

Avaliação alelopática de *Tithonia diversifolia* na germinação e no crescimento inicial de *Bidens pilosa* e *Brachiaria brizantha*

Paulo Vinicius Anderson de Oliveira

Suzelei de Castro França

Unidade de Biotecnologia, Universidade de Ribeirão Preto, ppreira@pq.cnpq.br

Marcelo Bregagnoli

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais, campus Muzambinho

Paulo Sérgio Pereira

Unidade de Biotecnologia, Universidade de Ribeirão Preto

Resumo

O objetivo deste projeto foi de avaliar o potencial alelopático do extrato e frações purificadas das espécies vegetais *Tithonia diversifolia* na germinação de *Brachiaria brizantha* e *Bidens pilosa*. A germinação foi avaliada quanto aos aspectos: percentual de germinação, velocidade de germinação, número de folhas, altura das plântulas, tamanho das raízes, peso e sobrevivência das mesmas. Os resultados obtidos permitiram concluir que *Tithonia diversifolia* mostrou-se tóxico para as plantas daninhas utilizadas. Adicionalmente, devido a inibição da germinação e o retardamento do desenvolvimento radicular e aéreo ficou confirmado o efeito alelopático do ácido clorogênico isolado desta espécie.

Palavras-chave: *Tithonia diversifolia*; Ácido clorogênico; Alelopatia.

Allelopathic effect of *Tithonia diversifolia* on germination and early seedling growth of *Bidens pilosa* and *Brachiaria brizantha*

Abstract

The aim of this work was to evaluate the allelopathic potential of crude extracts and purified fractions of *Tithonia diversifolia* in the germination process of *Brachiaria brizantha* and *Bidens pilosa*. Several germination parameters were investigated: proportion of germination, growth rate, number of leaves, plant height, root elongation, plant weight and survival. Obtained results lead to the conclusion that *Tithonia diversifolia* extract showed enhanced toxicity against tested weeds. Additionally due to germination inhibition and retarding on the development of aerial parts and root system it was confirmed the allelopathic effect of the chlorogenic acid isolated from that specie.

Keywords: *Tithonia diversifolia*; Allelopathy; Chlorogenic acid.

1. Introdução

A fim de reduzir infestações de plantas em cultivos agrícolas, estudos vêm utilizando recursos naturais a procura de compostos químicos presentes nas plantas resultantes do metabolismo primário e secundário para o controle racional das plantas invasoras. O primeiro grupo é composto de substâncias formadas a partir da fotossíntese, sendo divididas em: carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. O segundo é representado por substâncias formadas a partir da energia do metabolismo dos compostos primários (GAVILANES et. al., 1988).

Tithonia diversifolia (Hemsl.) A. Gray pertence à família Asteraceae, tribo Heliantheae, conhecida popularmente como margaridão, compreende 13 espécies, das quais 7 foram investigadas quimicamente sendo isoladas destas, lactonas sesquiterpênicas, com esqueleto carbocíclico do tipo heliangolídeo e germacrolídeo e, ainda, diterpenos e flavonóides (BARUAH et al., 1979; PEREZ et al., 1992; PEREIRA et al., 1997; KUO & CHEN, 1997). Margaridão é comum em certas regiões do México, América Central (SCHUSTER et al., 1992) e no Brasil é amplamente distribuída. Essa espécie pertence à mesma tribo

do girassol (*Helianthus annuus*), o qual apresenta elevada atividade alelopática contra plantas daninhas de onde foi isolado sequiterpenos não lactônicos derivado de heliannanos (AZÂNIA et al, 2003; LEATHER, 1983). O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o potencial alelopático do extrato bruto, e purificados da espécie *Tithonia diversifolia* usando *Bidens pilosa* e *Brachiaria brizantha* como planta invasora.

2. MATERIAIS E MÉTODO

2.1 Coleta e preparo do material vegetal

O material vegetal de *Tithonia diversifolia* foi coletado na Coleção de Plantas Medicinais da Universidade de Ribeirão Preto, utilizando partes aéreas (caule, folhas e flores) in natura. As partes foram submetidas à seleção, processo de secagem em estufa de circulação de ar quente à 40°C, moagem em moinho de facas.

2.2 Preparo do Extrato

A partir de 850g do material seco e triturado, foram realizados macerações sucessivas por 8 horas com 3 litros de água a 100 °C obtendo-se 910 mL de extrato aquoso na primeira extração, que posteriormente foi macerado novamente por 12 horas com 3 litros de água a 100 °C obtendo 1920 mL. No final das macerações foram reunidos os extratos das duas extrações e submetido a liofilização a fim de se tornar um extrato sólido rendendo 133,33 g de extrato seco.

2.3 Fracionamento dos extratos

O extrato aquoso seco de *T. diversifolia* foi submetido ao fracionamento cromatográfico aquoso em Sephadex® LH-20 nas condições descritas a seguir: 2 g de extrato diluídos em 6 ml de água destilada e submetidos a cromatografia em coluna (75 x 2,5 cm), eluídas com água. Frações de 5 mL foram coletadas, e posteriormente reunidas em 3 frações (TIT01, TIT02 e TIT03) de acordo com visualizações dos perfis por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) em placas de sílica gel (10 x 10 cm, J.T.Baker Si250F®), eluídas em BAW (n-butanol:ácido acético:H₂O, 4:1:5, fase superior); observadas em lampadas de UV 254 e 366 nm e reveladas com Ninhidrina e/ou Vanilina Sulfúrica. O processo de purificação foi realizado 5 vezes, para armazenamento de maior quantidade de fracionado a serem utilizados nos re-fracionamentos seguintes, e devidos a demanda para os bioensaios.

2.4 Purificação dos constituintes ativos

Uma parte de 0,400 g da fração TIT02, obtida do fracionamento do extrato aquoso, foi dissolvido em 4 mL

de água, centrifugada e filtrada para purificação em HPLC (Shimadzu®), nas condições: Coluna reversa (10 x 250 mm), fase móvel H₂O (ácido acético 0,1 %), fluxo de 2,0 mL/min, detecção a 280 nm e coleta de 2 mL/tubo, sendo o tempo total de análise de 130 min. Todas as frações foram caracterizadas fitoquimicamente através de CCDC em placas de sílica gel (10 x 10 cm, J.T.Baker Si250F®), eluídas em BAW, observadas em UV 254 e 366 nm e reveladas com Ninhidrina ou Vanilina sulfúrica onde foram reunidas segundo perfil e concentradas em liofilizador, resultando em 2 frações denominadas de TIT02.01a e TIT02.01d (Fração desprezada).

O restante de 0,669 g da fração TIT02 obtida do fracionamento do extrato aquoso foi também purificado em HPLC (Shimadzu®), nas condições: Coluna reversa (10 x 250 mm), fase móvel MeOH:H₂O: 0:100 à 10:90 gradiente linear por 80 min; 10:90 à 80:20 gradiente linear por 30 min; 80:20 à 0:100 gradiente linear por 2 min; 0:100 isocrático por 8 min, sendo o tempo total de análise de 120 min. O fluxo foi 2,0 mL/min, a detecção a 280 nm e a coleta de 2 mL/tubo. Todas as frações foram caracterizadas fitoquimicamente através de CCDC nas mesmas condições de análise anterior, reunidas segundo perfil e concentradas em liofilizador, resultando em 2 frações denominadas de TIT02.01b e TIT02.01d (Fração desprezada).

Após comparações dos perfis cromatográficos foram reunidas as duas frações TIT02.01a e TIT02.01b denominada em TIT02.01ab. A fração reunida foi dissolvida em água e submetida ao fracionamento em HPLC (Shimadzu®), nas condições: Coluna reversa (10 x 250 mm), fase móvel MeOH:H₂O: 0:100 isocrático por 50 min; 0:100 à 80:20 gradiente linear por 10 min; 80:20 à 0:100 gradiente linear por 10 min; 0:100 isocrático por 20 min, sendo o tempo total de análise de 90 min. O fluxo foi 1,0 mL/min, a detecção a 280 nm e a coleta de 1 mL/tubo. Todas as frações foram caracterizadas fitoquimicamente através de CCDC nas mesmas condições das análises anteriores, reunidas segundo este perfil e concentradas em liofilizador, resultando em 14 frações.

2.5 Identificação da substância purificada

Para identificação das substâncias semi-purificadas, 3 das 14 frações foram dissolvidas em DMSO-d₆ e submetidas à técnica de RMN de ¹H e ¹³C, 300 e 75 MHz. As frações purificadas também foram analisadas por HPLC analítico nas condições: Coluna reversa (4,6 x 250 mm), fase móvel MeOH:H₂O (Ácido Acético, 0,1%, v/v): 0:100 à 15:85 gradiente linear por 25 min; 15:85 à 100:0 gradiente linear por 5 min; 100:0 à 0:100 gradiente linear por 2 min; 0:100 isocrático por 8 min, sendo o tempo total de análise de 40

min. O fluxo foi 1,0 mL/min e a detecção a 280 nm. Nesta análise comparativa foi utilizado o ácido clorogênico (Aldrich), frações e o extrato bruto (50 mg/mL).

2.6 Execução e avaliação da germinação das plantas daninhas com o extrato

As espécies *Bidens pilosa* e *Brachiaria brizantha* foram selecionadas como alvos receptores dos aleloquímicos pela sua relevância dentre as espécies de ervas daninhas na agricultura.

Para os testes de germinação das espécies utilizadas como invasoras nos extratos vegetais foi utilizado uma câmara de germinação da marca Marconi, modelo MA 1403/UR, com condições controladas em 23 °C, 80 % de umidade relativa do ar e fotoperíodo de 13 h/Luz. Nas avaliações foram utilizadas caixas acrílica Gerbox de dimensões 7,0 x 7,0 x 7,0 cm, 2 g de espuma fenólica moída como suporte, 25 mL de extrato vegetal em três dosagens diferentes (1%, 2% e 4%) e 20 (vinte) sementes por Box, sementes estas passada por assepsia com cercobin 1% (p/v) por 1 hora em agitação e hipoclorito de sódio 0,5% (p/v) por 30 min, sob agitação. Para segurança das informações foram feitos grupos de seis boxes para cada dose de extrato, sendo 3 com sementes de *B. brizantha* e 3 com sementes de *B. pilosa* mais 1 box com água destilada como controle, finalizando em 24 boxes por experimento submetidos a condições em câmara de germinação, com vistorias diárias e coleta de dados no 7°, 14° e 21° dias após a semeadura com 3 repetições por extrato a fim de garantir a legitimidade dos dados coletados. Nas coletas de dados foram anotadas as seguintes informações: percentual de germinação, velocidade de germinação, número de folhas, altura das plântulas, tamanho das raízes, peso e sobrevivência das mesmas.

2.7 Avaliação da germinação das plantas daninhas com os fracionados

A metodologia de avaliação da germinação com os fracionados ficou definida utilizando as avaliações com os extratos como base com pequenas alterações. Alterações foram feitas quanto ao recipiente que foi utilizado anteriormente, redefinido para cubetas de vidros (h = 8,5 cm e d = 2,2 cm) com tampas plásticas, 150 mg de espuma fenólica moída, umedecida com 1,5 mL de solução aquosa contendo os fracionados à 1% para todas as frações e cinco sementes passada por assepsia por cubeta. Câmara de germinação com condições controladas em 23 °C, 80 % de umidade relativa do ar e fotoperíodo de 13 h/luz foi utilizada nos testes. Para segurança das informações foram feitos grupos de 10 cubetas para cada fração, sendo 5 com sementes de *B. brizantha* e 5 com sementes de *B.*

pilosa mais 1 cubeta com água destilada no lugar do extrato para cada espécie usado como controle. Todo o experimento foi realizado com materiais autoclavados e executado em fluxo laminar para não haver contaminações. Os materiais foram submetidos a condições em câmara de germinação, vistorias diárias e coleta de dados no 7°, 14° e 21° dias após a semeadura e 3 repetições por fracionado a fim de garantir a legitimidade dos dados coletados. Os dados foram coletados as mesmas informações que para a avaliação com o extrato.

2.8 Análises estatísticas

As análises foram realizadas em triplicata e o delineamento adotado foi o inteiramente casualizado (DIC). Os resultados foram submetidos a ANOVA através do programa da Universidade Federal de Lavras - SISVAR V.4.3 (FERREIRA, 2003), sendo as médias dos tratamentos comparados pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância (SCOTT & KNOTT 1974).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Fracionamento do extrato

O fracionamento em coluna com o extrato aquoso de *T. diversifolia*, resultaram em 3 (três) frações de acordo com visualizações em CCDC, denominadas TIT01, TIT02 e TIT03, que após processo de liofilização apresentaram peso de 3,5297, 3,2419 e 3,0323g, respectivamente.

Na cromatografia em coluna o extrato foi fracionado e através de observações em CCDC foi agrupado em 3 frações. Após bioensaios com estas frações, observou-se que a atividade que o extrato apresentava estava presente na TIT02. Mediante ao fato da atividade estar na fração TIT02 iniciou-se o isolamento das substâncias desta fração através de HPLC com duas fases móveis diferentes H₂O:ácido acético (0,1%) e MeOH:H₂O.

No fracionamento com fase móvel H₂O:Ácido acético a amostra inicial (0,400 g) foi dividida em 16 (dezesseis) frações, onde através de observações do cromatograma e a CCDC, agrupou-se as frações 3, 4 e 5 em uma só amostra denominada de TIT02.01a que apresentou peso igual a 0,059 g, as demais frações foram agrupadas em outra amostra denominada de TIT02.01ad que foi desprezada.

No fracionamento com fase móvel MeOH:H₂O a amostra inicial (0,669 g) foi dividida em 13 frações, onde através de observação do cromatograma e a CCDC, agrupou-se as amostras 3, 4 e 5 em uma só amostra denominada de TIT02.01b que apresentou peso igual a 0,075 g., as demais frações foram agrupadas em outra amostra denominada de TIT02.01bd que foi desprezada.

As duas amostras TIT02.01a e TIT02.01b foram reunidas em uma só fração denominada TIT02.01ab após observações do cromatograma e da CCDC, onde mostraram conter as mesmas substâncias. A amostra TIT02.01ab (0,134 g) foi submetida ao fracionamento em HPLC com fase móvel MeOH:H₂O dividida em 14 frações. Através de observações do cromatograma em HPLC e da CCDC, destas quatorze frações, 3 (três) foram enviadas para análise em RMN ¹H (300MHz) e RMN ¹³C (75MHz) denominadas como TIT02.01.05ab, TIT02.01.07ab e TIT02.01.08ab.

Comparações entre cromatogramas de HPLC do extrato bruto (Fig. 1A), do purificado TIT02.01.07ab (Fig. 1B) e do padrão (ácido clorogênico) (Fig. 1C), juntamente com as comparações de dados da literatura (IWAI et al., 2004; CORSE et al., 1962; MORISHITA et al., 1984), nos permitiu a identificação da substância isolada como sendo o ácido clorogênico.

Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C da sub-fração TIT02.01.07ab, indica que a substância majoritária é um derivado do ácido hidroxicinâmico (IWAI et al., 2004). Os dados de RMN de ¹H mostra que os deslocamentos e a multiplicidade são características do ácido clorogênico. E os deslocamentos nos espectros de RMN de ¹³C comprovam esta informação.

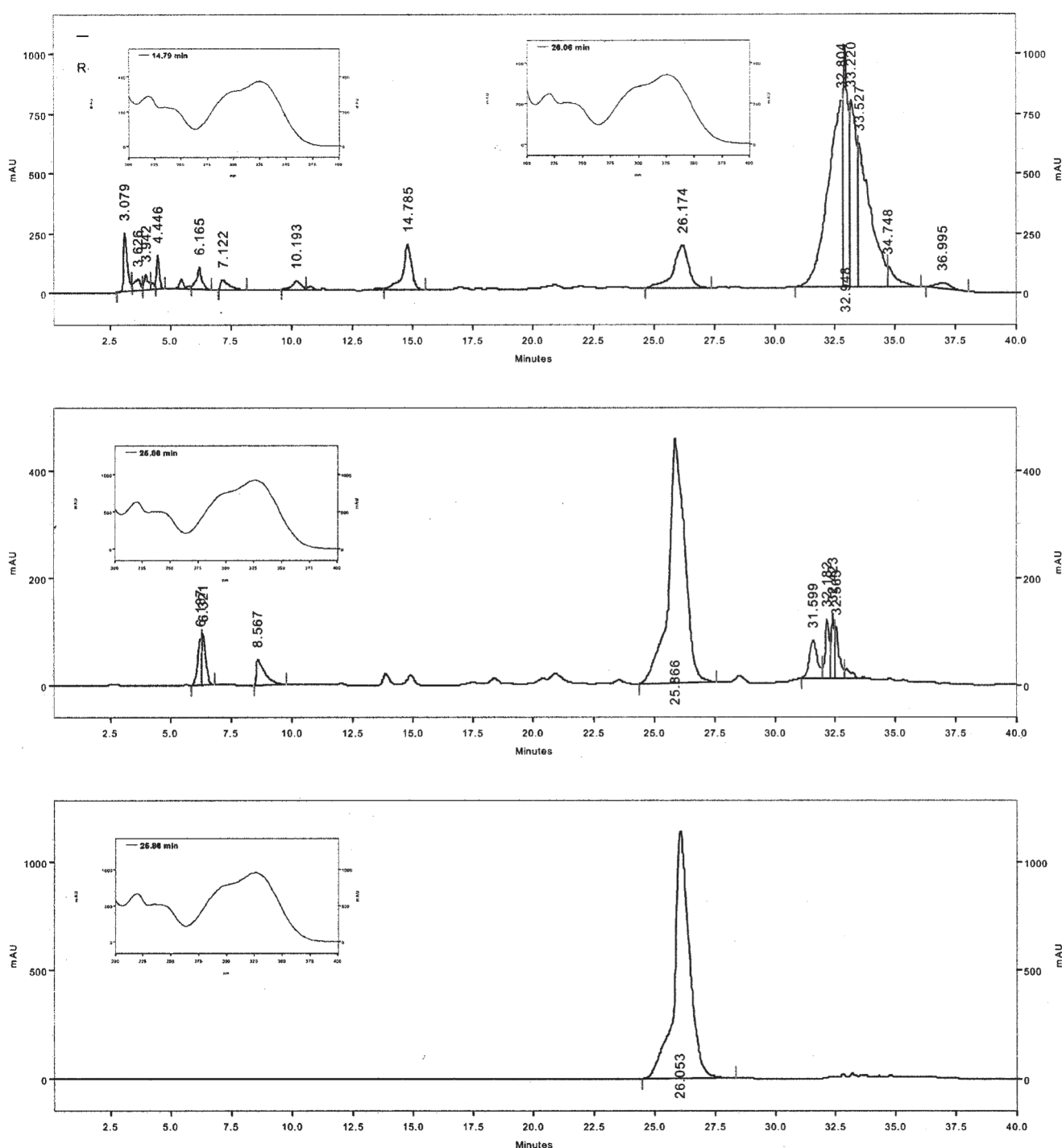


Figura 1: Cromatogramas a 280 nm em HPLC e espectros de ultravioleta do extrato bruto de *Tithonia diversifolia* (A), fração TIT02.01.07ab (B) e do ácido clorogênico (C).

3.2 Bioensaios com extratos e fracionados

Na primeira fase do projeto foi analisado o extrato bruto da espécie medicinal proposta, sobre a germinação das duas espécies invasoras. E na segunda fase foram realizados bioensaios com as frações purificadas do extrato bruto. As Tabelas 1 e 2 mostram os resultados alelopáticos obtidos nos bioensaios quanto aos aspectos: número de sementes germinadas, velocidade de germinação, número de folhas, altura das plântulas, tamanho das raízes, peso e sobrevivência das mesmas.

Concentrações (%)	Avaliações (dias)	Invasoras					
		<i>Bidens pilosa</i>			<i>Brachiaria brizantha</i>		
Número de sementes germinadas							
Controle	7	33,33	± 2,08	a	31,33	± 2,08	e
	14	38,33	± 4,50	a	38,66	± 4,50	e
	21	46,00	± 2,00	a	47,00	± 2,00	e
1%	7	33,66	± 1,52	a	7,66	± 1,52	f
	14	48,00	± 1,15	b	11,66	± 1,15	f
	21	50,66	± 2,51	a	11,66	± 2,51	f
2% e 4%	7	ng			ng		
	14	ng			ng		
	21	ng			ng		
Desenvolvimento das plântulas (mm),							
Controle	7	10,33	± 0,57	a	10,33	± 0,57	e
	14	16,66	± 1,52	a	56,66	± 2,51	e
	21	51	± 2,64	a	82,00	± 2,00	e
1%	7	17,66	± 1,15	b	3,33	± 0,57	e
	14	42,33	± 0,57	b	56,66	± 3,05	e
	21	71	± 1,73	b	81,66	± 2,08	e
Desenvolvimento radicular das plântulas (mm)							
Controle	7	3,66	± 0,57	a	3,66	± 0,57	e
	14	28,66	± 2,51	a	27,66	± 1,52	e
	21	53,00	± 3,46	a	61,66	± 3,05	e
1%	7	3,33	± 0,57	a	3,00	± 0,00	e
	14	28,00	± 2,64	a	22,66	± 2,08	f
	21	59,66	± 1,15	b	61,66	± 2,08	f
Peso das plântulas (mg)							
Controle	7	8,66	± 0,57	a	7,66	± 0,57	e
	14	11,33	± 1,52	a	10,66	± 0,57	e
	21	15,33	± 0,57	a	17,00	± 2,00	e
1%	7	15,00	± 2,00	b	6,00	± 0,00	e
	14	20,66	± 0,57	b	8,33	± 0,57	e
	21	23,66	± 1,52	b	14,66	± 1,52	e
Numero de folhas das plântulas							
Controle	7	2	± 0,00	a	2	± 0,00	e
	14	4	± 0,00	a	4	± 0,00	e
	21	4	± 0,00	a	4	± 0,00	e
1%	7	2	± 0,00	a	2	± 0,00	e
	14	4	± 0,00	a	4	± 0,00	e
	21	4	± 0,00	a	4	± 0,00	e

Tabela 1: Número de sementes germinadas, desenvolvimento das plântulas (mm), desenvolvimento radicular das plântulas (mm), peso das plântulas (mg) e número de folhas das plântulas em contato com o extrato bruto de *Tithonia diversifolia*. Médias comparadas estatisticamente de acordo com o estágio de avaliações (dias), quando acompanhadas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. ng – sementes não germinadas.

Amostras	Avaliações (dias)	Invasoras					
		<i>B. pilosa</i>	<i>B. brizantha</i>	<i>B. pilosa</i>	<i>B. brizantha</i>		
		Número de sementes germinadas		Desenvolvimento das plântulas (mm)			
Controle	7	32,00±2,08 a	31,66±8,08 e	10,50±0,50 a	10,33±0,28 e		
	14	39,00±8,08 a	34,66±2,08 e	16,66±0,57 a	57,00±1,00 e		
	21	45,33±2,08 a	47,66±0,57 e	51,00±1,00 a	81,33±2,88 e		
TIT01	7	28,00±1,52 b	7,66±1,15 f	9,83±1,25 a	9,50±0,86 e		
	14	32,66±1,15 b	11,66±2,08 f	16,50±1,32 b	56,00±0,00 e		
	21	41,00±2,51 a	11,66±2,08 f	48,00±1,73 b	81,50±2,78 e		
TIT02	7	11,33±0,57 c	9,00±1,52 g	10,50±1,75 a	10,50±0,50 e		
	14	20,00±1,00 c	13,33±1,52 g	16,50±0,57 b	57,00±1,60 e		
	21	25,00±0,00 c	24,66±1,52 g	51,00±0,57 a	81,00±2,30 e		
TIT03	7	35,33±0,57 d	31,66±0,57 h	14,33±1,52 a	10,16±1,25 f		
	14	42,66±2,08 d	35,00±2,08 h	22,00±1,00 c	56,16±0,28 e		
	21	52,66±2,08 d	47,66±1,15 e	57,83±1,25 c	82,00±1,73 f		
		Desenvolvimento radicular das plântulas (mm)		Peso das plântulas (mg)			
Controle	7	3,66±0,57 a	4,00±0,00 e	8,66±0,57 a	7,66±0,57 e		
	14	29,00±1,73 a	27,33±0,57 e	11,33±1,52 a	10,66±0,57 e		
	21	52,66±2,08 a	63,33±1,15 e	15,33±0,57 a	17,00±2,00 e		
TIT01	7	3,33±0,57 a	3,33±0,57 e	8,66±1,52 b	7,00±1,00 f		
	14	28,66±1,15 a	25,33±0,57 f	11,33±0,57 b	10,00±1,00 f		
	21	59,33±2,08 b	62,00±2,00 f	15,66±2,08 b	17,33±1,15 f		
TIT02	7	3,66±0,00 a	2,00±0,00 e	7,00±0,00 c	5,33±0,57 g		
	14	28,00±2,30 a	16,33±1,52 e	8,33±0,57 c	7,00±1,15 e		
	21	53,00±1,15 a	43,66±2,00 e	10,66±1,52 c	13,66±1,52 g		
TIT03	7	3,33±0,57 a	3,00±0,00 e	12,33±0,57 d	6,66±1,15 h		
	14	28,33±1,52 a	27,00±3,00 g	16,66±0,57 d	1,66±1,52 g		
	21	52,66±2,51 a	62,66±3,21 g	19,66±1,15 d	18,33±1,15 h		
		Número de folhas das plântulas					
		<i>B. pilosa</i>	<i>B. brizantha</i>		<i>B. pilosa</i>	<i>B. brizantha</i>	
Controle	7	2±0,00 a	2±0,00 e	7	2±0,00 a	2±0,00 e	
	14	4±0,00 a	4±0,00 e	TIT02	14	4±0,00 a	4±0,00 e
	21	4±0,00 a	4±0,00 e	21	4±0,00 a	4±0,00 e	
TIT01	7	2±0,00 a	2±0,00 e	7	2±0,00 a	2±0,00 e	
	14	4±0,00 a	4±0,00 e	TIT03	14	4±0,00 a	4±0,00 e
	21	4±0,00 a	4±0,00 e	21	4±0,00 a	4±0,00 e	

Tabela 2: Número de sementes germinadas, desenvolvimento das plântulas (mm), desenvolvimento radicular das plântulas (mm), peso das plântulas (mg) e número de folhas das plântulas em contato com as frações do extrato bruto de *Tithonia diversifolia*. Médias comparadas estatisticamente de acordo com o estágio de avaliações (dias), quando acompanhadas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Os resultados mostram que *B. pilosa* em interação com o extrato à 1% obteve maior índice germinativo comparado com o controle, mostrando ter efeito estimulatório quanto à germinação, e inibitório nas demais concentrações. Já as sementes da espécie *B. brizantha* em contato com o extrato obtiveram menor índice de germinação no extrato à 1% e inibitório nas demais concentrações comparado com o controle. Leather (1983) relatou que a resposta da germinação depende da fonte do extrato, da concentração e da espécie utilizada. Além disso, demonstrou o efeito alelopático do extrato de *Helianthus annuus* conhecido popularmente como girassol pertencente à mesma tribo da espécie *T. diversifolia*, relacionando com os resultados apresentados. Os resultados da primeira avaliação mostram que a espécie *B. pilosa* em interação com o extrato à 1% apresentou desenvolvimento superior comparado com o controle. Já as sementes da espécie *B. brizantha* apresentou menor desenvolvimento na primeira semana após semeadura e diferença insignificante nas demais avaliações comparado com o controle com inibição total da germinação nas concentrações de 2 e 4%. Quanto ao desenvolvimento radicular de *B. pilosa* e *B. brizantha* comparado com o controle, os resultados das avaliações não mostram alterações significativas quanto ao crescimento das raízes para ambas as espécies em estudo. Porém quanto ao peso das plântulas houve alteração significativa quanto ao peso das plântulas da primeira espécie e pouca alteração de peso na segunda espécie. Tongma et al. (1998) relatam o menor desenvolvimento e peso das plântulas testadas em seu trabalho utilizando *T. diversifolia* como planta doadora de aleloquímico (s). Os resultados das avaliações não mostram alterações quanto ao número de folhas para ambas as espécies em estudo comparado com o controle.

Os efeitos alelopáticos podem variar quanto à sua intensidade, visto que a ação dos aleloquímicos é condicionada por diversos fatores, tais como concentração, temperatura e outras condições ambientais. Geralmente, os efeitos causados tendem a ser dependentes da concentração dos aleloquímicos, ou seja, tendem a ser mais acentuados em concentrações mais altas, sendo essa tendência observada nos bioensaios de crescimento. Entretanto, Reigosa et al. (1999) afirmam que os efeitos alelopáticos podem escapar deste padrão, já que os efeitos observados resultam do somatório de uma série de alterações moleculares. Maraschin-Silva (2005) mostrou que os efeitos de extratos vegetais sobre as raízes de *Lactuca sativa* reforçam esta idéia, e mostra que o número de folhas normalmente não é alterado com o aumento da concentração dos aleloquímicos, mas sim o tamanho das partes aéreas.

Neste estudo a fração TIT02, rica em ácido clorogênico e tido como aleloquímico (KEELER & TU, 1991; DUKE, 1992; LYNDON & DUKE, 1989; RUSSELL, 1986), como tóxica para *B. pilosa* e *B. brizantha* inibindo a germinação e desenvolvimento. Dowd & Vega (1996) relataram o efeito alelopático e inseticida do ácido clorogênico, apontando a diminuição do desenvolvimento como o principal efeito em plantas usadas como alvo. Concomitante ao trabalho provou que a concentração do ácido é maior nas partes vegetais nos meses de verão, apontando a maior competição por nutrientes e água para o desenvolvimento como justificativa para a conclusão.

4. Conclusões

Os resultados obtidos permitem concluir que a metodologia utilizada nos bioensaios mostrou-se confiável com o uso da espuma fenólica como suporte, passando confiabilidade aos dados coletados. A metodologia de fracionamento do extrato bruto mostrou-se eficiente para separação das substâncias presentes nos extratos e no isolamento do ácido clorogênico. As espécies utilizadas como invasoras apresentam resultados o mais próximo para o estudo evoluir para um produto, pois, são espécies com resistência a aleloquímicos e agrotóxicos. A espécie *Tithonia diversifolia* mostrou-se positiva quanto ao uso de seu extrato, frações e o ácido clorogênico isolado desta como aleloquímicos, inibindo a germinação, retardando o desenvolvimento radicular e retardando o desenvolvimento minimizando a matéria seca das plantas receptoras.

Referências Bibliográficas

- AZANIA, A. A. P.; AZANIA, C. A. M.; ALVES, P. L. C. A.; PALANIRAJ, R.; KADIAN, H. S.; SATI, S. C.; RAWAT, L. S.; DAHIYA, D. S.; NARWAL, S. S. Allelopathic Plants. 7. Sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Allelopathy Journal**, Índia, v.11, n.1, p.1-20, 2003.
- BARUAH, N.C.; SHARMA, R. P.; MADHUSUDANAN, K. P.; THYAGARAJAN, G.; HERZ, W. MURARI, R.. Sesquiterpene lactones of *Tithonia diversifolia*. Stereochemistry of the tagitinins and related compounds. **Journal of Organic Chemistry**, Baltimore, v. 44, n. 11, p.1831-1835, 1979.
- CORSE, J.; SONDEHEIMER, E.; LUNDIN, R. 3-feruloylquinic acid : A 3'-methyl ether of chlorogenic acid. **Tetrahedron**, v.18, n.11, p.1207-1210, 1962.

DOWD, P. F.; VEGA, F. E. Enzymatic oxidation products of allelochemicals as a basis for resistance against insects: effects on the corn leafhopper *Dalbulus maidis*. **Natural Toxins**, v.4, n.2, p.85-91, 1996.

DUKE, J.A.; **Handbook of phytochemical constituents of gras herbs and other economic plants**. CRC Press: Boca Raton, 320. 1992.

FERREIRA, D. F. SISVAR (Sistema para análise de variância de dados balanceados) v.4.3, UFLA. 2003.

GAVILANES, M. L.; CARDOSO, C.; BRANDÃO, M. Plantas daninhas como medicamentosas de uso popular. **Informe Agropecuário**, v.13, n.150, p. 21-29, 1988.

IWAI, K.; KISHIMOTO, N.; KAKINO, Y.; MOCHIDA, K.; FUJITA, T. In vitro antioxidative effects and tyrosinase inhibitory activities of seven hydroxycinnamoyl derivatives in green coffee beans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n.15, p.4893-4898, 2004.

KEELER, R.F.; TU, A.T.; Toxicology of plant and fungal compounds In: Dekker, M., **Handbook of Natural Toxins**. Ed. New York, 6, 665, 1991.

KUO, Y. H.; CHEN, C. H. Diversifolol, a novel re-arranged eudesmane sesquiterpene from the leaves of *Tithonia diversifolia*. **Chemistry and Pharmaceutical Bulletin**, v.45, 1223-1224, 1997.

LEATHER, G. R. Sunflowers (*Helianthus annuus*) are allelopathic to weeds. **Weed Science**, Champaign, v. 31, n. 1, p. 37-42, 1983.

LYDON, J.; DUKE, S. The potential of pesticides from plants. In CRAKER, L.; SIMON, J., Eds **Herbs, Spices & Medicinal Plants: Recent Advances in Botany, Horticulture, & Pharmacology**. Oryx Press: Phoenix, 4, 1-41, 1989.

MARASCHIN-SILVA, F. **Extração aquosa de aleloquímicos e bioensaios laboratoriais de alelopatia**. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. p. 87, 2004.

MORISHITA, H.; IWAHASHI, H.; OSAKA, N.; KIDO, R. Chromatographic separation and identification of naturally occurring chlorogenic acids by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v.315, p.253-260, 1984.

PEREIRA, P. S.; DIAS, D. A.; NASI, A. M. T. T.; VICHNEWSKI, W.; HERZ, W. Sesquiterpenes lactones from *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A.Gray. **Phytochemistry**, Oxford, v. 45, p.1445-8, 1997.

PEREZ, A. L.; LARA, O.; ROMO DE VIVAR, A. Sesquiterpenoids and diterpenoids from *Tithonia longiradiata*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 31, n. 12, p. 4227-31, 1992.

REIGOSA, M. J.; SANCHEZ-MOREITA, A.; CONZALEZ, L. Ecophysiological approach in allelopathy, **Critical reviews in plants sciences**, p. 577, 1999.

RUSSELL, G. B. Phytochemical resources from crop protection. **New Zealand Journal Technology**, v.2, p.127-134, 1986.

SCHUSTER, A.; STOKES, S.; PAPASTERGIU, F.; CASTRO, V.; POVEDA, L.; JAKUPOVIC, J. Sesquiterpene lactones from two *Tithonia* species. **Phytochemistry**, Oxford, v. 31, n. 9, p. 3139-41, 1992.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A cluster analyses method for grouping means in the analyses of variance. **Biometrics**, Washington, v.30, n.3, p.507-512, 1974.

TONGMA, S.; KOBAYASHI, K.; USUI, K. Allelopathic activity of Mexican sunflower (*Tithonia diversifolia*) in soil. **Weed Sciences**, Lawrence, v.46, p.432-437, 1998.