



**Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de botânica
Programa de Pós-Graduação em Botânica**

Efeito alelopático e fitoquímica do rizoma e das folhas de *Arundo donax* L. (Poaceae)

Lucas Giroto Lagreca da Silva

Brasília, 2019

Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Ciências Biológicas – IB
Programa de pós-graduação em Botânica - PPGBOT

Lucas Giroto Lagreca da Silva

Efeito alelopático e fitoquímica do rizoma e das folhas de *Arundo donax* L. (Poaceae)

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Botânica pelo Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade de Brasília

Orientadora: Dra. Cristiane da Silva Ferreira

LUCAS GIROTTI LAGRECA DA SILVA

**Efeito alelopático e fitoquímica do rizoma e das folhas
de *Arundo donax* L. (Poaceae)**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Botânica, e aprovada em sua forma final pelo programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade de Brasília.

Aprovada em 22 de Fevereiro de 2019.

BANCA EXAMINADORA:

Dra. Cristiane da Silva Ferreira (Orientadora)

. Dr. Christopher William Fagg (Membro Titular Interno)

Dra. Christina Cleo Vinson Williams (Membro Titular Externo)

Dr. Sérgio Araújo Figueiredo (Suplente)

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, que mesmo distantes em boa parte do meu mestrado, sempre se mantiveram presentes.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) pelo apoio financeiro que possibilitou a execução desse trabalho e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa de mestrado.

À professora Cristiane, pela orientação e por toda a atenção e apoio nestes quase dois anos.

À professora Sarah Oliveria, por seu papel na concepção do meu mestrado, e por toda ajuda e disponibilidade.

À professora Cecília Nunez, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, pela disposição em me receber em seu laboratório e a atenção que enriqueceram muito este trabalho.

Aos alunos do Laboratório de Bioprospecção Vegetal do INPA por toda a ajuda durante minha estadia em Manaus.

À todos os professores e alunos do Departamento de Botânica da UnB que me auxiliaram de qualquer forma durante meu mestrado.

Aos meus amigos, que mantiveram minha sanidade intacta.

À Carol, por ser a pessoa especial sempre ao meu lado nas horas mais difíceis.

RESUMO

Arundo donax L. (Poaceae), conhecida popularmente como cana-do-reino, é uma espécie exótica invasora do cerrado brasileiro. Sua propagação e estabelecimento podem ameaçar a diversidade e a manutenção das espécies nativas. Esta é uma espécie com elevada produção de biomassa e de reprodução majoritariamente vegetativa através de seu vasto rizoma, fatores que a tornam de difícil controle. Alelopatia, descrita como a produção de biomoléculas, principalmente compostos secundários, por parte de um indivíduo, que induzem efeitos positivos ou negativos em um segundo indivíduo, pode ser um fator relevante na invasão biológica desta espécie. Desta forma o objetivo deste trabalho foi analisar a alelopatia e os compostos fitoquímicos presentes nas folhas e rizomas de *A. donax* por meio de testes fitoquímicos, visando ter maior conhecimento sobre o papel da alelopatia na invasão desta espécie no Distrito Federal. Extratos aquosos e metanólicos foram produzidos a partir de folhas e rizomas de *A. donax* coletados em áreas antropizadas do Distrito Federal. Para o experimento de alelopatia, estes extratos foram diluídos em diferentes frações para teste de alelopatia em bioensaios de germinação contra espécies alvo, estas duas espécies modelo, *Lactuca sativa* e *Solanum lycopersicum*, um capim invasor, *Panicum maximum*, e uma espécie nativa do cerrado, *Handroanthus impetiginosus*. Material extraído com água e metanol de folhas e de rizomas foi seco e utilizado para testes com foco fitoquímico. Cromatografia de camada delgada (CCDC), testes antioxidantes e antimicrobianos, um ensaio de citotoxicidade, e análises de ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massa foram realizados. Foi possível observar nos resultados obtidos que os extratos aquosos e metanólicos de folhas e rizomas foram inibitórios do crescimento em altura das espécies alvo. Extratos metanólicos foram mais inibitórios que os aquosos, enquanto extratos de folhas foram mais inibitórios que os extratos de rizomas. Por meio da CCDC observamos que compostos fitoquímicos como alcaloides e flavonoides estão presentes majoritariamente nas folhas de *A. donax*, e possuem afinidade maior com o metanol do que com a água. Porém, a presença destes compostos não se traduziu em resultados positivos nos testes antioxidante, antimicrobiano e no

ensaio de citotoxicidade. Por meio da RMN e da espectrometria de massa tivemos a indicação da presença de compostos fitoquímicos como alcaloides, mas a grande quantidade de material presente nas amostras impediu análises detalhadas. Os resultados obtidos comprovam a alelopatia desta espécie, em situação de laboratório. Podemos afirmar que a maioria dos compostos fitoquímicos ativos está presente nas folhas, com menor afinidade à água do que ao metanol. Dentre estes compostos observamos a presença de alcaloides, flavonoides e outros compostos fenólicos. Este resultado contribui para explicar um ponto relevante na invasão biológica de *Arundo donax*, o que auxilia em futuras ações de controle populacional. Contudo, mais estudo é necessário para se conhecer o completo potencial fitoquímico desta espécie desta gramínea.

PALAVRAS CHAVE: *Arundo donax*, espécie exótica, invasão biológica, alelopatia, composto alelopático, fitoquímica, alcaloide, potencial fitoquímico

ABSTRACT

Arundo donax L. (Poaceae), popularly known as cana-do-reino, is an exotic invasive species of the Brazilian Cerrado. Its propagation and establishment can threaten the diversity and maintenance of native species. This is a species with high biomass production and mainly vegetative reproduction through its vast rhizome, factors that hinder control initiatives. Allelopathy, described as the production of biomolecules, mainly secondary metabolites, by an individual, which induce positive or negative effects in a second individual, may be a relevant factor in the biological invasion of this species. Thus, the objective of this study was to analyze the allelopathy and the phytochemical compounds present in the leaves and rhizomes of *A. donax* by means of phytochemical tests, aiming to have greater knowledge about the role of allelopathy in the invasion of this species in Distrito Federal. Aqueous and methanolic extracts were produced from *A. donax* leaves and rhizomes collected in anthropic areas of the Federal District. For the allelopathy experimente, these extracts were diluted in different fractions for allelopathic testing in germination bioassays against target species, these two model species, *Lactuca sativa* and *Solanum lycopersicum*, one invasive grass, *Panicum maximum*, and one native species of the cerrado, *Handroanthus impetiginosus*. The material extracted with water and methanol of leaves and rhizomes was dried and used for testing with phytochemical focus. Thin layer chromatography (TLC), antioxidant and antimicrobial tests, a cytotoxicity assay, and nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrometry analyses were performed. The results obtained indicate that the aqueous and methanolic extracts of leaves and rhizomes were inhibitory of growth at the target species. The methanolic extracts were more inhibitory than the aqueous, while the leaf extracts were more inhibitory than rhizome extracts. Through the TLC we observed that phytochemical compounds such as alkaloids and flavonoids are mainly present in the leaves of *A. donax*, and have greater affinity with methanol than with water. However, the presence of these compounds does not translate into positive results in the antioxidant, antimicrobial and cytotoxicity assays. Through NMR and mass spectrometry, we indicate the presence of phytochemical compounds as alkaloids, but the large amount of material present in the samples prevented detailed analyses. The results obtained confirm the

allelopathy of this species, in a laboratory situation. We indicate that most of the active phytochemical compounds are present in the leaves, with less affinity with water than with methanol. Among these compounds, we observed the presence of alkaloids, flavonoids and other phenolic compounds. This result contributes to explain a relevant point in the biological invasion of *Arundo donax*, which assists in future actions of population control. However more studies are necessary to know the full extent of the phytochemical potential of *Arundo donax*.

KEYWORDS: *Arundo donax*, exotic species, biological invasion, allelopathy, allelopathic compound, phytochemistry, alkaloid, phytochemical potential.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Coleta de *Arundo donax* L. (Poaceae) em área urbana do Distrito Federal, no Campus da Universidade de Brasília ----- 17
- Figura2. Rizoma de *Arundo donax*. Imagem retirada de: <http://www.bamboocraft.net/bamboo/showphoto.php?photo=2809&size=big>. ----
----- 18
- Figura 3. Locais de coleta na cidade de Brasília, DF: (1) Instituto de Química, Campus da Universidade de Brasília, (2) trecho final da Via L3, Asa Norte, e (3) setor de embaixadas sul, Asa Sul. ----- 34
- Figura 4. Desenho experimental do bioensaio de germinação. Alface, tomate, capim-colonião e ipê-roxo foram as espécies alvo escolhidas. Elas foram regadas com cinco tratamentos diferentes, 10% (m/v), 5%, 2,5%, 1,25% e controle com água ultra pura. ----- 37
- Figura 5. Fórmula da porcentagem de inibição, onde XT é a média de alongamento das plântulas nos tratamentos e XC é a média do alongamento das plântulas controle. ----- 38
- Figura 6. Germinabilidade das espécies alvo tratadas com diferentes concentrações de extratos aquosos foliares de *Arundo donax*, mais o controle de água destilada. Alface (*Lactuca sativa*), tomate (*Solanum lycopersicum*), capim-colonião (*Megathyrsus maximus*), e ipê-roxo (*Handroanthus impetiginosus*). Resultado do teste de Tukey representado por letras acima das colunas, significando diferença significativa ($p>0,05$). ----- 39
- Figura 7. Germinabilidade das espécies alvo tratadas com diferentes concentrações de extratos aquosos de rizomas de *Arundo donax*, mais o controle de água destilada. Alface (*Lactuca sativa*), tomate (*Solanum lycopersicum*), capim-colonião (*Megathyrsus maximus*), e ipê-roxo (*Handroanthus impetiginosus*). Resultado do Teste de Tukey representado por letras acima das colunas, significando diferença significativa ($p>0,05$). ----- 40

Figura 8. Germinabilidade das espécies alvo tratadas com diferentes concentrações de extratos metanólicos de folhas, mais o controle de água destilada. Resultado do Teste de Tukey representado por letras acima das colunas, significando diferença significativa. ----- 42

Figura 9. Germinabilidade das espécies alvo tratadas com diferentes concentrações de extratos metanólicos de rizomas de *Arundo donax*, mais o controle de água destilada. Alface (*Lactuca sativa*), tomate (*Solanum lycopersicum*), capim-colonião (*Megathyrsus maximus*), e ipê-roxo (*Handroanthus impetiginosus*). Resultado do Teste de Tukey representado por letras acima das colunas, significando diferença significativa ($p>0,05$). ----- 42

Figura 10. Taxa de inibição da parte aérea das quatro espécies alvo em relação ao controle de água destilada, nos quatro tratamentos diferentes. Extrato aquoso de folhas (A) e Extrato aquoso de rizomas (B) de *Arundo donax*. Alface (*Lactuca sativa*), tomate (*Solanum lycopersicum*), capim-colonião (*Megathyrsus maximus*), e ipê-roxo (*Handroanthus impetiginosus*). Resultado do Teste de Tukey ($p>0,05$).representado por letras acima das colunas, significando diferença significativa. ----- 44

Figura 11. Taxa de inibição da parte radicular das quatro espécies alvo em relação ao controle de água destilada, nos quatro tratamentos diferentes. Extrato aquoso de folhas (A) e Extrato aquoso de rizomas (B) de *Arundo donax*. Alface (*Lactuca sativa*), tomate (*Solanum lycopersicum*), capim-colonião (*Megathyrsus maximus*), e ipê-roxo (*Handroanthus impetiginosus*). Resultado do Teste de Tukey ($p>0,05$) representado por letras acima das colunas, significando diferença significativa. ----- 45

Figura 12. Taxa de inibição da parte aérea das quatro espécies alvo em relação ao controle de água destilada, nos quatro tratamentos diferentes. Extrato metanólico de folhas (A) e Extrato metanólico de rizomas (B) de *Arundo donax*. Alface (*Lactuca sativa*), tomate (*Solanum lycopersicum*), capim-colonião (*Megathyrsus maximus*), e ipê-roxo (*Handroanthus impetiginosus*). Resultado do Teste de Tukey ($p>0,05$) representado por letras acima das colunas, significando diferença significativa. ----- 47

Figura 13. Taxa de inibição da parte radicular das quatro espécies alvo em relação ao controle de água destilada, nos quatro tratamentos diferentes. Extrato metanólico de folhas (A) e Extrato metanólico de rizomas (B) de *Arundo donax*. Alface (*Lactuca sativa*), tomate (*Solanum lycopersicum*), capim-colonião (*Megathyrsus maximus*), e ipê-roxo (*Handroanthus impetiginosus*). Resultado do Teste de Tukey ($p>0,05$) representado por letras acima das colunas, significando diferença significativa. ----- 49

Figura 14. mapa da área de coleta em Brasília, no campus da Universidade de Brasília, no Distrito Federal. ----- 56

Figura 15. Fotografias das placas cromatográficas com extratos metanólicos de folhas e rizoma nas condições de luz UV 265nm (A), luz UV 354 (B) e luz natural (C), respectivamente. Extratos brutos de folhas (1 e 3) e rizomas (2 e 4). ----- 62

Figura 16. Fotografias das placas cromatográficas com extratos metanólicos de folhas e rizoma nas condições de cloreto férrico (A); dragendorff (B); nppcg (C); anisoaldeído (D). Extratos metanólicos brutos de folhas (1) e rizomas (2). ----- 63

Figura 17. Fotografias das placas cromatográficas com extratos aquosos de folhas e rizomas nas condições de luz UV 265nm (A), luz UV 354 (B) e luz natural (C). Extratos brutos de folhas (1 e 3) e rizomas (2 e 4). ----- 63

Figura 18. Fotografias das placas cromatográficas com extratos metanólicos de folhas e rizoma nas condições de cloreto férrico (A); dragendorff (B); nppcg (C); anisoaldeído (D). Extratos metanólicos brutos de folhas (1) e rizomas (2). ----- 63

Figura 19. Resultados do teste antimicrobiano com diferentes diluições do extrato aquoso de folhas. **** representam diferentes níveis de significância. ---
----- 68

Figura 20. Resultados do teste antimicrobiano com diferentes diluições do extrato aquoso de rizoma. **** representam diferentes níveis de significância. ---
----- 69

Figura 21. Resultados do teste antimicrobiano com diferentes diluições do extrato metanólico de folhas. **** representam diferentes níveis de significância.
----- 71

Figura 22. Resultados do teste antimicrobiano com diferentes diluições do extrato metanólico de folhas. **** representam diferentes níveis de significância. -----	73
Figura 23. Espectro de RMN de 1H para o extrato aquoso bruto de folhas de <i>Arundo donax</i> . -----	75
Figura 24. Espectro de RMN de 1H para o extrato metanólico bruto de folhas de <i>Arundo donax</i> . -----	75
Figura 25. Espectro de RMN de 1H para o extrato aquoso bruto de rizomas de <i>Arundo donax</i> . -----	76
Figura 26. Espectro de RMN de 1H para o extrato metanólico bruto de rizomas de <i>Arundo donax</i> . -----	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados dos testes antioxidantes com os métodos DPPH e Fe ³⁺ . Equiv = mg de extrato/ mg de ácido ascórbico. -----	65
Tabela 2. Citotoxicidade dos extratos de arundo donax expresso em porcentagem de larvas vivas de <i>A. salina</i> após o tratamento. -----	66
Tabela 3. Compostos encontrados por espectrometria de massa, com o método ESI+ nos quatro extratos analisados. Compostos marcados com * estão presentes em mais de um extrato. -----	78
Tabela 4. Compostos encontrados por espectrometria de massa, com o método ESI- nos quatro extratos analisados. Compostos marcados com * estão presentes em mais de um extrato. -----	78

ÍNDICE

1.1 INTRODUÇÃO GERAL	16
1.2 HIPÓTESES	24
1.3 OBJETIVOS	24
1.2.1 OBJETIVO GERAL	24
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
CAPÍTULO 1 – ALELOPATIA	32
2.1 INTRODUÇÃO	32
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	34
2.2.1 COLETA	34
2.2.2 EXTRATO AQUOSO	35
2.2.3 EXTRATO METANÓLICO	35
2.2.4 BIOENSAIO COM EXTRATO AQUOSO	36
2.2.5 BIOENSAIO COM EXTRATO METANÓLICO	38
2.2.6 ANÁLISE DE DADOS	38
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
2.3.1.1 GERMINABILIDADE COM EXTRATOS AQUOSOS	39
2.3.1.2 GERMINABILIDADE COM EXTRATOS METANÓLICOS	41
2.3.2.1 BIOENSAIO COM EXTRATO AQUOSO	43
2.3.2.2 BIOENSAIO COM EXTRATO METANÓLICO	47
2.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
CAPÍTULO 2 – FITOQUÍMICA	55

3.1 INTRODUÇÃO	55
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	56
3.2.1 COLETA	56
3.2.2 PREPARO DO MATERIAL PARA ANÁLISE	57
3.2.3 PRODUÇÃO E PROCESSAMENTO DE EXTRATOS	57
3.2.4 CROMATOGRADIA DE CAMADA DELGADA (CCDC)	58
3.2.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	58
3.2.6 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM <i>ARMEMIA SALINA</i>	59
3.2.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	59
3.2.8 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) E ESPECTROMETRIA DE MASSA	61
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
3.3.1 CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA	62
3.3.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	65
3.3.3 <i>ARTEMIA SALINA</i>	66
3.3.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	67
3.3.5 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) E ESPECTROMETRIA DE MASSA	74
3.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	83

1.1 INTRODUÇÃO GERAL

Espécies exóticas afetam significativamente o ambiente durante o processo de invasão. Na maioria dos casos, as populações de plantas e animais nativas são atingidas negativamente, com redução no número de indivíduos e comunidades (PYSEK *et al.* 2012).

Uma espécie exótica, ao ser introduzida em determinada área, pode alterar o balanço das interações entre as espécies nativas e a microbiota do solo. Diferentes espécies interagem diferentemente com os microrganismos, gerando microbiotas únicas para aquele ambiente (BEVER *et al.* 1996). Este é um dos pontos mais relevantes para uma invasão biológica, considerando que alterações na microbiota podem afetar todo um ecossistema (WOLFE e KLIRONOMOS, 2005).

As gramíneas (Poaceae) são um grupo relevante em processos de invasão biológica. Espécies deste grupo são conhecidas por serem frequentes invasoras de ecossistemas, com casos observados em todos os continentes (D'ANTONIO e VITOUSEK, 1992). Em geral são espécies com uso eficiente de água (EISSENSTAT, 1986) e elevada taxa de crescimento (THOMPSON e HARPER, 1988), sendo, portanto, ótimas competidoras. Deste modo as gramíneas podem abalar todo um ecossistema, resultando em perda de diversidade da flora e da fauna (D'ANTONIO e VITOUSEK, 1992).

Outro agravante a ser levado em consideração nos ecossistemas secos e sujeitos ao fogo, como no caso do Cerrado, é que a presença de gramíneas invasoras pode aumentar a frequência de queimadas na região (BROOKS *et al.*, 2004). Estas espécies servem de combustível, queimando e espalhando o fogo mais rapidamente do que a madeira. Porém, as gramíneas possuem menor investimento na parte aérea, possibilitando uma recuperação mais rápida, o que facilita a colonização desses ambientes (D'ANTONIO e VITOUSEK, 1992).

Arundo donax (Figura 1) é uma espécie herbácea perene da família Poaceae, primeiro descrita por Carl von Linnaeus em 1753. Conhecida popularmente como cana-do-reino, essa espécie cresce até oito metros de

altura, com caule oco de poucos centímetros de diâmetro. Suas folhas são alternadas, com comprimento de até sessenta centímetros (PERDUE, 1958). Seu rizoma é vasto (Figura 2), penetrando até um metro no solo e formando uma extensa rede (ALDEN *et al*, 1998).



Figura 1. Coleta de *Arundo donax* L. (Poaceae) em área urbana do Distrito Federal, no Campus da Universidade de Brasília

O sucesso reprodutivo desta espécie se dá por sua rápida reprodução vegetativa (MARIANI *et al*, 2010), através do rizoma ou da fragmentação do

caule. Apesar desta forma de reprodução vegetativa acarretar baixa variabilidade genética, populações de *A. donax* apresentam variação fenotípica significativa (KHUDAMRONGSUWAT *et al*, 2004).



Figura 2. Rizoma de Arundo donax. Imagem retirada de: <http://www.bamboocraft.net/bamboo/showphoto.php?photo=2809&size=big>.

A reprodução majoritariamente vegetativa desta espécie, com grande dificuldade para a produção de gametas viáveis, pode ter sido determinada pelo abandono da diploidia (MARIANI *et al*. 2010). Variações de ploidia ocorrem com frequência em angiospermas (LES e PHILBUCK, 1993). Variações estas que podem dar origem a linhagens não diploides (SHARBEL e MITCHEL-OLDS, 2001). Ainda existe certo conflito quanto ao número de cromossomos de *A. donax*, com estudos mais recentes concluindo que este número chega a cento e dez (BUCCI *et al*, 2013).

Arundo donax possui elevada produtividade de biomassa lenho celulósica (CEOTTO e DI CANDILO, 2010). Em condição de água em abundância esta espécie pode produzir cerca de 0,189 g/dia (SPENCER, 2006), e crescer em altura até 6,25 cm/dia (RIEGER e KRAEGER, 1989). Isto torna esta espécie uma

boa candidata para programas de crédito de carbono (WILLIAMS *et al.* 2009) ou para a produção de papel (SHATALOV e PEREIRA, 2002). Quando irrigado apenas com água poluída, com alta concentração salina, *A. donax* manteve sua elevada produtividade, bem como removeu diversos elementos químicos da água (WILLIAMS, 2009). Deste modo é possível que *A. donax* possa agir como uma espécie interceptadora de certos poluentes.

Análises filogenéticas indicam que esta espécie é nativa do sudeste da Ásia e do Mediterrâneo (DUDLEY *et al.*, 2008; MARIANI *et al.*, 2010). *Arundo donax* foi disseminada durante milhares de anos através do seu cultivo por toda a Ásia, pelo sul da Europa, no norte da África, e mais recentemente, nas Américas e na Austrália (BELL, 1997). A espécie normalmente não produz sementes (WILLIAMS *et al.*, 2009; MARIANI *et al.*, 2010). Isto ocorre devido à problemas durante a megasporogênese e microsporogênese (MARIANI *et al.*, 2010; BOLOGH *et al.*, 2012). Durante ambos os processos há degeneração e colapso celular, resultando na não produção de óvulos e grãos de pólen viáveis.

A introdução de *A. donax* em novos ambientes trouxe impacto sobre as populações nativas em vários locais no mundo. Nos Estados Unidos, *A. donax* é considerada uma espécie invasora muito relevante, principalmente na Flórida e na Califórnia, onde populações ripárias estão sendo abaladas pela forte competição apresentada pela espécie (DUDLEY, 2000). Os fragmentos de rizomas e caules são facilmente transportados por cursos de água junto dos quais esta espécie geralmente se encontra (BOOSE e HOLT, 1999), facilitando sua dispersão. Análises moleculares indicam que todos os indivíduos dispersos nesses estados possuem baixa variação genética (AHMAD *et al.* 2008).

Atualmente no Brasil temos diversas gramíneas invasoras. No Parque Nacional de Brasília, área protegida, foram observadas mais de vinte gramíneas invasoras (MARTINS *et al.* 2007), com aumento de 133% nos oito anos analisados por este levantamento. *Arundo donax* foi identificado dentro do Parque, mas está bem distribuído por todo o estado, principalmente em áreas antropizadas (SIMÕES *et al.*, 2013). Estima-se que a prática do governo do estado de roçagem mecânica favorece a disseminação desta espécie, devido ao seu método de reprodução.

Um fenômeno importante no sucesso de invasões biológicas é alelopatia. Descrita como a produção de biomoléculas, principalmente compostos secundários, por parte de um indivíduo, que induzem efeitos positivos ou negativos em um segundo indivíduo (RIZVI e RISVI, 1992). Esse fenômeno pode alterar o balanço da competição com as espécies nativas (RIDENOUR e CALLAWAY, 2001), ou ainda agir como inibidora contra patógenos do solo (ZHANG *et al*, 2009).

Diversas plantas têm sido estudadas com enfoque alelopático, como o jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stagnocarpa* Mart.), característica do cerrado brasileiro. Nesta espécie foram encontrados aleloquímicos em suas folhas e frutos que podem permanecer ativos no solo por até noventa dias (OLIVERIA *et al*, 2002). Do mesmo modo, em doze espécies diferentes da família Myrtaceae ocorrentes no cerrado foi evidenciada atividade alelopática contra espécies alvo modelo (IMATOMI, 2010).

Pelo fato da interação entre plantas poder ocorrer de forma negativa, a alelopatia tem sido aproveitada para o controle de espécies indesejadas (SINGH *et al*, 2003). Isso é possível através da utilização direta da relação alelopática entre duas espécies, com plantio de espécies com efeito alelopático próximas à uma área de cultivo, para impedir o avanço da vegetação. Outro método é a aplicação direta de aleloquímicos como herbicidas, após a extração, identificação e produção em larga escala de um destes compostos.

Compostos alelopáticos se inserem no ambiente por uma variedade de vias diferentes, como a lixiviação e decomposição da serrapilheira (AHMED *et al*, 2008), liberação de exsudados para o solo através das raízes (ZHANG *et al*, 2010), ou através da lixiviação das estruturas da planta (IMATOMI, 2010).

Aleloquímicos possuem diversos mecanismos de ação diferentes. Um dos principais mecanismos é a inibição da fotossíntese através do fotossistema II (WEIR *et al*, 2004). Outras formas de ação incluem a inibição da respiração através de ligações de aleloquímicos com as membranas das mitocôndrias (ABRAHIM *et al*, 2003) ou com enzimas relacionadas à respiração (MUSCOLO *et al*, 2001), e o acúmulo de radicais livres através da interação de aleloquímicos com enzimas redutoras da planta (YU *et al*, 2003).

Exsudados da raiz podem ter impactos significativos em um ambiente de forma indireta. A liberação destes aleloquímicos na rizosfera pode afetar diretamente a microbiota local ou alterar a composição química do solo (BERTIN *et al*, 2003). De maneira contrária, bactérias podem também degradar compostos alelopáticos e impedir sua ação (HAUSER, 1993).

Alelopatia não necessariamente ocorre apenas entre duas espécies vegetais. Microorganismos podem muitas vezes agir como alvo ou como mediadores de compostos alelopáticos (CIPOLLINI *et al*, 2012). Algumas espécies podem estimular a proliferação de fungos e a formação de micorrizas, enquanto outras possuem efeito contrario, o que pode levar a vantagens competitivas (SCHREINER e KOIDE, 1993).

Compostos ativos para alelopatia, se inserem em um grande grupo de moléculas ativas produzidas por plantas chamado fitoquímicos. Estas moléculas possuem função de defesa contra herbivoria, estresse hídrico, radiação UV e ataque de patógenos, além de influenciar na coloração, gosto e cheiro da planta (SAXENA *et al*, 2013).

O estudo das fitomoléculas, a fitoquímica, almeja isolar e identificar compostos para elucidar suas interações bioquímicas. Dentre diversas classes de fitomoléculas podemos citar as mais relevantes como os alcaloides, os fenóis e os terpenoides.

Alcalóides são moléculas nitrogenadas presentes em uma grande variedade de organismos, com função de defesa contra predação (KOCHANOWSKA-KARAMYAN e HAMANN, 2010). Geralmente moléculas extremamente ativas, alcaloides são produzidos por cerca de um quinto das espécies de angiospermas (WINK, 1998). Cafeína (BARANSKA e PRONIEWICZ, 2008) e cocaína (JOHNSON e ELSOHL, 1991) são dois exemplos de alcaloides conhecidos. Diversas espécies nativas do cerrado produzem alcaloides (SILVA *et al*, 2010; GODINHO *et al*, 2015).

Devido à tendência dos alcaloides de serem fitoquímicos muito ativos, estes compostos possuem destaque na alelopatia. Estudos que avaliaram a germinação e o crescimento de alface (*Lactuca sativa*) mostraram a inibição desses processos por ação de alcaloides isolados de *Lupinus mutabilis*, *Lupinus*

polyphyllus e *Fagopyrum esculatum* (WINK, 1983; IQBAL *et al*, 2006). Do mesmo modo, a proliferação de bactérias foi inibida por ação de alcaloides isolados de *Lupinus augustifolius* (TYSKI *et al*, 1988).

Além do importante papel desempenhado nas interações entre plantas e ação sobre microrganismos, os alcaloides mostram também fortes efeitos em animais. Em nível celular podem bloquear os canais iônicos, inibir enzimas e atuar sobre neurotransmissores (TIWARI e RANA, 2015) elevando a relevância desses compostos vegetais para estudos nas áreas de farmácia e medicina.

Foi observada ampla atividade fitotóxica em alcaloides indólicos, e reportada atividade bactericida e fungicida em testes *in vitro*, citotoxicidade contra células cancerígenas e células sexuais, e inibição no desenvolvimento de embriões (KOCHANOWSKA-KARAMYAN e HAMANN, 2010; DOAN *et al*, 2000). Há similaridade na estrutura química de alcaloides indólicos e neurotransmissores (KOCHANOWSKA-KARAMYAN e HAMANN, 2010), o que leva certas moléculas deste grupo a possuírem atividade neurológica. Algumas moléculas apresentam ambas as atividades, como a 5,6-dibromo-3-(2methylaminoethyl)índole que apresenta atividade fitotóxica contra bactérias, mas pode também agir como inibidora neural.

A classe dos fenóis consiste em moléculas que possuem um grupo hidroxila ligado diretamente a um anel aromático. Esta classe é dividida em três grandes grupos: os flavonoides, os ácidos fenólicos e os polifenóis, ou taninos. Com função de defesa contra patógenos e predadores, estes fitoquímicos também contribuem para algumas características em frutos, como coloração e cheiro (BALASUNDRAM *et al*, 2006).

Flavonoides são um grupo que recebe bastante atenção dentro dos compostos fenólicos pela série de propriedades conhecidas, como fitotoxicidade, citotoxicidade, ação anti-inflamatória e anti-tumoral (SAXENA *et al*. 2013; GALEOTTI *et al*. 2008). Porém, flavonoides são ainda mais reconhecidos por sua forte capacidade antioxidante (ROBAK e GRYGLEWSKI, 1987; VAN ACKER, 1996).

Este grupo de moléculas pode causar efeito alelopático sobre o sistema radicular de espécies próximas, bem como inibir ou estimular o crescimento de

microorganismos da rizosfera (HASSAN e MATHESIUS, 2012). Catequina, um flavonoide produzido por *Centaurea maculosa* possui efeito alelopático sobre o sistema radicular de outras espécies (BAIS *et al*, 2003).

Terpenoides são uma classe de compostos químicos presentes em uma grande variedade de organismos. Estes lipídeos são visados comercialmente pelas suas propriedades no gosto e no cheiro de produtos vegetais (SAXENA *et al*, 2013). Porém, alguns terpenos também podem possuir atividade fitotóxica (MULLER, 1965) ou antioxidativa (NG *et al*, 1999).

Tagetes minuta L., da família Asteraceae, produz terpenoides que causam inibição de espécies que habitam seu ecossistema (LÓPEZ *et al*, 2009). Terpenos produzidos por macroalgas inibiram a fotossíntese e causaram a morte de espécies de corais ameaçados (RASHER *et al*, 2011).

Considerando então a capacidade invasora de *Arundo donax* L. e o impacto que esta espécie pode ter no cerrado, poderemos ter uma compreensão maior sobre o processo de invasão desta espécie ao estudarmos seu potencial alelopático e sua fitoquímica de forma complementar. Estas informações podem, no futuro, levar a melhores estratégias de controle biológico, ou à produção em maior escala de substâncias de interesse provenientes desta espécie.

1.2 HIPÓTESES

1. Folhas e rizomas de *Arundo donax* possuem compostos alelopáticos que alteram o balanço da competição a favor desta espécie e, conseqüentemente, favorece sua propagação em áreas do Distrito Federal, atuando mesmo sobre outras espécies invasoras.
2. Os compostos fitoquímicos ativos de *A. donax* estão presentes principalmente nas folhas, em relação ao rizoma.

1.3 OBJETIVOS

1.5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a presença de compostos fitotóxicos em folhas e rizomas de *A. donax* e analisar de forma comparativa, com foco fitoquímico, o espectro de compostos químicos destes dois órgãos.

1.5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Testar através de bioensaios extratos de folhas e rizomas de *A. donax* para possível atividade alelopática contra espécies alvo específicas: *Lactuca sativa* e *Solanum lycopersicum*, duas espécies modelo; *Panicum maximum*, espécie de capim invasor; *Handroanthus impetiginosus*, espécie nativa comumente encontrada em áreas de cerrado antropizado no DF.

Analisar o espectro de compostos presentes nas folhas e nos rizomas de *Arundo donax* por meio de testes com foco fitoquímico.

1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHIM, D. TAKAHASHI, L. KELMER-BRACHT, A. ISHII-IWAMOTTO, E. Effects of Phenolic Acids and Monoterpenes on the Mitochondrial Respiration of Soybean Hypocotyls Axes. *Allelopathy Journal*. V. 11. Pp 21-20. 2003.

AHMAD, D. LIOW, P. SPENCER, D. JASIENIUK, M. Molecular evidence for a single genetic clone of invasive *Arundo donax* in the United States. *Aquatic Botany*. V. 88. Pp 113-120. 2008.

AHMED, R. HOQUE, R. HOSSAIN, M. Allelopathic Effect of Leaf Litters of *Eucalyptus camaldulensis* on some Forest and Agricultural Crops. *Journal of Forestry Research*. V. 19, 1. Pp 19-24. 2008.

ALDEN, P. HEATH, A. LEVENTER, R. KEEN, W. ZOMFLER, E. National Audubon Society Field Guide to California. Knopf, Nova Iorque. 1998.

BAIS, H. VEPACHEDU, R. GILROY, S. CALLAWAY, R. VIVANCO, J. Allelopathy and Exotic Plant Invasion: from Molecules and Genes to Species Interactions. *Science*. V. 301. Pp 1377-1380. 2003.

BALASUNDRAM, N. SUNDRAM, K. SAMMAM, S. Phenolic Compounds in Plants and Agri-industrial By-products: Antioxidant Activity, Occurance, and Potential Uses. *Food Chemistry*. V. 99. Pp 191-203. 2006.

BARANSKA, M. PRONIEWICZ, L. Raman Mapping of Caffeine Alkaloid. *Vibrational Spectrometry*. V. 48, 1. Pp 153-157. 2008.

BELL, G.P. Ecology and management of *Arundo donax*, and approaches to riparian habitat restoration in southern California. *Plant Invasions: Studies from North America and Europe*. Backhuys Publishers, Leiden, Países Baixos. Pp. 103-113. 1997.

BERTIN, C. YANG, X. WESTON, L. The Role of Root Exudates and Allelochemicals in the Rhizosphere. *Plant and Soil*. V. 1. Pp 67-83. 2003.

- BEVER, J. MORTON, J. ANTONOVICS, J. SCHULTZ, P. Host-dependant sporulation and species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a mown grassland. *Journal of Ecology*. V. 84,1. Pp 71-82. 1996.
- BOLOGH, E. HERR, J. CZAKÓ, M. MÁRTON, L. Defective development of male and female gametophytes in *Arundo donax* L. (POACEAE). *Biomass and Bioenergy*. V. 45. Pp 265-269. 2012.
- BOOSE, A. HOLT, J. Environmental Effects on Asexual Reproduction in *Arundo donax*. *Weed Research*. V. 39, 2. Pp 117-127. 1999.
- BROOKS, M. D'ANTONIO, C. RICHARDSON, D. GRACE, J. KEELEY, J. DITOMASO, J. HOBBS, R. PELLANT, M. PYKE, D. Effects of Invasive Alien Plants on Fire Regimes. *Bioscience*. V. 54, 7. Pp 677-688. 2004.
- BUCCI, CASSANI, E. LANDONI, M. CANTALUPPI, E. PILU, R. Analysis of chromosome number and speculations on the origin of *Arundo donax* L. (Giant Reed). *Cytology and Genetics*. V. 47, 4. Pp 237-241. 2013.
- CEOTTO, E. DI CANDILO, M. Shoot cuttings propagation of giant reed (*Arundo donax* L.) in water and moist soil: The path forward? *Biomass and Bioenergy*. V. 34, 11. Pp 1614-1623. 2010.
- CIPOLLINI, D. RIGSBY, C. BARTO, K. Microbes as Targets and Mediators of Allelopathy in Plants. *Journal of Chemical Ecology*. V. 38, 6. Pp 714-727. 2012.
- D'ANTONIO, C. VITOUSEK, P. Biological invasion by exotic grasses, the grass/fire cycle, and global change. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*. V. 22. Pp 63-87. 1992.
- DOAN, N. RICKARDS, R. ROTHSCHILD, J. SMITH, G. Allelopathic Actions of the Alkaloid 12-epi-hepalindole e isonitrile and Calothrixin A from Cyanobacteria of the Genera *Fischerella* and *Calothrix*. *Journal of Applied Phycology*. V. 12. Pp 409-416. 2000.
- DUDLEY, T.L. *Invasive Plants of California's Wildlands*. University of California Press. Berkeley, California. Pp 53-58. 2000.
- DUDLEY, T.L. LAMBERT, A.M. KIRK, A. TAMAGAWA, Y. Herbivores associated with *Arundo donax* in California. *Proceedings of the XII International Symposium*

on Biological Control of Weeds. Wallingford, Reino Unido. CAB international. Pp. 146-152. 2008.

EISSENSTAT, D. Belowground resource exploitation in semi-arid plants. A comparative study using two tussock grass species that differ in competitive ability. University of Utah. Tese de doutorado, 1982.

GALEOTTI, F. BARILE, E. CURIR, P. DOLCI, M. LANZOTTI, V. Flavonoids from Carnation (*Dianthus caryophyllus*) and their Antifungal Activity. Phytochemistry Letters. V. 1. Pp 44-48. 2008.

GODINHO, C. SILVA, C. MENDES, C. FERREIRA, P. OLIVERIA, D. Estudo Fitoquímico de Espécies Arbóreas do Cerrado. Revista Multitexto. V. 3, 1. Pp 64-70. 2015.

HASSAN, S. MATHESIUS, U. The Role of Flavonoids in Root-Rhizosphere Signalling: Opportunities and Challenges for Improving Plant-Microbe Interactions. Journal of Experimental Botany. V. 63, 9. Pp 3429-3444. 2012.

HAUSER, S. Effect of *Acioa barteri*, *Cassia siamea*, *Flemingia macrophylla* and *Gmelina arborea* leaves on Germination and Early Development of Maize and Cassava. Agriculture, Ecosystems and Environment. V. 45. Pp 263-273. 1993.

IQBAL, Z. HIRADATE, S. NODA, A. ISOJIMA, S. FUJII, Y. Allelopathy of Buckwheat: Assessment of Allelopathic Potential of Extract of Aerial Parts of Buckwheat and Identification of Fagomine and Other Related Alkaloids as Allelochemicals. Weed Biology and Management. V. 2, 2. Pp 110-115. 2006.

IMATOMI, M. Estudo Alelopático de Espécies da Família Myrtaceae do Cerrado. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos. 2010.

JOHNSON, E. ELSOHLY, M. Content and *De Novo* Synthesis of Cocaine in Embryos and Endosperms from Fruit of *Erythroxylum coca* Lam. Annals of Botany. V. 68, 5. Pp 451-453. 1991.

KHUDAMRONGSUWAT, J. TAYYAR, R. HOLT, J. Genetic diversity of giant reed (*Arundo donax*) in the Santa Ana River, California. Weed Science. V. 52, 3. Pp. 395-405. 2004

- KOCHANOWSKA-KARAMYAN, A. HAMANN, M. Marine indole alkaloids: potential new drug leads for the control of depression and anxiety. *Chemical Reviews*. V. 110, 8. Pp 4489-4497. 2010.
- LES, D. PHILBRICK, C. Studies of hybridization and chromosome number variation in aquatic angiosperms: evolutionary implications. *Aquatic Botany*. V. 44. Pp 181-228. 1993.
- LÓPEZ, M. BONZANI, N. ZYGLADO, J. Allelopathic Potential of *Tagetes minuta* terpenes by a Chemical, Anatomical and Phytotoxic Approach. *Biochemical Systematics and Ecology*. V. 36. Pp 882-890. 2009.
- MARIANI, C. CABRINI, R. DANIN, A. PIFFANELLI, P. FRICANO, A. GOMARASCA, S. DICANDILO, M. GRASSI, F. SOAVE, C. Origin, diffusion and reproduction of the giant reed (*Arundo donax* L.): a promising weedy energy crop. *Annals of Applied Biology*. V. 157, 2. Pp 191-202. 2010.
- MARTINS, C. HAY, J. VALLS, J. LEITE, L. HENRIQUES, R. Levantamento das gramíneas exóticas do Parque Nacional de Brasília, Distrito Federal, Brasil. *Natureza e Conservação*. V. 5, 3. Pp 23-30. 2007.
- MULLER, C. Inhibitory Terpenoids Volatized from *Salvia* Shrubs. *Bulletin of the Torrey Botanical Group*. V. 92, 1. Pp 38-45. 1965.
- MUSCOLO, A. PANUCCIO, M. SIDARI, M. The Effect of Phenols on Respiratory Enzymes in Seed Germination. *Plant Growth Regulation*. V. 25, 1. Pp 31-35. 2001.
- NG, T. LIU, F. WANG, Z. Antioxidative Activity of Natural Products from Plants. *Life Sciences*. V. 66, 8. Pp 709-723. 1999.
- OLIVERIA, M. MERCADANTE, M. LOPES, P. GOMES, I. GUSMÃO, E. RIBEIRO, L. Efeitos Alelopáticos dos Extratos Aquoso e Etanólico de Jatobá do Cerrado. *Unimontes Científica*. V. 4, 2. 2002.
- PERDUE, R. *Arundo donax*: Source of Musical Reeds and Industrial cellulose. *Economic Botany*. V. 12, 4. Pp 368-404. 1958.
- PYSEK, P. JAROSÍK, V. HULME, P. PERGI, J. HEJDA, M. SCHAFFNER, U. VILÁ, M. A Global Assessment of Invasive Plant Impacts on Resident Species,

Communities and Ecosystems: The Interaction of Impact Measures, Invading Species Traits and Environment. *Global Change Biology*. V. 18, 5. Pp 1725-1737. 2012.

RASHER, D. STOUT, P. ENGEL, S. KUBANEK, J. HAY, M. Macroalgal Terpenes Function as Allelopathic Agents Against Reef Corals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. V. 108, 43. Pp 17726-17731. 2011.

RIDENOUR, W. CALLAWAY, R. The relative importance of allelopathy in interference: the effects of an invasive weed in native bunchgrass. *Oecologia*. V. 126, 3. Pp 444-450. 2009.

RIEGER, J. KREAGER, A. Giant Reed (*Arundo donax*): a climax community of the riparian zone. *Proceedings of the Californian Riparian Systems Conference: Protection, Management, and Restoration for the 1990s*. Pp 222-225. 1989.

RIZVI, S. RISVI, V. Capítulo 1: A discipline called allelopathy. In: _____ (Ed.), *S. Allelopathy: basic and applied aspects*. London, Chapman and Hall. 1992.

ROBAK, J. GRYGLEWSKI, R. Flavonoids are Scavengers of Superoxide Anions. *Biochemical Pharmacology*. V. 37, 5. Pp 837-841. 1987.

SAXENA, M. SAXENA, J. NEMA, R. SINGH, D. GUPTA, A. Phytochemistry of Medicinal Plants. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. V. 1, 6. Pp 168-182. 2013.

SCHREINER, R. KOIDE, R. Mustards, Mustard Oils and Mycorrhizas. *New Phytologist*. V. 123. Pp107-113. 1993.

SHARBEL, T. MITCHEL-OLDS, T. Recurrent polyploid origins and chloroplast phylogeography in the *Arabis holboellii* complex (Brassicaceae). *Heredity*. V. 87. Pp 59-68. 2001.

SHATALOV, A. PEREIRA, H. Influence of stem morphology on pulp and paper properties of *Arundo donax* L. reed. *Industrial Crops and Products*. V. 15. Pp 77-83. 2002.

- SILVA, N. MIRANDA, F. CONCEIÇÃO. G. Triagem Fitoquímica de Plantas do Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. *Scientia Plena*. V. 6, 2. 2010.
- SINGH, H. BATISH, D. KOHLI, R. Allelopathic Interactions and Allelochemicals: New Possibilities for Sustainable Weed Management. *Critical Reviews in Plant Sciences*. V. 22, 3-4. Pp 239-311. 2003.
- SIMÕES, K. HAY, J. ANDRADE, C. JÚNIOR, O. GOMES, R. Distribuição de Cana-do-Reino (*Arundo donax* L.) no Distrito Federal, Brasil. *Biodiversidade Brasileira*. V. 3, 2. Pp 97-105. 2013.
- SPENCER, D. LIOW, P. CHAN, W. KSANDER, G. GETSINGER, K. Estimating *Arundo donax* biomass. *Aquatic Botany*. V. 84. Pp 272-276. 2006.
- THOMPSON, L. HARPER, J. The effect of grasses on the quality of transmitted radiation and its influence on the growth of the white clover *Trifolium repens*. *Oecologia*. V. 75. Pp 343-342. 1988.
- TIWARI, R. RANA, C. Plant Secondary Metabolites: a Review. *International Journal of Engineering research and General Science*. V. 3, 5. 2015.
- TYSKI, S. MARKIEWICZ, M. GULEWICZ, K. TWARDOSKI, T. The effect of Lupin Alkaloids and Ethanol Extracts from Seeds of *Lupinus augustifolius* on Selected Bacterial Strains. *Journal of Plant Physiology*. V. 133, 2. Pp 240-242. 1988.
- VAN ACKER, S. VAN DER BERG, D. TROMP, M. GRIFFIOEN, D. VAN BENNEKOM, W. VAN DER VIJGH, W. BAST, A. Structural Aspects of Antioxidant Activity of Flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*. V. 20, 3. 1996.
- WILLIAMS, C. BISWAS, T. BLACK, I. MARTON, L. CZAKO, M. HARRIS, P. POLLOCK, R. HEADING, S. VIRTUE, J. Use of poor quality water to produce high biomass yields of giant reed (*Arundo donax* L.) on marginal lands for biofuel or pulp/paper. *Acta Hort.* V. 806. Pp 595-602. 2009.
- WINK, M. Inhibition of Seed Germination by Quinolizidine Alkaloids. *Planta*. V. 158. Pp 365-368. 1983.

WINK, M. Chemical Ecology of Alkaloids. In: Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications. Plenum Press. Nova Iorque. 1998.

WEIR, T. PARK, S. VIVANCO, J. Biochemical and Physiological Mechanisms Mediated by Allelochemicals. Current Opinion on Plant Biology. V. 7, 4. Pp 472-479. 2004.

WOLFE, B. KLIRONOMOS, J. Breaking new ground: soil communities and exotic plant invasion. BioScience. V. 55,6. Pp 477-487. 2005.

YU, J. YE, S. ZHANG, M. HU, W. Effects of Root Exsudates and Aqueous Root Extracts of Cucumber (*Cucumis sativus*), and Allelochemicals on Photosynthesis and Antioxidant Enzymes in Cucumber. Biochemical Systematics and Ecology. V. 31. Pp 129-139. 2003.

ZHANG, S. JIN, Y. TANG, J. CHEN, X. The invasive plant *Solidago canadenses* L. suppresses local soil pathogens through allelopathy. Applied Soil Ecology. V. 41, 2. Pp 215-222. 2009.

ZHANG, Y. GU, M. SHI, K. ZHOU, Y. YU, J. Effects of Aqueous Root Extracts and Hydrophobic Root Exsudates of Cucumber (*Cucumis sativus* L.) on Nuclei DNA Content and Expression of Cell Cycle-related Genes in Cucumber Radicles. Plant Soil. V. 327. Pp 455-463. 2010.

CAPÍTULO 1. EFEITO ALELOPATICO DE PLANTAS DE *ARUNDO DONAX*

2.1 INTRODUÇÃO

Arundo donax L. (Poaceae), conhecida como cana-do-reino, é uma espécie exótica invasora, cuja propagação e estabelecimento em um novo ambiente podem ameaçar a diversidade e a manutenção de espécies nativas.

Alelopatia, descrita como a produção de moléculas, majoritariamente compostos secundários, por parte de um indivíduo, que induzem efeitos positivos ou negativos em um segundo indivíduo (RIZVI e RISVI, 1992), pode ser um fator relevante na invasão de *A. donax*. Esta espécie já possui potencial alelopático documentado (HONG *et al.* 2010; HONG *et al.* 2011; ABU-ROMMAN e AMMARI, 2015), mas pouco explorado quanto ao aspecto fitoquímico.

O tecido vegetal mais utilizado em ensaios de alelopatia são as folhas (REIGOSA *et al.*, 2013). O extrato aquoso bruto de folhas de *A. donax* se mostrou inibidor da germinação e do crescimento de plântulas de lentilha (*Lens culinaris* Medik., espécie modelo para testes alelopáticos) (ABU-ROMMAN e AMMARI, 2015), experimento inicial, realizado apenas com uma única espécie alvo. Algumas atividades biológicas têm sido estudadas utilizando extratos dessa planta, como o extrato metanólico foliar, que causou efeito inibitório na proliferação de *Microcystis aeruginosa*, cianobactéria responsável por contaminação de água em reservatórios (HONG *et al.* 2010).

Foram isolados alcaloides da parte subterrânea de *A. donax* (KHUZAEV *et al.*, 2004 B; KHUZAEV *et al.*, 2004 C), mas não há estudos sobre o rizoma de *A. donax* focados em testes fitotóxicos, embora estudos com rizomas de outras espécies comprovem o potencial alelopático desta estrutura (RIGANO *et al.*, 2006; VRCHOTOVÁ e SERÁ, 2008). O extrato aquoso do rizoma de *Cynodon dactylon* L., uma gramínea, inibiu quase totalmente a germinação e o crescimento de sementes de diversas outras espécies (MAHMOODZADEH,

2014). Similarmente, o extrato do rizoma de *Solidago canadenses*, outra gramínea, inibiu a germinação e o crescimento de sementes de várias famílias de plantas (MEI *et al*, 2005).

Foi observada variação na composição química de *A. donax* entre estruturas (NETO *et al*. 1996). Caule e folhas possuem concentrações diferentes de certos compostos, como a lignina, mais presente no caule, enquanto as folhas apresentam maior concentração de proteínas. Partes mais maduras desta espécie apresentaram maior presença de ácido urônico e outros carboidratos. Desta forma é de se esperar que compostos alelopáticos de folhas e de rizomas, caso sejam produzidos, sejam diferentes, o que implica em atividade alelopática diferente entre estas duas estruturas.

O presente trabalho tem o objetivo de avaliar o potencial alelopático de extratos aquosos e metanólicos rizomas e folhas de *A. donax*, a fim de contribuir para aumentar o conhecimento sobre essa espécie que tem colonizado com sucesso áreas urbanas e de Cerrado antropizado no Distrito Federal.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 COLETA

Amostras de folhas e rizomas frescos foram coletadas de três localidades, no perímetro urbano de Brasília, DF (Figura 3). Dois locais estavam situados na área do Campus Darcy Ribeiro, pertencentes à Universidade de Brasília (1) na área externa do Instituto de Química (15°46'07.91" S; 47°51'51.19" O) e (2) no trecho final da via L3 Norte (15°44'46.59" S; 47°52'53.88" O). A terceira coleta (3) foi realizada na região do Setor de Embaixadas Sul (15°50'21.04" S; 47°54'57.03" O).

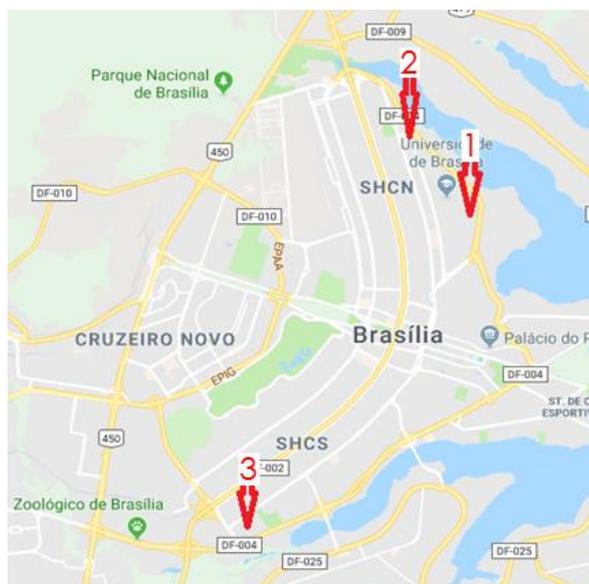


Figura 3. Locais de coleta na cidade de Brasília, DF: (1) Instituto de Química, Campus da Universidade de Brasília, (2) trecho final da Via L3, Asa Norte, e (3) setor de embaixadas sul, Asa Sul.

As coletas de material vegetal ocorreram durante os meses de agosto e setembro. Para a coleta foram selecionadas plantas adultas, não senescentes, com ausência de inflorescência, altura superior a 1 m e ausência de evidência de herbivoria. Foram coletadas o máximo de três folhas por espécime.

Foram utilizadas uma pá e uma tesoura de poda para a coleta, e sacos de papel para o transporte das amostras para o laboratório de Alelopatia Alfredo Gui Ferreira da UnB. No laboratório, as folhas e os rizomas de cada uma das plantas foram lavados com água corrente e armazenados em sacos de papel

devidamente identificados, separados por local de coleta. Em seguida, as amostras foram secas em estufa a 100°C por um período de sete dias.

2.2.2 EXTRATOS AQUOSOS

De cada uma das três localidades amostradas, foi produzido um extrato aquoso de folhas e rizomas na concentração 10% (m/v). Este valor é adequado para testes de fitotoxicidade pelas convenções de padronização de extratos vegetais (BURHAN e SHAUKAT, 1999; MAITI *et al*, 2004; KUMARAN e KARUNARAKAN, 2006; SIDDIQUI *et al*, 2009). Foi utilizada apenas água milli-Q na produção dos extratos aquosos.

As folhas foram trituradas macânicamente em um moinho de facas e extraídas em ultrassom por 45 minutos. Os extratos foram filtrados duas vezes através de uma folha de papel filtro, com o auxílio de uma bomba à vácuo.

Os rizomas foram fracionados com o auxílio de uma serra manual em pedaços de 1cm³, que foram colocados em suspensão no solvente por um período de 48 horas. A solução foi extraída em ultrassom por 4 horas. Os extratos foram filtrados duas vezes através de uma folha de papel filtro, com o auxílio de uma bomba à vácuo.

No total foram produzidos três pares de extratos aquosos (foliar e de rizoma), um para cada população coletada. Os extratos possuíam 1L de volume cada, e foram armazenados na geladeira durante os experimentos. Cada extrato foi testado individualmente em bioensaios.

Diante da ausência de diferença estatísticas entre as três populações, foi calculado a média de atividade entre elas.

2.2.3 EXTRATOS METANÓLICOS

Houve um ajuste na metodologia para a produção dos extratos metanólicos. Uma nova coleta foi realizada na localidade (1), na área externa do Instituto de Química da Universidade de Brasília (15°46'07.91" S; 47°51'51.19" O), e apenas este material foi utilizado na produção destes extratos. A secagem

do material vegetal ocorreu a 60°C ao invés de 100°C, enquanto os outros parâmetros da metodologia permaneceram inalterados.

Os extratos metanólicos a 10% m/v, de folhas e de rizoma, foram produzidos inicialmente com a mesma metodologia utilizada na extração com água (extratos aquosos) porém utilizando metanol absoluto (Applichem BioChemica).

Devido à rápida evaporação do metanol em temperatura ambiente os extratos metanólicos de folhas e de rizoma foram secos em um evaporador rotativo, após sua filtração até a completa evaporação do metanol. A matéria seca foi solubilizada em água com adição de DMSO na proporção 5µl/mL, durante 40 minutos em ultrassom.

Os extratos aquosos foram previamente quantificados quanto à sua proporção solutos x solvente, através da liofilização do material. Foi observado que no extrato aquoso de folha eram extraídos mais solutos (28mg/mL) do que no extrato aquoso de rizoma (11,4 mg/mL). Com objetivo de manter a equidade de concentração entre os extratos aquosos e metanólicos, foram produzidos extratos na mesma proporção. Desta forma a proporção utilizada na solubilização da matéria seca dos extratos metanólicos foi de 28mg/mL extraídos das folhas, e 11,4mg/mL extraídos dos rizomas.

Desta forma foram produzidos dois extratos metanólicos, um de folhas e um de rizoma, ambos solubilizados em água e DMSO.

2.2.4 BIOENSAIOS COM EXTRATOS AQUOSOS

Foi testada a fitotoxicidade (inibição da germinação e do crescimento das partes radicular e aérea da plântula), de cada extrato aquoso produzido, em bioensaios (Figura 4) com sementes de espécies alvo pré-determinadas: alface (*Lactuca sativa* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.), capim-colonião (*Megathyrsus maximus* (Jacq.) B.K.Simon e S.W.L. Jacobs), e ipê-roxo (*Handroanthus impetiginosus* Mattos.). O capim-colonião é uma espécie exótica no Brasil, introduzida para uso em pastagens (AZEVEDO, 1995). Ipê-roxo é uma espécie nativa da mata atlântica e do cerrado brasileiro (LEMOS e ZAPPI, 2012).

Sementes de alface Vera, de germinabilidade 90%, e tomate Santa Clara, de germinabilidade 85%, foram obtidas pela marca Sakata. Sementes de capim-colonião e ipê-roxo foram coletadas no campo.

Cada espécie alvo foi submetida a cinco tratamentos: controle (água ultra pura obtida em sistema milli-Q), extrato bruto a 10% (m/v), extrato diluído nas concentrações de 5%, 2,5% e 1,25%. Dez (10) sementes de cada espécie alvo foram colocadas em placas de *Petri* de 6 cm de diâmetro, em quadruplicata (repetições), sobre uma folha de papel filtro. Cada placa de Petri recebeu 1,5 mL do extrato de cada tratamento. Devido ao seu tamanho, apenas cinco sementes de ipê-roxo foram colocadas em cada placa, porém o numero de repetições foi aumentado para oito, a fim de manter a proporção com as outras espécies alvo.

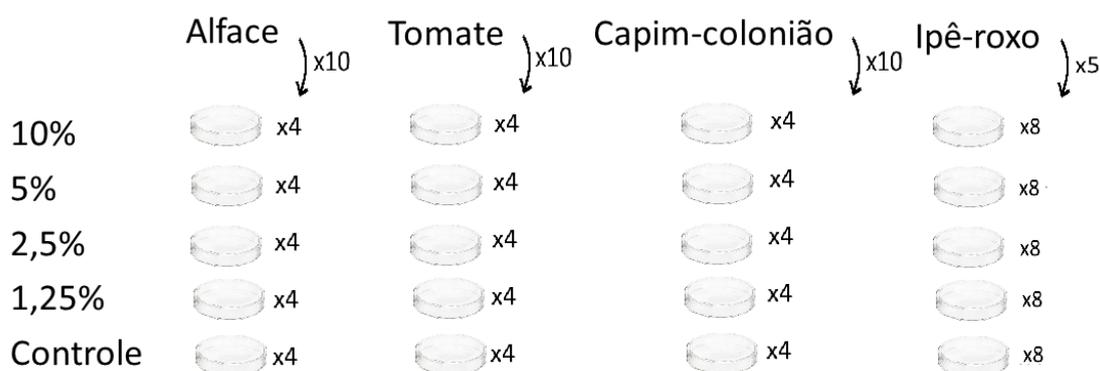


Figura 4. Desenho experimental do bioensaio de germinação. Alface, tomate, capim-colonião e ipê-roxo foram as espécies alvo escolhidas. Elas foram regadas com cinco tratamentos diferentes, 10% (m/v), 5%, 2,5%, 1,25% e controle com água ultra pura.

As placas foram seladas com parafilme e deixadas em sala de crescimento, a 25°C e fotoperíodo de 12 horas, por sete dias. Porém, diferentemente das outras espécies alvo, placas com sementes de ipê-roxo foram deixadas por quatorze dias na sala de crescimento.

Após o período determinado, as placas, previamente seladas com filme plástico tipo PVC para evitar a evaporação dos extrato durante o período experimental, foram retiradas da sala de crescimento e colocadas em congelador para parar o crescimento. As plântulas foram fotografadas e sua parte aérea e sua parte radicular foram medidas com o auxílio do programa ImageJ®.

O desenho experimental do bioensaio (Figura 4) foi repetido para cada um dos extratos aquosos produzidos. Desta forma o experimento foi repetido

seis vezes, três para os extratos aquosos de folhas e três para os extratos aquosos de rizomas.

2.2.5 BIOENSAIO COM EXTRATOS METANÓLICOS

Para a montagem e realização dos bioensaios com extratos metanólicos obtidos de folhas e de rizomas de *A. donax*, foi utilizada a mesma metodologia descrita para o bioensaio com extratos aquosos (item 2.2.4). O único diferencial foi no tratamento controle (água milli-Q), que se adicionou DMSO na proporção 5µl/mL.

2.2.6 ANÁLISE DE DADOS

Os resultados dos bioensaios foram expressos como valores médios da taxa de inibição em relação ao controle (porcentagem de inibição, Figura 5). Esta taxa permite visualização direta do efeito alelopático dos extratos utilizados em relação ao controle. Caso o resultado fosse negativo, as plântulas teriam seu alongamento inibido pelo tratamento em relação ao controle, e caso o resultado seja positivo, as plântulas terão seu alongamento estimulado em relação ao controle.

$$\% \text{ de inibição} = [(XT - XC)/XC] * 100\%$$

Figura 5. Fórmula da porcentagem de inibição, onde XT é a média de alongamento das plântulas nos tratamentos e XC é a média do alongamento das plântulas controle.

Foram feitos testes de normalidade de variância e os resultados submetidos a uma Anova modelo One-Way seguida do teste de Tukey (p<0.05) que analisou a diferença entre os parâmetros avaliados nas diferentes concentrações de extratos. Para as análises foi utilizado o programa Minitab 8.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1.1 GERMINABILIDADE COM EXTRATOS AQUOSOS

De forma geral, a germinação das espécies testadas não foi afetada ($p>0.05$) pelos extratos obtidos de folhas e rizomas de *A. donax*, independente da concentração (Figuras 6 e 7). A exceção foi o tomate, que reduziu a germinabilidade ($p<0.05$) especialmente no extrato mais concentrado de 10% (Figura 6). Embora as figuras indiquem que diferentes concentrações influenciaram diferentemente a germinação das espécies alvo, houve muita variação nos valores médios de germinação das sementes, obtidos nos testes realizados com os extratos das três populações de *A. donax*, e estas não foram significativas, segundo o teste de Tukey ($p>0.05$).

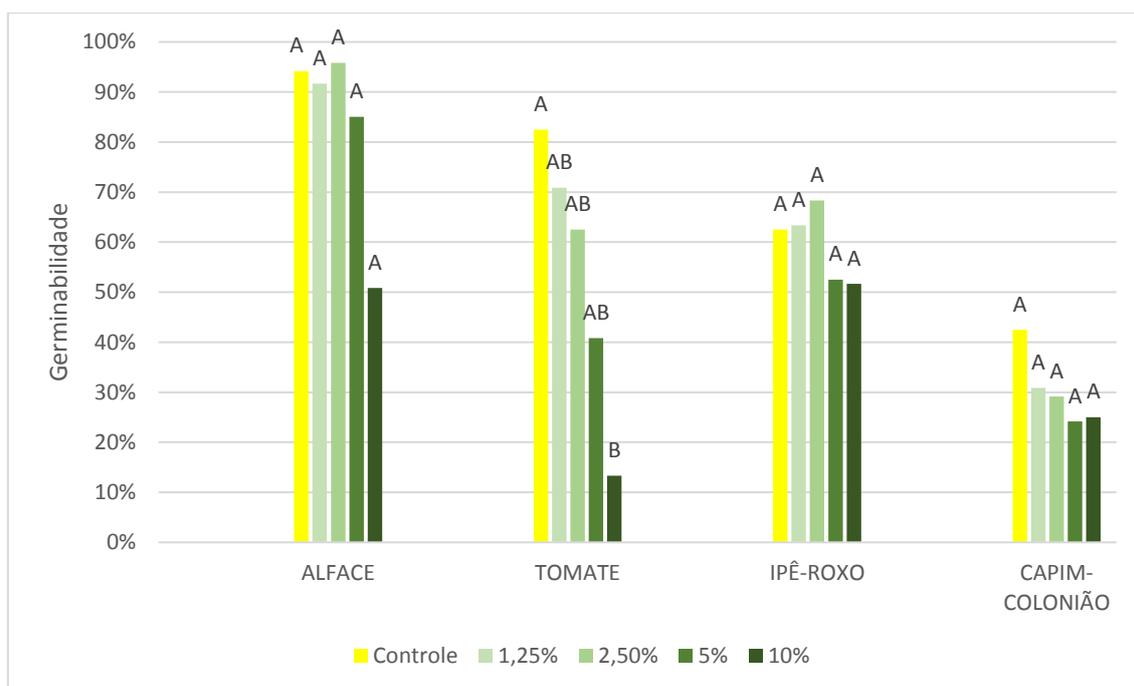


Figura 6. Germinabilidade das espécies alvo tratadas com diferentes concentrações de extratos aquosos foliares de *Arundo donax*, mais o controle de água destilada. Alface (*Lactuca sativa*), tomate (*Solanum lycopersicum*), capim-colonião (*Megathyrus maximus*), e ipê-roxo (*Handroanthus impetiginosus*). Resultado do teste de Tukey representado por letras acima das colunas, significando diferença significativa ($p>0,05$).

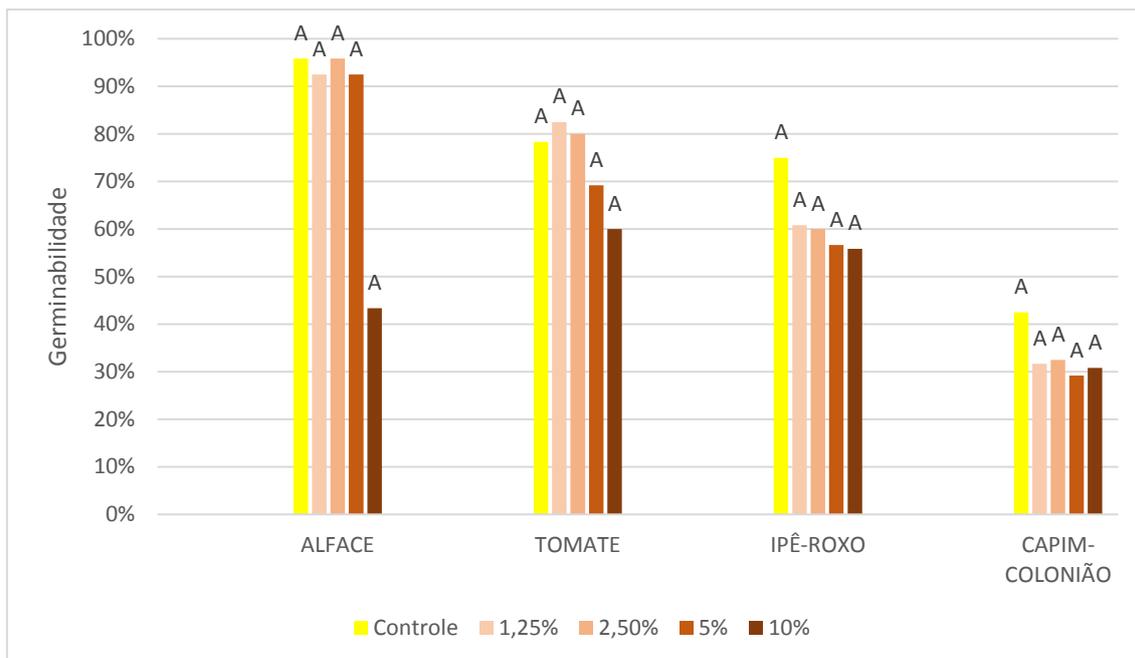


Figura 7. Germinabilidade das espécies alvo tratadas com diferentes concentrações de extratos aquosos de rizomas de *Arundo donax*, mais o controle de água destilada. Alface (*Lactuca sativa*), tomate (*Solanum lycopersicum*), capim-colonião (*Megathyrus maximus*), e ipê-roxo (*Handroanthus impetiginosus*). Resultado do Teste de Tukey representado por letras acima das colunas, significando diferença significativa ($p > 0,05$).

Com excessão da concentração 10% do extrato de folhas (Figura 6) foram observadas taxas de germinabilidade próximas à informada pela empresa responsável pela distribuição das sementes em alface (90%) e tomate (85%) em todas as diluições dos extratos.

Capim-colonião apresenta baixa germinabilidade, com taxa de 40% em sementes não escarificadas (TOLEDO, 1995). Os resultados encontrados indicam a não inibição da germinabilidade nesta espécie alvo. Todos os resultados obtidos para ipê-roxo ficaram abaixo da média descrita na literatura (RIBEIRO, 2010), mas não houve inibição da germinabilidade causada pelos tratamentos.

Pequenas variações da germinabilidade entre os diferentes tratamentos podem ser causadas por efeito osmótico. íons diluídos (solutos osmoticamente ativos) osmolaridade nos extratos podem gerar um potencial osmótico do meio diferente do interior das sementes impedindo, desta forma, o embebedimento correto das sementes e afetando a taxa de germinabilidade (SOSA *et al*, 2005). Para se descartar a influência deste efeito é necessário se avaliar a osmolaridade das soluções em um osmômetro.

2.3.1.2 GERMINABILIDADE COM EXTRATOS METANÓLICOS

É possível observar inibição da germinabilidade em relação ao controle na maioria das espécies alvo testadas (Figuras 8 e 9). Sementes de alface tratadas com extrato de rizoma tiveram germinabilidade próxima à informada pela empresa responsável pela venda (90%) nos tratamentos mais diluídos. Contudo, as concentrações de 5% e 10% inibiram fortemente a germinabilidade desta espécie. Sementes de alface tratadas com extrato de folhas tiveram sua germinabilidade reduzida em relação ao controle em todas as concentrações. Sementes de tomate tratadas com extratos de folhas e de rizomas não mostraram variação significativa na sua germinabilidade.

O resultado encontrado para as sementes de capim-colonião um controle com germinabilidade muito acima da taxa de 40% registrada na literatura (TOLEDO, 1995). Nesta espécie, as concentrações de 5% e 10% dos dois extratos causaram redução na germinabilidade.

A inibição da germinabilidade das sementes de ipê-roxo ocorreu nos tratamentos de 5% e 10% do extrato foliar, mas apenas na concentração a 10% do extrato de rizomas. Apesar de alguns tratamentos registrarem germinabilidade eleva acima do controle, em nenhum destes casos as taxas foram superiores à média descrita na literatura (RIBEIRO, 2010).

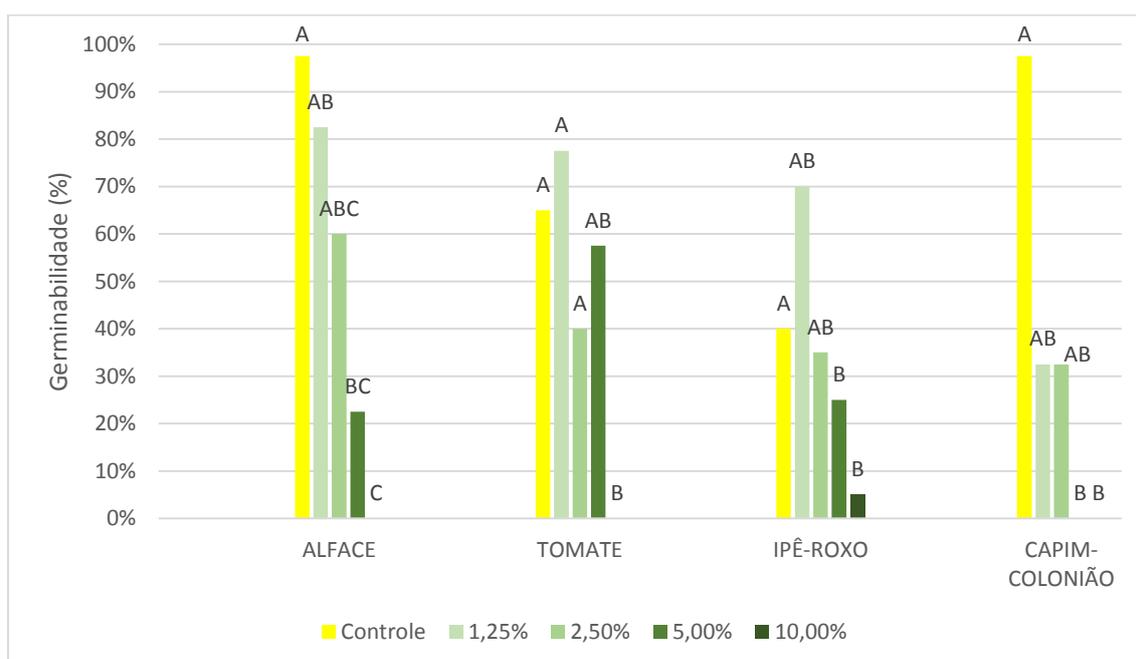


Figura 8. Germinabilidade das espécies alvo tratadas com diferentes concentrações de extratos metanólicos de folhas de *Arundo donax*, mais o controle de água destilada. Alface (*Lactuca sativa*), tomate (*Solanum lycopersicum*), capim-colonião (*Megathyrsus maximus*), e ipê-roxo (*Handroanthus impetiginosus*). Resultado do Teste de Tukey representado por letras acima das colunas, significando diferença significativa.

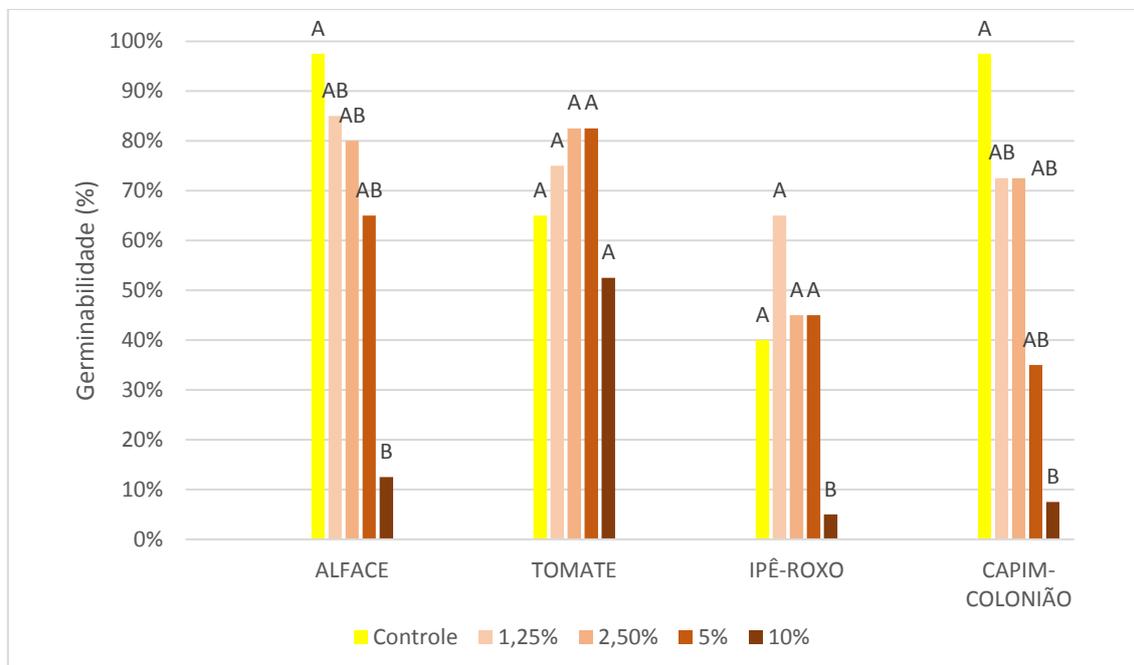


Figura 9. Germinabilidade das espécies alvo tratadas com diferentes concentrações de extratos metanólicos de rizomas de *Arundo donax*, mais o controle de água destilada. Alface (*Lactuca sativa*), tomate (*Solanum lycopersicum*), capim-colonião (*Megathyrsus maximus*), e ipê-roxo (*Handroanthus impetiginosus*). Resultado do Teste de Tukey representado por letras acima das colunas, significando diferença significativa ($p > 0,05$).

A redução da germinabilidade pelos extratos metanólicos ocorreu em todas as espécies alvo tratadas com o extrato foliar, e apenas o tomate não teve sua germinabilidade reduzida pelo extrato de rizoma. Este resultado é um grande contraste com a germinabilidade das espécies alvo tratadas com as diluições dos extratos aquosos.

Outra explicação que reforça a diferença nos resultados encontrados entre os bioensaios (Figuras 6-9) é de que o metanol é um solvente menos polar do que a água. Por conta desta diferença de polaridade os compostos vegetais extraídos com estes solventes não são os mesmos.

Compostos presentes nos dois extratos metanólicos foram inibitórios da germinabilidade das espécies alvo testadas (Figuras 8 e 9) de maneira significativa nos tratamentos mais concentrados dos extratos. Compostos presentes nos extratos aquosos, ou possivelmente a ausência de compostos,

não resultaram em alteração significativa da germinabilidade (Figuras 6 e 7). Este resultado indica que compostos alelopáticos possuem maior afinidade com o metanol em relação à água.

2.3.2.1 INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO COM EXTRATOS AQUOSOS

Extratos de rizomas foram inibitórios apenas no tratamento mais concentrado (10%), e apenas nas plântulas de alface e tomate (Figuras 10B e 11B). Apenas os extratos aquosos de folhas de *Arundo donax* promoveram a inibição do crescimento em altura (Figuras 10A e 11A), de maneira significativa ($p>0,05$).

Os efeitos de inibição e dose-dependência ficaram mais evidentes quando analisamos o efeito dos extratos na parte radicular das espécies alvo (Figura 11). Este resultado está ligado à vulnerabilidade da raiz em relação à estruturas da parte aérea, justamente pelo papel da raiz na absorção. Compostos secundários diluídos no meio afetaram de maneira mais intensa a parte radicular do que a aérea, como estudos com outras espécies relataram (AIRES, 2005; SOUZA, 2007; VRCHOTOVÁ, 2008).

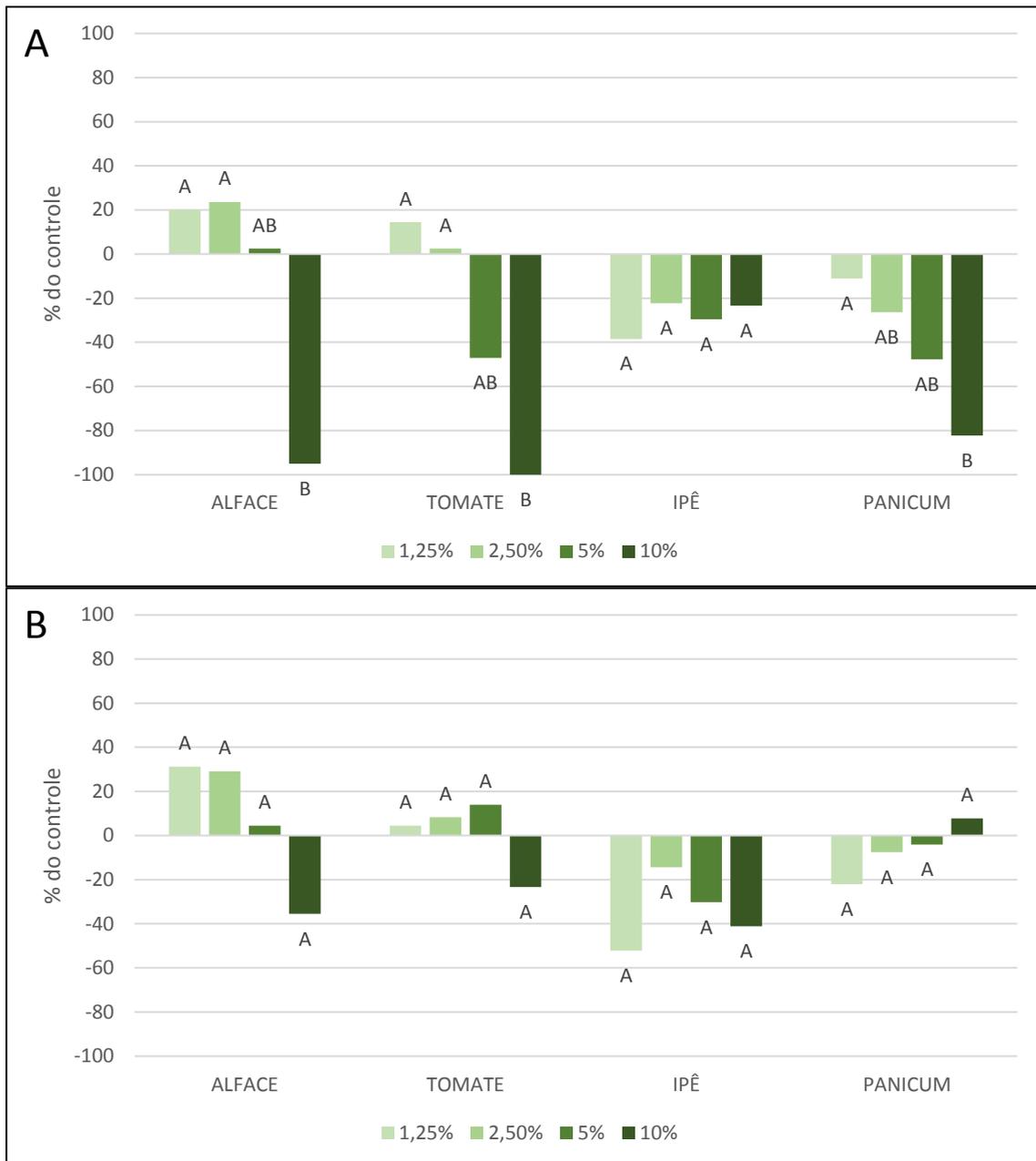


Figura 10. Taxa de inibição da parte aérea das quatro espécies alvo em relação ao controle de água destilada, nos quatro tratamentos diferentes. Extrato aquoso de folhas (A) e Extrato aquoso de rizomas (B) de *Arundo donax*. Alface (*Lactuca sativa*), tomate (*Solanum lycopersicum*), capim-colonião (*Megathyrus maximus*), e ipê-roxo (*Handroanthus impetiginosus*). Resultado do Teste de Tukey ($p > 0,05$), representado por letras acima das colunas, significando diferença significativa.

O resultado indica efeito de dose dependência nas espécies alvo tratadas com extrato de folhas, para as partes aérea e radicular, nas plântulas de alface, tomate e capim-colonião. Contudo, não houve diferença significativa entre os tratamentos para as partes aérea e radicular de ipê-roxo, logo não houve dose dependência neste caso.

Espécies alvo tratadas com diferentes concentrações do extrato aquoso de rizomas (Figuras 10B e 11B) apresentaram diferenças no seu crescimento,

porém, de forma não significativa. Apenas o extrato mais concentrado inibiu o crescimento de forma significativa, desta forma, independente da espécie avaliada, não foi observada dose dependência no resultado de inibição

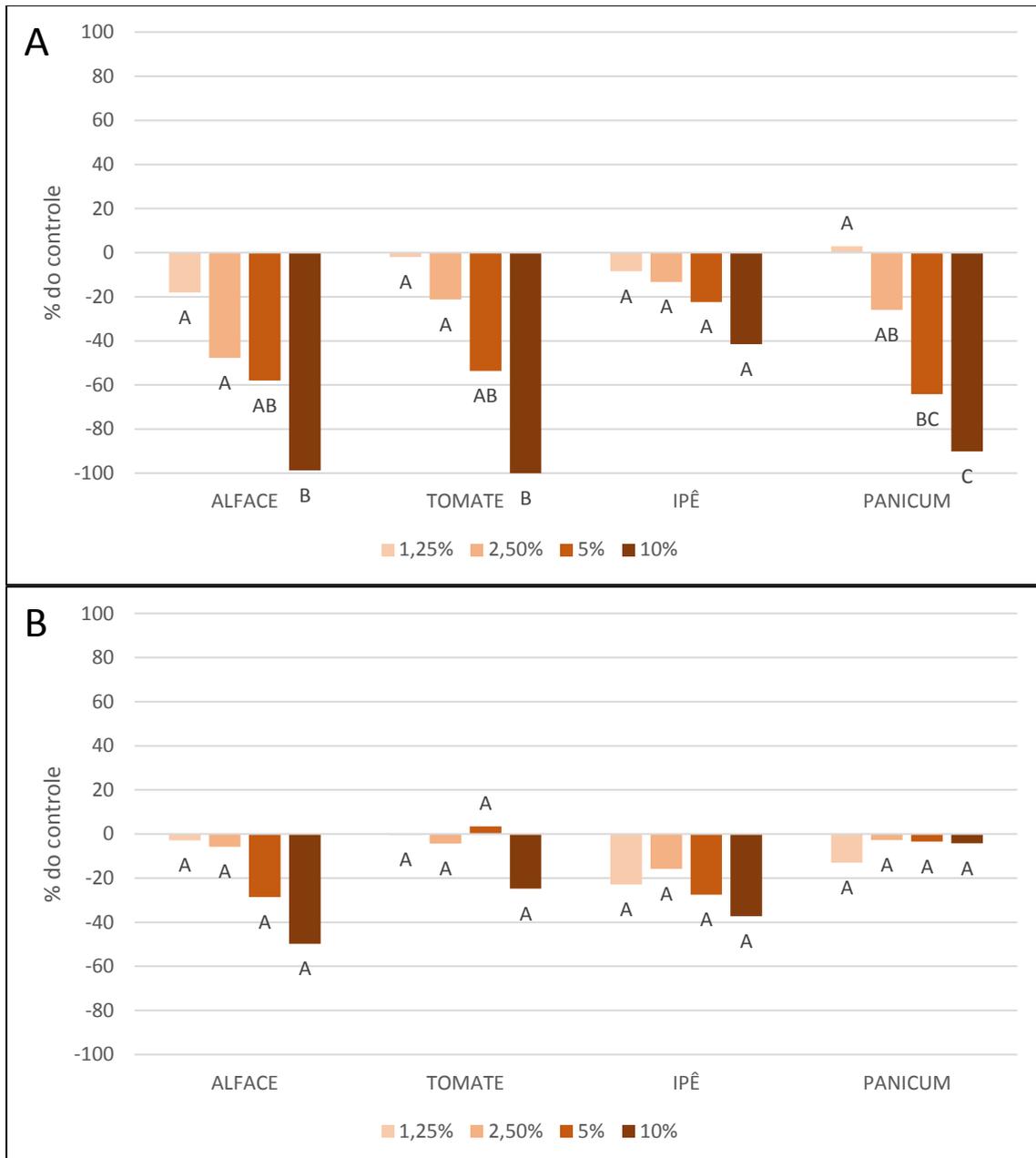


Figura 11. Taxa de inibição da parte radicular das quatro espécies alvo em relação ao controle de água destilada, nos quatro tratamentos diferentes. Extrato aquoso de folhas (A) e Extrato aquoso de rizomas (B) de Arundo donax. Alface (*Lactuca sativa*), tomate (*Solanum lycopersicum*), capim-colonião (*Megathyrsus maximus*), e ipê-roxo (*Handroanthus impetiginosus*). Resultado do Teste de Tukey ($p > 0,05$) representado por letras acima das colunas, significando diferença significativa.

A existência de atividade alelopática por extrato de *A. donax* obtido do rizoma é uma informação nova que agrega valor sobre o potencial invasor da espécie. O controle efetivo da planta é feito através da remoção completa do rizoma (BELL, 1997), o que é trabalhoso e muitas vezes não ocorre em detrimento da remoção apenas das parte aérea. A permanência do rizoma na área favorece a liberação de compostos alelopáticos de forma contínua e duradoura, o que pode impedir outras espécies de se estabelecerem.

O uso de diferentes espécies alvo em ensaios de alelopatia é importante uma vez que apenas desta forma é possível ter uma abrangência maior da resposta nos testes realizados. Alface e tomate são espécies modelo para ensaios de alelopatia por causa de sua sensibilidade, sendo utilizadas em testes com diversas espécies (OLESZEK, 1987; LYNN *et al*, 1991), pois facilitam a demonstração e comprovação de efeitos inibitórios.

Como esperado, foi observada inibição significativa do crescimento das plântulas de alface e tomate, de forma dose-dependente, pelo extrato aquoso de folhas de *A. donax*. O extrato de rizomas causou inibição apenas na maior concentração (10%).

Handroanthus impetiginosus foi a espécie menos inibida pelos extratos aquosos. Houve diferença estatística no crescimento das plântulas apenas na radícula tratada com extratos foliares concentrados (5% e 10%) (Figura 11A). Podemos afirmar que esta espécie nativa foi a espécie alvo que se mostrou resistente à alelopatia de *A. donax*.

O capim-colonião foi inibido pelos tratamentos mais concentrados dos extratos aquosos de folhas de *A. donax* (5% e 10%) (Figuras 10A e 11A), não tendo sofrido efeito inibitório de nenhuma concentração do extrato aquosos de rizomas. A suscetibilidade do capim-colonião à fitotoxicidade dos extratos de *A. donax*, em relação à espécie alvo nativa, pode estar relacionada à seu *status* de invasora. Para ser introduzida em um novo ambiente, a espécie exótica deve passar por filtros bióticos e abióticos (LORENZO e SANCHÉZ, 2010). A alelopatia se insere neste filtro biótico, uma vez que a espécie exótica deve resistir a possíveis efeitos alelopáticos de espécies nativas, ou de outras espécies invasoras.

A resistência da espécie alvo nativa, o ipê-roxo, e a suscetibilidade da espécie invasora, o capim-colonião, condiz com a teoria alelopática “Homeland Security”, que diz que espécies invasoras seriam mais suscetíveis à alelopatia de espécies nativas do que o inverso (CUMMINGS *et al*, 2012). Desta forma espécies nativas seriam as mais indicadas para medidas de controle populacional de gramíneas invasoras agressivas, tal como *A. donax*.

Ambos os extratos aquoso de folhas e de rizomas foram inibitórios do crescimento das espécies alvo, porém com intensidades diferentes. Quando estes dois extratos são comparados, há a indicação de que o extrato de rizoma foi menos inibitório do que o extratos foliar. Enquanto já se conhece parte da ação dos compostos fitotóxicos presentes nas folhas de *A. donax* e sua ação (HONG *et al*, 2010), não há análise equivalente com o rizoma desta espécie. Este tipo de análise já foi feito com rizomas de outras espécies (YANG *et al*, 2009).

2.3.2.2 INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO COM EXTRATOS METANÓLICOS

Ambos os extratos metanólicos de folhas e de rizomas inibiram o crescimento das espécies alvo (Figuras 12 e 13). A inibição observada nas plântulas tratadas com extratos metanólicos foi superior às tratadas com extratos aquosos. O metanol foi o solvente mais eficiente na extração de material alelopático de *Arundo donax*.comparado com a água.

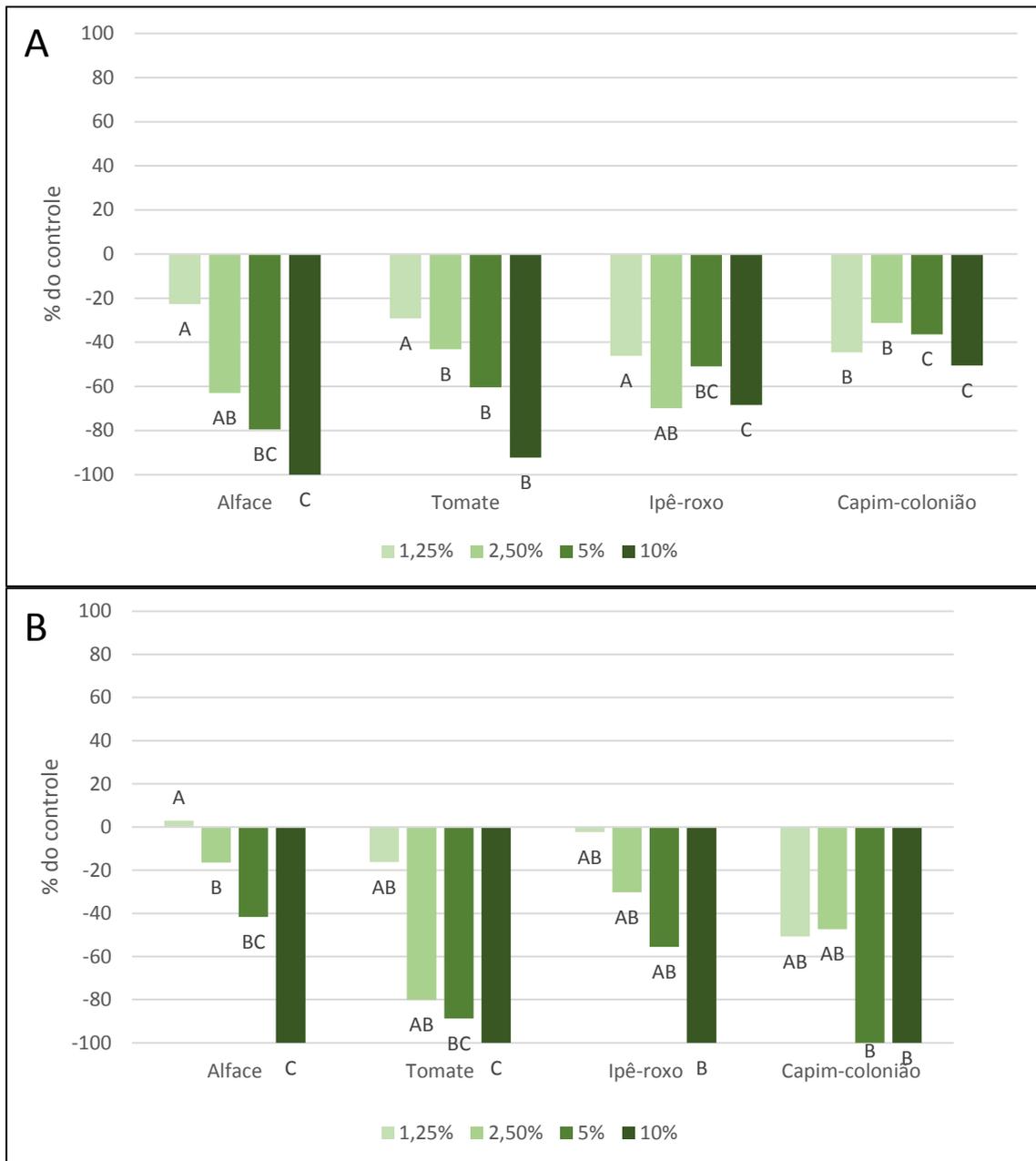


Figura 12. Taxa de inibição da parte aérea das quatro espécies alvo em relação ao controle de água destilada, nos quatro tratamentos diferentes. Extrato metanólico de folhas (A) e Extrato metanólico de rizomas (B) de *Arundo donax*. Alface (*Lactuca sativa*), tomate (*Solanum lycopersicum*), capim-colonião (*Megathyrus maximus*), e ipê-roxo (*Handroanthus impetiginosus*). Resultado do Teste de Tukey ($p > 0,05$) representado por letras acima das colunas, significando diferença significativa.

Houve forte inibição, de forma dose-dependente, em todas as espécies alvo tratadas com extrato metanólico de folhas (Figuras 12A e 13A). Este efeito é menos evidente nas plântulas de tomate. A concentração de 1,25% não possui diferença significativa ($p > 0,5$) em relação ao controle, enquanto as outras concentrações (2,5%, 5% e 10%) são significativamente diferentes ($p < 0,5$) do controle, mas não entre si.

Diferentemente do resultado com extratos aquosos de rizomas é possível observar efeito de dose dependência na inibição causada pelo extrato metanólico de rizomas (Figuras 12B e 13B). Alface e tomate foram as espécies alvo mais inibidas, o que já era esperado, devido à sensibilidade destas como espécies modelo. As plântulas de ipê-roxo foram as significativamente ($p < 0.5$) menos inibidas, resultado igual ao observado nos tratamentos com extratos aquosos.

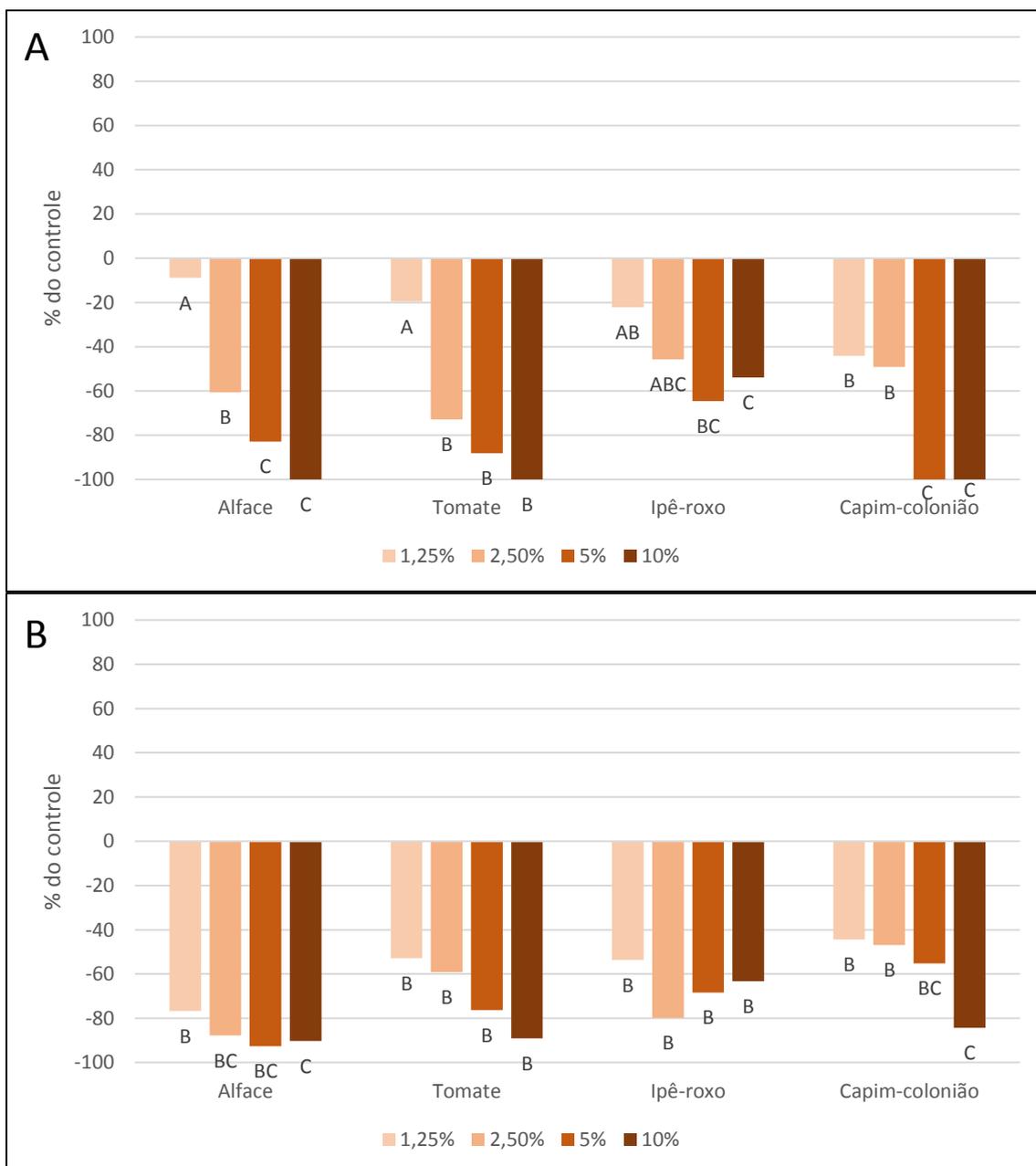


Figura 13. Taxa de inibição da parte radicular das quatro espécies alvo em relação ao controle de água destilada, nos quatro tratamentos diferentes. Extrato metanólico de folhas (A) e Extrato metanólico de rizomas (B) de *Arundo donax*. Alface (*Lactuca sativa*), tomate (*Solanum lycopersicum*), capim-colônia (*Megathyrus maximus*), e ipê-roxo (*Handroanthus impetiginosus*). Resultado do Teste de Tukey ($p > 0,05$) representado por letras acima das colunas, significando diferença significativa.

Observando as Figuras 12 e 13 não é possível observar maior resistência ou suscetibilidade da espécie alvo nativa, o ipê-roxo, em relação à espécie invasora, o capim-colonião. Desta forma não é possível apontar ligação com a teoria “Homeland Security” (CUMMINGS *et al*, 2012), como também não é possível apontar ligação com a teoria “Novel Weapons” (CALLAWAY e RIDENOUR, 2004).

Os dois tipos diferentes de extratos avaliados nesse trabalho apresentaram resultados diferentes quanto à inibição das espécies alvo. Quanto aos extratos aquosos, os extratos de rizomas não inibiram significativamente o crescimento das espécies alvo, apenas os extratos foliares tiveram tal efeito. Resultado contrastante com o observado nos tratamentos de extratos metanólicos. Ambos os extratos foliares e os de rizomas inibiram significativamente o crescimento das espécies alvo.

O resultado observado indica que folhas e rizomas são ambas estruturas que produzem ou armazenam aleloquímicos. Porém, a diferença observada entre os resultados dos extratos aquosos e metanólicos indica que os compostos alelopáticos nesta espécie possuem mais afinidade com o solvente orgânico do que com a água. Este resultado era esperado, uma vez que solventes orgânicos como o metanol possuem maior eficiência na extração de aleloquímicos do que a água (LI *et al*, 2010).

Em situação de campo durante um evento de chuva ou de alagamento do solo, enquanto vários compostos serão extraídos, muitos permanecerão nas estruturas desta planta. Rompimento mecânico da parte aérea ou do rizoma, ou até a decomposição destas estruturas (AHMED *et al*, 2008), podem causar a liberação destes compostos no ambiente

A forte inibição causada pelos extratos de *A. donax*, principalmente dos extrato metanólicos, comprova a alelopativa nesta espécie. A exploração do potencial alelopático desta espécie por ensaios fitoquímicos podem contribuir para explicar este fenômeno, com identificação de compostos responsáveis pelos efeitos observados neste trabalho.

2.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-ROMMAN, S. AMMARI, T. Allelopathic effect of *Arundo donax*, a Mediterranean invasive grass. *Plant Omics Journal*. V. 8, 4. Pp 287-291. 2015.

AHMED, R. HOQUE, R. HOSSAIN, M. Allelopathic Effect of Leaf Litters of *Eucalyptus camaldulensis* on some Forest and Agricultural Crops. *Journal of Forestry Research*. V. 19, 1. Pp 19-24. 2008.

AIRES, S. FERREIRA, A. BORGHETTI, F. Efeito Alelopático de Folhas e Frutos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil. (Solanaceae) na Germinação e no Crescimento de *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae) em Solo sob Três Temperaturas. *Acta Botanica Brasílica*. V. 19, 2. Pp 339-344. 2005.

AZEVEDO, G. Recuperação e Utilização de pastagem de capim-colonião (*Panicum maximum*) para a engorda de bovinos, no município de Abel Figueiredo, Pará. 1995. Acesso em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/374324/recuperacao-e-utilizacao-de-pastagem-de-capim-colonio-panicum-maximum-para-a-engorda-de-bovinos-no-municipio-de-abel-figueiredo-para>.

BELL, G.P. Ecology and management of *Arundo donax*, and approaches to riparian habitat restoration in southern California. *Plant Invasions: Studies from North America and Europe*. Backhuys Publishers, Leiden, Países Baixos. Pp. 103-113. 1997.

BURHAN, N. SHAUKAT, S. Allelopathic Potential of *Argemone Mexicana* L. a Tropical Weed. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. V. 2, 4. Pp 1268-1273. 1999.

CALLAWAY, R. RIDENOUR, W. Novel Weapons: Invasive Success and the Evolution of Increased Competitive Ability. *Frontiers in Ecology and the Environment*. V. 2, 8. Pp 436-443. 2004.

CUMMINGS, J. PARKER, I. GILBERT, G. Allelopathy, a Tool for Weed Management in Forest Restoration. *Plant Ecology*. V. 213, 12. Pp 1975-1989. 2012.

- KHUZHAEV, V. ZHALOLOV, I. TURGUNOV, K. TASHKHODZHAEV, B. LEVKOVICH, M. ARIPOVA, S. SHASHKOV. A. Alkaloids from *Arundo donax*. XVII. Structure of the Dimeric Indole Alkaloid Arundavine. Chemistry of Natural Compounds. V. 40, 3. Pp 220-224. 2004.
- HONG, Y. HU, H. SAKODA, A. SAGEHASHI, M. Isolation and characterization of antialgal allelochemicals from *Arundo donax* L. Allelopathy Journal. V. 25, 2. Pp 357-368. 2010.
- HONG, Y. HU, H. SAKODA, A. SAGEHASHI, M. Straw preservation effects of *Arundo donax* L. on its allelopathic activity to toxic and bloom forming *Microcystis aeruginosa*. Water Science et Technology. V. 63, 8. Pp 1566-1573. 2011.
- JIMÉNEZ, J. SCHULTZ, K. ANAYA, A. HERNÁNDEZ, J. ESPEJO, O. Allelopathic Potential of Corn Pollen. Journal of Chemical Ecology. V. 9, 8. Pp 1011-1025. 1983.
- KHUZHAEV, V. ZHALOLOV, I. LEVKOVICH, M. ARIPOVA, S. SHASHKOV, S. Alkaloids of *Arundo donax* L. 15.* A New Dimeric Alkaloids Arundarine from the Roots of *Arundo donax* L.. Russian Chemical Bulletin, International Edition. V. 53, 8. Pp 1765-1767. 2004.
- KHUZHAEV, V. ZHALOLOV, I. TURGUNOV, K. TASHKHODZHAEV, B. LEVKOVICH, M. ARIPOVA, S. SHASHKOV. A. Alkaloids from *Arundo donax*. XVII. Structure of the Dimeric Indole Alkaloid Arundavine. Chemistry of Natural Compounds. V. 40, 3. Pp 220-224. 2004.
- KUMARAN, A. KARUNAKARAN, R. Antioxidant and Free Radical Scavenging Activity of na Aqueous Extract of *Coleus aromaticus*. Food Chemistry. V. 97. Pp 109-144. 2006.
- LEMOS, J. ZAPPI, D. Distribuição Geográfica Mundial de Plantas Lenhosas da Estação Ecológica de Aiuaba, Ceará, Brasil. Revista Brasileira de Biociências. V. 10, 4. Pp 446-456. 2012.
- LI, Z. WANG, Q. RUAN, X. PAN, C. JIANG, D. Phenolics and Plant Allelopathy. Molecules. V. 15. Pp 8933-8952. 2010.

LORENZO, P. GONZÁLEZ, L. Alelopatia: una Característica Ecofisiológica que Favorece la Capacidad Invasora de las Especies Vegetales. *Ecosistemas*. V. 19, 1. Pp 79-91. 2010.

LYNN, D. BLOOM, U. Effects of Exogenously Applied Ferulic Acid, A Potential Allelopathic Compound, on Leaf Growth, Water Utilization, and Endogenous Abscisic Acid Levels of Tomato, Cucumber and Bean. *Journal of Chemical Ecology*. V. 17, 5. Pp 865-886. 1991.

MAHMOODZADEH, H. MAHMOODZADEH, M. Allelopathic Effects of Rhizome Aqueous Extract of *Cynodon dactylon* L. on Seed Germination and Seedling Growth of Legumes. *Labiatae and Poaceae. Iranian Journal of Plant Physiology*. V. 4, 3. Pp 1047-1054. 2014.

MAITI, R. JANA, D. DAS, U. GHOSH, D. Antidiabetic Effect of Aqueous Extract of Seed of *Tamarindus indica* in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *Journal of Ethno-Pharmacology*. V. 92. Pp 85-91. 2004.

MEI, L. CHEN, X. TANG, J. Allelopathic effects of invasive weed *Solidago canadensis* on native plants. *The Journal of Applied Ecology*. V. 16, 12. Pp 2379-2382. 2005.

MORAIS, L. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. *Horticultura Brasileira* 27: S4050-S4063. 2009

NETO, C. SECA, A. NUNES, A. COIMBRA, M. DOMINGUES, F. EVTUGUIN, D. SILVESTRE, A. CAVALEIRO, J. Variation in chemical composition and structure of macromolecular components in different morphological regions and maturity stages of *Arundo donax*. *Industrial Crops and Products*. V. 6. Pp 51-58. 1996.

OLESZEK, W. Allelopathic Effect of Volatiles from some *Cruciferae* Species on Lettuce, Barnyard Grass and Wheat Growth. *Plant and Soil*. V. 102. Pp 271-273. 1987.

REIGOSA, M. GOMES, A. FERREIRA, A. BORGHETTI, F. Allelopathic Research in Brazil. *Acta Botanica Brasilica*. V. 27, 4. Pp 629-646. 2013.

RIBEIRO, L. Aspectos Ecofisiológicos da Germinação de Sementes de Espécies do Cerrado *sensu strictu* e da Mata de Galeria do Bioma Cerrado Expostas a

Diferentes Condições de Estresse. 2010. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília.

RIGANO, D. GRASSIA, A. FORMISANO, C. BASILE, A. SORBO, S. SENATORE, F. Antibacterial and allelopathic activity of methanolic extract from *Iris pseudopumila* rhizomes. *Fitoterapia*. V. 77, 6. Pp 460-462. 2006.

RIZVI, S. RISVI, V. Capítulo 1: A discipline called allelopathy. In: _____ (Ed.), S. Allelopathy: basic and applied aspects. London, Chapman and Hall. 1992.

SIDDIQUI, S. BHARDWAJ, S. KHAN, S. MEGHVANSHI, M. Allelopathic Effect of Different Concentration of Water Extract of *Prosopis juliflora* Leaf on Seed Germination and Radicle Length of Wheat (*Triticum aestivum* Var-Lok-1). *American-Eurasian Journal of Scientific Research*. V. 4, 2. Pp 81-84. 2009.

SOSA, L. LLANES, A. REINOSO, H. REGINATO, M. LUNA, V. Osmotic and Specific Ion Effects on the Germination of *Prosopis strombulifera*. *Annals of Botany*. V. 2, 1. Pp 261-267. 2005.

TOLEDO, F. CHAMMA, H. NOVEMBRE, A. Germinação de Sementes de *Panicum maximum* Jacq. Pré-tratadas com Ácido Sulfúrico. *Sci. Agric.* V. 52, 1. Pp 20-24. 1995.

SOUZA, L. CANINO, G. AIRES, S. BORGHETTI, F. Efeito Alelopático de Folhas de Quatro Espécies do Cerrado sobre Crescimento de Gergelim. *Revista Brasileira de Biociências*. V. 5, 2. Pp 540-542. 2007.

VRCHOTOVÁ, N. SERÁ, B. Allelopathic properties of knotweed rhizome extract. *Plant Soil Environment*. V. 54, 7. Pp 301-303. 2008.

YANG, Z. YANG, W. PENG, Q. HE, Q. FENG, Y. LUO, S. YU, Z. Volatile Phytochemical Composition of Rhizome of Ginger After Extraction by Headspace Solid-phase Microextraction, Petroleum Ether Extraction and Steam Distillation Extraction, *Bangladesh Journal of Pharmacology*. V. 4. Pp 136-143. 2009.

CAPÍTULO 2. ESTUDO FITOQUÍMICO DE FOLHAS E RIZOMAS DE *ARUNDO DONAX*, COLETADOS EM ÁREAS DO DISTRITO FEDERAL

3.1. INTRODUÇÃO

Arundo donax é uma espécie invasora de grande relevância mundial (TNC, 2009), mas esta gramínea também chama atenção pelos metabolitos que produz. Diversas substâncias comercialmente interessantes foram isolados desta espécie, que ainda possui um largo potencial fitoquímico a ser explorado (MATSUO *et al*, 2001; HONG *et al*, 2010).

Foram isolados de folhas de *A. donax* diversos alcalóides indólicos e outras substâncias aromáticas nitrogenadas (MATSUO *et al*, 2001; HONG *et al*, 2010). Alguns destes compostos possuem inclusive efeitos comercialmente interessantes, como o alcaloide Gramina, que tem reconhecida atividade antifúngica e algicida; e a amina Escatol, caracterizado pelo seu forte odor, que já havia sido observado em outros organismos apresentando atividade inibidora em microrganismos (BROWN *et al*, 1979). Embora compostos já tenham sido isolados e estudados quanto sua atividade biológica, faltam estudos sobre possível atividade fitotóxica.

Do rizoma de *Arundo donax* também foram isolados diversos alcaloides, como triptaminas, alcaloides indolicos, semelhantes aos encontrados em animais (AL-SNAFI, 2015), e alcaloides diméricos (KHUZHAEV, 2004 A). No entanto, da mesma forma que os compostos isolados das folhas, há falta de estudos de fitotoxicidade com os compostos isolados dos rizomas.

O objetivo deste trabalho foi realizar uma prospecção fitoquímica preliminar dos extratos brutos obtidos a partir de folhas e de rizomas de *Arundo donax*, para detectar classes de metabólicos secundários e alguns constituintes presentes nesta estruturas. Adicionalmente, bioensaios que avaliaram a ação antioxidante, de toxicidade e fungicida dos extratos brutos da planta, foram testados.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 COLETA

Foram coletadas amostras frescas de folhas e rizomas de uma população de *Arundo donax* localizada no Campus da Universidade de Brasília (UnB), no Distrito Federal (15°46'07.91" S; 47°51'51.19" O) (Figura 14).



Figura 14. mapa da área de coleta em Brasília, no campus da Universidade de Brasília, no Distrito Federal.

Para a coleta de material vegetal os indivíduos selecionados eram não senescentes, com ausência de inflorescência, altura superior a 1 metro e sem evidências de herbivoria. Foram coletadas o máximo de três folhas por espécime. A coleta ocorreu no mês de setembro, durante um período de estresse hídrico elevado.

3.2.2 PREPARO DO MATERIAL PARA ANÁLISE

As amostras coletadas foram levadas para o Laboratório de Alelopatia da UnB, onde foram lavadas com água corrente e armazenadas em sacos de papel com identificação devida. Em seguida, foram secas em estufa de circulação forçada a 60°C, por um período de sete dias, as folhas foram trituradas em moinho de facas (Tecnal) e os rizomas, pela dureza do material, foram cortados em pequenos pedaços (<1 cm³), com auxílio de uma serra manual, para uso na obtenção dos extratos.

3.2.3 PRODUÇÃO E PROCESSAMENTO DE EXTRATOS

Extratos aquosos e metanólicos, na concentração de 10%, massa por volume (m/v), foram produzidos das amostras de folhas e de rizomas de *A. donax*. Foi utilizada água milli-Q na produção dos extratos aquosos, e metanol absoluto (Applichem BioChemica), para os extratos metanólicos.

Para as folhas (amostras pulverizadas) procedeu-se a extração em ultrassom por 45 minutos. Os extratos foram filtrados duas vezes em uma folha de papel filtro com o auxílio de uma bomba à vácuo. Os rizomas (amostras em pedaços pequenos) foram colocados em suspensão em água por um período de 48 horas, e a solução foi extraída em ultrassom por 4 horas. Os extratos foram filtrados duas vezes através de uma folha de papel filtro, com o auxílio de uma bomba à vácuo.

Foram produzidos quatro extratos: Aquoso de folhas; Metanólico de folhas; Aquoso de rizomas; Metanólico de rizomas.

Extratos, foliares e de rizomas, foram desidratados, de acordo com o solvente extrator. Os extratos aquosos foram transferidos para tubos de plástico (Falcon) de 50 mL e liofilizados. Extratos metanólicos foram processados em um Evaporador Rotativo até a completa evaporação do álcool.

O extratos secos foram utilizados em experimentos realizados no Laboratório de Bioprospecção Vegetal, do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, em Manaus (AM).

3.2.4 CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (CCDC)

A CCDC foi realizada para identificação dos diferentes grupos químicos presentes nas amostras. Os extratos secos de folhas e rizomas foram solubilizados em metanol para aplicação nas placas.

Foram utilizados dois sistemas de solventes. Um para aplicações de extratos metanólicos (clorofórmio e metanol na proporção 7:3) e outro para aplicações dos extratos aquosos (Clorofórmio, metanol e água, na proporção 5:5:1).

Para identificação de cada grupo químico foram utilizados diferentes reveladores, estes sendo: Dragendorff, para detecção de aminas, em especial alcaloides (PERES *et al*, 2012); NP-PEG, para detecção de flavonoides (CALINA *et al*, 2013); Cloreto Férrico, para detecção de taninos e outros compostos fenólicos (PASCUAL *et al*, 2002); Anisoaldeído, revelador que detecta esteroides e fenóis, além de alguns carboidratos e gorduras (JORK *et al*, 1990). As placas foram também visualizadas sob luz ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda 265nm e 354nm para visualização não especificista de compostos.

3.2.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os extratos secos foram diluídos em metanol para teste de atividade antioxidante. Dois métodos foram utilizados simultaneamente, NPPH e Fe³⁺-fenantrolina, ambos em triplicata, seguindo MARTINS *et al*, (2014). Os resultados foram comparados com uma curva controle utilizando ácido ascórbico, substância utilizada como referência em testes de atividade antioxidante.

Para o ensaio com o radical livre DPPH foi preparada de uma solução contendo extrato vegetal e a molécula de DPPH. Foi adicionado 10µL de extrato

(na concentração 1mg/mL) em 990µL da solução de NPPH (na concentração 30mg/mL, em metanol). O controle negativo utilizado foi uma amostra contendo apenas 10µL de metanol. Após 30 minutos foi feita a medição da absorbância a 517nm em um espectrofotômetro. O experimento foi realizado no escuro devido à sensibilidade da molécula de NPPH.

Para o ensaio com Fe³⁺-fenantrolina foi preparada uma solução contendo um extrato vegetal e a molécula de Fe³⁺. 10µL da solução de Fe³⁺ foram adicionados a 10µL de extrato (na concentração 1mg/mL) e deixados em repouso por 10 minutos. Após este período foi adicionado à amostra 980µL da solução de fenatrolina, seguido de um período de repouso de 1 hora. Após este período é realizada a medição da absorbância a 515nm em espectrofotômetro.

3.2.6 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM ARTEMIA SALINA

A toxicidade dos extratos foi testada contra larvas do microcrustáceo *Artemia salina*. Ovos foram depositados em uma solução de água salinizada por 48 horas para a eclosão dos crustáceos. Durante este período foi disponibilizada luz e aeração constante, a temperatura ambiente.

Após a eclosão 10 larvas foram colocadas por poço de placas de 24 poços. Os extratos secos foram solubilizados em água salinizada, idêntica à utilizada para eclosão dos ovos, nas concentrações de 1000, 500, 250, 125, 60 e 30 µL/mL. O controle negativo que consistiu apenas da solução de água salinizada.

Após um período de 24 horas, em temperatura ambiente, foi quantificado o número de larvas vivas e mortas em cada poço.

3.2.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana foi avaliada pela diluição dos extratos em placas de 96 poços e a determinação do crescimento microbiano foi realizada por leitura em espectrofotômetro. O controle positivo utilizado foi a oxitetraciclina a 125 µg/mL e como controle negativo, o próprio meio de cultura.

Os inóculos foram preparados com o auxílio de uma alça calibrada descartável, onde colônias bacterianas provenientes de culturas puras de 24 horas foram inoculadas em caldo Müeller Hinton e homogeneizadas. A turvação dos inóculos foi homogeneizada à turvação dos tubos a 0,5 da escala de MacFarland. Este valor, padrão para testes de atividade antimicrobiana corresponde à uma suspensão contendo aproximadamente $1-2 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC/mL).

Cada microrganismo-teste foi diluído na proporção de 1:20 e 10 µL de cada foi inoculado nas placas. Foram feitas diluições sucessivas do extrato (1000, 500, 250, 125, 62,25, 31,12 e 15,5 µg/mL), e em seguida, 100 µL de cada diluição foram adicionados em cada poço da placa. As placas foram incubadas, estacionárias, a 37°C por 24 horas.

Foram realizadas leituras de espectrofotômetro antes das placas serem levadas à estufa e após este período. As leituras da absorbância foram realizadas com comprimento de onda de 625 nm. A atividade inibitória foi obtida pelas diferenças das densidades ópticas entre essas duas leituras.

Os microrganismos utilizados foram doados pelo Laboratório de Micro-Organismos de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz: *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606; *Aeromonas hydrophila* IOC/FDA 110-36; *Candida albicans* ATCC 10231, CBS 6431; *Candida parapsilosis* ATCC 22019, CBS 604; *Citrobacter freundii* ATCC 8090; *Edwardsiella tarda* ATCC 15947; *Enterobacter cloacae* ATCC 13047; *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; *Escherichia coli* ATCC 11775; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883; *Morganella morganii* ATCC 00082; *Propionibacterium acnes* ATCC 6919; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145; *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 (NCTC 10038); *Salmonella enterica* ATCC 13076; *Serratia marcescens* ATCC 13880; *Staphylococcus aureus* ATCC 12600; *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228; *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610.

3.2.8 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) E ESPECTROMETRIA DE MASSA

Os extratos secos foram analisados por ressonância magnética nuclear de ^1H . 25mg de amostras secas dos extratos aquoso de folhas e aquoso de rizoma foram diluídas em água deuterada (D_2O). 25mg de amostras secas dos extratos metanólico de folhas e metanólico de rizoma foram diluídos em DMSO. O equipamento utilizado foi Bruker Fourier 300, operando em 300 MHz para o núcleo de H.

Para análise em espectrometria de massa as amostras secas dos extratos foram diluídas em mistura de água destilada e metanol na proporção 1:1, na concentração 1mg/mL. Em seguida 10 μL desta solução foram diluídos em 990 μL de mistura água destilada e metanol 1:1.

Os métodos utilizados foram a ionização electrospray positiva e negativa (ESI+ e ESI-) em um aparelho micrOTOF-Q Bruker Daltonics para buscar massas moleculares no intervalo de 50m/z a 900. A temperatura utilizada foi de 180°C e o fluxo a 5.0 L/min.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (CCDC)

A presença de metabólitos secundários foi observada em ambos os extratos brutos obtidos de folhas de *A. donax*. No entanto, os resultados variaram em função do método de extração, e o tipo de revelador utilizado para detectar os compostos. Ao analisar as placas cromatográficas que tiveram a aplicação de extratos metanólicos, de folhas e rizomas, podemos notar uma série de pontos que reagiram à luz ultravioleta na Figura 15 A/B. O que fica ainda mais evidente com uma comparação com a Figura 15C. Estas regiões de coloração diferente indicam a presença de compostos.

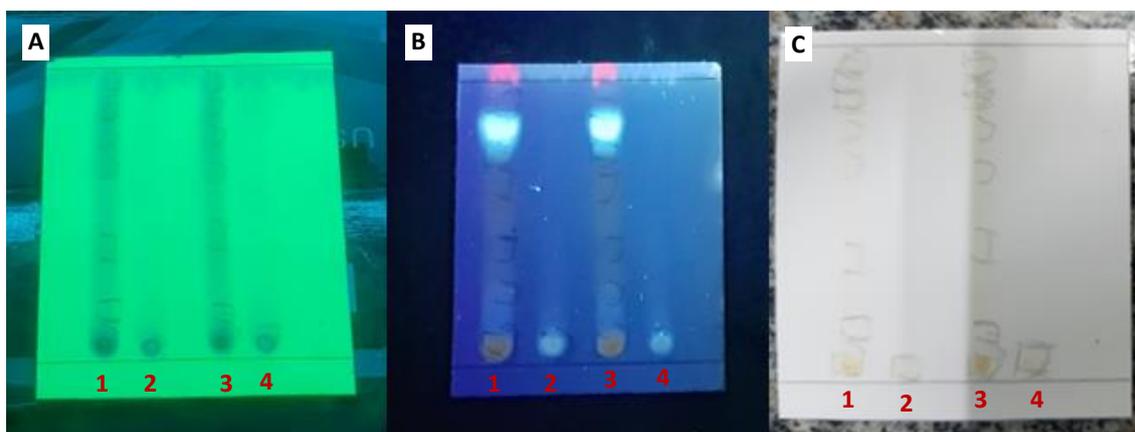


Figura 15. Fotografias das placas cromatográficas com extratos metanólicos de folhas e rizoma nas condições de luz UV 265nm (A), luz UV 354 (B) e luz natural (C), respectivamente. Extratos brutos de folhas (1 e 3) e rizomas (2 e 4).

O cloreto férrico apontou a presença de compostos fenólicos apenas no extrato metanólico foliar (Figura 16A). Não foi identificada a presença destes compostos em ambos os extratos de rizoma, bem como no extrato aquoso foliar (Figura 18^a).

O tratamento com NPPEG reagiu à presença de flavonoides em ambos os extratos foliares, embora de maneira mais evidente no extrato metanólico foliar do que no aquoso (Figuras 16C e 18C). Extratos de rizoma não reagiram ao revelador. Este resultado corrobora o observado por outros autores (AHRAR *et al.*, 2017; TEMIZ *et al.*, 2013) que identificaram as folhas como mais ativas que os rizomas na produção de metabólitos.

Observamos um resultado muito parecido com o cloreto férrico nas placas tratadas com dragendorff, em que apenas no extrato metanólico foliar foi possível observar a presença de alcaloides (Figuras 16B e 18B).

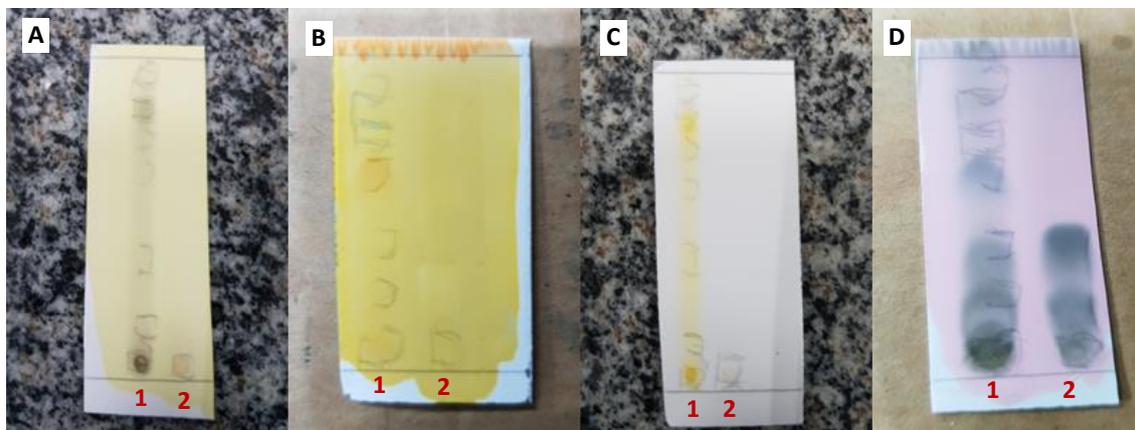


Figura 16. Fotografias das placas cromatográficas com extratos metanólicos de folhas e rizoma nas condições de cloreto férrico (A); dragendorff (B); npeg (C); anisoaldeído (D). Extratos metanólicos brutos de folhas (1) e rizomas (2).

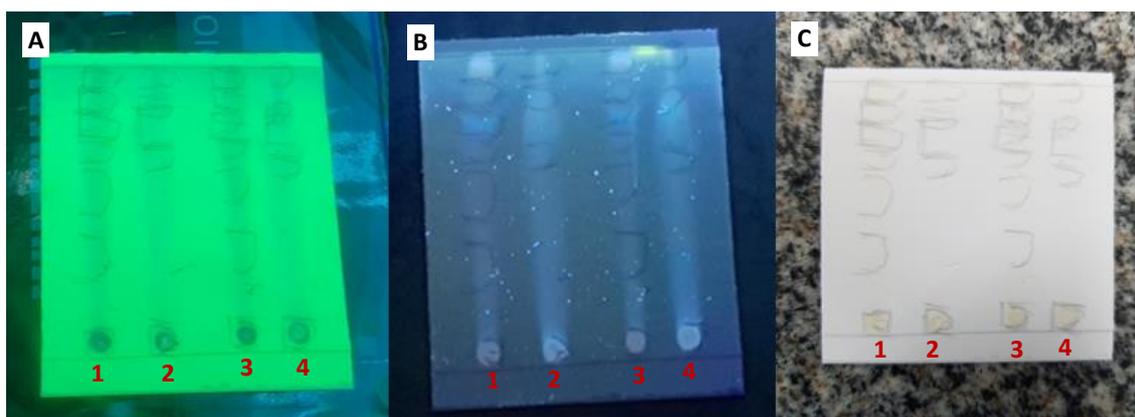


Figura 17. Fotografias das placas cromatográficas com extratos aquosos de folhas e rizomas nas condições de luz UV 265nm (A), luz UV 354 (B) e luz natural (C). Extratos brutos de folhas (1 e 3) e rizomas (2 e 4).

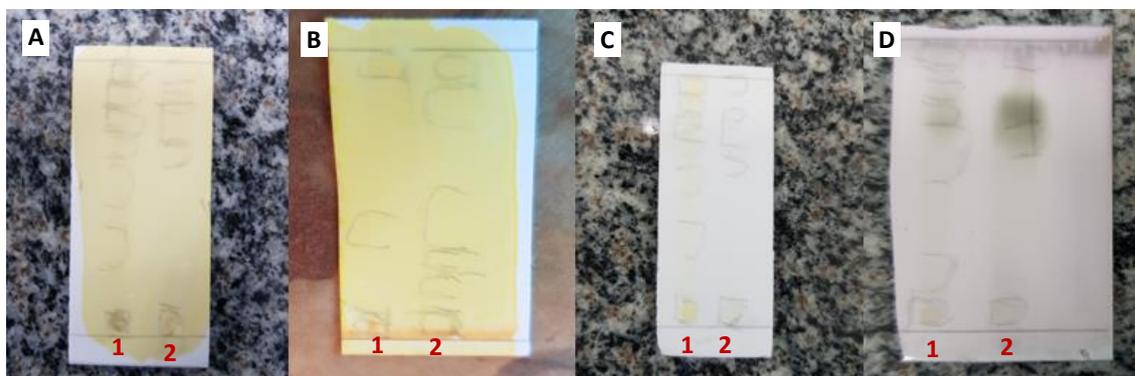


Figura 18. Fotografias das placas cromatográficas com extratos metanólicos de folhas e rizoma nas condições de cloreto férrico (A); dragendorff (B); npeg (C); anisoaldeído (D). Extratos metanólicos brutos de folhas (1) e rizomas (2).

A presença de alcaloides em folhas de *A. donax* (Figura 16B) confirma a informação da literatura, e que foi observado por outros autores para a espécie (HONG *et al.*, 2010). A detecção de alcaloides apenas no extrato metanólico contribui com as informações básicas sobre a polaridade destes alcaloides nas plantas que se estabeleceram na região Central do Brasil.

Por se tratar de um revelador mais geral, para diferentes classes de compostos, foi observado que todos os extratos reagiram ao tratamento com anisoaldeído, mas com intensidades diferentes (Figuras 16D e 18D). O extrato metanólico foliar reagiu ao revelador durante toda a extensão da corrida, enquanto ao seu lado o extrato metanólico de rizoma reagiu até um ponto mediano na placa. Os extratos aquosos de folhas e rizoma reagiram ao revelador apenas um ponto, com intensidade maior no extrato de rizoma.

Com relação ao rizoma, a análise preliminar mostrou que extratos brutos de rizomas, tanto metanólicos quanto aquosos, apresentaram baixa atividade biológica, quando comparado com os extratos brutos de folhas. O resultado positivo para a presença de metabólitos ocorreu apenas com anisoaldeído (Figuras 16D e 18D), mas estes resultados não podem ser conclusivos. Mesmo em número menor que para as folhas, alguns trabalhos identificaram e isolaram moléculas de alcaloides nos extratos de rizoma (KHUZHAEV *et al.*, 2004 A; KHUZHAEV *et al.*, 2004 B; ZANETTI, 2007). No entanto, o método de extração utilizado foi diferente (ZANETTI, 2007) ou não estava descrito (KHUZHAEV *et al.*, 2004 A; KHUZHAEV *et al.*, 2004 B). A constituição fibrosa e a dureza do tecido do rizoma torna difícil a obtenção dos extratos para análise.

Comparando as placas de luz UV 354 dos extratos metanólicos e aquosos (Figuras 15B e 17B) temos a indicação de que compostos fitoquímicos estão presentes em maior número nos extratos metanólicos, porém de forma quase exclusiva no extrato de folhas. Esta indicação foi corroborada com o resultado observado com os reveladores, onde novamente de forma quase exclusiva, compostos fitoquímicos estão presentes em maior número no extrato metanólico foliar.

Este resultado trás informações sobre o local de produção ou armazenamento e a polaridade dos compostos fitoquímicos de *Arundo donax*.

Produzidas majoritariamente nas folhas em relação ao rizoma, estas moléculas pertencem a diversas classes fitoquímicas, como alcaloides, flavonoides e outros compostos fenólicos. Sua polaridade está mais próxima ao metanol, solvente mais apolar do que a água.

O resultado observado é preliminar, indicativo para testes futuros. Estudos detalhados, com a otimização de protocolos de extração do material, e que avaliem o potencial bioativo dessa estrutura precisam ser realizados para que tenhamos um cenário mais realista da produção de compostos por *A. donax* e o impacto da planta na interação com outros organismos e com o meio ambiente.

3.3.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Comparando os valores encontrados nas medições do espectrofotômetro com o artigo de referência (MARTINS *et al*, 2014) temos o resultado de que nenhuma atividade antioxidante foi encontrada. Embora tenha havido diferença significativa na atividade dos diferentes extratos, nenhuma foi o suficiente para a caracterização como antioxidante. Este resultado foi o mesmo em ambos os testes (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados dos tentes antioxidantes com os métodos DPPH e Fe³⁺. Equiv = mg de extrato/ mg de ácido ascórbico.

	Método DPPH			Método Fe ³⁺		
	$ \Delta\text{ABS}_{517} $	[AA] _{eq}	Equiv.	[Fe ²⁺]	[AA] _{eq}	Equiv.
Folha MetOH	0,038	0,004	111,696	0,424	0,838	6,180
Riz MetOH	0,002	-0,317	-15,793	0,015	0,218	23,280
Folha H ₂ O	0,016	-0,195	-25,783	0,188	0,480	10,540
Riz H ₂ O	0,007	-0,272	-20,995	-0,017	0,170	30,620

Resultado similar foi observado na literatura. Extratos aquosos e metanólicos foliares de *A. donax* não tiveram atividade antioxidante no teste com o método DPPH (MENEZES *et al*, 2004; DALL'ACQUA *et al*, 2008). Não foi encontrado registro na literatura para atividade antioxidante em teste DPPH para extratos de rizoma de *A. donax*, bem como testes com Fe³⁺ ainda não haviam sido reportados na literatura, para esta espécie.

Moléculas que possuem esta atividade quando em estado isolado ou em frações de extratos podem não ser ativas quando diluídas em extratos brutos,

como os utilizados neste trabalho. Desta forma os resultados encontrados nos testes realizados não são suficientes para se descartar a possibilidade de que *Arundo donax* produza moléculas com propriedade antioxidante. Experimentação adicional é necessária para obter a resposta concreta.

3.3.3 ARTEMIA SALINA

Muito utilizado na pesquisa de fitoquímica pela facilidade de realização, o teste com o microcrustáceo *Artêmia salina* é um bom indicativo preliminar da citotoxicidade do material (LHULLIER *et al*, 2006). Sua análise é baseada na concentração letal mediana, ou CL50, concentração em µg/ml que causa a morte de metade dos organismos testados.

Para que seja confirmado a citotoxicidade da amostra no teste de *Artemia salina* a CL50 deve ser igual ou menor do que 30µg/mL (MEYER *et al*, 1982). Nenhuma das concentrações dos extratos reduziu o número de larvas de *Artemia salina* abaixo de 50% (Figura 7).

Tabela 2. Citotoxicidade dos extratos de arundo donax expresso em porcentagem de larvas vivas de *A. salina* após o tratamento.

Extrato	Concentração utilizada (µg/mL)						Controle
	1000	500	250	125	60	30	
Folha MetOH	86%	90%	83%	96%	93%	93%	96%
Riz MetOH	93%	90%	96%	93%	93%	96%	96%
Folha H2O	76%	86%	96%	96%	90%	96%	96%
Riz H2O	80%	90%	90%	100%	100%	93%	96%

Podemos afirmar que nenhum dos quatro extratos apresentou atividade citotóxica significativa para *Artemia salina*. Extratos aquosos produzidos a partir da parte aérea inteira de *Arundo donax* (folhas e caule) não foram significativamente citotóxicos contra *A. salina*, enquanto extratos etanólicos deste material foi citotóxico (BUSSMANN *et al*, 2011). Não haviam dados na literatura para extratos metanólicos brutos de *A. donax*.

Arundo donax é uma espécie muitas vezes encontrada às margens de rios e lagos, onde possuem sua condição ideal de água em abundância.

Compostos ativos presentes nos rizomas ou em fragmentos da parte aérea podem ser lavados para o corpo d'água e interferir através do meio líquido em outras espécies vegetais e microorganismos (GOPAL e GOEL, 1993).

Faltam informações na literatura quanto ao impacto que *A. donax* poderia ter em corpos d'água. Este resultado com um microcrustáceo bioindicador da qualidade da água contribui com novas informações neste aspecto.

3.3.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

De maneira geral não houve efeito inibitório do crescimento nos microorganismos testados, em relação ao controle (Figuras 19 a 22). Enquanto alguns microorganismos não reagiram ao tratamento, o resultado mais expressivo foi o estímulo ao crescimento, observado em grande parte das culturas.

Muitos alcaloides e flavonoides possuem atividade antimicrobiana (COWAN, 1999). Desta forma os resultados observados são contrastantes com outros resultados observados neste trabalho e com a literatura. Porém, embora não tenha sido observado efeito inibitório no crescimento dos microorganismos testados, não é possível afirmar que não há compostos com efeito antimicrobiano nestes extratos. Extratos brutos e as substâncias isoladas destes podem ter resultados muito diferentes (RAUHA *et al*, 2000).

O resultado dos microorganismos tratados com diluições do extrato aquoso de folhas (Figura 19) é similar ao resultados do extrato aquoso de rizomas (Figura 20). É possível observar que não houve inibição do crescimento dos microorganismos testados com estes extratos, em relação ao controle negativo.

Em diversos microorganismos testados os tratamentos mais concentrados (1000, 500 e 250 µg/mL) estimularam a proliferação, enquanto tratamentos menos concentrados (125, 60 e 30 µg/mL) não causaram diferença significativa.

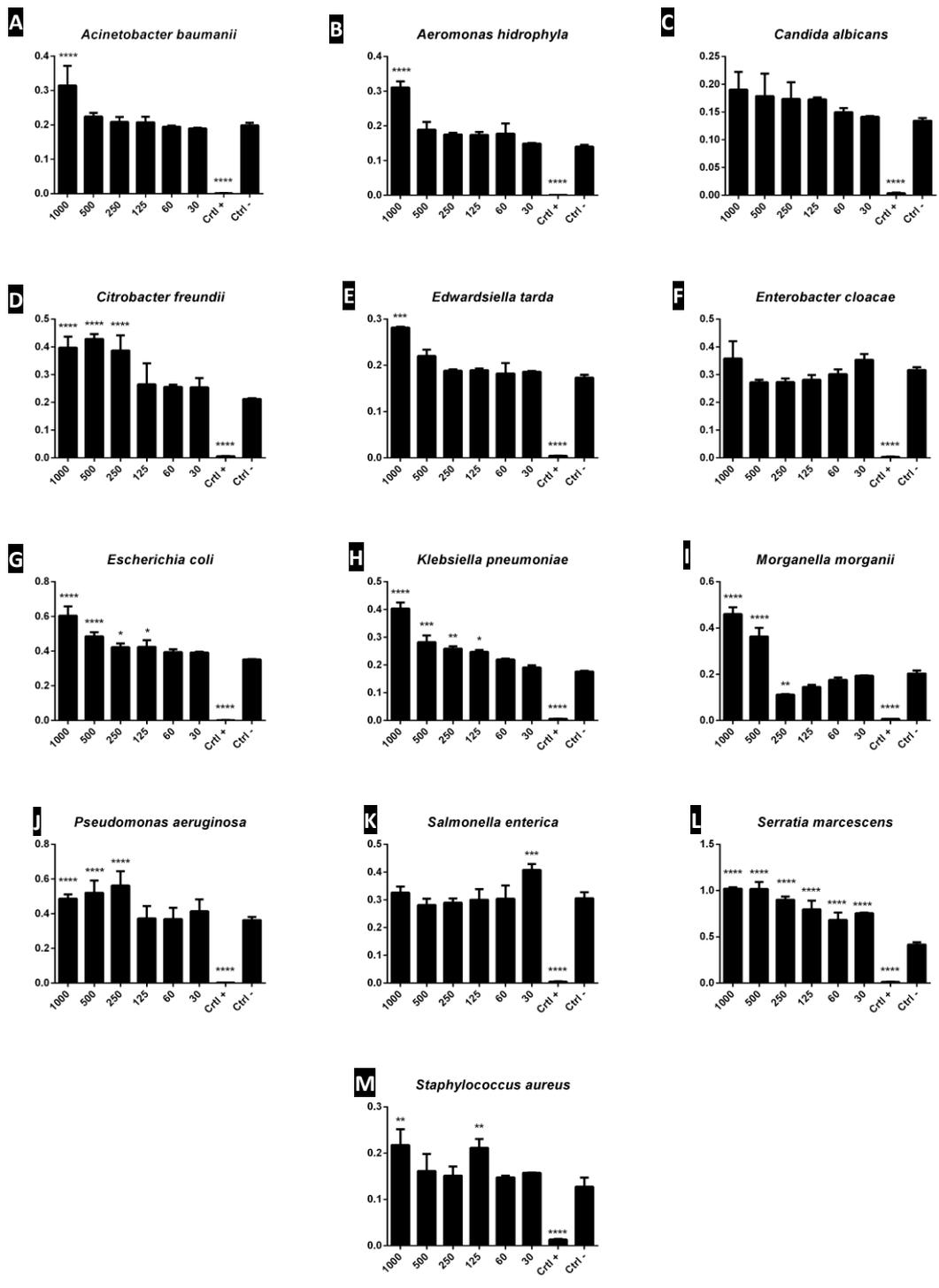


Figura 19. Resultados do teste antimicrobiano com diferentes diluições do extrato aquoso de folhas. **** representam diferentes níveis de significância.

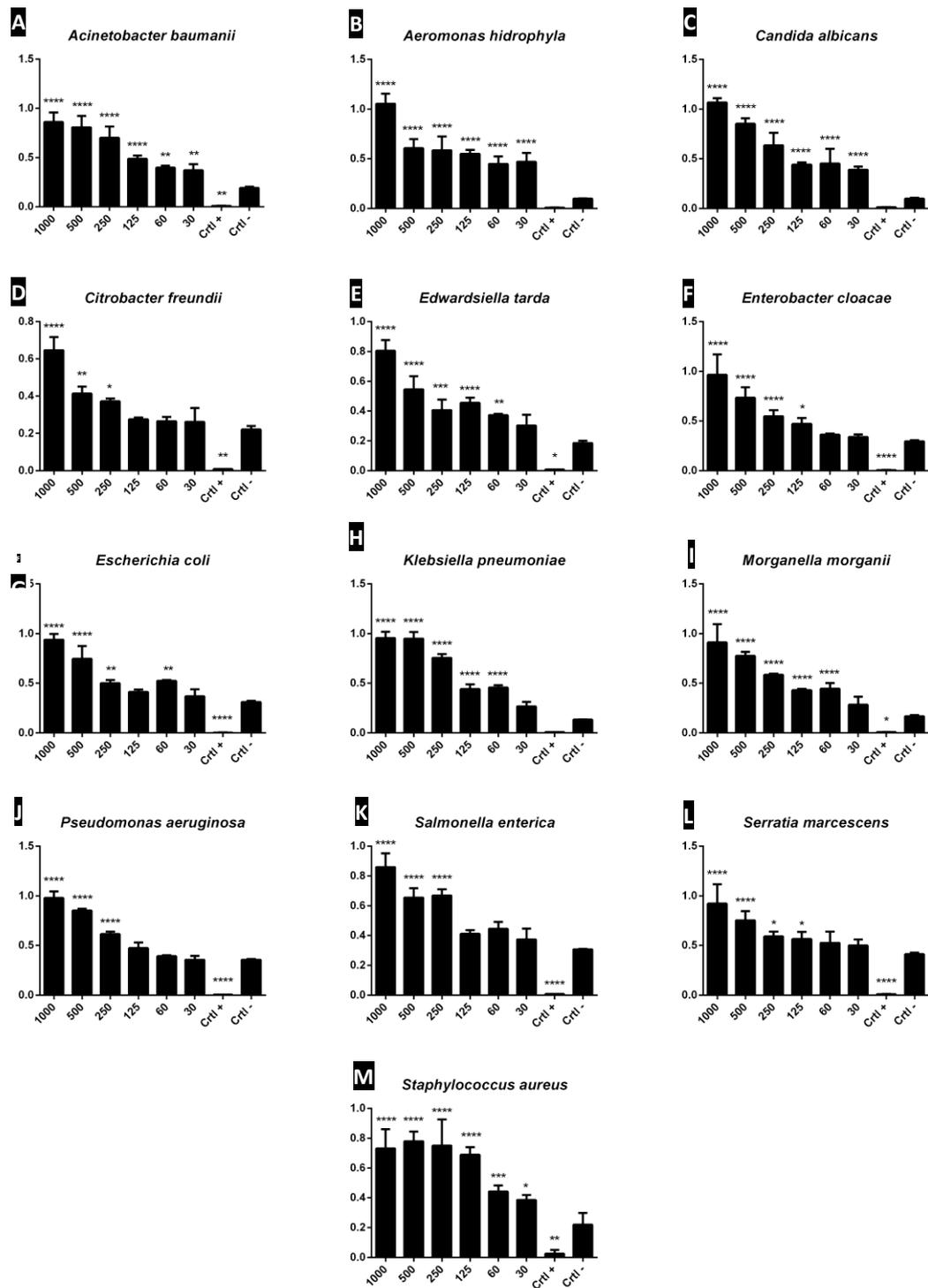


Figura 20. Resultados do teste antimicrobiano com diferentes diluições do extrato aquoso de rizoma. **** representam diferentes níveis de significância.

Houve pouca variação significativa do crescimento dos microorganismos tratados com extrato metanólico de folhas (Figura 21). Embora tenha sido observado estímulo do crescimento em alguns tratamentos, este resultado não

foi unânime. Não houve variação significativa do crescimento dos microorganismos na maioria dos tratamentos.

Acinobacter baumannii, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* apresentaram inibição do crescimento. Contudo, em nenhum destes três microorganismos esta inibição ocorreu em mais de dois tratamentos diferentes, dificultando a análise mais detalhada deste resultado.

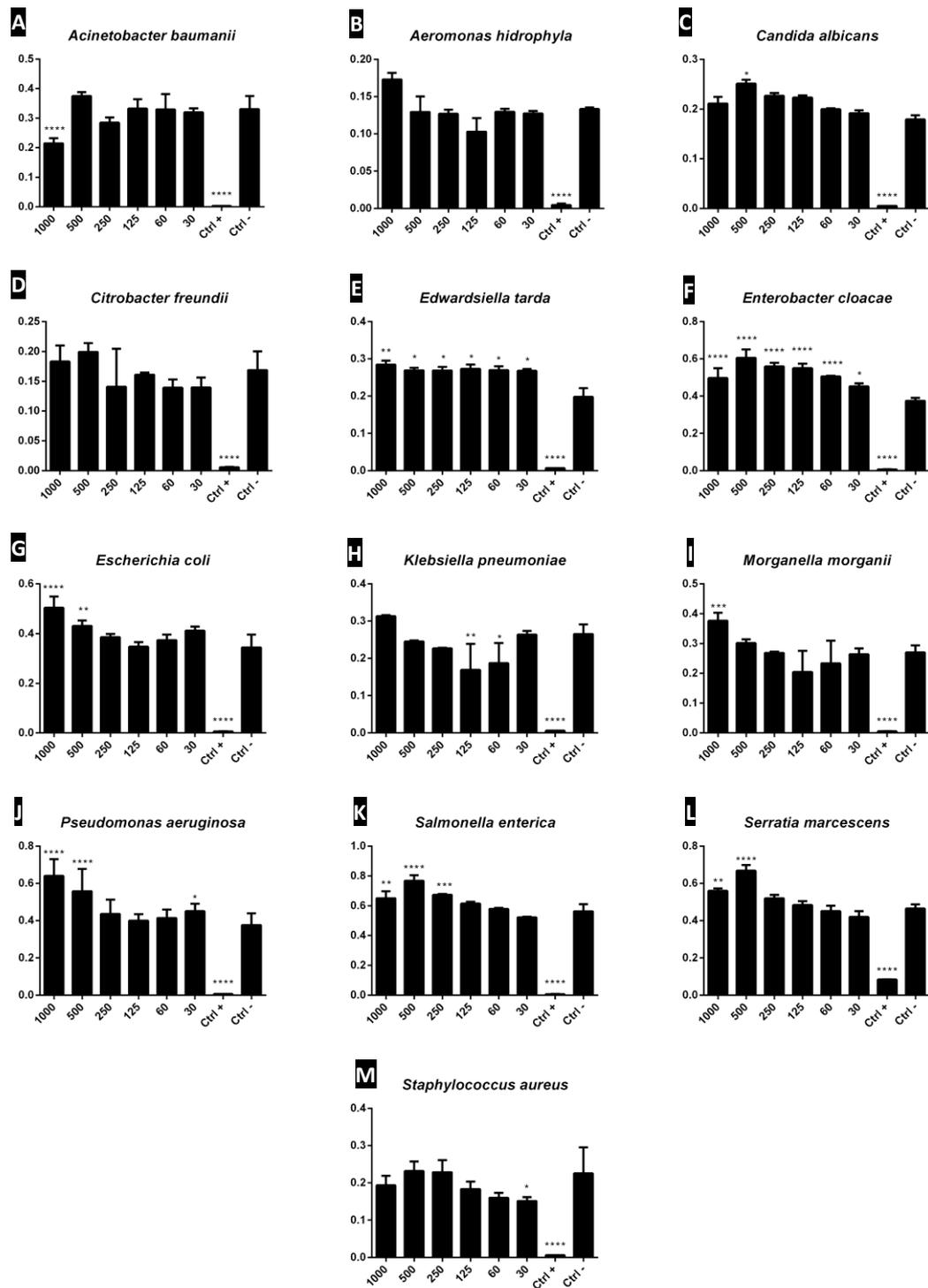


Figura 21. Resultados do teste antimicrobiano com diferentes diluições do extrato metanólico de folhas. **** representam diferentes níveis de significância.

Microorganismos tratados com diluições do extrato metanólico de rizomas apresentaram resultados variados (Figura 22). Enquanto alguns microorganismos proliferaram quando tratados com este extrato, também

podemos observar a maior inibição de crescimento dentre todos os quatro extratos testados.

Morganella morganii e *Edwardstella tarde* sofreram inibição do crescimento nos tratamentos menos concentrados (250, 125, 60 e 30 µg/mL). *Klebsiella pneumoniae* foi o microorganismo que apresentou maior inibição do crescimento dentre todos os testados, de maneira inversamente proporcional à concentração do tratamento.

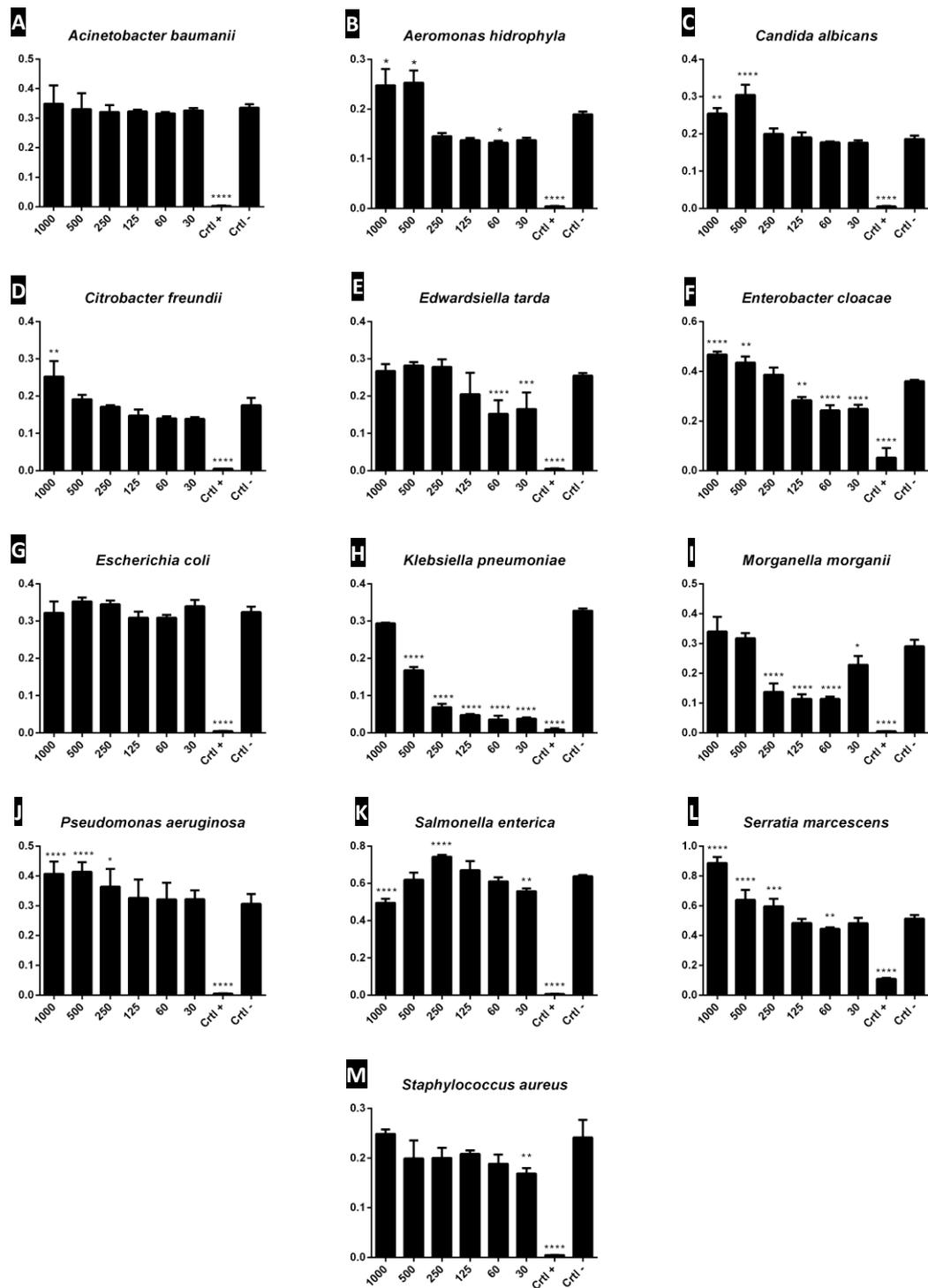


Figura 22. Resultados do teste antimicrobiano com diferentes diluições do extrato metanólico de folhas. **** representam diferentes níveis de significância.

Comparando os resultados para os extratos aquosos (Figuras 19 e 20) e para os extratos metanólicos (Figuras 21 e 22) é possível observar que o estímulo ao crescimento dos microorganismos testados é muito mais expressivo

nos tratamentos com extratos aquosos. Isto ocorre possivelmente devido à maior concentração de açúcares nos extratos aquosos, devido à maior solubilidade destas moléculas na água do que em álcoois (BOUCHARD *et al*, 2007). Contudo, experimentação adicional é necessária para melhor explorar esta hipótese.

Diferentemente do metanol, um solvente orgânico, a água é um solvente que ocorre naturalmente nos ecossistemas. Desta forma existe a possibilidade do resultado de estímulo ao crescimento microbiano encontrado com os tratamentos de extratos aquosos ocorrer em situação de campo.

Atenção extra deve ser prestada ao extrato aquoso de rizomas, considerando que esta é uma estrutura subterrânea, que fica em direto contato com a microbiota do solo. Desta forma durante uma invasão de *Arundo donax*, quando essa espécie se insere em um novo ecossistema ela pode ter um impacto sobre a microbiota do solo. Impacto este não de inibição, mas de estímulo, com proliferação acelerada destes microorganismos.

Ensaio antimicrobianos com microorganismos da microbiota específica do cerrado são necessários para se avaliar o real impacto que esta espécie pode causar aos microorganismos durante sua invasão.

3.3.5 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) E ESPECTROMETRIA DE MASSA

3.3.5.1 RMN

É possível observar em todos os espectros obtidos uma grande aglomeração de sinais na faixa de deslocamento químico entre 3 e 5 ppm, região característica de açúcares (Figuras 23 a 26). Contudo, também é possível observar a presença de sinais na faixa de deslocamento químico entre 6 e 8 ppm, região característica de estruturas aromáticas.

Um indicativo da presença de alcaloides em um espectro de RMN de ¹H é a detecção de sinais com deslocamento químico na faixa de 4-7 ppm (DIJKSTRA *et al*, 1989; DIJKSTRA *et al*, 1990. LOGIE *et al*, 1994). Podemos observar pequenos sinais nesta faixa em todos os extratos testados (Figuras 23 a 26).

Análises de RMN de ^1H com alcaloides isolados de raízes (ZHALOLOV *et al*, 2002; KHUZHAEV *et al*, 2004 C). e de rizomas (KHUZHAEV *et al*, 2004 A; JIA *et al*, 2008) de *A. donax* indicam a presença de diversos sinais de hidrogênios com deslocamento químico na faixa de 6 a 8 ppm.

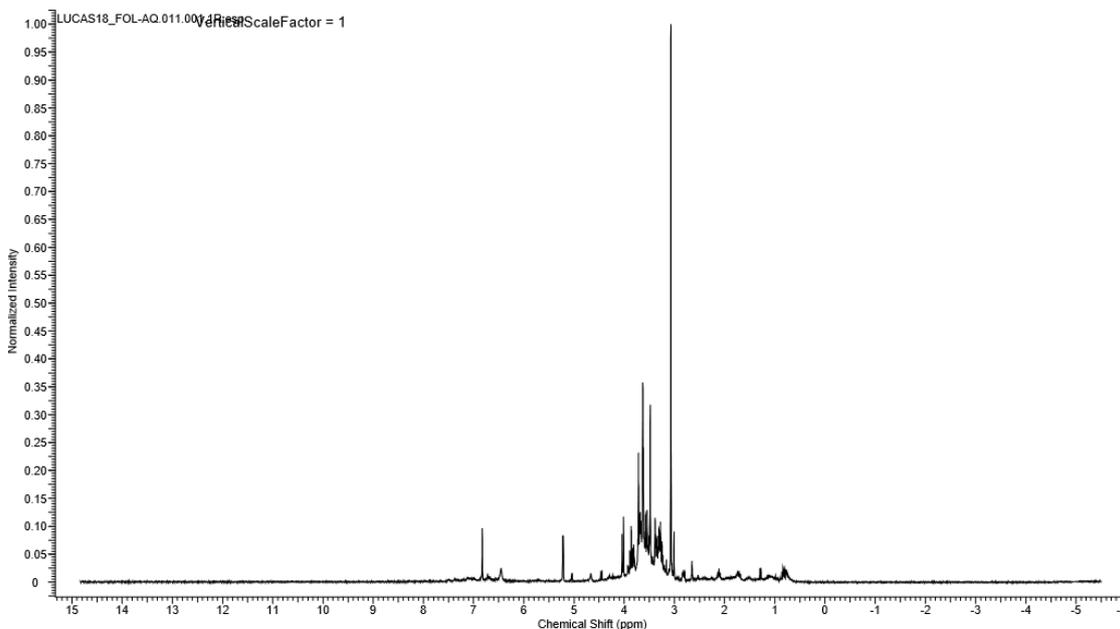


Figura 23. Espectro de RMN de ^1H para o extrato aquoso bruto de folhas de *Arundo donax*.

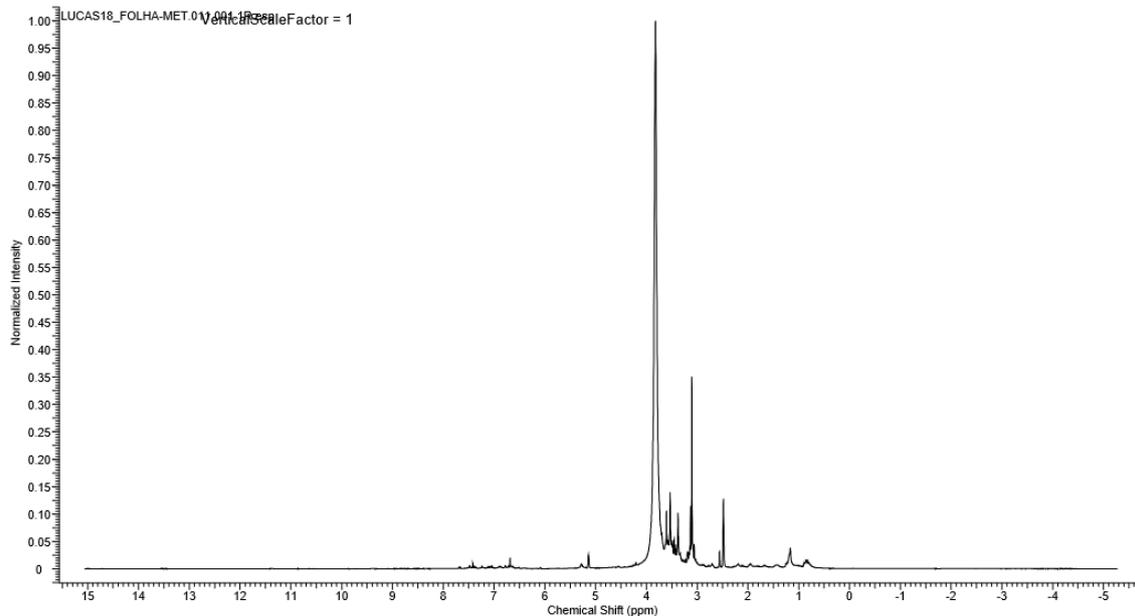


Figura 24. Espectro de RMN de ^1H para o extrato metanólico bruto de folhas de *Arundo donax*.

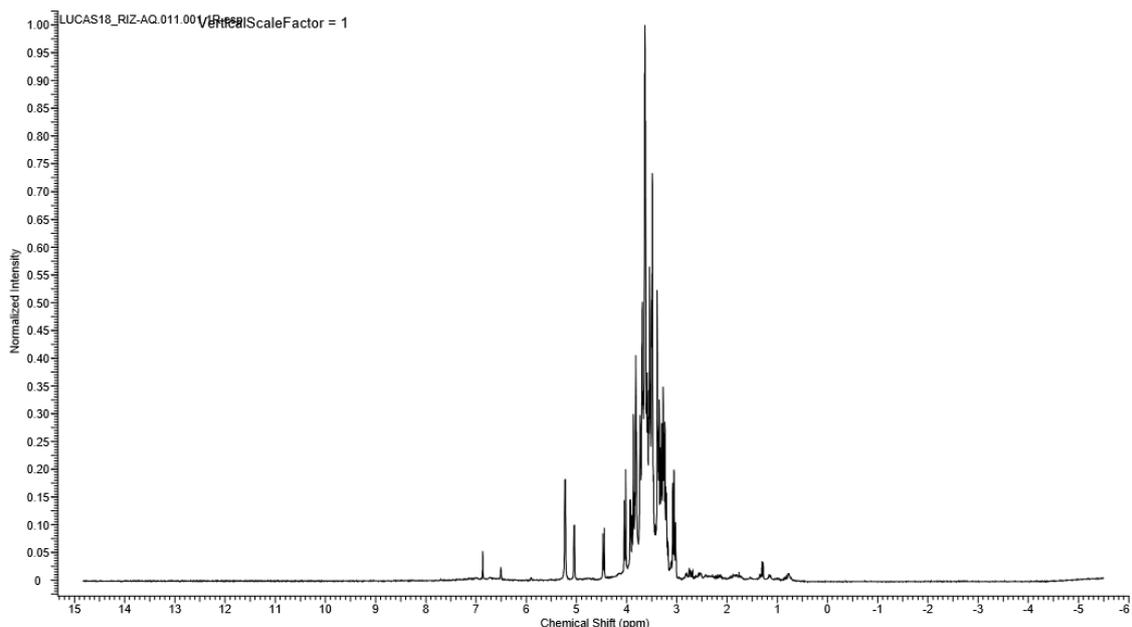


Figura 25. Espectro de RMN de ^1H para o extrato aquoso bruto de rizomas de Arundo donax.

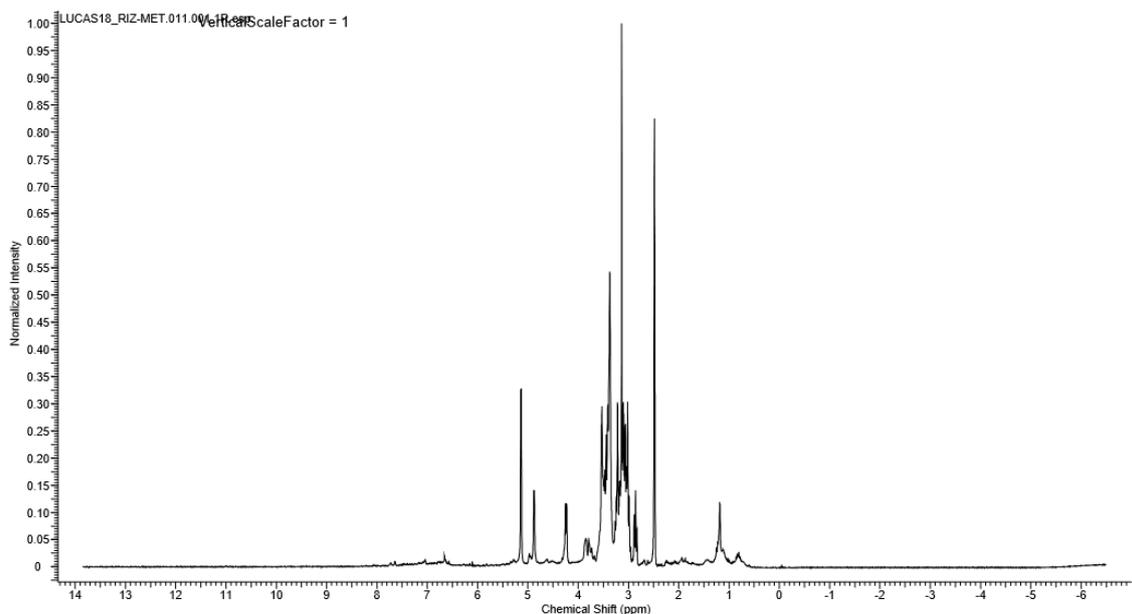


Figura 26. Espectro de RMN de ^1H para o extrato metanólico bruto de rizomas de Arundo donax.

O resultado obtido indica a presença majoritária de açúcares em todos os extratos testados, o que pode explicar outros resultados observados no atual capítulo deste trabalho. O resultado de estímulo ao crescimento de microorganismos observado no ensaio antimicrobiano (3.3.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, página 55, Figuras 19 a 22), e a presença de coloração nas placas cromatográficas tratadas com o revelador anisoaldeído (3.3.1

CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (CCDC), Página 51 ,Figuras 16D e 18D) podem ser explicadas pela grande presença de carboidratos observada.

Há indicação da presença de alcaloides nos extratos, com destaque para os extratos metanólicos. Contudo, este resultado foi limitado pela própria natureza dos extratos brutos. A grande quantidade de sinais presentes no espectro mascara os sinais possivelmente interessantes, impedindo análises mais detalhadas.

São necessárias novas análises de RMN de ^1H nestes mesmos parâmetros com subfrações dos extratos produzidos, a fim de se obter resultados mais específicos, como identificação de moléculas.

3.3.5.2 ESPECTROMETRIA DE MASSA

As moléculas identificadas pela espectrometria de massa foram comparadas com os diversos alcaloides identificados em *Arundo donax* em busca de correspondência (ZHALOLOV *et al*, 1998; ZHALOLOV *et al*, 2002; KHUZHAEV *et al*, 2002; KHURZHAEV *et al*, 2004 C; HONG *et al*, 2010;). Destas dezenas de moléculas, apenas duas obtiveram correspondência.

O íon de massa 175,0162 m/z (Tabela 3) possui massa correspondente à gramina, porém há divergência quanto à fórmula química (HONG *et al*, 2010). Enquanto a fórmula proposta para o íon é $\text{C}_8\text{H}_3\text{N}_2\text{O}_2$, a fórmula química da gramina é $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2$. A mesma divergência ocorre entre a fórmula proposta para o íon de massa 387,1182 m/z (Tabela 4), $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}$, e a arundarina, $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{N}_4$ (KHURZHAEV *et al*, 2004 C).

Tabela 3. Compostos encontrados por espectrometria de massa, com o método ESI+ nos quatro extratos analisados. Compostos marcados com * estão presentes em mais de um extrato.

Ex. Aquoso de folhas		Ex. metanólico de folhas		Ex. Aquoso de rizomas		Ex. Metanólico de rizomas	
Massa	Fórmula	Massa	Fórmula	Massa	Fórmula	Massa	Fórmula
118,0866	C5H12NO2*	118,0855	C5H12NO2*	203,0518	C4H7N6O4*	203,0522	C4H7N6O4*
125,0532	C3H5N6	130,0639	C9H8N	365,1049	C10H17N6O9*	365,1053	C10H17N6O9*
140,0670	C3H6N7*	140,0667	C3H6N7*	383,1126	C21H19O7		
150,1121	C6H16NO3	156,0405	C5H6N3O3*				
156,0412	C5H6N3O3*	161,0106	C6HN4O2*				
161,0116	C6HN4O2*	175,0162	C8H3N2O3				
179,0218	C6H3N4O3	193,0265	C9HN6				
203,0518	C4H7N6O4*	203,0508	C15H7O				
219,0500	C9H7N4O3	365,1018	C21H17O6				
365,1035	C9H21N2O13	381,0766	C9H9N12O6				
381,0778	C10H5N16O2						

Tabela 4. Compostos encontrados por espectrometria de massa, com o método ESI- nos quatro extratos analisados. Compostos marcados com * estão presentes em mais de um extrato.

Ex. Aquoso de folhas		Ex. metanólico de folhas		Ex. Aquoso de rizomas		Ex. Metanólico de rizomas	
Massa	Fórmula	Massa	Fórmula	Massa	Fórmula	Massa	Fórmula
X	X	277,2129	C13H29N2O4	179,0562	C6H11O6	291,2020	C12H27N4O4
		341,1099	C13H17N4O7	291,1998	C18H27O3	387,1182	C16H11N12O
		367,1054	C18H15N4O5	341,1094	C12H21O11		
		387,1163	C14H19N4O9	387,1150	C13H23O13		
		447,0958	C23H11N8O3				
		461,1108	C23H17N4O7				

As fórmulas presentes nas Tabelas 3 e 4 foram propostas pelo próprio instrumento, baseadas em um score de confiança. É necessária a busca destas substâncias em banco de dados para a comprovação de suas estruturas moleculares.

Embora diversas moléculas tenham sido identificadas (Tabelas 3 e 4), possivelmente nem todas são fitoquímicos de interesse. A partir do subfracionamento dos extratos brutos produzidos, e do teste destas frações para atividade é possível direcionar a espectrometria de massa para identificação precisa de compostos fitoquímicos de interesse ecológico ou comercial.

3.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHRAR, M. DONEVA, D. TATTINI, M. BRUNETTI, C. GORI, A. RODEGHIERO, M. WOHLFAHRT, G. BIASIOLI, F. VAROTTO, C. LORETO, F. VELIKOVA, V. Phenolic Difference Determine Drought Stress Responses in Ecotypes of *Arundo donax* Adapted to Different Environment. *Journal of Experimental Botany*. V. 68, 9. Pp 2439-2451. 2017.

AL-SNAFI, A. The Constituents and Biological Effects of *Arundo donax* – a Review. *International Journal of Phytopharmacy Research*. V. 6, 1. Pp 34-40. 2015.

BOUCHARD, A. HOFLAND, G. WITKAMP, G. Properties of Sugar, Polyol, and Polysaccharide Water-Ethanol Solutions. *Journal of Chemical and Engineering Data*. V. 52, 5. Pp 1838-1842. 2007.

BROWN, C. WATKINS, J. ELDRIDGE, D. Repression of bacteria and fungi by the army ant secretion: skatole. *Journal of the Kansas Entomological Society*. V. 52, 1. Pp 119-122. 1979.

BUSSMANN, R. MALCA, G. GLENN, A. SHARON, D. NILSEN, B. PARRIS, B. DUBOSE, D. RUIZ, D. SALEDA, J. MARTÍNEZ, M. CARILLO, L. WALKER, K. KUHLMAN, A. TOWNESMITH, A. Toxocity of Medicinal Plants Used in Traditional Medicine in Northern Peru. *Journal of Ethnopharmacology*. V. 137, 1. Pp 121-140. 2011.

CALINA, D. OLAH, N. PATRU, M. DOCEA, A. POPESCU, H. BUBULICA, M. Chromatografic Analysis of the Flavonoids from *Robinia pseudoacacia* Species. *Current Health Sciences Journal*. V. 39, 4. 2013.

COWAN, M. Plant Product as Microbial Agents. *Clonical Microbiology Reviews*. V. 12, 4. Pp 564-582. 1999.

DALL'ACQUA, S. CERVELLATI, R. LOI, M. INNOCENTI, G. Evaluation of In Vitro Antioxidant Properties of some Traditional Sardinian Medicinal Plants: Investigation of the High Antioxidant Capacity of *Rubus ulmifolous*. *Food Chemistry*. V. 106. Pp 745-749. 2008.

DIJKSTRA, G. KELLOG, R. WYNBERG, H. SVENDSEN, J. MARKO, I. SHARPLESS, K. Conformational Study of Cinchona Alkaloids. A Combined NMR, Molecular Mechanics, and X-ray Approach. *Journal of the American Chemical Society*. V. 111, 21. Pp 8070- 8076. 1989.

DIJKSTRA, G. KELLOG, R. WYNBERG, H. Conformational Study of Cinchona Alkaloids. A Combined NMR and Molecular Orbital Approach. *Journal of Organic Chemistry*. V. 55, 25. Pp 6121-6131. 1990.

GOPAL, B. GOEL, U. Competition and Allelopathy in Aquatic Plant Communities. *The Botanic Review*. V. 59, 3. Pp 155-210. 1993.

HONG, Y. HU, H. SAKODA, A. SAGEHASHI, M. Isolation and characterization of antialgal allelochemicals from *Arundo donax* L. *Allelopathy Journal*. V. 25, 2. Pp 357-368. 2010.

JIA, A. DING, X. CHEN, D. CHAO, Z. LIU, Z. CHAO, R. A New Indole Alkaloid from *Arundo donax* L.. *Journal of Asian Natural Products Research*. V. 10, 2. Pp 105-109. 2008.

JORK, H. FUNK, W. FISCHER, W. WIMMER, H. Thin-layer Chromatography, Reagents and Detection Methods. VCH Verlagsgesellschaft mbH, D-6940 Weinheim (Federal Republic of Germany). 1990.

KHUZHAEV, V. ZHALOLOV, I. LEVKOVICH, M. ARIPOVA, S. SHASHKOV, S. Alkaloids of *Arundo donax*. XII. Structure of New Dimeric Indole Alkaloid Arundacine. *Chemistry of Natural Compounds*. V. 28, 3. Pp 234-236. 2002.

KHUZHAEV, V. ZHALOLOV, I. TURGUNOV, K. TASHKHODZHAEV, B. LEVKOVICH, M. ARIPOVA, S. SHASHKOV. A. Alkaloids from *Arundo donax*. XVII. Structure of the Dimeric Indole Alkaloid Arundaphine. *Chemistry of Natural Compounds*. V. 40, 3. 2004.

KHUZHAEV, V. ZHALOLOV, I. TURGUNOV, K. TASHKHODZHAEV, B. LEVKOVICH, M. ARIPOVA, S. SHASHKOV. A. Alkaloids from *Arundo donax*. XVII. Structure of the Dimeric Indole Alkaloid Arundavine. *Chemistry of Natural Compounds*. V. 40, 3. Pp 220-224. 2004.

- KHUZHAEV, V. ZHALOLOV, I. LEVKOVICH, M. ARIPOVA, S. SHASHKOV, S. Alkaloids of *Arundo donax* L. 15.* A New Dimeric Alkaloids Arundarine from the Roots of *Arundo donax* L.. Russian Chemical Bulletin, International Edition. V. 53, 8. Pp 1765-1767. 2004.
- LHULLIER, C. HORTA, P. FALKENBERG, M. Avaliação de Extratos de Macroalgas Bênticas do Litoral Catarinense Utilizando Teste de Letalidade para *Artemia salina*. Revista Brasileira de Farmacognosia. V. 16, 2. Pp 158-163. 2006.
- LOGIE, C. GRUE, M. LIDDELL, J. Proton NMR Spectroscopy of Pyrrolizidine Alkaloids. Phytochemistry. V. 37, 1. Pp 43-109. 1994.
- MARTINS, D. FACHIN-ESPINAR, M. OLIVEIRA, T. LIMA, K. CAVALCANTI, R. TELES, B. NUNEZ, C. Phytochemical Prospection and Biological Activity of *Duroia macrophylla* (Rubiaceae). Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research. V. 2, 6. Pp 158-171. 2014.
- MATSUO, H. TANIQUCHI, K. HIRAMOTO, T. YAMADA, T. ICHINOSE, Y. TOYADA, K. TAKEDA, K. SHIRAISHI, T. Gramine increase associated with rapid and transient systemic resistance in barley seedlings induced by mechanical and biological stress. Plant Cell Physiology. V. 42, 10. Pp 1103-1111. 2001.
- MENEZES, P. SCHWARTZ, E. SANTOS, C. In Vitro Antioxidant Activity of Species Collected in Paraná. Fitoterapia. V. 75. Pp 398-400. 2004.
- MEYER, B. FERRIGNI, N. PUTNAM, J. JACOBSEN, L. NICHOLS, D. MCLAUGHLING, J. Brine Shrimp: A Convenient General Bioessay for Active Plant Constituents. Journal of Medical Plant Research. V. 45. Pp 31-34. 1982.
- PASCUAL, M. CARRETERO, . SLOWING, K. VILLAR, A. Simplified Screening by TLF of Plant Drugs. Pharmaceutical Biology. V. 40, 2. Pp 139-143. 2002.
- PERES, J. CARVALHO, L. GONÇALEZ, E. BERIAN, L. FELICIO, J. Evaluation of Antifungal Activity of Seaweed Extractcs. Ciência e Agrotecnologia. V. 26, 3. 2012.
- RAUHA, J. REMES, S. HEINONEN, M. HOPIA, A. KÄHKÖNEN, M. KUJALA, T. PIHLAJA, K. VUORELA, H. VUORELA, P. Antimicrobial Effects of Finnish Plant

Extracts Containing Flavonoids and other Phenolic Compounds. International Journal of Food Microbiology. V. 56. Pp 3-12. 2000.

TEMIZ, A. AKBAS, S. PANOV, D. TERZIEV, N. ALMA, M. PARLAK, S. KOSE, G. Chemical Composition and Efficiency of Bio-oil Obtained from Giant Cane (*Arundo donax* L.) as a Wood Preservative. Bio Resources. V. 8, 2. Pp 2084-2098. 2013.

TNC, THE NATURE CONSERVANCY. 2009. Programa de Espécies Exóticas Invasoras para a América do Sul. Contextualização Sobre Espécies Exóticas Invasoras – Dôssie Pernambuco.

ZANETTI, G. D. Lectina dos rizomas de *Arundo donax* L.: purificação, determinação de características e propriedades, imuno-histoquímica e separação de suas isoformas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Tese de Doutorado. 2007.

ZHALOLOV, Z. CHUZHAEV, V. TASHKHODZHAEV, B. Alkaloids of *Arundo donax* VII. A Spectroscopic and X-ray Structural Investigation of Arundinine – a New Dimeric Alkaloids from the Epigeal Part of *Arundo donax*. Chemistry of Natural Compounds. V. 34, 6. 790-795. 1998.

ZHALOLOV, Z. KHUZHAEV, V. LEVKHOVIC, M. ARIPOVA, S. SHASHKOV, A. Alkaloids of *Arundo donax*. XI. NMR Spectroscopic Study of the Structure of the Dimeric Alkaloid Arundamine. Chemistry of Natural Compounds. 2002.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho contribuiu na comprovação e na explicação do processo de alelopatia em *Arundo donax*. Ambos as folhas e os rizomas desta espécie possuem atividade alelopática, com inibição do crescimento observada em todas as espécies alvo testadas.

Embora presente nas duas estruturas testadas, a inibição do crescimento das espécies alvo é marcante nos tratamentos com extratos foliares, afirmando a grande importância desta estrutura para a alelopatia de *Arundo donax*. Desta forma temos a indicação de que compostos alelopáticos nesta espécie estão presentes em maior número nas folhas do que nos rizomas.

Aleloquímicos desta espécie possuem afinidade maior com o metanol do que com a água. Este fato foi observado nos bioensaio com extratos aquosos e metanólicos, e reafirmado nos testes fitoquímicos realizados.

Baseado nos ensaios realizados neste trabalho e na literatura podemos apontar a presença de alcaloides, flavonoides e outros compostos fenólicos. A presença destes compostos nos extratos brutos de *Arundo donax* no entanto não se traduziu em atividade anti-oxidante, citotóxica ou anti-microbiana

Embora este trabalho tenha avançado o conhecimento de alelopatia e fitoquímica nesta espécie invasora do Distrito Federal, *Arundo donax* ainda possui um potencial fitoquímico de grande magnitude. É necessária ainda extensiva experimentação para percorrer todo o caminho restante.