

Análise por CLAE/EM, Investigação do Efeito Fitotóxico e da Atividade Larvicida de *Tetrapteryx anisoptera* (Malpighiaceae)

HPLC/MS Analysis, Investigation of the Phytotoxic Effect and Larvicidal Activity of *Tetrapteryx anisoptera* (Malpighiaceae)

Gracelene de S. Lima,^a Renata A. Cunha,^b Anne J. Rangel,^c Alberto J. O. Lopes^a, Antônio J. Cantanhede Filho^{a,*}

^aInstituto Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Química–PPGQ, Campus Monte Castelo, CEP 65030-005, São Luís–MA, Brasil

^bInstituto Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica–PPGMEC, Campus Monte Castelo, CEP 65030-005, São Luís–MA, Brasil

^cUniversidade Regional do Cariri, Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular, CEP 63105-000, Crato–CE, Brasil

*E-mail: prof.antoniofilho@ifma.edu.br

Recebido: 25 de Julho de 2023

Aceito: 12 de Março de 2024

Publicado online: 20 de Março de 2024

Tetrapteryx anisoptera belongs to the Malpighiaceae family, with limited knowledge concerning its chemical constitution and bioactive properties. This genus is recognised for its toxicity to ruminants. Given the significance of comprehending the chemical constituents of this species and their associated biological functions, the present study endeavoured to explore the chemical diversity of *T. anisoptera*. It aimed to assess its potential as a larvicide against *Aedes aegypti* mosquitoes and to evaluate the allelopathic potential of its leaf extracts against *Senna obtusifolia* species. Crude extracts of the plant's leaves, specifically in ethyl acetate, methanol, and aqueous solvents, were subjected to chemical characterisation via Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry. This analytical approach unveiled the presence of various compounds, including catechin, muchronatin B, gambiririn C, glycosidic apigenin, glycosidic luteolin, vicenin II, leucenin II, and quercetin-3-*O*-neohesperidoside. Notably, this marks the first annotation of these compounds within the context of *T. anisoptera*. Regarding the larvicidal assessment against *A. aegypti* larvae, the extracts from *T. anisoptera* demonstrated negligible activity, exhibiting no significant impact on larval development. Nonetheless, the ethyl acetate extract displayed an average mortality rate of 46%. Turning to the allelopathic evaluation, the outcomes indicated that the leaf extract of *T. anisoptera* exhibited a low potential for inhibiting germination. In summary, this study stands as the initial documented instance elucidating the chemical composition of *T. anisoptera*, alongside the evaluation of its biological, allelopathic, and larvicidal activities.

Keywords: Natural products; biological activity; biolarvicide; allelopathy; bioprospection

1. Introdução

Numerosos estudos, por meio de técnicas analíticas com altos níveis de seletividade e sensibilidade, estão sendo conduzidos no Brasil em um esforço para identificar compostos ativos de diversas espécies de plantas.¹⁻² Dentre elas, a espécie *Tetrapteryx anisoptera* A. Juss (Malpighiaceae), visto que pertence a um gênero com uma rica diversidade química e várias classes de substâncias.³⁻⁶ Diversas espécies do gênero *Tetrapteryx* apresentam atividades biofarmacológicas.^{4,5,7,8} Esse gênero compreende 90 espécies distribuídas nas regiões tropicais, na América Central e América do Sul, e é conhecido por possuir espécies tóxicas. A intoxicação por *Tetrapteryx* foi relatada pela primeira vez por Tokarnia (1989), e sua toxicidade está relacionada à insuficiência cardíaca crônica, associada a lesões degenerativas e fibrosantes acentuadas no miocárdio bovino. Também há relatos de abortos devido à intoxicação pela ingestão de espécies do gênero *Tetrapteryx*, como *T. acutifolia* e *T. multiglandulosa* no Brasil, onde aparecem como plantas tóxicas.^{6,9}

A espécie em estudo, *Tetrapteryx anisoptera*, possui identificação catalogada no Brasil apenas nos estados da Bahia, Pernambuco, Minas Gerais e Espírito Santo. No entanto, não há relatos sobre seus constituintes químicos e atividades biológicas na literatura existente, o que confere grande potencial para o estudo de seus extratos vegetais.

Em geral, os extratos vegetais tendem a ser seletivos e biodegradáveis, devido ao fato de serem compostos por uma multiplicidade de princípios ativos. Alguns compostos servem principalmente para garantir a sobrevivência da planta, dotando certas espécies de atividades substanciais, incluindo propriedades alelopáticas, larvicidas e inseticidas.⁹⁻¹⁰

Cada vez mais, o uso de produtos de origem natural derivados de plantas para controle de insetos é reconhecido como uma fonte alternativa de compostos larvicidas, com o objetivo de também alcançar o controle químico de vetores como o *Aedes aegypti*. Esse inseto é o vetor para

vários arbovírus, incluindo zika, febre amarela e dengue, os quais podem ter consequências graves para os infectados.¹¹⁻¹³

O controle de plantas daninhas é outra área com alta demanda por agroquímicos sintéticos, necessitando de uma vigilância intensificada no contexto de minimizar as perdas agrícolas e impactos ambientais.¹⁴ *Senna obtusifolia* (L.) Irwin & Barneby (Fabaceae) é uma planta invasora que tem apresentado um grande potencial de resistência, quando como espécie receptora, em estudos para descoberta de bioherbicidas.¹⁵ Os efeitos alelopáticos observados em matrizes naturais podem auxiliar na busca por novos pesticidas agrícolas e reduzir o uso de herbicidas, substituindo-os por bioherbicidas, que são de grande utilidade na agricultura.¹⁶

Sob essa perspectiva, o presente artigo desenvolveu o estudo químico de extratos das folhas de *Tetrapterys anisoptera* e avaliou sua atividade larvicida frente ao *Aedes aegypti* e sua atividade alelopática frente à *Senna obtusifolia*, visando contribuir com futuros estudos para a formulação de novos bioherbicidas e biolarvicidas naturais, de modo que substituam ou reduzam a utilização de agrotóxicos sintéticos no controle de plantas daninhas e insetos.

2. Experimental

2.1. Coleta, identificação e obtenção dos extratos brutos de *Tetrapterys anisoptera*

Amostras de *T. anisoptera* foram coletadas no Sítio Sobradinho, zona rural de Aurora, Estado do Ceará, Brasil (6° 56' 4" S, 38° 57' 51" O), herborizadas e depositadas no Herbário Graziela Barroso (TEPB) da Universidade Federal do Piauí. Conforme preconizado pela legislação brasileira, o presente estudo está registrado Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SISGEN, sob protocolo A3293DC.

Após coletadas, as folhas foram transportadas até o laboratório do Instituto Federal do Maranhão - Monte Castelo para processamento.

Os extratos foram preparados a partir de 600 g de folhas trituradas em moinho rotor tipo ciclone TE-651/2, com malha de 8 mm e submetidos à maceração com 2 L dos solventes acetato de etila (99,5%) (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA), metanol (99,8%) (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) e água deionizada, sequencialmente, em ordem crescente de polaridade. Cada solvente permaneceu em contato com as folhas durante 48 h, sob agitação nesse intervalo de tempo. Os extratos brutos de acetato de etila e metanólico foram obtidos após filtração e evaporados até secagem no vácuo, à temperatura de, aproximadamente, 40 °C para produzir 17,00 g e 23,03 g, respectivamente. A massa do extrato aquoso foi de 15,18 g, obtida após filtração e secagem em liofilizador Liotop® K108 (Liobrás, São Carlos, Brasil) nas seguintes condições: tempo de 48 h, temperatura de 54 °C e vácuo 213 VcA.

2.2. Análise por Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (CL-EM)

Os extratos brutos obtidos de *Tetrapterys anisoptera* (3,0 mg), em acetato de etila (AcOEt), metanólico (MeOH) e aquoso, foram diluídos em acetonitrila (ACN) grau gradiente para cromatografia de alta eficiência e submetidos à análise de HPLC. Alíquotas de 10 µL foram injetadas diretamente para serem submetidas à análise por (CLAE) com detecção de UV a 254 nm.

Os extratos brutos foram analisados em cromatógrafo com duas bombas e injetor automático Shimadzu Prominence LC-30 AD (Shimadzu, Kyoto, JP). Na análise, foi utilizada uma coluna C₁₈ Phenomenex Gemini (250 mm x 4,6 mm – 5 µm). A fase móvel foi constituída por água deionizada e acetonitrila (ACN) 99,9% (B); acidificada com uma solução 0,1% de ácido fórmico. O gradiente para o extrato de acetato de etila fo: 0 min, 5% de B; 65-80 min, 100% de B; 81-86 min, 5% de B. Para os extratos metanólico e aquoso, gradientes de: 0 min, 2% de B; 60-70 min, 100% de B; 71-76 min, 2% de B. (1,0 mL. min⁻¹).

Para análise dos extratos por CLAE/EM, o cromatógrafo é acoplado a um espectrômetro de massa (Amazon X, Bruker, Massachusetts, EUA) equipado com ionização eletrospray (ESI) alternado, sob as seguintes condições: tensão capilar de 5 kV, temperatura capilar de 300 °C, gás de entrada (N₂) fluxo de 12 L/min, pressão de nebulizador de nitrogênio a 30 Psi. A faixa de aquisição foi *m/z* 100-1000. A anotação estrutural foi realizada a partir das fragmentações dos picos dos íons moleculares MSⁿ e comparação com dados da literatura.

2.3. Bioensaio larvicida de extratos brutos de *Tetrapterys anisoptera*

Os ovos de populações de campo do mosquito *Aedes aegypti* foram coletados na área urbana da cidade de São Luís - MA (2° 32' 56" S e 44° 16' 46" O). As armadilhas de oviposição, denominadas ovitrampas, foram confeccionadas a partir de pequenos vasos pretos de polietileno com capacidade de 500 mL, com dois furos laterais e palhetas de MDF (comercialmente conhecidos como Eucatex®) limpas e secas, fixadas verticalmente da parte interna do recipiente.¹² Os bioensaios foram realizados, conforme metodologia preconizada pela Organização Mundial de Saúde, com adaptações.¹⁷

Em cada vaso foi adicionada água limpa a um terço da sua capacidade, para garantir que as fêmeas do mosquito *Aedes* sp. realizassem a oviposição na superfície áspera e úmida da palheta. As ovitrampas foram instaladas à sombra e as armadilhas foram recolhidas no período de cinco a sete dias, quando se realizou a inspeção das palhetas quanto à presença ou ausência de ovos.¹⁸

As palhetas positivas foram colocadas para eclodir à temperatura ambiente (28 °C) em recipiente de polipropileno (34,50 cm x 21,50 cm x 15,60 cm) contendo 1 L de

água mineral. O crescimento das larvas foi monitorado diariamente até atingirem o terceiro estágio larval. Os testes com os extratos brutos foram realizados adicionando 10 larvas em um recipiente de poliestireno de 50 mL contendo alíquotas de 20 mL de solução em diferentes concentrações dos extratos brutos: C1 = 100; C2 = 300; C3 = 500, C4 = 700; C5 = 900 (mg. L⁻¹) e o branco.

Os ensaios foram realizados em quintuplicata, monitorados por 24 horas, contabilizando-se o número de larvas mortas e vivas. Em seguida, a identificação das larvas foi feita em microscópio óptico, (marca Alltion, modelo AO2 900461) baseada na visualização de escamas do 8º segmento larval. Foram usadas chaves de identificação larval das espécies de *Aedes* que ocorrem no Brasil, disponíveis em literatura especializada.¹⁹ Dessa forma, a partir da visualização das escamas presentes no pente do 8º segmento larval, foram identificadas como *Aedes aegypti* as larvas que apresentaram escamas compostas por um espinho longo, mediano e com dentes bilaterais.

A concentração letal cinquenta (CL₅₀) foi encontrada pela interpolação das duas curvas: curva do percentual de mortalidade, sendo estabelecida a CL₅₀ no ponto de intersecção entre as curvas *versus* as concentrações estudadas.²⁰

2.4. Avaliação do potencial alelopático

O efeito fitotóxico frente às sementes de *Senna obtusifolia* foi avaliado para os extratos brutos de acetato de etila, metanólico e aquoso de *T. anisoptera* na concentração de 1%, utilizando como veículo de dispersão álcool etílico 99,5%. Para o bioensaio foi realizado teste em branco (testemunha).

As sementes de *Senna obtusifolia* foram coletadas na vegetação próxima à entrada do Laboratório de Solos, no campus da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), na cidade de São Luís. Posteriormente passaram por processo de limpeza e foram tratadas com 500 mL de ácido sulfúrico (98%), para a quebra da dormência, conforme estabelecido por Souza.²¹ Utilizou-se caixa de germinação (Gerbox) contendo uma folha de papel de filtro autoclavada a 120 °C e 50 sementes para cada tratamento. Cada gerbox recebeu 3 mL da solução do extrato bruto, que foi adicionado apenas uma vez, no início dos bioensaios, e, quando necessário, adicionou-se água.

O delineamento experimental dos bioensaios das etapas descritas foi realizado em triplicata, segundo a RAS (Regra de Análise de Sementes).²²

Os efeitos fitotóxicos das substâncias no alongamento da radícula e do hipocótilo foram feitos em câmaras de germinação a 25 °C, com fotoperíodo de 24 h de luz. Os cálculos de percentual de germinação de sementes (% G), percentual de inibição da germinação (% I), percentual de inibição de crescimento (% IC) para radícula e hipocótilo, foram feitos de acordo com as fórmulas propostas por Cantanhede Filho *et al.*²³

2.5. Análise estatística para o teste alelopático

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições. Os dados de inibição de germinação, alongamento de radícula e hipocótilo da espécie receptora foram analisados por meio do software AgroEstatic, constatando o efeito dos extratos brutos. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, e as medidas comparadas pelo teste de Tukey (5%).²⁴

3. Resultados e Discussão

Neste estudo, pela primeira vez, a análise do perfil químico e a anotação dos metabólitos presentes nas folhas de *Tetrapterys anisoptera* foram realizadas por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Espectômetro de Massas. Foi possível, a partir dos íons moleculares, observar oito compostos: (S1) catequina, (S2) mucronatina B, (S3) gambiriina C, (S4) apigenina glicosilada, (S5) luteolina glicosilada, (S6) vicenina II, (S7) lucenina II, (S8) quercetina-3-O-neohesperidosídeo (Figura 1). Os compostos anotados a partir dos extratos brutos de *T. anisoptera* encontram-se na Tabela 1.

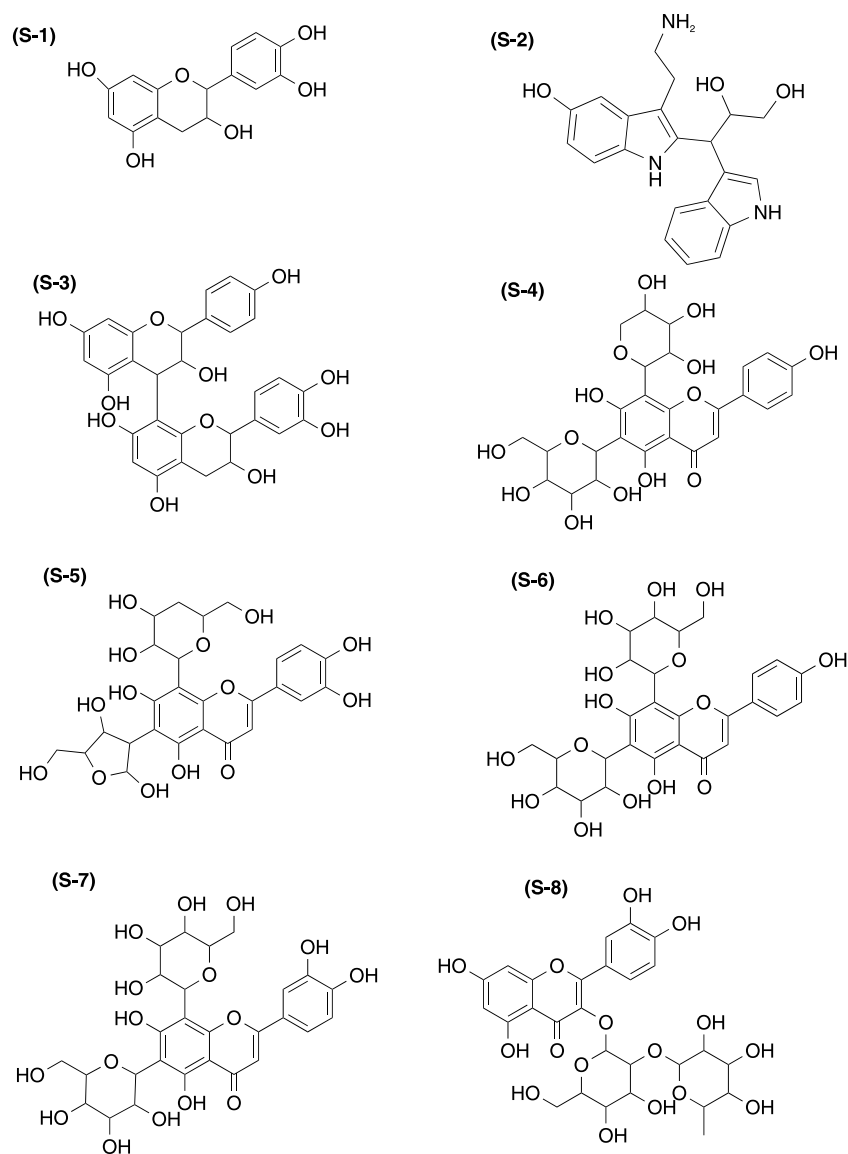
Para **S-1**, o espectro apresentou íon molecular [M – H]⁻ em *m/z* 288 que gerou um fragmento (íon filho) de *m/z* 244 [M–44–H]. De acordo com Mutungi²⁵ o composto proposto é a catequina. Esse composto foi anotado em espécies do gênero *Tetrapterys*; na Família Malpighiaceae, esse metabólito é descrito como um quimiomarcador.²⁶⁻²⁸

O espectro MS do composto **S-2** apresentou [M–H]⁻ em *m/z* 364 que gerou em MS² o íon filho *m/z* 326. Queiroz²⁵ anotou e isolou pela primeira vez no gênero *Tetrapterys* esse composto ao realizar estudo do extrato etanólico da casca de *Tetrapterys mucronata*. Utilizando HPLC-PDA-Uv 254 nm, observou a presença do íon molecular [M–H]⁻ *m/z* 364, representado pela fórmula C₂₁H₂₃N₃O₃, sendo anotado como um novo alcaloide, indólico dimérico, chamado mucronatina B. Esse alcaloide teve sua atividade avaliada como potente inibidora *in vitro* da enzima acetilcolinesterase (AChE) com valor de IC₅₀ de 12.7 ± 0.3 µM⁵, o que credencia a espécie do presente estudo como alvo de interesse farmacológico, uma vez que o presente estudo se configura como o segundo registro desse composto no gênero *Tetrapterys* e primeiro registro para a espécie.

O íon precursor [M–H]⁻ em *m/z* 561 do composto **S-3**, de acordo com Oliveira²⁹, corresponde à forma desprotonada do tanino condensado Epiafzelequina-(4β->8)-catequina (Gambiriina C).^{30,31} Em *Tetrapterys anisoptera* a fragmentação do íon precursor *m/z* 561 levou, em MS², ao íon fragmento *m/z* 288 e em MS³ originou um íon fragmento *m/z* 244, resultados das perdas de um monômero de epiafzelequina e da molécula [M–C₂H₄O–H], respectivamente. Gambiriina C, segundo o banco de dados LOTUS³², não foi encontrada no gênero *Tetrapterys*, sendo anotada pela primeira vez neste estudo.

Tabela 1. Compostos identificados por CL-EM nos extratos brutos foliares de *Tetrapteryx anisoptera*

Nº	[M – H] ⁻	Tempo de Retenção/ min	MS ^a	Substância Proposta	Extrato Aquoso	Extrato AcOEt	Extrato MeOH
S-1	288	22.1	288-244	Catequina	-	✓	-
S-2	364	4.0	326	Mucronatina B	-	✓	-
S-3	561	24.2	288-244	Gambirina C	-	✓	-
S-4	563	27.8	473-352-324-296	Apigenina glicosilada	-	-	✓
-	563	24.4	443-352-324-296	-	✓	-	-
S-5	579	23.2	459-368-340-313	Luteolina glicosilada	✓	-	-
S-6	593	23.2	473-352-324-296	Vicenina II	✓	-	-
S-7	609	22.2	489-369	Lucenina II	✓	-	-
S-7	609	25.6	489-369	Lucenina II	-	-	✓
S-8	609	31.0	300-178	Quercetina-3- <i>O</i> -neohesperidósídeo	-	-	✓

**Figura 1.** Estruturas químicas dos compostos anotados por CLAE-IES-AI-EM/EM nos extratos de *T. anisoptera*

Para o composto **S-4**, o íon pseudomolecular em $[M-H]^-$ 563 produziu principalmente os fragmentos em MS^2 e m/z 473 $[M-90-H]$ e m/z 443 $[M-120-H]$, respectivamente. Do íon em m/z 473, em MS^3 gerou o íon m/z 353 $[M-120-H]$. Do íon em m/z 443 produziu o par de íons diagnósticos de $[M-90-H]$ em MS^3 m/z 353 $[M-60-H]$.

Tanto para o íon em m/z 443, quanto para o íon em m/z 473, os espectros MS^4 foram denominados por perda neutra de 28 Da (CO) e apresentaram pico base em m/z 324. Da mesma forma, o MS^5 produziu um íon fragmento em m/z 296 com uma perda de 28 Da de uma molécula de monóxido de carbono. O composto proposto por Cao³³ é a apigenina 6-C- β -D-glucosil-8-C- β -L-arabinosídeo, sendo registrado neste estudo, pela primeira vez no gênero. Em MS^4 e em MS^5 o mesmo ocorre em $[M-H]^-$ 593 do composto **S-6**.

O espectro MS do composto **S-5** mostrou principalmente fragmentos em m/z : 459, 368 e 340. Segundo Simirgiotis *et al.*,³⁴ o íon $[M-H]^-$ em m/z 579 no espectro MS completo indica a presença de uma pentose em vez de uma hexose, o que a difere da leucenina-II em um dos açúcares ligados a C. Assim, o composto **S-5** foi atribuído como um derivado de orientina 6-C-pentose. De acordo com literatura, esse composto foi anotado como luteolina-C-hexosídeo-C-pentosídeo.^{35,36}

Em m/z 593 $[M-H]^-$ o composto **S-6** produziu dois íons proeminentes em MS^2 m/z 473 $[M-120-H]$, íons fragmentos característicos de flavonas de C-glicosil e em MS^3 m/z 353 $[M-120-H]$. Duas perdas consecutivas de 120 unidades de massa como os picos de base em m/z 473 em MS^2 e m/z 353 em MS^3 , respectivamente, correspondendo às clivagens das glicoses C-6 e C-8.^{37,38} O composto anotado é a 6,8-Di-C-glucosil apigenina (vicenina-II).

Na busca por informações que elucidem o mecanismo de ação de metabólitos secundários, vicenina-2 tem se revelado como um composto bioativo significativo, uma vez que apresenta atividades hepatoprotetoras, anticancerígenas, anti-inflamatórias, e é capaz de prevenir o aumento da depleção de antioxidantes, entreposto pela geração de espécies reativas de oxigênio. Também possui potencial inibição de infecção por *Helicobacter pylori*, conhecida como *H. pylori* em evento carcinogênico gástrico. Estudos de toxicidade *in vitro* mostraram que 40 μ M desta substância protege significativamente as células gástricas, sendo que

essa concentração revela 85% de viabilidade celular e não produz toxicidade.^{39,40}

Para o composto **S-7**, o espectro MS apresenta um íon $[M-H]^-$ em m/z 609 que produziu íons filhos em MS^2 489 $[M-H-120]$, em MS^3 m/z 369 $[M-H-120]$. A identidade foi confirmada com dados da literatura, que realizaram experimentos com composto padrão. Bouillant *et al.*,⁴¹ e Brito⁴² sugeriram sua identidade como 6,8-di-C-glucosil luteolina (lucenina-II). O composto **S-7** é relatado como notável anti-hepatotóxico além de possuir atividade antibacteriana.^{43,44}

O composto **S-8** apresentou MS completo em m/z 609. Na análise, o fragmento MS^2 gerou um íon em m/z 300 e em MS^3 um íon filho m/z 178. Segundo Li⁴⁵ o MS^2 do fragmento m/z 300 (clivagem homolítica) é diferente do m/z 301 de clivagem heterolítica $[M-H-308]$, visto que o sítio de entrada do açúcar da 3-OH é determinado pela intensidade m/z 300 maior que quando ocorre em m/z 301. Ao comparar sítios de onde estão presentes os glicosídeos em seu estudo, Ek⁴⁶ relata que esses são muito semelhantes aos obtidos para outras quercetinas-3-O-glicosídeos, e as razões foram relatadas como dependentes do local de onde foi glicosilado, o tipo de instrumento e se os parâmetros foram cuidadosamente ajustados. O composto **S-8** foi proposto por Al-Madhagy⁴⁷ como sendo a quercetin-3-O-neohesperidósídeo, que é um composto, com base na literatura, dotado de atividades de efeitos antiestrogênicos, antiplaquetários e antitrombínico, podendo restaurar a viabilidade celular, suprimir o dano oxidativo, proteger a integridade vascular e fortalecer o efeito anti-inflamatório da disfunção endotelial aterosclerótica.⁴⁸⁻⁵⁰

3.1. Bioensaio larvívica dos extratos brutos das folhas de *Tetrapteryx anisoptera*

A atividade larvívica do extrato foliar de *Tetrapteryx anisoptera* foi avaliada contra *Aedes aegypti*. A Tabela 2 apresenta os valores médios da quintuplicata, para cada concentração de trabalho, após 24 horas de exposição, variando de 100,0 a 900,0 $mg L^{-1}$ dos extratos de acetato de etila, metanólico e aquoso, respectivamente.

O extrato bruto de acetato de etila apresentou, nas concentrações de 100,0 a 500,0 $mg L^{-1}$, os menores percentuais de atividade larvívica com variações de 0 a 4%.

Tabela 2. Percentual de mortalidade das larvas do *Aedes aegypti* a partir da ação dos extratos brutos de *Tetrapteryx anisoptera*

Concentração dos extratos ($mg L^{-1}$)	Mortalidade % 24 h			
	Controle	Acetato de Etila	Metanólico	Aquoso
900	0	46	6	0
700	0	22	10	0
500	0	4	6	4
300	0	2	2	0
100	0	0	2	2

Nas concentrações 700,0 mg L⁻¹ e 900,0 mg L⁻¹ a atividade larvicida apresentou crescimento exponencial sendo, respectivamente, 22% e 46% de mortes entre os indivíduos testados. A taxa de mortalidade do extrato foliar de *Tetrapteryx anisoptera* (Figura 2) evidencia que o efeito larvicida se intensifica à medida que a concentração aumenta, apresentando boa correlação com R² = 0,9806. O percentual máximo de mortalidade é verificado na concentração de 900,0 mg L⁻¹. Porém, a concentração letal CL₅₀ = 1039,5 mg L⁻¹ está acima de 1000,0 mg L⁻¹, indicando que o extrato bruto não possui efeito tóxico contra esta espécie.

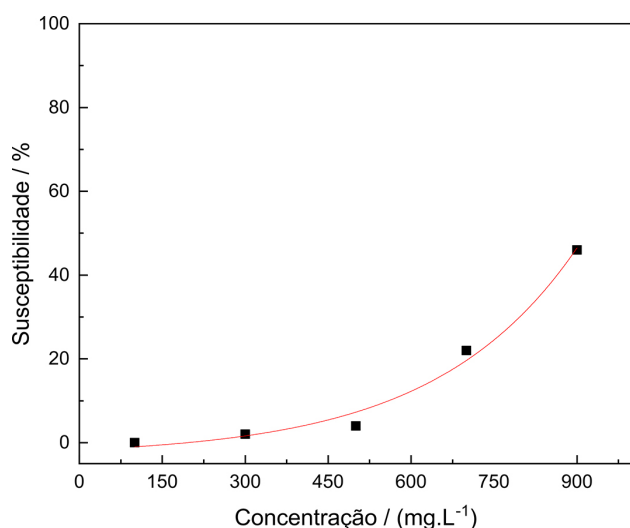


Figura 2. Taxa de mortalidade larval do *Aedes aegypti*

A OMS¹⁷ não estabelece uma faixa de concentração padrão para determinar a eficácia da atividade larvicida de produtos naturais. De acordo com Garcia⁵¹, quando um produto alcança uma redução $\geq 80\%$, pode ser considerado eficiente para o controle populacional de uma espécie.

Para os extratos metanólico e aquoso observou-se que o percentual de mortalidade foi correspondente a 2% na menor concentração: 100,0 mg. L⁻¹. O maior percentual de atividade larvicida no extrato metanólico foi de 10% na concentração de 700,0 mg. L⁻¹.

Nas maiores concentrações 900,0 mg L⁻¹ e 700,0 mg L⁻¹ o extrato aquoso não apresentou mortalidade para larvas do *Aedes aegypti*. O maior percentual de mortalidade foi igual a 4%, na concentração de 500,0 mg L⁻¹. Assim, não houve diferença significativa da mortalidade entre as concentrações, e os extratos aquoso e metanólico não apresentaram perfil linear quanto à atividade larvicida.

Nos extratos brutos de *Tetrapteryx anisoptera* observou-se, principalmente nos extratos metanólicos e aquosos, a presença de flavonoides, importante classe de polifenóis encontrados nas plantas, os quais são responsáveis por diversas funções como repelentes, inseticidas e antimicrobianos. Simões *et al.*,⁵² supõe que a menor eficiência em maiores concentrações pode ocorrer devido à redução na dissolução de compostos que

possuem menor solubilidade em água, influenciando no resultado. Isso evidencia que a avaliação larvicida, na concentração mínima, deve ser uma constante necessária na busca por produtos alternativos no controle frente ao *Aedes aegypti*.

As probabilidades de diminuição das concentrações letais se ampliam quando substâncias ativas são isoladas e purificadas. Sendo assim, por se tratar de um estudo realizado com o extrato bruto, não significa que não há possibilidade de *Tetrapteryx anisoptera* não possuir atividade larvicida contra o *Aedes aegypti*.⁵³

3.2. Teste de germinação

No bioensaio de germinação não foi observada uma tendência de aumento na inibição de germinação entre os extratos acetato de etila, metanólico e aquoso, sendo a inibição mais intensa 11% e 11,4%, para os extratos acetato de etila e metanólico, respectivamente. O extrato aquoso, por sua vez, estimulou a germinação da espécie receptora.

O extrato aquoso foi o único que manteve uma diferença evidente quando comparado aos índices dos extratos de acetato de etila e metanólico. A ação dos aleloquímicos na germinação leva em conta seus aspectos qualitativos e quantitativos. Assim, sugere-se que a influência negativa no percentual de sementes germinadas no extrato aquoso possa estar relacionada com a concentração de metabólitos de natureza polar presentes no extrato (Figura 3a). Embora para algumas espécies, as principais fontes de substâncias químicas com atividades alelopáticas sejam as de maior polaridade.⁵⁴⁻⁵⁶

O efeito sobre o alongamento da radícula apresentou a mesma tendência de distribuição entre os extratos metanólicos e aquosos, o que pode inferir que estes não revelaram nenhuma atividade de inibição de crescimento radicular. Nos testes de alongamento da radícula, a espécie receptora foi mais sensível para o extrato acetato de etila, cujo resultado percentual de inibição foi de 40%. Destaca-se o extrato de acetato de etila (Figura 3b), que demonstrou inibição no alongamento da radícula, apesar de não ter considerável percentual de inibição na germinação das sementes de *Senna obtusifolia*.

Para o alongamento do hipocótilo pôde-se observar baixa efetividade para os extratos de acetato de etila, extrato metanólico e extrato aquoso, cujos percentuais foram 11,5%, 11,5% e 7,6% respectivamente (Figura 3c).

Comparando-se os efeitos sob o crescimento do hipocótilo e da radícula, observa-se que os efeitos fitotóxicos foram mais evidentes no crescimento da radícula do que no crescimento do hipocótilo. Esses efeitos podem ter se concentrado nas radículas visto que a concentração de fitotoxinas nos tecidos radiculares é favorecida pelo contato físico da raiz com o substrato.⁵⁷

As diferenças observadas são condicionadas pela diversidade da composição dos extratos brutos em relação à atividade alelopática. Em *Tetrapteryx anisoptera*, no extrato

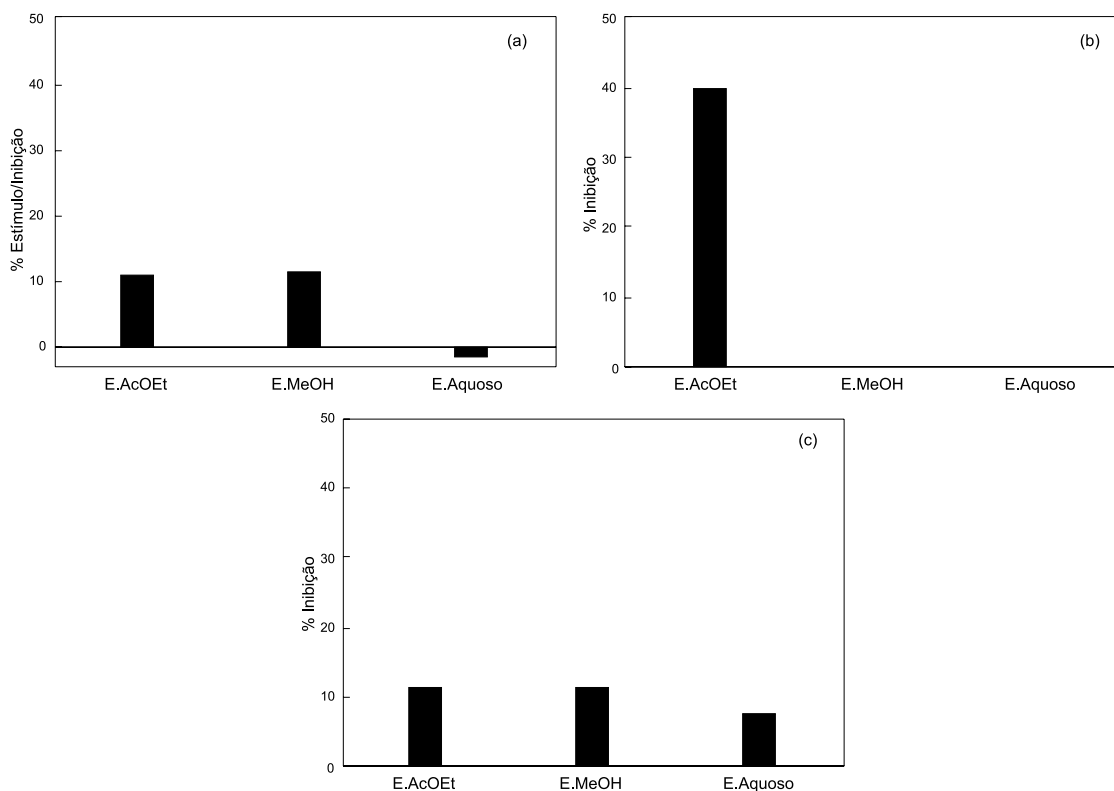


Figura 3. (a) Gráfico do percentual de inibição das sementes de *Senna obtusifolia* (b) Gráfico do percentual de inibição do crescimento da radícula das sementes de *Senna obtusifolia* (c) Gráfico do percentual de inibição do crescimento da radícula das sementes de *Senna obtusifolia*

acetato de etila, foi anotada a presença da catequina L^{-1} . A sensibilidade da espécie receptora sob a ação da catequina foi de 81% na concentração de $20,0 \text{ mg L}^{-1}$, também foi mais perceptível para o alongamento da radícula, assim como observado no extrato acetato de etila de *Tetrapteryx anisoptera*. Esses resultados indicam a radícula mais sensível aos efeitos alelopáticos do extrato de acetato de etila do que para a germinação.

Rice⁵⁹relata que as substâncias alelopáticas podem não ser inibitórias em baixas concentrações para determinadas espécies, ou até mesmo apresentar efeito estimulatório.

A espécie receptora utilizada neste bioensaio tem se revelado resistente à ação dos extratos brutos. Souza²¹ avaliou a ação inibitória de germinação e de desenvolvimento de radícula, variando a concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ a $8,0 \text{ mg L}^{-1}$ do ácido *p*-cumárico, reportado na literatura como um aleloquímico de grande potencial. A espécie de *Senna obtusifolia* não teve a germinação inibida e não apresentou desenvolvimento radicular afetado em nenhuma das concentrações testadas.

Considerando o percentual mínimo de 50% de inibição da germinação⁶⁰ como um padrão satisfatório para avaliar as potencialidades alelopáticas de um extrato, o resultado deste trabalho revela que nenhum dos três extratos proporcionou inibição satisfatória. O tratamento estatístico confirma que os tratamentos não mostraram diferença significativa de resposta conforme Teste de Tukey a 5%.

4. Conclusões

A investigação fitoquímica por CL-EM dos extratos brutos de *Tetrapteryx anisoptera*, anotou 8 compostos: a catequina e mucronatina B (pela primeira vez nesta espécie); gambiriina C, apigenina 6-C- β -D-glucosil-8-C- β -L-arabinosídeo, luteolina-C-hexosídeo-C-pentosídeo, vicenina II, lucenina II e quercetina-3-O-neohesperidósídeo (pela primeira vez no gênero).

O extrato acetato apresentou baixa atividade alelopática inibitória da germinação, no entanto obteve considerável expressão dos seus efeitos sobre o desenvolvimento da radícula.

As larvas do *Aedes aegypti* mostraram-se resistentes ao extrato bruto das folhas de *Tetrapteryx anisoptera*. Observando os resultados apresentados e comparando com as classificações da literatura, os extratos brutos foliares da espécie de *Tetrapteryx anisoptera* não são considerados biologicamente ativos frente às larvas de *Aedes aegypti*.

Embora a *Tetrapteryx anisoptera* não seja ainda uma planta extensivamente explorada, evidencia-se neste estudo, que seus extratos brutos apresentam compostos com grandes potenciais biofarmacológicos, conforme reporta a literatura, caracterizando esta espécie como promissora para estudos futuros de importância medicinal.

Vale ressaltar que a espécie estudada neste trabalho foi investigada pela primeira vez quanto à atividade larvicida

contra o *Aedes aegypti* e quanto à atividade alelopática frente à *Senna obtusifolia*, o que sugere um fator importante para essa pesquisa.

Informações Suplementares

Os dados cromatográficos e os espectros de massas usados na anotação das substâncias, bem como os valores analíticos usados para o tratamento estatístico, encontram-se disponíveis como informação suplementar.

Agradecimentos

Agradecemos à Universidade Estadual do Maranhão pelo apoio na realização dos ensaios alelopáticos; à Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA), pela concessão da Bolsa de Mestrado de G.S.L. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências Bibliográficas

- Vizzotto, M.; Krolow, A. C. R.; Weber G. E. B.; Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. *Embrapa Clima Temperado* **2010**, 16. [Link]
- Niculau, E.S.; De Freitas, S. D. L.; De Sá, I. C.; Fernandes, J. B.; Da Silva, M. F. G.; Análise Quantitativa de Produtos Naturais em Plantas por CL-EM. *Revista Virtual de Química* **2016**, 8, 204. [Crossref]
- De Haro Moreno, A. H.; Possebon, L.; Sant'ana, M.; Souza, H. R., Pilon, M. M. I.; Girol, A. P.; *Resumo Expandido do XIV Congresso Anual de Iniciação Científica e XVI Encontro Científico da Famerp*, São João do Rio Preto, Brasil, 2018. [Link]
- Fernandes, R. D.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2016. [Link]
- Rodríguez, M.; Hasegawa, M.; González-Mújica, F.; Motta, N.; Castillo, A.; Castillo, J.; Camejo, D.; Atividades antidiabéticas e antirradicais de plantas da Amazônia venezuelana. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2008**, 18, 331. [Crossref]
- Queiroz, M. M. F.; Queiroz, E. F.; Zeraik, M. L.; Ebrahimi, S. N.; Marcourt, L.; Cuendet, M.; Wolfender, J. L.; Chemical composition of the bark of *Tetrapteryx mucronata* and identification of acetylcholinesterase inhibitory constituents. *Journal of Natural Products* **2014**, 77, 650. [Crossref] [PubMed]
- Facco, G. G.; Muller, J.; Matias, R.; Barbosa-Ferreira, M.; Correa, B. O.; Bono, J. A. M.; Fernandes, C. D. S.; Antifungal potential and phytochemistry of *Tetrapteryx multiglandulosa* CAV aerial parts. *Bioscience Journal* **2016**, 32, 1586. [Crossref]
- Matsuse, I. T.; Lim, Y. A.; Hattori, M.; Correa, M.; Gupta, M. P.; A search for anti-viral properties in Panamanian medicinal plants.: The effects on HIV and its essential enzymes. *Journal of Ethnopharmacology* **1998**, 64, 15. [Crossref] [PubMed]
- Riet-Correa, G.; Terra, F. F.; Schild, A. L.; Riet-Correa, F.; Barros, S. S. D.; Intoxicação experimental por *Tetrapteryx multiglandulosa* (Malpighiaceae) em ovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* **2005**, 25, 91. [Crossref] [PubMed]
- Carvalho, G. D.; De Carvalho, L. N.; Porfírio, L. C.; Bragança, H. B. N.; Intoxicação por *Tetrapteryx acutifolia* em bovinos na Região Sul do estado do Espírito Santo-Brasil. *PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia* **2019**, 2, 159-. [Link]
- Pinheiro, A. I.; Da Costa, R. S.; De Oliveira, L. K. B.; Amorim, A. V.; De Sousa, F. E. C.; Utilização de produtos naturais como alternativa no controle de pragas: revisão bibliográfica exploratória. *VWINOTEC: O Seminário Brasileiro: Realidades e perspectivas*, Sobral CE, Brasil, 2018. [Link]
- Brandão, C. M.; Cavalcante, K. S. B.; Teles, R. M.; Marques, G. E. C.; Monteiro, O. S.; Andrade, E. H. A.; & Maia, J. G. S.; Composição e atividade larvicida do óleo de *Dizygostemon riparius* (Plantaginaceae), uma nova espécie aromática ocorrente no Maranhão, Brasil. *Chemistry & Biodiversity* **2020**, 17, e2000462. [Crossref] [PubMed]
- Murhekar, M.; Joshua, V.; Kanagasabai, K.; Shete, V.; Ravi, M.; Ramachandran, R.; Mehendale, S.; Epidemiology of Dengue Fever in India, Based on Laboratory Surveillance Data, 2014–2017. *International Journal of Infectious Diseases* **2019**, 84, 10. [Crossref] [PubMed]
- Lima, C. P. D.; Cunico, M. M.; Trevisan, R. R.; Philippsen, A. F.; Miguel, O. G.; Miguel, M. D.; Efeito alelopático e toxicidade frente à *Artemia salina* Leach dos extratos do fruto de *Euterpe edulis* Martius. *Acta Botanica Brasílica* **2011**, 25, 331. [Crossref]
- Neto, J. R. C.; Mazutti, M. A.; Zabot, G. L.; Tres, M. V.; Bioherbicidal action of *Phoma dimorpha* fermented broth on seeds and plants of *Senna obtusifolia*. *Pesquisa Agropecuária Tropical* **2020**, 50, e56894. [Crossref]
- Santos, C. A. B.; Silva, A. P. M.; Viabilidade do uso de inseticidas botânicos extraídos de plantas exóticas. *Educação Ambiental em Ação* **2015**, 54, 22. [Link]
- World Health Organization, Genebra-Suíça. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/69101/1/WHO_CDS_WHOPEP_GCDPP_20_05.13.pdf>. Acesso em: 15 dezembro 2022.
- Reiter, P.; Amador, M. A.; Colon, N.; Enhancement of The Cdc Ovitrap with Hay Infusions for Daily Monitoring of *Aedes Aegypti* Populations. *Journal of the American Mosquito Control Association* **1991**, 7, 52. [PubMed]
- Consoli, R. A. G. B.; Oliveira, R. L.; Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. *Fiocruz* **1994**, 228. [Link]
- Nguta, J. M.; Mbaria, J. M.; Gakuya, D. W.; Gathumbi, P. K.; Kabasa, J. D.; Kiama, S. G.; Biological screening of Kenya medicinal plants using *Artemia salina* L. (Artemiidae). *Pharmacology online* **2011**, 2, 458. [Crossref]
- Souza Filho, A. P. S.; Pereira, A. A. G.; Bayma, J. C.; Aleloquímico produzido pela gramínea forrageira *Brachiaria humidicola*. *Planta daninha* **2005**, 23, 25. [Crossref]

22. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes /Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS, 2009, 399. [Link]
23. Cantanhede, A. J.; Santos, L. S.; Guilhon, G.; Zoghbi, M. D. G. B.; Ports, P. S.; Rodrigues, I. Triterpenoides, fenólicos e efeito fitotóxico das folhas de *Eugenia flavescens* DC (Myrtaceae). *Química Nova* **2017**, *40*, 252. [Crossref]
24. Barbosa, J. C.; Maldonado Júnior, W.; *AgroEstatv.1.0*; Sistema de análises estatísticas de ensaios agrônômicos. Universidade Estadual Paulista, São Paulo, Brasil, 2009.
25. Mutungi, M. M.; Muema, F. W.; Kimutai, F.; Xu, Y. B.; Zhang, H.; Chen, G. L.; Guo, M. Q.; Antioxidant and antiproliferative potentials of *Ficus glumosa* and Its Bioactive Polyphenol Metabolites. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 266. [Crossref] [PubMed]
26. Sannomiya, M.; Montoro, P.; Piacente, S.; Pizza, C.; Brito, A. R. M. S.; Vilegas, W.; Application of liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry to the analysis of polyphenolic compounds from an infusion of *Byrsonima crassa* Niedenzu. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2005**, *19*, 2244. [Crossref] [PubMed]
27. Rinaldo, D.; Batista Junior, J. M.; Rodrigues, J.; Benfatti, A. C.; Rodrigues, C. M.; Santos, L. C.; Furlan, M.; Vilegas, W.; Determination of catechin diastereomers from the leaves of *Byrsonima* species using chiral HPLC-PAD-CD. *Chirality* **2010**, *22*, 726. [Crossref] [PubMed]
28. Queiroz, M. M. F.; *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual Paulista, 2013. [Link]
29. Oliveira, D. S.; Lima, L. S.; Antonio, A. S.; Wiedemann, L. S.; Veiga-Junior, V. F.; Perfil metabólico dos extratos polares das folhas, galhos e cascas de *Copaifera multijuga* hayne (copaibamari-mari da Amazônia) por ESI-MS. *Química Nova* **2020**, *43*, 72. [Crossref]
30. Zhang, Y. F.; Zhu, Z. X.; Wang, W. X.; Zhang, H.; Liu, L.; Zhang, S. L.; Zhao, Y. F.; Song, Y. L.; Zheng, J.; Tu, P. F.; Huo, H. X.; Li, J.; (2021). Condensed tannins from roots of *Indigofera stachyodes*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, China Journal of Chinese Materia Medica* **2021**, *46*, 4131. [PubMed]
31. Nonaka, G. I.; Goto, Y. U. K. O.; KINJO, J. E.; NOHARA, T.; NISHIOKA, I. (1987). Tannins and related compounds. LII. Studies on the constituents of the leaves of *Thujopsis dolabrata* Sieb. et Zucc. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1987**, *35*, 1105. [Crossref]
32. Rutz, A.; Sorokina, M.; Galgonek, J.; Mietchen, D.; Willighagen, E.; Gaudry, A.; Graham, J. G.; Stephan, R.; Page, R.; Vondrášek, J.; Steinbeck, C.; Pauli, G. F.; Wolfender, J.; Bisson, J.; Allard, P.; The LOTUS initiative for open knowledge management in natural products research. *eLife* **2022**, e70780. [Crossref] [PubMed]
33. Cao, J.; Yin, C.; Qin, Y.; Cheng, Z.; Chen, D.; Approach to the study of flavone di-C-glycosides by high performance liquid chromatography-tandem ion trap mass spectrometry and its application to characterization of flavonoid composition in *Viola yedoensis*. *Journal of Mass Spectrometry* **2014**, *49*, 1010. [Crossref] [PubMed]
34. Simirgiotis, M. J.; Schmeda-Hirschmann, G.; Bórquez, J.; Kennelly, E. J.; The *Passiflora tripartite* (Banana Passion) Fruit: A Source of Bioactive Flavonoid C-Glycosides Isolated by HSCCC and Characterized by HPLC-DAD-ESI/MS/MS. *Molecules* **2013**, *18*, 1672. [Crossref]
35. Llorent-Martínez, E. J.; Gouveia, S.; Castilho, P. C.; Analysis of phenolic compounds in leaves from endemic trees from Madeira Island. A contribution to the chemotaxonomy of *Laurisilva forest* species. *Industrial Crops and Products* **2015**, *64*, 135. [Crossref]
36. Hauck, B.; Gallagher, J. A.; Morris, S. M.; Leemans, D.; Winters, A. L.; Soluble phenolic compounds in fresh and ensiled orchard grass (*Dactylis glomerata* L.), a common species in permanent pastures with potential as a biomass feedstock. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2014**, *62*, 468. [Crossref] [PubMed]
37. Ferreres, F.; Silva, B. M.; Andrade, P. B.; Seabra, R. M.; Ferreira, M. A.; Approach to the study of C-glycosyl flavones by ion trap HPLC-PAD-ESI/MS/MS: application to seeds of quince (*Cydonia oblonga*). *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques* **2003**, *14*, 352. [Crossref] [PubMed]
38. Zhang, M.; Duan, C.; Zang, Y.; Huang, Z.; Liu, G.; The flavonoid composition of flavedo and juice from the pummelo cultivar (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) and the grapefruit cultivar (*Citrus paradisi*) from China. *Food Chemistry* **2011**, *129*, 1530. [Crossref]
39. Li, Y.; Zheng, Y.; Wang, H. (2021). Anticancer activity of Vicenin-2 against 7, 12 dimethylbenz [a] anthracene-induced buccal pouch carcinoma in hamsters. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* **2021**, *35*, e22673. [Crossref] [PubMed]
40. Zhang, Y.; Sun, J.; Dong, Y.; Shen, X.; Zhang, Z.; (2021). Vicenin-2 inhibits the *Helicobacterium pylori* infection associated gastric carcinogenic events through modulation of PI3K/AKT and Nrf2 signaling in GES-1 cells. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* **2021**, *35*, e22680. [Crossref] [PubMed]
41. Bouillant, M. L.; Ferreres De Arce, F.; Favre-Bonvin, J.; Chopin, J.; Zoll, A.; Mathieu, G.; Nouvelles C-glycosylflavones extraites de *Spergularia rubra*. *Phytochemistry* **1979**, *18*, 1043. [Crossref]
42. Brito, A.; Ramirez, J. E.; Areche, C.; Sepúlveda, B.; Simirgiotis, M. J.; HPLC-UV-MS profiles of phenolic compounds and antioxidant activity of fruits from three citrus species consumed in Northern Chile. *Molecules* **2014**, *19*, 17400. [Crossref] [PubMed]
43. Basile, A.; Giordano, S.; López-Sáez, J. A.; Cobianchi, R. C.; Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. *Phytochemistry* **1999**, *52*, 1479. [Crossref] [PubMed]
44. Hoffmann-Bohm, K.; Lotter, H.; Seligmann, O.; Wagner, H.; Antihepatotoxic C-glycosylflavones from the leaves of *Allophylus edulis* var. *edulis* and *gracilis*. *Planta medica* **1992**, *58*, 544. [Crossref] [PubMed]
45. Li, Z. H.; Guo, H.; Xu, W. B.; Ge, J.; Li, X.; Alimu, M.; He, D. J.; Rapid identification of flavonoid constituents directly from PTP1B inhibitive extract of raspberry (*Rubus idaeus* L.) leaves by HPLC-ESI-QTOF-MS-MS. *Journal of Chromatographic Science* **2016**, *54*, 805. [Crossref] [PubMed]

46. Ek, S.; Kartimo, H.; Mattila, S.; Tolonen, A.; Characterization of phenolic compounds from lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54*, 9834. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
47. Al-Madhagy, S. A.; Mostafa, N. M.; Youssef, F. S.; Awad, G. E.; Eldahshan, O. A.; Singab, A. N. B.; Metabolic profiling of a polyphenolic-rich fraction of *Coccinia grandis* leaves using LC-ESI-MS/MS and in vivo validation of its antimicrobial and wound healing activities. *Food & Function* **2019**, *10*, 6267. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
48. Wang, X.; Zhang, R.; Gu, L.; Zhang, Y.; Zhao, X.; Bi, K.; Chen, X.; Cell-based screening identifies the active ingredients from Traditional Chinese Medicine formula Shixiao San as the inhibitors of atherosclerotic endothelial dysfunction. *PLoS One* **2015**, *10*, e0116601. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
49. Su, S. L.; Xue, P.; Ouyang, Z.; Zhou, W.; Duan, J. A.; Study on antiplatelet and antithrombin activities and effective components variation of Puhuang-Wulingzhi before and after compatibility. *Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo Zhongyao Zazhi= China Journal of Chinese Materia Medica* **2015**, *40*, 3187. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
50. Zhao, J.; Zhang, C. Y.; Xu, D. M.; Huang, G. Q.; Xu, Y. L.; Wang, Z. Y.; Fang, S. D.; Cheng, Y.; Gu, Y. L.; The antiatherogenic effects of components isolated from pollen typhae. *Thrombosis research* **1990**, *57*, 957. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
51. Garcia F. R. M.; *Zoologia Agrícola: Manejo Ecológico de Pragas*, 2a. ed., Rígel: Porto Alegre, 2002.
52. Simões, C. M. O.; *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, 3ª. ed., UFRGS: Florianópolis, 2001.
53. Carvalho, G. H. F. D.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Goiás, 2011. [[Link](#)]
54. Souza, V. D.; Cardoso, S. B.; Efeito alelopático do extrato de folhas de *Eucalyptus grandis* sobre a germinação de *Lactuca sativa* L.(alface) e *Phaseolus vulgaris* L.(feijão). *Revista Eletrônica de Educação e Ciência* **2013**, *3*, 1. [[Link](#)]
55. Shetta, N. D.; Alshahrani, T. S.; Aref, I. M.; Nasser, R. A.; Allelopathic potential of *Calotropis procera* and *Eucalyptus species* on germination and growth of some timber trees. *Allelopathy Journal* **2017**, *40*, 81. [[Crossref](#)]
56. Silva, C. B.; Cândido, A. C. S.; Simionatto, E.; Faccenda, O.; Scalon, S. D. P. Q.; Peres, M. T. L. P.; Atividade alelopática, antioxidante e teor de fenólistotais de *Hydrocotyle bonariensis* Lam. (Araliaceae). *Acta Scientiarum. Technology* **2010**, *32*, 413. [[Crossref](#)]
57. Alves, P. I.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Alfenas, 2019. [[Link](#)]
58. Lôbo, L. T.; Castro, K. C. F.; Arruda, M. S. P.; Silva, M. N. D.; Arruda, A. C.; Müller, A. H.; Arruda, G. M. S. P.; Santos A. S.; Souza Filho, A. P. D. S.; Potencial alelopático de catequinas de *Tachigali myrmecophyla* (Leguminosae). *Química Nova* **2008**, *31*, 493. [[Crossref](#)]
59. Rice, E. L.; *Allelopathy*, 2a. ed., Academic Pres: Orlando, 1984.
60. 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](#)]