identified several molecules with allelopathic potential, including phenolic compounds such as protocatechuic acid, gallic acid, caffeic acid, and *p*-coumaric acid, as well as the following derivatives of cinnamic acid: *m*-hydroxycinnamic acid, *p*-hydroxycinnamic acid, methyl *m*-hydroxycinnamate, and methyl *p*-hydroxycinnamate. Additionally, palmitic acid, stearic acid, and aconitic acid were also identified.

Keywords: Bioherbicide, phytotoxic compounds, phytochemistry, Biodirected isolation, *Lepidaploa aurea*

Sumário

1. Introdução.....	12
2. Hipóteses.....	20
3. Objetivos.....	20
3.1. Objetivo geral.....	20
3.2. Objetivos específicos.....	21
4. Material e Métodos.....	21
4.1. Coleta de material vegetal.....	21
4.2. Produção de extrato das folhas de <i>L. aurea</i>	22
4.3. Extração ácida de folhas de <i>L. aurea</i>	22
4.4. Fracionamento do extrato aquoso bruto de folhas de <i>L. aurea</i>	23
4.5. Purificação do extrato de folhas de <i>L. aurea</i> por extração em cromatografia de fase sólida (SPE).....	24
4.6. Bioensaio de coleóptilo de trigo.....	26
4.7. Bioensaio de fitotoxicidade com sementes alvo padrão.....	28
4.8. Bioensaio de hidroponia.....	30
4.9. Ensaio fitoquímicos preliminares do extrato aquoso de folhas de <i>L. aurea</i>	31
4.9.1. Saponinas.....	31
4.9.2. Fenóis e Taninos.....	32
4.9.3. Alcaloides.....	32
4.9.4. Terpenoides.....	33
4.10. Análises instrumentais.....	33
4.10.1. Preparo e análise das amostras para CG/MS.....	33
5. Resultados e Discussão.....	34
5.1. Extração ácida de folhas de <i>L. aurea</i>	34
5.2. Bioensaio de coleóptilo de trigo.....	36
5.3. Bioensaio de fitotoxicidade com sementes padrão.....	41
5.4. Bioensaio de hidroponia.....	43
5.5. Ensaio fitoquímicos preliminares.....	46
5.6. Análises instrumentais.....	49
5.6.1. CG/MS.....	49
6. Conclusões.....	53
7. Referências bibliográficas.....	54

1. Introdução

Os herbicidas são substâncias químicas que podem atuar seletivamente, provocando a morte de certas plantas sem afetar outras. Etimologicamente a palavra herbicida vem do latim *herba* (plantas) *caedere* (matar) (OLIVEIRA JR, 2011), e são utilizados como um dos métodos para eliminar plantas daninhas das culturas.

Os termos “planta daninha”, planta exótica” ou “erva daninha” são usados para toda planta que ocorre em local e momento indesejável prejudicando a atividade humana. Os termos “planta exótica” ou “erva daninha” deveriam ser evitados já que essas plantas não são necessariamente herbáceas ou exóticas (BARROSO; MURATA, 2021; BRIGHENTI; OLIVEIRA, 2001). Em uma “era pós herbicida” e com o manejo integrado das plantas daninhas os conceitos gerados em épocas de culturas intensivas foi analisado mais holisticamente pois decidir se uma planta é daninha envolve um julgamento de valor, sendo mais um conceito ético e cultural que um conceito científico, sendo então proposto em (MERFIELD, 2022) como: “Uma planta, ou população de plantas, em um tempo e lugar específicos, causando danos significativos, imediatamente ou a longo prazo, com base em uma análise holística de seus atributos positivos e negativos”. As plantas daninhas competem por água, luz e nutrientes com a cultura, reduzindo assim a produtividade da cultura e o desenvolvimento das culturas, além de servir de porta de entrada de pragas e doenças, dificultando a implantação e/ou manejo da cultura (SALOMÃO; FERRO; RUAS, 2020). O controle das infestantes está entre os maiores problemas enfrentados pela agricultura mundial (COSTA et al., 2018), existindo diferentes meios de controle: mecânico, físico, químico e biológico (BARROSO; MURATA, 2021; SOUZA BARROS et al., 2021). Dentre os métodos físicos, a roçada é uma boa opção para culturas com espaçamentos maiores (OLIVEIRA; BRIGUETI, 2018) e o método químico com o uso de herbicidas, propiciou também a “Revolução verde” na agricultura, combatendo as plantas daninhas permitindo o desenvolvimento de sistemas mais produtivos (BARROSO; MURATA, 2021; CONCENÇO et al., 2014).

Os herbicidas contribuíram com 56,63% do volume total dos defensivos agrícolas (herbicidas, inseticidas e fungicidas) que foram comercializados no Brasil em 2021 (IBAMA, 2021). O N-(fosfometil) glicina, o glifosato, é um dos herbicidas mais utilizado no mundo. É um sólido branco, com fórmula $C_3H_8NO_5P$, e massa molar de 169,1 g/mol (SINGH et al., 2020). Começou a ser comercializado em 1974 nos EUA, com nome comercial Roundup®,

pela Monsanto Company, existindo outras formulações disponíveis no mercado, como a Accord® e Touchdown® (TARAZONA et al., 2017). Já no Brasil existem mais de 100 produtos à base de glifosato registrados, comercializados por 34 empresas (AGROFIT, 2023). A ANVISA o classifica como na classe IV, pouco tóxico (ANVISA, 2018) e é um provável cancerígeno humano (grupo 2A) (IARC/WHO. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2015). Na União Europeia (UE) há um longo debate sobre o uso do glifosato e a renovação do seu registro foi aprovado por mais 10 anos, mas políticas públicas europeias exigem uma redução de 50% no uso de pesticidas até 2030 (NEVE et al., 2024).

Com o uso constante e repetitivo desses herbicidas sintéticos, tem ocorrido a seleção de biótipos resistentes a esses produtos como, por exemplo, ao glifosato e ao 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (SCHÜTTE et al., 2017). Num número crescente de situações, as plantas daninhas resistentes aos herbicidas limitam a produção agrícola e trazem efeitos ao meio ambiente (DE AMARANTE JUNIOR et al., 2002). De acordo com o HRAC – comitê de ação de resistência a herbicidas (“Herbicide resistance action committee”, [s.d.]), até o momento, em torno de 250 espécies de plantas daninhas apresentam resistência a pelo menos um modo ou local de ação de herbicida no mundo, com 523 casos únicos (espécies x local de ação), com 269 espécies (154 eudicotiledôneas e 115 monocotiledôneas) (HEAP, [s.d.]). Esta resistência foi desenvolvida pelas plantas daninhas a 21 dos 31 locais de ação de herbicidas conhecidos e a 167 herbicidas diferentes, sendo relatadas em 99 culturas em 72 países (HEAP, [s.d.]). Entre as espécies relatadas com resistência ao glifosato no Brasil encontram-se o azevém-perene (*Lolium perene* L. vr. multiflorum), o capim-pé-de-galinha (*Eleusine indica* (L.) Gaertn), o caruru (*Amaranthus palmeri* S. Watson), o capim-amargoso (*Digitaria insularis* (L.) Mez ex Ekman), o capim-branco (*Chloris elata* Desv.), a buva (*Conyza sumatrensis* (Retz.) E. Walker), sendo essa última com resistência a múltiplos herbicidas (INTERNATIONAL SURVEY OF HERBICIDE RESISTENTE WEEDS, 2024; KASPARY et al., 2024; SOUZA BARROS et al., 2021).

Com esse crescimento da resistência aos herbicidas pelas plantas daninhas e as consequentes perdas econômicas, surgiu então a necessidade de novas soluções para enfrentar esse problema, como o desenvolvimento de novos herbicidas com mecanismos de ação e locais alvos ainda não explorados (DUKE et al., 2024). Além disso, na agricultura orgânica e em ações de restauração ecológica em unidades de conservação, há poucos herbicidas sintéticos aprovados e esses não têm muita aceitação pública (DAYAN; CANTRELL; DUKE, 2009).

Manejar de forma sustentável e ecologicamente correta as plantas daninhas é um desafio (ABD-ELGAWAD et al., 2021), mas esta tendência está direcionando os estudos de compostos naturais para serem utilizados como herbicidas ambientalmente seguros, chamados de “bioherbicidas”, que são compostos orgânicos produzidos por organismos vivos, dentre eles, compostos do grupo dos metabólitos secundários de plantas. Alguns desses metabólitos participam de interações químicas entre as plantas, as denominadas interações alelopáticas (SOLTYS et al., 2013). O Conselho Internacional de Língua Francesa, em 1971, definiu os bioherbicidas como substâncias utilizadas no controle de plantas daninhas sem degradar o meio ambiente (CORDEAU et al., 2016; MATHUR; GEHLOT, 2018). O único bioherbicida sistêmico comercializado no momento é o Bialaphos, conhecido com nome comum de ISO bilanafos, um tripeptídeo produzido pelas bactérias *Streptomyces viridichromogenes* e *S. hygroscopicus*, mas não é certificado para uso na agricultura orgânica (DAYAN; CANTRELL; DUKE, 2009; DUKE et al., 2000). Alguns estudos estão em andamento, por exemplo, uma parceria entre a Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e a empresa Transfertech, desenvolve um bioherbicida obtido a partir de um fungo patógeno de plantas, o *Fusarium fujikuroi* (PROINOVA, 2023). Outros estudos como em RATHKE; DIAS; FILHO, 2020, que testou um bioherbicida que possui entre seus componentes, resíduos de laranja e está em fase de regularização e obtenção de registro, e por isso o nome não foi mencionado, mas os resultados mostram que o produto também afeta a germinação da cultura.

Estes metabólitos secundários considerados possíveis bioherbicidas são aqueles conhecidos como alelopáticos. Alelopatia é a interferência negativa ou positiva dos compostos secundários de plantas no desenvolvimento de outro organismo (LOVETT; RYUNTHYU, 1992; RICE, 1984). Estes compostos secundários que apresentam alelopatia são chamados de compostos aleloquímicos ou alelopáticos, e podem afetar direta ou indiretamente a planta receptora, até pela transformação por microrganismos no solo, sendo uma interação bioquímica entre plantas (CHENG; CHENG, 2015; FERREIRA; BOREGHETTI, 2004; LOVETT; RYUNTHYU, 1992). Esses compostos secundários como fenóis, flavonóides, alcalóides, terpenóides e glicosídeos cianogênicos, podem ser lançados no ambiente por lixiviação, volatilização, exsudação radicular ou decomposição de resíduos da planta no solo (CHENG; CHENG, 2015; CHOU, 2006).

Os efeitos deletérios dos aleloquímicos nas plantas suscetíveis, geralmente são a redução ou atraso da germinação e a redução do crescimento. E isso acontece alterando vários

processos fisiológicos e diferentes mecanismos como: Alterações morfológicas (MOJARAD; MAJD; FAHIMI, 2013), e fisiológicas (LORENZO et al., 2011), perturbação do metabolismo energético e na fotossíntese (WEIR; PARK; VIVANCO, 2004), estresse oxidativo (ŠOLN; KLEMENČIČ; KOCE, 2022), modificação da estrutura da membrana e os receptores de transporte e sinalização, interferência no ciclo celular, modificação da atividade hormonal, modificação do funcionamento dos estômatos e no balanço de água, inibição da síntese ou degradação dos pigmentos, bloqueio de várias enzimas, principalmente as reguladoras (HENNSEN et al., 2006).

Como alguns aleloquímicos possuem fitotoxicidade (HARDING; RAIZADA, 2015), estão sendo usados como uma nova classe de agrotóxico no controle de plantas daninhas, funcionando como bioherbicidas (DUKE et al., 2024; SOLTYS et al., 2013).

Há algumas vantagens no uso de aleloquímicos como bioherbicidas, pois a maioria são total ou parcialmente solúveis em água (DAYAN; CANTRELL; DUKE, 2009; VYVYAN, 2002), sendo de fácil aplicação sem a necessidade de surfactantes. São menos nocivos ao meio ambiente que os herbicidas sintéticos, pois possuem mais átomos de oxigênio e nitrogênio e poucos átomos pesados em sua estrutura química, que além de diminuir a meia-vida, evitam o acúmulo no solo e a influência em plantas que não são o alvo (NOVAES, 2020). Mas isso também se torna uma desvantagem, uma vez que a duração da atividade é menor e a estrutura é mais reativa e instável, se degradando rapidamente no ambiente, perdendo assim a bioatividade (SOLTYS et al., 2013).

Pelas vantagens apresentadas, os compostos alelopáticos são promissores bioherbicidas devido à sua alta diversidade e possíveis novos sítios-alvo com especificidade nas plantas aceptoras, podendo inibir a fotossíntese e/ou a respiração, além de se ligarem a proteínas diferentes das que os herbicidas de origem sintética se ligam (DAYAN; CANTRELL; DUKE, 2009; NIMBAL et al., 1996). Possibilitam assim, a eliminação das plantas daninhas que são resistentes aos herbicidas existentes. Outra característica importante é que os compostos alelopáticos agem de forma dose-dependente nas plantas alvo (BELZ; HURLE; DUKE, 2005), permitindo que tenhamos uma dose seletiva, que tenha efeito na planta alvo e não na cultura.

Mas, uma desvantagem da obtenção de bioherbicidas por meio de um aleloquímico é que a rota para sua descoberta é mais complicada por ter de ser extraído da planta e isolado, além da quantidade de compostos obtidos ser geralmente baixa, comparando-se com a síntese

química (SOLTYS et al., 2013). Entretanto, há avanços nesse sentido, pela utilização de métodos mais modernos de extração, isolamento, purificação e identificação de moléculas biológicas, que contribuem muito para conhecermos melhor os compostos com potencial alelopático (CHENG; CHENG, 2015; DUKE et al., 2024; FERREIRA; AQUILA, 2000).

Já existem estudos com o uso de herbicidas no manejo de gramíneas exóticas invasoras em áreas de restauração, sendo o glifosato o mais utilizado, e o uso de uma combinação de técnicas de manejo, muitas vezes sendo utilizado a roçagem da gramínea exótica invasora com posterior aplicação do herbicida (CASTILLIONI, 2015; MANTOANI; TOREZAN, 2016; MARTINS, 2011; SANTOS et al., 2020). O uso de um bioherbicida para este controle seria mais condizente com uma área de restauração já que estes são compostos orgânicos naturais, não prejudicando tanto o meio ambiente.

Espécies exóticas invasoras são uma das maiores ameaças à biodiversidade a nível global (MACK et al., 2000) e um grande desafio em áreas de restauração ecológica. A invasão por gramíneas leva a dificuldade de se ter a sucessão ecológica em áreas degradadas (GARCÍA-ORTH; MARTÍNEZ-RAMOS, 2011), além de dificultar o trabalho da restauração devido a sua alta taxas de rebrota e dispersão de sementes.

O Cerrado é o bioma de savana mais biodiverso, mas também o mais ameaçado do mundo (KLINK; MACHADO, 2005; SILVA; BATES, 2002) e muitas das áreas que necessitam ser restauradas são de uso anterior por pastagens para animais e, por isso, apresentam dominância de gramíneas exóticas invasoras, principalmente de gramíneas C4 africanas como *Urochloa* spp. e *Andropogon gayanus* Kunth (BARBOSA; PIVELLO; MEIRELLES, 2008; PIVELLO; SHIDA; MEIRELLES, 1999).

A restauração de um ecossistema visa contribuir com o restabelecimento dos processos ecológicos, sendo assim uma prática importante para reabilitar ecossistemas degradados ou convertidos em usos diferentes da terra (GANN et al., 2019) como, por exemplo, a agricultura de grande escala que substituiu vegetações como a savana e as pastagens naturais em áreas cultivadas tropicais (VELDMAN et al., 2015).

No Cerrado, a semeadura direta de espécies nativas tem sido utilizada para a restauração das áreas degradadas, sendo recomendada principalmente para áreas que foram de pastagens e agricultura que são áreas dominadas por gramíneas exóticas invasoras (GEI). Na semeadura

direta, faz-se antes o preparo do solo e o controle das GEI, podendo combinar fogo e gradagens sucessivas (SAMPAIO et al., 2015). Esses métodos de controle e a competição com as espécies nativas em áreas de restauração ecológica não eliminaram as GEI após quatro estações chuvosas depois da semeadura direta das espécies nativas (LIAFFA, 2020), o que faz necessário o manejo contínuo das GEI, que poderia ser facilitado com a utilização de um bioherbicida.

Lepidaploa aurea (Mart. ex DC.) H. Rob. é uma espécie arbustiva perene, da família das Asteraceae, tem cerca de 1 metro de altura e é chamada popularmente de assa-peixe ou amargoso, sendo encontrada em áreas de Cerrado no Brasil central (FARIAS et al., 2002). As espécies do gênero *Lepidaploa* ocorrem, preferencialmente, em áreas de alta luminosidade, de dossel aberto, e tem sua propagação favorecida em ambientes alterados, por terem alta produção de sementes e reprodução assexuada, sendo caracterizadas como plantas daninhas associadas a pastagens e culturas (LORENZI, 2000).

Em ações de restauração ecológica no Cerrado em áreas ocupadas por GEI observa-se que a espécie *L. aurea* se estabelece muito bem, além de ter uma boa cobertura de solo e, por isso, é a principal espécie empregada na semeadura direta (SAMPAIO et al., 2015), além de comumente coexistir com as GEI em áreas degradadas e pastagens plantadas (LIMA RIBEIRO; PRADO, 2007). Observa-se também uma camada espessa de serrapilheira (**Figura 1**) e uma redução de ocorrência de espécies de gramíneas invasoras como a *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster, *Urochloa humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga, *Melinis minutiflora* P. Beauv. e *Andropogon gayanus*, embora nessas áreas as espécies nativas geralmente ocorrem sem parecerem afetadas (**Figura 2**).



Figura 1. Serrapilheira de *L. aurea*. Foto própria.

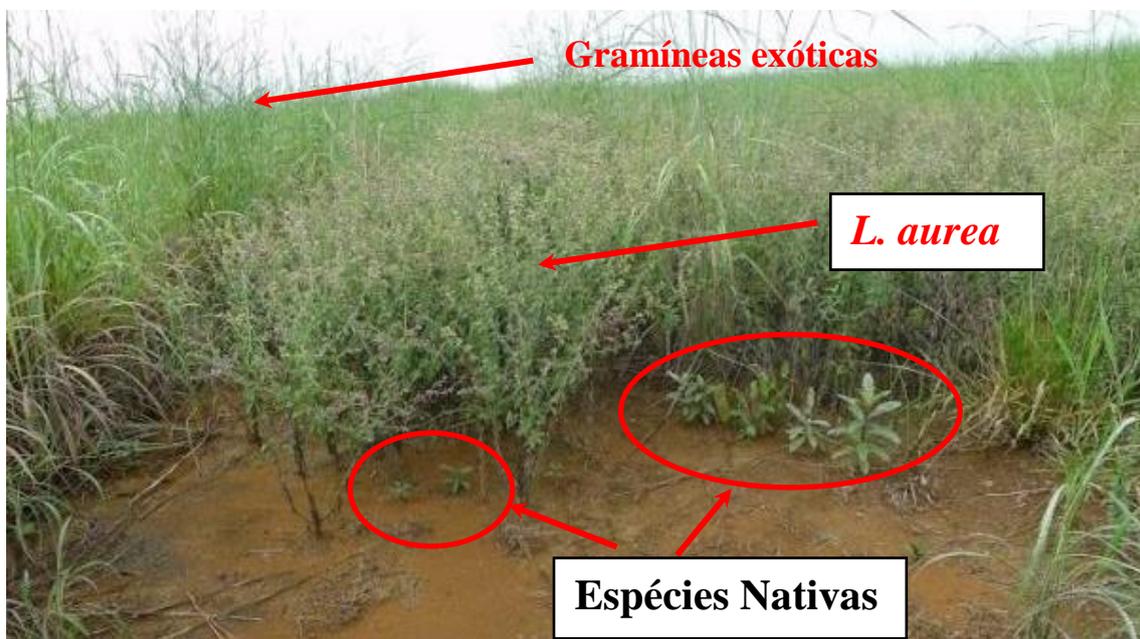


Figura 2. Área de restauração ecológica no Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros, GO, mostrando o estabelecimento de *L. aurea* coexistindo com plantas nativas, mas não com gramíneas exóticas invasoras. Foto: Keiko Fueta Pellizzaro.

O efeito de *L. aurea* na dinâmica populacional de *U. decumbens* diminui com o passar do tempo, pois essa espécie tem alta capacidade de rebrota e rápida recuperação das populações mesmo após fortes distúrbios como fogo e aragem que são utilizados como preparação para a semeadura direta, indicando que para o sucesso da restauração é necessário manejar continuamente a área para o controle de *U. decumbens* (MOTTA, 2017). *L. aurea* tem alta taxa de estabelecimento nos primeiros estágios da restauração (PELLIZZARO, 2016; SAMPAIO et al., 2015), mas as plantas vivem somente de 3 a 5 anos e a população declina depois de 2 anos da semeadura (MOTTA, 2017). A espécie não se reproduz clonalmente e nas áreas de restauração suas taxas de recrutamento por sementes são pequenas, devido à alta cobertura do solo por outras espécies após o estabelecimento inicial promovido pela semeadura de alta densidade (MOTTA, 2017).

A família Asteraceae tem muitas espécies com potencial alelopático (ARAÚJO et al., 2021). Como, por exemplo, o extrato de folhas de *Guizotia abyssinica* (Lf) Cass, conhecida popularmente como níger, e *Carthamus tinctorius* L., conhecida popularmente como cártamo ou açafraão, mostraram inibição de germinação e crescimento de raiz em azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) e capim amargoso (*D. insularis*) (GOMES et al., 2019), que são plantas daninhas associadas a muitas culturas no Brasil. O extrato de *Vernonanthura brasiliiana* L., o assa-peixe, diminuiu o índice de velocidade de germinação em *Lactuca sativa* L. (NISHIMUTA et al., 2019), alface, espécie alvo muito usada em bioensaios preliminares de fitotoxicidade. Em ensaios fitoquímicos de extratos de folhas de *Vernonia amygdalina* Delile, foram detectados flavonoides, alcaloides, esteroides, terpenoides, glicosídeos, taninos, fenóis e saponinas (ALARA et al., 2019), compostos bioativos alelopáticos. Ademais *Piptocarpha rotundifolia* (Less.) Baker, uma espécie de Asteraceae dominante no Cerrado, mostra atividade inibitória do extrato de folhas em várias plantas daninhas pela presença da piptocarphin A, uma lactona sesquiterpênica (ANESE et al., 2021).

No Gênero *Lepidaploa*, a espécie *Lepidaploa rufogrisea* (A. St.-Hil.) H. Rob., diminuiu o índice de velocidade de germinação e crescimento radicular de *L. sativa*, além de provocar algumas alterações cromossômicas e nucleares no fuso mitótico celular (ARAGÃO et al., 2017).

Em *L. aurea* já foram detectados metabólitos secundários como, cinco tipos de ácido cafeoilquínico, polifenóis (5-p-coumaroylquinic acid), quercetinas (putative quercetin 3-O-rutinoside e putative quercetin 3-O-glucoside), o putative chrysoeriol 7-O-neohesperidoside, flavonoides (tiliroside e kaempferol), e lactonas sesquiterpenos (glaucolide B) (GALLON; JAIYESIMI; GOBBO-NETO, 2018). E, em trabalhos anteriores, verificou-se o potencial fitotóxico de *L. aurea* (LOPES et al., 2017), e potencial alelopático do extrato aquoso de folhas, em espécies invasoras alvos como *U. decumbens* e *A. gayanaus* inibindo o crescimento de suas raízes (LOPES et al., 2018).

Dentre os métodos utilizados para pesquisas de novos compostos fitotóxicos está o isolamento biodirigido, que consiste na realização de bioensaios em todas as etapas de isolamento. Isto faz com que seja determinada a fração com maior atividade biológica, sendo essa fracionada novamente até a purificação e identificação dos compostos presentes na amostra que são responsáveis por esta atividade (MACÍAS; CASTELLANO; MOLINILLO, 2000). Estes bioensaios utilizados no isolamento biodirigido geralmente são o bioensaio de bioatividade geral em coleóptilo estiolado de trigo (*Triticum* spp.), e de fitotoxicidade em sementes de espécies alvos sensíveis como alface (*L. sativa*), tomate (*Solanum lycopersicum* L.), cebola (*Allium cepa* L.) e agrião (*Nasturtium officinale* W.T. Aiton) (MACÍAS et al., 2004, 2010; MACÍAS; CASTELLANO; MOLINILLO, 2000).

Assim, o isolamento biodirigido torna-se uma ferramenta importante, tanto nos estudos alelopáticos quanto nos estudos de descoberta de novos compostos fitotóxicos com potencial para serem utilizados como bioherbicidas (DA SILVA et al., 2017; MACÍAS et al., 2004; MACÍAS; CASTELLANO; MOLINILLO, 2000; OLIVEIRA et al., 2012). Experimentos de pós-emergência também são muito utilizados como parte de um estudo de fitotoxicidade para desenvolvimento de um bioherbicida a base de extrato de plantas (KAAB et al., 2020; PUIG et al., 2018), como por exemplo o estudo de DA SILVA et al. (2017) que avaliou a fitotoxicidade dos compostos isolados de *Bidens sulphurea* Sch. Bip. Através de um bioensaio de hidroponia.

2. Hipóteses

Extrato aquoso de folha de *L. aurea* tem compostos secundários com fitotoxicidade capaz de inibir o crescimento de gramíneas exóticas invasoras e plantas daninhas podendo ser usado como bioherbicida em restaurações ecológicas e como defensivo agrícola.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar a fitotoxicidade e o potencial bioherbicida de extratos de folhas de *L. aurea* para o controle de gramíneas exóticas invasoras do Cerrado e plantas daninhas de culturas.

3.2 Objetivos Específicos

- 1) Avaliar o melhor método de extração do extrato aquoso de folhas de *L. aurea*;
- 2) Fazer o isolamento biodirigido dos compostos fitotóxicos do extrato aquoso de *L. aurea*, através da avaliação de sua influência no alongamento celular de coleótilo estiolado de trigo; e na germinação e crescimento inicial da parte aérea e radicular de espécies alvo sensíveis;
- 3) Avaliar a fitotoxicidade da fração de separação do extrato aquoso de *L. aurea* com acetato de etila em bioensaio de hidroponia nas plantas daninhas *B. pilosa* e *C. bonariensis* e as espécies exóticas invasoras do Cerrado *E. indica* e *P. maximum*.
- 4) Avaliar a presença e a natureza dos compostos secundários fitotóxicos do extrato aquoso de folhas de *L. aurea*, com potencial de ser um bioherbicida para aplicações como aliado no controle de plantas daninhas em culturas e em restaurações ecológicas.
- 5) Separar por cromatografia as moléculas de interesse fitotóxico presentes nas frações de purificação do extrato aquoso de folhas de *L. aurea* e identificar por comparação com a biblioteca NIST.

4. Material e Métodos

4.1 Obtenção de material vegetal

Para o extrato aquoso, foram coletadas folhas de *L. aurea* no Jardim Louise Ribeiro, jardim experimental do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro, com exsicata depositada no herbário da Universidade de Brasília (UnB) sob número UB 245243. Para o bioensaio de coleótilo de trigo foram usadas sementes de trigo (*Triticum* spp.), da variedade BRS 264. Nos ensaios com sementes sensíveis foram usadas sementes de *L. sativa* (alface), variedade 029- Hanson crespa repolhuda; *S. lycopersicum* (tomate), variedade 270 – San Marzano; *Allium schoenoprasum* L. (cebolinha), e *Nasturtium*

officinale (agrião), variedade Agrião do Seco Topázio Berro-Cress, da marca Feltrin sementes. Para o bioensaio de hidroponia foram usadas sementes de espécies exóticas invasoras: *Panicum maximum* (Syn. *Megathyrsus maximus*) cv. Mombaça (capim-colonião) e *Eleusine indica* (L.) Gaertn. (capim-pé-de-galinha) e espécies daninhas alvos: *Bidens pilosa* L (picão-preto) compradas com o fornecedor Agrocosmo sementes; e sementes de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (buva), produzidas em sala de crescimento em laboratório partindo de exemplar coletado e exsicata depositada no herbário da UnB sob número UB 245244.

Os experimentos foram feitos no laboratório de Alelopatia Gui Ferreira do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro

4.2 Produção de extrato das folhas de *L. aurea*

As folhas coletadas foram secas em estufa de circulação de ar forçado a 50 °C por 24 hs e trituradas em liquidificador doméstico. Para o extrato aquoso, o material vegetal foi extraído com água a 10% p/v, com auxílio de banho de ultrassom, que tem sido utilizado para extração de compostos orgânicos como um método rápido e eficiente (LUQUE-GARCÍA; LUQUE DE CASTRO, 2003; MATSUMOTO et al., 2014), depois filtrado à vácuo e utilizado nos ensaios fitoquímicos preliminares; no fracionamento com acetato de etila e purificação por extração por fase sólida (SPE); nos bioensaios de coleóptilo de trigo e com as sementes padrão, e na cromatografia de camada delgada.

Foi realizada cromatografia de camada delgada, sendo a fase fixa uma placa DC-Fertigfolien ALUGRAM Xtra SIL G/UV 254 de 0,20 mm de sílica gel, com 5 cm de altura para a eluição.

A fase móvel foi constituída de solução de 50% de Hexano e 50% de Acetona, e o extrato para análise foi preparado com a folha seca triturada e acetona. A placa foi observada em luz UV a 254 nm e 365 nm e depois reveladas em banho de *Oleum* (200 ml de água destilada, 10 ml de ácido sulfúrico e 40 ml de ácido acético) e queimadas a 180°C com um aquecedor.

4.3 Extração ácida de folhas de *L. aurea*

Com a finalidade de testar o rendimento da extração aquosa de folhas de *L. aurea*, foram feitas extrações ácidas utilizando soluções com diferentes combinações de metanol e ácido acético, de acordo com a **Tabela 1**.

Tabela 1. Soluções utilizadas para as extrações aquosas de folhas de *L. aurea* e as respectivas concentrações de água destilada, metanol e ácido acético.

<i>Extração</i>	<i>H2O</i>	<i>MeOH</i>	<i>Ácido acético</i>
<i>E1</i>	100%	-	-
<i>E2</i>	95%	-	5%
<i>E3</i>	80%	20%	-
<i>E4</i>	75%	20%	5%

As folhas de *L. aurea* foram trituradas e secas em estufa e realizadas as extrações com as soluções E1, E2, E3 e E4, a 10% p/v, 4 g de folhas para 40 mL das soluções, levadas ao ultrassom por 15 minutos e filtradas a vácuo.

Com estas extrações foi feita a separação com acetato de etila como no item 4.4 dos materiais e métodos, e as frações do acetato de etila foram secas em rotoevaporador em balões tarados e pesadas para verificação do rendimento.

Foi realizada cromatografia de camada delgada, sendo a fase fixa uma placa DC-Fertigfolien ALUGRAM Xtra SIL G/UV 254 de 0,20 mm de sílica gel, com 5 cm de altura para a eluição e a fase móvel foi constituída de solução de 5% de metanol, 95% de clorofórmio. Em seguida foi pesado 9,8 mg de cada fração seca (E1, E2, E3 e E4), e solubilizadas em metanol. A placa foi observada em luz UV a 254 nm e 365 nm e depois reveladas em banho de *Oleum* (200 ml de água destilada, 10 mL de ácido sulfúrico e 40 mL de ácido acético) e queimadas a 180°C com um aquecedor.

4.4 Fracionamento do extrato aquoso bruto de folhas de *L. aurea*

Foi realizado um fracionamento do extrato aquoso de folhas de *L. aurea* utilizando acetato de etila para separação dos compostos mais apolares (**Figura 3**). Foi utilizado o extrato aquoso obtido na extração ácida com maior rendimento (E4), adicionando acetato de etila em um funil de separação, recolhendo as fases separadas nas frações: do acetato de etila (Fac) e da parte aquosa (Faq). A fração Fac foi recolhida enquanto a fração aquosa foi extraída com mais acetato de etila por mais 3 vezes até a coloração da fração estar mais clara. Todas as porções de Fac foram secas em rotoevaporador, e a fração Faq foi levado ao Speed Vac em tubos Falcons

de 15 mL para evaporação de restos de acetato de etila, e depois congelado e levado ao liofilizador. Com estas duas frações (Fac e Faq) foram realizados bioensaios de coleóptilo estiolado de trigo.

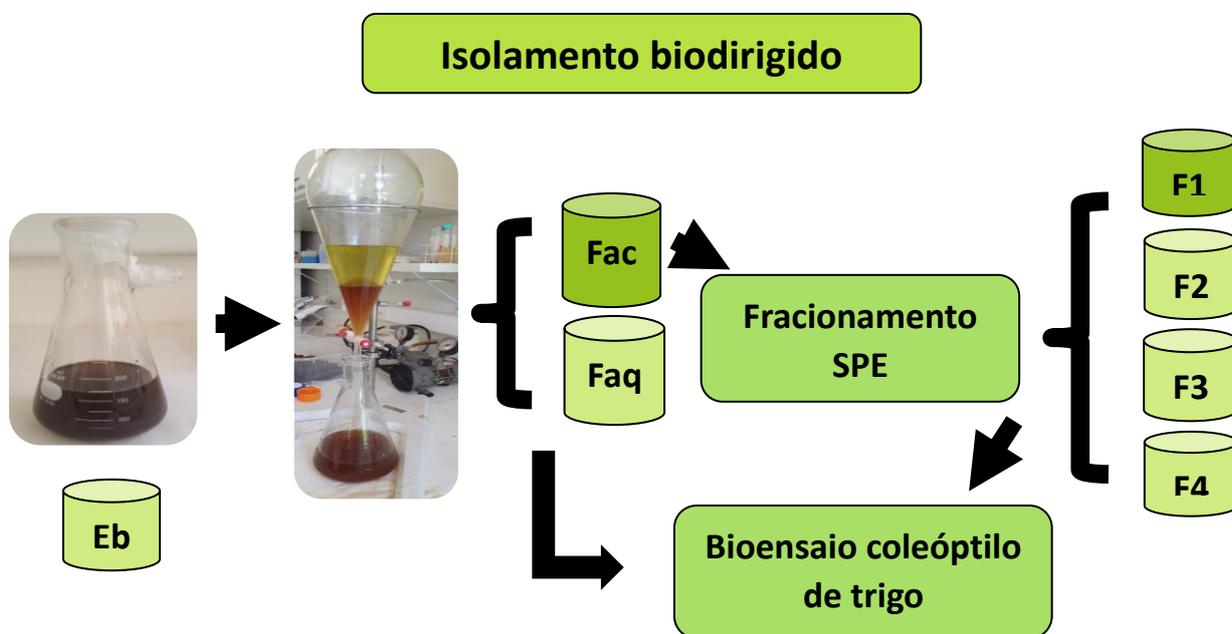


Figura 3. Esquema do isolamento biodirigido com o fracionamento do extrato aquoso de folhas de *L. aurea* com acetato de etila e posterior fracionamento com SPE/CL18, as frações separadas e feito o bioensaio de coleóptilo estiolado de trigo.

Como a fração do acetato de etila (Fac) foi a que teve resultados significativos de inibição no bioensaio de coleóptilo estiolado de trigo, foi realizada cromatografia de camada delgada, sendo a fase fixa uma placa DC-Fertigfolien ALUGRAM Xtra SIL G/UV 254 de 0,20 mm de sílica gel, com 5 cm de altura para a eluição e a fase móvel foi constituída de solução de 50% de Hexano e 50% de acetato de etila, e a fração Fac seca para análise foi preparada com acetato de etila. A placa foi observada em luz UV a 254 nm e 365nm e depois reveladas em banho de *Oleum* (200 mL de água destilada, 10 mL de ácido sulfúrico e 40 mL de ácido acético) e queimadas a 180°C com um aquecedor.

4.5 Purificação do extrato de folhas de *L. aurea* por extração em cromatografia de fase sólida (SPE)

Para purificação da fração de acetato de etila (Fac) do extrato de folha de *L. aurea* foi feita a separação utilizando extração em fase sólida (SPE) de fase reversa CL 18 STRATA-X de 500mg, com ajuda de um coletor a vácuo (Vacuum Manifold), e soluções em diferentes

concentrações de Metanol, água destilada e diclorometano como fase móvel de acordo com a **Tabela 2**.

Tabela 2. Soluções utilizadas para a purificação por SPE da fração do acetato de etila (Fac) do extrato de folhas de *L. aurea* e as respectivas concentrações de metanol, água destilada e diclorometano.

<i>Soluções</i>	<i>Metanol</i>	<i>H2O</i>	<i>Diclorometano</i>
<i>F1</i>	50%	50%	-
<i>F2</i>	80%	20%	-
<i>F3</i>	100%	-	-
<i>F4</i>	-	-	100%

Foi utilizado aproximadamente 120 mg da fração da separação com o acetato de etila (Fac) seca, 3 ml de metanol e 3 ml de água destilada para solubilização da amostra, e duas colunas de SPE.

As colunas de SPE foram ativadas com 10 mL de metanol e posteriormente com 10 mL de água destilada. Depois foram passadas as amostras de Fac pelas colunas e as soluções F1, F2, F3 e F4 foram obtidas separadamente. Após, estas frações foram levadas ao Speed Vac para secagem do solvente e, posteriormente, avaliadas no bioensaio de coleóptilo estiolado de trigo.

Foi realizada cromatografia de coluna delgada, sendo a fase fixa uma placa DC-Fertigfolien ALUGRAM Xtra SIL G/UV 254 de 0,20 mm de sílica gel, com 5 cm de altura para a eluição e a fase móvel foi constituída de solução de 70% de hexano e 30% de acetona. Em seguida foi pesado 9,8 mg de cada fração seca (F1, F2, F3 e F4), e solubilizadas 4 gotas de metanol e acrescentado acetona. A placa foi observada em luz UV a 254 nm e 365 nm e depois reveladas em banho de Oleum (200 mL de água destilada, 10 mL de ácido sulfúrico e 40 mL de ácido acético) e queimadas a 180°C com um aquecedor.

Os resultados do bioensaio de coleóptilo de trigo indicaram a F1 tendo maior bioatividade de inibição de crescimento. Sendo assim, uma purificação desta fração também utilizando coluna de SPE de fase reversa CL 18 STRATA-X de 500mg, e soluções em diferentes concentrações de Metanol e água destilada como fase móvel, de acordo com a **Tabela 3**.

Tabela 3. Soluções utilizadas para a purificação por SPE da fração F1 e as respectivas concentrações de metanol, água destilada e diclorometano.

<i>Soluções</i>	<i>Metanol</i>	<i>H2O</i>
<i>K1</i>	-	100%
<i>K2</i>	10%	90%
<i>K3</i>	20%	80%
<i>K4</i>	30%	70%
<i>K5</i>	40%	60%

Foram utilizados aproximadamente 30 mg da fração F1 seca, e foi diluída em 2 mL de água destilada e levada ao ultrassom por 40 minutos e ao vórtex para ajudar na solubilização.

A coluna de SPE foi ativada com 10 mL de Metanol e posteriormente com 10 mL de água destilada. Depois a amostra de F1 foi passada pela coluna e em seguida foram passadas as soluções K1, K2, K3, K4 e K5, sendo recolhidas as frações separadamente. Após, estas frações foram levadas ao Speed Vac para secagem do solvente e liofilizadas para secagem da água.

Para as frações que obtiveram maior rendimento, K3, K4 e K5, foi realizada cromatografia de coluna delgada, sendo a fase fixa uma placa DC-Fertigfolien ALUGRAM Xtra SIL G/UV 254 de 0,20 mm de sílica gel, com 5 cm de altura para a eluição e a fase móvel foi constituída de solução de 5% de metanol, 95% de clorofórmio e duas gotas de ácido acético. Em seguida foi pesado 9,8 mg de cada fração seca (K3, K4 e K5), e solubilizadas em metanol. A placa foi observada em luz UV a 254 nm e 365nm e depois reveladas em banho de *Oleum* e queimadas a 180°C com um aquecedor.

Foi calculado o rendimento em porcentagem da fração F1 obtida da purificação da fração Fac, e das frações K3, K4 e K5, obtidas da purificação da fração F1.

4.6 Bioensaio de coleóptilo de trigo

Foram feitos bioensaios para testar a influência das amostras no crescimento de coleóptilo estiolado de trigo conforme MACÍAS; CASTELLANO; MOLINILLO (2000). Foram analisadas as seguintes amostras: extrato aquoso bruto de *L. aurea* (Eb); fração aquosa

(Faq) e fração do acetato de etila (Fac); frações F1, F2, F3 e F4 da separação por SPE da fração do acetato de etila (Fac); do glifosato (grânulo dispersível em água – Round up® WG 750) como controle positivo; e das frações K3, K4 e K5 da separação por SPE da fração F1.

Foram germinadas sementes de trigo, em caixas Gerbox com papel filtro e 15 ml de água destilada, em câmara escura com temperatura média de 26°C por 4 dias (HANCOCK; BARLOW; LACEY, 1964). Após germinadas, em uma sala escura sob luz verde para evitar o crescimento dos coleóptilos, com uma guilhotina Van der Wij com papel filtro umedecido, foi cortado 4mm dos coleóptilos a uma distância de 2mm da zona apical, sendo depositados em uma placa de Petri com água destilada para que não desidratem e foram utilizados no bioensaio (NITSCH; NITSCH, 1956).

Foi feito um tampão misturando 2 g de sacarose com 0,29 g de fosfato de potássio dibásico trihidratado e 0,105 g de ácido cítrico e acrescentando água Milli Q até o volume de 100 mL. Foram pesados 10 mg da amostra liofilizada, acrescentado 60µL de DMSO, solubilizado e completado até 12 mL de tampão, chegando a uma concentração de 800 ppm. Em seguida foram feitas diluições seriadas para as concentrações de 400 e 200 ppm respectivamente. Em tubos de ensaio foram colocados 2 mL da amostra preparada com o tampão nas concentrações de 800, 400 e 200 ppm, com três repetições cada, e cinco coleóptilos de trigo cortados anteriormente em cada tubo. O controle foi feito com o tampão mais DMSO a 5µL/mL, também com três repetições, e cinco coleóptilos em cada tubo. Foi feito um controle positivo com o herbicida glifosato nas concentrações de 800, 400 e 200 ppm, no mesmo delineamento do extrato. Os tubos foram tapados e levados a um rotor e envolvido com papel alumínio, com rotação de 6 rpm durante 24 horas a 25°C. Após as 24 horas, os coleóptilos foram retirados dos tubos, secados e colocados em uma planilha numerada em função da amostra e concentração do mesmo (**Figura 4**). Foram realizadas fotos, transferindo-as ao computador para serem analisadas pelo programa ImageJ®. Neste programa foram medidos o comprimento dos coleóptilos em milímetros e depois calculadas a porcentagem de atividade dos tratamentos em relação ao controle de acordo com a fórmula abaixo:

$$\% \text{ inibição} = [(\bar{X}T - \bar{X}C) / \bar{X}C] \times 100\%$$

Onde $\bar{X}T$ é a média de alongamento dos tratamentos e $\bar{X}C$ a média de alongamento do controle. Os resultados foram expressos em relação ao controle negativo (branco) e mostrados em gráfico de barras, com o valor “0” representando o controle. Valores positivos representam

estimulação dos parâmetros medidos e valores negativos inibição. Foi feito o teste t de Student a 5% de significância para a diferença entre o comprimento dos coleóptilos. Foi feito também a análise de Concentração Inibitória 50%, ou IC 50, no programa Prism 7.0, que é uma medida utilizada para indicar a quantidade de uma substância necessária para reduzir em 50% a atividade de inibição. Em geral, quanto menor o valor de IC50, maior é a potência do inibidor, pois é necessária uma menor concentração para obter o efeito desejado.

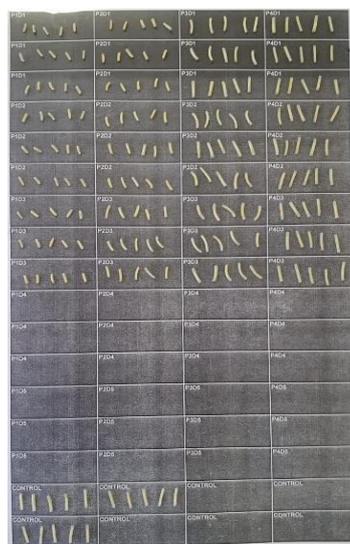


Figura 4. Planilha com os coleóptilos após bioensaio.

4.7 Bioensaio de fitotoxicidade com sementes padrão.

Após o bioensaio com coleóptilos, foram selecionadas três frações para o teste de fitotoxicidade em sementes:: Fac, F1, K5, que foram comparados ao controle positivo glifosato - Glif (grânulo dispersível em água – Round up® WG 750) e ao controle com tampão MES e DMSO a 5µL/mL, em quatro espécies alvo, *L. sativa* (alface), *S. lycopersicum* (tomate), *A. schoenoprasum* (cebolinha) e *N. officinale* (agrião), com três diluições cada de 800, 400 e 200 ppm, e quatro repetições.

As espécies alvo avaliadas foram selecionadas por serem sensíveis e de fácil aquisição no comércio agropecuário. Foram colocadas 20 sementes em cada placa de Petri de 50mm de diâmetro com papel filtro, e 1 mL de extrato nas concentrações de 800, 400 e 200 ppm e controle com tampão MES (1,95g de tampão MES, mais 5 mL de NaOH 1N, para o volume de 1L de água Milli Q, mais DMSO a 5µL/mL, com quatro repetições por tratamento, controle e espécie

alvo. As placas foram seladas com papel filme de pvc e colocadas em sala de germinação no escuro a temperatura aproximada de 25°C. Ao término do bioensaio, aos 4 dias para o agrião e aos 6 dias para as outras espécies, as placas foram colocadas em congelador. No dia seguinte foram retiradas do congelador, deixando descongelar por uns 10 minutos e adicionando algumas gotas de água destilada para facilitar a remoção das plântulas para medição.

Foram contadas as sementes germinadas, feitas fotos com as plântulas esticadas em uma base com régua para calibração, como na **figura 5**, e medido o comprimento da parte aérea e radicular das que tiveram crescimento, pelo programa ImageJ®. Foram consideradas como sementes germinadas as que tiveram emissão de radícula de pelo menos 2mm, de acordo com a definição de germinação da biologia.

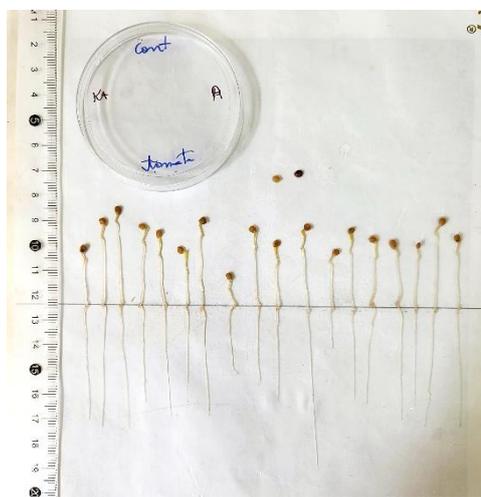


Figura 5. Foto para medição pelo ImageJ® do controle branco do tomate (*S. lycopersicum*) do bioensaio de sementes alvo padrão.

Foi avaliado a porcentagem de bioatividade na germinação, na parte aérea e na raiz, dos tratamentos em relação ao controle negativo, e feito teste de Welch para a significância dos resultados. O nível de atividade foi expresso em porcentagem de inibição segundo a fórmula abaixo:

$$\% \text{ inibição} = [(\bar{X}T - \bar{X}C) / \bar{X}C] \times 100\%$$

Onde $\bar{X}T$ é a média de alongamento dos tratamentos e $\bar{X}C$ a média de alongamento do controle. Os resultados serão expressos em relação ao controle negativo (branco) e mostrados em gráfico de barras, com o valor “0” representando o controle. Valores positivos representam estimulação dos parâmetros medidos e valores negativos inibição.

4.8 Bioensaio de hidroponia

O bioensaio de hidroponia foi feito de acordo com DA SILVA et al. (2017), com algumas adequações. Foram previamente semeadas as espécies de monocotiledôneas: *P. maximum* e *E. indica*, e de eudicotiledôneas *B. pilosa* e *C. bonariensis*, em bandejas de plástico com substrato Bioplant®, acondicionadas em sala de crescimento a 26°C com fotoperíodo de 12 horas. Após duas semanas foram selecionadas plântulas sadias e transplantadas para sementeiras individuais com substrato Bioplant® nas mesmas condições anteriores. Após trinta dias da emergência as plantas foram transferidas para potes de vidro contendo as soluções avaliadas em suas concentrações apropriadas. Foram avaliados o Glifosato (grânulo dispersível em água – Round up® WG 750) como controle positivo e a fração Fac obtida pela separação por acetato de etila do extrato aquoso de folhas de *L. aurea*, ambos nas concentrações de 800, 400 e 200 ppm. As soluções foram preparadas diluindo os compostos em meio de cultura Murashige e Skoog Medium (M&S) com 1/3 da força iônica e DMSO a 5µL/mL. Como controle foi utilizado a solução de Murashige e Skoog Medium (M&S) com 1/3 da força iônica e DMSO a 5µL/mL. Foram usados potes de vidro com 6 cm de diâmetro e 12 cm de altura envolvidos externamente em papel alumínio até a altura de preenchimento do substrato. Como substrato foi utilizado 75 g de esferas de vidro de 3 mm de diâmetro e adicionados 20 mL da solução a ser analisada por pote. Os potes com as espécies de eudicotiledôneas foram cobertos com papel filme plástico para que a evapotranspiração fosse menor evitando a embolia. Cada pote com a planta representa uma unidade de amostra. O experimento foi conduzido por 15 dias em sala de crescimento a 26 °C, com fotoperíodo de 12 horas. As amostras foram monitoradas a cada dois dias e adicionada solução controle a fim de manter o nível da solução constante. Seis dias após o início do experimento a força iônica da solução nutriente foi aumentada em 10% para ajustar as necessidades do desenvolvimento da planta. Quinze dias após o início do experimento, este foi desmontado e avaliado o efeito fitotóxico nas plantas de acordo com a escala proposta pela Sociedade Europeia de pesquisas em plantas daninhas (European Weed Research Society -EWR) (DEAR et al., 2003; MONTEON-OJEDA et al., 2020; MORALES et al., 2024) (**Tabela 4**). Foi feita regressão linear dos dados obtidos e ANOVA a 5% de significância.

Tabela 4. Escala de classificação da Sociedade Europeia de Pesquisa de Ervas Daninhas (EWRS) usada para pontuar a eficácia do controle das espécies daninhas no bioensaio de hidroponia.

Índice	Efeito Fitotóxico	% de Fitotoxicidade
1	Completamente morta	100%
2	Controle muito bom	99,9 – 98%
3	Controle bom	97,9 – 95%
4	controle praticamente suficiente	94,9 – 90%
5	controle moderado	89,9 – 82%
6	controle regular	81,9 – 70%
7	controle pobre	69,9 – 55%
8	controle muito pobre	54,9 – 30%
9	sem efeito	29,9 – 0%

4.9 Ensaios fitoquímicos preliminares do extrato aquoso de folhas de *L. aurea*.

A análise fitoquímica preliminar foi feita para identificar a presença de saponinas, fenóis e taninos, alcaloides e terpenoides de acordo com Barbosa (2004). As folhas coletadas foram secas em estufa de circulação de ar forçado a 50 °C por 24hs e trituradas em liquidificador doméstico. Foi feito o extrato aquoso de *L. aurea*, extraído com água a 10% p/v com auxílio de banho de ultrassom, que tem sido utilizado para extração de compostos orgânicos como um método rápido e eficiente (LUQUE-GARCÍA; LUQUE DE CASTRO, 2003; MATSUMOTO et al., 2014), foi congelado e seco em liofilizador por 24 horas. Depois dissolveu-se um pouco do conteúdo liofilizado do extrato de folhas de *L. aurea* em 8 ml de água destilada e dividido em quatro frações em tubos de ensaio.

4.9.1 Saponinas

Em uma das quatro frações do extrato, o tubo de ensaio foi agitado vigorosamente durante 2 minutos. O resultado é positivo para saponina se a camada de espuma permanecer estável por mais de meia hora.

4.9.2 Fenóis e Taninos

Em outra fração foi adicionado duas gotas de solução alcoólica de cloreto férrico (FeCl_3) a 1%. A mudança na coloração ou formação de precipitado é resultado positivo. Uma coloração entre o azul e o vermelho, no início, é indicativo da presença de fenóis. Um precipitado escuro de tonalidade azul indica presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis) e verde, presença de taninos catéquicos.

A análise de fenóis e taninos também foi realizada nas frações F1, K3, K4 e K5 de cordo com WAGNER; BLADT, 1996. Foi realizada cromatografia de camada delgada destas frações, sendo a fase fixa uma placa DC-Fertigfolien ALUGRAM Xtra SIL G/UV 254 de 0,20 mm de sílica gel, com 5 cm de altura para a eluição e a fase móvel foi constituída de solução de 5% de metanol, 95% de clorofórmio. Após a corrida na placa, essa foi imersa na solução de cloreto férrico a 1%, retirada, deixada secar e analisada de acordo com a coloração acima descrita.

4.9.3 Alcaloides

Em outra fração foi adicionado gotas do reativo de Dragendorff, uma solução de 0,85g de nitrato de bismuto em 10mL de ácido acético e 40mL de água destilada (solução A), misturada com uma solução de 8g de iodeto de potássio e 30mL de água destilada (solução B), em uma proporção de 1:1 da solução A com a solução B. O aparecimento de precipitado vermelho-tijolo é indicativo da presença de alcaloides e compostos nitrogenados heterocíclicos.

Também foi realizada análise de alcaloides nas frações F1, K3, K4 e K5 de cordo com WAGNER; BLADT, 1996. Foi realizada cromatografia de camada delgada destas frações, sendo a fase fixa uma placa DC-Fertigfolien ALUGRAM Xtra SIL G/UV 254 de 0,20 mm de sílica gel, com 5 cm de altura para a eluição e a fase móvel foi constituída de solução de 5% de metanol, 95% de clorofórmio. Após a corrida na placa, essa foi imersa na solução do reativo Dragendorff, retirada, seca e analisada de acordo com a formação do precipitado descrito acima.

4.9.4 Terpenoides

Foi preparado o reativo de anisaldeído, uma solução com 85 mL de metanol, 10 ml de ácido acético, 0,5 mL de anisaldeído e 5 mL de ácido sulfúrico. Em outra fração do extrato foi adicionado algumas gotas desta solução. Havendo as cores do vermelho ao violeta, indicam

resultado positivo. Esta análise detecta terpenoides, propilpropanoides, princípios pungentes e amargos e saponinas.

A análise de terpenoides também foi realizada nas frações F1, K3, K4 e K5 de acordo com WAGNER; BLADT, 1996. Foi realizada cromatografia de camada delgada destas frações, sendo a fase fixa uma placa DC-Fertigfolien ALUGRAM Xtra SIL G/UV 254 de 0,20 mm de sílica gel, com 5 cm de altura para a eluição e a fase móvel foi constituída de solução de 5% de metanol, 95% de clorofórmio. Após a corrida na placa, essa foi imersa na solução do reativo de anisaldeído, retirada, seca e analisada de acordo com a variação de cores descritas acima.

Os resultados do extrato aquoso bruto de *L. aurea* foram expressos em forma de presença (+), e ausência (-). E a intensidade de acordo com a representação: muito intenso: +++++, intenso: +++++, moderado: ++, leve: +, e ausente: -. Os resultados nas frações F1, K3, K4 e K5 foram expressos também nas bandas da CCD (cromatografia de camada delgada).

4.10. Análises instrumentais

4.10.1. Preparo e análise das amostras para o GC-MS

Um dos métodos utilizados para analisar os compostos presentes nas amostras que mostraram potencial fitotóxico, F1, K3, K4 e K5, foi a cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (CG - EM), que diferencia compostos voláteis baseado em volatilidade e polaridade (VEYEL et al., 2014).

Para preparar as amostras, foi pesado 1 mg de cada amostra F1, K3, K4 e K5 em eppendorf, com duplicata, e seca em speedvac por 20 min a 40° C. Após secagem foram adicionados 40 µL de piridina e levado a um agitador térmico por 30 minutos a 37° C. Depois foram adicionados 70 µL de N-metil-N (trimetilsilil) trifluoroacetamida (MTSFA) e levados a mais 30 minutos ao agitador térmico a 37° C, e por último sendo centrifugado por 5 minutos para decantar partículas que não tenham se solubilizado, e o sobrenadante foi transferido para os vials e utilizado para análise. Foi utilizado 100 µL de acetato de etila como teste branco também em duplicata.

As amostras foram analisadas em um cromatógrafo Agilent CG-EM (Agilent Technologies 7820A GC System e 5975 Series MSD) com coluna capilar de sílica HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm de espessura do filme), e os seguintes parâmetros de injeção: 1 µL da amostra à 230 °C foi injetada no modo Split (30:1) utilizando como carreador o gás hélio

com fluxo de 0,6 mL min⁻¹. Esta taxa de fluxo foi mantida constante com o controle eletrônico de pressão. Os seguintes parâmetros cromatográficos foram utilizados: Iniciou-se com a temperatura do programa em 80 °C por 2 min, seguido de um aumento de 7 °C min⁻¹ até alcançar a temperatura de 330 °C mantendo nessa temperatura por 6 min. Os parâmetros da espectrometria de massas foram: A faixa de massa foi de m/z 70 para m/z 600, a corrente de polarização do filamento foi de -70 V, e o detector de voltagem foi de aproximadamente 1700-1850 V. A biblioteca NIST foi utilizada para identificação dos compostos detectados por comparação. Os cromatogramas obtidos foram alinhados utilizando o software MetAlign 3.0 (LOMMEN, 2009) e os dados alinhados foram analisados utilizando a plataforma MetaboAnalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/>).

5. Resultados e Discussão

5.1 Extração ácida de folhas de *L. aurea*.

A extração ácida E4 (75% água destilada, 20% metanol e 5% ácido acético) foi a que obteve maior rendimento, de 3,015% de extrato seco em relação ao peso de folha seca triturada de *L. aurea*, usada no extrato (**Tabela 5**).

Tabela 5. Rendimento das extrações ácidas E1, E2, E3 e E4 de extrato de folhas de *L. aurea*.

<i>Extração</i>	<i>Rendimento (%)</i>
<i>E1</i>	1,035
<i>E2</i>	1,478
<i>E3</i>	1,723
<i>E4</i>	3,015

A extração ácida é uma técnica utilizada em química analítica e química orgânica com a finalidade de separar e purificar substâncias com base nas propriedades ácido-base. O aumento de rendimento em uma extração baseada em alteração do pH da extração aquosa se dá devido ao aumento da solubilidade de alguns grupos seletivos de metabólitos secundários (SEIDEL, 2005), devido a capacidade de uma substância alvo se ligar fortemente ao agente extrator ácido, por exemplo, aumentando assim sua eficiência de recuperação, o que também foi observado na extração de *L. aurea*. Com este resultado, nas próximas extrações foi feita a

extração aquosa com a ajuda do metanol e ácido acético como em E4 para ser obtido um melhor rendimento.

A extração ácida foi feita com intenção de melhorar o rendimento da extração aquosa de folhas de *L. aurea*. Nas análises de CCD das extrações ácidas E1, E2, E3 e E4 (**Tabela 1**), foi verificada bandas mais expressivas em E2 e E4, onde foi usado 5% de ácido acético na solução da extração, sendo mais expressiva em E4 com a combinação de ácido acético com metanol na extração, o que corrobora com o maior rendimento obtido (**Figura 6**). Esta banda também aparece na CCD das frações Fac e F1 como uma banda marrom após revelação e com coloração azul/violeta sob luz UV de 365 nm (**Figuras 9 e 10**). A extração ácida aumenta o rendimento preservando os produtos.

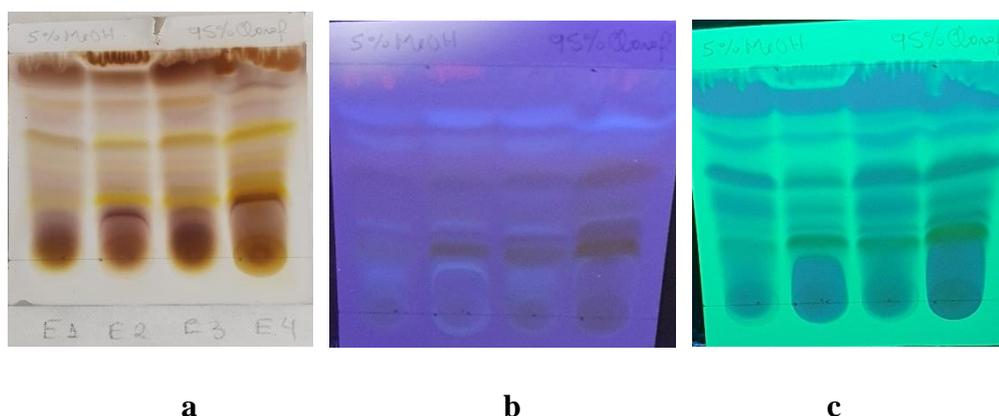


Figura 6. Cromatografia de camada delgada das extrações ácidas E1, E2, E3 e E4 de folhas de *L. aurea*, como fase móvel uma solução de 5% de metanol e 95% de clorofórmio. Em a: E1, E2, E3 e E4 da esquerda para a direita respectivamente, após revelação em Oleum; b: E1, E2, E3 e E4 da esquerda para a direita respectivamente, exposto a luz UV 254 nm; c: E1, E2, E3 e E4 da esquerda para a direita respectivamente, exposto a luz UV 365 nm.

5.2 Bioensaio de coleóptilo de trigo

O extrato aquoso bruto (Eb) de *L. aurea* a 800 ppm apresentou uma inibição significativa de -37% no crescimento do coleóptilo de trigo, mas sendo menor que a inibição apresentada pelo glifosato, de -79%, -65%, -44%, a 800 ppm, 400 ppm e 200 ppm respectivamente, em relação ao controle (**Figura 7**).

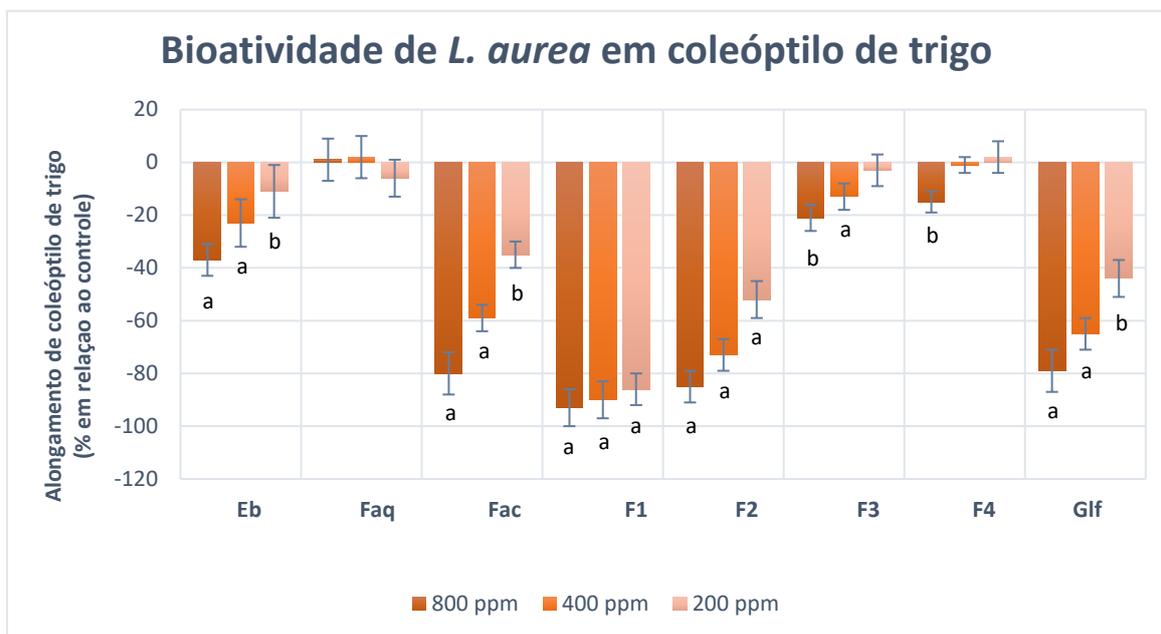


Figura 7. Porcentagem de bioatividade de extrato foliares de *L. aurea*, das frações EB (extrato aquoso bruto), FAQ (fração aquosa da separação com acetato de etila), FAC (fração do acetato de etila), F1, F2, F3 e F4 da fração do acetato de etila (FAC), e do Glifosato (GLF, controle positivo) em coleóptilos estiolados de trigo, em relação ao controle, nas concentrações de 800, 400 e 200 ppm. Significância: a = $p < 0,01$ e b = $0,01 < p < 0,05$.

O glifosato (N-(fosfonometil) glicina), é usado como controle positivo por ser um herbicida não-seletivo, sistêmico, pós-emergente, representa 60% do mercado mundial de herbicidas não seletivos (DE AMARANTE JUNIOR et al., 2002), e foi escolhido como controle positivo pois já é usado em áreas de restauração ecológica no controle das gramíneas exóticas invasoras (CASTILLIONI, 2015; MANTOANI; TOREZAN, 2016; MARTINS, 2011; SANTOS et al., 2020), também na agricultura no controle das plantas daninhas, já apresentando resistência em algumas dessas (SCHÜTTE et al., 2017; SOUZA BARROS et al., 2021).

Na CCD do extrato aquoso bruto (Eb) de *L. aurea* mostra 6 faixas mais definidas mais acima na placa de sílica, nos indicando que os componentes da amostra podem ser mais apolares pois tiveram mais afinidade com o solvente utilizado na fase móvel (50% acetona / 50% hexano). A faixa que mostra fluorescência rosa em UV 254 nm provavelmente é clorofila (Figura 8).

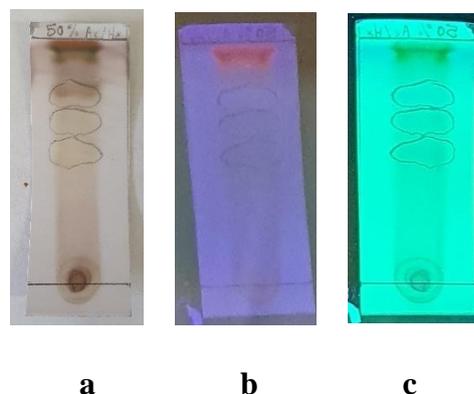


Figura 8. Cromatografia de coluna delgada do extrato aquosos bruto (Eb) de folhas de *L. aurea*, usando como fase móvel uma solução de 50% acetona e 50% hexano. a: após revelação em *Oleum*; b: exposto a luz UV 254 nm; c: exposto a luz UV 365 nm.

Após extração do extrato aquoso bruto de *L. aurea* com o acetato de etila para a separação dos compostos apolares dos polares, verificou-se que o composto secundário ativo está na porção do acetato de etila (Fac), mais apolar, pois essa fração mostrou inibição do crescimento de coleóptilo de trigo de -80%, -59%, -35%, a 800 ppm, 400 ppm e 200 ppm respectivamente, em relação ao controle, com valores muito parecidos com os do glifosato (**Figura 7**).

Na CCD da fração do acetato de etila (Fac) da separação por acetato de etila do extrato aquoso bruto de *L. aurea*, observa-se uma grande faixa marrom, que aparece com fluorescência azul arroxado em UV 365 nm, na parte mais baixa da placa de sílica, nos mostrando que este componente da amostra é mais polar tendo mais afinidade com a fase estacionária de sílica (**Figura 9**). Percebe-se também que este componente da amostra é abundante podendo ser o componente responsável pela bioatividade verificada no bioensaio de coleóptilo estiolado de trigo (**Figura 7**).

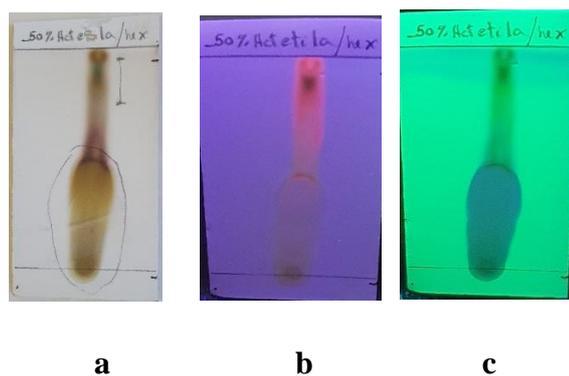


Figura 9. Cromatografia de coluna delgada da fração do acetato de etila (Fac) do extrato aquosos de folhas de *L. aurea*, como fase móvel uma solução de 50% acetato de etila e 50% hexano. a: após revelação em Oleum; b: exposto a luz UV 254 nm; c: exposto a luz UV 365 nm.

Assim, desta fração (Fac) foi feita a purificação por SPE originando as frações F1, F2, F3 e F4 (**Tabela 2**), que ao analisadas pelo bioensaio de coleóptilo de trigo verificou-se que as frações F1 e F2 foram as que apresentaram maior inibição de crescimento, sendo F1 com mais inibição até que o glifosato, de -93%, -90%, - 86%, a 800 ppm, 400 ppm e 200 ppm respectivamente, em relação ao controle (**Figura 7**), nos mostrando que o composto ativo é mais polar, mesmo dentro da fase mais apolar do acetato de etila, pois foi extraído na SPE em 50% de água e 50% de metanol (F1).

Na CCD das frações F1, F2, F3 e F4 verificou-se uma banda maior em F1 e em Fac (na figura 10 representada como B), mostrando coloração marrom após revelação com Oleum, e a cor azul/violeta sob luz UV de 365 nm (**Figura 10**).

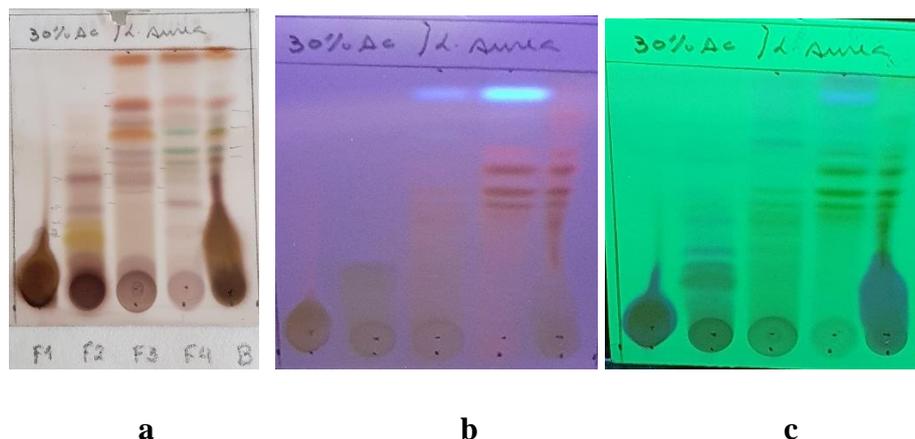


Figura 10. Cromatografia de camada delgada das frações F1, F2, F3, F4 e da fração do acetato de etila (Fac, representada na figura como B) do extrato aquosos de folhas de *L. aurea*. Como fase móvel uma solução de 30% de acetona e 70% hexano. a: F1, F2, F3, F4 e fração do acetato de etila (Fac) da esquerda para a direita respectivamente, após revelação em Oleum; b: F1, F2, F3, F4 e fração do acetato de etila (Fac) da esquerda para a direita respectivamente, exposto a luz UV 254 nm; c: F1, F2, F3, F4 e fração do acetato de etila (Fac) da esquerda para a direita respectivamente, exposto a luz UV 365 nm.

Esta fluorescência azul/violeta observada pode indicar a presença de alcaloides, pois esses apresentam fluorescência azul/violeta em luz UV de 365 nm (WAGNER; BLADT, 1996). Os alcaloides são comumente encontrados na família das Asteraceae (AGUILERA; MEIRA; FERREIRA, 2004; PATACCI et al., 2012; RIBEIRO; SILVA; CASTRO, 2010), como, por exemplo, em *Vernonia amygdalina* (ALARA et al., 2019).

Após verificada a maior atividade em F1, essa foi purificada originando as frações K1, K2, K3, K4 e K5 (**Tabela 3**), onde foi obtido nas frações K3, K4 e K5 um sólido branco em grande quantidade (**Figura 11**).



Figura 11. Sólido branco nas frações K3, K4 e K5 obtidas na purificação por SPE da fração F1.

As frações K3, K4 e K5 foram analisadas pelo bioensaio de coleóptilo de trigo pois tiveram maior rendimento, e foi verificada atividade de inibição do crescimento do coleóptilo semelhante entre elas e em comparação com o Glifosato, e uma atividade maior que na fração F1 que é a fração originária destas (**Figura 12**).

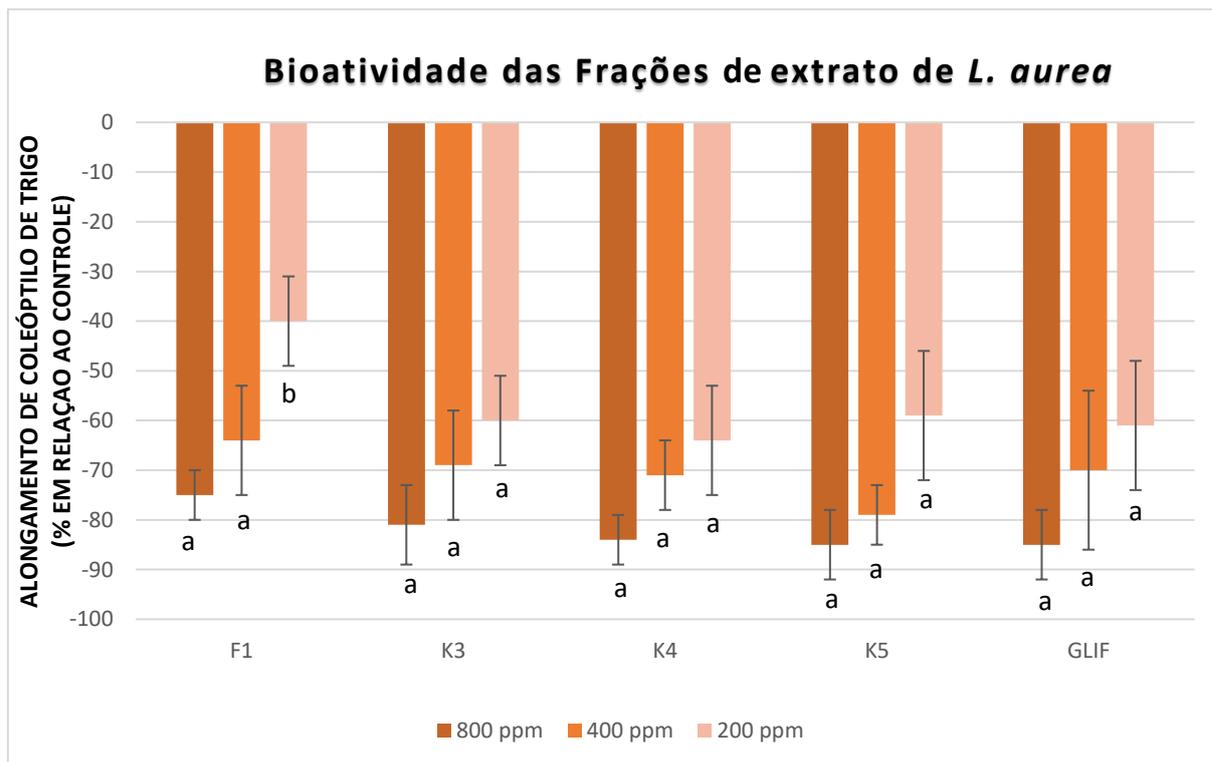


Figura 12. Porcentagem de bioatividade de extrato foliares de *L. aurea*, das frações F1 (fração mais bioativa de FAC), K3, K4 e K5 (frações com maior rendimento a partir da F1) e do Glifosato (GLIF, controle positivo) em coleóptilos estiolados de trigo, em relação ao controle, nas concentrações de 800, 400 e 200 ppm. Significância: a = $p < 0,01$ e b = $0,01 < p < 0,05$.

Na CCD dessas frações mostram em K3, K4 e K5 uma banda marrom no alto da placa de sílica (**Figura 13**), como nas outras bandas em Fac e F1 (**Figuras 9 e 10**), pois são as frações que tiveram maior rendimento visualmente (**Figura 11**), e apresentam esta mesma faixa marrom escura maior como nas outras frações (Fac e F1) (**Figuras 9 e 10**) que mostraram alta bioatividade de inibição nos coleóptilos de trigo (**Figura 7**).



Figura 13. Cromatografia de coluna delgada das frações K3, K4 e K5 da fração F1 do acetato de etila (Fac) do extrato aquosos de folhas de *L. aurea*, como fase móvel uma solução de 5% de metanol e 95% de clorofórmio, após revelação em *Oleum*.

A **Tabela 6** mostra o rendimento obtido na fração F1, e nas frações K3, K4 e K5 resultantes da posterior purificação por SPE de F1. Percebe-se aqui o baixo rendimento das frações purificadas (K3, K4 e K5), o que é uma desvantagem da obtenção de compostos fitotóxicos com potencial bioherbicida por extração natural de plantas, comparando-se com a síntese química (SOLTYS et al., 2013).

O IC 50 de K4 e K5 (125,5 e 129 respectivamente) são menores que o IC 50 do Glifosato (140,3), mostrando que seriam necessárias menores concentrações destas sub-frações que do Glifosato, para obter o efeito de inibição desejado (**Tabela 6**).

Tabela 6. Rendimento em porcentagem das frações e IC 50 de F1, K3, K4, K5 e do Glifosato.

<i>Frações</i>	<i>Rendimento (%)</i>	<i>IC 50</i>
<i>F1</i>	61,25	262,9
<i>K3</i>	14,78	147,5
<i>K4</i>	15,11	125,5
<i>K5</i>	17,25	129
<i>Glif</i>	-	140,3

5.3 Bioensaio de fitotoxicidade com sementes padrão.

Para este bioensaio, foram testadas as frações Fac, F1 e K5. A sub-fração K5 foi selecionada para dar continuidade com os bioensaios em detrimento de K3 e K4 devido ao

maior rendimento e o IC 50 ser menor que o do Glifosato (**Tabela 6**). Observou-se no bioensaio de sementes uma diferença de resposta entre as espécies alvo utilizadas. No alface tratado com as frações do extrato de *L. aurea* (Fac, F1 e K5) observou-se uma pequena estimulação do crescimento na parte aérea e radicular, e uma inibição (-26%) na parte radicular com a fração K5 a 800 ppm. No agrião o tratamento com Fac, F1 e K5 estimulou o crescimento um pouco mais significativo na parte aérea (**Figura 14**). No tomate observou-se alguma inibição do crescimento, mas com significância somente na parte aérea (-20%) e na radícula (-30%) tratado com Fac a 800 ppm. Havendo também algum estímulo na germinação, mas sem significância, e estímulo na parte aérea (28%) tratado com K5 a 200 ppm (**Figura 14**). Já na cebolinha observou-se inibição do crescimento tanto na parte aérea quanto na raiz em todos os tratamentos menos na germinação. A inibição foi maior e mais significativa na raiz nas concentrações de 800 ppm de todos os tratamentos, sendo maior em K5 (-60%) (**Figura 14**).

No controle positivo, o Glifosato, verificou-se inibição significativa da parte aérea e radicular em todas as espécies alvo utilizadas, mas sem influência na germinação destas, o que era esperado pois o glifosato (N-(fosfonometil) glicina), é um herbicida não-seletivo, sistêmico, pós-emergente, e foi utilizado como controle positivo pois representa 60% do mercado mundial de herbicidas não seletivos (DE AMARANTE JUNIOR et al., 2002). Comparando a inibição causada pelo Glifosato com a causada pelas frações de *L. aurea*, observou-se que foi na cebolinha, onde o Glifosato a 800 ppm obteve 67 % de inibição do crescimento da raiz, que a fração K5 teve efeito inibitório de crescimento que mais se aproxima ao do Glifosato, com 60% de inibição do crescimento da raiz também na concentração de 800 ppm.

Observou-se também que nas espécies de eudicotiledôneas analisadas aqui, agrião, tomate e alface, a bioatividade das frações de *L. aurea* não tiveram uma resposta regular, apresentando algumas vezes estímulo, por exemplo no agrião e alface, e em outras, pouca inibição e sem significância, como no tomate. Já na cebolinha, uma espécie de monocotiledônea, observou-se que a resposta às frações de *L. aurea* são sempre de inibição e com significância e aproximando-se do efeito do Glifosato. No bioensaio com coleóptilo de trigo, que também é uma espécie de monocotiledônea, também foi observado uma grande inibição no alongamento de coleóptilo. Esta seletividade não foi observada no Glifosato, que teve efeito inibitório no crescimento de raiz e de parte aérea em todas as espécies, tanto monocotiledôneas quanto eudicotiledôneas. Esta resposta nos mostra que *L. aurea* pode ter efeito fitotóxico predominantemente em monocotiledôneas, assim como um herbicida seletivo

para gramíneas, um graminicida, como por exemplo o trifluralin, pendimethalin, oryzalin, butylate, DCPA; ou um graminicida exclusivo, que matam exclusivamente monocotiledôneas como o fenoxaprop-p-ethyl, sethoxydim, alloxydim-sodium, dalapon, asulam, entre outros (CARVALHO, 2013).

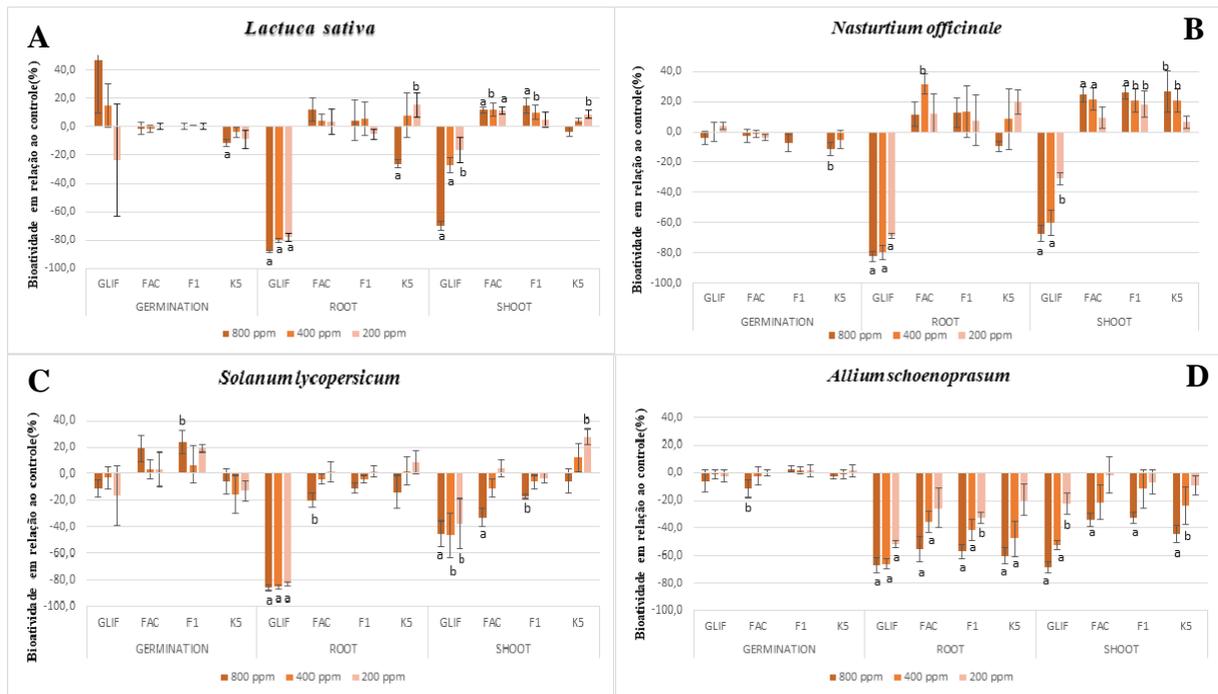


Figura 14. Efeito das frações Fac, F1, e K5 do extrato de *L. aurea* e do glifosato (Glif), nas concentrações de 200, 400 e 800 ppm, na germinação e crescimento de *L. sativa* (A), *N. officinale* (B), *S. lycopersicum* (C) e *A. schoenoprasum* (D), com valores expressos em porcentagem em relação ao controle, e significância com $a = p < 0,01$; $b = 0,01 < p < 0,05$.

5.4 Bioensaio de hidroponia

Neste bioensaio foi avaliado o efeito da fração acetado de etila (fac) sobre as espécies de plantas daninhas de cultura. Observou-se que a fração acetato de etila (Fac) não teve efeito fitotóxico (0%) em *C. bonariensis* em nenhuma das concentrações, com pontuação 9 de acordo com a escala da EWRS. Em *B. pilosa* o efeito fitotóxico foi baixo, de 17,5% na concentração mais alta de 800 ppm, também com pontuação 9 na mesma escala. Já na espécie de monocotiledônea *P. maximum*, o efeito fitotóxico foi de 62,5% na concentração de 800 ppm, o que representa na escala EWRS uma pontuação 7, indicando um controle pobre, chegando mais

perto do Glifosato que obteve 80% de fitotoxicidade, pontuação 6, indicando um controle regular. Em *E. indica* tratada com a fração Fac, observou-se uma inibição de 49% na concentração de 800 ppm, com pontuação 8, indicando um controle muito pobre, diferente do glifosato que nesta mesma concentração apresentou um controle regular de 80% com pontuação 6 na escala da EWRS (**Figura 15 e Figura 16**).

No bioensaio de hidroponia observou-se também que a maior atividade fitotóxica de *L. aurea* foi em espécies monocotiledôneas, pois em *P. maximum* e *E. indica* os índices de fitotoxicidade de *L. aurea*, apresentados em forma de percentual de controle de daninhas conforme **Figura 15 e Figura 16**, foram maiores que em *B. pilosa* e *C. bonariensis*, espécies eudicotiledôneas, principalmente na concentração mais alta, de 800 ppm. Acredita-se que em *E. indica* o resultado de fitotoxicidade foi menor que o esperado, comparando com *P. maximum*, sendo uma monocotiledônea também, por ter sido o último experimento a ser feito e o produto bioativo com fitotoxicidade em Fac pode ter sido degradado por estar guardado, mesmo em geladeira, por mais tempo. Assim, seria necessário um estudo para estipular o tempo de degradação do bioativo fitotóxico presente em *L. aurea*, ou alguma forma de estabilizar o composto fitotóxico.

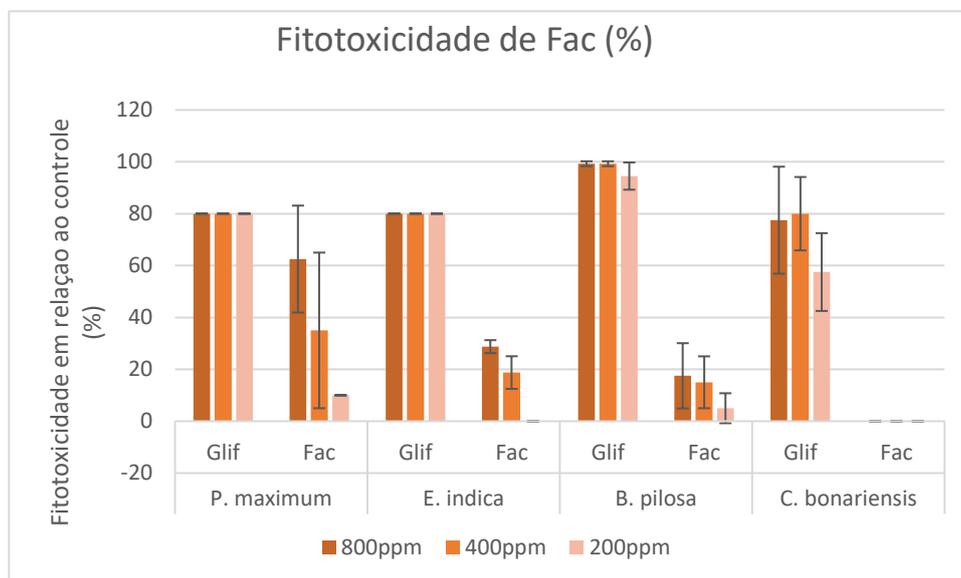


Figura 15. Efeito de fitotoxicidade da fração Fac do extrato de *L. aurea* e do glifosato (Glif), nas concentrações de 200, 400 e 800 ppm em *P. maximum*, *E. indica*, *B. pilosa* e *C. bonariensis*, no bioensaio de hidroponia, expresso em porcentagem de dano em relação ao controle nas espécies testadas de acordo com a EWRS.

Observou-se também que o efeito do glifosato em *C. bonariensis* foi menor que nas outras espécies testadas, o que de acordo com a literatura era esperado, já que *C. bonariensis* já apresenta múltiplos casos de resistência ao glifosato (INTERNATIONAL SURVEY OF HERBICIDE RESISTENTE WEEDS, 2024; KASPARY et al., 2024), principalmente em sua fase adulta, o que não era o caso aqui testado, que foi em seu estágio inicial vegetativo de roseta, talvez por isso ainda sofreu o efeito fitotóxico do glifosato embora menos que nas outras espécies.



Figura 16. Efeito de fitotoxicidade da fração Fac do extrato de *L. aurea* e do glifosato (Glif), nas concentrações de 800 ppm em comparação com o controle negativo (tampão MS) em *B. pilosa* (A), *C. bonariensis* (B), *P. maximum* (C) e *E. indica* (D), no bioensaio de hidroponia.

Tabela 7. Resultado da Regressão linear simples e ANOVA a 95% de confiança do bioensaio de hidroponia com a fração Fac do extrato de *L. aurea*, e o Glifosato nas espécies *P. maximum*, *E. indica*, *B. pilosa* e *C. bonariensis*.

Tratamento	R ²	F	valor-P	Erro padrão
Glif_+ <i>P. maximum</i>	1	-	-	-
Fac + <i>P. maximum</i>	0,8330	54,887	1,35E-05	0,01061
Glif + <i>E. indica</i>	1	-	-	-
Fac + <i>E. indica</i>	0,8080	42,088	7,01E-05	0,00688
Glif_+ <i>B. pilosa</i>	0,7912	41,689	4,7E-05	0,02544
Fac_+ <i>B. pilosa</i>	0,6774	23,100	0,000548	0,00520
Glif_+ <i>C. bonariensis</i>	0,8104	47,022	2,74E-05	0,01832
Fac_+ <i>C. bonariensis</i>	1	-	-	-

Os resultados da regressão nos mostram que todos os tratamentos tiveram um R^2 maior que 0,6, com $\text{valor-}P \leq 0,05$, mostrando uma boa correlação entre as concentrações. Muitos compostos extraídos de plantas possuem correlação da fitotoxicidade com a concentração utilizada dos mesmos, sendo dose-dependentes (ABD-ELGAWAD et al., 2021; ARAGÃO; PALMIERI; COSTA, 2015; MASUM et al., 2019). No tratamento com Glifosato em *P. maximum* e *E. indica*, e no tratamento com Fac em *C. bonariensis* mesmo o R^2 sendo um (1) não mostra variação do efeito fitotóxico correlacionado com as concentrações, pois não teve variação do efeito fitotóxico com a concentração, todos as réplicas tiveram o mesmo resultado (Tabela 7).

5.5 Ensaio fitoquímico preliminares

Nos ensaios fitoquímicos preliminares foram detectados em maior quantidade fenóis, alcaloides e taninos em menor quantidade, e sem detecção de terpenoides no extrato aquoso de folhas de *L. aurea*, de acordo com a Tabela 8 e a Figura 17. Corroborando com esses resultados, em outros estudos com *L. aurea* já foram detectados polifenóis como o 5-p-coumaroylquinic acid, mas não foram detectados terpenos nos testes fitoquímicos preliminares do extrato aquoso bruto (Eb) como foi detectado o glaucolide B., uma lactona sesquiterpênica em GALLON; JAIYESIMI; GOBBO-NETO (2018).

Tabela 8. Resultado dos ensaios fitoquímicos preliminares de saponinas, fenóis, taninos, alcaloides e terpenoides. Muito intenso: +++++, Intenso: +++, Moderado: ++, Leve: +, e ausente: -, no extrato aquoso de folhas de *L. aurea*.

Saponinas	Fenóis	Taninos	Alcaloides	Terpenoides
-	++++	++	++++	-

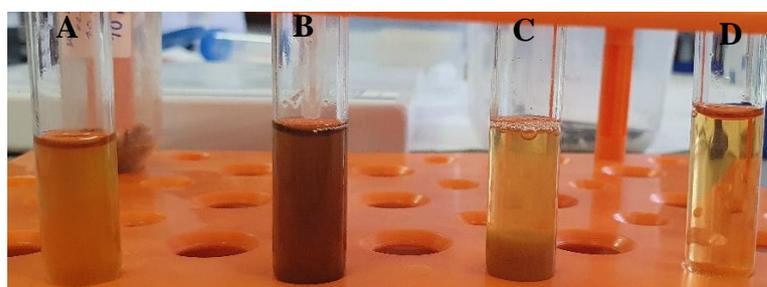


Figura 17. Resultado dos ensaios de detecção de saponinas (A), fenóis e taninos (B), alcaloides (C) e terpenoides (D), respectivamente da esquerda para a direita, em extrato aquoso de folhas de *L. aurea*.

Nas análises fitoquímicas colorimétricas preliminares foram observados a presença de fenóis em todas as frações F1, K3, K4 e K5, com bandas de coloração azul e vermelho logo após a secagem da placa de CCD e posteriormente a fixação da cor azul mostrando precipitado azul indicativo de taninos, menos em K5. Foram detectados alcaloides na fração F1 com banda vermelha na CCD bem suave e em K5 com duas bandas vermelhas mais intensas. Terpenóides também foram detectados em todas as frações mostrado em bandas vermelho-violeta na CCD (**Tabela 9 e Figura 18**).

Os terpenos foram identificados com os testes colorimétricos nas frações provenientes do fracionamento e da purificação do extrato aquoso de folhas de *L. aurea* e não no extrato aquoso bruto em si (**Tabela 8**) possivelmente devido a eficiência de detecção no método em baixas concentrações, pois no extrato bruto os terpenóides estavam acrescidos de muitos outros compostos que foram retirados na purificação deixando as frações mais limpas e puras, podendo ser detectados os terpenos com mais eficiência. Estudos em óleos essenciais (OE) extraídos de várias famílias botânicas mostram que a ação fitotóxica aumenta em relação direta com o conteúdo de terpenóides, principalmente os oxigenados, inibindo germinação e crescimento das daninhas, sendo os monoterpenoides oxigenados o principal componente dos OEs mais fitotóxicos, além dos sesquiterpenos terem também papel importante na fitotoxicidade dos OEs (ABD-ELGAWAD et al., 2021).

Tabela 9. Resultado dos ensaios fitoquímicos colorimétricos preliminares em CCD de fenóis, taninos, alcaloides e terpenoides. Muito intenso: +++++, Intenso: +++, Moderado: ++, Leve: +, e ausente: -, nas frações F1, K3, K4 e K5 provenientes do fracionamento e purificação do extrato aquoso de folhas de *L. aurea*.

Frações	Fenóis	Taninos	Alcaloides	Terpenoides
F1	++++	++++	+	+++
K3	++++	++++	-	+++
K4	++++	++++	-	++++
K5	+++	-	++	++++

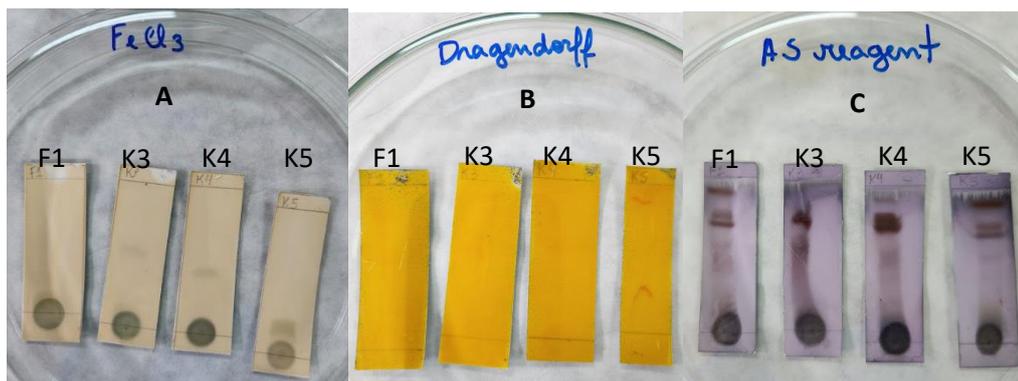


Figura 18. Resultado dos ensaios de detecção de fenóis e taninos (A), alcaloides (B) e terpenoides (C), respectivamente da esquerda para a direita, das frações F1, K3, K4 e K5 obtidas da purificação do extrato de folhas de *L. aurea*.

Os compostos secundários produzidos pelas plantas têm importantes funções ecológicas, como por exemplo a competição entre plantas e simbiose entre plantas e microrganismo. Dentre os compostos secundários, os compostos fenólicos, flavonoides e taninos são os agentes mais comumente associados com o efeito alelopático (BORGES; AMORIM, 2020; FERREIRA; AQUILA, 2000; TAIZ; ZEIGER, 2006). Os compostos fenólicos possuem grande variedade química e por isso também desempenham uma diversidade de funções nos vegetais, uma delas é a atração dos polinizadores, além da proteção da planta contra injúria e herbivoria (BORGES; AMORIM, 2020; VIZZOTO, 2010), e os alcaloides têm grande papel medicinal e exercem defesa contra insetos herbívoros (BORGES; AMORIM, 2020; TAIZ et al., 2017).

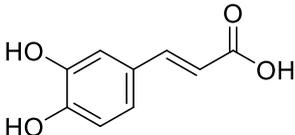
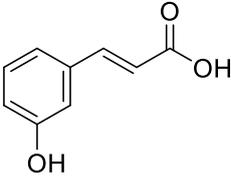
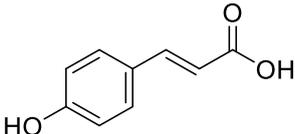
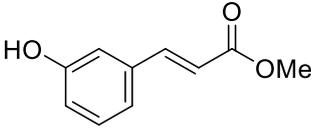
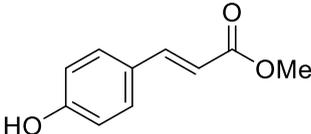
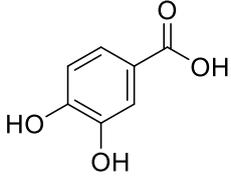
Na família das Asteraceae é muito comum a presença de alcaloides, taninos e fenóis (AGUILERA; MEIRA; FERREIRA, 2004; PATACCI et al., 2012; RIBEIRO; SILVA; CASTRO, 2010). Em *Vernonia amygdalina*, já foram encontrados flavonoides, alcaloides, esteroides, terpenoides, glicosídeos, taninos, fenóis e saponinas (ALARA et al., 2019), que são compostos bioativos alelopáticos. Em *L. aurea* já foram detectados metabólitos secundários como fenóis, quercetinas, flavonoides e terpenos (GALLON; JAIYESIMI; GOBBO-NETO, 2018).

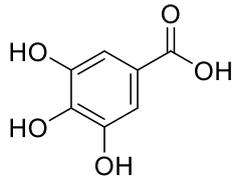
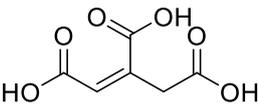
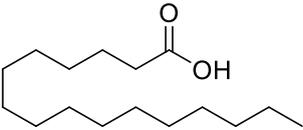
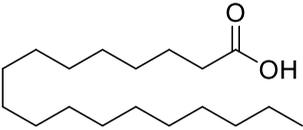
5.6 Análises instrumentais

5.6.1 CG/MS

Como resultado do CG/MS obtivemos a identificação de algumas moléculas com importante potencial alelopático descrito na literatura (CHENG; CHENG, 2015). Foram identificados os compostos fenólicos: o ácido protocatecuico, o ácido gálico, o ácido cafeico, o ácido *p*-cumárico, e os seguintes derivados do ácido cinâmico: o ácido *m*-hidroxicinâmico, o ácido *p*-hidroxicinâmico, o metil *m*-hidroxicinamato, o metil *p*-hidroxicinamato, além do ácido palmítico, esteárico e aconítico (**Tabela 10**).

Tabela 10. Moléculas com alguma atividade alelopática encontradas nas frações F1, K3, K4 e K5 provenientes do fracionamento e purificação do extrato aquoso de folhas de *L. aurea*, através de CG/MS, suas estruturas, propriedades e o Qual, de acordo com a biblioteca NIST11.L.

	Molécula	Estrutura	Propriedades	F1	K3	K4	K5
1	Ácido cafeico (ácido 3,4-dihidroxicinâmico)		Fórmula molecular: C ₉ H ₈ O ₄ Massa molecular: 180 g/mol	-	98	95	98
2	Ácido <i>m</i> -hidroxicinâmico ou ácido <i>m</i> -cumárico (ácido 3-hidroxicinâmico)		Fórmula molecular: C ₉ H ₈ O ₃ . Massa molecular: 164,16 g/mol.	-	91	95	-
3	Ácido <i>p</i> -hidroxicinâmico, ou ácido <i>p</i> -cumárico (ácido 4-hidroxicinâmico)		Fórmula molecular: C ₉ H ₈ O ₃ Massa molecular: 164,16 g/mol.	91	97	99	99
4	Metil <i>m</i> -hidroxicinamato		Fórmula molecular: C ₁₀ H ₁₀ O ₃ . Massa molecular: 178,17 g/mol.	91	-	-	-
5	Metil <i>p</i> -hidroxicinamato		Fórmula molecular: C ₁₀ H ₁₀ O ₃ Massa molecular: 178,18 g/mol	98	-	97	98
6	Ácido protocatecuico (Ácido 3,4-dihidroxibenzóico)		Fórmula molecular: C ₇ H ₆ O ₄ Massa molecular: 154,12 g/mol	94	94	-	95

7	Ácido gálico (3,4,5-trihidroxibenzoico)		Fórmula molecular: C ₇ H ₆ O ₅ Massa molecular: 170,12 g/mol	93	-	-	-
8	Ácido aconítico (1-Propene-1,2,3-tricarboxylic acid)		Fórmula Molecular: C ₆ H ₆ O ₆ Massa molecular: 174,11 g/mol	99	97	-	-
9	Ácido palmítico (Hexadecanoic acid)		Fórmula molecular: C ₁₆ H ₃₂ O ₂ Massa molecular: 256 g/mol	-	94	91	99
10	Ácido esteárico (Octadecanoic acid)		Fórmula molecular: C ₁₈ H ₃₆ O ₂ Massa molecular: 284 g/mol	-	-	95	99

As plantas da família Asteraceae são amplamente conhecidas por sua rica diversidade de compostos fenólicos. Esses compostos desempenham papéis importantes na fisiologia da planta, incluindo defesa contra herbívoros, proteção contra estresses ambientais e interação com outros organismos (TAIZ; ZEIGER, 2006). Além disso, eles têm grande relevância farmacológica devido às suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas (FABRI et al., 2011). Os compostos fenólicos são uma classe dos aleloquímicos vegetais mais comuns e importantes no ecossistema (CHENG; CHENG, 2015). São compostos químicos que possuem um grupo hidroxila (-OH) ligado diretamente a um grupo hidrocarboneto aromático. Metabólitos fenólicos, devido à presença de anel aromático, possuem capacidade de interferir em processos com fluxo de carga (cátions e ânions), como fotossíntese, transporte, permeabilidade iônica da membrana celular e eliminação de radicais livres (TAIZ et al., 2017). Dentre os compostos fenólicos, também é uma característica da família Asteraceae a ocorrência dos derivados do ácido hidroxicinâmico (JAISWAL; KIPROTICH; KUHNERT, 2011).

O ácido cafeico (ácido 3,4-dihidroxicinâmico), um dos derivados mais comuns do ácido hidroxicinâmico, é encontrado em café, frutas e vegetais e está presente em extratos vegetais que mostraram potencial alelopático, como em *Eragrostis plana* Nees (capim-annoni)

(FIORENZA et al., 2016) , e isolado já foi estudada sua atividade alelopática mostrando inibição moderada na germinação de sementes de alface (LI et al., 2010), parecendo atuar na fotossíntese, inibindo o transporte de elétrons (ZHOU; YU, 2006).

O Ácido m-hidroxicinâmico ou ácido m-cumárico e o ácido p-hidroxicinâmico ou ácido p-cumárico são isômeros posicionais, pois possuem a mesma fórmula molecular ($C_9H_8O_3$), mas diferem na posição do grupo funcional no anel aromático o que pode causar diferentes atividades ou interações com enzimas. Ambos são ácidos hidroxicinâmicos, compostos fenólicos, e estão presentes em plantas. O isômero p, ácido p-cumárico (4-hidroxicinâmico), já foi detectado em cultivares de arroz e relacionado a fitotoxicidade deste (HO et al., 2020). É encontrado também em frutas, vinho e mel, também apresenta relatos de sua atividade alelopática, como em TEJEDA-SARTORIUS et al., 2004, mostrando a sua presença em resíduo seco de *Amaranthus hypochondriacus* L. var. Azteca (amaranto) provocando inibição de germinação e alongamento de raiz em *Amaranthus hybridus* L. Dicho. Em outro estudo com *Brachiaria humidicola* foi associado o efeito alelopático dos seus extratos ao ácido p-cumárico, influenciando na germinação e no desenvolvimento da radícula das espécies invasoras *Mimosa pudica* (malícia), *Senna obtusifolia* (fedegoso) e *Senna occidentalis* (mata-pasto) (SOUZA FILHO; PEREIRA; BAUMA, 2005).

O metil m-hidroxicinamato, metil p-hidroxicinamato são os ésteres metílicos dos ácidos hidroxicinâmicos, também são isômeros posicionais e derivados do ácido hidroxicinâmico. Em geral, os ácidos hidroxicinâmicos apresentam maior potencial fitotóxico do que seus ésteres metílicos, devido à sua maior reatividade e interação direta com processos metabólicos das plantas. No entanto, as diferenças específicas dependem do contexto experimental e das espécies avaliadas (GONÇALVES, 2020).

Os Ácido protocatecuico (3,4-diidroxibenzoico) e ácido gálico (3,4,5-triidroxibenzoico) são derivados do ácido hidroxibenzoico, são policresólicos (com vários grupos hidroxila). O ácido protocatecuico, é um composto fenólico presente em diversas plantas e estudos indicam que pode inibir a germinação e o crescimento de plântulas de algumas espécies vegetais, por exemplo, pesquisas realizadas com a planta *Myrcia guianensis* (pedra-ume-caá) mostraram que extratos contendo este ácido afetaram negativamente a germinação e o desenvolvimento de espécies daninhas como *Mimosa pudica* (malícia) e *Senna obtusifolia* (mata-pasto) mostrando dose-dependência e especificidade a algumas espécies (SOUZA FILHO et al., 2006). Essas propriedades fazem dele um composto de interesse em estudos sobre controle biológico de

plantas daninhas e manejo sustentável de culturas. Atividades anti-inflamatórias e antioxidantes do ácido protocatecuico em doses muito baixas também já foram relatadas em estudos, mostrando ser uma molécula promissora para uso medicinal (DE FARIA, 2014). O ácido gálico é encontrado no chá verde e em frutos e é precursor de taninos hidrolisáveis. É um composto fenólico com forte potencial fitotóxico, desempenhando papéis importantes em alelopatia podendo ser explorado em práticas agrícolas para manejo de plantas daninhas. Verificou-se em estudo do extrato aquoso de *Crotalaria juncea* influência do ácido gálico sobre a germinação e o crescimento inicial de *Ocimum basilicum* (GOMES; SOUZA; OLIVEIRA, 2020), e sua presença em extratos de *Eragrostis plana* Nees (capim-annoni), também com potencial alelopático (FIORENZA et al., 2016).

O ácido aconítico (1-Propene-1,2,3-tricarboxylic acid) é um composto orgânico pertencente à classe dos ácidos tricarboxílicos, caracterizado por possuir três grupos carboxílicos (-COOH) ligados a uma estrutura de propeno. É um intermediário no ciclo do ácido cítrico e ocorre naturalmente em várias plantas, particularmente na cana-de-açúcar, beterraba e outros vegetais. Em alguns estudos com o ácido aconítico verificou-se sua presença em *Urochloa plantaginea*, em pastagens como em *Agropyron* sp., e em variedades de milho, sorgo, cevada e trigo, apresentando potencial alelopático influenciando na germinação das sementes e causando a redução do crescimento das plântulas, sendo mais afetadas as raízes do que o caule em plantas daninhas de várias espécies e de diferentes locais (VOLL, 2019; VOLL et al., 2009; VOLL; GAZZIERO; ADEGAS, 2010).

O ácido palmítico e o ácido esteárico são ácidos graxos saturados amplamente encontrados na natureza, especialmente em óleos e gorduras de origem vegetal e animal. Ambos desempenham papéis importantes no metabolismo e têm diversas aplicações industriais e cosméticas. A maioria dos estudos sobre alelopatia concentra-se em compostos fenólicos, alcaloides e terpenoides, que demonstram efeitos mais pronunciados na inibição ou promoção do crescimento de plantas. Embora os ácidos graxos saturados, como o ácido palmítico e o ácido esteárico, não sejam tradicionalmente reconhecidos por possuírem atividade alelopática significativa, alguns estudos sugerem que eles podem influenciar o crescimento de plantas. Estes ácidos foram encontrados em *Saccharum officinarum* (cana-de-açúcar) em resíduos da indústria sucroalcooleira (vinhaça) que mostraram potencial fitotóxico de suas biomoléculas na planta daninha resistente *Ipomoea purpúrea* sendo um potencial bioherbicida (LUZ et al., 2021). Outro estudo também com a vinhaça mostra influência na espécie daninha

Calopogonium mucunoides e em alface, onde a fitotoxicidade foi atribuída a presença de ácidos graxos e substâncias fenólicas (GOMES et al., 2016). Muitos estudos têm sugerido que a interação de compostos secundários como os compostos fenólicos somados aos ácidos graxos, por exemplo, pode resultar em um potencial alelopático (SAFDAR et al., 2014; SAMPIETRO; VATTUONE, 2006). Há indícios de que os ácidos graxos atuem sobre a membrana plasmática celular, afetando principalmente sua permeabilidade, com a formação de um canal iônico, que resulta na destruição da organização da membrana e dissociando pigmentos envolvidos em processos de fotossíntese (TAIZ; ZEIGER, 2006).

Nos estudos discutidos anteriormente a maioria fez as análises de alelopatia e fitotoxicidade dos compostos com plantas daninhas associadas a culturas como plantas alvo. Mas os compostos encontrados em *L. aurea* também podem ser utilizados em gramíneas exóticas invasoras como as testadas nesse estudo no bioensaio de hidroponia *P. maximum* e *E. indica*, que constam na lista de espécies exóticas invasoras em Unidades de Conservação (ICMBio, 2025). Assim, estes compostos encontrados em *L. aurea* têm grande potencial bioherbicida, que, se utilizado em áreas de restauração no combate as gramíneas exóticas invasoras seria uma grande ferramenta na conservação da biodiversidade do Cerrado.

Mais estudos são necessários para separação e determinação dos compostos presentes no extrato aquoso de folhas de *L. aurea*, e da determinação da fitotoxicidade deles. Sendo necessário posteriormente estudos para formulação de um bioherbicida com base nos achados de fitotoxicidade dos compostos encontrados no extrato.

O uso de um bioherbicida ecologicamente correto, ambientalmente sustentável e economicamente eficiente pode contribuir no manejo integrado de áreas de restauração ecológica e no aumento da eficiência na agricultura pelo controle das daninhas. A seletividade também seria uma vantagem para contribuir neste controle. Este produto também poderia contribuir na redução da resistência a herbicidas, já que teria outro mecanismo de ação que aqueles dos herbicidas já utilizados. Assim, novos produtos podem ser desenvolvidos com esse mesmo objetivo de termos moléculas orgânicas naturais com potencial de produção de um bioherbicida a partir de espécies nativas do Cerrado para serem usados nesse bioma, além de poderem ser utilizados na produção agrícola contribuindo para uma agricultura menos agressiva ao meio ambiente e à saúde.

6. Conclusões

A extração ácida melhora o rendimento do extrato aquoso das folhas de *L. aurea*, principalmente associado ao Metanol como solvente junto à água.

De acordo com o isolamento biodirigido pode-se concluir que o extrato aquoso de folhas de *L. aurea* possui compostos secundários fitotóxicos com grande potencial bioherbicida. Estes compostos são solúveis em água e foram extraídos com acetato de etila, pois o resíduo aquoso perdeu a atividade inibitória.

Verifica-se também uma seletividade da fitotoxicidade deste composto presente em *L. aurea* a espécies de monocotiledôneas, já que nos bioensaios de sementes alvo padrão e de hidroponia, as espécies mais atingidas foram exemplares do clado das monocotiledôneas, além de mostrar grande inibição no alongamento do coleóptilo estiolado de trigo, que também é uma espécie monocotiledônea.

Quanto a natureza do composto fitotóxico, verifica-se a presença de fenóis, taninos e terpenóides no extrato aquoso de folhas de *L. aurea*, concatenando com os compostos achados no CG/MS. Dentre os compostos verificados pelo CG/MS estão os compostos fenólicos derivados do ácido hidroxicinâmico como o ácido cafeico, os ácidos m e p-cumárico, o metil m-hidroxicinamato e metil p-hidroxicinamato, somado aos derivados do ácido hidroxibenzóico como o ácido protocatecuico e o ácido gálico. Verifica-se a presença também de um ácido tricarbóxico como o ácido aconítico, e os ácidos graxos saturados como o ácido palmítico e o ácido esteárico.

Há grande possibilidade destas moléculas fazerem parte dos compostos fitotóxicos por serem esses compostos secundários alelopáticos, além da possibilidade da fitotoxicidade ser proveniente da combinação destes, como descrito na literatura. Assim, o extrato aquoso de folhas de *L. aurea* tem grande potencial bioherbicida já que é composto por vários compostos alelopáticos e fitotóxicos amplamente descritos na literatura.

7. Referências bibliográficas

ABD-ELGAWAD, A. M. et al. **Phytotoxic effects of plant essential oils: A systematic review and structure-activity relationship based on chemometric analyses.** *Plants* MDPI AG, 1 jan. 2021.

AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários.** Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 23 out. 2023.

AGUILERA, D. B.; MEIRA, R. M. S. A.; FERREIRA, F. A. Anatomia e histoquímica dos órgãos vegetativos de *Siegesbeckia orientalis* (Asteraceae). **Planta Daninha**, v. 22, p. 483–489, 2004.

ALARA, O. R. et al. Extraction and characterization of bioactive compounds in *Vernonia amygdalina* leaf ethanolic extract comparing Soxhlet and microwave-assisted extraction techniques. **Journal of Taibah University for Science**, v. 13, n. 1, p. 414–422, 11 dez. 2019.

ANESE, Simoni et al. Search of New Tools for Weed Control Using *Piptocarpha rotundifolia*, a Dominant Species in the Cerrado. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 31, p. 8684–8694, 2021.

ANVISA. **Nota técnica nº 23/2018/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA.** [s.l: s.n.].

ARAGÃO, F. B. et al. Phytotoxicity and cytotoxicity of *Lepidaploa rufogrisea* (Asteraceae) extracts in the plant model *Lactuca sativa* (Asteraceae). **Revista de Biologia Tropical**, v. 65, n. 2, p. 435–443, 2017.

ARAGÃO, F. B.; PALMIERI, M.; COSTA, A. Phytotoxic and cytotoxic effects of Eucalyptus essential oil on lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Allelopathy Journal**, v. 35, n. 1, p. 259–272, abr. 2015.

ARAÚJO, C. A. et al. Asteraceae family: A review of its allelopathic potential and the case of *Acmella oleracea* and *Sphagneticola trilobata*. **Rodriguesia**, v. 72, 2021.

BARBOSA, E. G.; PIVELLO, V. R.; MEIRELLES, S. T. Allelopathic evidence in *Brachiaria decumbens* and its potential to invade the Brazilian Cerrados. **Brazilian Archives Biology and Technology**, v. 51, n. 4, p. 825–831, 2008.

BARROSO, A. A. M.; MURATA, A. T. **Matologia: Estudo sobre plantas daninhas.** 1. ed. Jaboticabal: Fábrica da Palavra, 2021.

BELZ, R. G.; HURLE, K.; DUKE, S. O. Dose-response—A challenge for allelopathy? **Nonlinearity in Biology, Toxicology, Medicine**, v. 3, n. 2, p. nonlin.003.02.0, 1 abr. 2005.

BORGES, L. P.; AMORIM, V. A. Metabólitos secundários de plantas. **Revista Agrotecnologia, Ipameri**, n. 11, p. 54–67, 2020.

BRIGHENTI, A. M.; OLIVEIRA, M. F. *Biologia de Plantas Daninhas*. Em: OLIVEIRA JÚNIOR, R. S.; CONSTANTIN, J. (Eds.). **Plantas Daninhas e seu Manejo**. [s.l.] Guaíba Agropecuária, 2001.

CARVALHO, L. B. DE. **Herbicidas**. Lages: O autor, 2013. v. 1

CASTILLIONI, K. P. **Avaliação de diferentes técnicas de manejo para o controle de gramíneas invasoras em unidades de conservação de Cerrado**. Rio Claro: Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, mar. 2015.

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** Frontiers Media S.A., 17 nov. 2015.

CHOU, C.-H. *Introduction to Allelopathy*. Em: REIGOSA, M. J.; PEDROL, N.; GONZÁLEZ, L. (Eds.). **Allelopathy: A Physiological Process with Ecological Implications**. Dordrecht: Springer, 2006.

CONCENÇO, G. et al. *Ciência das plantas daninhas: Histórico, Biologia, ecologia e fisiologia*. Em: MONQUERO, A. (Ed.). **Aspectos da biologia e manejo das plantas daninhas**. São Carlos: [s.n.]. p. 1–32.

CORDEAU, S. et al. Bioherbicides: Dead in the water? A review of the existing products for integrated weed management. **Crop Protection**, v. 87, p. 44–49, 1 set. 2016.

COSTA, N. V. et al. Métodos de controle de plantas daninhas em sistemas orgânicos: breve revisão. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 17, n. 1, p. 25, 10 mar. 2018.

DA SILVA, B. P. et al. Phytotoxicity Study on *Bidens sulphurea* Sch. Bip. as a Preliminary Approach for Weed Control. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 25, p. 5161–5172, 28 jun. 2017.

DAYAN, F. E.; CANTRELL, C. L.; DUKE, S. O. Natural products in crop protection. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 12, p. 4022–4034, 15 jun. 2009.

DE AMARANTE JUNIOR, O. P. et al. Glifosato: Propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Quim. Nova**, v. 25, n. 4, p. 589–593, 2002.

DE FARIA, C. M. Q. G. **Ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos: Propriedades antioxidantes e seus efeitos no metabolismo oxidativo de leucócitos**. Araraquara: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, 2014.

DEAR, B. S. et al. The tolerance of three transgenic subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.) lines with the *bxn* gene to herbicides containing bromoxynil. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 54, n. 2, p. 203–210, 2003.

DUKE, S. O. et al. Natural products as sources of herbicides: Current status and future trends. **Weed Research**, v. 40, n. 1, p. 99–111, fev. 2000.

DUKE, S. O. et al. **New Approaches to Herbicide and Bioherbicide Discovery**. **Weed Science** Cambridge University Press, 1 set. 2024.

FABRI, R. L. et al. Potencial antioxidante e antimicrobiano da família Asteraceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 2, p. 183–189, 2011.

FARIAS, R. et al. **Caminhando pelo Cerrado: plantas herbáceo-arbustivas, caracteres vegetativos e organolépticos**. Brasília: EDUnB, 2002.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: Uma área emergente da Ecofisiologia. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal 12 (edição especial)**, p. 175–204, 2000.

FERREIRA, A. G.; BOREGHETTI, F. Interferência: Competição e alelopatia. Em: **Germinação: Do básico ao complicado**. [s.l: s.n.]. p. 253–264.

FIORENZA, M. et al. Análise fitoquímica e atividade alelopática de extratos de *Eragrostis plana* Nees (capim-annoni). **Iheringia. Série Botânica**, v. 71, n. 2, p. 193–200, 31 ago. 2016.

GALLON, M. E.; JAIYESIMI, O. A.; GOBBO-NETO, L. LC-UV-HRMS Dereplication of secondary metabolites from Brazilian Vernoniae (Asteraceae) species supported through in-house database. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 78, p. 5–16, 1 jun. 2018.

GANN, G. D. et al. Princípios e Padrões internacionais para a prática da restauração ecológica. **Society for Ecological restoration**, 2019.

GARCÍA-ORTH, X.; MARTÍNEZ-RAMOS, M. Isolated Trees and Grass Removal Improve Performance of Transplanted *Trema micrantha* (L.) Blume (Ulmaceae) Saplings in Tropical Pastures. **Restoration Ecology**, v. 19, n. 1, p. 24–34, 2011.

GOMES, A. A. et al. Fitotoxicidade de espécies de Asteraceae cultivadas sobre gramíneas infestantes resistentes ao glifosato. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, n. 9, p. 64–74, 2019.

GOMES, A. C. C. et al. In vitro phytotoxic activity of *Saccharum officinarum* leaves on lettuce and weed *Calopogonium mucunoides*. **Allelopathy Journal**, v. 39, n. 2, p. 177–190, 2016.

GOMES, M. DE M.; SOUZA, J. R. P. DE; OLIVEIRA, E. C. DE. Extrato aquoso de *Crotalaria juncea* sobre a germinação e o crescimento inicial de *Ocimum basilicum*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 22, p. 25–34, 2020.

GONÇALVES, P. M. **Síntese e atividade fitotóxica de ésteres obtidos a partir de fenóis e do ácido fenoxiacético**. Alegre: Universidade Federal do Espírito Santo, 2020.

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

HARDING, D. P.; RAIZADA, M. N. **Controlling weeds with fungi, bacteria and viruses: A review**. **Frontiers in Plant Science** Frontiers Research Foundation, 28 ago. 2015.

HEAP, I. **Banco de dados internacional de ervas daninhas resistentes a herbicidas**. Disponível em: <<http://weedsociety.org/Home.aspx>>. Acesso em: 8 out. 2023.

HENNSSEN, B. L. et al. Plant secondary metabolites. Target and mechanisms of allelopathy. Em: REIGOSA, M. J.; PEDROL, N.; GONZÁLEZ, L. (Eds.). **Allelopathy: A Physiological Process with Ecological Implications**. Dordrecht: Springer, 2006.

Herbicide resistance action committee. Disponível em: <<https://hracglobal.com/herbicide-resistance/overview>>. Acesso em: 8 out. 2023.

HO, T. L. et al. Allelopathic potential of rice and identification of published allelochemicals by cloud-based metabolomics platform. **Metabolites**, v. 10, n. 244, p. 1–20, 2020.

IARC/WHO. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides. **International agency for research on cancer**, v. 112, 2015.

IBAMA. **Boletim anual de vendas por classe de uso 2021**. Disponível em: <<https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>>. Acesso em: 23 out. 2023.

ICMBio. Ministério do Meio Ambiente. **Lista de espécies exóticas invasoras em Unidades de Conservação**. Disponível em: <<https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/biodiversidade/manejo-de-especies-exoticas-invasoras/listas-de-eei-em-ucs>>. Acesso em: 24 fev. 2025

INTERNATIONAL SURVEY OF HERBICIDE RESISTENTE WEEDS. **Group G/9 resistant horseweed (*Conyza canadensis*)**. Disponível em: <<https://www.weedscience.org/Details/Case.aspx?ResistID=5086>>. Acesso em: 20 nov. 2024.

JAISWAL, R.; KIPROTICH, J.; KUHNERT, N. Determination of the hydroxycinnamate profile of 12 members of the Asteraceae family. **Phytochemistry**, v. 72, n. 8, p. 781–790, jun. 2011.

KAAB, S. B. et al. Screening of Tunisian plant extracts for herbicidal activity and formulation of a bioherbicide based on *Cynara cardunculus*. **South African Journal of Botany**, v. 128, p. 67–76, 1 jan. 2020.

KASPARY, T. E. et al. *Conyza bonariensis*' Resistance to Glyphosate, Diclosulam, and Chlorimuron: Confirmation and Alternative Control for the First Case of Multiple and Cross-Resistance in Uruguay. **Agronomy**, v. 14, n. 1, 1 jan. 2024.

KLINK, C.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, p. 147–155, jul. 2005.

LI, Z. H. et al. **Phenolics and plant allelopathy**. **Molecules**, dez. 2010.

LIAFFA, A. B. S. **Restauração ecológica no Cerrado: Intenso preparo de solo e alta densidade de semeadura não eliminam a necessidade de erradicação de gramíneas exóticas invasoras**. Dissertação de mestrado—Brasília: Universidade de Brasília, 2020.

LIMA RIBEIRO, M. DE S.; PRADO, E. C. **Population spatial distribution of *Vernonia aurea* MART. ex DC (Asteraceae) in a cerrado fragment at Caiapônia county, GO, Brazil** *Original Article Biosci. J.* [s.l.] Asteraceae, 2007.

LOMMEN, A. Metalign: Interface-driven, versatile metabolomics tool for hyphenated full-scan mass spectrometry data preprocessing. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 8, p. 3079–3086, 15 abr. 2009.

LOPES, P. G. et al. Evidence of phytotoxicity in a fast-growing shrub useful for savanna restoration in Central Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 40, n. 3, p. 643–649, 1 set. 2017.

LOPES, P. G. et al. Allelopathy of a native shrub can help control invasive grasses at sites under ecological restoration in a Neotropical savanna. **Plant Ecology and Diversity**, v. 11, n. 4, p. 527–538, 4 jul. 2018.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas.** [s.l.] Nova Odessa: Inst. Plantarum, 2000.

LORENZO, P. et al. Allelopathic interference of invasive *Acacia dealbata* Link on the physiological parameters of native understory species. **Plant Ecology**, v. 212, n. 3, p. 403–412, mar. 2011.

LOVETT, J.; RYUNTHYU, M. Allelopathy: broadening the context. Em: RIZVI, S. J. H.; RIZVI, V. (Eds.). **Allelopathy - Basic and applied aspects.** 1º ed. Dordrecht: Springer Netherlands, 1992. p. 11–17.

LUQUE-GARCÍA, J. L.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Ultrasound: a powerful tool for leaching. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 41–47, jan. 2003.

LUZ, D. A. et al. Chemical study and phytotoxic activity of fractions from agroindustrial residue vinasse against the weed *Ipomoea purpurea*. **Revista Virtual de Química**, v. 13, n. 5, p. 1084–1091, 2021.

MACÍAS, F. A. et al. Bioactive lignans from a cultivar of *Helianthus annuus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 21, p. 6443–6447, 20 out. 2004.

MACÍAS, F. A. et al. Isolation and phytotoxicity of terpenes from *Tectona grandis*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 36, n. 4, p. 396–404, 2010.

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

MACK, R. N. et al. Biotic invasions: Causes, epidemiology, global consequences, and control. **Ecological Applications**, v. 10, n. 3, p. 689–710, 2000.

MANTOANI, M. C.; TOREZAN, J. M. D. Regeneration response of Brazilian Atlantic Forest woody species to four years of *Megathyrus maximus* removal. **Forest Ecology and Management**, v. 359, p. 141–146, 1 jan. 2016.

MARTINS, A. F. **Controle de gramíneas exóticas invasoras em área de restauração ecológica com plantio total, floresta estacional semidecidual, Itu-SP**. Piracicaba: Universidade de São Paulo, 10 mar. 2011.

MASUM, S. M. et al. Comparison Study of Allelochemicals and Bispyribac-Sodium on the Germination and Growth Response of *Echinochloa crus-galli* L. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 38, n. 2, p. 501–512, 15 jun. 2019.

MATHUR, M.; GEHLOT, P. Recruit the plant pathogen for weed management: Bioherbicide a sustainable strategy. Em: **Fungi and their Role in Sustainable Development: Current Perspective**. [s.l.] Springer Singapore, 2018. p. 159–181.

MATSUMOTO, S. et al. Bio-guided optimization of the ultrasound-assisted extraction of compounds from *Annona glabra* L. leaves using the etiolated wheat coleoptile bioassay. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, n. 4, p. 1578–1584, jul. 2014.

MERFIELD, C. N. Redefining weeds for the post-herbicide era. **Weed Research**, v. 62, n. 4, p. 263–267, 1 ago. 2022.

MOJARAD, A. K.; MAJD, A.; FAHIMI, H. Allopathic effects of *Nerium oleander* L. on growth and anatomy structure of *Hordeum vulgare* (monocotyledon) and *Vicia sativa* (dicotyledon) seedlings. **Advances in Environment Biology**, v. 7, n. 4, p. 766–771, 2013.

MONTEON-OJEDA, A. et al. Eficacia de insecticidas botánicos y biorracionales para el control de trips (Thysanoptera: Thripidae) en árboles de mango en Veracruz, México. **Revista Bio Ciencias**, v. 7, 4 dez. 2020.

MORALES, J. Á. M. et al. Evaluación de coberteras y herbicidas orgánicos para el manejo de maleza en el valle del Yaqui, Sonora, México. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 7, n. 3, p. e71886, 14 ago. 2024.

MOTTA, C. P. **Dinâmica populacional de uma gramínea invasora e um arbusto nativo: implicações para a restauração ecológica no Cerrado**. Dissertação de Mestrado—Brasília: Universidade de Brasília, 2017.

NEVE, P. et al. **Current and future glyphosate use in European agriculture**. **Weed Research** John Wiley and Sons Inc, 1 jun. 2024.

NIMBAL, C. I. et al. Herbicidal activity and site of action of the natural product Sorgoleone 1. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, p. 73–83, 1996.

NISHIMUTA, H. A. et al. Leaf and root allelopathic potential of the *Vernonanthura brasiliiana*. **Planta Daninha**, v. 37, 2019.

NITSCH, J. P.; NITSCH, C. Studies on the growth of coleoptile and first internode sections. A new, sensitive, straight-growth test for auxins. **Plant Physiology**, v. 31, n. 2, p. 94–111, 1 mar. 1956.

NOVAES, P. Metabólitos secundários e sua importância na agricultura. Em: DOS SANTOS, D. Y. A. C. (Ed.). **Biossíntese, funções e aplicações dos metabólitos secundários de plantas**. 1ª ed. [s.l: s.n.]. p. 375–391.

OLIVEIRA, M. F. DE; BRIGUETI, A. M. **Controle de plantas daninhas - métodos físico, mecânico, cultural, biológico e alelopatia**. 1ª edição ed. Sete Lagoas: Embrapa, 2018.

OLIVEIRA JR, R. S. DE. Introdução ao controle químico. Em: OLIVEIRA JR, R. S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H. (Eds.). **Biologia e Manejo de Plantas Daninhas**. Curitiba: Omnipax, 2011. p. 125–140.

OLIVEIRA, S. C. C. et al. Estudo fitoquímico de folhas de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil (Solanaceae) e sua aplicação na alelopatia. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, p. 607–618, set. 2012.

PATACCI, F. et al. Phytochemistry and quantification of polyphenols in extracts of the Asteraceae weeds from Diamantina, Minas Gerais State, Brazil. **Planta Daninha**, v. 30, n. 1, p. 9–15, 2012.

PELLIZZARO, K. F. **Restauração ecológica por meio de semeadura direta no Cerrado: avaliando espécies de diferentes formas de vida e densidades de plantio**. Dissertação de mestrado—Brasília: Universidade de Brasília, 2016.

PIVELLO, V. R.; SHIDA, C. N.; MEIRELLES, S. T. Alien grasses in Brazilian savannas: a threat to the biodiversity. 1999.

PROINOVA, P.-R. DE I. E E. **Parceria entre UFSM e Transfertech pode registrar o primeiro bioherbicida no Brasil**. Disponível em: <<https://www.ufsm.br/pro-reitorias/proinova/2023/04/18/parceria-entre-ufsm-e-transfertech-pode-registrar-o-primeiro-bioherbicida-no-brasil>>. Acesso em: 20 nov. 2024.

PUIG, C. G. et al. Unravelling the bioherbicide potential of *Eucalyptus globulus* Labill_ Biochemistry and effects of its aqueous extract _ Enhanced Reader. **Plos one**, 2018.

RATHKE, B.; DIAS, B.; FILHO, O. Impacto da utilização de bioherbicida na germinação de plantas cultivadas Impact of the use of bioherbicide on the germination of cultivated plants. **Revista Cultivando o Saber**, 2020.

RIBEIRO, A. O.; SILVA, A. F.; CASTRO, A. H. F. Identificação de espécies da família Asteraceae, revisão sobre usos e triagem fitoquímica do gênero *Eremanthus* da Reserva Boqueirão, Ingaí-MG. **Rev. Bras. Pl. Med**, p. 456–465, 2010.

RICE, E. L. **Allelopathy**. 2^a ed. Orlando: Academic Press, Inc, 1984.

SAFDAR, M. E. et al. Allelopathic action of *Parthenium* and its rhizospheric soil on maize as influenced by growing conditions. **Planta Daninha**, v. 32, n. 2, p. 243–253, 3 fev. 2014.

SALOMÃO, P. E. A.; FERRO, A. M. S.; RUAS, W. F. Herbicidas no Brasil: uma breve revisão. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 2, p. e32921990, 1 jan. 2020.

SAMPAIO, A. B. et al. **Guia de restauração do Cerrado - Volume 1 - Semeadura Direta**. [s.l: s.n.]. v. 1

SAMPIETRO, D. A.; VATTUONE, M. A. Sugarcane straw and its phytochemicals as growth regulators of weed and crop plants. **Plant Growth Regulation**, v. 48, n. 1, p. 21–27, 2006.

SANTOS, F. A. M. DOS et al. Control strategies of *Urochloa* spp. in the formation of forest restoration. **Ciencia Florestal**, v. 30, n. 1, p. 29–42, 2020.

SCHÜTTE, G. et al. Herbicide resistance and biodiversity: agronomic and environmental aspects of genetically modified herbicide-resistant plants. **Environmental Sciences Europe**, v. 29, n. 1, 1 dez. 2017.

SEIDEL, V. Initial and bulk extraction. Em: SARKER, S. D.; LATIF, Z.; GRAY, A. I. (Eds.). **Natural products isolation**. 2nd ed. [s.l.] Humana Press, 2005. p. 27–46.

SILVA, J. M. C. DA; BATES, J. M. Biogeographic patterns and conservation in the south american Cerrado: A tropical savanna hotspot. **American Institute of Biological Science**, v. 52, n. 3, p. 225–234, 1 mar. 2002.

SINGH, S. et al. **Herbicide glyphosate: Toxicity and microbial degradation**. **International Journal of Environmental Research and Public Health** MDPI AG, 2 out. 2020.

ŠOLN, K.; KLEMENČIČ, M.; KOCE, J. D. **Plant cell responses to allelopathy: from oxidative stress to programmed cell death**. **Protoplasma** Springer, 1 set. 2022.

SOLTYS, D. et al. Allelochemicals as bioherbicides — Present and perspectives. Em: **Herbicides - Current Research and Case Studies in Use**. [s.l.] InTech, 2013.

SOUZA BARROS, V. M. DE et al. Herbicides of biological origin: a review. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 96, n. 3, p. 288–296, 2021.

SOUZA FILHO, A. P. S. et al. Potencial alelopático de *Myrcia guianensis*. **Planta Daninha**, v. 24, n. 4, p. 649–656, 2006.

SOUZA FILHO, A. P. S.; PEREIRA, A. A. G.; BAUMA, J. C. Aleloquímico produzido pela gramínea forrageira *Brachiaria humidicola*. **Planta Daninha**, v. 23, n. 1, p. 25–32, 2005.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6^a ed. [s.l.] Artmed, 2017.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3^a ed. [s.l.: s.n.].

TEJEDA-SARTORIUS, O. et al. Inhibidores de la germinación en el residuo seco del tallo del amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*). **Revista Sociedad Química de México**, v. 48, n. 2, p. 118–123, 2004.

VELDMAN, J. W. et al. Toward an old-growth concept for grasslands, savannas, and woodlands. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 13, n. 3, p. 154–162, abr. 2015.

VEYEL, D. et al. Rationales and Approaches for Studying Metabolism in Eukaryotic Microalgae. **Metabolites**, v. 4, n. 2, p. 184–217, 11 abr. 2014.

VIZZOTO, M. Metabólitos Secundários Encontrados em Plantas e sua Importância. **Embrapa Clima Temperado**, 2010.

VOLL, E. et al. Alelopatia do ácido aconítico em soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 6, p. 645–648, jun. 2009.

VOLL, E. **Efeitos alelopáticos do ácido aconítico: considerações e resultados**. Embrapa, **Circular Técnica 153**, 2019.

VOLL, E.; GAZZIERO, D. L. P.; ADEGAS, F. S. Ácido aconítico em sementes de espécies de plantas daninhas de diferentes locais. **Planta Daninha**, n. 1, p. 13–22, 2010.

VYVYAN, J. R. **Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals**. Washington: [s.n.].

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas**. 2nd. ed. [s.l.] Springer, 1996.

WEIR, T. L.; PARK, S. W.; VIVANCO, J. M. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, n. 4, p. 472–479, ago. 2004.

ZHOU, Y. H.; YU, J. Q. Allelochemicals and photosynthesis. Em: **Allelopathy**. Asturias: Springer, Dordrecht, 2006. p. 127–139.