

Artigo

Atividade Fitotóxica de di-Hidrochalconas Obtidas pela Biorredução de Chalconas Promovidas pelo Fungo Endofítico *Aspergillus flavus*

Pinto, F. T.; Ribeiro, W. S.; Corrêa, M. J. C.; Ripardo Filho, H. S.; Souza Filho, A. P. S.; Lopes Júnior, M. L.; Araujo, R. N. M.; Guilhon, G. M. S. P.; Santos, L. S.

Rev. Virtual Quim., 2020, 12, 00-00. Data de publicação na Web: 21 de Agosto de 2020

<http://rvq.s bq.org.br>

Phytotoxic Activity of dihydrochalcones Obtained by Bioreduction of Chalcones Promoted by the Endophytic Fungus *Aspergillus flavus*

Abstract: The aim of this study was to evaluate the phytotoxic effects of dihydrochalcones obtained by biotransformation reactions of the corresponding chalcones, promoted by the endophytic fungus *Aspergillus flavus*. The compounds 3,4,5-trimethoxydihydrochalcone (**1a**) and 2,3,4,4'-tetramethoxydihydrochalcone (**2a**) obtained from their corresponding chalcones (**1** and **2**) were submitted to the bioassays monitored under controlled temperature of 25°C and photoperiod of 12 hours. For bioassays were used as test plants two invasive species, *Mimosa pudica* L. (malícia) e *Senna obtusifolia* (L.) Irwin & Barneby (mata-pasto), belonging to the Fabaceae family. The phytotoxic effects of dihydrochalcones were analyzed at concentrations of 80 and 160 mg L⁻¹. Substances **1a** and **2a**, at a concentration of 160 mg L⁻¹, showed significant inhibitions, respectively, 54% and 65% , against the germination of the species *M. pudica*. Inhibitions of 61% and 49% of *M. pudica* radicle growth were observed, respectively, to compounds **1a** and **2a** at concentration 160 mg L⁻¹. In the bioassays performed, no significant phytotoxic activity of the tested substances was observed, at concentrations of 80 and 160 mg L⁻¹ on the weed *S. obtusifolia*.

Keywords: *Paspalum maritimum*; biotransformation; *Senna obtusifolia*; *Mimosa pudica*.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito fitotóxico de di-hidrochalconas obtidas por reação de biotransformação de suas correspondentes chalconas, promovidas pelo fungo endofítico *Aspergillus flavus*. As substâncias 3,4,5-trimetoxi-di-hidrochalcona (**1a**) e 2,3,4,4'-tetrametoxi-di-hidrochalcona (**2a**) obtidas por reação de biorredução de suas correspondentes chalconas (**1** e **2**) foram submetidas aos bioensaios monitorados sobre condições de temperatura controlada de 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Como plantas testes foram utilizadas as espécies daninhas *Mimosa pudica* L. (malícia) e *Senna obtusifolia* (L.) Irwin & Barneby (mata-pasto), pertencentes à família Fabaceae. Os efeitos fitotóxicos das di-hidrochalconas foram analisados em concentrações de 80 e 160 mg L⁻¹. As substâncias **1a** e **2a**, na concentração de 160 mg L⁻¹ apresentaram significantes inibições, respectivamente, 54% e 65% , frente à germinação da espécie *M. pudica*. Foram observadas inibições de 61% e 49% sobre o crescimento da radícula de *M. pudica*, respectivamente, para as substâncias **1a** e **2a** na concentração de 160 mg L⁻¹. Nos bioensaios realizados, não foi observado nenhuma atividade fitotóxica significativa das substâncias testadas, nas concentrações de 80 e 160 mg L⁻¹ sobre a planta daninha *S. obtusifolia*.

Palavras-chave: *Paspalum maritimum*; biotransformação; *Senna obtusifolia*, *Mimosa pudica*.

* Universidade Federal do Pará, Programa de Pós-Graduação em Química, Av. Augusto Correa 1, CEP 66075-110, Belém-PA, Brasil.

 lsslouri@gmail.com

DOI: [10.21577/1984-6835.20200107](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20200107)

Atividade Fitotóxica de di-Hidrochalconas Obtidas pela Biorredução de Chalconas Promovidas pelo Fungo Endofítico *Aspergillus flavus*

Fabiane T. Pinto,^a Williams S. Ribeiro,^a Marivaldo J. C. Corrêa,^a Haroldo S. Ripardo Filho,^b Antonio Pedro S. Souza Filho,^c Manoel L. Lopes Júnior,^a Railda Neyva M. Araujo,^d Giselle Maria S. P. Guilhon,^a Lourivaldo Silva Santos^{a,*} 

^a Universidade Federal do Pará, Programa de Pós-Graduação em Química, Rua Augusto Corrêa 1, CEP 66075-110, Belém-PA, Brasil.

^b Instituto Federal do Amapá, Campus Macapá, Rod. Br-210, Km 03 S/N, Brasil Novo, CEP 68909-398, Macapá-AP, Brasil.

^c Embrapa Amazônia Oriental, Tv. Dr. Enéas Pinheiro-Curió-Utinga, CEP 66095-903, Belém-PA, Brasil.

^d Escola Estadual de Ensino Médio Agostinho Moraes de Oliveira S/N, CEP 68770-000, Inhangapi-PA, Brasil.

*lsslouri@gmail.com

Recebido em 22 de Abril de 2020. Aceito para publicação em 5 de Agosto de 2020.

1. Introdução

2. Metodologia

- 2.1. Síntese dos substratos para biotransformação
- 2.2. Coleta e identificação do material botânico
- 2.3. Isolamento do fungo endofítico
- 2.4. Procedimentos utilizados na obtenção das di-hidrochalconas
- 2.5. Efeitos fitotóxicos das di-hidrochalconas **1a** e **2a**

3. Resultados e Discussão

- 3.1. Biotransformação
- 3.2. Dados espectrométricos
- 3.3. Avaliação dos efeitos fitotóxicos

4. Conclusão

1. Introdução

A pecuária é uma atividade econômica que se destaca no agronegócio da região amazônica brasileira, principalmente a pecuária bovina, considerada a de maior impacto para região.¹ Tal atividade representa o uso de solo mais importante da Amazônia e tem apresentado

crescimento em todos os estados.² Nesse contexto, a manutenção de pastos saudáveis, assume aspectos relevantes, pois, a presença de plantas invasoras de pastagens tem causado elevado prejuízo, tanto de ordem econômica quanto agrônoma, em razão de competirem com as espécies forrageiras e, em alguns casos, serem tóxicas para o gado.³ Para manejar e controlar essas plantas daninhas e manter a qualidade do pasto, tem-se utilizado

preferencialmente os agroquímicos, que muitas vezes favorecem o surgimento de espécies invasoras resistentes e, ainda estão associados a fatores negativos ao meio ambiente e à saúde humana e animal.^{4,5}

Motivados pela busca de alternativas que possam reduzir ou substituir os agroquímicos sintéticos, inúmeras pesquisas vem sendo desenvolvidas sobre alelopatia e fitotoxicidade de metabólitos secundários, para produção de bioerbicidas.⁶ Uma sub-área que pode figurar como grande aliada nessa busca, é síntese orgânica, produzindo em laboratório os produtos naturais de interesse ou moléculas inspiradas em produtos naturais, em quantidades que permita a realização de estudos de atividade biológica aprofundados e, até mesmo para atender grandes demandas mercadológicas em caso de comercialização.⁷ A biotransformação, que trata da derivatização de uma molécula utilizando um microrganismo ou enzima isolada, também é uma ferramenta que tem muito a contribuir com a obtenção de compostos bioativos, além da vantagem de produzir compostos estéreo, régio e quimioseletivos de difícil acesso pelas técnicas de sínteses tradicionais.⁸

Nesse sentido, este trabalho faz parte de um projeto que agrega conhecimentos de química de produtos naturais, síntese orgânica, biotransformação e atividade fitotóxica. Numa primeira fase, foi desenvolvida a síntese de chalconas,⁹ que são compostos 1,3-difenil-2-propen-1-ona, de ocorrência natural em plantas superiores, precursores virtualmente de todos os flavonoides e que possuem uma gama de atividades biológicas associadas.¹⁰ Numa segunda fase, as substâncias sintetizadas foram utilizadas em estudos de biotransformação com o fungo endofítico *Aspergillus flavus*, uma vez que são excelentes substratos para estudos de derivatização, por não possuírem centros quirais. Como resultado, foram obtidas por biotransformação as di-hidrochalconas 3,4,5-trimetoxi-di-hidrochalcona (**1a**) e 2,3,4,4'-tetrametoxi-di-hidrochalcona (**2a**).¹¹ Na continuidade do projeto, o presente estudo avaliou a atividade fitotóxica dos produtos da biotransformação **1a** e **2a** frente a duas plantas invasoras de pastagem da região amazônica *Mimosa pudica* L. e *Senna obtusifolia* (L.) Irwin & Barneby, ambas pertencentes à família Fabaceae, conhecidas popularmente como malícia e mata-pasto, respectivamente.

2. Metodologia

2.1. Síntese dos substratos para biotransformação

Em um balão de 125 mL, em banho de gelo, foram adicionados 15 mL de EtOH, 11 mmol de 3,4,5-trimetoxiacetofenona ou 2,3,4,4'-tetrametoxiacetofenona, 15 mL de solução de NaOH a 10% e 12 mmol de benzaldeído. A mistura de reação foi mantida sob agitação magnética a 40 °C por 40 min. Após esse período, a mistura foi resfriada e armazenada em refrigerador por 48 h e depois filtrada sob vácuo. Em seguida, os produtos foram recristalizados em MeOH.⁹ Como produtos foram obtidas as chalconas 3,4,5-trimetoxichalcona (**1**) e 2,3,4,4'-tetrametoxichalcona (**2**), em 75% e 60% de rendimento, respectivamente.

2.2. Coleta e identificação do material botânico

As folhas de *Paspalum maritimum* foram coletadas em janeiro de 2009, no Campo Experimental da Embrapa Amazônia Oriental, localizado em Belém, estado do Pará, pelo Dr. Joaquim Ivanir Gomes, pesquisador da instituição, estando uma exsicata depositada no herbário da instituição, sob o número de registro IAN 183337.

Assementes das plantas utilizadas nos bioensaios de atividades fitotóxicas foram coletadas em áreas de pastagens cultivadas no município de Castanhal, estado do Pará, e o processo de identificação das plantas foi realizado por comparação com amostras autênticas depositadas no herbário da Embrapa-Amazonia Oriental, em Belém-PA. As exsicatas utilizadas na identificação possuem os registros IAN 16494 para *M. pudica* e IAN 196817 para *S. obtusifolia*. As sementes passaram por processo de limpeza e foram tratadas com ácido sulfúrico, objetivando a superação da dormência.¹²

2.3. Isolamento do fungo endofítico

O isolamento do fungo endofítico seguiu a metodologia descrita na literatura.¹³⁻¹⁵ Após duas horas da coleta, as folhas de *P. maritimum* foram transferidas para o laboratório, e lavadas abundantemente com água corrente e detergente neutro para retirar o excesso de epífitos. Em seguida, em câmara asséptica, o material

foi imerso em álcool 70% por um minuto, em hipoclorito de sódio a 3% por 4 minutos e, novamente em álcool 70% por trinta segundos, para retirar o excesso de hipoclorito. Após a assepsia, cinco pequenos fragmentos de folhas, foram plaqueados em meio de cultura sólido Ágar Sabouraud Dextrose/ASD, composto de 10 g L⁻¹ de Meat Peptona (HIMEDIA, Pennsylvania, USA), 20 g L⁻¹ de D-glicose anidra (NUCLEAR, São Paulo, Brasil) e 20 g L⁻¹ de Ágar (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil) acrescido de 1 g L⁻¹ Cloranfenicol, para inibir o crescimento bacteriano no decorrer do processo de isolamento dos fungos endofíticos. À medida que, foi observado o crescimento de colônias com características de fungos filamentosos, dos fragmentos de folha, as mesmas foram repicadas sucessivamente, em ASD, até o isolamento e identificação de *Aspergillus flavus*, conforme suas estruturas micromorfológicas.

2.4. Procedimentos utilizados na obtenção das di-hidrochalconas

Foram utilizados três frascos de Erlenmeyer (500 mL) contendo 250 mL de meio de cultura líquido Caldo Sabouraud/CS, com fonte de carbono reduzida em 50%, composta de 10 g L⁻¹ de Meat Peptona (HIMEDIA, Pennsylvania, USA), 10 g L⁻¹ de D-glicose anidra (NUCLEAR, São Paulo, Brasil) e 1 g L⁻¹ Cloranfenicol, previamente esterilizados. A cada um dos frascos foram acrescentados três discos (5 mm de diâmetro) do micélio de *A. flavus* isolado e 0,05 g de substrato. Tal procedimento foi realizado para cada um dos substratos, as chalconas 3,4,5-trimetoxichalcona (**1**) e 2,3,4,4'-tetrametoxichalcona (**2**). Os frascos foram submetidos a agitação em sheaker orbital (160 rpm, 30 °C) por um período de dez dias, e em seguida o material foi extraído com acetato de etila (3 x 100 mL). As fases orgânicas foram reunidas, secadas com sulfato de sódio anidro, filtradas e concentrada sob pressão reduzida. O extrato obtido foi fracionado em cromatografia de coluna, na qual se utilizou como fase estacionária sílica gel 60 (MERCK, Darmstadt, Alemanha; partículas com 0,063-0,2 mm, 70-230 mesh) e como fase móvel misturas de hexano/ACOEt e ACOEt/MeOH em ordem crescente de polaridade. A partir do fracionamento foram isoladas e posteriormente identificadas, utilizando técnicas de RMN, as di-hidrochalconas **1a** e **2a**.¹¹

2.5. Efeitos fitotóxicos das di-hidrochalconas **1a** e **2a**

As avaliações dos efeitos fitotóxicos das substâncias **1a** e **2a** foram realizadas para verificar a inibição ou não sobre a germinação de sementes, bem como à inibição do desenvolvimento da radícula e do hipocótilo das plantas daninhas *M. pudica* e *S. obtusifolia*. As substâncias foram testadas separadamente frente a cada uma das espécies vegetais.

Procedimentos comuns

Inicialmente a cada placa de Petri de 9,0 cm de diâmetro, forrada com um disco de papel-filtro qualitativo (FITEC, São Paulo, Brasil) foram aplicados 3 mL de solução etanólica de **1a** e **2a** nas concentrações de 0,80 e 160 mg L⁻¹. Após evaporação do solvente, adicionou-se água destilada na mesma quantidade da solução orgânica, para manter a concentração original. O tratamento a 0 mg L⁻¹, foi considerado testemunha e constou apenas de água destilada.¹⁶⁻¹⁸

Bioensaio de germinação de sementes

Em cada placa de Petri foram inoculadas 20 sementes da espécie invasora. As placas foram transferidas para câmara de germinação a 25 °C de temperatura constante e fotoperíodo de 12 h. A germinação foi monitorada em um período de 10 dias, com contagens diárias e eliminação das sementes germinadas. Foram consideradas sementes germinadas aquelas que apresentavam extensão radicular igual ou superior a 2,00 mm.¹⁶⁻¹⁸

Bioensaio de desenvolvimento da radícula e do hipocótilo

Em cada Placa de Petri foram inoculadas 20 sementes pré-germinadas da espécie invasora. As placas foram transferidas para câmara de germinação a 25°C e fotoperíodo de 24 h. O ensaio foi desenvolvido em um período de 10 dias e ao final foram medidos o comprimento da radícula e do hipocótilo.¹⁶⁻¹⁸

Análise estatística

O delineamento experimental para todos os bioensaios foi inteiramente casualizado, com três

repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as medidas comparadas pelo teste de Tukey (5%). Na análise desses dados utilizou-se o *software* SAS.¹⁹

3. Resultados e Discussão

3.1. Biotransformação

As chalconas **1** e **2** foram sintetizadas segundo a literatura,⁹ e utilizadas como substratos nas reações de biotransformação pelo fungo endofítico *Aspergillus flavus*, produzindo as correspondentes di-hidrochalconas **1a** e **2a**, respectivamente.¹¹ O fungo *A. flavus* promoveu reação de biorredução dos carbonos olefinicos 7 e 8 do sistema enona das chalconas, mantendo a carbonila intacta, levando à formação de suas respectivas di-hidrochalconas (Figura 1). Como principal evidencia da biorredução das chalconas, observa-se no espectro de RMN de ¹H das di-hidrochalconas, a ausência de dois dupletos referentes aos hidrogênios olefinicos *trans*, localizados em δ_H 7,54 e 7,96 ($J=15,6$ Hz) para a chalcona **1** e em δ_H 7,53 e 7,95 ($J=15,3$ Hz) para a chalcona **2**. Em substituição ao par de dupletos olefinicos *trans*, observa-se nos espectros dos compostos biotransformados, dois tripletos referentes a dois pares de hidrogênios metilênicos que acoplam entre si, em δ_H 3,01 e 3,29 ($J=7,5$ Hz) para **1a** e δ_H 2,95 e 3,18 ($J=8,5$ Hz) para

2a. Tais dados revelam que os carbonos metínicos da olefina nas chalconas foram bio-reduzidos à carbonos metilênicos nas di-hidrochalconas.

3.2. Dados espectrométricos

3,4,5-trimetoxichalcona (1)

RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ_H 3,87 (s, OCH₃), 3,88 (s, 2xOCH₃), 6,84 (s, 2H), 7,46 (dd, $J=7,8$ e 8,1, 2H), 7,51 (m, 1H), 7,54 (d, $J=15,6$ Hz, 1H), 7,96 (d, $J=15,6$ Hz, 1H), 7,98 (dd, $J=1,9$ e 7,8 Hz, 2H) ppm. RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz): δ_C 56,1 (2C), 60,8, 105,6 (2C), 121,3 (2C), 128,3 (2C), 128,5 (2C), 130,2, 132,6, 138,1, 140,3, 144,8, 153,3, 190,3 ppm.

2,3,4,4'-tetrametoxichalcona (2)

RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz): 3,82 (s, OCH₃), 3,85 (s, OCH₃), 3,90 (s, OCH₃), 6,67 (d, $J=9,0$ Hz, 1H), 6,92 (d, $J=8,7$ Hz, 1H), 7,34 (d, $J=8,7$ Hz, 1H), 7,53 ($J=15,3$ Hz, 1H), 7,95 ($J=15,3$ Hz, 1H), 7,99 (d, $J=9,0$ Hz, 1H) ppm. RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz): δ_C 55,3, 55,9, 60,7, 61,2, 107,5, 113,6 (2C), 120,9, 121,9, 123,6, 130,5 (2C), 131,2, 139,0, 142,3, 153,5, 155,4, 163,0, 188,8 ppm.

3,4,5-trimetoxi-di-hidrochalcona (1a)

RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz): 3,01 (t, $J=7,5$ Hz, 2H), 3,29 (t, $J=7,5$ Hz, 2H), 3,82 (s, OCH₃), 3,84

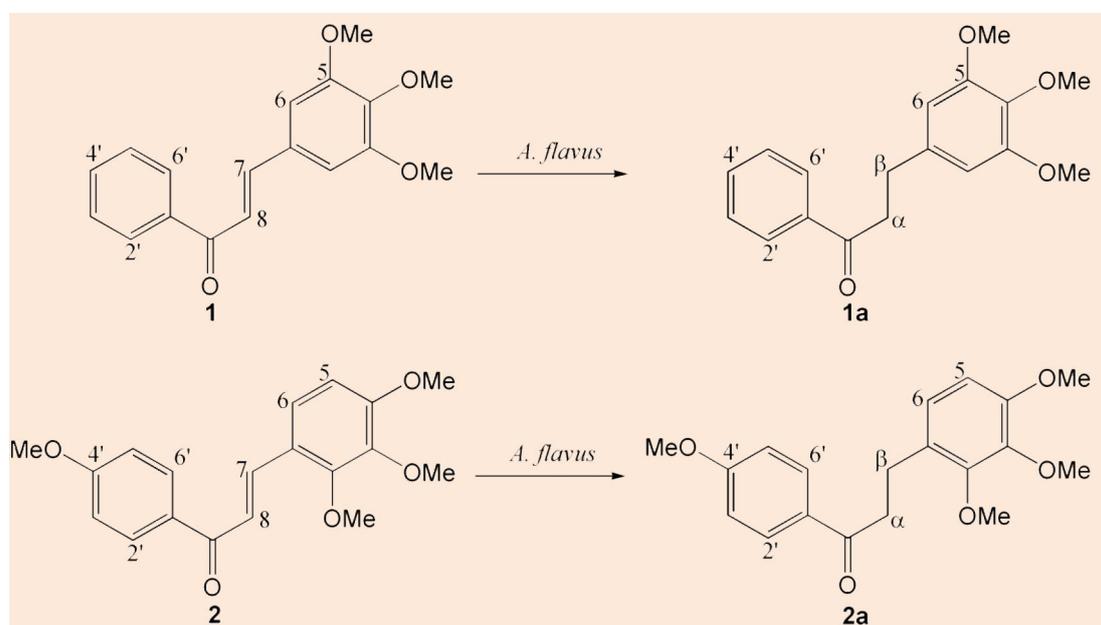


Figura 1. Reações de biorredução promovidas por *A. flavus*

(s, 2xOCH₃), 6,46 (s, 2H), 7,45 (t, *J*=7,5 Hz, 2H), 7,56 (m, 1H), 7,96 (dd, *J*=7,5 e 1,5 Hz) ppm. RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz): δ_c 31,1, 40,7, 56,1 (2C), 60,8, 105,4 (2C), 128,0 (2C), 128,8 (2C), 133,42 (2C), 136,9, 137,1 (2C), 153,2, 199,3 ppm.

2,3,4,4'-tetrametoxi-di-hidrochalcona (2a)

RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz): 2,95 (t, *J*=8,4 Hz, 1H), 3,18 (t, *J*=8,4 Hz, 1H), 3,83 (s, OCH₃), 3,85 (s, OCH₃), 3,88 (s, OCH₃), 3,90 (s, OCH₃), 6,59 (d, *J*=8,4 Hz, 1H), 6,87 (d, *J*=8,4 Hz, 1H), 6,92 (d, *J*=9,3 Hz, 2H), 7,95 (*J*=9,3 Hz, 2H) ppm. RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz): δ_c 25,5, 39,4, 55,3, 55,9, 60,6, 60,8, 107,2, 113,6 (2C), 123,9, 127,2, 129,9, 130,3 (2C), 142,3, 151,8, 152,2, 163,3, 198,3 ppm.

3.3. Avaliação dos efeitos fitotóxicos

A intensidade dos efeitos fitotóxicos das substâncias **1a** e **2a** variou em função da concentração, das espécies de plantas daninhas utilizadas (*M. pudica* e *S. obtusifolia*) e dos tipos de bioensaios realizados.²⁰⁻²² Verificou-se, também, que a intensidade dos efeitos esteve positivamente associada ao aumento da concentração, com inibições mínimas e máximas obtidas nas concentrações de 80 e 160 mg L⁻¹, respectivamente, tanto quando foram analisados os efeitos sobre a germinação das sementes, como do desenvolvimento da radícula e do hipocótilo, sendo as inibições efetivadas na concentração de 160 mg L⁻¹ sempre superior estatisticamente (*p*>0,05) à concentração de 80 mg L⁻¹.

Substâncias fitotóxicas afetam vários processos metabólicos nas plantas, como alteração da permeabilidade da membrana e absorção de íons;²³ inibição do transporte de elétrons na fotossíntese e na respiração;²⁴ alteração da atividade enzimática e bloqueio da divisão celular.^{25,26}

Assubstâncias fitotóxicas alteram o crescimento das plantas e a germinação das sementes através de uma multiplicidade de efeitos nos processos fisiológicos e bioquímicos. Essas substâncias podem afetar as atividades enzimáticas ou hormônios vegetais, aumentando a atividade da amilase e promovendo uma maior liberação de reservas que seriam fornecidas ao embrião, estendendo o estresse oxidativo e a dormência das sementes através do aumento da produção de ácido abscísico e inibindo a absorção de água

via alterações na permeabilidade da membrana.²⁵ É conhecido que a alteração na atividade enzimática das sementes afeta a mobilidade dos compostos armazenados, aumentando a inibição da germinação ou, às vezes, suprimindo-a completamente.²⁷ As fitotoxinas podem afetar a hidrogênio adenosina trifosfatase na membrana plasmática, resultando na redução da captação de minerais e água pelas raízes e, conseqüentemente, tem um efeito significativo nas funções essenciais das plantas, como fotossíntese, respiração e síntese de proteínas, culminando na redução do crescimento.²³ Além disso, as fitotoxinas têm sido associadas à inibição da mitose e à ruptura da estrutura das organelas, sendo que o crescimento celular nas plantas é dependente do processo mitótico.²⁸ Quando as divisões celulares são perturbadas durante a germinação, a maioria das plântulas morre antes do surgimento ou mostra anormalidades.²⁹

Raros estudos têm focado sobre o potencial fitotóxico de di-hidrochalconas. A partir de frutos e folhas de *Myrica gale* L. foi isolada e identificada a substância 3-(1-oxo-3-fenilpropil)-1,1,5-trimetilciclo-hexano-2,4,6-triona, uma di-hidrochalcona de esqueleto raro C-metilado, conhecida como mirigalona A. O composto é fitotóxico para espécies de plantas clássicas usadas em ensaios aleloquímicos e também contra *Fallopia x bohémica* (Chrtek & Chrtková) J. P. Bailey, uma planta altamente invasiva.²⁹ Miragalona A também inibiu a germinação de sementes de *Lepidium sativum* de maneira dose dependente, impedindo o metabolismo de giberelinas, o metabolismo do ácido abscísico e a produção de superóxido apoplástico, todos necessários para a ruptura do endosperma e conseqüente crescimento embrionário por alongamento.³⁰ A di-hidrochalcona ceratiolina não demonstrou efeito na germinação ou no crescimento radicular de sementes de *Lactuca sativa* L. ou *Schizachyrium scoparium* (Michx.) Nash., no entanto, ela se decompõe pura ou em solução ao ácido di-hidrocinâmico, que demonstrou ser inibidor de sementes de *L. sativa* e do e do *S. scoparium*.³¹ A di-hidrochalcona floretina foi avaliada quanto ao desenvolvimento das espécies daninhas *Amaranthus hybridus* L. (caruru-roxo) e *Ipomoea grandifolia* (Dammer) O'Donell (corda-de-viola) e, também, os seus efeitos sobre as funções mitocondriais. Em *A. hybridus*, a floretina (250 μM) induziu um aumento dos parâmetros biométricos avaliados e em *I. grandifolia* (250 e

500 μM) estimulou o crescimento das raízes, mas reduziu o comprimento do caule, sem alterar as biomassas, e em concentrações mais elevadas passou a exercer efeito inibitório em ambas as plantas.³²

Outras substâncias, que também possuem um esqueleto C6-C3-C6, aí incluídas as di-hidrochalconas e as chalconas, têm apresentado fitotoxicidade sobre a radícula de diferentes espécies. Um exemplo é a trans-chalcona, que na concentração de apenas 35 μM , apresentou uma ação inibitória de 50% sobre desenvolvimento da radícula de *Arabidopsis thaliana*.¹⁰ A atividade relatada foi atribuída a alterações teciduais e danos celulares nos meristemas da espécie receptora.¹⁰

A atividade inibitória de di-hidrochalconas já foi observada para o desenvolvimento do hipótalo do feijão (*Vigna radiata*).³³ O estudo realizado relata que as di-hidrochalconas foram responsáveis pelo desacoplamento da fosforilação oxidativa no hipocótilo do feijão. Ao comparar a atividade das di-hidrochalconas com as correspondentes chalconas, que também foram testadas, os autores concluíram que o sistema carbonila α,β -insaturado das chalconas não foi essencial para o efeito fitotóxico sobre o hipocótilo.³³

As plantas invasoras de pastagens têm causado elevados prejuízos à pecuária na Amazônia.¹⁻³ Entre as principais plantas invasoras de pastagens nessa região, merecem destaque *M. pudica* e *S. obtusifolia*, as quais são extremamente agressivas ao pasto. Assim, diversos trabalhos envolvendo alelopatia e efeitos fitotóxicos de substâncias produzidas por plantas^{18,34-36} e microrganismos (fungos endofíticos)³⁷⁻⁴¹ frente a essas duas espécies invasoras têm sido publicados.

Efeitos fitotóxicos na germinação de sementes

A avaliação dos efeitos fitotóxicos das di-hidrochalconas **1a** e **2a** sobre a germinação de sementes das espécies *M. pudica* e *S. obtusifolia* está registrada na Figura 2. Na concentração de 160 mg L^{-1} as substâncias **1a** e **2a** apresentaram, respectivamente, os maiores percentuais de inibição, 54% e 65% sobre a germinação de sementes de *M. pudica*, enquanto que, não foram observados efeitos expressivos para *S. obtusifolia*. Esses resultados indicaram que, as inibições causadas pelas substâncias **1a** e **2a** sobre a germinação de sementes da espécie *M. pudica* foram de maior magnitude ($p > 0,05$) em

comparação a espécie *S. obtusifolia*, indicando maior sensibilidade da primeira espécie aos efeitos fitotóxicos dos compostos testados. De acordo com Dudai e colaboradores (1999),⁴² o percentual mínimo de 50% é considerado como satisfatório para a atividade fitotóxica, indicando que ambos compostos testados apresentaram efeitos satisfatórios na concentração de 160 mg L^{-1} . Ligeiras diferenças na estrutura química de substâncias fitotóxicas podem ser favoráveis ao aumento da atividade fitotóxica.^{43,44} A presença ou ausência de certos grupos funcionais em uma molécula pode representar o aumento ou diminuição da atividade alelopática.⁹ A di-hidrochalcona **2a** apresenta em sua estrutura química uma metoxila (OMe) a mais do que **1a**, e pode-se inferir que a presença dessa metoxila no anel A de **2a** seja responsável por sua maior atividade na inibição da germinação de sementes de *M. pudica*. A presença da metoxila em **2a** aumenta a densidade eletrônica do anel aromático A, porque o grupo metoxila é doador de elétrons.^{45,46} Um estudo de correlação estrutura química versus atividade biológica com maior número de substâncias análogas, se faz necessário para comprovar essa hipótese.^{47,48} Mesmo na concentração de 160 mg L^{-1} , os resultados dos ensaios não foram significativos⁴² para a espécie *S. obtusifolia*, com inibição de 12% para **1a** e 16% para **2a**. A espécie *M. pudica* foi mais sensível à ação inibitória dos compostos frente à inibição da germinação de sementes do que *S. obtusifolia*, e esse resultado pode estar relacionado com as densidades das sementes das plantas receptoras.^{49,50} Na maioria dos casos, a atividade fitotóxica é inversamente proporcional à densidade das sementes, e como as sementes de *M. pudica* são menos densas do que as de *S. obtusifolia*, o resultado observado neste trabalho justifica sua maior sensibilidade nesse bioensaio.⁵¹

Efeitos fitotóxicos no desenvolvimento da radícula

As di-hidrochalconas também apresentaram maior fitotoxicidade sobre o desenvolvimento da radícula de *M. pudica* em relação à *S. obtusifolia*. Para *M. pudica* os percentuais de inibição mais expressivos foram observados na concentração de 160 mg L^{-1} , sendo que a magnitude de inibição da di-hidrochalcona **1a** foi de 61% e a da di-hidrochalcona **2a** de 49%. Esses resultados foram

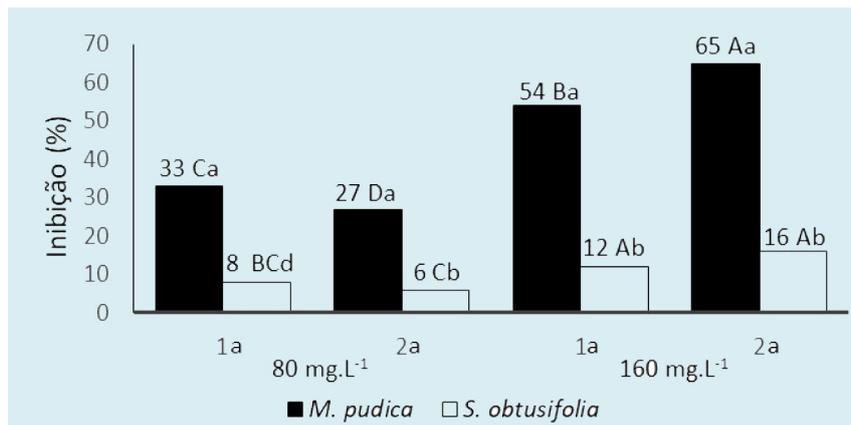


Figura 2. Efeitos inibitórios sobre a germinação de sementes das plantas daninhas *M. pudica* e *S. obtusifolia*, efetivados pelas substâncias **1a** e **2a**. Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas para efeito de concentração e minúscula para comparação entre as substâncias, não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$)

contrários aos de desenvolvimento de germinação de sementes, haja vista que **1a** foi mais ativa do que **2a**. Aqui, pode-se inferir que a ausência da metoxila no Anel A de **1a** esteja favorecendo seu maior potencial de inibição em comparação ao de **2a**. Nesse caso, a densidade eletrônica do Anel A de **1a** é menor do que a de **2a**.^{45,46} Em relação ao bioensaio de desenvolvimento da radícula de *S. obtusifolia*, a di-hidrochalcona **1a** foi mais fitotóxica, com 37% de inibição, enquanto **2a** inibiu apenas em 26%, não sendo esse resultado considerado significativo (Figura 3).⁴² Em geral, a germinação de sementes é menos sensível aos efeitos fitotóxicos do que o crescimento da radícula,⁵¹ o que de certa forma pode explicar as variações observadas neste estudo. Ripardo Filho e colaboradores³⁴ avaliaram

a atividade fitotóxica dos esteróides espinasterol e espinasterol glicosilado isolados de *Moutabea guianensis* no desenvolvimento da radícula da espécie *Senna obtusifolia*, na concentração de 20 mg L⁻¹, onde o espinasterol glicosilado apresentou 75% de inibição, enquanto o espinasterol livre inibiu em 37%. Os autores atribuíram a inibição mais elevada do glicosil espinasterol à sua maior solubilidade em água.³⁴

Efeitos fitotóxicos no desenvolvimento do hipocótilo

Os efeitos fitotóxicos sobre as duas espécies invasoras nos bioensaios de alongamento do hipocótilo não foram considerados satisfatórios para ambas concentrações testadas, com

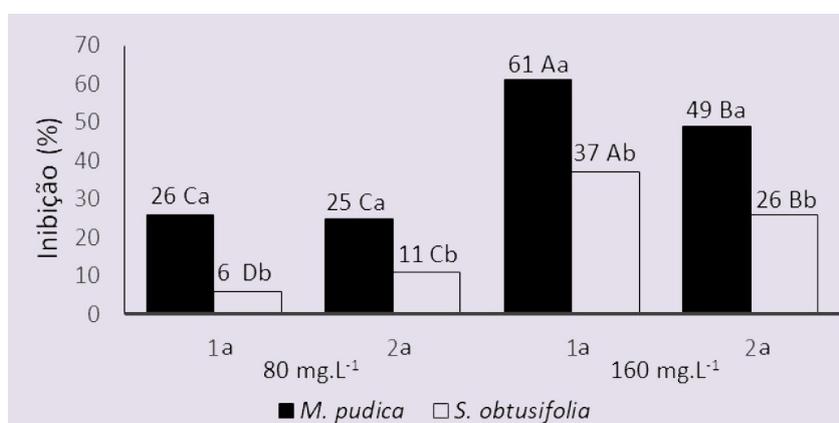


Figura 3. Efeitos inibitórios sobre o desenvolvimento da radícula das plantas daninhas *M. pudica* e *S. obtusifolia*, efetivados pelas substâncias **1a** e **2a**. Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas para efeito de concentração e minúscula para comparação entre as substâncias, não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$)

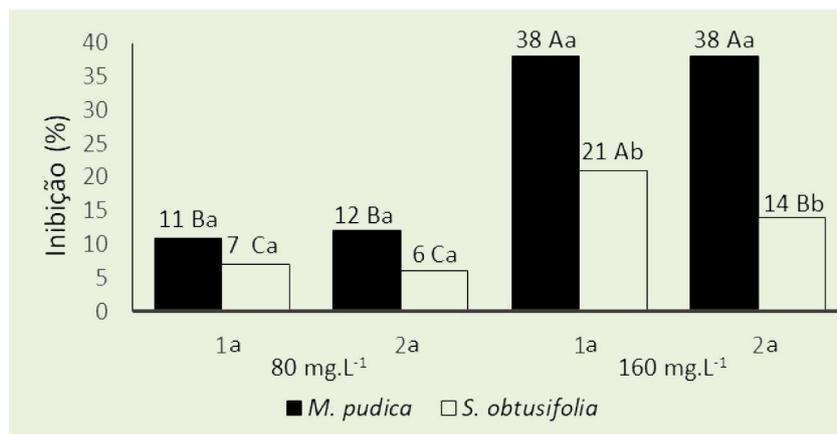


Figura 4. Efeitos inibitórios sobre o desenvolvimento do hipocótilo das plantas daninhas *M. pudica* e *S. obtusifolia*, efetivados pelas substâncias **1a** e **2a**. Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas para efeito de concentração e minúscula para comparação entre as substâncias, não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$)

percentuais de inibição abaixo de 50% .⁴² Na concentração mais elevada (160 mg L⁻¹), as di-hidrochalconas **1a** e **2a** inibiram na mesma magnitude o desenvolvimento do hipocótilo de *M. pudica* em 38% . Já para *S. obtusifolia*, **1a** foi ligeiramente mais efetiva (21%) do que **2a** (14%). Novamente é possível observar que os efeitos inibitórios de **1a** e **2a** dependem da concentração utilizada e da espécie receptora, e que a espécie *M. pudica* foi mais sensível à ação inibitória dos compostos frente ao desenvolvimento do hipocótilo do que *S. obtusifolia* (Figura 4).

4. Conclusão

Variações consideráveis nos efeitos fitotóxicos foram observadas entre as concentrações de 80 e 160 mg L⁻¹, com inibições mais intensas verificada na concentração mais elevada. Quando se considera o valor de 50% de inibição como indicador satisfatório para avaliar as potencialidades fitotóxicas de uma dada substância, observa-se inibições dessa magnitude para as duas substâncias, apenas na concentração de 160 mg L⁻¹ sobre a germinação de sementes e alongamento da radícula a espécie *M. pudica*. Esses resultados indicam o fator concentração como decisivo para os efeitos observados, conforme já reportado na literatura. Independentemente da substância e da concentração, os efeitos inibitórios incidiram com mais intensidade sobre a espécie *M. pudica*, o que indica maior especificidade entre planta receptora e substância testada. Esse resultado indica que além da concentração, as variações nas intensidades dos

efeitos inibitórios são, também, dependentes da sensibilidade relativa da espécie receptora.

As reações de biorredução de chalconas aqui apresentadas são quimiosseletivas, uma vez que somente a ligação dupla C=C do sistema enona das chalconas sofreu redução, indicando o potencial de biotransformação do fungo endofítico *Aspergillus flavus* na produção de di-hidrochalconas.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas concedidas a FTP e WSR, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro ao projeto 407586/2013-0 e à Universidade Federal do Pará (UFPA) pela infraestrutura de pesquisa.

Referências Bibliográficas

- ¹Dos Santos, M. A. S.; Lourenço Júnior, J. B.; de Santana, A. C.; Homma, A. K. O; de Andrade, S. J. T.; Maciel e Silva, A. G. Caracterização do nível tecnológico da pecuária bovina na Amazônia brasileira. *Revista de Ciências Agrárias* **2017**, *60*, 103. [Link]
- ²Rivero, S.; Almeida, O.; Ávila, S.; Oliveira, W. Pecuária e desmatamento: uma análise das principais causas diretas do desmatamento na Amazônia. *Nova Economia* **2009**, *19*, 41. [CrossRef]
- ³Rodrigues, D. A.; Pereira, G. A. M.; Silva, A. A.; Santos, M. H.; Demuner, A. J.; Oliveira, P. M. Phytochemical profile of pasture weeds from the brazilian cerrado. *Planta Daninha* **2019**, *37*, 1. [CrossRef]

- ⁴ González, J. G.; Flies, C. N.; Navarrete, A. M.; López, J. G.; Troncoso, C. T. Bioherbicida a partir de extracto fenólico obtenido de residuos de almazaras. *Scientia Agropecuaria* **2019**, *10*, 497. [[CrossRef](#)]
- ⁵ Beckie, H. J. Herbicide-resistant weed management: focus on glyphosate. *Pest Management Science* **2011**, *67*, 1037. [[CrossRef](#)]
- ⁶ Shah, R. H.; Baloch, M. S.; Khan, A. A.; Ijaz, M.; Zubair, M. Bioherbicidal assessment of aqueous extracts of mesquite (*Prosopis juliflora*) on weeds control and growth, yield and quality of wheat. *Planta Daninha* **2018**, *36*, 1. [[CrossRef](#)]
- ⁷ Berlink, R. G. S.; Borges, W. S.; Scottic, M. T.; Vieira, P. C. A química de produtos naturais do Brasil do século XXI. *Química Nova* **2017**, *40*, 706. [[CrossRef](#)]
- ⁸ do Nascimento, J. S.; Núñez, W. E. R.; dos Santos, V. H. P.; Aleu, J.; Cunha, S.; Silva, E. O. Mapping the biotransformation of coumarins through filamentous fungi. *Molecules* **2019**, *24*, 3531. [[CrossRef](#)]
- ⁹ Bitencourt, H. R.; Santos, L. S.; Souza Filho, A. P. S. Atividade alelopática de chalcona sintética, de seus precursores e de cetonas e aldeídos relacionados. *Planta Daninha* **2007**, *25*, 747. [[CrossRef](#)]
- ¹⁰ Díaz-Tielas, C.; Graña, E.; Reigosa, M. J.; Sánchez-Moreiras, A. M. Biological activities and novel applications of chalcones. *Planta Daninha* **2016**, *34*, 607. [[CrossRef](#)]
- ¹¹ Corrêa, M. J. C.; Nunes, F. M.; Bitencourt, H. R.; Borges, F. C.; Guilhon, G. M. S. P.; Arruda, M. S. P.; Marinho, A. M. R.; Santos, A. S.; Alves, C. N.; Brasil, D. S. B.; Santos, L. S. Biotransformation of chalcones by the endophytic fungus *Aspergillus flavus* isolated from *Paspalum maritimum* Trin. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2011**, *22*, 1333. [[CrossRef](#)]
- ¹² Souza Filho, A. P. S.; Dutra, S.; Silva, M. A. M. Métodos de superação da dormência de sementes de plantas daninhas de pastagens cultivadas da Amazônia. *Planta Daninha* **1998**, *16*, 3. [[CrossRef](#)]
- ¹³ Araújo, W. L.; Lima, A. O. S.; Azevedo, J. L.; Marcon, J.; Sobral, J. K.; Lacava, P. T.; Manual: Isolamento de Microrganismos Endofíticos, CALQ: Piracicaba, Brazil, 2002.
- ¹⁴ De Hoog, G. S.; Guarro, J. G.; Figueras, M. J.; *Atlas of clinical fungi*, 2a. ed., Centraalbureau voor Schimmelcultures: Utrecht, 2000.
- ¹⁵ Sidrim, J. J. C.; Rocha, M. F. G.; *Micologia Médica à luz de autores contemporâneos*. 1a. ed., Ed. Guanabara: Rio de Janeiro, 2004.
- ¹⁶ Safdar, M. E.; Tanveer, A.; Khaliq, A.; Naeem, M. S. Allelopathic action of parthenium and its rhizospheric soil on maize as influenced by growing conditions. *Planta Daninha* **2014**, *32*, 243. [[CrossRef](#)]
- ¹⁷ Reis, F. C.; Medina Sotomayor, J. F.; Garcia, D. B.; Barroso, A. A. M.; Albrecht, A. J. P.; Filho, R. V. Germination and emergence of trumpet flower (*Tecoma stans*) under different environmental conditions. *Planta Daninha* **2014**, *32*, 283. [[CrossRef](#)]
- ¹⁸ Santos, L. S.; Borges, F. C.; Oliveira, M. N.; Ferreira, I. C. S.; Guilhon, G. M. S. P.; Souza Filho, A. P. S.; Santos, A. S.; Arruda, M. S. P.; Moller, A. H.; Arruda, A. C. Allelochemicals isolated from the leaves of *Virola michelli* Heckel. *Allelopathy Journal* **2007**, *20*, 235. [[Link](#)]
- ¹⁹ SAS-INSTITUTE; *Statistical Analysis Systems. User's guide*. Version 6.4. Cary: **1989**, 846 p.
- ²⁰ Grisi, P. U.; Gualtieri, S. C. J.; Anese, S.; Pereira, V. C.; Forim, M. R. Effect of *Serjania lethalis* ethanolic extract on weed control. *Planta Daninha* **2013**, *31*, 239. [[CrossRef](#)]
- ²¹ Turk, M. A.; Lee, K. D.; Tawaha. A. M. Inhibitory effects of aqueous extracts of Black mustard on germination and growth of radish. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* **2005**, *1*, 227. [[Link](#)]
- ²² Ghareib, H. R. A.; Abdelhamed, M. S.; Ibrahim, O. H. Antioxidative effects of acetone fraction and vanillic acid from *Chenopodium murale* on tomato plants. *Weed Biology and Management* **2010**, *10*, 64. [[CrossRef](#)]
- ²³ Gniazdowska, A.; Bogatek, R. Allelopathic interactions between plants. Multi site action of allelochemicals. *Acta Physiologiae Plantarum* **2005**, *27*, 395. [[CrossRef](#)]
- ²⁴ Abraham, D.; Braquini, W. L.; Kelmer-Bracht, A. M.; Ishii-Iwamoto, E. L. Effects of four monoterpenes on germination, primary root growth, and mitochondrial respiration of maize. *Journal of Chemical Ecology* **2000**, *26*, 611. [[CrossRef](#)]
- ²⁵ Singh, A.; Singh, D.; Singh, N. B. Allelochemical stress produced by aqueous leachate of *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. *Plant Growth Regulation* **2009**, *58*, 163. [[CrossRef](#)]
- ²⁶ Teerarak, M.; Laosinwattana, C.; Charoenying, P. Evaluation of allelopathic, decomposition and cytogenetic activities of *Jasminum officinale* L. f. var. grandiflorum (L.) Kob. on bioassay plants. *Bioresource Technology* **2010**, *101*, 5677. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]

- ²⁷ Einhellig, F. A. Em *Mechanism of Action of Allelochemicals in Allelopathy*; Einhellig, F. A., ed.; ACS Symposium Series. American Chemical Society: Washington, 1995, cap. 7. [CrossRef]
- ²⁸ Zhang, Y.; Gu, M.; Shi, K.; Zhou, Y. H.; Yu, J. Q. Effects of aqueous root extracts and hydrophobic root exudates of cucumber (*Cucumis sativus* L.) on nuclei DNA content and expression of cell cycle-related genes in cucumber radicles. *Plant and Soil* **2010**, *327*, 455. [CrossRef]
- ²⁹ Popovici, J.; Bertrand, C.; Jacquemoud, D.; Bellvert, F.; Fernandez, M. P.; Comte, G.; Piola, F. An Allelochemical from *Myrica gale* with Strong Phytotoxic Activity against Highly Invasive *Fallopia x bohemica* Taxa. *Molecules* **2011**, *16*, 2323. [Crossref][Pubmed]
- ³⁰ Oracz, K.; Voegelé, A.; Tarkowská, D.; Jacquemoud, D.; Turecková, V.; Urbanová, T.; Strnad, M.; Sliwinska, E.; Leubner-Metzger, G. Myrigalone A inhibits *Lepidium sativum* seed germination by interference with gibberellin metabolism and apoplastic superoxide production required for embryo extension growth and endosperm rupture. *Plant and cell physiology* **2012**, *53*, 81. [CrossRef][Pubmed]
- ³¹ Fischer, N. H.; Tanrisever, N.; Williamson, G. B. Em *Allelopathy in the Florida scrub community as a model for natural herbicide actions*; Cutler, H. G., ed.; ACS Books: Washington, D.C., 1998, cap. 15. [CrossRef]
- ³² Ribeiro, M. R.; Mantovanelli, G. C.; Menezes, P. V. M. C.; Luiza, E.; Iwamoto, I. *Resumos do 28º Encontro Anual de Iniciação Científica-UEM*, Maringá, Brasil, 2019. [Link]
- ³³ Ravel, P.; Tissut, M.; Douce, R. Uncoupling activities of chalcones and dihydrochalcones on isolated mitochondria from potato tubers and mung bean hypocotyls. *Phytochemistry* **1980**, *21*, 2845. [CrossRef]
- ³⁴ Ripardo Filho, H. S.; Pacheco, L. C.; Souza Filho, A. P. S.; Guilhon, G. M. S. P.; Arruda, M. S. P.; Santos, L. S. Bioensaios de atividade alelopática dos esteroides espinasterol, espinasterona e glicopiranosil espinasterol. *Planta Daninha* **2012**, *30*, 705. [CrossRef]
- ³⁵ Santos, L. S.; Santos, J. C. L.; Souza Filho, A. P. S.; Corrêa, M. J. C.; Veiga, T. A. M.; Freitas, V. C. M.; Ferreira, I. C. S.; Gonçalves, N. S.; Silva, C. E.; Guilhon, G. M. S. P. Atividade alelopática de substâncias químicas isoladas do capim-marandu e suas variações em função do pH. *Planta Daninha* **2008**, *26*, 531. [CrossRef]
- ³⁶ Borges, F. C.; Santos, L. S.; Correa, M. J. C.; Oliveira, M. N.; Souza Filho, A. P. S. Atividade alelopática de duas neolignanais isoladas de folhas de *Virola surinamensis* (Myristicaceae). *Planta Daninha* **2007**, *25*, 51. [CrossRef]
- ³⁷ Santos, L. S.; Oliveira, M. N.; Guilhon, G. M. S. P.; Santos, A. S.; Ferreira, I. C. S.; Lopes-Júnior, M. L.; Arruda, M. S. P.; Sailva, M. N.; Souza Filho, A. P. S.; Rodrigues-Filho, E.; Oliveira, M. C. F. Potencial herbicida da biomassa e de substâncias químicas produzidas pelo fungo endofítico *Pestalotiopsis guepinii*. *Planta Daninha* **2008**, *26*, 539. [CrossRef]
- ³⁸ Rodrigues, I. C. S. Cardoso, R. O.; Correa, M. J. C.; Santos, L. S.; Ribeiro, W. S.; Pinto, F. T.; *Resumos do 56º Congresso Brasileiro de Química*, Belém, Brasil, 2016. [Link]
- ³⁹ Araujo, R. N. M.; Ribeiro, W. S.; Pinto, F. T.; Santos, M. M. M.; Corrêa, M. J. C.; Lopes Junior, M. L.; Guilhon, G. M. S. P.; Santos, L. S.; *Resumos da 42ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Joinville, Brasil, 2019. [Link]
- ⁴⁰ Viana, J. S.; Mendes, L. C. F.; Lopes Junior, M. L.; Corrêa, M. J. C.; Araujo, R. N. M.; Ribeiro, W. S.; Souza Filho, A. P. S.; Santos, L. S.; *Resumos do 16º Encontro de Profissionais de Química da Amazônia*, Belém, Brasil, 2019. [Link]
- ⁴¹ Bezerra, F.; Viana, J. S.; Lopes Junior, M. L.; Araujo, R. N. M.; Mendes, L. C. F.; Filho, A.; Filho, H.; Santos, L. *Resumos do 16º Encontro de Profissionais de Química da Amazônia*, Belém, Brasil, 2019. [Link]
- ⁴² Dudai, N.; Poljakoff-Mayber, A.; Mayer, A. M.; Putievsky, E.; Lerner, H. R. Essential oils as allelochemicals and their potential use as bioherbicides. *Journal of Chemical Ecology* **1999**, *25*, 1079. [CrossRef]
- ⁴³ Souza Filho, A. P. S.; Borges, F. C.; Santos, L. S. Análise comparativa dos efeitos alelopáticos das substâncias químicas tironina e tironina acetilada. *Planta Daninha* **2006**, *24*, 205. [CrossRef]
- ⁴⁴ Souza Filho, A. P. S.; de Vasconcelos, M. A. M.; Zoghbi, M. G. B.; Cunha, R. L. Potential allelopathic of the oils of *Piper hispidinervium* C. DC. and *Pogostemon heyneanus* (Benth) on weeds. *Acta Amazônica* **2009**, *39*, 389. [CrossRef]
- ⁴⁵ Silverstein, R. M.; Bassler, G. C.; Morrill, T. C.; *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. 7a. ed., LTC: Rio de Janeiro, 2007.
- ⁴⁶ Solomons, T. W. G.; Fryhle, C. B. G.; *Química orgânica*: vol. 1, 10a. Ed., LTC: Rio de Janeiro, 2012.

- ⁴⁷ Alves, C. N.; de Macedo, L. G. M.; Honório, K. M.; Camargo, A. J.; Santos, L. S.; Jardim, I. N.; Barata, L. E. S.; da Silva, A. B. F. A Structure-Activity-Relationship (SAR) study of neolignan compounds with anti-schistosomiasis activity. *Journal of the Brazilian Chemistry Society* **2002**, *13*, 300. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁸ Pereira, G. A. N.; Souza, G. C.; Santos, L. S.; Barata, L. E. S.; Meneses, C. C. F.; Krettli, A. U.; Daniel-Ribeiro, C. T.; Alves, C. N. Synthesis, antimalarial activity in vitro, and docking studies of novel neolignan derivatives. *Chemical Biology & Drug Design* **2017**, *90*, 464. [[CrossRef](#)][[Pubmed](#)]
- ⁴⁹ Tseng, M.; Kuo, Y.; Chen, Y.; Chou, C. Allelopathic Potential of *Macaranga tanarius* (L.) Muell.–Arg.. *Journal of Chemical Ecology* **2003**, *29*, 1269. [[CrossRef](#)]
- ⁵⁰ Souza Filho, A. P. S.; Alves, S. M.; Figueiredo, F. J. C. Allelopathic effects of calopo according to its age and to seed density of the receiver plant. *Planta Daninha* **2003**, *21*, 211. [[CrossRef](#)]
- ⁵¹ Reigosa M. J.; Pazos-Malvido, E. Phytotoxic effects of 21 plant secondary metabolites on *Arabidopsis thaliana* germination and root growth. *Journal of Chemical Ecology* **2007**, *33*, 1456. [[CrossRef](#)][[Pubmed](#)]